

甘肃栽培蒙古黄芪横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性研究

王振恒^{1,2,3}, 马定财¹, 邵晶^{1,2,3*}, 晋玲^{1,2,3*}, 李小凤¹, 林丽^{1,2,3}[1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2.甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; 3.西北中藏药协同创新中心, 兰州 730000]

摘要: 目的 研究蒙古黄芪横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性, 为蒙古黄芪商品等级划分和质量评价提供依据。方法 测量 13 批蒙古黄芪药材横切面 7 个组织显微定量参数, HPLC 测量质量标志物中 7 个化学成分; 对 13 批蒙古黄芪药材的 7 个组织显微定量参数和 7 个质量标志物及其相加相除运算的 8 个结果(以下简称“运算结果”), 分别运用 SPSS 26.0 软件进行 Spearman 相关性分析和聚类分析, Graphpad Prism 8.0 对显著相关变量进行多元线性回归, SIMCA 14.1 进行主成分分析。结果 木射线数、木质部宽度、木栓层宽度、韧皮部宽度/木质部宽度与质量标志物及其运算结果存在多对显著相关关系, 蒙古黄芪横切面组织形态可以描述质量标志物含量。主成分分析提取了 2 个主成分, 对主成分贡献较大的 6 个变量分别是毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、韧皮部宽度/木质部宽度、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II, 其将 13 批蒙古黄芪药材分为 2 类, 结果与聚类分析一致。结论 本研究基于横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性, 以蒙古黄芪横切面组织显微定量参数间接表征质量标志物的含量, 为蒙古黄芪药材商品等级划分的综合依据提供新的科学基础, 对于蒙古黄芪药材质量现代化评价模式的形成具有参考价值。

关键词: 蒙古黄芪; 组织显微定量; 质量标志物; 相关性; 商品等级划分; 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)06-0767-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223340

引用本文: 王振恒, 马定财, 邵晶, 等. 甘肃栽培蒙古黄芪横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(6): 767-776.

Study on the Correlation Between the Microstructure Quantification and the Content of Quality Markers of Cultivated *Astragalus Membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*Mongholicus*(Bge.)Hsiao in Gansu Province

WANG Zhenheng^{1,2,3}, MA Dingcai¹, SHAO Jing^{1,2,3*}, JIN Ling^{1,2,3*}, LI Xiaofeng¹, LIN Li^{1,2,3}(1.College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Quality Research in Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 3.Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide the basis for commodity grade classification and quality evaluation of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao by studying the correlation between the microscopic quantification of transsection tissue of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao and the content of quality markers. **METHODS** The microscopical quantitative parameters of 7 tissues in the cross section of 13 batches of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao were measured, and the chemical components of 7 quality markers were measured by HPLC. For 7 tissues microquantitative parameters and 7 quality markers of 13 batches of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao and 8 results of addition and division calculation(hereinafter referred to as “calculation results”), SPSS 26.0 software was used for Spearman correlation analysis and cluster analysis, Graphpad Prism 8.0 was used for multiple linear regression of significant correlation variables, and SIMCA 14.1 was used for principal component analysis. **RESULTS** There were many pairs of significant correlation between wood ray number, xylem width, cork layer width, phloem width/xylem width and the quality markers and their calculation results. The tissue morphology of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao transverse section could describe the content of quality markers. Two principal components were extracted by principal component analysis, and the six variables that contributed significantly to the principal components were calycosin-7-glucoside, ononin, phloem width/xyloside width, astragaloside IV, Astragaloside I and Astragaloside II. Thirteen batches of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao were divided into two

基金项目: 甘肃省科技计划自然科学基金项目 (21JR11RA136); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题 (ZYG202004); 中医药公共卫生服务补助专项子课题 (2305191901); 兰州市城关区科技计划项目 (2020JSCX0058)

作者简介: 王振恒, 男, 硕士, 副教授 E-mail: 363340807@qq.com *通信作者: 邵晶, 女, 博士, 教授, 硕导 E-mail: cn221@163.com 晋玲, 女, 博士, 教授, 博导 E-mail: 1131858632@qq.com

中国现代应用药学 2024 年 3 月第 41 卷第 6 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2024 March, Vol.41, No.6

· 767 ·

categories, and the results were consistent with cluster analysis. **CONCLUSION** Based on the correlation between the microscopic quantification of cross-section tissue and the content of quality markers, this study indirectly represents the content of quality markers with the microscopic quantitative parameters of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao cross-section tissue, which provides a new scientific basis for the comprehensive basis of commodity grade classification of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao medicinal materials, and has reference value for the formation of modern evaluation model of *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.)Hsiao medicinal materials quality.

KEYWORDS: *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge. var. *mongholicus*(Bge.)Hsiao; microstructure quantification; quality markers; relevance; commodity grade division; quality evaluation.

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge.var.*mongholicus*(Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge.的干燥根^[1], 具有抗肿瘤、抗病毒、神经保护、降血糖、抑制黑色素生成等药理作用^[2]。近年来, 随着计算机技术的发展, 基于体视学和计算机图像测试技术的显微定量分析应用于中药易混淆品种鉴定和中药品质评价, 将中药活性成分与内部组织结构联系在一起, 对中药的显微特征常数与其活性成分含量进行相关性分析^[3]。对显微特征明显, 而化学成分不明确或者复杂的中药, 可以利用显微量化进行质量控制。显微量化主要分为两部分, 一是中药粉末显微定量, 二是中药特殊组织显微定量。有学者将粉末显微量化应用于中药材品种和年限的鉴别^[4-5]、中成药的含量测定^[6-8], 以及和化学成分的相关性研究^[9-12]。也有学者将中药材横切面组织显微定量应用于品种鉴别^[13-15], 以及和化学成分的相关性研究^[16-19]。关于黄芪横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性研究还未见有关报道。刘昌孝院士提出的中药质量标志物对反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制^[20]。研究表明, 黄芪质量标志物集中在多糖类、黄酮类、皂苷类^[21-23], 主要集中在毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II, 故质量标志物选取以上 7 个成分。熊一峰^[24]研究表明, 黄芪皂苷类成分绝大多数存在表皮或者韧皮部, 黄酮类成分在韧皮部、木质部、表皮均有分布, 但木质部较多。参考相关文献^[13-19], 本研究选择木射线数、韧皮射线数、单列导管数、木质部宽度、韧皮部宽度 (不包括皮部)、木栓层厚度、韧皮部宽度/木质部宽度 7 个组织形态定量参数, 对质量标志物与组织显微定量参数进行相关性探究, 对显著相关的变量进行多元线性回归并进行主成分和聚类分析。为完善蒙古黄芪药材商品等级划分提供理论依据, 探究横切面组织显微定量

