

# 野生与栽培太白米 HPLC 指纹图谱及化学模式识别

杨冰月, 胡本祥, 张琳, 张岗, 颜永刚, 李依民, 高静, 王薇, 王媚, 彭亮\*  
(陕西中医药大学药学院, 西安 712046)

**[摘要]** 目的:建立野生和栽培太白米的 HPLC 指纹图谱,结合化学模式识别方法对二者进行判别,以期为不同来源太白米药材的质量评价和驯化栽培提供依据。方法:利用高效液相色谱法,测定 10 批野生品和 10 批栽培品共计 20 批太白米药材的指纹图谱,建立指纹图谱共有模式,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)计算相似度,运用主成分分析(PCA),聚类分析(HCA)和最小偏二乘法-判别分析(PLS-DA)对野生与栽培品太白米进行模式识别研究。结果:建立了野生与栽培太白米的 HPLC 指纹图谱共有模式,标定了 26 个共有峰,20 批太白米样品的指纹图谱与对照指纹图谱相似度 > 0.9。主成分分析、聚类分析和最小偏二乘法-判别分析能对野生与栽培太白米进行明确的区分,表明导致差异的主要化学标记物为对香豆酸等 8 个成分。结论:该文建立的太白米 HPLC 指纹图谱具有较强的特征性和重复性,与模式识别方法结合起来可有效的评价太白米质量以及区分其野生与栽培品,为太白米的质量控制和驯化栽培提供参考依据。

**[关键词]** 太白米; 高效液相色谱指纹图谱; 野生品; 栽培品

**[中图分类号]** R284.1;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0187-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190215

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0718.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-02 09:27

## HPLC Fingerprint Analysis and Chemistry Pattern Recognition of Wild and Cultivated *Notholirion bulbuliferum* from Different Regions

YANG Bing-yue, HU Ben-xiang, ZHANG Lin, ZHANG Gang, YAN Yong-gang, LI Yi-min, GAO Jing,  
WANG Wei, WANG Mei, PENG Liang\*

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of wild and cultivated *Notholirion bulbuliferum*, and recognize them according to the chemical pattern, in the expectation of providing the basis for the quality control and domestication cultivation of *N. bulbuliferum* of origins. **Method:** Twenty samples of wild and cultivated *N. bulbuliferum* collected from different origins were detected by HPLC, and a common mode of fingerprint was established. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2012A edition) was used to evaluate the similarity of the samples. The differences among the samples were identified by chemical pattern recognition methods, including principal component analysis (PCA), cluster analysis (HCA) and partial least squares discriminate analysis (PLS-DA). **Result:** The HPLC fingerprint of *N. bulbuliferum* was obtained, and 26 common peaks were found in the chromatograph. Similarities of all samples were over 0.9, PCA, and HCA and PLS-DA results demonstrated obvious distinctions between wild and cultivated *N. bulbuliferum*. Eight constituents, such as pcoumaric acid were identified as biomarkers, representing major differences between the two varieties. **Conclusion:** The HPLC chromatogram of *N. bulbuliferum* developed in this paper has strong characteristics and

**[收稿日期]** 20180427(015)

**[基金项目]** 陕西省中医管理局项目(203050017)

**[第一作者]** 杨冰月, 讲师, 博士, 从事中药品种、质量及资源开发研究, E-mail: 304951774@qq.com

**[通信作者]** \* 彭亮, 讲师, 博士, 从事中药资源评价与开发利用、中药材质量控制研究, E-mail: ppengliang@126.com

repeatability. After being combined with the pattern recognition mode, it can be used as an effective method for evaluating the quality of *N. bulbuliferum* and distinguishing wild and cultivated *N. bulbuliferum*, and provide a reference for the quality control and domestication introduction of *N. bulbuliferum*.

