

# 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的不同产地与不同部位川牛膝及其混淆品差异性分析

徐 微<sup>1</sup>, 高必兴<sup>2\*</sup>, 齐景梁<sup>2</sup>, 苟 琰<sup>2</sup>, 汤 敏<sup>1</sup>, 邓 科<sup>1</sup>, 李 倩<sup>2</sup>, 兰志琼<sup>1\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院 现代中药产业学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 四川省药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731

**摘要:** 目的 建立不同产地川牛膝 *Cyathula officinalis* UPLC 指纹图谱, 并与不同部位川牛膝及混淆品进行对比分析。方法 采用 Waters acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 波长为 210 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 4 μL。结合相似度评价、聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别式分析 (orthogonal partial least squares method-discriminant analysis, OPLS-DA) 比较不同产地、不同部位川牛膝及其混淆品的差异。结果 UPLC 指纹图谱共标定了川牛膝 19 个特征峰, 并指认了 2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、杯苋甾酮、滨蒿内酯、2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸 4 个特征峰。通过相似度分析发现, 川牛膝的不同产地、不同部位及混淆品样品均存在一定的差异, CA、PCA、OPLS-DA 可将 62 批样品根据主产地、部位、基原进行区分, 通过 OPLS-DA 项下的投影中的变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 各筛选出 9 个差异性标志物。结论 建立的指纹图谱方法能准确有效区分川牛膝的不同产地、不同部位及其混淆品, 为川牛膝的质量评价及鉴别提供参考。

**关键词:** 川牛膝; UPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 相似度评价; 质量评价; 杯苋甾酮; 滨蒿内酯; 牛膝皂苷I; 牛膝皂苷II; 竹节参皂苷 IVa

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5639-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.025

## Differential analysis of different origins and parts of *Cyathula officinalis* and its adulterants based on UPLC fingerprint coupled with chemical pattern recognition

XU Wei<sup>1</sup>, GAO Bixing<sup>2</sup>, QI Jingliang<sup>2</sup>, GOU Yan<sup>2</sup>, TANG Min<sup>1</sup>, DENG Ke<sup>1</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, LAN Zhiqiong<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, National Medical Products Administration, Sichuan Institute for Drug Control, Chengdu 611731, China

**Abstract: Objective** To establish UPLC fingerprint for different regions of *Cyathula officinalis* and analyze them with *C. officinalis* in different parts and adulterants. **Methods** The UPLC analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) by using a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution in a gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min, with a detection wavelength of 210 nm, and a column temperature of 30 °C and the injection volume of 4 μL. Similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares method-discriminant analysis (OPLS-DA) were utilized to compare the differences among different regions and parts of *C. officinalis* and its adulterants. **Results** The UPLC fingerprints identified 19 characteristic peaks for *C. officinalis*, including four specific compounds:

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: 四川省药品检验研究院院立科研项目 (2024-KYYL-002); 国家药品监督管理局中国药品监管科学行动计划第三批重点项目 (RS2024Z006-075, RS2024Z006-076)

作者简介: 徐 微, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药品种、质量与资源开发研究。Tel: 18382890703 E-mail: 1432209036@qq.com

\*通信作者: 兰志琼, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药品种、质量与资源开发研究。Tel: (028)61800231 E-mail: lanlan1979512@126.com

高必兴, 男, 博士, 副主任中药师, 研究方向为中药及民族药质量研究。Tel: (028)87877141 E-mail: gaobixing@scsjys.org

2-hydroxy-3-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oxy] succinic acid, cyasterone, scoparone, and 2-(benzoyl)-3-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oxy] succinic acid. Similarity analysis revealed distinct differences among samples from various origins, parts, and adulterants of *C. officinalis*. CA, PCA, and OPLS-DA could differentiate 62 batches of samples according to their primary regions, parts, and botanical origins, and OPLS-DA identified nine differential markers through the variable importance in projection (VIP). **Conclusion** The established fingerprint method can accurately and effectively differentiate between various sources and parts of *C. officinalis*, as well as its adulterants, which provides reference for quality evaluation and identification of *C. officinalis*.

**Key words:** *Cyathula officinalis* Kuan; UPLC fingerprints; chemical pattern recognition; similarity evaluation; quality evaluation; cyasterone; scoparone; achyranthes saponins I; achyranthes saponins II; chikusetsusaponin IVa

川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根<sup>[1]</sup>, 是著名川产道地药材。目前川牛膝多为栽培品, 主产于四川、重庆、湖北等地<sup>[2]</sup>。其中四川为传统道地产区, 重庆和湖北为新兴产区, 近年来开始引种。由于各地栽培方式、初加工方式、采收年限、气候、土壤的差异, 各产区川牛膝的质量参差不齐<sup>[3-4]</sup>。因历史引种原因, 目前市场上川牛膝常见混淆品主要来源为同属植物头花杯苋 *C. capitata* Moq. (药材名为麻牛膝) 及两者的自然杂交品种杂牛膝 *C. officinalis* × *C. capitata* (药材名为杂牛膝)<sup>[5]</sup>。研究表明, 川牛膝和麻牛膝、杂牛膝在性状、药理作用、化学成分上均表现出一定的差异<sup>[6-10]</sup>, 麻牛膝和杂牛膝不宜作为川牛膝入药<sup>[11]</sup>。但因麻牛膝和杂牛膝外观形态上与川牛膝十分相似, 市场上存在冒充或掺混出售的现象, 给川牛膝的临床用药安全和道地药材资源开发带来负面影响。此外, 根据课题组前期调研, 发现部分产地存在将川牛膝非药用部位根茎留存晾晒出售的情况, 推测可能会以某种方式流入市场, 值得引起重视, 但目前对于根茎化学成分的研究鲜有报道。因此, 有必要对不同产地、不同部位川牛膝及其混淆品的化学成分差异进行系统分析。

