

蒙古黄芪主产区2种不同种植模式黄芪药材的质量比较

杜国军^{1,2}, 秦雪梅^{2*}, 李震宇¹, 何盼^{1,2}, 高凡茸^{1,2}, 李科¹, 周然^{3*}

1. 山西大学中医现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西中医学院, 山西 太原 030024

摘要: 目的 比较传统与2年生栽培蒙古黄芪药材的化学成分, 探讨化学成分差异性。方法 采集 HPLC-ELSD 指纹图谱信息, 测定指标成分黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总多糖、浸出物的量。对传统黄芪和2年生栽培黄芪样品进行指纹图谱相似度分析、代谢组学多元统计分析以及质量比较。结果 传统黄芪的毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总多糖量明显高于2年生栽培黄芪, 但二者的黄芪甲苷量和浸出物量没有差别; HPLC-ELSD 代谢组学分析技术可以将传统黄芪与2年生栽培黄芪明显区分开, 引起二者明显区别的主要差异性化学成分为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、峰4和5、黄芪皂苷II、峰13、黄芪皂苷I。结论 基于 HPLC-ELSD 代谢组学技术结合化学指标成分的测定, 可用于传统黄芪与2年生栽培黄芪的质量评价研究。

关键词: 蒙古黄芪; 指纹图谱; 代谢组学; 多元统计分析; HPLC-ELSD

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)23-3386-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.023

Comparative study on quality of *Astragali Radix* by two different planting patterns in major producing areas

DU Guo-jun^{1,2}, QIN Xue-mei², LI Zhen-yu¹, HE Pan^{1,2}, GAO Fan-rong^{1,2}, LI Ke¹, ZHOU Ran³

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

Abstract: Objective To compare the chemical constituents in traditional planted and two-year-old cultivated *Astragali Radix*, and to discuss the chemical differences. **Methods** The HPLC-ELSD fingerprint of *Astragali Radix* was collected, and the contents of astragaloside, calycosin-7-O- β -D-glucoside, total polysaccharide, and extract were also determined. The similarity analysis, metabolomic multivariate statistical analysis, and quality comparison were performed. **Results** The contents of calycosin-7-O- β -D-glucoside and total polysaccharide in traditional planted *Astragali Radix* were obviously higher than those in two-year-old cultivated *Astragali Radix*. But the contents of astragaloside and extract showed no difference. The two kinds of *Astragali Radix* could be distinguished by HPLC-ELSD metabolomic analysis. The differential metabolites were calycosin-7-O- β -D-glucoside, ononin, peaks 4, 5, 13, astragalosides I and II. **Conclusion** HPLC-ELSD metabolomic approach combined with the content determination of index components could be used for the quality evaluation of traditional planted and two-year-old cultivated *Astragali Radix*.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; fingerprint; metabolomics; multivariate statistic analysis; HPLC-ELSD

黄芪为常用大宗中药材, 具有补气、固表、利水消肿、托毒生肌等功效^[1]。史载于《神农本草经》, 列为上品^[2]。《中国药典》2010年版收载正品黄芪为

豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[3]。

收稿日期: 2013-02-16

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2011BA107B01); 山西省科技攻关项目(20100312027-6); 山西省中药材、中药饮片地方标准研究(2011014A)

作者简介: 杜国军(1988—), 男, 山西定襄人, 硕士, 主要从事中药质量控制与评价以及中药材质量标准的研究。

Tel: (0351)7011202 E-mail: guojundusxu@sina.com

*通信作者 秦雪梅 Tel: (0351)7011379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

周然 Tel: (0351)2272390 E-mail: zhour58@sohu.com

黄芪为多年生草本植物,传统上一直是野生或者仿野生栽培(采籽撒播于山野中任其生长)方式,至少生长4年以上,通常6~8年采收。建国后由于黄芪用量的急剧增长,这种采创困难的多年生传统黄芪不能满足需求,在20世纪70~80年代,甘肃、内蒙、山西等地探索的育苗移栽2年生蒙古黄芪栽培技术获得成功,得到大面积推广,形成了以甘肃陇西栽培2年生蒙古黄芪的主产区,总体商品格局以甘肃产栽培蒙古黄芪量最大,山西、内蒙古、陕西另保留有少量的传统蒙古黄芪。虽然在产量上满足了国内市场的供应,但在海外市场,传统蒙古黄芪却一直受到青睐。目前,主产于山西恒山山脉的浑源、应县、代县等地的野生或半野生传统蒙古黄芪,称为“正北芪”或“恒山黄芪”,其主根粗长,俗称“鞭杆芪”,具有粉性足、豆腥味浓等特点。