[Key words] *Notholirion bulbuliferum*; HPLC fingerprint; wild; cultivated

太白米为百合科假百合属多年生草本植物假百合的干燥小鳞茎,因其地下鳞茎盘周围的小鳞茎里面包裹有数层紧实的肉质鳞片,形状如米粒一般,故名“太白米”<sup>[1]</sup>。太白米性温,味辛、微甘苦,具有宽胸理气、健胃、镇痛等功效。太白米的化学成分研究始于 20 世纪 80 年代,表明其主要化学成分为甾体生物碱、酚类、有机酸和黄酮类等<sup>[2-4]</sup>;临床上主治气滞心痛、胃炎、胃腹胀痛、呕吐、风寒咳嗽等,特别在治疗萎缩性胃炎方面疗效独特<sup>[5]</sup>。假百合是假百合属三种植物中唯一具有极高药用价值的植物,收载于《陕西省地方重点保护野生植物名录(第一批修订)》,属于珍稀濒危保护植物,其野生资源主要分布于我国秦岭和西南高山地区,以秦岭主峰太白山的东太白最为丰富。近年来,由于太白米在治疗胃癌和食道癌等方面疗效良好,使其市场用量供不应求,价格不断增高(约 2 600 元/kg)<sup>[6]</sup>。同时,受限于自身的繁殖特性及药农滥采滥挖等因素,其野生资源已濒临枯竭<sup>[7]</sup>。因此,研究人员开展了一系列太白米离体愈伤组织培养及植株再生等研究,并表明太白米药材与愈伤组织的总黄酮含量无差异,然而未见植株再生后的相关驯化种植及药材生产、质量等报道<sup>[8-10]</sup>。本课题组前期对太白米的濒危因素、人工栽培及质量控制等进行了大量研究,建有太白米的人工栽培基地,制定了太白米的陕西省地方药材标准,并构建了太白米的 HPLC 指纹图谱,但仍缺乏太白米栽培与野生种质量差异性评价研究<sup>[1,11-14]</sup>。

模式识别技术(pattern recognition)是化学计量学的重要组成部分,也是筛选中药 Q-markers 的重要数学方法,具有较好的预测精度和广泛的适用性,按照有无训练可划分为无监督的模式识别和有监督的模式识别方法。前者主要包括主成分分析(PCA),聚类分析(CA)等方法;后者主要包括偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),人工神经网络(ANNs),判别分析(DA)等方法<sup>[15]</sup>。目前,指纹图谱结合模式识别方法已广泛应用于中药材的质量控制、差异标记物筛选和种质鉴别等方面,可有效地对中药材复杂的次生代谢产物信息进行综合评价,在夏枯草<sup>[16]</sup>、何首乌<sup>[17]</sup>、鸡血藤<sup>[18]</sup>等多种中药材上

取得了较好的研究成果。基于此,本项目通过 HPLC 建立不同来源栽培及野生种太白米的指纹图谱,采用 PCA, HCA 和 PLS-DA 等模式识别技术分析栽培及野生太白米药材的次生代谢产物特征,筛选导致样品间差异的化学成分,可为太白米的质量评价、引种驯化和大面积种植提供基础数据。

## 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2998 PDA 检测器,美国 Waters); Agilent 5TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.0 mm × 250 mm, 5 μm); KQ-200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS-02 型多功能高速粉碎机(上海兆申科技有限公司); SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); FA2104 型 1/10 万电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。对-香豆酸(批号 201803, 纯度 ≥98.7%)购于中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他试剂均为分析纯(天津市天力化学试剂有限公司)。

太白米栽培品 S1 ~ S8 采自陕西省太白县, S9, S10 采自陕西省眉县, 太白米野生品 S11 ~ S18 采自秦岭, S19, S20 购自西藏, 见表 1。上述样品经陕西中医药大学中药鉴定教研室胡本祥教授鉴定为百合科植物假百合 *Notholirion bulbuliferum* 的干燥小鳞茎, 标本保存于陕西中医药大学大学生药实验中心。