目前已有的研究主要集中在基原鉴别、药材性状、指纹图谱和分子生物学等方面<sup>[7, 11-15]</sup>, 对于川牛膝的指纹图谱结合化学模式识别的文献较少, 且所用样品代表性有一定欠缺, 并不能全面反映药材质量。本研究建立川牛膝 UPLC 指纹图谱, 结合相似度评价与化学模式识别对不同产地、不同部位川牛膝及其混淆品进行区分及系统分析, 并筛选出差异性标志物, 以期为川牛膝药材的质量评价及鉴别提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LC-40B 型超高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); BP211D 型十万分之一电子天平 (德国

Sartorius 公司); XPR26 型百万分之一电子天平 (梅特勒-托利多公司); Milli-Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司); HU-17-008 型超声清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 材料

对照品杯苋甾酮 (批号 111804-201705, 质量分数 97.2%) 购于中国食品药品检定研究院; 滨蒿内酯 (批号 MUST-21062008, 质量分数 ≥99.6%)、竹节参皂苷 IVa (批号 MUST-21102710, 质量分数 ≥99.44%) 均购于成都曼斯特生物科技有限公司; 牛膝皂苷 I (批号 FW2021015-A, 质量分数 ≥98.0%)、牛膝皂苷 II (批号 51161-81-1, 质量分数 ≥98.0%) 均购于成都普思生物科技股份有限公司; 2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸为实验室自制 (质量分数 >98.0%); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 磷酸 (色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

川牛膝 27 批, 为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根; 川牛膝 (根茎) 21 批, 为苋科植物川牛膝 *C. officinalis* Kuan 的干燥根茎; 杂牛膝 4 批, 为杂牛膝 *C. officinalis* × *Cyathula capitata* 的干燥根; 麻牛膝 10 批, 为苋科植物头花杯苋 *C. capitata* Moq. 的干燥根。共计 62 批。所有样品均经四川省药品检验研究院高必兴副主任中药师鉴定为基原准确的样品。样品信息见表 1。其中 GJ1~GJ21 为 C1~C21 对应的根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

分别取 2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、杯苋甾酮、滨蒿内酯、2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、牛膝皂苷 I、牛膝皂苷 II、竹节参皂苷 IVa 对照品适量, 精密称

表 1 62 批样品信息

Table 1 Information table for 62 batches of samples

编号	基原	部位	产地/购买地	编号	基原	部位	产地/购买地
C1	川牛膝	根	湖北省恩施州建始县官店镇白果坝	GJ5	川牛膝	根茎	湖北省恩施州建始县官店镇白果坝
C2	川牛膝	根	湖北省恩施州建始县官店镇官店村	GJ6	川牛膝	根茎	湖北恩施州板桥镇大木村
C3	川牛膝	根	湖北省恩施州建始县官店镇三岔坪	GJ7	川牛膝	根茎	湖北恩施州板桥镇太和土家族乡
C4	川牛膝	根	湖北省恩施州建始县官店镇官店村	GJ8	川牛膝	根茎	湖北恩施州板桥镇林家垭口
C5	川牛膝	根	湖北省恩施州建始县官店镇白果坝	GJ9	川牛膝	根茎	湖北恩施州板桥镇林家垭口
C6	川牛膝	根	湖北恩施州板桥镇大木村	GJ10	川牛膝	根茎	湖北恩施州板桥镇太和土家族乡
C7	川牛膝	根	湖北恩施州板桥镇太和土家族乡	GJ11	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡和平村
C8	川牛膝	根	湖北恩施州板桥镇林家垭口	GJ12	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡顺河村
C9	川牛膝	根	湖北恩施州板桥镇林家垭口	GJ13	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡和平村
C10	川牛膝	根	湖北恩施州板桥镇太和土家族乡	GJ14	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡民主村
C11	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡和平村	GJ15	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡顺河村
C12	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡顺河村	GJ16	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡民主村
C13	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡和平村	GJ17	川牛膝	根茎	四川省乐山市金口河区永胜乡瓦山村
C14	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡民主村	GJ18	川牛膝	根茎	四川省凉山州甘洛县海棠镇
C15	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡顺河村	GJ19	川牛膝	根茎	四川省凉山州甘洛县斯觉镇
C16	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡民主村	GJ20	川牛膝	根茎	四川省凉山州甘洛县斯觉镇
C17	川牛膝	根	四川省乐山市金口河区永胜乡瓦山村	GJ21	川牛膝	根茎	四川省凉山州甘洛县海棠镇
C18	川牛膝	根	四川省凉山州甘洛县海棠镇	Z1	杂牛膝	根	四川省雅安市天全县思经乡
C19	川牛膝	根	四川省凉山州甘洛县斯觉镇	Z2	杂牛膝	根	四川省雅安市汉源县片马乡
C20	川牛膝	根	四川省凉山州甘洛县海棠镇	Z3	杂牛膝	根	四川省凉山州甘洛县海棠镇
C21	川牛膝	根	四川省凉山州甘洛县海棠镇	Z4	杂牛膝	根	四川省雅安市宝兴县永富乡
C22	川牛膝	根	重庆市奉节县新民镇	M1	麻牛膝	根	四川省雅安市宝兴县永富乡
C23	川牛膝	根	重庆市奉节县永乐镇	M2	麻牛膝	根	四川省凉山州普格拿马五道菁乡
C24	川牛膝	根	重庆市奉节县毛草坝村	M3	麻牛膝	根	四川省普格县特尔果乡署机拉达
C25	川牛膝	根	重庆市奉节县太和乡	M4	麻牛膝	根	四川省雅安市宝兴县长富乡中岗村
C26	川牛膝	根	重庆市巫山县红坪村	M5	麻牛膝	根	四川省雅安市宝兴县长富乡中岗村
C27	川牛膝	根	重庆市奉节县太和乡	M6	麻牛膝	根	重庆解放路中药材专业市场
GJ1	川牛膝	根茎	湖北省恩施州建始县官店镇白果坝	M7	麻牛膝	根	重庆解放路中药材专业市场
GJ2	川牛膝	根茎	湖北省恩施州建始县官店镇官店村	M8	麻牛膝	根	成都荷花池中药材专业市场
GJ3	川牛膝	根茎	湖北省恩施州建始县官店镇三岔坪	M9	麻牛膝	根	四川省西昌市城门洞陈姐草药
GJ4	川牛膝	根茎	湖北省恩施州建始县官店镇官店村	M10	麻牛膝	根	四川省西昌市大通门菜市场旁门市