近年来国内外学者以黄酮类或皂苷类成分为指标的测定对不同来源的黄芪进行了大量的比较研究^[4-15],结果表明,2种植模式蒙古黄芪从量上都达到《中国药典》2010年版规定的要求,且2年生栽培黄芪甲苷量甚至超过传统黄芪。许多学者,如陈士林等^[16]、胡世林等^[17]均指出应系统评价2类黄芪的质量差异。为了系统阐明传统和2年生栽培蒙古黄芪的化学差异,本课题组以21份山西传统黄芪样本和8份甘肃等地2年生栽培黄芪样本为对象,进行了指纹图谱^[18]、代谢组学^[19]和定量测定比较。测定《中国药典》2010年版中规定的指标成分,并通过HPLC-ELSD指纹图谱结合代谢组学分析中的多元统计方法^[19]对传统黄芪与2年

生栽培黄芪进行系统的化学比较。

1 材料与试剂

1.1 仪器

戴安 UltiMate 3000 高效液相色谱仪、Alltech ELSD 2000ES 检测器、Chromeleon 色谱工作站(美国戴安公司); Waters 1525 高压泵、Waters 2487 紫外检测器、Breeze 色谱工作站(美国 Waters 公司); 大连依利特 P230 高压恒流泵、Chromachem ELSD 检测器、EC2000 色谱工作站(大连依利特公司); 超声波清洗器 KQ—300 型(江苏昆山市超声仪器有限公司); UV—7501 紫外/可见分光光度计(无锡科达仪器厂); 旋转蒸发器 RE—52A(上海亚荣生化仪器厂); Sartorius BSA124S 分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110781-200613); 黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、环黄芪醇对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号依次为 1443-091113、1443-091109、1443-091115、1445-091105),质量分数均大于 98%。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷对照品(上海永恒生物科技有限公司)质量分数均大于 98%。

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司); 水为纯净水(娃哈哈有限公司); 其他试剂均为分析纯; 黄芪药材经山西大学秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。标本保存在山西大学中医药现代研究中心。黄芪药材详细情况见表 1。

表 1 不同产地蒙古黄芪药材表

Table 1 Samples of *Astragali Radix* from different habitats

编号	产地	生长方式	生长年限	编号	产地	生长方式	生长年限
DH-01	浑源黄涯村	仿野生	6 年	DH-16	阳高罗文皂	野生	未知
DH-02	浑源王家沟	仿野生	7 年	DH-17	内蒙古商都	野生	未知
DH-03	浑源麻地沟	仿野生	7 年	DH-18	内蒙古兴和	野生	未知
DH-04	应县梨树坪	野生	未知	DH-19	五寨芦芽山	仿野生	4~5 年
DH-05	应县白马寺	野生	未知	DH-20	五寨丘陵	仿野生	4 年
DH-06	应县三条岭	野生	未知	DH-21	山西五寨	仿野生	5 年
DH-07	应县双钱树	野生	未知	EH-01	山西五寨	栽培	2 年
DH-08	代县分水岭	野生	未知	EH-02	山西浑源	栽培	2 年
DH-09	代县滩上乡	野生	未知	EH-03	内蒙固阳	栽培	2 年
DH-10	浑源东十字	仿野生	7 年	EH-04	甘肃渭源	栽培	2 年
DH-11	浑源后兑沟	野生	未知	EH-05	甘肃陇西	栽培	2 年
DH-12	浑源麻黄沟	野生	未知	EH-06	甘肃岷县	栽培	2 年
DH-13	浑源土岑村	野生	未知	EH-07	内蒙赤峰	栽培	2 年
DH-14	浑源东石字	野生	未知	EH-08	甘肃陇西	栽培	2 年
DH-15	天镇新平堡	野生	未知				

