

黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片化学成分及体外抗氧化活性比较研究

吴红伟^{1,2}, 李东辉^{1,2}, 宋沁洁^{1,2}, 李国峰^{1,2}, 李咸慰^{1,2}, 杨新荣^{1,2}, 李越峰^{1,2,3*}

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

3. 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 采用 HPLC、UV 等方法测定并比较黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片的指标性成分及体外抗氧化活性, 为不同加工方式的黄芪饮片质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC、UV 等方法对黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片的 7 种指标性成分(黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、总黄酮、总多糖、水溶性浸出物)进行含量测定, 采用熵权法结合逼近理想解排序法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)评价不同产地加工方式对黄芪药材质量的影响, 并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)等化学计量学方法对黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片进行区分和比较, 同时以 DPPH 自由基、羟基自由基和 ABTS 自由基清除能力为评价指标对黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片的体外抗氧化活性进行比较。结果 通过熵权综合评分法比较 2 种不同加工方式对黄芪饮片质量的影响, 结果发现黄芪趁鲜切制饮片综合评分均高于黄芪传统饮片; 同时, 黄芪趁鲜切制饮片组与黄芪传统饮片组在体外抗氧化活性方面, DPPH 自由基清除能力的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为 5.560、8.168 mg/mL, 羟基自由基清除能力的 IC₅₀ 分别为 10.994、15.045 mg/mL, ABTS 自由基清除能力的 IC₅₀ 分别为 8.126、14.546 mg/mL, 表明黄芪趁鲜切制饮片体外抗氧化活性强于黄芪传统饮片。结论 通过熵权 TOPSIS 综合评分法结合化学计量学分析方法及体外抗氧化活性对黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片进行分析, 为不同加工方式的黄芪饮片质量控制提供参考。

关键词: 黄芪; 产地加工; 体外抗氧化; 化学模式识别分析; 质量控制; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 总黄酮; 总多糖; 水溶性浸出物

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)22-7039-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.22.007

Comparative study on chemical composition and *in vitro* anti-oxidant activity of *Astragali Radix* fresh-cut pieces and traditional pieces

WU Hong-wei^{1,2}, LI Dong-hui^{1,2}, SONG Qin-jie^{1,2}, LI Guo-feng^{1,2}, LI Xian-wei^{1,2}, YANG Xin-rong^{1,2}, LI Yue-feng^{1,2,3}

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

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

3. Gansu Engineering Research Center for Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective HPLC, UV and other methods were used to determine and compare the index components and *in vitro* antioxidant activities of fresh-cut pieces and traditional pieces of Huangqi (*Astragali Radix*), providing scientific basis for quality control of *Astragali Radix* pieces with different processing methods. **Methods** HPLC, UV and other methods were used to

收稿日期: 2022-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960713); 国家自然科学基金资助项目(82160750); 基础研究创新群体项目(21JR7RA569); 甘肃省教育厅产业支撑计划项目(2021CYZC-21); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题(ZYGY202003); 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室项目(2020GSMPA-KL15); 甘肃省高等学校产业支撑计划项目——四种道地陇药绿色规范化产业发展示范推广(2020C-09); 民生科技专项(科技特派员专题)——中药材引种驯化与道地药材产业化扶贫示范推广(20CX9NA070); 甘肃省科学技术厅——科技计划(创新基地与人才计划)双一流科研重点项目(GSSYLXM-05); 甘肃省中药炮制技术传承基地项目

作者简介: 吴红伟, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方加工炮制机制及活性成分研究。Tel: 13519317036 E-mail: 2419161734@qq.com

*通信作者: 李越峰, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药及复方加工炮制机制及活性成分研究。E-mail: lyfyxk@126.com

determine the contents of 7 index components (astragaloside IV, calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin, total flavonoids, total polysaccharides, water-soluble extract) in fresh-cut and traditional pieces of *Astragali Radix*. The effect of different processing methods on the quality of *Astragali Radix* was evaluated by the entropy weight method combined with technique for order preference by similarity to an ideal solution (TOPSIS). In addition, chemometric methods such as principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to differentiate and compare the fresh-cut pieces of *Astragali Radix* with the traditional pieces of *Astragali Radix*. At the same time, DPPH free radical, hydroxyl free radical and ABTS radical scavenging ability were used as evaluation indexes to compare the *in vitro* antioxidant activity of fresh-cut pieces of *Astragali Radix* and traditional pieces of *Astragali Radix*. **Results** The entropy weight comprehensive score method was used to compare the effects of two different processing methods on the quality of *Astragali Radix* decoction pieces. The results showed that the comprehensive score of fresh-cut *Astragali Radix* decoction pieces was higher than that of traditional *Astragali Radix* decoction pieces. *In vitro* antioxidant activities of *Astragali Radix* in the fresh-cut group and the traditional group were 5.560, 8.168 mg/mL for IC₅₀ of DPPH radical scavenging capacity, the IC₅₀ of hydroxyl radical scavenging capacity was 10.994, 15.045 mg/mL, and the IC₅₀ of ABTS radical scavenging capacity was 8.126, 14.546 mg/mL, respectively. The above results showed that the *in vitro* antioxidant activity of fresh-cut pieces of *Astragali Radix* was stronger than that of traditional slices of *Astragali Radix*. **Conclusion** In this study, the entropy weight TOPSIS comprehensive scoring method combined with chemometrics analysis method and *in vitro* antioxidant activity were used to analyze the fresh-cut slices and traditional slices of *Astragali Radix*, so as to provide reference for the quality control of *Astragali Radix* slices with different processing methods.

