

• 药材与资源 •

黄芪药材性状和化学特征与绝对生长年限的相关性分析研究

张瑞^{1,2,3,4}, 曹庆伟^{1,2,3,4}, 李科^{1,3,4*}, 秦雪梅^{1,3,4*}

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

3. 山西大学 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 通过分析黄芪 *Astragali Radix* 药材的性状以及黄酮类化学成分与绝对生长年限的相关性, 明确黄芪根的生长年限是引起黄芪药材性状和化学差异性的主要因素。 **方法** 收集不同产地、不同等级的黄芪药材, 对其外观形态定性描述, 长度、直径定量测定, 并采用徒手切片法观察不同等级仿野生芪的生长年限分布, 观察其分布规律。采用 UPLC-UV 法, 色谱柱为 Ultimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 230 nm, 进样量 20 μL, 乙腈-水梯度洗脱, 建立了 24 批不同产地黄芪药材黄酮类成分 HPLC-UV 指纹图谱, 并对不同等级仿野生芪和栽培芪 5 种黄酮类成分进行含量测定。 **结果** 将不同生长方式的黄芪药材划分为仿野生芪和栽培芪 2 个规格。特等黄芪主要是 5 年以上生长年限的根段, 一等主要是 4~5 年生的根段, 二等主要是 3~4 年生的根段, 三等主要是 2~3 年生的根段, 四等主要是 1~2 年生的根段。不同产地、不同等级黄芪指纹图谱中指出 5 个共有峰, 采用相似度评价软件分析, 以仿野生芪图谱为参照, 仿野生芪样品相似度为 0.892~0.994, 栽培芪样品相似度为 0.274~0.531, 主成分分析和聚类分析均显示仿野生芪和栽培芪可以明显分成 2 类。仿野生芪 5 种黄酮类成分含量明显高于栽培芪, 仿野生芪 (除特等外) 总黄酮含量与等级 (或直径、年限) 呈正相关, 栽培芪与等级不相关。 **结论** 本研究为黄芪药材商品规格等级标准的制定提供科学依据, 为进一步构建黄芪药材质量等级标准奠定基础。 **关键词:** 黄芪药材; 商品规格等级标准; 性状分析; 黄酮类成分; 绝对生长年限

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)02-0451-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.023

Analysis of correlation between commercial traits and chemical characteristics and absolute growth years of *Astragali Radix*ZHANG Rui^{1,2,3,4}, CAO Qing-wei^{1,2,3,4}, LI Ke^{1,3,4}, QIN Xue-mei^{1,3,4}

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 Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

4. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To clear that the growth period of *Astragali Radix* (AR) is the main factor causing the traits and chemical differences by analyzing the correlation between commercial traits and chemical characteristics and absolute growth years of AR. **Methods** Different grades AR from different origin were collected and divided into two specifications-wild *Astragali Radix* (WAR) and transplanted *Astragali Radix* (TAR) according to character description, length and diameter. The growth years distribution of different grades WAR were observed by hand-sections to find its distribution rule. The separation was performed on a Ultimate C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mixed mobile phase of water and acetonitrile in a gradient mode. The flow rate was 1 mL/min and the wavelength of measurement was 230 nm. A total of 24 batches of the AR were determined. The content of five flavonoids in WAR and TAR were determined. **Results** The results showed that the

收稿日期: 2019-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家重点研发计划项目 (2019YFC1710805)

作者简介: 张瑞, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药材质量控制。E-mail: 1358779225@qq.com

*通信作者 李科 Tel/Fax: (0351)7019297 E-mail: like@sxu.edu.cn

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

growth year of top grade AR was more than five years, grade I AR was 4—5 years, grade II AR was 3—4 years, grade III and IV AR were 1—3 years. The HPLC-UV specific chromatograms fingerprints of chemical constituents were established from the 24 batches of AR with five characteristic common peaks. Twenty-four batches of samples was assessed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM, the similarity of WAR was 0.892—0.994 and TAR was 0.274—0.531. AR were classified as two clusters including WAR and TAR by clustering analysis (CA) and principle component analysis (PCA). The content of total flavonoids of WAR were significantly higher than TAR. Exception the top grade WAR, the content of total flavonoids in WAR was significantly positively correlated with grade. There was no correlation in different grades of TAR. **Conclusion** This study provides a scientific basis for the establishment of the grade standard of AR, and lays a foundation for further construction of the quality grade standard of AR.

Key words: *Astragali Radix*; standard of specification and grade; trait analysis; flavonoids; absolute growth years

中药材的传统商品规格等级是根据不同交易品类(基原、栽培方式、产地、药用部位等)进行规格划分,为区分中药材品质的优劣,根据外观特征、断面特性、质地、质量、大小、长度、直径、含杂率等进行“一等、二等、三等”的等级划分,或用“统货”来表示药材的商品等级^[1],基于中药材性状的商品规格等级标准对市场有指导作用,但也有一定的局限性。大量研究表明^[2-3],中药材传统商品规格等级划分与其质量的相关性并不太强,产品的质量仅以《中国药典》这一标准为底线,不能完全起到择优淘劣的作用^[4]。近年来提出的中药材质量等级标准^[5]有一定的优点,它是以质量等级区分药材商品规格的标准,区别于传统以药材大小、粗细、质量作为商品规格区分的药材等级标准,将性状与关联药效的化学成分指标结合作为划分依据,对中药材质量评价有重要的推进作用。但是,这些指标(性状与化学成分)与质量的相关性需要科学实验加以明确,对引起药材质量的某一主要因素更需明确,才能为选择适宜的性状和化学指标用以划分规格和等级提供科学依据。

