

不同产地黄芪药材质量的差异性分析

段琦梅^{1,2}, 梁宗锁^{1,2}, 杨东风^{1,2}, 聂小妮^{1,2}, 刘 婷¹, 兰晓继¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省中药指纹图谱与天然产物库研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】结合《中国药典》(2005 年版)规定指标及 HPLC 指纹图谱, 对不同来源黄芪药材质量进行综合评价。【方法】测定来源于甘肃渭源、吉林舒兰、陕西凤县、甘肃陇西、山西浑源、陕西旬邑和陕西杨凌 7 个产区黄芪的总灰分、酸不溶性灰分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物及黄芪甲苷的含量; 建立黄芪药材样品的 HPLC 指纹图谱; 对不同产地黄芪药材的质量指标和指纹图谱进行比较分析。【结果】不同产地黄芪样品的总灰分和水溶性浸出物均符合《中国药典》标准; 醇溶性浸出物存在一定差异性; 黄芪甲苷含量差异较大; 不同样品 HPLC 指纹图谱共有 15 个共有峰, 图谱间相似性较高。【结论】不同产地黄芪药材质量存在差异, 多个指标综合评价能够更准确地反映黄芪药材的质量。

【关键词】 黄芪; 药材质量; HPLC 指纹图谱

【中图分类号】 R282. 710. 5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0187-05

Quality diversity analysis of Radix Astragali from different habitats

DUAN Qi-mei^{1,2}, LIANG Zong-suo^{1,2}, YANG Dong-feng^{1,2},
NIE Xiao-ni^{1,2}, LIU Ting¹, LAN Xiao-ji¹

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Research Center in Traditional Chinese Medicine Fingerprint & Natural Product Library, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study evaluated the quality of Radix Astragali collected from different habitats with a combination of Chinese Pharmacopoeia (Edition 2005) indexes and HPLC fingerprint method. 【Method】 The contents of total ash, acid insoluble ash, watery extract, ethanolic extract and contents of astragaloside IV of Radix Astragali from Weiyuan Gansu, Shulan Jilin, Fengxian Shaanxi, Longxi Gansu, Hanyuan Shanxi, Xunyi Shaanxi, Yangling Shaanxi were determined; the fingerprint of Radix Astragali from different habitats was established by HPLC methods; and the quality indexes and fingerprint were compared and analyzed. 【Result】 All contents of total ash and watery extract reached the pharmacopeia standards; some differences existed among ethanolic extracts of different samples; the contents of astragaloside IV had obvious difference among the different Radix Astragali; there were 15 common peaks in the HPLC fingerprints and the fingerprints had high similarity. 【Conclusion】 The quality of Radix Astragali from different habitats was different. Multi-indices to assess the quality of Radix Astragali could make assessment result more accurate.

Key words: Radix Astragali; quality; HPLC fingerprint

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.)

Hisao) 或膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.) 的干燥根, 为常用大宗药材, 主要功

* [收稿日期] 2010-06-04

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAD98B08); 农业部 DUS 测试品种信息(200903008-11)

[作者简介] 段琦梅(1969—), 女, 陕西蓝田人, 讲师, 在读博士, 主要从事药用植物学研究。E-mail: duanqimei1969@163.com

[通信作者] 梁宗锁(1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物学研究。E-mail: Liangzs@ms.iswc.ac.cn

能为补气固表,利尿脱毒,排脓,敛疮生肌^[1]。黄芪为我国历来最被推崇的补气药之一,始载于《神农本草经》^[2]。黄芪主要含皂苷类、黄酮及其苷类和多糖类成分^[3],广泛用于治疗心血管疾病、肾病、乙肝等,具有增强免疫机能的功效。

由于黄芪属植物分布广泛,种类较多,全国各地均有种植,但不同产区黄芪药材的质量差异很大^[4-5],对药品生产不同批次间的质量控制影响较大。目前,对黄芪的质量评价研究多集中在含量测定、性状比较、黄芪复方的质量标准等方面^[6-10],而对不同产区黄芪药材的质量差异及其原因分析研究较少。

