

## 四裂红景天与大花红景天红景天的 NMR 指纹图谱与化学模式识别方法研究

李涛\*, 苏趁, 李立新, 李冲, 司梦鑫

四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

**摘要:**目的 建立基于核磁共振技术  $^1\text{H-NMR}$  指纹图谱-化学模式识别的四裂红景天和大花红景天的品种分类和鉴别方法。方法 采用高分辨 (600 MHz) 的核磁共振 (NMR) 指纹图谱技术, 测定四裂红景天和大花红景天的全成分信息  $^1\text{H-NMR}$  指纹图谱, 结合相似性分析、层次聚类分析、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 进行化学模式识别分析。结果  $^1\text{H-NMR}$  指纹图谱-化学模式识别方法是一种有效的区分、鉴别四裂红景天和大花红景天的方法。四裂红景天和大花红景天的  $^1\text{H-NMR}$  指纹图谱差异性较明显, 能够真实、全面地反映红景天中的特征性成分和内在品质, 四裂红景天和大花红景天主要差异成分为萜类、黄酮类, 尤其萜类成分大花红天素是鉴别四裂红景天和大花红景天的特征性成分, 可作为四裂红景天和大花红景天的分类和鉴别指标。结论  $^1\text{H-NMR}$  指纹图谱-化学模式识别方法是一种有效的红景天品种分类和鉴别方法, 为红景天属药用植物的品种鉴别和品质评价奠定基础。

**关键词:** 四裂红景天; 大花红景天; 核磁共振氢谱; 化学模式识别; 层次聚类分析; 偏最小二乘法-判别分析; 主成分分析  
中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3918-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.028

## Identification of *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola crenulata* based on NMR fingerprint and chemical pattern recognition method

LI Tao, SU Chen, LI Li-xin, LI Chong, SI Meng-xin

West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** A method for classification and identification of *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola crenulata* was established based on nuclear magnetic resonance  $^1\text{H-NMR}$  fingerprints-chemical pattern recognition technique. **Methods** Using high resolution (600 MHz) NMR fingerprints pattern technique, the total component information  $^1\text{H-NMR}$  fingerprint of *R. quadrifida* and *R. crenulata* was determined, combined with the similarity analysis, hierarchical cluster analysis, principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) methods for chemical pattern recognition analysis. **Results**  $^1\text{H-NMR}$  fingerprints techniques combined with chemical pattern recognition analysis was an effective method to discriminate and identify *R. quadrifida* and *R. crenulata*. The difference of the  $^1\text{H-NMR}$  fingerprint of *R. quadrifida* and *R. crenulata* was obvious, which truly and comprehensively reflected the characteristic components and internal qualities of *Rhodiola*. The main different components of *R. quadrifida* and *R. crenulata* were terpenoids and flavonoids, in particular, crenulatin of the terpenoid was a characteristic ingredient in the identification of *R. quadrifida* and *R. crenulata*, which can be used as the identification and classification index of *R. quadrifida* and *R. crenulata*. **Conclusion**  $^1\text{H-NMR}$  fingerprints techniques combined with chemical pattern recognition analysis method is an effective method for classification and identification of *Rhodiola*, which lays the foundation for variety identification and quality evaluation of medicinal plants of *Rhodiola*.

**Key words:** *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.; *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba;  $^1\text{H-NMR}$ ; chemical pattern recognition; hierarchical cluster analysis; partial least squares discriminant analysis; principal component analysis

我国景天科红景天属 *Rhodiola* L. 植物种类多, 野生资源丰富, 有 73 种 2 亚种 7 变种, 主要集中分布在我国西部的高山地区, 尤其以云南、四川和西

藏种类最多<sup>[1]</sup>。西南高山地区是我国红景天属植物的聚居地, 种类多, 分布集中, 由喜马拉雅山至滇西北、川西南、川西北地区形成了我国红景天属植

收稿日期: 2018-02-24

基金项目: 成都市科学技术局科技惠民技术研发项目 (2016-HM01-00339-SF); 四川省科学技术厅应用基础研究计划项目 (2016JY0247)

\*通信作者 李涛 (1971—), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事天然药物化学成分和品质评价。

Tel: (028)85501146 E-mail: scdxltao@scu.edu.cn

物的分布中心<sup>[1]</sup>。红景天属药用植物具有耐缺氧、抗衰老、抗疲劳、抗辐射、调节血糖、抗肿瘤等功效<sup>[2-4]</sup>。四裂红景天和大花红景天以根和根茎入药，藏药名称“索罗玛布”<sup>[5]</sup>，大花红景天收载于《中国药典》2015 年版，能益气活血、通脉平喘<sup>[6]</sup>。红景天属植物种类多，近年来，红景天商品药材的植物来源复杂，而且由于野生大花红景天的大量采集，野生资源急剧枯竭，不同品种间常存在混用现象，但不同品种红景天的有效成分、药效等往往差异明显，导致红景天临床用药极为混乱，严重影响红景天临床用药的安全有效。由于四裂红景天和大花红景天的药材是中医或藏医临床的常用品种，但其性状特征和显微特征均具有高度的相似性<sup>[7-9]</sup>。采用薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、近红外光谱 (NIR) 等均不能全面、综合反映不同红景天品种间的差异<sup>[10-15]</sup>。因此，迫切需要建立四裂红景天和大花红景天快速、准确的鉴别方法，用于对四裂红景天和大花红景天进行有效的、合理的分类和鉴别。而核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 指纹图谱信号灵敏度高且能够反映复杂红景天样本的全成分信息，能真实、全面地