黄芪始载于《神农本草经》,列为上品^[6],《中国药典》2015 年版规定其为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根^[7]。蒙古黄芪作为主流商品占据了大部分黄芪药材市场,由于野生黄芪(wild *Astragali Radix*, WAR)生长年限太长导致产量供不应求,市场出现了生长年限缩短为 2~3 年的移栽黄芪(transplanted *Astragali Radix*, TAR),缓解了市场需求紧张,也冲击了传统的野生芪资源。然而,由于产地、种植方式、生长年限等不同引起的 2 种黄芪的性状差异虽然非常明显,但原有的“黄芪商品规格等级标准”却无相应的规格之分^[8],不能发挥药材商品规格等级标准对市场的择优淘劣

作用。由于野生黄芪根的生长年限与外观性状上并无准确的鉴别特征,划分药材等级的主要依据是根的长度和直径,这 2 个指标易受到外界土壤肥力的影响而带来不准确性。那么长度和直径与其内在活性成分之间存在怎样的关系?是否与根的绝对生长年限相关?就成为解决黄芪药材等级划分依据准确性的关键。课题组前期^[9]采用徒手切片与石蜡切片技术对 1~6 年生黄芪根中的生长轮现象进行观察研究,发现不同年限黄芪根去掉空心部分处生长轮数目与黄芪实际种植年限一致,且同一黄芪根从顶端无空心部分开始至根尖生长轮数目逐渐递减,横切面直径差为 0.3 cm 左右时,生长轮数目相差 1。该结果虽表明了根直径与生长年限的密切关系,但与化学成分的关系还不明确。

因此,本研究收集了来自 2 个省不同等级的共 24 批黄芪药材,对其性状指标进行定性定量分析,对不同等级仿野生芪的绝对生长年限分布进行观察统计,同时建立黄酮类指纹图谱,并对仿野生芪和栽培芪 5 种黄酮类成分进行含量测定,探讨黄芪药材性状等级与其内在化学成分间的相关性,为黄芪药材商品规格等级标准的制定提供依据,为进一步构建黄芪药材质量等级标准奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

24 批黄芪药材直接从产地收集,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。药材样品留存于山西大学中医药现代研究中心样品库,黄芪药材信息见表 1。

1.2 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪,安捷伦 1260 高效液相色谱仪;Waters 2489 检测器,安捷伦 G1316A 紫外检测器;sartorius BSA124S 分析天平(万分之一);恒温数显水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);

表 1 黄芪样品信息 ($n = 60$)
Table 1 Samples information of *Astragali Radix* ($n = 60$)

编号	产地	等级	收集年	种植方式	长度/cm		头部斩口下 3.5 cm 处直径/cm		末端直径/cm	
					范围	$\bar{x} \pm s$	范围	$\bar{x} \pm s$	范围	$\bar{x} \pm s$
S1	山西浑源	特等	2017	仿野生	35.6~51.1	44.5± 5.9	1.7~2.2	1.9±0.2	1.3~1.6	1.4±0.1
S2	山西浑源	一等	2017	仿野生	42.8~59.7	52.2± 6.6	1.5~1.9	1.7±0.2	1.1~1.4	1.2±0.1
S3	山西浑源	二等	2017	仿野生	50.8~65.6	58.5± 7.1	1.2~1.6	1.4±0.1	0.8~1.3	1.0±0.2
S4	山西浑源	三等	2017	仿野生	28.6~58.7	42.6± 9.6	1.0~1.4	1.2±0.2	0.7~1.0	0.8±0.1
S5	山西浑源	四等	2017	仿野生	31.1~60.9	44.5± 9.2	0.8~1.2	1.0±0.1	0.5~0.8	0.7±0.1
S6	山西应县	特等	2017	仿野生	31.2~54.4	42.9± 9.6	1.9~2.5	2.2±0.3	1.2~2.0	1.6±0.3
S7	山西应县	一等	2017	仿野生	24.1~52.0	36.7±10.4	1.5~1.9	1.7±0.2	1.0~1.5	1.2±0.2
S8	山西应县	二等	2017	仿野生	29.8~51.2	38.2± 7.4	1.3~1.7	1.5±0.2	0.9~1.3	1.1±0.1
S9	山西应县	三等	2017	仿野生	31.2~54.4	40.9± 8.0	1.2~1.5	1.3±0.1	0.7~1.1	0.9±0.2
S10	山西应县	四等	2017	仿野生	30.8~56.1	43.4± 9.2	0.9~1.3	1.1±0.2	0.6~0.9	0.7±0.1
S11	甘肃渭源	特等	2017	栽培	23.8~38.0	31.5± 5.5	1.5~1.9	1.7±0.1	1.1~1.6	1.3±0.2
S12	甘肃渭源	一等	2017	栽培	22.1~29.5	25.5± 2.9	1.2~1.6	1.4±0.2	1.0~1.3	1.1±0.1
S13	甘肃渭源	二等	2017	栽培	22.0~33.8	27.7± 4.6	1.1~1.4	1.2±0.1	0.8~1.0	0.9±0.1
S14	甘肃渭源	三等	2017	栽培	22.5~37.0	28.7± 5.3	1.0~1.2	1.1±0.1	0.7~1.0	0.8±0.1
S15	甘肃渭源	四等	2017	栽培	18.9~32.9	25.6± 4.9	0.7~1.0	0.9±0.1	0.5~0.8	0.7±0.1
S16	甘肃岷县	特等	2017	栽培	25.4~38.3	32.3± 4.9	1.6~2.1	1.9±0.2	1.3~1.7	1.4±0.1
S17	甘肃岷县	一等	2017	栽培	23.5~36.7	31.2± 4.9	1.4~1.7	1.5±0.1	1.0~1.3	1.2±0.1
S18	甘肃岷县	二等	2017	栽培	23.8~35.7	29.7± 4.3	1.2~1.5	1.4±0.1	0.9~1.2	1.1±0.1
S19	甘肃岷县	三等	2017	栽培	26.2~38.4	32.4± 4.6	1.0~1.4	1.2±0.1	0.8~1.0	0.9±0.1
S20	甘肃岷县	四等	2017	栽培	23.8~33.9	29.2± 3.8	0.9~1.2	1.0±0.1	0.6~0.9	0.8±0.1
S21	甘肃陇西	一等	2017	栽培	25.9~50.0	36.5± 9.0	1.1~1.6	1.3±0.2	0.8~1.1	0.9±0.1
S22	甘肃陇西	二等	2017	栽培	25.8~40.5	32.4± 5.5	0.9~1.2	1.0±0.1	0.7~0.9	0.8±0.1
S23	甘肃陇西	三等	2017	栽培	23.5~37.7	30.4± 5.4	0.8~1.1	0.9±0.1	0.6~0.8	0.7±0.1
S24	甘肃陇西	四等	2017	栽培	25.5~40.9	32.9± 6.1	0.6~0.9	0.8±0.1	0.5~0.7	0.6±0.1

