

# 基于化学计量学的重楼（加格略）生品和蒸制品饮片 HPLC 指纹图谱研究

熊 瑞<sup>1</sup>, 武 娟<sup>1</sup>, 张兴兴<sup>1</sup>, 杨玉婷<sup>1</sup>, 吴珊珊<sup>1</sup>, 王建科<sup>1</sup>, 李 玮<sup>1\*</sup>, 胡昌江<sup>2</sup>

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 构建重楼（加格略）蒸制前后的 HPLC 指纹图谱, 并借助化学计量学手段科学评价其蒸制前后的质量差异。方法 利用 HPLC 建立指纹图谱分析测定方法, 采用相似度软件建立共有模式及确立共有峰, 并运用 SIMCA 14.1、SPSS 26 等软件进行化学计量学分析, 如系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。结果 相似度结果显示, 重楼生品饮片和蒸制品饮片相似度相对较高, HCA 和 PCA 结果显示, 重楼生品饮片及其蒸制品饮片基本能各自聚类, 但仍存在小部分交叉, 而采用 OPLS-DA 模型能有效体现重楼蒸制前后的差异, 并筛选出 12(重楼皂苷 I)、9(重楼皂苷 II)、4(loureiroside) 和 5(未知) 号色谱峰可能是重楼蒸制前后差异性潜在关键性成分。结论 构建的重楼蒸制前后饮片 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的研究可以为完善重楼生、制饮片的质量控制和品质评价提供参考, 为民族药炮制的临床用药研究奠定基础。

**关键词:** 重楼（加格略）; 蒸制; 指纹图谱; 化学计量学; 正交偏最小二乘-判别分析; 系统聚类分析; 主成分分析; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; loureiroside

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5663-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.009

## HPLC fingerprint analysis of crude and steamed *Paridis Rhizoma* (jab gib liod) based on chemometrics

XIONG Rui<sup>1</sup>, WU Juan<sup>1</sup>, ZHANG Xing-xing<sup>1</sup>, YANG Yu-ting<sup>1</sup>, WU Shan-shan<sup>1</sup>, WANG Jian-ke<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, HU Chang-jiang<sup>2</sup>

1. College Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To establish the HPLC fingerprint of Chonglou (*Paridis Rhizoma*) before and after steaming processing, and to evaluate the difference between processed products by chemometrics. **Methods** The chromatographic fingerprint analysis was carried out respectively by HPLC, and the common pattern was conducted by similarity evaluation. In addition, for quality evaluation, the results were taken to perform the chemometric analyses, such as hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA), by using SIMCA 14.1, SPSS 26, and other software. **Results** The similarity evaluation results indicated that the crude *Paridis Rhizoma* and the steamed *Paridis Rhizoma* could have high similarity. The HCA and PCA results showed the processed products could be basically cluster separately, but there was still crossover. The applied OPLS-DA results showed the processed products could be ideally classified by five characteristic peaks (12-chonglou saponin I, 9-chonglou saponin II, 4-loureiroside, 5-unknown). These chromatographic peaks can be used as potential key quality markers for the difference before and after steaming. **Conclusion** The establishment of HPLC fingerprint combined with chemometrics could be considered as a comprehensive reference and powerful strategy for quality evaluation of *Paridis Rhizoma* and lay the foundation for the further clinical medicine research of ethnic medicine processing.

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 2020 年度贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题 (QZYY-2020-011); 2020 年贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教合 KY 字[2021]200); 2021 年度贵州省基础研究项目 (自然科学类) (黔科合基础-ZK[2022]一般 496); 贵州中医药大学博士启动基金项目 (2019[48]号); 国家自然科学基金面上项目 (81773899)

作者简介: 熊 瑞 (1991—), 女, 讲师, 主要从事中药、民族药炮制工艺、质量标准及炮制原理研究。E-mail: rui342296918@163.com

\*通信作者: 李 玮 (1964—), 男, 硕士生导师, 主要从事中药炮制学的教学和科研工作。E-mail: 3158433860@qq.com

**Key words:** *Paridis Rhizoma* (jab gib liod); steaming processing; fingerprint; chemometrics; orthogonal partial least square discriminant analysis; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; chonglou saponin I; chonglou saponin II; loureiroside

重楼药材的基原主要来自于百合科重楼属植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎<sup>[1]</sup>。重楼作为中药使用时,以生品饮片入药,归属于清热药,具有清热解毒、消肿止痛和凉肝定惊的作用,用于疮痍肿痛、咽喉肿痛、蛇虫咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等疾病的治疗。在苗医药中,重楼被称之为加格略,采用蒸制的炮制方法后使用。《贵州苗药·兴仁卷》<sup>[2]</sup>及《苗乡采药习俗与方法》<sup>[3]</sup>等苗药相关书籍中记载了重楼采用蒸制的炮制方法用于治疗胃痛、胃溃疡、十二指肠溃疡等胃肠性疾病,同时贵州民间食疗亦有与糯米共蒸后打粉服用,用于治疗如胃痛、胃溃疡及十二指肠溃疡等病的习惯,表明蒸制后的重楼在治疗消化系统相关疾病具有较大潜力,但目前对于重楼蒸制工艺、质量控制、蒸制前后化学成分变化等相关研究基础较薄弱。

指纹图谱技术,可以系统地反映中药或民族药化学成分整体成分信息(组成及含量分布状况),从而成为一种质量控制模式广泛应用于中药或民族药内在质量的客观评价。随着数据挖掘技术的发展,指纹图谱结合化学计量学分析已广泛应用于中药及民族药的质量评价及差异标记物的筛选<sup>[4-6]</sup>。因此,本实验通过运用 HPLC 技术构建蒸制前后重楼的指纹图谱,并结合相似度分析(similarity analysis, SA)以及化学计量学中多元统计分析的模式识别方法如系统聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)进行模式识别和差异性成分的筛选,用于重楼生品饮片与蒸制品饮片的差异比较,以期为重楼不同炮制饮片的质量标准的建立提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Shimadzu 高效液相色谱仪,配备 Essentia LC-16×2 泵, SIL-16 自动进样器, CTO-16L 柱温箱, Essentia SPD-16 紫外分光光度检测器, DGU-20A 脱气机, CBM-20A 控制器, 岛津仪器苏州有限公司;

Waters Xevo G2-S QToF 质谱系统, 美国 Waters 公司; JFD-300T 型粉碎机, 武义海纳电器有限公司; WP-UP-WF-20 型超纯水机, 四川沃特尔水处理设备有限公司; SK8200LHC 型超声波清洗器, 上海科导超声仪器有限公司; ME204E 型万分之一天平, 0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; LE403E 型千分之一天平, 1 mg, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

