

红花龙胆不同药用部位 UV-Vis 和 UPLC 指纹图谱研究及资源评价

沈涛¹, 张霖², 赵艳丽², 左智天², 王元忠^{2*}

1. 玉溪师范学院资源环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 云南 昆明 650200

摘要: 目的 建立红花龙胆 *Gentiana rhodantha* 不同药用部位 UV-Vis 和 UPLC 指纹图谱, 结合多变量分析研究红花龙胆根、茎、叶和花中化学成分的整体分布与质量分数变化。方法 Shim-pack XR-ODS III 液相色谱柱(150 mm×2.0 mm, 2.2 μm)。流动相为 0.1% 甲酸水溶液和乙腈, 梯度洗脱, 柱温 40 ℃; 检测波长 242 nm, 进样量 0.3 μL; 体积流量为 1.00 mL/min。电喷雾离子源 (ESI) 正/负离子模式, 多反应监测 (MRM) 模式, 喷雾电压 3.5 kV, 脱溶剂管温度 250 ℃, 鞘气和干燥气体积流量分别为 3.0 L/min 和 15.0 L/min, 碰撞气体积流量 0.15 mL/min; UV-Vis 指纹图谱测定, 检测波长 200~500 nm, 狭缝 1.0 nm, 采样间隔 0.5 nm; 采用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA), 变量投影重要性准则 (VIP) 和系统聚类 (CA) 对不同产地药材进行分类研究。结果 UPLC 和 UV-Vis 方法学考察显示, 精密度、稳定性、重复性试验 RSD 均小于 2.00%; 马钱苷酸、芒果苷和当药苷加样回收率在 97.89%~102.71%, RSD 在 1.09%~2.88%; 11 点平滑十一阶导数预处理为最佳光谱预处理方法, PLS-DA 模型 $R^2_{\text{cal}}=0.931$, $\text{RMSEE}=0.302$, $R^2_{\text{val}}=0.901$, $\text{RMSEP}=0.341$, 根、茎、叶和花 UV-Vis 光谱呈现指纹特性; UPLC 指纹图谱相似度分析显示植株化学成分分别在叶部和花部较接近, 根部和茎部较相似。不同产地红花龙胆根部 UPLC 指纹图相似性系数变化范围大, 药材质量不稳定。马钱苷酸、芒果苷在叶片和花中量较高[(1.46±0.42)、(51.59±15.45) mg/g]; 当药苷在根中量较高 [(4.41±3.24) mg/g]。叶片总体呈现较高的化学成分量, 马钱苷酸、芒果苷和当药苷量对不同药用部位的区分均有较大贡献。聚类分析显示, 不同产地红花龙胆植株化学成分呈现一定地理特征, 高海拔地区的药材和低海拔地区的药材成分整体差别较大, 聚为不同类群。结论 UPLC 和 UV-Vis 指纹图谱相结合可反映红花龙胆根、茎、叶和花中化学成分的整体分布与质量分数变化, 研究结果为野生红花龙胆资源的质量评价提供方法和理论依据。

关键词: 红花龙胆; UPLC 指纹图谱; UV-Vis 指纹图谱; 多变量分析; 资源评价

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)02-0309-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.021

UV-Vis and UPLC fingerprint analysis on various medicinal parts of *Gentiana rhodantha* and resource evaluation

SHEN Tao¹, ZHANG Ji², ZHAO Yan-li², ZUO Zhi-tian², WANG Yuan-zhong²

1. College of Resource and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

2. Institute of Medicinal Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

Abstract: Objective To develop a method for UV-Vis and UPLC fingerprint on various medicinal parts of *Gentiana rhodantha*. The chemical compounds variation in roots, stems, leaves, and flowers were studied by using fingerprint data combined with multivariate analysis. **Methods** Using Shim-pack XR-ODS III liquid chromatographic column (150 mm × 2.0 mm, 2.2 μm) for gradient elution, mobile phase was water with 0.1% formic acid and acetonitrile, temperature was 40 ℃, detection wavelength was 242 nm, injection value was 0.3 μL, and flow rate was 1.00 mL/min. Electrospray ionization (ESI) source and MRM model, the interface voltage was set to 3.5 kV. Desolvation line (DL) temperature was 250 ℃. Nebulizing gas and drying gas were nitrogen at a flow rate of 3.0 and 15.0 L/min, respectively. Collision gas was 0.15 mL/min. UV-Vis detection wavelength range at 200 – 500 nm, slit was 1.0 nm, step was 0.5 nm. Multivariate analysis methods including partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), variable importance (VIP), and hierarchical cluster were used for this projection. **Results** The investigation of UPLC and UV-Vis showed RSD was lower than 2.00% for precision, repeatability, and stability. The recoveries of loganin acid, mangiferin, and sweroside were 97.89% – 102.71%

收稿日期: 2015-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260608); 云南省自然科学基金资助项目 (2013FD050, 2013FZ150, 2013FD066, 2014FD068)

作者简介: 沈涛 (1984—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为药用植物资源评价研究。Tel: 13888780300 E-mail: st_yxnu@126.com

