

HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价红芪质量

王振恒^{1,2,3}, 马定财¹, 邵晶^{1,2,3*}, 晋玲^{1,2,3*}, 李小凤¹, 马毅^{1,2,3}, 崔治家^{1,2,3}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 西北中藏药协同创新中心, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 以完善红芪 *Hedysari Radix* 质量评价方法与内容为目的, 建立红芪 HPLC 指纹图谱并测定 4 种有效成分的含量, 并在建立多成分含量测定方法基础上, 为其质量标志物的可测性提供依据。**方法** 运用 HPLC 法建立 36 批红芪的指纹图谱, 通过对照品比对, 对共有峰进行指认, 确定并建立 4 种有效成分含量的测定方法, 在指纹图谱相似度评价基础之上, 运用聚类分析、主成分分析、判别分析对 36 批次红芪差异性成分进行分析。**结果** 36 批红芪指纹图谱共有 16 个峰, 指认了 4 个峰, 分别是毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素; 30 批红芪相似度大于 0.900, 6 批红芪的相似度在 0.802~0.900; 聚类分析将 36 批红芪分为 4 类; 主成分因子分析提取了 4 个主成分, 5 批红芪主成分综合得分较低, 与其他批次有较大差异, 主成分分析依据生长类型将红芪分为 2 类、依据商品等级分为 4 类, 差异性成分分别为峰 7、芒柄花苷、峰 10、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素; 判别分析结果与主成分分析一致; 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷以及 4 种有效成分的总量与主成分综合得分呈显著负相关, 指认的 4 种有效成分在可测性方面具备成为红芪质量标志物的科学性。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学模式识别法的评价模式, 能够有效分析红芪质量的差异性, 为现有红芪质量控制与评价提供研究基础和参考依据。

关键词: 红芪; 指纹图谱; 多成分定量; 化学模式; 质量评价; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)23-7832-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.026

Quality evaluation of *Hedysari Radix* by HPLC fingerprint and multi-component quantitative method combined with chemical pattern recognition

WANG Zhen-heng^{1,2,3}, MA Ding-cai¹, SHAO Jing^{1,2,3}, JIN Ling^{1,2,3}, LI Xiao-feng¹, MA Yi^{1,2,3}, CUI Zhi-jia^{1,2,3}

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

2. Provincial Key Laboratory of Chemistry and Quality Research of Chinese (Tibetan) Medicine in Gansu Province, Lanzhou 730000, China

3. Northwest Chinese-Tibetan Medicine Collaborative Innovation Center, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective In order to improve the quality evaluation method and content of Hongqi (*Hedysari Radix*), this study established HPLC fingerprint of Hongqi (*Hedysari Radix*) and determined the contents of four active components. Based on the establishment of multi-component content determination method, it provided the basis for the measurability of its quality markers.

Methods HPLC method was used to establish the fingerprint of 36 batches of *Hedysari Radix*. The common peaks were identified by comparison with reference products, and four methods for the determination of active components were determined and established.

On the basis of fingerprint similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis were used to analyze the differential components of 36 batches of *Hedysari Radix*. **Results** There were 16 peaks in 36 batches of *Hedysari Radix* fingerprints, and four peaks were identified, which were calycosin-7-glycoside, ononin, calycosin and formononetin; The similarity of

收稿日期: 2023-05-06

基金项目: 兰州市城关区科技计划项目 (2020-2-2-2); 甘肃省科技计划自然科学基金项目 (21JR11RA136); 甘肃省教育厅双一流重大科研项目 (GSSYLXM-05); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题 (ZGY202004); 中医药公共卫生服务补助专项子课题 (2305191901)

作者简介: 王振恒 (1974—), 男, 副教授, 硕士, 主要从事药用植物资源开发研究。E-mail: 363340807@qq.com

***通信作者:** 邵晶 (1978—), 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中藏药物质基础及质量控制。E-mail: cn221@163.com

晋玲 (1974—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为中(藏)药资源评价、保护及可持续利用研究。

E-mail: 1131858632@qq.com

30 batches was greater than 0.900, and the similarity of six batches was 0.802—0.900. The 36 batches of *Hedysari Radix* were divided into four groups by cluster analysis; Four principal components were extracted by principal component factor analysis, and the comprehensive scores of principal components of the five batches of *Hedysari Radix* were low, which were significantly different from the other batches. *Hedysari Radix* was divided into two categories according to the growth type, and four categories according to the commodity grade. The differential components were peak 7, ononin, peak 10, calycosin-7-glucoside and formononetin; The results of discriminant analysis were consistent with those of principal component analysis; There was a significant negative correlation between the total amount of calycosin-7-glucoside, ononin and four active components and the comprehensive score of principal components. The four active ingredients identified became the scientific quality markers of *Hedysari Radix* in the aspect of measurability. **Conclusion** The established the HPLC fingerprint and multiple component content quantitative method combined with the combination of chemical pattern recognition method can effectively analyze the quality of *Hedysari Radix*, with view to providing research foundation and reference basis for the quality control and evaluation of *Hedysari Radix*.

