

基于化学计量学的多花黄精多糖部分酸水解产物PMP-HPLC指纹图谱构建

周忠瑜, 杜泽飞, 蒲婷婷, 杨丽英, 晏仁义, 段宝忠

Construction of PMP-HPLC Fingerprint of Partial Acid Hydrolysate of *Polygonatum cyrtonema* Polysaccharides Based on the Chemometric Methods

ZHOU Zhongyu, DU Zefei, PU Tingting, YANG Liying, YAN Renyi, and DUAN Baozhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100218>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于化学计量学的枸杞多糖部分酸水解产物PMP-HPLC指纹图谱

PMP-HPLC Fingerprint of Partial Acid Hydrolysate of *Lycium barbarum* Polysaccharides Based on the Chemometric Methods

食品工业科技. 2021, 42(18): 268-275

基于HPLC指纹图谱的木薯叶类黄酮质量研究

Cassava Leaf Flavonoids Quality Investigation Based on HPLC Fingerprint

食品工业科技. 2021, 42(15): 240-246

基于HS-SPME-GC/MS指纹图谱及化学计量学的野坝子蜂蜜鉴别

Research on *Elsholtzia rugulosa* Hems L. Honey via HS-SPME-GC/MS Fingerprint and Chemometrics Analysis

食品工业科技. 2020, 41(3): 221-227

指纹图谱在食品分析中的应用研究进展

Advances in Application of Fingerprint Technology in Food Analysis

食品工业科技. 2021, 42(12): 413-421

柱前衍生-高效毛细管电泳法分析不同黄酒的多糖组成

Analysis of polysaccharides in different yellow rice wine by pre-column derivatization and high performance capillary electrophoresis

食品工业科技. 2018, 39(8): 221-225

柱前衍生化高效液相色谱法测定荞麦中D-手性肌醇含量的方法

Method for the Content Determination of D-Chiro-Inositol from Buckwheat by Pre-column Derivatization HPLC

食品工业科技. 2018, 39(13): 248-252



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周忠瑜, 杜泽飞, 蒲婷婷, 等. 基于化学计量学的多花黄精多糖部分酸水解产物 PMP-HPLC 指纹图谱构建 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 284–290. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100218

ZHOU Zhongyu, DU Zefei, PU Tingting, et al. Construction of PMP-HPLC Fingerprint of Partial Acid Hydrolysate of *Polygonatum cyrtonema* Polysaccharides Based on the Chemometric Methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 284–290. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100218

· 分析检测 ·

基于化学计量学的多花黄精多糖部分酸水解产物 PMP-HPLC 指纹图谱构建

周忠瑜¹, 杜泽飞¹, 蒲婷婷¹, 杨丽英², 晏仁义³, 段宝忠^{1,*}

(1.大理大学药学院, 云南大理 671000;

2.云南省农业科学院药用植物研究所, 云南昆明 650205;

3.湖北汉江大健康产业有限公司, 湖北十堰 442521)

摘要: 本文通过构建多花黄精 HPLC 指纹图谱, 结合多种化学计量学方法探讨不同产地多花黄精药材多糖的差异。采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生化-HPLC 法, 建立多花黄精多糖类成分的指纹图谱, 对其单糖组成、总多糖含量进行分析, 并采用相似度评价 (SA)、聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 方法, 对多花黄精指纹图谱进行模式识别研究。结果显示, 不同产地多花黄精均含有半乳糖醛酸, 葡萄糖醛酸, 半乳糖, 葡萄糖和木糖; 13 批多花黄精药材相似度在 0.781~0.945 之间, 总多糖含量为 7.18%~16.27%, HCA 和 PCA 将不同产地的多花黄精分为 2 类, 采集于湖南省慈利县的样本单独为一支。以上研究结果表明多花黄精药材多糖指纹差异较大, 为保障黄精药材临床用药的有效和安全, 有必要建立多花黄精的规范化栽培技术体系。

关键词: 柱前衍生化, 多花黄精, 多糖, 质量评价, 指纹图谱, 化学计量学

中图分类号: O657.7²

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)13-0284-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100218



本文网刊:

Construction of PMP-HPLC Fingerprint of Partial Acid Hydrolysate of *Polygonatum cyrtonema* Polysaccharides Based on the Chemometric Methods

ZHOU Zhongyu¹, DU Zefei¹, PU Tingting¹, YANG Liying², YAN Renyi³, DUAN Baozhong^{1,*}

(1.College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China;

2.Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;

3.Hubei Hanjiang Health Industry Co., Ltd., Shiyan 442521, China)

