

基于液质联用-模式识别方法分析不同产地的绞股蓝皂苷

翟新房^{1,2}, 赵焕虎^{1,2}, 杨 册^{1,2}, 杨 康^{1,2}, 宋 宁¹, 常 拓^{1,2}, 崔伟业^{1,2}, 邢韶芳^{1,2}, 蔺 曼^{1,2}, 王玉荣¹, 朱 丹^{1,2}, 朴香兰^{1,2*}

1. 中央民族大学药学院, 北京 100081

2. 中央民族大学 民族医药教育部重点实验室, 北京 100081

摘要: 目的 采用 LC-MS 建立绞股蓝药材的指纹图谱, 鉴定其主要色谱峰, 并结合变量模式识别方法判别不同产地绞股蓝药材。方法 采用 Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水为流动相梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 使用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式下采集数据。通过聚类分析、主成分分析和对应分析对 21 批绞股蓝药材进行分析。结果 建立了绞股蓝药材指纹图谱, 标定出 9 个共有峰与 10 个特征峰, 并根据质谱信息及文献对照对其中 16 个色谱峰进行定性分析。并结合多变量分析区分了不同产地绞股蓝, 为绞股蓝的质量控制及综合评价奠定了基础。结论 液质联用-模式识别方法可用于不同产地绞股蓝的快速鉴别, 也可对其特征成分进行靶向分离。

关键词: 绞股蓝; 指纹图谱; 液质联用; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3193-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.028

Analysis of *Gynostemma pentaphyllum* sapoins from different regions based on LC-MS and pattern recognition method

ZHAI Xin-fang^{1, 2}, ZHAO Huan-hu^{1, 2}, YANG Ce^{1, 2}, YANG Kang^{1, 2}, SONG Ning¹, CHANG Tuo^{1, 2}, CUI Wei-ye^{1, 2}, XING Shao-fang^{1, 2}, LIN Man^{1, 2}, WANG Yu-rong¹, ZHU Dan^{1, 2}, PIAO Xiang-lan^{1, 2}

1. Key Laboratory of Chinese Minority Traditional Medicine (Ministry of Education of China), Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. Key Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective The fingerprint of *Gynostemma pentaphyllum* was established with liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS), and the main chromatographic peaks were preliminary identified, and combined with multi-variable analysis pattern recognition method to identify *G. pentaphyllum* from different origins. **Methods** Inertsil ODS-SP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) C₁₈ column was eluted with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase gradient. The detection wavelength was 203 nm. The mass spectrometry equipped with electrospray ionization (ESI) was used as detector and operated under the negative ion mode. A total of 21 batches of *G. pentaphyllum* were analyzed by cluster analysis, principal component analysis, and corresponding analysis. **Results** The fingerprints of *G. pentaphyllum* were established by LC-MS, and nine common peaks and 10 characteristic peaks were calibrated. According to the mass spectrometry information and literature comparison, 16 chromatographic peaks were qualitatively analyzed. Combined with multivariate analysis, *G. pentaphyllum* from different habitats was distinguished. It would establish the foundations for quality control and comprehensive evaluation of *G. pentaphyllum*. **Conclusion** The LC-MS and pattern recognition analysis can be used to distinguish *G. pentaphyllum* from different regions and the targeting compounds of interest would be separated.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; fingerprint; LC-MS; cluster analysis; principal component analysis

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) 为葫芦科绞股蓝属, 多年生攀援草本植物, 主要分布于中国、日本、朝鲜等国, 始载于明代明成祖朱

收稿日期: 2019-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673692); 中央民族大学研究生自主科研项目 (SSZZKY-2019110); 国家重点研发计划资助项目 (2017YFC1704000)

作者简介: 翟新房, 硕士研究生, 主要研究方向为民族药物物质基础及作用机制。E-mail: 310796106@qq.com

*通信作者 朴香兰, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为民族药物物质基础及作用机制。

Tel: 13366108978 E-mail: xlpiao@muc.edu.cn

棣的《救荒本草》：“采叶炸熟，水漫去邪味，涎沫淘洗净，油盐调食”，此时用作充饥之用，而非药用^[1]。随后明代医药学家李时珍《本草纲目》有关绞股蓝功效的记载“治疮疖，虫咬，凉血解毒，利小便”^[2]。绞股蓝味苦、微甘，性寒，无毒，具有清热解毒、止咳化痰、健脾安神之功效^[3]。作为一种与人参相似的免疫增强剂，其抗肿瘤^[4]、降血糖^[5]等作用显著，著有“南方人参”的美誉，一直是国内外学者研究的热点，皂苷类化合物是绞股蓝的主要活性成分。

