

(6): 1090-1096.

[9] 刘雅莉, 邓桂珠, 贤明华, 等. 枳壳炮制前后指纹图谱及主要黄酮类成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 113-118.

[10] 冯治国, 赵 祺, 朱 强, 等. 基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3689-3695.

[11] 关 欣, 王鹤辰, 包永睿, 等. 灰色关联分析中药蒲公英不同部位对 RAW264.7 细胞的抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1354-1357.

[12] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系[J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.

[13] 杨 超, 朱晓钗, 万浩婷, 等. 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5267-5274.

[14] 丁永胜, 罗 静, 赵程博文, 等. 基于 HPLC 法和灰色关联法评价不同产地、不同商品规格三七质量[J]. 中草药, 2020, 51(4): 1069-1075.

[15] 司明东, 李新蕊, 李亚楠, 等. 基于质量常数法和化学计量学的黄芪等级评价[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3235-3239.

[16] Liu X S, Wu Z Z, Yang K, *et al.* Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76: 70-74.

[17] Gao F Y, Xu Z H, Wang W Z, *et al.* A comprehensive strategy using chromatographic profiles combined with chemometric methods; Application to quality control of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc[J]. *J Chromatography A*, 2016, 1466: 67-75.

[18] 刘欣媛, 嵇长久, 彭文文. 中药枳壳的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(19): 1627-1631.

基于 HPLC-QAMS/GC 法联合多元统计分析及加权 TOPSIS 法评价广藿香质量

吴学辉¹, 程心玲¹, 潘艳琳¹, 张晓斌², 肖 钦^{1*}

(1. 福建中医药大学附属人民医院药学部, 福建 福州 350004; 2. 福建省食品药品质量检验研究院, 福建 福州 350001)

摘要: **目的** 基于 HPLC-QAMS/GC 法多组分定量, 建立多元统计分析及加权 TOPSIS 模型, 对不同产地广藿香进行综合质量评价。**方法** HPLC-QAMS 法同时测定新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮的含量。GC 法测定百秋李醇含量。主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 筛选影响广藿香化学成分差异的标志性成分。加权 TOPSIS 模型对广藿香整体质量进行分析和评价。**结果** 10 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 1$), 平均加样回收率 96.85%~100.20%, RSD 0.67%~1.64%。毛蕊花糖苷、百秋李醇、广藿香酮、列当苷是影响广藿香产品质量的主要潜在标志物。18 批不同产地广藿香加权 TOPSIS 法质量评价贴近度 (D_n) 分别为 0.382 1、0.512 9、0.512 5、0.535 8、0.535 7、0.358 8、0.536 5、0.548 3、0.206 3、0.178 2、0.142 6、0.117 4、0.716 9、0.749 5、0.664 5、0.738 1、0.623 4、0.582 1, 表明不同产地广藿香药材存在质量差异, 广东产的广藿香质量较优。**结论** 该方法操作便捷、结果准确, 可用于广藿香的综合质量评价。

关键词: 广藿香; 主成分分析 (PCA); 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA); 优劣解距离法 (TOPSIS); 质量评价; HPLC-QAMS/GC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2023)11-3670-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.11.027

收稿日期: 2023-01-11
基金项目: 福建省科技厅引导性项目 (2018Y0042)
作者简介: 吴学辉 (1973—), 男, 副主任药师, 从事药物质量评价、医院药学研究。Tel: (0591) 86250178
* 通信作者: 肖 钦 (1975—), 女, 主任药师, 从事研究医院药学研究。Tel: (0591) 83947159, E-mail: exff73@163.com

Quality evaluation of *Pogostemonis Herba* based on HPLC-QAMS/GC combined with multivariate statistical analysis and weighted TOPSIS method

WU Xue-hui¹, CHENG Xin-ling¹, PAN Yan-lin¹, ZHANG Xiao-bin², XIAO Qin^{1*}

(1. Department of Pharmacy, The People's Hospital Affiliated to Fujian University of TCM, Fuzhou 350004, China; 2. Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: AIM To establish the multivariate statistical analysis and weighted TOPSIS model for the comprehensive quality assessment of *Pogostemonis Herba* from different habitats based on HPLC-QAMS/GC multi-component quantification. **METHODS** The content determinations of vicenin II, campneoside II, acteoside, crenatoside, isoacteoside, rhamnetin, apigenin-7-O- β -D-glucuronic acid glycoside, pachypodol, retusin, pogostone were conducted by HPLC-QAMS method; and patchouli alcohol by GC method. *Pogostemonis Herba* had its marker components screened by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA); and its overall quality analyzed and assessed by the weighted TOPSIS model. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 1$), whose average recoveries were 96.85% – 100.20% with the RSDs of 0.67% – 1.64%. Acteoside, patchouli alcohol, pogostone and crenatoside might be the main potential markers affecting the quality of *Pogostemonis Herba*. The values of quality evaluation closeness (D_n) of 18 batches of *Pogostemonis Herba* from different habitats by weighted TOPSIS method were 0.382 1, 0.512 9, 0.512 5, 0.535 8, 0.535 7, 0.358 8, 0.536 5, 0.548 3, 0.206 3, 0.178 2, 0.142 6, 0.117 4, 0.716 9, 0.749 5, 0.664 5, 0.738 1, 0.623 4 and 0.582 1, respectively, suggesting the quality differences due to different habitats, and a better quality seen in those from Guangdong. **CONCLUSION** This method is easy to operate and accurate in result, and can be used for the comprehensive quality evaluation of *Pogostemonis Herba*. **KEY WORDS:** *Pogostemonis Herba*; principal component analysis (PCA); orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA); TOPSIS method; quality evaluation; HPLC-QAMS/GC