2 方法

2.1 黄芪甲苷的测定

黄芪样品处理及测定方法参考本实验室改进方法^[18]测定。

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-水(34:66)为流动相;蒸发光散射检测器检测。理论塔板数按黄芪甲苷峰计算应不低于4 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成含0.5 mg/mL黄芪甲苷的对照品溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品中粉约4 g,精密称定,置锥形瓶中,加甲醇150 mL,氨水15 mL,密塞,超声处理60 min,抽滤,滤渣用甲醇洗涤3次,每次30 mL,合并滤液,蒸干,残渣加水10 mL使溶解,放冷,通过D-101大孔吸附树脂柱(内径1.5 cm,长12 cm),以水50 mL洗脱,弃去水液,再用30%乙醇80 mL洗脱,弃去洗脱液,继用95%乙醇120 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,取上清液过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液10、20 μL,供试品溶液10~20 μL,注入液相色谱仪,测定,用外标两点法对数方程计算,即得。

2.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定

按《中国药典》2010年版一部黄芪项下规定的毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定方法测定^[3]。

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相(A),以0.2%甲酸溶液为流动相(B)梯度洗脱,0~20 min,20%~40% A;20~30 min,40% A;检测波长为260 nm。理论塔板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算应不低于3 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成50 μg/mL毛蕊异黄酮葡萄糖苷的对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,加热回流4 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.3 总多糖的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 取无水葡萄糖对照品适量,精密称定,加水制成含无水葡萄糖0.4 mg/mL的溶液,即得。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液3、4、5、6、7、8 mL分别置50 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密量取上述各溶液2 mL,置具塞试管中,分别加5%苯酚溶液1 mL,涡旋,使混匀,迅速加入硫酸5 mL,涡旋,使混匀,于沸水浴中保持15 min,取出,置冰水浴中迅速冷却至室温,取出,以相应试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010年版一部附录VA),在488 nm波长处测定吸光度(A)值,以A值为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2.3.3 供试品溶液的制备及测定方法 取黄芪粗粉约1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加水100 mL,加热回流1 h,静置,取上清液,如上重复提取1次,离心,2次滤液合并,浓缩至适量,转移至100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,精密量取5 mL,加乙醇26 mL,涡旋,使混匀,离心,取沉淀加水溶解,置50 mL量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。精密量取2 mL,按照标准曲线的制备项下方法,自“加5%苯酚溶液1 mL”起,依法测定A值,从标准曲线上读出供试品溶液中无水葡萄糖的质量,计算,即得。

2.3.4 精密度试验 取DH-05号供试品溶液测定A值,连续测定6次,其RSD为0.02%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取DH-05号供试品溶液,分别在制备后0、2、4、8、12、24 h时测定其A值,RSD值为2.28%,结果表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.6 重复性试验 精密称取DH-05号黄芪样品6份,按供试品方法进行备样,测得多糖的平均质量分数为10.68%,RSD值为2.94%,符合方法学考察要求。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取已测定黄芪总多糖量的黄芪样品,精密加入葡萄糖对照品0.061 9、0.060 5、0.060 0 g,按供试品制备方法制成供试液,测定总多糖质量分数,计算得总多糖加样回收率RSD值均小于3.00%。

2.4 传统黄芪与2年生黄芪浸出物量比较

黄芪样品浸出物测定方法按照《中国药典》2010年版一部黄芪项下浸出物测定法测定^[2]。

2.5 统计学分析

有效成分测定数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS16.0 进行数据统计分析。传统黄芪与2年生黄芪间显著性差异比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2.6 HPLC-ELSD 指纹图谱与代谢轮廓分析

2.6.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 色谱柱 VenusilMP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相乙腈(A)-水(B)溶液梯度洗脱, 洗脱程序为 0~8 min, 20% A; 8~15 min, 20%~30% A; 15~30 min, 30%~43% A; 30~40 min, 43%~60% A; 40~50 min, 60%~100% A; 50~60 min, 100% A; 60~65 min, 100%~20% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; ELSD 检测器漂移管温度 105 $^{\circ}$ C, 气体体积流量 2.5 L/min。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷、环黄芪醇、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素对照品适量, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 配制质量浓度分别为 0.11、0.13、0.13、0.14、0.16、0.12、0.37、0.21、0.04 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.6.3 供试品溶液的制备 取黄芪粉末约 2 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加甲醇 70 mL, 加热回流 3 h, 提取液过滤, 回收溶剂并浓缩至干, 用甲醇超声充分溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 静置, 取上清液, 滤过, 即得。

2.6.4 稳定性试验 取 DH-07 号供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 时检测指纹图谱。结果表明, 各主要色谱峰相对保留时间和单峰面积占总峰面积 5%以上峰的面积比值均无明显变化, 其 RSD 均在 5.0%以内, 供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6.5 精密度试验 取 DH-07 号供试品溶液, 按供试品溶液制备方法制备供试品, 连续进样 6 次, 检测指纹图谱。结果表明, 各主要色谱峰相对保留时间和单峰面积占总峰面积 5%以上峰的面积比值均无明显变化, 其 RSD 均在 5.0%以内, 符合指纹图谱要求。