## 2 方法

**2.1 供试品溶液的制备** 取各太白米粉末约 0.1 g, 精密称定, 精密加入 70% 甲醇 10 mL, 超声 1 h(功率 250 W, 频率 40 kHz), 取出, 放冷后, 用 70% 甲醇补足失重, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 取续滤液进行 HPLC 分析。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对-香豆酸对照品, 加纯甲醇配制为 0.152 4 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.3 色谱条件** Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.0 mm × 200 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 310 nm; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL; 流动相甲醇(A)-0.05% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 20% ~ 25% A; 10 ~ 15 min, 25% ~ 30% A; 15 ~ 20 min, 30% ~ 40% A; 20 ~ 30 min, 40% ~ 42% A; 30 ~ 40 min, 42% ~

表 1 太白米样品信息

Table 1 Sample information of *Notholirion bulbuliferum*

编号	名称	产地	收集时间
S1	太白米(栽培)	太白县	2016-08
S2	太白米(栽培)	太白县	2016-08
S3	太白米(栽培)	太白县	2016-09
S4	太白米(栽培)	太白县	2016-09
S5	太白米(栽培)	太白县	2016-10
S6	太白米(栽培)	太白县	2016-10
S7	太白米(栽培)	太白县	2016-10
S8	太白米(栽培)	太白县	2016-10
S9	太白米(栽培)	眉县	2016-10
S10	太白米(栽培)	眉县	2016-10
S11	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S12	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S13	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S14	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S15	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S16	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S17	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S18	太白米(野生)	秦岭	2016-08
S19	太白米(野生)	西藏	2017-07
S20	太白米(野生)	西藏	2017-07

45% A; 40 ~ 50 min, 45% ~ 50% A)。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 空白实验** 精密吸取甲醇溶液 10 μL 作为空白溶液,注入高效液相色谱仪,按 2.3 项下色谱条件进行测定。结果表明空白溶液对测定结果无干扰。

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,检测指纹图谱,以 14 号峰为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积的精密度,二者 RSD 分别为 1.6%, 1.1%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液 10 μL,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,按 2.3 项下色谱条件检测指纹图谱,以色谱峰相对保留时间和相对峰面积计算,考察样品的稳定性,二者 RSD 分别为 1.0%, 1.3%,符合指纹图谱要求,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

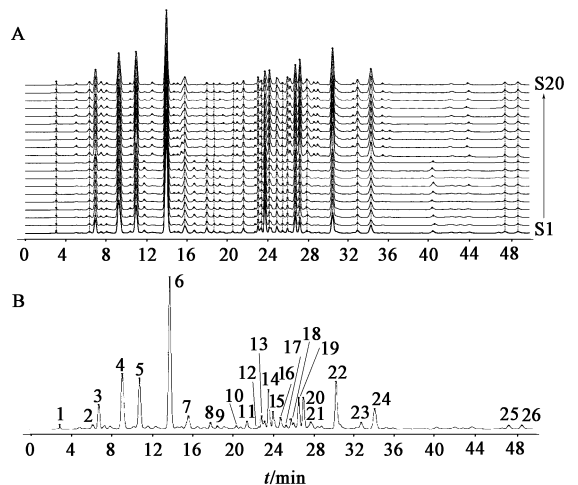
**2.4.4 重复性试验** 精密称取同一样品 6 份,按 2.1 项下方法制备成供试品溶液,2.3 项下色谱条件检测指纹图谱,以色谱峰相对保留时间和相对峰面积计算,二者 RSD 分别为 1.0%, 1.4%,表明该方法

重复性良好。

**2.5 模式识别分析** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)”分析太白米 HPLC 指纹图谱数据,确定共有峰,生成对照图谱并进行相似度计算。以共有峰峰面积为变量,将数据导入 SIMCA-P13.0 软件进行 PCA, PLS-DA 和变量投影重要性图(VIP)分析,研究野生与栽培太白米质量差异,筛选导致样品间差异的化学成分。以共有峰峰面积为变量,采用 SPSS 19.0 软件进行 HCA 分析。

### 3 结果

**3.1 指纹图谱的构建及共有峰的确定** 取 20 批次不同来源太白米进行 HPLC 测定与分析,记录色谱图,导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)”,叠加图及共有模式指纹图谱见图 1。