### 1.2 试剂与试药

甲醇, 分析纯, 成都金山化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 流动相用水为超纯水。对照品重楼皂苷 I (批号 MUST-20111714, 质量分数 98.82%)、重楼皂苷 II (批号 MUST-21062804, 质量分数 98.97%)、重楼皂苷 VI (批号 MUST-21090811, 质量分数 98.43%)、重楼皂苷 VII (批号 GZDD-0606, 质量分数 98.72%), 成都曼思特生物科技有限公司; 重楼皂苷 V, 批号 DST190513-252, 质量分数 ≥ 98%, 成都德思特生物技术有限公司。

### 1.3 药材

收集的重楼原药材信息见表 1, 经由贵州中医药大学中药鉴定教研室谢军丽讲师鉴定, 基原均为《中国药典》2020 年版<sup>[1]</sup>中收载品种百合科重楼属植物云南重楼 *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. Mazz. 的干燥根茎, 且均符合《中国药典》2020 年版相关规定。

## 2 方法与结果

### 2.1 重楼饮片的制备

#### 2.1.1 重楼生品饮片制备 分别取重楼各批次原药

表 1 重楼原药材采购信息及编号

Table 1 Information of *Paridis Rhizoma*

| 编号 | 产地     | 采收时间    | 编号  | 产地    | 采收时间    |
|----|--------|---------|-----|-------|---------|
| Y1 | 云南昭通   | 2020-11 | Y7  | 云南丽江  | 2020-07 |
| Y2 | 云南楚雄   | 2020-09 | Y8  | 云南文山  | 2021-01 |
| Y3 | 贵州惠水   | 2020-11 | Y9  | 贵州小贞丰 | 2020-10 |
| Y4 | 贵州普安   | 2020-11 | Y10 | 云南罗平  | 2020-12 |
| Y5 | 贵州兴义安龙 | 2020-07 | Y11 | 贵州紫云  | 2020-11 |
| Y6 | 贵州安顺   | 2020-09 |     |       |         |

材(Y1~Y11),净制后,加入83%蒸馏水闷润至透心,切片(2~4 mm),46℃鼓风烘干至完全干燥,即得生品饮片(编号S1~S11)。

**2.1.2 重楼蒸制品饮片制备** 分别取重楼各批次原药材(Y1~Y11),净制后,加入83%蒸馏水闷润至透心,切片(2~4 mm),再经常压蒸制87 min,46℃鼓风烘干至完全干燥,即得蒸制品饮片(编号P1~P11)。

## 2.2 供试品溶液的制备<sup>[7]</sup>

将制备好的重楼生品饮片和蒸制品饮片粉碎,过筛。取过4号筛粉末约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密量取甲醇10 mL,称定质量,超声处理(功率250 W、频率35 kHz)30 min,取出冷却,称定质量后用甲醇补足减失的质量,摇匀滤过,取续滤液过0.45 μm有机微孔滤膜后作为供试品溶液。

## 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品(重楼皂苷VII、II、I、VI、V)约10 mg,加甲醇溶解,并定容至10 mL,作为储备液。分别量取适量该5种对照品储备液,配制成一定质量浓度的混合对照品溶液。

## 2.4 色谱条件

色谱柱为Inertsustain C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),采用超纯水和乙腈作为流动相,进行梯度洗脱:0~11 min,20%~25%乙腈;11~14 min,25%~28%乙腈;14~24 min,28%~32%乙腈;24~34 min,32%~38%乙腈;34~43 min,38%~42%乙腈;43~49 min,42%~45%乙腈;49~64 min,45%乙腈;64~90 min,45%~70%乙腈;检测波长为203 nm;柱温为30℃;体积流量为0.8 mL/min;进样量为15 μL;分析时间为90 min。

## 2.5 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子模式采集;扫描范围质荷比( $m/z$ )为50~1500;低能量碰撞电压为6 V;低能量碰撞电压为20~60 V;毛细管电压为3000 V;锥孔电压为40 V;离子源温度为120℃,辅助喷雾电离与去溶剂气体为高纯度N<sub>2</sub>;去溶剂化温度500℃;锥孔气体流量90 L/h;去溶剂化气体流量800 L/h。

## 2.6 指纹图谱方法学考察

**2.6.1 精密度试验** 取S1批次样品粉末,依照“2.2”项下所述方法制备供试品溶液,并按“2.4”项下色谱条件下测定,连续进样6次,记录测定结

果。图谱中第12号色谱峰响应值相对较高,出峰较稳定且分离度较好,故以其为参照计算其他主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果计算所得主要共有峰的相对保留时间的RSD均小于1%,相对峰面积的RSD均小于3%,表明仪器精密度高,符合指纹图谱技术测定要求。

**2.6.2 重复性试验** 取6份平行的S1批次样品粉末,精密称定,依照“2.2”项下所述方法制备供试品溶液,并按“2.4”项下色谱条件下测定,记录测定结果,以第12号峰为参照,计算各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果测得各共有峰相对保留时间的RSD均小于2%,相对峰面积的RSD均小于3%,表明方法重复性良好,符合指纹图谱检测要求。

**2.6.3 稳定性试验** 取S1批次样品粉末,精密称量,依照“2.2”项下所述方法制备供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件测定,分别于0、1、2、4、8、12、24 h进样,记录测定结果,以第12号峰为参照,计算各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果测得各主要共有峰相对保留时间的RSD均小于2%,相对峰面积的RSD均小于3%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.7 蒸制前后重楼 HPLC 指纹图谱的建立和相似度评价

**2.7.1 指纹图谱的建立** 取蒸制前后的重楼饮片共22批次粉末,依照“2.2”项下所述方法制备相应供试品溶液,并按“2.4”项下指纹图谱色谱条件下分别进样,记录色谱图,借助Origin Pro(version 2021,美国)作图,结果如图1所示。

**2.7.2 指纹图谱共有模式的建立及共有峰的标定** 将指纹图谱结果分别导入国家药典委员会相似度评价软件《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(version 2012)软件中,分别以S1号和P1号色谱图为参照指纹图谱,采用中位数法,时间窗宽度设为0.8 min,经多点校正及全谱峰匹配后分别生成11批重楼蒸制前后指纹图谱的共有模式(图2、3),其中重楼生品饮片共有模式图谱主要色谱峰为13个,蒸制品共有模式图谱共有主要色谱峰9个。