反映药材的内在品质<sup>[16]</sup>。采用高分辨 (600 MHz) 的核磁共振 (NMR) 指纹图谱技术，结合相似性分析、层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 进行化学模式识别分析，建立基于 <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱-化学模式识别的红景天不同品种分类和鉴别方法，以保证红景天临床药用疗效，为红景天属药用植物的品种鉴别和品质评价奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

四裂红景天 (10 批) 和大花红景天 (10 批) 分别采集于四川省甘孜藏族自治州和阿坝藏族自治州、西藏自治区等地 (表 1)，红景天属植物样品经四川大学华西药学院李涛副教授鉴定为景天科红景天属植物四裂红景天 *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey. 和大花红景天 *R. crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba. DMSO-*d*<sub>6</sub> [(99.90+0.03)% TMS, Sigma 公司]; 甲醇 (分析级, 成都市科龙化工试剂厂)。

表 1 四裂红景天和大花红景天样品来源

Table 1 Samples source of *R. quadrifida* and *R. crenulata*

编号	名称	产地	编号	名称	产地
Q1	四裂红景天	四川省康定	C1	大花红景天	四川省康定
Q2	四裂红景天	四川省康定	C2	大花红景天	四川省宝兴县
Q3	四裂红景天	四川省康定	C3	大花红景天	四川省汶川县
Q4	四裂红景天	四川省理塘县	C4	大花红景天	四川省小金县
Q5	四裂红景天	四川省汶川县	C5	大花红景天	四川省松潘县
Q6	四裂红景天	四川省汶川县	C6	大花红景天	四川省丹巴县
Q7	四裂红景天	四川省汶川县	C7	大花红景天	四川省泸定县
Q8	四裂红景天	四川省泸定县	C8	大花红景天	四川省黑水县
Q9	四裂红景天	四川省宝兴县	C9	大花红景天	西藏林芝
Q10	四裂红景天	四川省九龙县	C10	大花红景天	四川省九龙县

### 1.2 仪器

Bruker AV II-600 MHz 型超导傅里叶变换核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); AB104-N 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-100DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); R-201 旋转蒸发器 (上海申顺生物科技有限公司); SHZ-D (III) 循环水式真空泵 (成都市予华伟业仪器有限公司); W201 恒温水浴锅 (上海申顺生物科

技有限公司)。分析软件采用 SIMCA-p 11.5 (Umetrics 公司, 瑞典)、MestReNova、Excel、SPSS 18.0 分析软件。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的制备

取四裂红景天、大花红景天根和根茎药材，干燥，粉碎，过 60 目筛，药材粉末干燥至恒定质量，备用。精密称取四裂红景天、大花红景天药材粉末

(1.000±0.005) g, 置 25 mL 锥形瓶中, 精密加入 10 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 在 50 °C 水浴中浸提 40 min, 冷却, 补足减失的质量, 滤过。同法再提取 1 次, 滤过, 合并滤液, 精密量取滤液 2 mL, 减压浓缩, 并减压干燥至恒定质量, 加入 0.8 mL DMSO-*d*<sub>6</sub> 溶解, 转移至核磁管中待测。

## 2.2 核磁共振图谱的测定条件

取样品溶液在 600 MHz 核磁共振波谱仪上

进行 <sup>1</sup>H-NMR 测试, 以 DMSO-*d*<sub>6</sub> 为内标, 恒温在 22.85 °C, 采样时间为 2.66 s, 脉冲间隔 D1 为 3.00 s, 谱宽为 12 335.526 Hz, 采样时间阈为 64 k, 采用标准预饱和脉冲序列压制水峰, <sup>1</sup>H-NMR 图谱扫描 64 次。分别将 10 批四裂红景天和 10 批大花红景天药材样品溶液在 600 MHz 核磁共振波谱仪上测定自由衰减信号 (FID) 和 <sup>1</sup>H-NMR 图谱 (图 1)。