Key words: *Hedysari Radix*; fingerprint pattern; multi-component quantification; chemical model; quality evaluation; isoflavonoid glycoside; anthocyanin; isoflavone; anthocyanin

红芪 *Hedysari Radix* 为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根^[1], 用药历史悠久, 最早见于《本草经集注》^[2]。陇南武都米仓山红芪由于质量佳被誉为传统特产^[3], 在台湾、澳门、香港以及东南亚地区作为黄芪优良品种药用^[4]。红芪的化学成分主要有多糖类、黄酮类、氨基酸类、苯丙素类、生物碱类、三萜类、甾体类以及微量元素等^[5]。具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、免疫调节、降糖、调脂、降压等药理作用^[6], 在疾病预防及保健产品开发等方面具有广阔的应用前景。由于红芪和黄芪植物基原、性味归经、功能主治等方面的共性, 在历史沿革中一直作为同一味中药使用, 自从《中国药典》将红芪从黄芪项下分开单列之后, 红芪在制剂生产中不再作为黄芪代用品使用, 现《中国药典》红芪项下暂无对其化学成分的定性鉴别和含量测定内容。本研究基于对红芪质量评价方法与内容的完善, 收集来自甘肃野生和栽培 2 种生长类型的红芪样品 36 批, 建立其指纹图谱, 在整体观基础上反映红芪中特征化学成分的种类和数量, 并测定毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 4 种有效成分的含量, 结合主成分分析、聚类分析、相关性分析, 为提高红芪质量评价方法提供研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), KQ-700D 型超声清洗器(昆山市仪器有限公司), BT125D 型十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), Purelab Classic 实验室超纯水机(ELGA 公司)。

1.2 试药

对照品芒柄花苷(批号 16112156)、芒柄花素

(批号 15102066)、毛蕊异黄酮苷(批号 14051927)、毛蕊异黄酮(批号 19073098), 质量分数均>98%, 均来自兰州普兰特生物有限公司。水为超纯水, 色谱纯和分析纯均购自天津大茂化学试剂厂。

样品基于第四次全国中药资源甘肃黄芪红芪专项调查, 经甘肃中医药大学王振恒副教授鉴定为多序岩黄芪 *H. polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根, 商品等级划分参考《七十六种药材商品规格标准》红芪项下中上部直径大小(一等: 上中部直径 1.3 cm 以上; 二等: 上中部直径 1 cm 以上; 三等: 上中部直径 0.7 cm 以上; 上中部直径小于 0.7 cm 自定为四等)。样品信息如表 1 所示。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取各红芪样品粉末 3.0 g, 置 150 mL 锥形瓶中, 精密加入 30 mL 甲醇, 称定质量, 75 °C 回流 1 h, 冷却后以甲醇补足缺失的质量, 滤过, 滤液减压浓缩, 蒸干, 残留物以甲醇定容至 5 mL, 置 4 °C 环境保存备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量, 配置成母液后, 分别精密量取各对照品母液适量混合, 配制成含芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮分别为 0.10、1.60、0.20、0.80 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件^[7]

Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Agilent 公司); 流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水(B); 洗脱梯度: 0~35 min, 25%~60%A; 35~45 min, 60%A; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

表 1 36 批红芪样品信息

Table 1 36 batches of *Hedysari Radix* samples

编号	生长类型	商品等级	采集时间	产地	编号	生长类型	商品等级	采集时间	产地
S1	栽培	二	2019-10	武都区玉皇乡罗家里村	S19	野生	一	2019-10	武都区马街镇沙坪村 1
S2	栽培	二	2019-10	宕昌县八里镇中拉村 1	S20	野生	四	2019-10	武都区马街镇沙坪村 2
S3	栽培	二	2019-10	宕昌县八里镇中拉村 2	S21	野生	三	2019-10	武都区安化镇朱家坪村
S4	栽培	二	2019-10	宕昌县八里镇中拉村 3	S22	野生	三	2019-10	武都区鱼龙镇小庄头村 1
S5	栽培	四	2019-10	岷县申都乡后家村	S23	野生	三	2019-10	武都区鱼龙镇小庄头村 2
S6	栽培	三	2019-10	陇西县首阳镇王家磨村	S24	野生	四	2019-10	武都区鱼龙镇小庄头村 3
S7	栽培	三	2019-10	积石山县安集镇杨家湾村	S25	野生	四	2019-10	武都区鱼龙镇小庄头村 4
S8	栽培	二	2019-10	武都区三仓镇罗家庄村	S26	野生	二	2019-10	武都区三河镇汉坪村 1
S9	栽培	一	2019-10	文县桥头镇张家坝村	S27	野生	四	2019-10	武都区三河镇汉坪村 2
S10	栽培	四	2019-10	武都区安化镇马家沟村 1	S28	野生	一	2019-10	武都区安化镇杜家塆村
S11	栽培	三	2019-10	武都区安化镇马家沟村 2	S29	野生	一	2019-10	武都区龙凤乡李家湾村
S12	栽培	一	2019-10	武都区安化镇马家沟村 3	S30	野生	一	2019-10	武都区马街镇半山村 1
S13	栽培	一	2019-10	武都区安化镇马家沟村 4	S31	野生	一	2019-10	武都区马街镇半山村 2
S14	栽培	四	2019-10	武都区安化镇马家沟村 5	S32	野生	一	2019-10	武都区马街镇半山村 3
S15	栽培	四	2019-10	武都区安化镇马家沟村 6	S33	野生	二	2019-10	武都区鱼龙镇刘家湾村 1
S16	野生	一	2019-10	武都区安化镇马家沟村 7	S34	野生	四	2019-10	武都区鱼龙镇刘家湾村 2
S17	野生	四	2019-10	武都区安化镇马家沟村 8	S35	野生	二	2019-10	渭源县会川镇小庄村村
S18	野生	三	2019-10	武都区安化镇李家庙村	S36	野生	三	2019-10	陇西县首阳镇菜子坪村