*通信作者 王元忠, 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事药用生物资源评价研究。Tel: (0871)65033575 E-mail: boletus@126.com

and RSD was 1.09% – 2.88%. Pretreatment by 11 smooth + first order was the best data processing method for PLS-DA model ($R^2_{\text{cal}} = 0.9315$, RMSEE = 0.302, $R^2_{\text{val}} = 0.901$, and RMSEP = 0.341). UV-Vis spectra of roots, stems, leaves, and flowers had the significant fingerprint characteristic. Similarity analysis showed the chemical compounds in the leaves and flowers were similar and those in the stems and roots were similar too. Similarity index of root medicinal material has a widely range. The quality of the roots was not stable. The contents of loganic acid and mangiferin were the highest in the leaves and flowers [(1.46 ± 0.42) and (51.59 ± 15.45) mg/g]. The content of sweroside was the highest in the roots [(4.41 ± 3.24) mg/g]. The total content of compounds of the leaves was higher than other medicinal part, the three compounds, loganic acid, mangiferin, and sweroside were very used for the discrimination of different parts of *G. rhodantha*. Cluster analysis showed there were geography characteristics of the constituents. Sample collected from high altitude was higher than samples collected from lower altitude. And they were classified in different groups. **Conclusion** UPLC and UV-Vis fingerprint could describe the variation of chemical compounds in the roots, stems, leaves, and flowers. All the results could provide the evaluation method and basic theory of *G. rhodantha* resource.

Key words: *Gentiana rhodantha* Franch. ex Hemsl.; UPLC fingerprint; UV-Vis fingerprint; multivariate analysis; resource evaluation

指纹图谱可对已知和未知成分进行分析,反映药材化学成分整体信息,被广泛应用于中药的质量评价研究^[1-3]。由于中药化学成分复杂多样^[4],单一指纹图谱难以全面反映药材的化学组成和量特征,近年已有学者将多种指纹图谱数据进行整合,借助多变量分析解读图谱信息,对食品和药品进行更全面的评价^[5-7]。Sârbu 等^[8]同时建立猕猴桃和柚子多个亚种的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)指纹图谱与紫外-可见(UV-Vis)光谱指纹图谱,借助主成分分析(PCA)、线性判别(LDA)等多变量分析方法对猕猴桃和柚子进行种类鉴别。Medvedovici 等^[9]采用模糊聚类(FHC)评价 UV-Vis、电喷雾电离质谱(ESI-MS)、反相液相色谱(RPLC)及其联用数据对银杏叶片不同提取物的区分能力,并确定最佳数据联用模式。Lu 等^[10]将偏最小二乘判别分析(PLS-DA)与超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)指纹图谱和流动注射质谱(FIMS)指纹图谱相结合,对中国传统中药枸杞的产地进行区分。以上报道表明,传统中药评价模式正从单一指纹图谱向多种指纹图谱技术联用评价的方式转变^[11]。

红花龙胆 *Gentiana rhodantha* Franch. ex Hemsl. 别名小龙胆草、星秀草,为龙胆科(Gentianaceae)龙胆属 *Gentiana* L. 多年生草本植物,主要分布于云南、四川、贵州等地^[12-13],以根及全草入药,味苦,性寒,具清热利湿、解毒等功效,常被用于治疗急性黄疸型肝炎、痢疾、风热感冒、胃痛等疾病^[13]。其质量评价多以芒果苷量为评价指标^[14]。植物化学研究显示,除芒果苷外,龙胆类药材富含环烯醚萜、多酚等化合物,如马钱甘酸,当药苷为该类药物中重要保肝、护肝活性成分^[15-17],红花龙胆以上成分的测定与评

价研究鲜有报道^[18]。作为一个复杂化学成分混合体系,以单一成分评价药材质量仍显不足^[1],本研究采用 UPLC 和 UV-Vis 法建立红花龙胆不同药用部位 UPLC 和 UV-Vis 指纹图谱,结合多变量分析研究红花龙胆根、茎、叶和花中化学成分的整体分布与含量变化,研究结果以期对红花龙胆资源的质量评价提供方法和理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

11 批药材于 2013 年 10~11 月分别采集自昆明嵩明(YKM)、丽江永胜(YLJ)、大理剑川(YJC)、文山小街(YWS)、云南蒙自(YMZ)、贵州安顺(GAS)、贵州遵义(GZY)、贵州凯里(GKL)、贵州兴义(GXY)、广西上林(XGL)、贵州安龙(GAL)。所有样品均为野生并由云南省农业科学院药用植物研究所金航研究员鉴定为红花龙胆 *Gentiana rhodantha* Franch. ex Hemsl.; 每批药材由 20 株红花龙胆构成,并依照不同药用部位分为根(G)、茎(J)、叶(Y)和花(H)4 个混合样品。所有样品于 50 °C 条件下烘干至恒定质量,粉碎过 60 目筛,充分混匀放入自封袋避光保存,样品信息详见表 1。

1.2 仪器和试剂

TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); LCMS-8030 超高效液相色谱联用仪(日本岛津公司),包括: LC/MS/MS-8030 主机, LC-30AD 高精度溶液输送单元, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 色谱柱恒温箱, SPD-20A UFLC 紫外检测器, CBM-20A 网络化系统控制器; SY3200-T 型超声波清洗仪(上海声源超声波仪器设备有限公司); 万分之一电子分析天平(美国奥豪斯); FW-100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); 优普 UPT-I-10L 超纯水机(四川卓越水处理设备有限公司)。

