

黄芪生态型与品质的相关性研究

杨庆珍^{1,2}, 刘德旺³, 王冬梅¹, 付娟¹, 黄林芳^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118

3. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010080

摘要: 目的 测定鞭杆芪、直根芪、二叉芪和鸡爪芪4种生态型黄芪中黄芪甲苷及黄酮类成分的量, 分析生态型与质量之间的相关性。方法 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定黄芪中黄酮类及黄芪甲苷量。对所测数据进行主成分分析(PCA)和聚类分析(CA)。结果 4种生态型黄芪的黄酮类成分及黄芪甲苷量高低顺序为鞭杆芪>直根芪>二叉芪>鸡爪芪; PCA分析结果表明4种生态型黄芪彼此可以很好地区分; CA结果显示直根芪与鞭杆芪聚为一支, 表明直根芪与鞭杆芪质量相近, 较好; 而二叉芪与鸡爪芪聚为一支表明两者质量相近, 较差。结论 4种生态型黄芪的质量优劣顺序鞭杆芪>直根芪>二叉芪>鸡爪芪, 黄芪的质量与生态型紧密相关。

关键词: 黄芪; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 槲皮素; 毛蕊异黄酮; 山柰酚; 芒柄花素; 生态型; 相关性; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R282.23

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)16-2395-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.022

Correlation on quality and ecotype of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*

YANG Qing-zhen^{1,2}, LIU De-wang³, WANG Dong-mei¹, FU Juan¹, HUANG Lin-fang¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010080, China

Abstract: Objective To determine the contents of astragaloside and flavonoids in four ecotypes of *A. membranaceus*, which are whip pole type, taproot type, binary type, and chicken feet type, and analyze the correlation between ecotypes and quality.

Methods The contents of astragaloside and flavonoids in *A. membranaceus* were determined by UPLC, and the measured data were analyzed by principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA). **Results** The order of contents of astragaloside and flavonoids in *A. membranaceus* was whip pole type > taproot type > binary type > chicken feet type; PCA revealed that four ecotypes of *A. membranaceus* could be separated significantly; CA showed that each ecotype of *A. membranaceus* could be clustered into one class perfectly. **Conclusion** The quality of *A. membranaceus* is closely associated with ecotypes. The quality merits of the order of four ecotypes of *A. membranaceus* is whip pole type > taproot type > binary type > chicken feet type.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; astragaloside; campanulin; ononin; quercetin; calycosin; kaempferol; formononetin; ecotype; correlation; principal component analysis; cluster analysis

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。其具有补气固表、利尿排脓、敛疮生肌的功效^[1]。黄芪药性温和, 有“补气固表之圣药”的美誉, 应用非常广泛, 已有2 000多年的

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274013); 国家自然科学基金重点项目(81130069); 国家重大科技专项创新药(2011ZX09307-002-01)

作者简介: 杨庆珍(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源学。

*通信作者 黄林芳, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源与质量评价研究。Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

应用历史^[2]。蒙古黄芪主产于山西、内蒙古、河北、甘肃等地^[3-5]，是黄芪栽培和商品流通中的主流品种。生态型(ecotype)是指种内因适应分布区不同生态条件所形成的变异类群。同一物种在不同的环境及人工栽培技术条件下，形态上表现出差异形成不同生态型，而这种种内变异是产生中药材品质优劣和疗效差异的实质^[6]。由于黄芪在长期栽培过程中根部发生变异，表现出黄芪生态型的特征，主要有鸡爪型(鸡爪芪)、直根型(直根芪)、二叉型(二叉芪)和鞭杆型(鞭杆芪)4种^[7-9]。

中药材质量的优劣主要取决于其性状特征和活性成分量，目前对黄芪的4种生态型与内在的化学成分之间的相关性研究尚未见报道^[7]。本实验通过测定4种生态型黄芪中黄酮类(毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、槲皮素、毛蕊异黄酮、山柰酚、芒柄花素)及皂苷类(黄芪甲苷)活性成分量，利用主成分分析(PCA)及聚类分析(CA)方法评价4种生态型黄芪的质量，探讨黄芪的4种生态型与质量的相关性，为药材黄芪资源的合理利用与可持续发展提供科学依据。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司，包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower 2 色谱工作站); KQ—400KDE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);

AB135—S 电子分析天平(Mettler); ELGA PURELAB Classic-UVF 纯水仪(英国); FZ102 型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

乙腈、异丙醇、甲醇均为色谱纯、水为超纯水(自制)。黄芪甲苷(批号 110781-200613)、芒柄花素(批号 111703-200602)、山柰酚(批号 110861-200808)及槲皮素(批号 100081-200907)4种对照品购自中国食品药品检定研究院。芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷购于北京恒元启天化工技术研究院，质量分数均大于 98%。

