

基于指纹图谱及多成分含量测定结合加权 TOPSIS 的红芪及其不同炮制品质量评价

龚文慧¹, 高磊¹, 辛力¹,

刘明贵^{2*}, 张文¹, 金姝含¹, 陈小燕¹, 张金莲^{1*}

¹江西中医药大学, 南昌 330004; ²江西景德中药股份有限公司, 南昌 330038

摘要: 建立红芪生品及不同炮制品(药典法炙红芪、蜜糠炙红芪)的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 综合评价红芪及其不同炮制品质量。采用 HPLC 法建立红芪不同炮制品指纹图谱并对 5 种主要成分进行含量测定, 通过主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA)等方法对结果进行分析, 并结合灰色关联度分析理论计算指标权重值, 建立加权-逼近理想解排序法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)算法模型, 对红芪及其不同炮制品进行质量评价。结果表明, 红芪不同炮制品指纹图谱中有 22 个共有峰, 指出 5 个共有峰, 分别为香草酸(峰 5)、毛蕊异黄酮苷(峰 8)、芒柄花苷(峰 12)、毛蕊异黄酮(峰 17)、芒柄花素(峰 18); PCA 共提取出 5 个主成分, 综合评分中 15 批次蜜糠炙红芪排名靠前; 加权 TOPSIS 模型结果表明红芪不同炮制品各 15 批次的相对接近度值分别为生红芪 0.116 1~0.447 3, 炙红芪 0.238 3~0.501 1, 蜜糠炙红芪 0.318 9~0.654 2。本研究建立的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法操作简便, 稳定可靠, 加权 TOPSIS 算法模型合理, 可用于红芪及其不同炮制品的综合质量评价。

关键词: 红芪; 指纹图谱; 蜜糠炙红芪; 灰色关联; 熵权; 逼近理想解排序

中图分类号: R283.1

文献标识码: A

Quality evaluation of Hedysari Radix and its different processed products based on fingerprint and multi-component content determination combined with weighted TOPSIS

GONG Wen-hui¹, GAO Lei¹, XIN Li¹, LIU Ming-gui^{2*},

ZHANG Wen¹, JIN Shu-han¹, CHEN Xiao-yan¹, ZHANG Jin-lian^{1*}

¹Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; ²Jiangxi Jingde Chinese Traditional Medicine Co., Ltd.,

Jingdezhen 333302, China

Abstract: HPLC fingerprint of Hedysari Radix and its different processed products (Hedysari Radix processed by pharmacopoeia method and Hedysari Radix processed with honey chaff) and multi-component determination method were established to evaluate the quality of Hedysari Radix and different prepared products comprehensively. HPLC method was used to establish fingerprints of different Hedysari Radix processed products, and the contents of five main components were determined. principal component analysis was performed. PCA), orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) and other methods were used to

analyze the results, and the weights of indicators were calculated according to the grey relational degree analysis theory. The technique for order preference by similarity to ideal solution (TOPSIS) was established to evaluate the quality of Hedysari Radix and its different processed products. The results showed that there were 22 common peaks in the fingerprints of different Hedysari Radix processed products, and five common peaks were identified, which were vanilic acid (peak 5), calycosin-7-O- β -D-glucoside (peak 8), ononin (peak 12), calycosin (peak 17) and ononin (peak 18). A total of five principal components were extracted from PCA, and 15 batches of honey bran and Hedysari Radix were ranked first in the comprehensive score. The results of weighted TOPSIS model showed that the relative proximity values of 15 batches of different prepared Hedysari Radix were 0.116 1-0.447 3, 0.238 3-0.501 1, and 0.318 9-0.654 2, respectively. The HPLC fingerprint and multi-component content determination method established in this study is simple, stable and reliable, and the weighted TOPSIS algorithm model is reasonable, which can be used for comprehensive quality evaluation of Hedysari Radix and its different processed products.

Key words: Hedysari Radix; fingerprint; Hedysari Radix processed with honey chaff; grey correlation; entropy weight; TOPSIS

红芪为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根^[1]。在历代本草中, 红芪多作为黄芪的来源品种用于临床。1977 年版《中华人民共和国药典》将红芪列为黄芪正品来源之一, 至 1985 年版《中国药典》才将红芪单列为一味中药, 此后药典均将红芪与黄芪分别记载。现代临床常用的红芪炮制品为炙红芪, 炮制后其免疫功能增强^[2], 且炙红芪在改善大鼠脾气虚证方面的药效优于炙黄芪及红芪生品^[3-4]。与药典法炙红芪不同, 蜜糠炙红芪是将红芪生品与蜜水溶液拌润后, 再用建昌帮特色辅料蜜糠炒制得到的炮制品, 炮制后可添香赋色, 增强补中益气作用。历版药典及各地方炮制规范中红芪饮片规格多为炙红芪品种, 而有关蜜糠炙红芪的化学成分和药理作用研究鲜有报道, 炮制机制尚未明确。2020 版《中华人民共和国药典》及各地方标准中仅以浸出物为红芪的质量评价标准, 缺乏相应的含量测定指标, 未能全面评价红芪及其炮制品质量。

中药指纹图谱具有整体性、特征性、宏观性和模糊性等特点, 可宏观反映中药化学信息的整体状况, 是中药质量控制和评价的常用技术^[5]。加权-逼近理想解排序法 (technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS) 是一种通过对多个指标合理赋权, 以距离理想化目标的程度为基准的综合评价方法, 能够充分利用原始数据的信息, 避免主观因素对品质评价的影响^[6-8]。目前研究中熵权法多采用归一化和标准分数 (standard score, Z-Score) 法对数据进行处理, 但由于归一化处理后的数据有 0 值出现, Z-Score 法处理的数据无法保证数据的非负, 针对上述问题有学者提出的基于灰色关联分析的熵权法能够解决指标的一致化处理 and 无量纲化问题, 同时最大程度地保留了原始数据所携带的信息, 可确保熵权法的准确性^[9]。本研究旨在通过建立生红芪、药典法炙红芪及蜜糠炙红芪的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱及多成分含量测定方法, 结合化学计量学及加权 TOPSIS 算法模型, 对红芪不同炮制品进行质量评价, 为红芪及其不同炮制品的质量控制体系及临床应用提供科学基础。

1 材料

1.1 药材

红芪饮片均购自江西景德中药股份有限公司，经江西中医药大学邓可众教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根。红芪及其不同炮制品样品信息见表 1。

表 1 红芪及其不同炮制品样品信息

Table 1 Sample information of Hedysari Radix and its different processed products