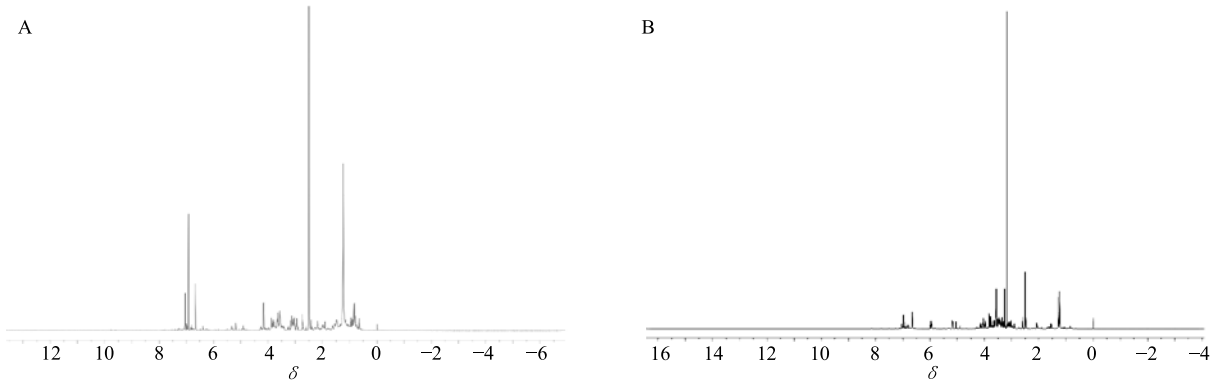


图 1 四裂红景天 (A) 和大花红景天 (B) 的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱

Fig. 1 <sup>1</sup>H-NMR spectra of *R. quadrifida* (A) and *R. crenulata* (B)

## 2.3 核磁共振图谱预处理、分析数据采集和处理

将 10 批四裂红景天和 10 批大花红景天药材样品溶液在 600 MHz 核磁共振波谱仪上测定的自由衰减信号导入 MestReNova 软件进行傅里叶转换, 调整基线, 以 DMSO-*d*<sub>6</sub> 试剂峰的化学位移值  $\delta$  2.50 作为内标, 校准 <sup>1</sup>H-NMR 图谱。应用 MestReNova 软件在 <sup>1</sup>H-NMR 图谱  $\delta$  0.00~9.00 区域进行分段积分, 以相同宽度  $\delta$  相差 0.04 为最小间隔积分, 扣除 DMSO-*d*<sub>6</sub> 溶剂峰、TMS 峰和积分值为零的值, 获得每个 0.04 等距的化学位移段对应的相对峰面积积分值, 共计 168 个数据值, 获得化学位移段与积分值相对应的分析数据矩阵 (20×168)。数据矩阵的行代表不同的化学位移段, 列代表对应于化学位移值段的积分值。为了消除样本间因质量浓度不同带来的分析误差, 利用 MestReNova 软件对得到的所有样品的 <sup>1</sup>H-NMR 数据矩阵的各分段积分值进行归一化处理, 并将数据矩阵导出至 Excel 软件中。利用 Excel 软件相关数学公式和统计学公式计算, 获得相关系数和夹角余弦值, 进行相似性分析。将数据矩阵导入 SIMCA-p 11.5 进行 PCA 和 PLS-DA。

## 2.4 相似性分析

相似性分析是模式识别方法的一种, 能评价

样品之间的相似性程度。利用 Excel 软件计算相关系数和夹角余弦值, 进行相似性分析。相关系数和夹角余弦值的数据越接近数值 1, 表明样品之间的相似性程度越好, 进行四裂红景天和大花红景天的品种分类和鉴别。以大花红景天 C1 样品设为对照时, 大花红景天组 (C2~C10) 样品之间计算所得的相关系数和夹角余弦值均介于 0.91~1.00 (接近 1), 而四裂红景天组 (Q1~Q10) 大部分样品 (除 Q2、Q9 外) 的相关系数和夹角余弦值仅为 0.22~0.48 (表 2)。而以四裂红景天 Q1 样品设为对照品时, 四裂红景天组大部分样品 (除 Q2、Q9 外) 之间计算所得的相关系数和夹角余弦值均介于 0.95~1.00 (接近 1), 而大花红景天组 (C1~C10) 样品的相关系数和夹角余弦值仅为 0.26~0.54 (表 3)。实验结果表明, <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱能够反映四裂红景天和大花红景天中的特征性成分, 同种红景天样本间具有较好的相似性, 而四裂红景天和大花红景天的 <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱相似性较差, 差异性较明显或亲缘关系较远。

## 2.5 聚类分析

将数据矩阵导入 SPSS 18.0 分析软件进行层次聚类分析, 采用离差平方和法, 以欧式平方距离为

表 2 四裂红景天和大花红景天相似性分析结果 (C1 为对照)

Table 2 Results of coefficients of cosine and correlation of *R. quadrifida* and *R. crenulata* (C1 as control sample)

样品编号	夹角余弦值	相关系数	样品编号	夹角余弦值	相关系数
C1	—	—	Q1	0.472	0.348
C2	0.987	0.985	Q2	0.711	0.638
C3	0.990	0.989	Q3	0.376	0.260
C4	0.973	0.969	Q4	0.421	0.300
C5	0.923	0.917	Q5	0.339	0.226
C6	0.961	0.955	Q6	0.392	0.273
C7	0.919	0.915	Q7	0.412	0.295
C8	0.991	0.990	Q8	0.482	0.369
C9	0.956	0.947	Q9	0.704	0.631
C10	0.992	0.992	Q10	0.455	0.329

表 3 四裂红景天和大花红景天相似性分析结果 (Q1 为对照)

Table 3 Results of coefficients of cosine and correlation of *R. quadrifida* and *R. crenulata* (Q1 as control sample)