广藿香为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分，用于湿浊中阻、脘痞呕吐、暑湿表证、湿温初起、发热倦怠、胸闷不舒、寒湿闭暑、腹痛吐泻、鼻渊头痛的治疗^[1]，主要含有甾体类、黄酮类、萜类、生物碱类、苯丙素类等成分^[2-3]，临床使用广泛。广藿香为福建中医药大学附属人民医院院内制剂藿砂颗粒的君药之一，现收载于 2020 年版《中国药典》一部，该标准使用 GC 法对百秋李醇进行含量测定，检索广藿香定量控制相关文献大多为 HPLC 法测定，未对检测结果进行有效评价。本研究采集广东、海南、广西、福建 4 个省、自治区 18 个产地的广藿香药材，采用 HPLC-QAMS/GC 法^[4-6]对广藿香中新西兰牡荆苷、紫葳新苷 II、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮、百秋李醇含量进行测定，结合主成分分析 (PCA)^[7-8]、正

交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)^[8-9]和加权 TOPSIS 法^[10-11]，筛选出引起不同批广藿香成分差异的主要标志性成分，同时对不同产地广藿香综合质量进行分析评价，以期为广藿香整体质量控制提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 新西兰牡荆苷 (批号 14022804, 纯度 99.1%)、异毛蕊花糖苷 (批号 15031204, 纯度 96.1%)、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (批号 PRF7090824, 纯度 97.3%)、广藿香酮 (批号 PRF8072523, 纯度 99.0%) 对照品购自成都普瑞法科技开发有限公司; 毛蕊花糖苷 (批号 111530-201914, 纯度 95.2%)、百秋李醇 (批号 110772-201909, 纯度 100.0%) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 紫葳新苷 II (批号 CFS202101, 纯度 98.0%)、藿香黄酮醇 (批号 CFS202101, 纯度 98.5%)、列当苷 (批号

CFS202003, 纯度 98.0%)、雷杜辛黄酮醇 (批号 CFS202101, 纯度 98.5%) 对照品购自武汉天植生物技术有限公司; 鼠李素 (批号 AF21080308, 纯度 98.0%) 对照品购自成都埃法生物科技有限公司。乙腈、磷酸为色谱纯; 水为纯净水。

广藿香按 2020 年版《中国药典》一部“广藿香”项下要求叶片筛净, 茎洗净润透, 切段晒干, 按茎叶比 80:20 混匀, 备用, 经福建中医药大学附属人民医院肖钦主任药师鉴定为正品。样品信息见表 1。

表 1 样品信息
Tab. 1 Information of samples

编号	来源	批号	编号	来源	批号
S1	广西田东	210903	S10	福建南靖	210902
S2	广西蒙山	211010	S11	福建闽侯	210901
S3	广西苍梧	211102	S12	福建连城	211005
S4	广西隆林	211012	S13	广东高要	210709
S5	海南万宁	210805	S14	广东石牌	210603
S6	海南五指山	210906	S15	广东阳春	210610
S7	海南东方	211003	S16	广东棠下	210902
S8	海南琼中	211101	S17	广东遂溪	210905
S9	福建罗源	210807	S18	广东徐闻	210901

1.2 仪器 LC-10AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Agilent 7820A 型气相色谱仪、Agilent TC C₁₈ 色谱柱、Agilent HP-5 毛细管柱 (美国 Agilent 公司); Primaide 1210 型高效液相色谱仪 (日本日立公司); Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (美国 Phenomenex 公司); Waters ODS C₁₈ 色谱柱 (美国 Waters 公司); XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); FQ-1024 型超声波清洗器 (杭州法兰特超声波科技有限公司)。

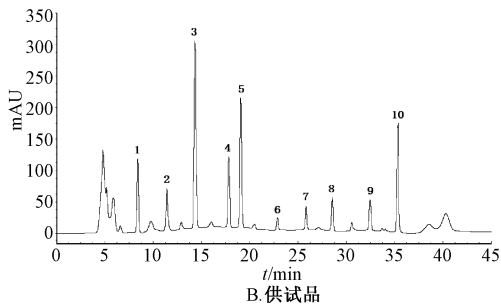
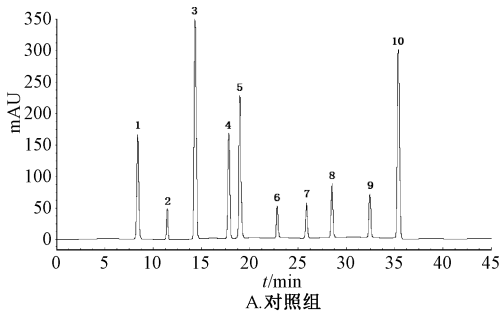
2 方法与结果

