

基于 ITS2 序列和特征图谱的天冬质量评价

钟婧婷¹, 殷洪林², 张桐², 鄢贵², 张复中², 谭庆昌², 沈刚^{2*}, 韩丽^{1*}

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

2. 成都市中草药研究所, 四川 成都 610016

摘要: **目的** 基于 ITS2 序列对天冬 *Asparagus cochinchinensis* 及其近缘种的样品进行分子鉴定, 并通过 HPLC 特征图谱技术对不同产地天冬样品进行质量评价, 为天冬的质量控制提供参考。 **方法** 采用 CTAB 法提取 19 批天冬样品的 DNA, 进行 PCR 扩增、测序; 从 GenBank 公共网站获取天冬及其近缘种的序列, 通过 MEGA 6.0 软件分析序列特征、计算遗传距离、构建系统发育树; 建立天冬 HPLC 特征图谱, 结合相似度评价、聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析对天冬样品进行质量评价, 筛选差异标志物。 **结果** 天冬及其近缘种样品的 ITS2 序列长度为 244~245 bp, GC 含量在 64.34%~64.75%, 变异位点数为 12; 遗传距离结果表明, 天冬种内平均遗传距离小于天冬及其相近基原的种间平均遗传距离; 系统发育树聚类分析结果表明, 19 份样品聚为 3 类, 具有良好的单系性, 能较直观地将天冬及其相近基原的样品进行区分; 从 12 批天冬样品的特征图谱中共标定了 13 个共有峰, 指认了 2 个成分, 分别为原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷; 聚类分析将 12 批天冬样品分为 2 类, 分类主要与种植、采收加工、经纬度、环境气候等因素有关; 主成分分析结果表明, 四川、广西产地的天冬质量较优; 正交偏最小二乘判别分析筛选出峰 1、7、12 (原薯蓣皂苷) 这 3 个质量标志差异物。 **结论** ITS2 序列分析可作为区分天冬及其相近基原样品的分子鉴定方法, 以及建立的 HPLC 特征图谱操作简单、重复性好; 可为天冬药材的质量评价和控制提供参考。

关键词: 天冬; ITS2 序列; 特征图谱; 化学计量学; 质量评价; 原薯蓣皂苷; 伪原薯蓣皂苷

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)22-7812-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.023

Quality evaluation of *Asparagus cochinchinensis* based on ITS2 sequence and characteristic chromatogram

ZHONG Jingping¹, YIN Honglin², ZHANG Tong², YAN Gui², ZHANG Fuzhong², TAN Qingchu², SHEN Gang², HAN Li¹

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

2. Chengdu Institute of Chinese Herbal Medicine, Chengdu 610016, China

Abstract: Objective The ITS2 sequence was employed for the molecular identification of Tiandong (*Asparagus cochinchinensis*) and its related species. Through an analysis of the HPLC characteristic chromatogram, a comprehensive quality evaluation was conducted on *A. cochinchinensis* samples sourced from diverse origins. This study serves as a valuable reference for quality control of *A. cochinchinensis*. **Methods** The DNA from 19 batches of samples were extracted utilizing the CTAB method. Following this, the ITS2 sequence was amplified via PCR and sequenced. The sequences of *A. cochinchinensis* and its related species were obtained from the publicly accessible GenBank website. The MEGA 6.0 software was used to analyze the sequence characteristics, calculate genetic distances, and construct phylogenetic trees. The HPLC characteristic chromatogram was developed to serve as a foundation for quality assessment. This assessment was performed through a comprehensive approach combining similarity evaluation, HCA, PCA and OPLS-DA to evaluate the quality of *A. cochinchinensis* samples, with the aim of screening for the Q-Marker. **Results** The length of the ITS2 sequences in *A. cochinchinensis* and its related species was 244—245 bp and the GC content ranged from 64.34% to 64.75%. A total of 12 mutation sites were identified within these sequences.

