

中药黄芪指纹图谱的研究进展[△]

汪海斌^{1*}, 石岩^{2#}, 李芳¹, 王德胜¹, 魏锋², 马双成²(1. 国家中药材产品质量监督检验中心, 安徽亳州 236800; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4749-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.39

摘要 目的: 为中药黄芪的质量评价及深入研究提供参考。方法: 以“黄芪”“指纹图谱”“*Astragali Radix*”“Fingerprint”等为关键词, 组合查询PubMed、中国知网、万方、维普等数据库中收录的2011-2016年发表的相关研究文献, 进行归纳、总结和综述。结果与结论: 共检索到相关文献116篇, 其中有效文献38篇。黄芪主要含有皂苷类、黄酮类、多糖类等成分。黄芪指纹图谱分析方法主要有色谱法(包括薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法等)、光谱法(包括红外光谱法、核磁共振光谱法等)和分子生物学方法(包括简单重复序列区间扩增标记方法等)。目前, 黄芪指纹图谱研究已从传统的化学指纹图谱研究领域, 逐渐转向了其指纹图谱与药效作用的相关性(谱效关系)研究领域。但该领域研究尚处于起始阶段, 还存在着诸多问题亟待解决。

关键词 黄芪; 指纹图谱; 研究进展

中药黄芪(*Astragali Radix*)为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *monghoicus* (Bge.) Hisao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1]。其性温, 味甘, 归脾、肺经, 是传统的补中益气类中药之一, 具有补气升阳、益卫固表、托毒生肌和利水退肿之功效。现代药理研究表明, 黄芪有增强机体免疫力、降血糖、利尿、抗疲劳、抗肿瘤等作用^[2-3]。

黄芪药材所含化学成分众多, 主要有皂苷类、黄酮类、多糖类等^[4]。长期以来, 《中国药典》中关于黄芪的质量控制主要是测定其黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量, 但是这种仅靠药材中一个或两个单一成分来评定其质量的方法, 忽略了药材中多组分的协同作用, 无法体现中药质量和疗效的整体性。因此, 对中药这种多组分的复杂体系来说, 从多角度评价质量的指纹图谱分析技术是一种比较有效的方法^[5]。本研究以“黄芪”“指纹图谱”“*Astragali Radix*”“Fingerprint”等为关键词, 组合查询PubMed、中国知网、万方、维普等数据库中收录的2011-2016年发表的相关研究文献, 进行归纳、总结和综述, 以期对中药黄芪的质量评价及深入研究提供参考。

1 色谱法

1.1 薄层色谱(TLC)指纹图谱

汪祺等^[6-7]通过归纳总结2005年版《中国药典》、中药处方制剂标准及新药转正标准等涉及黄芪的检测方法, 用甲醇回流提取, 提取液蒸干后用AB-8大孔树脂柱洗脱, 洗脱液再用水饱和正丁醇萃取, 以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5, V/V/V)的上层-甲醇(10:1, V/V)为展开剂,

置氨蒸气饱和的展开缸内展开, 以此分析了13批黄芪样品皂苷类成分的薄层特征图谱, 4个特征成分黄芪甲苷 I、II、III、IV分离良好; 并用醋酸乙酯回流提取, 以氯仿-甲醇(10:1, V/V)为展开剂, 分析了13批黄芪样品黄酮类成分的薄层特征图谱, 结果4个特征成分毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花素葡萄糖苷分离良好。

1.2 高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)指纹图谱

李婷婷等^[8]收集12批宁夏不同产地两年生蒙古黄芪样品, 用甲醇超声提取, 以甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液梯度洗脱, 254 nm为检测波长研究其指纹图谱, 并用毛蕊异黄酮苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素进行了定位, 测定了毛蕊异黄酮苷和芒柄花黄素的含量, 共找出了15个共有峰, 样品相似度符合要求。

李健等^[9]收集10批南北不同产地的黄芪样品, 将样品超微粉碎后经80%乙醇提取, 以甲醇-乙腈和水梯度洗脱, 检测波长为260 nm, 进行指纹图谱研究, 共找出了12个共有峰, 且聚类分析表明黄芪存在明显的南北地域差异。李翔等^[10]考察了不同色谱柱对黄芪样品指纹图谱的影响, 采用甲醇超声提取, 乙腈-甲醇和水梯度洗脱, 260 nm为检测波长, 共找出了11个共有峰, 且样品相似度良好。殷文静等^[11]比较了勾兑前后黄芪药材的指纹图谱, 以乙腈和0.2%甲酸梯度洗脱, 260 nm波长下检测, 发现勾兑后的8批黄芪药材指纹图谱相似度均在0.95以上, 基本达到一致性。