Key words: *Astragali Radix*; producing area processing; *in vitro* antioxidant; chemical pattern recognition analysis; quality control; astragaloside IV; calycosin-7-glucoside; ononin; calycosin; total flavonoids; total polysaccharides; water-soluble extract

黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌等功效^[1]。现代研究表明, 黄芪具有增强机体免疫力^[2]、抗氧化^[3]、利尿^[4]、保护肝肾^[5]及抗肿瘤^[6]等药理作用。中药材产地加工是指将采收到的中药材经过初步加工和干燥处理等过程后形成商品药材的过程, 是影响中药材品质的重要环节^[7], 课题组前期研究发现, 产地加工方式对黄芪品质的形成具有重要影响^[8-9]。现代研究表明黄芪主要化学成分包括黄酮类、多糖类、皂苷类及氨基酸类^[10], 而《中国药典》2020 年版以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷为含测指标性成分对黄芪进行质量评价, 对黄芪药材及饮片质量控制具有一定指导意义, 但黄芪除含有以上化学成分外, 还含有黄芪多糖、毛蕊异黄酮等成分, 这些成分也为黄芪增强免疫、抗肿瘤、抗氧化作用的活性成分, 在黄芪的质量评价中不宜忽视。因此, 本研究在《中国药典》2020 年版的基础上将芒柄花苷、毛蕊异黄酮、总黄酮、总多糖、水溶性浸出物作为考察指标, 对黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片的化学成分进行比较。同时, 基于黄芪甲苷、黄芪多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷均具有较强的抗氧化活性, 故本研究对黄芪趁鲜切制饮

片与传统饮片的体外抗氧化活性加以比较, 进一步阐明黄芪趁鲜切制工艺的可行性, 为黄芪产地加工工艺提供科学指导, 为不同加工方法所得黄芪饮片质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型系列高效液相色谱仪、ELSD 蒸发光散射检测器, 美国 Agilent 公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HH-S28s 型数显恒温水浴锅, 金坛市大地自动化仪器厂; HX502T 型电子分析天平, 慈溪市天东衡器厂; 766-6 型远红外辐射干燥箱, 上海锦屏仪器仪表有限公司; LFP-500A 型粉碎机, 上海菲力博实业公司; 3SHB-3 型循环水多用真空泵, 郑州杜甫仪器厂; L2-5K 型离心机, 湖南可成仪器设备有限公司; UV-power 型紫外分光光度计, 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; A1111 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SW22 型恒温水浴振荡器, 上海巴玖实业有限公司。

1.2 试药

3 批黄芪药材采自甘肃岷县, 经甘肃中医药大学中药鉴定教研室王明伟副教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的新鲜根, 将黄芪药材按不同产地加工方式处理, 干燥、粉碎后过 4 号筛, 置于干燥器中, 备用。

对照品黄芪甲苷(批号 PS010428, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 PS000687, 质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花苷(批号 PS000674, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮(批号 PS010251, 质量分数 $\geq 98\%$)、D-葡萄糖(批号 PS020418, 质量分数 $> 98\%$)均购自成都普思生物科技有限公司; 甲醇(批号 20200302)、甲酸(批号 20171201); 正丁醇(批号 20190801)、氨水(批号 20200706)均购自天津大茂化学试剂厂; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(批号 S21J11M116469)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(批号 A02GS143434)均购自上海源叶生物科技有限公司; FeSO_4 , 批号 20191101, 购自烟台市双双化工有限公司; 水杨酸, 批号 20210212, 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 过硫酸钾, 批号 20201120, 购自天津市凯通化学试剂有限公司; 水为娃哈哈纯水。

2 方法与结果

2.1 不同加工处理方式制备黄芪饮片

2.1.1 黄芪趁鲜切制饮片的制备 黄芪趁鲜切制饮片工艺制备方法采用课题组前期优选出来的工艺进行制备^[8]。将刚采挖的黄芪药材除去杂质及非药用部位, 晾晒至含水量为 50%, 进行发汗和揉搓处理, 发汗时长 3 d (普通发汗法), 揉搓次数 2 次, 每次时长 5 min, 2 项操作交替进行, 清洗、切制, 将切制所得饮片置于远红外辐射干燥箱中, 饮片铺设厚度约为 1.0~1.5 cm, 51 °C 条件下干燥, 最终得到黄芪趁鲜切制饮片。

2.1.2 黄芪传统饮片的制备 将黄芪药材晾晒至一定程度(含水量约为 40%), 揉搓 2 次(每次揉搓完成后晾晒 1 d), 洗去表面杂质, 切制、晒干, 得到黄芪传统饮片。

2.2 黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片外观性状的比较

中药饮片外观性状在一定程度上能反映其内在质量, 本研究发现, 黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片性状均符合《中国药典》2020 年版规定, 呈类圆形或椭圆形的厚片(2~4 mm), 外表皮黄白色至淡棕褐色, 可见纵皱纹或纵沟。切面皮部黄白色, 木部淡黄色, 有放射状纹理及裂隙, 但黄芪趁鲜切制饮片较黄芪传统饮片外表皮及切面颜色均加深, 其原因可能与黄芪趁鲜切制饮片发汗过程有密切关系。