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取红芪样品 (S3), 按照“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 选 9 号色谱峰芒柄花苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.72%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.71%。

2.4.2 重复性试验 取红芪样品 (S3), 按照“2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按照“2.3”项下色谱条件进样, 选 9 号色谱峰芒柄花苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.95%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.32%。

2.4.3 稳定性试验 取红芪样品 (S3), 按照“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 分别进样, 选 9 号色谱峰芒柄花苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.89%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.55%。

2.5 指纹图谱的建立和相似度分析

将 36 批红芪样品按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件进样, 记录色谱图。将 36 批红芪色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版, 以 S1 样品色谱图作为参照图谱, 经多点校正后进行色谱峰匹配得到 36 批红芪指纹图谱和对照指纹图谱 (R), 见

图 1。36 批红芪标定了 16 个共有峰, 通过对照品色谱图指认毛蕊异黄酮苷 (6 号峰), 芒柄花苷 (9 号峰), 毛蕊异黄酮 (12 号峰), 芒柄花素 (16 号峰)。各样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.802~0.989 (表 2), 表明各产地红芪药材质量稳定, 为多成分定量结合化学模式识别提供基础^[8]。

2.6 聚类分析

采用 R version 3.6.3 软件, 以 36 批红芪中 16 个共有峰的峰面积为变量, 以欧氏距离法进行 Ward 聚类分析, 当欧氏距离为 10 时, 36 批红芪可以聚为 4 类, 结果如图 2 所示, S1~S2、S4、S6~S9、S16~S17、S26~S33 聚为第 1 类, S3、S5、S10~S12、S13~S15、S35、S36 聚为第 2 类, S18~S19、S22、S34 聚为第 3 类, S20、S21 聚为第 4 类。

2.7 主成分分析

2.7.1 主成分因子特征值、方差贡献率分析 以 36 批红芪药材指纹图谱中 16 个共有峰的峰面积为变量, 输入 SPSS 进行因子分析, 由表 3 可知, 以特征值 > 1 为提取标准, 得到 4 个主成分, 其累积贡献率为 71.514%, 可以代表指纹图谱中 16 个共有峰的大部分信息, 碎石图见图 3, 主成分分析图见图 4。

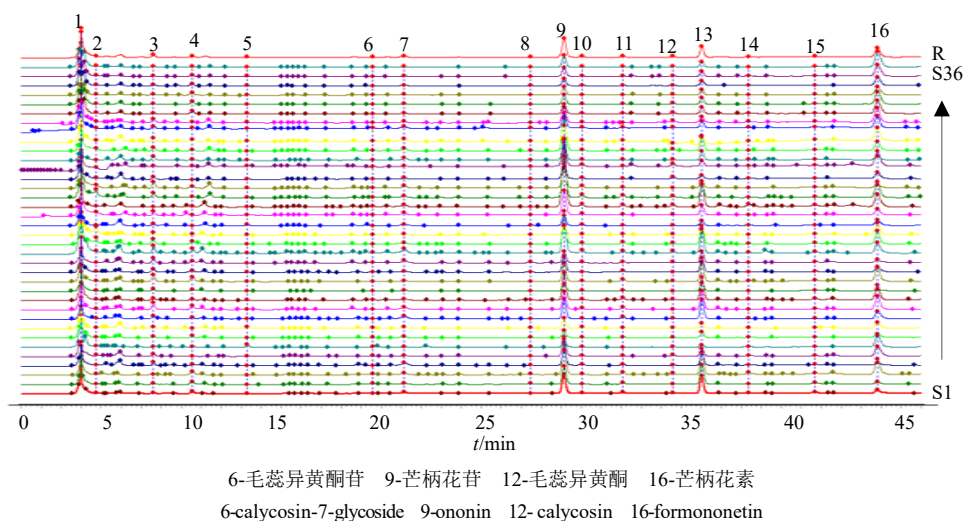


图 1 36 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 36 batches of samples

表 2 36 批样品 HPLC 图谱的相似度

Table 2 Similarity of HPLC chromatograms of 36 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.949	S13	0.942	S25	0.900
S2	0.988	S14	0.907	S26	0.837
S3	0.955	S15	0.895	S27	0.944
S4	0.932	S16	0.949	S28	0.945
S5	0.802	S17	0.955	S29	0.947
S6	0.859	S18	0.976	S30	0.884
S7	0.981	S19	0.989	S31	0.953
S8	0.971	S20	0.902	S32	0.945
S9	0.972	S21	0.902	S33	0.980
S10	0.922	S22	0.982	S34	0.976
S11	0.922	S23	0.961	S35	0.925
S12	0.958	S24	0.975	S36	0.983

因子载荷矩阵反映了 16 个共有峰对各主成分的贡献率, 相关系数的绝对值越大, 其对主成分的贡献也就越大, 结果见表 4。峰 1、6~15 对第 1 主成分贡献较大, 峰 8、15、16 对第 2 主成分贡献较大, 峰 3 对第 3 主成分贡献较大, 峰 5 对第 4 主成分贡献较大。为了区分 36 批红芪的质量差异, 以主成分方差贡献率为权重系数, 计算各主成分因子综合得分并排序, 结果如表 5 所示。综合得分从大到小排序依次是 S13>S14>S26>S15>S34>S17>S33>S7>S10>S31>S16>S23>S32>S24>S13>S4>S30>S8>S11>S3>S2>S5>S28>S1>S22>S6>S29>S9>S35>S25>S36>

