

## 溪黄草药材 4 种基原植物的 UPLC 特征图谱鉴别研究

萧晓吉<sup>1,2</sup>, 邱佳佳<sup>3</sup>, 刘军民<sup>1,2\*</sup>, 赵双双<sup>4</sup>, 古敬锋<sup>1,2</sup>, 王德勤<sup>5</sup>, 詹若挺<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>广州中医药大学中药学院, 广州 510006; <sup>2</sup>岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学), 广州 510006;  
<sup>3</sup>佛山市南海区人民医院(华南理工大学附属第六医院), 佛山 528225; <sup>4</sup>广东农垦热带农业研究院有限公司, 广州 511365;  
<sup>5</sup>广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广州 510515

**摘要:**本研究采用 UPLC 法建立适用于鉴别溪黄草药材 4 种基原植物溪黄草 *Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara、线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara、纤花香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* var. *graciliflora* (Benth.) H. Hara 和长叶香茶菜 *Rabdosia stracheyi* (Benth. ex Hook. f.) Hara 的特征图谱, 并结合特征图谱的相似度评价、聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)以及正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminate analysis, OPLS-DA)对 4 种基原植物的共有成分与差异性成分进行研究。从溪黄草、线纹香茶菜、纤花香茶菜和长叶香茶菜的特征图谱中分别标定了 19、24、26、21 个特征峰。除溪黄草外, 其他 3 种基原植物各自样品的相似度较高; 但是不同基原植物之间的相似度具有一定的差异性。通过 CA、PCA 可将溪黄草与其他 3 种基原植物明显区分, 通过 OPLS-DA 可将线纹香茶菜、纤花香茶菜和长叶香茶菜区分。该研究建立的 UPLC 特征图谱结合化学计量学方法较全面地反映了溪黄草药材 4 种基原植物的化学成分, 方法简便快速、专属性强, 可为溪黄草药材的基原鉴别和质量分析与评价提供参考。

**关键词:**溪黄草; 特征图谱; 化学计量学; 基原鉴别

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-1038-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.6.013

## Identification of UPLC characteristics spectrum of four original plants of Rabdosiae Herba

XIAO Xiao-ji<sup>1,2</sup>, QIU Jia-jia<sup>3</sup>, LIU Jun-min<sup>1,2\*</sup>,  
ZHAO Shuang-shuang<sup>4</sup>, GU Jing-feng<sup>1,2</sup>, WANG De-qin<sup>5</sup>, ZHAN Ruo-ting<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; <sup>3</sup>Nanhai District People's Hospital of Foshan (The Sixth Affiliated Hospital South China University of Technology), Foshan 528225, China; <sup>4</sup>Guangdong Agribusiness Tropical Agriculture Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 511365, China; <sup>5</sup>Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

**Abstract:** The purpose of this paper is to establish the UPLC characteristics spectrum method for the identification of four original plants of Rabdosiae Herba, *Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara, *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara, *Rabdosia lophanthoides* var. *graciliflora* (Benth.) H. Hara and *Rabdosia stracheyi* (Benth. ex Hook. f.) Hara. The similarity evaluation of characteristic chromatograms, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were combined, which was used to study the common components and differential components of four original plants of Rabdosiae Herba. 19, 24, 26 and 21 characteristic peaks were determined from the characteristic chromatograms of *R. serra*, *R. lophanthoides*, *R. lophanthoides* var. *graciliflora* and *R. stracheyi*. In addition to *R. serra*, the similarity of the samples of the other three original plants was high, but there were some differences in

收稿日期: 2022-09-28

接受日期: 2023-02-17

基金项目: 广东省省级乡村振兴战略(农业科技创新及推广体系建设)专项(2023KJ148); 广东省普通高校“服务乡村振兴计划”重点领域专项(2019KZDZX2017); 广东省教育厅 2021 年广东省本科高校教学质量与教学改革建设项目(粤教高函[2021]29 号)

\* 通信作者 E-mail: liujunmin@gzucm.edu.cn, ruotingzhan@vip.163.com

similarity between different original plants. *R. serra* could be clearly distinguished from the other three original plants by CA and PCA and OPLS-DA could be used to distinguish *R. lophanthoides*, *R. lophanthoides* var. *graciliflora* and *R. stracheyi*. The UPLC characteristics spectrum established in this study combined with chemometrics comprehensively reflected the chemical composition of four original plants of Rabdosiae Herba, and the method is simple, rapid and specific, which can provide a reference for the identification, quality analysis and evaluation of original plants of Rabdosiae Herba.

**Key words:** Rabdosiae Herba; characteristics spectrum; chemometrics; origin identification

溪黄草为一味岭南特色中草药,具有清热利湿、凉血散瘀之效,用于湿热黄疸、腹胀胁痛、湿热泄泻、热毒泻痢以及跌打损伤等<sup>[1]</sup>,为岭南地区临床常用药材,也是名优中成药大品种“消炎利胆片”的组方原料。《中国药典》(2020年版 四部)记载其为唇形科(Labiatae)香茶菜属 *Rabdosia* 植物线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch. -Ham. ex D. Don) H. Hara 或溪黄草 *Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara 的干燥地上部分<sup>[2]</sup>,《广东省中药材标准》收录的基原植物则为溪黄草 *R. serra*、线纹香茶菜 *R. lophanthoides* 及其纤花变种 *R. lophanthoides* var. *graciliflora* (Benth.) H. Hara<sup>[1]</sup>。本课题组成员在调研和整理溪黄草药材种质资源过程中发现,同属植物长叶香茶菜 *Rabdosia stracheyi* (Benth. ex Hook. f.) Hara 在民间也常作溪黄草药材使用。由于这几种植物的形态特征较为相似,很难从外观性状对干品药材进行鉴别区分,溪黄草商品药材一直存在品种资源混乱的现象。因此,研究建立不同基原溪黄草的鉴别方法,对确保与提高其临床用药安全和疗效具有重要意义。

