

基于 HPLC-PDA-ELSD 的炙黄芪特征成分一测多评适用性研究

黄沈辉^{1,3}, 李 洋¹, 孙 捷^{1,3}, 宋 丽^{1,3}, 万 毅¹, 彭国平^{1,2,3}, 郑云枫^{1,2,3*}

1. 江苏省经典名方工程研究中心, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 针对炙黄芪中主要指标成分及经蜜炙转化的特征乙酰基成分, 建立 HPLC-PDA-ELSD 测定炙黄芪中 6 种异黄酮及 2 种三萜皂苷的分析方法以及 6 种异黄酮的一测多评 (quantitative determination analysis multi-component by a single-marker, QAMS) 法。方法 选取毛蕊异黄酮 7-*O*- β -D-葡萄糖苷 (CYG)、黄芪皂苷 I (AGI) 分别为异黄酮和三萜皂苷类成分的内参物, 并计算 CYG 与乙酰毛蕊异黄酮苷 (CYA)、芒柄花苷 (FMG)、毛蕊异黄酮 (CY)、乙酰芒柄花苷 (FMA)、芒柄花素 (FM) 及 AGI 与乙酰黄芪皂苷 I (ATI) 的相对校正因子 ($f_{k/s}$), 在不同仪器、色谱柱、柱温、体积流量上考察各成分相对校正因子的稳定性与耐用性, 比较 QAMS 法与外标法 (ESM) 结果差异。结果 对来自 8 个厂家共 18 批炙黄芪进行检测, PDA 检测的 6 种异黄酮的 QAMS 法与 ESM 的结果相近, 相对误差绝对值均在 5% 以内, 表明针对异黄酮类成分建立的 QAMS 法准确性良好, 可选用 QAMS 法与 ESM 进行质量控制; ELSD 检测的 2 种三萜皂苷的 QAMS 法与 ESM 的结果差异明显, 相对误差绝对值为 0.40%~22.69%, 显示针对三萜皂苷类成分建立的 QAMS 法不适用, 应选用 ESM 进行质量控制。结论 建立的炙黄芪中 6 种异黄酮及 2 种三萜皂苷的分析方法及 6 种异黄酮的 QAMS 法准确可靠, 操作简便, 可反映黄芪的蜜炙程度, 为更加全面地评价炙黄芪质量提供参考, 以期提升炙黄芪饮片质量。

关键词: 炙黄芪; 特征成分; HPLC-PDA-ELSD; 一测多评法; 毛蕊异黄酮 7-*O*- β -D 葡萄糖苷; 乙酰毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 乙酰芒柄花苷; 芒柄花素; 黄芪皂苷 I; 乙酰黄芪皂苷 I

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5230-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.022

QAMS and applicability study of characteristic components in honey-processed *Astragali Radix* based on HPLC-PDA-ELSD

HUANG Shenhui^{1,3}, LI Yang¹, SUN Jie^{1,3}, SONG Li^{1,3}, WAN Yi¹, PENG Guoping^{1,2,3}, ZHENG Yunfeng^{1,2,3}

1. Jiangsu Engineering Research Center of Classical Prescription, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resource Industrialization, Nanjing 210023, China

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective Aiming at the major index components and characteristic acetyl components of Huangqi (*Astragali Radix*, AR) processed by honey, an analytical method by HPLC-PDA-ELSD for the determination of six isoflavones and two triterpenoid saponins as well as a quantitative determination analysis multi-component by a single-marker (QAMS) method for six isoflavones in honey-processed *Astragali Radix* were established. **Methods** Calycosin-7-*O*- β -D-glucoside (CYG) and astragaloside I (AGI) were selected separately as internal reference substances of isoflavones including calycosin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl (CYA), formononetin-7-*O*-glucoside (FMG), calycosin (CY), formononetin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl (FMA), formononetin (FM) and triterpenoid saponins including acetylastragaloside I (ATI), and relative correction factors (RCFs) between each component and internal reference were calculated. The stability and durability of the measured RCFs were investigated on different instruments, chromatographic columns, column temperatures and flow rates. The deviation of results of QAMS method and the external standard method (ESM) were compared. **Results** A total of 18 batches of honey-processed *Astragali Radix* from eight manufacturers were detected of which the QAMS method and ESM results of six isoflavones detected by PDA were similar and the absolute values of relative error were within 5%, indicating that the accuracy

收稿日期: 2023-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973482)

作者简介: 黄沈辉, 硕士, 研究方向为中药化学与分析学。Tel: (025) 86798186 E-mail: hshfons@163.com

*通信作者: 郑云枫, 博士, 教授, 研究方向为中药制剂工艺与质量评价。Tel: (025) 86798186 E-mail: zyunfeng@njucm.edu.cn

of the established QAMS method was good, thus the QAMS method and ESM could be used for quality control about isoflavones. There were larger differences between the QAMS method and ESM results of two triterpenoid saponins detected by ELSD, of which the absolute values of relative error ranged from 0.40% to 22.69%, indicating that the QAMS method established for triterpenoid saponins was not applicable, thus ESM should be selected for quality control about triterpenoid saponins. **Conclusion** The established analytical method for the determination of six isoflavones and two triterpenoid saponins and the QAMS method for the determination of six isoflavones in honey-processed *Astragali Radix* were accurate, reliable and easy to operate, which can reflect the degree of honey-processed *Astragali Radix* and provide a reference for the quality control of honey-processed *Astragali Radix* more comprehensively, in order to improve the quality of honey-processed *Astragali Radix* decoction pieces.

