

基于指纹图谱和多指标定量的蜜炙黄芪饮片质量控制研究

张淑娟^{1,2}, 张育贵^{1,2}, 李东辉^{1,2}, 吴红伟^{1,2}, 牛江涛^{1,2}, 司昕蕾^{1,2}, 李越峰^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 采用 HPLC 法建立蜜炙黄芪饮片指纹图谱, 并测定异黄酮类成分和皂苷类成分含量, 进行聚类分析与主成分分析 (PCA-主成分分析), 比较炙黄芪饮片中 4 种异黄酮成分 (毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素) 和 4 种皂苷类成分 (黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III) 的差异。方法 采用 HPLC 法对 15 批甘肃不同产地炙黄芪饮片 8 种成分进行测定, 运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)”进行评价, 并结合 PCA 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA-正交偏最小二乘判别分析) 等化学计量学方法对 15 批不同产地炙黄芪饮片进行区分与比较。结果 建立了炙黄芪饮片异黄酮类成分和皂苷类成分 HPLC 指纹图谱, 相似度均达 0.90 以上, 确定了 8 个共有峰 (毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III) 构成炙黄芪饮片的特征峰, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 是差异性化合物, 可作为鉴别和区分炙黄芪饮片的质量控制指标。结论 该法所建立的炙黄芪异黄酮成分和皂苷类成分指纹图谱特征性强、方法简便, 结合 8 种成分含量测定可更好控制其质量, 对炙黄芪饮片的鉴定及质量控制具有指导意义和参考价值。

关键词: 蜜炙黄芪; 指纹图谱; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 黄芪甲苷; 黄芪皂苷 I; 黄芪皂苷 II; 黄芪皂苷 III; 化学模式识别分析; 质量控制

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-3081-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.026

Quality control of *Astragali Radix* stir-frying with honey based on fingerprint and multi-index quantitative determination

ZHANG shu-juan^{1,2}, ZHANG Yu-gui^{1,2}, LI Dong-hui^{1,2}, WU Hong-wei^{1,2}, NIU Jiang-tao^{1,2}, SI Xin-lei^{1,2}, LI Yue-feng^{1,2}

1. GanSu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Key Laboratory of Standard and Quality of Chinese Medicine Research, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To establish fingerprint of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey by HPLC, determine the content of isoflavones and saponin, conduct clustering analysis and principal component analysis (PCA), and compare the difference of main four kinds of composition of isoflavones (campanulin, ononin, calycosin and formononetin) and four kinds of saponins (astragaloside IV, astragaloside I, astragaloside II and astragaloside III) in *Astragali Radix* decoction pieces. **Methods** Eight kinds of components in 15 batches of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey from different regions in Gansu Province were determined by HPLC method and evaluated by the national pharmacopoeia committee “Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation software (2012 edition)” evaluation, combined with PCA and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) to distinguish and compare the 15 batches of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey from different origins. **Results** The HPLC fingerprint of isoflavones and saponins of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey was established, with similarity above 0.90; Eight common peaks (campanulin, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, astragaloside I, astragaloside II and astragaloside III) were identified. Campanulin, ononin, calycosin

收稿日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960713); 自然科学基金创新基地和人才计划项目 (18JR3RA197); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室开放基金资助项目 (ZYZL18-008)

作者简介: 张淑娟 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方加工炮制机理及活性成分研究。Tel: 18393214965 E-mail: 1833431696@qq.com;

*通信作者: 李越峰, 女, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药及复方加工炮制机理及活性成分研究。E-mail: 1833431696@qq.com

and astragaloside I were differential compounds, which can be used as quality control index to identify and distinguish between *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey. **Conclusion** The fingerprint of isoflavones and saponins of processed *Astragali Radix* established by this method is characteristic and simple, which can better control its quality combined with the content determination of eight components, has and have guiding significance and reference value for the identification and quality control of processed *Astragali Radix* decoction pieces.

