

文章编号: 1006-2858(2011)08-0599-08

黄芪药材的综合质量评价

宋肖炜¹, 李清¹, 罗琥捷², 叶静¹, 陈晓辉¹, 毕开顺¹

(1. 沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016; 2. 无限极(中国)有限公司 广东 广州 510000)

摘要: 目的 测定黄芪药材总多糖、总皂苷、总黄酮的含量, 建立黄芪 HPLC 指纹图谱及判别其产地的线性数学模型, 为黄芪药材的综合质量评价提供依据。方法 有效部位总成分的测定: 分别以苯酚-浓硫酸比色法、香草醛-冰醋酸-高氯酸比色法及紫外分光光度法进行总多糖、总皂苷、总黄酮的含量测定; HPLC 指纹图谱的建立: 以芒柄花素为内参比峰, 采用 Kromasil ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈(A)-质量分数为 0.1% 磷酸水溶液(B) 为流动相进行梯度洗脱(0~36 min: 体积分数为 15%~31% A, 36~65 min: 体积分数为 31%~90% A, 65~75 min: 体积分数为 90%~95% A) 流速 1.0 mL·min⁻¹ 检测波长 203 nm 柱温 35 °C。采用独立性权重法确定色谱指纹图谱 15 个共有峰及 3 个总成分的权重, 进行聚类分析和判别分析。结果 *D*-无水葡萄糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷分别在 20.1~100.3 mg·L⁻¹、40.4~505.0 μg、0.5~24.8 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率分别为 97.7%、98.0%、95.7%; 获得了理想的黄芪药材 HPLC 指纹图谱, 确定了 15 个共有峰; 根据聚类分析结果, 将黄芪药材分为 3 类, 建立的判别函数能够对黄芪产地及其优劣进行较为准确的判别。结论 有效部位总成分的测定与 HPLC 指纹图谱特征峰相结合的聚类方法以及所建立的判别函数可为黄芪药材的综合质量评价提供依据。

关键词: 黄芪; 总多糖; 总皂苷; 总黄酮; 色谱指纹图谱; 综合质量评价

中图分类号: R 917 文献标志码: A

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*A. membranaceus*(Fisch.) Bge.] 的干燥根。春、秋二季采挖, 除去须根及根头, 晒干。性甘、温, 归脾、肺经, 具补气固表, 利尿托毒, 排浓, 敛疮生肌之功效。为常用补气药^[1]。其主要活性组分为糖类、黄酮类和皂苷类化合物^[2-3]。由于中药的药效不是来自单一的活性化学成分作用的结果, 而是多种活性成分之间的协同效应, 因此, 任何单一的活性化学成分或指标成分都难以评价中药的真伪和优劣。中药色谱指纹图谱可以较为全面地检测其多种成分在药材中分布的情况, 使药材的内在质量情况可视化, 但由于某些中药有效成分其自身结构不存在紫外吸收(糖类成分)或弱紫外吸收(皂苷类成分), 因此, 该类成分的含量很难反映在以紫外检测技术为主的色谱特征图谱中。本研究作者首次尝试将中药材有效部位总成分的含量与反映中药材单体化学成分信息的色谱指纹图谱共有峰综合考虑, 利用独立性权

重法对有效部位总成分含量和黄芪色谱指纹图谱的 15 个共有峰进行加权处理, 再进行聚类分析, 进而对采集的 43 批黄芪药材进行更为全面的质量评价, 此外还利用获得的总成分含量和色谱指纹图谱信息建立了 Fisher 判别函数, 以便对黄芪药材的产地及其优劣做出判别, 旨在为黄芪药材的开发研究提供综合质量评价方法依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), UV-265FW 紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司), Agilent LC-Solution 色谱工作站。

对照品: 黄芪甲苷(纯度质量分数 >99%, 批号 110781-200613)、*D*-无水葡萄糖(纯度质量分数 >99%, 批号 110833-200904) 购自中国药品生物制品检定所; 毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(纯度质量分数 >98.5%)、芒柄花素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(纯度质量分数 >98.5%)、毛蕊异黄

收稿日期: 2011-05-30

作者简介: 宋肖炜(1987-), 男(汉族), 河北石家庄人, 硕士研究生, E-mail soongxw@sina.com; 毕开顺(1956-), 男(汉族), 河北唐山人, 教授, 博士, 主要从事药品质量标准 and 中药现代化研究, Tel. 024-23986296, E-mail bikaisun@yahoo.com。

酮(纯度质量分数 >99%)、芒柄花素(纯度质量分数 >98.5%)均购自上海永恒生物技术有限公司;乙腈、磷酸为色谱纯,甲醇、乙醇为分析纯,水为二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。