Key words: honey-processed *Astragali Radix*; characteristic components; HPLC-PDA-ELSD; QAMS; calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside; calycosin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl; formononetin-7-*O*-glucoside; calycosin; formononetin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl; formononetin; astragaloside I; acetylastragaloside I

炙黄芪为黄芪的蜜炙炮制加工品^[1]。在黄芪众多炮制品中,炙黄芪的临床应用最为广泛,化学成分主要为黄酮类、皂苷类、多糖类^[2]等,具有抗氧化^[3]、抗炎^[4]、免疫调节^[5-6]、抗动脉粥样硬化^[7]等活性。已有文献及课题组研究表明,黄芪在过热条件下提取,其丙二酰基类成分会发生转化^[8-9]。在蜜炙过程中,生黄芪中丙二酰异黄酮苷会转化为相应的乙酰异黄酮苷及相关的异黄酮苷,丙二酰环黄芪醇皂苷仅转化为乙酰环黄芪醇皂苷^[10],转化后的乙酰基成分为炙黄芪特征成分。有研究表明,黄芪蜜炙后免疫调节活性增强^[11-13],蜜炙引起的化学成分的转化可能是产生此活性差异的重要物质基础。然而,现有炙黄芪的质量控制标准与黄芪基本一致,具体表现在含量测定指标与样品制备方法上^[1],主要聚焦于部分异黄酮类成分的含量测定及多组分指纹图谱^[14-15],而忽视了其中经蜜炙转化的乙酰基类成分。中药具有多成分、多靶点的复杂特性,药典中仅以 2 种成分对炙黄芪进行质量评价已不能满足质量控制的要求。鉴于对照品制备相对困难,采用一测多评(quantitative determination analysis multi-component by a single-marker, QAMS)法可以实现多成分质量评价,具有很高的适用性^[16-17]。

本研究基于黄芪蜜炙后化学成分的转化,考虑其主要指标成分及特征乙酰基成分,以毛蕊异黄酮 7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside, CYG)、黄芪皂苷 I(astragaloside I, AGI)分别为 6 种异黄酮和 2 种三萜皂苷的内参物,建立高效液相色谱仪-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器(HPLC-PDA-ELSD)联用测定炙黄芪中 CYG、乙酰毛蕊异黄酮苷(calycosin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl, CYA)、芒柄花苷(formononetin-7-*O*-glucoside, FMG)、毛蕊异黄酮(calycosin, CY)、乙酰芒柄花苷(formononetin-7-*O*-glucoside-6"-*O*-acetyl,

FMA)、芒柄花素(formononetin, FM)、AGI、乙酰黄芪皂苷 I(acetylastragaloside I, ATI) 8 种成分的分析方法,并建立炙黄芪 6 种异黄酮的 QAMS 质量控制方法。该法检测成本低、耐用性强、准确性高,为炙黄芪的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪、2998 PDA 检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); Altech/2000ES 分析型蒸发光散射检测器、Allchrom model 6000 蒸发光散射检测器(美国 Altech 公司),空气发生器(天津市津分分析仪器制造有限公司);色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m): Heder ODS-2 C₁₈(江苏汉邦科技股份有限公司)、Agela Vensuil XBP C₁₈(美国 Agela 公司)、Thermo hypersil C₁₈(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); MS-105DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Millipore Direct-Q5 纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料与试剂

CYG(批号 JBZ-0785,质量分数 $\geq$ 98%)、FMG(批号 JBZ-0778,质量分数 $\geq$ 98%)、CY(批号 JBZ-0786,质量分数 98.12%)、FM(批号 JBZ-0156,质量分数 99.40%)、AGI(批号 JBZ-0501,质量分数 $\geq$ 98%)均购于南京金益柏生物科技有限公司。CYA、FMA、ATI 对照品均由实验室自制^[16],经 HPLC 分析,质量分数 $\geq$ 98%;乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),甲酸(色谱纯,Merck 公司);超纯水(Millipore 超纯水系统制备)。18 批炙黄芪购自 8 个厂家,信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

