

基于多成分含量测定的红芪搓条与未搓条样品比较研究

罗旭东¹,李昕蓉¹,李成义^{1*},
齐鹏¹,梁婷婷¹,冯晓莉^{1,2},贾妙婷¹,王燕¹

¹甘肃中医药大学;²敦煌医学与转化教育部重点实验室,兰州 730000

摘要:建立搓条和未搓条红芪样品 HPLC 指纹图谱,结合多成分定量,比较搓条和未搓条样品的差异。采用 Angilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,建立 14 批搓条和未搓条样品指纹图谱,通过相似度评价和化学计量学分析,研究不同红芪样品的差异性,测定毛蕊异黄酮、芒柄花素、总多糖、总黄酮等成分的含量。结果显示,搓条和未搓条样品均标定 25 个共有峰,指认了其中 7 个成分,分别为腺苷、香草酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素。聚类分析、主成分分析均能很好地区分搓条和未搓条样品,正交偏最小二乘-判别分析共找到 12 个差异性标志物,差异显著性排序分别为峰 25 > 峰 23 > 峰 14 > 芒柄花素 > 毛蕊异黄酮苷 > 毛蕊异黄酮 > 峰 18 > 峰 19 > 峰 15 > 芒柄花苷 > 峰 4 > 香草酸。含量测定结果显示,红芪搓条样品中毛蕊异黄酮、芒柄花素、浸出物、总多糖含量明显高于未搓条样品,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、香草酸、总黄酮含量明显低于未搓条样品。该研究为红芪质量和搓条加工提供数据参考。

关键词:红芪;搓条;未搓条;指纹图谱;化学计量学;芒柄花素

中图分类号:R282.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)7-1215-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.7.014

Comparative study on rubbed and unrubbed Hedysari Radix based on multi-component determination

LUO Xu-dong¹,LI Xin-rong¹,LI Cheng-yi^{1*},
QI Peng¹,LIANG Ting-ting¹,FENG Xiao-li^{1,2},JIA Miao-ting¹,WANG Yan¹

¹Gansu University of Chinese Medicine;²Key Laboratory of Dunhuang Medicine,Ministry of Education Gansu,Lanzhou 730000,China

Abstract:To establish the HPLC fingerprints of rubbed and unrubbed Hedysari Radix samples, the differences between rubbed and unrubbed samples were compared with multi-component quantification. The chromatographic column was Angilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm). The flow rate was 1.0 mL/min, and the mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution). The column temperature was 30 °C. The fingerprints of 14 batches of rubbed and unrubbed samples were established, through similarity evaluation and chemometric analysis, and the difference between rubbed and unrubbed samples was studied subsequently. The contents of components such as calycosin, formononetin, total polysaccharides, and total flavonoids were determined. The results showed that there were 25 common peaks in the fingerprint of rubbed and unrubbed samples. Seven components were identified as adenosine, vanillic acid, calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, medicarpin. Both hierarchical clustering analysis and principal component analysis can be distinguished between rubbed and unrubbed samples. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis found twelve components of difference, and the order of significance of difference was peak 25 > peak 23 > peak 14 > formononetin > calycosin-7-glucoside > calycosin > peak 18 > peak 19 > peak 15 > ononin > peak 4 > vanillic acid. The results of content determination showed that the content of calycosin, formononetin, total polysaccharide, and extract in rubbed samples was significantly higher than in the unrubbed ones. In contrast, the contents of calycosin-7-glucoside, ononin, vanillic acid, and total flavonoids

收稿日期:2023-10-30 接受日期:2024-02-29

基金项目:国家自然科学基金地区基金(82160730);甘肃省重点研发计划(21YF5FA133);“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05);敦煌医学与转化教育部重点实验室项目(DHYX20-12)

*通信作者 Tel:86-931-5161159;E-mail:gslichengyi@163.com

in rubbed samples were significantly lower than in the unrubbed ones. The study can provide data reference for quality and rubbing processing of *Hedysari Radix*.

Key words: *Hedysari Radix*; rubbed; unrubbed; fingerprint; chemometrics; formononetin

红芪是豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根。甘肃为红芪道地产区, 主要分布于武都、宕昌、礼县、岷县等地区, 其产量约占全国的 95% 以上^[1], 尤以武都安化“米仓红芪”品质最佳。红芪具有补气升阳, 固表止汗, 利水消肿, 生津养血, 行滞通痹的功效^[2]。主要含有黄酮、多糖、皂苷、氨基酸等化学成分, 具有调节机体免疫功能、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[3-6]。

中药材产地加工是影响中药安全性和有效性的源头工序^[7], 特殊的加工工艺对保证药材的优良品质起到决定性作用^[8]。搓条加工作为红芪产地加工技术体系中的关键步骤, 也是红芪品质及商品形成的关键环节。研究表明, 传统加工过程诱导新代谢物产生、次生代谢物的相互转化及其含量的消长变化等抗脱水机制^[9-11]。课题组前期研究发现, 红芪搓条后根条变软, 增加内部水分向外扩散速率, 加快药材干燥, 改善药材性状, 使其皮紧实细腻, 全身较直, 质地坚硬, 质密。红芪搓条与未搓条样品在性状特征、一级纹理及皮孔、淀粉粒、木栓细胞等方面存在一定的差异^[12, 13]。红芪搓条加工及搓条前后的主要代谢成分差异研究具有一定的意义。

基于此, 本研究以红芪搓条和未搓条样品为研究对象, 采用 HPLC 指纹图谱、化学计量学及多成分含量测定对红芪化学成分进行定量及差异性分析, 整体探究红芪搓条前后化学成分的变化规律, 为红芪产地搓条加工提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DAD 高效液相色谱仪 (1260 型, 美国安捷伦科技有限公司); 紫外-可见分光光度计 (UV-2401-PC 型, 日本岛津公司); 十万分之一电子分析天平 (BT25S 型, 北京赛多利斯仪器有限公司); 万分之一电子分析天平 (BT124S 型, 北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