HPLC 指纹技术是利用高效液相色谱仪,宏观分析研究对象复杂的化学特征信息,以整体性和模糊性原则,定性定量反映医药植物遗传物种差异性,及后天个体差异性的技术,因此利用建立的指纹图谱对药材质量进行评价是一个很好的方法。本研究收集了甘肃、山西、陕西、吉林等产区的黄芪,利用 HPLC 方法建立黄芪 HPLC 指纹图谱,结合《中国药典》(2005 年版)中规定的总灰分等指标的测定,对黄芪药材的各项质量指标进行研究;同时,将这些指标结合起来,对不同来源黄芪药材质量的差异性进行综合分析和系统研究,旨在揭示不同区域黄芪药材质量的差异性及其产生的原因,为满足不同药品生产的需要提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试黄芪 供试黄芪样品分别来自甘肃渭源、山西浑源、甘肃陇西、吉林舒兰、陕西凤县、陕西旬邑、陕西杨凌等 7 个产区。经西北农林科技大学生命科学院药用植物教研室张跃进副教授鉴定为黄芪(*Astragalus membranaceus*)。

1.1.2 主要仪器与试剂 Waters 1525 二元高效液相色谱仪、Waters 2996 二极管阵列检测器、Waters SunFire C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm)、Empower2 色谱分析软件,美国 Waters 公司生产;Unimicro ELSD-UM3000 检测、Trisep-2003 色谱分析软件,上海通微分析技术有限公司;优普超纯水机,上海优普科技公司生产。黄芪甲苷对照品(批号:110781-200512),购自中国药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯,美国 Tedia 公司生产。

1.2 总灰分及浸出物含量的测定

总灰分及酸不溶性灰分、水溶性浸出物、醇溶性

浸出物含量采用《中国药典》(2005 年版)的方法测定^[1]。

1.3 黄芪甲苷含量的测定及指纹图谱的建立

1.3.1 HPLC 色谱条件及标准曲线 (1) 色谱条件。Waters SunFire C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相为乙腈 A—蒸馏水 B,梯度洗脱: $t=0$ min,4% A; $t=20$ min,25% A; $t=40$ min,45% A; $t=56$ min,65% A; $t=60$ min,80% A; $t=70$ min,90% A; $t=75$ min,100% A,流速 1.0 mL/min;ELSD 漂移管温度 75 ℃,氮气流速 2.5 L/min。

(2) 标准曲线。精密称取黄芪甲苷对照品,用甲醇配成 1.4 mg/mL 的储备液。精密量取该储备液 0.1 mL,置于 5 mL 容量瓶中,加入甲醇溶液 5 mL,摇匀后定容,即为黄芪甲苷对照品工作液。分别取黄芪甲苷对照品工作液 0,2,4,6,8,10 μL,注入色谱仪,在上述色谱条件下测定峰面积。以峰面积值为纵坐标,黄芪甲苷质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.9685X+3.9567$, $R^2=0.9988$ 。

1.3.2 黄芪甲苷含量的测定 精密称取黄芪样品粉末各 1.0 g,置具塞锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇溶液,超声提取 45 min,冷却,过滤,将提取物溶液转入 250 mL 圆底烧瓶中,旋转蒸发仪蒸干甲醇,精密加入 10 mL 色谱级甲醇溶解,并转移至 10 mL 容量瓶中,用孔径 0.45 μm 滤膜过滤后,即得待测液。将待测液在 1.3.1(1)色谱条件下,进样量为 20 μL,测定峰面积,根据 1.3.1(2)中的标准曲线计算黄芪甲苷含量。

1.3.3 黄芪 HPLC 指纹图谱的建立及方法学考察 采用 1.3.2 中的方法,制得不同黄芪样品待测液进行 HPLC 分析。进样量为 20 μL,记录谱图,找出谱图间的共有峰,进行相关系数及相似度计算,建立黄芪药材 HPLC 指纹图谱。

(1) 精密度试验。取陕西旬邑黄芪样品,采用 1.3.2 中的方法制得供试品溶液,连续进样 6 次,以峰面积较大且稳定的 11 号峰为参照峰,对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。

(2) 重复性试验。取陕西旬邑黄芪样品,采用 1.3.2 中的方法制得供试品溶液 6 份,分别进样,以峰面积较大且稳定的 11 号峰为参照峰,对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。

(3) 稳定性试验。取陕西旬邑黄芪样品,采用 1.3.2 中的方法制得供试品溶液,分别于 0,4,8,12,24 h 进样分析,以峰面积较大且稳定的 11 号峰为参