2.1 HPLC-QAMS 多组分定量方法的建立

2.1.1 对照品溶液制备 取新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮对照品适量, 精密称定, 用 75% 甲醇制成每 1 mL 分别含对照品 0.834、0.052、2.310、0.616、0.754、0.076、0.102、0.310、0.248、0.972 mg 的贮备液。精密吸取贮备液适量, 75% 甲醇稀释 20 倍制得质量浓度分别为 41.70、2.60、115.50、30.80、37.70、3.80、5.10、15.50、12.40、48.60 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取广藿香粉末 (过 3 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 45 min, 冷却, 再次称定质量, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 即得。

2.1.3 色谱条件 参考文献 [12-14] 报道, Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱; 流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~7 min, 12.0% A; 7~20 min, 12.0%~29.0% A; 20~38 min, 29.0%~65.0% A; 38~45 min, 65.0%~12.0% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 309 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1, 供试品溶液中各成分与相邻色谱峰分离分离度均大于 1.5。



1. 新西兰牡荆苷 2. 紫葳新苷Ⅱ 3. 毛蕊花糖苷 4. 列当苷 5. 异毛蕊花糖苷 6. 鼠李素 7. 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 8. 藿香黄酮醇 9. 雷杜辛黄酮醇 10. 广藿香酮
1. vicenin Ⅱ 2. campneoside Ⅱ 3. acteoside 4. crenatoside 5. isoacteoside 6. rhamnetin 7. apigenin-7-O-β-D-glucuronic acid glycoside 8. pachypodol 9. retusin 10. pogostone

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品贮备液适量, 用 75% 甲醇稀释 4、10、20、40、100、200 倍, 得 6 份不同质量浓度的对照品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 2, 可知成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 (μg·mL ⁻¹)
新西兰牡荆苷	<i>Y</i> = 2. 411 5×10 ⁶ <i>X</i> + 1 570. 1	0. 999 1	4. 17~208. 50
紫葳新苷Ⅱ	<i>Y</i> = 4. 001 8×10 ⁵ <i>X</i> - 121. 3	0. 999 3	0. 26~13. 00
毛蕊花糖苷	<i>Y</i> = 1. 909 0×10 ⁶ <i>X</i> - 1 109. 9	0. 999 6	11. 55~577. 50
列当苷	<i>Y</i> = 3. 088 4×10 ⁶ <i>X</i> + 1 476. 7	0. 999 7	3. 08~154. 00
异毛蕊花糖苷	<i>Y</i> = 3. 596 6×10 ⁶ <i>X</i> + 610. 4	0. 999 4	3. 77~188. 50
鼠李素	<i>Y</i> = 7. 785 8×10 ⁵ <i>X</i> + 1 037. 2	0. 999 8	0. 38~19. 00
芹菜素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	<i>Y</i> = 1. 069 4×10 ⁶ <i>X</i> - 491. 7	0. 999 4	0. 51~25. 50
藿香黄酮醇	<i>Y</i> = 2. 023 8×10 ⁶ <i>X</i> - 1 576. 5	0. 999 1	1. 55~77. 50
雷杜辛黄酮醇	<i>Y</i> = 1. 326 0×10 ⁶ <i>X</i> + 1 939. 8	0. 999 2	1. 24~62. 00
广藿香酮	<i>Y</i> = 3. 325 1×10 ⁶ <i>X</i> - 963. 5	0. 999 4	4. 86~243. 00

2. 1. 5 精密度试验 精密吸取“2. 1. 1”项下对照品溶液适量，在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮峰面积 RSD 分别为 1. 06%、1. 53%、0. 59%、1. 18%、1. 03%、1. 41%、1. 28%、1. 14%、1. 23%、0. 81%，表明仪器精密度良好。

2. 1. 6 稳定性试验 取同一份供试品溶液适量，于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24 h 在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定，测得新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮峰面积 RSD 分别为 1. 33%、1. 88%、0. 94%、1. 35%、1. 46%、1. 78%、1. 61%、1. 43%、1. 59%、1. 17%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2. 1. 7 重复性试验 取广藿香粉末 6 份（S1），按“2. 1. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定，测得新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、毛蕊花糖苷、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮含量 RSD 分别为 1. 09%、1. 48%、0. 57%、1. 22%、1. 06%、1. 43%、1. 25%、1. 17%、1. 22%、0. 78%，表明该方法重复性良好。

2. 1. 8 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的广藿香粉末 9 份（S1），每份 0. 5 g，随机平均分为 3 组，按 80%、100%、120% 的水平加入对照品溶液（新西兰牡荆苷 0. 211 mg/mL、紫葳新苷Ⅱ 0. 015 mg/mL、毛蕊花糖苷 0. 807 mg/mL、列当苷 0. 176、异毛蕊花糖苷 0. 215 mg/mL、鼠李素 0. 019 mg/mL、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷

0. 031 mg/mL、藿香黄酮醇 0. 087 mg/mL、雷杜辛黄酮醇 0. 069 mg/mL、广藿香酮 0. 335 mg/mL），按“2. 1. 2”项下方法制备供试品溶液，在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，各成分平均加样回收率分别为 98. 70%、97. 83%、100. 20%、98. 81%、100. 12%、98. 23%、98. 05%、96. 85%、98. 39%、98. 44%，RSD 分别为 1. 64%、0. 99%、0. 87%、0. 67%、1. 24%、1. 33%、1. 50%、0. 75%、1. 49%、1. 10%。