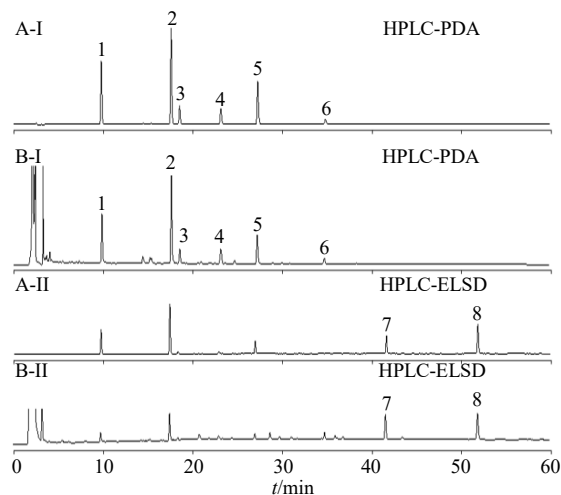
HPLC-PDA-ELSD 串联检测,色谱柱: Heder

表 1 炙黄芪来源信息

Table 1 Source information of honey-processed *Astragali Radix*

编号	批号	生产企业	产地
KH-1	210601	安徽康和中药科技有限公司	内蒙古
KH-2	210602		
HQT-1	20211102	广东汇群中药饮片股份有限公司	甘肃
HQT-2	20211103		
ZQ-1	210802	普宁市泽群中药饮片有限公司	甘肃
ZQ-2	210803		
KM-1	220302651	康美药业股份有限公司	甘肃
KM-2	220302652		
KM-3	220302653		
DYT-1	220101	安徽道源堂中药饮片有限公司	内蒙古
DYT-2	220102		
YQ-1	220102	安徽省益泉中药有限公司	甘肃
YQ-2	220103		
QA-1	2202133151	安国市祈澳中药饮片有限公司	内蒙古
QA-2	2202133152		
HX-1	201101	河南华夏药材有限公司	甘肃
HX-2	210601		
HX-3	220201		

ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱: 0~25 min, 16%~35% A; 25~50 min, 35%~60% A; 50~60 min, 60% A; 检测波长 260 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; ELSD 参数: 增益 4, 漂移管温度 120 °C, 氮气体积流量 2.8 L/min; 在当前色谱条件下, 各色谱峰分离度 (R) > 1.5, 拖尾因子 T≈1.00, 见图 1。



1-毛蕊异黄酮 7-O-β-D-葡萄糖苷; 2-乙酰毛蕊异黄酮苷; 3-乙酰芒柄花苷; 4-毛蕊异黄酮; 5-乙酰芒柄花苷; 6-芒柄花素; 7-黄芪皂苷 I; 8-乙酰黄芪皂苷 I。

1-CYG; 2-CYA; 3-FMG; 4-CY; 5-FMA; 6-FM; 7-AGI; 8-ATI。

图 1 炙黄芪混合对照品 (A) 和样品 (B) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed references (A) and sample (B) of honey-processed *Astragali Radix* (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 CYG、CYA、FMG、CY、FMA、FM、AGI、ATI 对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加色谱甲醇溶解并定容至刻度, 配制质量浓度分别为 242、372、43.8、52、145.6、9.82、190、236.5 μg/mL 的混合溶液, 即得 1 号混合对照品溶液。将 1 号混合对照品溶液依次稀释 2、4、8、16、32、64 倍, 制备得 2~7 号混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

采用《中国药典》2020 年版炙黄芪 CYG 含量测定供试品处理方法^[1], 即取本品粉末 (过四号筛) 约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 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, 离心, 取上清液, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取空白溶液甲醇注入液相色谱仪, 按“2.1”项色谱方法进行测定。空白溶液对当前色谱方法无干扰, 表明方法专属性良好。

2.4.2 线性范围、检测限与定量限 将“2.2”项下制得的混合对照品溶液, 依法分别测定 6 种异黄酮和 2 种三萜皂苷的峰面积, 其中 6 种异黄酮以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 2 种三萜皂苷以质量浓度的对数值为横坐标 (lnX), 峰面积的对数值为纵坐标 (lnY), 进行线性回归处理, 得到 8 种成分的回归方程、相关系数 (r) 及线性范围。进一步以对照品溶液逐级稀释、测定, 确定各成分的检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ), 结果显示, 该 8 种成分在相应浓度范围内, 线性关系良好, 并具有较高的灵敏度, 见表 2。

2.4.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液 1 号, 连续进样 6 次, 依法测得峰面积, 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。结果 CYG、CYA、FMG、CY、FMA、FM、AGI 及 ATI 峰面积 RSD 分别为 0.82%、0.95%、0.86%、1.00%、1.00%、1.23%、1.71% 及 2.13%。表明仪器的精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一炙黄芪 (HX-1) 样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法在 0、2、4、6、8、10、12 h 测得峰面积, 计算 RSD。结果 CYG、CYA、FMG、CY、FMA、FM、AGI 及 ATI 峰面积 RSD 分别为 1.23%、1.11%、1.28%、1.09%、

表 2 8 种成分的回归方程、线性范围和检测限、定量限

Table 2 Regression equations, linear ranges, LOD and LOQ of eight components

混合对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
CYG	$Y=27\,121\,X-2\,825.9$	0.999 9	3.780~242.000	0.059	0.177
CYA	$Y=26\,674\,X-3\,457.2$	0.999 9	5.810~372.000	0.091	0.273
FMG	$Y=47\,886\,X-2\,672.6$	0.999 9	0.684~43.800	0.021	0.063
CY	$Y=38\,717\,X-2\,182.7$	0.999 9	0.810~52.000	0.051	0.153
FMA	$Y=35\,774\,X-3\,219.4$	0.999 9	2.275~145.600	0.071	0.213
FM	$Y=69\,700\,X-2\,012.5$	0.999 8	0.153~9.820	0.038	0.090
AGI	$\ln Y=1.510\,7\,\ln X+6.554\,1$	0.999 1	2.970~190.000	0.742	2.226
ATI	$\ln Y=1.590\,9\,\ln X+6.451\,6$	0.999 2	3.695~236.500	0.924	2.772