红芪		炙红芪编号	蜜糠炙红芪编号	产地
Hedysari Radix		Hedysari Radix processed by	Hedysari Radix processed	Origin
编号	批号	pharmacopoeia method No.	with honey chaff No.	
No.	Batch No.			
S1	220301	Z1	M1	甘肃陇南鱼龙镇
S2	220302	Z2	M2	甘肃陇南鱼龙镇
S3	220303	Z3	M3	甘肃陇南鱼龙镇
S4	220101	Z4	M4	甘肃陇南马街镇
S5	220102	Z5	M5	甘肃陇南马街镇
S6	220103	Z6	M6	甘肃陇南马街镇
S7	220401	Z7	M7	甘肃陇南安化镇
S8	220402	Z8	M8	甘肃陇南安化镇
S9	220403	Z9	M9	甘肃陇南安化镇
S10	220405	Z10	M10	甘肃陇南甘泉镇
S11	220406	Z11	M11	甘肃陇南甘泉镇
S12	220407	Z12	M12	甘肃陇南甘泉镇
S13	220501	Z13	M13	甘肃陇南三河镇
S14	220502	Z14	M14	甘肃陇南三河镇
S15	220503	Z15	M15	甘肃陇南三河镇

1.2 仪器与试剂

Waters2695 型高效液相色谱仪器（美国 Waters 公司）；OHAUS 型万分之一分析天平（奥豪斯国际贸易（上海）有限公司）；AE240 型十万分之一电子天平（美国 Mettler 公司）；HH-6 型数显电子恒温水浴锅（常州国华电器有限公司）；KS-500E 型超声波清洗器（南昌恒益科学仪器有限公司）。

香草酸（批号 WP23011904，质量分数≥98%，四川省维克奇生物科技有限公司）；毛蕊异黄酮（批号 CHB201126，质量分数≥98%）、毛蕊异黄酮苷（批号 CHB201128，质量分数≥98%）、芒柄花素（批号 CHB201115，质量分数≥98%）、芒柄花苷（批号 CHB201114，质量分数≥98%，成都克洛玛生物科技有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，恩科化学有限公司）；水为娃哈哈水（杭州娃哈哈集团有限公司），其余

试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备

蜜糠的制备：取干糠，除去糠尘和杂质，得到净干糠。取一定量的净干糠，加入 30%的蜜水溶液，拌匀，于烘箱中 65 °C 烘制 30 min，备用^[10]。

药典法炙红芪的制备：每取净红芪片 100 g，称炼蜜 25 g，用适量沸水稀释后，倒入净红芪片中拌匀，闷润至透，置炒制容器内，以 200 °C 炒制 8 min 后出锅，摊晾，即得。

蜜糠炙红芪的制备：每取净红芪片 100 g，称炼蜜 25 g，用适量沸水稀释后，倒入净红芪片中拌匀，闷润至透。另取蜜糠 35 g，撒入预热的炒制容器内，炒制冒青烟时投入润透的红芪片，以 190 °C 炒制 13 min 后出锅，摊晾，即得。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

取香草酸、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.018 4、0.033 6、0.027 2、0.029 6、0.013 2 mg 的溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

分别取生红芪、炙红芪、蜜糠炙红芪粉末（过四号筛）约 3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，密塞，称定重量，浸泡半小时后，超声（功率 300 W；频率 40 kHz）处理 1 h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Titank C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水（B），梯度洗脱：0~5 min，7%→12%A；5~15 min，12%→20%A；15~25 min，20%→25%A；25~30 min，25%→35%A；30~35 min，35%→40%A；35~38 min，40%→50%A；38~50 min，50%→75%A；50~60 min，75%→90%A；流速 1 mL/min，检测波长 280 nm，柱温 30 °C，进样量 10 μL。

2.4 指纹图谱的构建

2.4.1 精密度试验

取蜜糠炙红芪（M1）粉末，按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件连续测定 6 次。以芒柄花素（18 号峰）为参照峰，计算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峰面积的相对标准偏差（relative standard deviation, RSD）为 0.050%~1.1%，RSD 为 1.6%~2.8%，表明所用仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取蜜糠炙红芪（M1）粉末 6 份，按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件进行测定。以芒柄

花素（18号峰）为参照峰，计算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RSD为0.030%~0.20%，相对峰面积的RSD为1.5%~2.5%，表明该方法重复性较好。

2.4.3 稳定性试验

取蜜糠炙红芪粉末（M1），按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件，分别在0、2、4、8、16、24 h进样。以芒柄花素（18号峰）为参照峰，计算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RSD为0.27%~0.63%，相对峰面积的RSD为2.0%~2.9%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度评价

将红芪及其不同炮制品各15批样品，按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件进行测定，将色谱数据分别导入《中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统（2012版）》中，采用中位数法，时间窗宽度为0.1 min，通过多点校正进行峰匹配，生成红芪不同炮制品的指纹图谱，见图1、图2、图3。在红芪指纹图谱中，18号峰峰面积最高，分离度较好，因此选择18号峰为参照峰，最终生红芪共有峰20个，药典法炙红芪及蜜糠炙红芪共有峰22个，炮制后产生了2个新的成分（峰1、峰2）。通过与对照品比对，指出5个共有峰，即香草酸（峰5）、毛蕊异黄酮苷（峰8）、芒柄花苷（峰12）、毛蕊异黄酮（峰17）、芒柄花素（峰18），见图4。

将红芪及其不同炮制品指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价，分别计算各自15批及总45批样品相似度。结果可得，与对照图谱（R）相比，生红芪、炙红芪、蜜糠炙红芪各15批的指纹图谱相似度均>0.900，见表2，说明同一炮制品不同批次之间整体质量较稳定。

表2 红芪及其不同炮制品图谱相似度

Table 2 Similarity of fingerprint of Hedysari Radix and its different processed products

红芪 Hedysari Radix	相似度 Similarity	炙红芪 Hedysari Radix processed by pharmacopoeia method	相似度 Similarity	蜜糠炙红芪 Hedysari Radix processed with honey chaff	相似度 Similarity
S1	0.950	Z1	0.950	M1	0.949
S2	0.909	Z2	0.936	M2	0.947
S3	0.965	Z3	0.949	M3	0.950
S4	0.965	Z4	0.981	M4	0.979
S5	0.972	Z5	0.975	M5	0.980
S6	0.995	Z6	0.920	M6	0.980
S7	0.995	Z7	0.957	M7	0.993
S8	0.995	Z8	0.959	M8	0.996
S9	0.993	Z9	0.938	M9	0.995

S10	0.990	Z10	0.951	M10	0.981
S11	0.990	Z11	0.973	M11	0.978
S12	0.989	Z12	0.992	M12	0.981
S13	0.997	Z13	0.986	M13	0.991
S14	0.991	Z14	0.969	M14	0.986
S15	0.984	Z15	0.984	M15	0.985