2.3 HPLC-蒸发光散射检测(ELSD)法测定黄芪甲苷含量

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 HC-C₁₈ 柱(250 mm×

4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-水(40:60)为流动相, 等度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 10 μL ; 蒸发光检测器: 漂移管温 40 °C, 载气体积流量 1.5 mL/min。黄芪甲苷对照品及黄芪样品的 HPLC 图见图 1。

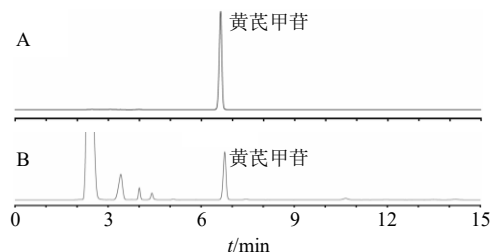


图 1 黄芪甲苷对照品 (A) 和黄芪样品 (B) 的 HPLC-ELSD 图

Fig. 1 HPLC-ELSD of astragaloside IV reference substance (A) and *Astragali Radix* sample (B)

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 25.00 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声使其完全溶解, 制成质量浓度为 2.5 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末约 4 g, 精密称定, 加甲醇 40 mL, 回流提取 1 h, 抽滤, 重复以上操作 2 次, 合并滤液, 减压浓缩后加 10 mL 水溶解, 加 40 mL 水饱和的正丁醇萃取, 重复操作 2 次, 合并萃取液并加入 40 mL 氨试液萃取, 重复操作 2 次; 将萃取液转移至圆底烧瓶中, 减压浓缩, 加甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取黄芪甲苷对照品储备液 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.9 mL 至 2 mL 量瓶中并用色谱甲醇定容至刻度。每个不同质量浓度的对照品溶液按“2.3.1”项下色谱条件进样 10 μL 测定峰面积, 对不同质量浓度的对照品溶液和峰面积求自然对数, 以进样量的对数为横坐标(X), 峰面积对数为纵坐标(Y)进行线性回归, 绘制标准曲线, 求得线性方程为 $Y=1.680\ 7\ X+2.166\ 1$, $R^2=0.999\ 5$, 表明黄芪甲苷在 3.771~11.313 μg 线性关系良好。

2.3.5 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[1]方法对实验稳定性、重复性、精密度、加样回收率进行考察, 其 RSD 值均分别为 1.77%、1.35%、1.68%、1.17%, 平均加样回收率为 97.00%。

2.3.6 样品含量测定 精密称取各黄芪样品粉末(过 4 号筛) 4 g, 分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.3.1”项下色谱条件测定, 计

算黄芪甲苷含量。

2.4 HPLC-二极管阵列检测器 (DAD) 法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷含量

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 260 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 5 μL; 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~20 min, 20%~40%乙腈; 20~30 min, 40%乙腈。混合对照品及黄芪样品 HPLC 图见图 2。

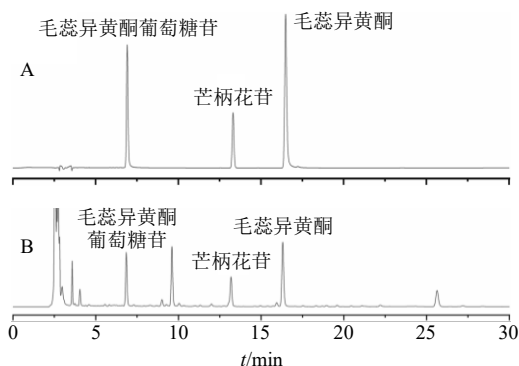


图 2 混合对照品 (A) 和黄芪样品 (B) 的 HPLC-DAD 图
Fig. 2 HPLC-DAD of mixed reference substances (A) and *Astragalus Radix* sample (B)

2.4.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 10.11 mg、毛蕊异黄酮对照品 4.98 mg、芒柄花苷对照品 3.30 mg 分别定容至 10、5、10 mL 量瓶中并用色谱甲醇定容至刻度, 制成质量浓度分别为 1.011、0.996、0.330 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液 0.08、0.07、0.15 mL 至 10 mL 量瓶中并用色谱甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取黄芪样品粉末约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 40 mL, 加热回流 1 h, 抽滤, 滤渣加 40 mL 甲醇回流提取 1 h, 合并 2 次所得滤液, 于旋转蒸发仪减压浓缩并用色谱甲醇定容至 5 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4.4 线性关系考察 分别取“2.4.2”项下各对照品溶液, 体积为 0.05、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mL 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液于 2 mL 量瓶中并用色谱纯甲醇定容至刻度; 体积为 0.03、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mL 的毛蕊异黄酮对照品溶液于 2 mL 量瓶中并用色谱纯甲醇定容至刻度; 体积为 0.1、0.3、0.7、0.9、1.3、1.7 mL 的芒柄花苷对照品溶液于 2 mL 量瓶中并用色谱纯甲醇定容至

刻度。按照“2.4.1”项下色谱条件进行检测, 进样量 5 μL。以峰面积为纵坐标 (Y), 进样质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=19\,079\,X-26.369$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 25.28~303.30 μg/mL; 毛蕊异黄酮 $Y=26\,723\,X-38.364$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 14.94~149.40 μg/mL; 芒柄花苷 $Y=14\,485\,X-12.39$, $R^2=0.999\,8$, 线性范围 16.50~280.50 μg/mL; 结果表明, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷在相应质量浓度间线性关系良好。

2.4.5 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[1]方法对实验进行方法学考察, 得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷稳定性的 RSD 在 0.97%~1.13%, 重复性的 RSD 在 1.15%~2.38%, 精密度的 RSD 在 0.97%~2.16%。平均加样回收率分别为 98.00%、97.00%、97.00%, RSD 分别为 0.79%、1.89%、1.15%。