**2.7.3 相似度评价<sup>[8-10]</sup>** 11批蒸制前后重楼指纹图谱的相似度结果分别见表2、3,不同批次重楼生品饮片指纹图谱与其生成对应的对照图谱的相似度结果均大于0.8,蒸制品与其生成对应的对照图谱的相似度结果亦大于0.8,分别表明11个批次的重楼生

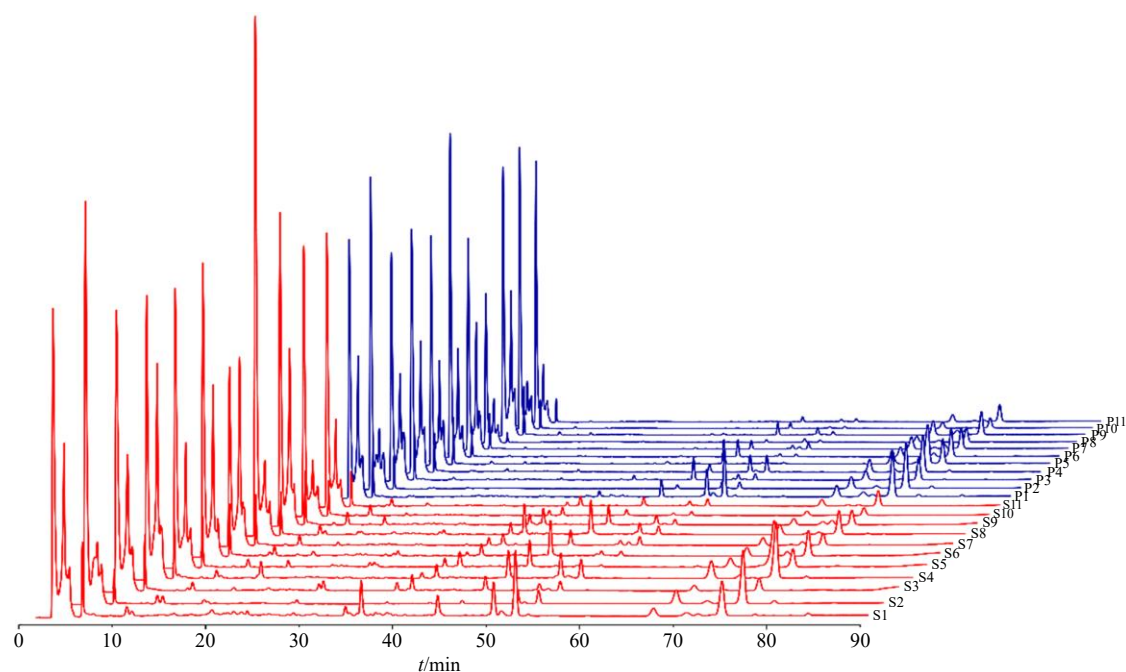


图 1 22 批次蒸制前后重楼 HPLC 指纹图谱叠加图

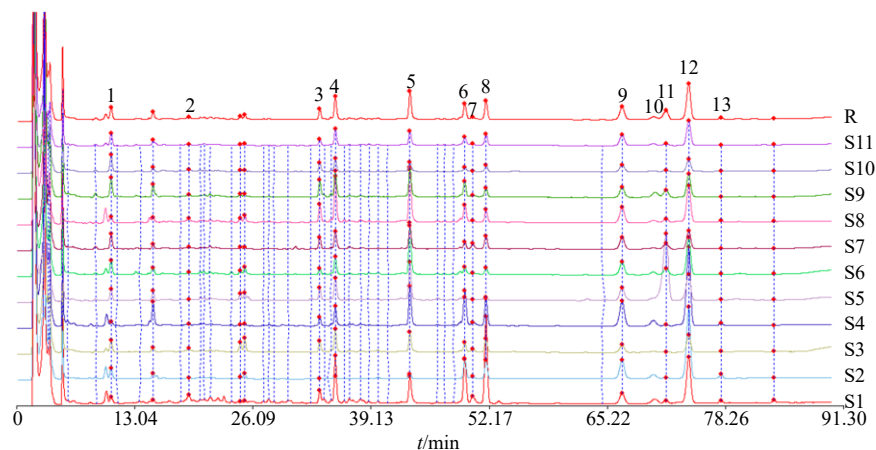
Fig. 1 HPLC fingerprints of 22 batches of crude and steamed *Paridis Rhizoma* samples

图 2 11 批重楼生品饮片 (S1~S11) 指纹图谱及其共有模式 (R)

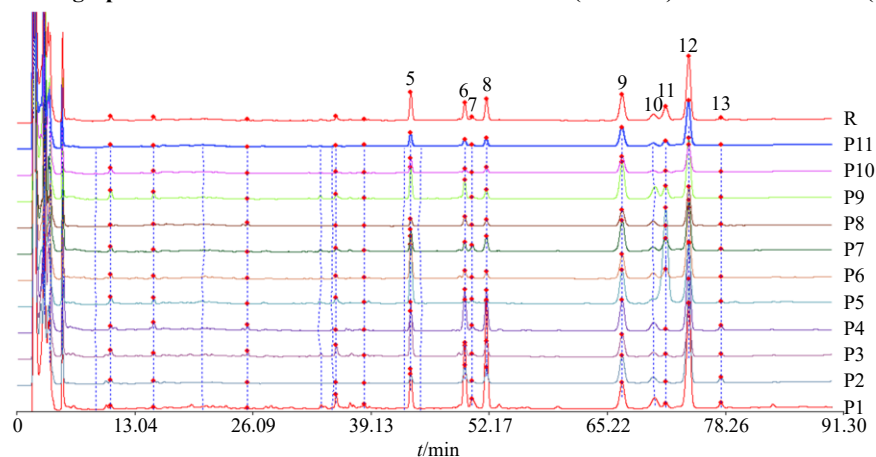
Fig. 2 Fingerprints of 11 batches of crude *Paridis Rhizoma* (S1—S11) and mutual mode (R)

图 3 11 批重楼蒸制品饮片 (P1~P11) 指纹图谱及其共有模式 (R)

Fig. 3 Fingerprints of 11 batches of steamed *Paridis Rhizoma* (P1—P11) and mutual mode (R)

