

# 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别法对黄芪不同炮制品多指标成分分析研究

周晶晶<sup>1</sup>, 周洁<sup>1</sup>, 张红伟<sup>1</sup>, 党文飞<sup>1</sup>, 窦霞<sup>2,3</sup>, 靳子明<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃中医药大学; <sup>2</sup>甘肃中医药大学附属医院; <sup>3</sup>杨锡仓全国名老中医药专家工作室, 兰州 730030

**摘要:**本研究通过建立黄芪不同炮制品 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法,并结合化学计量法对其进行比较分析,为黄芪炮制品的综合利用提供理论支持。采用 HPLC 建立黄芪炮制品指纹图谱并进行 6 种成分的含量测定,并通过聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、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)评价不同黄芪炮制品的差异,找寻差异性成分。结果显示,不同炮制品(各 10 批)共得到 20 个共有峰,其中指认了 6 个共有峰,且 6 个成分在各自的质量浓度范围内线性关系良好( $r > 0.999$ ),平均加样回收率为 100.5%~102.1%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.77%~2.1%;指纹图谱相似度结果显示,蜜麸黄芪、蜜炙黄芪、盐黄芪、酒黄芪各自 10 批的相似度均在 0.900 以上,但不同类型炮制品的相似度降低;聚类分析可将四种炮制品聚为 3 类,主成分分析与聚类分析结果一致,可相互佐证,正交偏最小二乘-判别分析能有效的将 4 种炮制品区分,以变量重要性投影(variable importance of projection, VIP)大于 1 为依据,筛选了 9 种主要差异成分,确认了毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、5-羟甲基糠醛是引起黄芪不同炮制品间成分差异的主要标志性成分。该研究所建立的黄芪炮制品 HPLC 指纹图谱结合化学计量法的方法准确可靠,可为黄芪炮制品的质量控制和品质评价提供参考依据。

**关键词:**黄芪; HPLC; 指纹图谱; 含量测定; 化学模式识别; 质量评价

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)6-0993-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.6.010

## Multi-index composition analysis of different processed products of Astragali Radix based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition method

ZHOU Jing-jing<sup>1</sup>, ZHOU Jie<sup>1</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1</sup>, DANG Wen-fei<sup>1</sup>, DOU Xia<sup>2,3</sup>, JIN Zi-ming<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu University of Traditional Chinese Medicine; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine;

<sup>3</sup>Yang Xicang National Famous Old Chinese Medicine Expert Studio, Lanzhou 730030, China

**Abstract:** This study provides theoretical support for the comprehensive utilization of Astragali Radix processed products by establishing HPLC fingerprints and multi-component content determination methods for different processed products of Astragali Radix, and combining them with chemometric methods for comparative analysis. The fingerprints of Astragali Radix processed products were established by HPLC and the contents of six components were determined, and evaluate the differences of processed products of Astragali Radix by hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to find the differential components. The results showed that a total of 20 common peaks were obtained from different processed products (ten batches each), among which six common peaks were identified, and the linearity of the six components was good in their respective mass concentration ranges ( $r > 0.999$ ), with average spiked recoveries ranging from 100.5% to 102.1%, and the relative standard deviation (RSD) was

收稿日期: 2023-12-01

接受日期: 2024-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(82360944); 甘肃省科技厅科技重大专项-2022年中医药产业创新联合体项目(22ZD6FA021-4); 兰州市城关区科技计划(2021-2-9); 甘肃省中医药科研重点课题(GZKZ-2021-5)

\* 通信作者 Tel: 86-013993191995; E-mail: Jinziming110@sina.com

0.77% -2.1% ;The similarity results of fingerprint mapping showed that the similarity of ten batches each of honey bran-processed Astragali Radix ,honey-processed Astragali Radix ,salt-processed Astragali Radix ,and wine-processed Astragali Radix was above 0.900 ,but the similarity of different types of concoctions decreased ;Hierarchical clustering analysis can cluster the four kinds of processed products into three categories ,the results of principal component analysis and cluster analysis are consistent and can be corroborated with each other ,orthogonal partial least squares-discriminant analysis can effectively differentiate the four kinds of processed products ,and nine main difference components were screened based on the variable importance of projection (VIP) greater than 1 ,calycosin-7-glucoside ,ononin ,and 5-hydroxymethylfurfural were identified as the major landmark components causing compositional differences among different processed products of Astragali Radix .The HPLC fingerprint combined with stoichiometry of Astragali Radix processed products established by this institute is accurate and reliable ,which can provide a reference for the quality control and quality evaluation of Astragali Radix processed products .

**Key words:** Astragali Radix ;HPLC ;fingerprint ;content determination ;chemical pattern recognition ;quality evaluation

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。春、秋二季采挖,除去须根和根头,晒干<sup>[1]</sup>。主要含有多糖类、皂苷类和黄酮类等成分,其具有增强机体免疫力、抗病毒、抗炎等药理活性<sup>[2,3]</sup>。黄芪的炮制历史悠久,宋代就出现了蜜制黄芪、盐炒等,明代初又新增了酒拌炒、盐炒、米泔拌炒等方法<sup>[4]</sup>。黄芪生品具有补气升阳,固表止汗,利水消肿的功效;蜜炙后甘温而偏润,长于益气补中,缓和药性;酒制能引药上行,活血通络;盐制则能引药下行入肾经,增强滋阴降火,缓和药物辛燥之性;蜜糖炙黄芪是建昌帮独特的一种炮制方法,蜜糖炙后的黄芪不仅色鲜气香,而且补益作用明显增强<sup>[4]</sup>。不同的炮制方法影响其物质基础,进一步导致药效变化,而中药发挥药效作用的强弱与中药化学成分息息相关<sup>[5-9]</sup>。

