

不同产地显齿蛇葡萄以及近缘种指纹图谱的建立及有效成分分析

凌伟红¹, 陈 燕², 冯 淼¹, 王超纯¹, 龚慧敏³, 田春莲^{1,3,4*}

1. 吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000
2. 张家界市永定区农业农村局, 湖南 张家界 427000
3. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000
4. 杜仲综合利用技术国家地方联合工程实验室, 湖南 吉首 416000

摘要: 目的 建立显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 以及近缘种的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并对有效成分进行定量分析。方法 使用 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.01%磷酸, 检测波长为 280、360 nm, 体积流量为 1 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C 下梯度洗脱, 建立显齿蛇葡萄以及近缘种 HPLC 指纹图谱, 结合相似度评价、层次聚类分析 (clustering analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 与正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares method-discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别方法, 评价不同产地显齿蛇葡萄及近缘种的质量。结果 建立的 HPLC 指纹图谱方法符合方法学要求, 18 批显齿蛇葡萄属样品指纹图谱有 31 个共有峰, 经对照品定性指认 4、9、11、14、15 和 24 号峰对应的化合物分别为没食子酸、儿茶素、二氢杨梅素、芦丁、杨梅苷和杨梅素, 且相似度>0.8; 所有样品按产地经 CA 分为 2 类, PCA 结果与其一致; OPLS-DA 筛选出不同产地显齿蛇葡萄及近缘种的 13~14 个差异标志物, 以二氢杨梅素和杨梅素为主要差异标志物。结论 建立的指纹图谱方法稳定、可靠、重复性好, 结合化学模式识别可用于作为藤茶原料的蛇葡萄属植物的质量评价。

关键词: 藤茶; 显齿蛇葡萄; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 正交偏最小二乘法-判别分析; 没食子酸; 儿茶素; 二氢杨梅素; 芦丁; 杨梅苷; 杨梅素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5725-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.025

HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Ampelopsis grossedentata* from different producing areas

LING Wei-hong¹, CHEN Yan², FENG Miao¹, WANG Chao-chun¹, GONG Hui-min³, TIAN Chun-lian^{1,3,4}

1. Hunan Key Laboratory of Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China
2. Zhangjiajie Yongding County Agricultural and Rural Bureau, Zhangjiajie 427000, China
3. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China
4. National and Local United Engineering Laboratory of Integrative Utilization Technology of *Eucommia ulmoides*, Jishou University, Jishou 416000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Xianchi Sheputao (*Ampelopsis grossedentata*) and perform chemical pattern recognition. **Methods** The gradient elution was carried out on an Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.01% phosphoric acid, detection at 280 nm and 360 nm, a volume flow rate of 1 mL/min, an injection volume of 20 μL and a column temperature of 30 °C. HPLC fingerprints of *A. grossedentata* and closely related species was established and a combination of chemical pattern recognition methods such as similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), were used to evaluate the quality of *A. grossedentata* and closely related species from different producing areas. **Results** The HPLC fingerprint method was developed in accordance with the methodological requirements, with 31 common peaks from 18 batches of *A. grossedentata*. The peaks 4, 9, 11, 14, 15 and 24 were qualitatively identified as gallic acid, catechin, dihydromyricetin, rutin, myricetrin and myricetin, respectively, and the similarity was more than 0.8. The samples were

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 湖南省科技厅资助项目 (2019NK4164); 林产化工工程湖南省重点实验室开放基金 (LCHG21908)

作者简介: 凌伟红 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事天然产物研发及药物质量控制研究。Tel: 15580542151 E-mail: 1455426685@qq.com

*通信作者: 田春莲, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药、民族药质量控制及新药研发工作。E-mail: tianchunlian1970@163.com

divided into two categories according to different origins through CA and the results of PCA were consistent with it. Moreover, thirteen to fourteen markers of variation were identified in OPLS-DA, with dihydromyricetin and myricetin as the main markers of variation in the different origins of *A. grossedentata* and closely related species. **Conclusion** The established fingerprint method is stable, reliable and reproducible; Combined with chemical pattern recognition, it can be used for the quality evaluation of *Ampelopsis* genus as raw material plant of vine tea.

Key words: vine tea; *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T.; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; gallic acid; catechin; dihydromyricetin; rutin; myricetrin; myricetin

藤茶是由葡萄科 (Vitaceae) 蛇葡萄属 *Ampelopsis* L. 植物的嫩茎叶加工而成, 又称莓茶、甜茶藤、龙须茶和甘露茶^[1]。藤茶是我国南方地方习用类茶, 常用于治疗口腔溃疡、咽喉肿痛、感冒发热、湿热黄疸、目赤肿痛和痈肿疮疖等症状^[2]。藤茶的化学成分、保健属性和功能特性已受到学者的广泛关注, 有望成为预防与高脂肪饮食有关的代谢性疾病的辅助饮食^[3-4]。显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 为主要藤茶加工原料, 富含黄酮类、甾体类、萜类、多酚等有效成分, 其中黄酮类成分抗病毒、抗菌、抗炎、调节免疫等功效显著^[5]。显齿蛇葡萄分布区域广, 主产于湖南、湖北、广东、广西、云南等地^[6], 产地环境及生长条件造成有效成分差异较大。目前, 地方标准仅以二氢杨梅素含量作为质量控制的考察指标, 无法完整反映显齿蛇葡萄内在品质和产地质量差异, 限制了显齿蛇葡萄叶作为新资源食品的应用。因此, 建立一种整体、全面的藤茶植物质量控制方法尤为重要。