Key words: *Astragali Radix* stir-frying with honey; fingerprints; campanulin; ononin; calycosin; formononetin; astragaloside IV; astragaloside I; astragaloside II; astragaloside III; chemical pattern recognition analysis; quality control

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, 味甘, 性微温, 归肺、脾经, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿等功效, 主要用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷等症; 炙黄芪为黄芪的蜜炙炮制加工品, 炙黄芪味甘, 性温, 归肺、脾经, 更长于益气补中^[1]。现代药理研究表明, 黄芪具有提高机体免疫功能, 抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抗病毒等药理作用^[2-6]。除药用外, 黄芪作为保健品在国际保健食品界具有一定的地位, 有研究发现, 黄芪蜜炙前后其化学成分及药效均有一定的差异^[7-11]。化学成分是药物产生不同药理作用的物质基础, 故差异成分有可能是使黄芪与炙黄芪药效改变的活性物质。目前对黄芪化学成分的含量测定方面主要有单一成分以及多个成分同时测定, 而关于蜜炙黄芪的质量控制方面水平较低。研究表明, 指纹图谱结合多指标含量测定在中药材质量控制和相近品种区分与鉴别等方面的应用越来越广泛^[12-14]。本实验收集了 15 批黄芪药材, 拟采用 HPLC 法全面分析蜜炙黄芪化学成分, 建立炙黄芪化学成分指纹图谱, 在此基础上, 建立炙黄芪饮片中毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 8 种成分的含量测定方法, 并测定 8 种化学成分的含量。基于含量测定结果, 进一步结合聚类分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学计量学方法对不同产地炙黄芪饮片进行区分与比较, 并寻找差异性成分。基于以上实验研究, 通过对不同产地多批炙黄芪饮片的分析, 建立炙黄芪的质量控制研究方法, 以期能提升炙黄芪饮片的质量控制水平, 为炙黄芪饮片的质量评价提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 样品 15 批黄芪样品为甘肃不同产地药材, 分别采集于甘肃陇南、陇西、渭源、岷县、漳县 (表 1), 经甘肃中医药大学王明伟教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。

表 1 15 批黄芪药材信息

Table 1 Information of 15 batches of *Astragali Radix*

编号	产地	收集时间
S1	甘肃甘南会作县	2020-04-20
S2	甘肃武威民勤县	2020-04-22
S3	甘肃甘南卓尼县	2020-04-20
S4	甘肃陇南康县	2020-04-23
S5	甘肃定西陇西县	2020-04-24
S6	甘肃陇南礼县	2020-04-23
S7	甘肃武威古浪县	2020-04-22
S8	甘肃陇南宕昌县	2020-04-25
S9	甘肃临夏广河县	2020-04-26
S10	甘肃临夏和政县	2020-04-26
S11	甘肃临夏康乐县	2020-04-26
S12	甘肃武威天祝县	2020-04-22
S13	甘肃定西渭源县	2020-04-27
S14	甘肃定西漳县	2020-04-28
S15	甘肃甘南夏河县	2020-04-20

1.1.2 试药 对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 PS000687)、毛蕊异黄酮 (批号 PS010251)、芒柄花苷 (批号 PS000671)、芒柄花素 (批号 PS000674)、黄芪甲苷 (批号 PS010428)、黄芪皂苷 I (批号 PS000459)、黄芪皂苷 II (批号 PS000462)、黄芪皂苷 III (批号 PS200514-03) 均购自成都普思生物科技有限公司, 所有对照品质量分数均大于 98%。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯购于天津大茂有限公司; 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱仪 (Agilent 公司); HC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测器 (DAD、ELSD 检测器); BT125D 型十万分之一天平 (北

京赛多利斯科学仪器有限公司); 超声清洗器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 高速离心机 (美国科峻仪器公司)。

2 方法

2.1 黄芪饮片切制

将收集到的 15 批黄芪药材去掉泥土, 快速过水, 冲洗干净, 闷润, 切成厚片 (2~4 mm), 干燥备用。

2.2 蜜炙黄芪饮片的制备

取一定量的黄芪饮片, 加沸蒸馏水稀释过的炼蜜闷润 1 h, 黄芪每 100 g 用炼蜜 25 g, 水为蜜的 20%。置炒锅内, 130 °C 炒 10 min, 取出, 放凉, 筛去碎屑, 即得蜜炙黄芪饮片。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取经处理的炙黄芪饮片粉末 4 g, 置圆底烧瓶中, 加甲醇 40 mL, 加热回流 2 h, 过滤, 减压回收甲醇, 残渣加水 10 mL, 用水饱和的正丁醇萃取 2 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇, 加入氨试液洗涤 2 次 (40 mL/次), 弃去氨试液, 减压回收正丁醇, 残渣加适量甲醇使溶解, 定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 对照品适量, 以甲醇溶解, 得到质量浓度分别为 0.403、0.325、0.344、0.104、7.278、1.022、1.010、1.002 mg/mL 的对照品溶液。分别精密吸取这 8 种对照品储存液各 2 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 制成混合对照品溶液, 备用。