表 1 红花龙胆样品来源信息

Table 1 Source information of *G. rhodantha* samples

样品	产地	部位	样品	产地	部位	样品	产地	部位	样品	产地	部位
J01	昆明嵩明	茎	Y03	大理剑川	叶	H06	贵州安顺	花	G09	贵州兴义	根
G01	昆明嵩明	根	J04	文山小街	茎	Y06	贵州安顺	叶	H09	贵州兴义	花
H01	昆明嵩明	花	G04	文山小街	根	J07	贵州遵义	茎	Y09	贵州兴义	叶
Y01	昆明嵩明	叶	H04	文山小街	花	G07	贵州遵义	根	J10	广西上林	茎
J02	丽江永胜	茎	Y04	文山小街	叶	H07	贵州遵义	花	G10	广西上林	根
G02	丽江永胜	根	J05	云南蒙自	茎	Y07	贵州遵义	叶	H10	广西上林	花
H02	丽江永胜	花	G05	云南蒙自	根	J08	贵州凯里	茎	Y10	广西上林	叶
Y02	丽江永胜	叶	H05	云南蒙自	花	G08	贵州凯里	根	J11	贵州安龙	茎
J03	大理剑川	茎	Y05	云南蒙自	叶	H08	贵州凯里	花	G11	贵州安龙	根
G03	大理剑川	根	J06	贵州安顺	茎	Y08	贵州凯里	叶	H11	贵州安龙	花
H03	大理剑川	花	G06	贵州安顺	根	J09	贵州兴义	茎	Y11	贵州安龙	叶

马钱苷酸购自中国食品药品检定研究院(批号 111865-201403), 芒果苷(批号 B10640)和当药苷(批号: B11118)购自上海士锋科技有限公司; 乙腈和甲酸均为色谱纯购自美国 Fisher, 水为自制超纯水; 甲醇和其余试剂均为分析纯, 购自四川西陇化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品测试条件

2.1.1 UPLC-UV 色谱条件 色谱柱为岛津 Shim-pack XR-ODS III 液相色谱柱(150 mm×2.0 mm, 2.2 μm)。流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)和

乙腈(B), 梯度洗脱, 0~2.50 min, 12%B; 2.51~7.30 min, 12%~15% B; 7.31~12.00 min, 15%~32% B; 12.01~16.00 min, 32%~78% B。体积流量 0.25 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 242 nm, 进样量 0.3 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)正/负离子模式; 多反应监测(MRM)模式, 喷雾电压 3.5 kV, 脱溶剂管温度 250 °C, 鞘气和干燥气体积流量分别为 3.0 L/min 和 15.0 L/min, 碰撞气体积流量 0.15 mL/min。马钱苷酸、芒果苷和当药苷的监测离子对及锥孔电压、碰撞能、离子源模式等参数^[18]见表 2。

表 2 待测化学成分质谱分析条件

Table 2 MS parameters for analysis of compounds to be measured

待测成分	时间/min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能/eV
马钱苷酸	2.541	421.15 [M+HCOO] ⁻	375.25, 213.20	10, 25
芒果苷	5.736	421.10 [M-H] ⁻	301.00, 331.05	20, 25
当药苷	6.632	359.15 [M+H] ⁺	197.20, 127.15	-10, -30

2.1.3 UV-Vis 光谱测定条件 将不同极性部位红花龙胆供试品溶液置于紫外-可见分光光度计中, 分别以 70%甲醇溶液作为参比液进行 UV-Vis 指纹图谱测定, 检测波长 200~500 nm, 狭缝 1.0 nm, 采样间隔 0.5 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 5.0 mg 马钱苷酸、30.0 mg 芒果苷、1.0 mg 当药苷对照品, 分别溶于 10 mL 容量瓶中并加入适量色谱纯甲醇定容, 摇匀, 得马钱苷酸、芒果苷和当药苷对照品储备溶液, 避光 4 °C 保存备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取样品粉末 0.250 0 g 放入具塞试管中, 倒入 10.00 mL 70%甲醇溶液超声提取 30 min, 待溶液冷却至室温, 称定质量, 用甲醇补足损失质量, 摇匀过 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液得 UPLC 供试品溶液。取 UPLC 供试品溶液 1 mL 稀释 14 倍即得 UV-Vis 紫外吸收光谱测定用供试品溶液。

2.4 线性关系、检出限及定量限

以峰面积为纵坐标(Y), 对照品溶液质量浓度为横坐标(X)绘制标准工作曲线, 得回归方程。结果见表 3。

表 3 回归方程与线性范围
Table 3 Regression equation and linear ranges

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
马钱苷酸	$Y=7\,159.00\,X-10\,444.31$	0.999 6	5~500	1.950	3.02
芒果苷	$Y=21\,938.20\,X-334\,055.00$	0.999 9	20~3\,000	0.470	1.57
当药苷	$Y=7\,317.47\,X-2\,830.44$	0.999 8	5~100	0.844	1.91

2.5 UPLC 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一份供试品(Y11)溶液,在“2.1.1”项色谱条件下连续进样 6 次,测得马钱苷酸、芒果苷和当药苷相对峰面积的 RSD 分别为 1.25%、1.07%、1.87%,结果表明方法精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取样品(Y11)6 份,依照“2.3”项方法制备 UPLC 供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定马钱苷酸、芒果苷和当药苷相对峰面积,计算 RSD 分别为 1.75%、1.23%、1.98%,表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取样品(Y11)6 份,依照“2.3”项方法制备 UPLC 样品溶液,在 0、2、4、6、8、12 h 内测定,计算马钱苷酸、芒果苷和当药苷相对峰面积 RSD 均小于 2.00%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.4 加样回收率试验 称取已测定的样品 0.250 0 g 共 6 份。分别添加一定浓度的马钱苷酸、芒果苷和当药苷对照品,依照“2.3”项方法制备样品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定各化学成分的量,马钱苷酸芒果苷和当药苷加样回收率在 97.89%~102.71%,RSD 在 1.09%~2.88%。