关于溪黄草药材不同基原植物的鉴定,传统上多从性状、显微等方面进行鉴别研究<sup>[3-5]</sup>,由于干品药材多皱缩破碎,难以准确、快速地鉴别。近年来,学者们多从 DNA 分子和化学组分水平对其基原植物进行鉴别研究,然而分子鉴定只能区分种水平的溪黄草(*Rabdosia serra*)和线纹香茶菜,难于区分线纹香茶菜原变种与其变种<sup>[6]</sup>。化学组分研究方面,有学者认为傅里叶红外光谱法和二维相关红外光谱法可实现对溪黄草、线纹香茶菜及其纤花和狭基变种的鉴别<sup>[7]</sup>,也有学者开展了化学成分含量和指纹图谱的鉴别研究<sup>[8,9]</sup>,实验结果也不能很好地区分线纹香茶菜原变种与其变种。近年来,化学计量学方法在中药色谱分析中应用越来越广,能对色谱分析产生的大量数据进行进一步分析与处理,与色谱分析结合在中药质量控制方面扮演着越来越重要的角色<sup>[10]</sup>,超高效液相(UPLC)具有分析时间短、分离效果好、灵敏度高等优势<sup>[11]</sup>,因此本研究采用 UPLC

对收集的溪黄草、线纹香茶菜、纤花香茶菜和长叶香茶菜 4 种不同基原植物的 32 批次药材进行特征图谱研究,并结合聚类分析、主成分分析、偏最小二乘法判别分析等化学计量学方法对此 4 种基原植物进行区分和鉴别,以期为溪黄草药材的基原鉴别及药材质量的分析和评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-30AD 超高效液相色谱仪(日本岛津公司);BP110S 电子天平(德国 Sartorius 公司);十万分之一天平(瑞士 Precisa 公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);H1650R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);SHZ-D III 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

### 1.2 药物与试剂

对照品咖啡酸(质量分数为 99.7%,批号:110885-201703)、迷迭香酸(质量分数为 98.5%,批号:111871-201505)、冬凌草甲素(质量分数为 99.7%,批号:111721-201704)均购自中国食品药品检定研究院;异夏佛塔昔(质量分数为 98%)购自成都埃法生物科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯(德国默克公司);甲酸为色谱纯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);水为超纯水;其余所用试剂均为分析纯(天津市致远化学试剂有限公司)。

### 1.3 药材

本研究试验材料共 32 批药材,分为市购商品药材和种质资源圃种植采集的药材。其中 24 批药材为 2018—2019 年间课题组实地考察广东、江西等省区溪黄草药材资源时所收集的不同居群的种质,统一种植保存于广州中医药大学时珍山种质资源圃,于植株生长旺盛期割取地上部分,自然阴干而成。药材样品信息见表 1,其中溪黄草 *R. serra* 16 批(XHC1 ~ XHC16)、线纹香茶菜 *R. lophanthoides* 2 批(XW1 ~ XW2)、纤花香茶菜 *R. lophanthoides* var. *graciliflora* 10 批(XH1 ~ XH10)、长叶香茶菜 *R. stracheyi* 4 批(CY1 ~ CY4),样品 XHC9 ~ XHC16 为商

表 1 溪黄草药材样品信息

Table 1 Sample information of Rabdosiae Herba

编号 No.	来源 Origin
XHC1	广东省兴宁市福兴街
XHC2	广东省阳春市河朗镇
XHC3	广东省惠州市博罗县
XHC4	广东省韶关市始兴县
XHC5	广东省清远市阳山县
XHC6	广东省广州市番禺区
XHC7	广东省英德市大湾镇
XHC8	广东省韶关市曲江县
XHC9	广州市香雪制药股份有限公司
XHC10	广东南北行中药饮片有限公司
XHC11	安徽广印堂中药股份有限公司
XHC12	广东南北行中药饮片有限公司
XHC13	广州市诚济药业有限公司
XHC14	佛山市御嘉中药饮片有限公司
XHC15	广东时珍制药有限公司
XHC16	广州市药材公司中药饮片厂
XW1	广东省韶关市始兴县
XW2	广东省梅州市平原县
XH1	广东省广州市番禺区
XH2	广东省梅州市平原县
XH3	广东省从化市良口镇
XH4	江西省赣州市寻乌县
XH5	广东省清远市连南县
XH6	广东省梅州市梅县
XH7	广东省梅州市平原县
XH8	广东省普宁市梅塘镇
XH9	广东省汕头市澄海区
XH10	广东省韶关市信丰县
CY1	广东省茂名市思贺镇
CY2	广东省阳春市春湾镇
CY3	广东省阳春市春湾镇
CY4	广东省阳春市河朗镇

品药材,其余为种质资源圃采集的药材。各样品均经广州中医药大学刘军民教授鉴定。各批次药材样品分别粉碎,过 50 目筛,于常温下密闭保存,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~30 min, 18%→45% A; 30~45 min, 45%→85% A; 45~50 min, 85%→95% A; 50~55 min, 95%→100% A; 55~70 min, 100% A。流速为 0.3 mL/min,进样量为 2 μL,柱温为 30 °C,检测波长为 254 nm。

