

# 不同产地桔梗 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

张 迟<sup>1</sup>, 黄戎婕<sup>1</sup>, 曾金祥<sup>1\*</sup>, 钟国跃<sup>1</sup>, 韩风雨<sup>2</sup>, 于秀玲<sup>2</sup>

<sup>1</sup>江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004; <sup>2</sup>内蒙古天奇中蒙制药股份有限公司, 赤峰 024000

**摘要:**为建立桔梗 HPLC 指纹图谱并对其质量控制方法进行探讨。研究采用 YMC Hydrosphere C<sub>18</sub> 分析色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm), 以水和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm。建立不同产地 15 批桔梗药材 HPLC 指纹图谱。采用相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法对不同产地桔梗质量及其控制方法进行分析 and 评价。建立的桔梗 HPLC 指纹图谱共标定 21 个共有峰, 并通过对照品指认其中 7 个成分; 不同产地桔梗相似度在 0.927 ~ 0.991 之间; 聚类分析和主成分分析结果都将 15 批桔梗分为 3 类, 利用正交偏最小二乘判别分析筛选出造成桔梗差异的 13 个色谱峰。本研究建立的 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的方法简便准确, 能够为桔梗的质量控制和品质评价提供依据。

**关键词:**桔梗; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量控制

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)8-1269-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.8.001

## Study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Platycodins Radix from different habitats

ZHANG Chi<sup>1</sup>, HUANG Rong-jie<sup>1</sup>, ZENG Jin-xiang<sup>1\*</sup>, ZHONG Guo-yue<sup>1</sup>, HAN Feng-yu<sup>2</sup>, YU Xiu-ling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Chinese Medicine Resource and National Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

<sup>2</sup>Inner Mongolia Tianqi Han & Mongolia Pharmaceutical Co., Ltd., Chifeng 024000, China

**Abstract:** The HPLC fingerprints and chemical pattern recognition were studied to provide new method for quality control and evaluation of Platycodins Radix. The HPLC was selected to establish the fingerprints of 15 batches Platycodins Radix from different habitats. The chromatographic separation was performed on an YMC hydrosphere C<sub>18</sub> analytical column (250 × 4.6 mm, 5 μm), a mixture of water and acetonitrile solution was selected as mobile phase for gradient elution, and the detection wavelength was set as 210 nm. The chemical pattern recognition of similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to analyze and evaluate the quality of Platycodins Radix. The results showed that the fingerprints of 15 batches of Platycodins Radix from different habitats were successfully established, which possessed 21 common peaks and 7 common peaks could be identified using standards. The results about the chemical pattern recognition showed that the similarities of those fingerprints were between 0.927 and 0.991, and 15 batches of Platycodins Radix could be divided into 3 groups by both cluster analysis and principal component analysis. Furthermore, the quality difference of those Platycodins Radix was mainly caused by 13 common peaks according to the results of orthogonal partial least squares discriminant analysis. In a word, the fingerprints combined with chemical pattern recognition provides a simple and accurate method for the quality control and evaluation of Platycodins Radix.

**Key words:** Platycodins Radix; fingerprint; chemical pattern recognition; quality control

桔梗为重要的药食两用大宗药材, 来源于桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 临床常用于咳嗽痰多、胸闷不畅、咽痛音哑、肺痈吐脓等<sup>[1]</sup>。该种分布广泛, 在南至我国的两广、西至川西, 东至日本、朝鲜, 北至西伯利亚地区

收稿日期: 2020-04-26 接受日期: 2020-07-09

基金项目: 国家自然科学基金(81860685); 国家中医药管理局中药行业科研专项(ZYBZH-Y-NMG-30); 江西中医药大学双一流学科建设项目(JXSYLXK-ZHYA0033)

\* 通信作者 Tel: 86-791-87119065; E-mail: zjx@jxutem.edu.cn

均有分布。桔梗在我国东北、华东、华中、西南等地多有栽培,现药材也主要来自于栽培生产,以内蒙古赤峰市的种植面积最大,常年种植面积约 5~7 万亩,其产量约占全国总产量的 50%~60%。既往研究表明,桔梗中含有皂苷、黄酮、酚酸类等多类成分,其中皂苷类成分系桔梗镇咳祛痰的主要活性成分,目前已从桔梗中分离得到 70 余种皂苷类化合物<sup>[2-6]</sup>。