黄芪药材由无限极(中国)有限公司提供,共43批,经沈阳药科大学贾英副教授鉴定为黄芪正品,药材样品阴干后粉碎成粗粉,密封保存待用,药材来源见表1。

Table 1 Sources of *Radix Astragali* samples collected

Sample No.	Batche	Source	Sample No.	Batche	Source
1	Yuantiaoliuyepianzhongpian ^a	Gansu	23	Erdaotou	Shanxi ^b
2	Fubaiqi	Shanxi ^b	24	Erdenghuangqi	Shanxi ^b
3	Guazipianjiapian	Gansu ^a	25	Yuantiaoliuyepiantedapian	Gansu ^a
4	Guazipianyipian	Gansu ^a	26	Yuanqiepiantongtiao	Gansu ^a
5	Huangqituo	Shanxi ^b	27	Teyouhuangqi	Shanxi ^b
6	Liuyepiandapian1#	Shanxi ^b	28	Yidenghuangqi	Shanxi ^b
7	Xiaomianqi	Shanxi ^b	29	Tedenghuangqi	Shanxi ^b
8	Qimao	Shanxi ^b	30	Yuantiaoyuanqieliyepiantedapian	Gansu ^a
9	Honglanqi	Shanxi ^b	31	Yuantiaoguazipianjiapian	Gansu ^a
10	Liuyepiantedapian 1#	Gansu ^a	32	Sandenghuangqi	Shanxi ^b
11	Yuanqieliyuetedapian 1#	Gansu ^a	33	Sidenghuangqi	Shanxi ^b
12	Yuantiaoguazipianyipian	Gansu ^a	34	Chifenghuangqi	Chifeng ^b
13	Yuantiaoguazipianbingpian	Gansu ^a	35	Yuanqieguazipian 1#	Gansu ^a
14	Liuyepiantedapian 2#	Gansu ^a	36	yuanzhi 1#	Gansu ^a
15	Liuyepianzhongpian 1#	Gansu ^a	37	Yuanqieliyuepian 1#	Gansu ^a
16	Liuyepiandapian 2#	Gansu ^a	38	Yuanqieiyuepian 2#	Gansu ^a
17	Guazipianbingpian	Gansu ^a	39	Yuanqieguazipian 2#	Gansu ^a
18	Liuyepianzhongpian 2#	Gansu ^a	40	Yuanzhi 2#	Gansu ^a
19	Yuantiaotongtiao	Gansu ^a	41	Yuanqieliyuepian 3#	Gansu ^a
20	Yuanqieliyuepiantedapian2#	Gansu ^a	42	Yuanzhi 3#	Gansu ^a
21	Yuanqieliyuepiantongtiao	Gansu ^a	43	Yunqieguazipian 3#	Gansu ^a
22	Yuantiaoliuyepiandapian	Gansu ^a			

a—The origin of the samples collected from Gansu is *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge.; b—The origin of the samples collected from Shanxi and Chifeng is *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao

2 方法与结果

2.1 总多糖、总皂苷、总黄酮含量测定

2.1.1 黄芪多糖的制备

取黄芪药材粉末 30.0 g,采用石油醚脱脂,水提醇沉的方法提取多糖,体积分数为 70% 的乙醇溶液去除单糖、低聚糖、苷类,Sevag 法去除蛋白对多糖进行纯化,最终得到白色黄芪多糖粉末, Molish 试验、Fehling 试验及双缩脲试验结果表明,黄芪粗多糖中不含蛋白、单糖等杂质。

2.1.2 对照品溶液制备

分别称取 60 °C 干燥恒重的 D-无水葡萄糖对照品约 10 mg(10.03 mg),黄芪甲苷对照品约 2.0 mg(2.02 mg),毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品约 2.5 mg(2.48 mg) 精密称定, D-无水葡萄

糖对照品置于 100 mL 量瓶中,水溶解并定容至刻度,摇匀;黄芪甲苷及毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品分别置于 10 mL、50 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即分别制得每 1 mL 含 0.100 3 mg D-无水葡萄糖,0.202 mg 黄芪甲苷,0.050 mg 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液制备

称取黄芪药材约 0.5 g,精密称定,体积分数为 70% 乙醇回流提取 2 h,弃去醇液,60 °C 烘干,加 50 mL 蒸馏水回流 3 次,每次 1 h,合并,滤过,药渣用蒸馏水洗涤 2 次,每次 50 mL,滤过,与水提液合并,定容至 250 mL,摇匀即得总多糖的供试品溶液;取黄芪药材粉末 1.0 g 精密称定,加甲醇 50 mL,回流 1 h 后,滤过,减压收甲醇,残渣用

50 mL 水饱和正丁醇分3次转移至分液漏斗中, 氨试液洗涤3次, 每次30 mL, 正丁醇层减压回收至干, 甲醇转移至50 mL量瓶中并定容至刻度, 摇匀, 即得总皂苷的供试品溶液; 取黄芪药材粉末1.0 g, 精密称定, 加甲醇40 mL, 回流1 h, 滤过, 适量甲醇洗涤药渣, 合并滤液并转移至50 mL量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 精密量取1.0 mL, 转移至10 mL量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得总黄酮的供试品溶液。

