

引用:张贵赋,廖鑫,龚年春,彭艳梅. 不同产地黄芪药材 HPLC 指纹图谱及其聚类研究[J]. 湖南中医杂志,2021,37(8): 181-184,187.

# 不同产地黄芪药材 HPLC 指纹图谱及其聚类研究

张贵赋<sup>1</sup>,廖鑫<sup>2</sup>,龚年春<sup>2</sup>,彭艳梅<sup>2</sup>

(1. 湖南省药品审核查验中心,湖南长沙,410013;

2. 湖南省中医药研究院中药研究所,湖南长沙,410013)

**[摘要]** 目的:建立黄芪药材高效液相色谱指纹图谱分析方法。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 A:乙腈-甲醇(90:10),流动相 B:0.2%甲酸溶液,梯度洗脱,流速:0.7 ml/min,柱温:30℃;进样量:10 μl;检测波长:254 nm。结果:通过方法学考察及 17 批样品的测定,建立了黄芪药材的 HPLC 指纹图谱,确定了 10 个共有峰,3 个产地 17 批黄芪药材特征峰的相似度在 0.92 以上,各产地黄芪药材有一定的差异性。主成分分析中前 3 个主成分累计贡献率为 92.0%,说明这 3 个主成分包含了被分析样本的绝大部分信息。聚类分析按产地将 17 批黄芪药材聚为 3 类。结论:本文所建立的方法准确、可靠,可用于评价和控制不同产地黄芪药材的质量。

**[关键词]** 黄芪;高效液相色谱法;指纹图谱;实验研究

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.08.059

## A cluster analysis of high-performance liquid chromatography fingerprints of *Astragalus membranaceus* from different producing areas

ZHANG Guifu<sup>1</sup>, LIAO Xin<sup>2</sup>, GONG Nianchun<sup>2</sup>, PENG Yanmei<sup>2</sup>

(1. Hunan Provincial Center for Drug Inspection, Changsha 410013, Hunan, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China)

**[Abstract]** Objective: To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint analysis method for *Astragalus membranaceus*. Methods: HPLC was performed on an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase A of acetonitrile-methanol (90:10) and mobile phase B of 0.2% formic acid solution for gradient elution, at a flow rate of 0.7 ml/min, a column temperature of 30℃, a sample size of 10 μl, and a detection wavelength of 254 nm. Results: The HPLC fingerprints of *Astragalus membranaceus* were established based on methodological analysis and measurement of 17 batches of samples, and a total of 10 common peaks were identified. The similarity of characteristic peaks was above 0.92 for the 17 batches of *Astragalus membranaceus* from three producing areas, and there was a certain difference between *Astragalus membranaceus* from different producing areas. The principal component analysis showed that the top three principal components had a cumulative contribution rate of 92.0%, suggesting that these three principal components contained most of the information of the samples analyzed. The cluster analysis showed that the 17 batches of *Astragalus membranaceus* were clustered into three categories based on producing area. Conclusion: The method established in this study is accurate and reliable and can be used for quality assessment and control of *Astragalus membranaceus* from different producing areas.

**[Keywords]** *Astragalus membranaceus*; high-performance liquid chromatography; fingerprint; experimental study

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Radix astragali* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Radix astragali* (Fisch.) Bge. 的干燥根。作为临床上广泛应用的一味中药,黄芪具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通

痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明,黄芪中含有黄酮类、皂苷类、多糖类等化学成分<sup>[2-3]</sup>,对免疫性疾病<sup>[4]</sup>、机体能量代谢疾病、血液病及心血管疾病等有治疗作用<sup>[5-8]</sup>。

**基金项目:**湖南省传统中药制剂质量评价和溯源工程技术研究中心项目(2018TP2035)

**第一作者:**张贵赋,男,主治医师,研究方向:药品标准研究

**通讯作者:**彭艳梅,女,博士,研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药学,E-mail:271853145@qq.com

黄芪主产于我国内蒙古自治区、山西和甘肃三省,不同地区所产黄芪质量有一定的差别<sup>[9]</sup>。不同批次的药材药效成分含量亦各有差异。如黄芪原药材,有的药材毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量较高,有的则低于药材标准。而药材中的药效成分含量及各成分之间的比例关系都影响到药材的质量。目前对黄芪质量控制较为单一,无法全面反映黄芪药材质量。近年来,虽然黄芪指纹图谱的研究取得了一定进展<sup>[10-11]</sup>,但是考察的批次较少,缺乏一定的代表性。本实验通过对3个产地的17批次黄芪药材进行指纹图谱研究,以期达到能够更全面、有效地控制黄芪药材质量和产地的目的。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 安捷伦1260-II型高效液相色谱仪;分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];恒温水浴锅(江苏金坛市中大仪器厂)。