### 2.2 混合对照品溶液的制备

分别取咖啡酸、迷迭香酸、冬凌草甲素、异夏佛塔苷对照品适量,精密称定,加入甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为 0.46、2.13、0.25、1.94 mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取溪黄草药材粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 10 mL,摇匀,超声提取 30 min,上清液进行离心 10 min,取离心后的上清液 2.0 mL 移至 10 mL 容量瓶中,甲醇定容后摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

### 2.4 特征图谱方法学研究

#### 2.4.1 专属性试验

取空白对照(甲醇)、混合对照品溶液和溪黄草药材(XHC1)样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,色谱图见图 1。结果显示,空白溶剂在测定成分出峰时间处无干扰,表明该方法专属性良好。

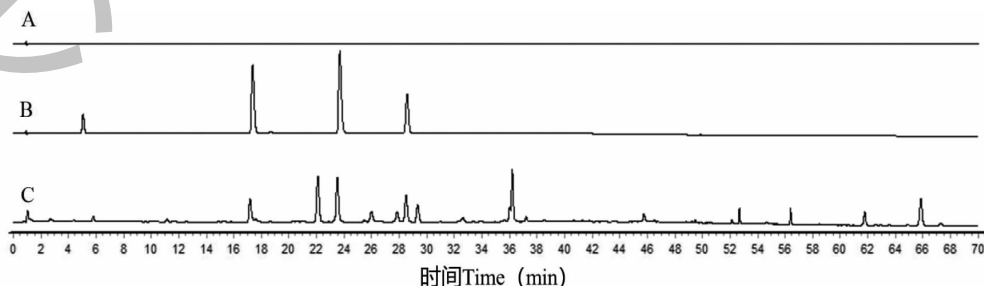


图 1 1 专属性考察色谱图

Fig. 1 Chromatogram of specificity investigation

注:A:空白对照;B:混合对照品;C:样品。Note:A:Blank control;B:Mixed reference substance;C:Sample.

### 2.4.2 精密度试验

取同一份溪黄草药材供试品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,计算得各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0%,相对峰面积的RSD均小于2.0%,表明仪器的精密度良好。

### 2.4.3 稳定性试验

取同一份溪黄草药材供试品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于配制后的0、2、4、6、8、16、24 h按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算得各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0%,相对峰面积的RSD值均小于3.0%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.4.4 重复性试验

取同一份溪黄草药材样品,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算得各共有峰相对保留时间的RSD值均小于1.0%,相对峰面积的RSD值均小于3.0%,表明此方法的重复性良好。

## 2.5 特征图谱分析及评价

### 2.5.1 特征图谱的建立及相似度评价

分别取32批不同基原的溪黄草药材样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,将32批药材样品的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)”进行分析,建立4种基原植物的特征图谱。分别以

XHC1、XW1、XH1、CY1特征图谱作为参照图谱,采用中位数法,时间窗格为0.5,进行多点校正和色谱峰匹配,生成4种基原植物药材的特征图谱叠加图和对照图谱(见图2、图3)。根据出峰时间的先后,对各基原植物的共有峰进行编号,4种基原植物共标定了41个峰(见图4)。其中溪黄草确定了19个共有峰,线纹香茶菜确定了24个共有峰,纤花香茶菜确定了26个共有峰,长叶香茶菜确定了21个共有峰。经与混合对照品的色谱图比对,可指出4个特征峰,分别为1号峰咖啡酸,7号峰异夏佛塔苷,12号峰迷迭香酸,17号峰冬凌草甲素。

由图3可知,4种基原的溪黄草药材共具有7个共有峰,分别为1(咖啡酸)、12(迷迭香酸)、31、37、38、40和41号峰。16批溪黄草共有峰多集中于色谱图30 min之前,而其他3种基原的共有峰均主要集中于30 min之后,表明溪黄草与其他3种基原所含化学成分具有较大差别。其中,共有峰2、6、7(异夏佛塔苷)、10、11、13、14、16、17(冬凌草甲素)、19、22仅在溪黄草中检出,可作为特征峰明显区分溪黄草与其他3种基原;其他3种基原所含共有峰相似度较高,部分共有峰仍具有差别,如共有峰15和21仅在线纹香茶菜中检出,可作为特征峰区别于其他2个基原;长叶香茶菜比纤花香茶菜少了3、5、9、23、30、34、36号峰,多了8和26号峰,可用于区分二者。因此,通过特征图谱色谱峰的差异能对4种基原进行初步区分。