2. 1. 9 相对校正因子（*f*）计算 精密吸取“2. 1. 4”项下对照品溶液，在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定，以毛蕊花糖苷为内标，计算其他 9 种成分相对校正因子，公式为 $f_{k/s} = (C_k A_s) / (C_s A_k)$ ，其中 C_k 为其他成分含量， A_k 为其他成分峰面积， C_s 为内标含量， A_s 为内标峰面积。计算得毛蕊花糖苷与新西兰牡荆苷、紫葳新苷Ⅱ、列当苷、异毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、藿香黄酮醇、雷杜辛黄酮醇和广藿香酮的平均相对校正因子分别为 0. 785 8、4. 738 9、0. 620 5、0. 529 0、2. 453 9、1. 783 4、0. 937 5、1. 427 1、0. 572 9，RSD 分别为 1. 86%、1. 53%、1. 10%、0. 78%、1. 05%、1. 30%、1. 93%、1. 67%、1. 06%。

2. 1. 10 耐用性考察 精密吸取“2. 1. 1”项下对照品溶液，在“2. 1. 3”项色谱条件下进样测定，分别考察色谱仪（LC-10AT、Primaide 1210）、色谱柱（Phenomenex Gemini C₁₈、Waters ODS C₁₈、Agilent TC C₁₈）、体积流量（0. 8、1. 0、1. 2 mL/min）、柱温（25、30、35 ℃）等条件对*f*的影响。结果，不同仪器及色谱柱条件下毛蕊花糖苷与其他 9 种成分的平均相对校正因子分别为 0. 784 2、4. 736 5、0. 624 3、0. 524 8、2. 455 6、1. 785 2、0. 936 0、1. 427 0、0. 572 5，不同体积流量条件下

平均相对校正因子分别为 0.785 0、4.738 9、0.623 8、0.526 1、2.458 1、1.785 0、0.937 5、1.427 7、0.572 2，不同柱温条件下平均相对校正因子分别为 0.790 3、4.739 1、0.622 1、0.525 6、2.461 9、1.786 5、0.934 8、1.429 5、0.568 6，RSD 值均小于 2.0%，表明不同仪器及色谱柱、体积流量、柱温对所建立的 f 无显著性影响，耐用性良好。

表 3 不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 3 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器	色谱柱	新西兰牡荆苷	紫葳新苷 II	列当苷	异毛蕊花糖苷	鼠李素	芹菜素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	藿香黄酮醇	雷杜辛黄酮醇	广藿香酮
LC-10AT	Phenomenex Gemini C ₁₈	0.584 0	0.801 5	1.248 1	1.328 2	1.599 2	1.813 0	2.000 1	2.274 8	2.480 9
	Waters ODS C ₁₈	0.589 6	0.813 7	1.257 6	1.334 7	1.627 4	1.834 3	2.037 6	2.291 3	2.498 4
	Agilent TC C ₁₈	0.594 3	0.827 4	1.269 4	1.349 1	1.659 7	1.857 1	2.049 3	2.307 1	2.519 7
Primaide 1210	Phenomenex Gemini C ₁₈	0.580 1	0.791 2	1.232 5	1.314 3	1.584 3	1.801 4	1.984 1	2.266 4	2.463 5
	Waters ODS C ₁₈	0.583 5	0.806 4	1.250 3	1.329 6	1.613 9	1.832 7	2.032 8	2.285 6	2.486 6
	Agilent TC C ₁₈	0.593 2	0.824 8	1.267 8	1.346 5	1.652 3	1.853 6	2.046 6	2.298 9	2.516 8
	平均值	0.587 5	0.810 8	1.254 3	1.333 7	1.622 8	1.832 0	2.025 1	2.287 4	2.494 3
	RSD/%	0.98	1.72	1.10	0.96	1.82	1.20	1.32	0.66	0.87

2.2 百秋李醇 GC 定量检测方法 取广藿香粉末(过 3 号筛)约 3.0 g，精密称定，按 2020 年版《中国药典》一部^[1]“广藿香”项下方法对百秋李醇进行定量检测。

2.3 多组分含量测定 取 18 批广藿香(S1~S18)，按“2.1.2”项下方法制备广藿香供试品溶液，平行 3 份，在“2.1.3”项色谱条件下进样测定，分别采用外标法、一测多评法计算含量，结果见表 4。经 SPSS 26.0 软件正态性检验和方差齐性检验，广藿香中各成分 2 种方法含量数据符合正态分布 ($P>0.05$) 和方差齐 ($P>0.05$)， t 检验结果显示 2 种方法结果无显著性差异 ($P>0.05$)，表明 HPLC-QAMS 法准确可靠；百秋李醇 GC 法稳定，结果准确。

2.4 多元统计分析

2.4.1 PCA 以 18 批广藿香中 10 种成分 HPLC-QAMS 法测定结果以及百秋李醇 GC 法测定结果为变量，采用 SPSS 26.0 软件 PCA 分析对多维数据进行降维。结果第 1、2 个主成分的主成分贡献率分别为 62.880%、24.098%，累计方差贡献率为 86.978%，表明前 2 个主成分可以代表广藿香中 11 种成分 86.98% 的信息量，故确定采用前 2 个主成分作为分析对象。由广藿香主成分矩阵结果可知，第 1 主成分信息主要由新西兰牡荆苷、紫葳新苷 II、毛蕊花糖苷、鼠李素、芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、雷杜辛黄酮醇、广藿香酮、百秋李醇组