收稿日期: 2024-03-02

基金项目: 内江市东兴区中医药发展服务中心合作项目 (2023510102000221)

作者简介: 钟婧婷 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂与质量评价。E-mail: 2796991672@qq.com

*通信作者: 韩丽 (1965—), 女, 教授, 从事中药制剂与品质评价研究。E-mail: hanliyx@163.com

沈刚 (1989—), 男, 助理研究员, 从事中药新药及中药药理研究。E-mail: 709209717@qq.com

Genetic distance calculations indicated that the average intraspecific genetic distance within *A. cochinchinensis* was smaller than the interspecific genetic distance between it and its related species. Phylogenetic tree clustering analysis effectively grouped the 19 batches of samples into three distinct classes, demonstrating good monophyly and facilitating the differentiation of *A. cochinchinensis* from its related species. In the HPLC characteristic chromatogram of 12 batches of *A. cochinchinensis* samples, a total of 13 common peaks were observed, with two peaks identified as protodioscin and pseudoprotodioscin. HCA divided these 12 batches into two categories, likely influenced by factors such as planting, harvesting and processing methods, as well as geographical factors like longitude, latitude and climate. PCA highlighted the relatively superior quality of *A. cochinchinensis* samples originating from Sichuan and Guangxi provinces. OPLS-DA identified three Q-Markers, corresponding to peak 1, peak 7, and peak 12 (protodioscin). **Conclusion** The ITS2 sequence can serve as a molecular identification method for distinguishing *A. cochinchinensis* from its related species. Moreover, the HPLC characteristic chromatogram established in this study is both simple and repeatable, offering a reference for the quality evaluation and control of *A. cochinchinensis*.

Key words: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.; ITS2 sequence; characteristic chromatogram; chemometric; quality evaluation; protodioscin; pseudoprotodioscin

天冬为百合科植物天冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块根。《中国药典》2020 年版^[1]记载天冬味甘、苦，性寒，具有养阴润肺、清肺生津的功效。天冬以“天门冬”为正名始载于《神农本草经》^[2]，历代本草多以名沿用，《神农本草经》记载：“主诸风湿偏痹，强骨髓，杀三虫，去伏尸。久服轻身，益气延年。一名颠勒。”“天冬”一名最早出现于明代兰茂所著《滇南本草》^[3]中，后世本草均沿用天冬之名。天冬在我国分布较广，现代植物学研究发现天冬自然分布于广西、贵州、云南、四川等地，以气候温暖湿润的长江以南地区为主。天冬中主要含有多糖类、皂苷类、氨基酸类、木脂素等多种化学成分，其中多糖类、皂苷类为天冬的主要活性成分^[4]。现代药理研究表明，天冬具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗抑郁等药理活性^[5]。由于种质退化严重以及未形成标准的规范化种植，导致市场上天冬的使用较为混乱，出现天冬的近缘种充当天冬的现象。目前，关于天冬的质量评价研究较少，《中国药典》2020 年版中评价天冬质量仅通过性状、浸出物、水分、总灰分等检查项，缺乏综合评价药材质量的方法。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术是由加拿大生物学家 Paul Hebert 等在 2003 年首次提出^[6]；2004 年，美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 与生命条形码联盟 (Consortium For Barcode of Life, CBOL) 合作，为标准 DNA 条形码序列及相关的支持性数据提供检索服务。该技术通过筛选通用条形码，鉴定条形码数据库和鉴定平台，运用生物信息学方法分析对比 DNA 数据，从而进行物种的鉴定。DNA

条形码技术是传统生物鉴定方法的强有力补充，使得物种鉴定快速准确有效，是 DNA 分子鉴定技术基础上的新发展。陈士林团队^[7]在大量实验研究基础上建立了中草药 DNA 条形码生物鉴定技术体系：以 ITS2 为核心，*psbA-trnH* 为辅的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系和以 COI 为主、ITS2 为辅的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系。通过比较核基因序列、叶绿体基因组序列以及线粒体基因组序列在药用植物中的变异率，发现 ITS2 在物种水平的鉴定效率高达 92.7%^[8]；ITS2 序列的鉴定能力已在多个药材中得到了验证^[9-11]。

随着现代分析技术的不断进步及对中药研究的不断深入，中药 HPLC 特征图谱技术在质量控制中得到广泛的应用。HPLC 特征图谱是指中药材经适当处理后，采用 HPLC 分析手段，得到的能够标示该中药材特性的共有峰图谱。HPLC 特征图谱具有分离效能高、选择性高、检测灵敏度高、分析速度快以及应用范围广等特点^[12]；其主要的分析方法包括化学模式识别、中药色谱指纹图谱相似度评价软件、中药特征图谱数据库等。HPLC 特征图谱作为公认的中药质量控制的良好技术方法，在中药材及中药制剂中得到了广泛的应用^[13]。