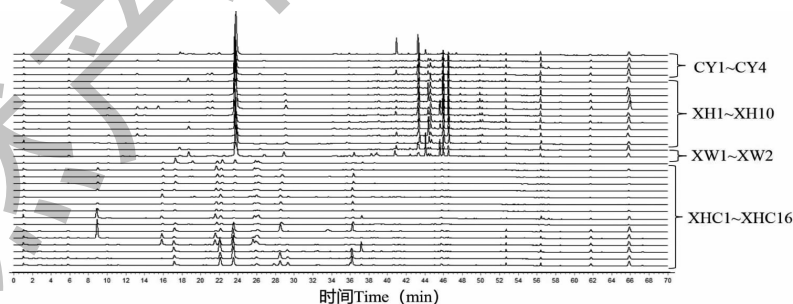


图2 32批溪黄草药材UPLC叠加色谱图

Fig. 2 UPLC overlay chromatogram of 32 batches of Rabdosiae Herba

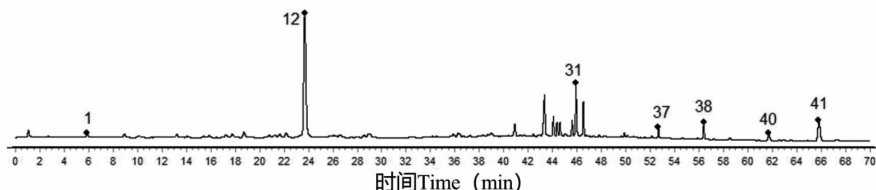


图3 32批溪黄草药材指纹图谱共有模式

Fig. 3 Common pattern of the fingerprint of 32 batches of Rabdosiae Herba

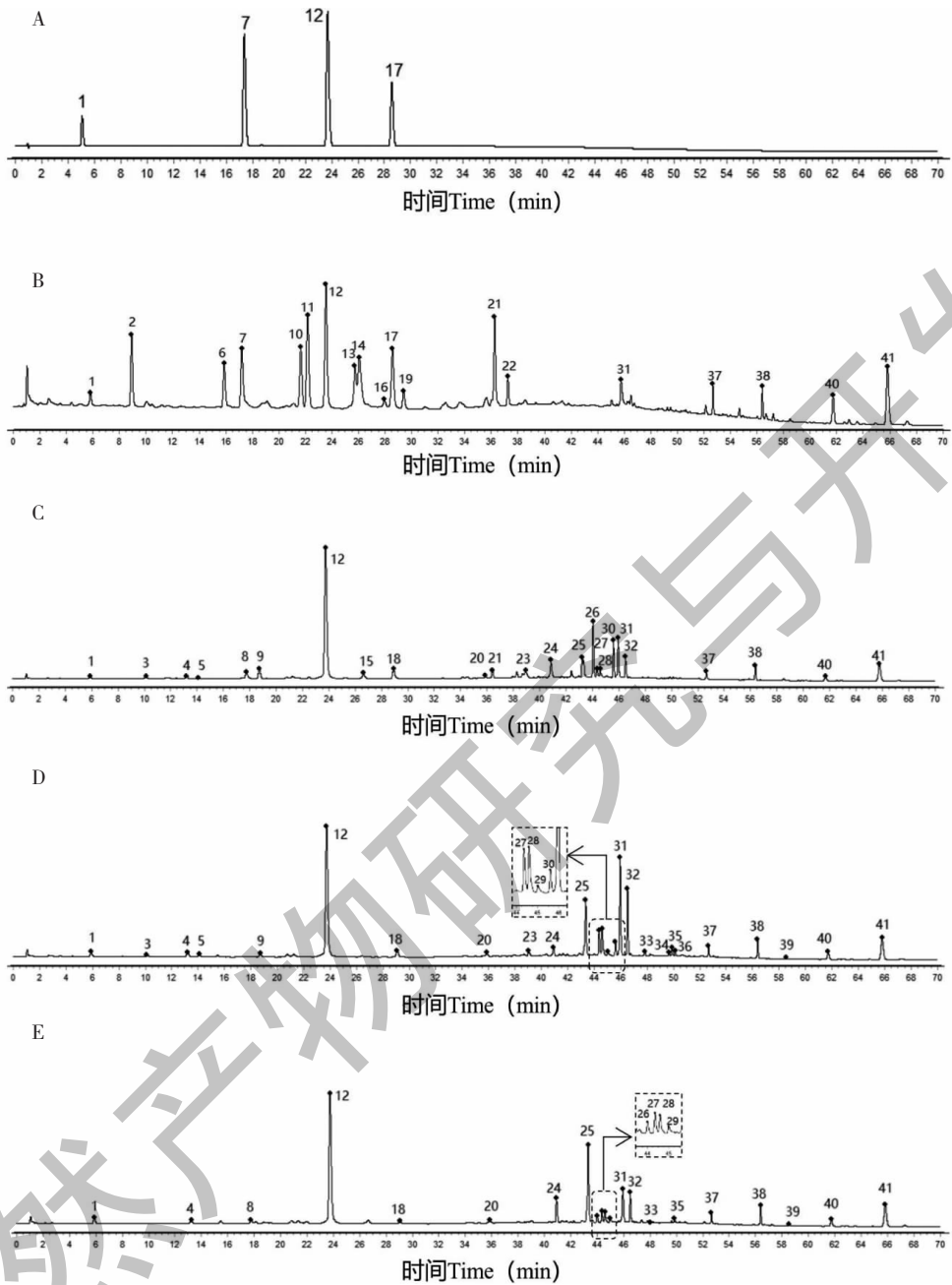


图4 4种基原溪黄草药材特征图谱色谱峰指认

Fig. 4 Characteristic chromatograms peak identification of four original plants of Rabdosiae Herba

注:A:混合对照品;B:溪黄草对照特征图谱;C:线纹香茶菜对照特征图谱;D:纤花香茶菜对照特征图谱;E:长叶香茶菜对照特征图谱。1:咖啡酸;7:异夏佛塔昔;12:迷迭香酸;17:冬凌草甲素。Note:A:Mixed reference substance;B:Control characteristic chromatogram of *R. serra*;C:Control characteristic chromatogram of *R. lophanthoides*;D:Control characteristic chromatogram of *R. lophanthoides* var. *graciliflora*;E:Control characteristic chromatogram of *R. stracheyi*. 1:Caffeic acid;7:Isoschaftoside;12:Rosmarinic acid;17:Oridonin.

Control characteristic chromatogram of *R. lophanthoides*;D:Control characteristic chromatogram of *R. lophanthoides* var. *graciliflora*;E:Control characteristic chromatogram of *R. stracheyi*. 1:Caffeic acid;7:Isoschaftoside;12:Rosmarinic acid;17:Oridonin.