刘敏^[12]优选黄芪药材中黄酮类成分提取方法和梯度洗脱方法, 确定了甲醇超声40 min及体积分数90%-5%乙腈梯度洗脱的方法, 共找出了8个共有峰。覃红萍、陈伯丛、张秋红等^[13-15]也运用了HPLC-DAD法研究了不同产地黄芪中黄酮类成分的指纹图谱, 结果稳定、可靠, 说明该法适用于黄芪中黄酮类成分的含量测定与指纹图谱分析。

△ 基金项目: 亳州市科技攻关项目(No. BK2015008)

* 助理工程师, 硕士。研究方向: 中药质量评价。E-mail: 1157838457@qq.com

通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 中药及保健食品质量控制与评价。E-mail: san0373@163.com

李桂兰等^[16]将12批黄芪药材经甲醇超声后,以乙腈和水梯度洗脱,由于黄芪皂苷类成分仅在紫外末端具有吸收,故选择208 nm为检测波长,指认了芒柄花素和黄芪甲苷色谱峰的位置,共标出了12个较大的共有峰,且根据指纹图谱总结出了同产地不同年限黄芪中化学成分的变化规律。石玉娟^[17]分析了14批山西地道黄芪药材的指纹图谱,以乙腈和水为流动相,208 nm为检测波长进行检测,共标出了11个共有峰,且不同产地的药材中黄芪甲苷均得到很好地分离。

宋肖炜等^[18]以芒柄花素为内参比峰,用甲醇超声提取后,以乙腈和0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长为203 nm,进行指纹图谱研究,共标出了15个共有峰,并通过与对照品对照,对其中4个色谱峰进行了定位。白根本等^[19]比较了26批购自全国不同地区的市售黄芪饮片,以乙腈和0.05%磷酸水溶液为流动相,检测波长为203 nm,进行指纹图谱研究,共标出了25个共有峰,发现饮片相互吻合程度较低,说明市售黄芪饮片整体质量的一致性欠佳。

另外,胡晓等^[20]考察了黄芪药材中皂苷类成分分析的色谱条件,选用Ultimate XB-C₁₈柱,柱温35℃,乙腈-0.5%磷酸梯度洗脱,205 nm波长下检测,共找出了16个共有峰;所建立的方法可操作性强,适用于黄芪中皂苷类成分的指纹图谱研究。

1.3 HPLC-蒸发光散射检测器(ELSD)指纹图谱

杜国军等^[21]将黄芪药材经甲醇索氏提取后,以环黄芪醇、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪甲苷I、II、III、IV为对照品,使用ELSD检测器,并经乙腈和水梯度洗脱,研究了来自蒙古黄芪主产区的2种不同种植模式下的29批黄芪药材的HPLC-ELSD指纹图谱,共标出了22个共有峰,经分析后发现2种种植模式下的黄芪药材得到了很好地区分。

邱莉等^[22]将黄芪药材用石油醚索氏回流除杂后,药渣经甲醇提取,提取液使用ODS C₁₈柱进行洗脱,以乙腈和水为流动相,建立了黄芪药材的HPLC-ELSD指纹图谱,指认出了14个共有指纹峰,标定了其中5个指纹峰的结构,且得出14批样品相似度均在90%以上。

1.4 HPLC-DAD-ELSD指纹图谱

梁瑾等^[23]采用HPLC-DAD-ELSD联用法,将黄芪药材用95%乙醇回流提取,以乙腈和水梯度洗脱,检测波长254 nm,漂移管温度112.8℃,载气流速3.2 L/min,进行检测,结果10批黄芪药材HPLC-DAD指纹图谱中共找到了14个共有峰,鉴别了毛蕊异黄酮和芒柄花素;HPLC-ELSD指纹图谱中共找到9个共有峰,鉴别了毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪甲苷II、黄芪甲苷III,且10批黄芪药材相似度良好。

苏碧茹等^[24]将黄芪药材经甲醇回流提取,以乙腈和0.2%甲酸溶液为流动相,建立了黄芪药材的HPLC-DAD-ELSD指纹图谱,并在指纹图谱中选择了8个较大的共有峰作为变量指标,经化学模式识别分析有效直观地区分了黄芪药材及其相关样品。

