基于化学计量学分析方法黄芪药材质量评价体系的建立

汪 祺，郑笑为，刘 燕，姚令文，戴 忠*，马双成*
中国食品药品检定研究院，北京 100050

摘 要：目的 采用化学计量学分析方法，建立黄芪 *Astragalus membranaceus* 药材质量评价体系。**方法** 收集 20 批不同产地不同品种黄芪药材，建立皂苷、黄酮类成分特征图谱。运用主成分分析、聚类分析方法深入研究不同黄芪药材中化学成分量的变化趋势及规律。**结果** 17 个特征成分中，黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 IV、芒柄花素和 2 个未知皂苷成分的差异显著，可作为区分不同产地或不同品种黄芪的关键性指标成分。**结论** 通过化学计量学分析方法，建立的黄芪药材中皂苷、黄酮类成分评价体系专属性强、准确性高，可有效控制和评价黄芪药材质量。

关键词：黄芪；特征图谱；化学计量学；质量评价体系；黄芪皂苷 I；黄芪皂苷 IV；芒柄花素
中图分类号：R286.022 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2015)12 - 1825 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.022

Quality evaluation system of *Astragali Radix* by chemometrics

WANG Qi, ZHENG Xiao-wei, LIU Yan, YAO Ling-wen, DAI Zhong, MA Shuang-cheng
National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To form the evaluation system of *Astragali Radix* by chemometrics. **Methods** To establish the characteristic chromatogram for *Astragali Radix* with 20 samples from different regions and to analyze the methods data by principal components analysis and cluster analysis. **Results** There is significant difference in the content of astragaloside I, IV, formononetin, and z6, z7 (unknown components) among the 17 characteristic components. And these components can be the critical index to distinguish the origin. **Conclusion** It is a sensitivity evaluation system for the quality control of *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; characteristic spectrum; chemometrics; quality evaluation system; astragaloside I; astragaloside IV; formononetin

黄芪为《中国药典》2010 年版[1]收载品种，为豆科（Leguminosae）植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *monghoicus* (Bge.) Hisao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。其主要含皂苷、黄酮、多糖、氨基酸等成分。《中国药典》2010 年版、《中药成方制剂》[2]、《新药转正标准》[3]共收载含黄芪制剂 140 个，涉及黄芪中皂苷、黄酮类成分的测定及薄层鉴别项。分析 140 个药材及成药标准发现，黄芪皂苷均以黄芪皂苷 IV 为指标成分，方法均采取碱化处理，促使黄芪中黄芪皂苷 I、II 转化为黄芪皂苷 IV，而后进行测定；黄酮类成分除黄芪药材测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷量外，成药多采用薄层方法进行鉴别。上述 2 类方法很难全面真实反映黄芪药材质量。经实验发现[4]，不同来源的黄芪药材不经碱化处理时黄芪皂苷 I、II、III、IV 量相差悬殊。各成药处方组成中，黄芪药材君、臣、佐、使作用各不相同，复杂的化学成分体系发挥了不同的药理作用，仅以单一指标成分作为评价手段很难真实地反映药材或产品质量，为此，本实验收集不同产地、不同品种（野生、栽培）的膜荚黄芪、蒙古黄芪共 20 批，建立皂苷、黄酮类成分的特征图谱，并采用化学计量学分析方法进行深入研究，揭示影响黄芪药材质量的活性成分，从而为质量评价工作以及物质基础研究提供实验依据。

1 仪器与材料

Waters 2695-2996 高效液相色谱仪，DAD-ELSD

收稿日期：2015-01-19
基金项目：国家重大新药创制（2009ZX09308-001）
作者简介：汪 祺，女，助理研究员，研究方向为药物分析。Tel: (010)67095282 E-mail: sansan8251@sina.com
*通信作者 马双成，男，研究员，主要从事中药质量控制及安全评价工作。Tel: (010)67095376 E-mail: msch@nifdc.org.cn
戴 忠，男，研究员，主要从事中药对照品标定及中成药质量控制工作。Tel: (010)67095376 E-mail: daizhong@nifdc.org.cn

