

· 资源与鉴定 ·

## 川产几种葛根类药材资源品种的 UPLC 指纹图谱

黄再强, 陈玲, 张燕飞, 胡明勋, 马逾英\*  
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:研究并建立四川几种葛根类药材的超高效液相(UPLC)指纹图谱,为其药材鉴别和质量控制提供依据。方法:采用超高效液相色谱-二极管阵列(UPLC-DAD)测定方法,Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 5 mm, 1.8 μm),乙腈-0.1%乙酸水溶液作为流动相,柱温 30 °C,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 250 nm,进样量 0.5 μL;进行相似度分析和聚类分析。结果:建立了野葛、甘葛、峨眉葛的 UPLC 指纹图谱,分别确定了 29, 18, 16 个峰,并通过比较对照品与色谱峰的保留时间,指认了野葛 7 个峰,甘葛和峨眉葛 6 个峰;甘葛和峨眉葛与野葛主要差异为野葛色谱中 2, 13, 14, 16, 23, 25, 26, 29 号峰,甘葛和峨眉葛中无出峰;峨眉葛与甘葛的主要差异为甘葛色谱中 6 和 14 号峰,峨眉葛中无出峰;聚类分析得到的样品之间的相关性,与相似度分析较一致。结论:UPLC 指纹图谱技术快速准确,结果可靠,可作为此类药材指纹图谱研究的可靠手段。

**[关键词]** 超高效液相色谱; 指纹图谱; 野葛; 甘葛; 峨眉葛

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0041-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070041

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1130.026.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-07 11:30

### UPLC Fingerprint on Several Resource Varieties of *Pueraria*

HUANG Zai-qiang, CHEN Ling, ZHANG Yan-fei, HU Ming-xun, MA Yu-ying\*

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To design and establish UPLC fingerprint on several varieties of *Pueraria* from Sichuan, and provide basis for its medicinal materials identification and quality control. **Method:** The UPLC fingerprint was performed on Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 mm × 5 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-0.1% acetic acid aqueous solution as mobile phase; the column temperature was 30 °C; the flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> and injection volume was 0.5 μL; the detection wavelength was set at 250 nm. In addition, similarity analysis and cluster analysis were conducted. **Result:** The UPLC fingerprint of *P. lobata*, *P. thomsonii* and *P. omeiensis* were established, and respectively confirmed 29, 18 and 16 peaks. Seven peaks in *P. lobata* and six peaks in *P. thomsonii* and *P. omeiensis* were identified by comparing the retention time of reference substance and chromatographic peak. The main differences between three varieties were peaks 2, 13, 14, 16, 23, 25, 26 and 29, which were not detected in *P. thomsonii* and *P. omeiensis*; the main differences between *P. thomsonii* and *P. omeiensis* were peaks 6 and 14, which were not detected in *P. omeiensis*. The correlation results obtained in clustering analysis were close to similarity analysis results. **Conclusion:** UPLC fingerprint technology is fast and its result is reliable and accurate, so it can be used as a reliable method for study on this kind of medicine fingerprint.

**[Key words]** UPLC; fingerprint; *Pueraria lobata*; *Pueraria thomsonii*; *Pueraria omeiensis*

**[收稿日期]** 20160904(006)

**[基金项目]** 四川省科技计划项目(2014SZ0131)

**[第一作者]** 黄再强, 硕士, 从事中药品种、质量与资源开发研究, Tel: 18380186079, E-mail: 1164375439@qq.com

**[通讯作者]** \* 马逾英, 教授, 从事中药品种、质量与资源开发研究, Tel: 13678189939, E-mail: ma-yuying@126.com

葛根类药材来源于豆科植物<sup>[1]</sup>, 葛属共 12 种<sup>[2]</sup>, 品种繁多, 资源丰富, 分布遍及全国各地, 药材质量控制难度较大。2015 年版《中国药典》<sup>[3]</sup> 收录的葛根类药材包括葛根和粉葛, 前者为豆科植物野葛的干燥根, 后者为同属植物甘葛藤的干燥根。据文献报道<sup>[1]</sup>, 同属其他植物在部分区域也作中药葛根或粉葛使用。调查发现, 四川葛根类药材资源丰富, 除上述《中国药典》收录品种外, 尚有以野生或栽培的峨眉葛做粉葛使用, 并有商品药材, 其在四川分布的资源量仅次于野葛和甘葛。峨眉葛与甘葛外观、粉性特征相似, 在采挖或采收时常常误将野生或人工峨眉葛当作甘葛。加工成商品药材后难从外观鉴别峨眉葛与甘葛, 显微特征差异也比较小, 使粉葛药材的质量控制难度加大。需寻找快速、高效的技术或方法来鉴别峨眉葛与甘葛, 控制粉葛药材的来源, 促进药材质量的控制。