本研究通过 ITS2 序列对天冬及其近缘种属进行分子鉴别；建立 HPLC 特征图谱，结合化学计量学分析不同产地天冬药材的质量，以期为天冬的质量评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司)；BT25S 型万分之一天平 (德国 Sartorius 公司)；BSA

224SA 型百万分之一天平（德国 Sartorius 公司）；KQ-500DE 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DS-11⁺型超微量分光光度计（美国 DeNovix 公司）；T100 Thermal Cycler 型 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；实验室自制超纯水。

1.2 材料

乙腈为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水；原薯蓣皂苷（批号 111937-202102，质量分数 94.8%）、伪原薯蓣皂苷（批号 111855-202304，质

量分数 96.6%）对照品均购自中国食品药品鉴定研究院。19 批样品（S1~S19）分别收集于四川、广西、云南、贵州 4 个地区，具体信息见表 1；经成都中医药大学王光志教授鉴定为天冬 *A. cochinchinensis* (Lour.) Merr.、西南天门冬 *A. munitus* Wang et S. C. Chen、大理天门冬 *A. taliensis* Wang et Tang 的干燥块根。从美国国家生物技术信息中心（NCBI）下载天冬及其近缘种共 14 份 DNA 序列用于构建系统发育树，见表 2。

表 1 天冬及其相近基原样品信息

Table 1 Sample information of *A. cochinchinensis* and its related species

编号	基原	产地	GenBank 登记号 (ITS2)
S1	天冬	广西壮族自治区玉林市	PQ094075
S2	天冬	广西壮族自治区玉林市	PQ094076
S3	天冬	广西壮族自治区玉林市	PQ094077
S4	天冬	广西壮族自治区玉林市	PQ094078
S5	天冬	广西壮族自治区来宾市	PQ094079
S6	天冬	四川省内江市	PQ094080
S7	天冬	四川省内江市	PQ094081
S8	天冬	四川省内江市	PQ094082
S9	天冬	四川省内江市	PQ094083
S10	天冬	四川省内江市	PQ094084
S11	天冬	云南省楚雄彝族自治州	PQ094085
S12	天冬	云南省楚雄彝族自治州	PQ094086
S13	西南天门冬	四川省乐山市	PQ094087
S14	西南天门冬	四川省乐山市	PQ094088
S15	西南天门冬	四川省泸州市	PQ094089
S16	大理天门冬	云南省临沧市	PQ094090
S17	西南天门冬	贵州省遵义市	PQ094091
S18	大理天门冬	云南省大理白族自治州	PQ094092
S19	大理天门冬	云南省大理白族自治州	PQ094093

表 2 天冬及其近缘种 DNA 序列信息

Table 2 DNA sequence information of *A. cochinchinensis* and its related species

编号	种名	拉丁学名	GenBank 登记号
1	天门冬	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	LC767086
2	石刁柏	<i>Asparagus officinalis</i>	LC766586
3	大理天门冬	<i>Asparagus taliensis</i>	LC767074
4	滇南天门冬	<i>Asparagus subscandens</i>	LC767023
5	短梗天门冬	<i>Asparagus lycopodineus</i>	LC766686
6	西藏天门冬	<i>Asparagus tibeticus</i>	LC766596
7	长刺天门冬	<i>Asparagus racemosus</i>	LC766590
8	文竹	<i>Asparagus setaceus</i>	LC766584
9	非洲天门冬	<i>Asparagus densiflorus</i>	LC766582
10	多刺天门冬	<i>Asparagus myriacanthus</i>	LC766579
11	羊齿天门冬	<i>Asparagus filicinus</i>	LC766577
12	细枝天门冬	<i>Asparagus trichoclados</i>	LC766573
13	密齿天门冬	<i>Asparagus meioclados</i>	LC766563
14	西南天门冬	<i>Asparagus munitus</i>	LC766519

2 方法

2.1 ITS2 条形码

2.1.1 总 DNA 提取 取样品适量, 加入液氮充分研磨成细粉, 称取约 10 mg, 置 2 mL 离心管中, 采用 CTAB 法, 提取总 DNA。使用微量紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 测定吸光度 (A) 值。

2.1.2 PCR 扩增和测序 上游引物 ITS2 2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 下游引物 ITS2 3R: 5'-GACGCTTCTCCAGAGACTACAAT-3'。PCR 扩增体系为 50 μ L, 其中包括 Taq PCR Master Mix (终浓度: $1\times$) 25 μ L、DNA 模板 (终质量浓度: 5 μ g/mL) 1 μ L、上游和下游引物 (终浓度: 0.4 μ mol/L) 各 2 μ L、ddH₂O 补足至 50 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、48 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s、30 个循环、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。测序工作由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