检测器；对照品黄芪甲苷即黄芪皂苷 IV（批号 110781-200613）、芒柄花素（批号 111703-200602）、毛蕊异黄酮-7-*O*-葡萄糖苷（批号 111920-201001）均购自中国食品药品检定研究院；黄芪皂苷 I（E-0129）、II（E-0130）、III（E-0131）质量分数均大于 98%，毛蕊异黄酮（E-0156）、芒柄花素-7-*O*-葡萄糖苷（E-0573）质量分数均大于 98%，均购自上海同田生物科技有限公司；试剂均为分析纯、色谱纯，药材由中国食品药品检定研究院中药所张继鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.、野生和日本、甘肃栽培蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao、市售黄芪（未鉴定种），具体样品信息见表 1。

表 1　黄芪药材来源信息表

Table 1　Sample information

样品编号	来源
1	膜荚黄芪（黑龙江药品检验所提供）
2	膜荚黄芪（黑龙江药品检验所提供）
3	膜荚黄芪（购自黑龙江药材市场）
4	膜荚黄芪（购自黑龙江药材市场）
5	野生蒙古黄芪（购自亳州药材市场）
6	野生蒙古黄芪（购自亳州药材市场）
7	野生蒙古黄芪（购自亳州药材市场）
8	野生蒙古黄芪（购自亳州药材市场）
9	甘肃栽培蒙古黄芪（购自安国药材市场）
10	甘肃栽培蒙古黄芪（购自安国药材市场）
11	甘肃栽培蒙古黄芪（购自安国药材市场）
12	甘肃栽培蒙古黄芪（购自安国药材市场）
13	日本栽培蒙古黄芪（中国食品药品检定研究院中药标本馆标本）
14	日本栽培蒙古黄芪（中国食品药品检定研究院中药标本馆标本）
15	日本栽培蒙古黄芪（中国食品药品检定研究院中药标本馆标本）
16	日本栽培蒙古黄芪（中国食品药品检定研究院中药标本馆标本）
17	黄芪（购自樟树药市）
18	黄芪（购自樟树药市）
19	黄芪（购自樟树药市）
20	黄芪（购自樟树药市）

2　方法与结果

2.1　色谱条件

2.1.1　皂苷测定条件[5]　色谱柱：Agilent SB C_{18} 柱（250 mm×4.5 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-水（B），梯度洗脱：0～30 min，32%～45% A；30～35 min，45% A；35～40 min，45%～80% A；40～45 min，80% A；ELSD 检测，柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.1.2　黄酮测定条件[6]　色谱柱：Agilent SB C_{18} 柱（250 mm×4.5 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2% 甲酸（B），梯度洗脱，0～30 min，16%～40% A；30～35 min，40% A；35～45 min，40%～80% A；检测波长 260 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2　对照品溶液的制备

取黄芪皂苷 I 10.85 mg、II 13.35 mg、III 10.60 mg、IV 12.15 mg 至 50 mL 量瓶；另取毛蕊异黄酮-7-*O*-葡萄糖苷（13.15 mg）、芒柄花素（12.6 mg）、芒柄花素-7-*O*-葡萄糖苷 13.20 mg、毛蕊异黄酮 15.10 mg 至 25 mL 量瓶中，分别加甲醇定容至刻度，配得皂苷、黄酮混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

2.3.1　皂苷类成分供试品溶液的制备[5]　取药材粉末约 4 g，加甲醇 40 mL，加热回流 1 h，滤过，滤液蒸干，残渣加水 10 mL，微热使溶解，用水饱和的正丁醇振摇萃取 4 次，每次 40 mL，合并正丁醇液，蒸干，残渣加水 5 mL 使溶解，放冷，通过大孔吸附树脂，以水 50 mL 洗脱，弃去水液，再用 40%乙醇 30 mL 洗脱，弃去洗脱液，继用 70%乙醇 80 mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣加甲醇定容于 5 mL 量瓶，即得供试品。

2.3.2　黄酮类成分供试品溶液的制备[6]　取药材粉末（过四号筛）约 1 g，置圆底烧瓶中，加入甲醇 50 mL，加热回流 4 h，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 10 mL，即得供试品。