评价蒙古黄芪质量的可行性。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (二极管阵列检测器、蒸发光散射检测器, 美国 Agilent 公司); CM1950 冷冻切片机 (Leica 公司); B×43+DP74 正置显微镜 (甘肃嘉瑞贸易有限责任公司); KQ-700D 型超声清洗器 (昆山市仪器有限责任公司); BT125D 型十万分之一电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); PURELAB Classic 实验室超纯水机 (ELGA 公司)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: 14051927)、芒柄花苷 (批号: 16112156)、毛蕊异黄酮 (批号: 19073098)、芒柄花素 (批号: 15102066)、黄芪甲苷 (批号: 18112506)、黄芪皂苷 II (批号: 18052568)、黄芪皂苷 I (批号: 18052677) 均购自兰州普兰特生物有限公司, 对照品质量分数均 >98%。色谱纯和分析纯均来自天津大茂化学试剂厂, 超纯水为实验室自制。

样品基于第四次全国中药资源甘肃黄芪红芪栽培调查, 经甘肃中医药大学崔治家教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bge. var. *mongholicus*(Bge.)Hsiao 的干燥根, 生长年限为 2 年, 等级划分参考《七十六种药材商品规格等级》^[25], 样品信息见表 1。

2 方法

2.1 黄芪横切片的制备

先将黄芪药材软化, 取切除芦头以下 3.5 cm 处, 用单面刀片切成 0.3~0.5 cm 厚的圆片, 放置于培养皿中并加蒸馏水适量, 调整冷冻室温度为 -20 ℃, 冷台温度为 -23 ℃, 涂抹包埋剂, 冷冻 3~4 min, 切片厚度调整为 15~20 μm。滴蒸馏水展片。

2.2 黄芪横切面组织显微观测

木射线和韧皮射线数量统计: 10×4 倍镜下, 选取每张制片 3 个不同位置 (相邻位置与圆心连线近似 120°), 统计 3 张不同制片的木射线和韧皮射线的条数、单列导管数、韧皮部和木质部宽度,

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of the samples

编号	采集时间	等级	产地
S1	2019年10月	二	35°2'34.28"N, 104°19'21.69"E
S2	2019年10月	一	34°30'7.62"N, 103°50'11.13"E
S3	2019年10月	二	35°20'6.37"N, 105°15'25.08"E
S4	2019年10月	二	33°29'36.99"N, 104°58'21.6"E
S5	2019年10月	二	33°28'24.43"N, 105°7'20.34"E
S6	2019年10月	二	35°11'39.06"N, 106°34'29.4"E
S7	2019年10月	二	35°12'9.33"N, 106°2'17.06"E
S8	2019年10月	二	34°51'6.76"N, 104°22'1.5"E
S9	2019年10月	二	36°57'28.56"N, 107°1'37.71"E
S10	2019年10月	二	35°4'20.58"N, 104°22'51.43"E
S11	2019年10月	三	35°41'30.75"N, 102°52'19.85"E
S12	2019年10月	三	34°45'51.04"N, 103°56'36.44"E
S13	2019年10月	二	34°59'2.6"N, 104°39'17.4"E

10×40 倍镜下, 测量木栓层宽度。以上标记、拍照和记录, 见图 1, 计算平均值, 见表 2。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件^[26-27] 黄酮类: Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相甲醇 (A)-0.1% 磷酸水 (B), 洗脱梯度为 0~35 min, 25%→60%A; 35~45 min, 60%A。检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。皂苷类: Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相乙腈 (A)-水 (B), 黄芪甲苷洗脱梯度为 0~6 min, 30%→41%A; 6~10 min, 41%→45%A; 10~12 min, 45%A; 12~14 min, 45%→30%A。黄芪皂苷 II、

表 2 横切面组织显微定量 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 2 Microstructure quantification in transverse section ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

编号	单列导管/个	木射线/条	韧皮射线/条	木栓层宽度/μm	木质部宽度/μm	韧皮部宽度/μm
S1	12.00±2.13	23.00±2.20	20.00±3.10	87.29±5.46	3 142.37±98.13	2 485.87±89.12
S2	9.00±1.24	16.00±1.25	14.00±3.10	103.09±5.66	3 853.65±22.13	2 796.93±102.87
S3	11.60±1.25	15.67±1.25	13.67±6.60	76.19±4.88	3 239.47±69.69	2 325.04±151.27
S4	14.83±3.00	16.17±4.00	21.50±4.00	93.43±16.28	2 169.94±223.00	2 306.11±161.92
S5	10.33±0.47	15.67±1.25	14.00±1.41	65.01±4.50	4 341.46±33.71	2 603.05±45.91
S6	11.67±1.25	17.00±1.41	17.33±2.62	100.71±6.14	3 041.31±109.77	1 721.28±102.81
S7	7.40±2.22	13.36±5.91	10.48±3.97	60.30±24.42	3 448.05±152.04	1 823.47±83.91
S8	17.17±5.00	24.33±6.00	21.00±2.00	87.29±11.75	3 753.42±201.94	1 592.47±350.11
S9	17.00±4.00	12.00±7.00	21.00±1.00	39.91±6.69	3 555.77±24.12	1 118.08±43.33
S10	13.47±5.10	23.05±4.05	18.79±4.51	63.81±14.17	2 985.08±878.92	1 509.51±500.83
S11	12.75±4.02	15.75±3.27	12.50±4.03	75.78±14.86	2 662.41±1 215.06	2 020.42±329.21
S12	12.17±6.79	16.08±3.64	14.75±5.72	83.37±18.54	2 435.46±589.18	1 633.56±579.79
S13	11.56±2.22	19.44±3.65	16.56±5.70	75.66±17.79	2 904.70±977.54	2 360.36±240.09