刘小花等^[25]在对黄芪药材全成分研究的基础上,将黄芪95%提取液分为石油醚、乙酸乙酯、乙醇以及水4个部位,以乙腈和水梯度洗脱,分别应用DAD和ELSD检测器,建立了黄芪药材不同极性部位的HPLC-DAD-ELSD指纹图谱,且运用各部位共有峰峰面积计算了10批黄芪药材各部位的相似度,结果相似度均>90%。

王惠等^[26]通过部分酸水解方法,采用正交试验选取最佳水解条件,将黄芪中多糖水解成可供分析的寡糖,运用ELSD检测器,建立了基于酸水解-亲水作用色谱的黄芪多糖指纹图谱,结果20批黄芪药材的多糖指纹图谱相似度为0.258~0.949,反映出黄芪多糖组成存在明显差异;同时,运用DAD检测器,建立了RP-HPLC指纹图谱,用于控制除黄芪多糖以外的其他成分,对上述20批黄芪药材进行了分析,实现了对黄芪药材质量的全面评价。

1.5 HPLC-质谱(MS)指纹图谱

乌日汗^[27]在研究民族植物学野外调查的基础上,建立了一套代谢组学研究方法,研究了4种药用黄芪——蒙古黄芪、膜荚黄芪、北蒙古黄芪和一个未鉴定种。通过HPLC-电喷雾(ESI)-飞行时间质谱(TOF-MS)联用法研究得到了15个黄芪样品的代谢指纹图谱,并鉴定出19个化合物的结构式,包括6个黄酮及其苷类化合物和13个三萜皂苷类化合物。

1.6 超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱

付娟^[28]将黄芪药材经甲醇超声后,以乙腈-异丙醇(7:3, V/V)和0.1%甲酸溶液梯度洗脱,研究了蒙古黄芪和膜荚黄芪的UPLC-光电二极管阵列检测器(PDA)指纹图谱,发现6批膜荚黄芪之间相似度较好,而蒙古黄芪各批次之间相似度不是很高,但图谱整体特征基本一致。

芮雯等^[29]在研究UPLC-PDA指纹图谱的基础上,首次建立了UPLC/四极杆(Q)-TOF-MS指纹图谱研究方法,以0.1%甲酸-水为流动相A、含0.1%甲酸的乙腈-异丙醇(7:3, V/V)为流动相B梯度洗脱,采用ESI离子源,在正离子与负离子模式下分别采集数据,扫描范围m/z 100~1 000,雾化气N₂流速60 L/h,碰撞能量10~40 V,进行检测,选定22个共有峰作为特征峰,结合主成分分析(PCA),可以区分不同产地的黄芪药材,并找出包括毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷I和II等8个差异最大

的化合物。

1.7 气相色谱(GC)-MS 指纹图谱

高凡茸等^[30]应用GC-MS联用法,将黄芪药材70%乙醇提取游离糖进行三氟乙酸(TFA)水解,水解产物经乙酰化处理后检测,探索建立速生黄芪与野生黄芪药材的单糖指纹图谱,结果野生黄芪中不同糖类成分的含量明显高于速生黄芪,且2种黄芪可按指标成分的比例进行鉴别。

1.8 毛细管电泳色谱指纹图谱

马丽娟等^[31]将黄芪饮片经甲醇提取后,采用高效毛细管电泳色谱法(HPCE)进行分析,以40 mmol/L硼砂-20 mmol/L硼酸-10%甲醇为电泳介质,分离电压20 kV,波长为210 nm,建立其HPCE-DAD指纹图谱,共找出了9个共有峰,指认了其中的黄芪甲苷、黄芪皂苷I和毛蕊异黄酮的位置。

刘杨等^[32]通过应用蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,采用8种提取方法提取黄芪药材中的水溶性蛋白,根据PAGE谱带的多少和清晰度优选建立黄芪药材的蛋白质指纹图谱的蛋白提取条件,结果当确定以双蒸水为提取溶剂时,可辨识谱带数目最多,清晰度较好,且指纹图谱中各峰的分度度较高。

2 光谱法

2.1 红外光谱指纹图谱

周清等^[33]利用傅里叶变换红外光谱法(FTIR),将黄芪粉末和溴化钾混匀压片,采用经氘化处理后的硫酸三甘肽晶体(DTGS)检测器扫描,研究了黄芪药材的红外光谱指纹图谱,发现不同产地黄芪样品的特征峰值分布差异较大,在1 000~1 800 λ/cm 的峰值时特征性较强,依据这些特征峰值可对黄芪作出初步鉴别。李洪泽等^[34]则通过山西同一产地不同生长年限黄芪及不同产地同一生长年限黄芪的FTIR研究,建立了山西地产黄芪的特征指纹图谱。此方法比传统的性状鉴别法更具有科学性,比常规的光谱、色谱和质谱法更快速、简便。