因此,基于桔梗主要皂苷类成分构建科学合理的桔梗药材质量控制方法对于其临床应用及新药开发极为必要。既往研究多数侧重桔梗化学成分的分 离以及测定其中极少数几个皂苷类成分<sup>[7-11]</sup>,部分研究或以配备蒸发光散射检测器的高效液相色谱构建指纹图谱<sup>[12-14]</sup>,但未见以高效液相色谱联合紫外-可见光检测器构建指纹图谱并结合化学模式识别对桔梗质量控制和品质评价进行探讨的报道。因此,本研究建立桔梗的 HPLC 指纹图谱,并首次结合相似度评价、聚类分析、主成分分析以及正交偏最小二乘判别分析等多种模式识别方法对桔梗质量控制和品质评价进行探讨。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪,配备 PDA 紫外-可见光检测器(日本岛津公司);KQ-5200DB 型超声清洗机(昆山市超声波仪器公司);CP-214 电子天平(上海奥豪斯有限公司);R-210 旋转蒸发器(瑞士步琪公司);DZKW-S-6 型电热恒温不锈钢水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);DHG-111 型电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

甲醇、浓氨水、正丁醇(分析纯,西陇化工股份有限公司);乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);超纯水(实验室自制);对照品桔梗皂苷 D3(批号: P23N8F48914)、去芹糖桔梗皂苷 D3(批号: P15N8F48398)、桔梗皂苷 D2(批号: P15N8F48273)、桔梗皂苷 D(批号: Z08J9L52294)购自于上海源叶生物科技有限公司;去芹糖桔梗皂苷 D(批号: PRF8032746)购自于江西本草天工科技有限公司;以上对照品纯度均 $\geq 98\%$ ;远志皂苷 D2、远志皂苷 D 为实验室自制,纯度均 $\geq 95\%$ 。部分桔梗皂苷结构信息见表 1 和图 1。

表 1 桔梗皂苷结构信息

Table 1 Structural information of platycodon saponins

化合物名称 Compound	分子式 Formula	母核类型 Parent nucleus	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
桔梗皂苷 D Platycodin D	C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> O <sub>28</sub>	A	Glc	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl <sup>3</sup> -Api
桔梗皂苷 D2 Platycodin D2	C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> O <sub>33</sub>	A	Lam	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl <sup>3</sup> -Api
桔梗皂苷 D3 Platycodin D3	C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> O <sub>33</sub>	A	Gen	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl <sup>3</sup> -Api
去芹糖桔梗皂苷 D3 Deapio-platycodin D3	C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	A	Gen	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl
去芹糖桔梗皂苷 D Deapio-platycodin D	C <sub>52</sub> H <sub>84</sub> O <sub>24</sub>	A	Glc	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl
远志皂苷 D2 Polygalacin D2	C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> O <sub>32</sub>	B	Lam	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl <sup>3</sup> -Api
远志皂苷 D Polygalacin D	C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> O <sub>27</sub>	B	Glc	-Ara <sup>2</sup> -Rha <sup>4</sup> -Xyl <sup>3</sup> -Api

注:Glc: $\beta$ -D-葡萄糖;Ara: $\alpha$ -L-阿拉伯糖;Rha: $\alpha$ -L-鼠李糖;Xyl: $\beta$ -L-木糖;Api: $\beta$ -D-芹糖;Lam: $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-葡萄糖;Gen: $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-葡萄糖。

Note:Glc: $\beta$ -D-Glucose;Ara: $\alpha$ -L-Arabinose;Rha: $\alpha$ -L-Rhamnose;Xyl: $\beta$ -L-Xylose;Api: $\beta$ -D-Apiose;Lam: $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-Glucose;Gen: $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-Glucose.

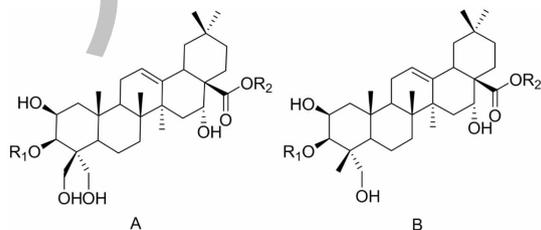


图 1 母核类型

Fig. 1 Parent nucleus

### 1.3 药材

桔梗药材共 15 批,采集或收集于内蒙古、山东、河北、陕西、吉林、重庆、甘肃等 7 省市(其中 3 批为野生样品),经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根。内蒙古赤峰产区样品因气候条件原因,药材采挖后遵循产地初加工工艺,摊