表 2 11 批重楼生品饮片相似度分析结果

Table 2 Results of similarity analysis between 11 batches of crude *Paridis Rhizoma*

| 样品     | 相似度   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 对照指纹图谱 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|        | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | S11   |        |
| S1     | 1.000 | 0.891 | 0.966 | 0.960 | 0.909 | 0.970 | 0.944 | 0.914 | 0.965 | 0.913 | 0.950 | 0.965  |
| S2     | 0.891 | 1.000 | 0.913 | 0.834 | 0.880 | 0.904 | 0.784 | 0.972 | 0.895 | 0.972 | 0.961 | 0.945  |
| S3     | 0.966 | 0.913 | 1.000 | 0.945 | 0.936 | 0.988 | 0.947 | 0.950 | 0.996 | 0.960 | 0.985 | 0.994  |
| S4     | 0.960 | 0.834 | 0.945 | 1.000 | 0.886 | 0.962 | 0.978 | 0.846 | 0.957 | 0.848 | 0.909 | 0.934  |
| S5     | 0.909 | 0.88  | 0.936 | 0.886 | 1.000 | 0.943 | 0.885 | 0.914 | 0.940 | 0.916 | 0.936 | 0.942  |
| S6     | 0.970 | 0.904 | 0.988 | 0.962 | 0.943 | 1.000 | 0.956 | 0.941 | 0.990 | 0.942 | 0.974 | 0.987  |
| S7     | 0.944 | 0.784 | 0.947 | 0.978 | 0.885 | 0.956 | 1.000 | 0.818 | 0.961 | 0.832 | 0.892 | 0.923  |
| S8     | 0.914 | 0.972 | 0.950 | 0.846 | 0.914 | 0.941 | 0.818 | 1.000 | 0.935 | 0.994 | 0.987 | 0.974  |
| S9     | 0.965 | 0.895 | 0.996 | 0.957 | 0.940 | 0.990 | 0.961 | 0.935 | 1.000 | 0.945 | 0.976 | 0.989  |
| S10    | 0.913 | 0.972 | 0.960 | 0.848 | 0.916 | 0.942 | 0.832 | 0.994 | 0.945 | 1.000 | 0.991 | 0.979  |
| S11    | 0.950 | 0.961 | 0.985 | 0.909 | 0.936 | 0.974 | 0.892 | 0.987 | 0.976 | 0.991 | 1.000 | 0.997  |
| 对照指纹图谱 | 0.965 | 0.945 | 0.994 | 0.934 | 0.942 | 0.987 | 0.923 | 0.974 | 0.989 | 0.979 | 0.997 | 1.000  |

表 3 11 批重楼蒸制品饮片相似度分析结果

Table 3 Results of similarity analysis between 11 batches of steamed *Paridis Rhizoma*

| 样品     | 相似度   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 对照指纹图谱 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|        | P1    | P2    | P3    | P4    | P5    | P6    | P7    | P8    | P9    | P10   | P11   |        |
| P1     | 1.000 | 0.883 | 0.951 | 0.853 | 0.881 | 0.920 | 0.936 | 0.894 | 0.943 | 0.852 | 0.890 | 0.940  |
| P2     | 0.883 | 1.000 | 0.914 | 0.934 | 0.904 | 0.966 | 0.919 | 0.986 | 0.918 | 0.971 | 0.987 | 0.974  |
| P3     | 0.951 | 0.914 | 1.000 | 0.877 | 0.917 | 0.975 | 0.984 | 0.943 | 0.996 | 0.912 | 0.932 | 0.977  |
| P4     | 0.853 | 0.934 | 0.877 | 1.000 | 0.853 | 0.900 | 0.852 | 0.908 | 0.868 | 0.921 | 0.922 | 0.929  |
| P5     | 0.881 | 0.904 | 0.917 | 0.853 | 1.000 | 0.925 | 0.920 | 0.909 | 0.923 | 0.884 | 0.909 | 0.940  |
| P6     | 0.920 | 0.966 | 0.975 | 0.900 | 0.925 | 1.000 | 0.980 | 0.990 | 0.980 | 0.972 | 0.982 | 0.994  |
| P7     | 0.936 | 0.919 | 0.984 | 0.852 | 0.920 | 0.980 | 1.000 | 0.960 | 0.992 | 0.919 | 0.939 | 0.977  |
| P8     | 0.894 | 0.986 | 0.943 | 0.908 | 0.909 | 0.990 | 0.960 | 1.000 | 0.951 | 0.983 | 0.992 | 0.987  |
| P9     | 0.943 | 0.918 | 0.996 | 0.868 | 0.923 | 0.980 | 0.992 | 0.951 | 1.000 | 0.918 | 0.937 | 0.979  |
| P10    | 0.852 | 0.971 | 0.912 | 0.921 | 0.884 | 0.972 | 0.919 | 0.983 | 0.918 | 1.000 | 0.993 | 0.969  |
| P11    | 0.890 | 0.987 | 0.932 | 0.922 | 0.909 | 0.982 | 0.939 | 0.992 | 0.937 | 0.993 | 1.000 | 0.984  |
| 对照指纹图谱 | 0.940 | 0.974 | 0.977 | 0.929 | 0.940 | 0.994 | 0.977 | 0.987 | 0.979 | 0.969 | 0.984 | 1.000  |

品饮片和蒸制后的重楼饮片品质均较为一致, 相对稳定。另外, 将蒸制前后重楼分别生成的共有模式图谱分别导入相似度评价软件中, 计算其相似度达到 99.7%, 说明采用相似度评价虽能很好地单独反映重楼生品饮片和蒸制品饮片指纹图谱的相似程度, 但从二者共有模式相似度结果并不能体现出蒸制前后重楼的区分性及质量差异, 采用指纹图谱相似度评价方法无法有效区分重楼生品饮片和蒸制品饮片。尽管指纹图谱中主要峰群的整体面貌相似, 但各色谱峰响应值仍是有区别的, 因此, 需要进一步采用化学计量学可对其差别进行分析。

**2.7.4 共有特征峰的指认** 通过与标准物质的保留时间进行定性对比, 指认出其中 4 个共有色谱峰, 分别为重楼皂苷 VII、II、I、V, 而重楼皂苷 VI 为非共有峰, 典型色谱图见图 4。并进一步采用“2.5”项下质谱条件进行 HPLC-Q-TOF-MS 分析, 获取共有峰的液质联用分析数据, 并结合对照品及相关文献报道<sup>[11-14]</sup>, 鉴定了其中 10 个共有峰, 结果如表 4 所示。