药材中的化学成分变化或其含量发生变化会影响药材质量及其生物活性。绞股蓝在我国陕西、安徽、湖北、湖南、福建、广西等地均有生长，比较容易推广种植^[6]。不同地理环境对绞股蓝成分有何影响？如何判别不同产地的绞股蓝？有必要建立一种检测方法区分不同产地绞股蓝，确保用药的准确性。液质联用（LC-MS）是通过高效液相的分离与质谱的结构信息可以快速提供样品的成分组成，是一种理想的快速分析手段，对混合物的分析有很高的灵敏度和选择性以及广泛的适用性，可大大缩短分析时间，减少原料的浪费，并可对感兴趣的化合物进行靶向分析。目前，关于不同产地绞股蓝的评价和鉴别研究中主要集在绞股蓝黄酮类成分，尚未见到绞股蓝皂苷的指纹图谱研究的报道，本研究首次建立绞股蓝皂苷的指纹图谱，选择 3 个不同纬

度产地陕西、福建、广西采集的 21 份绞股蓝药材（陕西绞股蓝 7 个样本，福建绞股蓝 9 个样本，广西绞股蓝 5 个样本），通过 LC-MS 标定出 9 个共有峰与 10 个特征峰，并对其结构进行定性分析，同时，结合聚类分析（cluster analysis, CA）、主成分分析（principal component analysis, PCA）和对应分析（correspondence analysis）方法进行不同产地绞股蓝的模式识别研究。

1 仪器与材料

KQ-500E 超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；LC-20A 高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；离子阱飞行时间液质联用（LCMS-IT-TOF）仪（日本 Shimadzu 公司）；色谱纯乙腈（美国 Fisher 公司）；Inertsil ODS-SP（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱（日本 GL Sciences 公司）；Cleanert C₁₈-SPE（200 mg/3 mL，55 μm）固相萃取柱（Agela 公司）；NW Ultra-pure 超纯水系统（上海 Heal Force 公司）；电子分析天平（奥豪斯国际贸易上海有限公司）；色谱甲酸（天津市光复试剂研究所）；95%乙醇（北京化工厂）。

绞股蓝药材共 21 批（表 1），分别采自陕西、福建和广西，经香港浸会大学陈虎彪教授鉴定为葫芦科（Cucurbitaceae）绞股蓝属 *Gynostemma* Bl. 绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino，自然干燥，密封保存于阴凉干燥处。

表 1 绞股蓝样本来源

Table 1 Origins of collected *G. pentaphyllum*

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
S1	陕西-长庚-1	2017-9-23	F5	福建-林中-3	2017-9-23
S2	陕西-长庚-2	2017-9-23	F6	福建-羊坑-1	2017-9-25
S3	陕西-平利-1	2017-9-24	F7	福建-羊坑-2	2017-9-25
S4	陕西-平利-2	2017-9-24	F8	福建-林板-1	2017-9-27
S5	陕西-七叶-1	2017-9-25	F9	福建-林板-2	2017-9-27
S6	陕西-七叶-2	2017-9-25	G1	广西-金秀-1	2017-7-21
S7	陕西-七叶-3	2017-9-25	G2	广西-金秀-2	2017-7-21
F1	福建-漳州-1	2017-9-21	G3	广西-南宁-1	2017-7-25
F2	福建-漳州-2	2017-9-21	G4	广西-南宁-2	2017-7-25
F3	福建-林中-1	2017-9-23	G5	广西-南宁-3	2017-7-25
F4	福建-林中-2	2017-9-23			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Inertsil ODS-SP（250 mm×4.6 mm，5 μm）C₁₈ 色谱柱，流动相为 0.01%甲酸水溶液（B）-乙腈溶液（A），梯度洗脱：0~5 min，35%~38% A；5~15 min，38%~39% A；15~30 min，39%~68% A；30~45 min，68%~95% A；45~60 min，95% A；

体积流量 1.0 mL/min；检测波长为 203 nm；柱温恒温；进样量 30 μL。LCMS-IT-TOF 离子源为 ESI，扫描范围 m/z 100~1 200，加热模块温度 200 °C，CDL 温度 200 °C，雾化气体流量 1.5 L/min，干燥气体压力 108 kPa；IT 真空度 0.018 Pa，TOF 真空度 2.2×10^{-4} Pa，离子源电压负离子模式-3.5 kV，检测器电压 1.62 kV。