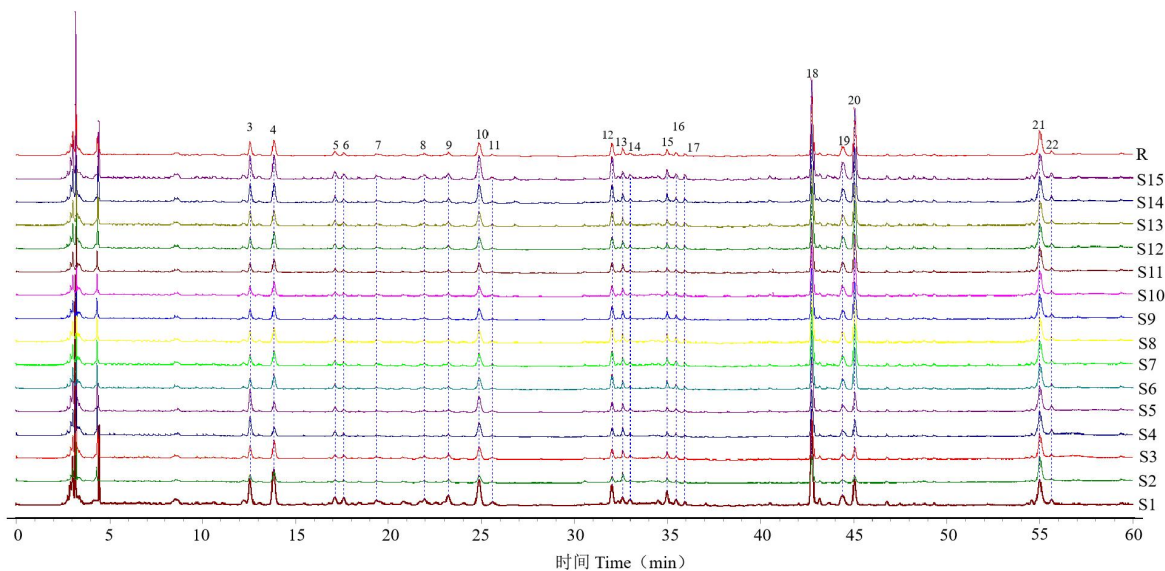


图 1 不同批次生红芪指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of different batches of Hedysari Radix

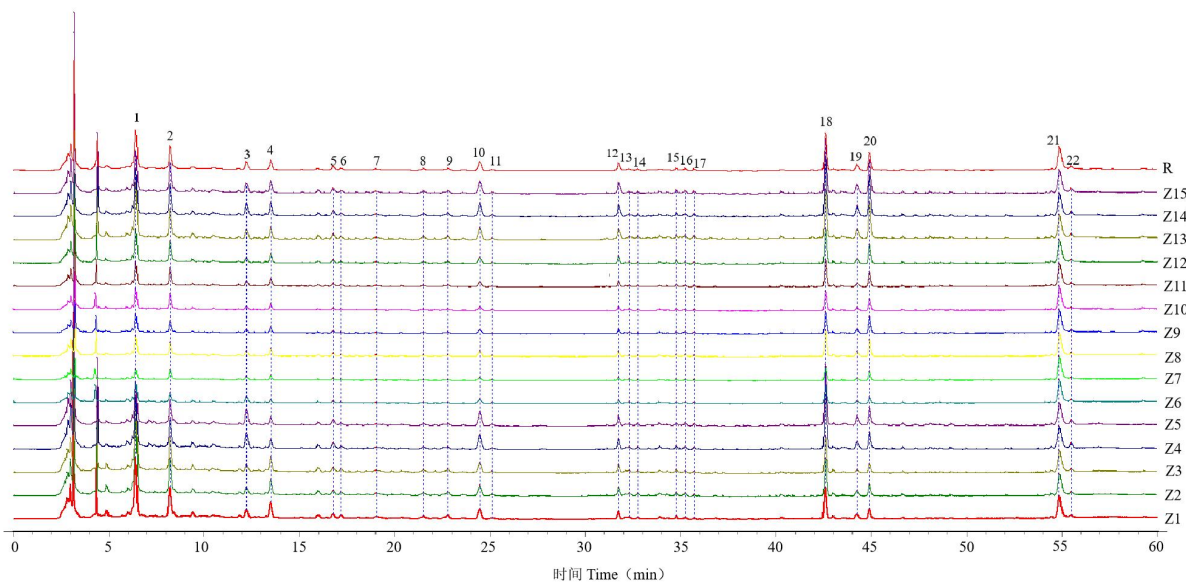


图 2 不同批次药典法炙红芪指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of different batches of Hedysari Radix processed by pharmacopoeia method

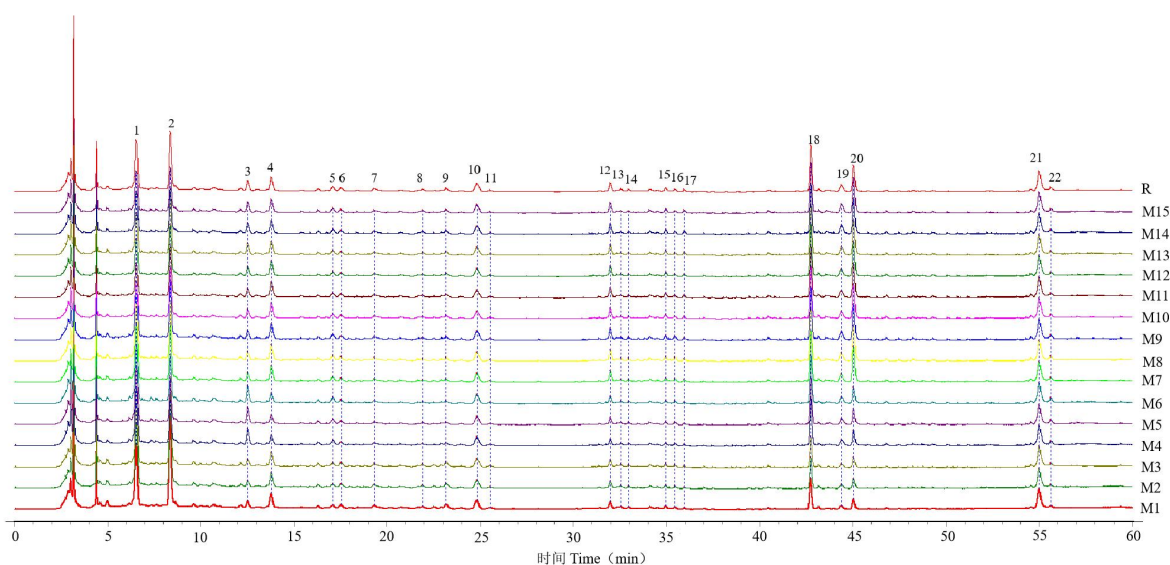


图 3 不同批次蜜糠炙红芪指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of different batches of Hedysari Radix processed with honey chaff