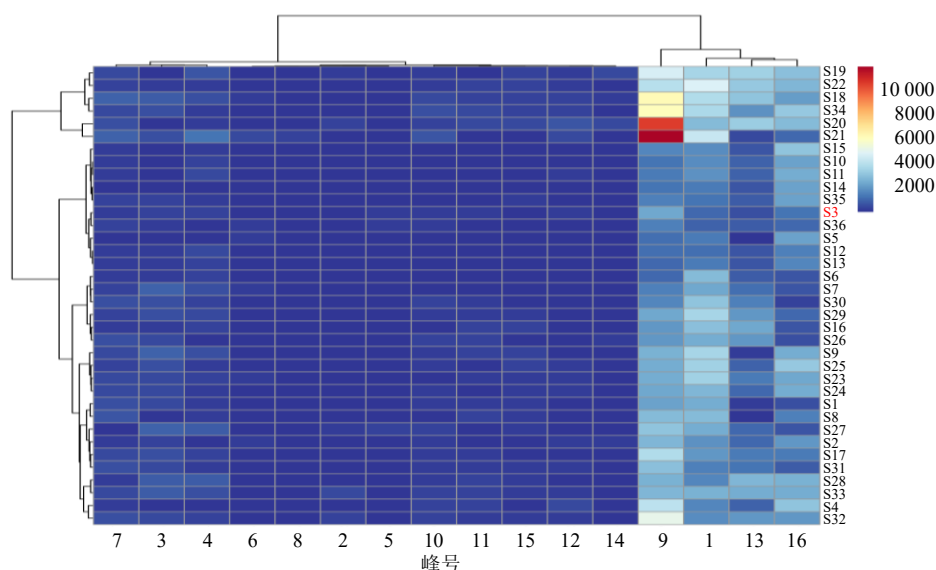


图 2 36 批样品聚类图

Fig. 2 CA diagram of 36 batches of samples

表 3 36 批样品主成分因子特征值、方差贡献率

Table 3 Principal component factor eigenvalues and variance contribution rates of 36 batches of samples

成分	初始特征值		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.518	34.485	34.485
2	2.861	17.879	52.364
3	1.672	10.450	62.814
4	1.392	8.700	71.514

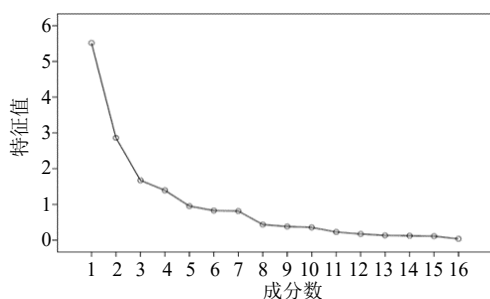


图 3 碎石图

Fig. 3 Scree plot

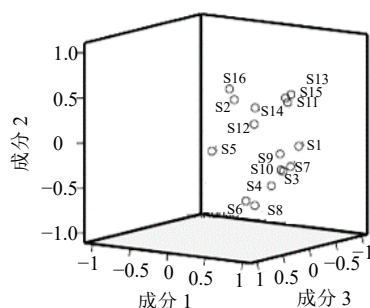


图 4 主成分图

Fig. 4 PCA gravel map

表 4 因子载荷矩阵

Table 4 Factor loading matrix

共有峰	载荷				共有峰	载荷			
	1	2	3	4		1	2	3	4
9	0.917	-0.039	0.277	0.011	11	0.559	0.402	-0.381	0.027
10	0.807	-0.253	0.106	0.265	8	0.515	-0.664	0.185	-0.318
7	0.751	-0.258	-0.160	-0.272	16	0.191	0.599	0.205	0.071
12	0.717	0.302	0.484	0.062	6	0.572	-0.574	0.435	-0.052
1	0.684	-0.075	-0.410	-0.202	2	0.292	0.499	0.256	0.327
15	0.631	0.505	-0.341	0.057	4	0.494	-0.498	-0.161	0.233
13	0.591	0.468	-0.294	-0.042	3	0.365	-0.409	-0.572	0.479
14	0.574	0.438	0.264	-0.238	5	-0.025	-0.109	0.234	0.800