照峰,对各主要共有色谱峰相对保留时间和相对峰面积进行统计。

1.4 数据处理

试验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同产地黄芪总灰分和酸不溶性灰分含量的比较

不同产地黄芪总灰分和酸不溶性灰分的含量见表 1。

表 1 不同产地黄芪样品总灰分和酸不溶性灰分含量的比较

Table 1 Comparison of the contents of total ash and acid-insoluble ash of different Radix Astragali samples

来源 Origin	g/kg	
	总灰分 Total ash	酸不溶性灰分 Acid-insoluble ash
甘肃渭源 Weiyuan,Gansu	42.24 a	9.94 ab
吉林舒兰 Shulan,Jilin	44.00 a	11.96 ab
陕西凤县 Fengxian,Shaanxi	45.32 a	7.97 ab
甘肃陇西 06 Longxi,Gansu 06	45.27 a	11.94 ab
山西浑源 Hunyuan,Shanxi	31.86 b	4.98 ab
甘肃陇西 05 Longxi,Gansu 05	30.78 b	2.98 b
陕西旬邑 Xunyi,Shaanxi	49.75 a	13.11 a
陕西杨凌 Yangling,Shaanxi	31.05 b	3.50 ab

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note:Different letters in a column mean significant difference in different samples($P<0.05$). The same below.

从表 1 可以看出,不同黄芪总灰分和酸不溶性灰分存在着明显的差异。所测黄芪样品总灰分含量最高为 49.75 g/kg,最低为 30.78 g/kg,平均为 40.0 g/kg;酸不溶性灰分含量最高为 13.11 g/kg,最低为 2.98 g/kg,平均为 8.30 g/kg。方差分析结

表 2 不同产地黄芪样品水溶性浸出物、醇溶性浸出物和黄芪甲苷含量的比较

Table 2 Comparison of the contents of watery extract,ethanolic extract and astragaloside IV of different Radix Astragali

产地 Habitat	浸出物/(g·kg ⁻¹) Extract		黄芪甲苷/(mg·g ⁻¹) Astragaloside IV content
	水溶性 Watery	醇溶性 Ethanolic	
甘肃渭源 Weiyuan,Gansu	307.53 d	122.71 b	0.011 3 c
吉林舒兰 Shulan,Jilin	298.97 e	114.81 b	0.186 2 b
陕西凤县 Fengxian,Shaanxi	275.12 f	111.14 b	0.437 7 a
甘肃陇西 06 Longxi,Gansu 06	310.47 d	123.58 b	0.088 9 c
山西浑源 Hunyuan,Shanxi	318.56 c	123.57 b	0.235 3 b
甘肃陇西 05 Longxi,Gansu 05	433.55 a	168.82 a	0.032 5 c
陕西旬邑 Xunyi,Shaanxi	243.05 g	97.77 c	0.195 0 b
陕西杨凌 Yangling,Shaanxi	331.33 b	98.16 c	0.081 9 c

2.2.3 黄芪甲苷含量 表 2 表明,不同产地黄芪样品的黄芪甲苷含量差异较大,其中陕西凤县最高,达

果表明,陕西旬邑黄芪样品中总灰分含量最高,与甘肃渭源、吉林舒兰、陕西凤县、甘肃陇西 06 黄芪样品无显著性差异,可将其分为第 1 组;而山西浑源、甘肃陇西 05、陕西杨凌黄芪样品无显著性差异,可将它们分为第 2 组。第 1 组 5 个黄芪样品的总灰分含量显著高于第 2 组。供试的 8 个黄芪样品中,陕西旬邑黄芪样品酸不溶性灰分含量最高,甘肃陇西 05 的最低,两者差异显著,但与其他样品无显著性差异。

2.2 不同产地黄芪浸出物和黄芪甲苷含量的比较

2.2.1 水溶性浸出物 按照《中国药典》(2005 年版)的规定,黄芪中水溶性浸出物含量不得少于 170 g/kg^[1]。表 2 显示,不同产地黄芪样品的水溶性浸出物含量都显著高于《中国药典》的标准,但各样品之间存在一定差异,其中水溶性浸出物含量最高的是甘肃陇西 05 样品,为 433.55 g/kg,最低的是陕西旬邑的样品,为 243.05 g/kg,平均为 314.8 g/kg。方差分析结果表明,除甘肃渭源和甘肃陇西 06 样品之间无显著性差异外,其他样品之间均有显著差异。由此可见,各地产黄芪的水溶性浸出物含量均较高,且差异显著,《中国药典》(2005 年版)规定的水溶性浸出物含量偏低,应提高到 200 g/kg 以上。