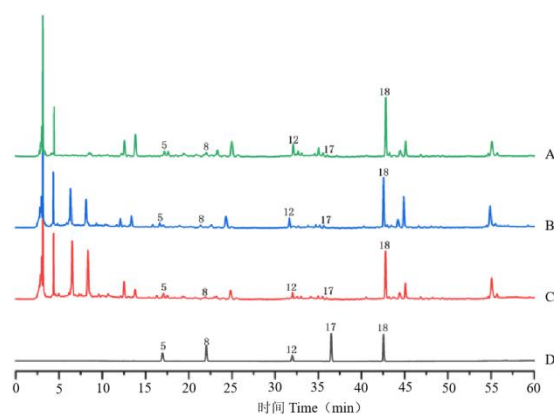


图 4 红芪生品、不同炮制品及混合对照品的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatograms of Hedysari Radix, different processed products and reference substance

注：A-红芪生品；B-药典法炙红芪；C-蜜糠炙红芪；D-混合对照品。

Note: A-Hedysari Radix; B-Hedysari Radix processed by pharmacopoeia method; C- Hedysari Radix processed with honey chaff; D- Mixed standards.

2.5 化学模式识别

2.5.1 主成分分析

采用 SPSS19.0 以及 SIMCA14.1 软件对 45 批生红芪、炙红芪、蜜糠炙红芪 22 个共有峰的相对峰面积进行主成分分析，得到抽样适合性检验值为 0.656，显著性为 0.000，样品间自然聚类结果见图 5，生红芪与两种炮制品能够很好的分开，炙红芪与蜜糠炙红芪样品虽有部分重叠，但大多数样本可以将炙红芪与蜜糠炙红芪分为 2 类。以特征值>1 为提取标准，共提取出 5 个主成分，累积方差贡献率为 88.838%，可代表指纹图谱中 22 个共有峰的大部分信息，结果见表 3。

表 3 主成分特征值及方差贡献率结果

Table 3 Results of principal component eigenvalues and variance contribution rates

成份 Component	特征值 Characteristic value	方差贡献率	累积方差贡献率
		Variance contribution rate (%)	Cumulative variance contribution rate (%)
1	7.679	34.906	34.906
2	5.046	22.937	57.843
3	2.948	13.398	71.240
4	2.217	10.077	81.317
5	1.655	7.521	88.838

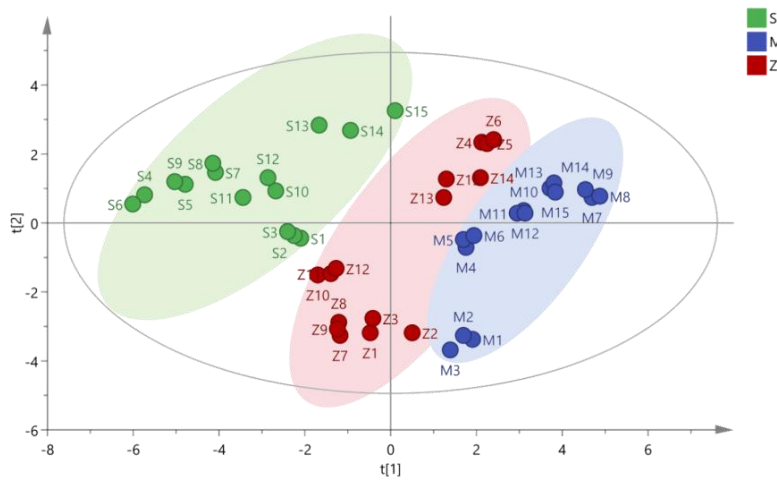


图 5 黄芪生品及其不同炮制品的主成分散点

Fig. 5 Principal component scatter of Hedysari Radix and its different processed products

因子载荷矩阵反应了各主成分与 22 个共有峰即原始变量之间的相关系数，由表 4 可知 22 个共有峰对 5 个主成分的贡献，主成分表达式中各个因子系数绝对值的大小可以反映该因子对其主成分所作出贡献的强弱。第 1 主成分对应荷载量较大的峰为峰 19、峰 18（芒柄花素）；第 2 主成分对应荷载量较大的峰为峰 9、峰 3；第 3 主成分对应荷载量较大的峰为峰 1、峰 20；第 4 主成分对应荷载量较大的峰为峰 11、峰 12（芒柄花苷）、峰 5（香草酸）；第 5 主成分对应荷载量较大的峰为峰 8（毛蕊异黄酮苷）、峰 17（毛蕊异黄酮）。

表 4 初始因子载荷矩阵

Table 4 Initial factor load matrix

共有峰 Common peak	载荷矩阵 Loading matrix				
	1	2	3	4	5

S1	-1.383 1	1.155 9	-0.055 6	-0.245 5	0.973 6	-0.176 6	27
S2	-1.352 0	1.548 5	-0.295 4	-0.764 0	1.460 5	-0.123 5	26
S3	-1.464 6	1.105 3	-0.127 8	-0.746 5	0.305 0	-0.327 1	29
S4	-4.320 6	-1.818 3	0.339 0	-2.322 4	-0.255 6	-2.133 0	44
S5	-3.449 6	-1.678 1	0.176 1	-1.581 8	-0.117 1	-1.733 6	42
S6	-4.736 9	-1.648 1	0.082 3	-1.934 1	-0.388 2	-2.244 5	45
S7	-2.589 1	-0.608 9	-1.964 0	-1.023 9	0.026 5	-1.407 7	40
S8	-2.537 0	-0.788 2	-2.072 9	-1.130 3	0.014 1	-1.457 0	41
S9	-3.498 5	-0.609 6	-1.994 9	-1.611 7	0.450 4	-1.756 8	43
S10	-1.906 7	-0.061 6	-1.404 3	-1.363 9	0.385 1	-0.976 3	34
S11	-2.526 7	-0.008 2	-1.572 6	-1.293 8	-0.032 2	-1.227 3	38
S12	-1.764 6	-0.255 3	-1.319 0	-1.852 9	-0.171 0	-1.050 8	35
S13	-0.250 7	-1.543 0	-0.862 5	-1.123 2	1.892 4	-0.527 9	30
S14	0.187 3	-1.277 9	-1.098 9	-0.318 7	1.662 9	-0.282 0	28
S15	1.261 8	-1.691 6	-0.519 1	-0.094 1	1.864 0	0.113 6	24
Z1	-1.846 5	1.794 0	2.106 6	0.278 9	0.671 6	0.127 8	23
Z2	-1.144 5	2.108 9	2.058 0	0.811 3	1.865 7	0.582 0	17
Z3	-1.688 8	1.501 2	1.791 9	0.167 2	0.823 6	0.073 7	25
Z4	2.073 1	-3.789 7	2.475 1	-0.002 3	-0.752 5	0.129 2	22
Z5	2.169 2	-3.411 2	2.174 2	0.345 3	-0.327 0	0.276 2	20
Z6	2.257 2	-3.739 9	2.346 6	-0.312 3	-0.673 1	0.162 4	21
Z7	-2.929 4	0.066 1	0.323 3	3.426 4	-1.085 8	-0.700 4	31
Z8	-2.944 7	-0.403 9	0.043 3	3.142 7	-1.206 3	-0.888 8	33
Z9	-3.071 6	-0.377 5	0.029 1	3.708 9	-1.428 6	-0.888 6	32
Z10	-2.485 4	-0.011 4	-1.634 2	-1.017 9	-1.477 0	-1.302 8	39
Z11	-2.232 7	-0.084 5	-1.520 5	-0.935 3	-1.206 8	-1.187 5	37
Z12	-2.100 5	-0.174 4	-1.606 0	-0.931 6	-0.825 1	-1.144 3	36
Z13	1.0180	-0.901 0	0.409 2	0.585 3	1.158 4	0.349 6	18
Z14	1.9275	-1.293 8	0.824 0	0.486 6	1.218 2	0.627 1	15
Z15	1.3173	-1.310 4	0.540 0	-0.074 0	0.966 1	0.296 8	19
M1	0.8483	3.861 8	1.626 2	0.471 9	-0.595 7	1.402 5	6
M2	0.735 7	3.863 8	1.752 8	-0.242 1	-0.730 4	1.298 6	8
M3	0.246 2	3.952 3	1.632 1	0.365 7	-0.724 2	1.193 5	10
M4	1.175 9	0.082 3	2.140 4	-0.266 7	-0.535 6	0.648 9	14
M5	1.229 2	-0.178 9	2.065 4	-0.043 9	-0.782 5	0.601 5	16
M6	1.735 5	0.079 5	2.368 7	-0.193 9	-1.067 4	0.841 6	13