2.1.11 色谱峰定位 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液，在“2.1.3”项色谱条件下进样测定，考察色谱仪 (LC-10AT、Primaide 1210)、色谱柱 (Phenomenex Gemini C₁₈、Waters ODS C₁₈、Agilent TC C₁₈) 对相对保留时间值 (t) 的影响，结果见表 3。可知各成分相对保留时间 RSD 均小于 2.0%，相对保留时间值法可用于广藿香中各成分色谱峰定位。

成，第 2 主成分信息主要由列当苷、异毛蕊花糖苷、藿香黄酮醇组成。进一步应用 SIMCA 14.1 软件对 18 批广藿香样品构建 PCA 模型 (图 2)，提取出 2 个主成分 R^2X 为 0.870，表明建立的模型稳定性较高，不同产地广藿香样品呈现一定的聚集性，S1~S8 位于得分图中上部，S9~S12 位于得分图左下角，S13~S18 位于得分图右侧。

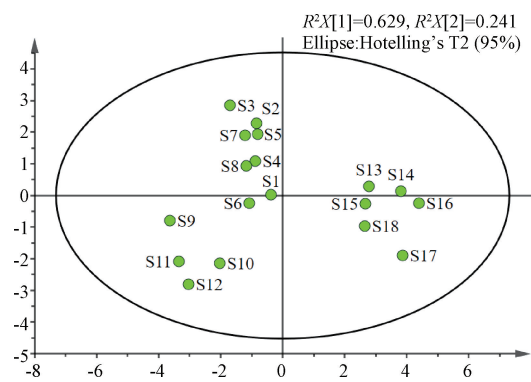


图 2 PCA 得分图
Fig. 2 Score plot for PCA

2.4.2 OPLS-DA 以 18 批广藿香中 10 种成分 HPLC-QAMS 法测定结果以及百秋李醇 GC 法测定结果为变量，采用 SIMCA 14.1 软件 OPLS-DA 分析，挖掘影响广藿香产品质量差异的主要潜在标志物，得 OPLS-DA 模型。结果显示模型稳定可靠、预测能力好，累积解释能力参数 R^2X 为 0.950、 R^2Y 为 0.858，预测能力参数 Q^2 为 0.744，均大于

表 4 各成分含量测定结果 (n=3)
Tab. 4 Results of content determination for various constituents (n=3)

成分	方法	含量/(mg·g ⁻¹)																		P 值
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	
毛蕊花糖苷	ESM	3.251	3.456	3.684	4.307	3.86	3.035	4.101	4.527	2.519	2.617	2.069	2.285	5.617	5.827	5.409	6.055	5.199	4.646	—
新西兰牡荆苷	ESM	0.839	0.867	0.842	0.951	0.882	0.681	0.920	1.043	0.735	0.823	0.752	0.701	1.022	1.289	1.076	1.238	1.149	1.115	0.800
	QAMS	0.817	0.886	0.861	0.974	0.906	0.678	0.936	1.067	0.744	0.834	0.767	0.712	1.048	1.303	1.104	1.263	1.172	1.138	
紫葳新苷Ⅱ	ESM	0.059	0.066	0.091	0.079	0.075	0.065	0.081	0.088	0.095	0.081	0.097	0.085	0.058	0.050	0.069	0.054	0.048	0.061	0.898
	QAMS	0.058	0.065	0.090	0.078	0.074	0.064	0.082	0.087	0.094	0.080	0.096	0.084	0.057	0.049	0.070	0.053	0.047	0.062	
列当苷	ESM	0.697	0.886	0.991	0.796	0.857	0.721	0.837	0.745	0.567	0.611	0.437	0.396	0.643	0.775	0.541	0.670	0.522	0.589	0.771
	QAMS	0.679	0.870	0.969	0.783	0.838	0.702	0.815	0.728	0.552	0.599	0.425	0.389	0.626	0.758	0.529	0.654	0.510	0.576	
异毛蕊花糖苷	ESM	0.873	1.047	1.079	0.863	0.957	0.877	1.013	0.934	0.907	0.659	0.843	0.831	0.813	0.791	0.759	0.734	0.703	0.691	0.639
	QAMS	0.851	1.020	1.055	0.846	0.936	0.856	0.991	0.911	0.892	0.644	0.829	0.810	0.792	0.773	0.746	0.718	0.691	0.672	
鼠李素	ESM	0.081	0.076	0.054	0.063	0.071	0.067	0.061	0.058	0.046	0.053	0.042	0.048	0.091	0.096	0.096	0.113	0.104	0.086	0.870
	QAMS	0.079	0.075	0.053	0.062	0.070	0.066	0.060	0.057	0.045	0.052	0.041	0.047	0.089	0.094	0.098	0.111	0.102	0.084	
芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	ESM	0.116	0.105	0.121	0.109	0.113	0.103	0.118	0.107	0.098	0.099	0.095	0.090	0.146	0.151	0.143	0.155	0.149	0.139	0.763
	QAMS	0.113	0.103	0.119	0.108	0.110	0.101	0.116	0.105	0.096	0.098	0.093	0.089	0.143	0.149	0.140	0.153	0.146	0.136	
藜香黄酮醇	ESM	0.359	0.409	0.463	0.408	0.439	0.325	0.449	0.398	0.256	0.253	0.276	0.211	0.394	0.301	0.418	0.346	0.231	0.382	0.792
	QAMS	0.351	0.404	0.452	0.399	0.431	0.317	0.441	0.392	0.251	0.247	0.271	0.207	0.385	0.295	0.411	0.340	0.225	0.373	
雷杜辛黄酮醇	ESM	0.281	0.312	0.304	0.273	0.286	0.291	0.263	0.251	0.239	0.245	0.223	0.230	0.359	0.377	0.341	0.369	0.365	0.348	0.731
	QAMS	0.274	0.303	0.296	0.265	0.280	0.288	0.257	0.247	0.233	0.239	0.218	0.226	0.351	0.372	0.336	0.365	0.357	0.343	
广藜香酮	ESM	1.337	1.531	1.043	1.256	1.474	1.398	1.194	1.121	0.720	0.767	0.682	0.613	1.997	1.972	1.883	2.136	2.197	1.796	0.894
	QAMS	1.302	1.514	1.019	1.234	1.443	1.373	1.162	1.093	0.704	0.752	0.678	0.604	1.991	1.940	1.852	2.100	2.169	1.773	
百秋李醇	GC	2.816	3.545	3.138	3.215	3.350	2.681	2.987	2.909	3.736	2.732	2.572	2.469	2.338	2.207	2.076	1.916	1.813	1.710	—