化学识别模式结合指纹图谱可将指纹图谱中的有效信息提取, 以获得完整的质量信息, 在中药材鉴别的作用日益凸显^[7-8]。目前, 藤茶 HPLC 指纹图谱研究多为方法学考察, 应用聚类分析 (clustering analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对显齿蛇葡萄分类描述^[4, 9-12], 吴佳等^[13]首次采用 CA、PCA 结合正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares method - discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选其普叶和龙须的 7 个差异性成分。藤茶原料植物为显齿蛇葡萄, 但同属植物广东蛇葡萄与羽叶蛇葡萄也为加工原料^[14], 导致藤茶产品同名异物。因此, 为有效甄别藤茶及其易混品, 从材料源头控制藤茶品质, 本研究采用 HPLC 双波长切换法, 建立藤茶植物定量指纹图谱, 结合相似度评价、CA、PCA、OPLS-DA 等化学识别模式, 鉴别各地用于加工藤茶的 3 种蛇葡萄属植物并筛选差异标志物, 以期对藤茶质量控制、

标准制订提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); FA1004 型万分之一电子天平 (上海舜宇恒平仪器有限公司); EX125DZH 型奥豪十万分之一电子天平 (上海析平科学仪器有限公司); DSA300-GL1 型超声波清洗仪 (福州德森精工有限公司)。

1.2 试药

对照品儿茶素 (批号 200829)、芦丁 (批号 RP190213) 购自成都麦德省科技有限公司; 没食子酸 (批号 202011-201215)、杨梅苷 (批号 202012-201218) 购自中原植提标准品实验耗材中心; 二氢杨梅素 (批号 20190610) 购自中国生物制品检定所; 杨梅素 (批号 L1623059) 购自上海麦克林生化科技有限公司, 质量分数均 >98%。乙腈为色谱纯, 磷酸等其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

1.3 样品

20 批次样品于 2021 年 5 月下旬~6 月初采自湖南、湖北、广西、云南 4 省 18 个产地 (表 1), 经吉首大学廖儒博研究员鉴定 S1~S18 为显齿蛇葡萄 *A. grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang, S19 为羽叶蛇葡萄 *A. chaffanjoni* (Lévl. et Vant.) Rehd., S20 为广东蛇葡萄 *A. cantoniensis* (Hook. et Arn.) Planch. 的 4 年生植物。取长 5~7 cm 的嫩茎叶 50 °C 烘干, 分别粉碎, 过 40 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷、没食子酸、儿茶素、芦丁适量置入 5 mL 量瓶中, 加入 60% 的甲醇溶解并定容, 摇匀, 得 140 µg/mL 没食子酸、10 406 µg/mL 二氢杨梅素、2034 µg/mL 杨梅苷 162 µg/mL 杨梅素、78 µg/mL 儿茶素、126 µg/mL 芦丁的对照品溶液, 按一定梯度稀释, 得不同质量浓度的对照品溶液。

表 1 样品及来源信息

Table 1 Samples and source information

编号	产地	品种	编号	产地	品种
S1	湖南永定三家馆	显齿蛇葡萄	S11	湖南双牌上梧江	显齿蛇葡萄
S2	湖南永定温塘	显齿蛇葡萄	S12	湖南桂东四都	显齿蛇葡萄
S3	湖南永定王家坪	显齿蛇葡萄	S13	湖北来凤绿水	显齿蛇葡萄
S4	湖南永定沅古坪	显齿蛇葡萄	S14	湖北来凤旧司	显齿蛇葡萄
S5	湖南永定茅岩河	显齿蛇葡萄	S15	湖北来凤芭蕉溪	显齿蛇葡萄
S6	湖南永定罗塔坪	显齿蛇葡萄	S16	湖北来凤牛耳坪	显齿蛇葡萄
S7	湖南永定教字垭	显齿蛇葡萄	S17	云南广南者兔	显齿蛇葡萄
S8	湖南桑植桥自湾	显齿蛇葡萄	S18	广西西林古障	显齿蛇葡萄
S9	湖南永顺润雅	显齿蛇葡萄	S19	湖北来凤旧司	羽叶蛇葡萄
S10	湖南双牌孝层场	显齿蛇葡萄	S20	湖北来凤旧司	广东蛇葡萄

2.2 供试品溶液的制备

分别称取 0.1 g 样品于圆底烧瓶, 加入 10 mL 60% 甲醇溶液后称定质量, 超声 45 min, 冷却至室温, 再次称量, 加 60% 甲醇溶液适量补足质量, 过 0.45 μm 滤膜, 4 ℃ 保存, 供试品溶液备用^[11]。