开任其自然晾干(耗时较长);其它产地样品通常在 采收后直接晒干。样品信息见表 2。

表 2 桔梗样品信息

Table 2 Information of Platycodinis Radix

编号 No.	样品名 Name	产地 Origin	样品干燥方式 Drying method	批号 Batch No.
S1	赤峰-1	内蒙古赤峰市喀喇沁旗牛家营子镇罗营子村	低温存放晾干	20171201
S2	赤峰-2	内蒙古赤峰市喀喇沁旗牛家营子镇罗营子村	低温存放晾干	20171115
S3	赤峰-3	内蒙古赤峰市喀喇沁旗牛家营子镇罗营子村	低温存放晾干	20171210
S4	赤峰-4	内蒙古赤峰市喀喇沁旗牛家营子镇于营子村	低温存放晾干	20170715
S5	赤峰-5	内蒙古赤峰市松山区城子乡喇嘛扎子村	低温存放晾干	20171113
S6	通辽	内蒙古通辽市罕山(野生)	低温存放晾干	20171101
S7	甘肃	甘肃省陇南市成县鐔河乡石榴村	采收后晒干	20171101
S8	吉林	吉林省延边朝鲜族自治州安图县松江镇	采收后晒干	20171101
S9	陕西-1	陕西省商洛市商州区张村镇	采收后晒干	20171011
S10	陕西-2	陕西省商洛市商州区杨峪河镇	采收后晒干	20180110
S11	山东-1	山东省淄博市博山区池上镇东池村	采收后晒干	20171205
S12	山东-2	山东省淄博市沂源县南鲁山镇	采收后晒干	20171208
S13	山东-3	山东省威海市鹿道村枣山(野生)	采收后晒干	20171101
S14	河北	河北省保定市安国市明官店乡明官店村	采收后晒干	20170718
S15	重庆	重庆市南川区(野生)	采收后晒干	20170515

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件

YMC Hydrosphere C<sub>18</sub> 分析色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0 ~ 40 min, 15% ~ 25% B; 40 ~ 80 min, 25% ~ 30% B, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 210 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

### 2.2 溶液配制

#### 2.2.1 供试品溶液制备

参照中国药典方法<sup>[1]</sup> 略微改动, 取桔梗粉末(过二号筛)约 2 g, 精密称定, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置水浴上蒸干, 残渣加水 20 mL, 微热使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液 50 mL 洗涤, 弃去氨液, 再用正丁醇饱和的水 50 mL 洗涤, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 定容至 5 mL。分析前过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

#### 2.2.2 对照品溶液制备

精密称定桔梗皂苷 D3、去芹糖桔梗皂苷 D3、去

芹糖桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D2、桔梗皂苷 D、远志皂苷 D2、远志皂苷 D 对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.25、0.34、0.46、0.97、3.19、0.65、0.30 mg/mL 的混合溶液, 备用。

### 2.3 指纹图谱方法学考察

#### 2.3.1 精密度实验

取 S1 样品, 按“2.2.1”项下处理供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以 12 号色谱峰为参照峰, 计算色谱图中各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.13%, 相对峰面积的 RSD < 1.61%。结果说明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的要求。

#### 2.3.2 稳定性试验

取 S1 样品, 按“2.2.1”项下方法处理供试品溶液, 以“2.1”项下色谱条件分别在 0、4、8、12、16、24、48 h 进样, 记录色谱图。以 12 号色谱峰为参照峰, 计算色谱图中各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.10%, 相对峰面积的 RSD < 2.38%。结果表明供试品在 48 h 内稳定性良好。

#### 2.3.3 重复性试验

取 S1 样品, 按“2.2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样, 记录色谱

图。以 12 号色谱峰为参照峰,计算色谱图中各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.87%, 相对峰面积的 RSD < 2.73%。结果表明供试品制备方法重复性良好。

## 2.4 桔梗药材 HPLC 指纹图谱及技术参数

### 2.4.1 指纹图谱的建立

取 15 批桔梗药材,按“2.2.1”项下方法制备供

试品,在“2.1”项下的色谱条件进行分析,记录色谱图,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012)”对不同产地 15 批次桔梗药材的指纹图谱进行数据分析,设置 S1 为参照图谱,采用中位数法并进行自动匹配,生成 15 批桔梗药材的 HPLC 指纹图谱及共有模式对照图谱(见图 2 和图 3)。

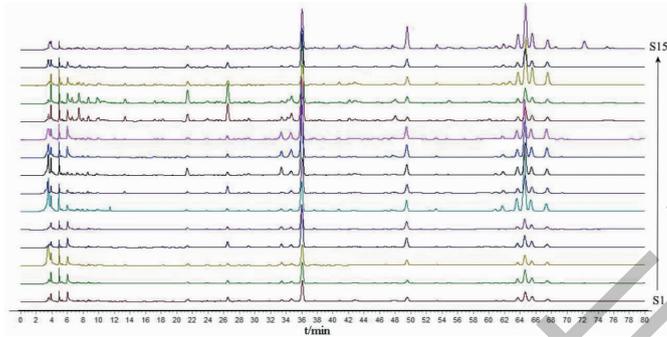


图 2 15 批桔梗药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 15 batches of Platycodins Radix