目前,国内外对黄芪指纹图谱已有较多报道<sup>[10-14]</sup>,黄芪经过炮制后其功效发生变化,关键在于炮制后其内在成分发生不同程度的改变。研究表明,黄芪经过蜜炙后其黄酮、多糖和甲苷的含量均发生变化<sup>[15]</sup>,而经蜜麸炒、盐制、酒制前后成分含量变化报道较少。因此,本研究通过 HPLC 建立黄芪不同炮制品指纹图谱、测定有效成分的含量,通过聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、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)等化学计量模式识别法对蜜麸黄芪、蜜炙黄芪、盐黄芪、酒黄芪进行质量分析研究,为黄芪不同炮制品质量提供有效的参考,

同时也为其他中药的不同炮制品质量评价提供思路。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

CPA225D 型十万分之一分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LC-20AD 型 HPLC 仪配备 DGU-20A 型在线脱气系统、SIL-20A 型自动进样系统、CTO-20A 型柱温箱、SPD-M20A 型二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

### 1.2 试剂

对照品 5-羟甲基糠醛(批号 170310,北京盛世康普化工技术研究院)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 B20847)、芒柄花苷(批号 B20214)、美迪紫檀苷(批号 B28219)、毛蕊异黄酮(批号 B20846)、芒柄花素(批号 B20836)(纯度均大于 98%,上海源叶生物科技有限公司);甲醇(分析纯,批号 2022112,天津市北辰方正试剂厂);甲醇(色谱纯,批号 S62209ME02H,天津大茂化学试剂厂);磷酸(批号 20160308,天津市凯通化学试剂有限公司);水为娃哈哈纯净水;黄酒(甘肃五山池黄酒有限责任公司,酒精度:8% vol)。

### 1.3 材料

10 批黄芪饮片购自甘肃康乐药业有限责任公司(批号分别为 230109、230526、230702、230721、230725)和陇西保和堂药业有限责任公司(批号分别为 20210108、20220602、20220205、20230203、20230301),经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师鉴别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的

干燥根,记为 H1~H10。四种黄芪炮制品分别由黄芪原饮片炮制,记为:蜜麸黄芪 MF1~MF10、蜜炙黄芪 Z1~Z10、盐黄芪 Y1~Y10、酒黄芪 J1~J10,均为实验室自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 炮制品的制备

#### 2.1.1 蜜麸黄芪

按 10:2:1 比例称取麦麸、炼蜜、热水,炼蜜加热水融化后与麦麸拌匀得到蜜麸,先将蜜炙麸皮撒入热锅内,待冒烟时投入黄芪饮片,用文火炒至表面呈深黄色,取出,筛去麸皮放凉即得。

#### 2.1.2 蜜炙黄芪

按 4:1 比例称取黄芪饮片和炼蜜,将炼蜜加入适量沸水稀释后,加入待炮制品中拌匀、闷透,置炒制容器内,用文火炒至表面深黄色且不粘手时,取出摊晾,筛去碎屑既得。

#### 2.1.3 盐黄芪

每取净制黄芪饮片 100 g,称食盐 0.002 g 加水使之充分溶解,制得盐水加入后拌匀闷润,待盐水被充分吸收后,置炒制容器中,以文火加热炒至表明呈深黄色时,取出晾凉,筛去碎屑,既得。

#### 2.1.4 酒黄芪

每取净制黄芪饮片 100 g,则加黄酒 20 mL 搅拌闷润,静置 1 h 至黄芪和黄酒充分浸润后,置入热锅中用文火炒干后取出放凉,筛去碎屑,既得。

## 2.2 溶液的制备

### 2.2.1 供试品溶液的制备

称取 4 种黄芪炮制品饮片粉末各 1.0 g(过 4 号筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声(250 W,40 kHz)提取 40 min,晾凉,用甲醇补足减失质量,摇匀滤过,取续滤液,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得黄芪各炮制品的供试品溶液,置于冰箱中冷藏备用。

### 2.2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素对照品,加甲醇制成质量浓度分别为 100.01、76.24、99.06、68.10、104.08、85.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品储备液,置于冰箱中冷藏备用。

## 2.3 色谱条件

Robusta<sub>C</sub><sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),

流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱 0~5 min,2%→5% A;5~20 min,5%→20% A;20~40 min,20%→40% A;40~50 min,40% A;50~60 min,40%→65% A;60~70 min,65%→68% A;70~80 min,68%→80% A。检测波长 280 nm,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 1 mL/min,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

## 2.4 指纹图谱的构建

### 2.4.1 精密度实验

取蜜麸黄芪样品粉末(MF1),按照“2.2.1”项下制备供试品溶液,按照“2.3”项下连续进样 6 次,以 7 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰相对保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)小于 1.2%,相对峰面积的 RSD 小于 2.4%,表明仪器精密度良好。

### 2.4.2 稳定性实验

取蜜麸黄芪样品粉末(MF1),按照“2.2.1”项下制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.3”项下进行测定,以 7 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰,结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.8%,相对峰面积的 RSD 小于 1.8%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.4.3 重复性实验

取蜜麸黄芪样品粉末(MF1),按照“2.2.1”项下平行制备供试品溶液 6 份,按照“2.3”项下进样检测,以 7 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰,结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.6%,相对峰面积的 RSD 小于 2.6%,表明该方法重复性良好。