样品编号	夹角余弦值	相关系数	样品标号	夹角余弦值	相关系数
C1	0.473	0.348	Q1	—	—
C2	0.496	0.374	Q2	0.825	0.770
C3	0.477	0.363	Q3	0.986	0.988
C4	0.499	0.392	Q4	0.994	0.994
C5	0.405	0.307	Q5	0.966	0.967
C6	0.450	0.337	Q6	0.987	0.987
C7	0.367	0.269	Q7	0.993	0.994
C8	0.527	0.408	Q8	0.981	0.977
C9	0.507	0.400	Q9	0.848	0.802
C10	0.536	0.414	Q10	0.960	0.950

测度, Z 得分标准化, 对四裂红景天和大花红景天的 20 批样本 <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱数据进行聚类分析, 其层次聚类分析树状图结果见图 2。分析结果显示, 四裂红景天 10 批样本和大花红景天 10 批样本分别聚为一类。结果表明, 四裂红景天和大花红景天的聚类分析的结果与夹角余弦相似性分析结果一致, <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱在同种红景天样本间具有较好的相似性, 而四裂红景天和大花红景天的差异性较明显或亲缘关系较远。

### 2.6 PCA

PCA 可以在 <sup>1</sup>H-NMR 图谱中获得大量的有效信息, 对不同品种的红景天进行对比分析, 并在一定的范围内分析造成样本差异的化学成分, 载荷图能解释样本间差异的化学成分归属。将数据矩阵导入 SIMCA-p 11.5 进行 PCA, 分析结果如图 3 所示, 主成分 1 (PC1)、主成分 2 (PC2)、主成分 3

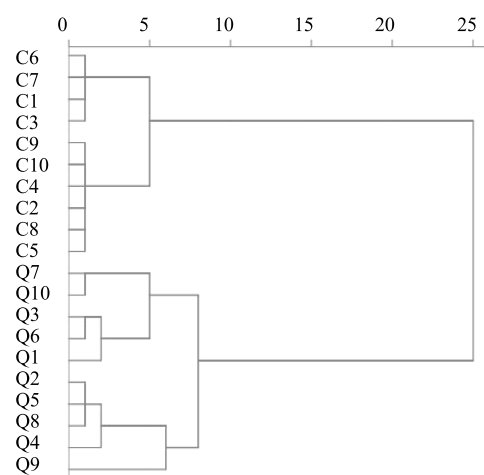


图 2 四裂红景天和大花红景天 <sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱的聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of hierarchical cluster analysis of *R. quadrifida* and *R. crenulata*

(PC3)、主成分 4 (PC4)、主成分 5 (PC5) 的累积贡献率大于 85%，前 5 个主成分 (PCs) 的累积贡献率  $R^2_x$  达到 0.879 872，则说明主成分 1~5 能够详细解释说明 85% 以上原变量信息，表明所构建的模型预测能力良好。图 3 中  $R^2_x$  表示主成分的累积贡献率， $Q^2$  表示利用该模型做 PCA 分析时测得的预测模型主成分的累积贡献率，因此，通过主成分 PC1、PC2、PC3 进行得分图和载荷图分析，四裂红景天和大花红景天进行鉴别和差异性分析。

从 PC1/PC2 (图 4-A)，PC1/PC3 (图 4-B) 的二维得分散点图和三维得分散点图 (图 5)，分析 PC1、PC2、PC3 对于四裂红景天和大花红景天鉴别的意义。以 PC1 的得分为横坐标，PC2 或 PC3 的得分为纵坐标绘制二维得分散点图 (图 4)；以 PC1、PC2、PC3 共同表征而成的三维得分散点图 (图 5)，均可以明显显示出 10 批四裂红景天和 10 批大花红景天各自聚集成一类，并集中在不同区域，四裂红

景天和大花红景天样本之间界限清晰，无相互重叠。四裂红景天样本聚集在 PC1 得分值的正值区域，而大花红景天样本分布在 PC1 得分值的负值区域，不同品种红景天组内样品间的化学成分较接近，但四裂红景天和大花红景天的差异明显。PC1/PC3 (图 4-B) 所作的二维得分散点图显示，大花红景天样本集中的区域属于 t[1] 坐标 (PC1 得分值) 的负数区间和 t[3] 坐标 (PC3 得分值) 的零点、正数区间，而四裂红景天绝大部分样本集中的区域属于 t[1] 坐标 (PC1 得分值) 的正数区间和 t[3] 坐标 (PC3 得分值) 的负数区间。结果表明，PCA 得分矢量图可明确表征四裂红景天和大花红景天样本之间存在明显差异，四裂红景天和大花红景天在 PC1 和 PC3 水平上的区别最为显著。因此，PC1 和 PC3 是四裂红景天和大花红景天分类与鉴定的富信息变量，可以采用 PC1/PC2、PC1/PC3 和 PC1/PC2/PC3 作为四裂红景天和大花红景天的分类识别变量，用于四裂红景天和大花红景天的分类与鉴定。