腺苷 (批号: N24D11W135689202013, 纯度 $\geq 98.0\%$)、毛蕊异黄酮苷 (批号: R31A10F96530, 纯度 $\geq 98.0\%$)、毛蕊异黄酮 (批号: Y24N9Y75652, 纯度 $\geq 98.0\%$)、芒柄花苷 (批号: P03A10F84910, 纯度 \geq

98.0%)、芒柄花素 (批号: H06S9Z69494, 纯度 $\geq 98.0\%$)、美迪紫檀素 (批号: Y12M11H112983, 纯度 $\geq 98.0\%$)、香草酸 (批号: H11J9Z65318, 纯度 $\geq 98.0\%$) (上海源叶生物科技有限公司); *D*-无水葡萄糖 (批号: 110833-201707, 纯度 $\geq 99.0\%$, 中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈、甲酸 (色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 红芪样品

采集新鲜红芪 (陇南市武都区: 33°27'44.92" N, 105°4'18.44" E, 海拔 1 876.00 m), 经甘肃中医药大学李成义教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的根, 分为搓条组 (编号 CT1 ~ CT14) 与未搓条组 (编号 WCT1 ~ WCT14) (CT 代表搓条; WCT 代表未搓条), 未搓条组晾晒至干, 搓条组按照课题组前期优化搓条工艺 (红芪自然晾晒至药材水分为 52% ~ 59% 进行搓条, 搓条时间 6 min, 搓条 2 次) 搓条加工, 晾晒, 粉碎, 过四号筛, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长: 腺苷、香草酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 (254 nm), 美迪紫檀素 (280 nm)。流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 5% → 6% B; 6 ~ 14 min, 6% → 20% B; 14 ~ 27 min, 20% → 25% B; 27 ~ 35 min, 25% → 33% B; 35 ~ 45 min, 33% → 50% B; 45 ~ 60 min, 50% → 60% B; 60 ~ 61 min, 60% → 5% B), 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取腺苷、香草酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每 1 mL 含腺苷 0.50 mg、香草酸 0.35 mg、毛蕊异黄酮苷 0.27 mg、芒柄花苷 2.15 mg、毛蕊异黄酮 0.40 mg、芒柄花素 2.98 mg、美迪紫檀素 2.60 mg 的对照品储备液。取 1 mL 至 10 mL 容量瓶, 制成每 1 mL 含腺苷 50.00 μg、香草酸 35.00 μg、毛蕊异黄酮苷 27.00 μg、芒柄花苷 215 μg、毛蕊异黄酮 40.00 μg、芒柄花素 298 μg、美迪紫

檀素 260.00 μg 的混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取搓条与未搓条样品粉末 3.0 g,置于锥形瓶(150 mL)中,加入 30 mL 甲醇,水浴(80 $^{\circ}\text{C}$)回流提取 1 h,放置室温,过滤,滤液浓缩定容于 10 mL 容量瓶,0.22 μm 滤膜过滤,备用。

2.4 化学指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验

取同一供试品(CT-3)溶液,在“2.1”项色谱条件下重复进样 6 次,以芒柄花素的为参照峰计算各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.060% ~ 0.80%,相对峰面积的 RSD 值为 0.73% ~ 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批药材(CT-3)6 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,以芒柄花素的为参照峰计算各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.10% ~ 2.3%,相对峰面积的 RSD 值为 0.75% ~ 2.7%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一供试品(CT-3)溶液,按“2.1”项色谱条件,分别在溶液制备后 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 进行色谱分析,以芒柄花素的为参照峰计算各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.070% ~ 0.53%,相对峰面积的 RSD 值为 0.65% ~ 3.0%,样品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度评价

按“2.3”项下方法分别制备 14 批搓条和未搓条样品的供试品溶液,“2.1”项下方法进行色谱分析,分别将 14 批样品图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版),以 CT3、WCT3 样品的图谱为参照图谱,进行共有峰的匹配和多点校正。搓条和未搓条样品均标定了 25 个共有峰。通过与对照品比对,指认出其中 7 个色谱峰,腺苷(1 号峰)、香草酸(10 号峰)、毛蕊异黄酮苷(13 号峰)、芒柄花苷(16 号峰)、毛蕊异黄酮(17 号峰)、芒柄花素(20 号峰)、美迪紫檀素(24 号峰),红芪搓条和未搓条样品指纹图谱见图 1~2,对照指纹图谱见图 3。

将搓条和未搓条样品图谱与对照图谱进行相似度评价,由相似度评价结果可知各批搓条及未搓条样品的相似度良好,均大于 0.900(见表 1),所建立的指纹图谱方法可用于红芪药材的整体质量控制。

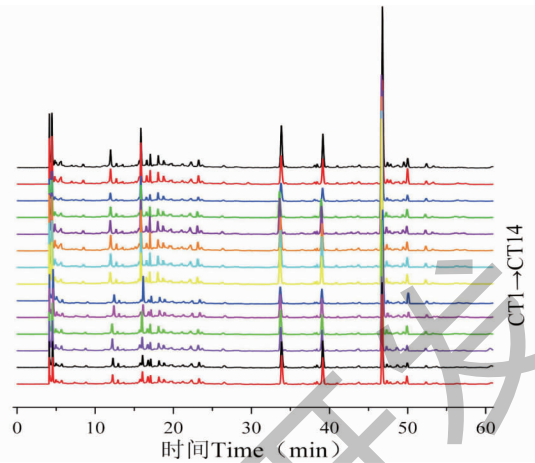


图 1 14 批搓条样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 HPLC overlay fingerprint of 14 batches of rubbed samples

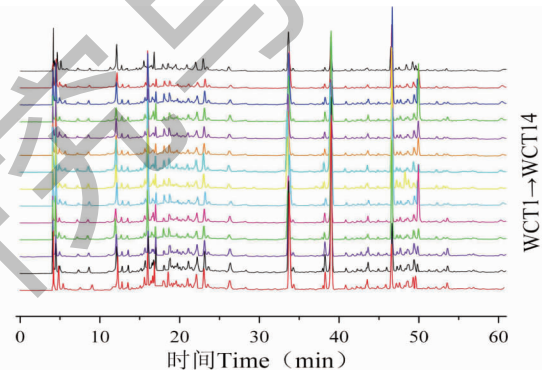


图 2 14 批未搓条样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC overlay fingerprint of 14 batches of unrubbed samples

