

基于 PMP-HPLC 和化学计量学的黄精基原物种多糖差异分析

杜泽飞, 陶爱恩, 夏从龙, 李龙星*, 段宝忠*

(大理大学药学院, 云南大理 671000)

[摘要] 目的:建立 2015 年版《中国药典》中 3 种基原黄精的多糖指纹图谱,探讨黄精基原物种多糖的差异,为黄精药材质量评价和临床应用提供参考。方法:采用水提醇沉法提取黄精药材中的多糖,经三氟乙酸(TFA)水解和 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)柱前衍生后,采用 HPLC 建立 3 种黄精的色谱指纹图谱;并利用相似度(SA)分析,聚类分析(HCA)和主成分分析方法(PCA)对指纹图谱进行分析,研究 3 种基原黄精物种多糖的差异。结果:3 种基原黄精的多糖 PMP-HPLC 指纹图谱存在差异,3 个物种中均未检测到 D-甘露糖,L-鼠李糖和 L-岩藻糖,但均含有 D-半乳糖醛酸,D-盐酸氨基葡萄糖,D-半乳糖,D-葡萄糖,D-木糖。PCA 和 HCA 分析表明,黄精与多花黄精的多糖色谱指纹较为接近,而滇黄精与二者差异明显。结论:3 种法定基原黄精物种的多糖组成存在差异,在临床应用中,应考虑物种对临床应用可能产生的影响。所建立 PMP-HPLC 方法简便、准确、重复性好,可用于 3 种黄精药材的多糖的差异研究。

[关键词] 黄精;多糖;柱前衍生-高效液相色谱;指纹图谱;差异;化学计量学

[中图分类号] R289;R284.1;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0025-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191618

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190527.1030.003.html>

[网络出版时间] 2019-05-27 16:33

Approach Based on PMP-HPLC Fingerprint and Chemometrics to Compare Difference of Polysaccharide in Polygonati Rhizoma

DU Ze-fei, TAO Ai-en, XIA Cong-long, LI Long-xing*, DUAN Bao-zhong*

(College of Pharmaceutical science, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To established an approach of chemical fingerprinting and study the differences of the polysaccharides from three species of Polygonati Rhizoma in *Chinese Pharmacopoeia*, so as to provide reference for quality evaluation and clinical application of Polygonati Rhizoma. **Method:** The polysaccharides were extracted by water extraction and alcohol precipitation from Polygonati Rhizoma. After hydrolysis by trifluoroacetic acid (TFA) and pre-column derivation by PMP, the chromatographic fingerprints of three kinds of Polygonati Rhizoma were established by high performance liquid chromatography. The fingerprinting model and chemometrics method, include similarity analysis (SA), cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were used for compare the differences among three species. **Result:** There were some differences in the PMP-HPLC fingerprints and monosaccharide composition from the three species. The D-mannose, L-rhamnose and L-fucose were not detected, but they all contained D-galacturonic acid, D-glucosamine hydrochloride, D-galactose, D-glucose and D-xylose among three species. The PCA and HCA analysis showed that chromatographic fingerprints of

[收稿日期] 20181213(030)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31460084);云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2015HB058);云南省重大科技专项(201800501);大理大学中药资源与民族药创新团队项目(ZKLX2019318)

[第一作者] 杜泽飞,在读硕士,从事中药资源与品质评价研究,E-mail:2011624706@qq.com

[通信作者] *李龙星,高级实验师,从事天然药物化学研究,Tel:0872-2213005,E-mail:lilongxing2007@163.com;

*段宝忠,博士,副教授,从事中药资源与鉴定研究,Tel:0872-2257401,E-mail:bzduan@126.com

P. cyrtonea and *P. sibiricum* were similar, while *P. kingianum* and other two species were significantly different. **Conclusion:** There are differences in fingerprints of polysaccharides among three species of *Polygonati Rhizoma*. The possible effects of species should be considered in clinical application. The established PMP-HPLC is a simple, accurate and reproducible method, which can be used for the quality evaluation of *Polygonati Rhizoma*.

