·制剂与炮制·

不同产地葛根饮片的 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定研究

黄紫炎，沈钱能，李平，苏联麟，陈丽红，陆兔林*，毛春芹*
(南京中医药大学 药学院，江苏 南京 210023)

[摘要] 建立不同产地葛根饮片的 UPLC 指纹图谱和同时测定 6 种异黄酮类化合物含量的 UPLC 分析方法。采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×50 mm，1.7 μm)，流动相乙腈-0.05% 甲酸，梯度洗脱；检测波长 250 nm；流速 0.2 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 2 μL；采用中药指纹图谱相似度评价系统进行相似度评价，并使用 Simca-P 软件中的主成分分析(PCA)与偏最小二乘法判别(OPLS-DA)寻找 3 个产地的差异成分。29 批样品相似度均在 0.90 以上，表明样品一致性良好，经 PCA 与 OPLS-DA 分析，葛根聚集为 3 组，并发现了葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元等 6 个差异成分。对其中 3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元 6 种异黄酮的含量测定结果表明，同一成分在各产地葛根饮片中的含量差异明显，不同成分的波动范围不同；各产地 6 种异黄酮质量分数为安徽 11.21%>河南 10.97%>陕西 9.38%。构建的不同产地葛根饮片 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定方法为完善葛根饮片的质量控制和品质评价提供了更全面的参考。

[关键词] 葛根；UPLC 指纹图谱；多成分含量测定；主成分分析；偏最小二乘法判别分析

Quality research of Puerariae Lobatae Radix from different habitats with UPLC fingerprint and determination of multi-component content

HUANG Zi-yan, SHEN Qian-neng, LI Ping, SU Lian-lin, CHEN Li-hong, LU Tu-lin*, MAO Chun-qin*
(*School of Pharmacy*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023, *China*)

[Abstract] To establish ultra performance liquid chromatography(UPLC) fingerprint of Puerariae Lobatae Radix from different habitats and simultaneously determine the contents of six isoflavonoids. The UPLC fingerprint analysis and content determination were performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18}(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) chromatographic column, with acetonitrile-0.05% formic acid as mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 250 nm; the flow rate was 0.2 mL·min^{-1}; the column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 2 μL. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine(TCM) was adopted; principal component analysis(PCA) and discriminant analysis by partial least square method (PLS-DA) in Simca-P software were used to identify the differential components in samples from three habitats. The similarity was over 0.90 in 29 batches of samples, indicating good consistency of the samples. The samples were clustered into 3 categories by PCA and PLS-DA, and six differential components such as puerarin apioside, daidzin, and isoflavoues aglycone were found. The determination results of 6 isoflavones, including 3′-hydroxy puerarin, puerarin, 3′-methoxy puerarin, puerarin apioside, daidzin, and isoflavoues aglycone, showed that the content of the same component and the fluctuation range between different components were all different among different habitats. The total content of 6 isoflavones from different regions was Anhui 11.21%>Henan 10.97%>Shannxi 9.38%. The establishment of UPLC fingerprint combined with simultaneous determination of 6 active components provides a more comprehensive reference for quality control and quality evaluation of Puerariae Lobatae Radix.

[收稿日期] 2018-11-28
[基金项目] 国家公益性行业科研专项(201307008)
[通信作者] * 陆兔林，教授，博士生导师，主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究，Tel: (025) 85811835，E-mail: lutuling2005@126.com；* 毛春芹，正高级实验师，主要从事新药研发及药物制剂研究，E-mail: mcq63@163.com
[作者简介] 黄紫炎，硕士研究生，主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究，E-mail: huangziyan115@gmail.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[Key words] Puerariae Lobatae Radix; UPLC fingerprint; determination of multi-component content; principal component analysis; discriminant analysis of partial least square method

