

不同产地葛根与粉葛的 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式识别分析

杨园珍¹, 王雅琪^{1,2*}, 胡恋琪¹, 焦姣姣², 杨明^{1*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:**建立葛根与粉葛的 HPLC 特征图谱,结合化学模式识别方法对不同产区的葛根与粉葛进行区分,并鉴别葛根产区,为科学评价和有效控制二者的质量提供参考。**方法:**利用 HPLC 检测 23 批葛根或粉葛药材,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件进行相似度评价,建立共有模式。以其色谱峰信息为数据来源,利用 3 种化学模式识别方法综合分析葛根和粉葛药材的质量。**结果:**除了样品 S22(陕西产地)之外,不同产区的葛根和粉葛的相似度均 >0.9;说明葛根与粉葛药材的相似度良好,采用特征图谱相似度评价方法无法区分葛根与粉葛药材。利用主成分分析只能鉴别葛根与粉葛;偏最小二乘法-判别分析其模型解释度 96.4%,预测度 74.6%,能够区分葛根与粉葛,并能区分葛根的产区;系统聚类分析与偏最小二乘法-判别分析结果较为一致。**结论:**利用化学模式识别方法可快速区分葛根与粉葛,鉴别葛根产区,适用于葛根与粉葛的药材质量评价。

[关键词] 葛根; 粉葛; 特征图谱; 相似度评价; 化学模式识别; 大豆苷; 3'-羟基葛根素

[中图分类号] R22;R282;R284;R931;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0162-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182005

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180726.1728.012.html>

[网络出版时间] 2018-07-27 14:59

Analysis of HPLC Fingerprint and Their Multicomponent Chemical Pattern Recognition of *Puerariae Lobatae Radix* from Different Habitats and *Puerariae Thomsonii Radix*

YANG Yuan-zhen¹, WANG Ya-qi^{1,2*}, HU Lian-qi¹, JIAO Jiao-jiao², YANG Ming^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;

2. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC specific chromatograms of *Puerariae Lobatae Radix* (PLR) and *Puerariae Thomsonii Radix* (PTR), and make a distinction about their species and different habitats of PLR by chemical pattern recognition, provide reliable methods for scientific evaluation and effective control of their quality. **Method:** HPLC was employed to determine the contents of chemical ingredients in 23 batches of PLR and PTR. The similarity analyzed with “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica” (version of 2004A), then a common pattern was established. Based on its chemical fingerprint information, the quality of PLR and PTR was comprehensively analyzed by three kinds of chemical pattern recognition methods. **Result:** In addition to sample S22 (from Shaanxi province), the similarities of 23 batches of samples were more than 0.9, which showed that similarity of PLR and PTR was good, this method can not differentiate them. Principal component analysis (PCA) could only identify PLR and PTR, but partial least

[收稿日期] 20180528(017)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1702904);国家中药标准化项目(ZYBZH-C-SC-54)

[第一作者] 杨园珍,在读硕士,从事中药质量分析与控制研究,Tel:0791-87118108,E-mail:yangyuanzhen666@163.com

[通信作者] *王雅琪,讲师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:0791-87118108,E-mail:wangyaqi_3@163.com;

*杨明,教授,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:0791-87118108,E-mail:yangming16@126.com

squares-discriminant analysis (PLS-DA) could distinguish PLR from PTR and the producing areas of PLR with model interpretation of 96.4% and prediction of 74.6%. The result of hierarchical cluster analysis (HCA) was consistent with PLS-DA. **Conclusion:** Chemical pattern recognition method can make a distinction between PLR and PTR, as well as different habitats of PLR; it is suitable for quality control of their medicinal materials.

[**Key words**] Puerariae Lobatae Radix; Puerariae Thomsonii Radix; specific chromatograms; similarity evaluation; chemical pattern recognition; daidzin; 3'-hydroxypterarin

葛根与粉葛分别来源于豆科植物野葛和甘葛藤的干燥根,具有解肌退热、生津止渴、透疹、升阳止泻、通经活络、解酒毒等功效^[1],且富含膳食纤维、氨基酸、微量元素等成分,已被广泛应用于药品与食品等领域。现代药理学研究表明葛根对心脑血管疾病^[2-3]、消化系统疾病^[4-5]均具有良好的疗效。