通过对四裂红景天和大花红景天分类、鉴定的富信息变量 PC1 和 PC3 的载荷分析，可以显示出引起 PCA 分类差异的化学成分。在载荷图的纵坐标上，纵坐标正值越大表示对得分图中的正数区间的样本作用越大，值越小则对样本的作用越小；而负值越大，则表示对得分图中负数区间的样本作用越大。PC1 的线形载荷图 (图 6-A) 显示，载荷量的正值主要和化学位移段  $\delta$  0.60~1.20、 $\delta$  1.28~1.48、 $\delta$  1.72~1.96、 $\delta$  2.12~2.40、 $\delta$  2.64~2.80、 $\delta$  3.84、 $\delta$  4.72~4.84、 $\delta$  4.92~4.96、 $\delta$  5.40、 $\delta$  6.16~

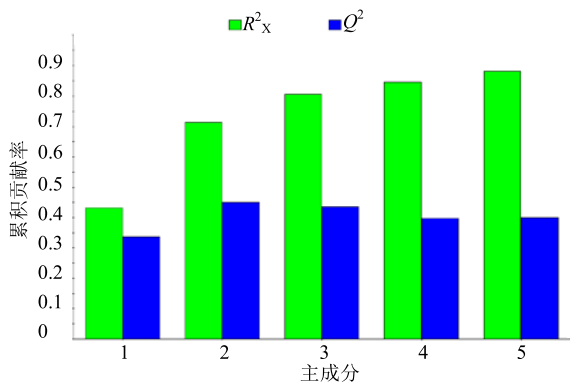
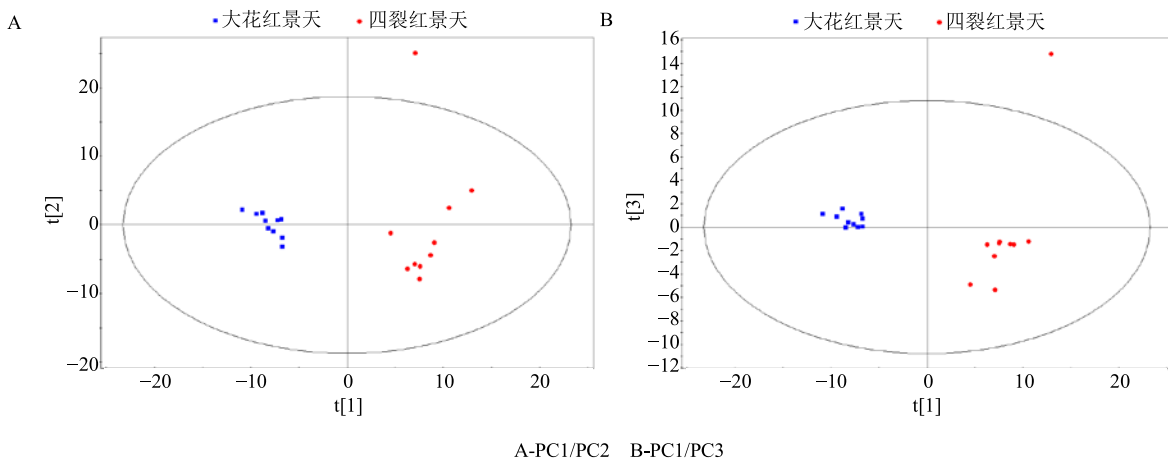


图 3 PCA 法分析主成分累积贡献率

Fig. 3 Accumulative contribution of PCs by PCA



A-PC1/PC2 B-PC1/PC3

图 4 四裂红景天和大花红景天的二维 PCA 得分散点图

Fig. 4 2D score scatter plot of *R. quadrifida* and *R. crenulata* by PCA

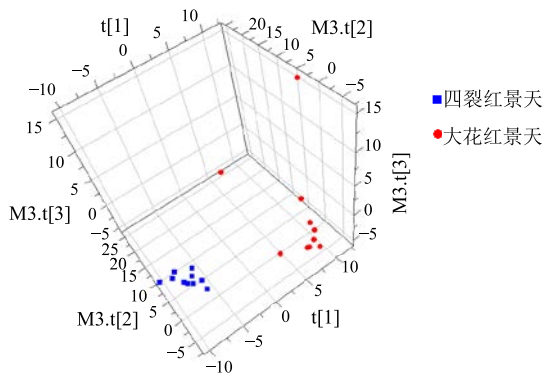


图 5 四裂红景天和大花红景天的三维 PCA 得分散点图  
Fig. 5 3D score scatter plot of *R. quadrifida* and *R. crenulata* by PCA