doi: 10. 19540/j. cnki. cjcmm. 20190116. 002

葛根 Puerariae Lobatae Radix 为豆科植物野葛 *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi 的干燥根，有解肌退热，生津止渴，透疹，升阳止泻，通经活络的功效。主要用于外感发热头痛，项背强痛，麻疹不透，泄泻，眩晕头痛[1]。葛根来源丰富，在我国分布十分广泛，主产区主要位于安徽、湖北、陕西、河南、重庆等地。根据中药材天地网大数据中心汇总，陕西是葛根目前的第一大产区，安徽的葛根加工技术较好，河南也是目前主要产区之一。目前，葛根的质量控制多以外观性状和葛根素含量为指标[1]。现代文献研究发现葛根中异黄酮类成分具有较强的生理活性，是葛根的主要有效成分，包括 3′-羟基葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷等[2]。具有抗心脑血管疾病[3]、降血糖[4]、增强免疫力[5]、缓解腹泻[6]、改善骨质疏松[7]等药理作用。中药是多指标成分共同作用产生疗效，单一的指标成分不能真正控制中药的质量，反映其所体现的整体疗效。在尚不清楚中药整体化学成分的情况下，运用现代分析技术手段得到的指纹图谱，能从整体上全面、准确地描述中药材及其制剂的内在质量，大大提高了中药质量评价的技术水平和科技含量[8-9]。本研究建立了葛根 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定相结合的方法，并运用相似度评价、主成分分析与偏最小二乘法判别分析方法对收集的三大产区葛根饮片进行了综合评价，为全面控制和评价葛根饮片质量提供了科学依据。

1　材料

Waters Acquity 超高效液相色谱仪，PDA 检测器和 Empower 工作站(美国 Waters 公司)；MS-105D 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)；KQ-500E 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

葛根素(批号 110752-201415)购自中国食品药品检定研究院；3′-羟基葛根素(批号 150102)、3′-甲氧基葛根素(批号 151204)均购自南京森贝伽生物科技有限公司；葛根芹菜糖苷(批号 151216)、大豆苷(批号 20111016)、大豆苷元(批号 YY20101110)均购自上海源叶生物技术有限公司。乙腈(HPLC 级，德国 Merck 公司)，甲酸(HPLC 级，美国 ACS 恩科公司)；水为娃哈哈纯净水；其他试剂均为分析纯(山东禹王实业有限公司化工分公司)。29 批不同产地的葛根饮片收集于陕西、河南、安徽 3 个省份，经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为豆科植物野葛 *P. lobate* 的干燥根，饮片来源信息见表 1。

表 1　葛根样品的来源与相似度

Table 1　Informations of Puerariae Lobatae Radix samples

No.	批号	药材来源	相似度	No.	批号	药材来源	相似度
S1	GG150321	陕西札水	0. 997	S16	11508012	安徽	0. 999
S2	GG150322	陕西札水	0. 999	S17	11508013	安徽	0. 999
S3	GG150323	陕西札水	0. 997	S18	11508014	安徽	0. 999
S4	GG150324	陕西札水	0. 999	S19	11508015	安徽	0. 999
S5	GG150325	陕西札水	0. 999	S20	11508016	安徽	0. 999
S6	14102011	陕西商洛	0. 999	S21	11508017	安徽	0. 999
S7	14102012	陕西商洛	0. 999	S22	11508018	安徽	0. 999
S8	14102013	陕西商洛	0. 999	S23	11508019	安徽	0. 999
S9	14102014	陕西商洛	0. 997	S24	11508020	安徽	0. 999
S10	14102015	陕西商洛	0. 999	S25	GG150311	河南	0. 993
S11	1409012	陕西商洛	0. 997	S26	GG150312	河南	0. 992
S12	1409013	陕西商洛	0. 999	S27	GG150313	河南	0. 986
S13	1409014	陕西商洛	0. 999	S28	GG150314	河南	0. 992
S14	1409015	陕西商洛	0. 999	S29	GG150315	河南	0. 993
S15	11508011	安徽	0. 999				

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 方法与结果

2.1 指纹图谱及含量测定色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm);流动相 0.05%甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0~4 min,94% A,4~10 min,94%~90% A,10~16 min,90%~80% A,16~20 min,80%~40% A,20~21 min,40%~94% A,流速 0.2 mL·min^{-1};检测波长 250 nm;柱温 30 ℃;进样量 2 μL。

2.2 对照溶液的制备

取各对照品适量,加 50%甲醇配制成含 3′-羟基葛根素 0.019 0 g·L^{-1}、葛根素 0.100 1 g·L^{-1}、3′-甲氧基葛根素 0.022 7 g·L^{-1}、葛根芹菜糖苷 0.035 7 g·L^{-1}、大豆苷 0.020 2 g·L^{-1}、大豆苷元 0.005 0 g·L^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 120 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 50%甲醇补足减重,摇匀,离心,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密称取对照品 3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷和大豆苷元适量,配成质量浓度分别为 0.038 0,0.200 1,0.045 4,0.071 4,0.040 5,0.010 1 g·L^{-1}的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液,用倍比稀释的方法以 50%甲醇制成系列对照品溶液,在 2.1 项色谱条件下,分别进样 2 μL,每个质量浓度 2 针,记录各峰面积的值,以峰面积平均值(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,计算回归方程,结果见表 2。