中药指纹图谱研究中 HPLC 技术得到广泛应用, 已有学者对不同产地的葛根和粉葛的 HPLC 指纹图谱进行了研究, 不同产地的葛根、粉葛质量差异较大, 通过 HPLC 指纹图谱可以从整体上分析评价葛根、粉葛质量<sup>[4-8]</sup>, 但尚未有葛根和粉葛指纹图谱进行系统的比较研究。HPLC 指纹图谱耗时较长, 样品耗量大, 灵敏度低, 部分含量较少的成分难以检出, 各研究报道的葛根、粉葛指纹图谱结果存在差异。近年已有学者将超高效液相色谱(UPLC)技术应用于五味子、苍耳子、益智仁、知母、木香等中药的指纹图谱研究, UPLC 法具有快速高效, 耗时短, 灵敏度高, 准确度高, 所需样品量少等优点, 在中药指纹图谱研究领域具有较好的应用前景<sup>[9-15]</sup>。邓少东等<sup>[16]</sup>对化橘红黄酮类成分 UPLC 与 HPLC 指纹图谱的比较研究, 其中 UPLC 法标识出 21 个共有峰, HPLC 法标识出 17 个共有峰, UPLC 法较 HPLC 法更高效、快速、灵敏。目前葛根类的指纹图谱研究主要采用在 HPLC 技术, 尚未见将 UPLC 技术应用于葛根类药材指纹图谱研究, 采用 UPLC 技术研究葛根类药材的指纹图谱找出各品种之间的差异, 对葛根类药材的鉴别及葛根和粉葛药材的质量控制有重要意义。

故试验采用 UPLC 技术, 建立川产葛根类药材主流品种野葛、甘葛、峨眉葛的 UPLC 指纹图谱, 并结合相似度分析和聚类分析, 研究不同品种、产地及栽培和野生之间的异同, 为其质量评价及栽培选址等提供参考依据。

## 1 材料

对照品葛根素、大豆苷、大豆苷元(成都曼思特

生物科技有限公司; 纯度分别  $\geq 99.71\%$ ,  $\geq 98.72\%$ ,  $> 99.99\%$ ; 批号分别为 MUST-16011207, MUST-15031507, MUST-15051511), 3'-羟基葛根素、染料木苷(成都普思生物科技有限公司; 纯度分别  $> 98.50\%$ ,  $> 98.5\%$ ; 批号分别为 PS0182-0020, PS0369-0025), 染料木素(北京中科仪友化工技术研究院, 纯度  $\geq 98.00\%$ , 批号 C15H1005), 芒柄花素(南京森贝科技有限公司, 纯度  $> 98.50\%$ , 批号 111703-200603); 试验涉及试剂乙醇、乙腈、乙酸等试剂均为分析纯。葛根对照药材, 购于中国科学院成都生物研究所, 经成都中医药大学药学院卢先明、马逾英教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根粉末。试验收集产地葛根类对口药材 43 批, 经成都中医药大学药学院卢先明、马逾英教授鉴定(表 1)。所有药材均于 2015 年 10—12 月自采于四川各产地, 药材 1~13 为野葛 *P. lobata* 的干燥根; 14~31 为甘葛 *P. thomsonii* 的干燥根; 32~44 为峨眉葛 *P. omeiensis* 的干燥根。

Technologies 1290 Infinity 系列液相色谱系统(包括 1290 Infinity 二元泵, 高性能自动进样器, 二级管阵列检测器, 柱温箱, Chem-station 色谱工作站, 美国 Agilent 公司), SQP 型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], SB-3200DTD 型超声仪(宁波新艺超声设备有限公司), HWS-26 型电恒温水浴锅(上海-恒科技有限公司), SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 5 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1% 乙酸水(B)溶液(0~2 min, 4%~10% A; 8~16 min, 10%~25% A; 16~18 min, 25%~42% A), 柱温 30 °C, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 波长 250 nm, 进样量 0.5 μL。