Abstract: In this paper, the polysaccharides fingerprints of *Polygonatum cyrtonema* Hua. were constructed, combined with various chemometric methods, to evaluate the differences of *P. cyrtonema* polysaccharides from different origins. The 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization-HPLC method was applied to analyze the monosaccharide composition and total polysaccharide content of *P. cyrtonema*. Furthermore, the fingerprints were further evaluated by chemometric methods, including similarity analysis (SA), cluster analysis (HCA), and principal component analysis (PCA). The results showed that the composition of monosaccharides was galacturonic acid, glucuronic acid, galactose, glucose, and xylose. The similarities were ranged from 0.781 to 0.945. In addition, the content of total polysaccharides was in the range of 7.18% to 16.27%. HCA and PCA all divided *P. cyrtonema* polysaccharides from different origins into two categories, the samples collected in Cili County, Hunan Province were a separate one. These results indicated that the polysaccharide

收稿日期: 2021-10-22

基金项目: 云南省院士专家工作站 (202205AF150026、202105AF150053); 云南省重大科技专项 (202002AA100007、202102AA310036); 云南省万人“青年拔尖人才”计划 (YNWR-QNBJ-2020251); 云南省科技人才与平台计划 (202005AE160007)。

作者简介: 周忠瑜 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源与种质创新, E-mail: zyzhou21@126.com。

*** 通信作者:** 段宝忠 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源与种质创新, E-mail: bzduan@126.com。

fingerprints of *P. cyrtanema* were quite different. Establishing the standardized cultivation technology system of *P. cyrtanema* is necessary to ensure clinical efficacy and safety.

Key words: pre-column derivatization; *Polygonatum cyrtanema*; polysaccharide; quality evaluation; fingerprint; chemometrics

多花黄精为百合科黄精属植物 *Polygonatum cyrtanema* Hua., 又名姜状黄精, 为 2020 年版《中华人民共和国药典》黄精药材的基原植物之一, 是目前市场上黄精的主流栽培品种, 具有补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾之功能^[1], 多花黄精为重要的药食同源资源, 由于其良好的功效, 近年来被广泛用于食品和保健品开发^[2]。现代研究表明, 多花黄精化学成分主要包括多糖、甾体皂苷、黄酮等成分^[3-5], 其中多糖是多花黄精中的质量标志物, 也是中国药典黄精的质量控制指标^[1], 具有抗衰老、降血糖、降血脂、抗菌等药理作用^[6-8]。据对保健食品原料的调查发现, 黄精在中药类原料的使用频率排名靠前^[9], 目前市场上存在大量的黄精多糖产品如黄精膏、黄精饮料等产品, 因此判定多花黄精产品的质量好坏和原料真伪极为重要。现有方法一般采用苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法测定总多糖含量^[10], 用于控制多花黄精多糖产品质量, 但此类方法选择性较差, 不能有效地鉴别出掺假品; 因此, 迫切需要制定有效可靠的评价标准, 以便科学地评价多花黄精多糖的质量, 对黄精多糖保健食品的应用开发具有深远意义。

指纹图谱是近年来用于中药质量控制的一种有效、可行的方法, 已广泛用于中药质量控制、药效成分研究领域^[11-13]。由于黄精多糖为非单一分子化合物, 结构复杂, 且不含有共轭结构, 使用常规高效液相二极管阵列检测法(High-performance liquid chromatography-diode array detection, HPLC-DAD)方法无法有效检测。已有学者采用高效液相色谱-蒸发光散射法、高效阴离子交换色谱-脉冲安培法和电喷雾式检测器(Charged aerosol detector, CAD)对植物多糖的单糖组成进行了研究^[14-16], 但蒸发光散射检测的耐用性和稳定性欠佳^[17-18], 脉冲安培检测的成本较高、稳定性差且对色谱条件要求较为严格^[16], CAD 检测仪器价格昂贵, 使用受到一定的限制^[19-21]。有关黄精法定基原植物的指纹图谱研究方面, 目前已有学者对滇黄精 *P. kingianum* Coll. Et Hemsl. 和黄精 *P. sibiricum* Red. 多糖的指纹图谱进行了研究^[22-23]; 而对于多花黄精 *P. cyrtanema* 的指纹图谱研究方面, 仅见周宝珍, 杨青等多花黄精乙醇提取物的指纹图谱研究^[24-25], 尚未见多花黄精中的多糖组分的指纹图谱的报道。因此, 建立能表征多花黄精中多糖指纹的方法具有重要意义。鉴于此, 本文采用柱前衍生化-HPLC 对多花黄精药材的指纹图谱和单糖组成进行研究, 并结合相似度分析(Similarity analysis, SA)、聚类分析(Hierarchical cluster analysis, HCA)和主成分分析(Principal component analysis, PCA)等化学计量学^[26-28]手段, 以期多花黄精药材的质量控

制奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄精药材 13 批样品 购于安徽、四川、湖南等地, 均为栽培品, 经大理大学段宝忠教授鉴定为百合科植物多花黄精 *P. cyrtanema* Hua., 新鲜根茎切片后于 40 ℃ 烘箱烘干, 样品信息详见表 1, 凭证标本保存于大理大学中药标本馆; 葡萄糖(批号 171106)、甘露糖(批号 170921)、盐酸氨基葡萄糖(批号 171210)、半乳糖(批号 171206)、L-鼠李糖(批号 171024)、L-岩藻糖(批号 170813)、葡萄糖醛酸(批号 170730)、木糖(批号 170912)、半乳糖醛酸(批号 170903)、核糖(批号 171103)、阿拉伯糖(批号 171219) 以上单糖纯度 ≥ 98%, 购自上海融禾医药科技有限公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) 阿拉丁; 色谱级乙腈(批号 085884) Fisher Scientific; 水为超纯水, 其他试剂为国产分析纯。

Agilent 1200 高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司; GH-252 电子天平 日本 AND 公司; AL204 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SB25-12D 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

表 1 样品信息
Table 1 Information of samples

编号	来源	编号	来源
S1	安徽省金寨县	S8	贵州省赤水市
S2	四川省成都市	S9	湖南省怀化市
S3	湖南省祁阳县	S10	安徽省祁门县
S4	四川省遂宁市	S11	福建省建宁县
S5	广西省全州县	S12	江西省安福县
S6	重庆市江津区	S13	湖南省慈利县
S7	浙江省遂昌县		

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)–0.025 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液(B) (pH7.5); 梯度洗脱(0~10 min, 15%~17% A; 10~18.5 min, 17%~22.5% A; 18.5~20 min, 22.5%~23.5% A; 20~32 min, 23.5%~30% A); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 35 ℃; 检测波长: 250 nm; 进样量: 20 μL。

1.2.2 衍生化对照品溶液制备 精密称取各单糖对照品适量, 用蒸馏水配制成浓度约为 0.5 mg·mL⁻¹ 的单糖对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 400 μL, 置于 5 mL 的安瓿瓶中, 精密加入 200 μL 0.6 mol·L⁻¹

NaOH 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP 溶液, 置 70°C 条件下反应 60 min。取出, 放冷, 精密加入 $200 \mu\text{L}$ $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 混匀。加入等体积的三氯甲烷, 混匀, 离心 10 min ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 去掉三氯甲烷层, 重复多次至三氯甲烷层无色, 即得衍生化对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液制备

1.2.3.1 粗多糖制备 取多花黄精样品于 40°C 烘箱干燥 12 h 至恒重, 粉碎, 过 80 目筛, 取粉末 5.0 g, 精密称定, 根据预实验得到最优工艺制备粗多糖, 即加入 100 mL 水于 80°C 下超声提取, 重复 3 次, 每次 1 h, 抽滤, 洗净滤渣, 浓缩至 10 mL, 放入离心机离心 20 min ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。取上清液转移至分液漏斗, 加入 3 倍体积的石油醚进行萃取, 直至石油醚层无色, 静置分层, 取下层水相, 调节 pH 至 6, 加入体积分数为 2% 的木瓜蛋白酶溶液 (80 万 U/g), 水浴温度 60°C , 酶解 4 h, 待反应完成, 沸水浴灭酶 10 min。取上清液采用 Sevage 法 (正丁醇: 氯仿=1:5) 脱去蛋白, 直至无絮状物生成, 离心 10 min ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 再取上清液转至烧杯中, 精密缓慢的加入 6 倍量的无水乙醇, 快速搅拌, 于 4°C 冰箱中放置 12 h, 离心, 向沉淀中加 10 mL 95% 乙醇, 洗涤 2 次, 再离心, 加热水使沉淀溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 室温下放冷, 后定容, 再将溶液置于烧杯中冷冻干燥, 最后得粗多糖粉末。

1.2.3.2 衍生化供试品溶液制备 精密称取 5 mg 粗多糖粉末, 置于 5 mL 的安瓿瓶中, 精密加入 2 mL $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 (TFA) 溶液, 封口, 置于 110°C 条件下 7 h, 进行水解, 取出, 室温放冷, 后水浴蒸干, 向残渣中加入甲醇 1 mL, 烘干, 重复多次, 直至三氟乙酸除尽。再加热水适量, 使沉淀溶解, 转移至 1 mL 容量瓶中, 室温放冷, 定容摇匀, 得供试品酸水解溶液。取酸水解溶液 $400 \mu\text{L}$, 按 1.2.2 项下衍生化方法制备, 得衍生化供试品溶液, 每批样品重复 3 次。

1.2.4 总多糖含量测定 按课题组已发表文献方法, 对 13 批多花黄精总多糖含量进行测定^[10]。

1.3 数据处理

相似度分析采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2.0 版), 聚类分析采用 SPSS 20.0 软件进行, 主成分分析采用 SIMCA 13.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

本研究比较了以下 4 种色谱柱: Zorbax SB- C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), Zorbax Extend- C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), Zorbax SB-Aq- C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), Zorbax XDB- C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)。实验结果表明, Agilent Zorbax SB- C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 出峰较多, 各成分分离较好。同时, 当流动相为纯水时, 部分色谱峰产生了拖尾情况, 因此, 在实验中考察不同浓度磷酸盐缓冲