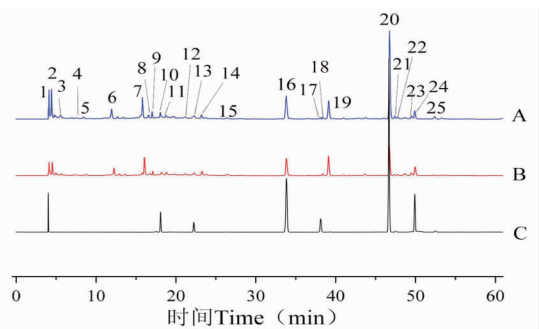


图 3 搓条样品(A)和未搓条样品(B)对照指纹图谱与混合对照品(C) HPLC 图

Fig. 3 Reference fingerprints of rubbed samples of Hedysari Radix(A) and unrubbed samples of Hedysari Radix (B) and HPLC chromatogram of mixed standards(C)

注:1-腺苷;10-香草酸;13-毛蕊异黄酮苷;16-芒柄花苷;17-毛蕊异黄酮;20-芒柄花素;24-美迪紫檀素。Note: 1-Adenosine; 10-Vanillic acid; 13-Calycosin-7-glucoside; 16-Ononin; 17-Calycosin; 20-Formononetin; 24-Medicarpin.

表 1 搓条与未搓条样品指纹图谱相似度评价

Table 1 Similarity of 14 batches of rubbed and unrubbed samples

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
CT1	0.992	WCT1	0.968
CT2	0.971	WCT2	0.969
CT3	0.986	WCT3	0.982
CT4	0.952	WCT4	0.901
CT5	0.963	WCT5	0.903
CT6	0.993	WCT6	0.91
CT7	0.991	WCT7	0.983
CT8	0.962	WCT8	0.977
CT9	0.963	WCT9	0.944
CT10	0.992	WCT10	0.975
CT11	0.976	WCT11	0.93
CT12	0.954	WCT12	0.936
CT13	0.964	WCT13	0.969
CT14	0.952	WCT14	0.977

2.4.5 聚类分析

为比较搓条和未搓条样品之间的差异,以测得的 25 个共有成分的峰面积为变量,导入 Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 以 Ward 联接法结合平方欧式距离进行聚类热图分析。结果见图 4。由聚类分析 (hierarchical clustering analysis,

HCA) 结果可知,搓条和未搓条样品聚为两类,CT1 ~ CT14 号搓条样品聚为一类,WCT1 ~ WCT14 号未搓条样品聚为一类。提示搓条和未搓条样品化学成分有差异,红芪药材化学成分与其搓条加工因素有关。

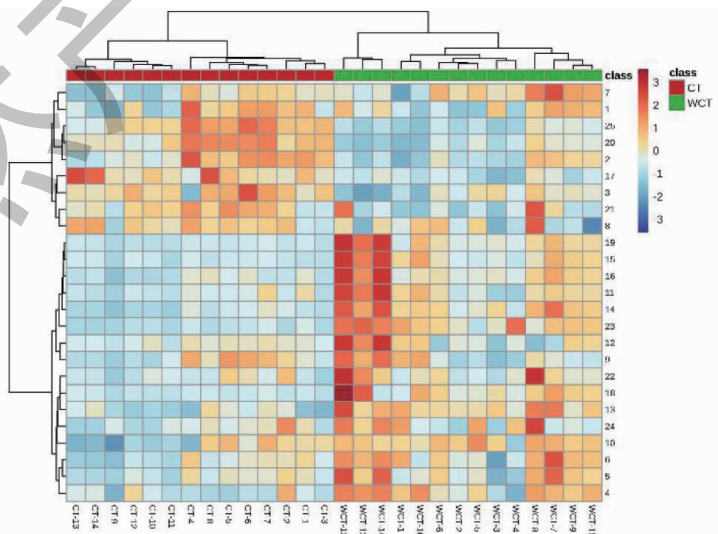


图 4 搓条与未搓条样品聚类分析

Fig. 4 Cluster heat map analysis of rubbed and unrubbed samples

2.4.6 主成分分析与正交偏最小二乘-判别分析

为了进一步比较红芪搓条和未搓条样品之间的差异,以测得的25个共有成分的峰面积为变量,导入Metaboanalyst进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis,

OPLS-DA),获得相应的模型(见图5、6)。PCA结果表明,前3个主成分累积贡献率超过75%,故选择其进行区分;搓条和未搓条样品各自聚为一类,与HCA结果相互佐证,说明搓条加工处理对红芪化学成分的总体特征构成了明显影响。

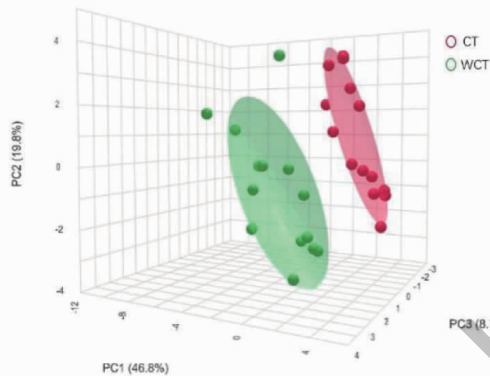


图5 搓条与未搓条样品 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score diagram of rubbed and unrubbed samples

OPLS-DA 结果表明,累积解释能力参数(R^2X)为0.746,累积解释能力参数(R^2Y)为0.937,模型预测能力参数(Q^2)为0.862,均大于0.5,表明所建模型稳定可靠、预测能力较强,可用于区别红芪搓条与未搓条样品。由OPLS-DA得分图可知,红芪搓条与未搓条样品明显分为2类,与HCA、PCA结果一致,说明红芪搓条前后化学成分存在差异。

取OPLS-DA模型中变量重要性投影(VIP)图(见图7)。以VIP值>1.0为标准筛选差异化合物,共得到12个差异性成分,影响显著性排序顺序为峰25>峰23>峰14>芒柄花素>毛蕊异黄酮苷>毛蕊异黄酮>峰18>峰19>峰15>芒柄花苷>峰4>香草酸。部分差异成分未做指认,课题组后续将会继续深入研究,以期评价红芪药材质量提

