

山西恒山地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪的质量差异研究

熊一峰^{1,2}, 万燕晴^{1,2}, 李科¹, 李震宇^{1*}, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 比较生长于山西北部恒山及其周边地区的蒙古传统黄芪和移栽黄芪化学成分差异。**方法** 采用 ¹H-NMR 代谢组学技术结合 HPLC-UV-ELSD 联用技术分别对两种种植模式黄芪的初级代谢物和次级代谢物进行差异性比较。**结果** 从核磁图谱中共指认出 25 个代谢物, 其中甲醇水相中主要为氨基酸和有机酸等初级代谢物, 氯仿相中主要为脂肪酸类物质; 多元统计结果显示二者的初级代谢物差异不大, 但 8,2'-羟基-7,4'-甲氧基异黄酮只在传统黄芪中检测到。采用 HPLC-UV-ELSD 联用技术测定不同黄芪样本中 6 种黄酮和 4 种皂苷的量, 结果显示传统黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷和黄芪皂苷 III 量显著高于移栽黄芪, 而移栽黄芪中黄芪皂苷 I 的量显著高于传统黄芪, 传统黄芪总黄酮量显著高于移栽黄芪, 总皂苷量无显著性差异。**结论** 恒山地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪差异性主要体现在次级代谢物上, 说明不同种植方式对黄芪次级代谢物的积累影响较大, 为恒山地区发展优质的传统黄芪资源奠定了基础。

关键词: 黄芪; ¹H-NMR; HPLC-UV-ELSD; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花苷; 紫檀烷苷; 异黄酮苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 黄芪皂苷 IV; 黄芪皂苷 III; 黄芪皂苷 II; 黄芪皂苷 I

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)08-1635-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.024

Quality comparison between traditional and cultivated *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* grown in Shanxi Hengshan area

XIONG Yi-feng^{1,2}, WAN Yan-qing^{1,2}, LI Ke¹, LI Zhen-yu¹, QIN Xue-mei¹

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

Abstract: Objective To compare the chemical constituents difference between the cultivated *Astragali Radix* (AR) and those grown in traditional way in Hengshan area of northern Shanxi Province. **Methods** ¹H-NMR based metabolomics approach combined with content determination based on HPLC-UV-ELSD was used to compare the primary and secondary metabolites in AR of different growing pattern. **Results** Twenty-five metabolites were identified in the NMR spectra, and the major metabolites in the aqueous methanol fraction were the primary metabolites, such as amino acids and organic acids, while the fatty acids derivatives were present in the chloroform fraction; Multivariate analysis showed that there was no significant difference between the two kinds of AR for the primary metabolites, but 8,2'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyisoflavan was only detected in AR grown in traditional way. The results of content determination of six major isoflavonoids and four saponins revealed that the contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, and astragaloside III were higher in AR grown in the traditional way, but astragaloside I was significantly higher in the cultivated AR. **Conclusion** The major differences between the cultivated AR and those grown in traditional way are in the secondary metabolites, which indicates that the growing pattern is important for the biosynthesis and accumulation of secondary metabolite in AR. The results lay the scientific foundation for the rational utilization of the AR resources in Hengshan Area.

Key words: *Astragali Radix*; ¹H-NMR; HPLC-UV-ELSD; calycosin-7-O-β-D-glucoside; ononin; (6aR, 11aR)-9,10-dimethoxypterocarpan; 8,2'-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucopyranoside; calycosin; formononetin; astragaloside IV; astragaloside III; astragaloside II; astragaloside I

收稿日期: 2016-09-13

基金项目: 山西省优秀人才科技创新项目: 黄芪生长年限与化学成分积累规律研究 (201605D211030); 山西省中药产业重点科技攻关项目: 道地药材种质资源与规范化生产技术研究 (201603D311101); 国家中药标准化项目: 黄芪药材及饮片规格等级和质量标准研究 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目: 山西省药材行业标准-恒山黄芪药材与精品饮片商品等级标准研究 (2014ZD0401)

作者简介: 熊一峰 (1989—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 15735189122 E-mail: 15735189122@163.com

***通信作者** 李震宇 Tel: (0351)7011202 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

黄芪来源于豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根^[1]。现代临床常用于治疗心气虚损、血脉瘀阻之病毒性心肌炎、心功能不全及脾虚湿困之肝炎等疾病^[2-4]。产于山西北部恒山山脉及其周边地区（主要是山西大同和忻州等地区）的野生或半野生蒙古黄芪俗称“恒山黄芪”或“正北芪”，市场采用的恒山黄芪生长年限最少在 4 年以上，多远销海内外。随着黄芪需求量的急剧增加，2 年生的育苗移栽黄芪开始逐渐占据国内市场，称为“移栽黄芪”，而采用传统种子直播生长的多年生黄芪则称为“传统黄芪”。由于传统和移栽黄芪生长年限以及种植模式的差异，二者外观性状也表现出明显差异性^[5]。传统蒙古黄芪主根粗直，末端较细，俗称“鞭杆芪”，皮部色白，中心木质部淡黄色、菊花状纹理比较清晰，为典型的“金井玉栏”，一般依据直径粗细划分不同等级。移栽黄芪的种植方式是平地横栽，因此主根长度较一致，上下端生长发育比较均匀，但须根较多，称为“统货”，一般不分等级^[6]。可见，2 种栽培模式的黄芪在外观上存在着显著的差异，但内在质量的差异尚不清楚。