2.3 色谱条件

采用 Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.01% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱 (0~8 min, 5%~15% A; 8~18 min, 15%~24% A; 18~25 min, 24%~40% A; 25~35 min, 40%~50% A); 检测波长: 0~15 min, 280 nm; 15~35 min, 360 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 将含没食子酸、二氢杨梅素、杨梅苷、杨梅素、儿茶素、芦丁的对照品溶液梯度稀释, 得不同质量浓度的对照品溶液, 分别按“2.3”项色谱条件进样, 将对照品溶液的质量浓度与峰面积线性回归, 得回归方程(表 2), 6 种成分的相关系数(R^2)均大于 0.999, 各成分在浓度范围内线性关系良好。

表 2 线性关系数据

Table 2 Linear relationship data

对照品	回归方程	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	R^2
没食子酸	$Y=40.196 X-41.254$	1.40~140.00	0.999 5
二氢杨梅素	$Y=2.041 2 X-56.867$	104.06~10 406.00	0.999 9
杨梅苷	$Y=19.843 X+371.97$	20.34~2 034.00	0.999 6
杨梅素	$Y=33.787 X+142.86$	16.20~162.00	0.999 4
儿茶素	$Y=4.740 8 X-1.009 7$	7.80~78.00	0.999 7
芦丁	$Y=28.98 X-20.225$	1.26~126.00	0.999 8

2.4.2 精密度试验 称取 S2 样品 0.1 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件重复进样 6 次, 记录各共有峰的保留时间及峰面积, 并计算 RSD。结果保留时间的 RSD 为 0.53%~1.42%, 峰面积的 RSD 为 0.78%~1.92%, 仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S2 样品 0.1 g, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.3”项色谱条件进样测定, 记录各共有峰的保留时间及峰面积, 并计算 RSD。结果相对保留时间的 RSD 为 0.89%~1.73%, 相对峰面积 RSD 为 0.61%~1.62%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 称取同一份 S2 样品 0.1 g, 共 6 份, 按“2.2”项方法制备成 6 份供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样, 记录各共有峰的保留时间及峰面积。得出保留时间 RSD 为 0.829%~1.26%, 相对峰面积的 RSD 为 2.24%~4.41%, 表明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 称取 5 份 S2 样品 0.1 g, 按“2.2”项方法制备样品液, 取 500 μL 样品溶液按比例(1:1)加入相应的对照品溶液, 按“2.3”项方法测定, 记录峰面积, 并计算各成分的加样回收率及 RSD。没食子酸、儿茶素、二氢杨梅素、芦丁、杨梅苷、杨梅素的加样回收率结果分别为 104.22%、102.73%、101.73%、96.48%、101.25%、98.76%, RSD 分别为 2.5%、0.6%、2.3%、1.0%、0.5%、1.5%, 表明本方法的加样回收率良好。

2.5 指纹图谱的建立和相似度评价

取 20 批样品供试液 20 μL 按“2.3”项下色谱条件进样, 记录色谱图。将 S1~S18 的色谱图导入

《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版), 以 S1 图谱为参照匹配共有峰, 时间窗宽度设为 0.2 min, 生成叠加图谱, 采用中位数法生成对照指纹图谱^[15]。再将对照、S19、S20 的图谱导入, 并评价相似度。图 1 和图 2 分别为对照指纹图谱及 HPLC 指纹图谱, 标定出 31 个共有峰, 通过与混合对照品出峰时间相匹配, 确认峰 4 为没食子酸、峰 9 为儿茶素、峰 11 为二氢杨梅素、峰 14 为芦丁、峰 15 为杨梅苷、峰 24 为杨梅素。峰 11 保留时间 (16.161 min) 居中、峰面积大且分离度良好, 作

为参照峰计算出样品共有峰相对保留时间 RSD < 0.86%, 说明样品共有峰出峰时间稳定; 但共有峰相对峰面积 RSD 为 21.47%~117.93%, 相差较大, 表明 S1~S20 共有化合物的含量差异较大。样品与对照指纹图谱相似度 (表 3) 分别为 S1~S16 (0.943~0.998), S17、S18 (0.869、0.868), S19、S20 (0.319、0.389), 表明湖南和湖北产显齿蛇葡萄化学成分种类相似度极高, 而广西、云南产显齿蛇葡萄与前 2 个产地有差异, 不同种蛇葡萄属植物化学成分种类差异大。

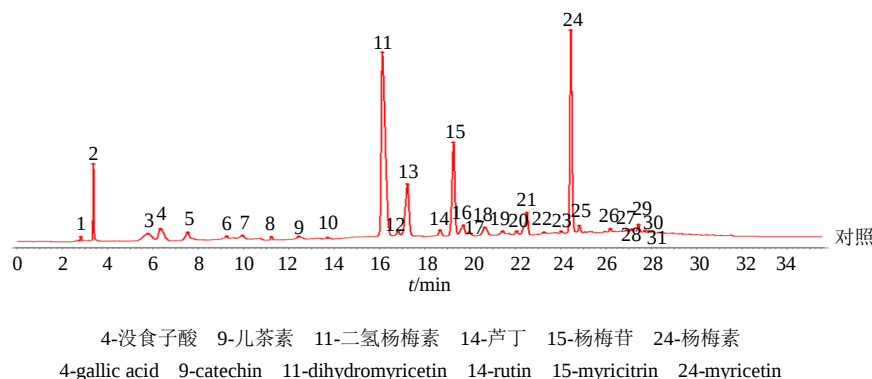


图 1 HPLC 对照指纹图谱 (中位数法)