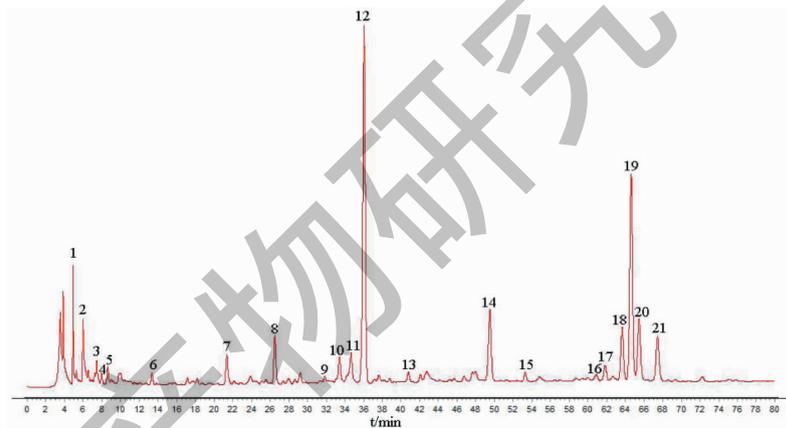


图 3 桔梗药材的共有模式对照图谱

Fig. 3 Reference fingerprint of Platycodins Radix

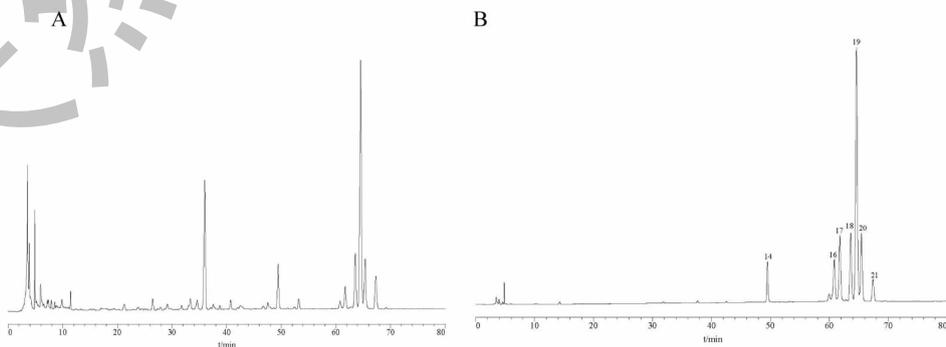


图 4 桔梗药材样品(A)和混合对照品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of Platycodins Radix(A) and mixed standards(B)

注:14:桔梗皂苷 D3;16:去芹糖桔梗皂苷 D3;17:去芹糖桔梗皂苷 D;18:桔梗皂苷 D2;19:桔梗皂苷 D;20:远志皂苷 D2;21:远志皂苷 D。

Note:14:Platycodin D3;16:Deapio-platycodin D3;17:Deapio-platycodin D;18:Platycodin D2;19:Platycodin D;20:Polygalacin D2;21:Polygalacin D.

### 2.4.2 特征峰的标定

根据保留时间标定特征指纹峰,对 15 批桔梗 HPLC 指纹图谱测定结果进行比较分析,发现 21 个特征峰是 15 批桔梗共有的,因此确定这 21 个峰为特征指纹峰,共有峰的峰面积总和大于总峰面积的 90%。通过对照品比对,确定 14 号峰为桔梗皂苷 D3,16 号峰为去芹糖桔梗皂苷 D3,17 号峰为去芹糖

桔梗皂苷 D,18 号峰为桔梗皂苷 D2,19 号峰为桔梗皂苷 D,20 号峰为远志皂苷 D2,21 号峰为远志皂苷 D。桔梗药材样品和混合对照品的 HPLC 图谱见图 4。以峰面积较大、峰形较好且保留时间居中的 12 号峰作为参照峰,计算其他各共有峰和参照峰的峰面积比值即相对峰面积,结果见表 3。

表 3 15 批桔梗指纹图谱中共有特征峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peak of fingerprint of 15 batches of Platycodins Radix