药材中所含的化学成分是中药发挥疗效的物质基础，因此阐明 2 种生长模式黄芪的内在质量差异需要对二者的化学组成进行系统比较。虽然已有研究对不同年限、不同种植方式的黄芪中有效成分的量差异进行了比较^[7-18]，但研究选取的样本多为传统黄芪与市场占有率最大的甘肃移栽黄芪作为研究对象，由于影响药材化学成分量的因素较多，直接比较不同产地、不同种植模式黄芪化学成分的差异性，会使结论难以界定。本研究选用的黄芪样本同为山西恒山道地产区的蒙古传统黄芪和移栽黄芪，这些产地年均气温为 6.2~7.0 °C，年均降雨量为 380~430 mm，光照、气温以及降水等生存环境相似，黄芪均一性较好，可以减少环境差异带来样本成分量不均一的问题。拟采用 ¹H-NMR 代谢组学技术结合 HPLC-UV-ELSD 联用技术^[10]，分别从黄芪初级代谢物和次级代谢物 2 方面对 2 种生长模式的蒙古黄芪进行比较。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

黄芪药材采自山西大同浑源和应县、忻州五寨地区，见表 1。经山西大学中医药现代研究中心秦

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	产地	种植模式	生长年限/年
1	山西应县	野生	≥5
2	山西浑源	半野生	≥5
3	山西浑源	半野生	≥5
4	山西五寨	半野生	5
5	山西五寨	半野生	≥5
6	山西浑源	野生	≥5
7	山西五寨	移栽	2
8	山西浑源	移栽	2
9	山西五寨	移栽	2
10	山西浑源	移栽	2
11	山西浑源	移栽	2
12	山西应县	移栽	2

雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。药材样品留存于山西大学中医药现代研究中心样品库。

1.2 仪器与试剂

Waters e2695 高压泵、Waters 2489 紫外可见检测器、ChromachemELSD 检测器、Empower 色谱工作站、Sartorius BSA124S 分析天平、超声提取器、RE-52A 旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；涡旋混匀器、TGL-16 高速台式冷冻离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）；SC-3160 低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；Bruker 600 MHz, Avance III NMR Spectrometer（600.13 MHz 质子频率，德国布鲁克公司）；700 Series 微量进样器（1~20 μL，1~100 μL，1~1 000 μL，美国 Fisher）。乙腈（美国 Fisher 公司）为色谱纯；水（娃哈哈）为纯净水；NMR 试剂重水（Norell，Landisville，美国）；三甲基硅烷丙酸钠盐（TSP，Cambridge Isotope Laboratories Inc.，MA）；其他试剂均为分析纯。对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷（紫檀烷苷）、8,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷（异黄烷苷）和黄芪皂苷 I、II、III、IV 均购于上海永恒生物科技有限公司，批号依次为 20120428、20120528、20120515、20100202、20111125、20110503、20120515、20120315；芒柄花苷、毛蕊异黄酮购于成都曼斯特公司，批号依次为 13021808、13082713；质量分数均大于 98%。

2 方法

2.1 核磁分析样本制备

参考课题组之前报道的方法^[19],精密称取样品粉末 200 mg 置于 10 mL 玻璃离心管中,分别加 1.5 mL 蒸馏水,1.5 mL 甲醇和 3 mL 氯仿,加盖涡旋混匀 1 min,超声提取 25 min,以 3 500 r/min 转速室温离心 25 min,提取液分为 2 层(上层为水溶性部分,下层为有机部分),用移液枪分别转移上下层至 25 mL 圆底烧瓶中,用旋转蒸发仪干燥。于测定前用 NMR 试剂溶解,其中有机相部分用氘代氯仿 800 μ L 溶解,水相部分用 400 μ L 氘代甲醇与 400 μ L buffer 缓冲重水(KH_2PO_4 溶于 D_2O 中,以 1 mol/L 氘代氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8,含 0.05% TSP),溶解液分别转移至 2 mL 离心管中,以 13 000 r/min 转速离心 10 min,移取 600 μ L 溶液于核磁管中。

2.2 ^1H -NMR 分析

样品于 600 MHz NMR 仪上测定,测定频率 600.13 MHz,扫描 64 次,谱宽 12 345.679 Hz,脉冲时间 14 μ s,采样时间 2.654 s,延迟时间 1.0 s,采样间隔 40.5 μ s,两相提取法中的水相采用 noesypr1d 序列,有机相采用 ZG30 序列。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄烷苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、III、II 和 I 共 10 种成分分别至 10 mL 量瓶中,用甲醇各自溶解,摇匀,分别制成 1.870、1.360、1.362、0.601、0.522、1.254、0.979、0.500、0.582、1.972 mg/mL 的对照品贮备液。再分别吸取适量至 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解,摇匀,分别制成质量浓度为 200.09、85.6、141.2、60.1、29.2、12.5、62.7、45.8、55.9、164.0 μ g/mL 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取黄芪粉末 1.5 g,精密称定,置 150 mL 圆底烧瓶中,加甲醇 60 mL,加热回流 3 h,滤过,滤渣用甲醇冲洗 3 次,每次 20 mL,浓缩续滤液至干,用甲醇溶解药膏并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.5 HPLC 色谱条件

参考文献报道的黄芪 10 种成分同时测定的方法^[10],并对洗脱条件进行优化^[20]。流动相为乙腈(A)-水(B),体积流量 1.0 mL/min,蒸发光检测器参数: N_2 压力为 158.5 MPa (23 psi),雾化温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,