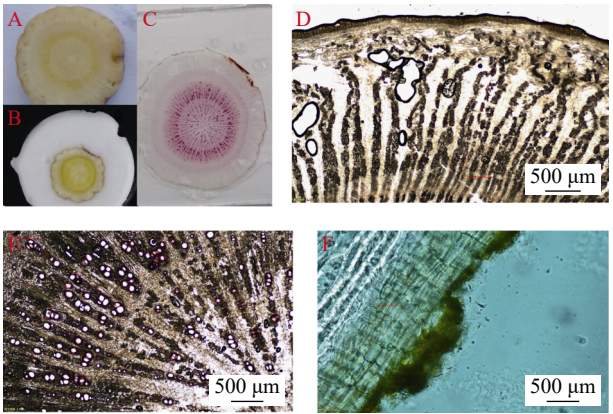


图 1 横切面组织显微图

A-黄芪横切面; B-横切面包埋; C-浓盐酸-间苯三酚染色; D-韧皮部; E-木质部; F-木栓层。

Fig. 1 Tissue micrograph of transverse section

A-Transverse section of Astragali Radix; B-embedded transverse section; C-concentrated hydrochloric acid-phloroglucinol staining; D-phloem; E-xylem; F-cork layer.

I 洗脱梯度为 0~6 min, 30%→41%A; 6~10 min, 41%→45%A; 10~12 min, 45%A; 12~14 min, 45%→55%A; 14~18 min, 65%A; 18~20 min, 65%→30%A。雾化温度 30 ℃, 蒸发温度 90 ℃, 氮气流速 1.6 L·min⁻¹, 进样量 10 μL。

分别以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷计, 理论塔板数均满足中国药典 2020 年版不得低于 3 000, 4 000 的要求。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取黄芪粉末 4.0 g, 置 150 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 称定质量, 4 ℃ 冷浸 16 h, 75 ℃ 回流 3 h, 补重, 抽滤, 减压浓缩, 用甲醇定容至 5 mL, 置 4 ℃ 保存

备用,测定毛蕊异黄酮苷等6个成分;测定黄芪甲苷的含量时,提取溶剂变为(甲醇:氨水=4:1)50 mL,补重用80%的甲醇,其余操作一致^[26,28]。

2.3.3 对照品溶液制备 精密称取对照品适量,配置成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素分别是0.90, 0.40, 0.20, 0.02 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液1,黄芪皂苷II、黄芪皂苷I分别是0.340, 0.788 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液2,黄芪甲苷对照品溶液0.782 mg·mL⁻¹。

2.3.4 线性关系考察 分别将混合对照品溶液按照倍半稀释法连续稀释,按“2.3.1”项下方法进样,以质量浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归。结果见表3。

表3 线性关系考察

Tab.3 Investigation of linear relationship

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ mg·mL ⁻¹
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=29\,560X-0.000\,7$	1.000 0	0.001 8~0.90
芒柄花苷	$Y=37\,280X-4.241\,2$	1.000 0	0.000 3~0.40
毛蕊异黄酮	$Y=45\,844X-6.846\,3$	1.000 0	0.000 6~0.20
芒柄花素	$Y=114\,258X-2.492\,0$	1.000 0	0.000 3~0.020
黄芪甲苷	$\lg Y=1.531\,9\lg X+3.299\,6$	0.999 8	0.097 8~0.782
黄芪皂苷II	$\lg Y=1.650\,2\lg X+3.394\,3$	0.999 9	0.084 5~0.340
黄芪皂苷I	$\lg Y=1.284\,3\lg X+3.445\,3$	0.999 6	0.049 4~0.788

2.3.5 仪器精密度试验 取“2.3.3”项下对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积并进行偏差分析,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I峰面积RSD分别为0.53%, 0.40%, 0.68%, 0.38%, 1.24%, 2.53%, 2.18%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密称取黄芪粉末4.0 g,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.3.1”项下色谱条件,以0, 2, 4, 8, 16, 24 h进样,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I峰面积RSD分别为1.22%, 1.25%, 0.59%, 1.24%, 1.92%, 2.26%, 0.83%,表明稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 精密称取黄芪粉末4.0 g,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.3.1”项下色谱条件进样,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、黄

芪皂苷II、黄芪皂苷I峰面积RSD分别为2.25%, 1.37%, 1.96%, 1.30%, 0.77%, 2.94%, 2.97%,表明重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的黄芪粉末1.0 g,加入样品含量80%, 100%, 120%的对照品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液各3份,按“2.3.1”项下色谱条件进样。回收率分别为98.07%, 100.53%, 98.42%, 94.91%, 94.27%, 103.75%, 102.97%,结果见表4。

2.3.9 黄酮类成分含量测定 将黄芪粉末按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样并进行谱图分析,结果见表5和图2。

3 基于化学计量学的数据分析

3.1 相关性及多元线性回归分析

参考孙秀蕊等^[29]研究中利用化学成分峰面积及其峰面积比值与外观性状相关性分析的方法,本研究基于蒙古黄芪横切面7个组织显微定量参数、7个化学成分、(毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/毛蕊异黄酮、(毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/芒柄花素、皂苷和(黄芪甲苷、黄芪皂苷I、黄芪皂苷II 3个成分之和)、黄酮和(毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 4个成分之和)、皂苷和/黄酮和、毛蕊异黄酮苷/黄芪甲苷、黄芪甲苷/(黄芪皂苷I+黄芪皂苷II)共22个变量,用SPSS软件进行Spearman相关性分析,选取显著相关的变量($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见表6。对原始数据做标准化处理,输入Graphpad Prism 8.0得到多元线性模型图见图3,图中的 R^2 为调整后 R^2 , R^2 越大,自变量对因变量的解释程度越高,自变量引起的变动占总变动的百分比越高。多元线性回归方程的 R^2 分别为0.430, 0.442, 0.439, 0.344, 0.570, 0.371, 0.435, 0.878,排除不可控因素的影响,蒙古黄芪横切面组织显微定量可以描述质量标志物含量。