sartorius CPA 225D 分析天平 (十万分之一)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水 (纯净水); 甲醇 (分析纯, 国药集团); 对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 20150408)、芒柄花苷 (批号 20150425)、(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (紫檀烷苷, 批号 20150318)、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, 批号 20150328) 和 8,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷 (异黄烷, 批号 20150712) (江苏永健有限公司, 质量分数均>98%)。

2 方法

2.1 性状测量

对收集到的 24 批黄芪药材, 测量其总长度 (length)、斩口下 3.5 cm 处直径 (diameter of 3.5 cm under head chopping)、末端直径 (diameter of terminatio), 结果见表 1。

2.2 年限鉴别取样

取 S1~S5 号不同等级仿野生黄芪药材各 6 根, 去掉芦头及空心部分根段, 参照前期建立的徒手切

片法^[9], 在体视显微镜下观测记录木质部中逐渐形成的粉红色环的数目。

2.3 黄酮类成分指纹图谱与含量测定的色谱条件与系统适用性

Venuil MP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); Ultimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 230 nm; 进样量 20 μ L; 流动相为乙腈 (A)-水 (B); 梯度洗脱程序: 0~8 min, 20% A; 8~15 min, 30% A; 15~30 min, 43% A; 30~40 min, 60% A; 40~50 min, 100% A; 50~60 min, 100% A; 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (色谱峰 1) 计算理论塔板数不低于 7 000。

2.4 混合对照品溶液的制备

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄烷苷、异黄烷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 1.870、1.360、1.362、0.601、1.046 mg/mL 的储备液。取对照品储备液适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 56.5、81.3、75.5、86.8、

83.79 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.5 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 150 mL 圆底烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,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。

2.6 指纹图谱方法学考察

2.6.1 精密度试验 取 S1 号黄芪药材,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰为参照峰,计算各色谱峰(单峰面积大于 5%总峰面积)与参照峰的相对保留时间和相对峰面积,结果相对保留时间的 $RSD < 0.25\%$,相对峰面积的 $RSD < 5\%$,表明仪器精密度良好,符合特征图谱要求。

2.6.2 重复性试验 取 S1 号样品 6 份,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,记录色谱图,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰为参照峰,计算各色谱峰(单峰面积大于 5%总

峰面积)与参照峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 $RSD < 2\%$,各主要共有峰的相对峰面积 $RSD < 5\%$,表明方法重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取 S1 号样品 6 份,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别于供试品制备后 0、3、6、12、24、48 h 进样分析,记录色谱图,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰为参照峰,计算各色谱峰(单峰面积大于 5%总峰面积)与参照峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 $RSD < 0.15\%$,各主要共有峰的相对峰面积 $RSD < 5\%$,表明供试品在 48 h 内稳定性良好。

2.7 5 种黄酮类成分含量测定的方法学考察

2.7.1 线性关系考察 精密量取“混合对照品溶液的制备”项下混合对照品溶液,按照“色谱条件”项下色谱条件测定。横坐标(X)为对照品溶液的质量,纵坐标(Y)为峰面积,绘制标准曲线,结果见表 2,表明各成分在各自范围内均呈良好的线性关系。

表 2 5 种黄酮类成分的线性关系

Table 2 Linear relationships of five flavonoids components

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 508.32 X + 1497$	1.000 0	0.298~18.700
芒柄花苷	$Y = 2542 X + 236.1$	0.999 9	0.212~6.800
紫檀烷苷	$Y = 1951 X + 156.9$	0.999 9	0.213~6.810
异黄烷苷	$Y = 1621.1 X + 227.6$	0.999 1	0.094~6.010
异黄烷	$Y = 2950.3 X + 28.7$	0.999 9	0.330~10.460

精密度、稳定性、重复性试验同指纹图谱,结果良好。

2.7.2 加样回收率试验 精密称取含量已知的样品(S1 样品)6 份,每份约 20 mg 加入适量对照品溶液,按照“2.3”项下色谱条件测定,计算回收率,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄烷苷、异黄烷平均加样回收率分别为 99.67%、98.73%、98.85%、99.81%、98.64%; RSD 值分别为 1.10%、0.93%、1.10%、0.62%、1.48%。

2.8 数据处理

采用 SPSS 软件对指纹图谱各色谱峰的峰面积进行聚类分析,采用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析,采用 Metabo Analyst 4.0 在线分析软件进行热图分析。