S20>S19>S27>S18>S21。S18~S21、S36、S27 综合得分较低，与其他批次红芪差异较大。

2.7.2 主成分分析 以 36 批红芪药材指纹图谱

表 5 36 批样品的主成分因子得分和排序

Table 5 Principal component factor scores and ranking of 36 batches of samples

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	综合得分	排序
S1	-0.824	-0.942	-0.625	-1.222	-0.624	24
S2	0.160	0.128	-0.724	-0.960	-0.081	21
S3	-0.485	0.445	1.001	-0.631	-0.038	20
S4	-0.461	1.041	0.730	1.070	0.196	16
S5	-0.955	-0.148	1.023	1.078	-0.155	22
S6	-2.244	-1.339	-3.057	2.252	-1.131	26
S7	1.144	0.981	0.446	4.145	0.977	8
S8	-0.520	1.132	0.633	-0.887	0.012	18
S9	-2.164	-1.998	-4.261	1.011	-1.461	28
S10	0.560	2.624	0.736	2.424	0.950	9
S11	-0.168	-0.996	0.055	2.232	-0.036	19
S12	0.463	-1.346	-0.040	5.836	0.423	15
S13	2.792	1.040	2.279	5.834	1.895	1
S14	2.571	1.963	1.011	4.903	1.770	2
S15	2.408	-0.519	1.042	6.003	1.369	4
S16	0.832	0.550	1.407	3.588	0.845	11
S17	2.107	2.125	0.707	1.893	1.345	6
S18	-10.132	-4.731	-6.772	-12.274	-6.115	35
S19	-8.135	-5.421	-7.799	-4.710	-4.999	33
S20	-10.318	0.548	-1.758	-4.062	-3.997	32
S21	-15.744	-7.741	-9.033	-20.089	-9.505	36
S22	-0.920	-4.473	2.418	2.501	-0.647	25
S23	1.469	-0.437	3.429	0.294	0.812	12
S24	1.184	-0.189	-0.229	1.266	0.461	14
S25	-4.366	-0.704	-1.022	0.142	-1.726	30
S26	3.692	1.430	-0.917	3.802	1.764	3
S27	-8.503	-8.745	-5.690	-6.029	-5.615	34
S28	2.833	-4.099	-3.234	-4.492	-0.485	23
S29	-2.317	0.086	-2.058	-1.599	-1.138	27
S30	-1.524	-0.412	4.912	2.776	0.156	17
S31	-0.904	4.434	2.687	1.387	0.883	10
S32	0.959	2.387	-0.272	-0.389	0.695	13
S33	2.606	1.508	-3.982	6.346	1.304	7
S34	4.187	-1.089	-2.927	4.645	1.347	5
S35	-3.963	0.366	-1.178	-2.511	-1.643	29
S36	-5.810	-4.259	-3.278	-8.070	-3.810	31

中 16 个共有峰的峰面积为变量，采用多元统计软件 SIMCA 14.1 进行主成分分析，以 36 批红芪生长类型分组建模，结果如图 5 所示，栽培红芪和野生红芪可以分开。以 36 批红芪商品等级分组建模，结果如图 6 所示，不同商品等级的分类结果不理想。载荷图（图 7），峰 7、9（芒柄花苷）、10 对主成分 1 贡献较大，峰 2、16（芒柄花素）、12（毛蕊异黄酮）对主成分 2 贡献较大。

2.8 判别分析

将 36 批红芪生长类型分组建模，以 16 个共有峰标准化后的峰面积为判别变量建了 1 个判别函数（函数 = $-0.532 x_1 - 0.191 x_2 - 0.324 x_3 - 0.038 x_4 + 0.526 x_5 + 0.759 x_6 + 0.687 x_7 - 0.407 x_8 - 0.074 x_9 +$

$0.581 x_{10} - 0.350 x_{11} - 0.494 x_{12} + 1.377 x_{13} - 0.943 x_{14} + 1.079 x_{15} - 0.265 x_{16}$, $x_1 \sim x_{16}$ 代表峰 1~16)。36 批红芪正确率都达到了 100%，这一结果与主成分分析一致。以商品等级分组建模，共建立 3 个判别函数。

函数 1 = $1.284 x_1 + 0.140 x_2 + 0.343 x_3 - 0.681 x_4 + 1.195 x_5 + 0.340 x_6 + 0.247 x_7 - 0.324 x_8 + 3.020 x_9 - 2.145 x_{10} - 0.645 x_{11} - 0.679 x_{12} + 0.808 x_{13} - 0.842 x_{14} - 1.535 x_{15} + 0.595 x_{16}$

函数 2 = $-0.384 x_1 - 0.342 x_2 - 0.665 x_3 + 0.931 x_4 - 0.132 x_5 + 0.606 x_6 + 0.475 x_7 + 0.598 x_8 - 1.485 x_9 - 0.501 x_{10} + 0.141$

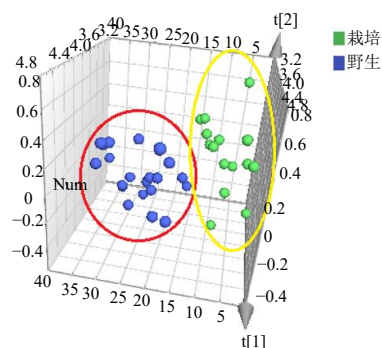


图 5 生长类型主成分得分图

Fig. 5 Growth type principal component score map

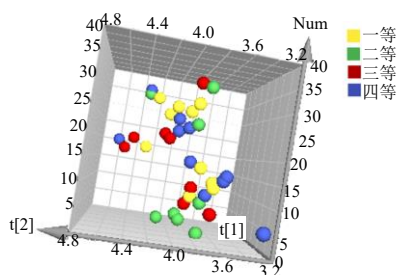


图 6 商品等级主成分得分图

Fig. 6 Commodity grade principal component score chart

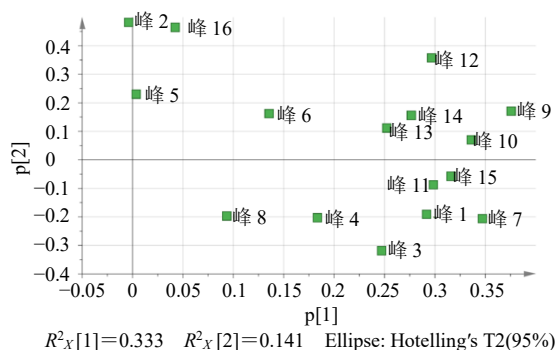


图 7 载荷图

Fig. 7 load diagram

$x_{11} + 0.585 x_{12} + 0.794 x_{13} - 0.852 x_{14} + 1.010 x_{15} - 0.351 x_{16}$