2.2 HPLC 特征图谱

2.2.1 色谱条件 采用 Hypersil BDS C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μ m) 为色谱柱; 以乙腈 (A)-水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~7 min, 10% A; 7~20 min, 10%~28% A; 20~45 min, 28%~32% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.2.2 供试品溶液制备 取天冬粉末 (过 3 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 65% 甲醇 10 mL, 称定锥形瓶质量, 超声波提取 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷至室温, 再称定锥形瓶质量, 用 65% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.2.3 精密度试验 取天冬粉末, 按上述供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以峰 12 为参照峰 (S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 小于 3.00%, 相对峰面积 RSD 小于 5.00%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取同一批天冬粉末 6 份, 按上述供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰 12 为参照峰 (S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 小于 3.00%, 相对峰面积 RSD 小于 5.00%, 表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取天冬供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、16、20、24 h 按“2.2.1”项

下色谱条件进样测定, 以峰 12 为参照峰 (S), 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 小于 3.00%, 相对峰面积 RSD 小于 5.00%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 HPLC 特征图谱建立 取 12 批天冬样品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 以 S1 号样品色谱图作为参照图谱, 采用中位数法生成共有模式, 对 12 批天冬特征图谱进行匹配, 标定共有峰, 并进行相似度评价; 与对照品色谱保留时间比对指认色谱峰。

3 结果与分析

3.1 ITS2 条形码鉴定

3.1.1 总 DNA 提取、PCR 扩增和测序及序列分析 样品总 DNA 提取的质量浓度 40~100 ng/L 不等, A_{260}/A_{280} 在 1.7~2.1, 说明符合后续 PCR 的要求^[14], 可以作为 PCR 扩增时的模板。PCR 扩增及测序成功率是评价 DNA 条形码技术实用性及通用性的指标, 本研究中所有实验样品 PCR 扩增和测序成功率为 100%; 样品均成功得到 ITS2 序列, 且大部分条带单一清晰, 无非特异性条带和拖尾现象。将获得的序列结果上传 NCBI 数据库, 得到 S1~S19 的序列号分别为 PQ094075~PQ094093。PCR 扩增所得的 19 批样品 ITS2 序列长度范围为 244~245 bp, GC 含量为 64.34%~64.75%, 变异位点数为 12 个, 结果见表 3。

3.1.2 遗传距离分析 遗传距离可以反映出不同物种间的亲缘关系, 遗传多样性的研究多从物种间的遗传距离入手。利用 MEGA 6.0 软件, 计算 19 批样品的种内种间距离。结果表明, 种内遗传距离为 0~0.012 5, 种内平均遗传距离为 0.005 6, 种间遗传距离为 0~0.034 0, 种间平均遗传距离为 0.015 0。天冬及其近缘种之间 ITS2 序列的平均种间距离大于天冬平均种内遗传距离, 说明其存在明显隔阂, 可用于区分鉴别天冬及其近缘种。

3.1.3 系统发育树聚类分析 采用 MEGA 6.0 软件将 19 批样品测得的序列和 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 上下载天冬及其近缘种的序列构建系统发育树, 结果见图 1。12 批不同产地的天冬样品为同一物种, 聚为一类; 3 批云南产地的大理天门冬聚为一类; 3 批四川产地和 1 批贵州产地的西南天门冬聚为一类。结果表明, 天冬及其近缘种的 ITS2 序列有各自特异性的序列位点,

表 3 天冬及其相近基原样品 ITS2 序列变异位点
Table 3 Variable sites of ITS2 sequence of *A. cochinchinensis* and its related species

编号	变异位点											
	24	34	35	39	44	56	126	128	134	201	203	233
S1	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S2	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S3	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S4	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S5	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S6	T	C	G	—	A	T	G	G	C	A	A	T
S7	T	C	G	—	A	T	G	G	C	A	A	T
S8	T	C	G	—	A	T	G	G	C	A	A	T
S9	T	C	G	—	A	T	G	G	C	A	A	T
S10	T	C	G	—	A	T	G	G	C	A	A	T
S11	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S12	C	C	A	—	A	C	G	G	C	A	A	T
S13	C	T	C	A	A	C	G	C	T	G	T	C
S14	C	T	C	A	A	C	G	C	T	G	A	C
S15	C	T	C	A	A	C	G	C	T	G	T	C
S16	C	T	C	A	A	C	A	C	T	G	A	C
S17	C	T	C	A	A	C	G	C	T	G	A	C
S18	C	T	C	A	G	C	A	C	T	G	A	C
S19	C	T	C	A	G	C	A	C	T	G	A	C