2.2.2 醇溶性浸出物 表 2 显示,所有黄芪样品的醇溶性浸出物含量均在 97.77 g/kg 以上,最高达到 168.82 g/kg,平均为 120.07 g/kg。方差分析结果表明,甘肃陇西 05 样品含量最高,与其他样品差异显著;甘肃渭源、吉林舒兰、陕西凤县、甘肃陇西 06、山西浑源黄芪样品无显著差异,但均显著高于陕西旬邑和杨凌的黄芪样品;陕西旬邑和杨凌的黄芪样品含量无显著差异,但均显著低于其他黄芪样品。

到 0.437 7 mg/g,其次为山西浑源,为 0.235 3 mg/g;甘肃渭源的最低,为 0.011 3 mg/g。

2.3 黄芪 HPLC 指纹图谱的建立与比较

2.3.1 共有峰的确定 对黄芪样品进行测定分析,比较其色谱图,共确定 15 个共有峰(图 1)。经与对照品对比后确认 6 号峰为黄芪甲苷。由于黄芪甲苷的含量小,峰面积易受提取和色谱条件的影响,不宜选作参照峰,因此本研究以峰面积较大且稳定的 11 号峰为参照峰,计算其他各峰的相对保留时间,结果表明,15 个共有峰相对保留时间的相对标准偏差均在 1.0%以下,且不同样品间各共有峰光谱图较为一致,说明 15 个共有指纹峰确认结果较为可靠,可用于建立黄芪药材对照指纹图谱。对照指纹图谱的 1~15 共有峰的保留时间分别为 21.175,27.432,28.432,30.12,30.949,35.654,37.597,38.282,40.954,43.898,47.246,48.917,55.969,57.485,60.532 min,对应的峰面积分别为 71 170.25,

10 755.43, 35 281.88, 27 598.75, 29 923.75, 12 326.13,14 047,23 332.75,90 490.38,31 772.5, 680 444.9,11 242.75,31 337,13 618.5,7 890。

2.3.2 HPLC 指纹图谱的方法学考察 (1)精密度试验。连续进样 6 次各主要共有色谱峰相对峰面积的相对标准偏差均小于 2.5%,相对保留时间的相对标准偏差均小于 0.34%,表明仪器精密度良好。

(2)重复性试验。6 份供试品溶液各主要共有色谱峰相对峰面积的相对标准偏差均小于 3.44%,相对保留时间的相对标准偏差均小于 0.19%,表明方法的重复性良好。

(3)稳定性试验。0,4,8,12,24 h 进样后,各主要共有色谱峰相对峰面积的相对标准偏差均小于 3.06%,相对保留时间的相对标准偏差均小于 0.20%,表明样品在 24 h 内稳定。