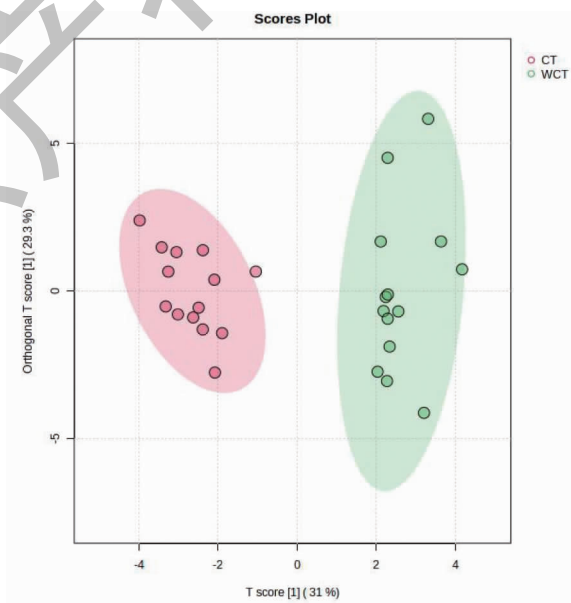


图6 搓条与未搓条样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA scores of rubbed and unrubbed samples

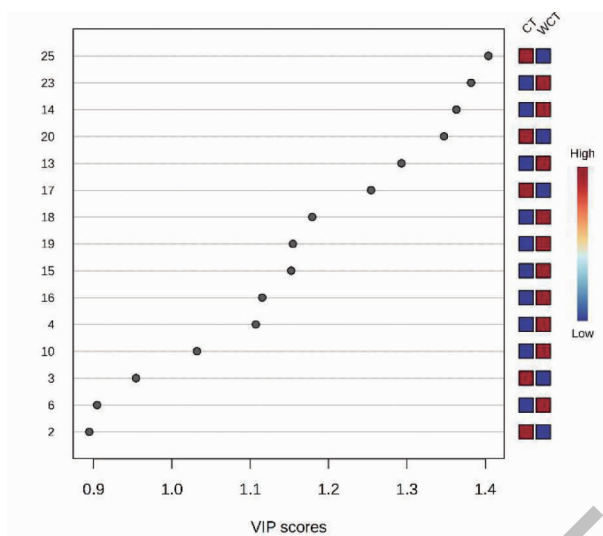


图7 OPLS-DA 分析 VIP 图

Fig. 7 VIP chart of OPLS-DA analysis

供更为全面的参考依据。

2.5 毛蕊异黄酮、芒柄花素等 7 种成分含量测定

2.5.1 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液逐级稀释,分别取 10 μL 按“2.1”项下色谱条件进样分析,以峰面积为纵坐标(Y)、对照品浓度为横坐标(X)绘制各成分标准曲线(见表 2)。

2.5.2 精密度、重复性、稳定性实验

按照《中国药典》2020 年版^[2]方法进行实验精密度、重复性、稳定性进行考察,结果见表 3。

2.5.3 加样回收率实验

精密称取 9 份 1.5 g (CT-3) 红芪样品,分别加入混合对照品溶液适量,其加入量分别为该样品中相应成分含量的 50%、100%、150%,按“2.3”项下

表 2 红芪 7 种成分的回归方程、线性范围及相关系数

Table 2 Regression equation, linear range and correlation coefficient of seven components of Hedysari Radix

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	r	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限 Limit of detection ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限 Limit of quantitation ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
腺苷 Adenosine	$Y = 23.4290X + 22.7630$	0.9991	0.391 ~ 50.000	0.098	0.391
香草酸 Vanillic acid	$Y = 26.4535X + 5.2121$	0.9998	0.273 ~ 35.000	0.068	0.273
毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-glucoside	$Y = 33.1022X + 12.1834$	0.9992	0.211 ~ 27.000	0.054	0.211
芒柄花苷 Ononin	$Y = 34.4135X + 86.0683$	0.9993	1.680 ~ 215.000	0.410	1.680
毛蕊异黄酮 Calycosin	$Y = 39.8275X + 18.5836$	0.9993	0.313 ~ 40.000	0.075	0.313
芒柄花素 Formononetin	$Y = 54.3271X + 195.5765$	0.9992	2.328 ~ 298.000	0.582	2.328
美迪紫檀素 Medicarpin	$Y = 14.0834X + 43.7955$	0.9993	2.031 ~ 260.000	0.521	2.031

表 3 精密度、重复性、稳定性考察结果

Table 3 Precision, repeatability, stability test results

成分 Component	RSD (%)		
	精密度 Precision	稳定性 Stability	重复性 Repeatability
腺苷 Adenosine	1.1	2.7	2.2
香草酸 Vanillic acid	1.1	2.8	1.3
毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-glucoside	1.0	1.8	2.5

续表 3(Continued Tab. 3)

成分 Component	RSD(%)		
	精密度 Precision	稳定性 Stability	重复性 Repeatability
芒柄花苷 Ononin	1.0	2.9	2.2
毛蕊异黄酮 Calycosin	1.0	1.6	1.6
芒柄花素 Formononetin	1.0	0.80	2.2
美迪紫檀素 Medicarpin	1.0	1.0	1.8

方法制备供试品溶液,“2.1”项下方法进样分析,记录各成分的峰面积,计算含量。加样回收率考察结果显示,腺苷、香草酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素平均回收率分别为 99.63%、99.85%、99.85%、100.7%、100.2%、98.34%、98.86%,RSD 分别为 2.2%、2.8%、2.5%、2.7%、2.7%、1.8%、2.7% ($n=9$),表明该方法准确性良好。

2.5.4 样品含量测定

按照“2.3”项下方法分别制备 14 批搓条和未搓条样品供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样分析,分别测定各成分含量,色谱图见图 8,结果见表 4。