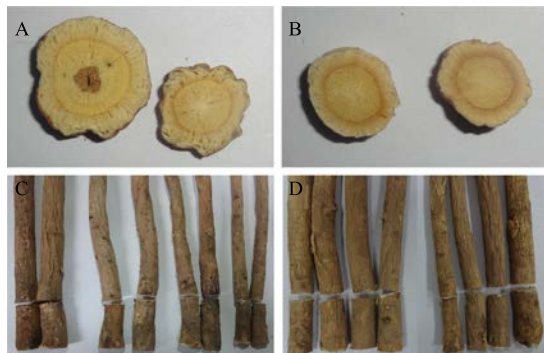
3 结果与分析

3.1 黄芪药材商品性状分析

3.1.1 黄芪药材规格的划分 根的形态特征与种植方式的关系 黄芪药材的性状特征主要有性状、大小(长度、直径)、表皮颜色、外观质地、断面特征、气味等构成。鲜黄芪在加工分级时要经过过去残留茎和芦头→减去芪毛、侧根、细尾→捆把→晾晒→修剪→分等一系列流程,各产地加工出来的黄芪在形态上都有一些共性:表面淡棕黄色或棕褐色,有不整齐的纵皱纹或纵沟。质硬而韧,不易折断,断面纤维性强,并显粉性,皮部黄白色,木部淡黄色,有放射状纹理。气微,味微甜,嚼之微有豆腥味。也存在一些差异性:野生芪表皮粗糙,根皮绵韧,断面皮部有裂隙,木心黄,质地松泡,老

根中心有的呈枯朽状，黑褐色或呈空洞。而移栽芪表皮平滑，根皮较柔韧，断面致密，有的木心中央黄白色，质地坚实（图 1）。故依据不同种植方式的形态性状差异，以及实际市场中黄芪药材的资源分布，可以划分为仿野生芪和栽培芪 2 个规格。

3.1.2 黄芪药材等级的划分 根直径与长度在所



A-仿野生芪的横切面 B-栽培芪的横切面 C-仿野生芪表皮外观 D-栽培芪表皮外观
A-cross section of wild *Astragali Radix* B-cross section of transplanted *Astragali Radix* C-epidermis of wild *Astragali Radix* D-epidermis of transplanted *Astragali Radix*

图 1 黄芪的外观特征

Fig. 1 Morphological characters of *Astragali Radix*

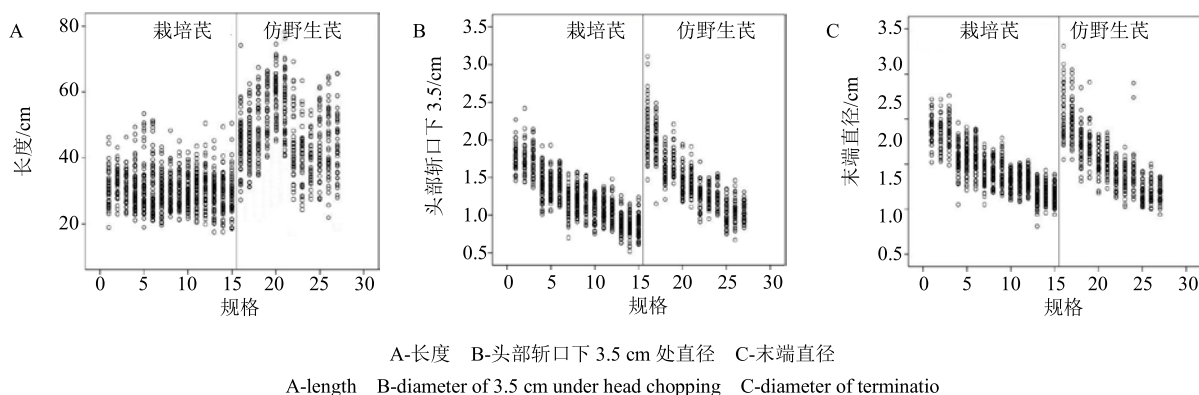


图 2 不同黄芪药材长度、直径散点图

Fig. 2 Scatter diagram of length and diameter from different *Astragali Radix*

结果见表 3。随着等级的降低生长轮数目减少，特等黄芪末端截面基本为 5 个生长轮，说明特等黄芪主要是 5 年以上生；依次说明，一等主要分布在 4~5 年，二等主要分布在 3~4 年，三等主要是 2~3 年生黄芪，四等主要是 1~2 年生。不同等级上下端直径分布特点：特等：1.55~1.96 cm，直径差为 0.41 cm；一等：1.23~1.62 cm，直径差为 0.39 cm；二等：1.04~1.40 cm，直径差为 0.36 cm；三等：0.79~1.11 cm，直径差为 0.32 cm；四等：0.64~0.96

有性状中大小最易量化，《76 种药材商品规格》中黄芪药材依据长度、直径划分等级。分别测量 24 批黄芪药材的长度、头部斩口下 3.5 cm 处直径、末端直径（表 1），并对各等级黄芪的测量值做散点图（图 2），观察各等级黄芪药材的分布情况。从长度看，甘肃栽培芪各等级间长度非常均一，主要分布在 20~40 cm，可能是由于种植方式为育苗移栽，其生长年限多为 2 年生引起的。仿野生芪主要分布在 30~70 cm，甚至更长。尤其是浑源产黄芪各等级间长度有明显差异：二等>一等>特等>三等、四等，仿野生芪长度总体大于栽培芪，可能与仿野生芪为传统直播种植，生长年限较长，根的长度可达 1 m 以上，这可以作为区分仿野生芪和栽培芪的一个指标。

仿野生芪和栽培芪头部斩口下 3.5 cm 处直径、末端直径分布有明显规律，等级越高直径越大，相同等级中仿野生芪直径大于栽培芪；不同等级间仿野生芪范围大于栽培芪。栽培芪各等级间直径交叉较大，直径差异不明显。栽培芪长度较均匀而直径有粗细，可能与种植过程中化肥的使用有关。