2.5 色谱条件

HC-C₁₈ 色谱柱 (Agilent 公司, 型号: Agilent 4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.2% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~13% A; 5~10 min, 13%~21% A; 10~23 min, 21%~37% A; 23~37 min, 37%~53% A; 33~43 min, 53%~69% A; 43~45 min, 69%~100% A; 体积流量 1 mL/min; UV 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

HC-C₁₈ 色谱柱 (Agilent 公司, 型号: Agilent 4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~13% A; 5~10 min, 13%~21% A; 10~23 min, 21%~37% A; 23~37 min, 37%~53% A; 33~43 min, 53%~69% A; 43~50 min, 69%~100% A; 体积流量 1

mL/min; ELSD: 雾化温度 30 °C; 漂移管温度 105 °C; 氮气流量 2.5 L/min。

2.6 指纹图谱的方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一批炙黄芪饮片粉末 (3 号), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5”项下色谱条件连续进样 6 次。记录指纹图谱, 以芒柄花素色谱峰为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明各共有峰的相对保留时间的 RSD<0.4%, 各共有峰相对峰面积的 RSD<1.3%。

2.6.2 重复性试验 取同一批炙黄芪饮片粉末 (3 号) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5”项下色谱条件进行测定, 记录指纹图谱, 以芒柄花素色谱峰为参照峰, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别小于 2%、3%, 表明该方法重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取炙黄芪饮片粉末 (3 号), 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在供试品溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.5”项下色谱条件进行测定。以芒柄花素色谱峰为参照峰, 结果各共有峰的相对保留时间 RSD<1.7%, 相对峰面积 RSD<2.5%。

2.7 指纹图谱的建立

取 15 批蜜炙黄芪饮片, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5”项下色谱条件测定, 得到 15 批蜜炙黄芪饮片指纹图谱, 将得到的实验数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012A 版进行分析, 设置 S1 为参照指纹图谱, 采用多点校正后进行全谱峰匹配, 生成对照指纹图谱 (R), 并对色谱峰进行指认。经过与对照品的比对, 指认了其中 8 个色谱峰, 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (1 号峰)、芒柄花苷 (2 号峰)、毛蕊异黄酮 (3 号峰)、芒柄花素 (4 号峰)、黄芪皂苷 III (5 号峰)、黄芪甲苷 (6 号峰) 和黄芪皂苷 II (7 号峰)、黄芪皂苷 I (8 号峰)。将 15 批炙黄芪饮片指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价, 得到 15 批不同产地炙黄芪饮片指纹图谱, 见图 1。结果各产地炙黄芪饮片 HPLC-UV 指纹图谱相似度在 0.949~0.999, 均大于 0.90, S1~S15 相似度依次为 0.992、0.985、0.949、0.997、0.998、0.999、0.984、0.994、0.997、0.997、0.996、0.992、0.994、0.998、0.994; HPLC-ELSD 指纹图谱相似度在 0.959~0.998; S1~S15 相似

度依次为 0.993、0.994、0.982、0.995、0.996、0.997、0.997、0.982、0.981、0.992、0.998、0.996、0.959、0.963、0.993，均大于 0.90，表明 15 批炙黄芪饮片的整体质量相对稳定，所建立的指纹

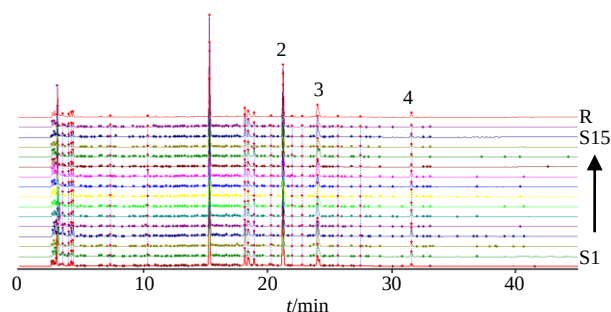


图 1 15 批炙黄芪样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 Overlay of HPLC fingerprint of 15 batches of *Astragali Radix* stir-frying with honey