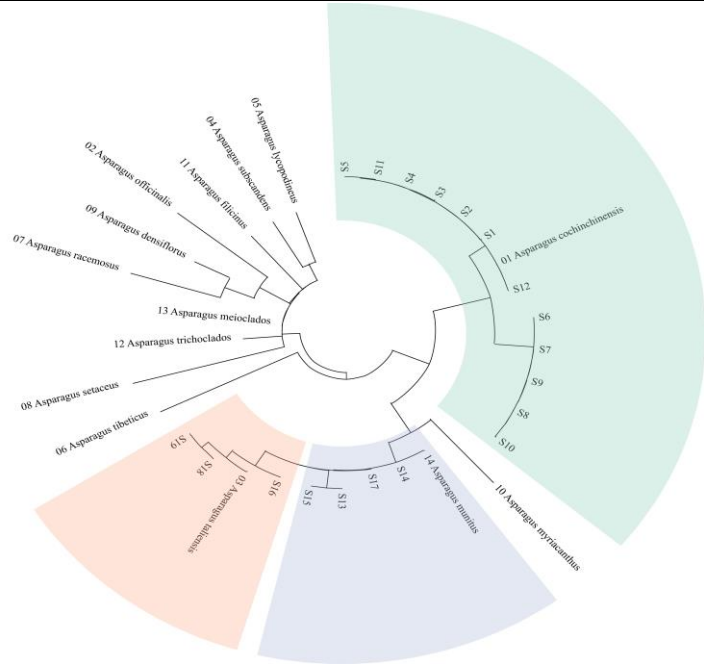


图 1 天冬及其近缘种样品的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *A. cochinchinensis* and its related species

存在显著差异，即通过系统发育树可以区分天冬及其近缘种样品的遗传进化关系，为天冬基原的鉴定提供了依据。

3.2 特征图谱研究

3.2.1 特征图谱的建立及相似度评价 按“2.2.4”项下方法，共标定出 13 个共有峰，结果及叠加图

谱见图 2；通过与对照品（图 3）对比，指认了 2 个成分，分别为峰 12（原薯蓣皂苷）、峰 13（伪原薯蓣皂苷）。相似度评价结果见表 4，12 批天冬样品特征图谱相似度均在 0.900 以上，说明四川、广西、云南产地的天冬样品质量具有较好的一致性。

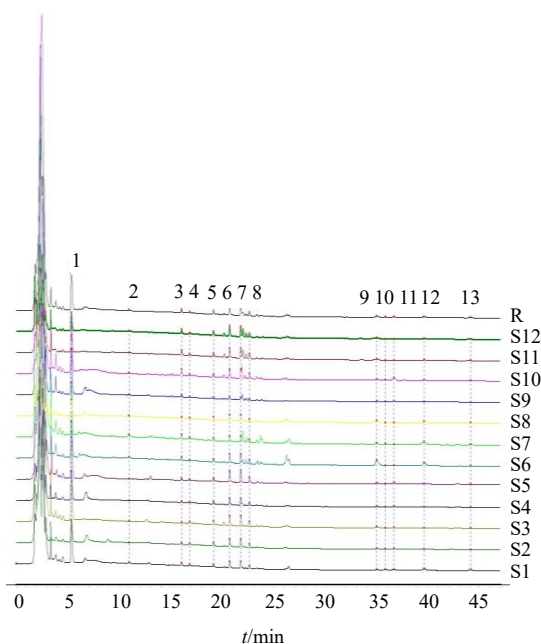
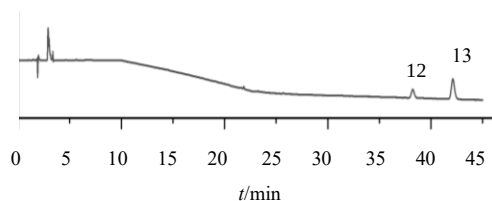


图 2 13 批天冬样品 HPLC 叠加图谱

Fig. 2 Overlapping chromatogram of 13 batches of *A. cochinchinensis* samples



12-原薯蓣皂苷; 13-伪原薯蓣皂苷。
12-protodioscin; 13-pseudoprotodioscin.