M7	4.513 3	0.746 0	-0.321 9	0.640 8	-1.269 3	1.672 5	2
M8	4.645 3	0.796 9	-0.488 5	0.850 5	-1.147 9	1.738 2	1
M9	4.503 8	0.553 4	-0.388 3	0.449 5	-1.899 6	1.549 4	4
M10	3.323 0	1.237 4	-1.426 4	0.509 1	-1.329 1	1.204 0	9
M11	3.075 0	1.208 5	-1.638 1	0.196 4	-1.005 9	1.075 2	12
M12	3.211 6	1.171 2	-1.714 9	0.583 1	-0.809 3	1.157 8	11
M13	3.475 2	0.144 5	-1.172 8	1.187 3	1.974 8	1.357 2	7
M14	3.603 8	0.171 0	-1.242 0	1.644 4	2.085 8	1.453 4	5
M15	3.691 1	0.517 2	-0.863 5	1.575 3	2.044 5	1.603 9	3

2.5.2 正交偏最小二乘法判别分析

采用正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA）对红芪及不同炮制品进行两两对比分析，以变量重要性投影系数（variable importance in projection scores, VIP）值>1 为原则，筛选不同炮制品与生品间差异较大的成分。结果发现，两种炮制品与生红芪均能很好地区分。与生品相比，炙红芪共筛选出 5 个差异化合物（见图 6），分别为峰 1、峰 2、峰 21、峰 18（芒柄花素）、峰 20；蜜糠炙红芪共筛选出 10 个差异化合物（见图 7），分别为峰 21、峰 2、峰 1、峰 14、峰 11、峰 6、峰 22、峰 5（香草酸）、峰 12（芒柄花苷）、峰 18（芒柄花素），其中峰 1、峰 2 为炮制后新增的峰。

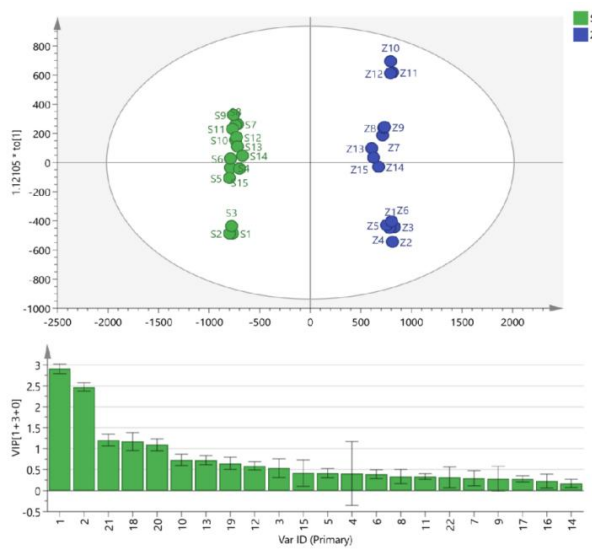


图 6 生红芪-药典法炙红芪 OPLS-DA 得分及 VIP 值

Fig. 6 OPLS-DA score and VIP value of Hedysari Radix and Hedysari Radix processed by pharmacopoeia method

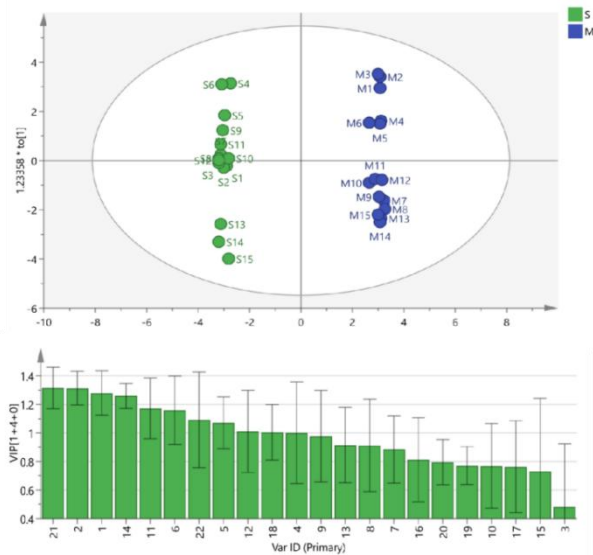


图 7 生红芪-蜜糖炙红芪 OPLS-DA 得分及 VIP 值

Fig. 7 OPLS-DA score and VIP value of Hedysari Radix and Hedysari Radix processed with honey chaff