2.6.6 重复性试验 取同一样品 6 份, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备供试品, 分别进样, 检

测指纹图谱。结果表明, 各主要色谱峰相对保留时间和单峰面积占总峰面积 5%以上峰的面积比值均无明显变化, 其 RSD 值均在 5.0%以内, 符合指纹图谱要求。

2.6.7 样品的测定 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 记录色谱图, 即得。

2.6.8 HPLC-ELSD 色谱图处理和代谢分析 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》2008 版 (V1.1), 以生成的特征指纹图谱共有模式为对照计算各批次样品的相似度。将实验所得的样品色谱峰的信息, 包括保留时间、色谱峰序号、色谱峰面积等参数输入 Microsoft Office Excel 表格。对各黄芪样品峰面积数据进行归一化, 归一化后数据矩阵为 29×22, 采用 SPSS16.0 软件聚类分析中离差平方和法, 利用欧氏距离作为样品的测度, 对这 29 批样品进行分类。并且采用 SIMCA-P 11.0 软件 (Umetrics, Umeå, Sweden) 进行主成分分析法 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 分析, 通过载荷图 (loading 图) 中的 VIP 值 (每个主成分变量对分开各组的贡献大小) 来寻找差异性标志物。

3 结果与分析

3.1 黄芪有效成分黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总多糖、浸出物的测定结果比较

每份样品平行备样 3 次, 4 种成分的测定结果以其平均值表示, 结果见表 2。再分别对传统黄芪样品和 2 年生黄芪进行分析, 传统黄芪甲苷质量分数为 $(0.111 \pm 0.021)\%$, 2 年生黄芪甲苷质量分数为 $(0.096 \pm 0.024)\%$; 传统黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数为 $(0.114 \pm 0.030)\%$, 2 年生黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数为 $(0.062 \pm 0.014)\%$; 传统黄芪多糖质量分数为 $(11.43 \pm 2.79)\%$, 2 年生黄芪多糖质量分数为 $(8.77 \pm 1.47)\%$; 传统黄芪浸出物质量分数为 $(32.56 \pm 1.37)\%$, 2 年生黄芪浸出物质量分数为 $(31.73 \pm 4.50)\%$ 。分别对 2 类样品 4 种成分进行 t 检验, 结果表明, 与 2 年生速生黄芪相比, 传统黄芪的毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总多糖量均具有显著性差异。

3.2 HPLC-ELSD 指纹图谱共有峰指认与相似度评价

取传统黄芪 DH-07 样品和 2 年生栽培黄芪 EH-06 样品, 按照“2.6”项方法, 绘制 HPLC-ELSD

表2 有效成分的测定结果

Table 2 Determination of active components

样品编号	黄芪甲苷 / %	毛蕊异黄酮苷 / %	总多糖 / %	浸出物 / %
DH-01	0.101	0.112	13.10	30.20
DH-02	0.107	0.122	10.58	34.25
DH-03	0.103	0.148	10.06	34.83
DH-04	0.118	0.123	17.16	32.68
DH-05	0.121	0.124	10.70	32.14
DH-06	0.151	0.123	12.82	32.21
DH-07	0.120	0.130	18.91	32.80
DH-08	0.106	0.102	10.14	31.30
DH-09	0.116	0.119	8.95	32.77
DH-10	0.118	0.129	12.37	33.05
DH-11	0.107	0.172	13.36	33.23
DH-12	0.124	0.122	9.23	33.69
DH-13	0.111	0.110	11.62	31.96
DH-14	0.116	0.121	10.21	33.14
DH-15	0.078	0.088	7.41	32.67
DH-16	0.106	0.137	9.99	32.29
DH-17	0.063	0.081	13.30	28.64
DH-18	0.118	0.103	10.11	31.59
DH-19	0.069	0.130	12.24	33.53
DH-20	0.150	0.051	10.19	32.87
DH-21	0.122	0.037	7.62	33.88
EH-01	0.061	0.063	7.27	37.36
EH-02	0.116	0.031	9.39	32.04
EH-03	0.085	0.073	8.41	25.27
EH-04	0.115	0.070	7.21	28.53
EH-05	0.070	0.056	7.23	30.30
EH-06	0.104	0.058	11.06	29.34
EH-07	0.089	0.077	10.19	32.17
EH-08	0.128	0.066	9.38	38.83