图谱方法可用于炙黄芪饮片的鉴定和质量控制。

2.8 炙黄芪饮片含量测定

2.8.1 混合对照品溶液制备 同“2.4”项下混合对照品溶液的制备方法。

2.8.2 供试品溶液制备 同“2.3”项下供试品溶液的制备方法。

2.8.3 色谱条件 同“2.5”项下方法。

2.8.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液，制成 6 个不同质量浓度的对照品溶液，按照“2.8.3”项下色谱条件进行测定，并记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，并进行线性回归，得标准曲线方程。8 个成分的线性回归方程见表 2。

2.8.5 精密度试验 取蜜炙黄芪饮片样品 (S3)，按“2.8.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6

表 2 对照品的回归方程

Table 2 Regression equation of reference substance

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
毛蕊异黄酮苷	$Y=21\,513\,X-63.95$	0.999 9	0.085 60~0.302 1
毛蕊异黄酮	$Y=23\,374\,X-27.592$	0.999 8	0.065 04~0.243 9
芒柄花苷	$Y=61\,541\,X-138.68$	0.999 9	0.010 40~0.083 2
芒柄花素	$Y=35\,571\,X-4.0476$	0.999 8	0.001 72~0.027 2
黄芪甲苷	$Y=438.53\,X-21.077$	0.999 9	0.072 78~2.183 4
黄芪皂苷 I	$Y=599.87\,X-15.777$	0.999 8	0.040 88~0.204 4
黄芪皂苷 II	$Y=498.01\,X-16.636$	0.999 8	0.040 40~0.202 0
黄芪皂苷 III	$Y=169.32\,X-11.525$	0.999 9	0.120 24~1.002 0

次，并记录各个成分峰面积，计算 RSD，结果毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 峰面积的 RSD 分别为 0.85%、0.55%、0.65%、0.45%、0.34%、0.74%、0.67%、0.78%。

2.8.6 稳定性试验 取蜜炙黄芪饮片 (S3) 供试品溶液，按“2.8.3”项下色谱条件，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 测定各成分的峰面积，记录峰面积并计算 RSD，结果毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 峰面积的 RSD 分别为 1.01%、0.76%、0.83%、1.15%、1.41%、0.86%、1.02%、0.97%。

2.8.7 重复性试验 精密称取炙黄芪样品 (S3) 粉末 6 份，按照“2.8.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.8.3”项下方法进样分析，记录峰面积。计算毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 质量分数的 RSD 值分别为 1.423%、1.344%、1.343%、1.325%、1.521%、1.434%、1.353%、1.458%。

2.8.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的炙黄芪饮片样品 (S3) 粉末 2 g，平行 6 份分别加入 8 种成分对照品适量，按“2.8.2”项下方法制备供试品溶液并进样分析，记录各化学成分峰面积。计算毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 平均加样回收率分别为 98.3%、100.1%、98.2%、99.7%、98.8%、99.8%、98.5%、100.3%，RSD 值分别为 0.87%、0.65%、1.68%、1.79%、0.76%、0.73%、0.84%、1.26%。

2.8.9 样品测定 按照“2.8.2”项下方法制备 15 批蜜炙黄芪饮片样品溶液，按照“2.8.3”项下方法进样分析，测定不同炙黄芪饮片中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III 的含量，其中黄酮类成分采用 HPLD-DAD 测定，皂苷类成分采用 HPLC-ELSD 测定。炙黄芪样品和混合对照品色谱图见图 2。15 批炙黄芪饮片含量测定结果见表 3。