溶液 (0.01 、 0.02 、 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对色谱峰分离效果的影响, 结果显示, 当磷酸盐缓冲溶液浓度为 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 所得色谱峰峰形及分离度较好, 故选择 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液作为洗脱溶剂。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取同一批供试品溶液 (S2), 按 1.2.1 项下方法连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.10%, 表明精密度良好。

2.2.2 重复性试验 取同一批 S2 样品 6 份, 按 1.2.3 项下方法进行制备, 在 1.2.1 项色谱条件下进样分析。测得结果显示, 各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均小于 2.60%, 表明重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取同一批 S2 供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、18、24、48 h 进样测定, 测得结果显示, 各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均小于 2.70%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3 指纹图谱的构建

将 13 批多花黄精样品按 1.2.3 方法制备供试品溶液, 按 1.2.1 项色谱条件下检测, 记录色谱图, 色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》软件, 采用中位数法, 以 S1 批样品作为参照谱进行指纹匹配, 生成共有模式指纹图谱 (图 1), 可见共有 10 个共有峰。相似度结果见表 2, 13 批多花黄精的指纹图谱相似度在 0.781~0.945 之间, 其中 S1 (安徽省金寨县)、S3 (湖南省祁阳县)、S8 (贵州省赤水市)、S11 (福建省建宁县) 和 S12 (江西省安福县) 5 批样本相似度大于 0.90, 其它样品低于 0.90, 占 61.5%, 这一结果与黄精 *P. sibiricum* Red. 和滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl. 的 HPLC 指纹图谱研究结果不一致^[22-23], 其原因是否是产地或生长年限等影响了其多糖组成, 还有待进一步深入研究。本研究中采集自湖南省慈利县的 S13 号相似度最低为 0.781, 观察发现与其他样品相比, S13 号样品根茎较幼嫩, 已有研究表明黄精幼嫩部位的多糖含量较成熟部位低^[29], 这可能是其相似度较低的原因。

2.4 单糖定性鉴定

样品及单糖对照品的 PMP-HPLC 色谱图见图 2。通过与对照品的保留时间比对, 发现 10 个共有峰中, 5 个与单糖对照品保留时间一致, 即 4 号峰 (18.80 min) 为半乳糖醛酸, 6 号峰 (20.13 min) 为葡萄糖醛酸, 7 号峰 (21.50 min) 为半乳糖, 8 号峰 (22.22 min) 为葡萄糖, 9 号峰 (22.84 min) 为木糖, 单糖研究结果与王坤等^[30] 对多花黄精单糖组成研究结果基本一致。在前期研究中, 何连军等^[14] 采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法, 检测到多花黄精含有果糖, 而本研究未检测到果糖, 主要原因是由于 PMP 仅能与醛糖发生衍生化反应, 果糖属于酮糖, 不发生衍生反应^[31]。

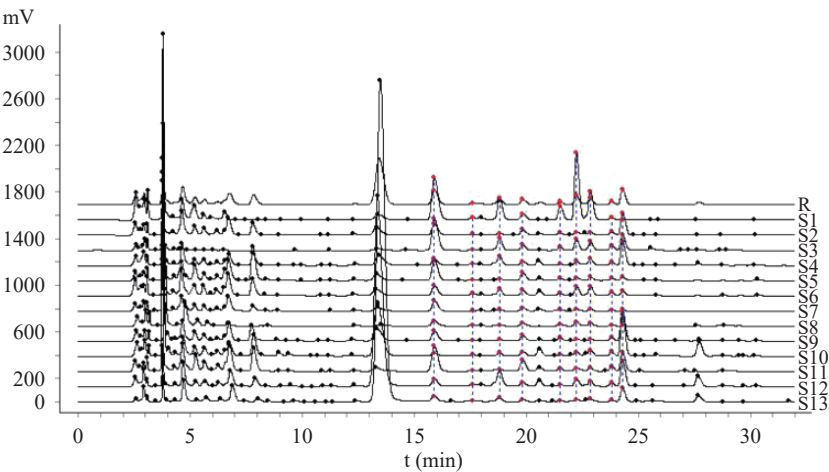


图 1 13 批多花黄精多糖柱前衍生化 HPLC 指纹谱

Fig.1 Pre-column derivation HPLC characteristic fingerprint of polysaccharide hydrolysate from 13 batches of *P. cyrtonema*
注: S1~S13: 13 批多花黄精药材指纹图谱; R: 共有模式图谱。

表 2 13 批不同产地多花黄精相似度

Table 2 Similarity evaluation of 13 batches of *P. cyrtonema* from different localities