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)”软件,分别对4种基原共32批药材样品进行分析,采用中位数法,时间窗格为0.5,分别以溪黄草、线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜共有模式作为对照特征图谱,计算各色谱图组内的相

似度(见表2)。结果显示,溪黄草之间的相似度为0.679~0.909,线纹香茶菜之间的相似度为0.783~0.990,纤花香茶菜之间的相似度为0.838~0.994,长叶香茶菜之间的相似度为0.806~0.975,即来源于同一基原不同产地的药材样品间化学组分

存在一定差异,其中不同产地的溪黄草差异较大,表明不同产地间溪黄草化学成分存在较大差异。药用植物的遗传多样性与植物表型多样性、化学成分多型性之间密切相关,并最终影响药材的功效<sup>[12]</sup>,课题组前期对溪黄草不同基原植物进行了遗传多样性

表 2 4 种基原溪黄草药材相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of four original plants of Rabdosiae Herba

编号 No.	相似度 Similarity
XHC1	0.879
XHC2	0.804
XHC3	0.733
XHC4	0.862
XHC5	0.679
XHC6	0.830
XHC7	0.834
XHC8	0.731
XHC9	0.900
XHC10	0.843
XHC11	0.734
XHC12	0.879
XHC13	0.909
XHC14	0.909
XHC15	0.842
XHC16	0.838
XW1	0.990
XW2	0.783
XH1	0.992
XH2	0.957
XH3	0.989
XH4	0.838
XH5	0.991
XH6	0.971
XH7	0.993
XH8	0.988
XH9	0.882
XH10	0.994
CY1	0.975
CY2	0.806
CY3	0.884
CY4	0.975

分析,研究表明,溪黄草居群的遗传变异主要存在于居群间,且遗传多样性明显高于其余种或者变种<sup>[13]</sup>,因此猜测其相似度低的原因与其较高的遗传变异相关。

再分别将上述 4 种基原溪黄草药材的对照特征图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)”软件,进行组间相似度比较(见表 3)。结果显示,4 种不同基原溪黄草药材对照特征图谱两组间的相似度范围为 0.206 ~ 0.919,其中,溪黄草与其他 3 种基原植物的相似度均较低,表明溪黄草的化学组分与其他 3 种植物区别明显,线纹香茶菜与纤花香茶菜的相似度最高,长叶香茶菜与纤花香茶菜的相似度也较高,这为长叶香茶菜在民间作溪黄草药材使用提供了一定的科学依据。

### 2.5.2 聚类分析(CA)

综合溪黄草的 19 个特征峰,线纹香茶菜的 24 个特征峰,纤花香茶菜的 26 个特征峰以及长叶香茶菜的 21 个特征峰,共计 41 个色谱峰,将各个基原中无色谱峰信号的峰面积设为 0,以 41 个色谱峰的峰面积作为变量,导入 SPSS 21.0 软件,采用组间平均数联结的聚类方法,以夹角余弦作为距离公式,进行聚类分析,结果见图 5。当判断距离为 13 时,4 种基原溪黄草药材样品可被分为 5 类,16 批溪黄草被分为 2 类,其他 3 种基原植物各为一类,此分类结果进一步表明了溪黄草遗传多样性明显高于其余种或者变种,且遗传多样性与化学成分差异的相关性;当判断距离为 15 时,4 种基原溪黄草药材样品可被分为 3 类,溪黄草和线纹香茶菜各为一类,纤花香茶菜和长叶香茶菜被划分为一类,表明纤花香茶菜与长叶香茶菜的化学成分具有较大相似度;当判断距离为 20 时,4 种基原溪黄草药材样品可被分为 2 类,一类均为溪黄草,另一类为其他 3 种基原植物,进一步表明溪黄草与其他 3 种基原植物药材的化学组分相差较大,聚类分析结果与相似度结果一致。

### 2.5.3 主成分分析(PCA)

以 32 批溪黄草药材的 41 个共有峰的峰面积作为变量,导入 SPSS 21.0 软件,进行主成分分析,得相关系数的特征值和方差贡献率(见表 4)和碎石图(见图 6)。由表 4 可知,以主特征值 > 1 为提取标准,可提取出 8 个主成分,其累计方差贡献率为 87.380%,表明提取出的 8 个主成分可以代表样品指纹图谱中 41 个共有峰的大部分信息内容;碎石图结果显示前 8 个因子的散点均在陡坡上,且特征值

表3 4种基原溪黄草药材间对照特征图谱相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of control characteristic chromatograms of four original plants of Rabdosiae Herba

基原植物 Original plant	溪黄草 <i>R. serra</i>	线纹香茶菜 <i>R. lophanthoides</i>	纤花香茶菜 <i>R. lophanthoides</i> var. <i>graciliflora</i>	长叶香茶菜 <i>R. stracheyi</i>
溪黄草 <i>R. serra</i>	1			
线纹香茶菜 <i>R. lophanthoides</i>	0.314	1		
纤花香茶菜 <i>R. lophanthoides</i> var. <i>graciliflora</i>	0.224	0.919	1	
长叶香茶菜 <i>R. stracheyi</i>	0.206	0.770	0.903	1