图 3 混合对照品溶液色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed reference substance

表 4 天冬样品相似度评价结果

Table 4 Similarity evaluation results of *A. cochinchinensis* samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S7	0.987
S2	0.993	S8	0.955
S3	0.978	S9	0.975
S4	0.996	S10	0.987
S5	0.993	S11	0.933
S6	0.967	S12	0.924

3.2.2 聚类分析 以 13 个共有峰的峰面积为变量, 运用 SPSS 27 软件, 采用组间平均数连接法进行聚类分析, 结果见图 4。当判别距离等于 20 时, 不同产地天冬样品分为 2 类, I 类包括 S11~S12, 即 2 批

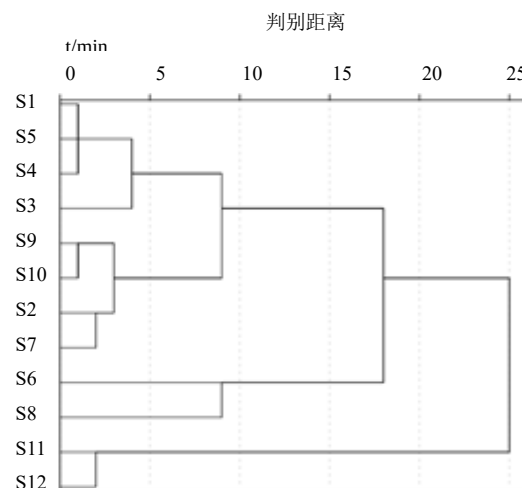


图 4 天冬样品聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis chart of *A. cochinchinensis* samples

云南样品聚为一类; II 类包括 S1~S10, 即 5 批四川样品、5 批广西样品聚为一类。从聚类分析结果可知, 四川天冬样品与广西天冬样品质量较为接近, 这可能与种植、采收加工等因素有关; 而与云南天冬样品质量差异较大, 这可能与经纬度差异、环境气候条件等因素有关。

3.2.3 主成分分析 以 12 批天冬样品 13 个共有峰的峰面积为变量, 导入 SPSS 25.0 软件进行主成分分析, 计算相关矩阵的特征值及方差贡献率; 以特征值 > 1 为标准, 筛选得到 5 个主成分, 第 1 个主成分的特征值为 3.928, 方差贡献率为 30.217%; 第 2 个主成分的特征值为 3.739, 方差贡献率为 28.765%; 第 3 个主成分的特征值为 2.287, 方差贡献率为 17.591%; 第 4 个主成分的特征值为 1.257, 方差贡献率为 9.67%; 第 5 个主成分的特征值为 1.064, 方差贡献率为 8.183%; 5 个主成分累计方差贡献率为 94.426%, 说明 3 个主成分可以反映天冬样品的大部分信息。利用这 5 个主成分对天冬样品进行综合评价, 按公式综合得分 = (0.302 17 × 主成分 1 得分 + 0.287 65 × 主成分 2 得分 + 0.175 91 × 主成分 3 得分 + 0.096 7 × 主成分 4 得分 + 0.081 83 × 主成分 5 得分) / 0.944 26 计算, 结果见表 5。排名前 3 的样品为 2 批四川产地和 1 批广西产地的天冬, 说明四川、广西的天冬样品质量较优, 与聚类分析的结果相一致。

3.2.4 正交偏最小二乘判别分析 为了进一步找出引起不同产地批次样品差异的主要标志物, 采用 SIMCA-P 14.1 软件对 13 批天冬样品进行正交偏最小二乘判别分析, 以 13 个共有峰峰面积为变量, 建

立模型, 结果见图 5; 建立的模型 $R^2_X=0.827$, $R^2_Y=0.793$, $Q^2=0.343$, 表明所建立的模型稳定性及预测能力良好。为了验证 OPLS-DA 模型的有效性, 进行模型交叉验证实验, Q^2 与 Y 轴相交点为负, 证明

该模型可靠, 未出现过拟合情况, 结果见图 6。以 VIP 值 >1 为标准, 得到 3 个差异标志性成分, 分别为色谱峰 1、7、12, 结果见图 7; 因此, 色谱峰 1、7、12 (原薯蓣皂苷) 所代表的成分是造成天