1.11%、1.07%、2.53%及 2.29%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批次炙黄芪 (HX-1) 样品, 平行 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 并计算各成分的平均质量分数及 RSD, 结果测得该批次炙黄芪样品的 CYG、CYA、FMG、CY、FMA、FM、AGI 及 ATI 含量分别为 0.363、0.733、0.078、0.114、0.218、0.024、0.623、0.561 mg/g, RSD 分别为 2.97%、2.61%、2.82%、2.47%、2.42%、2.15%、2.31%及 3.02%。表明方法的重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已测定的炙黄芪 (HX-1) 粉末 (过四号筛) 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 分别按饮片含量-对照品 (1:1) 加入一定量的对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算加样回收率, CYG、CYA、FMG、CY、FMA、FM、AGI 及 ATI 的加样回收率分别为 102.2%、101.5%、99.9%、101.1%、100.3%、97.0%、98.4%及 97.4%, RSD 分别为 2.07%、1.65%、1.50%、1.45%、1.34%、1.94%、2.46%及 1.79%。

2.5 相对校正因子的确定

2.5.1 相对校正因子的计算 按“2.2”项下方法制备 1~6 号混合对照品溶液, 依法测定 8 种成分的峰面积。6 种异黄酮, 以 CYG 为内参物, 采用多点

法^[18]计算 CYG 相对于 CYA、FMG、CY、FMA、FM 的校正因子 (relative correction factors, RCFs, 记为 $f_{k/s}$)。

$$f_{k/s}=(C_s\times A_k)/(C_k\times A_s)$$

C_s 为内参物浓度, A_s 为内参物峰面积; C_k 为待测组分浓度, A_k 为待测组分峰面积

2 种三萜皂苷以 AGI 为内参物, 采用多点法^[18]计算 AGI 相对于 ATI 的校正因子 $f_{\text{ATI/AGI}}$ 。

$$f_{k/s}=(\ln C_s\times \ln A_k)/(\ln C_k\times \ln A_s)$$

结果显示 (表 3), 采用多点法计算获得的相对校正因子 $f_{\text{CYA/CYG}}$ 、 $f_{\text{FMG/CYG}}$ 、 $f_{\text{CY/CYG}}$ 、 $f_{\text{FMA/CYG}}$ 、 $f_{\text{FM/CYG}}$ 、 $f_{\text{ATI/AGI}}$ 分别为 0.984、1.772、1.427、1.318、2.546、0.976, RSD $\leq$ 3.19%。

2.5.2 不同仪器及色谱柱测得的相对校正因子比较 采用 Waters e2695-PDA-ELSD1 (ELSD1 型号: Altech/2000ES)、Waters e2695-PDA-ELSD2 (ELSD2 型号: Allchrom model 6000) 2 种仪器, 以 Hedera ODS-2 C₁₈、Agela Vensuil XBP C₁₈、Thermo hypersil C₁₈ 3 种不同品牌的色谱柱, 分别测定并计算 CYG 与异黄酮类成分及 AGI 与三萜皂苷类成分的相对校正因子, 计算 RSD。结果显示, 内参物与各成分在不同仪器上的 $f_{k/s}$ 的 RSD $<$ 3.0%, 表明炙黄芪中 8 个成分在不同仪器及色谱柱上的耐用性较好, 见表 4。

表 3 多点法测定的待测成分 $f_{k/s}$

Table 3 Relative correction factors calculated by multi-point method

编号	$f_{\text{CYA/CYG}}$	$f_{\text{FMG/CYG}}$	$f_{\text{CY/CYG}}$	$f_{\text{FMA/CYG}}$	$f_{\text{FM/CYG}}$	$f_{\text{ATI/AGI}}$
1	0.984	1.767	1.430	1.320	2.572	1.001
2	0.982	1.761	1.412	1.312	2.517	1.000
3	0.987	1.775	1.424	1.322	2.549	0.994
4	0.985	1.773	1.422	1.323	2.534	0.983
5	0.982	1.770	1.429	1.314	2.494	0.953
6	0.987	1.786	1.446	1.319	2.609	0.924
平均值	0.984	1.772	1.427	1.318	2.546	0.976
RSD/%	0.20	0.47	0.78	0.33	1.60	3.19

表 4 不同仪器、色谱柱条件下待测成分的 $f_{k/s}$

Table 4 RCFs measured by different instruments and C₁₈ chromatographic columns

仪器	色谱柱	$f_{CYA/CYG}$	$f_{FMG/CYG}$	$f_{CY/CYG}$	$f_{FMA/CYG}$	$f_{FM/CYG}$	$f_{ATI/AGI}$
Waters e2695-PDA-ELSD1	Hedera ODS-2 C ₁₈	0.979	1.757	1.406	1.312	2.496	0.982
	Agela Vensuil XBP C ₁₈	0.970	1.688	1.374	1.308	2.459	0.990
	Thermo hypersil C ₁₈	0.978	1.752	1.390	1.298	2.421	0.977
Waters e2695-PDA-ELSD2	Hedera ODS-2 C ₁₈	0.977	1.767	1.422	1.308	2.420	0.986
	Agela Vensuil XBP C ₁₈	0.981	1.765	1.422	1.320	2.487	0.977
	Thermo hypersil C ₁₈	0.981	1.771	1.420	1.316	2.397	0.983
	平均值	0.977	1.750	1.405	1.310	2.447	0.983
	RSD/%	0.41	1.78	1.42	0.56	1.64	0.53