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
S1	1.000												
S2	0.951	1.000											
S3	0.854	0.706	1.000										
S4	0.888	0.862	0.617	1.000									
S5	0.952	0.862	0.832	0.941	1.000								
S6	0.590	0.485	0.819	0.247	0.469	1.000							
S7	0.596	0.445	0.895	0.221	0.508	0.924	1.000						
S8	0.744	0.718	0.797	0.446	0.580	0.925	0.807	1.000					
S9	0.634	0.469	0.928	0.288	0.568	0.916	0.994	0.806	1.000				
S10	0.975	0.979	0.765	0.910	0.920	0.524	0.483	0.737	0.523	1.000			
S11	0.813	0.716	0.939	0.490	0.702	0.887	0.927	0.879	0.928	0.730	1.000		
S12	0.963	0.858	0.899	0.895	0.989	0.585	0.621	0.670	0.676	0.919	0.793	1.000	
S13	0.534	0.515	0.637	0.218	0.358	0.919	0.746	0.896	0.719	0.497	0.792	0.464	1.000
R	0.929	0.857	0.935	0.805	0.845	0.841	0.808	0.907	0.829	0.884	0.945	0.905	0.781

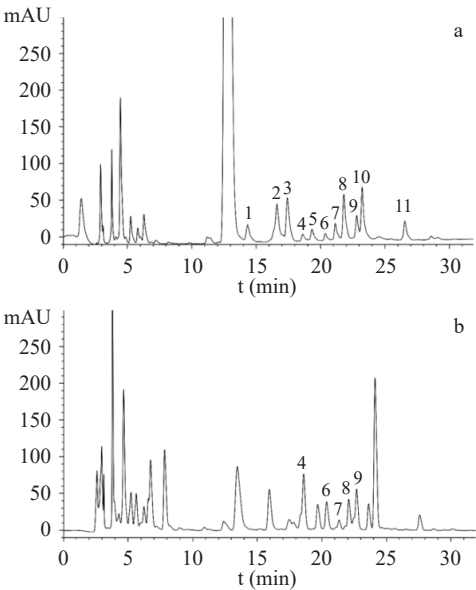


图 2 多花黄精药材共有模式图谱及对照品 HPLC 图

Fig.2 HPLC fingerprints of *P. cyrtonema* and chromatograms of reference substances

注: a. 对照品色谱图; b. 多花黄精共有模式图谱; 1. 甘露糖; 2. 核糖; 3. L-鼠李糖; 4. 半乳糖醛酸; 5. 盐酸氨基葡萄糖; 6. 葡萄糖醛酸; 7. 半乳糖; 8. 葡萄糖; 9. 木糖; 10. 阿拉伯糖; 11. L-岩藻糖。

2.5 总多糖含量

多糖是黄精药材的重要质量标志物^[32], 按 2020 年版《中华人民共和国药典》含量测定项规定, 其干燥品含多糖以无水葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)计, 不得少于 7.0%。本研究显示, 13 批多花黄精药材的多糖含量符合要求, 在 7.18%~16.27% 范围内, 结果见表 3。可见总多糖含量最高的 S3 号(湖南省祁阳县), 最低是 S9 号(湖南省怀化市), 约相差 1 倍, 表明不同产地多花黄精多糖含量有明显差异, 与相似度分析结果一致。已有研究表明, 产地和生长年限是影响黄精多

表 3 13 批多花黄精的总多糖含量测定结果

Table 3 Determination results of total polysaccharide content of 13 batches of *P. cyrtonema*

编号	吸光度(Abs)	百分含量(%)	编号	吸光度(Abs)	百分含量(%)
S1	0.654	14.11	S8	0.579	12.30
S2	0.516	10.78	S9	0.367	7.18
S3	0.743	16.27	S10	0.441	8.97
S4	0.471	9.69	S11	0.432	8.75
S5	0.390	7.73	S12	0.584	12.43
S6	0.559	11.82	S13	0.388	7.69
S7	0.418	8.42			

糖含量的重要影响因素^[29,33], 本研究中, 样品为随机采集, 产地和生长年限可能是形成其多糖差异的原因。

2.6 聚类分析

聚类分析(HCA)是按照个体数据特征对样本进行分类的一种方法, 其同一类别个体间具有较高的相似度^[11]。将 13 批样品单位质量药材峰面积进行量化, 得到 13×10 阶的数据矩阵, 采用 SPSS 20.0 版软件, 瓦尔德法(Ward)进行分析, 结果见图 3。可见当判别条件距离为 10 时, 13 批多花黄精药材被分成两类, I 类包括 12 个样品, 为 S1~S12 号, II 类仅有 S13 号(湖南省慈利县), 若以相似度 0.80 为界限, 聚类结果与相似度和多糖含量结果一致。不同产地的样品在聚类图上无明显区分, 表明栽培多花黄精药材的多糖成分类别差异不大, S13 号样本偏离的原因可能是采收年限、种质资源或栽培技术差异造成的^[34]。