1.2 材料

本研究所用黄芪来源于甘肃、山西、内蒙古，见表 1。药材由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳副研究员鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao。

2 方法

2.1 黄芪甲苷的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)，流动相为乙腈-水(8:2)等梯度洗脱，进样量为 2 μL，体积流量为 0.25 mL/min，柱温为 30 ℃。ELSD 参数：温度为 45 ℃，N₂ 压力为 172.375 MPa，氮气体积流量为 2.74 mL/min。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定黄芪甲苷对照品 2.60 mg 置于 10 mL 量瓶中，加少量甲醇溶解，再加甲醇至刻度，振摇使之充分混合均匀，即得对照品储备液，待用。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	生态类型	种植方式	采收时间	产地
B01	鞭杆芪	栽培	2012-10-29	山西大同市浑源县官儿乡官儿村
B02	鞭杆芪	栽培	2012-10-29	山西大同市浑源县官儿乡清湾村
B03	鞭杆芪	栽培	2012-10-29	山西大同市浑源县官儿乡小木沟村
B04	鞭杆芪	栽培	2012-10-29	山西大同市浑源县官儿乡麻庄村
Z05	直根芪	栽培	2012-10-27	内蒙古乌兰察布市科布尔镇朴然新村
Z06	直根芪	栽培	2012-10-27	内蒙古包头市固阳县南门村
Z07	直根芪	栽培	2012-10-27	内蒙古乌兰察布市四王子旗大清河北部
Z08	直根芪	栽培	2012-10-27	内蒙古包头市固阳县兴顺西乡朱换地
E09	二叉芪	栽培	2012-10-22	甘肃定西市岷县麻子川乡绿叶村
E10	二叉芪	栽培	2012-10-23	甘肃定西市岷县梅川镇车路村
E11	二叉芪	栽培	2012-10-23	甘肃定西市岷县梅川镇车路村
E12	二叉芪	栽培	2012-10-23	甘肃定西市岷县梅川镇红星村
J13	鸡爪芪	栽培	2012-10-21	甘肃定西市岷县寺沟乡纸坊村
J14	鸡爪芪	栽培	2012-10-22	甘肃定西市岷县寺沟乡扎地村
J15	鸡爪芪	栽培	2012-10-22	甘肃陇南市宕昌县阿坞乡西迭村
J16	鸡爪芪	栽培	2012-10-23	甘肃定西市岷县梅川镇红水村

2.1.3 供试品溶液的制备 取干燥的黄芪药材, 用粉碎机粉碎, 粉末过四号筛, 称取过筛后的粉末约 2.0 g, 置具塞三角瓶中, 加入甲醇 25 mL, 超声处理 60 min, 放置至室温, 取上层液体, 过滤到 25 mL 量瓶中, 加甲醇补至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 所得滤液即可进行 UPLC 分析。

2.1.4 线性关系的考察 精密移取对照品储备液 100、200、400、600、800、1 000 μL 置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀。在“2.1.1”色谱条件下进样分析, 以黄芪甲苷质量浓度的对数值为横坐标 (X), 峰面积的对数值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得到黄芪甲苷的回归方程为 $Y=1.972\ 4\ X+1.080\ 6$, $r=0.999\ 4$ 。结果表明, 黄芪甲苷在 26~260 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 吸取黄芪甲苷对照品储备液, 在“2.1.1”色谱条件下重复进样 6 次, 每次进样 2 μL 测定, 计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 值为 1.71%, 说明实验仪器的精密度较好。

2.1.6 稳定性试验 取同一份药材样品, 按照“2.1.3”的方法制备供试品溶液, 在室温下分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 内进行测定, 以峰面积为指

标计算黄芪甲苷的 RSD 值为 1.48%, 说明供试品溶液能够在 24 h 内保持稳定。

2.1.7 重复性考察 取黄芪粉末 2.0 g, 按照“2.1.3”制备供试品溶液, 平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.1”色谱条件下进行分析, 计算黄芪甲苷质量分数的 RSD 值为 1.53%, 说明实验重复性较好。

2.1.8 加样回收率试验 取同一批黄芪样品 6 份, 每份样品约 1.0 g, 分别精密加入黄芪甲苷对照品甲醇溶液 1 mL, 室温挥干, 按照“2.1.3”项制备供试品溶液, 测定, 加样回收率为 99.8%, RSD 小于 3%。

2.1.9 样品的测定 取所收集的 16 批次黄芪样品粉碎后过四号筛, 精密称定 2.0 g, 按照“2.1.3”项制备供试品溶液, 在“2.1.1”色谱条件下进行分析。