## 2.8 化学计量学分析

**2.8.1 HCA<sup>[15-17]</sup>** 系统聚类分析能衡量数据间的相似程度, 相似度越高表现在聚类树状图上相隔愈

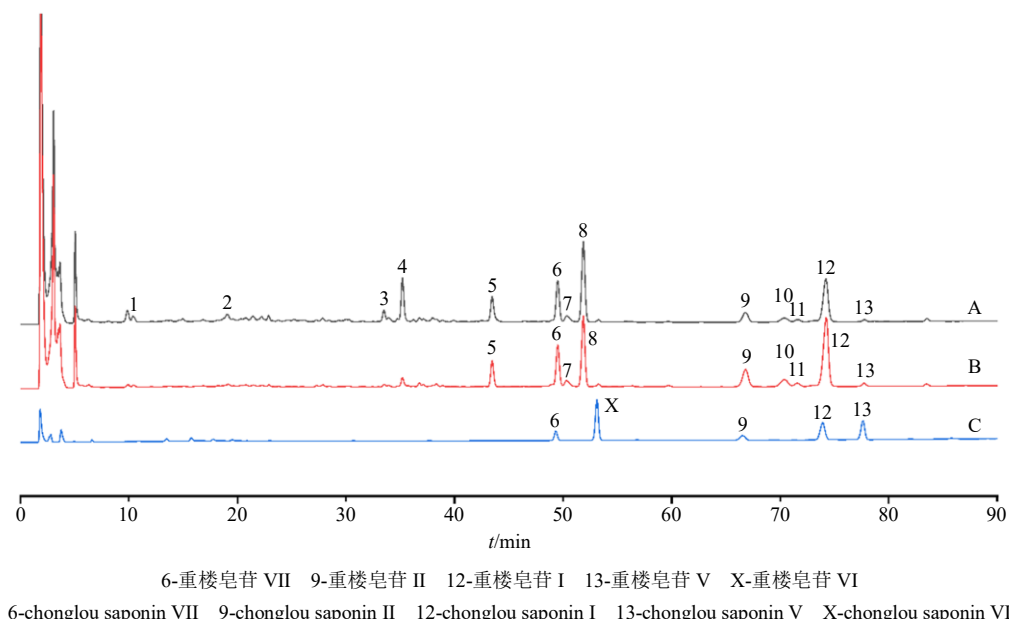


图 4 重楼生品 (A)、蒸制品 (B) 及混合对照品 (C) 典型 HPLC 图

Fig. 4 Representative HPLC chromatograms of the crude *Paridis Rhizoma* sample (A), steamed *Paridis Rhizoma* sample (B) and mixed reference substances (C)

表 4 共有峰的鉴定

Table 4 Identification of common peaks

| 峰号 | 分子式                                             | 准分子离子峰[M+H] <sup>+</sup> (m/z) |              | 误差/<br>(×10 <sup>-6</sup> ) | (+) MS and MS <sup>E</sup> (m/z)                 | 鉴定结果                                     |
|----|-------------------------------------------------|--------------------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|
|    |                                                 | 实测值                            | 理论值          |                             |                                                  |                                          |
| 1  | C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>22</sub> | 803.223 21                     | 803.224 05   | -1.05                       | 120.081 06, 166.086 21, 803.220 50               | NA                                       |
| 2  | C <sub>51</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub> | 899.423 94                     | 899.421 23   | 3.01                        | 899.423 94, 753.365 78, 621.324 00               | NA                                       |
| 3  | C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> O <sub>25</sub> | 1 177.597 48                   | 1 177.600 04 | -2.18                       | 1 177.597 48, 885.482 78, 1 031.539 41           | pseudoproto Pb <sup>[11]</sup>           |
| 4  | C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> O <sub>21</sub> | 1 017.524 29                   | 1 017.526 49 | -2.16                       | 1 017.524 29, 739.425 08, 885.482 60, 577.322 69 | loureiroside <sup>[11]</sup>             |
| 5  | C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>9</sub> | 494.332 08                     | 494.332 36   | -0.61                       | 494.332 08, 658.397 42, 739.225 25               | NA                                       |
| 6  | C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> O <sub>21</sub> | 1 031.539 02                   | 1 031.542 14 | -3.02                       | 1 031.539 02, 413.304 21, 395.293 50             | 重楼皂苷 VII <sup>[12-13]</sup>              |
| 7  | C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>18</sub> | 901.475 67                     | 901.479 14   | -3.86                       | 413.304 16, 353.228 54, 575.356 24               | 12-OH-gracillin 或其异构体 <sup>[12,14]</sup> |
| 8  | C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>17</sub> | 871.466 42                     | 871.468 58   | -2.48                       | 413.304 44, 395.293 65, 575.356 93, 871.466 42   | 重楼皂苷 H <sup>[11-12]</sup>                |
| 9  | C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> O <sub>20</sub> | 1 015.543 91                   | 1 015.547 22 | -3.26                       | 1 015.543 91, 415.320 04, 723.429 64, 397.309 34 | 重楼皂苷 II <sup>[13-14]</sup>               |
| 10 | C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> O <sub>20</sub> | 1 001.528 46                   | 1 001.531 57 | -3.11                       | 1 001.528 46, 415.319 16, 723.427 69             | reclinatoside <sup>[11]</sup>            |
| 11 | C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>17</sub> | 885.480 31                     | 885.484 23   | -4.43                       | 415.319 05, 397.308 43, 885.480 31, 723.428 12   | 纤细薯蓣皂苷 <sup>[12]</sup>                   |
| 12 | C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>16</sub> | 855.472 02                     | 855.473 66   | -1.92                       | 855.472 02, 415.321 99, 397.309 42, 723.429 54   | 重楼皂苷 I <sup>[12,14]</sup>                |
| 13 | C <sub>39</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub> | 723.428 23                     | 723.431 40   | -4.39                       | 397.308 29, 415.318 81, 723.428 23, 253.193 18   | 重楼皂苷 V <sup>[12-13]</sup>                |

NA 表示尚未见报道

NA means that have not been previously reported

近。分别以 11 批不同产地重楼生品饮片 (编号 S1~S11) 和 11 批对应的重楼蒸制品饮片 (编号 P1~P11), 各主要共有峰的峰面积相对于称样量量化后再经标准化处理后的数据作为识别数据集, 采用 SPSS (Version 26, 美国) 软件分析及 Origin Pro (Version 2021, 美国) 作图, 样本间以组间连接法

(average linkage between groups) 连接, 以平方欧氏距离 (squared euclidean distance) 作为距离系数, 对数据集进行系统聚类分析, 输出聚类热图 (图 5)。

结果显示, 除了重楼生品饮片 S5 批次及对应的蒸制品 P5 单独聚为一类, 另外 20 批次重楼饮片可分为 2 大类, 生品饮片 S1~S4 和 S6~S11 聚为