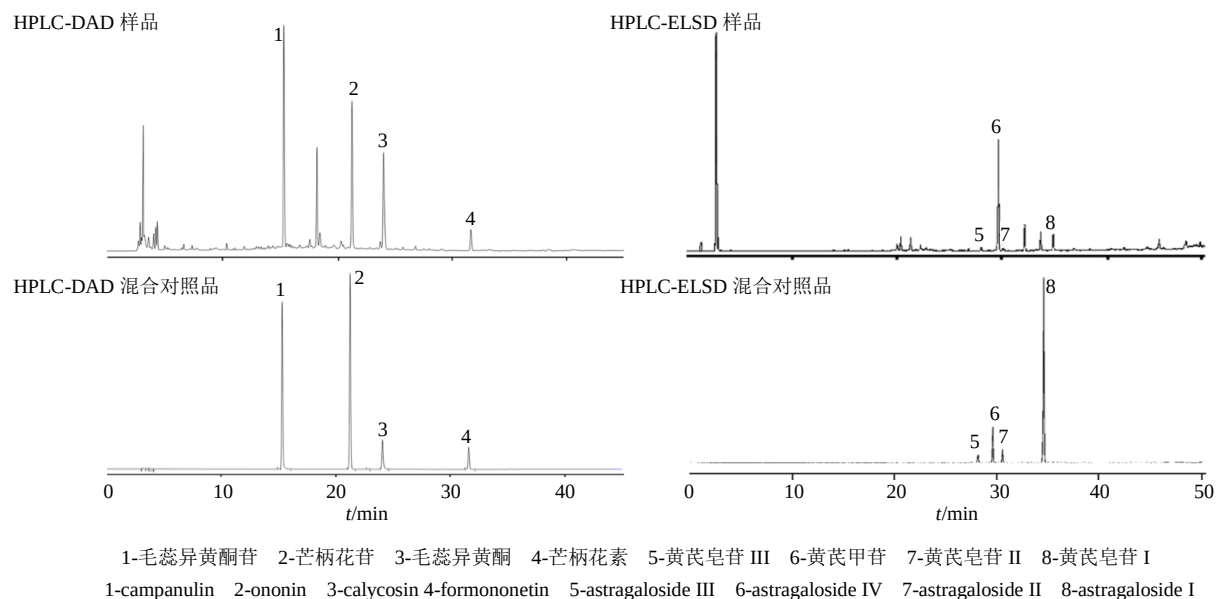


图 2 炙黄芪饮片样品和混合对照品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chart of sample and mixed reference of processed *Astragali Radix*

表 3 15 批炙黄芪饮片中 8 个成分的含量 (n=3)

Table 3 Contents of eight components in 15 batches of processed *Astragali Radix* decoction pieces (n=3)