2.6 红芪及其炮制品多成分含量测定

2.6.1 线性关系考察

取“2.2.2”项下对照品溶液适量，按倍数用甲醇稀释成系列对照品溶液 ($n=6$)，按“2.3”项下色谱条件测定，以对照品质量浓度为横坐标 (X)，对照品峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，进行线性回归分析，见图 8。毛蕊异黄酮线性回归方程为： $y=219\ 34x+847\ 2.7$ ($r=0.999\ 6$)，在 $1.05\sim 33.6\ \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系；毛蕊异黄酮苷线性回归方程为： $y=176\ 51x+359\ 3$ ($r=0.999\ 5$)，在 $0.85\sim 27.20\ \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系；芒柄花素线性回归方程为： $y=220\ 57x+598\ 5$ ($r=0.999\ 6$)，在 $0.93\sim 29.60\ \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系；芒柄花苷线性回归方程为： $y=166\ 09x+218\ 0.9$ ($r=0.999\ 5$)，在 $0.41\sim 13.20\ \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系；香草酸线性回归方程为： $y=136\ 26x+316\ 0.5$ ($r=0.999\ 6$)，在 $0.58\sim 18.40\ \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系。

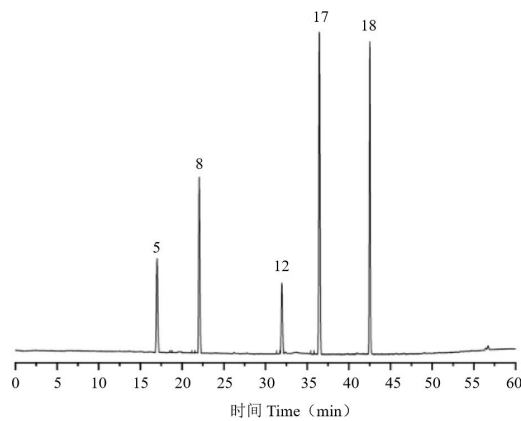


图 8 混合对照品 HPLC 图

Fig. 8 HPLC diagram of the reference substance

注：5.香草酸；8.毛蕊异黄酮；12.芒柄花苷；17.毛蕊异黄酮；18.芒柄花素。

Note: 5. Vanillic acid; 8. Calycosin-7-O- β -D-glucoside; 12. Ononin; 17. Calycosin; 18. Formononetin.

2.6.2 精密度试验

取蜜糠炙红芪粉末（M1），按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件进样分析，连续进样6次，记录各成分色谱峰面积。结果毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、香草酸峰面积的RSD值分别为1.8%、3.3%、1.3%、2.0%、2.5%，表明仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验

取蜜糠炙红芪粉末（M1），按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件分别在0、2、4、8、16、24 h进样，记录各成分色谱峰面积。结果毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、香草酸峰面积的RSD值分别为2.5%、2.1%、2.4%、2.1%、1.6%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6.4 重复性试验

取蜜糠炙红芪粉末6份（M1），按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件进行测定，记录各成分色谱峰峰面积，计算得到毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、香草酸含量的RSD值分别为2.4%、2.2%、1.5%、1.9%、1.7%，表明该方法重复性较好。

2.6.5 加样回收率

取蜜糠炙红芪粉末3 g(M1)，分别精密加入与样品中待测成分已知含量相当的混合对照品溶液，按“2.2”项下方法制备样品，平行制备6次，按“2.3”项下色谱条件进行测定，记录毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、香草酸的峰面积，计算平均加样回收率分别为100.3%、104.0%、104.8%、98.4%、103.9%，RSD值分别为2.8%、2.6%、3.6%、3.0%、3.3%。

2.6.6 样品含量测定

取45批生红芪、炙红芪、蜜糠炙红芪粉末，按“2.2”项下方法制备样品，按“2.3”项下色谱条件进行测定，计算各成分含量，结果见表6。为客观分析红芪及其不同炮制品中指标成分含量，将45批样品中5种成分含量数据导入Graphpad Prism 9软件中，采用小提琴图对45批样品含量测定结果进一步分析，结果见图9。与生红芪相比，红芪不同炮制品5种成分含量整体较高，且蜜糠炙红芪整体含量高于炙红芪，说明炮制对其含量变化有较大影响。

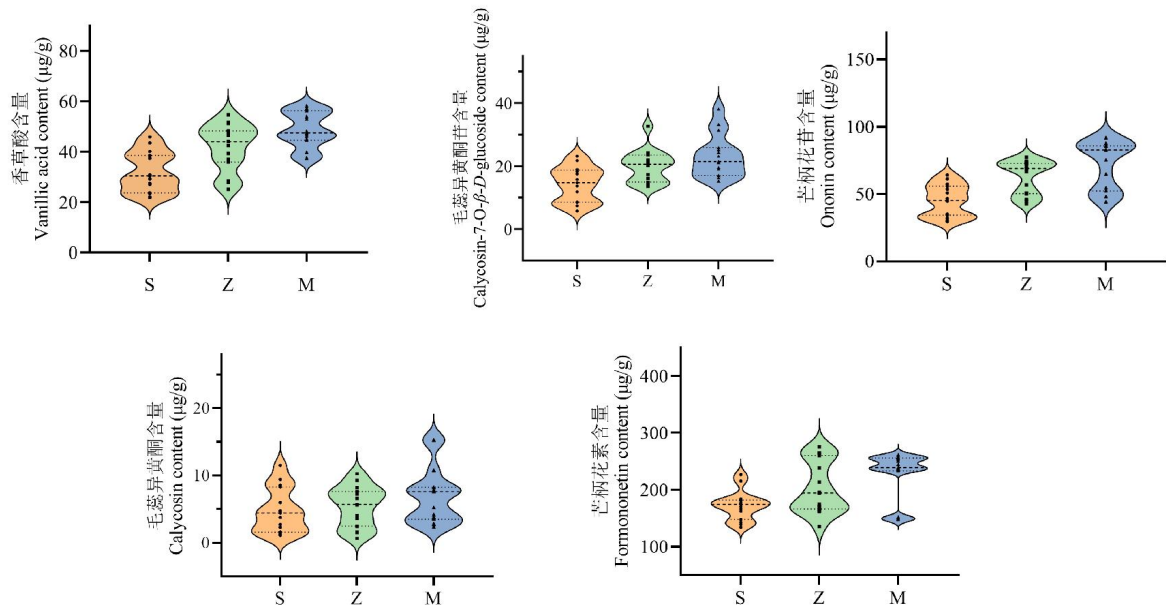


图 9 红芪及其不同炮制品 5 种成分含量测定结果

Fig. 9 Content of five components of Hedysari Radix and its different processed products

表 6 红芪及其不同炮制品含量测定结果 (n=3)

Table 6 Content of Hedysari Radix and its different processed products (n=3)

编号 No.	含量 Content (µg/g)				
	香草酸 Vanillic acid	毛蕊异黄酮苷 Calycosin-7-O-β-D-glucoside	芒柄花苷 Ononin	毛蕊异黄酮 Calycosin	芒柄花素 Formononetin
S1	37.40	21.78	45.17	1.58	184.03
S2	37.37	23.16	46.60	2.70	182.27
S3	38.44	14.71	44.50	1.12	174.74
S4	23.40	7.37	30.19	1.31	139.66
S5	30.78	8.54	34.41	2.29	162.47
S6	23.63	5.74	29.59	1.19	134.26
S7	27.45	8.51	57.31	4.76	166.52
S8	29.20	8.59	55.73	4.69	170.47
S9	22.07	11.88	50.78	3.76	147.98
S10	26.98	15.77	31.97	8.29	174.65
S11	21.78	17.51	34.89	4.42	142.86