2.1.4 溶液的显色

总多糖的测定: 精密量取对照品溶液或供试品溶液0.5 mL于具刻度试管中, 加水补至1.0 mL, 再加入质量分数8%苯酚溶液1.0 mL, 充分混匀后, 加入浓硫酸5.0 mL, 60℃水浴加热15 min, 取出, 冷却至室温后, 于487 nm下测定吸光度。总皂苷的测定: 精密量取对照品溶液或供试品溶液1.0 mL, 于具塞玻璃试管中, 空气吹干后, 加质量分数为5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL, 高氯酸0.8 mL, 于60℃水浴加热20 min, 取出后冰浴冷却至室温, 再加入冰醋酸5 mL, 摇匀, 于575 nm下测定吸光度。总黄酮的测定: 取溶液适量, 于260 nm下测定吸光度即可。

2.1.5 标准曲线绘制

精密量取D-无水葡萄糖对照品溶液(0.1003 g·L⁻¹) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 黄芪甲苷对照品溶液(0.202 g·L⁻¹) 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液(0.0496 g·L⁻¹) 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别按“2.1.4”条下相应要求同法操作, 以空白溶剂同法处理做参比, 400~700 nm波长下扫描, 以吸光度A为纵坐标, 对照品浓度或质量为横坐标(X), 绘制标准曲线并进行回归计算, 得到的D-无水葡萄糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷的标准曲线回归方程分别为 $A = 0.01X + 0.0469$, $r = 0.9998$; $A = 1.8 \times 10^{-3}X + 5.7 \times 10^{-3}$, $r = 0.9997$; $A = 0.0628X + 0.0911$, $r = 0.9998$ 。结果表明, 葡萄糖在20.1~100.3 mg·L⁻¹内, 黄芪甲苷在40.4~505.0 μg内, 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷在0.5~24.8 mg·L⁻¹内呈良好线性关系。

2.1.6 多糖换算因子计算

称取干燥至恒重的黄芪多糖约10 mg, 精密称定(10.23 mg), 蒸馏水定容至250 mL。取1.0 mL于具塞试管中, 按“2.1.4”条下方法操作,

测定吸光度, 按 $F = c_p/c_g$ 计算换算因子, c_p 为多糖溶液质量浓度(g·L⁻¹), c_g 为多糖中葡萄糖的质量浓度(g·L⁻¹), 平行测定3份, 得换算因子 $F = 1.73$ (RSD = 0.88%)。

2.1.7 精密度试验

分别取D-无水葡萄糖对照品溶液、黄芪甲苷对照品溶液及毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液适量, 依次按“2.1.4”条项下要求同法操作, 连续测定5次, 测得吸光度值, 外标一点法求得总多糖、总皂苷、总黄酮含量, RSD分别为0.11%、0.96%、0.34%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验

取同一批药材(No. 27), 依次按“2.1.3”和“2.1.4”条下要求同法操作, 测得吸光度值, 外标一点法求得总多糖、总皂苷、总黄酮含量, RSD分别为2.28%、1.04%、1.76%(n = 5), 结果表明本方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验

分别取同一批药材3份(No. 27), 依次按“2.1.3”和“2.1.4”条下要求同法操作, 室温放置, 分别在0、2、4、6、12 h测定吸光度值, 外标一点法求得总多糖、总皂苷、总黄酮含量, 计算RSD分别为0.65%、0.89%、0.59%, 结果表明供试品溶液显色后室温放置12 h内稳定性良好。

2.1.10 回收率试验

取黄芪药材9份(No. 27), 每份0.25 g, 精密称定, 分别加入不同量的D-无水葡萄糖对照品适量, 制备低、中、高不同浓度的供试品溶液, 每一浓度3份, 按“2.1.3”及“2.1.4”条下要求同法操作, 测定吸光度, 计算黄芪多糖的平均回收率为97.7%(RSD = 2.23%); 黄芪总皂苷、总黄酮提取回收率的测定取药材0.50 g, 试验方法同上所述, 结果显示黄芪皂苷及总黄酮的平均回收率分别为98.0%(RSD = 1.63%)、95.7%(RSD = 1.92%)。

2.1.11 实际样品测定

总多糖、总皂苷的含量测定每批黄芪药材平行取3份, 每份0.50 g, 精密称定, 总黄酮的含量测定每批黄芪药材平行取3份, 每份1.00 g, 精密称定, 依次按“2.1.3”和“2.1.4”条下要求同法操作, 测定吸光度, 代入标准曲线, 计算含量, 总多糖的测定按公式 $W = \rho \times D \times f/m$ 计算, 其中W为多糖含量(mg·g⁻¹), ρ 为样品中葡萄糖质量浓度