野葛与粉葛药材为同属不同变种,2015 年版《中国药典》仅以葛根素的含量作为二者的质控标准,这并不能全面反映药材的质量内涵。化学模式识别技术包括主成分分析^[6-7]、系统聚类分析^[8]、偏最小二乘法-判别分析^[9]、灰色关联度分析^[10]、直观推导式演进特征投影法^[11]和人工神经网络技术等^[12];目前,指纹图谱的化学模式识别已被广泛应用,即采用模式识别方法对色谱法获得的复杂中药化学数据进行特征提取,以便更全面地反映药材性质^[13],从而对药材进行鉴别^[14]和分类^[15]。

前期调研发现,黄河以南区域的葛根产量较大,尤以龙门山脉、秦岭、大巴山脉、大别山、武陵山等地资源蕴藏量最大。中药材产区与其质量关系密切。《本草纲目》^[16]记载“性从地变,质与物迁,未尝同也”。目前,关于不同产区葛根质量内涵差异性分析的研究较少。根据中药材天地网大数据中心汇总,湖北、陕西、四川 3 个省份葛根资源供应量占全国葛根商品产量的 80% 以上。为系统分析葛根与粉葛的质量差异以及不同产区葛根的质量差异,本实验收集了陕西、湖北、四川 3 个葛根主产区的 13 批葛根药材和 10 批产于江西的粉葛药材,运用 3 种化学模式识别方法对葛根与粉葛药材进行区分,鉴别葛根产区,综合评价葛根与粉葛药材的质量,为二者的质量控制提供理论依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), BT25S 型 1/10 电子分析天平和 BSA124 型 1/1 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),BJ-150 型多功能粉碎机(德清拜杰电器有限公司)。葛根素,3'-羟基葛根素,葛根素,3'-甲氧基-葛根素,葛根素-6"-O-木糖苷,葛根素芹菜糖苷,大豆苷对照品(成都克洛玛

生物科技有限公司,批号分别为 CHB170224, CHB160712, CHB170224, CHB160902, CHB160114, CHB160421, CHB160921,纯度均≥98%);水为自制双蒸馏水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。粉葛(S1~S10)与葛根(S11~S23)药材于 2017 年 11 月至 2018 年 2 月采于我国四川、湖北、陕西、江西 4 个省份,共计 23 批次,经江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室葛菲教授鉴定,分别为豆科植物甘葛藤 *Pueraria thomsonii* 和野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根,见表 1。

表 1 23 批葛药材收集来源

Table 1 Source of 23 batches of Puerariae Lobatae Radix (PLR) and Puerariae Thomsonii Radix (PTR)

样品	来源	批号	相似度
S1	江西省上饶市横峰县	20180201	0.979
S2	江西省上饶市横峰县	20180202	0.985
S3	江西省上饶市横峰县	20180203	0.975
S4	江西省上饶市横峰县	20180204	0.987
S5	江西省上饶市横峰县	20180205	0.988
S6	江西省上饶市横峰县	20180206	0.986
S7	江西省上饶市横峰县	20180207	0.977
S8	江西省上饶市横峰县	20180208	0.976
S9	江西省上饶市横峰县	20180209	0.977
S10	江西省上饶市横峰县	20180210	0.989
S11	四川省绵阳市平武县	20180101	0.937
S12	四川省绵阳市平武县	20180102	0.938
S13	四川省绵阳市安州区	20180103	0.945
S14	四川省绵阳市安州区	20180104	0.971
S15	湖北省黄冈市英山县	20171201	0.973
S16	湖北省黄冈市英山县	20171202	0.978
S17	湖北省宜昌市夷陵区雾渡河镇	20171101	0.981
S18	湖北省宜昌市夷陵区雾渡河镇	20171102	0.966
S19	陕西省商洛市柞水县	20171203	0.945
S20	陕西省商洛市柞水县	20171204	0.975
S21	陕西省商洛市柞水县	20171205	0.958
S22	陕西省汉中市城固县	20171206	0.891
S23	陕西省汉中市城固县	20171207	0.968

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称取各对照品适量,置于不同的 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇超声使溶解,定容,作为对照品贮备液,于 4 °C 冰箱保存备用。