2.4　方法学考察

2.4.1　指纹图谱的精密度试验　精密吸取“2.3.1”中的皂苷类成分供试品溶液和“2.3.2”项中的黄酮类成分供试品溶液各 10 μL，连续进样 6 次，测得黄芪皂苷 I、II、III、IV，毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，芒柄花素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，芒柄花素，毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.5%、2.1%、0.9%、1.1%、0.8%、1.1%、1.0%、1.1%。

2.4.2　指纹图谱的稳定性试验　取“2.3.1”中的皂苷类成分供试品溶液和“2.3.2”中的黄酮类成分供试品溶液，在室温下放置，分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样 10 μL，测得黄芪皂苷 I、II、III、IV，毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，芒柄花素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，芒柄花素，毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.9%、2.2%、1.3%、1.7%、1.0%、1.2%、1.5%、1.2%。

2.4.3　指纹图谱的重复性试验　取同一份黄芪样品，按“2.3.1”及“2.3.2”项下方法各制备 3 份供

试品溶液，测得指纹图谱，结果各主要共有峰相对峰面积的 RSD 在 0.10%～0.42%，相对保留时间的 RSD 在 0.08%～0.21%。表明方法重复性较好。

2.5 特征图谱共有模式识别

采用 ChemPattern 软件，对 20 批黄芪药材样品色谱图进行比较，20 批样品色谱图见图 1。以图 1 为基础，对数据进行标准化处理，共有峰筛选选取所有变量，最终形成黄酮、皂苷的共有模式图，并标记相应色谱峰，见图 2、3。略去峰面积小于 5% 的色谱峰，黄酮色谱图选取 4、7、8、13、17、19 号峰；皂苷色谱图选取 3、5、6、7、8、9、11、13、15、16、19 号峰，并将黄酮类成分的峰和皂苷类成分的峰号前加“h”和“z”，分别代表黄酮色谱图和皂苷色谱图中峰号对应的化合物，形成黄酮-皂苷的共有模式柱状图，结果见图 4。

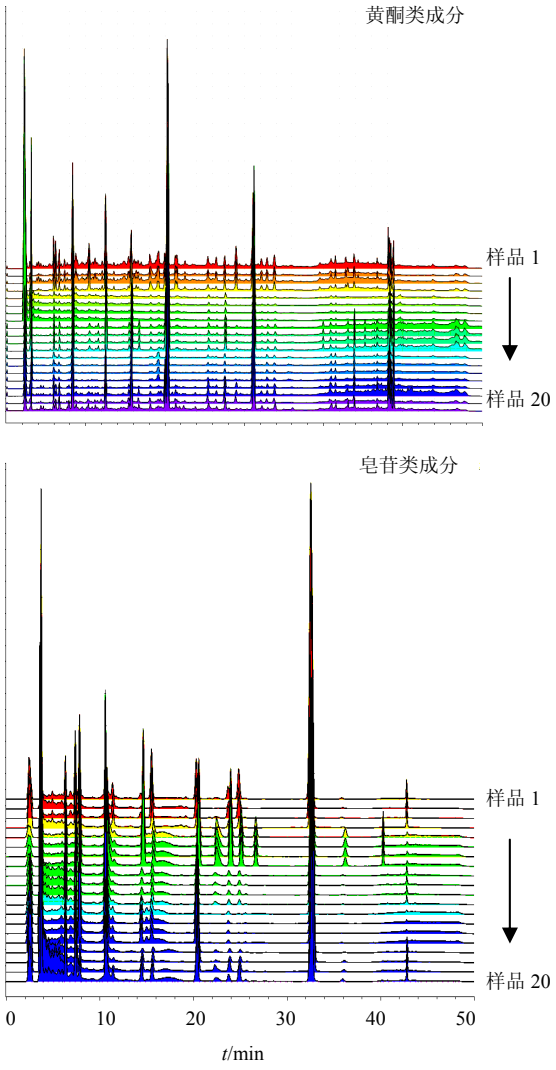
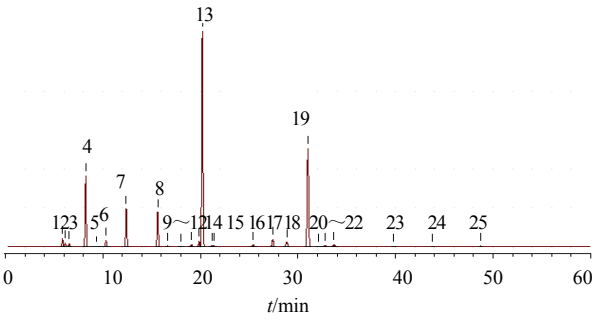