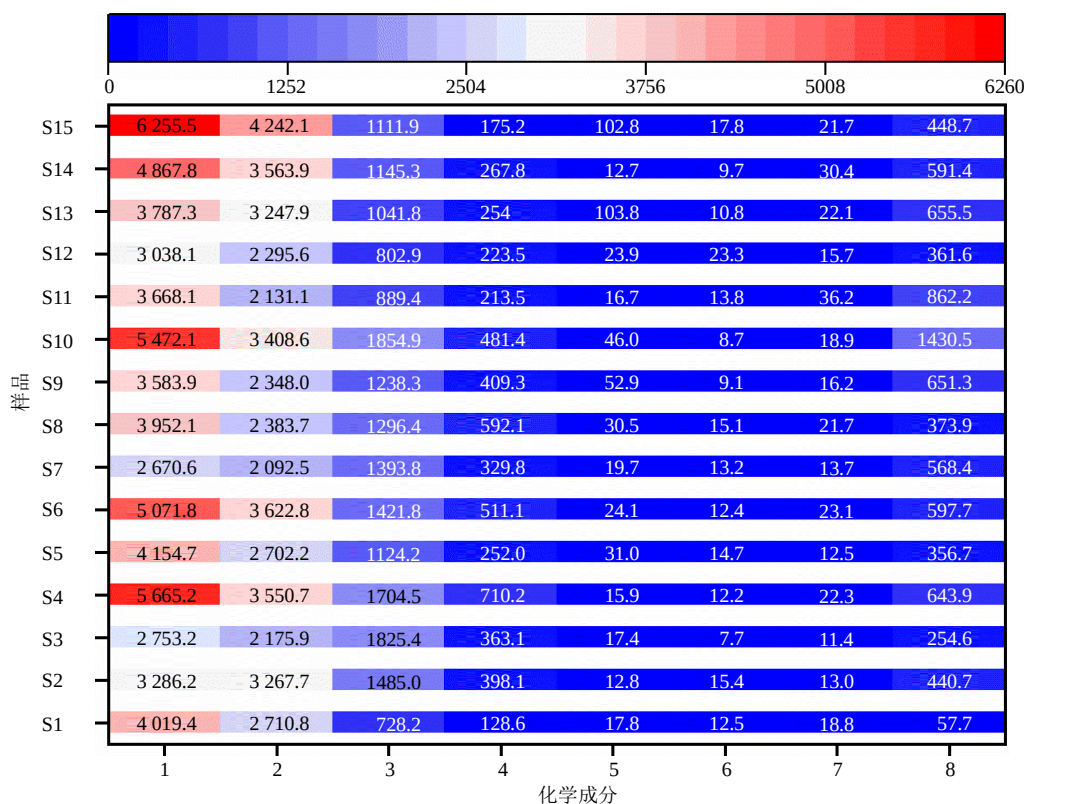
编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	黄芪甲苷	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	黄芪皂苷 III
S1	0.237	0.146	0.018	0.005	0.225	0.070	0.073	0.224
S2	0.195	0.176	0.033	0.014	1.316	0.060	0.080	0.181
S3	0.164	0.118	0.040	0.013	0.786	0.069	0.061	0.169
S4	0.333	0.191	0.037	0.025	1.895	0.066	0.072	0.250
S5	0.245	0.146	0.026	0.009	1.077	0.097	0.079	0.177
S6	0.298	0.195	0.032	0.018	1.764	0.083	0.073	0.256
S7	0.159	0.113	0.031	0.012	1.680	0.074	0.075	0.186
S8	0.233	0.129	0.029	0.021	1.126	0.096	0.080	0.245
S9	0.212	0.127	0.028	0.015	1.917	0.164	0.065	0.205
S10	0.322	0.184	0.040	0.017	4.138	0.129	0.064	0.225
S11	0.217	0.115	0.021	0.008	2.518	0.068	0.076	0.352
S12	0.180	0.124	0.019	0.008	1.091	0.083	0.100	0.201
S13	0.224	0.175	0.024	0.009	1.929	0.249	0.069	0.248
S14	0.287	0.192	0.026	0.010	1.746	0.059	0.066	0.310
S15	0.367	0.228	0.025	0.006	1.339	0.247	0.086	0.245

2.9 基于化学计量学方法的不同产地炙黄芪饮片的比较与区分

为了进一步比较与区分不同产地蜜炙黄芪饮片，寻找化学成分的差异，采用化学计量学方法以测得的 8 种成分的含量为变量，对 15 批炙黄芪饮片进行分析。

2.9.1 聚类分析 采用 SPSS 19.0 统计软件以 15

个不同产地蜜炙黄芪饮片各化学成分峰面积为变量，以平方欧氏距离 (Euclidean 距离) 为区间，采用组内均连法，对 15 批炙黄芪饮片指纹图谱进行系统聚类分析。峰面积进行可视化展示，见图 3。由聚类分析结果可知，15 批炙黄芪样品可分为 3 类，15 产地的为一类，4、6、10、14 产地的聚为一类，1~3、5、7~9、11~13 产地的聚为一类。



1-毛蕊异黄酮苷 2-芒柄花苷 3-毛蕊异黄酮 4-芒柄花素 5-黄芪皂苷 III 6-黄芪甲苷 7-黄芪皂苷 II 8-黄芪皂苷 I
1-campanulin 2-ononin 3-calycosin 4-formononetin 5-astragaloside III 6-astragaloside IV 7-astragaloside II 8-astragaloside I

图 3 炙黄芪中各化学成分峰面积可视化图

Fig. 3 Visualization diagram of peak area of each chemical component in processed *Astragali Radix*

2.9.2 主成分分析 (PCA) 为了进一步评价和区分不同产地的炙黄芪饮片, 以所测定的 8 种成分的含量为变量进行 PCA。根据特征值和贡献率选出主成分, 结果见表 4。以特征值 > 1, 提取出的主成分有 3 个, 其累积贡献率为 73.543%, 包含了 15 批炙黄芪指纹图谱的主要信息, 它们能够反映炙黄芪的基本特征。载荷的绝对值越大, 对主成分的贡献越大, 矩阵结果见表 5。毛蕊异黄酮苷、