3.2 聚类分析

将蒙古黄芪横切面组织显微定量和质量标志物含量9个变量输入SPSS 26.0软件,以平方欧氏距离为区间,采用组内均连法,见图4。对13批黄芪药材系统聚类,结果显示,13批黄芪药材聚为2类。S2、S3、S4、S13、S11、S12聚为一类, S5、S7、S9、S1、S6、S10、S8聚为一类。

表 4 加样回收率试验结果
Tab. 4 Results of recovery test

组分	称样量/g	样品含 量/g	对照品加 入量/mg	测得总 量/mg	回收率/ %	回收率 均值/%	RSD/ %
毛蕊异黄 酮苷	1.001 5	0.127 4	0.102 0	0.227 9	98.53	98.07	1.49
	0.999 9	0.127 3	0.102 0	0.224 2	94.95		
	1.00 28	0.127 7	0.102 0	0.226 9	97.24		
	1.003 2	0.127 8	0.127 0	0.253 8	99.24		
	1.001 1	0.127 5	0.127 0	0.252 1	98.11		
	1.004 5	0.127 9	0.127 0	0.254 9	99.97		
	1.002 0	0.127 6	0.153 0	0.276 5	97.31		
	1.000 8	0.127 5	0.153 0	0.277 9	98.32		
	1.004 1	0.127 9	0.153 0	0.279 3	98.96		
毛蕊异 黄酮	1.001 3	0.032 0	0.026 0	0.056 9	95.77	98.42	2.36
	1.002 4	0.032 0	0.026 0	0.058 0	99.86		
	1.002 2	0.032 0	0.026 0	0.057 4	97.72		
	1.003 0	0.032 0	0.033 0	0.064 9	99.62		
	1.000 8	0.031 9	0.033 0	0.063 3	95.06		
	1.001 4	0.032 0	0.033 0	0.065 7	102.06		
	1.002 2	0.032 0	0.039 0	0.071 3	100.70		
	1.002 1	0.032 0	0.039 0	0.069 8	96.93		
	1.001 1	0.032 0	0.039 0	0.070 2	98.03		
黄芪甲苷	1.001 5	1.024 1	0.820 0	1.794 8	93.99	94.27	1.12
	1.001 4	1.024 0	0.820 0	1.791 2	93.56		
	1.001 7	1.024 4	0.820 0	1.782 3	92.43		
	1.001 6	1.024 0	1.024 0	1.985 1	93.86		
	1.002 5	1.025 0	1.024 0	2.002 3	95.44		
	1.001 4	1.023 0	1.024 0	1.998 7	95.29		
	1.002 8	1.025 5	1.230 0	2.198 8	95.39		
	1.001 5	1.022 8	1.230 0	2.181 8	94.23		
	1.003 2	1.025 8	1.230 0	2.185 5	94.28		
黄芪皂苷	1.002 6	1.323 1	1.058 0	2.424 1	104.06	102.97	1.17
	1.001 8	1.322 0	1.058 0	2.418 3	103.62		
	1.001 9	1.323 2	1.058 0	2.414 5	103.14		
	1.002 1	1.323 4	1.323 0	2.675 7	102.22		
	1.002 5	1.323 6	1.323 0	2.676 2	102.24		
	1.002 7	1.323 4	1.323 0	2.650 3	100.30		
	1.003 3	1.323 9	1.588 0	2.972 3	103.80		
	1.002 7	1.322 3	1.588 0	2.969 8	103.75		
	1.001 9	1.322 0	1.588 0	2.967 2	103.60		
组分	称样量/g	样品含 量/mg	对照品加 入量/mg	测得总 量/mg	回收率/ %	回收率 均值/%	RSD/ %
芒柄花苷	1.002 3	0.342 0	0.272 0	0.615 8	100.66	100.53	1.81
	1.001 6	0.341 8	0.272 0	0.611 6	99.21		
	1.003 1	0.342 5	0.272 0	0.616 2	100.62		
	1.001 5	0.341 5	0.338 0	0.670 3	97.29		
	1.002 8	0.342 4	0.338 0	0.682 9	100.73		
	1.001 7	0.341 6	0.338 0	0.676 3	99.02		
	1.002 5	0.342 3	0.405 0	0.756 3	102.23		
	1.003 2	0.342 2	0.405 0	0.760 2	103.20		
	1.001 9	0.341 6	0.405 0	0.754 1	101.86		
芒柄花素	1.003 5	0.002 1	0.001 6	0.003 6	93.75	94.91	2.60
	1.002 5	0.002 1	0.001 6	0.003 6	93.88		
	1.001 2	0.002 1	0.001 6	0.003 7	100.17		
	1.001 2	0.002 1	0.002 2	0.004 2	95.45		
	1.001 9	0.002 1	0.002 2	0.004 2	95.39		
	1.001 1	0.002 1	0.002 2	0.004 2	95.53		
	1.001 4	0.002 1	0.002 5	0.004 4	91.97		
	1.000 7	0.002 1	0.002 5	0.004 4	92.06		
	1.001 2	0.002 1	0.002 5	0.004 5	95.96		
黄芪皂苷 II	1.001 7	0.245 1	0.196 0	0.448 0	103.52	103.75	1.16
	1.002 4	0.245 3	0.196 0	0.452 0	105.47		
	1.002 1	0.245 0	0.196 0	0.451 6	105.39		
	1.001 5	0.245 0	0.245 0	0.494 4	101.82		
	1.001 3	0.245 1	0.245 0	0.496 2	102.51		
	1.002 0	0.245 3	0.245 0	0.500 1	104.01		
	1.001 1	0.244 9	0.294 0	0.551 2	104.19		
	1.001 2	0.245 1	0.294 0	0.549 6	103.56		
	1.001 9	0.245 3	0.294 0	0.548 9	103.28		

3.3 主成分分析

主成分分析是最常用的多指标线性降维分析方法。该法可将原有具有一定相关性的众多变量，重新组合转换成一组新的、相互无关的变量来代替原变量，转换后的本组变量叫主成分^[30-31]。将蒙古黄芪横切面组织显微定量和质量标志物含