指纹图谱, 见图 1。随机选取不同黄芪样品, 建立指纹图谱, 见图 2。共生成 22 个共有指纹峰, 峰 1~22 保留时间分别为 9.95、19.18、20.23、20.79、21.70、23.60、26.81、28.94、29.60、32.80、33.55、34.72、35.29、38.68、39.75、41.58、45.09、46.33、47.56、50.98、52.79、54.10 min。采用对照品对照的方法指认其中 9 个色谱峰, 峰 1 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 峰 2 为芒柄花苷, 峰 6 为毛蕊异黄酮, 峰 8 为黄芪甲苷, 峰 9 为黄芪皂苷 III, 峰 10 为黄芪皂苷 II, 峰 11 为芒柄花素, 峰 14 为黄芪皂苷 I, 峰 16 为环黄芪醇。由图 2 可知, 黄酮类成分基本位于色谱图的前半段, 而皂苷类成分大多位于色谱图的后半部分。

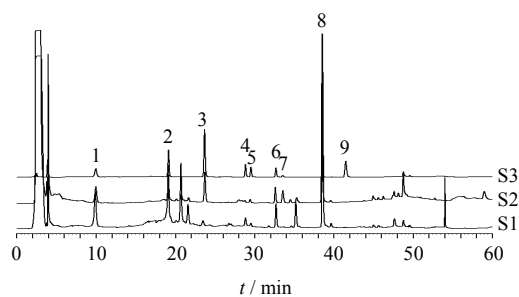
使用中国药典委员会的《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》2008 版 (V1.1), 通过色谱峰多点校正的方法, 对 DH-01~DH-21 号传统黄芪样品的色谱峰

进行匹配并自动生成对照指纹图谱 R (图 2)。计算各样品之间的相似度, 结果见表 3。

由表 3 可知, 传统黄芪相似度除 DH-21 为 0.908 外, 其余相似度均在 0.924 以上, 而除 EH-01、EH-03 外, 其余 2 年生黄芪相似度均在 0.92 以下, 说明通过相似度评价软件能初步将传统黄芪与 2 年生黄芪指纹图谱部分分开, 但仅仅通过相似度评价并不能明显对传统黄芪与 2 年生黄芪进行区别。

3.3 HPLC-ELSD 指纹图谱聚类分析

聚类结果清晰地分为 2 大类, 第一类为传统黄芪组 (I), 第二组为 2 年生黄芪组 (II), 见图 3。而样本 DH-21、EH-01、EH-03 未聚入相应的类别, 与相似度结果一致。其中, 第一大类传统黄芪组又分为 4 个小类, DH-04~DH-09 号为产自山西省恒山相邻的应县和代县的黄芪野生样品聚为一个小组, DH-01、DH-02、DH-11 聚为一个小组,



S1-传统黄芪 DH-07 样品 S2-2 年生栽培黄芪 EH-06 样品
S3-混合对照品 1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2-芒柄花苷 3-毛蕊异
黄酮 4-黄芪甲苷 5-黄芪皂苷 III 6-黄芪皂苷 II
7-芒柄花素 8-黄芪皂苷 I 9-环黄芪醇
S1-DH-07 sample of traditional planted *Astragali Radix* S2-EH-06
sample of two-year-old cultivated *Astragali Radix* S3-mixture of
reference substances 1-calycosin-7-O-β-D-glucoside 2-ononin
3-calycosin 4-astragaloside IV 5-astragaloside III 6-astragaloside
II 7-formononetin 8-astragaloside I 9-cycloastragenol

图 1 HPLC-ELSD 图谱

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms

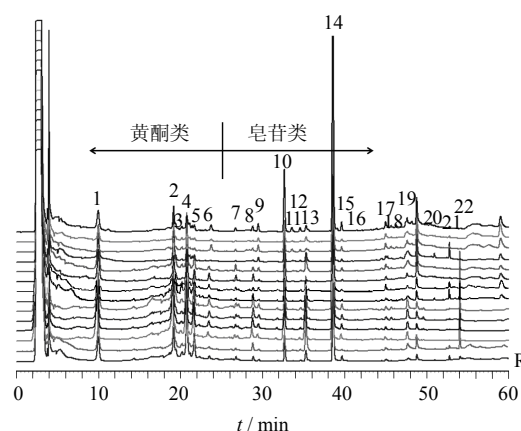


图 2 随机选取不同黄芪样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of *Astragali Radix* from different habitats