2.2 供试品溶液的制备

各取 21 批绞股蓝药材粉末 1 g, 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 加入 80%乙醇 8 mL 浸泡 24 h 后, 超声提取 3 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 滤液减压蒸干, 各取 50 mg 总提物, 用 1 mL 0.1%甲酸水溶液溶解, 上样于 C₁₈ 固相萃取小柱洗脱, 再用 1.5 mL 的 0.1%甲酸水-甲醇 (1:1) 溶液洗脱, 最后用 1.5 mL 的甲醇洗脱下来的洗脱液为总皂苷部位, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批 (S1) 绞股蓝供试品溶液, 连续进样 6 针, 每次 30 μL, 考察色谱峰保留时间的一致性, 结果表明, 共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.022%~0.365%, 0.152%~1.326%, 说明各主要色谱峰保留时间与峰面积基本一致, 符合指纹图谱的要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一批 (S1) 的绞股蓝供试品, 室温密闭保存, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 进行检测, 结果表明, 共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.726%~1.658%、0.591%~1.563%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批 (S1) 的绞股蓝供试品, 同法制备 6 个供试品溶液进行检测。按照“2.1”

项下色谱条件进样测定, 结果表明, 共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 1.053%~2.356%、0.982%~2.043%, 符合指纹图谱的要求, 重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 样品测定 按“2.2”项下方法制备 21 批供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液各 30 μL, 注入到高效液相色谱仪检测, 记录色谱峰的保留时间和峰面积, 共获得 9 个共有峰 (峰 11~19), 广西产绞股蓝 4 个特征峰 (峰 3、5、6、8), 福建产绞股蓝 5 个特征峰 (峰 1、2、7、9、10), 陕西产绞股蓝 1 个特征峰 (峰 4)。

2.4.2 共有峰和内参峰的选择 以上 21 个产地绞股蓝 HPLC 图均主要有 9 个共有峰, 因第 15 个色谱峰 (峰 15) 分离度较好, 保留时间适中, 在所有共有峰中占面积最大, 且在质谱中显示其为非皂苷类成分 (在负离子 ESI 中出现 m/z [M-H]⁻ 754.515 3), 故选择峰 15 为内参峰。在各批样品的共有峰、特征峰的相对峰面积 (表 2) 与相对保留时间 (表 3) 中, 每个样品的非共有峰面积占总峰面积均小于 10%, 符合指纹图谱要求, 且各共有峰较稳定, 具有指纹图谱特征性, 可初步拟定为绞股蓝皂苷类成分的指标成分群。

表 2 共有峰和特征峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common and specific peaks

样品	相对峰面积																		
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17	峰18	峰19
S1	—	—	—	1.110	—	—	—	—	—	—	0.258	0.184	0.247	0.209	1.000	0.131	0.563	0.277	0.311
S2	—	—	—	4.517	—	—	—	—	—	—	0.496	0.298	0.706	0.208	1.000	0.453	3.045	0.212	5.126
S3	—	—	—	5.199	—	—	—	—	—	—	0.571	0.589	0.836	0.285	1.000	0.496	3.155	0.192	4.328
S4	—	—	—	1.930	—	—	—	—	—	—	0.575	0.420	0.470	0.376	1.000	0.230	0.203	0.092	0.142
S5	—	—	—	9.264	—	—	—	—	—	—	1.051	2.068	1.058	0.567	1.000	0.825	0.199	0.244	0.299
S6	—	—	—	6.359	—	—	—	—	—	—	0.477	0.393	0.497	0.390	1.000	0.590	0.463	0.223	0.489
S7	—	—	—	4.559	—	—	—	—	—	—	0.351	0.282	0.394	0.310	1.000	0.302	0.605	0.193	0.522
F1	3.254	2.927	—	—	—	—	2.295	—	1.044	1.044	1.124	0.505	0.524	0.392	1.000	0.517	0.268	0.264	0.215
F2	2.720	3.067	—	—	—	—	4.373	—	1.079	2.531	2.104	0.655	1.366	0.389	1.000	0.604	1.411	0.079	3.059
F3	3.390	3.949	—	—	—	—	2.771	—	1.372	2.092	1.849	0.554	0.764	0.426	1.000	0.659	0.215	0.251	0.264
F4	3.227	4.147	—	—	—	—	2.676	—	1.232	2.095	2.146	0.462	0.852	0.397	1.000	0.718	0.162	0.230	0.323
F5	4.333	5.083	—	—	—	—	3.815	—	1.152	2.628	2.364	0.726	0.996	0.551	1.000	0.86	0.156	0.365	0.298
F6	6.197	6.878	—	—	—	—	3.865	—	2.242	3.133	2.837	1.608	1.072	0.494	1.000	0.734	0.429	0.402	0.571
F7	4.773	6.091	—	—	—	—	2.072	—	1.845	2.095	1.027	0.405	1.294	0.283	1.000	0.380	3.049	0.468	6.731
F8	2.794	3.402	—	—	—	—	2.590	—	0.636	2.029	0.544	0.716	0.790	0.458	1.000	0.423	0.384	0.318	0.421
F9	3.134	4.097	—	—	—	—	2.837	—	0.899	1.913	0.447	0.310	0.778	0.317	1.000	0.655	0.288	0.071	0.266
G1	—	—	0.603	—	0.381	0.791	—	0.385	—	—	0.622	0.441	0.374	0.199	1.000	0.373	0.318	0.547	0.301
G2	—	—	2.772	—	1.185	1.374	—	1.800	—	—	1.556	0.213	0.253	0.233	1.000	0.713	0.237	0.077	0.186
G3	—	—	3.179	—	1.865	1.433	—	2.034	—	—	1.254	0.255	0.352	0.227	1.000	0.781	0.116	0.029	0.114
G4	—	—	2.160	—	0.988	1.057	—	1.505	—	—	0.999	0.197	0.299	0.184	1.000	0.792	0.246	0.346	0.158
G5	—	—	1.080	—	0.514	1.163	—	0.819	—	—	0.920	1.313	0.638	0.358	1.000	0.382	0.176	0.134	0.236