函数 3 = $0.445 x_1 + 0.272 x_2 - 0.079 x_3 - 0.239 x_4 + 0.403 x_5 + 0.211 x_6 + 0.827 x_7 + 0.491 x_8 - 1.559 x_9 - 0.164 x_{10} + 0.698 x_{11} + 0.621 x_{12} - 0.339 x_{13} + 0.526 x_{14} - 0.957 x_{15} + 0.030 x_{16}$

函数 1、2、3 分别携带原始信息的 52.7%、32.0%、15.4%。以函数 1 和函数 2 得分作图，获得典则判别函数图（1~4 代表一等~四等，图 8）。可以看出，各等级分别聚为一类，组间距离较大，16 个共有峰的峰面积有区分各商品等级的潜力。36 批红芪总正确率达到了 86.1%，2 个一等品分别误判为二、三等品，1 个二等品误判为一等品，1 个三等品误判为四等品，表明 16 个共有峰可以作为区分 36 批红芪商品等级的指标，这一结果与主成分分析结果基本一致。

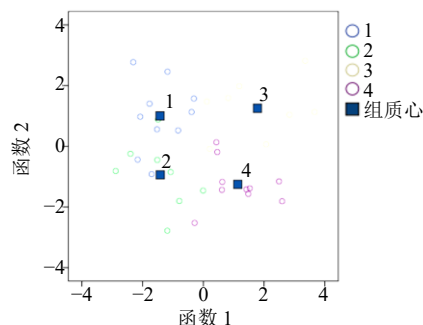


图 8 判别分析典则质心图

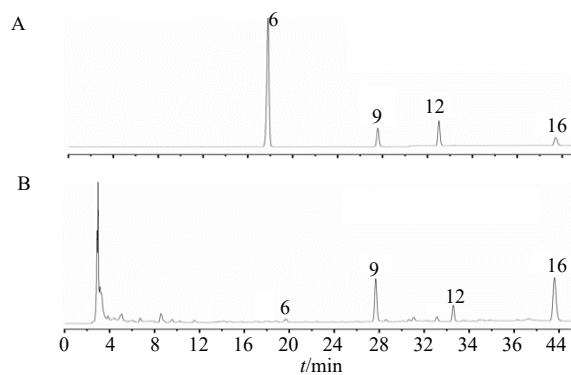
Fig. 8 Centroid of canonical discriminant function

2.9 含量测定

2.9.1 供试品溶液的制备 同“2.1”项。

2.9.2 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

2.9.3 色谱条件 同“2.3”项，色谱图见图 9。



6-毛蕊异黄酮苷 9-芒柄花苷 12-毛蕊异黄酮 16-芒柄花素
6-isoflavonoid glycoside 9-anthocyanin 12-isoflavone 16-anthocyanin

图 9 混合对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 图

Fig. 9 HPLC diagram of mixedreferences (A) and sample (B)

2.9.4 线性关系考察 将“2.2”项下混合对照品溶液按照倍半稀释法连续稀释,按“2.3”项下色谱条件进样,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),作线性回归。结果如表 6 所示。

表 6 线性关系

Table 6 Investigation of linear relation

成分	回归方程	r	线性范围/mg
毛蕊异黄酮苷	$Y=29\ 560 X-0.000\ 7$	0.999 9	0.000 5~0.10
芒柄花苷	$Y=37\ 280 X-4.241\ 2$	0.999 8	0.002 0~1.60
毛蕊异黄酮	$Y=45\ 844 X-6.846\ 3$	1.000 0	0.000 3~0.20
芒柄花素	$Y=114\ 258 X-2.492\ 0$	0.999 6	0.003 0~0.80

2.9.5 精密度试验 取“2.2”项下方法对照品溶液,按“2.3”项下连续进样 6 次,记录峰面积并进行偏差分析,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的 RSD 分别为 0.41%、0.94%、1.45%、1.09%。

2.9.6 稳定性试验 精密称取红芪粉末 3.0 g,按“2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.3”项下色谱条件进样,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,共 6 次,

毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的 RSD 分别为 0.78%、0.92%、1.65%、1.51%。

2.9.7 重复性试验 精密称取红芪粉末 3.0 g,按“2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.3”项下色谱条件进样测定质量分数,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的 RSD 分别为 0.19%、0.63%、0.59%、0.24%。

2.9.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的红芪粉末 2.0 g,加入样品含量 50%、100%、150%的各对照品溶液,按“2.1”项下方法制备供试品溶液各 3 份,按“2.3”项下色谱条件进样,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素平均回收率分别为 93.35%、101.18%、97.48%、95.72%,RSD 分别为 2.13%、1.77%、1.65%、2.45%。

2.9.9 样品测定 将红芪粉末按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样并进行谱图分析,计算质量分数,结果见表 7。