2.5.3 不同柱温、体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响 采用 Waters e2695-PDA-ELSD1 仪器和 Hedera ODS-2 C₁₈ 色谱柱, 分别测定并计算不同柱温条件下 (25、30、35 °C) 及不同体积流量 (0.9、1.0、1.1 mL/min) CYG 与异黄酮类成分及 AGI 与三萜皂苷类成分的 $f_{k/s}$, 计算 RSD。结果显示, 内参物与各成分的 $f_{k/s}$ 的 RSD<3.0%, 表明 $f_{k/s}$ 在温度 25~35 °C 及体积流量 0.9~1.1 mL/min 的耐受性良好, 见表 5。

2.5.4 待测成分色谱峰的定位 待测成分色谱

峰的准确定位是实现一测多评的前提, 本研究采用“相对保留值法”(各成分与内参物的保留时间比值 $t_{k/s}$) 对炙黄芪 8 个待测组分的保留时间进行了考察。结果显示待测成分与内参物相对保留值的差异较小 CYA、FMG、CY、FMA、FM 相对于 CYA 的相对保留值均值分别为 1.759、1.840、2.313、2.677、3.414, ATI 相对于 AGI 的相对保留值均值为 1.250, RSD≤2.64%, 表明采用待测组分与内参物相对保留值来定位具有可行性, 见表 6。

表 5 不同柱温、体积流量下的待测成分 $f_{k/s}$

Table 5 RCFs measured by different column temperatures and flow rates

项目	因素	$f_{CYA/CYG}$	$f_{FMG/CYG}$	$f_{CY/CYG}$	$f_{FMA/CYG}$	$f_{FM/CYG}$	$f_{ATI/AGI}$
柱温/°C	25	0.982	1.759	1.414	1.314	2.517	0.998
	30	0.987	1.775	1.424	1.322	2.549	0.994
	35	0.982	1.767	1.389	1.311	2.536	0.997
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.9	0.982	1.762	1.415	1.313	2.510	0.988
	1.0	0.987	1.775	1.424	1.322	2.549	0.994
	1.1	0.985	1.771	1.428	1.318	2.571	1.012
	平均值	0.984	1.768	1.416	1.317	2.539	0.997
	RSD/%	0.23	0.38	0.99	0.34	0.90	0.80

表 6 不同仪器、色谱柱条件下测得的相对保留时间比值

Table 6 Relative retention time ratios measured under different instruments and column conditions

仪器	色谱柱	$t_{CYA/CYG}$	$t_{FMG/CYG}$	$t_{CY/CYG}$	$t_{FMA/CYG}$	$t_{FM/CYG}$	$t_{ATI/AGI}$
Waters e2695-PDA-ELSD1	Hedera ODS-2 C ₁₈	1.798	1.895	2.370	2.783	3.553	1.246
	Agela Vensuil XBP C ₁₈	1.746	1.814	2.275	2.635	3.339	1.244
	Thermo hypersil C ₁₈	1.755	1.834	2.322	2.665	3.414	1.257
Waters e2695-PDA-ELSD2	Hedera ODS-2 C ₁₈	1.783	1.876	2.338	2.744	3.490	1.244
	Agela Vensuil XBP C ₁₈	1.734	1.810	2.287	2.618	3.352	1.257
	Thermo hypersil C ₁₈	1.737	1.812	2.286	2.617	3.336	1.255
	平均值	1.759	1.840	2.313	2.677	3.414	1.250
	RSD/%	1.48	1.99	1.60	2.63	2.64	0.53

2.5.5 样品含量测定及 QAMS 法的验证 按“2.3”项下方法,分别制备采集的 8 个厂家共 18 批炙黄芪,依法测定,进一步采用外标法(external standard method, ESM)和 QAMS 法对所测得的

数据分别进行含量计算,并以相对误差(relative error, RE)进行评价,以验证 QAMS 法测定上述 8 种成分含量的准确性,结果见表 7、8。结果显示,在 18 批炙黄芪中均能测得该 8 种成分,ESM

表 7 ESM 与 QAMS 测定炙黄芪中 6 种异黄酮的含量 (n = 2)
Table 7 Content of six isoflavones in samples of honey-processed *Astragali Radix* by ESM and QAMS (n = 2)