S12	30.40	13.69	34.85	5.99	181.29
S13	43.48	18.24	53.67	9.43	176.74
S14	40.12	18.73	64.05	8.54	226.67
S15	45.85	18.96	61.07	11.50	215.61
Z1	36.92	23.53	50.22	1.57	135.07
Z2	39.29	32.68	56.71	4.04	166.02
Z3	35.87	24.04	50.77	3.65	161.00
Z4	51.61	14.95	70.15	6.60	275.49
Z5	51.17	17.39	68.78	7.60	265.39
Z6	54.74	13.66	66.51	10.27	265.18
Z7	48.28	21.91	72.36	0.64	174.42
Z8	47.63	20.93	74.41	2.46	170.59
Z9	47.65	20.15	77.34	1.54	171.07
Z10	25.00	13.57	44.59	5.69	163.02
Z11	27.68	14.38	45.84	5.64	195.47
Z12	28.39	16.16	42.62	7.47	194.34
Z13	43.96	24.25	72.64	7.23	213.39
Z14	46.42	21.18	73.90	9.25	260.22
Z15	42.51	20.59	72.77	8.21	238.43
M1	39.69	25.84	64.74	2.68	151.77
M2	37.47	25.15	54.42	2.82	149.04
M3	37.42	24.29	52.40	2.36	148.18
M4	56.19	21.06	44.12	3.79	236.9
M5	58.05	19.50	47.92	3.51	238.87
M6	56.77	16.27	47.88	4.18	233.36
M7	57.19	21.45	87.65	7.63	256.41
M8	53.00	23.14	91.43	7.82	261.52
M9	53.88	15.24	91.73	8.24	257.59
M10	44.95	16.22	85.49	5.21	254.13
M11	44.52	16.98	82.51	7.57	250.92
M12	46.23	19.01	85.43	7.75	256.06

M13		47.51	31.41	75.14	15.29	237.93
M14		47.12	33.19	82.87	15.24	235.89
M15		48.03	38.15	85.58	10.76	244.41
	S	31.89±7.99	14.21±5.55	44.99±11.78	4.77±3.33	172.01±25.75
均值 Mean	Z	41.81±9.32	19.96±5.17	62.64±12.61	5.46±3.00	203.27±46.30
	M	48.53±7.08	23.13±6.76	71.95±17.89	6.99±4.19	227.53±41.29

2.7 基于灰色关联系数的加权-TOPSIS 模型建立

以红芪不同炮制品共 45 批样品中 5 种成分含量进行无量纲化处理并计算灰色关联系数^[11]，参照 Yang 等^[12]的方法计算红芪不同炮制品各 15 批次的相对接近度，生红芪为 0.116 1~0.447 3，炙红芪为 0.238 3~0.501 1，蜜糠炙红芪为 0.318 9~0.654 2。将红芪不同炮制品共 45 批次的相对接近度值导入 Graphpad prism 9，发现整体相对接近度蜜糠炙红芪>炙红芪>生红芪，说明炮制品优于红芪生品，且蜜糠炙红芪质量较优，结果见图 10。

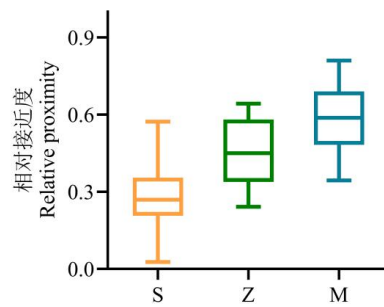


图 10 红芪及其不同炮制品相对接近度值

Fig. 10 Relative proximity values of Hedysari Radix and its different processed products

3 讨论与结论

本研究在前期实验中分别考察了不同提取方式（超声、回流），不同提取溶剂（50%甲醇、80%甲醇、纯甲醇），不同提取时间（0.5 h、1 h、1.5 h），不同流动相（乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%磷酸水），不同检测波长（248 nm、254 nm、280 nm）等条件，发现用纯甲醇超声提取 1 h，以乙腈-0.1%磷酸水为流动相，在 280 nm 条件下得到的图谱基线平整、分离度好，且色谱峰数量较多。

灰色关联系数是各个指标值与指标值中理想值的相关度，反映了指标值变异程度^[13]。不同于以往中药质量评价研究中运用的熵权法，本研究在指纹图谱及含量测定结果的基础上，直接利用灰色关联系数矩阵计算信息熵，对各指标赋予权重值，进而构建加权-TOPSIS 算法模型，综合评价红芪生品及其不同炮制品质量，不仅能避免主观因素对品质评价的影响，解决指标值异向和指标间量纲相差较大影响权重设置的问题，还极大地简化了计算过程，最大程度发挥灰色关联度法和熵权法的优势，实现中药内在质量的有效表征^[9]。在建立的加权-TOPSIS 算法模型中，红芪不同炮制品各 15 批次的整体相对接近度值为蜜糠炙红芪>

炙红芪>生红芪,说明红芪炮制品质量优于生品,且炮制品中蜜糠炙红芪质量最好,这与PCA综合得分的结果趋势一致,进一步说明了该模型用于评价红芪不同炮制品质量的稳定性和可靠性。

根据Q-Marker理论的“五要素”,有研究推测毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、美迪紫檀素、 γ -氨基丁酸等成分为红芪的质量标志物^[14]。在“五要素”的基础上,另有研究采用网络药理学等手段筛选出芒柄花苷、香草酸、毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷5种成分为炙红芪发挥补中益气功效的质量标志物^[15]。现代研究表明,香草酸为酚酸类化合物,具有抗氧化、抗血栓等作用^[16]。毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷均为黄酮类化合物,可通过抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用发挥双向免疫调节作用^[17],其中芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮等成分是红芪发挥免疫调节作用的潜在核心化合物^[18]。本研究中PCA发现芒柄花素对主成分1的影响较大,芒柄花苷和香草酸对主成分4的影响较大,毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮主要影响主成分5;OPLS-DA筛选出芒柄花素为生红芪与炙红芪的差异成分之一,而生红芪与蜜糠炙红芪的差异成分包括香草酸、芒柄花苷、芒柄花素等。这提示上述5种成分含量的变化可能是引起红芪炮制前后补中益气作用差异的原因之一。因此,本研究在红芪质量评价中以上述5种成分的含量作为评价指标。