2.4.6 样品含量测定 精密称取各黄芪样品粉末 (过 4 号筛) 2 g, 分别按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.4.1”项下色谱条件测定, 计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷含量。

2.5 总多糖含量测定^[11]

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取 D-葡萄糖对照品 0.042 g, 加纯水定容至 100 mL, 摇匀, 制得含 D-葡萄糖 0.42 mg/mL 的对照品溶液。分别取 3、4、5、6、7、8 mL 上述对照品溶液定容至 50 mL, 得到不同质量浓度的对照品溶液, 待测。

2.5.2 供试品溶液的制备 取各样品粉末约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加水 100 mL 回流提取 1 h, 离心, 取沉淀重复上述操作 1 次, 合并上清液, 浓缩至适量, 转移至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 加乙醇 26 mL, 涡旋使混匀, 离心, 取沉淀加水溶解并置于 250 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 待测。

2.5.3 显色及测定 取不同质量浓度对照品溶液及供试品溶液各 2 mL 置于具塞试管中, 加入 5%苯酚溶液 1 mL, 充分混匀, 再加入 5 mL 浓硫酸, 混匀, 于 40 ℃水浴锅加热 15 min 后取出, 冷却, 采用紫外分光光度计于 490 nm 测定吸光度 (A) 值。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取“2.5.1”项下不同浓度的对照品溶液各 2 mL 置于具塞试管中, 加入 5%苯酚溶液 1 mL, 充分混匀, 再加入 5 mL 浓硫酸, 混匀, 于 40 ℃水浴锅加热 15 min 后取出, 水浴冷

却,采用紫外分光光度计于 490 nm 测定 A 值。以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制葡萄糖标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.014\ 8\ X-0.045\ 9$, $R^2=0.999\ 5$, 结果表明, 在 25.2~67.2 $\mu\text{g/mL}$ 内, 葡萄糖对照品的检测质量浓度与 A 值呈良好的线性关系。

2.5.5 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[1]方法对实验稳定性、重复性、精密度、加样回收率进行考察, RSD 分别为 2.93%、2.63%、0.94%、1.60%, 平均加样回收率为 95.90%。

2.5.6 样品含量测定 精密称取各黄芪样品粉末(过 4 号筛) 2 g, 分别按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.5.3”项下方法处理, 测定 A 值并计算总多糖含量。

2.6 总黄酮含量测定

2.6.1 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2.50 mg, 加 70%乙醇定容至 100 mL 量瓶中, 制成含 0.025 mg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的对照品溶液; 分别吸取上述对照品溶液 1、2、3、4、5 mL 至 10 mL 量瓶中并定容至刻度, 采用紫外分光光度计于 260 nm 下测定 A 值。

2.6.2 供试品溶液的制备 取黄芪粉末约 0.3 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 加 70%乙醇 50 mL, 称定总质量后超声提取(500 W、50 Hz) 30 min, 称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 抽滤, 取续滤液 2 mL 定容至 10 mL 量瓶中, 于 260 nm 下测定 A 值。

2.6.3 线性关系考察 精密吸取“2.6.1”项下不同质量浓度的对照品溶液, 采用紫外分光光度计于 260 nm 测定 A 值。以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.051\ 3\ X+0.031\ 3$, $R^2=0.999\ 8$, 结果表明, 在 2.5~15.0 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖对照品的检测质量浓度与 A 值呈良好的线性关系。

2.6.4 方法学考察 按照《中国药典》2020 年版^[1]方法对实验稳定性、重复性、精密度、加样回收率进行考察, RSD 分别为 2.84%、0.95%、0.12%、0.73%, 平均加样回收率为 98.10%。

2.6.5 样品含量测定 精密称取各黄芪样品粉末(过 4 号筛) 2 g, 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液, 测定 A 值并计算总黄酮含量。

2.7 浸出物含量测定

依据《中国药典》2020 年版第四部水溶性浸出物测定法(通则 2201)项下冷浸法测定。

2.8 综合评分计算^[12-13]

熵权法是一种根据多项指标所提供的信息来确定各指标权重的客观赋权法。信息熵作为体系混乱程度的度量, 指标熵值越小, 则它所蕴涵的信息量越大, 在综合评价中所起作用也越大, 其权重也应越高, 具体计算方法如下。

①利用公式(1)进行数据归一化处理。

$$X_{ij}'=(X_{ij}-X_{\min})/(X_{\max}-X_{\min}) \quad (1)$$

X_{ij} 为第 j 个指标下第 i 组的含量, $X_{\max}$ 为每个指标下测得的含量最大值, $X_{\min}$ 为每个指标下测得的含量最小值

②采用公式(2)、(3)定义信息熵(E_j)。

$$P_{ij}=X_{ij}'/\sum_{i=1}^m X_{ij}' \quad (2)$$

$$E_j=-k\sum_{i=1}^m P_{ij}\ln P_{ij} \quad (3)$$

P_{ij} 为第 j 个指标下第 i 组的概率, 且 $0\leq P_{ij}\leq 1$; E_j 为各指标的信息熵, 当 $P_{ij}=0$ 时, $\ln P_{ij}$ 无意义, 故当 $P_{ij}=0$ 时, 将 $P_{ij}\ln P_{ij}$ 修正为 0