编号	CYG/(mg·g ⁻¹)	CYA/(mg·g ⁻¹)			FMG/(mg·g ⁻¹)			CY/(mg·g ⁻¹)			FMA/(mg·g ⁻¹)			FM/(mg·g ⁻¹)		
		ESM	QAMS	RE%	ESM	QAMS	RE%	ESM	QAMS	RE%	ESM	QAMS	RE%	ESM	QAMS	RE%
KH-1	0.490	0.711	0.711	0.07	0.104	0.104	0.17	0.110	0.109	0.28	0.208	0.208	0.17	0.023	0.023	0.12
KH-2	0.580	0.785	0.784	0.09	0.116	0.116	0.22	0.119	0.119	0.27	0.229	0.229	0.16	0.025	0.025	0.03
HQT-1	0.579	0.091	0.090	1.34	0.180	0.180	0.21	0.175	0.174	0.12	0.044	0.045	1.82	0.067	0.066	0.68
HQT-2	0.594	0.094	0.092	1.31	0.185	0.184	0.24	0.178	0.178	0.11	0.045	0.045	1.79	0.068	0.067	0.68
ZQ-1	0.503	0.035	0.034	3.58	0.134	0.134	0.19	0.213	0.213	0.02	0.014	0.014	3.78	0.071	0.071	0.73
ZQ-2	0.504	0.034	0.033	3.69	0.133	0.133	0.10	0.214	0.212	0.03	0.012	0.013	3.07	0.070	0.069	0.73
KM-1	0.347	0.097	0.096	1.13	0.117	0.117	0.06	0.083	0.083	0.35	0.048	0.049	1.50	0.021	0.021	0.17
KM-2	0.348	0.096	0.095	1.14	0.118	0.117	0.11	0.082	0.081	0.36	0.048	0.048	1.53	0.020	0.020	0.18
KM-3	0.363	0.095	0.094	1.17	0.122	0.121	0.11	0.083	0.083	0.32	0.050	0.051	1.44	0.021	0.022	0.12
DYT-1	0.493	0.713	0.713	0.07	0.102	0.101	0.23	0.115	0.115	0.25	0.207	0.207	0.17	0.024	0.024	0.03
DYT-2	0.471	0.677	0.676	0.03	0.098	0.098	0.14	0.105	0.105	0.29	0.197	0.197	0.18	0.023	0.023	0.12
YQ-1	0.493	0.727	0.726	0.09	0.101	0.101	0.22	0.115	0.115	0.25	0.210	0.210	0.16	0.025	0.025	0
YQ-2	0.487	0.708	0.707	0.06	0.104	0.104	0.24	0.107	0.107	0.29	0.207	0.207	0.17	0.022	0.022	0.19
QA-1	0.372	0.757	0.750	0.85	0.080	0.080	0.41	0.118	0.117	0.78	0.225	0.222	1.41	0.026	0.025	0.64
QA-2	0.358	0.719	0.729	1.43	0.077	0.077	0.14	0.112	0.112	0.19	0.214	0.214	0.08	0.024	0.024	0.83
HX-1	0.366	0.729	0.738	1.17	0.077	0.078	1.01	0.114	0.115	0.97	0.217	0.219	1.08	0.024	0.024	1.19
HX-2	0.547	0.055	0.053	2.28	0.139	0.139	0.20	0.201	0.201	0.06	0.018	0.019	4.73	0.066	0.066	0.69
HX-3	0.896	0.103	0.102	1.24	0.273	0.272	0.26	0.202	0.201	0.14	0.048	0.049	1.72	0.074	0.073	0.66

表 8 ESM 与 QAMS 测定炙黄芪中 2 种三萜皂苷的含量 (n = 2)

Table 8 Content of two triterponid saponins in samples of honey-processed *Astragali Radix* by QAMS and ESM (n=2)

编号	AGI/(mg·g ⁻¹)	ATI/(mg·g ⁻¹)		
		ESM	QAMS	RE%
KH-1	0.716	0.875	0.850	2.82
KH-2	0.786	0.912	0.931	2.10
HQT-1	0.351	0.306	0.239	21.82
HQT-2	0.388	0.333	0.258	22.43
ZQ-1	0.736	0.315	0.312	1.05
ZQ-2	0.747	0.294	0.293	0.40
KM-1	0.509	0.460	0.383	16.83
KM-2	0.513	0.459	0.385	16.37
KM-3	0.539	0.463	0.396	14.32
DYT-1	0.852	0.929	0.994	6.99
DYT-2	0.738	0.883	0.872	1.21
YQ-1	0.859	0.904	0.969	7.23
YQ-2	0.712	0.845	0.820	2.94
QA-1	0.659	0.583	0.715	22.69
QA-2	0.591	0.535	0.627	17.21
HX-1	0.619	0.559	0.679	21.52
HX-2	1.166	0.475	0.572	20.46
HX-3	0.782	0.306	0.310	1.34

与 QAMS 测得的 6 种异黄酮含量结果差异较小, RE<5.0%, 表明 QAMS 法检测的含量结果准确, 能够满足炙黄芪中 6 种异黄酮的含量测定要求。而 2 种三萜皂苷 ESM 与 QAMS 法测得结果差异较大, 表明针对该组分建立的 QAMS 法稳定性不好, 应选用 ESM 进行含量测定。

3 讨论

3.1 分析方法的建立与优化

采用二极管阵列检测器, 对 6 种异黄酮类成分进行了 200~400 nm 扫描, 结果显示, 该 6 种成分的紫外光谱图中, CYG、CYA、CY、FM 均在 247~291 nm 波长处有最大吸收, FMG、FMA 分别在 251、258 nm 处有最大吸收。研究发现, 在 260 nm 波长条件下 6 种待测成分的灵敏度均较好, 且色谱图基线平稳, 具有良好的分离度, 满足定量分析的要求。因此, 最终选择 260 nm 作为检测波长。