汽化温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,增益值为 5.0; Venusil MP C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),紫外检测波长 230 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μ L。梯度洗脱: 0~8 min, 20% A; 8~15 min, 30% A; 15~30 min, 30%~43% A; 30~40 min, 43%~60% A; 40~60 min, 60%~100% A; 60~65 min, 100%~20% A。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线的绘制 标准曲线的绘制过程中,至少包含 5 个质量浓度梯度,将以上配制的对照品贮备液分别逐级稀释。对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度系列分别为 0.935、0.312、0.078、0.039、0.019、0.010 mg/mL; 对照品芒柄花苷质量浓度分别为 0.68、0.34、0.17、0.09、0.043、0.021 mg/mL; 紫檀烷苷质量浓度分别为 0.681、0.341、0.170、0.085、0.043、0.021 mg/mL; 毛蕊异黄酮质量浓度分别为 0.276、0.138、0.069、0.035、0.017、0.009 mg/mL; 芒柄花素质量浓度分别为 0.627、0.314、0.157、0.078、0.039、0.020 mg/mL; 对照品异黄烷苷质量浓度系列分别为 0.301、0.100、0.025、0.013、0.003 mg/mL; 对照品黄芪皂苷 IV 质量浓度分别为 0.245、0.061、0.153、0.008、0.004 mg/mL; 黄芪皂苷 III 质量浓度分别为 0.250、0.125、0.031、0.008、0.004 mg/mL; 黄芪皂苷 II 质量浓度分别为 0.291、0.146、0.073、0.036、0.018 mg/mL; 黄芪皂苷 I 质量浓度分别为 0.657、0.329、0.164、0.082 2、0.411、0.021 mg/mL,过 0.45 μ m 滤膜后,进样 20 μ L。绘制标准曲线,得回归方程及其线性范围,见表 2。对照品与样品色谱图见图 1。

表 2 10 种成分同时测定的线性回归数据

Table 2 Regression data of six isoflavonoids and four saponins in HPLC-UV-ELSD

成分	回归方程	线性范围/ μ g	r^2
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=55\ 753.85\ X+547.91$	0.298~18.700	1.000 0
芒柄花苷	$Y=53\ 114\ X+63\ 560$	0.212~6.800	0.999 9
紫檀烷苷	$Y=46\ 359\ X+60\ 442$	0.213~6.810	0.999 9
异黄烷苷	$Y=36\ 788\ X+13\ 584$	0.094~6.010	0.999 1
毛蕊异黄酮	$Y=98\ 675\ X-42\ 582$	0.082~5.220	0.999 1
芒柄花素	$Y=98\ 481\ X-26\ 826$	0.196~6.270	0.999 3
黄芪皂苷 IV	$Y=1.674\ X+1.788$	0.076~4.895	0.995 0
黄芪皂苷 III	$Y=1.268\ X+2.584$	0.078~2.500	0.999 3
黄芪皂苷 II	$Y=1.387\ X+2.414$	0.091~5.820	0.995 0
黄芪皂苷 I	$Y=1.055\ X+3.382$	0.616~19.720	0.999 0

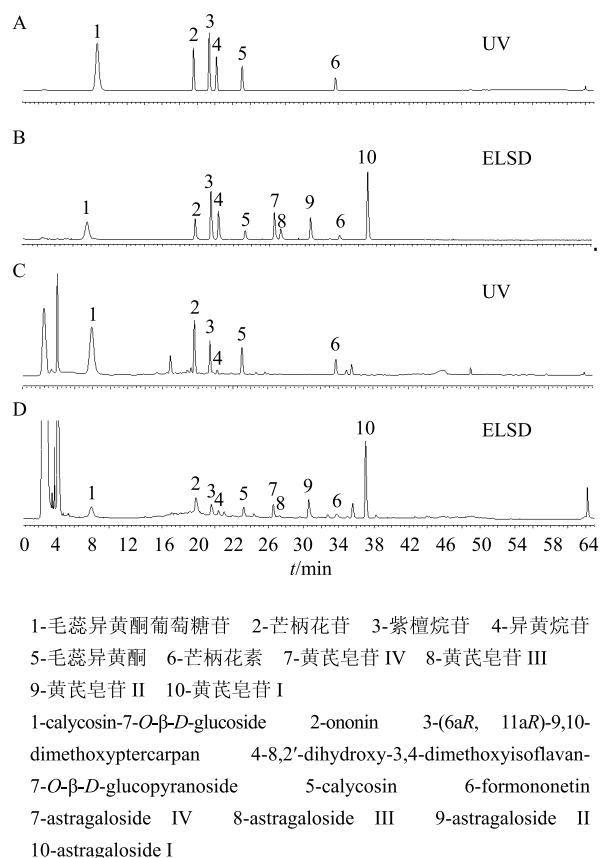


图 1 对照品 (A, B) 和黄芪药材 (C, D) 的 HPLC

Fig. 1 HPLC of reference substance (A and B) and *Astragalus Radix* samples (C and D)

2.6.2 精密度试验 吸取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 以 10 种成分的峰面积值计算, RSD 值分别为 1.8%、1.5%、1.9%、1.4%、1.2%、1.0%、1.0%、1.1%、1.5%、1.3%。

2.6.3 重复性试验 精密称取 1 号黄芪样品 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定。以 10 种成分的测定结果计算, RSD 值分别为 1.3%、2.2%、1.1%、3.6%、2.4%、2.4%、2.0%、1.5%、2.7%、2.5%。

2.6.4 稳定性试验 取 1 号黄芪药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 后进样分析。以 10 种成分的峰面积计算, RSD 值分别为 0.9%、1.1%、1.3%、1.2%、2.4%、1.8%、2.0%、2.6%、2.7%、2.9%。