DH-03、DH-10 为一个小组, DH-12 和 DH-13、DH-14 聚为一个小组, 此 8 个样品均为产自山西浑源县的传统黄芪样品, DH-15、DH-16、DH-18 3 个样品分别来自山西天镇、山西阳高、内蒙古兴和县野生黄

表 3 指纹图谱相似度分析结果

Table 3 Results of fingerprint similarity analysis

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
DH-01	0.983	DH-09	0.981	DH-17	0.927	EH-04	0.907
DH-02	0.957	DH-10	0.984	DH-18	0.993	EH-05	0.919
DH-03	0.975	DH-11	0.987	DH-19	0.957	EH-06	0.913
DH-04	0.967	DH-12	0.960	DH-20	0.928	EH-07	0.910
DH-05	0.959	DH-13	0.928	DH-21	0.908	EH-08	0.874
DH-06	0.962	DH-14	0.924	EH-01	0.948		
DH-07	0.983	DH-15	0.952	EH-02	0.879		
DH-08	0.952	DH-16	0.975	EH-03	0.935		

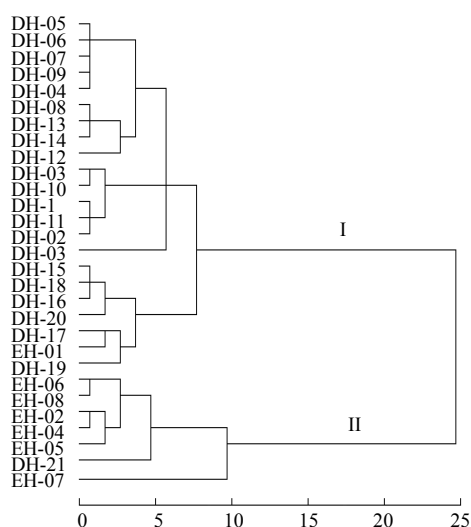


图 3 HPLC-ELSD 指纹图谱聚类分析

Fig. 3 HPLC-ELSD fingerprint hierarchical clustering analysis

芪样品, 此 3 个地点从地理位置来看比较接近, 故聚为一个小组。第二大类中, EH-02、EH-04、EH-05、EH-06、EH-08 5 个样品中除 EH-02 外, 其余均为产自甘肃的 2 年生栽培黄芪。EH-07 为内蒙古赤峰 2 年生栽培黄芪。EH-01 与 EH-03 分别为产自山西五寨县和内蒙古固阳县的 2 年生栽培黄芪, 但此 2 个产地为异常值聚入传统黄芪组, 对其性状特征进行进一步研究发现, 此两个产地黄芪与仿野生黄芪性状较为相同, 而与 2 年生栽培黄芪性状则有所不同, 这可能是其聚类分析结果异常的原因。DH-21 虽属山西五寨县传统黄芪, 但因其性状完全不同于其他传统黄芪。结合表 3 与图 3 结果可知, 相似度分析与聚类分析结果一致。

3.4 HPLC-ELSD 指纹图谱主成分分析

对传统黄芪和 2 年生黄芪进行 PCA 分析, 以色谱图中 22 个色谱峰的峰面积构成的数据矩阵

(29×22)进行多元统计分析,统计分析结果见图4。由图4-A中PCA散点图可见,传统黄芪与2年生黄芪沿PC1轴明显分开,第一主成分贡献率为32.3%,第二主成分贡献率为13.5%,说明二者化学组成差异较大。传统黄芪样本较为集中,原因在于产地较为集中,均为山西恒山及其周边地区。2年生黄芪样本较为分散,原因在于样本产地较多,分别为甘肃、山西、内蒙等。图中样品EH-01虽然是产自山西五寨县2年生栽培黄芪,却处于传统黄芪组,为异常值。但在聚类分析中处于传统黄芪组的样品EH-03,却被主成分分析正确分开。样品EH-07处于PCA分析置信区间

外,可能由于其产地为内蒙古赤峰,从地理位置来看处于内蒙古东部,属于我国东北部,因此与其他样品所处地理环境不同所造成的,且从定量测定结果来看,其毛蕊异黄酮葡萄糖苷量为2年生栽培黄芪中最高。产自山西五寨传统黄芪DH-21处于栽培黄芪组的最边缘,原因可能是其外观性状完全不同于其他传统黄芪导致化学成分的差异所造成的;同时结合测定结果可知其各项指标均与2年生栽培黄芪样品测定结果接近。结合图3与图4-A结果可知,指纹图谱聚类分析结果与主成分分析结果一致。