定，置 25 mL 量瓶中加 50%甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得到混合对照品溶液。

### 2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末（过 3 号筛）约 0.5 g。精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 20 mL，密塞，称定质量，超声提取 30 min，功率 500 W，取出，放冷，再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

### 2.3 色谱条件

色谱柱：Waters acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)；流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱：0~22 min, 5%~35% A；22~30 min, 35%~38% A；30~40 min, 38%~60% A；40~45 min, 60%~80% A，45~60 min, 80%~95% A；体积流量为 0.3 mL/min；检测波长为 210 nm；柱温为 30 °C；进样量为 4 μL。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 精密称取 C1 样品, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录各特征峰的保留时间及峰面积, 以 8 号峰 (杯苋甾酮) 为参照峰, 计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.58%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.85%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 精密称取 C1 样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.3”项下色谱条件进行分析, 记录各特征峰的保留时间及峰面积, 以 8 号峰 (杯苋甾酮) 为参照峰, 计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.74%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.93%, 表明该方法的重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 精密称取 C1 样品, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24、36 h 后按“2.3”项下色谱条件进行分析, 记录特征峰保留时间和峰面积, 以 8 号峰 (杯苋甾酮) 为参照峰, 计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD

均小于 1.72%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.82%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

## 2.5 指纹图谱的建立和相似度分析

**2.5.1 川牛膝指纹图谱的建立** 取表 1 中 27 批川牛膝样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件分析。以 C1 为参照图谱, 采用中位数法, 通过多点校正和 Mark 匹配, 生成 27 批川牛膝指纹图谱及对照图谱, 共标定了 19 个特征峰, 见图 1。

**2.5.2 川牛膝根茎及其混淆品指纹图谱分析** 取表 1 中 21 批川牛膝根茎样品及 14 批混淆品样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。将生成的川牛膝对照指纹图谱、川牛膝根茎及其混淆品的色谱图分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件, 分别生成叠加图谱, 见图 2。

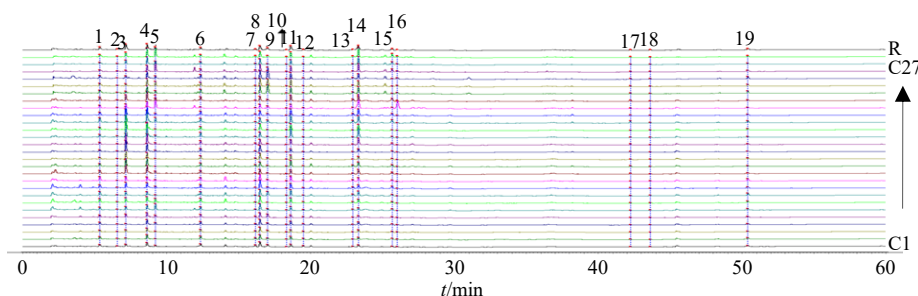


图 1 27 批川牛膝 UPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprints of 27 batches of *C. officinalis* and its reference fingerprint (R)

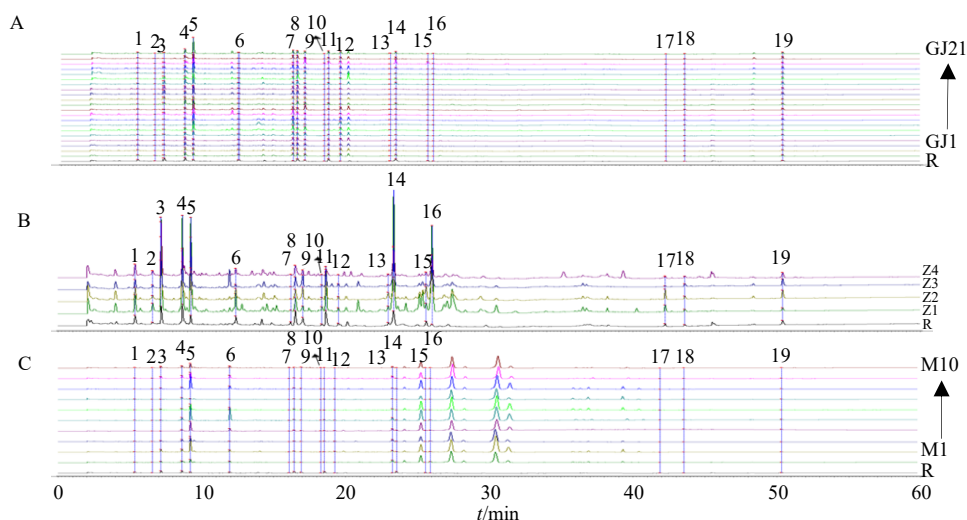


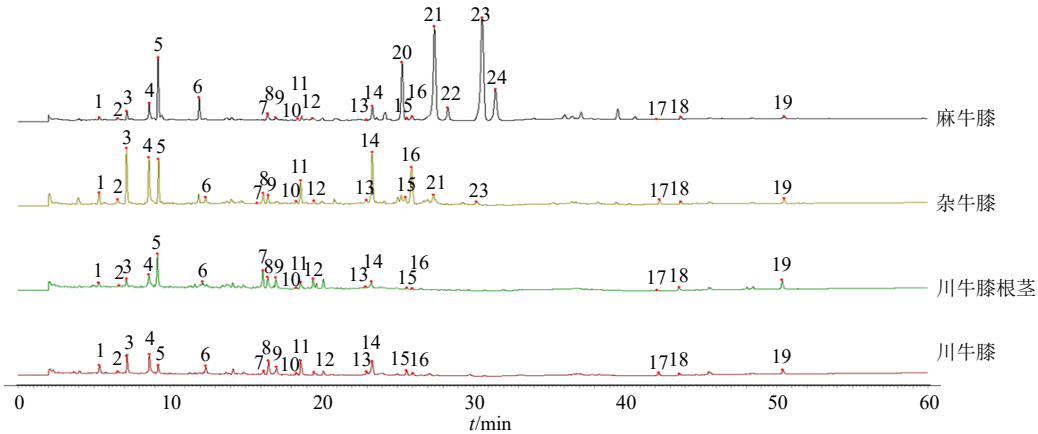
图 2 川牛膝对照指纹图谱 (R) 与川牛膝根茎 (A)、杂牛膝 (B)、麻牛膝 (C) 的 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints of reference fingerprints of *C. officinalis* (R) and rhizomes of *C. officinalis* (A), *C. officinalis* × *C. capitata* (B) and *C. capitata* (C)