③利用公式(4)计算指标的熵权系数(w_j)。

$$w_j=(1-E_j)/\sum_{i=1}^n (1-E_j) \quad (4)$$

w_j 为熵权系数, 且 $0\leq w_j\leq 1$

课题组在前期预试验中^[8-9], 应用熵权法计算得到黄芪甲苷质量分数(Y_1)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数(Y_2)、芒柄花苷质量分数(Y_3)、毛蕊异黄酮质量分数(Y_4)、总黄酮质量分数(Y_5)、总多糖质量分数(Y_6)、水溶性浸出物质量分数(Y_7)的 w_j 分别为 0.157、0.138、0.234、0.117、0.163、0.121、0.069, 则综合评分(Y)= $Y_1\times 0.157+Y_2\times 0.138+Y_3\times 0.234+Y_4\times 0.117+Y_5\times 0.163+Y_6\times 0.121+Y_7\times 0.069$ 。

2.9 基于化学计量学方法的黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片的比较

将“1.2”项下的 3 批黄芪药材采用传统加工工艺和趁鲜切制加工工艺进行产地加工, 得到传统组 1~3 ($T_1\sim T_3$) 和趁鲜切制 1~3 ($Q_1\sim Q_3$) 共 6 组黄芪饮片, 分别按照“2.3”~“2.7”项方法测定 6 组黄芪饮片中各指标成分含量并计算其质量分数($Y_1\sim Y_7$), 按照“2.8”项方法计算不同试验组别中各指标成分的综合评分(Y), 结果见表 1。

为进一步比较黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片间的差异, 寻找不同加工方式对黄芪化学成分的影响, 本研究采用化学计量学方法, 以 7 个指标性成分的

表 1 黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片指标性成分的综合评分比较

Table 1 Comparison of comprehensive scores of index components between fresh-cut pieces of *Astragali Radix* and traditional pieces

组别	质量分数/(mg·g ⁻¹)						Y ₇ /%	Y
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆		
T1	0.816	0.224	0.202	0.336	6.453	126.561	42.623	19.552
T2	0.792	0.201	0.213	0.314	6.750	123.341	44.322	19.321
T3	0.842	0.238	0.240	0.297	6.520	131.593	41.462	20.102
Q1	0.913	0.269	0.309	0.423	6.618	171.235	42.463	25.030
Q2	0.856	0.311	0.317	0.386	6.937	164.268	40.737	24.115
Q3	0.875	0.276	0.334	0.401	6.544	155.953	41.521	23.102

含量为变量，对黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片进行分析。

2.9.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SIMCA 14.1 统计学软件对 3 批黄芪趁鲜切制饮片 Q1~Q3 与 3 批传统饮片 T1~T3 进行 PCA，得分矩阵图见图 3，模型参数 R^2_X 值及预测能力参数 Q^2 值分别为 0.704、0.731。结果显示 6 批黄芪样品可被分为 2 组，其中黄芪趁鲜切制饮片 (Q1~Q3) 为 1 组，黄芪传统饮片 (T1~T3) 为 1 组，结果表明黄芪趁鲜切制饮片加工工艺与黄芪传统加工工艺具有一定差异。

2.9.2 偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 为了进一步区分不同加工方式对黄芪饮片及寻找差异成分，在经过 PCA 基础上，本研究进一步采用 PLS-DA 对黄芪趁鲜切制饮片 Q1~Q3 与传统饮片 T1~T3 进行分析。以 7 个指标性成分的含量作为输入变量得到相应模型，结果见图 4、5。建立的 PLS-DA 模型中，累积解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.817 和 0.984，预测能力参数 Q^2 为 0.956， 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

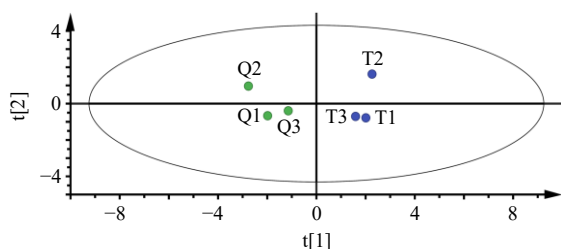


图 3 黄芪不同加工方式饮片 PCA 图

Fig. 3 PCA diagram of different processing methods of *Astragali Radix*

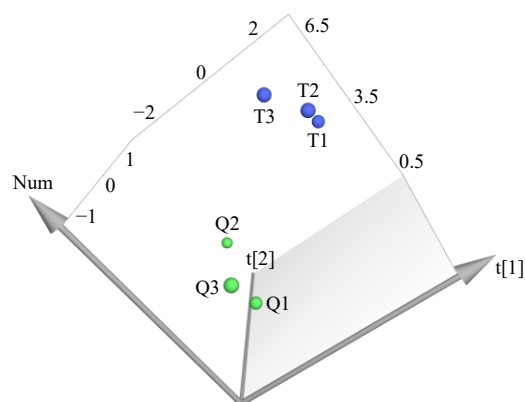


图 4 黄芪不同加工方式饮片 PLS-DA 图

Fig. 4 PLS-DA diagram of different processing methods of *Astragali Radix*

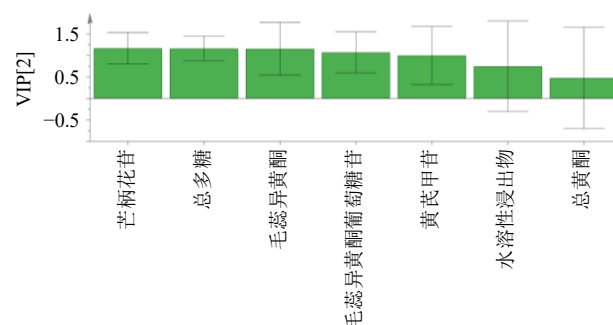


图 5 黄芪不同加工方式饮片 PLS-DA VIP 值

Fig. 5 PLS-DA VIP Value of different processing methods of *Astragali Radix*

和区分不同加工方式所得黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片。同时，研究结果发现 PLS-DA 得分图与 PCA 结果相似，不同加工方式所得黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片被很好地分为 2 类。