3.1.3 仿野生黄芪药材直径和长度与生长年限的相关性分析 对不同等级仿野生黄芪上下端年限分布以及 2 个年限间的长度分布进行了观察统计，

cm，直径差为 0.32 cm。由此可知，各等级上下端年限相差 1 年左右，直径差相差 0.3 cm 左右，该结果与前期研究^[10]结果一致，随横切面直径变小，生长轮数目减少，且横切面直径差为 0.3 cm 左右，生长轮数目相差 1。

为使结果更加直观，依据以上性状差异，对不同等级仿野生芪进行聚类分析（图 3），各等级可以划分为 4 类：特等聚为一类、一等聚为一类、二等聚为一类、三等和四等聚为一类。从热图中可以看

表 3 不同等级仿野生芪的年限分布

Table 3 Years range of different grade of wild *Astragali Radix*

等级	头部年限/年	末端年限/年	头部口下 3.5 cm 直径/cm	末端直径/cm	直径差/cm	长度/cm
特等	7	5	2.01	1.57	0.44	44.9
	5	5	1.80	1.43	0.37	43.4
	6	5	1.88	1.49	0.39	35.4
	6	5	2.03	1.61	0.42	35.3
	6	5	1.91	1.45	0.46	41.2
	7	5	2.11	1.75	0.36	40.8
平均值			1.96	1.55	0.41	40.2
一等	5	4	1.68	1.27	0.41	53.8
	5	4	1.63	1.21	0.42	46.7
	5	4	1.73	1.28	0.45	46.2
	4	3	1.48	1.09	0.39	48.3
	5	4	1.63	1.26	0.37	48.1
	5	4	1.56	1.24	0.32	52.7
平均值			1.62	1.23	0.39	49.3
二等	5	3	1.62	1.12	0.50	63.1
	5	3	1.61	1.07	0.54	54.5
	4	3	1.38	1.01	0.37	50.3
	4	3	1.22	1.02	0.20	60.2
	4	3	1.34	1.01	0.33	56.2
	4	3	1.24	1.01	0.23	57.2
平均值			1.40	1.04	0.36	56.9
三等	3	2	1.14	0.72	0.42	42.8
	2	2	1.05	0.79	0.36	47.3
	2	2	1.09	0.84	0.25	46.2
	3	2	1.12	0.78	0.34	39.1
	2	2	1.10	0.75	0.35	49.8
	3	2	1.16	0.87	0.29	40.8
平均值			1.11	0.79	0.32	44.3
四等	2	1	0.86	0.64	0.22	33.8
	2	1	1.12	0.68	0.44	32.4
	2	1	1.06	0.67	0.39	43.8
	2	1	0.78	0.56	0.22	47.4
	2	1	1.00	0.62	0.38	46.5
	2	1	0.95	0.67	0.28	37.8
平均值			0.96	0.64	0.32	40.3

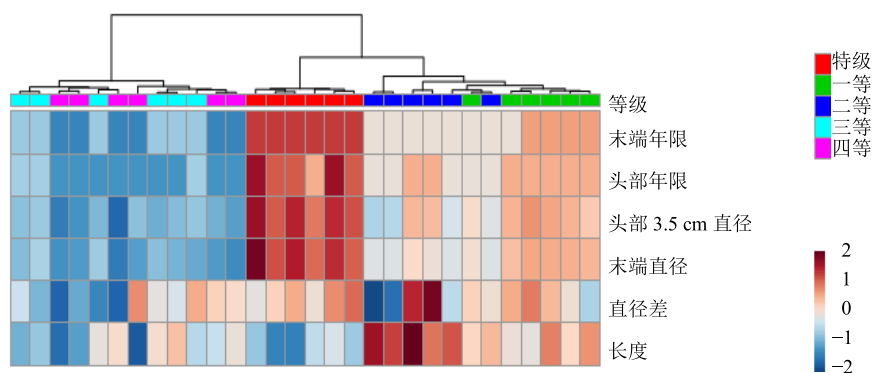


图 3 不同等级仿野生芪聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis results of different grades of wild *Astragali Radix*

出, 不同等级黄芪药材的实际生长年限有明显差异, 直径和年限分布规律保持一致。

3.2 HPLC-UV 指纹图谱分析研究

通过对 24 批 (每批 6 份) 样品的测定, 得各样品的 HPLC 谱图, 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 软件, 以 S1 为指定参照谱图, 采用中位数法, 时间窗宽度为 0.1, 经比较分别确立了 24 批黄芪黄酮类成分特征图谱 (图 4)。根据各批样品 HPLC-UV 指纹图谱的各共有峰相对保留时间及相对峰面积的相关参数, 对共有峰峰面积较稳定的色谱峰进行标定, 共标定出 5 个共有峰。在相同的色谱条件下, 将黄酮类对照品混合溶液进样分析, 并与样品特征图谱中相应色谱峰进行比较, 确定样品特征图谱中的峰 1、2、3、4、5 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄烷苷、异黄烷 (图 5), 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰, 计算特征峰 2~5 的相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 。相对保留时间规定为 1.0 (峰 1)、1.91 (峰 2)、2.08 (峰 3)、2.15 (峰 4)、3.64 (峰 5)。

3.3 种植方式与指纹图谱相关性分析

3.3.1 相似度分析 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 软件, 以野生芪 HPLC-UV 黄酮类指纹图谱为参照图谱, 采用夹角余弦法计算各样品