根据OPLS-DA载荷图(图4-B)与S-plot图(图

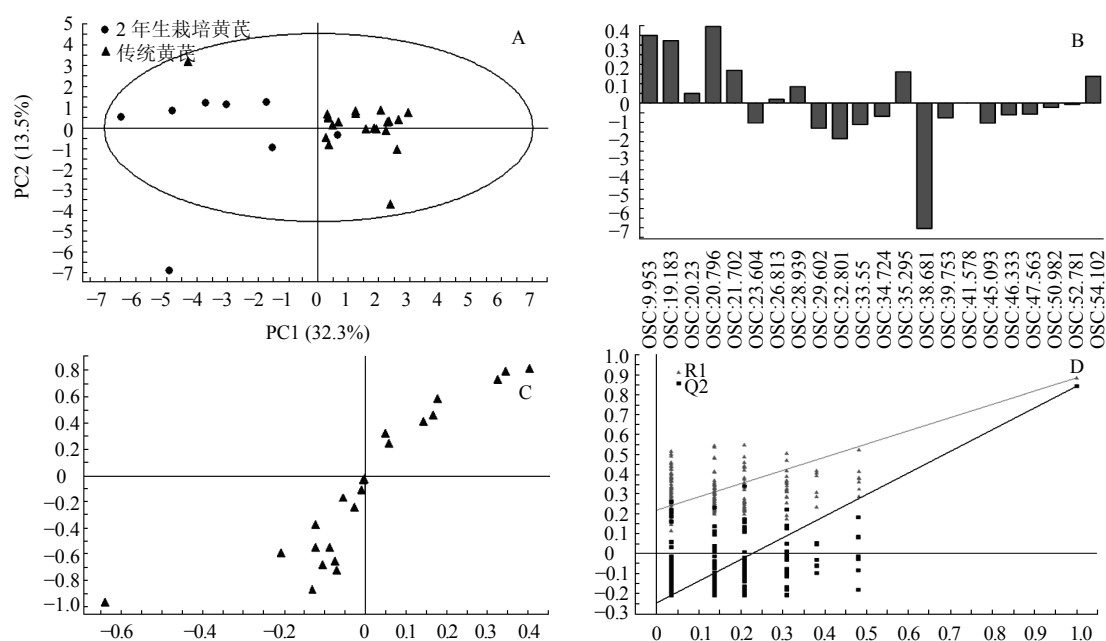


图4 PCA散点(A)、OPLS-DA载荷(B)、S-plot(C)、模型有效性交叉验证(D)图
Fig. 4 S-Plot of PCA (A), loading of OPLS-DA (B), S-plot (C), and cross-validation (D)

4-C)可知,引起传统黄芪与2年生黄芪差异性的主要成分为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(峰1)、芒柄花苷(峰2)、峰4、5、黄芪皂苷II(峰10)、峰13、黄芪皂苷I(峰14)。模型有效性交叉验证图(图4-D)参数为 $R^2=0.89$ 和 $Q^2=0.84$,说明OPLS-DA模型都有效可用。

与2年生黄芪相比,传统黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、峰4、5、13量较高,而黄芪皂苷II、黄芪皂苷I量较低。主成分分析结果与毛蕊异黄酮葡萄糖苷测定结果一致。此外,本课题组采用单变量分析中的 t 检验对7个主要差异性成分相对峰面积进行了检验,结果显示7个差异性成分均具有显著性差异。

4 讨论

4.1 黄芪有效成分的测定

本研究中分别测定了黄芪药材中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总多糖、浸出物4项指标的量。结果显示传统黄芪与2年生黄芪中黄芪甲苷量和浸出物量均无显著性差异,而传统黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷量与总多糖量明显高于2年生黄芪,这与文献报道结果一致^[5]。

4.2 黄芪HPLC-ELSD指纹图谱的研究

本研究中的HPLC-ELSD检测器可以同时对照苷类和黄酮类成分的整体指纹轮廓进行检测。传统的指纹图谱研究仅局限于相似度分析与聚类分析,而本研究在传统与2年生栽培黄芪药材的HPLC-