### 2.2 溶剂的制备

**2.2.1 对照品贮备液的制备** 精密称取 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素、芒柄花素对照品适量, 用 50% 乙醇分别配制成 0.140 1, 0.105 0, 0.156 1, 0.150 0, 0.136 0, 0.160 1, 0.105 0 g·L<sup>-1</sup>, 低温避光保存。

**2.2.2 混合对照品溶液的制备** 精密吸取贮备液适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇制成含 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素的质量浓度分别为 11.21, 42.02, 12.32, 7.812, 2.720, 1.984, 1.202 mg·L<sup>-1</sup>。

表 1 药材样品信息

Table 1 Information of medicinal material sample

No.	名称	来源	No.	名称	来源	No.	名称	来源
1	野葛	平武白马/野生	16	甘葛	大竹双溪/种植	31	甘葛	温江基地/种植
2	野葛	青川清溪/野生	17	甘葛	渠县大石/野生	32	峨眉葛	阆中五马/种植
3	野葛	平武古城/野生	18	甘葛	峨眉双福/种植	33	峨眉葛	温江基地/种植
4	野葛	平武阔达/野生	19	甘葛	仁寿青冈/种植	34	峨眉葛	苍溪歧坪/野生
5	野葛	北川高川/野生	20	甘葛	广安永兴/种植	35	峨眉葛	旺苍龙凤/野生
6	野葛	北川桂溪/野生	21	甘葛	简阳草池/野生	36	峨眉葛	苍溪歧坪/野生
7	野葛	雷波雷池/野生	22	甘葛	江油永胜/野生	37	峨眉葛	旺苍龙凤/野生
8	野葛	金阳大兴/野生	23	甘葛	绵阳玉河/野生	38	峨眉葛	雷波雷池/野生
9	野葛	苍溪歧坪/野生	24	甘葛	彭州红颜/野生	39	峨眉葛	峨眉峨眉山/野生
10	野葛	旺苍龙凤/野生	25	甘葛	青川清溪/野生	40	峨眉葛	金阳大兴/野生
11	野葛	青白江姚渡/野生	26	甘葛	射洪复兴/野生	41	峨眉葛	横峰青板/种植
12	野葛	米易南坝/野生	27	甘葛	新津文井/种植	42	峨眉葛	横峰葛源/种植
13	野葛	会东新山/野生	28	甘葛	中江永安/野生	43	峨眉葛	绵阳新桥/种植
14	甘葛	苍溪歧坪/野生	29	甘葛	资阳保和/野生	44	峨眉葛	绵阳新桥/种植
15	甘葛	旺苍龙凤/野生	30	甘葛	阆中五马/种植			

**2.2.3 对照药材溶液和供试品溶液的制备** 精密称取对照药材和供试品各 0.5 g, 分别置于 100 mL 锥形瓶中, 加 50% 乙醇 50 mL 溶解, 称重, 水浴回流提取 1 h, 冷却, 50% 乙醇补足损失质量, 滤过, 滤液过 0.2 μm 微孔滤膜, 即得。

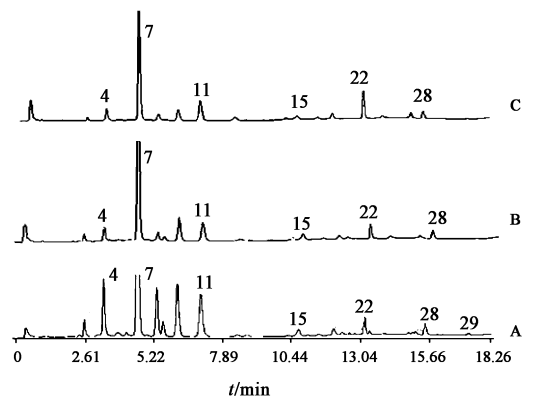
**2.3 方法学考察**

**2.3.1 精密度试验** 精密吸取对照药材溶液, 按 2.1 项下条件连续进样 6 次, 记录指纹图谱, 分析和计算各色谱峰的峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.5% ~ 1.5%, 0.07% ~ 0.48%。并用“中药材色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004 版 A) 进行相似度分析, 6 次进样色谱相似度 > 0.99, 表明该仪器精密度较好, 符合要求。