A. 叠加; B. 共有模式; 14. 对香豆酸

图 1 20 批太白米样品的指纹图谱叠加

Fig. 1 Fingerprint overlay of 20 batches of *Notholirion bulbuliferum*

20 批太白米共得到 26 个共有峰,以分离度良好、实验室前期确认的太白米药材中含量较高的化合物对-香豆酸为参照峰(14 号峰),计算相对保留时间及相对峰面积。

**3.2 不同来源太白米指纹图谱相似度分析** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)”,以太白米的共有模式图作为参照,计算相似度,结果见表 2。结合图 1 可知,不同来源太白米具有较高的相似度,其值均在 0.9 以上,但化学成分含量存在一定差异。

### 3.3 化学模式识别

**3.3.1 无监督模式识别-PCA** 以 26 个共有峰峰面积为变量,采用 SIMCA-P13.0 统计软件对收集的 20 批太白米样品进行主成分分析,前 2 个主成分的

表 2 不同来源太白米 HPLC 指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of HPLC chromatogram of 20 batches of *Notholirion bulbiferum* samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.981	S11	0.923
S2	0.983	S12	0.959
S3	0.985	S13	0.928
S4	0.980	S14	0.950
S5	0.982	S15	0.954
S6	0.982	S16	0.929
S7	0.987	S17	0.940
S8	0.977	S18	0.953
S9	0.986	S19	0.918
S10	0.985	S20	0.933

特征值均 > 1, 说明前 2 个因子在反映产地与 26 个共有成分的相互关系中起主导作用, 主成分 PC1 贡献率为 68.58%, PC2 贡献率为 20.22%, 前 2 个主成分的累计贡献率为 88.80%, 能够客观地反映不同产地与 26 个共有成分之间的内在联系, 故选取前 2 个主成分进行分析, 各样品的主成分的得分图见图 2。图 2 表明, 栽培太白米和野生太白米分别位于图的两侧, 二者能够完全区分开来。进一步分析可知, 栽培品中, 来自于眉县的 S9, S10 可和来自于太白县的 S1 ~ S8 区分开来; 野生品中, 来自于西藏的 S19, S20 可和来自于秦岭的 S11 ~ S18 区分开来。

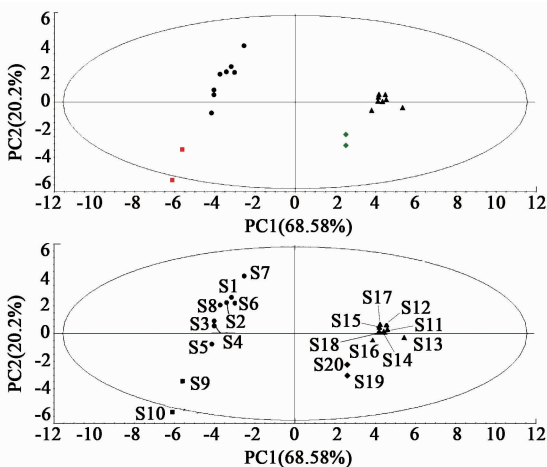


图 2 PCA 得分  
Fig. 2 Score plot of PCA

3.3.2 无监督模式识别-HCA 将 20 批太白米的 26 个共有色谱峰的峰面积数据导入 SPSS 19.0 统计软件, 采用中间数平方欧式距离进行聚类分析。结果表明, 20 批药材样品可以分成 I 和 II 两类, S1 ~ S10 号样品为 I 类, S11 ~ S20 的样品为 II 类; I 类被

分成 I a 和 I b 两类, 其中 S1 ~ S8 号样品为 a 类, S9, S10 号样品为 b 类。聚类分析得到的样品间相关性与 PCA 结果, 见图 3。

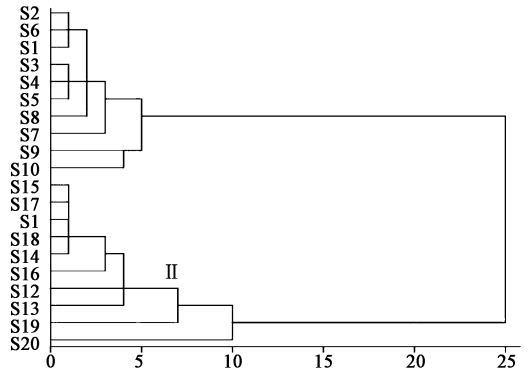


图 3 20 批太白米聚类分析  
Fig. 3 Score plot of PCA of 20 batches of *Notholirion bulbiferum* samples