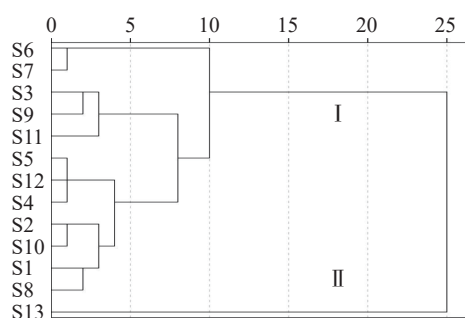


图 3 不同产地多花黄精系统聚类分析

Fig.3 The cluster analysis of *P. cyrtoneura* from different localities

2.7 主成分分析

主成分分析(PCA)是将多维具有相关性的数据压缩为少数几个相互独立数据的统计方法, 其在不损失主要信息的前提下实现降维, 扩大样本之间的差异, 可解决由于中成药成分复杂所致的谱带重叠分析困难^[35]。为了更加全面、系统地分析 13 批多花黄精之间的差异, 揭示其内在关系, 将上述 13×10 数据矩阵采用 SPSS 20.0 软件计算特征值和方差贡献率, 见表 4, 以主成分的特征值大于 1 和累计方差贡献率大于 85%, 作为选择主成分因子依据^[36], 结果显示前三个主成分可代表 89.364% 的信息量。采用 SIMCA-

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Characteristic value and variance contribution rate

成份	特征值	方差贡献率(%)	累计方差贡献率(%)
1	4.551	50.565	50.565
2	1.950	21.668	72.234
3	1.542	17.131	89.364
4	0.296	2.277	98.624
5	0.125	0.963	99.587
6	0.027	0.21	99.797
7	0.018	0.137	99.933
8	0.009	0.067	100
9	3.21E-16	2.47E-15	100

P13.0 计算 PCA 得分图, 结果见图 4, 13 个样品被分成两类, 其中采集于湖南省慈利县的 S13 号样品单独聚为一类, 与 HCA 结果一致, 观察发现与其他样品相比, S13 号样本较为幼嫩, 可能是其单独聚为一支的原因。

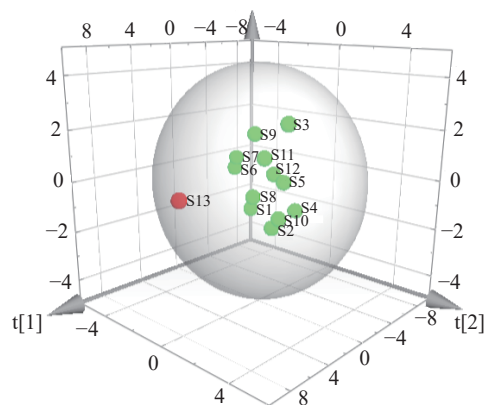


图 4 多花黄精 PMP-HPLC 图谱 PCA 结果

Fig.4 PCA results of PMP-HPLC fingerprints of *P. cyrtoneura*

3 结论

本实验首次建立了不同产地多花黄精中多糖成分的 PMP-HPLC 指纹图谱, 并对其单糖组成进行了研究, 在此基础上, 结合指纹图谱技术, 采用相似度分析, 聚类分析和主成分分析对其指纹图谱进行了研究, 并对其总多糖含量进行了测定。实验结果表明, 13 批多花黄精单糖组成均含半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、木糖, 其总多糖含量范围在 7.18%~16.27% 之间, HCA 和 PCA 分析结果一致, 样本被分为 2 类, 其次, 13 批多花黄精的指纹图谱相似度较低, 在 0.781~0.945 之间, 其中相似度低于 0.90 的样品占所研究样品的 61.5%, 从一定程度反映了多花黄精药材质量的不均一, 这一结果与黄精其他基原物种研究结果不一致^[22-23], 其原因可能是种质资源、产地或生长年限等影响了其多糖生成, 还有待进一步深入研究。综合产地与指纹图谱相似度、总多糖含量、单糖组成等分析, 未发现明显的规律, 已有研究表明, 多花黄精不同龄节间的有效成分含量差异较大^[37], 不同生长年限的黄精药材其多糖成分亦存在一定差异^[29], 提示采收年限和栽培技术可能是造成多花黄精品质差异的原因。因此, 为确保黄精药材临床用药的有效和安全, 有必要建立多花黄精的规范化栽培技术体系, 以确保多花黄精药材品质的一致性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 319. [National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 319.]
- [2] 宋艺君, 郭涛, 刘世军, 等. 响应面法优化黄精-大枣果酒发酵工艺及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 156-161. [SONG Yijun, GUO Tao, LIU Shijun, et al. Optimization of fermentation process and antioxidant activity of *Polygonati Rhizoma*-