### 2.4.4 HPLC 指纹图谱的建立

将 40 批黄芪炮制品样品,按照“2.2.1”项下制备供试品溶液,按照“2.3”项下的色谱条件测定。得到 40 批不同黄芪炮制品指纹图谱,将实验数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012 版)》,设置 MF1 为参照图谱,采用中位数法,通过多点校正后进行全谱峰峰匹配,生成对照指纹图谱(R)和黄芪四种炮制品的指纹图谱,结果见图 1。

结果 40 批样品共得到 20 个共有峰,经与混合对照品溶液色谱图比对,指认出其中 6 个色谱峰,分别为 5-羟甲基糠醛(2 号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷

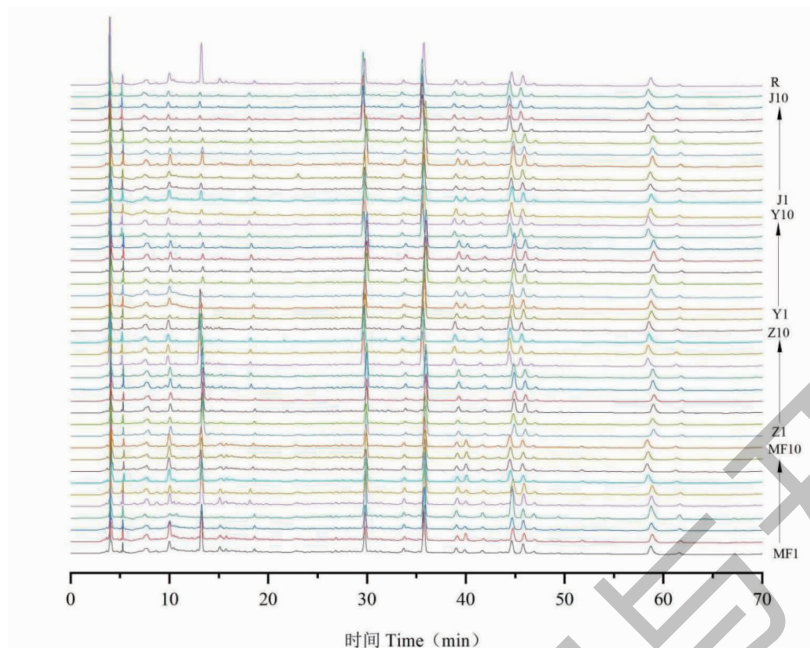


图1 四种黄芪炮制品的HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of four kinds of Astragali Radix processed products

(7号峰)、芒柄花苷(13号峰)、美迪紫檀苷(15号峰)、毛蕊异黄酮(17号峰)和芒柄花素(19号峰)。通过课题组前期研究对照黄芪生品与蜜麸炒黄芪时得出5-羟甲基糠醛是经过炮制后新增的成分,且相较于蜜麸黄芪和蜜炙黄芪,5-羟甲基糠醛的含量在

盐黄芪和酒黄芪中有所降低;15号峰(美迪紫檀苷)的含量也发生变化,其在蜜麸黄芪中的含量较其他三种炮制品中略高。此外,21号峰为蜜麸黄芪、酒黄芪共有峰,22号峰为蜜炙黄芪独有峰(见图2)。

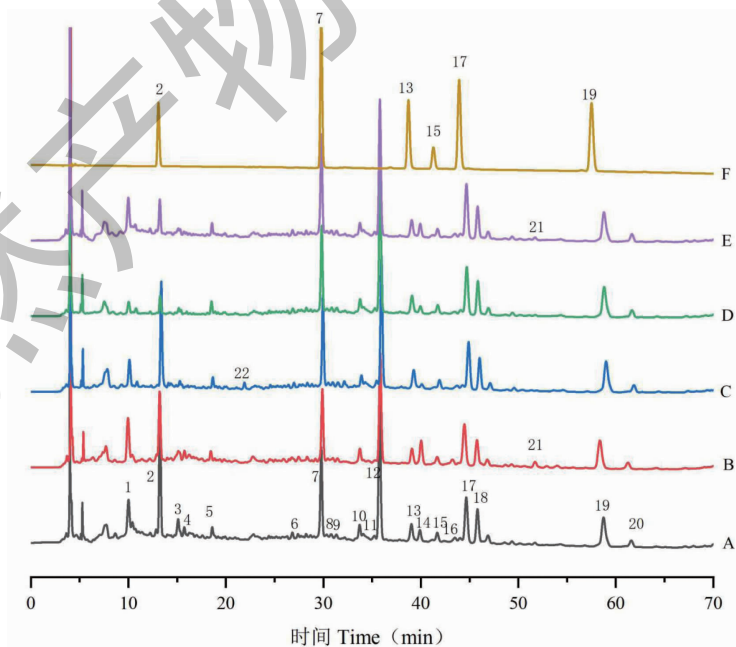


图2 样品对照、四种黄芪炮制品及混合对照品的HPLC图

Fig. 2 Sample control and HPLC of four kinds of Astragali Radix processed products and mixed reference substances  
注:A-样品对照;B-蜜麸黄芪;C-蜜炙黄芪;D-盐黄芪;E-酒黄芪;F-混合对照品。Note:A-Sample control;B-Honey bran-processed Astragali Radix;C-Honey-processed Astragali Radix;D-Salt-processed Astragali Radix;E-Wine-processed Astragali Radix;F-Mixed standards.