1.2 试剂 毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号:111920-201606,中国食品药品检定研究院);芒柄花素(批号:111703-201504,中国食品药品检定研究院);毛蕊异黄酮(批号:20575-57-9,宝鸡市辰光生物科技有限公司);芒柄花苷(批号:486-62-4,宝鸡市辰光生物科技有限公司);甲醇、乙腈均为色谱纯,Sigma-Aldrich公司;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。17批次黄芪药材产地信息详见表1。

表1 黄芪药材产地批次表

编号	产地	编号	产地
S1	山西大同市浑源县	S10	内蒙古包头市固阳县
S2	山西大同市浑源县	S11	内蒙古包头市固阳县
S3	甘肃陇西县	S12	内蒙古包头市固阳县
S4	甘肃渭源县	S13	内蒙古包头市固阳县
S5	甘肃陇西县	S14	内蒙古土默特右旗
S6	甘肃陇西县	S15	内蒙古土默特右旗
S7	甘肃岷县	S16	内蒙古土默特右旗
S8	甘肃陇西县	S17	内蒙古土默特右旗
S9	甘肃渭源县		

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温:30℃;检测波长:254 nm;进样量:10 μl;以乙腈:甲醇(90:10)为流动相A,以0.2%甲酸溶液为流动相B;流速:0.7 ml/min。按表2进行梯度洗脱。

表2 流动相梯度洗脱表

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~3	3	97
3~12	3~5	97~95
12~30	5~20	95~80
30~60	20~60	80~40
60~70	60~80	40~20

2.2 供试品溶液的制备 黄芪药材粉碎,过60目筛,精密称取5.0 g,置圆底烧瓶中,加水50 ml,称定重量,加热回流

1 h,取出放冷,用水补足减失重量,离心,精密吸取上清液10 ml 蒸干,残渣加70%甲醇溶解并定容至2 ml,即得。

2.3 混合对照品溶液的制备 分别取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素对照品适量,精密称定,至于50 ml容量瓶中,加70%甲醇至刻度,摇匀,即得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素质量浓度分别为0.0500、0.0512、0.0530、0.0514 mg/ml的混合对照品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷对照品约适量,精密称定,加甲醇分别制备成每1 ml含0.5330、0.03866、0.5010、1.012 mg该成分的溶液。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 取黄芪样品(S1),按照“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,检测指纹图谱,以3号色谱峰为参照,计算相对保留时间和相对峰面积,结果RSD分别为0.06%~0.26%、0.19%~2.48%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取黄芪样品(S1),按照“2.2”项下方法平行制备6份,按“2.1”项下色谱条件进样,检测指纹图谱,以3号色谱峰为参照,计算相对保留时间和相对峰面积,结果RSD分别为0.06%~0.52%、0.19%~2.48%,表明仪器重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取黄芪样品(S1),按照“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件进样,分别于0、2、4、6、8、12、16、20、24、48、64、72 h进样,检测指纹图谱,以3号色谱峰为参照,计算各共有峰相对保留时间和相对保留峰面积,结果RSD分别为0.13%~1.18%、0.94%~4.11%,表明供试品溶液在72 h内稳定性良好。

2.6 黄芪甲苷和毛蕊异黄酮苷含量测定结果 参照文献[1]中黄芪药材项下含量测定方法,按照高效液相色谱法(通则0512)测定,毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷分别不得少于0.02%、0.040%。由表3、4可知,本实验所采集的17批黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和黄芪甲苷含量均高于2015版药典规定的含量,说明该17批黄芪符合药用要求,可以作为黄芪药材使用。