表 2 6 种有效成分的回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Linear equation, linear ranges and correlation coefficient of 6 effective components

化合物	回归方程	线性范围/g·L^{-1}	r
3′-羟基葛根素	$Y=3\times10^7X+6\ 378.7$	0.000 594~0.038 0	0.999 7
葛根素	$Y=4\times10^7X+9\ 547.7$	0.003 126~0.200 1	0.999 9
3′-甲氧基葛根素	$Y=4\times10^7X-1\ 244.4$	0.000 709~0.045 4	0.999 9
葛根素芹菜糖苷	$Y=3\times10^7X+3\ 180.0$	0.001 116~0.071 4	0.999 9
大豆苷	$Y=4\times10^7X+4\ 824.6$	0.000 633~0.040 5	0.999 9
大豆苷元	$Y=5\times10^7X+8\ 672.6$	0.000 157~0.010 1	0.998 8

2.4.2 精密度试验 取葛根样品(S15) 0.1 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,记录其指纹图谱,以葛根素作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD<2.6%,相对峰面积的 RSD<3.0%,3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元峰面积的 RSD 分别为 0.80%,0.77%,0.85%,0.92%,0.96%,1.9%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h,按 2.1 项下色谱条件进样,记录其指纹图谱,以葛根素作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明共有峰相对保留时间的 RSD<1.0%,相对峰面积的 RSD<3.0%,3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元峰面积的 RSD 分别为 2.3%,1.3%,2.5%,2.0%,2.8%,2.8%,表明在该条件下样品在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取葛根样品(S15) 0.1 g 各 6 份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,记录其指纹图谱,以葛根素作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积,结果表明各共有峰相对保留时间的 RSD<0.50%,相对峰面积的 RSD<3.0%,3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元峰面积的 RSD 分别为 2.1%,1.8%,0.64%,2.6%,2.5%,0.54%,表明该方法的重复性良好。

2.4.5 回收率试验 精密称取已知 6 种成分含量的葛根粉末(S15) 9 份,每份 0.05 g,分成 3 组,每组 3 份,分别精密添加含 3′-羟基葛根素 0.581 g·

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

L^{-1}、葛根素 3.062 g·L^{-1}、3′-甲氧基葛根素 0.586 g·L^{-1}、葛根芹菜糖苷 0.717 g·L^{-1}、大豆苷 0.571 g·L^{-1}、大豆苷元 0.078 7 g·L^{-1}的混合对照品溶液 0.8，1.0，1.2 mL，按 2.3 项下方法制备成供试品溶液，按 2.1 项下进样测定，计算平均回收率。3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元的平均回收率分别为 98.23%，99.12%，97.50%，98.26%，99.63%，97.78%，RSD 分别为 2.3%，1.9%，1.0%，2.0%，1.4%，1.6%，表明所建立的含量测定方法准确性良好。

2.5　葛根指纹图谱的建立及共有峰的标定

2.5.1　葛根指纹图谱的建立　取 29 批葛根饮片，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件依次进样测定，记录色谱图，将 29 批葛根 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）软件。以 S17 号样品的指纹图谱作为参照谱，采用平均数法，进行多点校正和色谱峰匹配，确定了 20 个共有峰，得到葛根饮片指纹图谱叠加图，见图 1。