“—”表示未检出

“—”indicates that it is not detected

表 3 共有峰和特征峰相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common and specific peaks

样品	相对保留时间																		
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	峰 18	峰 19
S ₁	—	—	—	0.331	—	—	—	—	—	—	0.634	0.767	0.905	0.915	1.000	1.063	1.167	1.219	1.277
S ₂	—	—	—	0.336	—	—	—	—	—	—	0.636	0.767	0.905	0.916	1.000	1.062	1.171	1.218	1.279
S ₃	—	—	—	0.334	—	—	—	—	—	—	0.634	0.766	0.905	0.915	1.000	1.061	1.171	1.219	1.284
S ₄	—	—	—	0.328	—	—	—	—	—	—	0.634	0.765	0.905	0.914	1.000	1.062	1.165	1.224	1.278
S ₅	—	—	—	0.332	—	—	—	—	—	—	0.635	0.766	0.905	0.914	1.000	1.062	1.164	1.217	1.276
S ₆	—	—	—	0.339	—	—	—	—	—	—	0.634	0.766	0.905	0.915	1.000	1.063	1.167	1.219	1.279
S ₇	—	—	—	0.336	—	—	—	—	—	—	0.636	0.767	0.905	0.915	1.000	1.063	1.165	1.217	1.277
F ₁	0.168	0.207	—	—	—	—	0.472	—	0.525	0.566	0.634	0.766	0.905	0.915	1.000	1.063	1.166	1.219	1.279
F ₂	0.164	0.203	—	—	—	—	0.475	—	0.525	0.565	0.634	0.766	0.905	0.915	1.000	1.062	1.167	1.217	1.281
F ₃	0.168	0.208	—	—	—	—	0.474	—	0.525	0.567	0.636	0.766	0.905	0.915	1.000	1.063	1.166	1.219	1.279
F ₄	0.167	0.208	—	—	—	—	0.477	—	0.525	0.569	0.637	0.766	0.905	0.914	1.000	1.063	1.165	1.218	1.279
F ₅	0.167	0.207	—	—	—	—	0.475	—	0.524	0.567	0.635	0.765	0.905	0.914	1.000	1.063	1.165	1.218	1.277
F ₆	0.170	0.210	—	—	—	—	0.475	—	0.525	0.568	0.635	0.766	0.905	0.914	1.000	1.062	1.165	1.218	1.278
F ₇	0.169	0.209	—	—	—	—	0.475	—	0.528	0.568	0.628	0.768	0.905	0.915	1.000	1.062	1.167	1.218	1.280
F ₈	0.169	0.211	—	—	—	—	0.482	—	0.529	0.572	0.630	0.767	0.905	0.915	1.000	1.063	1.165	1.218	1.276
F ₉	0.171	0.212	—	—	—	—	0.483	—	0.530	0.572	0.630	0.767	0.907	0.914	1.000	1.063	1.173	1.216	1.275
G ₁	—	—	0.302	—	0.422	0.476	—	0.502	—	—	0.629	0.768	0.905	0.915	1.000	1.063	1.164	1.216	1.275
G ₂	—	—	0.305	—	0.420	0.470	—	0.504	—	—	0.629	0.767	0.905	0.915	1.000	1.063	1.164	1.222	1.275
G ₃	—	—	0.308	—	0.424	0.472	—	0.506	—	—	0.626	0.767	0.905	0.915	1.000	1.063	1.165	1.218	1.277
G ₄	—	—	0.303	—	0.417	0.468	—	0.502	—	—	0.626	0.759	0.905	0.915	1.000	1.063	1.166	1.218	1.277
G ₅	—	—	0.304	—	0.421	0.472	—	0.498	—	—	0.629	0.767	0.905	0.916	1.000	1.063	1.164	1.216	1.275

“—”表示未检出

“—”indicates that it is not detected

2.4.3 指纹图谱的建立 将 21 批绞股蓝总皂苷样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)》,通过多点校正法对色谱峰进行自动匹配,时间窗宽度设为 0.50 S,中位数法生成绞股蓝总皂苷指纹图谱见图 1,不同产地绞股蓝总皂苷的 HPLC 图见图 2。