**2.3.2 稳定性试验** 取供试品 0.5 g, 按 2.2.3 项下方法处理, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 18, 24 h, 按 2.1 项下条件进样。分析和计算各色谱峰的峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.6% ~ 2.3%, 0.04% ~ 0.58%。各色谱相似度 > 0.99, 表明样品溶液在 24 h 试验时间内稳定性良好, 符合要求。

**2.3.3 重复性试验** 取供试品 0.5 g, 平行 5 份, 按 2.2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下条件进样。各色谱峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.05% ~ 0.48%, 0.73% ~ 1.72%。各色谱相似度 > 0.99, 表明样品前处理方法重复性良好, 符合要求。

**2.4 几种葛根类药材 UPLC 指纹图谱特征峰的标定** 取各样品 0.5 g, 按 2.2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 得到各样品的 UPLC 指纹图谱。通过应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004 版 A) 进行图谱处理, 以葛根对照药材作参照(甘葛和峨眉葛没有对照药材), 生成了药材 UPLC 指纹图谱共有模式对照图谱(图 1), 确定了野葛指纹图谱 29 个共有峰, 甘葛指纹图谱 18 个共有峰, 峨眉葛指纹图谱 16 个共有峰。通过比对混合对照品中各对照品的保留时间, 指认了野葛 7 个峰, 甘葛和峨眉葛 6 个峰。



4. 3'-羟基葛根素; 7. 葛根素; 11. 大豆苷; 15. 染料木苷; 22. 大豆苷元; 28. 染料木素; 29. 芒柄花素

图 1 野葛(A), 甘葛(B), 峨眉葛(C) 指纹谱共有模式

Fig. 1 *Pueraria lobata* (A), *P. thomsonii* (B), *P. omeiensis* (C) fingerprint pattern

**2.5 几种葛根类药材的 UPLC 指纹图谱及相似度分析** 从 Agilent 软件中导出各药材 UPLC 图谱 AIA 格式,再依次全谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版 A) 软件,以对照药材(R) 图谱作为参照谱进行指纹匹配,建立指纹图谱的共有模式,并进行相似度计算,3 个品种 44 批药材的叠加指纹图谱(图 2)。

野葛、甘葛、峨眉葛指纹图谱共有模式与葛根对照药材相似度分别为 0.99,0.91,0.85,峨眉葛与甘葛的指纹图谱共有模式相似度为 0.90。比较 3 个品种共有模式,甘葛和峨眉葛与野葛主要区别为野葛色谱中 13,14,16,23,25,26,29 号峰,而甘葛和峨眉葛图谱中在相对应的保留时间无出峰,峨眉葛与甘葛的主要区别为色谱中 9 和 19 号峰,峨眉葛图谱中在相对应的保留时间无出峰。13 批不同产地野葛药材与野葛指纹图谱共有模式指纹图谱相似度均 > 0.98,与野葛对照药材指纹图谱的相似度均 > 0.97; 18 批不同产地甘葛与甘葛指纹图谱共有模式相似度均 > 0.96,与野葛对照药材指纹图谱相似度均 > 0.90,野生甘葛和种植甘葛样品之间的相似度均 > 0.96;13 批不同产地峨眉葛与峨眉葛指纹图谱共有模式相似度均 > 0.95,与葛根药材对照指纹图谱相似度均 > 0.88,种植峨眉葛与野生峨眉葛样品之间相似度均 > 0.95。相似度分析表明,种植甘葛与野生甘葛之间,种植峨眉葛与野生峨眉葛之间相似度较高,对生成指纹图谱无影响;野葛、甘葛、峨眉葛 3 个品种相似度高,可通过野葛色谱中 13,14,16,23,25,26,29 号峰将野葛与甘葛和峨眉葛进行鉴别;通过甘葛色谱中 9 和 19 号峰将甘葛与峨眉葛进行鉴别。