2.6 UV-Vis 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一份 UV-Vis 供试品(Y11)溶液,在“2.1.3”项 UV-Vis 光谱测定条件下连续进样 6 次,以吸收波长计算,供试品溶液吸光度值的 RSD 为 1.19%~1.37%。

2.6.2 稳定性试验 选取同一份样品(Y11),依照“2.3”方法制备 UV-Vis 供试品溶液,溶液分别放置 2、4、6、8、12 h 后,在“2.1.3”项条件下进行 UV-Vis 光谱测定,以吸收波长计算供试品溶液吸光度值的 RSD 为 1.15%~1.34%,供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 选取同一份样品(Y11),依照“2.3”方法制备 UV-Vis 供试品溶液,在“2.1.3”项条件下进行 UV-Vis 光谱测定,以吸收波长计算供试品溶液吸光度值的 RSD 为 0.77%~1.62%,结果表明该方法重复性良好。

2.7 数据分析

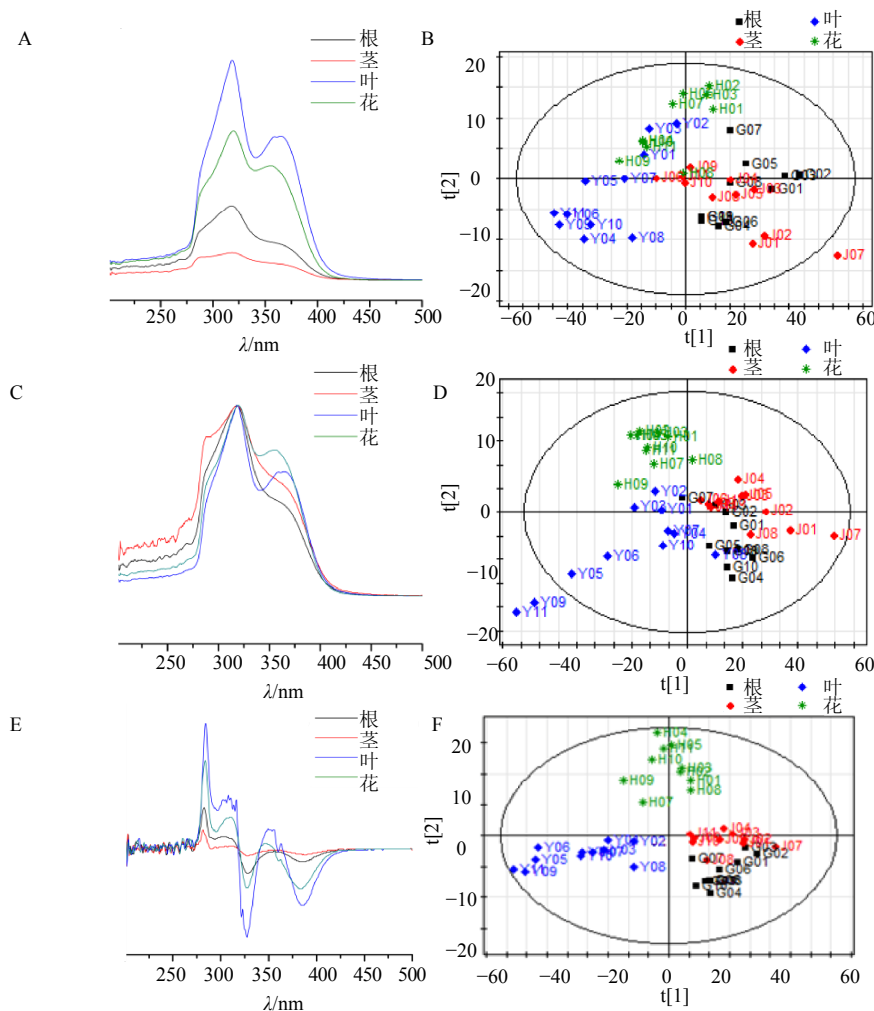
采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》分析红花龙胆不同药用部位 UPLC 指纹图谱数据,确定共有峰,生成对照指纹图谱并进行相似度(SA)计算。PLS-DA 和变量投影重要性准则(VIP)确定最佳光谱数据前处理方法及引起红花龙胆不同药用部位成分差异的重要光谱和色谱信息。以红花龙胆根、茎、叶和花 UV-Vis 光谱和 UPLC 色谱数据为变量,采用组间连接法和欧氏距离平方,对不同产地红花龙胆全株药材进行系统聚类(CA),研究药材间化学成分的整体差异。

2.8 结果与分析

2.8.1 红花龙胆根、茎、叶、花 UV-Vis 光谱指纹图谱的建立与分析 将 44 份供试品溶液分别进样分析,记录 200~500 nm 601 个检测波长对应的紫外-可见吸收光谱数据;对以上光谱数据进行 3 种预处理:(1)11 点平滑、(2)11 点平滑+标准化(3)11 点平滑+一阶导数,建立不同光谱预处理后的红花龙胆药材根、茎、叶和花 UV-Vis 光谱指纹图谱(图 1)。