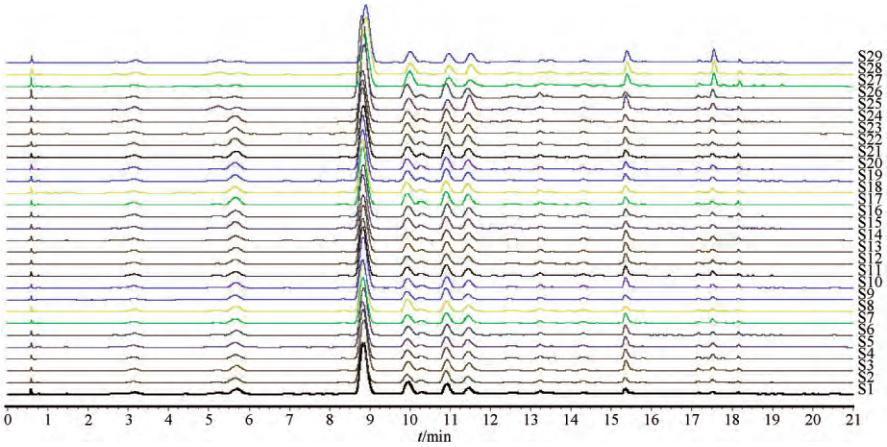
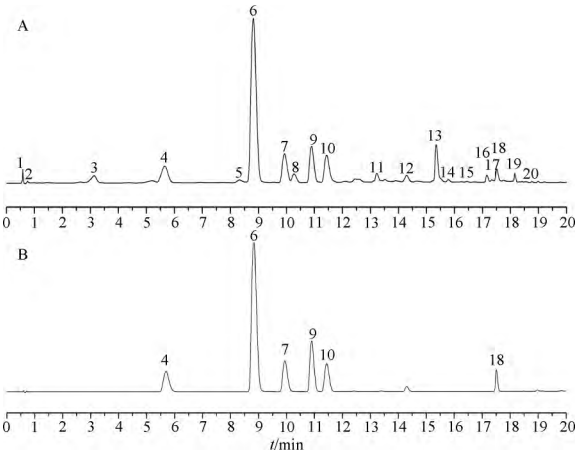


图 1　29 批葛根饮片指纹图谱

Fig.1　UPLC fingerprints of 29 batches of Puerariae Lobatae Radix pieces

2.5.2　指纹图谱共有峰的标定和相似度评价　采用对照品比对的方式，指认了其中 6 个共有峰，分别为 3′-羟基葛根素（4 号峰）、葛根素（6 号峰）、3′-甲氧基葛根素（7 号峰）、葛根芹菜糖苷（9 号峰）、大豆苷（10 号峰）、大豆苷元（18 号峰）。葛根指纹图谱共有模式图及混合对照液的对照色谱图见图 2。中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）软件对 29 批样品指纹图谱相似度计算，各产地葛根指纹图谱相似度大于 0.90，说明不同产地间葛根饮片的整体化学组分类似，且陕西产地与安徽产地的相似度均高于 0.99，说明两产地的葛根饮片相似度较高，采用指纹图谱相似度评价方法无法区分不同产区的葛根饮片。



4. 3′-羟基葛根素；6. 葛根素；7. 3′-甲氧基葛根素；9. 葛根芹菜糖苷；10. 大豆苷；18. 大豆苷元。

图 2　葛根指纹图谱共有模式图（A）及混合对照色谱图（B）

Fig.2　Chromatogram of reference fingerprint of Puerariae Lobatae Radix（A）and chromatogram of reference substances（B）

2.6　主成分分析（PCA）

将 29 批次葛根样品的各个共有峰相对于参照峰葛根素（6 号峰）的峰面积量化，得到 20×29 阶数据矩阵，见表 3，导入 SIMCA-P+13.0 软件，选取 20 个共有色谱峰的相对峰面积值作为变量，采用非监

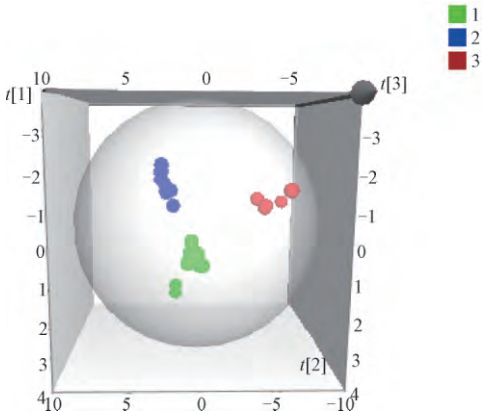
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

督模式识别方法 PCA 来观察样品的自然聚集。模型自动拟合选择了 3 个主成分,累计贡献率为 79.70%,模型预测良好。29 批次样品的得分矩阵图见图 3,结果显示 3 个产区的葛根可以完全区分为 3 类,可直观显示样品间的差异,可以看出几大主产区葛根有一定的差别。

表 3　29 批样品共有峰相对峰面积

Table 3　The relative peaks areas of 20 common chromatographic peaks of 29 samples