[Key words] *Polygonati Rhizoma*; polysaccharide; PMP-HPLC; fingerprint; difference; chemometrics

黄精为大宗药材,始载于《神农本草经》,为 2015 年版《中国药典》收载品种,其法定基原为多花黄精 *Polygonatum cyrtonea*,滇黄精 *P. kingianum*,黄精 *P. sibiricum* 的干燥根茎,具有补气养阴、健脾、润肺、益肾之功效^[1]。现代研究表明,黄精中主要含有多糖、皂苷和黄酮类成分^[2-3]。目前已有学者对 3 种基原黄精的多糖的组成进行了研究^[4-6],并开展了滇黄精和黄精的柱前衍生化多糖指纹图谱研究^[5-6]。但这些针对黄精多糖的研究均是零散的,未同时对 3 种基原黄精的多糖组成进行比较;且所采用的提取分离方法不一致,所得多糖部位也不一致,结果不具有可比性;此外也尚未见对 3 种黄精多糖中的单糖的含量进行研究的报道。有学者采用液相-质谱方法对 3 种基原黄精的化学成分差异开展了研究^[7-8],其所研究对象为黄精的混合组分,非黄精的多糖组分进行比较。由于黄精多糖是黄精的主要活性成分和质量标志物^[9],也是 2015 年版《中国药典》的质量控制指标^[1]。鉴于化学计量学方法可有效提取色谱信息,已广泛用于中药色谱指纹的差异解析研究,但目前尚未见黄精基原植物多糖类成分的化学计量学分析相关研究。因此,本研究基于柱前衍生化(PMP)-HPLC 方法,对 3 种基原黄精中多糖的单糖组成和含量进行了研究,同时结合相似度(SA)分析,聚类分析(HCA)和主成分分析方法对数据进行比较,探讨 3 种法定基原黄精中多糖的差异,以期为黄精药材的临床应用和质量评价提供科学参考。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(G1322A 在线脱气机, G1311A 型四元梯度泵, G1329A 型进样器, G1316A 型柱温箱, G1314B 型 VWD 检测器和 Chem Station 色谱工作站,美国 Agilent 公司);GH-252 型电子天平(日本 AND 公司);AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SB25-12D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);FY135 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

D-葡萄糖(Glu,批号 171106),D-甘露糖(Man,批号 170921),D-盐酸氨基葡萄糖(Gah,批号

171210),D-半乳糖(Gal,批号 171206),L-鼠李糖(Rham,批号 171024),L-岩藻糖(Fuc,批号 170813),D-葡萄糖醛酸(GlcUA,批号 170730),D-木糖(Xyl,批号 170912),D-半乳糖醛酸(GalUA,批号 170903),D-核糖(Rib,批号 171103),D-阿拉伯糖(Arab,批号 171219),以上单糖纯度≥98%,均购于上海融禾医药科技有限公司;1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP,阿拉丁);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

样品采集或购于云南、浙江及安徽等地栽培品,经大理大学段宝忠副教授鉴定为百合科黄精属植物黄精 *P. sibiricum* (S1 ~ S8),滇黄精 *P. kingianum* (S9 ~ S16) 和多花黄精 *P. cyrtonea* Hua (S17 ~ S29) 的新鲜根茎,所有样品未经加工,切片后在 40 ℃ 烘干,样品信息见表 1,凭证标本保存于大理大学中药标本馆。