- Jujubae Fructus* fruit wine by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 156–161.]
- [3] LI R S, TAO A E, YANG R M, et al. Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 131: 1–8.
- [4] XIE S Z, YANG G, JIANG X M, et al. *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharide promotes GLP-1 secretion from enteroendocrine L-Cells through sweet taste receptor-mediated camp signaling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(25): 6864–68721.
- [5] HUANG Z Z, DU X, MA C D, et al. Identification of antitumor active constituents in *Polygonatum sibiricum* flower by UPLC-Q-TOF-MSE and network pharmacology[J]. ACS Omega, 2020, 5(46): 29755–29764.
- [6] 杜泽飞, 陶爱恩, 夏从龙, 等. 基于 PMP-HPLC 和化学计量学的黄精基原物种多糖差异分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 15(25): 25–29. [DU Zefei, TAO Aien, XIA Conglong, et al. Approach based on PMP-HPLC fingerprint and chemometrics to compare difference of polysaccharide in *Polygonati Rhizoma*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 15(25): 25–29.]
- [7] 吴丰鹏, 李芹英, 吴彦超, 等. 九蒸九制对黄精多糖单糖组成及其抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 42–46. [WU Fengpeng, LI Qinying, WU Yanchao, et al. Effects of nine-steam-nine-bask on the monosaccharide composition and antioxidant activities of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 42–46.]
- [8] ZHAO P, ZHAO C C, LI X, et al. The genus *Polygonatum*: A review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 378(17): 274–291.
- [9] 杨紫玉, 杨科, 朱晓新, 等. 黄精保健食品的开发现状及产业发展分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(7): 853–859. [YANG Ziyu, YANG Ke, ZHU Xiaoxin, et al. Development status and industry development analysis of *Polygonati Rhizoma* healthcare food[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2020, 40(7): 853–859.]
- [10] 王彩步, 段宝忠. 云南不同种植基地滇黄精中多糖含量测定分析[J]. 大理大学学报, 2018, 3(2): 14–17. [WANG Caibu, DUAN Baozhong. Determination and analysis of polysaccharide in *Polygonatum kingianum* from different planting bases in Yunnan[J]. Journal of Dali University, 2018, 3(2): 14–17.]
- [11] 张晓灿, 罗丹丹, 陶爱恩, 等. 基于指纹图谱和化学计量学的丹参及紫丹参质量评价研究[J]. 中药材, 2017, 40(5): 1061–1065. [ZHANG Xiaocan, LUO Dandan, TAO Aien, et al. Species differentiation and quality assessment of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia trijuga* by HPLC fingerprint[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(5): 1061–1065.]
- [12] 段宝忠, 黄林芳, 尚飞能, 等. 云南野生抚育粗茎秦艽药材的品质评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 82–86. [DUAN Baozhong, HUANG Linfang, SHANG Feineng, et al. Quality evaluation of wildlife tending *Gentiana crassicaulis* in Yunnan Province[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(21): 82–86.]
- [13] DUAN B Z, HUANG L F CHEN S L. Chemical fingerprint analysis of *Fritillaria delavayi* Franch. by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2015, 35(4): 513–518.
- [14] 何连军, 干雅平, 吕伟德, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定多花黄精多糖的单糖组成[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1671–1676. [HE Lianjun, GAN Yaping, LÜ Weide, et al. Monosaccharide composition analysis on polysaccharides in *Polygonatum cyrtoneuma* by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(8): 1671–1676.]
- [15] 张雪, 李铮, 张英涛, 等. HPLC-CAD 法同时测定白及中单糖、双糖的含量[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(2): 1547–157. [ZHANG Xue, LI Zheng, ZHANG Yingtao, et al. Simultaneous quantification of monosaccharides and disaccharides in *Rhizoma Bletillae* by HPLC-CAD[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2018, 45(2): 1547–157.]
- [16] MCGREGOR N, ARNAL G, BRUMER H. Quantitative kinetic characterization of glycoside hydrolases using high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC)[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1588: 15–24.
- [17] LIU J, ZHOU J, ZHANG Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods[J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 11(4): 406–411.
- [18] LI H, YANG Z Z, WANG J J, et al. Chemical fingerprint for identification and quality control of saccharides in Danhong injection based on HPLC-ELSD with chemometrics[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2019, 35(5): 782–787.
- [19] XIE M, YU Y, ZHU Z, et al. Simultaneous determination of six main components in Bushen Huoxue prescription by HPLC-CAD[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 201(2): 1–9.
- [20] 罗昌明, 吴雪松, 雷明珠, 等. 风湿定片中 8 种指标成分的 HPLC-CAD 含量测定研究[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 863–867. [LUO Changming, WU Xuesong, LEI Mingzhu, et al. Simultaneous determination of 8 ingredients in Fengshiding tablets by HPLC-CAD[J]. Central South Pharmacy, 2019, 17(6): 863–867.]
- [21] 闫丽, 吴莹, 高慧. HPLC-CAD 法测定知母盐炙前后 4 种皂苷含量[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(1): 46–49. [YAN Li, WU Ying, GAO Hui. Determination of 4 kinds of saponins in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing by HPLC-CAD[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2019, 33(1): 46–49.]
- [22] 王海洋, 高阳, 高其品, 等. 黄精多糖的柱前衍生化 HPLC 指纹图谱研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(13): 3462–3464. [WANG Haiyang, GAO Yang, GAO Qipin, et al. Study on pre-column derivatives HPLC fingerprint of *Polygonati* polysaccharide[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(13): 3462–3464.]
- [23] 秦垂新, 曹子丰, 黄绮敏, 等. 黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 65–68.

