

指纹图谱结合化学计量法研究广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分的影响

于小庆¹, 曾威¹, 黄可儿², 陈为², 罗艳¹, 柯雪红²(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 比较广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分的影响, 从化学角度探讨广陈皮配伍黄芪-葛根药对的协同增效作用。**方法** 制备 6 种配比的黄芪-葛根-广陈皮药液, 建立广陈皮与黄芪-葛根药对不同配比水煎液指纹图谱, 对特征峰面积进行主成分分析, 确定变量投影重要度(VIP)>1 的差异变量(特征峰), 并采用高效液相色谱(HPLC)法对其进行含量测定。**结果** 黄芪-葛根药对(30:10)与黄芪、葛根、广陈皮(30:10:5)配比的 OPLS-DA 分析结果显示, VIP>1 的差异变量由大到小排序: 芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮、3-OH 葛根素、染料木苷、葛根素, 其中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮在两组药液中有明显差异($P<0.01$, VIP>1.2)。含量测定结果显示, 随着广陈皮的增加, 芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮含量呈现先增加后减少的趋势, 其中以黄芪、葛根、广陈皮比例为 30:10:5 时含量最高。黄芪、葛根、广陈皮(30:10:5)配比和黄芪-葛根药对(30:10)的药液中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮含量比分别为 1.55:1、1.39:1、1.53:1。**结论** 广陈皮配伍黄芪-葛根药对有协同增效作用, 黄芪、葛根、广陈皮的最佳配比为 30:10:5。

关键词: 广陈皮; 黄芪-葛根药对; 指纹图谱; 化学计量法; 配伍

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0109-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.016

Effect of Citri reticulatae Chachiensis Pericarpium on Chemical Constituents of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix Herb Pair Characterized Using Fingerprint and Chemometrics

YU Xiaoqing¹, ZENG Wei¹, HUANG Ke'er², CHEN Wei², LUO Yan¹, KE Xuehong²(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To compare the effects of chemical constituents of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium and Astragali radix-Puerariae lobatae radix herb pair from the perspective of chemistry, to study the synergetic effect of concerted application of it. **Methods** Six water decoctions with different proportions of Astragali radix, Puerariae lobatae radix, Citri reticulatae Chachiensis pericarpium were prepared. The fingerprints of the water decoctions were established with which Citri reticulatae Chachiensis pericarpium mixed in Astragali radix-Puerariae lobatae radix for different proportions were detected. Principal component analysis was carried out to determine the difference variable (characteristic peaks) with variable importance for the projection (VIP) >1, subsequently the contents were determined by HPLC. **Results** OPLS-DA analysis results of Astragali radix - Puerariae lobatae radix (30:10) and Astragali radix-Puerariae lobatae radix-Citri reticulatae Chachiensis pericarpium (30:10:5) show that the difference variables meet VIP>1, which ranking from large to small are: formononetin, daidzein, calycosin, 3'-hydroxypuerarin, genistin, puerarin; among them, formononetin, daidzein and calycosin are significantly different in the two groups of decoction ($P<0.01$, VIP>1.2). Content determination results showed that with the increase of the proportion of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium, the contents of the detected components of formononetin,

收稿日期: 2020-04-29

作者简介: 于小庆, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药开发及药物分析。Email: 18326656317@163.com。通信作者: 柯雪红, 女, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药新药开发及药物分析。Email: kexuehong@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074099); 广州中医药大学“一流学科建设学科研究项目”(XK2019011); 广州中医药大学第一附属医院“创新强院科研项目之院内制剂开发项目”(211010010602)。

daidzein and calycosin increased first and then decreased, and the contents of them were the highest when the ratio of Astragali radix-Puerariae lobatae radix-Citri reticulatae Chachiensis pericarpium was 30 : 10 : 5. The content ratios of formononetin, daidzein, and calycosin in the Astragali radix-Puerariae lobatae radix-Citri reticulatae Chachiensis pericarpium(30 : 10 : 5) and Astragali radix-Puerariae lobatae radix(30 : 10) decoctions were 1.55 : 1, 1.39 : 1, and 1.53 : 1, respectively. **Conclusion** Citri reticulatae Chachiensis pericarpium and couplet medicines of Astragali radix-Puerariae lobatae radix showed best synergistic effect with the ratio of 30 : 10 : 5.