($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) D 为供试品溶液的稀释倍数, f 为换算因子, m 为样品质量(g); 各批次黄芪药材中总多糖、总皂苷、总黄酮含量测定结果如表 2 所示。

Table 2 Contents of the total components in Radix Astragali ($n=3$)

Sample No.	$w(\text{ polysaccharides})$ /%	$w(\text{ saponins})$ /%	$w(\text{ flavonoids})$ /%	Sample No.	$w(\text{ polysaccharides})$ /%	$w(\text{ saponins})$ /%	$w(\text{ flavonoids})$ /%
1	8.96	1.24	0.38	23	10.08	1.05	0.48
2	11.64	1.17	0.44	24	7.61	1.86	0.51
3	9.35	0.89	0.40	25	15.60	0.64	0.41
4	8.89	0.86	0.36	26	2.77	0.73	0.40
5	6.59	0.72	0.49	27	10.54	1.18	0.43
6	9.90	0.93	0.36	28	13.69	2.08	0.55
7	7.34	1.58	0.56	29	17.19	1.72	0.38
8	8.61	1.70	0.57	30	11.61	2.14	0.34
9	2.93	1.02	0.42	31	8.65	2.18	0.33
10	10.94	0.72	0.35	32	8.39	2.21	0.40
11	11.98	0.56	0.30	33	10.15	2.15	0.53
12	4.75	0.77	0.37	34	10.34	0.94	0.40
13	7.20	1.03	0.24	35	11.75	0.72	0.27
14	10.31	1.07	0.40	36	12.60	1.41	0.39
15	5.79	0.52	0.39	37	8.63	1.58	0.28
16	7.19	1.39	0.38	38	8.91	1.19	0.25
17	6.61	0.91	0.38	39	11.94	1.13	0.22
18	3.44	1.04	0.43	40	9.58	1.36	0.25
19	5.99	1.39	0.35	41	9.95	1.02	0.22
20	7.03	1.29	0.34	42	11.21	1.72	0.26
21	9.07	1.38	0.46	43	10.14	1.36	0.26
22	10.60	1.33	0.44				

2.2 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱: Kromasil ODS 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-质量分数为 0.1% 的磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序 [0 ~ 36 min, 15% ~ 31% (φ) A, 36 ~ 65 min, 31% ~ 90% (φ) A, 65 ~ 75 min, 90% ~ 95% (φ) A]; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 203 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。在上述色谱条件下, 以芒柄花素的色谱峰(13 号峰, 内参比峰) 计算理论塔板数不低于 20 000。

2.2.2 供试品溶液制备

取黄芪药材粉末约 2.5 g, 精密称定, 加入 50 mL 的甲醇超声提取 3 次, 每次 30 min, 滤过, 残渣加少量甲醇洗涤 3 次, 与提取液合并, 旋蒸浓缩至适量后, 转移至 5 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取

续滤液, 即得^[4]。

2.2.3 对照品溶液制备

精密称取芒柄花素、芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷适量, 用甲醇溶解并稀释成每 1 mL 含芒柄花素 0.1 mg、芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷 0.1 mg、毛蕊异黄酮 0.1 mg、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷 0.1 mg 的混合对照品溶液, 用于指纹图谱色谱峰的指认。

2.2.4 精密度试验

取黄芪供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录色谱指纹图谱, 结果表明, 各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 符合色谱指纹图谱要求。

2.2.5 重复性试验

取同一样品供试品溶液 5 份, 按“2.2.2”条下

方法操作 进样分析,记录色谱指纹图谱,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5.0% 符合色谱指纹图谱要求。

2.2.6 稳定性试验

取样品供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进样分析,记录色谱指纹图谱,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 5.0% 符合色谱指纹图谱要求。

2.2.7 内参比峰的选择及特征峰的确定

各批次样品色谱图中,13 号峰(芒柄花素)与

其他色谱峰达到基线分离,且色谱峰面积稳定,因此选定 13 号峰为药材指纹图谱的内参比峰。以形态学鉴定的 43 批黄芪药材为研究对象,进行色谱指纹图谱研究,共获得 15 个共有峰,通过比对保留时间和对照品加入法,指认其中 4 个色谱峰,分别为毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1 号峰)、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷(3 号峰)、毛蕊异黄酮(6 号峰)、芒柄花素(13 号峰)。典型色谱图见图 1,43 批黄芪药材及其共有模式色谱图见图 2。