0.5; 不同产地 18 批广藜香样品分类聚集结果与 PCA 结果相吻合。对构建的 OPLS-DA 模型中 2 个主成分进行 200 次置换检验 (图 3)。结果模型可靠, 且未过度拟合, 预测能力好。采用 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (VIP) 值筛选影响广藜香化学成分差异的标志性成分 (图 4), VIP 值越大, 表明该成分对区分不同产地广藜香整体质量的贡献度越大。结果 VIP>1.0 的指标成分分别为成分 3 (毛蕊花糖苷, 2.014 0)、成分 11 (百秋李醇, 1.548 0)、成分 10 (广藜香酮, 1.277 0) 和成分 4 (列当苷, 1.009 0), 表明上述成分对不同产地广藜香样品的分类聚集影响显著, 可能是影响广藜香产品质量差异的主要潜在标志物。

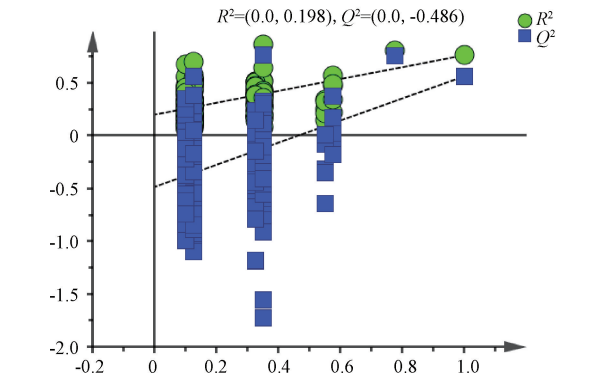


图 3 OPLS-DA 分析置换检测结果图
Fig. 3 Permutation test results graph for OPLS-DA

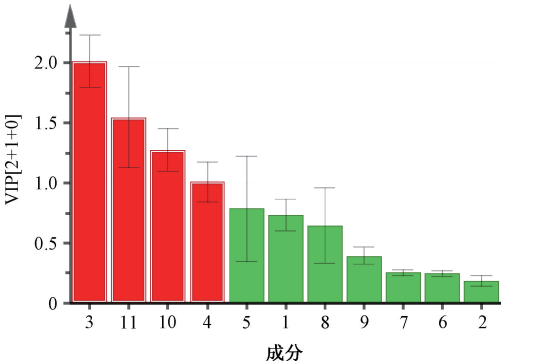


图 4 OPLS-DA 分析 VIP 值图
Fig. 4 VIP value graph for OPLS-DA

2.5 加权 TOPSIS 分析

2.5.1 原始数据归一化 以 18 批广藜香中 11 种成分含量结果为变量, 建立数据矩阵 X_{nm} ($n=1, 2, 3, \dots, 18; m=1, 2, 3, \dots, 11$), 采用越大越优型指标计算公式 $Y_{nm} = \frac{X_{nm} - \min(X_m)}{\max(X_m) - \min(X_m)}$ 对原始数据进行归一化, 式中 $\max(X_m)$ 和 $\min(X_m)$ 分别指第 m 个指标 18 批样品含量的最大值和最小值, 得归一化后数据矩阵 Y_{nm} 。

2.5.2 加权决策矩阵 以 OPLS-DA 分析中影响广藜香化学成分差异的 VIP 值为 11 个指标权重 (W_m), 按加权决策计算公式 $Z_{nm} = Y_{nm} \times W_m$ 对归一化后数据矩阵进行加权处理, 得加权决策矩阵 Z_{nm} , 最优方案矩阵 $Z_m^+ = (0.736\ 0, 0.187\ 0,$