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Peak 1	0.164	0.223	0.308	0.063	0.109	0.250	0.095	0.093	0.074	0.082	0.079	0.079	0.230	0.078	0.067
Peak 2	0.375	0.347	0.375	0.179	0.258	0.194	0.095	0.045	0.126	0.216	0.105	0.119	0.297	0.120	0.029
Peak 3	0.046	0.072	0.070	0.027	0.036	0.073	0.034	0.021	0.014	0.007	0.103	0.104	0.117	0.051	0.016
Peak 4	0.055	0.039	0.036	0.016	0.008	0.067	0.016	0.022	0.028	0.023	0.031	0.026	0.093	0.013	0.035
Peak 5	0.062	0.055	0.052	0.030	0.038	0.058	0.039	0.034	0.023	0.026	0.045	0.068	0.070	0.023	0.038
Peak 6	0.041	0.021	0.032	0.021	0.016	0.084	0.044	0.018	0.013	0.012	0.046	0.056	0.088	0.021	0.064
Peak 7	0.144	0.080	0.100	0.059	0.082	0.061	0.059	0.096	0.029	0.028	0.081	0.187	0.181	0.076	0.100
Peak 8	0.188	0.118	0.084	0.128	0.096	0.083	0.178	0.048	0.044	0.053	0.183	0.248	0.223	0.112	0.113
Peak 9	0.024	0.024	0.032	0.020	0.026	0.056	0.025	0.007	0.011	0.011	0.013	0.020	0.051	0.015	0.044
Peak 10	0.085	0.117	0.165	0.090	0.116	0.092	0.048	0.123	0.089	0.118	0.051	0.047	0.072	0.052	0.084
Peak 11	0.163	0.120	0.112	0.091	0.106	0.099	0.097	0.078	0.141	0.136	0.111	0.132	0.102	0.082	0.118
Peak 12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Peak 13	0.027	0.039	0.025	0.016	0.018	0.059	0.022	0.018	0.019	0.023	0.031	0.046	0.182	0.021	0.124
Peak 14	0.253	0.152	0.290	0.286	0.372	0.351	0.287	0.177	0.202	0.226	0.053	0.111	0.484	0.238	0.642
Peak 15	0.023	0.030	0.029	0.016	0.025	0.072	0.022	0.014	0.017	0.019	0.009	0.009	0.131	0.031	0.132
Peak 16	0.025	0.017	0.015	0.011	0.010	0.068	0.039	0.025	0.015	0.017	0.006	0.006	0.121	0.021	0.125
Peak 17	0.030	0.028	0.028	0.017	0.021	0.194	0.084	0.057	0.047	0.057	0.010	0.009	0.156	0.055	0.159
Peak 18	0.208	0.232	0.149	0.108	0.116	0.483	0.152	0.132	0.127	0.156	0.054	0.068	0.706	0.134	0.424
Peak 19	0.540	0.756	0.682	0.342	0.525	2.178	0.585	0.549	0.616	0.755	0.179	0.255	2.586	0.557	1.285
Peak 20	0.280	0.291	0.244	0.172	0.210	0.438	0.189	0.134	0.173	0.190	0.072	0.091	0.970	0.187	0.475
Peak 21	0.117	0.151	0.191	0.090	0.131	0.296	0.180	0.106	0.171	0.208	0.058	0.068	0.742	0.161	0.307

表 4 15 批桔梗指纹图谱相似度评价

Table 4 Similarity evaluation of fingerprint of 15 batches of Platycodins Radix

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照 Reference
S1	1	0.963	0.931	0.960	0.969	0.928	0.967	0.949	0.942	0.949	0.943	0.950	0.942	0.936	0.923	0.975
S2	0.963	1	0.966	0.939	0.948	0.940	0.938	0.946	0.934	0.944	0.901	0.900	0.902	0.934	0.868	0.954
S3	0.931	0.966	1	0.915	0.935	0.964	0.916	0.922	0.902	0.916	0.858	0.858	0.880	0.887	0.851	0.927
S4	0.960	0.939	0.915	1	0.991	0.920	0.980	0.979	0.985	0.988	0.933	0.931	0.883	0.965	0.935	0.983
S5	0.969	0.948	0.935	0.991	1	0.926	0.978	0.973	0.974	0.980	0.928	0.928	0.897	0.956	0.938	0.981
S6	0.928	0.940	0.964	0.920	0.926	1	0.932	0.941	0.921	0.932	0.883	0.875	0.885	0.889	0.869	0.940

续表 4(Continued Tab. 4)

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照 Reference
S7	0.967	0.938	0.916	0.980	0.978	0.932	1	0.979	0.974	0.976	0.961	0.958	0.919	0.961	0.947	0.991
S8	0.949	0.946	0.922	0.979	0.973	0.941	0.979	1	0.991	0.990	0.946	0.938	0.893	0.964	0.926	0.988
S9	0.942	0.934	0.902	0.985	0.974	0.921	0.974	0.991	1	0.998	0.942	0.927	0.872	0.968	0.923	0.984
S10	0.949	0.944	0.916	0.988	0.980	0.932	0.976	0.990	0.998	1	0.935	0.922	0.875	0.966	0.922	0.984
S11	0.943	0.901	0.858	0.933	0.928	0.883	0.961	0.946	0.942	0.935	1	0.984	0.925	0.938	0.927	0.974
S12	0.950	0.900	0.858	0.931	0.928	0.875	0.958	0.938	0.927	0.922	0.984	1	0.933	0.930	0.924	0.970
S13	0.942	0.902	0.880	0.883	0.897	0.885	0.919	0.893	0.872	0.875	0.925	0.933	1	0.879	0.914	0.932
S14	0.936	0.934	0.887	0.965	0.956	0.889	0.961	0.964	0.968	0.966	0.938	0.930	0.879	1	0.918	0.971
S15	0.923	0.868	0.851	0.935	0.938	0.869	0.947	0.926	0.923	0.922	0.927	0.924	0.914	0.918	1	0.951
对照 Reference	0.975	0.954	0.927	0.983	0.981	0.940	0.991	0.988	0.984	0.984	0.974	0.970	0.932	0.971	0.951	1