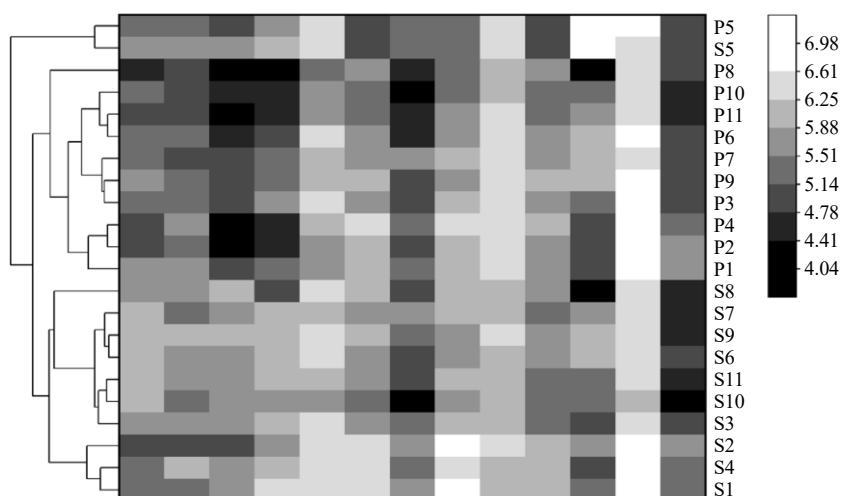


图 5 重楼生品和蒸制品饮片聚类热图

Fig. 5 Hierarchical clustering analysis of the crude and steamed *Paridis Rhizoma* coupled with heatmap

一类, 蒸制品饮片 P1~P4 和 P6~P11 聚为另一类, 聚类结果与重楼饮片类别基本一致, 表明蒸制前后重楼饮片之间是存在质量差异的, 这与其加工炮制有关。另外, 重楼生品饮片 S6、S9、S7 3 批样本聚拢为一类, S10、S11、S3 2 批样本聚拢为一类, S8 样本为一类, S1、S2、S4 3 批样本聚拢为一类, 再结合相似度评价结果, 提示不同批次重楼生品饮片质量存在一定差异, 这可能是由于实验购买的各批次的滇重楼药材分别在产地、生长环境、采收时间存在一定差异性, 而使不同批次的重楼生品饮片聚类呈交叉分布, 说明重楼品质易受到产地、采收时间、年限等诸多因素的影响。

**2.8.2 PCA<sup>[18-19]</sup>** PCA 是可快速表征样本的差异信息的化学计量学方法之一。在构建生、制重楼 HPLC 指纹图谱的基础上, 以蒸制前后各 11 批样本为观察对象 ( $Y$  变量, 编号依次为 S1~S11 和 P1~P11), 在重楼生品饮片及蒸制品饮片各自共有峰中, 选取的主要共有峰 (若蒸制品某一共有色谱峰在生品中未检出, 则在蒸制样品中峰面积记为 0), 共计 13 个色谱峰 (按保留时间依次编号为 1 号峰~13 号峰), 将峰面积相对于称样量量化后再经标准化处理后的数据作为多元变量 ( $X$  变量), 建立  $22 \times 13$  的原始矩阵, 采用 SIMCA (Version 14.1, 瑞典 Umetrics 公司) 统计分析软件以 PCA on X-block 模型进行分析进行统计分析, 以观察其 HPLC 指纹图谱的差异性。由软件进行拟合后, 自动提取了 2 个主成分, 并得到代表样本对自变量累积解释能力模型参数  $R^2_X(\text{cum})=63.6\%$  ( $>0.4$ ) 和对因变量累积解释能力模型参数  $Q^2_Y(\text{cum})=32.7\%$ , 表明 PCA 模

型虽然能解释 63.6%  $X$  变量的变化, 但预测值只有 32.7%, 且从 PCA 二维得分图 (图 6) 可看出, 虽然运用 PCA 可将重楼生品饮片与蒸制品饮片基本上分为 2 类, 但用此分类方法时, 仍存在有样品有一定的交叉。无监督的 PCA 无法很好地区分组间样本, 因此, 为了更加清晰地明确重楼生品和蒸制品差异性, 寻求更适合本实验的模式识别方法, 将进一步运用有监督模式识别算法 OPLS-DA, 对生、蒸重楼样品差异进行评价。

**2.8.3 OPLS-DA<sup>[20-24]</sup>** 在 PCA 的基础上, 进一步通过 OPLS-DA 建立判别模型, 通过交叉验证的方式自动拟合。自变量模型参数  $R^2_X(\text{cum})=97.6\%$  ( $>0.5$ ), 因变量模型参数  $R^2_Y(\text{cum})=88.5\%$  ( $>0.5$ ), 表明模型稳定性及预测力较好, 且远高于 PCA 模型预测值; 累积预测能力参数  $Q^2(\text{cum})=75.7\%$  ( $>0.5$ ), 且  $R^2_Y(\text{cum})-Q^2(\text{cum})<0.3$  (为 0.128), 表明预测模型具有较好的准确性和可靠性。OPLS-DA 得

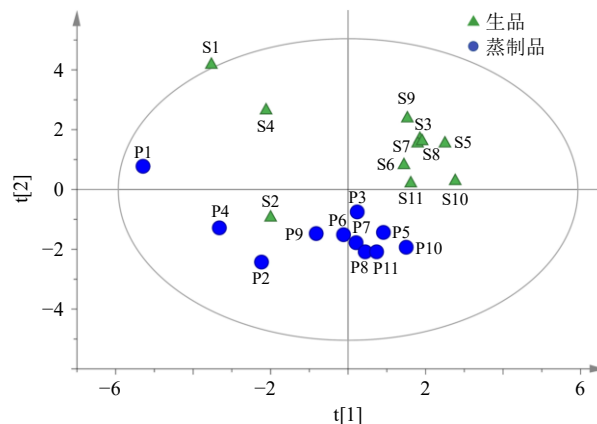


图 6 PCA 二维得分图

Fig. 6 PCA score scatter plot

分图见图 7、8。在得分图中，每个点分别代表各批次样品的均值，各个批次样品间的差异程度可通过点对点的间隔表征。22 批样品中重楼饮片被明显区别成 2 类，以中间轴为界，生品饮片聚集在左侧，蒸制品聚集于右侧，两者分布于不同区域，表明蒸制前后重楼有明显的差别。