结果表明,在不同产地绞股蓝总皂苷的 HPLC 指纹图谱中,共有峰的相对保留时间差别较小,RSD 为 0.030%~0.539%,说明 21 批绞股蓝总皂苷的主要特征成分基本相同。但是共有峰的相对峰面积差别较大,RSD 为 37.426%~164.952%,说明 21 批绞股蓝总皂苷的主要特征成分含量存在差异,其原因与产地、生长环境、生长年限、采收期等有关。

2.4.4 色谱峰的成分归属 各精密吸取“2.2”项中所确定的 3 个产地供试品溶液 30 μ L,按照上述所确定的液质条件进样,首先通过 (-) ESI-MS 的一

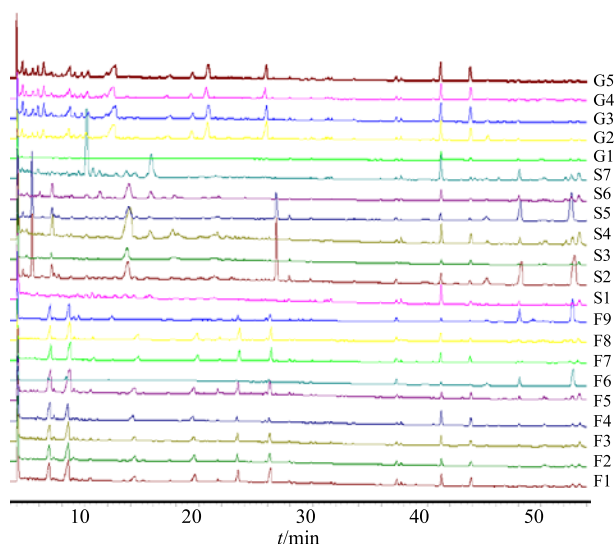


图 1 不同产地绞股蓝总皂苷的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of total saponins of *G. pentaphyllum* from different origins

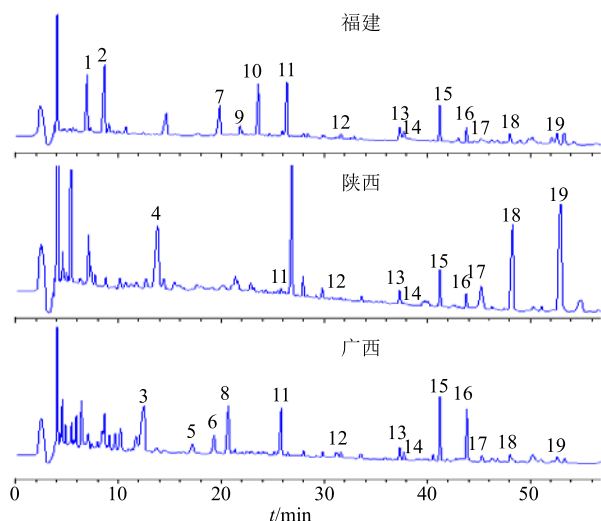


图 2 不同产地绞股蓝总皂苷 HPLC

Fig. 2 HPLC of total saponins of *G. pentaphyllum* from different origins

级扫描,检测到各共有峰与特有峰的准分子离子峰,根据质谱数据进行结构分析,并且与文献报道的成分进行对照,推测各个色谱峰可能的化学成分归属(表 4)。

2.5 数据分析

2.5.1 聚类分析 聚类分析属于化学计量学范畴,能够找到隐藏在众多共性下的差异,对数据进行多元分析,本研究运用 R3.5.1 语言软件对 21 批绞股蓝样品进行系统聚类,其中数据源为 9 个共有峰和 10 个特有峰的相对峰面积,所有的数据经过标准化处理,聚类方法为组间连接法,样品距离度采用欧式距离法,代入软件中进行计算,得到样品的聚类分析树状图(图 3)。聚类分析结果反映的是各样品的相似程度,样品间的分类距离值越小则样品间的差异越小,反之则越大。由图 3 可见,聚类分析将绞股蓝样品分为 3 类, I 包括 F1~F9, 为福建产绞