对 3 种光谱数据预处理方法进行比较,结果显示所有样品 UV-Vis 光谱在 270~400 nm 出现多个强吸收峰,且各药用部位吸收光谱峰形、峰高具有差异,呈现一定指纹特性;同一植株叶片和花的供试品溶液在 270~400 nm 内各检测波长对应吸光度值高于根、茎样品溶液的吸光度值。光谱数据经 11 点平滑和 11 点平滑+标准化预处理后(图 1-A、C),在 318 nm 和 357 nm 处有 2 个特征吸收峰;经 11 点平滑+一阶导数预处理后(图 1-E),在 283、310、313、351、354、362 nm 处共有 6 个特征吸收峰,图谱光谱信息更丰富。

进一步筛选最佳光谱预处理方法,以预处理后的光谱数据为变量,进行 PLS-DA 分析,通过校正决定系数(R^2_{cal})、均方差(RMSEE)、外部验证系数(R^2_{val})和均方差(RMSEP)对模型分类与预测能力进行评价(图 1-B、D、F)。结果显示用 11 点平



A、B-11 点平滑预处理 C、D-11 点平滑+标准化预处理 E、F-11 点平滑+一阶导数预处理

A and B-11 point smooth pretreatment C and D-11 point smooth + normalised pretreatment E and F-11 point smooth + first order pretreatment

图 1 红花龙胆根、茎、叶和花紫外-可见光谱指纹图谱 (A、C、E) 与 PLS-DA 模型得分图 (B、D、F)

Fig. 1 UV-Vis spectra fingerprint (A, C, and E) and PLS-DA model score chart (B, D, and F) of roots, stems, leaves, and flowers of *G. rhodantha*

滑处理后的光谱数据所建立的模型不能有效区分供试样品根、茎、叶和花 ($R^2_{\text{cal}}=0.859$, $\text{RMSEE}=0.346$, $R^2_{\text{val}}=0.880$, $\text{RMSEP}=0.814$); 经过 11 点平滑+标准化处理后, 样品中花可被正确区分, 但根、茎、叶区分效果不佳 ($R^2_{\text{cal}}=0.8993$, $\text{RMSEE}=0.357$, $R^2_{\text{val}}=0.7862$, $\text{RMSEP}=1.127$); 经过 11 点平滑+一阶导数处理后, 红花龙胆不同部位 UV-Vis 光谱指纹特征加强, 所有药材花、叶部位可被完全区分, 茎与根光谱特征较接近, 有少量样品仍有混淆 ($R^2_{\text{cal}}=0.9315$, $\text{RMSEE}=0.302$, $R^2_{\text{val}}=0.901$, $\text{RMSEP}=0.341$)。经 11 点平滑+一阶导数预处理后的光谱数据所建 PLS-DA 模型 R^2_{cal} 、 R^2_{val} 数值最高, RMSEE 与 RMSEP 数值较低, 在 3 种光谱预处理中效果最佳。基于 PLS-DA 结果, 对 11 点平滑+一阶

导数处理后的根、茎、叶、花各波长对应吸光度的 VIP 值大小进行排序。结果显示共有 207 个波长其对应吸光度 VIP 值 >1 (最大值为 2.21, 最小值为 1.00), 以上光谱数据对红花龙胆不同部位的区分具有较大贡献。其中有 50.24% 的波长 (104 个) 集中分布于 300~400 nm 内; VIP 值排名前 20 的波长主要介于 337.5~340.5 nm (共 7 个) 和 362.0~368.5 nm (共 13 个)。

2.8.2 红花龙胆根、茎、叶、花 UPLC 指纹图谱的建立与分析 11 批药材不同部位的 UPLC 色谱数据以 AIA 格式分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》, 以 Y01 色谱图作为参照谱, 通过多点校正、自动匹配建立有 12 个共有峰的红花龙胆根、茎、叶、花 UPLC 指纹图谱 (图 2)。通过与混合对

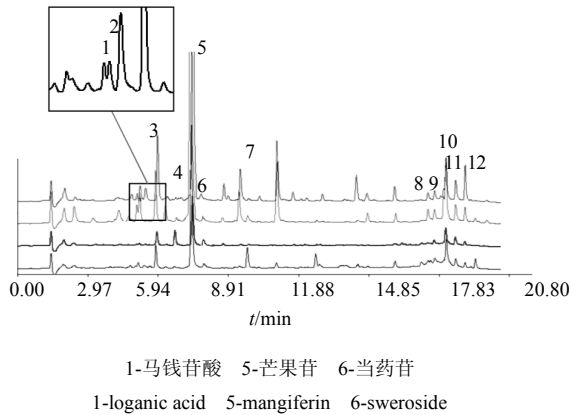


图 2 红花龙胆根、茎、叶和花 UPLC 色谱指纹图谱
Fig. 2 UPLC fingerprints of roots, stems, leaves, and flowers of *G. rhodantha*

表 4 11 批红花龙胆药材根、茎、叶和花 UPLC 指纹图谱相似度评价

Table 4 Similarity evaluation for UPLC fingerprint of roots, stems, leaves, and flowers of 11 batches of *G. rhodantha* medicinal materials

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
G01	0.911	J01	0.969	Y01	0.985	H01	0.982
G02	0.788	J02	0.950	Y02	0.985	H02	0.987
G03	0.946	J03	0.982	Y03	0.987	H03	0.986
G04	0.790	J04	0.964	Y04	0.994	H04	0.989
G05	0.892	J05	0.979	Y05	0.985	H05	0.989
G06	0.961	J06	0.993	Y06	0.989	H06	0.989
G07	0.962	J07	0.845	Y07	0.993	H07	0.985
G08	0.874	J08	0.991	Y08	0.989	H08	0.983
G09	0.952	J09	0.977	Y09	0.992	H09	0.987
G10	0.907	J10	0.989	Y10	0.994	H10	0.991
G11	0.953	J11	0.979	Y11	0.991	H11	0.978