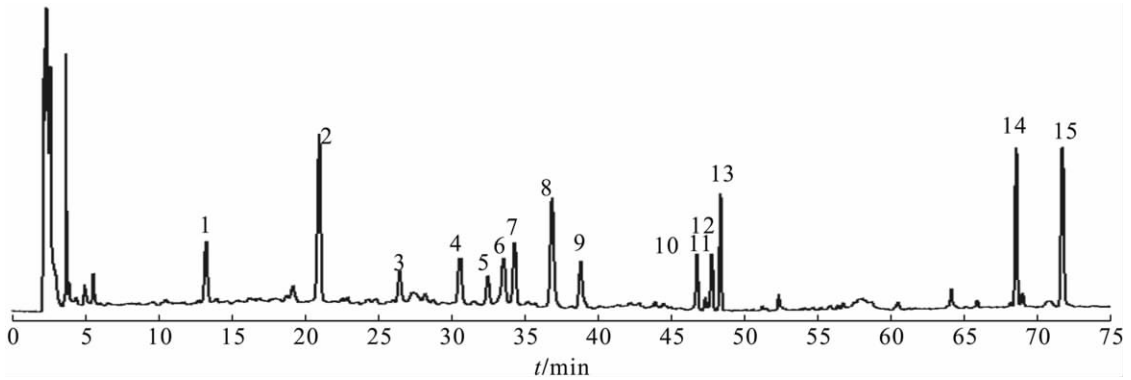


Fig. 1 Fingerprint chromatogram of Radix Astragali

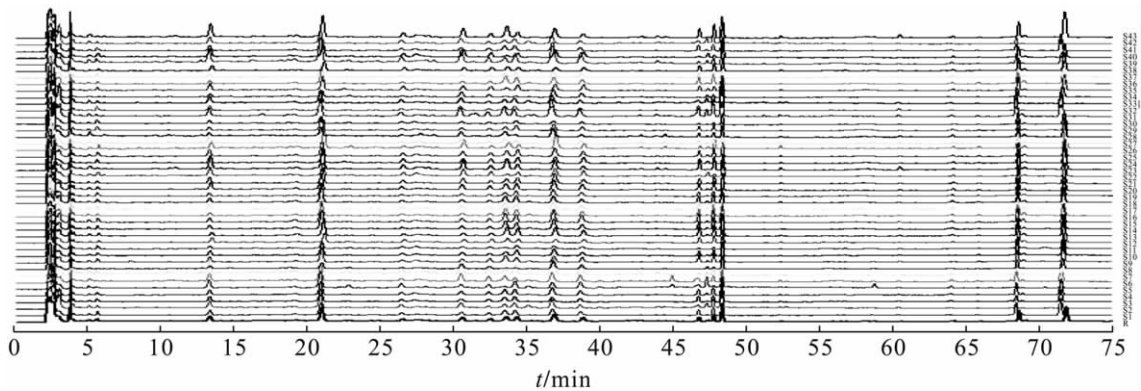


Fig. 2 Fingerprint chromatogram of Radix Astragali samples from different origins

2.3 黄芪药材综合质量评价方法的确定

2.3.1 权重系数的确定

作者共收集 43 个样本,每个样本存在 18 个变量(变量 1~15 分别为 15 个共有峰的峰面积,变量 16~18 分别为总多糖、总皂苷、总黄酮含量)形成原始数据矩阵 $X = (X_{ij})_{43 \times 18}$ 。采用独立性权数法确定原始数据矩阵中变量的权重系数,基本原理是利用多元线性回归的方法,计算复相关系数 R ,复相关系数越大,所赋的权数越大。计算各变量与其它变量的复相关系数 R , R 越大,重复信息越多,权重应越小。取复相关系数的倒数 R^{-1} 作为得分,再经归一化处理得权重系数

W_i [5-6]。应用 SPSS 软件计算各变量权重系数见表 3。

2.3.2 系统聚类分析

应用 SPSS 软件,采用类间平均链锁法(Between-groups linkage),以夹角余弦(Cosine)作为样品相似度的测度[7]将各样本 18 个指标分别乘以相应权重系数(表 3 所示)后,进行计算,结合形态学鉴定 43 批药材可分为 2 类,(样品 1~4, 6, 8~33, 35~43 为第 I 类;样品 5, 7, 34 为第 II 类),判定第 I 类为推荐品,第 II 类为非推荐品。聚类结果见图 3。

Table 3 Weight coefficient for each variable based on the independent weight method

Variable No.	R	R ⁻¹	W	Variable No.	R	R ⁻¹	W
1	0.980	1.020	0.048 8	10	0.934	1.071	0.051 2
2	0.984	1.026	0.048 6	11	0.783	1.277	0.061 1
3	0.951	1.052	0.030 3	12	0.966	1.035	0.049 6
4	0.987	1.013	0.048 5	13	0.779	1.284	0.061 4
5	0.975	1.026	0.049 1	14	0.945	1.058	0.050 7
6	0.981	1.019	0.048 8	15	0.957	1.045	0.050 0
7	0.944	1.059	0.050 7	16	0.439	2.278	0.109 0
8	0.990	1.010	0.048 3	17	0.684	1.462	0.070 0
9	0.977	1.024	0.049 0	18	0.875	1.143	0.054 7