**2.6 聚类分析** 将色谱中各峰面积相对于称样量量化,运用 SPSS 16.0 软件,采用组间平均数联结法 average linkage ( between groups ),以欧氏距离 (Euclidean distance) 作为样品相似度的距离公式进行聚类分析(图 3)。聚类结果将 3 个品种分为了两大类, I, II 类。I 类里包括甘葛和峨眉葛样品, II 类为野葛样品。甘葛和峨眉葛聚样品为一类,野葛单独聚,表明甘葛和峨眉葛 2 个品种之间成分类型和成分含量相似较高,野葛与甘葛和峨眉葛在成分类型与成分含量上存在差异。种植甘葛样品与野生甘葛样品没有分别聚类,种植峨眉葛样品与野生峨眉葛样品没有分别聚类,表明种植甘葛样品与野生甘葛样品,种植峨眉葛样品与野生峨眉葛样品,在成分类型和含量上相似度高。聚类分析得到的样品

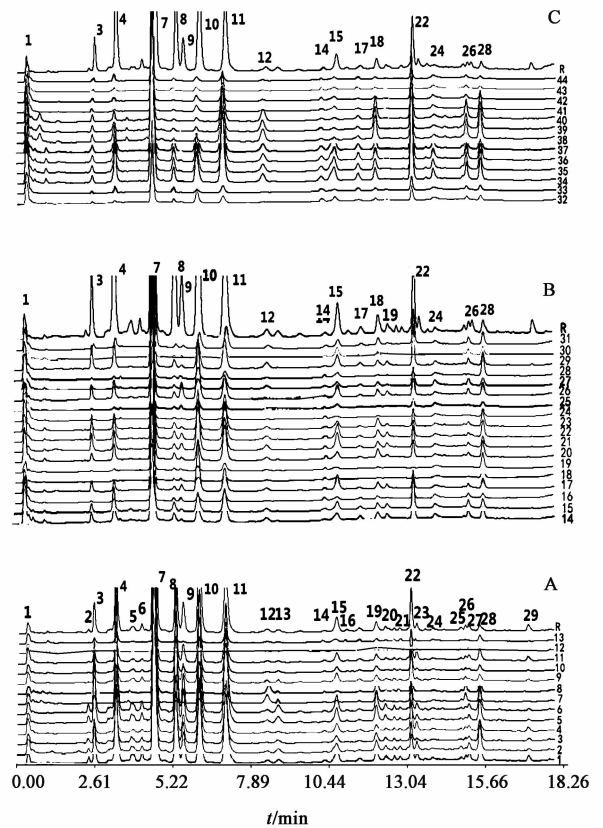


图 2 野葛(A),甘葛(B),峨眉葛(C)不同来源药材的叠加指纹谱  
Fig.2 *Pueraria lobata* (A), *P. thomsonii* (B), *P. omeiensis* (C) superposition of fingerprint of different sources medicine

之间的相关性,与相似度计算得到的样品之间的相关性,结果较一致。

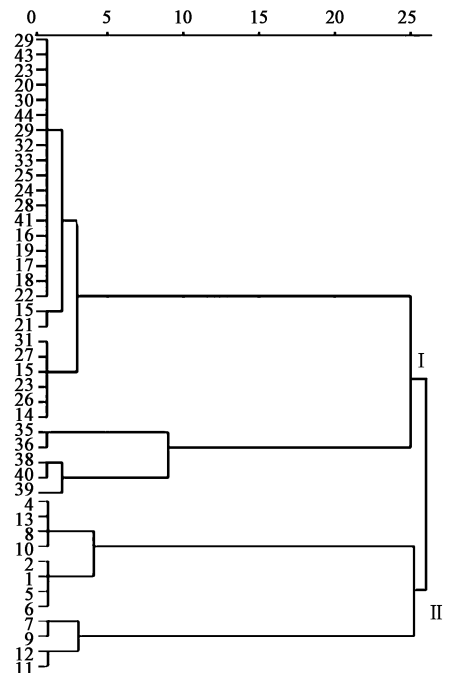


图 3 44 批样品聚类分析结果  
Fig.3 Clustering analysis results

### 3 讨论

实验根据药材中的成分存在形式和溶解性,对提取溶剂(甲醇,30%乙醇,50%乙醇,70%乙醇,90%乙醇)和提取方法(水浴回流、超声)进行了考察,结果表明,不同提取溶剂处理样品,其色谱峰的数目基本一致,但峰面积的大小有差异,最终选择50%乙醇作为提取溶剂;不同提取方法以水浴回流提取的色谱峰数较多,故选择回流提取。根据样品色谱的DAD检测三维图谱,在波长250 nm处样品紫外吸收最大,所以选择250 nm作为检测波长。野葛指纹图谱中8,9号峰分离较难,所以在2~8 min采用等梯度洗脱,同时进行减少进样量和增大流速,在进样0.5 μL,流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>时,分离度达到要求。