2.7 指纹图谱的建立及相似度分析 分别取17批黄芪样品(S1~S17),按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。将17批黄芪样品色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”,在“2.1”项色谱条件下,将黄芪指纹图谱与对照品色谱进行比较,确认17批黄芪药材有10个共有峰,其中3号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积适中,将其作为参照峰S,计算得到10个共有峰相对保留时间的RSD均不高于0.73%;相对峰面积的RSD值在21.56%~84.20%。以上结果表明,不同产地黄芪差异较大(见图1、图2、图3)。相似度评价结果显示,17批不同产地黄芪图谱与对照指纹图谱(R)的相似度为0.928~0.989(见表5)。

表 3 17 批黄芪药材黄芪甲苷含量测定结果

样品号	黄芪甲苷含量 (%)	样品号	黄芪甲苷含量 (%)	样品号	黄芪甲苷含量 (%)
S1	0.05066	S7	0.05752	S13	0.25501
S2	0.06717	S8	0.05209	S14	0.01158
S3	0.06519	S9	0.04982	S15	0.07705
S4	0.10403	S10	0.04049	S16	0.04623
S5	0.16946	S11	0.17366	S17	0.04402
S6	0.15562	S12	0.20879		

表 4 17 批黄芪药材毛蕊异黄酮苷含量测定结果

样品号	毛蕊异黄酮苷含量 (%)	样品号	毛蕊异黄酮苷含量 (%)	样品号	毛蕊异黄酮苷含量 (%)
S1	0.0425	S7	0.0380	S13	0.0216
S2	0.0389	S8	0.0537	S14	0.0352
S3	0.0443	S9	0.0393	S15	0.1031
S4	0.0249	S10	0.0373	S16	0.0902
S5	0.0281	S11	0.0248	S17	0.0554
S6	0.0203	S12	0.0252		

2.8 主成分分析 主成分分析(PCA)作为无监督分析技术, 能够将具有多维数据的对象降维化处理, 排除噪音和冗余, 找到数据的最主要影响因素<sup>[12-13]</sup>。为了更直观地体现不同产地黄芪药材的异同, 本研究通过 Matlab 2018b 软件, 将黄芪药材指纹图谱 10 个共有峰峰面积进行归一化处理, 再进行 PCA 分析, 图 4 为三维 PCA 得分图。从图中可知, PC1、PC2 和 PC3 对方差的贡献率分别为 54.8%、27.6% 和 9.6%, 三者之和为 92.0%, 说明这 3 个主成分包含了被分析样本的绝大部分信息。同时, 不同产地黄芪药材随产地呈现一定区分。

2.9 聚类分析 聚类分析(CA)是一种静态数据分析的统计学方法, 能够把相似的对象通过静态分类方式分成不同的组别或者更多的子集, 让在同一个子集中的对象都有一些相似的属性<sup>[13]</sup>。本研究将不同产地黄芪药材指纹图谱 10 个共有峰峰面积进行归一化处理, 采用 Matlab 2018b 软件进行 CA 分析。从图 5 可知, S1~S2 号样本(山西)自聚成一类, S3~S9 号样本(甘肃)自聚成一类, S10~S17 号样本(内蒙古自治区)自聚成一类。其中, 甘肃和内蒙古自治区黄芪较为接近, 这与 PCA 的分析结果相印证。说明不同产地黄芪药材存在一定差异。