Fig. 1 Reference HPLC fingerprint of *A. grossedentata* (median method)

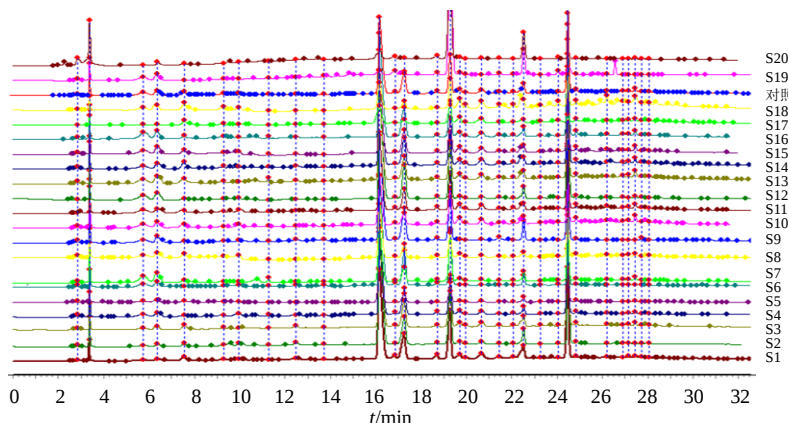


图 2 20 批次样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC fingerprint of 20 batches of samples

表 3 20 批样品与对照图谱的相似度结果

Table 3 Similarity results of fingerprints of 20 batches of raw material plants and reference atlas samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S6	0.970	S11	0.993	S16	0.994
S2	0.966	S7	0.943	S12	0.984	S17	0.869
S3	0.998	S8	0.987	S13	0.995	S18	0.868
S4	0.986	S9	0.994	S14	0.992	S19	0.319
S5	0.995	S10	0.975	S15	0.993	S20	0.389

2.6 化学模式识别研究

2.6.1 聚类分析 (cluster analysis analysis, CA) 以地域及种类将样品分组, 然后以 31 个共有峰相对峰面积为变量, 运用微生信在线绘图 (<http://www.bioinformatics.com.cn>), 采用组间均联法, 选择平方 Euclidean 距离为测度进行系统聚类, 绘制聚类热图^[16]。热图颜色代表归一化后的值, 颜色越红说明共有峰相对峰面积越大, 颜色越蓝表示

共有峰相对峰面积越小。如图 3 所示, 除 S18 外, 其他样品被分为 2 类, S20、S19、S7、S12、S9、S6 聚为第 I 类, 其他聚为第 II 类, 每类又分 2 小类, 第 I 类 S19、S20 单独聚成 1 小类, 显示显齿蛇葡萄与广东蛇葡萄、羽叶蛇葡萄差异较大, 第 II 类中 S13、S14、S16 聚为 1 小类, 说明湖北产显齿蛇葡萄与其他产地不同。同时, 热图显示广西显齿蛇葡萄未知峰 17、6、26、23 的相对峰面积比其他样品高, S19、S20 的 15 号峰杨梅苷相对峰面积高于 S1~S18, S20 未知峰 1、2、21 相对峰面积高于 S1~S18。聚类分析表明, 不同产地来源的显齿蛇葡萄质量与地理差异存在一定相关性, 不同种的蛇葡萄属植物化学成分差异较大。

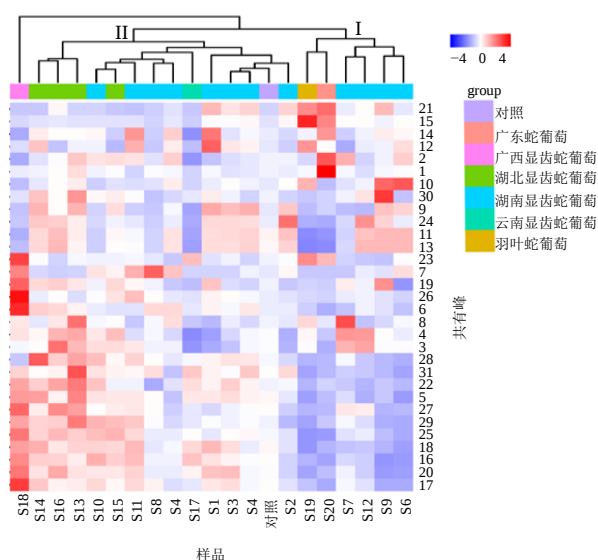


图 3 不同显齿蛇葡萄样品聚类热图

Fig. 3 Hierarchical clustering heat map in samples from different vine tea raw material plants