表 1 样品信息表

Table 1 Sample information

编号	植物名	产地	编号	植物名	产地
S1	黄精	安徽省池州市	S16	滇黄精	云南省江城县
S2	黄精	河南省洛阳市	S17	多花黄精	安徽省金寨县
S3	黄精	陕西省渭南市	S18	多花黄精	四川省成都市
S4	黄精	内蒙古赤峰市	S19	多花黄精	湖南省祁阳县
S5	黄精	广东省连州市	S20	多花黄精	四川省船山区
S6	黄精	安徽省青阳县	S21	多花黄精	广西省全州县
S7	黄精	河南省嵩县	S22	多花黄精	重庆市江津区
S8	黄精	陕西省丹凤县	S23	多花黄精	浙江省遂昌县
S9	滇黄精	云南省石林县	S24	多花黄精	贵州省赤水市
S10	滇黄精	云南省易门县	S25	多花黄精	湖南省怀化市
S11	滇黄精	云南省弥勒县	S26	多花黄精	安徽省祁门县
S12	滇黄精	云南省文山市	S27	多花黄精	福建省建宁县
S13	滇黄精	云南省香格里拉县	S28	多花黄精	江西省安福县
S14	滇黄精	云南省南涧县	S29	多花黄精	湖南省慈利县
S15	滇黄精	云南省云县			

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax-SB C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.025 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液(B);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。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 混合对照品及衍生物的制备 参照文献^[10-11]的方法,精密称取上述对照品适量,用蒸馏水配制成各单糖质量浓度约为 0.5 g·L⁻¹的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 400 μL,置于 5 mL 的安瓿瓶中,精密加入 0.6 mol·L⁻¹ NaOH 200 μL 和 0.5 mol·L⁻¹ PMP 甲醇溶液 200 μL,置 70℃ 条件下反应 60 min,取出,放冷,精密加入 0.6 mol·L⁻¹ HCl 溶液 200 μL,混匀。加入等体积的三氯甲烷,混匀,离心 10 min(4 000 r·min⁻¹),去掉三氯甲烷层,重复多次至三氯甲烷层无色,即得混合对照品的衍生溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 黄精多糖的提取 取药材粉末 5.0 g,精密称定,加入水 75 mL 在 80℃ 条件下超声提取 3 次,每次 2 h,抽滤,洗涤滤瓶滤渣,浓缩至约 10 mL,离心 20 min(4 000 r·min⁻¹),上清液转移至分液漏斗中,加入 3 倍体积的石油醚进行萃取,萃取 3 次,直至石油醚层无色,静止分层,取下层水相,调节 pH 至 6,加入多糖溶液体积 2% 木瓜蛋白酶,在 60℃ 下水浴温度酶解 4 h,反应完成后,沸水浴灭酶 10 min,取上清液转移至分液漏斗中,加入 Sevage 试剂 2 mL,振荡,除去下层有机相,重复多次至无白色絮状物产生。上清液转入烧杯,精密加入无水乙醇 60 mL(慢加快搅),置 4℃ 冰箱中放置 12 h,离心,弃上清液,沉淀加 95% 乙醇 10 mL 洗涤 2 次,离心,得沉淀物,加热水使沉淀溶解,转移到 10 mL 量瓶中,放冷,加水定容,冷冻干燥,得粗多糖粉末约 30 mg。

2.3.2 衍生化供试品溶液制备 精密称取 2.3.1 项下粗多糖粉末 20 mg,置 5 mL 安瓿中,精密加入 4 mol·mL⁻¹三氟乙酸(TFA)溶液 2 mL,封口后置 110℃ 条件下水解 7 h,放冷,置于蒸发皿中水浴蒸干,沉淀物加甲醇 1 mL 溶解,水浴蒸干,重复多次至 TFA 除尽,加水定容至 1 mL,得水解样品溶液。精密吸取 400 μL,按 2.2.1 项下方法进行衍生化,溶液过 0.45 μL 滤膜后备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批供试品溶液,按 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 < 2.1%,表明精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.3 项下方法制备,在 2.1 项色谱条件下进样分析,测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.6%,表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 18, 24, 48 h 进样测定,测得其各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均 < 2.7%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性较好。

2.5 指纹图谱建立 将 29 批样品按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件测定,得 29 批样品的 PMP-HPLC 色谱指纹图谱。