表 4 鉴定的绞股蓝皂苷成分质谱数据

Table 4 MS spectral data for saponins identification in *G. pentaphyllum*

峰号	保留时间/min	[M-H] ⁻	相对分子质量	分子式	误差 (×10 ⁻⁶)	鉴定结果
1	6.94	1 093.569 1	1 094.587 3	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₃	9.97	gypenoside LVI ^[4]
2	8.52	961.527 9	962.545 0	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	10.24	gypenoside XLVI ^[4]
3	12.46	653.421 7	654.434 3	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₀	8.13	gyp TR1 ^[7]
4	13.63	897.478 3	898.492 6	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₇	7.82	未知
5	17.39	797.463 7	798.476 6	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	6.99	11-oxomogroside IIE ^[8]
6	19.62	869.485 5	870.497 7	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₆	5.64	未知
7	20.68	651.406 7	652.418 6	C ₃₆ H ₆₀ O ₁₀	7.16	未知
8	21.63	769.470 6	770.481 6	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	4.89	gynoside A/gynoside C/ gynoside E ^[9-10]
9	21.94	841.490 2	842.502 8	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₅	6.29	未知
10	23.34	781.470 7	782.481 6	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₃	4.69	damulin A, damulin B ^[11]
11	26.15	653.373 1	654.376 8	C ₃₈ H ₅₄ O ₉	5.49	未知
12	31.60	823.479 0	824.492 2	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₄	7.19	gynoside B ^[9-10]
13	37.28	805.507 3	806.523 9	C ₃₈ H ₇₈ O ₁₇	11.56	未知
14	37.70	951.760 8	952.767 2	C ₆₇ H ₁₀₀ O ₃	0.03	未知
15	41.22	754.515 3	755.508 5	C ₄₃ H ₆₉ N ₃ O ₈	0.59	未知
16	43.80	635.233 5	636.293 4	C ₃₆ H ₄₄ O ₁₀	3.02	未知
18	50.23	741.473 5	742.486 7	C ₄₀ H ₇₀ O ₁₂	8.02	未知

“—”表示未报道

“—”not report

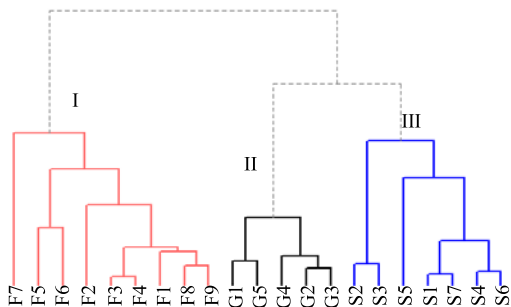


图 3 21 批绞股蓝样品的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 21 samples of *G. pentaphyllum*

股蓝; II 包括 G1~G5, 为广西产地绞股蓝; III 包括 S1~S7, 陕西产地绞股蓝都归为这一类。通过聚类分析,可以根据共有峰和特有峰的相对峰面积差异区分不同产地绞股蓝。

2.5.2 主成分分析 3 个产地 21 份绞股蓝总皂苷样品中 19 个特征峰成分所对应的归一化百分含量作为变量,将 21×19 组成的原始数据矩阵经标准化处理,再对其进行运算,主成分个数提取原则为主成分对应的特征值>1 的前 m 个主成分。从方差贡献率来看, PC1=2.822, 累积贡献率为 41.9%, 贡献

率最大, 包含的信息最多; $PC2=2.212\ 9$, 贡献率为 25.8%; $PC3=1.529\ 6$, 贡献率为 12.3%; $PC4=1.218\ 9$, 贡献率为 7.8%。结果前 4 个主成分的累积贡献率达到 87.81% > 80%, 即对前 4 个主成分分析已经能反映绞股蓝总皂苷的基本特征, 本研究选取前 2 个得分矢量来作图, 2 个主成分的得分图见图 4。PCA 得分图将所有样品归为 3 类, 陕西产地绞股蓝聚为一类, 广西产地绞股蓝聚为一类, 福建产地绞股蓝归为一类, 分析结果与聚类分析一致。

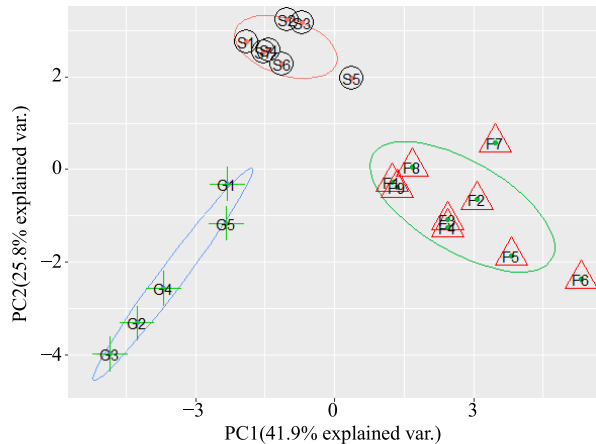


图 4 绞股蓝的主成分得分图

Fig. 4 PC scores for *G. pentaphyllum*

2.5.3 对应分析 对应分析是在因子分析基础上发展起来的, 因子分析分为 R 型和 Q 型因子分析, R 型是对变量 (即相对峰面积) 做因子分析, Q 型是对样品 (即不同批次绞股蓝) 做因子分析, 研究样品之间的相互关系, 对应分析是把 R 和 Q 统一起来, 通过 R 型因子分析直接得到 Q 型因子分析的结果, 同时把变量和样品反映到相同的坐标轴 (因子轴) 的一张图形上, 以此来说明变量与其样品之间的关系, 采用 R3.5.1 软件对 21 批样品和 19 个峰的相对峰面积进行降维处理, 得到因子载荷矩阵, 以因子载荷矩阵的第 1 因子为横轴, 第 2 因子为纵轴, 以 2 因子的载荷值为坐标值在图上描点就得到对应分析图 (图 5)。