2.6.5 加样回收率试验 取 1 号药材作为加样回收实验组, 以药材重复性实验中所得 6 组数据中的各成分质量分数的平均值作为该药材 10 种成分的真实值, 10 种成分的具体质量浓度分别为 0.852、0.247、0.296、0.018、0.012、0.158、

0.023、0.195、0.022、0.521 mg/mL。按照药材各成分量的 50%、100%和 150%分别加入对照品贮备液, 各对照品贮备液浓度见“2.3”项。在样品回流提取前, 用微量进样器或移液管分别向每组样品中加入一定量的对照品贮备液, 与样品一起制备。加入各对照品量计算质量分数, 每个质量分数平行备样 3 份样品, 一共 9 份。计算回收率, 回收率范围在 90%~110%, 所得 RSD 值均小于 5.0%。

2.6.6 样品测定 取 1~12 号各批次样品按“2.4”项制备, 用 5 mL 量瓶定容至刻度, 吸取约 1 mL 至 1.5 mL 的进样小瓶中, 测定得到峰面积。黄酮类成分, 对照品溶液和供试品溶液分别进样 20 μL; 皂苷类成分, 对照品溶液和供试品溶液分别进样 10 和 20 μL, 用外标两点法测定。

2.7 数据处理

NMR 数据用 MestReNova (version 10.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 处理, 水相以 1.0×10^{-11} 积分段对化学位移区间 δ 0.04~9.12 进行分段积分, 核磁图谱中 δ 4.60~5.12 (残余水峰) 和 δ 3.28~3.32 (甲醇峰) 不进行积分, 有机相核磁图 δ 7.22~7.30 (残余氯仿峰) 不进行积分。将 NMR 的分段积分数据及 HPLC-UV-ELSD 测定结果导入 SIMCA-P13.0 (Umetrics, umea, 瑞典) 软件进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)。S-plot 对核磁峰进行指认, 根据 VIP 值 (大于 1) 筛选差异化合物; 将 NMR 中指认的初级代谢物峰面积与 HPLC 检测的次级代谢物含量导入 SPSS16.0 中进行相关分析; 对 NMR 和 HPLC-UV-ELSD 寻找出来的差异代谢物用 SPSS 16.0 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, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

3 结果与分析

3.1 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学分析

对甲醇水相、氯仿相提取物的核磁峰分别进行指认, 水相中指认出 23 种化合物, 主要为氨基酸和糖类等初级代谢产物, 氯仿提取物主要为脂肪酸或脂肪酸酯类, 还包括黄酮苷元类成分 8,2'-羟基-7,4'-甲氧基异黄酮^[21]以及 β -谷甾醇; 传统黄芪和移栽黄芪核磁峰见图 2、3, 所指认化合物的核磁数据见表 3。

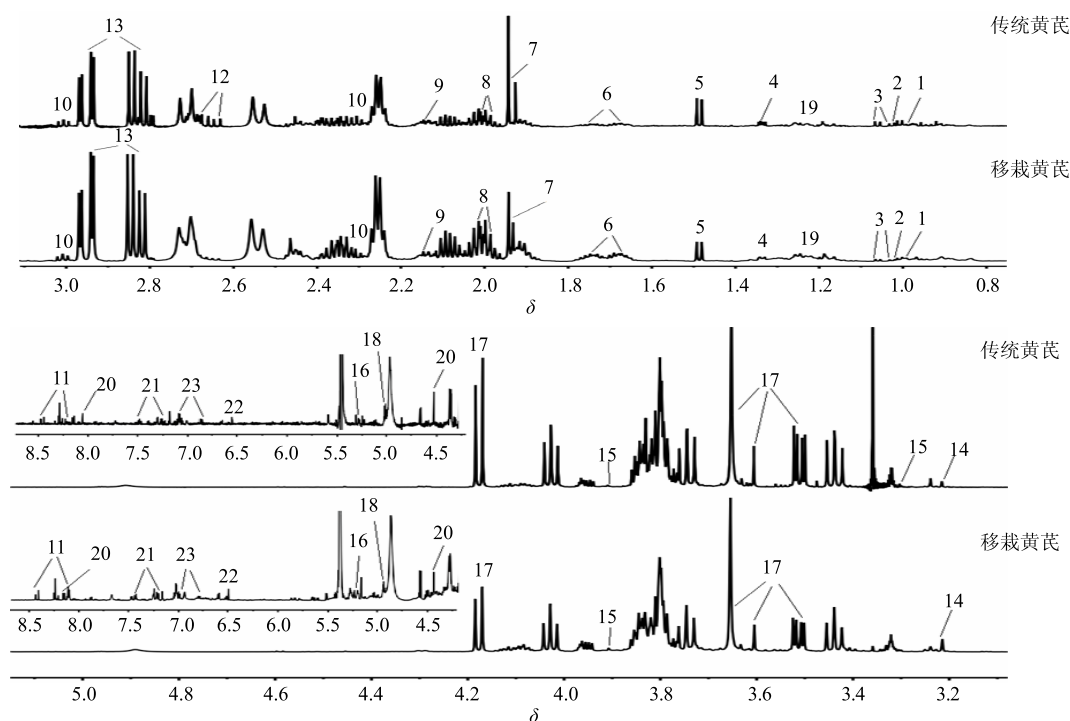


图 2 传统黄芪和移栽黄芪水相核磁峰

Fig. 2 ^1H -NMR spectra of aqueous methanol extracts in traditional AR and cultivated AR