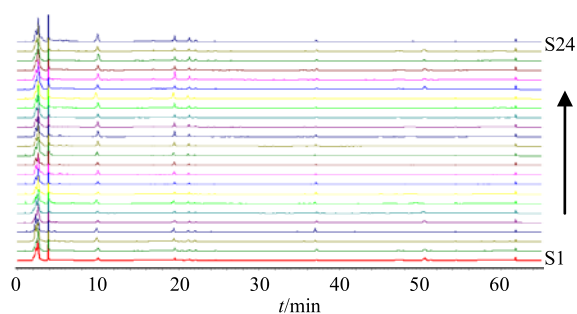
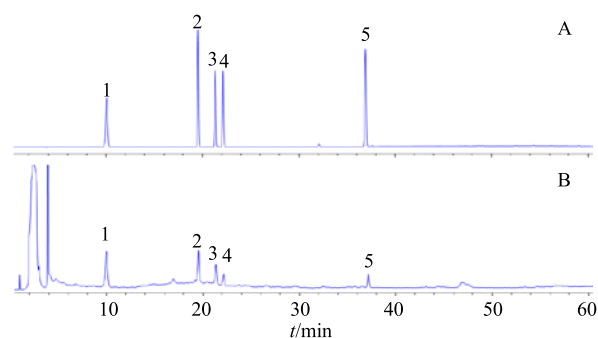


图 4 24 批黄芪样本的 HPLC-UV 图谱

Fig. 4 HPLC-UV fingerprint from 24 AR samples



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2-芒柄花苷 3-紫檀烷苷 4-异黄烷苷
5-异黄烷, 图 8 同

1-calycosin-7-O- β -D-glucoside 2-ononin 3-(6aR,11aR)-9,10-dimethoxypterocarpan 4-8,2'-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan-7-O- β -D-glucopyranoside 5-8,2'-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan, same as below fig.8

图 5 对照品 (A) 和代表性样品 (B) 的 HPLC-UV 图谱
Fig. 5 HPLC-UV specific chromatogram of reference substance (A) and typical sample (B)

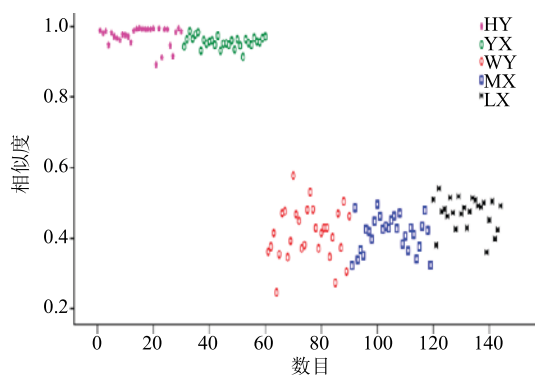
的相似度数据 (表 4), 并对 24 批黄芪药材相似度做散点图 (图 6), 可以看出仿野生芪样品的相似度为 0.892~0.994, 栽培芪样品的相似度为 0.274~0.531, 表明不同种植方式的黄芪药材质量差异较大, 而且与仿野生芪相比, 栽培芪不同等级的药材质量差异较大, 规律性不强。

3.3.2 主成分分析 (PCA) PCA 是利用降维的思想, 把多个指标转化为少数几个综合指标的一种对多变量数据进行综合简化的多元统计分析方法^[10]。在相似度评价的基础上, 对 24 批 (每批 6 份) 黄芪样本指纹图谱的峰面积进行 PCA (图 7-A), 仿野生芪和栽培芪可以明显分开, 不同等级间栽培芪较聚拢, 仿野生芪较分散。进一步对不同等级的仿野生芪和栽培芪进行 PCA 分析 (图 7-B、7-C), 不同等级的仿野生芪可以区分开, 而不同等级栽培芪没有明显规律。

表 4 24 批黄芪样品相似度

Table 4 Similarity of 24 batches of AR samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.977	S7	0.952	S13	0.446	S19	0.390
S2	0.968	S8	0.953	S14	0.399	S20	0.424
S3	0.992	S9	0.946	S15	0.398	S21	0.477
S4	0.963	S10	0.961	S16	0.382	S22	0.467
S5	0.970	S11	0.371	S17	0.441	S23	0.497
S6	0.970	S12	0.451	S18	0.446	S24	0.439

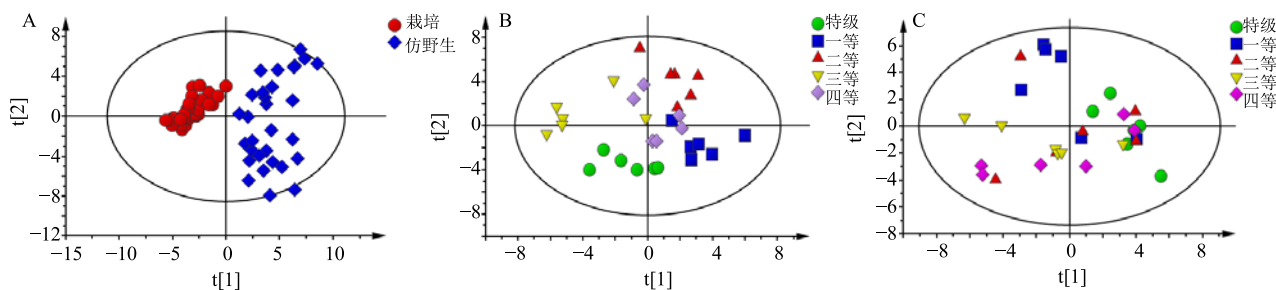


HY-山西浑源 YX-山西应县 WY-甘肃渭源 MX-甘肃岷县 LX-甘肃陇西,
图 8 同

HY-Shanxi Hunyuan YX-Shanxi Yingxian WY-Gansu Weiyuan MX-Gansu Minxian LX-Gansu Longxi, same as figure 8