## 2.5 相似度分析

将黄芪各炮制品数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,分别计算各自 10 批及总 40 批样品的相似度,结果见表 1。结果可知,与对照指纹图谱(*R*)相比,蜜麸黄芪、蜜炙黄芪、盐黄芪、酒黄芪各 10 批之间的指纹图谱相似度均大于 0.900,在总 40 批黄芪炮制品中,蜜麸黄芪、蜜炙黄芪、盐黄芪、酒黄芪的相似度分别为 0.851~0.956、0.870~0.952、0.832~0.950、0.714~0.955,经过分析数据得知,同一黄芪饮片的不同炮制品的相似度比较接近,表明炮制方法的稳定性较好。而总 40

批炮制品相似度有所降低,分析主要原因如下:其一,推测黄芪原饮片的质量差异是造成总体相似度降低的原因之一,如原饮片的生长年限、采收时间、干燥方法等因素在一定程度上可能影响黄芪样品的内在质量,从而影响总体的差异,本研究采用的原料从两个公司购买,未严格保证原料的质量一致性;其二,本研究各炮制方法均为人工炮制,虽已严格控制方法的一致性,但人工炮制难免有差异;其三,与同一饮片相同炮制方法对比,不同炮制方式使得相似度有所变化,可以为本实验建立的黄芪不同炮制方法提供参考。

表 1 四种黄芪炮制品指纹图谱相似度

Table 1 Similarity of fingerprints of four kinds of Astragali Radix processed products

样品 Sample	相似度 Similarity		样品 Sample	相似度 Similarity	
	10 批 10 batches	40 批 40 batches		10 批 10 batches	40 批 40 batches
MF1	0.993	0.931	Z1	0.984	0.908
MF2	0.975	0.936	Z2	0.991	0.951
MF3	0.987	0.934	Z3	0.983	0.952
MF4	0.990	0.862	Z4	0.994	0.936
MF5	0.987	0.947	Z5	0.981	0.952
MF6	0.993	0.956	Z6	0.976	0.935
MF7	0.975	0.858	Z7	0.994	0.870
MF8	0.987	0.868	Z8	0.994	0.886
MF9	0.990	0.855	Z9	0.985	0.887
MF10	0.987	0.851	Z10	0.990	0.872
Y1	0.978	0.907	J1	0.984	0.942
Y2	0.962	0.912	J2	0.981	0.918
Y3	0.994	0.926	J3	0.966	0.900
Y4	0.995	0.933	J4	0.987	0.955
Y5	0.996	0.946	J5	0.991	0.950
Y6	0.995	0.950	J6	0.987	0.938
Y7	0.993	0.950	J7	0.926	0.877
Y8	0.983	0.832	J8	0.987	0.839
Y9	0.994	0.862	J9	0.984	0.868
Y10	0.970	0.900	J10	0.991	0.714

## 2.6 聚类分析(HCA)

以 40 批不同黄芪炮制品 20 个共有峰峰面积为变量,运用 SPSS25.0 统计软件,采用组间联接法及皮尔逊相关性作为分类依据行 HCA,聚类分析结果显示,不同黄芪炮制品可分为 3 类,当分类距离为 10

时,蜜麸黄芪、蜜炙黄芪各自聚为一类,酒黄芪和盐黄芪聚为一类;当分类距离为 15 时,40 批样品被聚为两类,蜜麸黄芪和蜜炙黄芪聚为一类,酒黄芪和盐黄芪聚为一类(见图 3)。

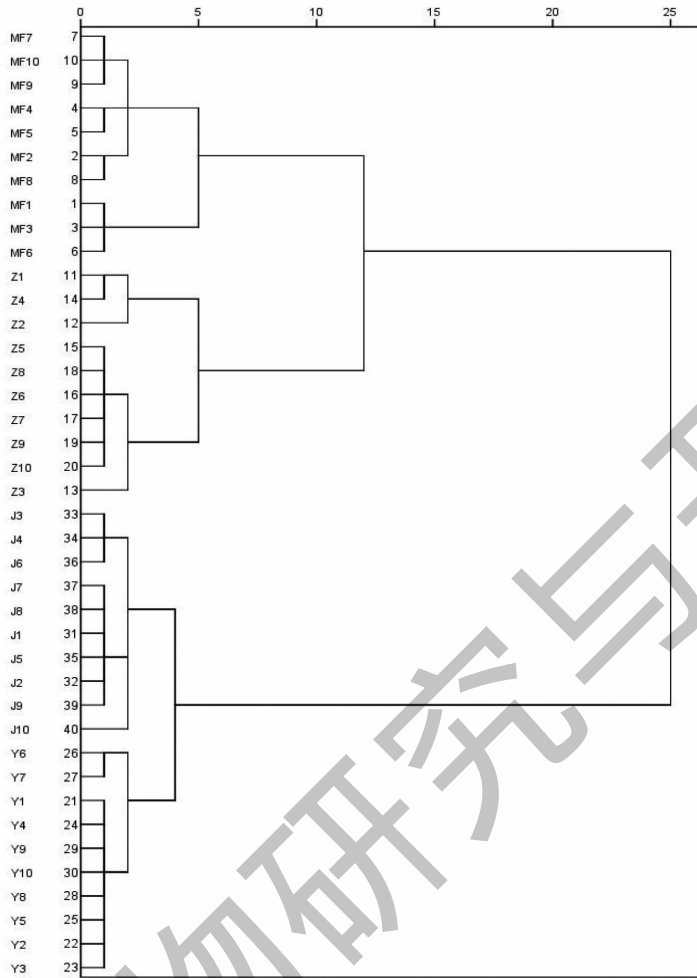


图3 四种黄芪炮制品的聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis dendrogram of four kinds of Astragali Radix processed products