本研究采用我国现行药典检测炙黄芪 CYG 的甲醇回流提取样品制备方法, 未采用检测黄芪甲苷加 4%浓氨的 80%甲醇回流提取方法^[1]。主要考虑检测三萜皂苷时的目标不一致, 本方法可表征黄芪蜜

炙后转化的成分乙酰黄芪皂苷 I 及未转化的成分黄芪皂苷 I。而药典法通过碱水解法检测黄芪甲苷含量来表征炙黄芪中总皂苷含量,此反应受碱性条件、提取时间等影响,难以转化完全^[19],不能较为全面真实地反映炙黄芪中乙酰基成分的含量,而该类成分为炙黄芪特征成分,含量相对较高,选用甲醇回流提取方法能检测到该类成分,且 8 种成分在当前样品制备方法中稳定,故选用此方法。

本研究相较于药典中炙黄芪的含测指标,增加了 5 个异黄酮类成分:CYA、CY、FMA、FMG、FM 以及 2 个三萜皂苷类成分:AGI、ATI,保留药典中 CYG、并去除黄芪甲苷含测指标,其中 CYG、CY、FMG、FM、AGI 为主要指标成分,药理作用明确,相关研究颇多,既是效用成分又是主要指标成分。CYA、FMA、ATI 为炙黄芪特征性成分,含量较高,既是特征成分亦是主要指标成分,已有初步研究表明这些乙酰基成分具有良好的生物活性^[20-24]。此外,从成分变化来判断炮制程度的深浅,从而用于提升炙黄芪饮片的质量,这些指标是呈关联性、动态性变化,例如炮制程度很浅,可检测到丙二酰毛蕊异黄酮苷、丙二酰芒柄花苷、丙二酰黄芪皂苷 I,与黄芪几乎无差异,相应的 CYA、CYG、FMA、FMG、ATI 的含量会很低;炮制程度完全,丙二酰基成分几乎检测不到,相应的 CYA、CYG、FMA、FMG、ATI 的含量会升高,增加以上指标有利于区分黄芪及炙黄芪,从而更全面地对炙黄芪质量进行控制。

本研究在色谱条件优化过程中发现,不同型号 C₁₈ 色谱柱对异黄酮类成分的分离效果影响显著,在考察已有的 6 种型号色谱柱中,仅 Heder ODS-2 C₁₈、Agela Vensil XBP C₁₈、Thermo hypersil C₁₈, 3 种色谱柱可以实现对 8 种组分的有效分离 ($R > 1.5$),其余色谱柱的分离效果不佳,不能将 CYA 与 FMG 色谱峰分开,影响分析结果。

3.2 内参物的选择

由于对照品价格相对昂贵或不易获得,所以内参物应尽量选择在样品中含量较高、易获得且保留时间适中的有效成分。本研究中,6 种异黄酮,选择 CYG 为内参物,主要考虑该物质在我国现行药典炙黄芪标准中已有使用,性质稳定且易于获得。2 种三萜皂苷,以 AGI 为内参物,主要考虑该物质为炙黄芪原有的皂苷,含量较高且较易获得。故选用以上成分作为 QAMS 法的内参物。各成分相对

校正因子 $f_{k/s}$ 的 RSD 均小于 3%,不同仪器、色谱柱、柱温、体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响较小 ($RSD < 3\%$),表明建立 QAMS 法选择该 2 种成分作为内参物具有可行性。

3.3 炙黄芪中 8 种特征成分 QAMS 的结果分析

本研究中,对于 HPLC-PDA 检测的 6 种异黄酮, QAMS 法与 ESM 的所得结果相对误差均在 5% 以内,验证了 QAMS 法所得结果准确。在多指标测定以及对照品短缺的情况下,该法能够替代 ESM 实现多成分的定量分析。

对于 HPLC-ELSD 检测的 2 种三萜皂苷, QAMS 法与 ESM 所得结果相对误差较大,其根本原因在于检测器检测原理的不同,相较于 PDA, ELSD 的响应强度和噪音水平主要受洗脱液雾化后形成的气溶胶颗粒大小、粒径分布以及流动相蒸发的程度的影响,响应值与样品物质的量呈指数关系^[25],从而导致误差在经指数换算后的数值上放大。当对照品和样品的浓度在一定范围内, ELSD 非线性曲线有一段可以近似为线性的响应区域,以该区域的参数来建立 QAMS 法理论上是可行的。本研究中,所使用的 ELSD 为雾化器不分流、直型漂移管类型,有较好峰形的同时,并受温度及载气体积流量较大的影响^[26]。因此,在 ELSD 上建立的 QAMS 法需要视上述待测组分性质、仪器条件等,深入研究方法的适用范围与准确性。