2.6 总多糖含量测定

2.6.1 红芪粗多糖的提取与精制

取红芪样品粉末 50 g,加 80% 乙醇 300 mL,回流 1 h,滤渣挥干乙醇后加蒸馏水 300 mL,回流 1 h,浓缩滤液至 100 mL,加入无水乙醇至溶液含醇量为 80%,于 4 °C 冰箱中静置过夜,倾出上清液,沉淀挥至无醇味后加入 150 mL 温水溶解,离心,上清液浓缩至 50 mL,加入无水乙醇至溶液含醇量为 80%,于

4 °C 冰箱中静置过夜,倾出上清液,离心,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,最后将沉淀于 40 °C 干燥至恒重^[14,15]。

2.6.2 *D*-无水葡萄糖对照品溶液配制

精密称取 *D*-无水葡萄糖对照品适量,加蒸馏水溶解,制成每 1 mL 含 1.26 mg *D*-无水葡萄糖的储备液,取 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中,制成每 1 mL 含 126 μg *D*-无水葡萄糖对照品溶液,备用。

2.6.3 红芪多糖溶液的配制

精密称取 0.1 g 红芪多糖,加蒸馏水溶解并定容至 100 mL,得浓度为 1.0 mg/mL 的红芪多糖溶液。

2.6.4 换算因子的测定

精密移取 4 份“2.6.3”项下所制红芪多糖溶液各 0.1 mL 于 20 mL 具塞试管中,加水至 1.0 mL,按项下检测条件测定吸光度值。根据线性方程计算红芪多糖溶液中葡萄糖的浓度(C)。然后将 C 代入公式(1),计算得出换算因子(f)为 1.36。

$$f = m / (C \times D) \quad (1)$$

式中, m -多糖质量(mg); C -多糖检测液中葡萄糖的浓度(μg/mL); D -稀释倍数。

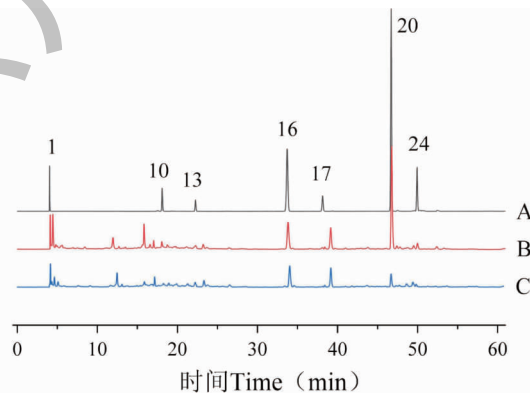


图 8 混合对照品(A)、搓条样品(B)和未搓条样品(C)色谱图

Fig. 8 HPLC chromatograms of mixed standards solution (A) and rubbed samples of Hedysari Radix (B) and unrubbed samples of Hedysari Radix (C)

注:1-腺苷;10-香草酸;13-毛蕊异黄酮苷;16-芒柄花苷;17-毛蕊异黄酮;20-芒柄花素;24-美迪紫檀素。Note:1-Adenosine;10-Vanillic acid;13-Calycosin-7-glucoside;16-Ononin;17-Calycosin;20-Formononetin;24-Medicarpin.

2.6.5 供试品溶液的配制

精密称取搓条与未搓条样品粉末 0.2 g, 置于锥形瓶(150 mL), 加入 50 mL 80% 乙醇, 回流 1 h, 过滤, 滤渣加蒸馏水 50 mL 回流 1 h, 放置室温, 过滤, 滤液定容至 100 mL, 移取 3 mL 于 10 mL 容量瓶中, 定容备用。

2.6.6 标准曲线的绘制

精密吸取“2.6.2”项下对照品溶液分别配制成 7.875、12.600、15.750、25.200、31.500、63.000、126.000 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度的 *D*-无水葡萄糖对照品溶液, 取 1 mL 于具塞试管中, 加入 1 mL 5% 苯酚溶液, 4 mL 浓硫酸, 摇匀, 沸水浴 10 min, 冷却, 于 480 nm 处测吸光度值。以浓度为 X , 吸光度为 Y , 绘制标准曲线 $Y = 12.758X + 0.0068$, $r = 0.9991$, 线性范围为 7.875 ~ 126.000 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6.7 方法学考察

按照《中国药典》2020 年版^[2]方法对实验精密度、重复性、稳定性进行考察, 其 RSD 值分别为 1.1%、2.9%、3.0%, 平均加样回收率为 98.51%, RSD 为 2.2% ($n = 9$)。

2.6.8 含量测定

按照“2.6.5”项下方法分别制备 14 批搓条和未搓条样品供试品溶液, 按照“2.6.6”项下方法进行分析, 测定总多糖含量, 结果见表 4。

2.7 总黄酮含量测定

2.7.1 对照品溶液配制方法

精密称取毛蕊异黄酮苷对照品适量, 加 70% 乙醇溶解, 制成每 1 mL 含 0.96 mg 毛蕊异黄酮苷的储

备液。取 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 制成每 1 mL 含 96 μg 毛蕊异黄酮苷的对照品溶液, 备用。

2.7.2 供试品溶液的配制

精密称取搓条与未搓条样品粉末 0.10 g, 置于锥形瓶(150 mL), 用移液管加入 50 mL 70% 乙醇, 称重, 超声处理 40 min, 放置室温, 称重, 补足减失的重量, 摇匀, 抽滤处理, 取续滤液, 备用^[8]。

2.7.3 标准曲线的绘制

精密吸取“2.7.1”项下的对照品溶液配成 2.40、4.80、9.60、19.20、48.00、96.00 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度, 以试剂溶液为空白溶液作参比, 在 260 nm 处测吸光度值。以浓度为 X , 吸光度为 Y , 绘制标准曲线 $Y = 27.946X + 0.0206$, $r = 0.9992$, 线性范围为 2.4 ~ 96.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7.4 方法学考察

按照《中国药典》2020 年版^[2]方法对实验精密度、重复性、稳定性进行考察, 其 RSD 值分别为 0.2%、2.9%、2.3%, 平均加样回收率为 101.7%, RSD 为 2.2% ($n = 9$)。