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.015	0.007	0.047	0.124	0.010	1.000	0.215	0.023	0.170	0.116	0.027	0.022	0.069	0.004	0.001	0.011	0.002	0.020	0.001	0.002
S2	0.016	0.010	0.042	0.143	0.018	1.000	0.177	0.037	0.245	0.137	0.029	0.029	0.069	0.005	0.001	0.013	0.003	0.030	0.001	0.002
S3	0.012	0.008	0.054	0.122	0.014	1.000	0.157	0.032	0.179	0.139	0.028	0.028	0.121	0.007	0.002	0.015	0.002	0.002	0.001	0.002
S4	0.013	0.007	0.053	0.107	0.012	1.000	0.154	0.037	0.190	0.138	0.031	0.029	0.118	0.007	0.002	0.016	0.002	0.039	0.001	0.002
S5	0.014	0.008	0.054	0.123	0.014	1.000	0.152	0.034	0.183	0.152	0.028	0.030	0.134	0.007	0.002	0.017	0.002	0.035	0.001	0.002
S6	0.014	0.006	0.057	0.121	0.014	1.000	0.163	0.034	0.185	0.147	0.030	0.029	0.127	0.008	0.002	0.016	0.002	0.028	0.001	0.002
S7	0.014	0.009	0.053	0.120	0.014	1.000	0.158	0.037	0.190	0.151	0.029	0.029	0.127	0.007	0.002	0.016	0.002	0.036	0.002	0.002
S8	0.015	0.007	0.047	0.124	0.011	1.000	0.215	0.023	0.169	0.116	0.028	0.021	0.069	0.004	0.001	0.010	0.002	0.020	0.001	0.002
S9	0.016	0.010	0.042	0.143	0.018	1.000	0.177	0.037	0.245	0.137	0.029	0.029	0.069	0.005	0.001	0.013	0.003	0.030	0.001	0.002
S10	0.012	0.008	0.054	0.122	0.014	1.000	0.157	0.032	0.179	0.139	0.028	0.028	0.121	0.007	0.002	0.016	0.002	0.027	0.001	0.002
S11	0.013	0.005	0.053	0.107	0.012	1.000	0.154	0.037	0.189	0.138	0.031	0.029	0.118	0.007	0.002	0.016	0.002	0.039	0.001	0.002
S12	0.014	0.008	0.054	0.123	0.014	1.000	0.152	0.034	0.183	0.152	0.029	0.030	0.134	0.007	0.002	0.017	0.002	0.035	0.001	0.002
S13	0.014	0.006	0.057	0.122	0.014	1.000	0.163	0.034	0.185	0.147	0.030	0.029	0.127	0.008	0.002	0.016	0.002	0.028	0.001	0.002
S14	0.014	0.006	0.053	0.119	0.014	1.000	0.157	0.037	0.191	0.151	0.029	0.029	0.127	0.007	0.002	0.016	0.002	0.036	0.001	0.002
S15	0.013	0.008	0.055	0.151	0.017	1.000	0.168	0.037	0.185	0.154	0.022	0.024	0.085	0.004	0.001	0.010	0.002	0.031	0.002	0.002
S16	0.013	0.008	0.059	0.150	0.017	1.000	0.173	0.044	0.198	0.156	0.023	0.025	0.089	0.005	0.001	0.011	0.002	0.032	0.002	0.002
S17	0.011	0.007	0.059	0.155	0.017	1.000	0.169	0.041	0.190	0.162	0.022	0.025	0.086	0.005	0.001	0.011	0.002	0.025	0.002	0.002
S18	0.014	0.008	0.055	0.142	0.016	1.000	0.169	0.036	0.184	0.156	0.024	0.024	0.084	0.004	0.001	0.010	0.002	0.033	0.001	0.002
S19	0.015	0.009	0.057	0.146	0.016	1.000	0.173	0.044	0.199	0.157	0.025	0.025	0.088	0.004	0.001	0.011	0.002	0.034	0.002	0.002
S20	0.013	0.008	0.055	0.151	0.017	1.000	0.168	0.037	0.185	0.154	0.022	0.024	0.085	0.004	0.001	0.010	0.002	0.031	0.002	0.002
S21	0.012	0.008	0.059	0.150	0.017	1.000	0.172	0.043	0.198	0.157	0.023	0.025	0.089	0.005	0.001	0.011	0.002	0.032	0.002	0.002
S22	0.011	0.007	0.059	0.155	0.017	1.000	0.170	0.041	0.189	0.162	0.023	0.025	0.086	0.005	0.001	0.011	0.002	0.025	0.002	0.002
S23	0.014	0.008	0.055	0.142	0.016	1.000	0.169	0.036	0.184	0.156	0.024	0.024	0.084	0.004	0.001	0.010	0.002	0.033	0.002	0.002
S24	0.015	0.008	0.058	0.146	0.016	1.000	0.173	0.044	0.199	0.157	0.025	0.025	0.088	0.005	0.001	0.011	0.002	0.034	0.002	0.002
S25	0.011	0.006	0.054	0.049	0.005	1.000	0.172	0.021	0.127	0.207	0.042	0.038	0.144	0.023	0.007	0.024	0.011	0.056	0.001	0.002
S26	0.014	0.004	0.030	0.025	0.005	1.000	0.155	0.034	0.152	0.117	0.048	0.032	0.053	0.009	0.005	0.017	0.011	0.050	0.001	0.001
S27	0.022	0.006	0.035	0.027	0.005	1.000	0.265	0.021	0.131	0.121	0.046	0.041	0.119	0.012	0.004	0.025	0.011	0.112	0.002	0.002
S28	0.017	0.006	0.050	0.035	0.008	1.000	0.176	0.018	0.127	0.154	0.036	0.036	0.134	0.016	0.002	0.018	0.010	0.100	0.001	0.002
S29	0.017	0.006	0.050	0.035	0.008	1.000	0.176	0.018	0.128	0.154	0.035	0.035	0.134	0.016	0.002	0.019	0.011	0.100	0.001	0.002