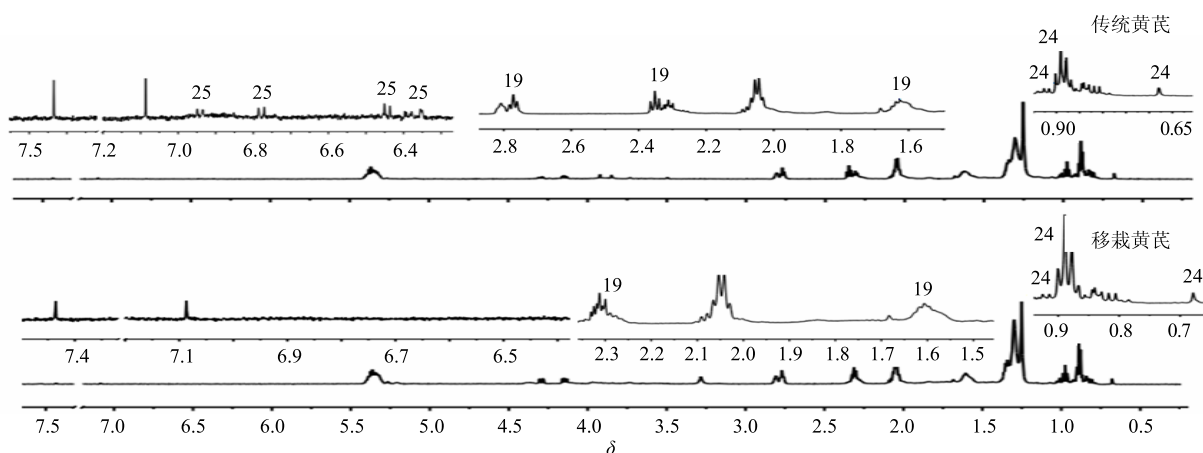


图 3 传统黄芪和移栽黄芪氯仿相核磁峰

Fig. 3 ^1H -NMR spectra of chloroform extract of traditional AR and cultivated AR

对于水相提取物，直观比较显示两种生长模式的黄芪无明显差异。PCA 散点图（PC1: 35.1%，PC2: 27.7%）结果（图 4-a）显示，两者既有部分重叠，又有一定分离趋势。有监督的模式识别方法着重强调组间差异，而将组内差异降至最低，但模型的使用应以模型有效为前提。排列实验结果显示模型无效，说明 2 种黄芪水相提取物的差异较小。对于有机相，由主成分 1（PC1: 82.2%）和主成分 2（PC2: 7.1%）为横纵坐标构建的得分散点图（图

4-b）可直观看出，2 种黄芪的低级性成分也无明显差异。但直观分析显示（图 3），所有传统黄芪中均可以检测到黄酮苷元 8,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷，但在移栽黄芪中则检测不到该成分。

3.2 测定结果分析

表 4 测定结果显示，2 年生移栽黄芪中的黄芪皂苷 I、II、IV 的量均高于传统黄芪；而传统黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花苷显著高于移栽黄芪，其中黄芪皂苷 I 的差异具有统计学意义（ $P=0.030$ ），

表 3 NMR 代谢物指认结果

Table 3 NMR assignments of major metabolites in traditional AR and cultivated AR

编号 代谢物	特征峰信号	编号 代谢物	特征峰信号
1 亮氨酸	0.98 (d, $J=6.0$ Hz), 0.99 (d, $J=6.6$ Hz)	14 胆碱	3.22 (s)
2 异亮氨酸	1.03 (d, $J=7.2$ Hz), 0.96 (t, $J=6.0$ Hz)	15 甜菜碱	3.27 (s), 3.9 (s)
3 缬氨酸	1.01 (d, $J=7.0$ Hz), 1.06 (d, $J=7.0$ Hz)	16 α -半乳糖	5.26 (d, $J=4.2$ Hz)
4 苏氨酸	1.34 (d, $J=6.6$ Hz)	17 蔗糖	5.42 (d, $J=3.8$ Hz), 3.57 (dd, $J=3.6, 9.6$ Hz), 4.05 (dd, $J=8.4, 9.0$ Hz)
5 丙氨酸	1.48 (d, $J=7.2$ Hz)	18 棉籽糖	5.43 (d, $J=3.6$ Hz), 4.97 (d, $J=3.7$ Hz),
6 精氨酸	1.60, 1.70, 1.90 (m), 3.24 (t, $J=7.0$ Hz)	19 脂肪酸	1.2~1.3 (m), 1.6 (m), 2.36 (t, $J=7.5$ Hz), 2.77 (t, $J=6.6$ Hz), 5.35 (m)
7 乙酸	1.94 (s)	20 葫芦巴碱	8.1 (dd, $J=6.0, 7.8$ Hz), 8.17 (dd, $J=8.4, 12.0$ Hz), 4.46 (s), 9.14 (s)
8 脯氨酸	2.00 (m), 2.08 (m), 2.38 (m), 4.12 (m)	21 苯丙氨酸	7.33 (m), 7.41 (t, $J=7.2, 7.8$ Hz)
9 谷氨酰胺	2.15 (m), 2.49 (m)	22 富马酸	6.53 (s)
10 GABA	2.30 (t, $J=7.2$ Hz), 3.00 (t, $J=7.0$ Hz)	23 酪氨酸	6.85 (d, $J=8.4$ Hz), 7.18 (d, $J=8.4$ Hz)
11 腺苷	6.03 (d, $J=6.6$ Hz), 8.21 (s), 8.35 (s)	24 β -谷甾醇	1.68 (s), 0.82 (d, $J=6.8$ Hz), 0.88 (d, $J=6.0$ Hz), 0.89 (d, $J=7.0$ Hz), 0.92 (d, $J=6.5$ Hz)
12 天冬氨酸	2.64 (dd, $J=9.3, 17.4$ Hz), 2.71 (dd, $J=3.6, 15.6$ Hz)	25 8,2-羟基-3,4-二甲 氧基异黄烷	6.35 (d, $J=2.4$ Hz), 6.39 (dd, $J=8.4, 3.0$ Hz), 6.44 (d, $J=8.4$ Hz), 6.78 (d, $J=9.0$ Hz)
13 天冬酰胺	2.82 (dd, $J=8.16, 16.94$ Hz), 2.95 (dd, $J=3.97, 16.94$ Hz)		