2.7.5 含量测定

按照“2.7.2”项下方法分别制备 14 批搓条和未搓条样品供试品溶液, 按照“2.7.3”项下方法进行分析, 测定总黄酮含量, 结果见表 4。

2.8 浸出物测定

依据《中国药典》(2020 年版)第四部醇溶性浸出物测定法(通则 2201)项下的热浸法测定, 用 45% 乙醇作溶剂, 结果见表 4。

表 4 搓条和未搓条样品中多成分含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Content determination results of compounds in rubbed and unrubbed samples($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号 No.	腺苷 Adenosine ($\mu\text{g/g}$)	香草酸 Vanillic acid ($\mu\text{g/g}$)	毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7- glucoside ($\mu\text{g/g}$)	毛蕊异 黄酮 Calycosin ($\mu\text{g/g}$)	芒柄花苷 Ononin ($\mu\text{g/g}$)	芒柄花素 Formononetin ($\mu\text{g/g}$)	美迪紫檀素 Medicarpin ($\mu\text{g/g}$)	总多糖 Total polysaccharides (%)	总黄酮 Total flavonoids (%)	浸出物 Extract (%)
CT-1	40.16 \pm 0.47	16.71 \pm 0.15	1.04 \pm 0.03	1.96 \pm 0.03	58.93 \pm 1.76	142.69 \pm 3.87	36.45 \pm 0.87	5.83 \pm 0.20	0.87 \pm 0.04	36.88 \pm 0.19
CT-2	38.02 \pm 0.63	16.91 \pm 0.17	1.66 \pm 0.02	1.42 \pm 0.01	49.99 \pm 2.27	91.72 \pm 3.72	45.51 \pm 0.80	6.68 \pm 0.13	0.80 \pm 0.02	38.23 \pm 0.46
CT-3	26.30 \pm 0.75	16.72 \pm 0.51	0.92 \pm 0.02	1.51 \pm 0.06	44.99 \pm 0.27	118.69 \pm 3.53	14.91 \pm 0.46	7.50 \pm 0.02	0.79 \pm 0.01	38.09 \pm 0.21
CT-4	24.92 \pm 0.50	11.49 \pm 0.09	0.97 \pm 0.03	1.23 \pm 0.00	54.40 \pm 2.16	98.48 \pm 4.24	16.73 \pm 0.45	7.66 \pm 0.19	0.84 \pm 0.02	43.76 \pm 0.68
CT-5	37.37 \pm 0.72	19.17 \pm 0.48	1.46 \pm 0.04	1.96 \pm 0.05	70.80 \pm 2.12	157.33 \pm 2.00	28.31 \pm 0.84	6.68 \pm 0.25	0.76 \pm 0.01	38.43 \pm 0.25
CT-6	41.87 \pm 0.67	15.31 \pm 0.03	1.36 \pm 0.03	1.58 \pm 0.02	66.26 \pm 0.06	150.72 \pm 2.86	30.61 \pm 0.07	7.50 \pm 0.13	0.84 \pm 0.03	35.79 \pm 0.89
CT-7	41.97 \pm 0.53	18.13 \pm 0.47	1.44 \pm 0.02	1.60 \pm 0.04	76.65 \pm 1.88	158.79 \pm 3.68	29.43 \pm 0.95	5.51 \pm 0.09	0.83 \pm 0.01	43.51 \pm 1.04
CT-8	36.91 \pm 0.39	17.66 \pm 0.29	1.63 \pm 0.03	3.00 \pm 0.05	70.81 \pm 2.01	150.24 \pm 1.70	34.69 \pm 1.05	5.81 \pm 0.15	0.90 \pm 0.01	36.65 \pm 0.31

续表 4 (Continued Tab. 4)