2.2 黄芪中 6 种黄酮类成分的测定

黄芪中 6 种黄酮成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、槲皮素、毛蕊异黄酮、山柰酚、芒柄花素的测定参照本课题组前期建立的 UPLC 方法^[10]。

3 结果与分析

3.1 黄芪甲苷及 6 种黄酮的测定结果

经过 UPLC 测得黄芪甲苷峰面积后, 根据回归方程, 计算黄芪甲苷和 6 种黄酮类化合物的质量分数, 结果见表 2。由表 2 可知, 鞭杆芪 (B01、B02、

表 2 黄芪中黄芪甲苷及 6 种黄酮类成分的量 ($n=3$)

Table 2 Contents of astragaloside and six kinds of flavonoids in *A. membranaceus* ($n=3$)

编号	质量分数 / (μg·g ⁻¹)						
	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	槲皮素	毛蕊异黄酮	山柰酚	芒柄花素
B01	1 330.0	1 599.3	1 109.3	983.4	400.6	719.8	364.5
B02	1 279.0	1 619.7	1 060.7	979.6	410.5	713.4	367.6
B03	1 203.0	1 620.5	1 009.8	981.3	434.6	709.6	359.7
B04	1 173.0	1 579.2	1 102.5	969.2	413.1	703.5	353.4
Z05	1 198.0	1 537.2	963.2	1 100.9	437.2	628.6	488.1
Z06	1 189.0	1 488.6	971.9	1 049.8	457.6	634.1	473.5
Z07	1 205.0	1 500.9	975.8	1 057.1	459.9	645.7	475.6
Z08	1 182.0	1 497.3	969.4	1 055.6	473.1	642.3	486.9
E09	1 102.0	1 137.7	825.9	830.5	823.7	501.8	703.6
E10	1 141.0	1 175.3	822.0	844.7	791.3	514.8	711.7
E11	1 126.0	1 178.1	823.5	856.2	800.8	510.4	709.3
E12	1 079.0	1 177.8	824.6	821.3	802.6	503.7	718.4
J13	1 003.0	1 035.2	828.7	827.4	798.8	499.7	713.6
J14	991.0	1 041.9	830.3	815.6	767.4	523.5	724.3
J15	1 047.0	1 095.3	819.9	824.8	799.0	512.5	700.6
J16	953.0	1 026.3	820.9	802.1	781.9	511.2	721.6

B03、B04)和直根芪(Z05、Z06、Z07、Z08)各成分的质量分数明显高于二叉芪(E09、E10、E11、E12)和鸡爪芪(J13、J14、J15、J16),其中《中国药典》2010年版规定的黄芪甲苷和毛蕊异黄酮苷2种化学成分质量分数高低次序为鞭杆芪>直根芪>二叉芪>鸡爪芪。

3.2 PCA

将所测得4种生态型黄芪黄酮类成分及黄芪甲苷成分量导入SIMCA-P 11.5 Demo版软件进行PCA,所得的载荷图结果见图1。由图1可知,4种生态型黄芪鞭杆芪(B01、B02、B03、B04)、直根芪(Z05、Z06、Z07、Z08)、二叉芪(E09、E10、E11、E12)和鸡爪芪(J13、J14、J15、J16)可以得到很好地区分,说明它们质量存在差别,且鞭杆芪、直根芪、二叉芪和鸡爪芪从左到右依次排列,根据“3.1”项黄芪甲苷及6种黄酮类成分分析推测,分布于坐标轴左边黄芪的质量最好,越往右质量越差。

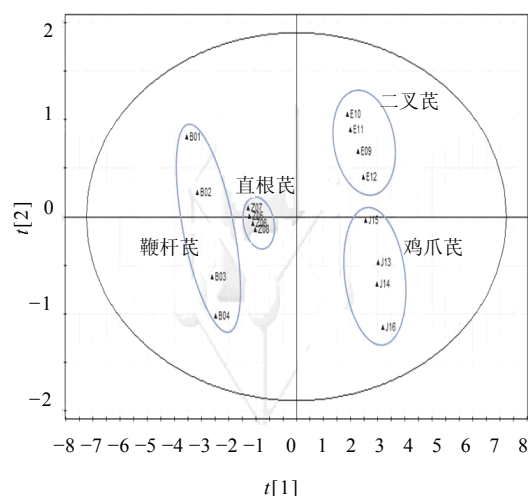


图1 4种生态型黄芪的PCA

Fig. 1 PCA for four ecotypes of *A. membranaceus*

3.3 CA

应用SPSS软件对16个分析样本7个属性进行CA。变量间相似性测度方法为Pearson Correlation,分类结果见图2。由图2可知,鞭杆芪(B01、B02、B03、B04)、直根芪(Z05、Z06、Z07、Z08)、二叉芪(E09、E10、E11、E12)及鸡爪芪(J13、J14、J15、J16)各自聚为一支;鞭杆芪(B01、B02、B03、B04)与直根芪(Z05、Z06、Z07、Z08)聚为一类,说明直根芪与鞭杆芪的质量相近;二叉芪(E09、E10、E11、E12)和鸡爪芪(J13、J14、J15、J16)聚为一类。