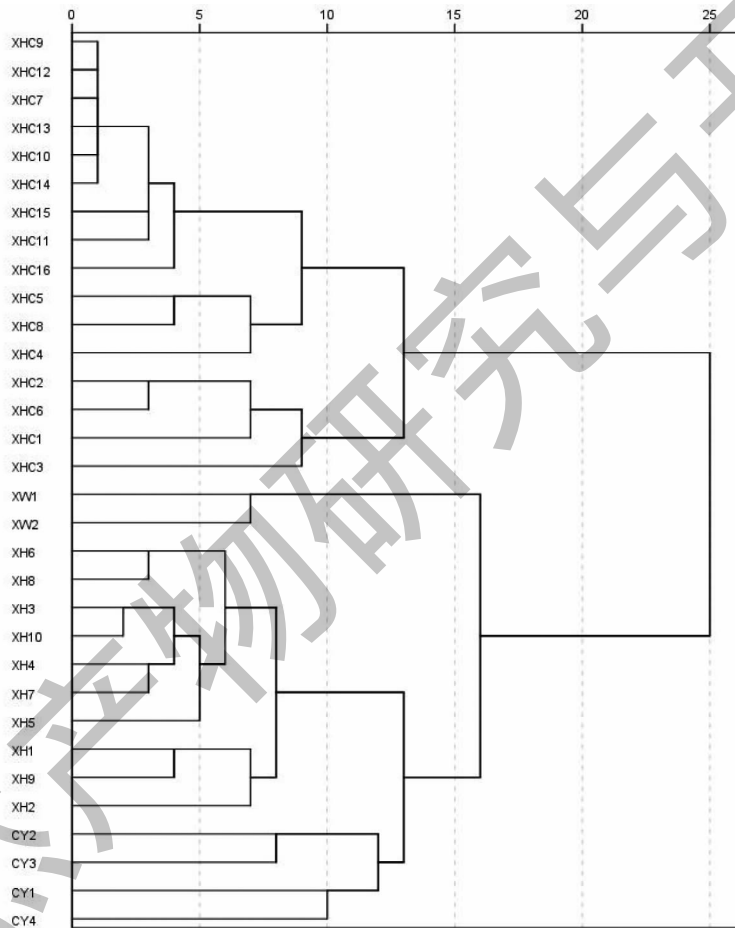


图5 聚类分析结果

Fig. 5 Results of cluster analysis

均大于1,表明这8个主成分基本显示出不同基原溪黄草药材之间的异同。计算各药材样品之间的总成分得分(见表5),结果显示,不同基原药材之间主成分得分具有一定差异,如溪黄草的主成分3和4得分较高,线纹香茶菜和纤花香茶菜均为主成分1得分较高,长叶香茶菜的主成分1、5和8得分较高,

除溪黄草外,其他3种基原均具有主成分1得分。采用SIMCA-P 13.0软件绘制4种基原植物的主成分分析得分图,结果与聚类分析一致,溪黄草可与其他3种基原植物区别明显,说明溪黄草与其他基原植物的化学主成分上存在明显差异,而3种基原植物还不能完全区分(见图7)。

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate(%)	累计方差贡献率 Cumulative variance contribution rate(%)
1	18.877	46.041	46.041
2	4.626	11.282	57.324
3	3.666	8.941	66.264
4	2.512	6.128	72.392
5	2.010	4.903	77.295
6	1.760	4.294	81.589
7	1.310	3.195	84.784
8	1.065	2.597	87.380

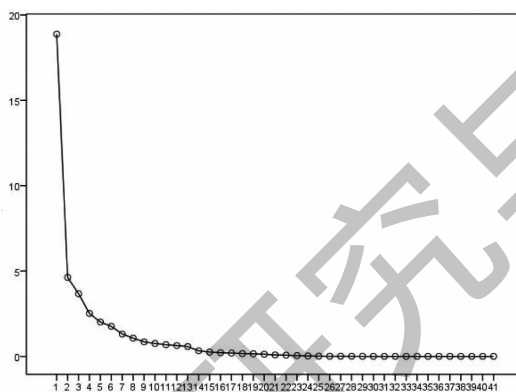


图 6 公共因子碎石图

Fig. 6 Scree plot of common factor

表 5 主成分得分

Table 5 Principal component scores

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
XHC1	-4.210	1.791	5.668	-0.608	-0.476	0.154	0.361	-1.013
XHC2	-3.577	0.963	3.566	-1.050	-0.539	0.262	2.179	0.713
XHC3	-3.866	1.714	5.072	0.414	0.928	-0.507	-4.257	0.091
XHC4	-5.113	1.241	-0.881	4.256	1.582	-0.105	-0.102	-0.844
XHC5	-3.688	0.640	-1.946	3.415	2.545	-0.352	1.562	1.312
XHC6	-3.504	0.955	2.703	-0.729	-0.590	0.198	3.076	-1.073
XHC7	-3.863	-0.374	-1.179	-1.118	-1.311	0.293	0.236	-1.119
XHC8	-4.199	0.454	-1.479	2.231	1.158	-0.206	-0.706	-0.528
XHC9	-3.424	-0.411	-1.318	-0.974	-0.803	0.089	-0.113	-1.047
XHC10	-3.990	-0.340	-1.534	-0.577	-1.020	0.214	-0.117	-1.259
XHC11	-3.954	-0.280	-1.221	-0.614	-0.985	0.213	-0.260	-0.979
XHC12	-3.794	-0.472	-1.704	-0.792	-1.016	0.176	-0.277	-1.149
XHC13	-3.852	-0.320	-1.304	-0.696	-0.906	0.207	-0.057	-0.755
XHC14	-4.103	-0.142	-1.065	-0.409	-0.910	0.223	0.068	-1.123
XHC15	-4.025	0.114	-1.376	0.785	0.032	0.073	-0.116	-0.810