2.1.2 供试品溶液 精密称取各产区葛根粉末约 0.1 g(过三号筛),置具塞锥形瓶中,精密加入 30% 乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,称定质量,用 30% 乙醇补足质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min, 3% A; 3 ~ 5 min, 3% ~ 11% A; 5 ~ 25 min, 11% A; 25 ~ 30 min, 11% ~ 20% A; 30 ~ 40 min, 20% A; 40 ~ 45 min, 20% ~ 35% A; 45 ~ 50 min, 35% A; 50 ~ 55 min, 35% ~ 60% A),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 254 nm。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取葛根药材适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,同一供试品溶液重复进样 6 次,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好,符合特征图谱的要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一葛根药材的供试品溶液,24 h 内每隔 3 h 进样分析 1 次,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批葛根药材适量,按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.2 项下色谱条件测定,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.4 特征图谱的建立 取 23 批葛根或粉葛药材,分别按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,按“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对各色谱数据进行分析,通过色谱峰多点校正的方法对葛根和粉葛的特征图谱色谱峰进行自动匹配,不同批次的葛根和粉葛色谱叠加图和对照特征图谱分别见图 1 和 2。经与对照品比对,确定 4, 6 ~ 10 号峰分别为 3'-羟基葛根素,葛根素,3'-甲氧基-葛根素,葛根素-6''-O-木糖苷,葛根素芹菜糖苷、大豆苷。不同产区葛根和粉葛的相似度见表 1,结果表明除了样品 S22 之外,不同

产区的葛根和粉葛的相似度均 > 0.9,说明葛根与粉葛药材的相似度良好,采用特征图谱相似度评价方法无法区分葛根与粉葛药材。

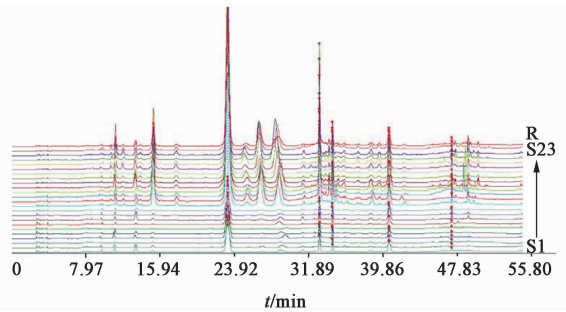
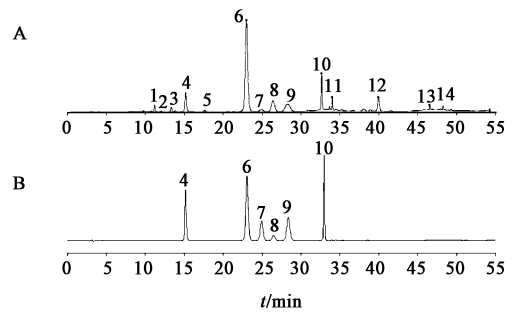


图 1 葛根与粉葛药材特征谱与对照特征谱的共有模式
Fig. 1 Common pattern of characteristic chromatograms and control characteristic chromatogram for PLR and PTR



4. 3'-羟基葛根素; 6. 葛根素; 7. 3'-甲氧基-葛根素; 8. 葛根素-6''-O-木糖苷; 9. 葛根素芹菜糖苷; 10. 大豆苷
图 2 葛根与粉葛药材的对照特征谱(A)及混合对照品的特征谱(B)

Fig. 2 Control characteristic chromatogram (A) and characteristic chromatogram of mixed reference substances (B) for PLR and PTR

2.4 主成分分析(PCA)与偏小二乘法-判别分析(PLS-DA) 运用 SIMCA-P 12.0 软件对 23 批药材的特征峰与指纹峰峰面积变量分别作无监督的 PCA 及有监督的 PLS-DA, 模型性能参数见表 2。通过对其特征峰变量进行分析可知, PCA 结果优于 PLS-DA。在 PCA 结果中, 2 个主成分的累积方差贡献率 92.5%, 模型的预测度 77.1%, 得分分布见图 3。粉葛与葛根药材能够得到很好的区分, 但是不能对葛根进行产区区分。通过对其指纹峰变量进行分析, 该分析包括药材的所有化学信息, 能更加全面的反映药材内涵差异, 由表 2 可知, PLS-DA 结果优于 PCA, 其模型解释度 96.4%, 模型预测度 74.6%, 可认为各成分质量分数 61.7%, 并对其前 2 个成分进行散点分析, 见图 4。结果发现葛根与粉葛能明显的区分, 葛根在主成分空间的分布呈现了各自的特定区域, 但来自湖