ELSD 指纹图谱的对比研究中,又引入了代谢组学技术中多元统计分析对传统与2年生蒙古黄芪药材的HPLC-ELSD指纹图谱进行评价,旨在寻找差异性成分。

相似度评价结果显示,传统黄芪与2年生栽培黄芪相似度较高,均在0.90以上,但传统黄芪之间的相似度更高,在0.92以上。聚类分析结果显示,除少数样本外,2种黄芪可初步区分,结果与相似度分析一致。本研究采用代谢组学分析中的多元统计分析方法对两种黄芪进行了进一步的分析。首先通过无监督模式识别方法主成分分析法(PCA)把两种黄芪区分开,表明有较大差异。然后通过正交偏最小二乘判别分析方法(OPLS-DA、S-plot)找到造成两种黄芪的7个差异化合物,对于通过OPLS-DA、S-plot找出的差异性化合物,采用单变量分析 t 检验进行进一步验证,结果显示2种黄芪中差异性成分均具有显著性差异,也从另一方面证明OPLS-DA、S-plot的有效性。最后通过模型有效性交叉验证图验证PCA、OPLS-DA、S-plot模型有效可用。

虽然聚类分析结果显示EH-01与EH-03号栽培黄芪样品聚为传统黄芪组,但是PCA结果却能够将EH-03号栽培黄芪样品与恒山黄芪组明显分开,但EH-01依然未分开,可见PCA分析对于指纹图谱的差异分析具有一定优势,值得推广普及。

本研究显示,相似度分析关注的是样本之间的相似性,无法确定其差异性,而代谢组学中的多元统计分析不仅能明确样本之间的分组聚类情况,而且能确定引起差异的具体化学成分。并且本研究在对指纹图谱的数据分析中采用多种方法的相互印证,如相似度与聚类分析的印证;PCA与聚类分析的印证。因此,在中药质量评价中,代谢组学^[19]分析与相似度分析具有很大的互补性,并且提高了分析结果的可靠性。

参考文献

- [1] 孙洁,张蕾,张晓拢,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 138-143.
- [2] 顾观光. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [4] Liu J, Zhao Z Z, Chen H B. Review of *Astragali Radix* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 90-105.
- [5] 胡明勋,郭宝林,周然,等. 山西浑源仿野生栽培蒙古黄芪的质量研究[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1829-1834.
- [6] Wu T, Bligh A, Gu L H, et al. Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial *Radix Astragali* by HPLC-UV [J]. *Fitoterapia*, 2005, 76: 157-165.
- [7] Qi L W, Yu Q T, Li P et al. Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134: 162-169.
- [8] Song J Z, Yiu H H W, Qiao C F, et al. Chemical comparison and classification of *Radix Astragali* by determination of isoflavonoids and astragalosides [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47: 399-406.
- [9] Qi L W, Li P, Ren M T, et al. Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of *Radix Astragali* and its preparations [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2087-2097.
- [10] 罗舟,苏明智,颜鸣,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 458-462.
- [11] 王平,梁逸曾. HPLC-DAD-MS研究黄芪的化学成分[J]. 中草药, 2011, 42(2): 226-229.
- [12] 覃红萍,鲁静,林瑞超. HPLC-ELSD法测定黄芪药材中黄芪皂苷I、II、III、IV [J]. 中草药, 2009, 40(3): 471-473.
- [13] 李英,秦雪梅,郭小青,等. 不同产地黄芪中黄芪甲苷含量比较研究[J]. 中国现代中药, 2007, 9(9): 9-11.
- [14] 姚雪莲,裴彩云,王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 797-801.
- [15] 陈有根,辛敏通,杨滨. 野生与栽培黄芪中毛蕊异黄酮苷的测定[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1484-1485.
- [16] 陈士林,魏建和,孙成忠,等. 中药材产地适宜性分析地理信息系统的开发及蒙古黄芪产地适宜性研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2006(3): 47-53.
- [17] 胡世林,刘岱,崔淑莲,等. 安国引种黄芪的质量初步评价[J]. 中草药, 1999, 30(6): 453-455.
- [18] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- [19] 王雪洁,李震宇,薛水玉,等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1727-1737.
- [20] 杜国军,秦雪梅,李震宇,等. 山西省中药材标准道地黄芪含量测定方法的建立[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(2): 23-27.
- [21] 范刚,周林,赖先荣,等. 基于代谢组学技术的中药质量控制研究思路探讨[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010(6): 870-875.