续表 5 (Continued Tab. 5)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
XHC16	-4.505	-0.060	-1.041	0.102	-0.860	0.208	-1.021	-0.994
XW1	3.277	-9.140	2.159	2.142	-0.439	2.167	0.123	0.425
XW2	1.279	-4.758	0.395	-0.223	0.438	-0.788	-0.731	-0.582
XH1	3.157	0.840	-1.222	-1.182	-0.686	0.688	-0.493	0.717
XH2	3.922	0.175	-0.970	-0.280	-2.560	-2.331	-0.594	1.792
XH3	5.177	0.524	0.064	0.420	-0.166	1.853	0.147	2.408
XH4	5.998	2.538	-0.280	-0.075	0.273	1.997	-0.392	1.473
XH5	6.521	0.880	-0.575	0.376	-1.635	-0.022	-0.512	2.470
XH6	7.123	0.294	1.364	3.002	-1.981	-3.437	0.806	-0.154
XH7	5.868	1.938	0.347	0.527	1.066	1.744	0.080	-1.415
XH8	5.775	1.516	0.205	0.701	-0.316	-1.657	0.327	-0.733
XH9	2.646	0.528	-1.420	-1.269	-1.292	0.635	-0.591	2.192
XH10	5.278	1.140	0.062	-0.076	1.388	2.695	0.116	0.444
CY1	1.813	-0.359	0.244	-0.897	1.673	-1.923	0.646	-1.089
CY2	2.615	1.248	-0.485	-1.717	2.037	0.053	0.128	0.431
CY3	1.730	0.289	-0.217	-1.781	1.632	-0.525	0.761	3.153
CY4	1.492	-3.127	-0.632	-3.305	3.738	-2.287	-0.275	-0.952

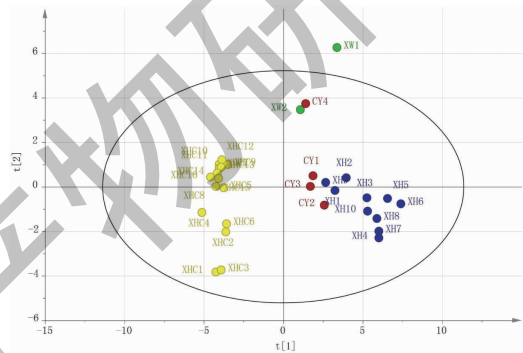


图 7 主成分分析得分图

Fig. 7 PCA score plot

#### 2.5.4 偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)

由不同基原间相似度结果和主成分分析结果可知,溪黄草与其他 3 种基原相似度较低,可明显区分,而其他 3 种基原间的相似度较高,较难区分。为了进一步探索这 3 种不同基原间的差异,寻找 3 种基原的差异标志物,采用 OPLS-DA 对线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜进行分析,得分图见图 8。本研究所构建的模型参数  $R^2X = 0.943$ ,  $R^2Y = 0.997$ ,  $Q^2 = 0.794$ ,均大于 0.5,说明此模型稳定可

靠且具有良好的预测性。从得分图可知,3 种基原的溪黄草药材可被明显分为 3 类,即相同基原植物各为一类。通过变量重要性投影值(VIP 值)对 3 种基原溪黄草差异性标志物分析,以  $VIP > 1$  为标准,可得到 15 个分类标志物(见图 9),分别为色谱峰 8、9、23、25、26、28~36、39,表明这些成分在 3 种基原的药材间含量差异较大,对区分这 3 种不同基原的药材样品具有重要意义。

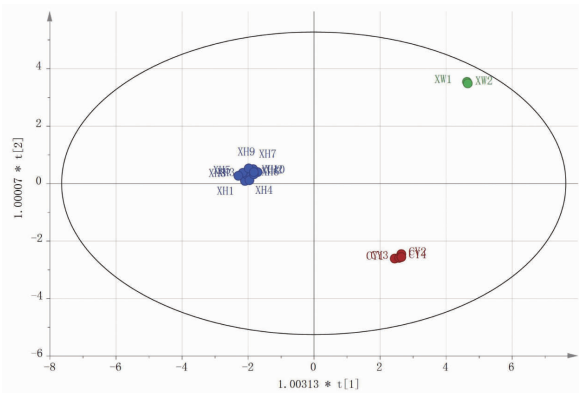


图 8 3 种基原溪黄草药材样品得分图

Fig. 8 Score plot of three original plants of Rabdosiae Herba

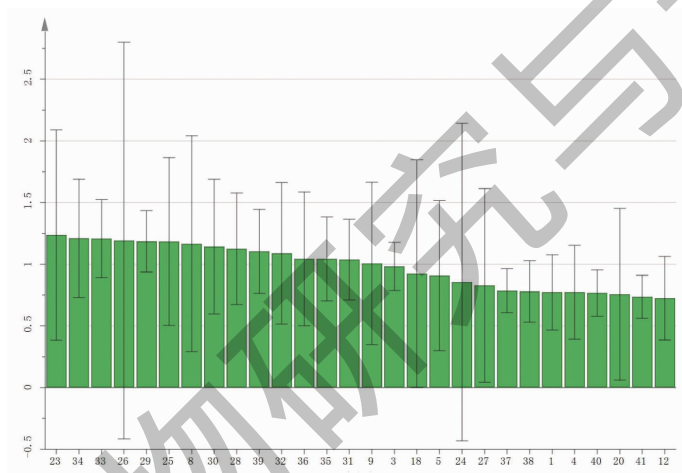


图 9 3 种基原溪黄草药材的 OPLS-DA 分析 VIP 图

Fig. 9 VIP value of three original plants of Rabdosiae Herba by OPLS-OA analysis

### 3 讨论与结论

本研究分别对供试溶液的制备方法和色谱条件进行了筛选优化。提取溶剂(甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇)考察结果显示,以甲醇作为提取溶剂时,得到的样品图色谱峰数较多,峰面积相对较大,基线平稳,较好地反映溪黄草药材的化学组分,因此选择甲醇作为溪黄草药材特征图谱的提取溶剂;测定波长(250、254、260、280 nm)考察结果显示,254 nm 下色谱峰较多且各峰大小均匀,因此选择 254 nm 为检测波长;流动相(甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、0.1% 甲酸甲醇-0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水)考察结果表明,甲醇-0.1% 甲酸水作流动相进行洗脱时,基线平整,分离度及峰形均较好;柱温和流速考察结果显示,当柱温 30 ℃ 和流速 0.3 mL/min 时,各色谱法分离效果最好。