含量测定结果发现,与红芪生品相比,药典法炙红芪和蜜糠炙红芪样品中5种成分的整体含量均升高。这一结果与部分现有报道不一致。既往研究认为在炮制过程中苷键断裂,毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷含量降低,对应的苷元毛蕊异黄酮和芒柄花素含量升高^[4,19]。对比分析发现,上述结果差异可能与饮片炮制方法及辅料的引入有关。首先,在饮片炮制方法上,本研究采用传统炒制法,经前期工艺优选,以锅底温度 $190\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 炒制13 min,实测炙红芪、蜜糠炙红芪炮制过程物料温度分别为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$;而牛江涛等人采用的是烘干法,将与蜜水溶液拌润好后的红芪饮片于烘箱中 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘2.5 h^[4,19]。故推测长时间加热会促进毛蕊异黄酮苷及芒柄花苷的酸水解反应。苷类成分经长时间加热,在蜂蜜中有机酸的作用下,脱掉糖基转化为相应的苷元^[20]。其次,辅料蜂蜜和蜜糠的引入提高了成分的稳定性,促进成分溶出^[21]。蜂蜜作为一种天然共熔混合物,能与溶质形成分子间作用力,具有保护成分稳定、提高提取率、促进药物吸收的作用^[22]。传统炒制过程不断翻炒,使分布在饮片表面的蜂蜜吸收更为均衡;此外,辅料蜜糠的加入保障了炒制过程饮片均匀受热,提高了成分的稳定性,这也可能是蜜糠炙红芪整体含量高于药典法炙红芪的原因之一。

综上,本研究建立了红芪生品及其不同炮制品的指纹图谱及多指标含量测定方法,建立的加权TOPSIS算法模型合理可靠。质量综合评价结果表明红芪不同炮制品质量优于红芪生品,且蜜糠炙红芪质量优于药典法炙红芪,为更全面阐明蜜糠炙红芪饮片的优势,后续将利用电子鼻、液质联用等现代技术方法,探究蜜糠炙红芪炮制前后化学成分变化,阐明其炮制科学内涵,为建昌帮特色炮制品蜜糠炙红芪的质量控制体系及传承推广运用提供科学基础。

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)[S].Beijing:China Medical Science Press,2020:108.
- 2 Niu JT,Cao R,Si XL,et al.Intervention effects of Hedysari Radix and honey-processing Hedysari Radix on immune function of rats with spleen qi deficiency[J].Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2020,40:265-268.
- 3 Zhang YG,Zhang SJ,Niu JT,et al.Comparative study of Astragali Radix Praeparata cum Melle and Hedysari Radix Praeparata cum Melle on spleen Qi deficiency rats[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2021,46:5641-5649.
- 4 Niu JT,Cao R,Bian TT,et al.Comparison of effects of Hedysari Radix and Hedysari Radix Praeparata cum Melle on Buzhong Yiqi and differential analysis of its chemical compositions[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2019,50:3107-3112.
- 5 Chen LH,Xiao FL,Huang SY,et al.Research ideas and innovation development trends of quality evaluation of Chinese materia medica[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2021,52:2541-2547.
- 6 Li YX,Xing N,Bai HD,et al.Study on quality evaluation of Notoginseng Radix et Rhizoma and its processed products from different producing areas by grey correlation method and TOPSIS method based on entropy weight method[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2023,54(4):1252-1259.
- 7 Shi YS,Wan Q,Wang QL,et al.Research on grades of vine tea based on entropy TOPSIS method and grey correlation analysis[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2022,53:5504-5512.
- 8 Li HY,Wang HR,Na LS,et al.Quality evaluation of Panacis Majoris Rhizoma from different producing areas by PCA,OPLS-DA and weighted TOPSIS-GRA fusion model[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2024,55:3116-3126.
- 9 Sun HY,Wang XJ.Application of entropy weight method based on grey cognate analysis in enterprise performance evaluation[J].J Nat Sci Heilongjiang Univ(黑龙江大学自然科学学报),2016,33:581-586.
- 10 Zhang JL,Ye XW,Xia LT,et al.Preparation method of honey chaff(蜜糠的制备方法):CN201911298499.8[P].2020-01-24.
- 11 Liu W,Liu Y,Liu JB,et al.Study on spectrum-effect relationship of anti-inflammatory effect of different polar parts of *Ampelopsis grossedentata* in mice based on grey relational analysis[J].J China Pharm(中国药房),2020,31:2382-2386.
- 12 Yang Y,Yang S,Yang FQ,et al.Entropy-weighted TOPSIS model in quality comprehensive evaluation of *Zanthoxylum armatum* DC.[J].J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报),2022,45:5-10.
- 13 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[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2021,52:2831-2842.
- 14 Zhang SJ.Quality evaluation of Astragali Radix Praeparata cum Melle and Hedysari Radix Praeparata cum Melle based on quality markers of traditional Chinese medicine control research[D].Lanzhou:Gansu University of Chinese Medicine(甘肃中医药大学),2022.
- 15 Yan QQ,Wang JC,Zhang WY.Evaluation of quality of *Valeriana officinalis* from different origins based on multi indicator component quantitative combined chemometrics,weighted TOPSIS,and grey relational degree fusion model[J].Drug Eval

Res(药物评价研究),2024,47:1305-1315.

- 16 Du GH,Wang HG,Kong LL,et al.Application of vanillic acid in preparation of antiplatelet and antithrombotic drugs(香草酸在制备抗血小板、抗血栓形成药物中的应用):CN201910264389.3[P].2020-10-16.
- 17 Liu SR,Li XR,Liu SB,et al.Research progress on immunoregulatory effect and mechanism of active components of Hedysari Radix[J].J Food Saf Food Qual(食品安全质量检测学报),2024,15:130-137.
- 18 Luo XD,Li XR,Li CY,et al.Exploration the immune regulatory mechanism of Hedysari Radix based on network pharmacology,molecular dynamics,and UPLC-MS/MS[J].Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理),2024,35:376-383.
- 19 Niu JT,Cao R,Si XL,et al.Study on composition difference of Hedysari Radix before and after honey-processing based on multiple statistical analysis[J].Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2021,28:93-97.
- 20 Liu PP,Shan GS,Zhang F,et al.Comparison of 12 constituents of Astragali Radix directionally processed with organic acid by UPLC-MS[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2020,45:113-118.
- 21 Cai JF,Dai YT,XiaoYQ,et al.Systemic evaluation of effect of honey-processing on therapeutical basis of Astragalus Radix[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2016,22:47-52.
- 22 Dai YT,Choi YH,Verpoorte R.Honey in traditional Chinese medicine:a guide to future applications of NADES to medicines[J].Adv Bot Res,2020,97:361-384.

收稿日期: 2024-07-23

接受日期:

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究专项(2018YFC1707206); 江西省中医药标委会标准化项目(2021B01); 江西省高水平本科教学团队(2252201013); 横向课题(53522058/2004)

*通信作者 E-mail: jxjzzjl@163.com, 20030768@jxutcm.edu.cn.