表 4 特征值与方差贡献率

Table 4 Characteristic values and cumulative variance proportion

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	2.706	33.825	33.825	2.706	33.825	33.825
2	2.054	25.676	59.501	2.054	25.676	59.501
3	1.123	14.042	73.543	1.123	14.042	73.543
4	0.944	11.801	85.344			
5	0.607	7.590	92.934			
6	0.352	4.394	97.328			
7	0.129	1.607	98.935			
8	0.085	1.065	100.000			

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Component matrix

因子	主成分载荷		
	1	2	3
毛蕊异黄酮苷	0.773	0.491	0.124
芒柄花苷	0.697	0.503	0.336
毛蕊异黄酮	0.637	-0.692	0.226
芒柄花素	0.591	-0.576	0.072
黄芪皂苷 I	0.243	0.565	0.393
黄芪皂苷 II	-0.481	0.423	0.254
黄芪皂苷 III	0.298	0.500	-0.759
黄芪甲苷	0.698	-0.045	-0.379

黄芪甲苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮在第 1 主成分中有明显的载荷值; 芒柄花素、黄芪皂苷 I 在第 2 主成分中有明显的载荷值; 黄芪皂苷 III 在第 3 主成分中有明显的载荷值。表明影响炙黄芪饮片质量差异性的是多个成分, 而不是单一成分。运用 SIMCA-P 14.1 分析软件对其进行 PCA, 结果见图 4。由 PCA 图可以看出, S15 产地的炙黄芪饮片为一类, S4、S6、S10、S14 产地的炙黄芪饮片为一类, 其余产地的为一类, 与聚类分析结果一致。

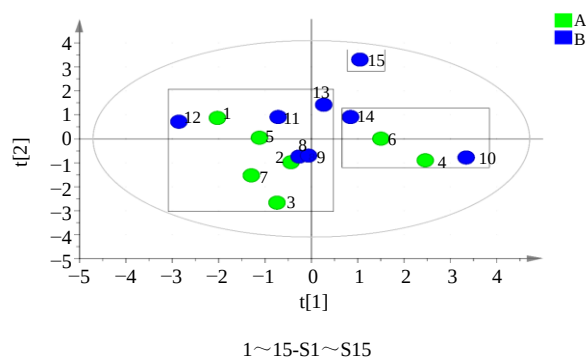


图 4 蜜炙黄芪饮片 PCA 图

Fig. 4 PCA diagram of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey

2.9.3 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)
 为了进一步区分 15 个不同产地炙黄芪饮片及寻找差异成分, 在经过 PCA 分析之后, 进一步采用 OPLS-DA 对炙黄芪饮片进行分析。以 8 种化学成分的含量作为输入变量得到相应模型。结果见图 5、6。建立的 OPLS-DA 模型中, 累积解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.629 和 0.686, 预测能力参数 Q^2 为 0.765, R^2 和 Q^2 均大于 0.5, 表明所建模型具有一定的稳定性及可靠性。可用于评价与区分不同炙黄芪饮片。由 OPLS-DA 得分图可知, 与聚类分析和 PCA 分析结果相似, 不同产地炙黄芪饮片被很好的分为 3 类。根据模型中变量权重重要性排序 (VIP) 预测值来筛选出具有统计学意义的差异标志物, 在 0.95 的置信区间内, 选出 $VIP > 1.0$ 的变量作为差异标志物, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花

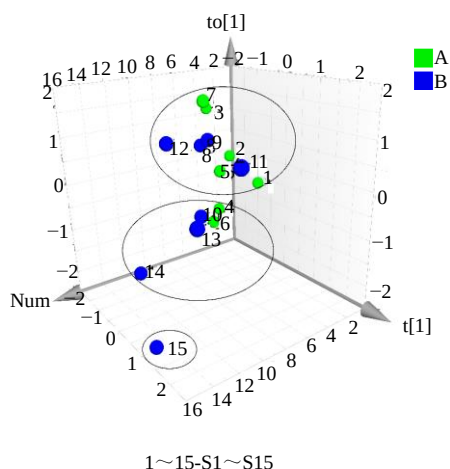


图 5 蜜炙黄芪饮片 OPLS-DA 图

Fig. 5 OPLS-DA diagram of *Astragali Radix* decoction pieces stir-frying with honey