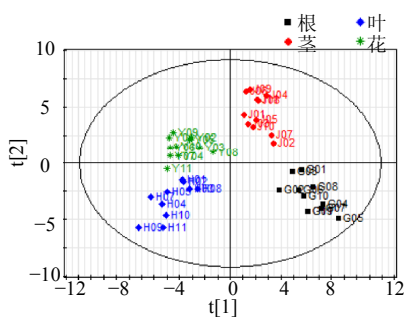


图 3 基于不同部位色谱指纹图谱数据的 PLS-DA 模型得分图
Fig. 3 PLS-DA model score chart based on fingerprint data of different medicinal parts

样品依照根、茎、叶、花被正确区分，叶部和花部化学成分构成较接近，根部和茎部化学成分构成与其他部位差别较大。依照 PLS-DA 结果，对各变量 VIP 值大小进行排序，结果显示包括 12 个共有峰在内的 70 个色谱峰峰面积 VIP 值 > 1，以上变量对药材根、茎、叶、花的区分具有重要

意义。其中保留时间在 3.00~5.00 min 的色谱峰共 7 个（占 10%），在 5.10~10.00 min 的色谱峰共 17 个（占 24.29%），在 10.01~15.00 min 内的色谱峰共 18 个（占 25.71%），在 15.01~20.44 min 内的色谱峰共 28 个（占 40%）。3 种已知化学成分 VIP 值由大到小为芒果苷（1.856）> 马钱苷酸（1.502）> 当药苷（1.341），芒果苷区分不同药用部位的贡献最大。

2.8.3 药材吡啶类与环烯醚萜类成分量比较 11 批药材 3 种化学成分测定结果显示（表 5），马钱苷酸量最大值为（2.27±0.09）mg/g（Y09），最小值为（0.25±0.01）mg/g（J07），叶部马钱苷酸平均量最高（1.46±0.42）mg/g，茎部马钱苷酸量最低（0.75±0.26）mg/g，花和根中马钱苷酸量较接近（0.87±0.48）mg/g 和（0.85±0.44）mg/g。芒果苷量最大值为（66.05±2.31）mg/g（Y11），最小值为

表 5 红花龙胆药材根、茎、叶和花中 3 种化学成分的定量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Determination of three constituents in roots, stems, leaves, and flowers of *G. rhodantha* medicinal materials ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

批次	马钱苷酸质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	根	茎	叶	花
1	0.69±0.03	0.85±0.03	0.87±0.03	0.84±0.03
2	0.51±0.02	1.19±0.04	1.29±0.05	0.65±0.02
3	0.77±0.03	0.71±0.02	1.79±0.07	0.83±0.03
4	1.72±0.06	0.63±0.02	1.61±0.06	0.47±0.02
5	0.60±0.02	0.61±0.02	1.75±0.06	2.14±0.08
6	0.80±0.03	0.67±0.02	1.72±0.06	2.13±0.05
7	0.73±0.03	0.25±0.01	1.25±0.05	0.57±0.02
8	0.57±0.02	1.12±0.04	1.36±0.05	1.02±0.04
9	1.72±0.06	0.65±0.02	2.27±0.09	0.58±0.02
10	0.71±0.03	0.86±0.03	0.86±0.03	0.73±0.03
11	0.52±0.02	0.66±0.02	1.27±0.05	0.88±0.03
平均值	0.85±0.44	0.75±0.26	1.46±0.42	0.87±0.48

批次	芒果苷质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	根	茎	叶	花
1	15.14±0.82	14.27±0.59	29.48±1.03	39.85±1.31
2	9.68±0.52	19.25±0.79	49.51±2.08	37.98±1.25
3	14.42±0.78	37.31±1.23	58.42±1.73	49.80±2.04
4	21.21±1.14	23.58±0.97	59.34±2.04	28.63±0.94
5	19.50±1.05	19.71±0.81	64.03±2.24	55.29±1.82
6	21.69±1.17	40.75±1.67	57.06±2.00	51.76±1.33
7	31.45±1.69	5.93±0.24	54.16±1.90	37.10±1.22
8	15.88±0.86	19.12±0.78	51.21±1.79	37.16±1.23
9	21.21±1.14	17.58±0.72	62.31±2.18	40.83±1.35
10	43.85±2.36	27.47±1.13	15.95±0.56	36.76±1.21
11	18.14±0.98	25.75±1.06	66.05±2.31	51.79±1.71
平均值	21.11±9.35	22.78±9.92	51.59±15.45	41.52±8.21

批次	当药苷质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	根	茎	叶	花
1	3.12±0.17	1.37±0.06	2.09±0.07	1.46±0.05
2	3.33±0.18	1.40±0.06	2.82±0.10	1.79±0.06
3	2.26±0.12	4.19±0.17	2.18±0.08	1.29±0.04
4	3.72±0.20	1.87±0.08	3.17±0.11	2.01±0.07
5	4.88±0.26	1.93±0.08	3.59±0.13	2.04±0.07
6	3.07±0.17	4.04±0.17	5.55±0.19	2.01±0.06
7	13.59±0.73	0.61±0.03	2.40±0.08	3.76±0.13
8	3.96±0.21	4.01±0.16	3.02±0.11	2.01±0.07
9	3.72±0.20	0.99±0.04	3.22±0.11	1.84±0.06
10	1.43±0.08	3.58±0.15	1.21±0.04	2.22±0.07
11	5.40±0.29	1.98±0.08	4.52±0.16	2.68±0.09
平均值	4.41±3.24	2.36±1.33	3.07±1.20	2.11±0.70