图 1 黄芪药材的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of *Astragali Radix*

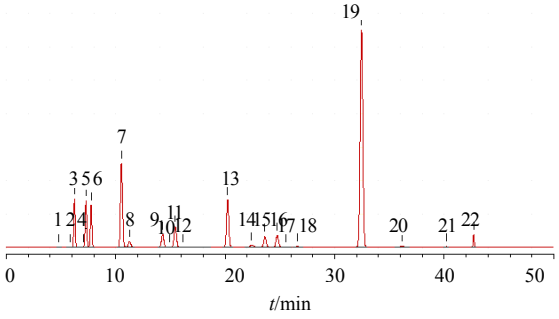


4-毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 8-芒柄花素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 13-芒柄花素 19-毛蕊异黄酮

4-calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside 8-formononetin-7-*O*-β-*D*-glucoside 13-formononetin 19-calycosin

图 2 黄酮类成分共有模式图

Fig. 2 Common pattern of flavonoids



9-黄芪皂苷 IV 11-黄芪皂苷 III 13-黄芪皂苷 II 19-黄芪皂苷 I

9-astragaloside IV 11-astragaloside III 13-astragaloside II 19-astragaloside I

图 3 皂苷类成分共有模式图

Fig. 3 Common pattern of saponins

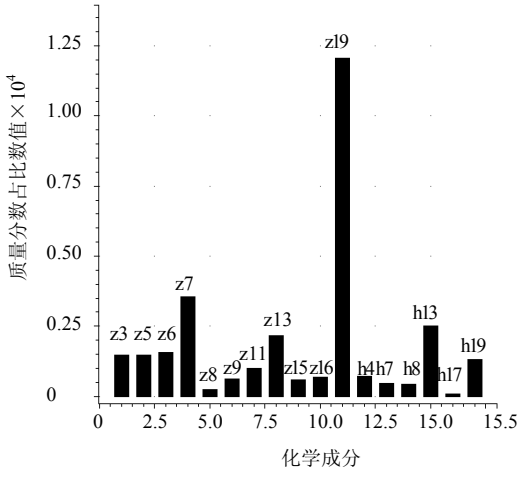


图 4 黄芪药材中黄酮和皂苷类成分共有模式

Fig. 4 Common pattern of flavonoids and saponins in *Astragali Radix*

2.6　化学计量学分析[7-11]

采用科迈恩科技有限公司 ChemPattern 软件对黄芪皂苷、黄酮数据进行化学计量学分析。

2.6.1　主成分分析　主成分分析是一种无监督多变量数据分析法，将原始变量（黄芪皂苷、黄酮各峰峰面积）转换成不相关变量（主成分）。PC1 代表最显著数据差异，PC2 代表剩余变量中最大数据差异，以此类推。将黄芪皂苷、黄酮共 17 个特征峰峰面积作为输入变量（20×17）用于主成分分析，结果见图 5。由图 5-A 可知，PC1 和 PC2 的总方差贡献率为 91.83%（其中，PC1＝70.6%，PC3＝21.23%）。PC1 图显示，野生蒙古黄芪和日本栽培蒙古黄芪为正值，其他品种为负，且载荷得分较高的峰为 h13 和 z19，因此仅根据芒柄花素和黄芪皂苷 I 量的差异可先将 5 组样品分为 2 类。PC2 图显示野生蒙古黄芪为正值，日本栽培蒙古黄芪为负，载荷得分高的峰除 h13 外还有 z9、z6。因此，通过 h8、z9 以及 z6 的量差异可以再对二者进行区分；膜荚黄芪、甘肃栽培蒙古黄芪、樟树药市购买黄芪在 PC1-PC2 图中相对集中，不能进行有效区分，需通过 PC1-PC3 图进行分类识别。由图 5-B 显示，PC3 上，甘肃栽培蒙古黄芪为正值，膜荚黄芪为负，樟树药市收集黄芪分别接近这 2 个品种，由载荷得分较高的成分 z7、z19、h13 可以对样品进行有效识别。综上所述可以发现，z19、h8、z9、z6、z7 即黄芪皂苷 I、芒柄花素、黄芪皂苷 IV 和 2 个未知皂苷成分（z7 和 z6）为影响黄芪药材质量评价的主要成分，其他成分方差贡献总和小于 10%，不具代表性。