**2.5.3 指纹图谱对比分析及特征峰的指认** 与川牛膝对照指纹图谱相比, 杂牛膝多了 21 和 23 号 2 个峰, 麻牛膝多了 20~24 号 5 个峰, 见图 3。通过与对照品色谱图对比, 指认了 7 个特征峰: 4 号峰为 2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、8 号峰为杯苋甾酮, 9 号峰为滨蒿内酯, 14 号峰为 2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸, 21 号峰为牛膝皂苷II, 23 号峰为牛膝皂

苷 I, 24 号峰为竹节参皂苷 IVa。

**2.5.4 相似度分析** 以川牛膝对照指纹图谱为基准, 首先计算不同产地川牛膝样品间的相似度; 然后通过川牛膝对照指纹图谱分析不同部位、混淆品的相似度, 结果见表 2。27 批川牛膝样品相似度范围为 0.776~0.973, 不同产地间川牛膝样品整体化学成分类似, 色谱行为基本一致, 药材质量稳定, 但可能由于受到环境因素影响, 导致药材内在化学



4-2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸; 8-杯苋甾酮; 9-滨蒿内酯; 14-2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸; 21-牛膝皂苷I; 23-牛膝皂苷II; 24-竹节参皂苷 IVa。

4-2-hydroxy-3-[(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl) oxy] succinic acid; 8-cyasterone; 9-scoparone; 14-2-(benzoyl)-3-[(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl) oxy] succinic acid; 21-achyranthes saponins I; 23-achyranthes saponins II; 24-chikusetsusaponin IVa.

图 3 川牛膝对照指纹图谱 (R)、川牛膝根茎、杂牛膝、麻牛膝样品对比图

Fig. 3 Comparison of the reference fingerprints of *C. officinalis* (R), *C. officinalis* rhizome, *C. officinalis* × *C. capitata* and *C. capitata* samples

表 2 62 批样品相似度

Table 2 Similarity of 62 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
C1	0.947	C22	0.901	GJ16	0.766
C2	0.948	C23	0.939	GJ17	0.770
C3	0.962	C24	0.860	GJ18	0.589
C4	0.967	C25	0.862	GJ19	0.759
C5	0.948	C26	0.973	GJ20	0.842
C6	0.935	C27	0.938	GJ21	0.553
C7	0.964	GJ1	0.859	Z1	0.780
C8	0.925	GJ2	0.815	Z2	0.856
C9	0.941	GJ3	0.875	Z3	0.818
C10	0.934	GJ4	0.838	Z4	0.799
C11	0.901	GJ5	0.751	M1	0.756
C12	0.966	GJ6	0.634	M2	0.525
C13	0.951	GJ7	0.638	M3	0.681
C14	0.925	GJ8	0.689	M4	0.514
C15	0.938	GJ9	0.594	M5	0.498
C16	0.921	GJ10	0.682	M6	0.611
C17	0.948	GJ11	0.885	M7	0.773
C18	0.938	GJ12	0.840	M8	0.402
C19	0.972	GJ13	0.762	M9	0.738
C20	0.776	GJ14	0.865	M10	0.760
C21	0.963	GJ15	0.846		

成分及含量存在一定差异,除 C20 外,其余样品相似度均在 0.860 以上。21 批川牛膝根茎相似度范围为 0.553~0.885,4 批杂牛膝样品相似度范围为 0.780~0.856,10 批麻牛膝样品相似度范围 0.402~0.773,说明不同部位及混淆品的化学成分组成与含量差异较大。

## 2.6 化学模式识别分析

单一的相似度评价分析可能无法全面反映不同产地川牛膝的质量,以及不同部位川牛膝、混淆品化学成分的差异。因此,本研究进一步采用聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA)进行分析。

**2.6.1 CA** 以 62 批样品各特征峰峰面积为变量,运用微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>),绘制聚类热图。热图颜色代表归一化后的值,颜色越红说明特征峰相对峰面积越大,颜色越蓝表示特征峰相对峰面积越小。采用组间均联法,选择平方 Euclidean 距离为测度

进行系统聚类。结果如图 4 所示,可以将 62 批样品根据其产地、部位、基原进行聚类,其中, C1~C10 聚为 1 类,产地为湖北, C11~C19、C21 聚为 1 类,产地为四川, C22~C27 聚为 1 类,产地为重庆, GJ1~GJ21 聚为 1 类,为川牛膝根茎样品, M1~M10 聚为一类,为麻牛膝样品, C20、Z1~Z4 聚为 1 类,除 C20 外,其余均为杂牛膝样品。聚类分析结果与指纹图谱相似度基本可以相互验证,并指出相似度较低的 C20 样品作为异常可能存在一定程度的杂交。热图显示,不同产地的川牛膝,重庆样品与四川、湖北样品间主要差异为 3 号峰,而川牛膝的 8 号峰(杯苋甾酮)的峰面积普遍高于其他样品。川牛膝根茎 5、7(滨蒿内酯)、9 号峰的峰面积高于其他样品,麻牛膝 20、21(牛膝皂苷 II)、23(牛膝皂苷 I)号峰的峰面积高于其他样品,杂牛膝 14 {2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸}、16 号峰的峰面积高于其他样品,可作为各分组的差异性特征峰用以相互区分。聚类分析结果表明,川牛膝各产地样品与川牛膝根茎、杂牛膝、麻牛膝质量存在差异,与相似度评价结果一致。