3 结果与讨论

3.1 3 种黄精指纹图谱比较 将 8 批黄精,8 批滇黄精和 13 批多花黄精药材色谱图,分别导入中药指纹图谱相似度评价系统(2.0 版),生成 3 种基原黄精 PMP-HPLC 共有模式色谱图,见图 1。从图中可以看出,3 种基原黄精 PMP-HPLC 色谱图有一定差异,其中滇黄精和多花黄精中的多糖组分明显较黄精丰富。通过与已知单糖对照品衍生物保留时间比较,3 种基原黄精药材中均未检测到 D-甘露糖, L-鼠李糖和 L-岩藻糖,均含有 D-半乳糖醛酸, D-盐酸氨基葡萄糖, D-半乳糖, D-葡萄糖, D-木糖。从单糖组成来看,黄精和多花黄精在多糖的组成上更为接近。总体来看,3 种基原黄精指纹图谱存在一定差异。

3.2 指纹图谱相似度评价 将 8 批黄精,8 批滇黄精和 13 批多花黄精药材色谱图,分别导入中药指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)软件,生成 3 种基原黄精的对照图谱。29 批样品分别与黄精、滇黄精和多花黄精的对照图谱比较,计算相似度,结果见图 2。从图中可看出,①与黄精共有模式图谱比较,8 批黄精药材相似度均 > 0.95,滇黄精和多花黄精与其相比,除 3 批多花黄精(S19, S25, S27)样品外,相似度均 < 0.90;②与滇黄精共有模式图谱比较,8 批滇黄精药材相似度均 > 0.90,黄精和多花黄精与滇黄精相比,除 S23, S24, S25 样品外,相似度均 < 0.90;③与多花黄精共有模式图谱相比,3 种基原黄精的相似度分布较离散,相似度在 0.69~0.94,其中黄精及多花黄精有部分相似度 > 0.90;8 批滇黄精均 < 0.90。上述结果表明,黄精和滇黄精药材种内指纹色谱相似度较高,差异较小;多花黄精种

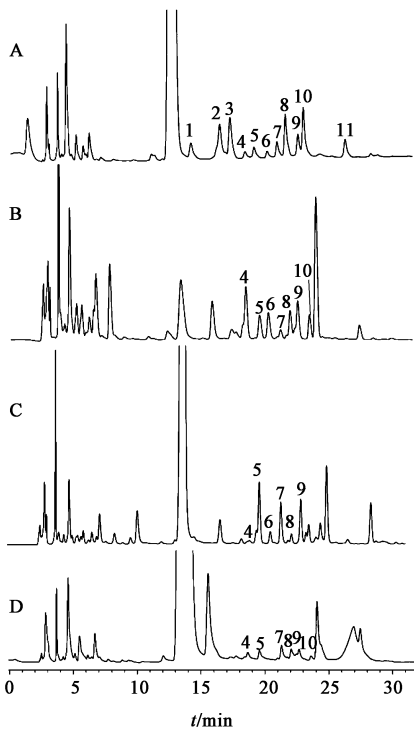


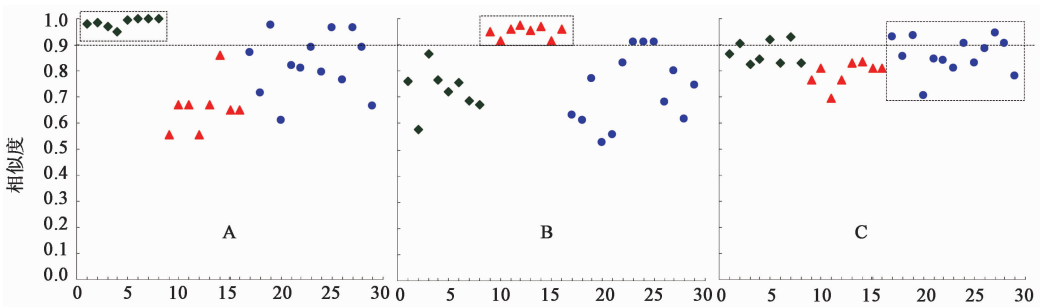
图 1 3 种黄精药材 PMP-HPLC
A. 对照品图谱; B. 多花黄精指纹色谱图; C. 滇黄精指纹色谱图; D. 黄精指纹色谱图; 1. D-甘露糖; 2. D-核糖; 3. L-鼠李糖; 4. D-半乳糖醛酸; 5. D-盐酸氨基葡萄糖; 6. D-葡萄糖醛酸; 7. D-半乳糖; 8. D-葡萄糖; 9. D-木糖; 10. D-阿拉伯糖; 11. L-岩藻糖