3.3.3 有监督模式识别-PLS-DA PLS-DA 是基于 PLS 上的一种监督模式识别方法。它的主要原理是先利用 PLS 提取样本的主成分, 然后将主成分作为新变量建立训练样本自变量和分类变量之间的回归模型, 进行判别分析。结果表明, PLS-DA 得分图中, 模型的主成分回归系数  $Q^2 Y = 0.5912 > 0.5$ , 说明模型的预测能力较强, 反映两组样本具明确分离的趋势;  $R^2 Y = 0.6378$ , 说明模型对因变量变异贡献的百分比为 63.78%, 即自变量(共有峰)的变化能够解释导致不同分类(因变量)发生的 63.78%, 模型的拟合度较好。见图 4。

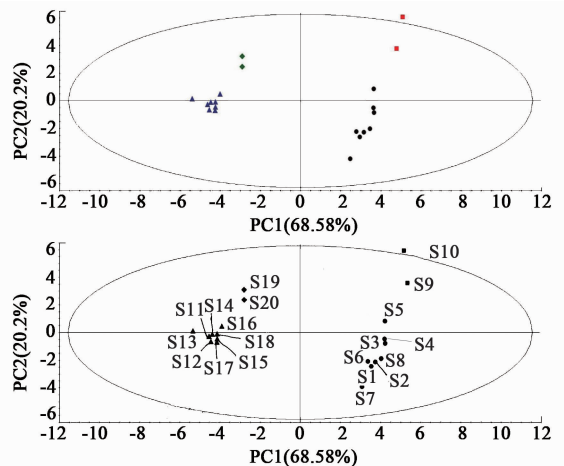


图 4 PLS-DA 得分  
Fig. 4 Score plot of PLS-DA

提取 PLS-DA 模型中 26 个变量的 VIP 值图, 对 26 个共有峰峰面积 VIP 值大小进行排列, 选择 VIP 值大于 1 的共有峰, 结果显示 4 号峰, 11 号峰, 6 号

峰,17 号峰,14 号峰(对香豆酸),8 号峰,19 号峰和 9 号峰 VIP 值均大于 1,说明以上化学成分对野生和栽培太白米样品分类具有显著的影响,这些成分是影响野生与栽培太白米成分差异的主要标志性成分。其余色谱峰 VIP 值小于 1,对样品的区分影响较小。见图 5。

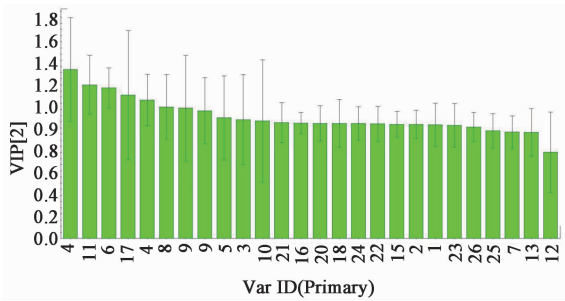


图 5 差异标志物的 VIP ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Fig. 5 Variable important plot of PLS-DA ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

#### 4 讨论

太白米为我国珍贵的民间草药,经济价值极高,目前对其质量控制是基于本课题组前期制定的陕西省药材标准,关于太白米的指纹图谱也只有本课题组做过初步的探讨<sup>[14]</sup>。本文在液相条件、流动相、色谱柱等进一步优化的基础上,建立了栽培与野生太白米的 HPLC 指纹图谱,且方法稳定、简便、可靠。以太白米的共有模式图参照,计算相似度,结果显示栽培品与参照图谱的相似度高于 0.97,野生品相对于栽培品来说相似度略微降低,但也在 0.92 以上,表明太白米化学成分相似度高,不同来源种质间变异较小。