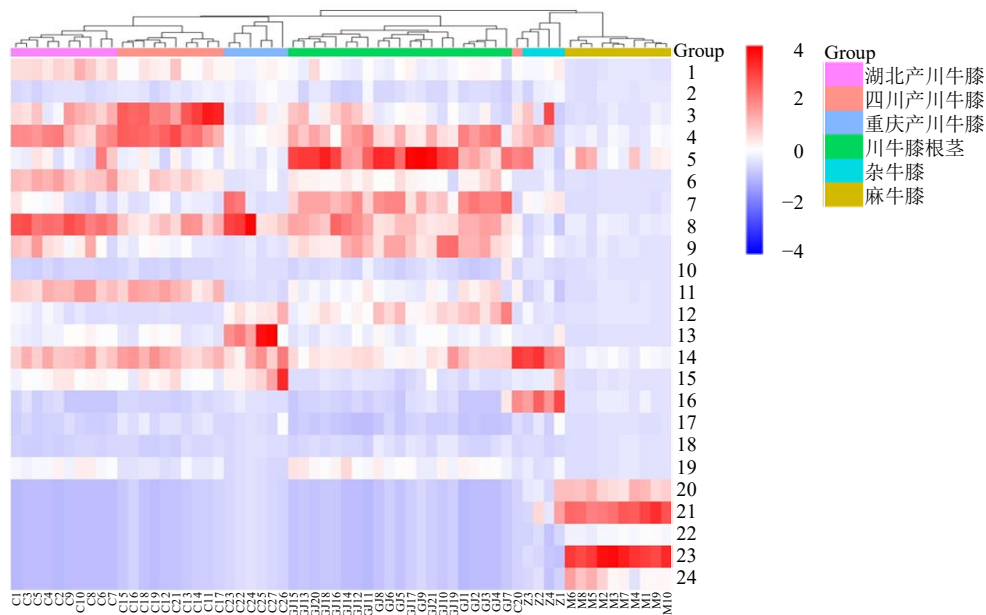


图 4 62 批样品聚类热图

Fig. 4 Cluster heat map of 62 batches of samples

**2.6.2 PCA** 将 62 批样品特征峰峰面积为变量导入 SIMCA14.1 软件,采用无监督模式识别法 PCA 进行分析<sup>[16-18]</sup>,以不同产地、不同部位及混淆品为组别,分别绘制 PCA 得分图。在不同产地川牛膝 PCA 得分图中(图 5-A),重庆样品与四川、湖北样品能组间差异较为明显,而四川和湖北样品组间差

异较小,四川少部分样品出现明显的组内差异,说明来源于四川的样品质量也存在一定的差异性。不同部位川牛膝 PCA 得分图中(图 5-B),川牛膝根与其相对应的根茎组间差异明显,首次从化学成分层面阐释了川牛膝根与根茎的差异。混淆品样品 PCA 得分图(图 5-C)中,麻牛膝与川牛膝、杂牛



膝组间差异较为明显，而川牛膝与杂牛膝组间差异相对较小。

**2.6.3 OPLS-DA** 为寻找川牛膝样品分组间的差异性标志物，以 62 批样品各特征峰峰面积为变量，

应用 SIMCA14.1 软件建立有监督模式识别法 OPLS-DA 模型进行分析<sup>[19-21]</sup>，同样以不同产地、不同部位及正伪品为组别，分别绘制 OPLS-DA 得分图（图 6），可以获得更显著的分组判别结果。各分

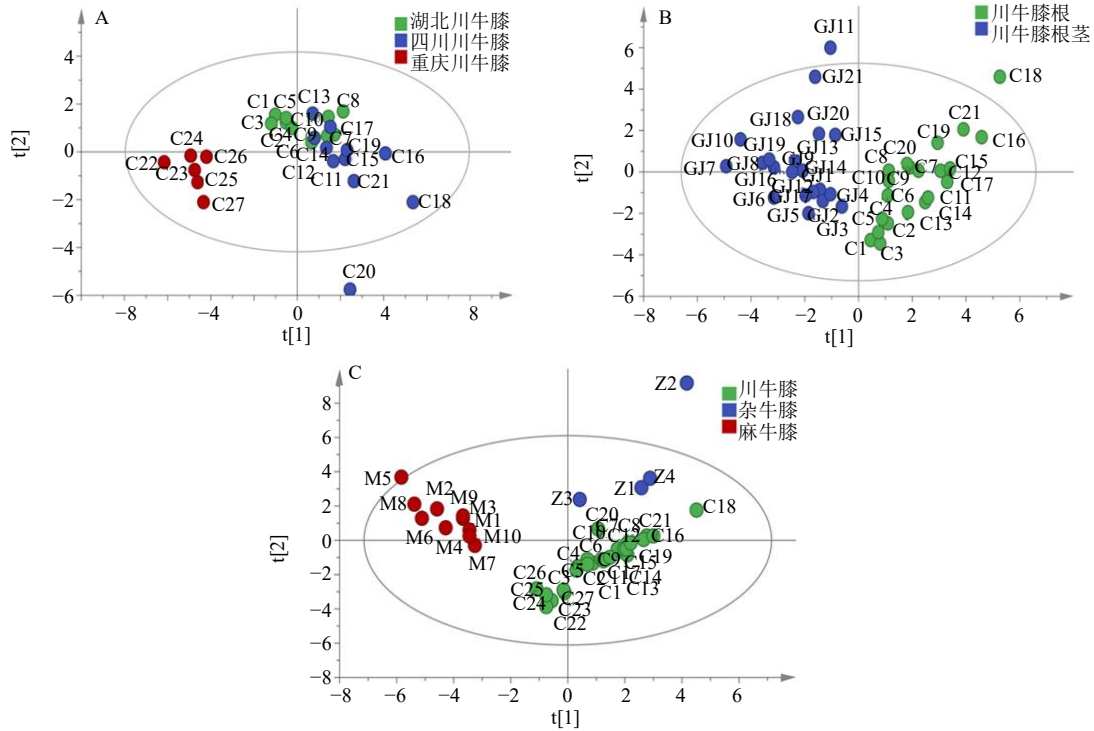


图 5 不同产地 (A)、不同部位 (B)、混淆品 (C) PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plots of different regions (A), different parts (B), adulterants (C)