根据模型中变量权重要性排序 (VIP) 预测值来筛选出具有统计学意义的差异成分，在 95% 的置信区间，选出 $VIP > 1.0$ 的变量作为差异化合物，芒柄花苷、总多糖、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 VIP 值分别为 1.168、1.162、1.158、1.072，因此确定芒柄花苷、总多糖、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷为不同加工方式所得黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片的差异性化合物，可以作为区分和评价黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片的指标性成分。

2.10 黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片体外抗氧化活性比较

2.10.1 溶液的制备 精密称定黄芪传统饮片组 T1、趁鲜切制饮片组 Q1 样品粉末 1 g，置于圆底烧瓶中，加水 100 mL，提取 1 h，重复上述操作 1 次，合并上清液，浓缩至适量，转移至 10 mL 量瓶中，

加水至刻度,摇匀,制得质量浓度为 100 mg/mL 的母液,4 ℃ 保存。

使用维生素 C (VC) 作为阳性对照组,其系列质量浓度分别为 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、30.000、40.000、50.000 mg/mL。

2.10.2 DPPH 自由基清除能力的测定 DPPH 自由基清除实验常用于评价植物中化合物的自由基清除力^[14]。本实验参考薛志远^[3]研究方法并在其基础上稍作修改。精密称取 20 mg DPPH,加甲醇使其溶解并定容至 250 mL 量瓶中,使其成为 0.2 mmol/L 反应溶液,避光,4 ℃ 保存,备用。将“2.10.1”项下取提前配制好的母液加水稀释成相当于原生药材的系列质量浓度溶液(0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、30.000、40.000、50.000 mg/mL),将不同质量浓度的药材溶液及 DPPH 反应溶液各取 2 mL 并加入同一试管中混匀,于避光处反应 30 min,测其在 517 nm 波长的 A 值,记录为 A_i ,测定 0.2 mmol/L DPPH 溶液 2 mL 与 2 mL 甲醇试剂混合后的 A 值,记为 A_c ; 2 mL 提取物与 2 mL 甲醇溶液混合后的 A 值,记为 A_j ; 重复 3 次^[15]。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_c$$

如图 6 所示,黄芪原生药材质量浓度为 0.625 mg/mL 时,黄芪趁鲜切制组与传统组对 DPPH 自由基的清除能力较低,而随着黄芪原生药材质量浓度的不断升高,其提取物对 DPPH 自由基的清除率具有剂量依赖性,当黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组原生药材质量浓度从 0.625 mg/mL 上升到 10.000 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除能力分别迅速上升到 77.18% 和 70.25%。此后,随着黄芪原生药材

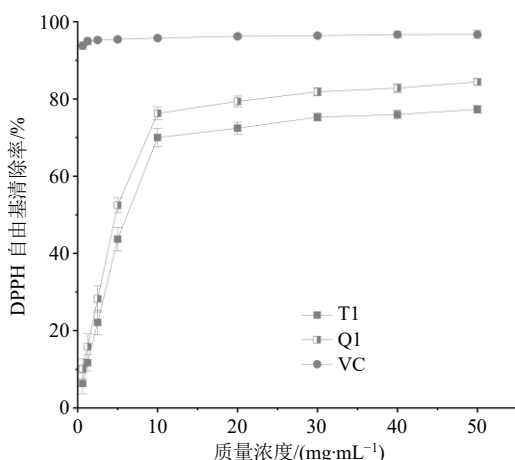


图 6 黄芪总提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 6 Scavenging ability of total extract of *Astragali Radix* on DPPH free radical

质量浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除率增加缓慢,黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组别的 IC_{50} 分别为 5.560、8.168 mg/mL,表明黄芪趁鲜切制组较黄芪传统组 DPPH 自由基清除力强。而阳性对照组质量浓度为 0.625 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率已经达到 93.81%。此后,随着质量浓度的增加,其对 DPPH 自由基的清除率无明显变化。

2.10.3 羟基自由基清除能力的测定 羟基自由基对生物体有较强的毒性,也常用于评价植物提取物体外抗氧化活性研究^[16],羟基自由基所致损害引起广泛关注^[17]。本实验参考 Chen 等^[18]的研究方法并稍作修改。羟基自由基反应液: 1 mL $FeSO_4$ 溶液(9 mmol/L)+2 mL 水杨酸-无水乙醇溶液(9 mmol/L)。将“2.10.1”项下提前配置的母液加水稀释成相当于原生药材的系列质量浓度溶液(0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、30.000、40.000、50.000 mg/mL),取不同质量浓度的药材溶液 2 mL、9 mmol/L H_2O_2 反应液 1 mL 及羟基自由基 3 mL 加入同一试管中混合均匀后 37 ℃ 反应 30 min,测其在 510 nm 波长的 A 值,记录为 A_i ;测羟基自由基 3 mL、9 mmol/L H_2O_2 反应液 1 mL 及 2 mL 双蒸馏水混合后的 A 值,记为 A_c ; 2 mL 提取液、羟基自由基 3 mL 及双蒸馏水 1 mL 混合后的 A 值,记为 A_j ; 重复 3 次。