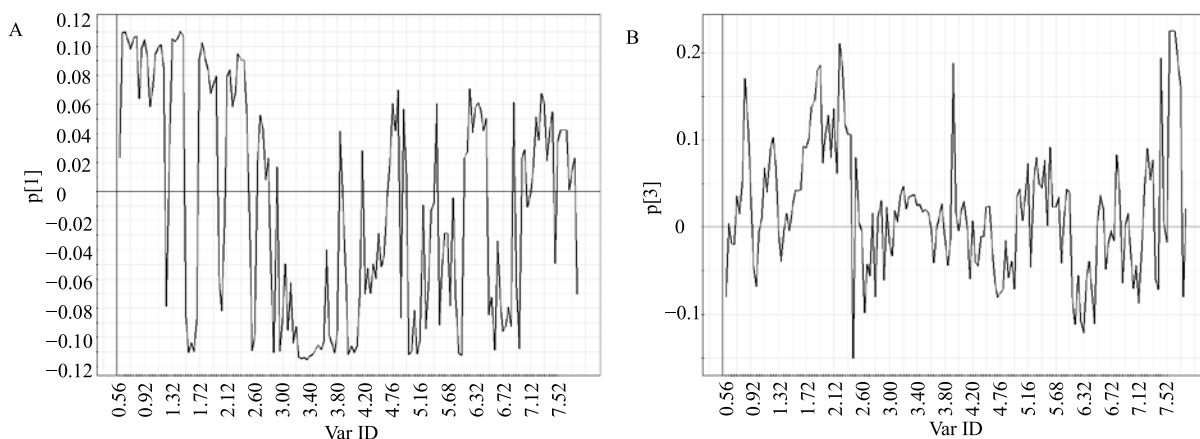


图 6 PCA 分析中 PC1 (A) 和 PC3 (B) 载荷图  
Fig. 6 Loading line plot of PC1 (A) and PC3 (B) by PCA

$\delta$  3.64、 $\delta$  3.80~3.88、 $\delta$  4.64~4.96、 $\delta$  5.20、 $\delta$  5.84、 $\delta$  6.16~6.52、 $\delta$  6.64~6.76、 $\delta$  6.88、 $\delta$  7.00~7.16、 $\delta$  7.36~7.40、 $\delta$  7.88 等是影响载荷负值变化的主要化学位移段。根据化学位移区间所对应的化合物类别，综合分析 PC1 的线形载荷图和 PC3 的线形载荷图，结果显示四裂红景天和大花红景天差异的主要成分为萜类、黄酮类，大花红景天分布在 PC1 的负值区域和 PC3 的正值区域，表明大花红景天中含有较多的萜类、黄酮类成分，尤其萜类成分大花红天素是鉴别四裂红景天和大花红景天的特征性成分，而苯烷基苷类、糖类、酚酸类成分的差异不明显。本课题组前期研究结果表明，萜类成分大花红天素是大花红景天的特征性成分；大花红景天中黄酮类成分草质素-7-*O*- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷的含量较高，而四裂红景天中无草质素-7-*O*- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷，与 NMR 的研究结果一致<sup>[14-19]</sup>。

6.48、 $\delta$  6.88、 $\delta$  7.16~7.44、 $\delta$  7.52~7.88 有关；载荷量的负值主要和化学位移段  $\delta$  1.24、 $\delta$  1.52~1.68、 $\delta$  2.00~2.08、 $\delta$  2.44~2.60、 $\delta$  2.84~3.80、 $\delta$  3.88~4.68、 $\delta$  4.88、 $\delta$  5.00~5.36、 $\delta$  5.44~5.96、 $\delta$  6.52~6.84、 $\delta$  6.92~6.96、 $\delta$  7.48 有关。主成分 3 (PC3) 的线形载荷图 (图 6-B) 显示， $\delta$  0.72~0.92、 $\delta$  1.08~1.28、 $\delta$  1.40~1.48、 $\delta$  1.52~2.36、 $\delta$  2.44~2.56、 $\delta$  2.84~2.88、 $\delta$  2.96、 $\delta$  3.08~3.60、 $\delta$  3.68~3.76、 $\delta$  3.92~4.08、 $\delta$  4.44~4.48、 $\delta$  5.00~5.16、 $\delta$  5.24~5.80、 $\delta$  5.88~5.96、 $\delta$  6.52~6.60、 $\delta$  6.80~6.84、 $\delta$  7.20~7.32、 $\delta$  7.44、 $\delta$  7.64~7.84 等是影响了载荷正值变化的主要化学位移段； $\delta$  0.96~1.04、 $\delta$  1.32~1.40、 $\delta$  2.40、 $\delta$  2.60~2.72、 $\delta$  2.80、 $\delta$  2.92、 $\delta$  3.00~3.04、

### 2.7 PLS-DA

PLS-DA 是一种常用的有监督模式识别方法，PLS-DA 分析往往更能发现样本组间差异和差异化合物<sup>[2]</sup>。采用 PLS-DA 分析方法，建立四裂红景天和大花红景天的分析模型，以实现四裂红景天和大花红景天的准确鉴别。将数据矩阵导入 SIMCA-p 11.5 进行 PLS-DA，分析结果如图 7 显示，PC1、PC2、PC3 的累积贡献率  $R^2_Y$  达到 0.991 592，即能够代表原始数据变量 99.16% 的信息，PLS-DA 分析中的模型质量评价参数  $Q^2$  描述模型的预测程度， $R^2_Y$  反映模型的拟合程度，当  $Q^2$  和  $R^2_Y$  值越接近于 1，表明该模型构建越成功，PLS-DA 分析结果显示  $Q^2$  为 0.944 912， $R^2_Y$  为 0.991 592，表明构建的模型预测能力良好。因此，通过主成分 PC1、PC2、PC3 进行得分图和载荷图分析，进行四裂红景天和大花红景天的鉴别和差异性分析。