表 7 30 批样品中 4 个主要成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 Contents of four main components in 30 batches of samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	总量
S1	0.002 0±0.000 3	0.187 7±0.006 7	0.141 6±0.012 5	0.017 8±0.000 4	0.349 0±0.005 8
S2	0.008 2±0.000 3	0.213 1±0.002 0	0.010 8±0.000 6	0.057 1±0.003 8	0.289 2±0.005 5
S3	0.006 1±0.001 6	0.203 1±0.004 6	0.018 9±0.001 6	0.036 6±0.001 2	0.264 6±0.005 6
S4	0.005 3±0.001 3	0.353 8±0.006 9	0.032 2±0.001 2	0.092 5±0.003 2	0.483 8±0.001 8
S5	0.007 6±0.001 2	0.083 4±0.015 1	0.004 1±0.000 8	0.073 1±0.015 1	0.168 2±0.031 6
S6	0.009 0±0.001 8	0.087 2±0.004 5	0.002 7±0.000 4	0.017 5±0.001 2	0.116 3±0.007 0
S7	0.002 8±0.000 9	0.246 3±0.014 9	0.006 6±0.000 4	0.044 6±0.003 2	0.300 4±0.019 2
S8	0.001 5±0.000 6	0.246 2±0.014 2	0.006 6±0.000 4	0.044 6±0.003 0	0.299 0±0.018 1
S9	0.002 2±0.000 2	0.228 2±0.001 2	0.003 1±0.000 2	0.049 5±0.039 4	0.283 0±0.038 8
S10	0.005 6±0.000 4	0.110 3±0.002 8	0.009 1±0.000 7	0.065 7±0.003 6	0.190 8±0.006 5
S11	0.003 1±0.000 4	0.122 9±0.008 2	0.012 6±0.001 1	0.073 0±0.004 1	0.211 6±0.013 6
S12	0.003 8±0.000 1	0.108 5±0.000 5	0.009 1±0.000 1	0.045 3±0.000 1	0.166 9±0.000 6
S13	0.004 0±0.000 7	0.089 6±0.003 7	0.005 3±0.000 3	0.045 4±0.002 1	0.144 3±0.006 7
S14	0.003 1±0.000 1	0.112 6±0.003 2	0.009 0±0.000 4	0.064 7±0.003 2	0.189 4±0.006 8
S15	0.005 7±0.000 6	0.139 4±0.007 8	0.010 8±0.000 8	0.085 7±0.003 6	0.241 7±0.012 3
S16	0.002 6±0.001 5	0.192 7±0.044 5	0.008 2±0.000 6	0.018 9±0.002 8	0.222 3±0.047 7
S17	0.003 8±0.000 1	0.338 1±0.009 6	0.006 3±0.000 2	0.040 6±0.000 9	0.388 8±0.009 9
S18	0.020 2±0.000 4	0.546 3±0.006 2	0.019 2±0.000 2	0.061 3±0.000 7	0.647 0±0.007 1
S19	0.010 1±0.001 1	0.423 3±0.012 6	0.014 9±0.000 6	0.087 7±0.002 3	0.536 0±0.015 0
S20	0.006 7±0.000 2	0.936 8±0.003 4	0.039 7±0.012 0	0.083 1±0.000 7	1.066 2±0.016 2
S21	0.054 4±0.014 8	1.134 6±0.077 3	0.028 1±0.011 3	0.030 5±0.002 4	1.247 6±0.096 9
S22	0.005 7±0.000 7	0.333 4±0.008 3	0.010 9±0.000 3	0.076 8±0.002 9	0.426 7±0.011 9
S23	0.017 9±0.002 5	0.229 6±0.019 5	0.013 3±0.000 8	0.071 3±0.002 0	0.332 1±0.022 2
S24	0.004 9±0.001 0	0.208 0±0.003 7	0.012 2±0.000 1	0.073 6±0.000 4	0.298 7±0.004 1
S25	0.003 0±0.000 1	0.218 8±0.001 4	0.016 0±0.000 6	0.093 2±0.001 7	0.331 1±0.001 0
S26	0.002 0±0.000 3	0.089 1±0.000 6	0.002 5±0.000 1	0.008 4±0.000 3	0.102 0±0.000 5
S27	0.007 3±0.002 2	0.278 5±0.012 4	0.005 0±0.000 5	0.020 7±0.002 3	0.311 5±0.009 9
S28	0.006 5±0.000 3	0.251 1±0.012 6	0.007 4±0.000 8	0.075 6±0.004 9	0.340 6±0.014 5
S29	0.002 2±0.000 6	0.192 3±0.017 8	0.005 4±0.000 6	0.028 6±0.003 1	0.228 5±0.021 9
S30	0.010 4±0.000 6	0.151 6±0.009 3	0.111 5±0.003 0	0.011 2±0.000 6	0.284 6±0.012 3
S31	0.004 0±0.000 1	0.269 8±0.001 3	0.010 1±0.000 9	0.023 3±0.000 4	0.307 3±0.000 1
S32	0.010 0±0.000 1	0.469 5±0.014 2	0.015 0±0.000 9	0.059 9±0.002 5	0.554 4±0.015 6
S33	0.007 1±0.003 3	0.255 9±0.028 3	0.012 7±0.000 6	0.066 9±0.003 9	0.342 6±0.022 1
S34	0.008 6±0.000 3	0.536 0±0.002 3	0.021 2±0.002 1	0.091 7±0.001 4	0.657 5±0.001 6
S35	0.003 1±0.000 6	0.135 9±0.004 9	0.027 3±0.033 6	0.064 8±0.000 9	0.231 1±0.039 4
S36	0.008 2±0.000 3	0.213 1±0.002 0	0.010 8±0.000 6	0.057 1±0.003 8	0.289 0±0.005 5

2.10 4 个成分含量与指纹图谱综合得分的相关性

将 36 批红芪中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素以及 4 个成分总量输入 SPSS17.0 软件进行 Pearson (双侧) 相关性分析。结果见表 8。

毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷以及 4 个有效成分的总量与指纹图谱综合得分呈显著负相关, 表明毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷及 4 个有效成分的总量可以作为红芪质量的评价指标。