## 2.7 主成分分析(PCA)

将4类黄芪炮制品的20个共有峰的相对峰面

积导入SIMCA14.1软件进行无监督模式的PCA分析,观察样品间自然聚集,结果见图4。根据PCA得

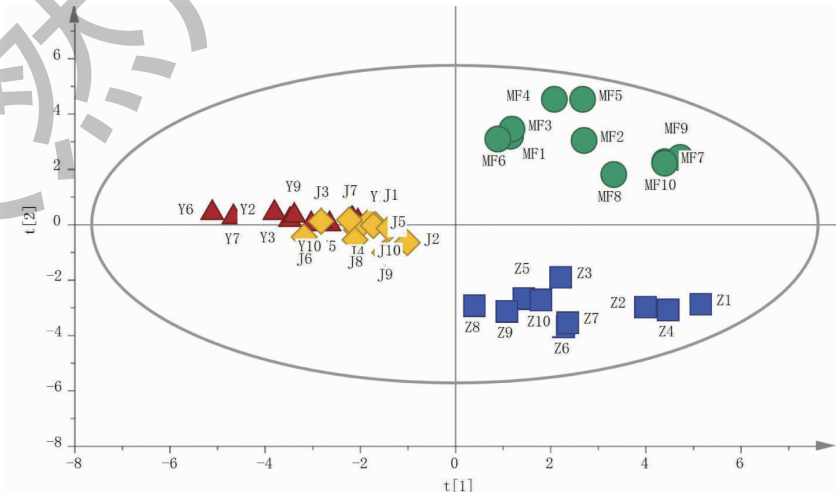


图4 四种黄芪炮制品PCA得分图

Fig. 4 PCA score plot of four kinds of Astragali Radix processed products

分图,40批黄芪炮制品各自聚集,可分为3类,说明黄芪的不同炮制方法对成分的影响显著不同;蜜麸黄芪、蜜炙黄芪各自聚为一类,酒黄芪和盐黄芪相距较近可聚为一类,该结果与聚类分析的结果一致。

## 2.8 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

为了进一步分析不同黄芪炮制品之间的差异性,在PCA的基础上,将4类黄芪炮制品20个共有峰的相对峰面积导入SIMCA14.1软件进行OPLS-

DA,建立的模型参数 $R^2X$ 为0.945, $R^2Y$ 为0.914, $Q^2$ 为0.863均大于0.500,表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。样本得分矩阵见图5。由OPLS-DA得分图可知,四类黄芪炮制品聚类效果较好,蜜麸黄芪、蜜炙黄芪各自聚为一类,酒黄芪和盐黄芪相距较近聚为一类,分为明显的3类,与聚类分析和PCA分析结果一致。

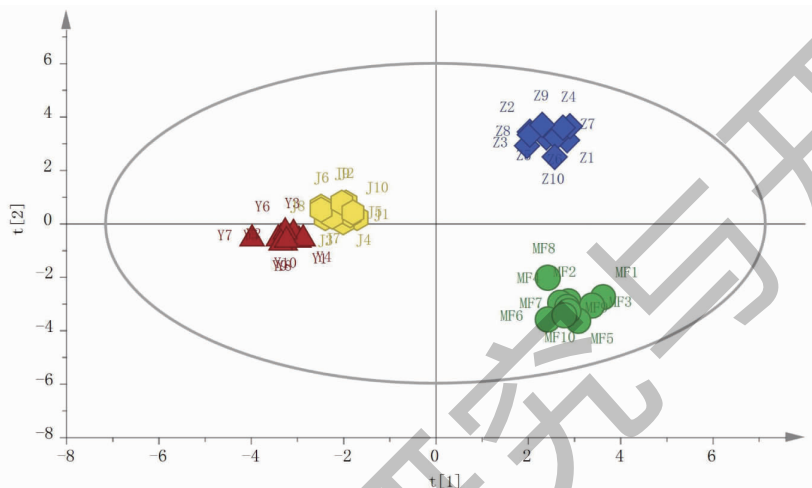


图5 四种黄芪炮制品 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot of four kinds of Astragali Radix processed products

根据变量重要性投影(VIP)值大于1的原则,筛选差异组分(见图6)。结果共找到了9个成分,VIP值大小排序依次为峰7(毛蕊异黄酮苷)>峰1>峰6>峰14>峰13(芒柄花苷)>峰2(5-羟甲基糠醛)>峰4>峰5>峰3,其中毛蕊异黄酮苷、芒柄

花苷、5-羟甲基糠醛的VIP值分别为1.30、1.12、1.10,因此提示毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、5-羟甲基糠醛可能是引起黄芪不同炮制品成分差异的主要标志性成分。

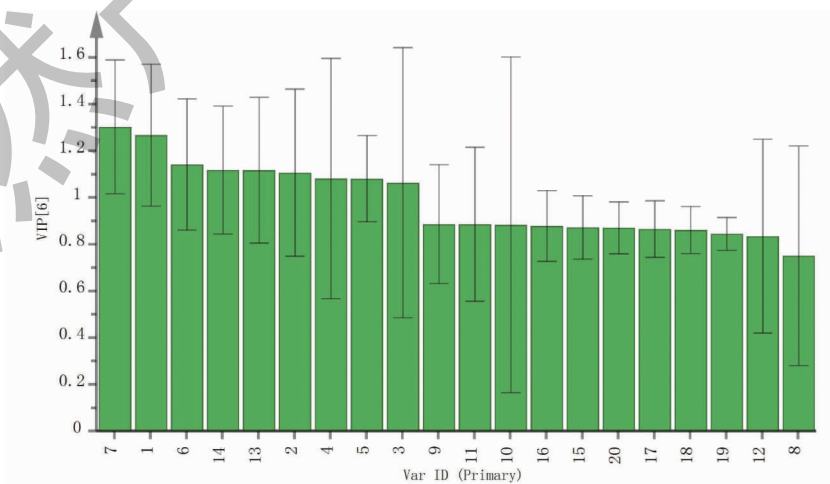


图6 四种黄芪炮制品 OPLS-DA 的VIP图

Fig. 6 VIP diagram of OPLS-DA of four kinds of Astragali Radix processed products