表 5 天冬样品各主成分得分和综合得分

Table 5 Principal component scores and comprehensive scores of *A. cochinchinensis* samples

编号	主成分 1 得分	主成分 2 得分	主成分 3 得分	主成分 4 得分	主成分 5 得分	综合得分	排名
S1	-0.344 5	1.003 9	-0.753 7	1.458 4	1.055 3	0.296 0	6
S2	1.392 7	-0.731 0	-0.397 5	1.669 6	-1.238 3	0.212 6	1
S3	-0.960 0	-0.098 5	-0.455 9	-0.099 6	-0.430 0	-0.469 6	12
S4	-0.464 5	0.824 9	-0.134 6	0.781 9	0.677 3	0.216 3	7
S5	-0.897 3	-0.384 7	-0.640 6	0.637 3	-0.131 3	-0.469 8	11
S6	0.016 0	0.075 0	2.383 2	-0.017 9	1.466 3	0.597 2	4
S7	1.434 7	-1.009 5	1.070 9	0.086 0	-0.524 4	0.314 5	2
S8	-0.998 3	-0.772 9	0.530 2	-0.070 7	-0.138 1	-0.475 3	10
S9	-0.404 6	-1.956 8	-1.076 6	-1.306 0	0.824 9	-0.988 4	13
S10	1.887 1	0.989 2	-1.097 8	-1.237 3	1.032 0	0.663 4	3
S11	-0.346 2	0.846 2	0.320 0	-0.971 0	-1.032 8	0.017 7	8
S12	-0.315 1	1.214 1	0.252 4	-0.930 6	-1.560 8	0.085 5	5

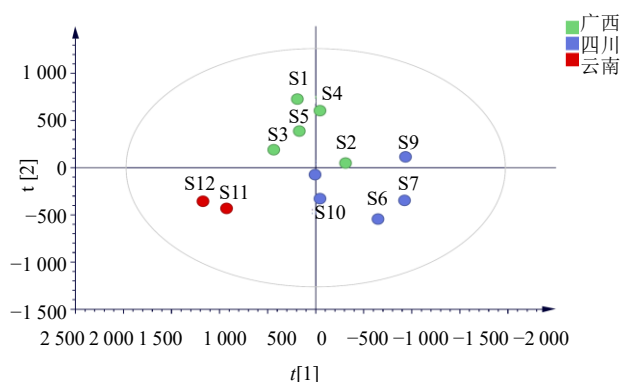


图 5 天冬样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score of *A. cochinchinensis* samples