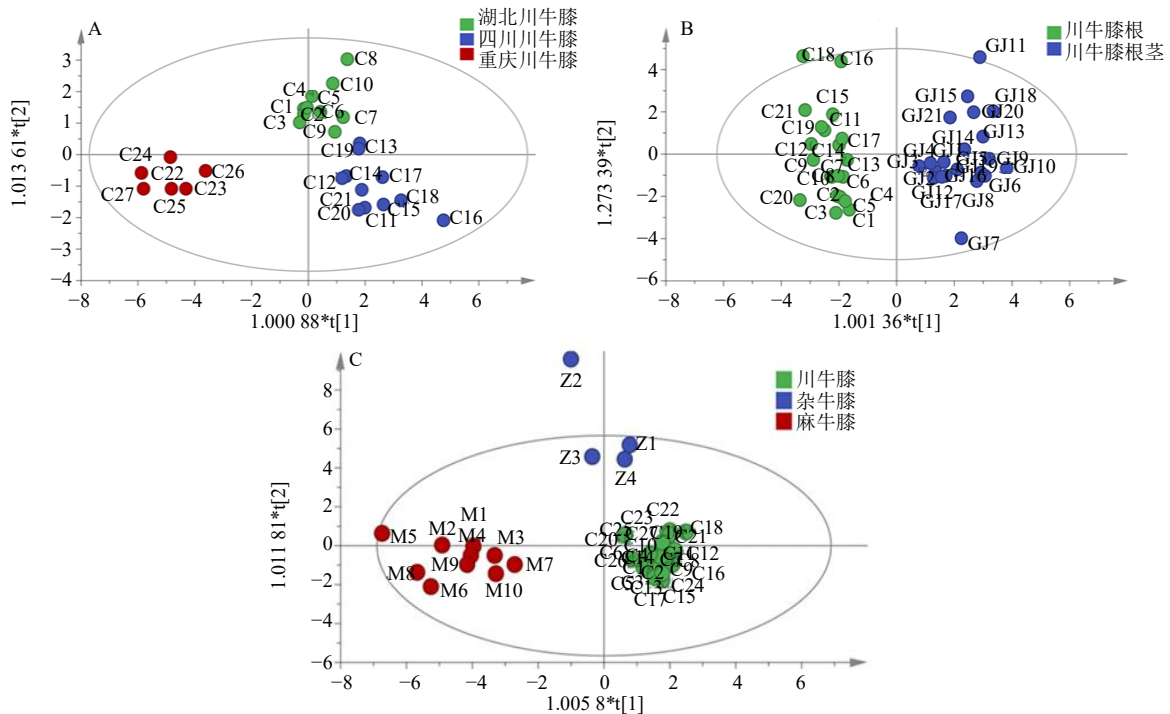


图 6 不同产地 (A)、不同部位 (B)、混淆品 (C) OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score plots of different origins (A), different parts (B), adulterants (C)

组模型中对  $X$  和  $Y$  矩阵的解释率 ( $R^2_X$  和  $R^2_Y$ ) 及  $Q^2$  的值均大于 0.5 (表 3), 为防止模型过度拟合造成假阳性, 采用置换检验 ( $n=200$ ) 对各分组分别进行验证, 结果见图 7, 表明 3 个分组模型均稳定可靠, 可用于不同产地、不同部位及混淆品样品分组间差异性标志物的分析。

通过 OPLS-DA 得分图进一步计算各个特征峰的变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 值 (图 8), 以 VIP 值 > 1 为阈值,

表 3 不同产地、不同部位、混淆品 OPLS-DA 模型解释率和预测能力

Table 3 Interpretation rate and prediction ability of OPLS-DA model in different regions, different parts, adulterants

分组	$R^2_X$	$R^2_Y$	$Q^2$
不同产地	0.667	0.848	0.742
不同部位	0.693	0.918	0.870
混淆品	0.718	0.902	0.772

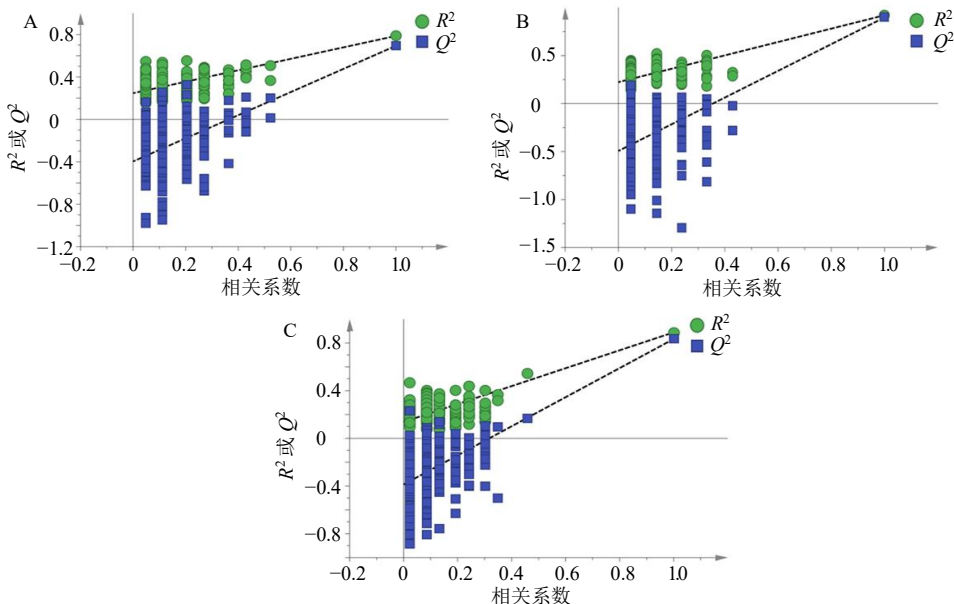


图 7 不同产地 (A)、不同部位 (B)、混淆品 (C) OPLS-DA 模型置换检验

Fig. 7 Permutation test of OPLS-DA for different regions (A), different parts (B), adulterants (C)