### 2.4.3 相似度评价

将不同产地 15 批次桔梗药材的指纹图谱导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012)”对相似度进行评价,结果见表 4。15 批桔梗与对照指纹图谱相比较相似度都在 0.9 以上,介于 0.927 ~ 0.991 之间,表明各产地间的桔梗有较高的一致性。

### 2.5 聚类分析

采用 SPSS 25 统计软件对桔梗进行聚类分析,将 15 批桔梗的相对共有峰峰面积导入到 SPSS 25

统计软件,以组间连接法及皮尔逊相关性作为分类依据获得分析结果(见图 5)。当分类距离为 20 时,15 批桔梗分为两类,S6、S13、S15 三个野生样品聚为一类,其余各地的栽培品种聚为一类,这提示野生生长的桔梗和人工种植的桔梗存在一定的差异。当分类距离为 15 时,15 批桔梗样品分为三类,即 3 个野生样品为一类,S11 和 S12 聚为一类,其余产地样品聚为一类。

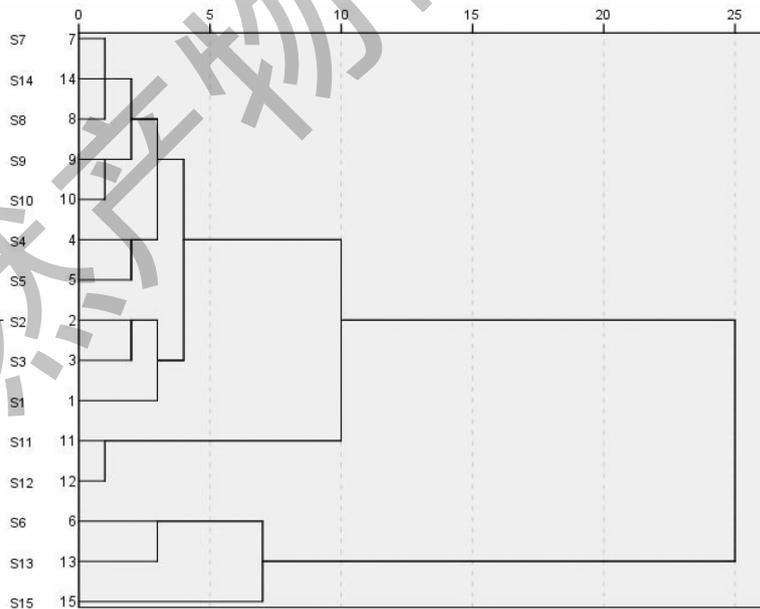


图 5 聚类分析结果

Fig. 5 Results of hierarchical cluster analysis

### 2.6 主成分分析

采用 SPSS 25 统计软件对桔梗进行主成分分

析,将 15 批桔梗药材共有峰峰面积经过 SPSS 标准化处理后,计算相关矩阵的特征值即方差贡献率,结

果见表5。以特征值大于1为提取标准,得到了4个主成分的累计方差贡献率为90.275%,能够较好的代表指纹图谱中的大部分信息,矩阵结果见表6。由结果可知,第一主成分的信息主要来源于色谱峰4、6、9、13~21;第二主成分的信息主要来源于色谱峰3~8、11和12;第三主成分的信息主要来源于色谱峰1、2、10~12;第四主成分的信息主要来源于色谱峰7、10~12、14。利用SIMCA 14.1分析软件绘制主成分分析得分图,见图6。15批桔梗被分为明

显的3类,S11和S12位于图的上方分为一类;S6、S13和S15位于图的右下方分为一类;其余样本基本位于图中央的位置分为一类,PCA结果与聚类分析基本一致,也进一步验证了聚类分析的分类结果。

## 2.7 正交偏最小二乘判别分析

正交偏最小二乘判别分析法(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)是常用来处理分类和判别问题的一种有监督的判别分析法。采用SIMCA 14.1对不同产地的15批桔梗药材

表5 特征值和方差贡献率

Table 5 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	8.547	40.699	40.699
2	6.558	31.227	71.926
3	2.466	11.742	83.668
4	1.387	6.607	90.275

表6 主成分初始因子载荷矩阵

Table 6 Principal component initial factor load matrix

No.	1	2	3	4
Peak 1	0.282	0.498	0.374	-0.565
Peak 2	-0.253	0.434	0.532	-0.303
Peak 3	0.15	0.915	-0.266	-0.159
Peak 4	0.675	0.561	0.226	-0.321
Peak 5	0.316	0.926	-0.099	0.052
Peak 6	0.603	0.688	-0.357	-0.075
Peak 7	0.278	0.792	-0.271	0.204
Peak 8	0.183	0.895	-0.337	0.115
Peak 9	0.805	0.14	-0.396	-0.101
Peak 10	0.213	0.235	0.814	0.357
Peak 11	0.313	0.722	0.435	0.308
Peak 12	0.325	0.735	0.409	0.379
Peak 13	0.884	0.163	-0.311	0.032
Peak 14	0.734	-0.403	0.072	0.507
Peak 15	0.854	-0.393	-0.235	0.087
Peak 16	0.864	-0.407	-0.179	0.15
Peak 17	0.833	-0.396	0.165	0.02
Peak 18	0.916	-0.344	0.066	-0.157
Peak 19	0.839	-0.308	0.299	-0.259
Peak 20	0.876	-0.359	0.049	-0.137
Peak 21	0.808	-0.258	0.326	-0.099