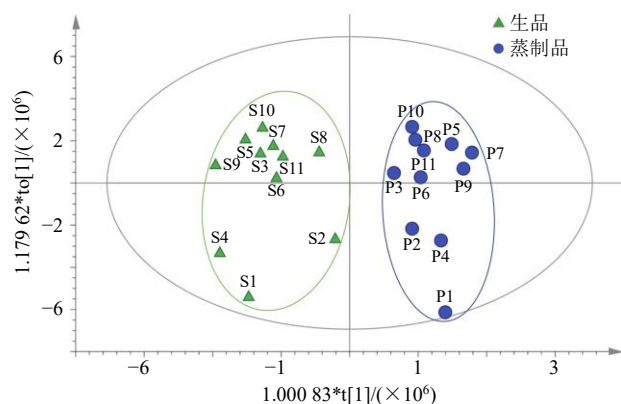


图 7 OPLS-DA 二维得分图

Fig. 7 OPLS-DA score scatter plot

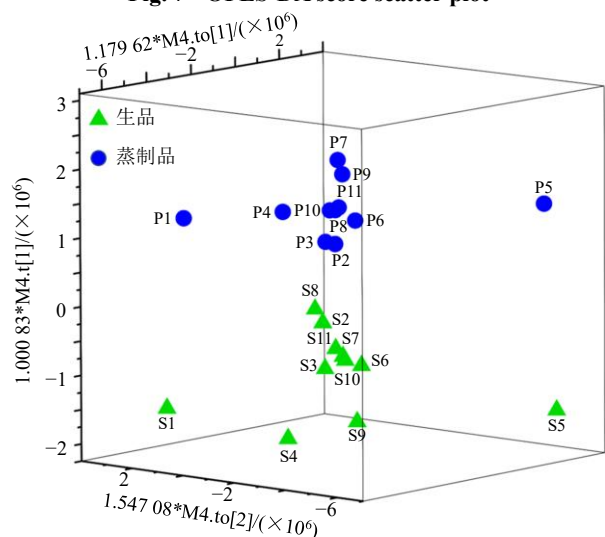


图 8 OPLS-DA 得分 3D 图

Fig. 8 OPLS-DA score scatter plot

除此之外，为了进一步检验模型的有效性或样本间是否有差异，利用 SIMCA 软件对已建立 OPLS-DA 模型进行 200 次迭代的置换检验 (permutation test)，结果如图 9 所示。置换检验图显示代表模型解释能力  $R^2$ 、模型预测能力  $Q^2$  均小于原始值，表明模型未过拟合，稳健可信度较好。综上均表明 OPLS-DA 更适宜作为重楼蒸制前后指纹图谱的模式识别方法。

在载荷散点图 (图 10) 中，图中的点与色谱峰相对应，距离中心点越远的色谱峰对区分样品的贡献作用越大。同时，基于 OPLS-DA 绘制反映贡献

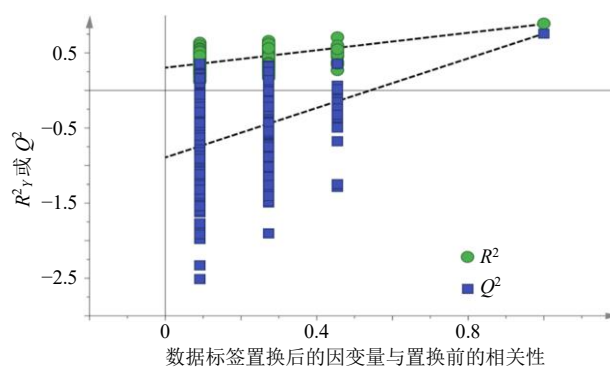


图 9 置换实验验证图

Fig. 9 Permutation plot

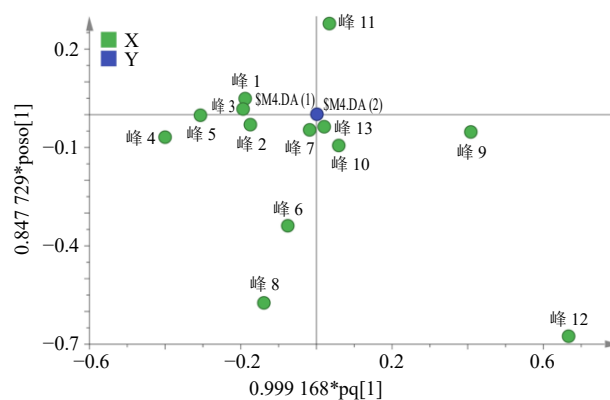


图 10 OPLS-DA 载荷图

Fig. 10 OPLS-DA loading scatter plot

率的 S-plot 图 (图 11)，分布在右上角和左下角离原点越远的点代表区分贡献度越大差异性色谱峰。为了进一步确认对样品分类贡献度较大的色谱峰，采用变量载荷评价参数值 (VIP，图 12) 进行评价，从而辅助筛选质量差异标志峰，在 0.95 的置信区间内，根据  $VIP > 1$  为标准筛选导致差异性的主要色谱峰，结合载荷图可知色谱峰 12 号 (重楼皂苷 I， $VIP=2.40$ )、9 号 (重楼皂苷 II， $VIP=1.47$ )、4 号 (loureiroside， $VIP=1.44$ )、5 号 (未知， $VIP=1.10$ ) 具有较高主成分载荷，在区分蒸制前后重楼起到重