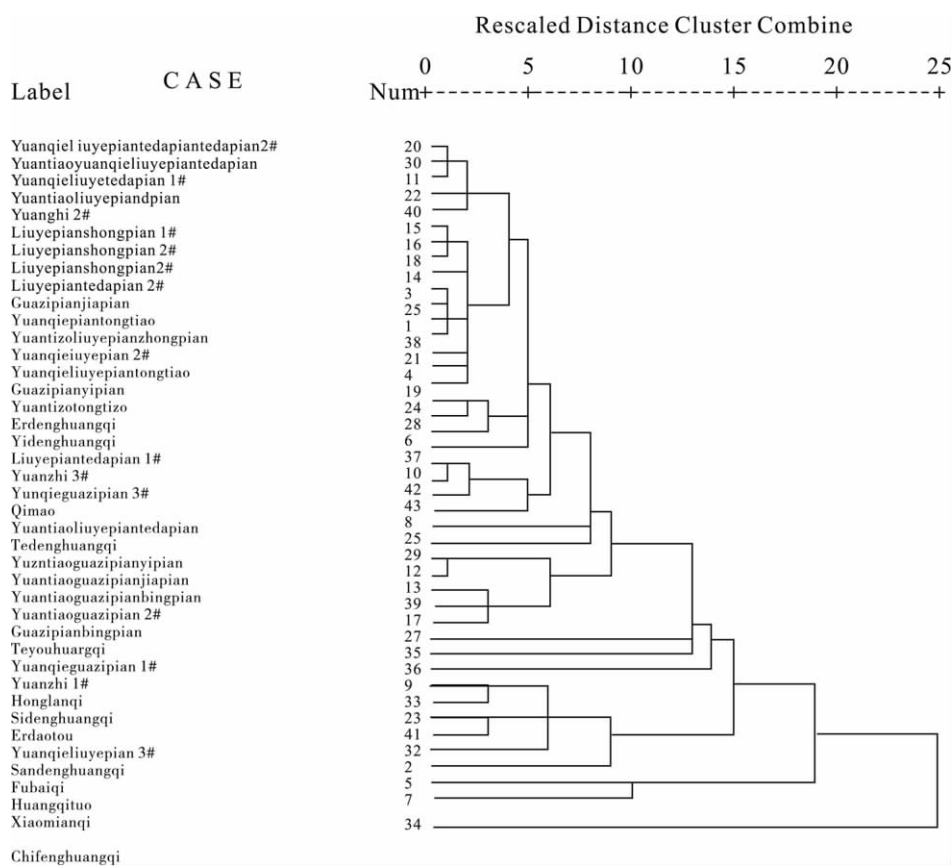


Fig. 3 Dendrogram of hierarchical clustering analysis

2.3.3 相似度分析

结合聚类分析的结果,从43批黄芪药材中选取40批推荐品药材(1~4、6、8~33、35~43号样品)建立共有模式。采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2009年版)计算43批药材的色谱指纹图谱相似度评价结果

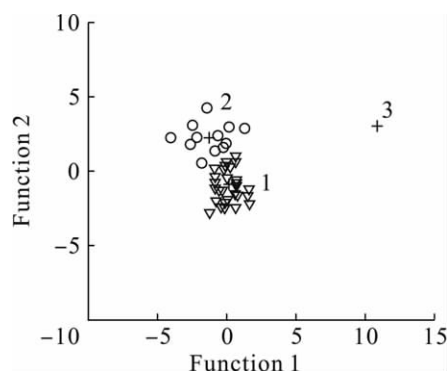
见表4。若相似度在0.90以上,则判定为推荐品;若相似度在0.80~0.90之间,则判定为非推荐品。本研究相似度分析结果显示:43批药材中5、7、34号样品相似度均低于0.90,相似度分析结果与系统聚类分析结果一致,判定该类为非推荐品。

Table 4 The results of similarity analysis

Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity
1	0.996	12	0.913	23	0.954	34	0.822
2	0.901	13	0.951	24	0.965	35	0.900
3	0.999	14	0.980	25	0.959	36	0.924
4	0.976	15	0.977	26	0.995	37	0.963
5	0.892	16	0.987	27	0.925	38	0.990
6	0.982	17	0.973	28	0.979	39	0.928
7	0.888	18	0.989	29	0.954	40	0.984
8	0.972	19	0.983	30	0.986	41	0.954
9	0.915	20	0.982	31	0.924	42	0.990
10	0.983	21	0.992	32	0.925	43	0.976
11	0.984	22	0.987	33	0.923		