北与陕西的药材区分程度不明显。对各个指纹峰变量的重要性投影(VIP)值进行排序,见图 5, VIP 值越大,说明该其对分类的贡献越大。结果发现

3'-羟基葛根素,葛根素,3'-甲氧基-葛根素,葛根素-6"-O-木糖苷,葛根素芹菜糖苷,大豆苷的 VIP 值均 >1,说明六者对分类的贡献较大。

表 2 PCA 与 PLS-DA 的各参数指标

Table 2 Parameter indexes of PCA and PLS-DA about 23 batches of samples

参数指标	PCA			PLS-DA			
	主成分 / 个	累积方差 贡献率/%	累积模型 预测能力/%	主成分 / 个	各成分质量 分数/%	累积模型 解释度/%	模型预测 能力/%
特征峰峰面积	2	92.5	77.1	4	99.7	63.0	35.5
指纹峰峰面积	5	50.9	7.25	6	61.7	96.4	74.6

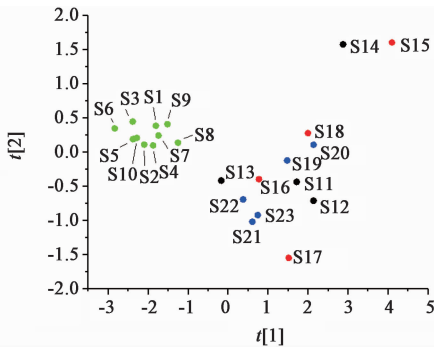


图 3 23 批药材共有峰的 PCA 得分分布

Fig. 3 PCA score distribution about common peaks of 23 batches of samples

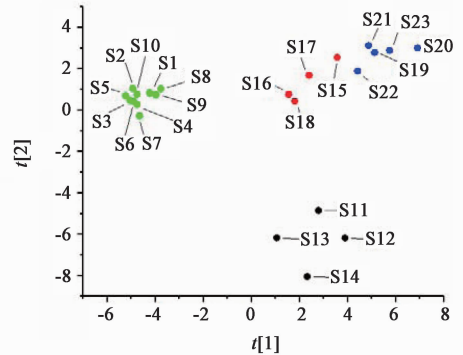


图 4 23 批药材指纹峰的 PLS-DA 得分分布

Fig. 4 PLS-DA score distribution about fingerprint peaks of 23 batches of samples

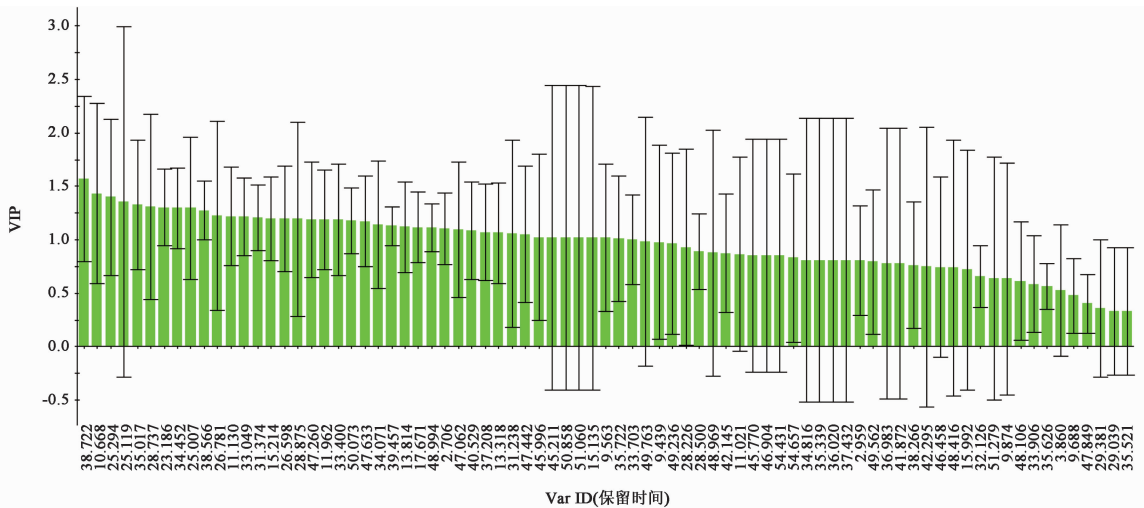


图 5 各指纹峰对药材分组的 VIP 值

Fig. 5 VIP values of each fingerprint peak for medicine grouping

2.5 系统聚类分析(HCA) 以 23 批药材的 79 个指纹峰峰面积为原始数据,采用 SPSS 21.0 软件对样品进行 HCA,采用组间平均数联结法,以欧氏距离平方为样品相似度的距离公式对不同产区、不同批次药材分别进行 HCA,见图 6。结果发现当欧氏

距离为 5 时,粉葛药材可聚为一类,明显与葛根分开;陕西产区大部分药材可聚为一类、四川产区大部分药材可聚为一类;湖北药材分布散乱,可能与生长年限、加工方法等因素有关。HCA 结果与 PLS-DA 结果较为一致。