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SPSS 22.0 系统标准化处理 31 个共有峰峰面积, 对 S1~S20 指纹图谱所得的 6 个共有峰 PCA, 见表 4, 以特征值 > 1 为标准, 提取 8 个主成分 (F1~F8), 累积方差贡献率 90.41% (>80%), 可代表所有样品指纹图谱共有峰的绝大多数信息。主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小及方向, 载荷值越大, 对主成分的贡献越大^[17], 由图 4 可知, 峰 29、18、20、25 对主成分 1 贡献较大, 峰 11、13、23、24 对主成分 2 贡献较大, 除峰 23 对第 2 主成分呈负相关外, 其他均呈正相关。依各主成分贡献率, 按公式计算综合得分值 (F)。

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Characteristic value and variance contribution rate

主成分	特征值	方差比/%	累积贡献率/%
1	11.305 96	36.47	36.47
2	5.102 72	16.46	52.93
3	3.103 24	10.01	62.94
4	2.911 98	9.39	72.34
5	2.185 28	7.05	79.38
6	1.446 59	4.67	84.05
7	1.063 90	3.43	87.48
8	1.005 05	3.24	90.41

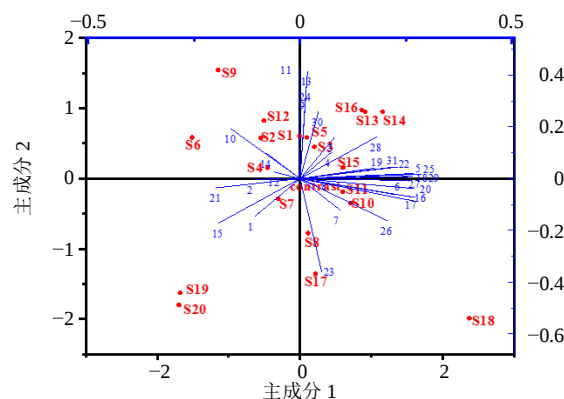


图 4 公共因子得分和载荷散点图

Fig. 4 Scatter plot of factor score and load

$$F = 0.364 7 F_1 + 0.164 6 F_2 + 0.100 1 F_3 + 0.093 9 F_4 + 0.070 5 F_5 + 0.046 7 F_6 + 0.034 3 F_7 + 0.032 4 F_8$$

由表 5 所知, 综合排名前 3 为 S13、S16、S18, 最小是 S19。PCA 与聚类分析结果基本一致。

2.6.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 以指纹图谱 31 个共有峰为变量系数, 参照文献方法^[14]将 31 个共有峰峰面积导入 SIMAC 14.1 软件进行 OPLS-DA, 并绘制散点得分图 (图 5)。S13~S16 分布在中线右侧, S19、S20 在图的左下角, 其结果与 PCA 结果一致。为寻找藤茶植物的差异标志物, 结合 OPLS-DA 模型中变量重要性投影值 (variable importance for the projection, VIP 值) 分析, 以 VIP > 1.0 为阈值, 从不同地域显齿蛇葡萄筛选出 14 个差异标志物 (图 6-A), 影响程度为峰 7 > 峰 28 > 峰 24 (杨梅素) > 峰 26 > 峰 17 > 峰 29 > 峰 9 (儿茶素) > 峰 11 (二氢杨梅素) > 峰 31 > 峰 13 > 峰 22 > 峰 5 > 峰 16 > 峰 23。图 6-B 显示近缘植物羽叶蛇葡萄、广东蛇葡萄、显齿蛇葡萄有 13 个差异标志物, 影响程度为峰 18 > 峰 17 > 峰 29 > 峰 1 > 峰 13 > 峰 31 > 峰 11 (二氢杨梅素) > 峰 10 > 峰 27 > 峰 24 (杨梅素) > 峰 5 > 峰 6 > 峰 28。差异标志物

表 5 主成分得分和综合排名
Table 5 Principal component score and comprehensive score

编号	主成分得分									排名
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F	
S13	1.156	0.952	1.234	2.046	-0.275	-1.119	0.332	-0.957	0.803	1
S16	0.866	0.975	1.063	0.332	0.509	-0.023	-0.099	1.728	0.701	2
S18	2.370	-1.988	-0.104	-1.155	2.313	-0.220	1.104	0.033	0.610	3
S14	0.909	0.955	-0.752	0.870	-0.056	-0.172	-0.924	-0.326	0.441	4
S15	0.602	0.158	0.790	-0.081	-0.364	0.254	0.427	-0.412	0.304	5
S10	0.706	-0.349	0.318	0.534	-0.902	0.603	-0.867	-0.464	0.202	6
S11	0.596	-0.187	-0.683	0.106	-0.100	2.287	-1.260	-0.556	0.167	7
S7	-0.305	-0.287	2.459	0.165	-0.328	-0.050	-0.460	0.096	0.065	8
S5	-0.008	0.603	-0.577	0.015	-0.361	-0.344	0.284	1.242	0.048	9
S1	0.093	0.587	-2.406	0.931	0.955	0.444	-0.585	0.045	0.047	10
S3	0.199	0.452	-1.030	0.177	-0.302	-0.828	0.005	0.845	0.028	11
S12	-0.505	0.827	0.861	-1.304	0.576	0.387	-0.466	1.546	0.009	12
对照	0.030	-0.001	0.091	-0.329	-0.686	-0.044	-0.095	-0.043	-0.066	13
S4	-0.455	0.154	-0.132	-0.498	-0.415	1.479	0.065	-0.161	-0.164	14
S9	-1.148	1.545	0.089	-0.580	1.809	-0.810	0.857	-2.609	-0.175	15
S8	0.111	-0.777	0.263	-1.311	-0.927	0.931	0.663	-0.726	-0.207	16
S2	-0.550	0.577	-0.851	-0.705	-0.685	-1.006	1.787	1.348	-0.247	17
S6	-1.511	0.587	0.068	-1.095	-0.142	0.688	0.003	-0.450	-0.543	18
S20	-1.696	-1.800	-0.027	2.449	0.198	0.921	1.995	0.357	-0.551	19
S17	0.217	-1.357	-0.862	-0.740	-2.162	-1.914	-0.326	-0.970	-0.584	20
S19	-1.677	-1.626	0.186	0.174	1.345	-1.465	-2.443	0.432	-0.887	21