图 6 不同批次黄芪样本的相似度散点图

Fig. 6 Similarity results of AR sample from different batches



A-仿野生芪和栽培芪的 PCA 得分图 B-不同等级仿野生芪的 PCA 得分图 C-不同等级栽培芪的 PCA 得分图

A-PCA score plot of WAR and TAR B-PCA score plot of different grades of WAR C-PCA score plot of different grades of TAR

图 7 不同黄芪样品的 PCA 结果

Fig. 7 PCA score plot of AR samples

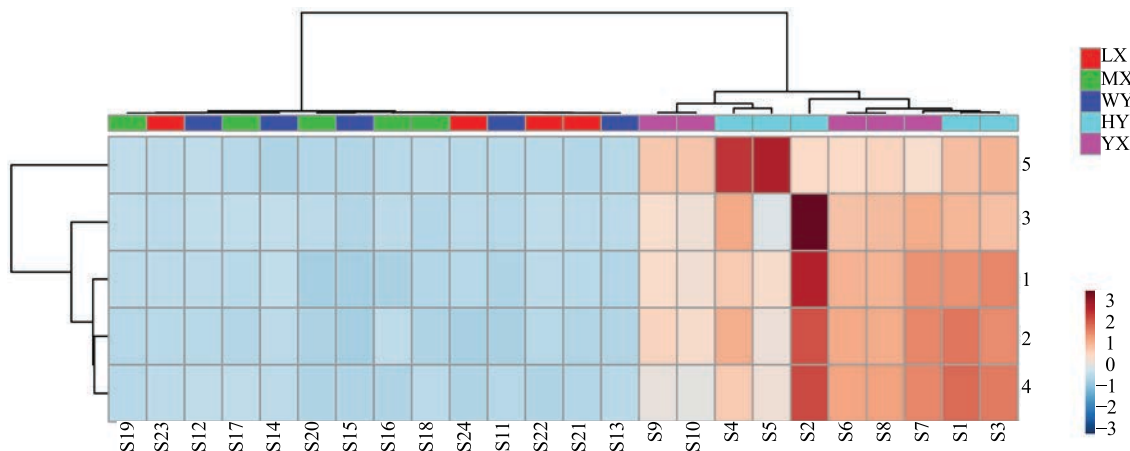


图 8 不同批次黄芪样品的 CA 结果

Fig. 8 CA results of AR samples

3.3.3 聚类分析 (CA) CA 是通过将观察对象依据某些特征加以归类, 从而建立样本与样本之间相似关系或亲疏关系的一种数据分析手段^[11]。以 5 个共有峰相对峰面积为变量, 采用 SPSS 2.0 软件, 采用欧氏距离进行聚类分析, 距离越短表示越相似, 结果见图 8。24 批黄芪药材明显被分为 2 类, 山西浑源、应县的仿野生芪为一类, 甘肃渭源、岷县、陇西的栽培芪为一类, 仿野生芪的三等、四等 (S4、S5、S9、S10) 聚为一类。特等、一等、二等 (S1、S2、S3、S6、S7、S8) 聚为一类。从成分来看, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄烷苷聚为一类, 然后与异黄烷合并为一类。

3.3.4 5 种黄酮类成分含量测定 分别选取 5 批仿野生芪和 5 批栽培芪的代表样本, 对黄芪中的 5 个黄酮类成分进行含量测定, 结果见表 5 和图 9, 可以看出仿野生芪 5 种成分含量明显高于栽培芪。

表 5 5 种黄酮类成分含量测定结果 ($n = 6$)

Table 5 Results of content determination of five constituents ($n = 6$)

规格	等级	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	异黄烷
仿野生芪	特等	0.981	0.343	0.261	0.332	0.265
	一等	1.352	0.384	0.534	0.363	0.213
	二等	1.012	0.321	0.248	0.313	0.281
	三等	0.763	0.282	0.280	0.223	0.471
	四等	0.681	0.193	0.143	0.181	0.511
栽培芪	特等	0.361	0.101	0.091	0.103	0.074
	一等	0.413	0.117	0.103	0.113	0.083
	二等	0.382	0.108	0.096	0.106	0.072
	三等	0.424	0.121	0.106	0.112	0.061
	四等	0.331	0.095	0.083	0.096	0.063