量共 9 个变量输入 SIMCA 14.1。结果显示，提取了 2 个主成分，分别是第 1 主成分 (principal component 1, PC1) 和第 2 主成分 (PC2)，累计贡献率为 78%。其中 S2、S3、S4、S13、S11、S12 可以聚为一类，S1、S5、S7、S10、S9、S6、S8 聚为一类，该结果与聚类分析一致。载荷图可以

表 5 质量标志物含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 5 Quality marker content determination($\bar{x} \pm s, n=3$)								%
编号	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	黄芪甲苷	黄芪皂苷II	黄芪皂苷I	
S1	0.062 9±0.002 0	0.012 1±0.000 6	0.020 0±0.000 2	0.003 3±0.000 0	0.208 3±0.007 7	0.048 0±0.004 9	0.200 0±0.019 5	
S2	0.083 4±0.003 0	0.034 8±0.003 1	0.003 5±0.000 4	0.000 9±0.000 0	0.981 1±0.690 1	0.053 6±0.014 5	0.230 3±0.059 4	
S3	0.051 9±0.006 1	0.030 7±0.003 9	0.001 1±0.000 1	0.000 4±0.000 1	0.308 4±0.010 3	0.041 8±0.006 8	0.161 3±0.027 2	
S4	0.090 8±0.000 6	0.046 3±0.000 7	0.002 8±0.000 1	0.000 8±0.000 0	0.209 7±0.006 7	0.046 8±0.003 1	0.193 5±0.007 9	
S5	0.061 4±0.006 8	0.017 4±0.001 6	0.001 8±0.000 1	0.000 2±0.000 0	0.302 5±0.013 1	0.043 1±0.002 8	0.141 4±0.007 9	
S6	0.024 5±0.005 9	0.006 1±0.002 1	0.021 6±0.006 2	0.006 5±0.001 3	0.323 3±0.029 2	0.069 5±0.003 2	0.288 3±0.046 1	
S7	0.059 8±0.003 2	0.017 4±0.000 6	0.001 4±0.000 3	0.000 2±0.000 0	0.192 9±0.009 4	0.022 5±0.000 1	0.056 2±0.001 5	
S8	0.026 9±0.000 6	0.008 3±0.000 7	0.015 7±0.000 1	0.007 0±0.000 1	0.220 4±0.036 2	0.047 7±0.004 2	0.144 5±0.011 4	
S9	0.036 5±0.000 1	0.013 6±0.000 0	0.001 3±0.000 2	0.000 4±0.000 1	0.222 8±0.009 9	0.035 6±0.003 2	0.166 0±0.002 0	
S10	0.065 1±0.000 1	0.020 2±0.000 0	0.004 9±0.000 0	0.000 8±0.000 0	0.186 5±0.009 8	0.051 5±0.002 0	0.117 6±0.002 0	
S11	0.089 3±0.003 2	0.035 9±0.000 9	0.002 7±0.000 1	0.000 7±0.000 0	0.162 1±0.013 6	0.024 5±0.002 9	0.133 1±0.017 9	
S12	0.086 3±0.001 2	0.026 8±0.000 5	0.003 0±0.000 3	0.000 7±0.000 1	0.288 6±0.007 2	0.040 8±0.002 8	0.170 0±0.013 0	
S13	0.159 1±0.004 7	0.048 3±0.001 6	0.005 3±0.000 2	0.00 13±0.000 0	0.289 5±0.036 3	0.041 5±0.001 9	0.176 4±0.012 3	

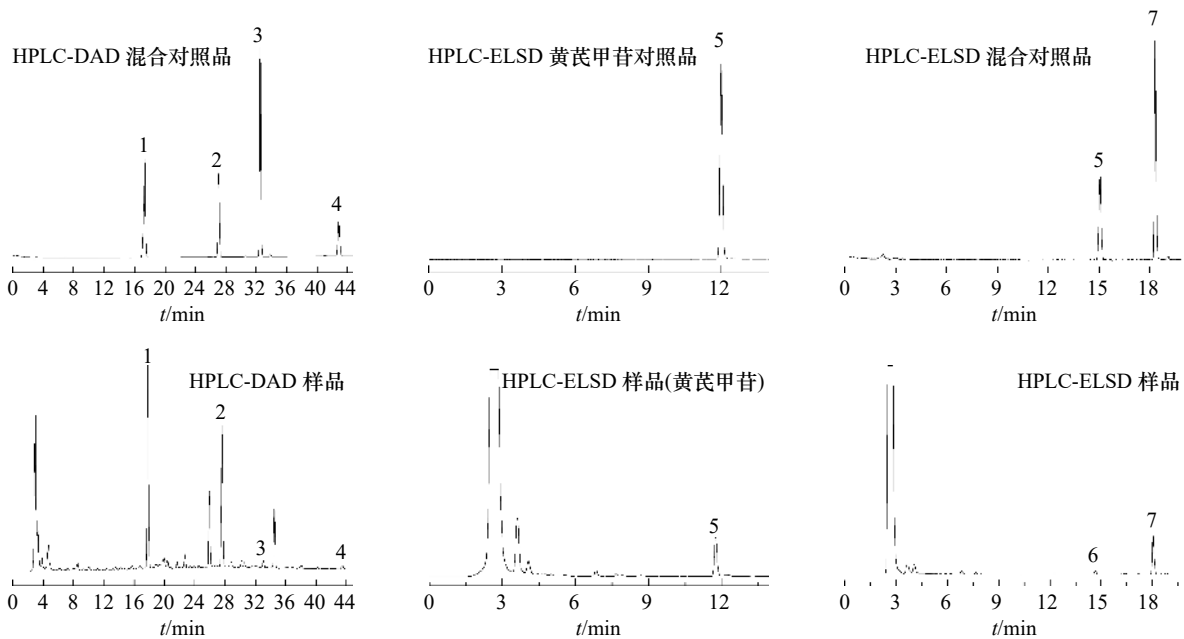


图 2 对照品和样品 HPLC 图
1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 2-芒柄花苷; 3-毛蕊异黄酮; 4-芒柄花素; 5-黄芪甲苷; 6-黄芪皂苷 II; 7-黄芪皂苷 I。
Fig. 2 HPLC diagram of reference and sample
1-calycosin-7-glucoside; 2-ononin; 3-calycosin; 4-formononetin; 5-astragaloside IV; 6-astragaloside II; 7-astragaloside I.