- [QIN Chuixin, CAO Zifeng, HUANG Qimin, et al. Pre-column derivatives HPLC fingerprint of *Polygonati Rhizoma* polysaccharide hydrolysate[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(11): 65–68.]
- [24] 周宝珍. UPLC 法在不同黄精指纹图谱研究中的应用[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(7): 36–39. [ZHOU Baozhen. Application of UPLC method in the study of fingerprints of different *Polygonatum*[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2017, 63(7): 36–39.]
- [25] 杨青, 高华春, 陈红丽, 等. 武夷山及周边地区黄精植物 ISSR 分子标记鉴定及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 亚热带植物科学, 2017, 46(1): 25–29. [YANG Qing, GAO Huachun, CHEN Hongli, et al. Identification of *Polygonatum* from Wuyishan and its surrounding areas by ISSR molecular markers and their HPLC fingerprints[J]. Subtropical Plant Science, 2017, 46(1): 25–29.]
- [26] SONG J H, CHEN F Z, LIU J, et al. Combinative method using multi-components quantitation and HPLC fingerprint for comprehensive evaluation of *Gentiana crassicaulis*[J]. Pharmacognosy Magazine, 2017, 13(49): 180–187.
- [27] ARYANI S, MOHAMAD R, LATIFAH K. D, et al. Discrimination of red and white rice bran from Indonesia using HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1717–1722.
- [28] LIU X Y, JIANG W W, SU M, et al. Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting[J]. Journal of Separation Science, 2019, 43(1): 6–17.
- [29] 潘德芳, 吕杨, 陈伟民, 等. 紫外可见分光光度法测定不同年份黄精中多糖含量[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5790–5795. [PAN Defang, LÜ Yang, CHEN Weimin, et al. Test of the content of the polysaccharide in the *Polygonatum* with different ages with the method of UV-visible spectrophotometry[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(10): 5790–5795.]
- [30] 王坤, 岳永德, 汤锋, 等. 多花黄精多糖的分级提取及结构初步分析[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(3): 364–369. [WANG Kun, YUE Yongde, TANG Feng, et al. Sequential extraction and structural analysis of polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneura* Hua[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(3): 364–369.]
- [31] 茅蕾蕾, 陈颖, 胡碧原, 等. 银杏外种皮多糖的单糖组成分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 262–266. [MAO Leilei, CHEN Ying, HU Biyuan, et al. Analysis of monosaccharide composition of exotesta polysaccharides of *Ginkgo biloba*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(2): 262–266.]
- [32] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2017, 48(1): 1–16. [JIANG Chengxi, ZHANG Tiejun, CHEN Changqing, et al. Research progress of *Polygonatum* and prediction and analysis of its quality markers[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(1): 1–16.]
- [33] 张洪洋, 李叶丹, 王义, 等. 不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析[J]. 黑龙江科技信息, 2017, 10: 87. [ZHANG Hongyang, LI Yedan, WANG Yi, et al. Comparison and principal component analysis of main chemical components of *Polygonatum* from different producing areas[J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2017, 10: 87.]
- [34] 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. [XIAO Linjing, LIU Yingying, ZHAO Yu, et al. Quality evaluation of *Erigeron breviscapus* from different origins and its related species by HPLC coupled with chemometrics[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(14): 3438–3443.]
- [35] 胡建勇, 缪明锦, 闻焜, 等. 基于红外光谱结合化学计量学及 HPLC 色谱的紫丹参及其近缘种成分差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 8–14. [HU Jianyong, MIAO Mingjin, WEN Kun, et al. Identification of *Salviae yunnanensis* Radix et Rhizoma and its allied species based on chemical composition by FTIR with chemometric analysis and HPLC fingerprint[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(15): 8–14.]
- [36] 卢森华, 黎强, 樊文研, 等. HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学评价不同产地消瘤藤的药材质量[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(6): 52–56. [LU Senhua, LI Qiang, FAN Wenyan, et al. HPLC fingerprint combined with chemometrics to evaluate the quality of *Pileostegia tomentella* from different areas[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2020, 34(6): 52–56.]
- [37] 刘佳, 朱翔, 叶宏达, 等. 云南多花黄精适宜采收期初步研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(27): 88–91. [LIU Jia, ZHU Xi-ang, YE Hongda, et al. The appropriate collection period of *Polygonatum cyrtoneura* in Yunnan[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(27): 88–91.]