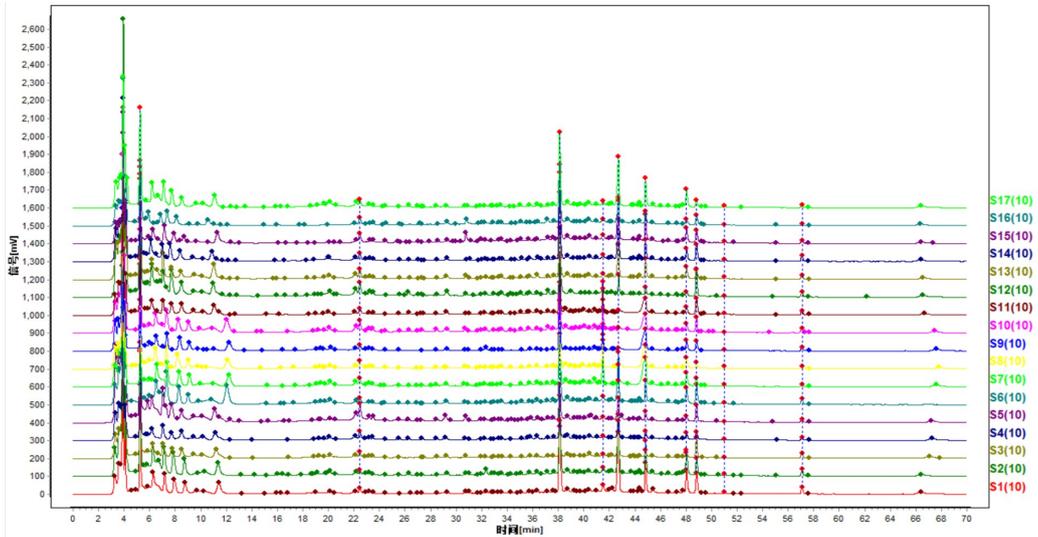


图 1 17 批不同产地黄芪 HPLC 叠加指纹图谱

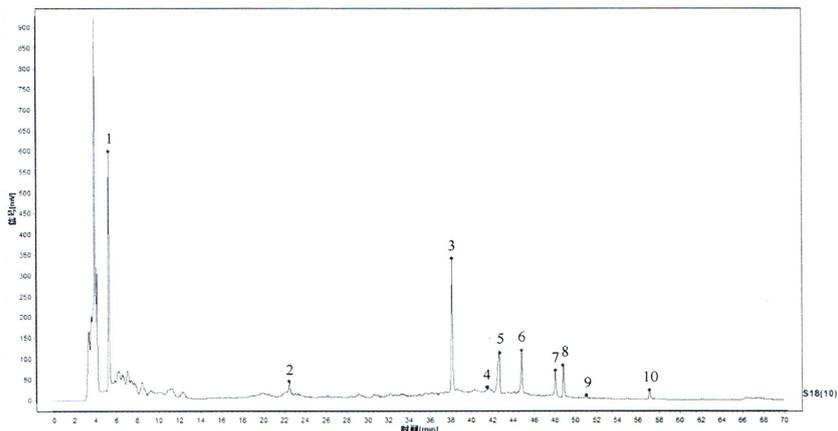
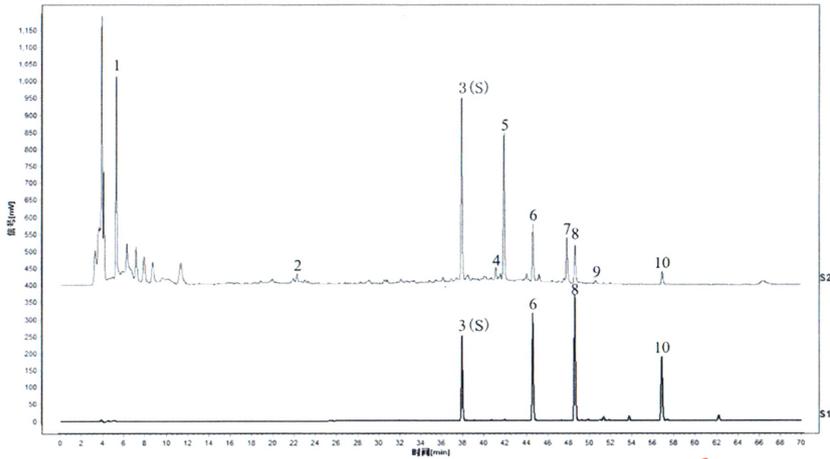


图 2 17 批不同产地黄芪 HPLC 对照指纹图谱



注:峰3(S)—毛蕊异黄酮葡萄糖苷;峰6—芒柄花苷;峰8—毛蕊异黄酮;峰10—芒柄花素

图3 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素混合对照品图

表5 17批黄芪药材与对照药材相似度评价结果

样品号	相似度	样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.933	S7	0.928	S13	0.985
S2	0.976	S8	0.959	S14	0.984
S3	0.960	S9	0.958	S15	0.948
S4	0.936	S10	0.965	S16	0.981
S5	0.945	S11	0.958	S17	0.987
S6	0.989	S12	0.957		