2.5.4 随机森林 随机森林 (random forest) 是一种利用多个分类树对数据进行判别与分类的方法, 在对数据进行分类的同时, 还可以给出各个变量的重要性评分, 评估各个变量在分类中所起的作用。本研究运用随机森林算法可以得到每个变量对区分各产地所占的权重, 其中峰 4、2、3、8、9、1、10 权重较大 (图 6), 对区分不同产地绞股蓝具有决定性作用, 与对应分析结果一致。图 6 中变量距离原

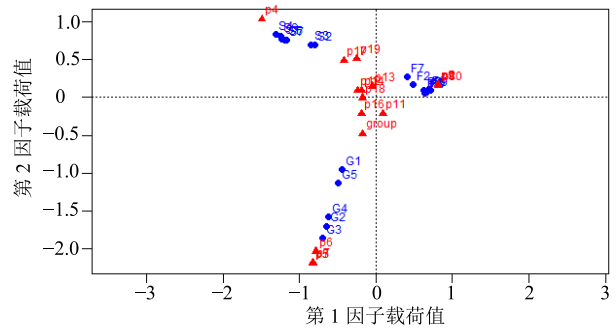


图 5 绞股蓝的对应分析图

Fig. 5 Correspondence analysis of *G. pentaphyllum*

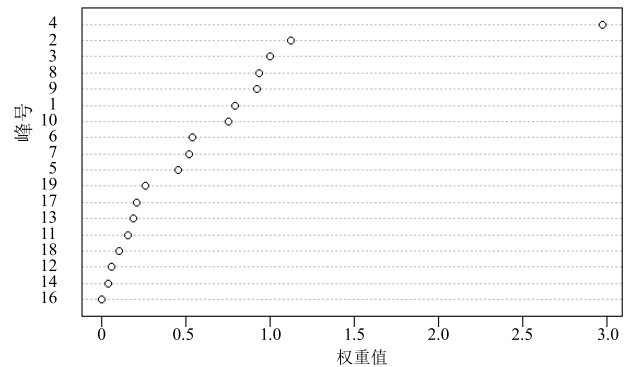


图 6 绞股蓝的变量得分图

Fig. 6 Variable score plot for *G. pentaphyllum*

点越远, 说明变量所占权重值越大, 表明该成分在决定样品区分中的作用越大, 结果表明峰 4 对陕西产地绞股蓝具有决定性作用, 而从色谱图可知, 峰 4 为陕西产地绞股蓝特有峰, 与实际分析结果相符, 即非共有特征峰可作为鉴别不同产地的依据, 可以快速、准确地区分不同产地绞股蓝。

此时运用决策树算法对变量峰 4、2、3、8、9、1、10 与样品变量进行分析 (图 7), 对应分析图上, 使联系密切的类别点较集中, 联系疏远的类别点较分散, 能够直观地把握变量与样品之间的联系。本研究将陕西产地绞股蓝命名为组 1, 福建产地绞股蓝命名为组 2, 广西产地绞股蓝命名为组 3。结果表明, 当峰 3 ≥ 0.3 时, 样品即为广西产绞股蓝; 当峰 3 < 0.3, 峰 4 ≥ 2.1 时, 样品即为陕西产绞股蓝; 当峰 3 < 0.3, 峰 4 < 2.1 时, 样品即为福建产绞股蓝。

3 讨论

绞股蓝, 别名南人参、五叶参等, 整个世界范围内拥有绞股蓝品种为 16 种 2 变种, 而在我国就有 14 种 2 变种的绞股蓝。它多数生长在 300~3 200 m 的山谷和其他潮湿的地方^[12]。在我国, 绞股蓝主要