表 6 横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性

Tab. 6 Correlation between microscopic quantification of cross-sectional tissue and content of quality markers

组分	木射线数	组分	韧皮射线数	组分	木栓层宽度	组分	韧皮部宽度/木部部宽度	显微定量参数	黄芪甲苷/黄芪皂苷I、II和
毛蕊异黄酮	0.850 ²⁾	毛蕊异黄酮苷	-0.604 ¹⁾	芒柄花素	0.669 ¹⁾	毛蕊异黄酮苷	0.753 ²⁾	单列导管数	-0.619 ¹⁾
芒柄花素	0.858 ²⁾	黄酮和	-0.615 ¹⁾	黄芪皂苷II	0.663 ¹⁾	芒柄花苷	0.688 ²⁾	韧皮射线数	-0.631 ¹⁾
黄芪皂苷II	0.624 ¹⁾	皂苷和/黄酮和	-0.637 ¹⁾	黄芪皂苷I	0.754 ²⁾	黄酮和	0.885 ²⁾		
(毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/毛蕊异黄酮	-0.754 ²⁾	毛蕊异黄酮苷/黄芪甲苷	-0.643 ¹⁾	皂苷和	0.580 ¹⁾				
(毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/芒柄花素	-0.674 ¹⁾	黄芪甲苷/(黄芪皂苷I+黄芪皂苷II)	0.555 ¹⁾						

注: ¹⁾表示在0.05水平(双侧)上相关性显著, ²⁾表示在0.01水平(双侧)上相关性显著。

Note: ¹⁾Indicated significant correlation at 0.05 level (bilateral), ²⁾indicates significant correlation at 0.01 level (bilateral).

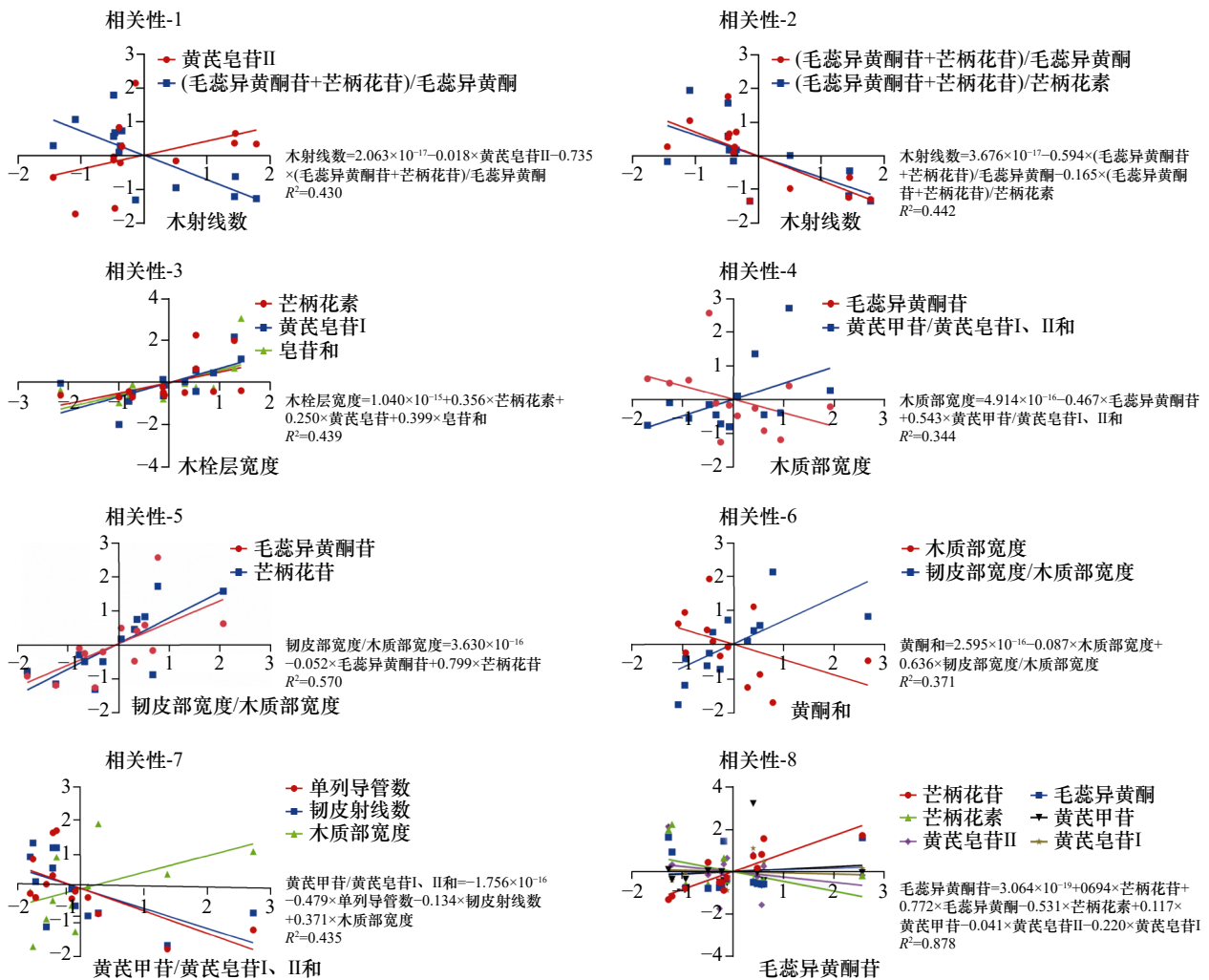


图3 多元线性回归图

Fig. 3 Multiple linear regression diagram

反映各变量对主成分的贡献程度, 距离 $X=0$ 距离越远, 对 PC1 贡献越大, 距离 $Y=0$ 距离越远, 对 PC2 贡献越大^[32]。对 PC1 贡献由大到小分别是芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷、韧皮部宽度/木质部宽

度, 对 PC2 贡献由大到小分别是黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II, 故主要是以上 6 个变量造成了 13 批蒙古黄芪药材差异, 主成分和载荷图见图 5。