培品。由于大规模栽培历史还很短,尚未形成完善的生产体系,且存在管理、技术和市场调控等诸多问题<sup>[14]</sup>。

中药指纹图谱是指中药经适当处理后,采用一定的分析手段,得到能够标示该中药特性的共有峰的图谱,是一种新的中药质量控制模式<sup>[15]</sup>。中药指纹图谱可以较全面地反映中药化学成分的种类与数量,具有系统性、特征性和重现性特点,现已成为中药质量评价和控制研究的热点之一。指纹图谱作为中药质量控制的有效手段已经被国内外广泛接受。以单一的有效成分控制中药质量已不能适应中药现代化的形势,中药指纹图谱可以在不清楚全体化学成分的情况下,有效控制中药的内在质量,提高中药质量的稳定性<sup>[16]</sup>。而 HPLC 指纹图谱因其检测灵敏度高,分离效率高,分析速度快,方法重现性好等优点发展尤为迅速。

本实验对乙腈-0.1%甲酸、乙腈:甲醇(90:10)-0.1%甲酸等多个流动相系统进行比较,结果表明,乙腈:甲醇(90:10)混合使用的分离效果优于乙腈单独作为有机相,甲酸的效果优于磷酸和冰醋酸,甲酸采用0.2%浓度时达到最佳分离效果。故最终选定乙腈:甲醇(90:10)-0.2%甲酸作为流动相系统。同时对检测器进行选择,黄芪药材中的主要有效成分为皂苷类、黄酮类和多糖等,皂苷类(如黄芪甲苷)无紫外(UA)吸收或仅为末端吸收,适于采用蒸发光散射(ELSD)检测,而黄酮类适合UV检测。UV-ELSD联合检测的结果表明,ELSD检测到的峰数量较少,峰面积较小,而UV外检测其能分离出10个以上具有一定峰面积(或峰高)且分离效果好的色谱峰,故选择UV检测器测定黄芪药材指纹图谱。

综上所述,本研究建立了黄芪药材的 HPLC 指纹图谱分析方法,采用指纹图谱软件确定3个产地的17批黄芪药材有10个共有峰,相似度均大于0.92。通过对色谱图的相似度分析、主成分分析和聚类分析,表明不同产地的黄芪质量存在差异。这不仅反映出黄芪中药用成分的质量含量在不同产区有一定的差异,也反映了黄芪在中药材市场中存在质量不一的情况,有利于市场黄芪的质量监督。

(下转第187页)

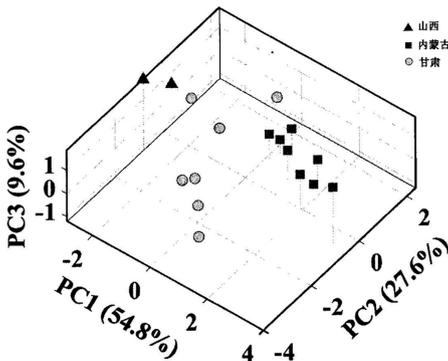


图4 三维PCA得分图

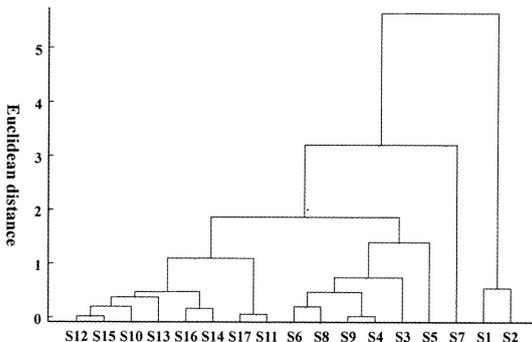


图5 17批黄芪样品聚类分析树状图

### 3 讨论

黄芪为常用大宗药材,国内市场对黄芪的需求极大,致使黄芪野生资源几近枯竭,目前市场上黄芪商品主要为栽

性心衰的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(4): 335-338.

- [6] 陈寒. 舒心汤治疗射血分数保留心力衰竭患者的临床疗效研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [7] 方晓江, 钱宝庆, 魏丽萍, 等. 防己黄芪汤加减用于射血分数保留型心衰的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(12): 2591-2593.
- [8] 朱凯浩. 参桂护心汤化裁治疗 HFpEF(心阳不振型)的临床疗效观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [9] 吴炜. 黄芪保心汤治疗射血分数保留型心衰的临床疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [10] 焦全林, 马骏麒. 温心汤治疗 60 例不同射血分数心力衰竭疗效评价[J]. 新疆中医药, 2015, 33(5): 1-4.
- [11] 吴超. 丹郁调心舒治疗射血分数保留性心衰患者的临床观察[D]. 昆明: 云南中医学院, 2017.
- [12] 杨雪卿, 王巍, 周琦. 心衰合剂对射血分数保留心力衰竭病人生存质量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(4): 581-583.
- [13] 杨雪卿, 王巍, 周琦. 心衰合剂对射血分数保留心衰患者无创血流动力学参数的影响[J]. 北京中医药, 2018, 37(6): 496-499.
- [14] 辛莉. 健心颗粒改善射血分数保留的心衰患者生存质量的临床研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
- [15] 黄飞翔, 许杨, 叶盈, 等. 健心颗粒干预左室射血分数正常的心衰临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(10): 1155-1157.
- [16] 田相同, 张曙光, 王友娟. 参苓养心颗粒治疗射血分数保留的心力衰竭临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42