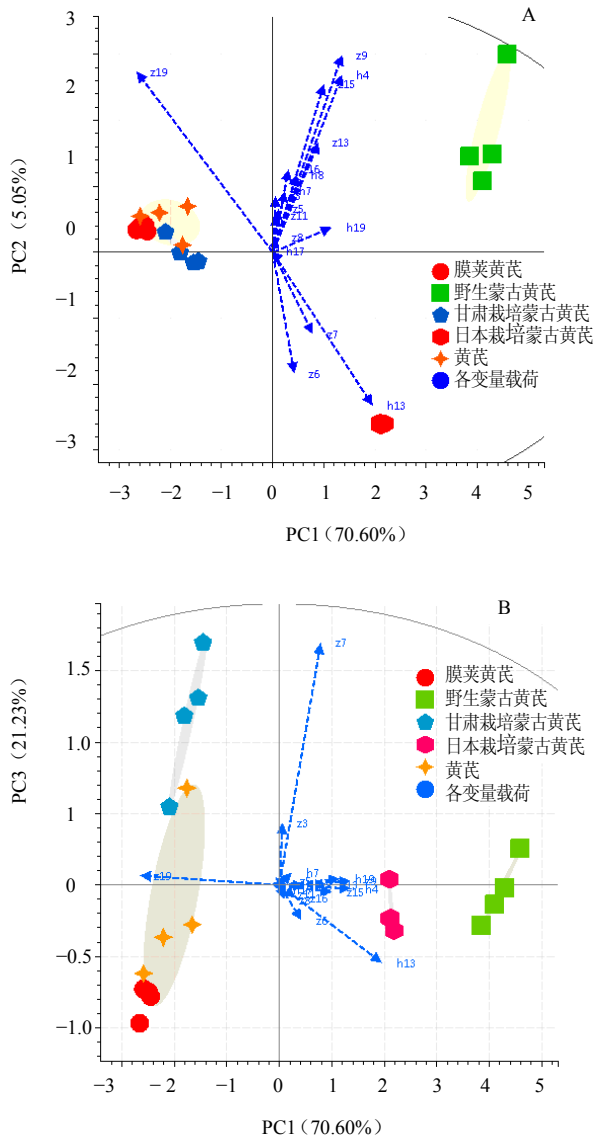
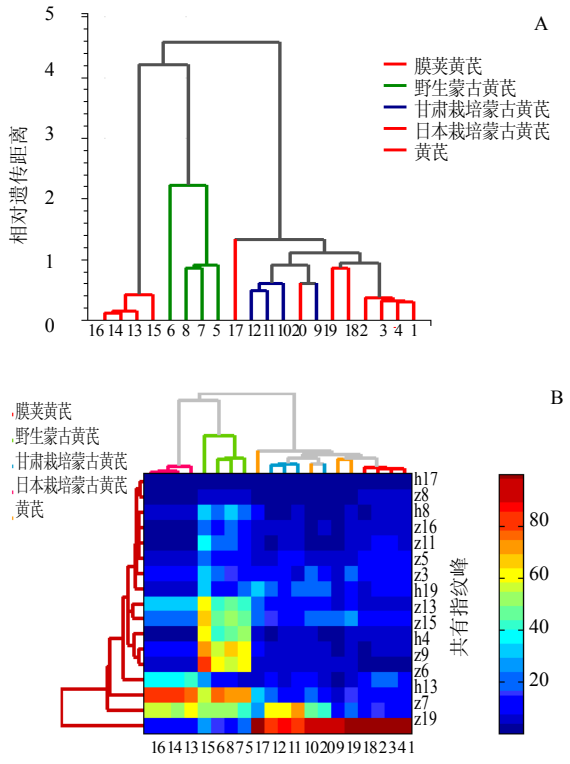