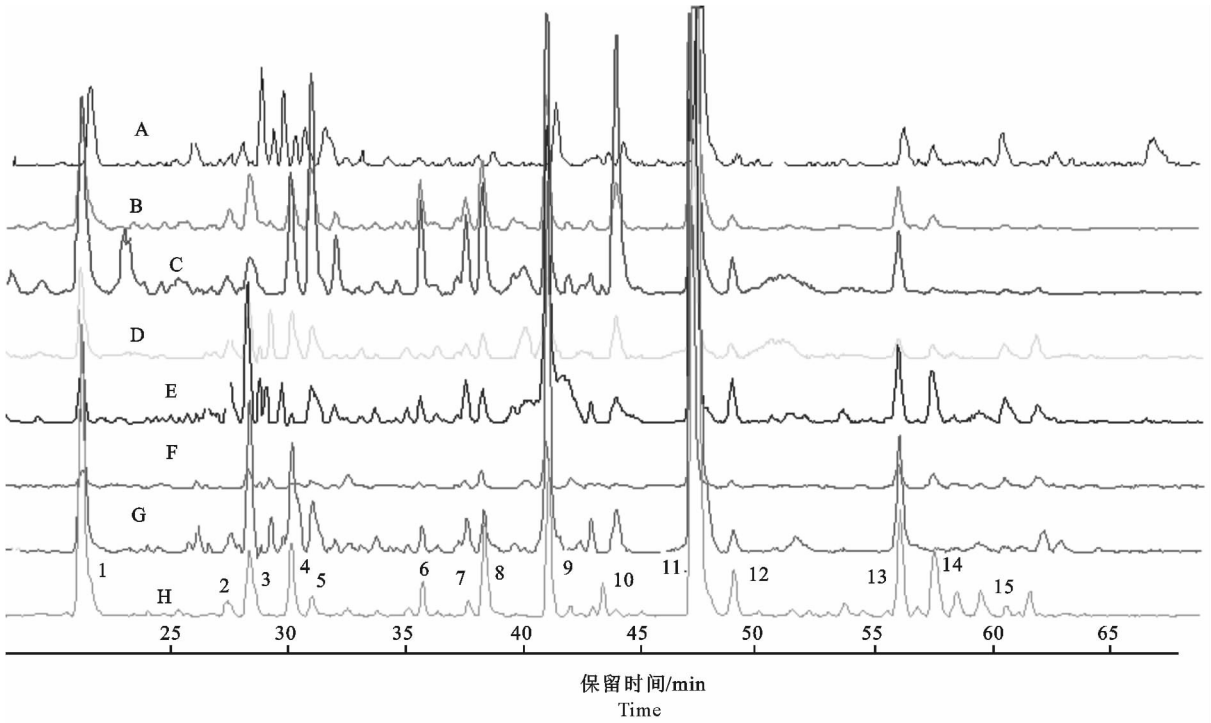


图 1 不同产地黄芪 HPLC 指纹图谱

1~15. 表示 15 个共有峰; A—H. 表示不同的黄芪样品,其中 A. 甘肃渭源; B. 吉林舒兰; C. 陕西凤县; D. 甘肃陇西 06; E. 山西浑源; F. 甘肃陇西 05; G. 陕西旬邑; H. 陕西杨凌

Fig.1 HPLC fingerprint of Radix Astragali from different habitats

1—15. Mean 15 common peaks; A—H. Mean different samples, A. Weiyuan, Gansu; B. Shulan, Jilin; C. Fengxian, Shaanxi; D. Longxi, Gansu 06; E. Hunyuan, Shanxi; F. Longxi, Gansu 05; G. Xunyi, Shaanxi; H. Yangling, Shaanxi

2.3.3 相似度评价 利用相似度评价软件对不同产地黄芪的 HPLC 图谱进行分析,各个不同来源黄芪的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度分别为 0.995,0.998,0.992,0.999,0.943,0.915,0.996,0.995,表明不同产地黄芪药材图谱与对照指纹图谱

间具有较高的相似性,所建立的指纹图谱稳定可靠。

2.3.4 不同产地黄芪 HPLC 指纹图谱的比较 通过此方法建立的黄芪药材 HPLC 指纹图谱中,各样品的指纹图谱中共有峰相对保留时间具有良好的一致性,图谱相似度高(图 1)。同时,由图 1 还可以看

出,各个样品具有共性的同时也能体现出各样品的个性,如各共有峰对应的峰面积存在一定差异,反映出各样品间共有的成分是一定的,但是由于是不同来源以及包含不同的品种,各种因素的影响造成相对应成分含量存在一定差异。