4 讨论

蒙古黄芪横切面组织显微定量参数分别与质量标志物含量具有多对显著相关关系。其中木质部宽度分别与毛蕊异黄酮苷、黄酮和呈显著负相关, 木栓层宽度分别与芒柄花素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、皂苷和呈显著正相关。木射线数分别与毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 II 显著正相关, 木射线数分别与 (毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/毛蕊异黄酮、(毛蕊异黄酮苷+芒柄花苷)/芒柄花素显著负相关。韧皮部宽度/木质部宽度分别与毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄酮和呈显著正相关。单列导管数和韧皮射线数与黄芪甲苷/黄芪皂苷 I、II 和

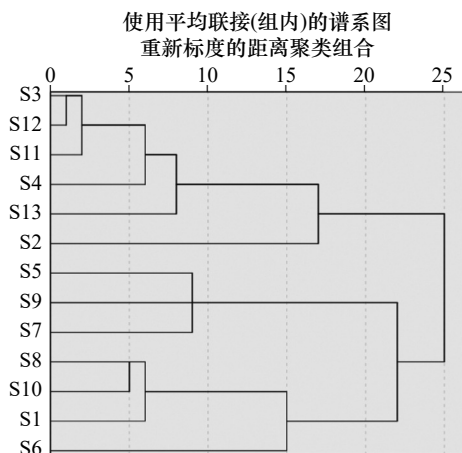


图4 聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis diagram

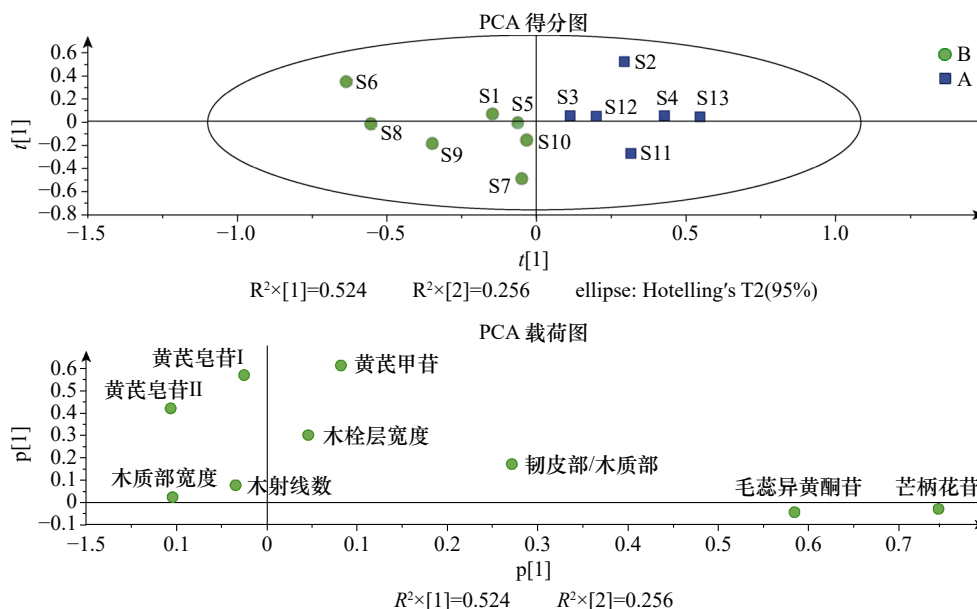


图5 主成分得分图和载荷图
Fig. 5 Principal component score diagram and load diagram

呈显著负相关。导管为植物木质部中主要输导水分和无机盐的管状结构,射线主要起横向输导和贮藏养分的作用,单列导管数和射线数越多,蒙古黄芪代谢越旺盛,代谢产生的次级代谢产物就越多。多元线性回归结果表明,排除不可控因素的影响,组织显微定量可以描述质量标志物的含量。建立组织显微定量参数与质量标志物含量的多元线性回归关系,可以依据蒙古黄芪横切面组织显微定量参数反映质量标志物的含量,快速评价蒙古黄芪的质量,对监测质量标志物含量的动态积累,评价蒙古黄芪质量提供理论依据。本研究依据横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性研究,为显微特征明显,活性成分复杂或者不明确的中药提供了质量评价的思路,丰富了中药“辨状论质”的内容,为建立外观性状-显微定量-活性成分含量一体化模式评价中药质量提供基础。

以主成分分析得到的6个差异成分为指标对13批黄芪药材进行分类,第1类的商品等级优于第2类。第1类:毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I、韧皮部宽度/木质部宽度的范围分别是0.0834~0.1591,0.0268~0.0483,0.2886~0.9811,0.0477~0.0695,0.1700~0.2883,0.6707~1.0628;第2类的范围分别是0.0245~0.0651,0.0061~0.0202,0.1621~0.2228,

0.0225~0.0468,0.0562~0.1660,0.3144~0.5660。除黄芪皂苷II外,依据上述5个差异成分的含量,可以把13批黄芪分为2类,此分类结果与聚类分析和主成分分析结果相似度较高。根据《七十六种药材商品规格等级》,13批样品中S2为一等品,S11、S12为三等品,其余样品为二等品。以毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I、韧皮部宽度/木质部宽度、木射线数、木质部宽度、木栓层宽度9个变量为分类标准,发现S2、S3、S4、S13、S11、S12聚为一类,S5、S7、S9、S1、S6、S10、S8聚为一类。化学成分结合横切面组织显微定量的分类结果与仅依靠外观性状分类的结果有较大差异。现行商品等级划分仅依靠黄芪药材外观性状划分商品等级还有待商榷。有报道称,黄芪性状特征与活性成分相关性不强^[33-34]。传统“辨状论质”的评价方法结合化学成分的含量可以为黄芪药材商品等级划分提供新参考。由于样本量有限,将其应用于商品等级划分还需进一步验证。本研究基于横切面组织显微定量与质量标志物含量的相关性,为黄芪药材商品等级划分的综合依据提供新的科学基础,对于黄芪药材质量现代化评价模式的形成具有参考价值。本课题组将继续以化学成分为指标,探究黄芪粉末显微量化和性状特征与质量标志物的相关性,引入黄芪多糖类成分,以期寻找