(5.93±0.24) mg/g (J07), 其平均量在叶片和花中量最高, 分别为 (51.59±15.45) mg/g 和 (41.52±8.21) mg/g, 根和茎中量较低, 分别为 (21.11±9.35) mg/g 和 (22.78±9.92) mg/g。当药苷质量分数最大值和最小值均出现在同一批药材的不同部位, G07

量最高(13.59±0.73)mg/g, J07 量最低(0.61±0.03) mg/g, 最大值和最小值相差 22.28 倍; 11 批药材当药苷平均量由大到小为根 [(4.41±3.24) mg/g]、叶[(3.07±1.20) mg/g]、茎 [(2.36±1.33) mg/g]、花[(2.11±0.70) mg/g]。

2.8.4 不同产地药材的聚类分析 基于 PLS-DA 和 VIP 分析结果,以区分根、茎、叶、花具有重要意义,对来自不同产地的 11 批药材进行系统聚类分析(图 4)。综合样品不同药用部位光谱和色谱信息,在距离 20 处,所有药材被分为 5 类。来自云南文山、蒙自,贵州兴义、安龙、凯里,和广西桂林的红花龙胆聚为第 1 类;来自贵州安顺和遵义的药材分别聚为第 2 和第 3 类;来自云南丽江和大理的药材聚为第 4 类,云南昆明采集的红花龙胆单独聚为第 5 类。

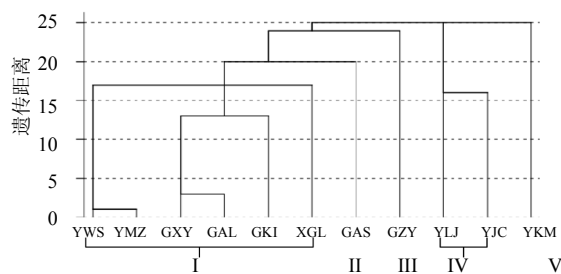


图 4 红花龙胆产地聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of *G. rhodantha* medicinal materials from different geographical origins

3 讨论

光谱分析是获得物质化学指纹图谱的途径之一^[1],UV-Vis、近红外(NIR)等光谱分析方法具备灵敏、可靠、简便快速等优点,在食品、药物的产地和部位鉴别研究中发挥重要作用^[19-20]。杨天伟等^[21]研究食用牛肝菌菌柄、菌盖紫外指纹图谱,发现不同部位化学成份的积累有差异,菌柄和菌盖紫外光谱信息可用于区别食用菌部位和产地。李建蕊等^[22]研究三七药材不同部位和组织的红外光谱信息,结果显示三七剪口、主根、表皮、形成层等部位和组织的红外光谱具指纹特征,通过红外光谱信息可对以上部位和组织进行准确、快速的鉴别。本研究显示红花龙胆根、茎、叶和花 UV-Vis 光谱特征具有差异,且在紫外区差异最大。平滑、归一化、求导是光谱数据预处理常用方法^[7]。数据处理可提高光谱的信噪比,去除高频噪音对信号的干扰,增强光谱指纹图谱的特征性^[8]。结合 PLS-DA 分析比较 3 种预处理方式,经 11 点平滑+一阶导数预处理后的光谱数据能较好体现红花龙胆不同药用部位指纹特征,可用于药材根、茎、叶和花的区分。VIP 分析表明 300~368.5 nm 内的光谱信息对红花龙胆

药用部位的区分具有重要意义,结合植物化学报道和紫外谱图相关结构信息^[16,23],推测在红花龙胆中具有较大共轭体系的化合物,如芒果苷、1-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-3,7,8-三羟基吡酮等物质可能对不同部位的区分贡献较大。紫外吸收光谱为宽带吸收,可反映一定化学成分的存在与否和总体量高低,化学物质若分子结构不同,其紫外吸收光谱也会有一定差别^[23]。红花龙胆紫外区光谱显示叶片光谱的峰形和峰高与其余部位差别较大,暗示叶片化学成分在种类和量上可能与其他部位有所不同。

UPLC 分析显示红花龙胆甲醇提取溶液在 210~320 nm 内均有吸收,其中 230~270 nm 主要为马钱苷酸、獐牙菜苦苷等环稀醚萜和裂环稀醚萜的吸收区,220~320 nm 为芒果苷的吸收区,242 nm 各化合物均有出峰且分离度较好,综合以上信息选取 242 nm 为样品 UPLC 指纹图谱检测波长。指纹图谱相似度分析显示植株化学成分分别在叶部和花部较接近,根部和茎部较相似。不同产地红花龙胆根部 UPLC 指纹图谱相似性系数变化范围大,药材质量不稳定。定量分析表明马钱苷酸、芒果苷在叶片和花中量最高;当药苷在根中量最高。叶片总体呈现较高的化学成分量,可作为药材的主要药用部位。UPLC 指纹图谱结合 PLS-DA 和 VIP 分析表明,UPLC 指纹图谱数据可对根、茎、叶、花进行正确区分。马钱苷酸、芒果苷和当药苷对药用部位的区分均有较大贡献。结合定量分析结果显示,马钱苷酸量差异可协助叶部和茎部的区分,当药苷量差异可协助地上和地下部位的区分。叶片和花中芒果苷量较接近,与 PLS-DA 分析结果类似;且芒果苷在 300~360 nm 内亦有强吸收。以上结论可用于支持 UPLC 指纹图谱和 UV-Vis 吸收光谱的研究结果。