图 1 3 种黄精药材 PMP-HPLC
Fig. 1 PMP-HPLC of 3 Polygonati Rhizoma

内色谱指纹有一定差异; 3 种基原黄精种间差异较大。

3.3 聚类分析 (HCA) 采用 SPSS 20.0 软件, 将 29 批多基原黄精药材共有峰峰面积的数据经标准化处理, 采用组间平均数连接法进行聚类分析, 分析结果见图 3。从聚类结果来看, 29 批黄精药材在分类距离为 20 时, 被明显的分为两大类, 其中 I 类为 8 批滇黄精样品 (S9 ~ S16), II 类为 21 批黄精和多花黄精样品。滇黄精单独聚为一支, 与黄精和多花黄精明显区分, 而黄精与多花黄精则聚为一支。已有研究表明, 3 种基原黄精的化学成分有明显差异^[8], 从本研究多糖色谱指纹聚类分析来看, 滇黄精与多花黄精和黄精多糖组分差异明显, 而黄精与多花黄精二者多糖指纹图谱相对滇黄精, 二者之间的色谱指纹差异稍小, 通过聚类分析无法将其区分。

3.4 主成分分析 (PCA) 主成分分析方法是通过对数据降维、变量提取, 在损失很少信息的前提下把多个指标转化为几个综合指标的多元统计方法^[12], 近年来广泛用于中药色谱指纹图谱信息的统计分析^[13-14]。本研究中, 采用 SPSS 20.0 软件, 对 29 批样品共有指纹图谱信息进行主成分分析, 研究表明前 3 个主成分累计贡献率达到了 89.21%, 其中第一主成分特征值为 15.85, 方差贡献率为



◆. 黄精; ▲. 滇黄精; ●. 多花黄精; A. 与黄精对照图谱比较; B. 与滇黄精对照图谱比较; C. 与多花黄精对照图谱比较

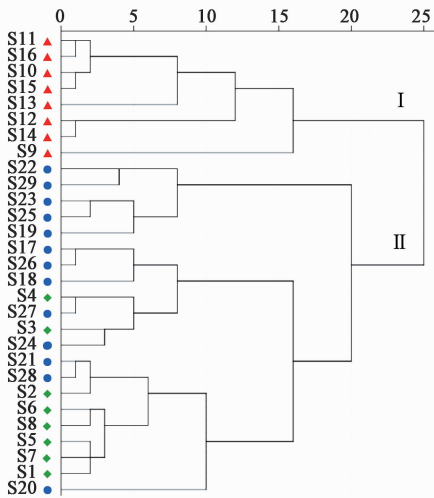
图 2 29 批样品与黄精、滇黄精、多花黄精对照图谱相似度比较
Fig. 2 Similarity comparison of 3 kinds Polygonati Rhizoma

54.69%, 第二主成分特征值为 6.82, 方差贡献率为 23.54%, 第三主成分特征值为 3.18, 方差贡献率为 10.98%。29 批样品的 PCA 结果见图 4, 可见 29 批黄精药材被分为 2 大类, 其中滇黄精样品聚为一类 (I), 黄精和多花黄精样品聚为另一类 (II), 与聚类分析结果一致。

4 小结

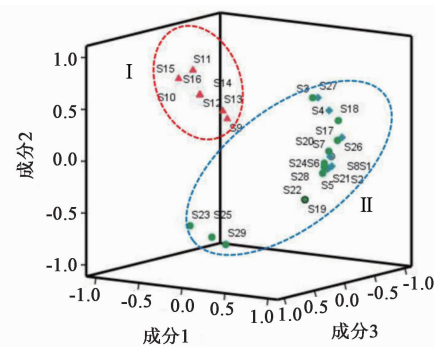
本研究采用柱前衍生化结合高效液相色谱法 (PMP-HPLC), 建立了《中国药典》黄精 3 个基原物