2. 014 0, 1. 009 0, 0. 787 0, 0. 247 0, 0. 253 0, 0. 648 0, 0. 396 0, 1. 277 0, 1. 548 0), 最劣方案矩阵 Z_m^- 均为 0。

2. 5. 3 相对贴适度计算及样品优劣评价 按欧氏距离计算公式 $E_n^+ = \sqrt{\sum_{m=1}^{11} (Z_{nm} - Z_m^+)^2}$ 和 $E_n^- = \sqrt{\sum_{m=1}^{11} (Z_{nm} - Z_m^-)^2}$ 分别计算 18 批广藿香样品与最优方案的欧氏距离 E_n^+ 以及 与最劣方案的欧氏距离 E_n^- , 再根据相对贴适度计算公式 $D_n = \frac{E_n^-}{E_n^+ + E_n^-}$ 计算 18 批广藿香样品的相对贴适度 D_n , D_n 值越大, 被评价的广藿香样品质量最优, 反之则最差。按照 D_n 值大小对 18 批广藿香样品质量优劣进行排序, 结果见表 5。结果显示排名前 6 位依次为广东石牌、棠下、高要、阳春、遂溪、徐闻, 广西和海南居中, 福建位于排名后四位。

表 5 加权 TOPSIS 模型综合评价结果
Tab. 5 Results of comprehensive evaluation using weighted TOPSIS model

编号	E_n^+	E_n^-	D_n	排序
S1	1. 853 7	1. 146 3	0. 382 1	13
S2	1. 549 8	1. 631 8	0. 512 9	11
S3	1. 638 6	1. 722 7	0. 512 5	12
S4	1. 392 3	1. 606 8	0. 535 8	9
S5	1. 421 0	1. 639 2	0. 535 7	10
S6	1. 977 3	1. 106 6	0. 358 8	14
S7	1. 438 2	1. 664 7	0. 536 5	8
S8	1. 377 6	1. 672 2	0. 548 3	7
S9	2. 488 7	0. 646 9	0. 206 3	15
S10	2. 489 6	0. 539 7	0. 178 2	16
S11	2. 742 4	0. 456 0	0. 142 6	17
S12	2. 767 6	0. 368 0	0. 117 4	18
S13	0. 913 2	2. 312 8	0. 716 9	3
S14	0. 826 4	2. 472 0	0. 749 5	1
S15	1. 095 1	2. 169 3	0. 664 5	4
S16	0. 914 9	2. 577 9	0. 738 1	2
S17	1. 316 5	2. 179 3	0. 623 4	5
S18	1. 316 8	1. 834 2	0. 582 1	6

3 讨论

本研究对提取溶剂 (50% 甲醇^[13]、75% 甲醇^[14]、100% 甲醇^[15-16]、乙醇^[17-19])、提取方式 (超声和加热回流) 和提取时间 (30、45、60 min) 进行了对比考察, 最终确定采用 75% 甲醇超声提取 45 min 对广藿香供试品溶液进行制备。在筛选流动相时, 首先对甲醇-水、乙腈-水进行了考察, 结果乙腈-水相对稳定, 但个别色谱峰出现拖尾变形, 同时检验用时较长, 考虑加入 0. 1% 磷酸^[14-15]、0. 1% 冰醋酸和 0. 1% 甲酸^[13] 加以改

善, 最终确定采用乙腈-0. 1% 磷酸为流动相梯度洗脱。

本研究采用 HPLC-QAMS 法对广藿香中新西兰牡荆苷等 10 种成分含量进行了同步检测, 方法操作便捷, 结果准确, 较普通多组分检测方法, 大大降低了检验成本, 有效避免了部分对照品不稳定等因素影响, 有效推动了方法的普及应用。百秋李醇挥发性较强, HPLC 法难以确保检测的准确度, 参考广藿香现行标准采用 GC 法对百秋李醇进行含量检测。广藿香中 11 种成分含量检测结果显示, 不同产地广藿香质量差异较大。多元统计分析结果显示毛蕊花糖苷、百秋李醇、广藿香酮和列当苷可能是影响广藿香产品质量的主要潜在标志物。加权 TOPSIS 法结果显示广东产广藿香质量最优, 位于排名前 6 位, 其次为广西和海南产广藿香, 福建产广藿香位于排名后 4 位, 所建立的方法能够有效地区分不同产地广藿香产品质量优劣。

综上所述, 本研究建立的 HPLC-QAMS/GC 多组分定量联合多元统计分析 及加权 TOPSIS 方法, 操作便捷, 结果准确, 客观全面, 为广藿香资源的合理开发和利用、优质种源的筛选和栽培以及道地性研究提供参考和借鉴。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 46-47.

[2] 马 川, 彭 成, 李馨蕊, 等. 广藿香化学成分及其药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2020, 43(1): 72-80.

[3] 徐 雯, 吴艳清, 丁浩然, 等. 广藿香的药理作用及机制研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(10): 103-106.

[4] 王 涛. 一测多评法同时测定广藿香中 4 种成分的含量 [J]. 中国科技信息, 2022, 34(9): 48-49.