图 5　PC1-PC2 (A) 和 PC1-PC3 (B) 主成分分析图

Fig. 5　Principal component analysis score of PC1-PC2 (A) and PC1-PC3 (B)

2.6.2　聚类分析　采用多元统计分析中的聚类分析法，分析参数选取欧氏距离，对 20 批黄芪药材中皂苷、黄酮类成分进行比较，同时验证主成分分析结果。结果见图 6。由图 6-A 可以看出野生蒙古黄芪



A-系统聚类图　B-二维系统聚类图

A-system cluster chart　B-2D system cluster chart

图 6　黄芪药材聚类分析

Fig. 6　Cluster analysis of *Astragali Radix*

和日本栽培蒙古黄芪相似度较高可聚为一类，而膜荚黄芪与蒙古黄芪（甘肃栽培品种）可聚为一类，未见明显差别，樟树药市购买黄芪可分别与膜荚黄芪、甘肃栽培蒙古黄芪聚为一类。图 6-B 为二维系统聚类图，颜色越接近红色，化学成分聚类程度越高。由图 6-B 可知，影响最大的变量参数的峰依次为 z19、z7、h13、z6、z9，与主成分分析结果基本一致。上述分析表明，不同品种的黄芪（蒙古黄芪、膜荚黄芪）在化学成分构成上可能相似，不同地域反而导致了化学成分的差异，因此只有制定合理的标准，控制关键性变量才能有效控制药材质量。

3 讨论

中药区别于化学合成药，其依靠所含多种成分协同发挥综合药效，仅以 1 种或 2 种化学指标很难评价中药的真伪优劣。《中国药典》2010 年版规定，黄芪为蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根，2 个品种可等同入药。统计涉及黄芪药材的相关标准发现，各标准中，多采用碱化处理样品，仅以转化后的黄芪甲苷为指标进行测定。在实际应用中，植物药来源的种属不同，其自身代谢需要从土壤摄取和形成的化学物质也不同，许多随机因素影响了化学成分的组成。本实验同时建立了黄芪中皂苷、黄酮 2 类成分的特征图谱，并采用化学计量分析法对 2 类成分的数据进行综合统计分析。结果表明，不同产地、不同品种的黄芪，化学成分存在差异，17 个特征成分中，黄芪皂苷 I、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、z6（未知皂苷成分）、z7（未知皂苷成分）5 个成分的量差异较大，直接影响黄芪药材的质量评价。目前，由于前期收集样品总量有限，制备出的 2 个未知皂苷类成分不能同时满足核磁、质谱、红外光谱等结构鉴定用量，对于结构的准确确认还需进一步样品收集。同时本研究确定的 5 种成分是否在药效、毒理方面有明显区别，还需进一步研究，如有明显差异建议有目的地针对这 5 种成分建立测定标准，从而有效规范黄芪药材及成药的产品质量。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 2010.
[3] 国家药品标准-新药转正标准 [S]. 2010.
[4] 刘 孜, 周 晶, 张庆伟, 等. 氨液水解法用于提高黄芪中黄芪甲苷含量的工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 635-638.
[5] 汪 祺, 张聿梅, 戴 忠, 等. 黄芪药材 HPLC 特征图谱研究 (1) 皂苷类成分 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1101-1104.
[6] 汪 祺, 张聿梅, 戴 忠, 等. 黄芪药材 HPLC 特征图谱研究 (2) 黄酮类成分 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1272-1276.
[7] 聂 磊, 罗国安, 曹 进, 等. 中药二维信息指纹图谱模式识别 [J]. 药学学报, 2004, 39(2): 136-1391.
[8] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
[9] 王文燕, 赵 强, 张铁军, 等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1810-1814.
[10] 崔红花, 郭 娇, 高幼衡, 等. 佛手和属间药用植物的主成分聚类分析及 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 978-984.
[11] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 48-51.