$$\text{羟基自由基清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_c$$

如图 7 所示,当黄芪原生药材质量浓度为 0.625~5.000 mg/mL,黄芪趁鲜切制组与传统组对羟基自由基的清除能力较低,而随着黄芪原生药材质量浓度的逐渐增加,其提取物对羟基自由基的清除率也随之增加,并呈上升趋势,当黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组原生药材质量浓度上升到 10.000 mg/mL 时,对羟基自由基的清除能力迅速上升到 46.242% 和 40.494%。此后,随着黄芪原生药材质量浓度的增加,对羟基自由基的清除率增加缓慢,黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组的 IC_{50} 分别为 10.994、15.045 mg/mL,表明黄芪趁鲜切制组较黄芪传统组羟基自由基清除力强。而阳性对照组质量浓度从 0.625 mg/mL 开始,对羟基自由基的清除率迅速升高,当其质量浓度为 10.000 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率达到 97.244%。此后,随着质量浓度的增加,其对羟基自由基的清除率无明显变化,其 IC_{50} = 3.572 mg/mL。

2.10.4 ABTS 自由基清除能力的测定 Miller 等^[19]于 1993 年首次介绍了通过清除 ABTS 来评价物质

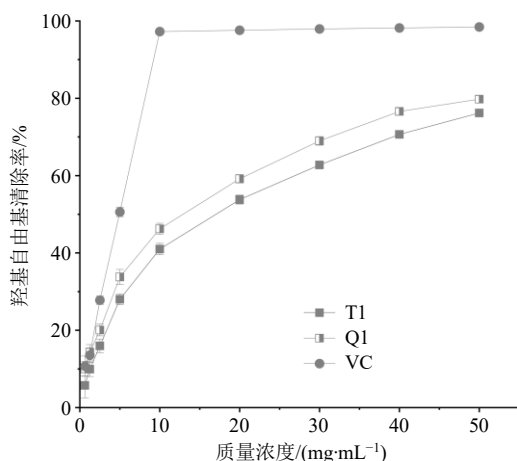


图 7 黄芪总提取物对羟基自由基的清除能力

Fig. 7 Scavenging ability of total extract of *Astragali Radix* on hydroxyl radical

的抗氧化能力的方法,根据待测物对 ABTS 自由基的清除能力,采用传统分光光度法进行测定,进而对其抗氧化活性大小进行评价,本实验参考 Souza 等^[20]的方法并稍作修改。将 5 mL 质量浓度为 2.5 mmol/L 过硫酸钾溶液与 7 mmol/L ABTS 溶液充分混匀,在 4 ℃、避光条件下静置 12~16 h, 3~4 d 内使用,使用前取 1 mL 混合液,加入超纯水稀释,使得溶液在 734 nm 下 A 值为 0.7 ± 0.2 。将“2.10.1”项下母液加水稀释成相当于原生药材的系列质量浓度溶液 (0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、30.000、40.000、50.000 mg/mL), 取不同质量浓度的药材溶液 0.1 mL, 加入 3.9 mL ABTS 反应液,摇匀,室温下避光反应 7 min, 在 734 nm 处测定 A 值, 记为 A_1 ; 以 3.9 mL 水代替 3.9 mL ABTS 反应液测定 A 值, 记作 A_2 ; 空白对照中的样品溶液用水代替, 记为 A_0 ; VC 作阳性对照^[21]。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

如图 8 所示,黄芪原生药材质量浓度为 0.625 mg/mL 时,黄芪趁鲜切制组与传统组对 ABTS 自由基的清除能力较低。随着黄芪原生药材质量浓度的不断升高,其提取物对 ABTS 自由基的清除率具有剂量依赖性,黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组原生药材质量浓度在 0.625~20.000 mg/mL, 对 ABTS 自由基的清除能力上升较快,当黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组原生药材质量浓度大于 20.000 mg/mL 后,分别迅速上升到 77.18% 和 70.25%。此后,随着黄芪原生药材质量浓度的增加,对 ABTS 自由基的清除率增加缓慢;黄芪趁鲜切制组与黄芪传统组别的 IC_{50} 分别为 8.126、14.546 mg/mL, 表明黄芪趁鲜切

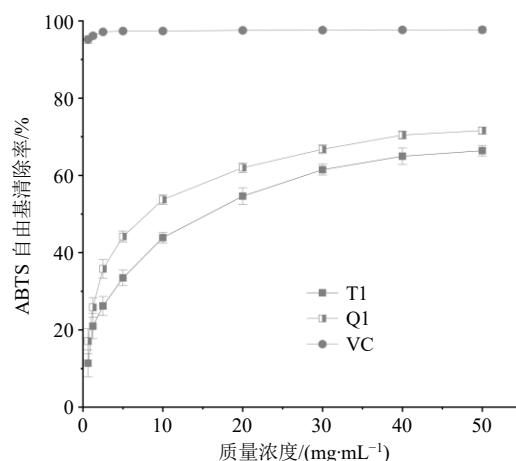


图 8 黄芪总提取物对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 8 Scavenging ability of total extract of *Astragali Radix* on ABTS free radical

制组较黄芪传统组 ABTS 自由基的清除力强。而阳性对照组质量浓度为 0.065 mg/mL 时, 对 ABTS 自由基的清除率已经达到 95.188%。此后随着质量浓度的增加,其对 ABTS 自由基的清除率无明显变化。