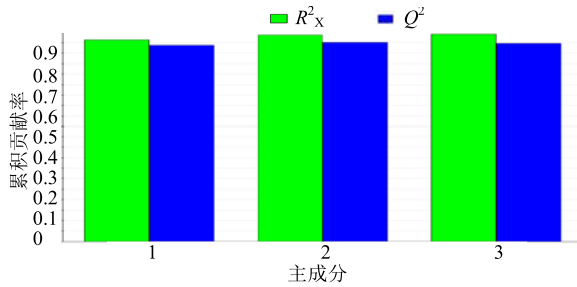


图 7 PLS-DA 法分析主成分累积贡献率

Fig. 7 Accumulative contribution of PCs by PLS-DA

从 PC1/PC2 的二维得分散点图 (图 8) 和三维得分散点图 (图 9), 分析 PC1、PC2、PC3 对于四裂红景天和大花红景天鉴别的意义。以 PC1 的得分值为横坐标, PC2 的得分值为纵坐标绘制二维得分散点图 (图 8); 以 PC1、PC2、PC3 共同表征而成的三维得分散点图 (图 9), 均可明显显示出 10 批四裂红景天和 10 批大花红景天各自聚集成一类, 并集中在不同区域, 四裂红景天和大花红景天样本间界限清晰, 无相互重叠。四裂红景天样本聚集在 PC1 得分值的负值区域, 而大花红景天样本分布在 PC1 得分值的正值区域, 不同品种红景天组内样品间的化学成分较接近, 但四裂红景天和大花红景天的差异明显。结果表明, PLS-DA 得分矢量图能明确表征四裂红景天和大花红景天样本之间存在明显差异, 四裂红景天和大花红景天在 PC1 和 PC2 或 PC1 和 PC3 水平上的区别均显著。因此, 采用 PC1/PC2、PC1/PC3 和 PC1/PC2/PC3 作为四裂红景天和大花红景天的分类识别变量, PLS-DA 分析方法能有效用于四裂红景天和大花红景天的分类与鉴定。

通过对四裂红景天和大花红景天分类、鉴定的富信息变量 PC1 的载荷分析, 可以显示出引起 PLS-DA 分类差异的化学成分。PC1 的线形载荷图 (图 10)

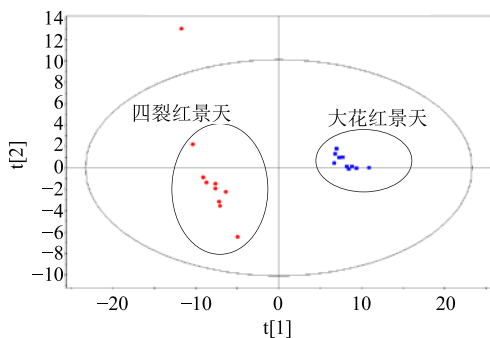


图 8 四裂红景天和大花红景天的二维 PLS-DA 得分散点图  
Fig. 8 2D score scatter plot of *R. quadrifida* and *R. crenulata* by PLS-DA

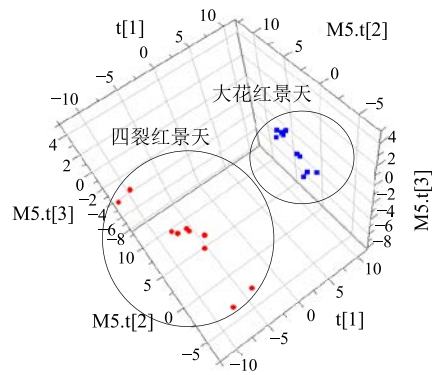


图 9 四裂红景天和大花红景天的三维 PLS-DA 得分散点图  
Fig. 9 3D score scatter plot of *R. quadrifida* and *R. crenulata* by PLS-DA

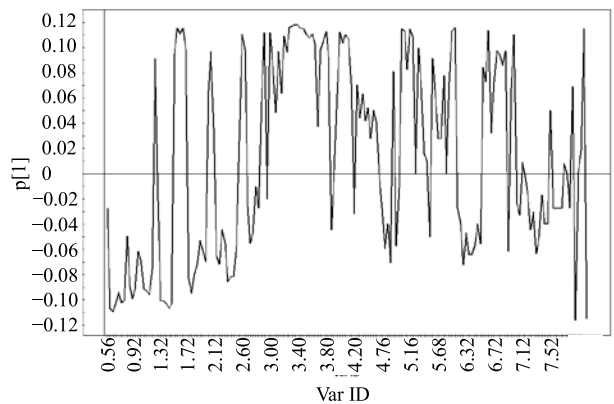


图 10 PLS-DA 分析中 PC1 载荷图

Fig. 10 Loading line plot of PC1 by PLS-DA

显示, 载荷量的正值主要和化学位移段  $\delta$  1.24、 $\delta$  1.52~1.68、 $\delta$  2.00~2.08、 $\delta$  2.44~2.60、 $\delta$  2.84~3.80、 $\delta$  3.88~4.68、 $\delta$  4.88、 $\delta$  5.00~5.36、 $\delta$  5.44~5.96、 $\delta$  6.52~6.84、 $\delta$  6.92~6.96、 $\delta$  7.48、 $\delta$  8.12 有关; 载荷量的负值主要和化学位移段  $\delta$  0.56~1.20、 $\delta$  1.28~1.48、 $\delta$  1.72~1.96、 $\delta$  2.12~2.40、 $\delta$  2.64~2.80、 $\delta$  3.84、 $\delta$  4.72~4.84、 $\delta$  4.92~4.96、 $\delta$  5.40、 $\delta$  6.16~6.48、 $\delta$  6.88、 $\delta$  7.12~7.44、 $\delta$  7.52~7.88 有关。四裂红景天和大花红景天的差异成分与 PCA 分析结果一致, 其主要差异成分为萜类、黄酮类, 大花红景天分布在 PC1 的正值区域, 表明大花红景天中含有较多的萜类、黄酮类成分, 上述化合物的贡献使 PC1 得分为正值, 而苯烷基苷类、糖类、酚酸类成分的差异不明显。