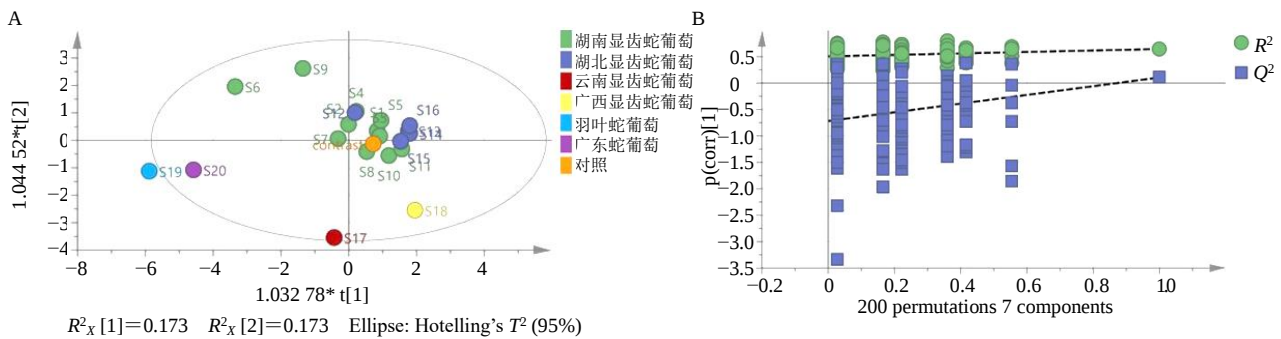


图 5 OPLS-DA 得分散点图 (A) 和 OPLS-DA 置换检验图 (B)
Fig. 5 Scattered point diagram of OPLS-DA (A) and OPLS-DA replacement test chart (B)

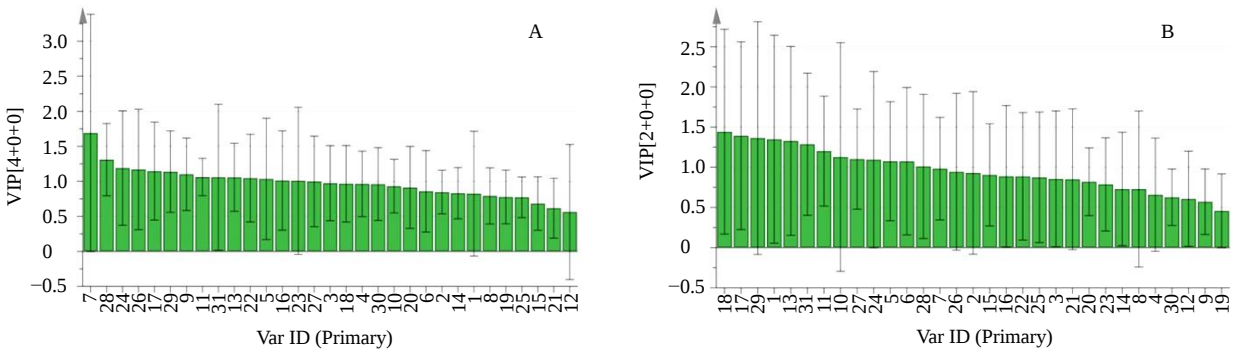


图 6 S1~S18 样品 (A) 和 S19~S20、对照 (B) 各共有峰的 VIP 图
Fig. 6 VIP chart of each component of S1—S18 samples (A) and S19—S20 and contrast (B)

数量见表 6, 显齿蛇葡萄 12~17 个, 3 种蛇葡萄属植物 11~13 个, 为进一步确认差异标志物, 通过计

算各共有峰峰面积占总共有峰峰面积的占比以及各共有峰峰面积的 RSD 值, 可知杨梅素 (峰 24)