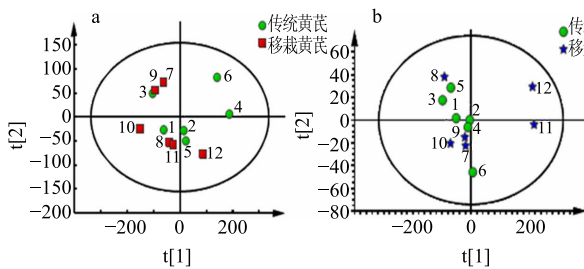


图 4 水相提取物 (a) 和氯仿相提取物 PCA 散点图 (b)

Fig. 4 PCA score plot of aqueous methanol extracts (a) and chloroform extract (b) between traditional AR and cultivated AR

而黄芪皂苷 III 则是传统黄芪高于移栽黄芪 ($P=0.024$); 对于黄酮类成分, 传统黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花苷这 2 种黄酮苷的量明显高于移栽黄芪 ($P=0.000$), 其相应的苷元芒柄花素和毛

瑞异黄酮也具有较高的分布趋势, 但由于组内差异的存在导致组间差异无统计学意义; 传统黄芪和移栽黄芪中紫檀烷苷和异黄烷苷的量无明显差异 (图 5)。分别将 6 种黄酮和 4 种皂苷进行加和得到总黄酮和总皂苷量 (图 6), 传统黄芪的总黄酮量显著高于移栽黄芪, 而总皂苷无显著差异。以 10 种成分的量进行 PCA, 结果显示 2 种生长模式的黄芪可明显区分, 且 PLS-DA 排列实验模型有效 (图 7), 说明 2 种黄芪的次级代谢产物组成存在显著差异。

3.3 初级代谢物和次级代谢物相关性分析

将水相中指认出来的 23 种初级代谢物与 HPLC 测定到的 10 种次级代谢物进行相关分析 (图 8), 可见黄芪皂苷 I、II、IV 之间存在较强的正相关 (pearson 系数大于 0.80), 但这 3 种皂苷与黄芪皂苷

表 4 黄芪样本测定结果

Table 4 Quantitative analytical results of various AR samples

样本	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	芒柄花苷	紫檀烷苷	异黄烷苷	毛蕊异 黄酮	芒柄花素	黄芪皂苷IV	黄芪皂苷III	黄芪皂苷II	黄芪皂苷I
1	0.865	0.249	0.299	0.018	0.012	0.151	0.023	0.196	0.021	0.521
2	0.981	0.251	0.325	0.020	0.011	0.126	0.012	0.184	0.008	0.547
3	0.998	0.290	0.256	0.013	0.012	0.087	0.011	0.121	0.024	0.497
4	1.010	0.309	0.342	0.018	0.012	0.133	0.011	0.318	0.023	0.443
5	0.982	0.296	0.279	0.019	0.011	0.131	0.043	0.260	0.016	0.514
6	0.976	0.288	0.314	0.018	0.011	0.158	0.003	0.057	0.054	0.506
7	0.838	0.196	0.309	0.015	0.011	0.154	0.011	0.023	0.028	0.723
8	0.796	0.302	0.321	0.010	0.010	0.131	0.081	0.105	0.016	0.611
9	0.809	0.222	0.296	0.020	0.011	0.108	0.011	0.019	0.113	0.686
10	0.823	0.126	0.289	0.019	0.011	0.119	0.018	0.112	0.023	0.514
11	0.767	0.253	0.293	0.016	0.012	0.064	0.032	0.135	0.020	0.474
12	0.677	0.198	0.312	0.020	0.010	0.129	0.048	0.054	0.030	0.729