UPLC与HPLC相比<sup>[16-20]</sup>,UPLC系统运用的固定相粒度较小,提高了分离度;UPLC能提供单位时间内更多的信息量,提供更高的分析速度;与HPLC相比,低浓度样品采用UPLC能获得灵敏度的显著提高。所以应用UPLC进行中药指纹图谱的研究,简单快捷,耗时短,准确度高,耗材少,在中药指纹图谱研究领域有着很好的应用前景。但是其存在一些缺陷,对样品的纯度有较高的要求,色素及杂质的存在易阻塞损伤色谱柱或仪器,所以应加强对样品进行前处理方法的相关研究,使UPLC技术得到更好地利用。

#### [参考文献]

[1] 楼之岑.常用中药材品种整理和质量研究[M].北京:北京大学医学出版社,2003:380-420.  
[2] 黄再强,张燕飞,胡明勋,等.葛根类药材主流品种品质研究进展[J].成都中医药大学学报,2016,39(2):11-15.  
[3] 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,2015:289,333.  
[4] 白而力.不同产地葛根HPLC指纹图谱研究[J].亚太传统医药,2015,11(13):24-26.  
[5] 李生茂,刘琳,谭睿,等.葛根和粉葛高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别[J].辽宁中医杂志,2016,43(5):1034-1037.  
[6] 王黎,高苏亚,李华.不同产地葛根的HPLC指纹图谱

及质量评价研究[J].安徽农业科学,2011,39(18):10782-10784,10801.  
[7] 洪燕,韩燕全,夏伦祝,等.不同产地苍耳子UPLC指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2013,38(11):1766-1771.  
[8] 王黎,高苏亚,李华.不同产地粉葛的指纹图谱及PCA模式识别分析研究[J].中药新药与临床药理,2011,22(4):448-451.  
[9] 刘芷贾,英赵旭,张晨宁,等.五味子的UPLC指纹图谱研究[J].中草药,2014,45(11):1631-1633.  
[10] 韩燕全,洪燕,夏伦祝,等.UPLC指纹图谱技术结合毒性成分含量优选苍耳子的炮制工艺[J].中国中药杂志,2014,39(17):1248-1253.  
[11] 刘佳,杨雅欣,刘俊宏,等.黔产苗药百尾参UHPLC-DVD指纹图谱研究[J].中药材,2014,37(11):1980-1983.  
[12] 刘冰,蒋波,廖争争.益智仁的UPLC指纹图谱研究[J].中草药,2015,46(6):906-911.  
[13] 罗洁,范旭航,崔思娇,等.知母的UPLC指纹图谱及聚类分析[J].中国现代应用药学,2013,31(1):28-31.  
[14] 袁辉,赵建勇,杨文菊.新疆不同产地雪菊UPLC指纹图谱的建立及其成分测定[J].中草药,2015,46(8):1223-1226.  
[15] 吕露阳,张吉仲,张志锋,等.木香川木香药材UPLC特征指纹图谱建立及鉴别研究[J].中国中药杂志,2014,39(14):2699-2702.  
[16] 邓少东,王莲晴,林励,等.化橘红黄酮类成分UPLC与HPLC指纹图谱的比较研究[J].中草药,2013,44(9):1195-1198.  
[17] 沈涛,张雾,赵艳丽,等.红花龙胆不同药用部位UV-Vis和UPLC指纹图谱研究及资源评价[J].中草药,2016,47(2):309-317.  
[18] 金林,赵万顺,郭巧生,等.白芍UPLC指纹图谱研究[J].中草药,2015,46(23):3564-3569.  
[19] 刘丹,齐双辉,马海英.UPLC在中药组分分析及代谢组学中的应用进展[J].中国药房,2016,27(7):973-975.  
[20] 赵容.UPLC在药物分析中的应用[J].黑龙江医药,2014,27(2):283-285.

[责任编辑 邹晓翠]