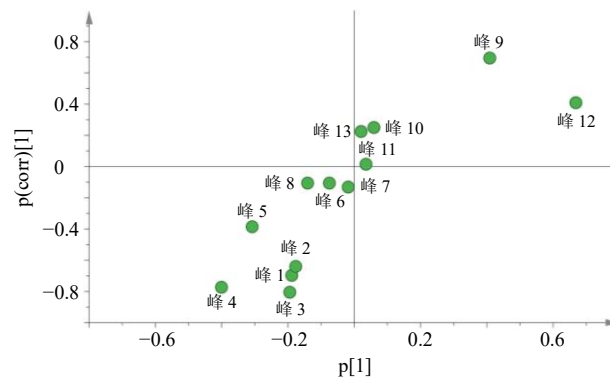


图 11 S-Plot 图

Fig. 11 S-plot diagram

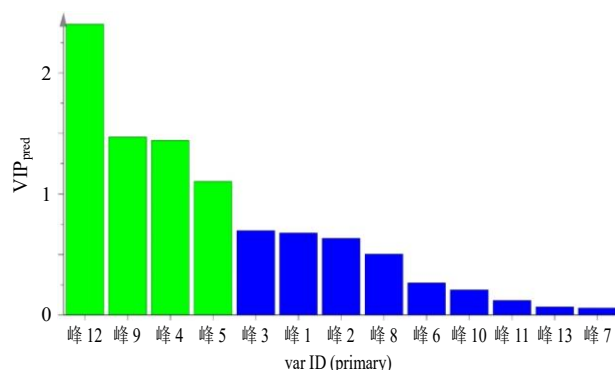


图 12 OPLS-DA 模型中各共有峰的 VIP 值

Fig. 12 VIP values of common peaks in OPLS-DA model

要作用,提示这 4 个色谱峰是有效区别重楼生品饮片和重楼蒸制品饮片的主要差异峰。

### 3 讨论

课题组前期已对重楼的常压蒸制工艺以及重楼指纹图谱供试品提取条件进行了考察和优化,并已通过指纹图谱色谱条件优化(流动相组成、梯度程序、体积流量、进样量等参数)和方法学考察,结果符合指纹图谱的技术要求,确定了指纹图谱条件稳定可靠。

本实验建立了重楼生品饮片及其蒸制品饮片的 HPLC 指纹图谱,通过相似度评价结果及 HCA 结果发现,不同批次重楼生品饮片整体质量相对稳定,但仍存在一定差异,其品质易受到产地、采收时间、年限等诸多因素的影响。另外,生品饮片与蒸制品饮片相似度较高,但可从指纹图谱可以直观看出,重楼生品饮片与蒸制品饮片虽然化学组成基本相同,但含量有所差异,提示重楼在蒸制过程中,某些成分可能发生了降解与转化。同时,进一步结合化学计量学方法,采用了 HCA、PCA、OPLS-DA 3 种模式识别方法分析重楼生品饮片和蒸制品饮片指纹图谱差异,HCA 和 PCA 下重楼生品饮片及其蒸制品饮片基本能聚类,但仍存在小部分交叉,而有监督的 OPLS-DA 模型可有效区别 2 种饮片,最为适合作为重楼蒸制前后指纹图谱的模式识别方法,并筛选出 12、9、4、5 号色谱峰可能是重楼蒸制前后差异的关键色谱峰,蒸制后 4、5 号色谱峰响应值有一定程度降低,12、9 号色谱峰有一定程度提高,而经已有对照品和 LC-MS 分析比对,结合文献分析,12、9、4 号分别为重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和 loureiroside,5 号峰目前未能指认,后续实验将收集更多对照品进行比对以及结合 LC-MS 质谱信息进一步进行指认。

由于重楼蒸制研究目前相对较少,其治疗胃溃疡的药效物质基础尚待进一步研究,指纹图谱结合化学计量学可以从整体上评价生、蒸重楼饮片的质量和明确其差异性,但由于药效作用机制目前尚不明确,为此,后续还将进一步开展药效机制与内在成分间的研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 271.
- [2] 贵州苗药 兴仁卷编委会. 贵州苗药 兴仁卷 (16 开精装本) [M]. 贵阳: 贵州民族出版社, 2014: 15.
- [3] 滕建甲, 黄爱辉. 苗乡采药习俗与方法 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014, 186.
- [4] 郭延生, 华永丽, 杜天玺, 等. 基于化学计量学的 HPLC 指纹图谱在当归炮制品质量控制和识别中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1551-1555.
- [5] 张景丽, 罗霞, 郑林用, 等. 运用色谱指纹图谱与化学计量学方法对灵芝进行分类 [J]. 色谱, 2009, 27(6): 776-780.
- [6] 苏静华, 张超, 孙磊, 等. 指纹图谱结合化学计量学用于香橼品种鉴别的可行性分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2318-2324.
- [7] 张敏, 李玮, 黄颖雪, 等. 加格略(重楼)蒸制前后 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 贵州科学, 2020, 38(4): 38-41.
- [8] 谭树慧, 任卫琼, 刘月新, 等. 不同产地生/醋炙乌药指纹图谱的建立及模式识别研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1803-1809.
- [9] 周冰倩, 高喜梅, 杨颖, 等. 不同来源竹茹药材 HPLC 指纹图谱和化学计量学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 853-857.
- [10] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1345-1353.
- [11] Kang L P, Yu K T, Zhao Y, et al. Characterization of steroidal glycosides from the extract of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by UPLC/Q-TOF MSE [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 235-249.
- [12] 黄圆圆. 15 种重楼属植物根茎的化学成分分析 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [13] Su F, Ye L, Zhou Z L, et al. Study of chemical compositions and anticancer effects of *Paris polyphylla* var. *chinensis* leaves [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2724.
- [14] Qiao X, Qu C, Luo Q M, et al. UHPLC-qMS spectrum-effect relationships for *Rhizoma Paridis* extracts [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 194: 113770.

- [15] 黄紫炎, 沈钱能, 李平, 等. 不同产地葛根饮片的 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2051-2058.
- [16] 何翠敏, 黄伟斌, 邱雨, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析相思子叶质量 [J]. 中成药, 2021, 43(6): 1521-1525.
- [17] 刘兴勇, 邵金良, 陈兴连, 等. 不同陈化年限普洱茶 HPLC 指纹图谱及年份判别 [J]. 分析试验室, 2015, 34(10): 1159-1163.
- [18] 韩忠耀, 曹芳, 江品良, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱和化学模式识别法评价不同采收期水冬瓜树皮药材质量 [J]. 理化检验: 化学分册, 2021, 57(3): 204-209.
- [19] 郭丽, 杨忠杰, 于晓涛, 等. 南、北五味子药材的 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(18): 2224-2229.
- [20] Ma Q D, Chen X X, Zhang K, *et al.* Chemical fingerprint analysis for discovering markers and identifying *Saussurea involucrata* by HPLC coupled with OPLS-DA [J]. *J Anal Methods Chem*, 2020, 2020: 7560710.
- [21] 张梦晨, 谢辉, 陆兔林, 等. 基于指纹图谱、化学计量学、网络药理学的半夏汤洗前后质量评价 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 2897-2908.
- [22] 石丽霞, 李科, 秦雪梅, 等. 基于糖特征图谱的不同柴胡的品种鉴别 [J]. 药学学报, 2020, 55(12): 2968-2975.
- [23] 郭威, 孙蓉, 王亮, 等. 基于指纹图谱和 OPLS-DA 的越南和国产土茯苓差异性化合物探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 62-67.
- [24] 荆文光, 郭晓晗, 李楚, 等. 基于质量源于生产的广藿香质量标志物的确立 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4496-4506.

[责任编辑 郑礼胜]