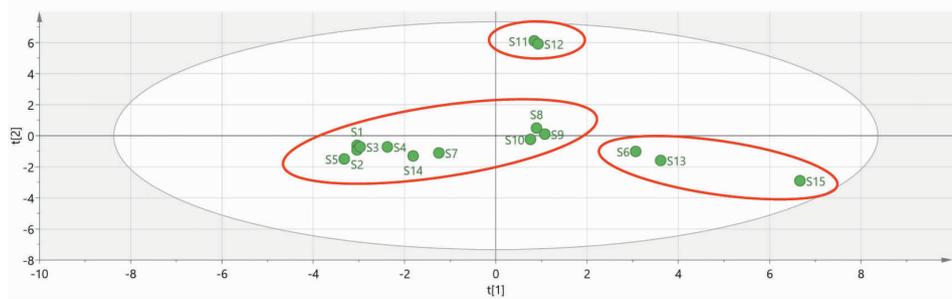


图6 主成分分析得分图

Fig. 6 PCA score figure

共有峰峰面积进行 OPLS-DA 分析, OPLS-DA 拟合的模型  $R^2X=0.811$ ,  $R^2Y=0.972$ ,  $Q^2=0.683$ , 均大于 0.5, 表示拟合的模型稳定可靠, 并具有较好的预测性, 可以作为桔梗指纹图谱的模式识别方法。15 批桔梗的 OPLS-DA 得分图见图 7。另外, 以变量投影

重要性(variable importance in projection, VIP) 大于 1 筛选对分组结果产生较大影响的色谱峰, 结果见图 8, 它们从大到小分别是色谱峰 6、5、13、9、8、3、12、18、7、15、20、11 和 4。

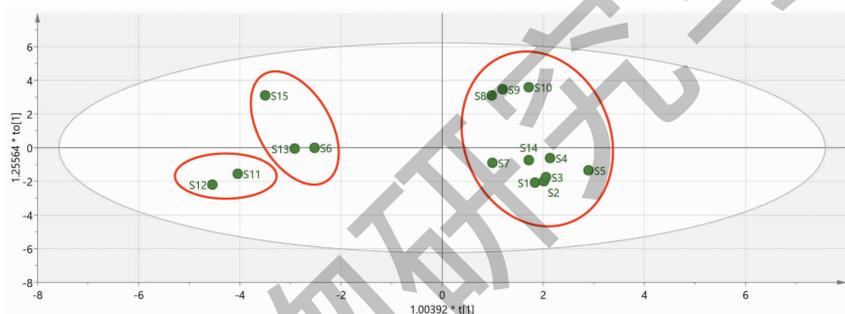


图7 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA score figure

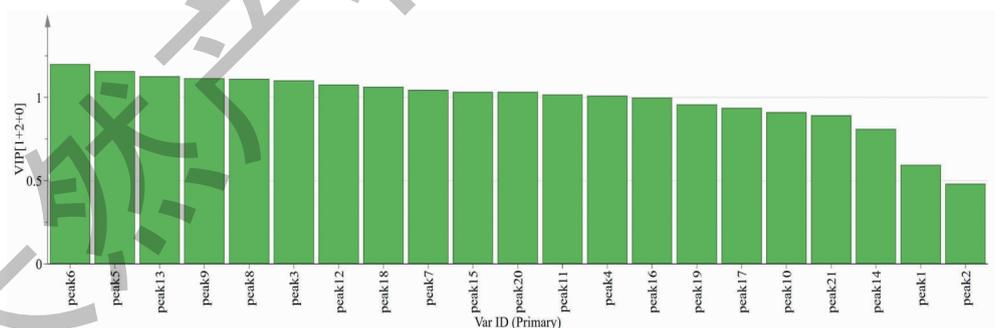


图8 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 8 OPLS-DA VIP figure

### 3 讨论

桔梗为药食两用大宗药材, 且主要药效成分为桔梗皂苷, 其品质评价与质量控制方法研究具有重要意义。本研究构建桔梗主要皂苷类成分 HPLC 指纹图谱并鉴定了其中 7 个皂苷成分, 结合相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分