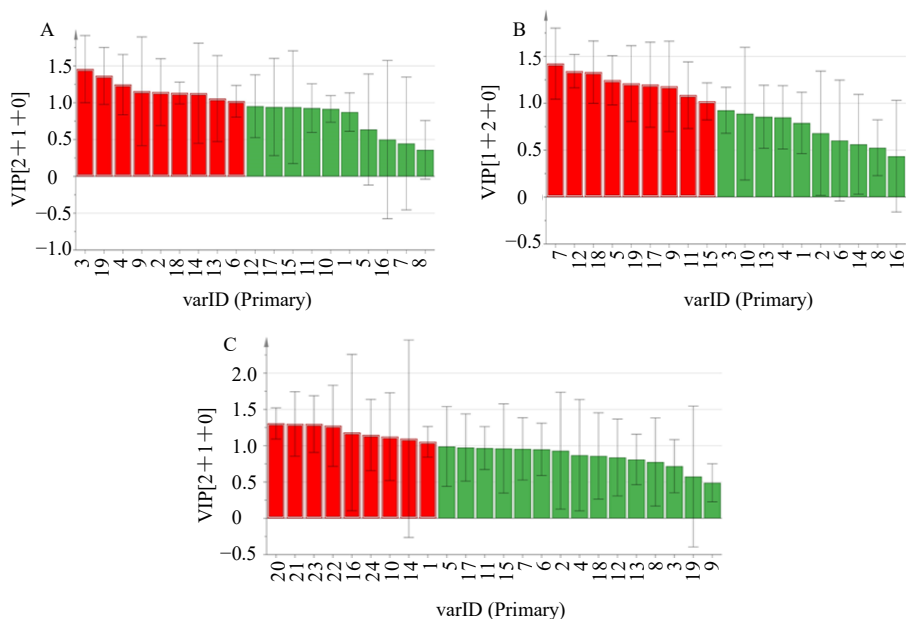


图 8 不同产地 (A)、不同部位 (B)、混淆品 (C) 特征峰的 VIP 图

Fig. 8 VIP charts of characteristic peaks of different regions (A), different parts (B), adulterants (C)



筛选差异性标志物。结果显示,不同产地川牛膝筛选出9个差异性标志物,按影响大小排列依次为3、19、4 {2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸}、9 (滨蒿内酯)、2、18、14 {2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸}、13、6号峰。川牛膝与川牛膝根茎筛选出9个差异性标志物,按影响大小排列依次为7、12、18、5、19、17、9 (滨蒿内酯)、11、15号峰。正伪品筛选出9个差异性标志物,按影响大小排列依次为20、21 (牛膝皂苷II)、23 (牛膝皂苷I)、22、16、24 (竹节参皂苷IVa)、10、14 {2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸}、1号峰。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件优化与供试品制备方法考察

本研究首先对色谱条件进行了考察,流动相分别考察了甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-水等,最终确定使用乙腈-0.1%磷酸时色谱峰基线较平稳且分离度较好。经全波长扫描,发现210 nm时供试品溶液色谱峰数目最多、整体平衡性最佳。对供试品制备的提取溶剂(30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、乙醇)、提取方式(超声、回流)、料液比(15、20、25 mL)、提取时间(15、30、60 min)进行考察,最终确定供试品溶液制备方法为50%甲醇为提取溶剂,料液比为1:25,超声提取30 min。

#### 3.2 相似度评价及化学模式识别分析

指纹图谱与化学模式识别相结合的研究策略目前已广泛应用于中药的质量控制和种质鉴别等方面<sup>[22-24]</sup>。本研究基于UPLC指纹图谱技术,共标识出24个特征峰,通过对照品指认了7个特征峰。本研究所建立的指纹图谱可快速、直观地对川牛膝、麻牛膝和杂牛膝进行鉴别区分,也可对川牛膝根及根茎进行有效区分。

相似度分析结果表明,除了C20样品,不同产地川牛膝相似度为0.860~0.973,波动较大,推测可能与产地变迁、采挖年限、种植方式、初加工方式等因素有关,如川牛膝传统的道地产区为四川省雅安市天全县,现产量已大幅减少,而乐山市金口河地区已成为新兴的道地产区;除四川外,重庆市奉节、巫溪、大庙,湖北省恩施州板桥镇和椿木营乡、湖南的隆回、龙山等地有规模化种植。同时四川采用直播疏苗,3年生起挖,而重庆、湖北多为育苗移栽,2年生起挖。《中国药典》2020年版一部

“川牛膝”项下规定其产地加工方式为烘或晒至半干,堆放回润,再烘干或晒干,其中“堆放回润”往往伴随着发汗过程。经实地调研,有的产地直接晒至半干后直接切片,并未发汗,有的产地则直接晒干或者炕干。王奎鹏等<sup>[25]</sup>测定1~3年生川牛膝中杯苋甾酮和葛根素的含量,发现其随生长年限而增加。施崇精等<sup>[26]</sup>采用HPLC特征指纹图谱结合化学计量学方法比较1~6年生川牛膝的化学成分差异,发现1、2、6年生差异较大,3~5生趋于一致。目前种植和加工方式对川牛膝药材品质影响的相关研究较少,但产地初加工是中药材生产过程当中的重要环节,对中药材品质优劣有重要影响。唐文文等<sup>[27]</sup>对“不发汗”和“发汗”天麻7种指标成分进行综合评分,表明“发汗”天麻的综合评分更高,特别是对天麻素和天麻多糖的含量有显著影响;洪智慧等<sup>[28]</sup>基于液质联用技术分析续断“发汗”前后化学成分的差异,发现发汗后化学成分种类无明显差异,但含量存在一定的差异。对于种植及产地初加工方式对川牛膝药材品质造成的影响,课题组未来拟进行更为深入系统地研究。与川牛膝对照指纹图谱相比,21批川牛膝根茎的相似度范围为0.553~0.885,表明川牛膝根与根茎的差异明显,如果混入市场将影响川牛膝临床用药安全。4批杂牛膝、10批麻牛膝样品相似度范围分别为0.780~0.856、0.402~0.773,杂牛膝与麻牛膝均含有皂苷类成分,响应较高,所指认的3个皂苷类成分可用以区分川牛膝可能与杂牛膝、麻牛膝,皂苷类成分呈苦涩味,与麻牛膝、杂牛膝口尝为苦味有一定的相关性。皂苷类成分具有细胞毒性,可解释杂牛膝与麻牛膝的急性毒性均大于川牛膝的研究结果<sup>[9]</sup>。