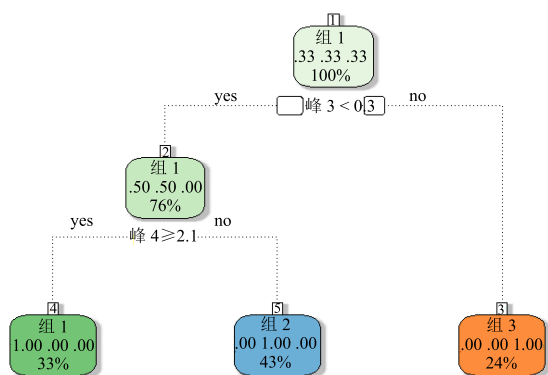


图7 不同产地绞股蓝决策树分析

Fig. 7 Decision tree analysis of *G. pentaphyllum* from different origins

生长在陕西平利县、湖北省的神农架、广西省的金秀县等位于秦岭和长江以南的地区,其中陕西平利被列为中国绞股蓝的原产地。此外,在平利县的境内广泛分布中国少见的富硒岩层,平利是绞股蓝的自然分布分化中心,著有“绞股蓝故乡”之称,独特的区域小生态环境十分适宜绞股蓝的生长发育,是中国开发最早、规模最大的绞股蓝人工栽培基地县、国家绞股蓝标准化示范区。2004年12月13日国家质检总局对平利绞股蓝实施原产地域保护(公告2004年第189号),平利绞股蓝成为了中国国家地理标志产品^[13]。

因此,平利绞股蓝内含丰富,有效成分含量高,且分支密集,富含锌硒等多种微量元素,食用保健功效明显优于其他产区。由于陕西平利所产的绞股蓝茶叶因天然富硒而著称,也是目前唯一的一个“全国富硒茶产业知名品牌创建示范区”。目前,平利县绞股蓝产品以纯天然、无公害和富含微量元素走俏日本和中国北京、上海、广州等市场。本研究建立绞股蓝皂苷的HPLC-MS指纹图谱可快速鉴别区分不同来源的绞股蓝药材,通过指纹图谱对绞股蓝药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材质量,促进绞股蓝药材及其制剂研制水平和质量控制的全面提高。

液质-联用技术是将色谱法良好的分离能力与波谱法特有的结构鉴别能力相结合,如GC-MS、LC-MS、LC-MS/MS等可提供丰富的多维信息,更适合于中药复杂体系分析的要求,已成为非常有效的药物分离、鉴定和建立表征图谱的手段。本研究通过LC-MS获得其质谱信息,可以更全面地了解样品的特点,提高科研效率,为后续单体化合物的分离提供指导作用,进而缩短科研周期。

绞股蓝中含有多种化学成分,简单测定一个或

几个有效成分的量已不能全面地反映药材的质量,而仅仅运用一两种方法也不能十分准确的区分不同产地,因此运用多种分析方法建立全面、系统、特征性的表征图谱,是区分不同产地绞股蓝的有效方法。绞股蓝的主要活性成分为皂苷类化合物,其成分不同或含量发生变化直接影响药材质量,甚至可以显示不同的生物活性。因此,本研究运用不同的数据处理方法对绞股蓝皂苷进行分析,最终发现仅用峰4、3两个变量就可以区分不同产地绞股蓝,其中峰4对区分陕西产绞股蓝具有决定性作用,可作为产地标识重要特征,有待进一步进行该化合物的分离与结构确定。鉴于本实验所采用的同一产地的绞股蓝药材多为绞股蓝基地药材,地域性不强,所以要对绞股蓝药材进行全面的质量标准的研究,还需要扩大样本量,且如何运用更少的变量、快速、准确地区分不同产地绞股蓝仍需要进一步的探究。

参考文献

- [1] 陈建国. 绞股蓝与其混淆品乌莓的本草考释 [J]. 中草药, 1990, 21(9): 40-42.
- [2] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社出版, 1985.
- [3] 赵国平, 戴慎, 陈仁寿. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [4] Chen D J, Liu H M, Xing S F, et al. Cytotoxic activity of gypenosides and gynogenin against non-small cell lung carcinoma A549 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(1): 186-191.
- [5] 邢韶芳, 陈道金, 刘慧敏, 等. 壮药“国虾薄”(绞股蓝)热处理产物中人参皂苷 Rg_3 的分离与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 120-124.
- [6] 张涛, 袁弟顺. 中国绞股蓝种质资源研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(3): 459-461.
- [7] Huang T H, Razmovski-Naumovski V, Salam K, et al. A novel LXR- α activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Biochem Pharm*, 2005, 70(9): 1298-1308.
- [8] Yang X R, Xu F, Li D P, et al. Metabolites of siamenoside I and their distributions in rats [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 176-183.
- [9] Liu X, Ye W, Mo Z, et al. Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(7): 1147-1151.
- [10] Liu X, Ye W, Mo Z, et al. Three dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Plant Med*, 2005, 71(9): 880-884.
- [11] Piao X L, Wu Q, Yang J, et al. Dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum* show fortified activity against A549 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(7): 874-879.
- [12] 朴香兰, 吴倩. 绞股蓝研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1758-1760.
- [13] 刘秀华. 平利绞股蓝产地特征识别技术研究 [D]. 石家庄: 河北大学, 2014.