2.3.4 判别分析

以黄芪药材的产地作为分类变量,对 18 个原始变量赋权后,采用逐步回归法进行 Fisher 判别分析,得判别函数: $Y_1 = -0.016 X'_1 + 0.046 X'_4 + 0.002 X'_5 - 0.008 X'_7 + 0.008 X'_8 - 0.038 X'_{14} + 0.153 X'_{18}$ 、 $Y_2 = -0.004 X'_1 - 0.011 X'_4 - 0.020 X'_5 + 0.014 X'_7 + 0.004 X'_8 - 0.031 X'_{14} + 29.686 X'_{18}$, X'_i 为第 i 个赋权变量 ($i = 1, 4, 5, 7, 8, 14, 18$)。第 1 类与第 2 类间的临界值为 $Y_1^c = -0.262$ 、 $Y_2^c = -0.08$; 第 1 类与第 3 类间的临界值为 $Y_1^c = 0.473$ 、 $Y_2^c = -0.857$; 第 2 类与第 3 类间的判别临界值为 $Y_1^c = -0.282$ 、 $Y_2^c = 2.344$ 。用该判别函数对 43 批黄芪药材进行判别分类,采用交叉核实法对判别效果进行评价,对黄芪产地进行判别的正确率为 90.7%,合并判别结果如图 4 所示。作者又以表 4 中的相似度结果作为黄芪药材优劣的分类变量,相似度大于等于 0.900 取值 1,小于 0.900 取值 2。利用 SPSS 软件对赋权后的数据作主成分分析,以累计贡献率 80.0% 作为标准,从 18 个指标中提取出 5 个主成分,这样原 18 维数据便转化成 5 维数据,对该 5 维数据作 Fisher 判别分析,采用逐步回归法,第 4 主成分、第 5 主成分被剔除,得判别函数: $Y_1 = -0.175 Z_1 + 0.369 Z_2 + 0.908 Z_3$, Z_i 表示第 i 主成分 ($i = 1, 2, 3$)。判别函数临界值为 $Y_c = -1.861$,用该判别函数对 43 批黄芪药材进行判别分类,采用交叉核实法对判别效果进行评价^[8],对黄芪推荐品进行判别的正确率为 100%,与相似度分析结果一致。



△—Ganshu; ○—Sanxi; ×—Chifeng; +—Group centroid
Fig. 4 The combined - groups plots of the 43 samples classified by the sources

3 讨论

a. 作者采用单因素循环试验的方法,分别对溶剂倍量、提取时间以及提取次数进行了考察,结果显示,多糖的最优提取工艺为 50 mL 水回流提取 3 次,每次 1 h;皂苷的提取工艺为 40 mL 甲醇回流提取 1 h,提取 1 次;黄酮的提取工艺为 40 mL 甲醇回流提取 1 h,提取 1 次。

b. 关于总黄酮含量测定的报道大多采用比色法,以芦丁为对照品,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 为显色剂进行含量测定^[9-10]。本研究中作者曾照上述比色法,在 350 ~ 600 nm 波长处扫描,结果对照品与供试品溶液显色后,在 510 nm 左右无明显吸收峰,而在 200 ~ 400 nm 内对黄芪中的主要的 4 种黄酮类成分对照品溶液(毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖

苷、芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷)进行紫外扫描,发现均在260 nm附近有最大吸收,故采用紫外分光光度法测定黄芪总黄酮的含量,操作简便,重现性好,结果准确。

c. 作者分别对熵权法、信息量权重法和独立性权重法对变量的加权效果进行了考察,由于熵权法及信息量定权法仅从数据本身的离散程度来考察权重大小,而忽略了变量之间存在的线性关系,就本研究而言,变量1-15反映黄芪药材中的特征性单体成分含量信息,而变量16-18反映黄芪有效部位总成分含量信息,二者必存在一定的线性相关性,由多元线性回归结果(表3)可知,变量17、18(总皂苷、总黄酮含量)与变量1-15之间将存在较强的相关性,而变量16(总多糖含量)则与变量1-15之间几乎不存在相关性,说明作为黄芪主要药效成分之一的总多糖含量难以反映在以紫外检测为主的HPLC色谱指纹图谱中,因此给予了较高的权重,同时也证实了采用独立性权重法赋权更具有合理性。本研究中作者将中药材有效部位的总含量与反映中药材单体化学成分信息的色谱指纹图谱共有峰综合考虑,再进行聚类分析,进而对不同批次的药材进行更为全面的评价,结合形态学鉴定、相似度分析结果,第1~4、6、8~33、35~43号样品为推荐品,第5、7、34号样品为非推荐品。

d. 作者在Fisher判别函数建立过程中发现,对赋权原始变量进行逐步判别所建立的Fisher判别函数能比较准确地对药材的产地进行归属,与依靠主成分建立的判别函数相比,回代准确度由86.0%提高至90.7%,且高于聚类分析对产地的