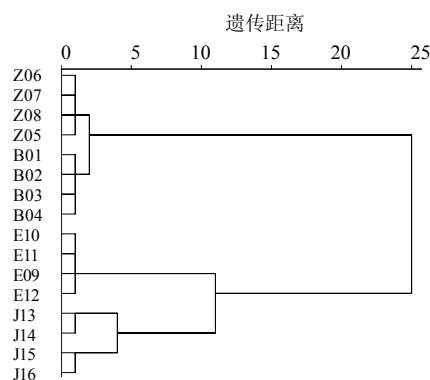


图2 4种生态型黄芪聚类分析

Fig. 2 CA for four ecotypes of *A. membranaceus*

说明各种生态型的质量及各自生态型间存在相关性。

4 讨论

黄芪最早见于《神农本草经》,根据本草考证,最初是以四川西北部产的膜荚黄芪为正品,之后产地逐渐北移,正品被山西北部 and 内蒙古南部产的蒙古黄芪所替代^[11]。随着多年的采挖和黄芪用量加大,黄芪野生资源锐减;另一方面,由于黄芪的种植技术较为成熟,近年来各个主产地纷纷引种^[12-13]。本实验的黄芪样品采自甘肃、山西和内蒙古,研究结果发现山西与内蒙古的黄芪生态型与质量相近,为鞭杆芪和直根芪;甘肃的黄芪样品则相对较差,为二叉芪和鸡爪芪。地理位置、种质资源、遗传特征和栽培方式等是影响黄芪品质的主要因素。

我国幅员辽阔,多样的气候环境、地理地貌、土壤因子等生态条件,形成了特有的中药材生态型的多样性^[14-16]。本实验通过对不同生态型黄芪中黄酮类及皂苷成分数据进行PCA、CA等生物统计学分析发现,黄芪的质量与生态型密切相关。PCA分析结果显示4种生态型黄芪可以得到很好的区分,CA结果显示直根芪与鞭杆芪聚为一支,说明直根芪的质量可以与鞭杆芪等同。二叉芪与鸡爪芪聚为一支,说明二者质量相近较差。从药物经济学的角度看,鞭杆芪的生长年限一般在4年以上,而直根芪的生长年限一般在2~3年。因此,生产实践过程中直根芪可推广应用。本实验通过对黄芪药材的化学成分与生态型相结合的研究,综合评价了4种生态型黄芪的品质,为药材黄芪的质量评价提供了可靠的科学依据,并为黄芪的可持续发展和合理用药提供了重要参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 苏彦雷. 黄芪的研究进展 [J]. 海峡药学, 2009(11): 1-4.
- [3] 中国药材公司. 中国常用中药材 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] 赵一之. 黄芪植物来源及其产地分布研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1189-1190.
- [5] 赵明, 段金廛, 黄文哲, 等. 中国黄芪属 (*Astragalus* Linn.) 药用植物资源现状及分析 [J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 5-9.
- [6] 李亚杰, 谭大吉, 杨永康, 等. 道地药材的品质评价现状 [J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2010, 12(4): 411-413.
- [7] 王凌诗, 王良信. 中药材性状特征的质量评价 [J]. 中草药, 1999, 30(5): 371-374.
- [8] 刘娟, 王良信, 王凌诗. 黄芪性状特征与物种及土壤条件相关性研究 [J]. 中国野生植物资源, 1996, 15(4): 3-6.
- [9] Fu J, Wang Z H, Huang L F, *et al.* Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, doi: 10.1002/ptr.5188.
- [10] 付娟, 杨世海, 黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中 6 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 916-919.
- [11] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [12] 冯学金, 刘根科, 梁素明. 蒙古黄芪种质资源研究进展 [J]. 山西农业科学, 2010(8): 95-98.
- [13] 杜国军, 秦雪梅, 李震宇, 等. 蒙古黄芪主产区 2 种不同种植模式黄芪药材的质量比较 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3386-3393.
- [14] 胡士林, 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.
- [15] 钱吉, 马玉虹, 任文伟, 等. 不同地理种群羊草分子水平上生态型分化的研究 [J]. 生态学报, 2000, 20(3): 440.
- [16] 黄林芳, 付娟, 陈士林. 中药材生态变异的学术探讨 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1249-1258.