析等多种化学模式识别方法, 与已有仅以含量测定<sup>[7-11]</sup>或指纹图谱<sup>[12-14]</sup>的品质评价与质量控制方法相比, 不仅可有效评价桔梗药材品质的一致性, 同时还可阐明桔梗药材品质差异形成的主要因素, 因而为桔梗的品质评价与质量控制提供了更为丰富的信息。

化学模式识别的数据来源于指纹图谱色谱峰面

积,因此指纹图谱的质量直接影响化学模式的分析结果。为构建良好的指纹图谱,本研究对样品的制备方法、检测波长、流动相组成及柱温均进行了考察优化。结果发现,参照 2015 版中国药典优化的样品制备方法,能够得到数量较多的桔梗皂苷类成分群。考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水及乙腈-磷酸水等流动相体系及不同色谱柱温与检测波长条件,发现以乙腈-水作为流动相,在 35 °C 时选用 210nm 检测波长能够获得基线平稳且色谱峰分离度良好、总体质量较高的指纹图谱。

由结果可知,15 批桔梗指纹图谱相似度在 0.927~0.991 之间,表明各产地间的栽培及野生桔梗在品质上均有较高的相似性。而聚类分析和主成分分析可进一步将 15 批桔梗样品分成不同类别,说明本研究构建的方法不仅可评价桔梗药材品质的一致性,还可评价桔梗药材的差异性。OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法,常用于判别分析样本的差异性。由实验结果可知 6、9、13、18 和 20 号等色谱峰对不同产地桔梗的品质差异具有较大影响。在本研究中聚类分析与主成分分析将野生样品与栽培品种分别聚类,说明野生样品与栽培样品在成分分布上存在一定差异。根据 OPLS-DA 分析结果考察各样品相对峰面积可知,3 个野生样品指纹图谱 6 号色谱峰相对峰面积介于 0.064%~0.088%,高于栽培品种 0.012%~0.056%;13 号色谱峰的相对峰面积介于 0.059%~0.182%,高于栽培品种的 0.018%~0.046%;9 号色谱峰相对峰面积介于 0.044%~0.056%,高于栽培品种 0.011%~0.032%;而 15 号、18 号和 20 号等色谱峰也表现出相同的趋势。因此,这些成分色谱峰峰面积的微小差异可能是导致野生样品与栽培品种聚类不同的主要原因。

总之,本研究采用指纹图谱结合化学模式识别技术对全国不同产地的桔梗样品质量进行探讨与分析,筛选出造成不同产地桔梗差异的标志性成分,为桔梗的质量控制和后续开发提供了科学参考以及实验依据。

#### 参考文献

- 1 Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:277.

- 2 Xie XX, Zhang C, Zeng JX, et al. Advances in the study of chemical constituents and pharmacological activities of *Platycodins Radix* [J]. *Tradit Chin Med J* (中医药通报), 2018, 17:66-72.
- 3 Mu LH, Liu P, Zhang J. Review on hydrolysis biotransformation studies of triterpenoid saponins [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:156-163.
- 4 Zhang L, Wang Y, Yang D, et al. *Platycodon grandiflorus*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164:147-161.
- 5 Lee JW, Ji SH, Kim GS, et al. Global profiling of various metabolites in *Platycodon grandiflorum* by UPLC-QTOF/MS [J], *Int J Mol Sci*, 2015, 16:26786-26796.
- 6 Lee JH, Oh EK, Cho HD, et al. Crude saponins from *Platycodon grandiflorum* induce apoptotic cell death in RC-58T/h/SA#4 prostate cancer cells through the activation of caspase cascades and apoptosis-inducing factor [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29:1421-1428.
- 7 Tan LL, Hou XM, Hu ZH. Determination of platycodin in *Platycodins Radix* from different habitats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46:1682-1684.
- 8 Fang XX, Huang BT, Zeng JX, et al. Content difference of total saponins and platycodin-D in *Platycodonis Radix* from different origin [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2016, 22:78-81.
- 9 Li W, Wang Z, Liu Z, et al. Simultaneous determination of deapio-platycodin D and platycodin D in *Platycodins Radix* by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:1823-1825.
- 10 Xia Q, Dong TX, Zhan HQ, et al. HPLC-ELSD determination of platycodin E in *Platycodins Radix* of different source [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26:637-639.
- 11 Ye J, Xiao MT, Tang XC, et al. HPLC-ELSD for determining the content of three platycodins in *Radix Platycodins* [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci* (西安交通大学学报:医学版), 2010, 31:640-642.
- 12 Li WT, Zhu M, Ma LK, et al. Fingerprint analysis of *Platycodonis Radix* by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17:50-53.
- 13 Zeng JK, Guo Q. Comparison of traits, root extract, platycodin D content and HPLC fingerprint of *Platycodonis Radix* from different habitats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23:62-70.
- 14 Li XF, Du YF, Xie XN, et al. HPLC fingerprints of *Platycodon grandiflorum* from different habitats and the determination of platycodin-D [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 24:529-532.