表 6 不同样品的差异标志物
Table 6 Differential markers of different samples

样品	差异代谢物共有峰号	总数/个
显齿蛇葡萄(湖南-湖北)	27、29、28、4、3、17、31、16、30、5、7、25、18、20	14
显齿蛇葡萄(湖南-云南)	24、9、13、1、11、23、3、4、31、14、2、22	12
显齿蛇葡萄(湖南-广西)	26、17、23、27、29、16、7、11、6、20、31、5、10、18、28、24、25	17
显齿蛇葡萄(湖北-云南)	24、9、1、3、4、13、2、11、8、14、19、23	12
显齿蛇葡萄(湖北-广西)	26、7、28、23、11、24、9、10、13、17、2、6、14、30	14
显齿蛇葡萄(云南-广西)	26、7、1、6、4、24、13、19、27、8、9、28、29	13
显齿蛇葡萄-羽叶蛇葡萄	18、29、13、31、11、27、5、28、22、24、25、15、20	13
显齿蛇葡萄-广东蛇葡萄	13、17、24、28、11、27、6、25、1、16、18、31、26	13
羽叶蛇葡萄-广东蛇葡萄	18、29、1、31、17、10、5、6、2、22、11	11

与二氢杨梅素(峰 11)占共有峰峰面积比率大且 RSD 值偏高,说明二氢杨梅素和杨梅素是影响显齿蛇葡萄产地差异的主要因素,也是区别其他藤茶原料的主要指标。

2.7 不同产地显齿蛇葡萄及近缘种植物中酚类成分的测定

取 20 批样品粉末各适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中 6 种待测成分的含量,平行操作 3 次,结果见表 7。20 批样品中 6 种成分含量热图见图 7。二氢杨梅素和杨梅素在显齿蛇葡萄含量较高,但杨梅苷含量最低。就各地

区显齿蛇葡萄上述成分含量差异明显,原产地张家界罗塔坪样品中二氢杨梅素含量最高。羽叶蛇葡萄与广东蛇葡萄中杨梅苷含量明显高于显齿蛇葡萄,说明杨梅苷可作为广东蛇葡萄、羽叶蛇葡萄质量评价的主要指标成分。

3 讨论

目前,关于藤茶的质量标准是以二氢杨梅素含量作为藤茶质量判定标准,但中药化学成分复杂多样,有效成分难以一一明确,因此,如何在化学成分不完全明确的前提下对药材进行质量控制十分有必要。而指纹图谱技术与相似度、聚类、主成分分析等化学计量学手段可以用于综合评价中药质量优

表 7 20 批样品 6 种酚类活性成分含量
Table 7 Content of six polyphenol active components in 20 batch of samples

编号	二氢杨梅素/%	杨梅素/%	杨梅苷/%	芦丁/%	儿茶素/%	没食子酸/%
S1	29.014 9	1.040 7	1.031 9	0.824 4	0.308 5	0.041 7
S2	33.137 0	1.907 9	1.138 3	0.340 1	0.255 4	0.051 6
S3	29.971 3	1.068 0	1.000 0	0.371 3	0.275 9	0.075 8
S4	28.204 2	0.603 6	0.741 5	0.584 7	0.160 0	0.077 1
S5	31.027 9	1.117 9	1.133 0	0.563 6	0.310 8	0.098 8
S6	35.731 1	0.579 7	1.060 1	0.475 2	0.237 4	0.089 4
S7	14.867 9	0.425 8	1.058 2	0.312 5	0.072 1	0.167 0
S8	14.874 2	0.361 3	0.433 6	0.312 6	0.085 8	0.094 9
S9	35.420 0	1.120 6	0.910 3	0.492 9	0.264 5	0.102 4
S10	13.894 0	0.430 7	0.686 0	0.466 5	0.102 8	0.116 2
S11	21.193 5	0.573 4	0.681 1	0.733 8	0.093 0	0.079 3
S12	33.411 0	1.627 9	1.113 2	0.417 1	0.058 6	0.161 8
S13	25.795 7	0.893 5	0.684 1	0.460 5	0.290 9	0.152 5
S14	29.793 7	1.173 7	0.662 8	0.496 5	0.289 7	0.104 4
S15	23.744 8	0.627 9	0.639 5	0.312 1	0.225 7	0.140 3
S16	34.809 6	1.146 9	0.753 8	0.456 9	0.175 1	0.146 0
S17	6.179 6	0.049 1	0.357 0	0.148 7	0.026 3	0.029 5
S18	7.773 4	0.295 9	0.513 6	0.222 2	0.077 3	0.116 7
S19	1.313 1	0.105 5	4.139 5	0.407 1	0.069 8	0.106 5
S20	3.194 6	0.050 5	2.761 0	0.736 3	0.101 0	0.065 6