表 8 4 个成分含量与指纹图谱综合得分的相关性

Table 8 Correlation between content of four components and comprehensive score of fingerprint

成分	相关系数					
	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	总量	综合得分
毛蕊异黄酮苷	1.000	0.710**	0.067	-0.049	0.704**	-0.668**
芒柄花苷		1.000	0.099	0.167	0.991**	-0.661**
毛蕊异黄酮			1.000	-0.234	0.187	-0.079
芒柄花素				1.000	0.233	0.022
总量					1.000	-0.651**
综合得分						1.000

** $P < 0.05$

3 讨论

本实验建立的 HPLC 指纹图谱专属性强, 准确可靠, 供试品溶液前处理简单, 操作简便。主成分分析中, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 4 个指认的化学成分很好地将不同生长类型和不同产地的红芪样品分开, 并且毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷以及 4 个成分的总量与主成分综合得分具有显著相关关系, 可以区分不同样品的品质。芒柄花苷和芒柄花素在红芪中的含量较高。根据 Q-Marker “成分可测性” 的原则^[9-10], 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素可以为红芪质量标志物的预测提供参考。

本研究考察了指纹图谱的色谱条件, 以乙腈/甲醇-0.1%磷酸水溶液为基本流动相, 通过反复摸索梯度洗脱程序, 发现以甲醇为有机相, 最大吸收波长选择 254 nm, 指纹图谱出峰较多, 出峰时间稳定, 峰面积较大的峰分离度较好, 故流动相选择甲醇-0.1%磷酸水溶液, 能够较为全面地反映红芪中的化学信息。

本研究对 36 批红芪药材指纹图谱的评价在相似度的基础上, 结合聚类分析、主成分分析、判别分析, 全面客观评价红芪的质量。36 批红芪药材指纹图谱的评价中, 30 批样品相似度大于 0.90, 说明红芪药材化学成分组成较相似, 但各批次药材化学成分含量存在一定差异, 有 6 批样品相似度低于 0.90, 可能与生长环境、揉搓方式、贮藏等因素有关, 需要进一步分析验证。聚类分析中, 大部分样品 (共 20 批) 聚为第 1 类, 10 批样品聚为第 2 类,

4 批样品聚为第 3 类, 2 批样品聚为第 4 类; 12 个峰聚为第 1 类, 峰 9 聚为第 2 类, 峰 1、13、16 聚为第 3 类。主成分特征值、方差贡献率分析中, 提取了 4 个主成分, 其累积贡献率为 71.514%, 可以反映样品的大部分信息, 主成分综合得分将 36 批样品进行排序, 为进一步含量测定和质量评价提供基础; 主成分分析中, 36 批样品以生长类型为标准, 可以分为栽培和野生 2 种, 以商品等级为标准的分类结果不理想, 表明野生红芪和栽培红芪存在一定的差异, 现行商品等级分类标准需要进一步改善和验证。判别分析中, 以生长类型、商品等级建立判别函数的正确率分别为 100%、86.1%, 结果与主成分分析中一致。

根据主成分分析结果和峰面积的大小, 参考关于红芪有效成分和 Q-Marker 的报道, 选择红芪药材含量测定指标。主成分分析中, 峰 7、9 (芒柄花苷)、峰 10、12 (毛蕊异黄酮)、16 (芒柄花素) 最能代表主成分, 但峰 7 和峰 10 峰面积较小。同时文献表明, 毛蕊异黄酮苷也是红芪的主要活性成分^[11]。根据 Q-Marker “五原则”^[12]: 质量传递与溯源、成分特有性、成分的有效性、成分可测性以及复方配伍环境。选择毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素作为含量测定指标, 能够为全面、科学地反映红芪药材质量提供研究基础。本研究建立的方法操作性强、可重复, 为红芪药材质量标准制定提供理论依据。

本研究结果表明, 芒柄花苷和芒柄花素在红芪中的含量较高, 与文献报道一致^[13]。4 个成分含量

与主成分综合得分的相关性表明,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷和 4 个有效成分的总量可以为红芪质量评价提供依据。《中国药典》2020 年版未规定红芪含量测定项,本实验建立的指纹图谱及多成分含量测定,为实现红芪有效质控提供重要参考依据。

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. 2020: 159.
- [2] 南朝·梁. 陶弘景编. 尚志钧尚元胜辑校. 本草经集注: [M]. 辑校本. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 262-263.
- [3] 李越峰, 辛二旦, 边甜甜, 等. 红芪研究新进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(6): 84-86.
- [4] 张玲, 李朋玲, 华永丽, 等. 黄芪和红芪的红外光谱法结合化学计量学方法鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1657-1659.
- [5] 冯慧敏, 李成义, 何军刚, 等. 红芪化学成分和药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2831-2842.
- [6] 牛江涛, 曹瑞, 张泽国, 等. 红芪多糖的提取分离及药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(1): 130-133.
- [7] 李紫岩, 杨敏, 王杰, 等. 以 7 种有效成分为指标评价内蒙古不同产地黄芪药材品质 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 65-73.
- [8] 张淑娟, 张育贵, 李东辉, 等. 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 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3081-3088.
- [9] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [10] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [11] 张淑娟. 基于中药质量标志物的炙黄芪和炙红芪质量控制研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2021.
- [12] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [13] 叶迎, 王瑞海, 柏冬, 等. 甘肃不同产地及不同生长年限红芪和黄芪中 4 种异黄酮类成分的含量对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 52-58.

[责任编辑 时圣明]