编号 No.	腺苷 Adenosine ($\mu\text{g/g}$)	香草酸 Vanillic acid ($\mu\text{g/g}$)	毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7- glucoside ($\mu\text{g/g}$)	毛蕊异 黄酮 Calycosin ($\mu\text{g/g}$)	芒柄花苷 Ononin ($\mu\text{g/g}$)	芒柄花素 Formononetin ($\mu\text{g/g}$)	美迪紫檀素 Medicarpin ($\mu\text{g/g}$)	总多糖 Total polysaccharides (%)	总黄酮 Total flavonoids (%)	浸出物 Extract (%)
CT-9	17.84 ± 0.48	8.35 ± 0.25	1.24 ± 0.03	1.53 ± 0.04	28.16 ± 0.90	89.23 ± 2.21	28.27 ± 0.64	8.52 ± 0.28	0.82 ± 0.02	45.35 ± 0.84
CT-10	20.76 ± 0.57	12.59 ± 0.21	1.16 ± 0.03	1.06 ± 0.02	41.54 ± 0.22	67.43 ± 1.31	14.99 ± 0.14	8.35 ± 0.23	0.92 ± 0.01	36.46 ± 0.73
CT-11	23.57 ± 0.05	13.94 ± 0.22	1.17 ± 0.04	1.47 ± 0.03	44.95 ± 1.05	109.04 ± 0.59	28.45 ± 0.36	6.68 ± 0.11	0.82 ± 0.03	37.80 ± 0.89
CT-12	34.90 ± 0.77	12.60 ± 0.32	1.14 ± 0.03	1.40 ± 0.01	43.83 ± 0.07	70.21 ± 0.57	15.95 ± 0.10	7.73 ± 0.14	0.84 ± 0.03	35.35 ± 1.00
CT-13	29.44 ± 0.77	11.17 ± 0.03	1.36 ± 0.04	3.04 ± 0.05	47.77 ± 0.27	79.65 ± 0.35	12.64 ± 0.13	7.37 ± 0.26	0.91 ± 0.03	38.07 ± 0.52
CT-14	23.04 ± 0.46	11.74 ± 0.20	1.54 ± 0.01	2.71 ± 0.08	52.50 ± 1.27	85.26 ± 1.48	13.84 ± 0.42	7.76 ± 0.05	0.91 ± 0.04	35.27 ± 0.86
WCT-1	27.43 ± 0.12	16.88 ± 0.09	2.94 ± 0.04	1.46 ± 0.05	62.50 ± 2.04	10.67 ± 0.36	58.28 ± 1.54	5.64 ± 0.10	0.88 ± 0.02	29.86 ± 0.37
WCT-2	19.61 ± 0.51	17.34 ± 0.20	1.82 ± 0.04	0.89 ± 0.01	58.83 ± 1.50	43.70 ± 1.29	13.42 ± 0.43	2.12 ± 0.08	0.81 ± 0.01	35.17 ± 0.21
WCT-3	31.65 ± 0.35	16.98 ± 0.14	2.07 ± 0.05	0.40 ± 0.01	67.33 ± 0.76	41.48 ± 0.34	12.70 ± 0.45	3.98 ± 0.26	0.90 ± 0.03	32.02 ± 1.53
WCT-4	26.67 ± 0.18	12.31 ± 0.20	1.66 ± 0.04	0.50 ± 0.00	54.58 ± 0.47	59.31 ± 1.89	45.62 ± 0.51	2.27 ± 0.07	0.99 ± 0.02	25.84 ± 0.69
WCT-5	21.39 ± 0.23	20.37 ± 0.12	1.83 ± 0.02	0.92 ± 0.01	59.07 ± 1.03	70.23 ± 0.85	56.13 ± 0.62	2.44 ± 0.11	1.05 ± 0.01	29.57 ± 0.27
WCT-6	28.13 ± 0.41	18.55 ± 0.15	1.91 ± 0.02	1.20 ± 0.03	75.54 ± 1.38	69.06 ± 1.09	22.22 ± 0.46	4.31 ± 0.21	0.91 ± 0.01	29.60 ± 0.36
WCT-7	44.83 ± 0.33	19.14 ± 0.18	2.78 ± 0.07	1.56 ± 0.03	106.28 ± 1.11	77.78 ± 0.64	24.25 ± 0.38	4.79 ± 0.20	0.94 ± 0.01	31.20 ± 0.51
WCT-8	36.24 ± 0.92	19.48 ± 0.13	2.84 ± 0.05	1.78 ± 0.05	85.71 ± 0.85	111.9 ± 1.76	84.23 ± 0.79	5.23 ± 0.16	0.90 ± 0.02	34.72 ± 0.82
WCT-9	27.10 ± 0.06	17.29 ± 0.29	1.71 ± 0.04	0.78 ± 0.02	85.46 ± 1.27	75.01 ± 1.44	29.55 ± 0.20	5.86 ± 0.22	0.82 ± 0.01	28.36 ± 0.43
WCT-10	20.17 ± 0.31	16.24 ± 0.17	1.85 ± 0.05	0.85 ± 0.02	76.18 ± 2.14	12.46 ± 0.12	26.92 ± 0.43	4.84 ± 0.18	1.04 ± 0.02	28.65 ± 1.12
WCT-11	38.60 ± 0.31	18.34 ± 0.28	2.07 ± 0.04	1.12 ± 0.02	81.04 ± 1.49	73.42 ± 1.58	23.84 ± 0.45	6.55 ± 0.05	0.85 ± 0.03	31.55 ± 0.56
WCT-12	28.29 ± 0.74	17.64 ± 0.13	1.94 ± 0.05	1.01 ± 0.03	117.99 ± 1.60	22.75 ± 0.23	40.27 ± 0.33	6.94 ± 0.17	1.16 ± 0.03	27.17 ± 0.49
WCT-13	38.84 ± 1.10	18.18 ± 0.18	3.24 ± 0.08	1.51 ± 0.04	158.23 ± 1.62	29.21 ± 0.55	68.13 ± 1.02	4.49 ± 0.24	0.99 ± 0.01	25.81 ± 0.75
WCT-14	38.70 ± 1.89	16.91 ± 0.09	2.77 ± 0.04	1.63 ± 0.03	161.83 ± 2.30	27.64 ± 0.25	65.36 ± 2.06	4.20 ± 0.19	1.03 ± 0.02	31.68 ± 1.03

含量测定结果显示,红芪经过搓条加工后,化学成分类型未改变,仅改变相应含量,搓条样品中芒柄花素、毛蕊异黄酮的平均质量分数分别为 112.11 ± 33.75 、 $1.82 \pm 0.64 \mu\text{g/g}$,明显高于未搓条样品中芒柄花素 $51.71 \pm 29.57 \mu\text{g/g}$ 、毛蕊异黄酮 $1.12 \pm 0.43 \mu\text{g/g}$ 的平均含量 ($P < 0.01$)。搓条样品中香草酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷的平均质量分数分别为 14.47 ± 3.21 、 53.68 ± 13.58 、 $1.29 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$,明显低于未搓条样品中香草酸 $17.55 \pm 1.90 \mu\text{g/g}$ 、芒柄花苷 $89.33 \pm 34.90 \mu\text{g/g}$ 、毛蕊异黄酮 $2.24 \pm 0.54 \mu\text{g/g}$ 的平均含量 ($P < 0.01$)。美迪紫檀素的

含量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而腺苷可能是样品量较小导致含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

红芪搓条样品中总多糖、浸出物的平均质量分数分别为 $(7.11 \pm 0.94)\%$ 、 $(38.55 \pm 3.26)\%$,明显高于未搓条样品中总多糖 $(4.55 \pm 1.50)\%$ 、浸出物 $(30.09 \pm 2.88)\%$ 的平均含量 ($P < 0.01$),红芪搓条样品中总黄酮的平均质量分数为 $(0.85 \pm 0.05)\%$,明显低于未搓条样品中总黄酮 $(0.95 \pm 0.10)\%$ 的平均含量 ($P < 0.01$),结果见表 5。

表 5 搓条与未搓条样品独立样本 t 检验结果Table 5 Independent sample t test results of rubbed and unrubbed samples

化合物 Compound	F	t	df	P
腺苷 Adenosine	0.459	0.219	26	0.829
香草酸 Vanillic acid	0.009	-3.092	21	0.006 **
毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-glucoside	0.000	-6.034	18	0.000 **

续表 5 (Continued Tab. 5)