本研究采用 UPLC 建立了同时适用于鉴别溪黄

草药材 4 种基原植物的特征图谱,基线平整、分离度良好、共有峰数量多,在建立的溪黄草、线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜对照图谱中分别标定了 19、24、26、21 个共有峰,根据各自共有峰的差异可将 4 种基原植物进行初步区分,由于收集到的线纹香茶菜和长叶香茶菜批次较少,为避免研究过程的误差,在研究共有峰时选择色谱峰响应值较高、分离度及峰形均较好的色谱峰进行标定。相似度评价结果表明,由于产地差异,同一基原药材间具有一定差异性;不同基原药材之间也存在差异,其中溪黄草与其他 3 种基原的相似度均较低,可明显区分;纤花香茶菜与线纹香茶菜相似度较高,长叶香茶菜与纤花香茶菜的相似度也较高,其原因可能为纤花香茶菜、线纹香茶菜与长叶香茶菜均为香茶菜属皱叶香茶菜组植物,化学成分类型相似。现有研究表明,溪黄草药材的基原植物所含有的化学成分类型差异较小,

均主要包括萜类、黄酮类、酚酸类、甾醇类化合物<sup>[14]</sup>。其中,二萜类化合物是溪黄草药材的重要成分,基原植物溪黄草主要含有的二萜类型为对映-贝壳杉烷型,线纹香茶菜及其纤花变种、长叶香茶菜则主要含有松香烷型及对映-松香烷型二萜<sup>[15]</sup>,猜测溪黄草与线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜相似程度较低的原因可能与二萜类化合物类型的区别有关,而线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜之间的区别可能与其各自所含成分的含量及种类有关。

主成分分析表明,可通过各基原的主成分得分差异进一步将溪黄草与线纹香茶菜、纤花香茶菜和长叶香茶菜区分。偏最小二乘法判别分析则可将线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜3种基原植物进行区分,分类效果显著,所得的15个分类标志物是引起三者差异的主要标志性成分,对区分这3种不同基原植物具有重要意义,这15个色谱峰的指认还有待进一步研究鉴定。

综上,本研究建立的溪黄草4种基原植物的UPLC特征图谱,通过特征峰的标定以及相似度评价可初步将4种不同基原植物进行区分。为更好地区分4种基原植物,寻找差异性成分,本研究进一步采用了聚类分析、主成分分析及偏最小二乘法判别分析法,可将溪黄草4种基原植物完全区分,研究结果为溪黄草药材的基原鉴别和质量分析与评价提供了一定的科学方法和参考依据。

#### 参考文献

- Guangdong Food And Drug Administration. Guangdong Traditional Chinese Medicine Standards; Vol II (广东省中药药材标准:第二册)[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2011: 347-353.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol IV (中华人民共和国药典:第四部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 558.
- Zhang Q, Pan CM. Different morphology of *Rabdosia serra*, *Rabdosia lophanthoides*, *Rabdosia lophanthoides* var. *gerardiana* and *Rabdosia lophanthoides* var. *graciliflora*[J]. Pharm Today(今日药学), 2012, 22: 21-24.
- Liu Y, Meng SS, Ye Z, et al. Comparison of the morphological characteristics of the seed-like fruits of four origins of Xihuangcao[J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2021, 19: 1337-1344.
- Chen JN, Jiang DX, Zhao AG, et al. Microscopic identification of medicinal material of Herba Rabdosiae Serrae[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2006, 23: 52-55.
- Tan RX, Hiang J, Xu W, et al. DNA molecular identification of *Isodon serra* and its adulterants[J]. J Chin Med Mater(中草药材), 2017, 40: 320-324.
- Huang DL, Chen XK, Xu YQ. Identification of four original species of Xihuangcao by 2D infrared correlation spectroscopy[J]. J Light Scatter(光散射学报), 2015, 27: 64-68.
- Tang HM, Chen JN, Zhang Y, et al. Simultaneous determination of eight water-soluble compositions in *Isodon serra* from different origins by HPLC[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35: 228-234.
- Zhu DQ. Study on HPLC fingerprint analysis of Xihuangcao and its quality evaluation[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2013.
- Xiong J, Li HY, Li GS, et al. Discussion on the application of chemometrics in chromatographic analysis of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2021, 41: 1681-1689.
- Tan P, Li CY, Zhang CE, et al. Application status and prospect of ultra-performance liquid chromatography in analysis field of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 4: 5938-5945.
- Qiao CZ. Multiplicity and genetic variation of higher phytochemical components of medicinal uses[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1979, 10: 38-41.
- Meng SS. The study in genetic diversity and development SCAR markers of Xihuangcao[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2019.
- Sun LQ, Qian F, Li YM, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Linearstripe Rabdosia Herb from various origins[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med(上海中医药大学学报), 2020, 34: 88-98.
- Liu M, Wang WG, Sun HD, et al. Diterpenoids from *Isodon* species; an update[J]. Nat Prod Rep, 2017, 34: 1090-1140.