色谱与光谱数据联用结合化学计量学可对食用和药用资源进行有效评价^[8-9,24]。对红花龙胆根、茎、叶、花 UPLC 与 UV-Vis 数据进行聚类分析,发现不同产地红花龙胆植株化学成分呈现一定地理特征,高海拔地区的药材(大理、丽江、昆明)和低海拔地区的药材(云南蒙自、文山、广西上林和贵州兴义等地)成分整体差别较大,聚为不同类群。龙胆科药用植物化学成分种类构成及量可随地理环境的变化发生变化^[25-26],且地上和地下部分化学成分变动有多种方式^[27],不同产地红花龙胆药材间化学成分的差异可能是多种因素共同作用的结果。

参考文献

- [1] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [2] Zhang Q F, Cheung H Y, Zeng L B. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of *Rhizoma Smilacis Glabrae* [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(1): 207-211.
- [3] Li W L, Cheng Z W, Wang Y F, *et al*. Quality control of *Lonicerae Japonicae Flos* using near infrared spectroscopy and chemometrics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72(2): 33-39.
- [4] Xu B Z. Modernization: One step at a time [J]. *Nature*, 2011, 480(7378): S90-S92.
- [5] 孙国祥, 豆小文, 李利锋. 紫外和红外光谱指纹谱与燃烧热谱联合定量评价人参归脾丸质量 [J]. 中南药学, 2012, 10(7): 543-548.
- [6] Alamprese C, Casale M, Sinelli N, *et al*. Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 53(1): 225-232.
- [7] Martelo-Vidal M J, Vázquez M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools [J]. *Food Chem*, 2014, 158(5): 28-34.
- [8] Sârbu C, Naşcu-Briciu R D, Kot-Wasik A, *et al*. Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate analysis of chromatographic and spectroscopic data [J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 994-1002.
- [9] Medvedovici A, Albu F, Naşcu-Briciu R D, *et al*. Fuzzy clustering evaluation of the discrimination power of UV-Vis and ($\pm$)ESI-MS detection system in individual or coupled RPLC for characterization of *Ginkgo biloba* standardized extracts [J]. *Talanta*, 2014, 119(1): 524-532.
- [10] Lu W Y, Jiang Q Q, Shi H M, *et al*. Partial least squares-discriminant analysis differentiating Chinese wolfberries by UPLC-MS and flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(37): 9073-9080.
- [11] 孙国祥, 池剑玲, 孙万阳, 等. 五波长高效液相色谱指纹图谱和红外指纹图谱联合鉴定复方丹参片质量 [J]. 中南药学, 2013(8): 598-602.
- [12] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第64卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [13] 云南省药材公司. 云南中药资源名录 [M]. 北京: 中国科学出版社, 1993.
- [14] 吴立宏, 官海峰, 俞 丽, 等. 红花龙胆的药用民族植物学及质量评价 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(2): 76-80.
- [15] Xu M, Zhang M, Wang D, *et al*. Phenolic compounds from the whole plants of *Gentiana rhodantha* (Gentianaceae) [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(10): 1891-1900.
- [16] 陈 云, 王国凯, 武 璨, 等. 红花龙胆化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 362-365.
- [17] Wang Y M, Xu M, Wang D, *et al*. Review on “Long-Dan”, one of the traditional Chinese medicinal herbs recorded in *Chinese Pharmacopoeia* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2012, 2(1): 1-10.
- [18] Pan Y, Shen T, Zhang J, *et al*. Simultaneous determination of six index constituents and comparative analysis of four ethnomedicines from genus *Gentiana* using a UPLC-UV-MS method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(1): 87-96.
- [19] Zhong G, Wang Y Z, Zhang J, *et al*. Common and variation peak ratio dual-index sequence analysis of vanillin-sulfuric acid developing UV fingerprint of *Panax notoginseng* [J]. *Asian J Chem*, 2014, 26(3): 865-868.
- [20] 程 权, 杨 方, 王丹红, 等. 近红外光谱技术对闽南乌龙茶品种的识别研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(3): 656-659.
- [21] 杨天伟, 崔宝凯, 张 霁, 等. 食用牛肝菌不同部位紫外指纹图谱鉴别分析 [J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 262-272.
- [22] 李建蕊, 陈建波, 周 群, 等. 中药三七不同部位和组织的红外光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(3): 634-637.
- [23] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [24] Liu X, Xu C, Sun S, *et al*. Discrimination of different genuine Danshen and their extracts by Fourier transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. *Spectrochim Acta A*, 2012, 97(1): 290-296.
- [25] Šiler B, Avramov S, Banjanac T, *et al*. Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaureum erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula [J]. *Ind Crop Prod*, 2012, 40(1): 336-344.
- [26] Yang H L, Liu J Q, Chen S L, *et al*. Spatial variation profiling of four phytochemical constituents in *Gentiana straminea* (Gentianaceae) [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(1): 38-45.
- [27] 沈 涛, 杨美权, 赵振玲, 等. 滇龙胆中萜类物质积累的动态变化 [J]. 植物学报, 2012, 46(6): 652-657.