种多糖的指纹图谱, 同时结合 HCA 和 PCA 分析, 探讨了 3 种法定基原黄精的多糖差异。结果表明, 3 个黄精基原物种的多糖 PMP-HPLC 指纹图谱种间差异较大, 从聚类分析和主成分分析的结果可看出, 黄精、多花黄精、滇黄精被分成 2 大类, 其中黄精和多花黄精二者的多糖色谱指纹相似性更高, 聚为一类; 滇黄精多糖色谱指纹相对于二者, 单独聚为一类, 这可能与 3 种基原物种者的地理分布密切相关, 由于滇黄精的来源主要为云南高原区域, 光合作用



◆. 黄精; ▲. 滇黄精; ●. 多花黄精
图 3 29 批黄精样品 HCA 树状关系

Fig. 3 HCA tree relationship of 29 batches Polygonati Rhizoma



◆. 黄精; ▲. 滇黄精; ●. 多花黄精
图 4 29 批黄精样品 PCA 三维投影

Fig. 4 PCA 3 D projection of 29 batches Polygonati Rhizoma

和气候等影响了其多糖成分的积累,相对于另外 2 种黄精,滇黄精与其他的种间差异更为明显。从种内差异来看,黄精和滇黄精药材种内相似度较高,指纹色谱相对多花黄精种内差异较小,这可能与采集多花黄精时,所采集的部位较幼嫩,生长年限影响了其成分的组成。从单糖组成来看,3 种基原黄精多糖的单糖组成差异不明显,三者均未检测到 *D*-甘露糖, *L*-鼠李糖和 *L*-岩藻糖,但均含有 *D*-半乳糖醛酸, *D*-盐酸氨基葡萄糖, *D*-半乳糖, *D*-葡萄糖, *D*-木糖等 5 种单糖。已有学者研究表明,3 种基原黄精的总体化学成分存在明显差异^[7-8]。本研究表明,从多糖的色谱指纹来看,滇黄精与黄精、多花黄精的多糖差异较明显,而黄精和多花黄精二者差异不明显,表明

二者的多糖成分更为接近,在临床应用中,应考虑物种对临床使用所造成的影响。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:306.

[2] 陶爱恩, 张晓灿, 杜泽飞, 等. 黄精属植物中黄酮类化合物及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (9): 2163-2171.

[3] 苏文田, 刘跃钧, 蒋燕锋, 等. 黄精产业发展现状与可持续发展的建议 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (13): 2831-2835.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 王海洋, 高阳, 高其品, 等. 黄精多糖的柱前衍生 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55 (13): 3462-3464, 3478.

[7] 余亚鸣, 马晓勇, 张铁军, 等. 基于高效液相色谱-质谱联用技术的黄精化学成分快速鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (4): 794-797.

[8] 杨兴鑫, 董金财, 胡海波, 等. 基于多元统计分析的 3 种法定基源黄精化学成分比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25 (5): 71-76.

[9] 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.

[10] 邝婷婷, 王宇, 王张, 等. 柱前衍生 HPLC 法分析蔓菁多糖中单糖的组成 [J]. 中成药, 2014, 36 (10): 2121-2124.

[11] 柳杨, 李清, 王菲, 等. 柱前衍生 HPLC 法分析藤三七多糖中单糖的组成 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (2): 199-202.

[12] 郝燕, 董鸿晔, 姜楠, 等. 基于主成分分析的中药色谱指纹图谱多维信息特征数据挖掘方法研究 [J]. 中南药学, 2007, 5 (3): 267-272.

[13] 郭龙, 焦倩, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的艾叶药材质量控制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (5): 977-984.

[14] 张晓灿, 罗丹丹, 陶爱恩, 等. 基于指纹图谱和化学计量的丹参及紫丹参质量评价研究 [J]. 中药材, 2017, 40 (5): 1061-1065.

[责任编辑 顾雪竹]