1. 陕西; 2.安徽; 3.河南(图 4 同) 。

图 3　29 批葛根样品的 PCA 得分图

Fig.3　PCA of score plot for 29 Puerariae Lobatae Radix samples

2.7　偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)

为更好地观察组间差异,本实验在此基础上采用监督模式识别方法进行了 3 组间的 PLS-DA。结合评价 PLSDA 模型的 3 个指标: 模型拟合参数 $R^2X=0.835$,$R^2Y=0.967$,模型预测参数 $Q^2=0.852$,均大于 0.5,表明建立的数学模型稳定且预测能力较强[10-11]。

PLS-DA 得分矩阵图见图 4,可看出不同产地的样品集中在不同区域,陕西产地分布在第 1、第 2 象限上,河南产地的分布在第 3 象限,安徽产地的集中分布在第 4 象限,与 PCA 结果一致。

为了明确引起组间差异的物质,采用独立样本 t 检验结合各变量的 VIP 值正态分布图,见图 5,筛选出贡献较大的 6 个变量(VIP>1) ,分别为 9 号峰(葛

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

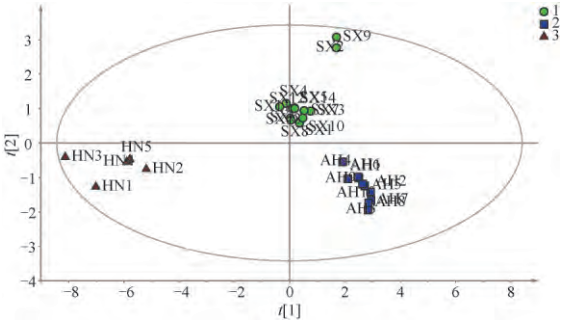


图 4　29 批葛根样品的 OPLS-DA 得分图

Fig.4　OPLS-DA score plot for 29 Puerariae Lobatae Radix samples

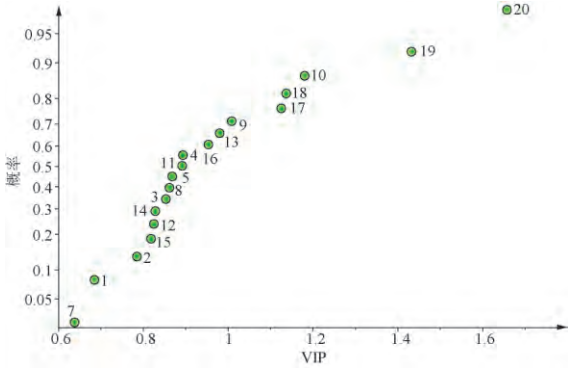


图 5　重要性变量投影图

Fig.5　VIP plot of PLS-DA

根芹菜糖苷)、10 号峰(大豆苷)、17 号峰、18 号峰(大豆苷元)、19 号峰、20 号峰。该成分在区分不同产地间葛根起到重要作用,是其主要差异成分。

2.8　葛根 6 种主要有效成分含量测定研究

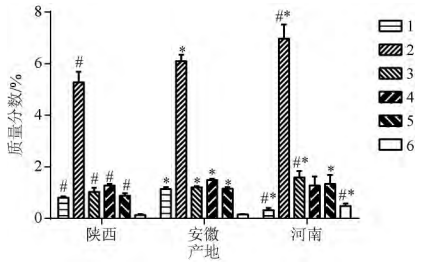
取 29 批葛根饮片,平行 3 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件测定,计算含量,见表 4。利用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行 LSD 方差分析($P<0.05$ 表示显著性差异),并借助 graphpad prism.6 数据绘图工具做差异分析图,见图 6。