3 讨论

黄芪药材产地加工在其品质形成过程中发挥重要作用,本研究以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、总黄酮、总多糖、水溶性浸出物为指标,通过熵权综合评分法比较 2 种不同加工方式对黄芪饮片质量的影响,发现黄芪趁鲜切制饮片及传统饮片在化学成分上具有一定差异,整体表现为黄芪趁鲜切制饮片质量优于传统饮片。但在黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片的化学成分比较结果中,黄芪趁鲜切制组与传统组组内同一指标出现较大差异,其主要原因在于不同产地黄芪药材质量具有一定差异;此外,由于本研究仅在实验室中进行,切制过程手工完成,切片厚度也可能是组内同一指标出现较大差异的另一重要原因。同时,本研究为了更好地辨识不同加工方式对黄芪饮片质量的影响,采用 PCA 和 PLS-DA,将黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片分为 2 类,筛选出了 4 个差异化合物,分别是芒柄花苷、总多糖、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷,可作为区分和鉴别不同加工方式的黄芪饮片质量的控制指标。同时,黄芪趁鲜切制饮片与黄芪传统饮片体外抗氧化结果表明: DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 分别为 5.560、8.168 mg/mL; 羟基自由基清除能力的 IC_{50} 分别为 10.994、15.045 mg/mL; ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 分别为 8.126、14.546 mg/mL。上述实验数据表明,黄芪趁鲜切制

工艺能在一定程度上避免其化学成分的损失, 保证黄芪饮片质量。

此外, 本课题组前期研究中发现, 黄芪趁鲜切制工艺与传统工艺加工所得饮片质量存在差异, 并优选出最佳加工工艺参数。在此基础上, 本研究从化学成分和体外抗氧化活性角度对 2 种不同加工方法所得饮片质量比较, 结果表明黄芪趁鲜切制饮片综合质量优于黄芪传统饮片。因此, 黄芪趁鲜切制饮片质量标准应在黄芪传统饮片的基础上加以完善, 为推广黄芪趁鲜切制饮片加工工艺及其质量控制提供参考。

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. 2020: 315-316.
- [2] 牛江涛, 曹瑞, 司昕蕾, 等. 红芪与黄芪免疫调节和抗氧化作用对比研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(4): 21-23.
- [3] 薛志远. 红芪和黄芪抗骨质疏松、抗氧化及抗肝损伤作用比较研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [4] 高丽, 白赟, 冯学斌, 等. 黄芪及其药对对气虚盐负荷模型大鼠利尿作用的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(10): 1344-1347.
- [5] 刘晔, 车念聪, 杜宇琼, 等. 芪水煎对糖尿病肾病小鼠肝、肾组织细胞外基质调节因子表达的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10(10): 1170-1174.
- [6] 曲晓宇, 翟婧卉, 高欢, 等. OCT2/MRP2 在黄芪甲苷联合顺铂的减毒增效作用中的机制研究 [J]. 药学报, 2021, 56(9): 2536-2543.
- [7] 吴红伟, 王临艳, 李东辉, 等. 黄芪药材产地加工方法探析 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4543-4546.
- [8] 吴红伟, 李东辉, 边甜甜, 等. 基于响应面法结合熵权法多指标优选黄芪药材产地加工炮制一体化工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5854-5861.
- [9] 吴红伟, 李东辉, 张育贵, 等. 基于熵权 TOPSIS 模型对不同加工方式黄芪药材质量的综合评价 [J]. 中国药
- 学杂志, 2021, 56(16): 1325-1331.
- [10] 马艳春, 胡建辉, 吴文轩, 等. 黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(4): 92-95.
- [11] 杜国军. 恒山黄芪道地药材质量标准研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [12] 崔曰新, 张景珍, 王思雨, 等. 基于熵权法和灰色关联度法的羌活饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5724-5730.
- [13] 王智群, 于亚田, 冯建安, 等. G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化黄虎胶囊的醇提工艺 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1110-1113.
- [14] 龚敏, 王燕, 张玉. DPPH 法评价分析海南曼陀罗果叶抗氧化活性 [J]. 北京农业, 2013(30): 7-8.
- [15] 段琦梅, 梁宗锁, 聂小妮, 等. 黄芪和党参提取物的抗氧化活性研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(10): 2123-2127.
- [16] 肖怀秋, 李玉珍. 羟基自由基定量检测技术的研究进展 [J]. 食品与药品, 2010, 12(1): 69-71.
- [17] Pei F, Shi Y, Gao X Y, *et al.* Changes in non-volatile taste components of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during different stages of freeze drying and freeze drying combined with microwave vacuum drying [J]. *Food Chem*, 2014, 165: 547-554.
- [18] Chen L, Zhang Y P, Jin L X, *et al.* Preparation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haral [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 259-262.
- [19] Miller N J, Rice-Evans C, Davies M J, *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. *Clin Sci*, 1993, 84(4): 407-412.
- [20] de Souza D R, Willems J L, Low N H. Phenolic composition and antioxidant activities of saskatoon berry fruit and pomace [J]. *Food Chem*, 2019, 290: 168-177.
- [21] 高海立, 郁吉锋, 黄路瑶, 等. 铁皮石斛叶总黄酮的大孔树脂纯化工艺及抗氧化活性 [J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2019, 41(3): 380-386.

[责任编辑 郑礼胜]