2.2 核磁共振光谱指纹图谱

陈燕燕等^[35]采用质子核磁共振指纹图谱(¹H-NMR)技术对黄芪及其4种炮制品的化学成分进行表征,探索建立了黄芪药材的¹H-NMR指纹图谱,通过该指纹图谱检测并鉴定出21种化学成分,其中有8个氨基酸类化合物、4个有机酸类化合物,并结合偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),揭示了不同炮制方法不仅影响黄芪药材中黄酮类成分的含量,同时对氨基酸类和糖类成分浸出率的影响也十分显著。Jung JY等^[36]研究建立了去皮与未

去皮黄芪药材的¹H-NMR和UPLC-MS指纹图谱,结果鉴定出20种化学成分,且发现去皮黄芪药材中异黄酮和皂苷的含量显著降低。

3 分子生物学方法

张蔓等^[37]利用简单重复序列区间扩增(ISSR)标记方法,经改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取法提取叶片总DNA,从120个ISSR引物中筛选出3个多态性引物分别对黄芪、红芪样品进行DNA扩增,建立了甘肃不同产地黄芪和红芪样品的ISSR指纹图谱,结果检测到黄芪、红芪共扩增出位点数23个,多态性位点数16个。厚毅清等^[38]则通过TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒提取黄芪和红芪样品的基因组,从101对简单重复序列(SSR)引物中筛选出6对有效鉴定物,标记参试引物及对应的特征泳带,生成了黄芪与红芪的指纹图谱,为黄芪与红芪的鉴别提供了依据。

4 结论

中药为多组分的复杂体系,因此仅测定少数几种有效成分或指标成分,并不足以保证其质量。与传统检测方法相比,指纹图谱分析技术能全面反映中药的多种内在化学成分的种类和数量,具有整体性、特征性及可量化等特点,弥补了单一化学成分质量控制的弊端,可以最大程度地综合评价中药的内在质量。

目前,黄芪指纹图谱研究已从传统的化学指纹图谱研究领域,逐渐转向了其指纹图谱与药效作用的相关性(谱效关系)研究领域。但该领域研究尚处于起始阶段,还存在着诸多问题亟待解决,如:在药效的有效性上大多采用西医的计量标准,而没有与中医理论密切结合;只体现了某个组分的药效相关性,还未达到阐明复杂成分协同作用的高度;缺乏一个科学合理的数据分析方法系统,从而更加准确地表明“谱”与“效”之间的关系。因此,如何科学、准确地阐述黄芪的谱效关系机制,尚待进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:302.
- [2] Zhang K, Pugliese M, Pugliese A, *et al.* Biological active ingredients of traditional Chinese herb Astragalus membranaceus on treatment of diabetes: a systematic review [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15(4):315-329.
- [3] Lv X, Chen D, Yang L, *et al.* Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016 (86):28-42.