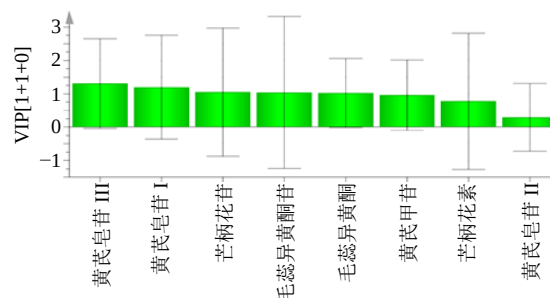


图 6 VIP 值

Fig. 6 VIP value

苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 和黄芪甲苷的 VIP 值分别为 1.04、1.05、1.03、0.77、1.20、0.29、1.31、1.00, 因此确定毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III 和黄芪甲苷为不同炙黄芪饮片的差异性化合物, 可以作为区分和评价不同炙黄芪饮片的指标性成分。

3 讨论

本研究采用 HPLC 法对 15 个不同产地的炙黄芪饮片进行分析, 建立了炙黄芪饮片化学指纹图谱, 结果显示相似度均大于 0.90, 表明 15 个不同产地炙黄芪饮片所含化学成分基本一致, 所建立的指纹图谱可用于炙黄芪饮片的鉴定与质量控制。本实验测定了不同产地炙黄芪饮片的 8 种化学成分的含量。结果显示 8 种成分总量为 0.997~5.118 mg/g, 8 种成分中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷质量分数最高, 分别为 0.225~4.138 mg/g、0.159~0.367 mg/g, 芒柄花素质量分数最低, 为 0.005~0.025 mg/g。而黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 质量分数差异不大, 分别为 0.059~0.249 mg/g、0.061~0.100 mg/g。

为了更好地辨识炙黄芪饮片之间的质量差异, 采用 PCA 和 OPLS-DA 分析, 将 15 批炙黄芪样品分成了 3 类, 筛选出了 6 个差异性质量标志物, 分别是毛蕊异黄酮苷 (1 号峰)、芒柄花苷 (2 号峰)、毛蕊异黄酮 (3 号峰)、黄芪皂苷 I (8 号峰)、黄芪皂苷 III (5 号峰) 和黄芪甲苷 (6 号峰)。可以作为区分和鉴别不同产地饮片的质量控制指标。

本研究采用 HPLC 法建立了不同产地炙黄芪指纹图谱, 首次采用指纹图谱结合 PCA 和 OPLS-DA 可快速筛选出不同产地炙黄芪差异性质量标志

物,并建立了含量测定方法。该方法能够有效地评价不同产地炙黄芪质量以及需关注的质量标志成分及含量,可为炙黄芪饮片的质量控制提供科学的方法与依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 301.
- [2] 吕琴, 赵文晓, 王世军, 等. 黄芪活血功效及现代药理学研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 215-224.
- [3] 周龙云, 田子睿, 刘书芬, 等. 黄芪对中枢神经系统的药理作用及毒理研究现状 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4935-4944.
- [4] 尤良震, 林逸轩, 方朝晖, 等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4700-4706.
- [5] 刘洋, 杜婧, 沈颜红. 10种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 222-234.
- [6] 袁红, 张淑芳, 贾绍辉, 等. 黄芪生物活性及其在保健食品中的应用研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(15): 330-334.
- [7] 蔡金坊, 代云桃, 肖永庆, 等. 系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的改变 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 47-52.
- [8] 刘巍, 王志成, 梁菲菲, 等. 蜜炙黄芪的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 142-146.
- [9] 肖满珊. 蜜炙黄芪化学成分分析及作用于脾气虚大鼠的药效学评价 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [10] 葛秀允, 孙立立. 蜜炙对黄芪饮片免疫活性的影响 [J]. 西部中医药, 2019, 32(4): 5-7.
- [11] Lv J, Zhang Y, Tian Z, *et al.* Astragalus polysaccharides protect against dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 723-729.
- [12] 邓斌, 王秋燕, 周成高, 等. 益肾排毒丸中有效成分含量测定及指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 658-662.
- [13] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [14] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.

[责任编辑 时圣明]