当前市场上,由于价格、产量且药材外观性状难以辨别等原因,杂牛膝、麻牛膝冒充或掺伪川牛膝的情况时有发生,现行药典中以杯苋甾酮作为定性和定量的指标性成分,根据课题组前期研究结果<sup>[29-30]</sup>,现行药典中的检查项无法对川牛膝与麻牛膝、杂牛膝进行有效区分并有效评价其质量。对川牛膝的化学模式识别分析显示,CA与PCA可以对产地、部位、基原进行划分,且两者结果基本一致;通过OPLS-DA结合变量重要性投影值各筛选出9个差异性标志物,2-羟基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸、滨蒿内酯、2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸可作为区别不同产地川牛膝的差异性标志物,滨蒿内酯可作为

区别根与根茎的差异性标志物,牛膝皂苷I、牛膝皂苷II、竹节参皂苷 IVa、2-(苯甲酰基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯甲酰)氧基]琥珀酸可作为鉴别川牛膝与其混淆品的差异性标志物,其余差异性标志物还有待后续进一步研究指认。基于本研究的结果认为,现行药典标准可能存在一定的局限性,在川牛膝的质量控制过程中应该适当关注皂苷类等成分的含量,以应对当前复杂多变的市场环境。综上所述,本研究为全面系统地评价川牛膝质量提供了新的思考角度和研究基础,为后续进一步提升川牛膝质量标准以促进其产业良性健康发展提供了科学的参考依据。

**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: 38.
- [2] 丁刚, 李隆云, 宋旭红, 等. 川牛膝不同产地药材质量综合评价研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5): 851-859.
- [3] 刘维, 裴瑾, 杨梅, 等. 川产道地药材川牛膝产地变迁探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1625-1628.
- [4] 巫明焱, 何兰, 陈佳丽, 等. 基于 3S 技术和 MaxEnt 的川牛膝在中国的潜在分布及种植空缺分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(22): 4395-4401.
- [5] 施崇精, 王姗姗, 刘小妹, 等. 川产道地药材川牛膝现状探讨 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(22): 55-58.
- [6] 梁欢, 何梦竹, 文青松, 等. 川牛膝与麻牛膝的形态鉴别 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(5): 342-348.
- [7] 赵磊. 川牛膝及其常见混用品鉴别研究 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(16): 32-34.
- [8] 何光星, 舒光明, 宾雪英, 等. 川牛膝及其混淆品活血化瘀作用比较 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2336-2339.
- [9] 宾雪英. 川牛膝及其混淆品药理作用研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2013.
- [10] 童凯. 川牛膝品质评价研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [11] 施崇精, 王姗姗, 程中琴, 等. HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学比较川牛膝及其混淆品、掺混品化学成分差异 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2313-2320.
- [12] 范巧佳, 李方安, 李杰勤, 等. 川牛膝与其伪品头花杯苋及其杂交后代同工酶的研究 [J]. 中药研究与信息, 2004, 6(4): 24-26.
- [13] 陈诗晴, 蒲沁琳, 陈小军, 等. 基于 ITS 序列分析技术鉴定川牛膝与常见伪品麻牛膝 [J]. 中药与临床, 2014, 5(4): 4-6.
- [14] 童凯, 李昭玲, 闫燊, 等. 川牛膝酒炙和盐炙前后 HPLC 化学指纹图谱及其主要药效成分变化研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 580-584.
- [15] 田孟良, 官宇, 刘帆, 等. 基于 RAPD 标记的 SCAR 分子标记技术鉴定川牛膝及其混淆品 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 953-956.
- [16] 李璿峪, 刘瑞连, 谭小娟, 等. 基于多元统计方法和成分差异分析栀子及其炮制品质量 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6836-6843.
- [17] 肖琳婧, 刘莹莹, 赵禹, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学的不同产地灯盏花药材和近缘种样品的质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3438-3443.
- [18] 范雪花, 王艳丽, 侯富国, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的白及与黄花白及辨识研究 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3990-3998.
- [19] 石欢, 封燮, 常雅晴, 等. 基于多成分含量测定和化学计量学的不同基原白芷药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3676-3684.
- [20] 冯淼, 王超纯, 凌伟红, 等. 基于指纹图谱和化学模式识别评价杜仲叶质量 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2931-2939.
- [21] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [22] 刘江, 陈兴福, 邹元锋. 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1081-1088.
- [23] 王露露, 孙倩怡, 杨慧海, 等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4282-4288.
- [24] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [25] 王奎鹏, 余海滨. 不同生长年限川牛膝中葛根素和杯苋甾酮含量比较与分析研究 [J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 84-88.
- [26] 施崇精, 刘小妹, 程中琴, 等. HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学比较不同生长年限川牛膝化学成分差异 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5404-5409.
- [27] 唐文文, 孟艳林, 陈垣. 基于多指标成分优化天麻产地“发汗”加工工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7185-7191.
- [28] 洪智慧, 杜伟锋, 杨莹, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 分析续断“发汗”前后化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1233-1241.
- [29] 高必兴, 齐景梁, 耿昭, 等. 基于皂苷类成分研究鉴别川牛膝及其伪品 [J]. 中药材, 2020, 43(9): 2118-2123.
- [30] 覃婷婷, 齐景梁, 苟琰, 等. 川牛膝质量标准提高研究 [J]. 中药与临床, 2020, 11(4): 1-7.

[责任编辑 时圣明]