化合物 Compound	<i>F</i>	<i>t</i>	<i>df</i>	<i>P</i>
芒柄花苷 Ononin	0.014	-3.562	17	0.002**
毛蕊异黄酮 Calycosin	0.177	3.412	26	0.002**
芒柄花素 Formononetin	0.420	5.036	26	0.000**
美迪紫檀素 Medicarpin	0.003	-2.382	18	0.028*
总多糖 Total polysaccharides	0.200	5.425	26	0.000**
总黄酮 Total flavonoids	0.014	-3.384	19	0.003**
浸出物 Extract	0.818	7.278	26	0.000**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

本研究建立了红芪搓条前后的化学指纹图谱,各批次样品相似度均较高。指纹图谱分析发现红芪搓条前后所含化学成分种类一致,但峰面积大小有差异,提示两者成分含量之间存在差异性。通过 HCA、PCA 均可明显区分搓条和未搓条样品, OPLS-DA 共找到 12 个相对峰面积变化较大的色谱峰,分别为峰 25、峰 23、峰 14、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、峰 18、峰 19、峰 15、芒柄花苷、峰 4、香草酸。

通过指认成分的含量测定,发现红芪搓条后毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷等异黄酮苷类成分含量降低,毛蕊异黄酮、芒柄花素等异黄酮苷元类成分含量升高,可能的机制是:①通过“搓条”这一机械力学刺激,将力学信号施加于“缓慢代谢”的药材表面,并将力学信号向药材内部传输,引起芒柄花素合成途径上关键异黄酮合酶基因、苯丙氨酸解氨酶基因、肉桂酸羟化酶基因、香豆酸辅酶 A 连接酶基因、查尔酮合成酶基因等的表达或沉默,引起次生代谢产物含量发生变化^[9,12,16,17],影响红芪品质。②机械力作用下力学信号到达机械力离子通道 Piezo1 参与机械力感应的关键功能位点, Piezo 通道传导多种生化信号,使芒柄花素等异黄酮类成分生物合成途径有关蛋白质变化,引起次生代谢产物发生变化^[18-20]。搓条加工对红芪异黄酮合成酶活性及蛋白质的影响有待深入研究。

搓条后红芪中总多糖、浸出物含量升高,提高红芪药材品质。其机制可能是机械力促使细胞结构的改变及膜系统的破坏^[21,22],破坏了细胞壁聚合物的分子间和分子内连接,利于有效成分溶出,使多糖、浸出物等含量升高。搓条后总黄酮含量降低,可能是因为芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷等水溶性的黄酮苷

类成分转化形成醇溶性的异黄酮苷元类成分,导致总黄酮含量降低。

本实验采用统一的色谱条件实现了指纹图谱定性和多成分定量的同时分析,建立的方法专属性强,准确、可靠。指纹图谱结合化学计量学、多成分含量测定对搓条和未搓条样品进行了区分与比较,阐释了红芪搓条前后化学成分变化规律,为红芪产地搓条加工提供科学依据和技术参考。

参考文献

- Lin X, Li CY, Xie YH, et al. Research progress on the quality status and production area suitability of Hedysari Radix [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2024, 42: 122-126.
- 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, 2010: 159.
- Tsai YC, Lin MK, Peng WH. Comparison of the immunomodulatory effect of TCM formulas containing either Astragali Radix or with this replaced by Hedysari Radix [J]. Nat Prod Commun, 2022, 17: 1934578X221142797.
- Jia MT, Li CY, Qiang ZZ, et al. Anti-tumor effect and mechanism of effective components in Hedysari Radix: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 213-219.
- Feng HM, Li CY, He JG, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Hedysari Radix and predictive analysis on quality markers (Q-Marker) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2831-2842.
- Mou Y, Wang SJ, Zhang YN. Research progress on anti-tumor mechanism of formononetin [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2023, 45: 850-855.

- 7 Liu L, Yang DY, Zhang XY, et al. Research status of research on production of Chinese medicinal materials and discussion on characteristics of modern research [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2021, 32: 2956-2958.
- 8 Yang JJ, Li L, Ji D, et al. Research on history and present situation of integration of habitat processing and processing of Chinese herbal medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47: 2751-2757.
- 9 Duan JA, Su SL, Yan H, et al. "Sweating" of traditional Chinese medicinal materials during primary processing and its mechanisms of enzymatic reaction and chemical conversion [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44: 1219-1225.
- 10 Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 507-514.
- 11 Sun JC, Li X, Wang Y, et al. Research progress of quality marker during Chinese materia medica processing [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2020, 51: 2593-2602.
- 12 Wang Y, Qiang ZZ, Jia MT, et al. Comparative study on rubbed and unrubbed *Hedysari Radix* samples based on trait-micro-fingerprinting [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2023, 35: 1402-1415.
- 13 Qiang ZZ. Study on the geo-characteristics of *Hedysari Radix* [D]. Lanzhou: Gansu University of Traditional Chinese Medicine(甘肃中医药大学), 2019.
- 14 Li YF, Niu JT, Cao R, et al. Study on the effect of different drying processes on the content of *Hedysarum polybotrys* polysaccharides [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2019, 30: 92-94.
- 15 Yang XJ, Yang ZJ, Niu PX, et al. Content determination of total flavones and polysaccharides in *Hedysari Radix* in different producing areas in Gansu Province [J]. *Chin J Inform Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2018, 25: 79-82.
- 16 Li P, Dong Q, Ge S, et al. Metabolic engineering of proanthocyanidin production by repressing the isoflavone pathways and redirecting anthocyanidin precursor flux in legume [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 1604-1618.
- 17 Liu Y, Hassan S, Kidd BN, et al. Ethylene signalling is important for isoflavonoid mediated resistance to *Rhizoctonia solani* in roots of *Medicago truncatula* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2017, 30: 691-700.
- 18 Zhao Q, Zhou H, Chi S, et al. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel [J]. *Nature*, 2018, 554: 487.
- 19 Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66: 113-137.
- 20 Liu L, Wang YL, Xiao SL, et al. Biomechanopharmacology of Chinese medicine based on mechano-ion channel Piezo1: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 235-244.
- 21 Xiao B. Simulation and experimental study on drying process of plant materials based on cell structure [D]. Beijing: China Agricultural University(中国农业大学), 2016.
- 22 Xue Q. Study on post-harvest physiology and storage technology of yam [D]. Baoding: Hebei Agricultural University(河北农业大学), 2008.