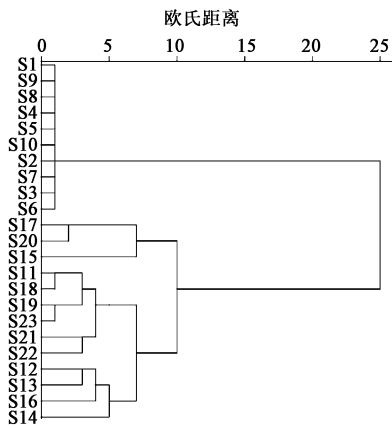


图 6 23 批药材样品的 HCA 树状

Fig. 6 HCA dendrogram of 23 batches of samples

3 讨论

3.1 流动相的选择 在流动相系统的选择中,本实验考察了乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.5% 磷酸水溶液。结果发现以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱时,6 种色谱峰的分离度、塔板数、拖尾因子都比较理想,表明该方法耐用性良好,有利于特征图谱的分析。

3.2 检测波长的选择 预试验对葛根素对照品溶液与葛根药材提取液分别进行了不同波长(254, 210, 280, 310 nm)的检测,结果发现在 254 nm 处均有较大吸收,特征图谱的原则是在一张图谱中尽可能多地体现待测样品中的化学成分信号峰,故选择 254 nm 作为检测波长。

3.3 化学模式识别结果的分析 本实验通过对 23 批葛根或粉葛药材进行研究,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件进行评价,发现不同产区药材质量相似性较好,但为了更好地进行葛属药材识别和葛根产区区分,采用化学模式识别方法进行分析,以弥补单纯应用相似度评价指纹图谱的不足,能反映药材多成分的特点,整体控制葛根药材的质量。本文所用的 3 种化学模式识别都能将药材分为两类,一类为样品 S1 ~ S10,一类为样品 S11 ~ S23,与之对应的药材收集信息为粉葛和葛根,说明化学模式识别能够较好的区分粉葛与葛根药材。但在葛根产区分析时,湖北与陕西的区分程度不明显,原因可能受其生长环境影响,如温度、湿度、光照、土壤等因素。鉴于本研究中葛根各个产区样本数较少,在后续研究中还需继续增加采集地区与样品批次,进一步完善葛根产区的鉴别研究,同时也为其他中药材产区的鉴别研究提供参考。

[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,2015:289-290,333.
- [2] 邹东洋,董桂英. 葛根治疗心脑血管病的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(23):2992-2993.
- [3] 魏述永. 葛根素心血管保护作用及其机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(12):2278-2284.
- [4] 谭家林,文颖娟,樊一波. 葛根及其复方治疗糖尿病心肌病研究进展[J]. 亚太传统医药,2018,14(1):76-78.
- [5] 李昕,潘俊娴,陈士国,等. 两个品种葛根化学成分及体外抗氧化性的分析[J]. 中国食品学报,2017,17(2):274-280.
- [6] 于海帅. 基于主成分分析、聚类分析和典型相关分析的漏芦抗胃癌谱效关系探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):27-31.
- [7] 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.
- [8] 吴一凡,肖新立. 不同产地甘草中主要微量元素及系统聚类分析[J]. 临床合理用药杂志,2017,10(27):96-97.
- [9] 陈安珍,蒋万枫,袁航,等. 基于超高效液相色谱偏最小二乘判别分析法建立鉴别大黄真伪及种属预测模型的方法[J]. 中国药学杂志,2016,41(3):197-202.
- [10] 陈舒好,石婧婧,邹立思,等. UFLC-Q-TRAP-MS/MS 同时测定五味子中木脂素及有机酸类成分[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):2104-2111.
- [11] 孙长海,杨伟丽,郑苹,等. 细叶杜香挥发油 GC-MS 与直观推导式演进特征投影法分析[J]. 中草药,2009,40(10):1556-1558.
- [12] 韩胜男,张晓杭,周培培,等. 化学计量学在中药组效关系研究中的应用进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(14):2595-2602.
- [13] 徐彤,黄萌萌,陈家进,等. 安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):14-19.
- [14] 张晓冬,陈龙,白玉,等. 近红外光谱结合主成分分析和聚类分析鉴别炉甘石生品、伪品和炮制品[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):1-8.
- [15] 苏素娇,李娜,陈亮,等. 藤茶的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):144-147.
- [16] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:780-945.

[责任编辑 刘德文]