表 4　29 批葛根中 6 种异黄酮类成分的质量分数($n=3$)

Table 4　The content of six compounds in the 29 batches of Puerariae Lobatae Radix samples　　%

No.	3′-羟基葛根素	葛根素	3′-甲氧基葛根素	葛根芹菜糖苷	大豆苷	大豆苷元
S1	0.88	5.66	1.40	1.22	0.79	0.09
S2	0.79	4.43	0.91	1.38	0.73	0.11
S3	0.87	5.68	1.03	1.29	0.95	0.01
S4	0.74	5.51	0.98	1.34	0.91	0.17
S5	0.79	5.14	0.90	1.20	0.94	0.15
S6	0.81	5.31	1.00	1.25	0.94	0.12
S7	0.77	5.15	0.94	1.24	0.94	0.15
S8	0.88	5.67	1.41	1.22	0.79	0.09
S9	0.79	4.42	0.90	1.38	0.73	0.11
S10	0.86	5.67	1.03	1.29	0.95	0.13
S11	0.74	5.51	0.98	1.33	0.92	0.17
S12	0.79	5.14	0.90	1.20	0.94	0.15
S13	0.81	5.31	1.00	1.25	0.94	0.12
S14	0.77	5.15	0.93	1.25	0.94	0.15
S15	1.16	6.13	1.19	1.44	1.14	0.15
S16	1.10	5.86	1.17	1.48	1.10	0.15
S17	1.27	6.51	1.28	1.57	1.27	0.13
S18	1.09	6.13	1.20	1.43	1.15	0.16
S19	1.07	5.83	1.17	1.47	1.10	0.16
S20	1.16	6.13	1.19	1.44	1.14	0.15
S21	1.10	5.87	1.17	1.48	1.11	0.15
S22	1.26	6.51	1.28	1.57	1.27	0.13
S23	1.09	6.14	1.20	1.44	1.15	0.16
S24	1.07	5.83	1.17	1.48	1.10	0.16
S25	0.46	7.51	1.49	1.21	1.87	0.34
S26	0.31	7.55	1.77	1.90	1.39	0.40
S27	0.22	6.26	1.92	1.05	0.91	0.57
S28	0.30	6.77	1.38	1.10	1.25	0.55
S29	0.30	6.75	1.37	1.10	1.25	0.55

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1. 3′-羟基葛根素; 2. 葛根素; 3. 3′-甲氧基葛根素; 4. 葛根芹菜糖苷; 5. 大豆苷; 6. 大豆苷元; 符号表示同一成分质量分数间的水平差异, 与陕西组比较* $P<0.05$; 与安徽组比较# $P<0.05$。

图 6　不同产地葛根样品中各指标成分的量($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.6　Average content of different habitats Puerariae Lobatae Radix samples($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

测定结果表明,葛根饮片中 6 种异黄酮类成分以葛根素含量较高; 所分析的葛根饮片中,其葛根素质量分数为 4.42%~7.55%,均符合 2015 年版《中国药典》一部的标准; 统计学分析结果显示 3 个产地间葛根的 3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素含量均存在显著性差异,3′-羟基葛根素为安徽产区最高,为(1.14±0.08) %; 葛根素、3′-甲氧基葛根素河南产区含量最高,为(6.97±0.55) %,(1.58±0.24) %。葛根芹菜糖苷、大豆苷质量分数安徽产区最高,为(1.48±0.05) %,(1.15±0.06) %,与河南产区无显著性差异,但与陕西产区存在显著性差异。大豆苷元河南产区最高,为(0.48±0.10) %,与陕西、安徽存在显著性差异,但陕西和安徽产区之间无显著性差异。各产地 5 种异黄酮质量分数: 安徽 11.21%>河南 10.97%>陕西 9.38%。