目前炙黄芪主要靠现行药典参照蜜炙法“炒至不粘手”等性状及 2 个定量指标来进行质量控制,尚不能全面反映炙黄芪的内在质量。基于蜜炙前后黄芪化学成分的转化机制,在测定的 8 个厂家共 18 批炙黄芪中,不同厂家的乙酰基成分含量差异较大,侧面反映了黄芪的蜜炙程度不一,相关成分转化程度不一,缺乏明确且统一的工艺参数,这样很可能会影响到炙黄芪质量及临床疗效。炙黄芪中除了药典规定的 2 种含量测定指标,含有主要指标成分,包括特征乙酰基成分 (CYA、FMA、ATI)、异黄酮 (CYA、CYG、FMA、FMG、CY、FM)、三萜皂苷 (AGI、ATI),建议将以上成分作为质控指标。

本研究建立了炙黄芪 8 种成分的分析方法,同时建立了 6 种异黄酮的 QAMS 质控方法,为炙黄芪的质量控制提供依据。

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: 315-316.
- [2] Chang X N, Chen X F, Guo Y X, et al. Advances in

- chemical composition, extraction techniques, analytical methods, and biological activity of *Astragali Radix* [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1058.
- [3] Hao M, Liu Y, Chen P, *et al.* Astragaloside IV protects RGC-5 cells against oxidative stress [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(6): 1081-1086.
- [4] Nöst X, Pferschy-Wenzig E M, Nikles S, *et al.* Identification of constituents affecting the secretion of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced U937 cells by UHPLC-HRMS-based metabolic profiling of the traditional Chinese medicine formulation Huangqi Jianzhong Tang [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3116.
- [5] Shao P, Zhao L H, Zhi-Chen, *et al.* Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Astragalus mongholicus* polysaccharides [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(7): 1161-1166.
- [6] Bamodu O A, Kuo K T, Wang C H, *et al.* *Astragalus polysaccharides* (PG2) enhances the M1 polarization of macrophages, functional maturation of dendritic cells, and T cell-mediated anticancer immune responses in patients with lung cancer [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2264.
- [7] Zhang Q, Liu J, Duan H, *et al.* Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [8] Xiao M S, Chen H Y, Shi Z F, *et al.* Rapid and reliable method for analysis of raw and honey-processed astragalus by UPLC/ESI-Q-TOF-MS using HSS T3 columns [J]. *Anal Methods*, 2014, 6(19): 8045-8054.
- [9] 郑云枫, 李洋, 段伟萍, 等. 一测多评法测定黄芪中异黄酮及苷类成分 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3104-3111.
- [10] Li Y, Huang S H, Sun J, *et al.* RRLC-QTOF/MS-based metabolomics reveal the mechanism of chemical variations and transformations of *Astragali Radix* as a result of the roasting process [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 903168.
- [11] Huang L, Ye M Z, Wu J C, *et al.* A metabonomics and lipidomics based network pharmacology study of qi-tonifying effects of honey-processed *Astragalus* on spleen qi deficiency rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1146: 122102.
- [12] 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.
- [13] Dai Y T, Jin R N, Verpoorte R, *et al.* Natural deep eutectic characteristics of honey improve the bioactivity and safety of traditional medicines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112460.
- [14] 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.
- [15] 徐滨. 一测多评法同时测定炙黄芪中 4 种黄酮类成分 [J]. 中国药品标准, 2022, 23(4): 391-398.
- [16] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [17] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(6): 2378-2387.
- [18] 赵一懿, 郭洪祝, 陈有根, 等. 中药多组分含量测定中相对校正因子计算方法的比较与建议 [J]. 中国药品标准, 2014, 15(4): 245-251.
- [19] 刘蓬蓬, 鞠成国, 林桂梅, 等. HPLC-CAD 分析黄芪甲苷提取过程中黄芪皂苷类成分动态变化 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(11): 92-96.
- [20] Caliş I, Koyunoğlu S, Yeşilada A, *et al.* Antitrypanosomal cycloartane glycosides from *Astragalus baibutensis* [J]. *Chem Biodivers*, 2006, 3(8): 923-929.
- [21] Zhang L J, Liu H K, Hsiao P C, *et al.* New isoflavonoid glycosides and related constituents from *Astragali Radix* (*Astragalus membranaceus*) and their inhibitory activity on nitric oxide production [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(4): 1131-1137.
- [22] 邵长鑫, 林欢欢, 靳晓杰, 等. 黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5057-5074.
- [23] Zhao H D, Zhang Y P, Guo Y, *et al.* Identification of major α -glucosidase inhibitors in *Radix Astragali* and its human microsomal metabolites using ultrafiltration HPLC-DAD-MS(n.) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 104: 31-37.
- [24] 梁丽娟, 董婷霞, 詹华强, 等. 黄芪中 7 种活性成分对缺氧诱导因子(HIF-1)表达的影响 [J]. 中国药房, 2010, 21(47): 4422-4424.
- [25] Almeling S, Holzgrabe U. Use of evaporative light scattering detection for the quality control of drug substances: Influence of different liquid chromatographic and evaporative light scattering detector parameters on the appearance of spike peaks [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(14): 2163-2170.
- [26] Megoulas N C, Koupparis M A. Twenty years of evaporative light scattering detection [J]. *Critic Rev Analyt Chem*, 2005, 35(4): 301-316.

[责任编辑 时圣明]