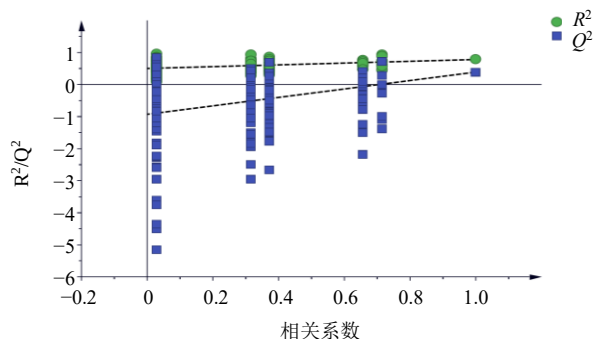


图 6 基于 200 次置换检验的 OPLS-DA 模型验证图

Fig. 6 OPLS-DA model verification chart based on 200 permutation tests

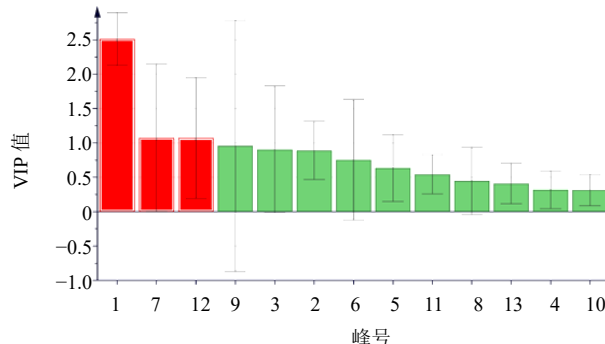


图 7 天冬样品 OPLS-DA VIP 值图

Fig. 7 OPLS-DA VIP score of *A. cochinchinensis* samples

冬样品质量差异的主要标志性成分, 提示这 3 个成分对区分不同产地天冬样品的贡献较大。

4 讨论

ITS2 序列作为药用植物鉴定中的一种有效标记物, 已经广泛应用中药材的分子鉴定研究中^[7]。本试验中, 天冬平均种内遗传距离较小, 为 0.005 6, 说明其生物遗传相似、种缘关系较近, 平均种间遗传距离为 0.015 0, 平均中间遗传距离大于平均种内遗传距离^[15], 说明其存在隔阂, 即能有效区分天冬及其近缘种; 也有文献指出最小种间遗传距离大于最大种内遗传距离时, 可有效区分物种^[16]。本试验中, 基于 ITS2 序列分析的 19 批天冬样品的种内最大遗传距离和种间最小遗传距离存在重叠, 与石斛

DNA 条形码鉴定研究出现相同的情况^[17]；因此在后续研究大样本时，考虑在 ITS2 序列基础上增加其他 DNA 组合片段研究，以此来提高鉴定的准确性。构建系统发育树是物种鉴别中最直观的表现方法，能明显的看出不同物种间的亲缘关系，即同一物种聚类于同一分支。本实验中 19 批天冬 ITS2 序列构建系统发育树，有效区分为天冬、西南天门冬、大理天门冬 3 类，进一步证实了 ITS2 序列作为天冬基原鉴定的有效性。

本实验在使用原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷对照品进行保留时间对比指认时发现，现配制的对照品溶液在检测时，色谱图中呈现 1 个色谱峰，对照品溶液在放置一段时间后检测，色谱图中呈现 2 个色谱峰，提示原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷对照品溶液应现配现用。采用光电二极管阵列紫外可见光检测器对天冬供试品溶液进行 190~400 nm 全波长扫描，对比发现 203 nm 波长下所得到的色谱图中色谱峰信息较多，色谱峰响应值较高，干扰较少，因此选择 203 nm 作为检测波长。中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统是国家药典委带领清华大学等高校单位共同合作开发的一款计算软件，能实现对照特征图谱的生产、相似度计算、峰匹配等基本功能^[18]；本实验中 12 批天冬样品特征图谱相似度为 0.924~0.996，说明四川、广西、云南 3 个产地的天冬样品质量较为稳定。通过以共有峰峰面积为变量，对特征图谱数据的综合处理、降维及分类，使得数据可视化^[19]；其中聚类分析结果表明四川、广西的天冬样品质量较为相似，这与姚诚等^[20]结果相一致。

综上，ITS2 序列能较好地反映天冬及其近缘种之间的差异，建立的 HPLC 特征图谱也能较好的区分不同产地的天冬样品，为天冬药材的质量评价提供了参考依据。

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: 56-57.
- [2] 清·孙星衍, 清·孙冯翼. 神农本草经 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2018: 15.
- [3] 《滇南本草》整理组整理. 滇南本草 (第三卷) [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1978: 399.
- [4] 鄢贵, 张复中, 施后奎, 等. 天冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48(21): 116-118.
- [5] 宫兆燕, 张君利. 天冬活性化合物的提取及其药理活性研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(24): 4938-4942.
- [6] 中国科协学会学术部. 植物 DNA 条形码前沿探讨 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2013: 2.
- [7] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列 [M]. 北京: 北京出版社, 2012: 4.
- [8] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [9] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [10] Luo K, Chen S L, Chen K L, *et al.* Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(6): 701-708.
- [11] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [12] 王平. 高效液相色谱在中药研究中的应用 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 2010: 145.
- [13] 连益纯, 林静, 李知瑾, 等. HPLC 特征图谱技术在中药制剂质量控制中的应用进展 [J]. 海峡药学, 2024, 36(2): 1-5.
- [14] 夏艺萌, 尹杰, 曾丽珊, 等. 基于 ITS2 序列的球兰属植物种间鉴定研究 [J]. 中药材, 2023, 46(3): 603-609.
- [15] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312.
- [16] Meier R, Zhang G Y, Ali F. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification [J]. *Syst Biol*, 2008, 57(5): 809-813.
- [17] 张高曼, 赵立佳, 刘光富, 等. 基于 ITS 和 ITS2 序列的药用石斛 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 575-587.
- [18] 赵青. 中药色谱指纹图谱辅助分析系统 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [19] 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.
- [20] 姚诚, 张宝林, 罗东玲, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价天冬的质量 [J]. 华西药学杂志, 2024, 39(1): 68-71.

[责任编辑 时圣明]