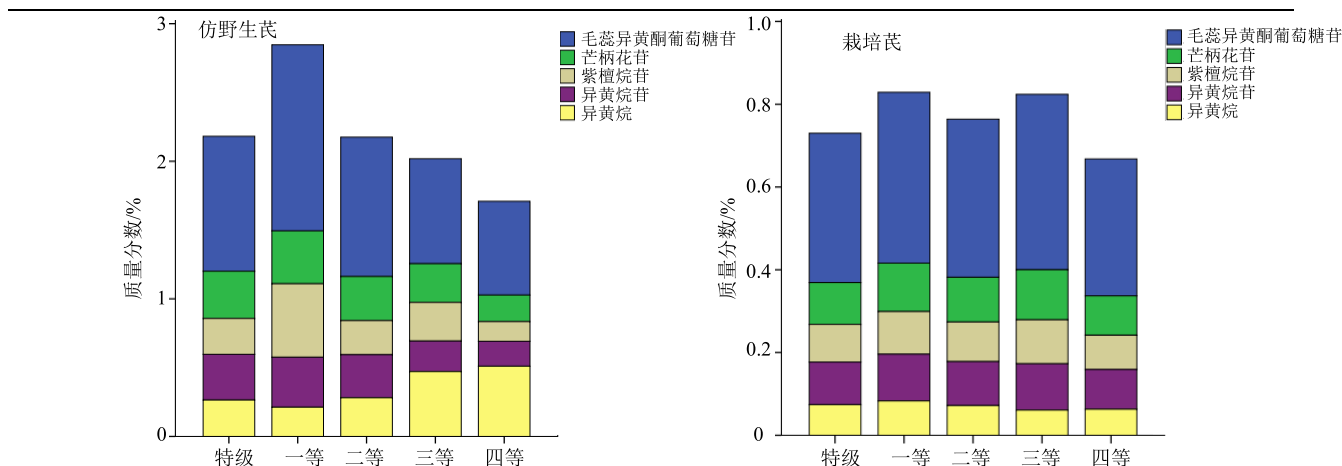


图 9 不同等级黄芪黄酮类成分含量

Fig. 9 Content of flavonoids in different grade of AR

3.3.5 黄酮类成分与绝对生长年限的相关性分析
 基于 5 种黄酮类成分含量对不同等级仿野生芪和栽培芪样本进行分析 (图 9), 仿野生芪中, 除特级外, 总黄酮含量与等级呈正相关, 一等总黄酮含量最高, 对应年限 4~5 年, 与实验室前期报道一致; 其原因可能是由于特等黄芪药材生长年限多为 6 年以上, 空心部分占比相对较大, 影响了黄芪的内在含量。其中, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异黄烷苷与等级呈正相关, 异黄烷与等级呈负相关。栽培芪的总黄酮含量与等级没有相关性, 等级均一性较强, 可能是由于栽培芪均为 2 年生, 其内在化学成分积累差异不大。

4 讨论

4.1 规格等级与外观性状、生长年限的关系

中药材作为一种商品, 外观性状质量描述是质

量评价的关键环节。《76 种药材商品规格等级》1984 年版对黄芪的规格没有划分, 因为当时市场中并没有栽培芪。本实验从不同产地收集了 24 批黄芪药材, 通过外观形态、直径、长度的统计分析, 提示黄芪药材在进行规格等级划分时, 首先应考虑从形态和长度上进行仿野生芪和栽培芪的规格划分, 然后依据直径的不同进行等级划分, 仿野生芪划分为特等、一等、二等、三等, 栽培芪为统货和选货。

4.2 黄酮类成分指纹图谱和含量测定对规格等级划分的支持

中药指纹图谱能够对同一药材群体化学成分和相似性进行表征, 选择特征性和重现性较好的色谱峰组合作为特征性指纹图谱, 可以反映特征性化学成分的种类和数量, 能够比较全面、综合地控制中药的质量^[12-13]。在本研究中, 建立了 5 种黄酮类

成分指纹图谱并与化学计量学方法相结合,包括相似性评价,PCA 和 CA 来综合评价种植方式与指纹图谱间的关系。同时测定 5 种黄酮类成分含量,结果表明黄芪药材 2 种规格的划分,除了性状质量的不同,其内在化学成分也有一定的质量差异,验证了性状对规格划分的合理性。

4.3 黄芪药材商品规格等级与质量等级研究

中药材的规格等级划分是药材质量标准评价的传统方法,而质量等级是近年提出的评价药材质量优劣性的新方法。本研究通过黄芪药材外观性状、黄酮类指纹图谱的建立以及 5 种黄酮类成分的定量分析,将药材的外观性状与内在质量进行综合评价,发现生长年限是影响黄芪药材内外在质量的关键因素。毛蕊异黄酮葡萄糖苷和异黄烷苷的含量可作为划分黄芪药材不同等级的关键指标,为构建黄芪药材质量等级标准提供了一定依据,但仍需进一步分析验证,特别是还需要结合药效,制定符合临床应用的黄芪药材等级划分标准,为进一步构建黄芪药材质量等级标准奠定基础。

参考文献

- [1] 郭宝林,龙兴超,甘我挺,等. 中药材商品电子交易规格等级标准的编制方法和技术特征 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(11): 1390-1395.
- [2] 牛倩芸,万燕晴,李震宇,等. 不同商品等级黄芪质量评价研究 [J]. 中药材, 2015, 38(6): 1186-1190.
- [3] 辛 博,马生军,谢 景,等. 生长年限对黄芪药材中黄酮及皂苷类成分含量积累的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1366-1369.
- [4] 中国中药协会. 中药材和饮片行业健康发展 [EB/OL]. [2017-05-18]. <http://www.catcm.org.cn/commonsearch.asp>.
- [5] 中国中药协会. 中国中医药学会发布首个中医药“质量标准” [EB/OL]. [2018-09-11]. <http://www.catcm.org.cn/newsmain.asp>.
- [6] Chu C, Qi L W, Liu E H, et al. *Radix Astragalus (Astragalus): Latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics* [J]. *Cur Org Chem*, 2010, 14(16): 1792-1807.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 七十六种药材商品规格标准 [S]. 1984.
- [9] 高四云,李 科,熊一峰,等. 恒山仿野生黄芪绝对生长年限鉴别及黄酮和皂苷积累规律研究 [J]. 药学报, 2018, 53(1): 147-154.
- [10] 王亚丹,戴 忠,孙彩林,等. UPLC-ELSD 指纹图谱结合化学计量学方法用于骨刺片的质量控制 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1156-1161.
- [11] Guo H, Zhang Z, Yao Y, et al. A new strategy for statistical analysis-based fingerprint establishment: Application to quality assessment of Semen Sojae Praeparatum [J]. *Food Chem*, 2018, 258: 189-198.
- [12] 黄 涛,刘 丽,张笑敏,等. 夏天无 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2474-2479.
- [13] 吕邵娃,赵 敏,赵 爽,等. 线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱研究及 5 种成分含量测定 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1160-1164.