归属正确率(86.0%);而以主成分作为判别指标建立的Fisher判别函数则能更加准确地对药材的优劣进行判别,回代准确度为100.0%,与相似度分析结果一致。

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,2010:283.
- [2] 马晓丰. 蒙古黄芪的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2003.
- [3] 李瑞芬,周玉枝,乔莉,等. 蒙古黄芪化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(1):20-22.
- [4] 田兰,程海燕,李清,等. 黄芪药材的HPLC色谱特征图谱[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(12):979-982.
- [5] 王晖,陈丽,刘庆,等. 多指标综合评价方法及权重系数的选择[J]. 广东药学院学报,2007,23(5):583-589.
- [6] 刘自远,刘成福. 综合评价中指标权重系数确定方法讨论[J]. 中国卫生质量管理,2006,13(2):44-47.
- [7] 王玺,王文宇,毕开顺. 中药HPLC色谱特征图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(5):360-362.
- [8] 孙振球,徐勇勇. 医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:387.
- [9] 严赞开. 紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J]. 食品研究与开发,2007,28(9):164-167.
- [10] 郭亚建,范莉,王小强,等. 关于 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2):97-99.

Synthetical quality evaluation of Astragali Radix

SONG Xiao-wei¹, LI Qing¹, LUO Hu-ji², YE Jing¹, CHEN Xiao-hui¹, BI Kai-shun¹
(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Infinitus (China) Company Ltd, Guangzhou 510000, China)

Abstract: Objective To determine the contents of total components in Astragali Radix. To establish the HPLC specific chromatogram and Fisher discriminant function of Astragali Radix. **Methods** The colorimetry was used for the determination of the total polysaccharides and total saponins and ultraviolet spectrophotometry method for the determination of the total flavonoids. Phenol-sulfuric acid and vanillin-glacial acetic acid-

(下转至第 639 页)

- Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease [J]. *Nat Med* 2007 ,13(4) : 432 - 438.
- [21] ASHE K H. A tale about tau [J]. *N Engl J Med* 2007 , 357(9) : 933 - 935.
- [22] WYSS-CORAY T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force ,bystander or beneficial response [J]. *Nat Med* 2006 ,12(9) : 1005 - 1015.

Novel regulatory mechanisms of the GPCR/secretase complex on the pathogenesis of Alzheimer's disease

CUI Jin¹ , ZHAO Jian¹ , PEI Gang²

(1. *Institute of Biochemistry and Cell Biology , Shanghai Institutes for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200031 , China*; 2. *School of Life Science and Technology , Tongji University , Shanghai 200092 , China*)

Abstract: Objective To review the mechanistic studies on G protein-coupled receptors' (GPCRs) regulatory roles in the progress of Alzheimer's Disease(AD) and to discuss the potentials of targeting GPCRs to develop novel anti-AD drugs or therapeutic strategies with less side-effects and better clinical efficacy. **Methods** Cell biology and animal model based recent research progress in the field was reviewed in this article and a few hot topics related to the topic were discussed. **Results and Conclusions** A list of GPCRs regulate the pathogenesis of AD through a substrate specific mechanism and show great potentials to be utilized as the novel therapeutic targets for AD prevention and treatment.

Key words: Alzheimer's disease; G protein-coupled receptors; secretase; amyloid- β

(上接第 606 页)

perchloric acid were used as the color developing reagents for the total polysaccharides and total saponins , respectively. Agilent 1100 series was used under the following chromatographic conditions: column by Kromasil ODS(250 mm \times 4.6 mm 5 μ m) , acetonitrile(A) -0.1% (φ) phosphoric acid solution(B) with gradient elution 0-36 min ,15%-31% A ,36-65 min ,31%-90% A ,65-75 min ,90%-95% A) at a flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹ , wavelength of 203 nm , column temperature of 35 $^{\circ}$ C. **Results** The standard curve was linear in the range of 20.1-100.3 mg \cdot L⁻¹ for *D*-glucose ,40.4-505.0 μ g for astragaloside IV and 0.5-24.8 mg \cdot L⁻¹ for calycosin-7-O- β -*D*-glycoside respectively with the average recoveries of total polysaccharides , total saponins and total flavonoids of 97.7% ,98.0% and 95.7% , respectively. A satisfactory method for HPLC specific chromatogram determination of Astragali Radix was established , fifteen characteristic peaks in the HPLC specific chromatogram were indicated. The forty-three batches of the Astragali Radix were recommended into two based on the results of cluster analysis. **Conclusions** The determination of the total components combined with the HPLC characteristic peaks based on the independent weighing method and the established discriminant functions can be used as a good synthetical quality control method for the Astragali Radix.

Key words: Astragali Radix; total polysaccharide; total saponin; total flavanoid; fingerprint chromatogram; synthetical quality evaluation