葛根指纹图谱结合多成分含量测定的结果表明,同一成分在各产地葛根饮片中的含量差异明显,不同成分的波动范围不同。陕西产区的葛根饮片与安徽产区的葛根饮片相似度较高,质量稳定,且安徽产区的葛根饮片较为优质。河南产区葛根素含量最高,异黄酮类成分含量与其他 2 个产区差异较大。

3　讨论

3.1　实验条件的优化

本实验考察了回流提取法、超声提取法 2 种提取方法,同时比较了不同提取溶剂(30%,50%,80% 甲醇; 30%,50%,80% 乙醇) ,回流与超声无显著差异,且 50% 甲醇提取效果最佳,故选择 50% 甲醇超声的提取方法; 葛根指纹图谱方法的建立应尽量使得多数色谱峰分离,体现指纹图谱的整体性和模糊性,在进行全波长扫描,250 nm 检测条件下,色谱峰较多,各峰吸收均匀; 同时对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05% 甲酸、甲醇-0.05% 甲酸 4 个流动相进行了考察,发现乙腈-0.05% 甲酸作为流动相进行梯度洗脱各色谱峰分离度较好,分析时间 20 min 后无特征峰出现,建立了不同产地葛根 UPLC 指纹图谱; 同时,6 种异黄酮类成分在此条件下可实现分离及含量测定,该方法简便,稳定可靠,重复性好。

3.2　葛根饮片质量标准研究

本研究在 UPLC 同一色谱条件下完成了 3 个不同产地葛根饮片 6 种异黄酮类成分的含量测定和指纹图谱的建立。与普通的 HPLC 相比,UPLC 在分离方面有更快的分析速度,极大的缩小了样品成分分析所需要的时间[12],可较全面的反映葛根中化学成分的信息。同时采用模式识别的方法对三大产地的葛根共有峰进行多元统计分析,三大产地的饮片可归为 3 类,表明不同产地的葛根饮片有一定差异性,并找出了 3 个产地的 6 个主要差异性成分,通过对照品指认出了其中 3 种成分,分别为葛根芹菜糖苷、大豆苷、大豆苷元,这表明不同产地的地理、气候、土壤等因素会在葛根累积次生代谢产物过程中产生影响,从而导致质量的差异性。指纹图谱结合多成分含量测定相对于单一成分的含量测定可以从整体上反映葛根饮片的质量,但葛根的药效来自于一种成分还是多种成分目前还不明确,光靠某些成分含量高低难以全面评价葛根质量,为此,还需开展外观性状特征与内在成分间科学联系研究,完善葛根的饮片质量评价标准。

参考文献

[1]　中国药典.一部[S].2015: 333.

[2]　时晓媞, 贺志龙, 顾健, 等. 基于 5 种葛根异黄酮组分综合评分法优选葛根提取工艺[J]. 现代中药研究与实践, 2016(3) : 49.

[3]　侯筱婷. 葛根素对心脑血管疾病影响的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(14) : 2002.

[4]　刘倩, 范颖, 李新, 等. 黄芪葛根配伍调节糖尿病大鼠血糖血脂炎症的作用与机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11) : 81.

[5]　Ge B, Zhang Z, Zhong Z. Radix Puerariae Lobatae(Gegen) suppresses the anticoagulation effect of warfarin: a pharmacokinetic and pharmacodynamics study[J]. Chin Med, 2016, 11(1) : 1.

[6]　钟凌云, 马冰洁, 叶喜德, 等. 葛根主要药效成分止泻作用研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2015, 17(1) :

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

109.

[7] Liu M, Liu R, Wu H, et al. Radix Puerariae extracts ameliorate paraquat-induced pulmonary fibrosis by attenuating follistatin-like 1 and nuclear factor erythroid 2p45-related factor-2 signalling pathways through downregulation of miRNA-21 expression [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 16(1): 1.

[8] 邹纯才，鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年) 研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志，2018, 43(10): 1969.

[9] 刘东方，赵丽娜，李银峰，等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085.

[10] 郝敏，陆兔林，毛春芹，等. 3 种温郁金根茎炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志，2018, 43(11): 2288.

[11] 刘爱朋，郭利霄，薛紫鲸，等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的蒲公英药材质量控制研究 [J]. 中国中药杂志，2018, 43(18): 3715.

[12] 张帅，丛海林，于冰. 超高效液相色谱的发展及在分析领域的应用 [J]. 分析仪器, 2017(6): 16.

[责任编辑 曹阳阳]

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net