[5] 秦昆明, 杨 冰, 胡 静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.

[6] 胡端龙, 奚静芳, 张国明. 藿胆滴丸中百秋李醇的测定方法及其局限性[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2477-2479.

[7] 康念欣, 袁炎炎, 张 潇, 等. 酒黄连 HPLC 特征图谱的建立及聚类分析和主成分分析[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2020, 22(8): 2790-2798.

[8] 邹 妍, 鄢海燕. 基于 PCA 及 PLS-DA 算法分析决明子炒制前后化学成分的变化 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(19): 2027-2030.

[9] 丁若雯, 魏惠珍, 吕 尚, 等. 基于多元统计分析的车前子药材质量等级研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 673-679.

[10] 王玉霞, 武晓玉, 夏鹏飞, 等. 基于熵权 TOPSIS 模型对

经不同方法干燥的苦水玫瑰品质的综合评价[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1241-1248.

[11] 张志鹏, 邓李红, 李美洲, 等. 基于化学模式识别和熵权 TOPSIS 法分析槐角不同部位的差异[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1415-1421.

[12] 苏建芬. 基于指纹图谱及多元统计分析评价藿香清胃片质量[J]. 中国药师, 2022, 25(9): 1661-1666.

[13] 李 媚, 陈盛君, 王协和, 等. 广藿香 UPLC 指纹图谱研究及基于网络药理学的广藿香潜在质量标志物预测[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2665-2677.

[14] 毕 丹, 张水英, 任 晋, 等. 超高效液相色谱法同时测定广藿香中 6 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(8): 1331-1336.

[15] 潘艳琳, 程心玲, 肖 淋, 等. HPLC 法同时测定藿砂颗粒中 7 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2049-2052.

[16] 李洪彬, 赵兴奎, 王 静. HPLC 一测多评法同时测定金蓝清瘟合剂中 8 种成分含量[J]. 药学与临床研究, 2020, 28(2): 105-109.

[17] 林钦贤, 梁伟龙, 王 斌, 等. 基于灰色关联分析法评价广藿香药材质量[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(2): 213-218; 263.

[18] 张颖梅, 陈海明, 吴晓丽, 等. HPLC 同时测定广藿香中雷杜辛黄酮醇及广藿香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 160-163.

[19] 甄亚钦, 田 伟, 王迎春, 等. HPLC 波长切换法同时测定广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 79-83.

基于流式细胞术与基因组 Survey 分析白及基因组大小及特征

杨 渊¹, 黄明进^{1*}, 王大昌¹, 阮宝丽¹, 杨秋悦¹, 杨 洋¹, 罗影子¹, 覃玉强²
(1. 贵州大学农学院, 贵州大学石斛研究院, 贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州创禾源农业科技有限公司, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 研究白及的核型、基因组大小等特征信息。**方法** 双色荧光原位杂交分析白及的染色体核型; 以番茄为内参, 流式细胞术检测白及基因组大小; 基因组 Survey 分析获得白及基因组大小、杂合率、GC 含量等生物学信息。**结果** DAPI 荧光染色及端粒荧光原位杂交发现白及染色体为二倍体, 染色体类型为 sm 和 st 型, 核型类型为 2C。rDNA 荧光原位杂交发现白及染色体有 1 对显示较强的 5S rDNA 位点和 1 对 18S rDNA 位点, 5S rDNA 位点位于 2 个同源染色体间隙, 18S rDNA 位点位于染色体短臂的次缢痕部位。白及基因组大小为 2.37 Gb, 同时全基因 Survey 分析得到有效数据 60.11 Gb, 经过 K-mer 分析修正及 Genomescope 评估, 白及基因组大小约为 2.53 Gb, 杂合率约为 1.099%, 重复序列约占 67.45%, GC 含量为 36.11%, 总测序深度为 23.73。**结论** 本研究首次获得白及基于 5S rDNA 和 18S rDNA 荧光原位杂交核型及增补了白及属植物的基因组大小数据, 为白及后续的物种分类、种群进化研究及全基因组测序、组装及去冗余处理等工作提供基础参考数据。

关键词: 白及; 基因组调查; 流式细胞术; K-mer 分析; 双色荧光原位杂交

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2023)11-3677-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.11.028

Analysis of genome size and characteristics of *Bletilla striata* based on flow cytometry and genomic survey

YANG Yuan¹, HUANG Ming-jin^{1*}, WANG Da-chang¹, RUAN Bao-li¹, YANG Qiu-yue¹,
YANG Yang¹, LUO Ying-zi¹, QIN Yu-qiang²
(1. College of Agriculture, Guizhou University, The Dendrobium Research Institute of Guizhou University, Guizhou Key Laboratory of Medicinal Plant

收稿日期: 2022-08-31
基金项目: 贵州省科学技术厅项目(黔科合支撑[2021]246号); 贵州创禾源中药产业创新发展项目(创禾源科技合同[2021]001号)
作者简介: 杨 渊(1998—), 女, 硕士生, 从事药用植物栽培学研究。Tel: 18385839833, E-mail: 2468432646@qq.com
*通信作者: 黄明进(1981—), 男, 博士, 副教授, 从事药用植物栽培与开发利用研究。Tel: 18798888615, E-mail: hmjctm@163.com