### 3 讨论

采用高分辨 (600 MHz) 的核磁共振指纹图谱技术, 结合相似性分析、层次聚类分析、PCA 和 PLS-DA 方法进行化学模式识别分析, 能对四裂红

景天和大花红景天进行有效的分类和鉴别。聚类分析的结果与夹角余弦相似性分析结果表明,四裂红景天和大花红景天的<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱在同种红景天样本间具有较好的相似性,而四裂红景天和大花红景天的差异性较明显或亲缘关系较远。PCA 和 PLS-DA 分析显示,PCA 和 PLS-DA 得分矢量图可明确表征四裂红景天和大花红景天样本之间存在明显差异,能用于四裂红景天和大花红景天的准确分类和鉴定。高分辨<sup>1</sup>H-NMR 全成分信息指纹图谱能够反映四裂红景天和大花红景天中的特征性成分,线形载荷图能反映引起 PCA 和 PLS-DA 分类差异的特征化学成分,四裂红景天和大花红景天差异的主要成分为萜类、黄酮类,尤其萜类成分大花红天素是鉴别四裂红景天和大花红景天的特征性成分,可作为四裂红景天和大花红景天的分类和鉴别指标。<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱-化学模式识别方法构建的分析模型,稳定性和重现性好,具有良好的种间区分度,<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱信号灵敏度高且能够反映复杂红景天样本的全成分信息,能真实、全面地反映药材的内在品质。因此,<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱-化学模式识别方法是一种有效的红景天品种分类和鉴别方法,以保证红景天临床药用疗效,为红景天属药用植物的品种鉴别和质量评价奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Li T, Zhang H. A new species of *Rhodiola* (Crassulaceae) from western Sichuan, China [J]. *Novon*, 2010, 20(1): 53-56.
- [2] 李涛,何璇. 红景天<sup>1</sup>H-NMR 指纹图谱-化学模式识别研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(4): 888-891.
- [3] 张明发,沈雅琴. 红景天苷的血管药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(6): 866-873.
- [4] 张明发,沈雅琴. 红景天苷心脏保护药理作用的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 125-132.
- [5] 青海省药品检验所. 中国藏药 (第 3 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] Li T, Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology [J]. *Microsc Res Techniq*, 2008, 71(6): 448-459.
- [8] 李涛,何璇,汪元娇. 红景天属药用植物的形态分类比较研究 [J]. *华西药学杂志*, 2015, 30(4): 450-451.
- [9] 李涛,张浩. 12 种红景天属植物性状鉴别特征的比较 [J]. *华西药学杂志*, 2010, 25(5): 514-516.
- [10] Li T, He X. Studies on two economically and medicinally important plants, *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola fastigiata* of Tibet and Sichuan province, China [J]. *Pak J Bot*, 2016, 48(5): 2031-2038.
- [11] Li T, He X. Quantitative analysis of salidroside and *p*-tyrosol in the traditional Tibetan medicine *Rhodiola crenulata* by fourier transform near-infrared spectroscopy [J]. *Chem Pharm Bull*, 2016, 64(4): 289-296.
- [12] 张杰,金诗雪,耿冰,等. HPLC-DAD 法测定不同产地红景天中 6 个黄酮类成分 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4253-4256.
- [13] Li T, Su C. Authenticity identification and classification of *Rhodiola* species in traditional Tibetan medicine based on fourier transform near-infrared spectroscopy and chemometrics analysis [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 204:131-140.
- [14] Li T, Zhang H. Identification and comparative determination of rhodionin in traditional Tibetan medicinal plants of fourteen *Rhodiola* species by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(6): 807-814.
- [15] 李涛,葛志乐. 红景天属 14 种药用植物的薄层鉴别 [J]. *华西药学杂志*, 2015, 30(6): 736-737.
- [16] Li T, He X, Luo Q Q. Metabolomic differentiation of *Rhodiola crenulata* from different geographical origins of Sichuan province and Tibet, China [J]. *Pak J Bot*, 2017, 49(6): 2285-2293.
- [17] 王雪晶,谢雪,罗鑫,等. 大株红景天化学成分研究 (I) [J]. *中草药*, 2015, 46(23): 3471-3474.
- [18] 李涛,葛志乐,张浩. 大花红景天的化学成分研究 [J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(4): 367-370.
- [19] 李涛,葛志乐,何璇. 川西高原产 13 种红景天属药用植物中多糖含量的测定与比较 [J]. *华西药学杂志*, 2017, 32(5): 529-530.