## 2.9 多成分含量测定

- 2.9.1 对照品溶液的制备  
制备方法同“2.2”项下。
- 2.9.2 供试品溶液的制备  
制备方法同“2.2”项下。
- 2.9.3 色谱条件  
同“2.3”项下。

### 2.9.4 线性关系考察

分别吸取“2.2.2”项下各对照品溶液适量,按倍数用甲醇稀释6次,得系列对照品溶液,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.3”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲线,进行线性回归,得到6种成分的回归方程及线性范围见表2。

表2 回归方程和线性范围  
Table 2 Regression equation and linear range

指标成分 Index component	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient( $r$ )	线性范围 Linear range(μg/mL)
5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	$Y = 136\ 460X - 9\ 021$	0.999 6	0.252 ~ 1.515
毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-glucoside	$Y = 26\ 673X - 33\ 979$	0.999 8	3.838 ~ 23.030
芒柄花苷 Ononin	$Y = 22\ 187X - 18\ 432$	0.999 8	2.500 ~ 15.000
美迪紫檀苷 9- <i>O</i> -Methylisissolin 3- <i>O</i> -glucoside	$Y = 11\ 796X - 7\ 787$	0.999 5	1.717 ~ 10.303
毛蕊异黄酮 Calycosin	$Y = 30\ 756X - 28\ 077$	0.999 6	2.626 ~ 15.757
芒柄花素 Formononetin	$Y = 36\ 086X - 28\ 248$	0.999 6	2.146 ~ 12.878

### 2.9.5 精密度试验

取“2.2.2”项下各对照品溶液适量,按“2.3”项下条件连续进样6次,记录各成分峰面积,结果5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的RSD分别为0.34%、0.28%、0.41%、0.55%、0.38%、0.62% ( $n=6$ ),结果表明仪器精密度良好。

### 2.9.6 稳定性试验

取按“2.2.1”项下制备蜜麸黄芪(MF1)供试品溶液,室温条件下放置0、2、4、8、16、24 h,按“2.3”项下进样分析,记录色谱图。结果5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的RSD分别为1.8%、2.1%、2.7%、0.88%、1.3%、0.63% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.9.7 重复性试验

取蜜麸黄芪(MF1),平行6份,按照“2.2.1”项下制备供试品溶液,按“2.3”项下进样分析,记录各成分峰面积,结果5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量平均值分别为0.03、0.16、0.05、0.06、0.11、0.08 mg/g, RSD 分别为 1.3%、2.2%、2.4%、1.7%、1.2%、1.8% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

### 2.9.8 加样回收率试验

取已知含量的黄芪炮制品粉末(编号MF1),分

别精密加入与样品中待测成分已知含量相当的0.5、1.0、1.5倍混合对照品溶液,每个梯度平行3份,按“2.2.1”项下制备供试品溶液,按“2.3”项下进样测定,记录5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素峰面积,并计算平均加样回收率分别为102.1%、100.9%、101.5%、101.5%、101.5%、100.5%, RSD 分别为0.77%、1.7%、0.99%、2.1%、2.0%、1.6%。

### 2.9.9 样品含量测定

取蜜麸黄芪、蜜炙黄芪、盐黄芪、酒黄芪各10批样品,按照“2.2.1”项下的方法制备成供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定,计算各成分含量,结果见表3。

### 2.9.10 指标成分含量分析

将4种黄芪炮制品各10批的6个成分含量测定结果导入SPSS25.0进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异; $P < 0.01$ 表示有显著统计学差异,各成分含量测定结果平均值和显著性见表4。

## 3 讨论与结论

中药经过一定的炮制后方可入药,包括修制、水制、火制、水火共制等,是中医用药的特点之一。不同的炮制工艺可能引起物质基础改变,进而引起药效差异。因此,通过炮制对药物原有的性能予以改变取舍,以适应中医辨证施治、灵活用药的要



表 3 样品含量测定结果 ( $n=3$ )  
Table 3 Sample content determination results ( $n=3$ )