- [4] Fu J, Wang Z, Huang L, *et al.* Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus mbranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(9):1275-1283.
- [5] Li SP, Zhao J, Yang B. Strategies for quality control of Chinese medicines[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(4):802-809.
- [6] 汪祺,张聿梅,戴忠,等.黄芪中皂苷类成分的特征薄层图谱鉴别[J].中国药事,2011,25(12):1227-1232.
- [7] 汪祺,张聿梅,戴忠,等.黄芪中氨基酸、黄酮类成分的特征薄层图谱鉴别[J].中国药事,2012,26(1):50-56.
- [8] 李婷婷,舒志恒,于良,等.不同产地黄芪HPLC/DAD指纹图谱及主要黄酮成分含量测定[J].中国医院药学杂志,2015,35(13):1182-1187.
- [9] 李健,韩林,马玉芳,等.黄芪超微粉HPLC指纹图谱的建立[J].食品科学,2013,34(20):199-202.
- [10] 李翔,王晓青,高磊,等.黄芪药材HPLC-DAD指纹图谱的色谱柱评价研究[C]//2011年中国药学会大会暨第11届中国药师周论文集,2011:6.
- [11] 殷文静,魏惠珍,刘晟楠.等.黄芪药材质量一致性及指纹图谱研究[J].中南药学,2015,13(12):1233-1236.
- [12] 刘敏.红参、黄芪、三七三味中药的饮片、破壁粉体、破壁粉粒的质量评价研究[D].广州:广州中医药大学,2011.
- [13] 覃红萍,鲁静,林瑞超.不同种、不同产地黄芪中黄酮类HPLC指纹图谱研究[J].中国药师,2013,16(7):954-958.
- [14] 陈伯丛,王汝上,罗德祥.不同产地黄芪总黄酮HPLC指纹图谱研究[J].北方药学,2016,13(7):8-10.
- [15] 张秋红,王志刚.黄芪中黄酮类成分HPLC指纹图谱及聚类分析[J].临床医学工程,2012,19(6):975-977.
- [16] 李桂兰,赵慧辉,赵平,等.基于HPLC指纹图谱的黄芪生长年限的质量控制研究[J].中华中医药杂志,2011,26(1):84-87.
- [17] 石玉娟.山西道地药材黄芪HPLC研究及其药效调查[D].太原:山西医科大学,2011.
- [18] 宋肖炜,李清,罗璇捷,等.黄芪药材的综合质量评价[J].沈阳药科大学学报,2011,28(8):599-606.
- [19] 白根本,王敏,杨鑫,等.市售黄芪饮片质量一致性的高效液相指纹图谱法评价[J].时珍国医国药,2014,25(4):974-976.
- [20] 胡晓,杨义芳,屈晓晟,等.黄芪总苷抗HBV有效部位的HPLC指纹图谱[J].中国医药工业杂志,2012,43(11):931-934.
- [21] 杜国军,秦雪梅,李震宇,等.蒙古黄芪主产区2种不同种植模式黄芪药材的质量比较[J].中草药,2013,44(23):3386-3393.
- [22] 邱莉,黄丽凤,苏志恒,等.黄芪药材SPE-HPLC-ELSD特征图谱研究[J].时珍国医国药,2012,23(5):1127-1129.
- [23] 梁瑾,刘小花,任远,等.黄芪药材的HPLC-DAD-ELSD指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(17):70-74.
- [24] 苏碧茹,邓慧敏,马宏亮,等.HPLC-DAD-ELSD指纹图谱的化学模式识别用于黄芪质量评价[J].中国中药杂志,2013,38(19):3319-3323.
- [25] 刘小花,白仲梅,梁瑾,等.黄芪药材不同极性部位的指纹图谱[J].兰州大学学报:自然科学版,2013,49(4):573-580.
- [26] 王惠,辛华夏,蔡剑锋,等.基于部分酸水解-亲水作用色谱的黄芪多糖指纹图谱分析及结合反相指纹图谱全面质量评价方法的建立[J].色谱,2016,34(7):726-736.
- [27] 乌日汗.黄芪的代谢组学研究[D].北京:中央民族大学,2012.
- [28] 付娟.中药黄芪质量评价研究[D].长春:吉林农业大学,2013.
- [29] 芮雯,冯毅凡,石忠峰,等.不同产地黄芪药材的UPLC/Q-TOF-MS指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2012,32(4):607-611.
- [30] 高凡茸,李科,郝霞,等.基于单糖指纹图谱技术的速生黄芪与野生黄芪的鉴别[J].中草药,2015,46(14):2134-2142.
- [31] 马丽娟,韩乐,刘训红,等.黄芪饮片HPC指纹图谱的研究[J].内蒙古中医药,2012,28(10):34-35.
- [32] 刘杨,包华音,刘德丽,等.黄芪蛋白提取方法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(20):76-78.
- [33] 周清,温金莲,肖树雄,等.黄芪的红外指纹图谱鉴别研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):79-82.
- [34] 李洪泽,闫海涛,韩风雨,等.黄芪药材红外指纹图谱研究[J].中国现代药物应用,2015,9(4):242-243.
- [35] 陈燕燕,李晓男,王跃飞,等.应用核磁共振指纹谱考察黄芪不同炮制品化学成分的差异[J].中国科技论文,2014,9(12):1410-1413.
- [36] Jung JY, Jung Y, Kim JS, *et al.* Assessment of Peeling of *Astragalus* roots using ^1H NMR- and UPLC-MS-based metabolite profiling[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(43):10398-10407.
- [37] 张蔓,孙红国,吴海燕,等.甘肃不同产地黄芪与红芪的ISSR指纹图谱鉴别研究[J].时珍国医国药,2013,24(12):2917-2919.
- [38] 厚毅清,石有太,张艳萍,等.黄芪与红芪SSR引物的筛选及鉴定指纹代码的构建[J].中国中药杂志,2016,41(10):1819-1822.

(收稿日期:2017-03-25 修回日期:2017-10-15)

(编辑:周 箐)