化学模式识别与指纹图谱相结合能够很好的评价野生与栽培品药材,如甘草<sup>[19]</sup>、穿龙薯蓣<sup>[20]</sup>和山楂叶<sup>[21]</sup>等。本文基于太白米 HPLC 指纹图谱,通过模式识别分析,建立了栽培与野生太白米 PCA, PLS-DA 和聚类分析的分类模型,结果表明,野生与栽培太白米可分为明显的两类,说明由于引种驯化、栽培管理、环境等因素导致太白米中次生代谢成分发生了变化,对香豆酸等 8 个成分是导致差异性的主要组分。综上,本文建立的太白米 HPLC 指纹图谱结合模式识别能对不同来源太白米进行区分和评价,用于太白米药材的质量评价和控制。

#### [参考文献]

[1] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省药材标准 [M]. 西安:陕西科学技术出版社,2016:135-136.  
[2] 邱芳龙,陈昌祥,畅行若,等. 太白米的甾体生物碱甙(一)[J]. 云南植物研究,1982,4(4):419-423.

[3] 屠鹏飞,吴卫中,郑俊华. 太白米的酚酸类成分研究[J]. 药学报,1999,34(1):40-43.  
[4] 邵囡囡,杨吉安,刘建军,等. 秦岭太白米中黄酮类成分的研究[J]. 西北林学院学报,2011,26(5):166-169.  
[5] 李朋朋. 太白米及其提取物治疗慢性胃炎物质基础及机制研究[D]. 西安:陕西中医学院,2014.  
[6] 周乐,董旭俊,赵海双,等. 太白米中的甾体生物碱甙[J]. 西北植物学报,2005,25(6):1158-1162.  
[7] 车乐,曹博,白成科,等. 基于 MaxEnt 和 ArcGIS 对太白米的潜在分布预测及适宜性评价[J]. 生态学杂志,2014,33(6):1623-1628.  
[8] 宋利伟,张存旭,康永祥,等. 太白米离体愈伤组织诱导及植株再生[J]. 东北林业大学学报,2014,42(9):107-110,115.  
[9] 邵囡囡. 秦岭太白米组织培养快繁技术及总黄酮成分的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.  
[10] 赵银萍,高志强,董忠民. 濒危中药材太白米组织培养及总黄酮含量测定[J]. 西北植物学报,2010,30(1):175-179.  
[11] 胡本祥,王继涛,张琳,等. 太白米濒危因素研究之一—太白米植物的生活习性及其资源分布调查研究[J]. 陕西中医学院学报,2007,30(6):49-52.  
[12] 胡本祥,张琳. 太白米的研究进展[J]. 中草药,2006,37(2):312-314.  
[13] 胡本祥. 太白米栽培技术研究[J]. 中草药,2004,35(1):100-101.  
[14] 谢丽. 太白米的质量标准及指纹图谱研究[D]. 西安:陕西中医学院,2012.  
[15] 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.  
[16] 皮胜玲,胡玉珍,彭曦,等. 野生与栽培夏枯草 HPLC 指纹图谱研究及模式识别分析[J]. 中国药学杂志,2017,52(5):367-371.  
[17] 肖榕,林艳,雷思敏,等. UPLC 指纹图谱结合模式识别分析不同产地生/制何首乌[J]. 中国中药杂志,2017,42(12):2305-2310.  
[18] 刘静,苏建春,甘林建,等. 鸡血藤 UPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):87-90.  
[19] 尹海波,康廷国,张囡,等. 穿龙薯蓣 HPLC 指纹图谱及模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):145-148.  
[20] 杨天鸣,张璐,付海燕,等. 不同产地甘草的近红外指纹图谱模式识别鉴别方法[J]. 亚太传统医药,2015,11(14):11-14.  
[21] 胡玉珍,周亚敏,熊苏慧,等. UPLC 结合化学计量学方法的野生与市售山楂叶指纹图谱研究[J]. 中药材,2017,40(6):1355-1359.

[责任编辑 顾雪竹]