样品 Sample	含量 Content (mg/g)					
	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-glucoside	芒柄花苷 Ononin	美迪紫檀苷 9-O-Methylinissolin 3-O-glucoside	毛蕊异黄酮 Calycosin	芒柄花素 Formononetin
MF1	0.043 7	0.155 7	0.050 5	0.051 5	0.094 4	0.075 8
MF2	0.032 3	0.168 4	0.053 2	0.054 0	0.097 1	0.074 6
MF3	0.033 0	0.149 5	0.060 6	0.062 0	0.088 4	0.069 5
MF4	0.025 8	0.277 7	0.073 8	0.056 4	0.127 6	0.129 5
MF5	0.050 7	0.201 3	0.071 0	0.060 0	0.122 8	0.093 2
MF6	0.031 8	0.179 1	0.063 7	0.063 1	0.111 7	0.083 7
MF7	0.024 1	0.148 3	0.063 6	0.052 1	0.097 3	0.072 2
MF8	0.021 9	0.129 5	0.066 8	0.050 0	0.095 8	0.071 1
MF9	0.024 3	0.157 2	0.053 5	0.052 0	0.097 7	0.071 4
MF10	0.024 2	0.136 4	0.066 0	0.060 4	0.096 5	0.071 2
Z1	0.045 7	0.177 9	0.067 4	0.041 5	0.085 4	0.067 2
Z2	0.027 3	0.199 3	0.063 5	0.036 9	0.078 6	0.060 3
Z3	0.030 5	0.194 1	0.056 2	0.046 3	0.098 6	0.080 3
Z4	0.033 8	0.190 2	0.079 7	0.032 7	0.074 5	0.062 2
Z5	0.042 6	0.204 3	0.071 3	0.053 5	0.089 4	0.091 5
Z6	0.043 9	0.184 3	0.071 5	0.048 2	0.102 0	0.078 8
Z7	0.045 0	0.218 2	0.065 6	0.052 0	0.097 3	0.074 0
Z8	0.034 6	0.191 1	0.070 2	0.046 9	0.109 0	0.083 8
Z9	0.028 8	0.196 6	0.072 9	0.051 6	0.099 1	0.078 6
Z10	0.045 0	0.210 7	0.072 7	0.050 7	0.104 3	0.083 6
Y1	0.005 7	0.215 7	0.053 7	0.043 4	0.096 1	0.078 0
Y2	0.005 3	0.196 5	0.061 5	0.050 1	0.104 3	0.080 7
Y3	0.004 8	0.198 1	0.072 0	0.046 5	0.098 9	0.080 8
Y4	0.005 0	0.185 9	0.053 2	0.044 8	0.098 8	0.078 6
Y5	0.004 4	0.175 4	0.058 1	0.046 9	0.103 4	0.078 9
Y6	0.005 8	0.174 3	0.066 8	0.051 5	0.110 5	0.086 0
Y7	0.007 1	0.174 4	0.063 6	0.047 6	0.105 5	0.082 8
Y8	0.005 8	0.168 0	0.063 0	0.047 4	0.097 4	0.073 4
Y9	0.006 4	0.214 4	0.079 4	0.057 1	0.116 9	0.086 1
Y10	0.006 2	0.208 1	0.073 7	0.055 2	0.110 4	0.081 7
J1	0.004 5	0.273 5	0.064 3	0.043 7	0.110 0	0.069 0
J2	0.005 9	0.158 3	0.075 9	0.041 0	0.086 6	0.064 5
J3	0.006 2	0.124 4	0.047 7	0.043 4	0.096 9	0.073 3
J4	0.007 5	0.178 6	0.050 5	0.044 9	0.112 3	0.077 9
J5	0.005 9	0.142 7	0.060 7	0.042 2	0.088 9	0.067 4
J6	0.007 1	0.162 9	0.050 2	0.048 2	0.098 8	0.076 9
J7	0.007 3	0.202 4	0.072 6	0.051 8	0.147 3	0.098 7
J8	0.006 4	0.151 9	0.051 1	0.047 9	0.099 9	0.072 7
J9	0.004 6	0.152 1	0.054 0	0.050 1	0.095 0	0.071 1
J10	0.006 3	0.195 3	0.063 8	0.053 7	0.108 8	0.079 3

表4 四种黄芪炮制品含量平均值及显著性( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 4 Average value and significance of content of four kinds of Astragali Radix processed products( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

样品 Sample	含量 Content(mg/g)					
	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxyme- thylfurfural	毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7- glucoside	芒柄花苷 Ononin	美迪紫檀苷 9-O-Methylisssolin 3-O-glucoside	毛蕊异黄酮 Calycosin	芒柄花素 Formononetin
蜜麸黄芪 Honey bran-processed Astragali Radix	0.031 2 ± 0.009 4 <sup>#§\$&amp;&amp;</sup>	0.170 3 ± 0.043 1	0.062 3 ± 0.007 8	0.056 1 ± 0.004 9 <sup>##§\$&amp;&amp;</sup>	0.102 9 ± 0.013 1	0.081 2 ± 0.018 5
蜜炙黄芪 Honey-processed Astragali Radix	0.037 7 ± 0.007 4 <sup>*§\$&amp;&amp;</sup>	0.196 7 ± 0.012 1	0.069 1 ± 0.006 4 <sup>&amp;</sup>	0.046 0 ± 0.006 9 <sup>**</sup>	0.093 8 ± 0.011 4	0.076 0 ± 0.010 0
盐黄芪 Salt-processed Astragali Radix	0.005 6 ± 0.000 8 <sup>**###</sup>	0.191 1 ± 0.017 9	0.064 5 ± 0.008 6	0.049 0 ± 0.004 4 <sup>**</sup>	0.104 2 ± 0.006 7	0.080 7 ± 0.003 8
酒黄芪 Wine-processed Astragali Radix	0.006 2 ± 0.001 0 <sup>**###</sup>	0.174 2 ± 0.042 1	0.059 1 ± 0.009 9 <sup>*#</sup>	0.046 7 ± 0.004 3 <sup>**</sup>	0.104 4 ± 0.017 3	0.075 1 ± 0.009 5

注:与蜜麸黄芪相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与蜜炙黄芪相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与盐黄芪相比, § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.01$ ;与酒黄芪相比, & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ 。

Note: Compared with honey bran-processed Astragali Radix, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with honey-processed Astragali Radix, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; Compared with salt-processed Astragali Radix, § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.01$ ; Compared with wine-processed Astragali Radix, & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ .

求<sup>[16,17]</sup>。

实验结果表明聚类分析与主成分分析结果一致,4种黄芪炮制品主要分为三类,蜜麸炒黄芪、蜜炙黄芪各自为一类,盐黄芪、酒黄芪相聚较近聚为一类。通过对指标成分含量分析发现,不同的黄芪炮制品中5-羟甲基糠醛、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、美迪紫檀苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量存在差异,推测其含量变化可能与炮制过程中的火候、时间、加入的辅料等因素有关。有研究表明经炮制、贮藏及复方配伍过程均会产生5-羟甲基糠醛或使其含量增加<sup>[18]</sup>。这与课题组前期对比黄芪生品和蜜麸黄芪含量变化研究结果5-羟甲基糠醛是炮制后新增成分基本一致。中药经加工处理、辅料炮制等手段后某些化学成分将发生量与质的改变<sup>[19]</sup>。本实验对黄芪4种炮制品进行质量分析发现四种炮制品中都新增加了5-羟甲基糠醛,且相较于蜜麸黄芪和蜜炙黄芪,在盐黄芪和酒黄芪中5-羟甲基糠醛的含量有所降低,其可能与黄芪炮制过程中发生的化学反应息息相关,既在炮制过程中用盐水、酒水焖润后,加热炮制使得其内在成分之间发生复杂的化学反应导致。与蜜炙、盐或酒制相比,黄芪蜜麸炒后美迪紫檀苷含量增加,推测含量变化可能与黄酮苷在加入的辅料及受热不稳定的作用下脱掉糖基发生转化有关,蜜麸炒后使得黄芪中黄酮类成分含量增加,酒制、盐制则会降低黄酮含量。传统的蜜炙法也对黄酮类成分的溶出产生影响,可能是因为黄芪蜜炙后黏性较大,浸润药材表面,不易粉碎,溶出率受

限制等原因。

综上,黄芪经过不同炮制方式后其化学成分含量发生变化,而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黄芪炮制品药效改变的活性物质。此外,通过对比黄芪不同炮制品的指纹图谱显示,21号峰为蜜麸黄芪、酒黄芪共有峰,22号峰为蜜炙黄芪独有峰。笔者推测这些不同炮制品中特有的峰可能影响药效的物质基础。但现阶段课题组仅采用HPLC建立了黄芪四种炮制品的指纹图谱进行分析,后续需采用UPLC、LC-MS及GC-MS等分析方法对各炮制品中的新增峰进一步分析讨论,还可从外观、性状、鉴别等方面对其进行质量评价,更深层次的探究化学成分的变化及不同炮制品间的质量差异性。

本实验建立黄芪不同炮制品的指纹图谱与含量测定相结合的方法,经方法学考察建立的方法有效准确。并结合多元统计法对6个成分含量进行定量分析,为黄芪的炮制研究提供参考,同时也为其他中药的不同炮制品质量评价提供新的思路。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- 2 Yang L, Han X, Yuan J, et al. Early astragaloside IV administration attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by suppressing the maturation and function of

- dendritic cell[J]. *Life Sci*,2020,249:117448.
- 3 Tao Y,Huang X,Wang J,et al. Exploring Molecular mechanism of Huangqi in treating heart failure using network pharmacology[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2020,2020:6473745.
  - 4 Xu LL,Yuan JL. Investigation of processing *Astragalus membranaceus* in historical evolution and modern research thinking[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊),2011,29:2071-2073.
  - 5 Shao CX,Lin HH,Jin XJ,et al. Historical evolution and modern research progress of Astragali Radix processing[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2023,54:5057-5074.
  - 6 Wu HW,Li DH,Yang XR,et al. New progress in the study of chemical composition changes of *Astragalus membranaceus* before and after different processing methods[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药),2021,32(10):2488-2490.
  - 7 Zhao TT,Pei K,Yu ZH,et al. Research on differences between saccharides ingredients and other chemical components of Astragali Radix and honey-processed Astragali Radix[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2023,54:1586-1596.
  - 8 Yang ZC,Zhang FM,Sun CH,et al. Based on chemical compositions,the differences in material basis between *Astragalus mongolicus* and *Astragalus membranaceus* and their honey-burning products were explored[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药),2021,32:2681-2684.
  - 9 Wu L,Shu QL,Liu YQ,et al. Comparative study of *Astragalus* polysaccharides and honey-processed *Astragalus* polysaccharides on composition and diversity of gut microbiota in rats[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),2021,37:40-47.
  - 10 Yao J,Yang XN,Zhu P,et al. Quality evaluation of Astragali Radix from different producing areas by HPLC-CAD fingerprints combined with chemometrics[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2022,44:3214-3219.
  - 11 Wang QX,Guo S,Li HW,et al. Study on establishment of UPLC fingerprints and chemical pattern recognition of the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao from different regions[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2023,54:4312-4320.
  - 12 Tang SW,Li XL,Ma L,et al. Research on chemical composition of Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction based on HPLC fingerprint and LC-Q-TOF/MS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2023,54:711-721.
  - 13 Sang Q,Jia Q,Zhang H,et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2021,194:113771.
  - 14 Liao J,Wu Y,Xu F,et al. Comprehensive evaluation of NAODESHENG by combining UPLC quantitative fingerprint and antioxidant activity[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2021,193:113636.
  - 15 Zhang SJ,Zhang YG,Li DH,et al. Quality control of Astragali Radix stir-frying with honey based on fingerprint and multi-index quantitative determination[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2021,52:3081-3088.
  - 16 Zhuang WD,Zhong C,Chen HY,et al. Effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides concocted by different methods on oxidative stress and femoral tissue morphology in osteoporotic male mice[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2022,53:5409-5416.
  - 17 Song XW,Li Q,Ye J,et al. Comparison of flavonoids in different processed products of *Astragalus membranaceus*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2013,19:85-88.
  - 18 Wang M,Wang YX,Wu YR,et al. Research progress on content changes of 5-hydroxymethyl furfural during processing of Chinese medicine and it's pharmacological effects[J]. *Drug Eval Res*(药物评价研究),2020,432319-2327.
  - 19 Chen G,Li H,Wang YD,et al. Advance on the effect of processing on the chemical components of *Gastrodia elata*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2023,35:539-549.