(1): 56-57, 60.

- [17] 高彩, 金连珍, 文磊, 等. 芪蒯强心胶囊治疗射血分数保留慢性心力衰竭的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(17): 2621-2623.
- [18] 刘宏军, 许强, 夏晓鹏, 等. 芪蒯强心胶囊治疗射血分数保留心力衰竭的疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(14): 1730-1733.
- [19] 曹士强. 曲美他嗪联合芪参益气滴丸治疗左室射血分数保留型心力衰竭的效果研究[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(1): 138-139.
- [20] 李欣. 芪参益气滴丸联合曲美他嗪治疗左室射血分数保留心衰的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(5): 557-559.
- [21] 王璨. 益气泻肺汤对射血分数保留的心衰大鼠心脏舒张功能的疗效研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [22] PRADO DMLD, ENÉAS ANTÔNIO ROCCO. The benefits of exercise training on aerobic capacity in patients with heart failure and preserved ejection fraction[J]. Oxygen Transport to Tissue XXXIII, 2017, 1000: 51-64.
- [23] SANTOSO A, PURWOWIYOTO SL, PURWOWIYOTO BS, et al. Exercise training improved longitudinal intrinsic left ventricle function in heart failure with preserved ejection fraction[J]. Int J Angiol, 2019, 28(1): 44-49.
- [24] PANGDAY A, LAMONTE M, KLEIN L, et al. Relationship between physical activity, body mass index, and risk of heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 69(9): 1129-1142.

(收稿日期: 2020-12-28)

(上接第 184 页)

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 302.
- [2] 段亚丽, 谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 35-38.
- [3] 孙政华, 邵晶, 郭攻. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.
- [4] BRATIOV VM, SHKONDROV AM, ZDRAVEVA PK, et al. Flavonoids from the genus astragalus: phytochemistry and biological activity[J]. Pharmacogn Rev, 2016, 10(19): 11-32.
- [5] 仝欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1246-1249.
- [6] 韩娟, 刘宏艳, 肖照岑. 黄芪活血功效刍议[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(3): 21-22.
- [7] 龚廷栋, 黄水清. 当归补血汤有效组分抗动脉粥样硬化配伍比例的基础研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(4): 468-472.
- [8] 朱嘉欢, 黄小平, 邓常清. 黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究[J]. 中草药, 2019, 50(1): 111-119.

- [9] 张妍, 董琳, 雍婧婧, 等. 黄芪药材主要成分的含量测定方法及高效液相指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2610-2613.
- [10] 赵慧辉, 赵平, 吴刚, 等. 不同产地黄芪 HPLC 指纹图谱的聚类分析及相似度评价[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(4): 681-687.
- [11] 田兰, 程海燕, 陈晓辉, 等. 黄芪药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(12): 979-982.
- [12] 石岩, 魏锋, 马双成. 关于主成分分析在中药和天然药物分析研究中应用的探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3031-3035.
- [13] 李操, 周亚飞, 欧阳永中, 等. 电喷雾萃取电离质谱法用于掺假白酒的快速分析[J]. 化学学报, 2013, 71(12): 1625-1632.
- [14] 秦雪梅, 李震宇, 孙海峰, 等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3234-3238.
- [15] 梁瑾, 封士兰, 刘小花, 等. 黄芪药材的高效液相色谱指纹图谱及主要成分的含量测定方法研究进展[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 490-493.
- [16] 李静, 张莉, 曹玲, 等. 高效液相色谱法测定首乌丸中大黄素的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(2): 118-120, 123.

(收稿日期: 2021-06-15)