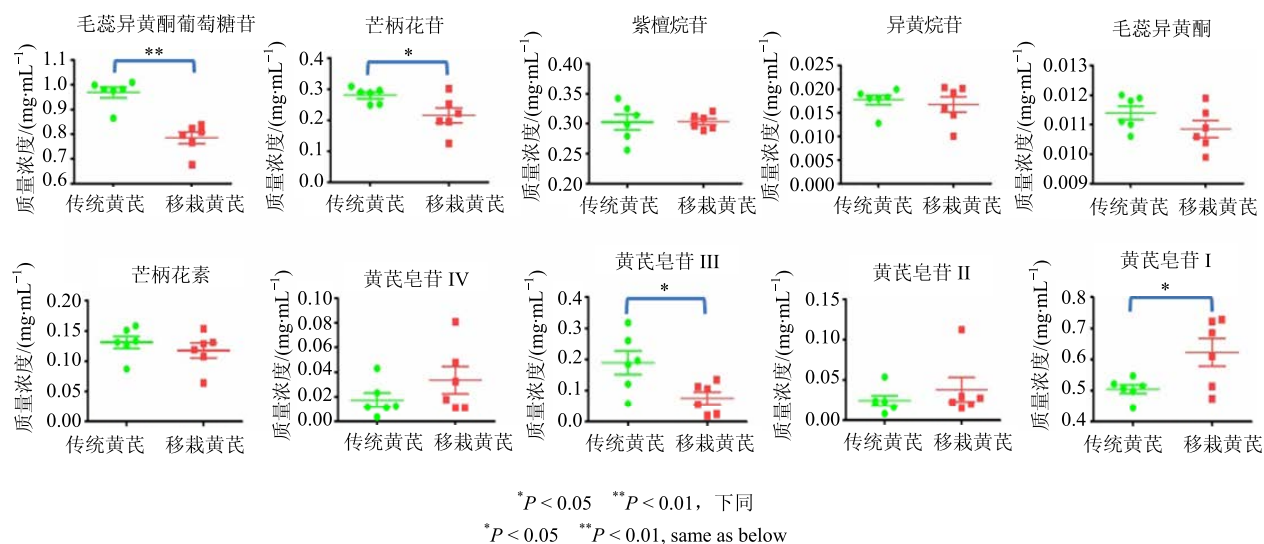


图 5 传统黄芪和移栽黄芪 10 种次级代谢物定量散点图

Fig. 5 Quantitative comparison of 10 secondary metabolites in traditional AR and cultivated AR expressed as content of compounds

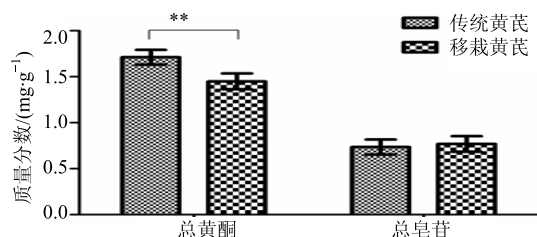


图 6 传统黄芪和移栽黄芪总黄酮和总皂苷量

Fig. 6 Result of total flavonoids and total saponins of traditional AR and cultivated AR

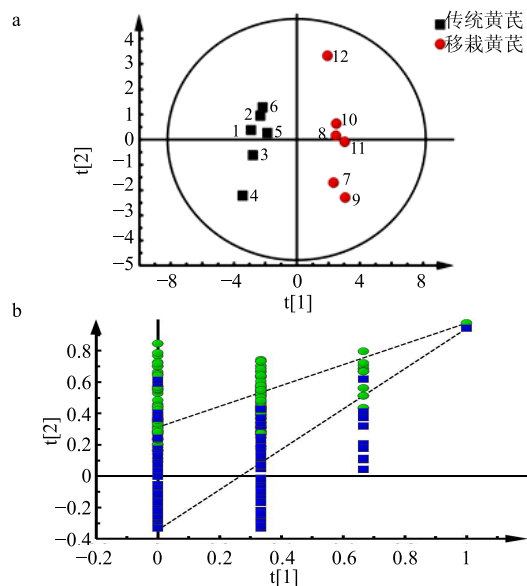


图 7 HPLC-UV-ELSD 测定结果 PLS-DA 散点图 (a) 和模型验证结果 (b)

Fig. 7 PLS-DA score plot (a) and permutation test model validation plot (b) between traditional AR and cultivated AR based on HPLC-UV-ELSD

III 为负相关。黄酮类成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、以及芒柄花素之间也存在较强的正相关 (pearson 系数大于 0.80); 黄芪皂苷 I、II 与毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷为负相关; 此外, 黄芪的部分次级代谢产物与初级代谢产物之间也存在一定的相关性, 如苏氨酸主要与黄芪皂苷 I、II 和 IV 呈较强的负相关 (pearson 系数分别为-0.63、-0.71 和 -0.69); 甜菜碱、蔗糖、富马酸主要与黄酮类成分呈较强的正相关, 蔗糖和富马酸与毛蕊异黄酮葡萄糖苷 pearson 相关系数分别为 0.82 和 0.89, 与芒柄花苷的相关系数分别为 0.80 和 0.86, 富马酸还与芒柄花素也具有较强相关性, 相关系数为 0.83。

4 讨论

本实验对生长于山西北部恒山地区的传统蒙古黄芪和移栽黄芪的化学组成进行了系统比较。核磁共振分析结果显示 2 种生长模式的黄芪在初级代谢物上的差异不大, 但进一步采用 HPLC-UV-ELSD 联用技术对 2 种栽培模式黄芪 10 种次级代谢物的测定发现, 传统黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷以及黄芪皂苷 III 的量显著高于移栽黄芪, 而移栽黄芪中的黄芪皂苷 I 量显著高于传统黄芪。此外, 传统黄芪氯仿相提取物中存在黄酮苷元异黄烷, 而移栽黄芪中则检测不到, 说明异黄烷可能是 2 种生长模式下黄芪的差异代谢物; 传统黄芪中的黄酮类成分量均比移栽黄芪高, 而皂苷量结果相反 (除黄芪皂苷 III 外), 但只有毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪皂苷 I 以及总黄酮量差异显著。