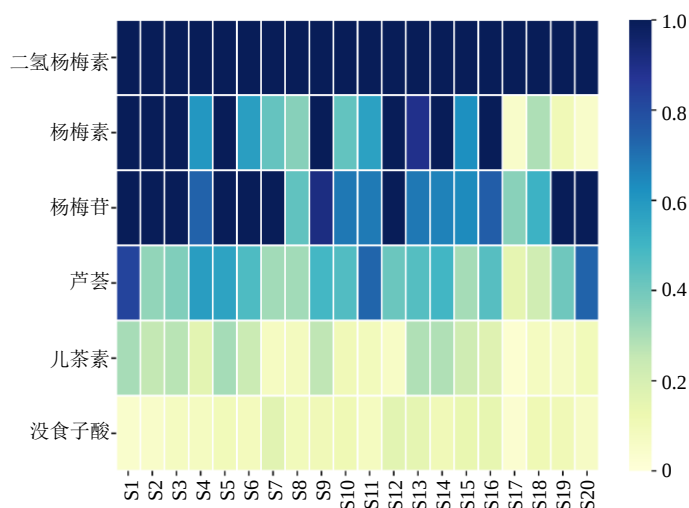


图7 20批样品6种成分含量热图

Fig. 7 Heat map of content of six components in 20 batches of samples

劣,避免了以单一成分含量来评价药品质量好坏的弊端。多酚类化合物抗氧化、抗病毒、抗心脑血管疾病、抗肿瘤等生物活性显著,类黄酮是多酚类化合物的典型代表,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷为3种藤茶植物嫩茎叶的主要化学成分^[13],儿茶素是诠释茶叶保健功能的主要物质基础,具有抗菌、抗突变、抗癌和保护神经系统等功效^[18],儿茶素在藤茶茶多酚中占60%~80%^[19],没食子酸是一种富含于藤茶植物中的多酚类化合物,具有抗癌等多种生物活性^[20]。因此,选用上述成分作为质量评价的主要指标。本研究基于HPLC指纹图谱技术,得到31个共有峰,指认其中6个共有成分,与已报道的显齿蛇葡萄(藤茶)指纹图谱的文献相比^[9,21],本研究得到的共有峰更多,且指认出的成分不仅为黄酮成分,并通过相似度分析初步评价了20批不同样品的相似性。同时,本研究利用PCA和OPLS-DA等化学模式识别分析技术评价了不同藤茶原料植物间的质量差异,初步筛选出了不同产地显齿蛇葡萄及其近缘种的差异性标志物。此外,研究发现羽叶蛇葡萄与广东蛇葡萄中杨梅苷含量明显高于显齿蛇葡萄。因此,该研究可为显齿蛇葡萄、羽叶蛇葡萄与广东蛇葡萄的药材质量标准的建立提供科学依据,并为藤茶植物综合开发提供技术参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册: 补编) [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 246-272.
- [2] 张云坤, 李娟, 黄丹, 等. 中药藤茶化学成分及抗感染作用研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(6): 2012-2022.
- [3] Carneiro R C V, Ye L Y, Baek N, *et al.* Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): A review of chemical composition, functional properties, and potential food applications [J]. *J Funct Foods*, 2021, 76: 104317.
- [4] Zhang Q L, Zhao Y F, Zhang M Y, *et al.* Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11(5): 555-563.
- [5] 刘畅, 邓薇, 刘小英, 等. 藤茶生物活性成分及其制备工艺研究进展 [J]. 食品工业, 2015, 36(4): 233-237.
- [6] 熊皓平, 何国庆, 杨伟丽, 等. 显齿蛇葡萄生化成分分析 [J]. 中国食品学报, 2004, 4(3): 68-71.
- [7] You G J, Li H H, Liu Y N, *et al.* Comparative analyses of *Radix Paeoniae Alba* with different appearance traits and from different geographical origins using HPLC fingerprints and chemometrics [J]. *Chromatographia*, 2020, 83(12): 1443-1451.
- [8] Bai J, Yue P, Dong Q, *et al.* Identification of geographical origins of *Panax notoginseng* based on HPLC multi-wavelength fusion profiling combined with average linear quantitative fingerprint method [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5126.
- [9] 范莉, 侯小龙, 王文清, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在藤茶质量评价中的应用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4076-4081.
- [10] 苏素娇, 李娜, 陈亮, 等. 藤茶的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 144-147.

- [11] 石依姗. 特色民族药材藤茶质量评价及其袋泡茶工艺研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [12] 张朝阳, 马世龙, 秦邦, 等. 野生藤茶资源的鉴别及指纹图谱评价 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2022, 53(2): 188-196.
- [13] 吴佳, 叶文卉, 卢宗元, 等. 藤茶不同部位指纹图谱及其差异研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1507-1514.
- [14] 刘翔, 李紫微, 秦松云. 重庆蛇葡萄属药用植物资源研究 [J]. 资源开发与市场, 2007, 23(6): 517-518.
- [15] 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.
- [16] 张琳琳, 张文婷, 唐登峰, 等. 基于指纹图谱、多指标含量测定及化学计量学的宁心宝胶囊质量评价 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(17): 1425-1431.
- [17] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7616-7623.
- [18] Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1744.
- [19] 李佳川, 李思颖, 王优, 等. 藤茶化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)预测分析 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2021, 47(3): 254-266.
- [20] Tuli H S, Mistry H, Kaur G, *et al*. Gallic acid: A dietary polyphenol that exhibits anti-neoplastic activities by modulating multiple oncogenic targets [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(3): 499-514.
- [21] 汪秋兰, 王文清, 万青, 等. 基于 HPLC-PDA 指纹图谱、化学模式识别及多成分定量分析评价藤茶药材的质量 [J]. 中国药师, 2021, 24(8): 558-565.

[责任编辑 时圣明]