3 讨 论

不同产地黄芪质量的差异,可能是由于种间差异、气候因素、生产栽培技术等因素引起的^[11-13]。药用植物有效成分多为植物的次生代谢产物,而次生代谢产物的产生与环境有密切关系。外界生态环境条件的不同,会导致相同品种药用植物次生代谢过程的变化,从而影响同一品种药材的内在质量^[14-15]。本研究以甘肃、陕西、山西、吉林等省黄芪主产区的黄芪样品为材料,分别对其灰分、酸不溶性灰分、浸出物、黄芪甲苷含量进行分析,结果表明,不同产地黄芪样品的灰分、酸不溶性灰分、浸出物基本都符合《中国药典》(2005 年版)的规定,其中陕西旬邑样品的总灰分及酸不溶性灰分含量分别为 49.75 和 13.11 g/kg,均高于其他产地的样品,甘肃陇西 05 的最低,分别为 30.78 和 2.98 g/kg;甘肃陇西 05 的水溶性浸出物含量为 433.55 g/kg,显著高于其他产地的样品,陕西旬邑的水溶性浸出物含量为 243.05 g/kg,显著低于其他样品;不同来源黄芪中黄芪甲苷含量的差异显著,其中陕西凤县的样品最高,黄芪甲苷含量为 0.437 7 mg/g,甘肃渭源的仅为 0.011 3 mg/g。由于本研究中所选黄芪产地的经纬度、年平均温度、降水量、年日照时数、年积温、无霜期、土壤等生态因子存在较大差异,因此可以推测不同来源的黄芪药材质量与产地的生态因子密切相关。

本研究结果表明,所有样品的醇溶性浸出物含量均在 97.77 g/kg 以上,最高达到 168.82 g/kg,平均为 120.07 g/kg。在《中国药典》(2005 年版)中虽然只要求测定黄芪样品的水溶性浸出物含量,但在黄芪活性有效成分中含有很多的脂溶性成分,如黄酮类、皂甙类等,因此在本试验中,同时测定其中醇溶性浸出物含量,可以为进一步评定黄芪样品质量提供一定的参考依据。

由于中药材成分的复杂性,采用 1 种或几种指标性成分已经不能准确地反映其真实质量。中药指纹图谱能够从整体上来表征中药的内在特征,目前已成为国际上公认的控制天然药物质量的有效手段,通过建立药材指纹图谱能有效全面地对中药材的质量进行控制^[16-18]。本研究建立了黄芪药材

HPLC 指纹图谱,所建立的对照指纹图谱有 15 个共有峰,不同黄芪样品的图谱与对照图谱的相关系数均在 0.915 以上,显示不同样品与对照图谱具有较高的相似性。表明所建立的指纹图谱中色谱峰分离度好,特征明显。此方法的精密度、稳定性和重复性均符合指纹图谱研究的技术要求,可作为不同产地黄芪药材评价和质量控制的科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005:212.
Nation Pharmacopoeia Committee. China pharmacopoeia [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2005:212. (in Chinese)
- [2] 顾观光. 神农本草经 [M]. 北京:人民卫生出版社,1955:101.
Gu G G. Shennong's herbal classic [M]. Beijing: People's Medical Publishing House,1955:101. (in Chinese)
- [3] 陈国辉,黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志,2008,17(17):1482-1485.
Chen G H, Huang W F. Progress in pharmacological effects of compositions of *Astragalus membranaceus* [J]. Chinese Journal of New Drugs,2008,17(17):1482-1485. (in Chinese)
- [4] 赵一之. 中药黄芪植物分类及其区系地理分布研究 [J]. 植物研究,2006,26(5):532-538.
Zhao Y Z. Taxonomy and floristic geographical distribution of the Chinese medicinal Huangqi [J]. Bulletin of Botanical Research,2006,26(5):532-538. (in Chinese)
- [5] 曹建军. 中药黄芪种质资源及环境因素对品质的影响 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2006.
Cao J J. Studies on idioplasm resource of Chinese traditional medicine *Astragalus* and on effects of environmental factors on quality [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2006. (in Chinese)
- [6] 梁 伟. 不同产地黄芪及其药用部位的质量考察 [J]. 时珍国医国药,2008,19(2):432-433.
Liang W. Qualitative investigation on different areas and medicinal parts of Radix Astragali [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2008,19(2):432-433. (in Chinese)
- [7] 夏广萍,刘 鹏,韩英梅. 不同处理方法和不同产地黄芪药材中黄芪甲苷的含量测定 [J]. 中药材,2008,31(3):385-387.
Xia G P, Liu P, Han Y M. Determination of the total content of astragaloside IV in Radix Astragali [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2008,31(3):385-387. (in Chinese)
- [8] 石子仪,鲍 忠,姜 勇,等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析 [J]. 中国中药杂志,2007,32(9):779-783.
Shi Z Y, Bao Z, Jiang Y, et al. Quantitative analysis of calycosin glycoside and formononetin in Radix Astragali from different sources [J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2007,32(9):779-783. (in Chinese)