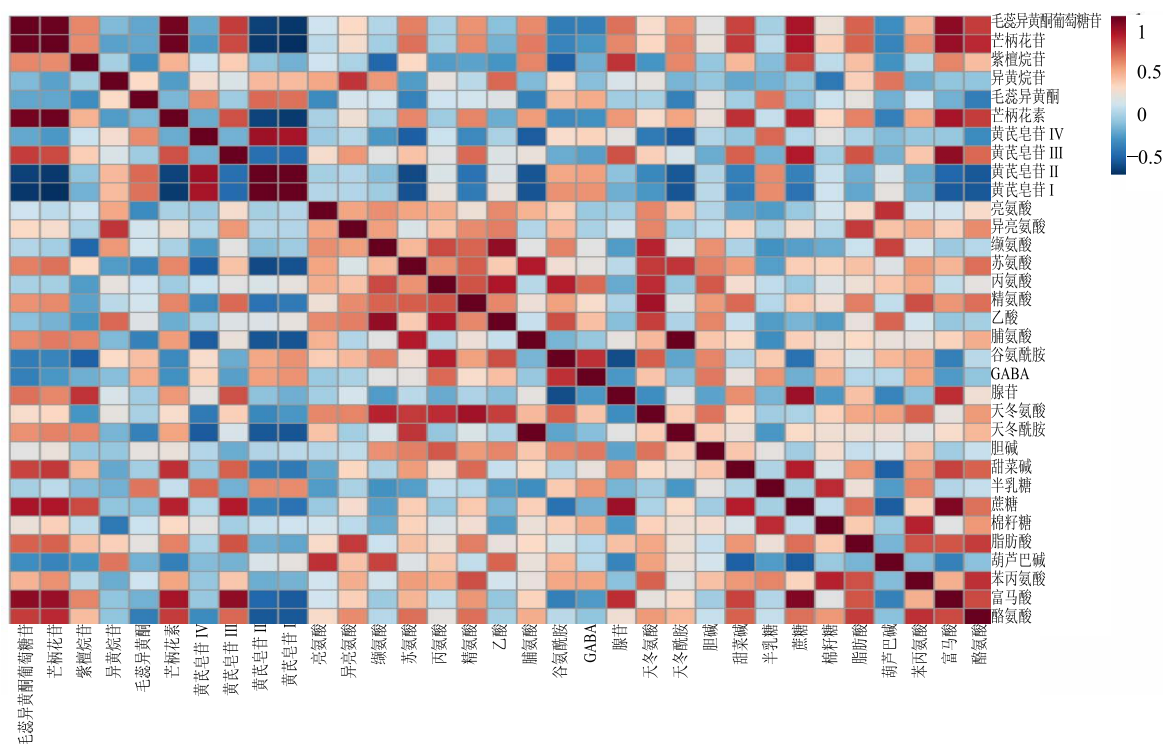


图 8 初级代谢物和次级代谢物相关分析

Fig. 8 Correlation analysis between primary and secondary metabolites

郭宝林课题组在研究传统黄芪中化学成分积累规律时发现：在一定年限范围内，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷以及总黄酮量随生长年限的积累而增加；黄芪皂苷 I 和总皂苷量随生长年限积累而减少^[8]。本实验的研究结果在此基础上进一步证明：生长 5 年及 5 年以上的传统黄芪中，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷以及总黄酮量是区别传统黄芪与移栽黄芪的差异性标志物。

此外，本研究显示部分黄酮类、皂苷类等次级代谢产物之间以及与部分初级代谢物之间存在显著的正相关或负相关，结合药材化学成分积累规律的研究结果，可以筛选出具有代表性的成分作为评价指标，可以为建立“一测多评”的中药质量控制体系提供依据。另外，在植物生长过程中，初级代谢产物参与植物的代谢，是大多次级代谢产物的前体，揭示这种初级与次生代谢产物在生物合成途径上的相关性，可为阐明道地黄芪的品质特征奠定基础。

然而，本实验只比较了 5 年及 5 年以上的传统黄芪样本。接下来将采用各年限传统黄芪作为研究对象，进一步研究异黄酮苷与生长年限和种植模式的相关性，确定传统黄芪中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、总黄酮以及黄芪皂苷 I 的量是否与生长年限相

关，移栽黄芪中这些物质与传统黄芪哪一生长年限相近，寻找传统黄芪中化学成分的积累与生长年限的对应关系，为建立合理的山西省道地中药材黄芪商品规格等级标准提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Li X D, Tian L C, Ming L, *et al.* Use of the metabolomics approach to characterize Chinese medicinal material Huangqi [J]. *Mole Plant*, 2011, 5(2): 291-293.
- [3] 温宇寒. 蒙古黄芪的化学成分研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2008.
- [4] 杨芮平. 膜荚黄芪的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [5] 周业庆. 不同来源黄芪的 AFLP 标记和代谢谱分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [6] 张贺廷, 王 健, 程铭恩, 等. 蒙古黄芪主产区栽培及商品规格等级调查 [J]. *中药材*, 2015, 38(12): 2487-2492.
- [7] Liu J, Zhao Z Z, Chen H B, *et al.* Review of *Astragali Radix* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 90-105.
- [8] 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): 1829-183.
- [9] 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(2): 157-165.

- [10] 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(1/2): 162-169.
- [11] Song J Z, Yiu 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(2): 399-406.
- [12] 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(11): 2087-2097.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 覃红萍, 鲁 静, 林瑞超, 等. 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.
- [16] 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.
- [17] 姚雪莲, 裴彩云, 王宗权, 等. 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.
- [18] 陈有根, 辛敏通, 杨 滨, 等. 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.
- [19] 何 盼, 李震宇, 范圣此, 等. 基于代谢组学技术和 ITS2 序列的恒山黄芪与川黄芪差异性研究 [J]. 药学报, 2013, 48(10): 1595-1601.
- [20] 万燕晴. 基于化学成分的黄芪药材质量评价研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [21] 马晓丰. 蒙古黄芪的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.