更加科学的分类标准,使黄芪质量评价多元化成为可能。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2020: 315-316.
- [2] HU N N, ZHANG X J. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus membranaceus*[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2021, 38(1): 76-82.
- [3] FAN L Y, ZHU H, TENG J B, et al. Discussion on application of microscopic characters quantification in quality identification of traditional Chinese medicine[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2019, 37(8): 1868-1872.
- [4] CHEN R. The study of microscopic quantitative method of Flos Lonicerae Japonicae, Flos Carthami and Flos Sophorae[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [5] ZHENG X X, WANG J, PAN F Y, et al. Identification of planted Ginseng and Shizhu Ginseng in different ages by testing their different parts via microscopic quantitative technique[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2013, 30(5): 392-398.
- [6] LI D, ZHANG J K, LIANG L, et al. Study on farfae Flos contents in Juhong pills by the microscopic quantitative method[J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2016, 30(3): 25-26, 30.
- [7] HU Q, YU H, CUI Y J, et al. Determination and foreign organic matter inspection of Fufang Danshen Tablets by microscopy[J]. J Pharm Res(药学研究), 2016, 35(2): 74-76.
- [8] JIANG Q, ZHAI Y, WANG R. Microscopic quantitative study on *Saiga tatarica* in “lingyang Qing Fei pill” [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2004, 27(2): 90-91.
- [9] YANG J H, LIU Y, FAN X F, et al. The initial exploration of the correlation between microscopic characteristic constants and chemical components of *Forsythia*[J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2019, 33(4): 5-8.
- [10] LI Q, GUO S, ZHANG J K, et al. Correlation between microscopic characteristic index and chemical components of stamen nelumbinis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2018, 36(2): 348-350.
- [11] HE W W, ZHANG J K, LI Y J, et al. Correlation between microscopic characteristic index and chemical components of menispermi rhizoma[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(1): 42-46.
- [12] GUO S, LIANG L, LI Q, et al. Correlation between microscopic characteristic index and chemical components of cinnamon[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2016, 27(10): 2312-2315.
- [13] BAO Y H, PAN C M, BAI Y. Comprehensive analysis of identification characters of three medicinal dendrobii[J]. J South China Norm Univ(华南师范大学学报:自然科学版), 2014, 46(3): 112-117.
- [14] BAI Y, BAO Y H, WANG W Q. Characters and its authentication value of stem epidermal cell of medicinal plant in *Dendrobium* Sw. and their adulterants[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(3): 593-597.
- [15] XIAO X H, QIAO C Z, SU Z W, et al. Recognition technique of the histomorphological images of Radix Curcumae[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1998, 33(2): 76-79.
- [16] ZHANG X, SU C L, CHEN Y J, et al. Quantitative analysis of microscopic parameters of aucklandiae Radix with different growth years and its correlation study with active components[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2021, 44(2): 299-303.
- [17] DING Q. The study on the correlation of the microstructure and chemical composition of Radix Salviae Miltiorrhizae, Radix Stellariae and Radix Angelicae Sinensis[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.
- [18] ZOU W J. The study of morphology quantitative method of cross-sections of Asparagi Radix, Ophiopogonis Radix, Isatidis Radix[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [19] FENG J H. Morphometric measurement studies of transverse section of Saposhnikovia Radix, Codonopsis Radix, Achyranthis Bidentatae Radix[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [20] LIU C X, CHEN S L, XIAO X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(9): 1443-1457.
- [21] ZHANG S J, ZHANG Y G, NIU J T, et al. Research progress of huangqi(astragali Radix) and prediction of its quality markers[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2022, 40(2): 151-155.
- [22] DAI Y T, ZHANG X Y, WANG Y X, et al. Research progress on Astragali Radix and prediction of its quality markers (Q-markers)[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(7): 1754-1764.
- [23] ZHANG S J, ZHANG Y G, LI D H, et al. Prediction of Q-markers of Astragali Radix based on network pharmacology and fingerprint[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(11): 2691-2698.
- [24] XIONG Y F. Establishment of standard detection procedure for *Astragalus saponins* and study on the accumulation and distribution of indicator component of *Astragalus membranaceus* in Hengshan Mountain[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017.
- [25] XIONG Y F, QIN X M, LI K, et al. Analysis on rationality of medicinal product commodity specifications from determination of chemical components in Astragalus Radix[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(12): 2194-2198.
- [26] LI Z Y, YANG M, WANG J, et al. Evaluation of quality of Astragali Radix in different producing areas of inner Mongolia

- with 7 active ingredients as indicators[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2020, 22(1): 65-73.
- [27] DING F F, DENG Y R, ZHANG X J, et al. Simultaneous determination of five astragalosides in Astragali Radix and Jinqi Jiangtang tablet by HPLC-ELSD[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(1): 156-159.
- [28] LIANG Y H, LI C, FENG W H, et al. Optimization of determination of astragaloside IV in Astragali Radix by continuous single-factor method[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(2): 391-397.
- [29] SUN X R, WEI G J, WANG H Y, et al. Evaluation of Astragali Radix quality grade based on appearance characteristics and internal ingredients[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(4): 966-971.
- [30] WANG Z, ZAN K, ZUO T T, et al. Study on HPLC fingerprint combined with chemometric to analyze the quality differences of Xinnaojian capsule(tablet) in different enterprises[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2022, 39(12): 1614-1619.
- [31] YOU M, XIA M Q, YU Y Y, et al. Quality control research of compound Chuipencao decreasing enzyme granules based on fingerprint combined with multi-components chemical pattern analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(21): 2610-2616.
- [32] WANG Y D, DAI Z, SUN C L, et al. Quality control of Guci tablets using UPLC-ELSD fingerprint analysis coupled with chemometrics[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(6): 1156-1161.
- [33] NIU Q Y, WAN Y Q, LI Z Y, et al. Study on quality evaluation of *Astragalus membranaceus* with different commercial grades[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(6): 1186-1190.
- [34] ZHANG R. Study and revision on the commodity specification and grade standard of Astragali Radix and the anti-fatigue effect of different Astragali Radix[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.
- 收稿日期: 2023-04-20
(本文责编: 李艳芳)