Keywords: Citri reticulatae Chachiensis pericarpium; Astragali radix-Puerariae lobatae radix herb pair; fingerprint; chemometrics; synergetic effect

芪葛颗粒由黄芪、葛根、陈皮组成^[1-2],为临床经验方,源于黄芪葛根汤^[3],以益气利水消肿功效的黄芪为君药,清热祛湿的葛根为臣药,佐以燥湿化痰的陈皮,共同发挥益气健脾、养胃护肝、解酒毒的功效,可用于酒精性脂肪肝、急性胃黏膜损伤等疾病的预防治疗^[4-6]。黄芪-葛根为临床常用药对,陈皮具有“同补药则补,同泻药则泻,同升药则升,同降药则降”的协同特点,两两配伍,能使药效作用增强^[7-8]。复方与组方药材成分并非简单的加和,在配伍过程中会发生物理、化学变化^[9-11]。本课题组前期已对芪葛颗粒的提取工艺和高效液相色谱(HPLC)指纹图谱进行研究^[1-2]。本研究通过比较广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分的影响,从化学角度探讨广陈皮配伍黄芪-葛根药对的协同增效作用,为进一步研究药物协同作用机制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2996 二极管阵列检测器、Empower 2 色谱工作站(美国 Waters 公司);色谱柱: Hypersil ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); SK3310LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); Thermo Legend Micro 17R 型离心机(德国 Thermo 公司); Mettler Toledo XS105 DualRange 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Smart-D 型超纯水机(上海力康生物医疗科技控股有限公司)。

1.2 试剂 色谱纯甲醇,德国 Merck 公司;水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药品 黄芪,康美药业有限公司,批号: 190201651;葛根,北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,批号: 20190103;广陈皮,购于广州新会,批号: 2013008。对照品 3-羟基葛根素(批号: C3D-1514-1410)、川陈皮素(批号: C3D-1513-1411)、桔

皮素(批号: C3D-1512-1411),卡托化学研究公司;葛根素(批号: 0752-9504)、大豆苷(批号: 111738-201302)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号: 111920-201304)、染料木苷(批号: 111709-200501)、橙皮苷(批号: 110721-200613)、大豆苷元(批号: 111502-200402)、染料木素(批号: 111704-200501)、芒柄花素(批号: 111703-200603),中国食品药品检定研究院;毛蕊异黄酮(批号: MUST-17120901),中国科学院成都生物研究所。

1.4 样品制备 取适量黄芪、葛根、广陈皮,合并煎煮 3 次,第 1 次用 20 倍水浸泡 0.5 h,武火煮沸后文火煮 0.5 h,第 2 次、第 3 次均用 15 倍水,合并 3 次滤液,浓缩至每毫升含 1 g 的药液。制备 6 种配比的黄芪、葛根、广陈皮药液,比例分别为 30 : 10 : 1.25(A)、30 : 10 : 2.5(B)、30 : 10 : 5(C)、30 : 10 : 10(D)、30 : 10 : 20(E)和 30 : 10 : 0(F)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱分析广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分的影响 色谱条件、对照品及供试品制备参考本课题组前期研究方法^[1]。

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~20 min, 90%~75% B; 20~45 min, 75%~65% B; 45~50 min, 65%~63% B; 50~55 min, 63% B; 55~60 min, 63%~55% B; 60~65 min, 55%~50% B; 65~70 min, 50%~40% B; 70~75 min, 40%~30% B; 75~80 min, 30%~20% B; 80~85 min, 20%~10% B)。运行时间: 85 min;检测波长: 250 nm;柱温: 25 ℃。进样量: 10 μL;流速: 1.0 mL·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 12 种对照品分别用甲醇配成储备液,精密吸取配成含 3-羟基葛根素

(53.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、葛根素(298.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、大豆苷(74.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(17.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、染料木苷(11.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、橙皮苷(45.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、大豆苷元(12.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、毛蕊异黄酮(6.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、染料木素(2.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、芒柄花素(3.98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、川陈皮素(5.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、桔皮素(3.95 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合对照品储备液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.3 供试品溶液制备 分别精密称取 1.3.1 项下各药液(各样品所含黄芪、葛根药材量均相同): A 液 825 μL 、B 液 850 μL 、C 液 900 μL 、D 液 1 000 μL 、E 液 1 200 μL 、F 液 800 μL 至 10 mL 容量瓶中,加入适量 50% 甲醇,超声 30 min,用 50% 甲醇定容到刻度线,以 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度的试验 取 C 液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。以大豆苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%;峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.5%;采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)处理,结果相似度均大于 0.99,表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 重复性试验 取 C 液,按“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液 6 份,按“2.1.1”项下的色谱条件进样,记录色谱图。以大豆苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 1.9%;峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.6%;采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)处理,结果相似度均大于 0.99,表明方法重复性较好。

2.1.4.3 稳定性试验 取 C 液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 依次进样测定,记录色谱

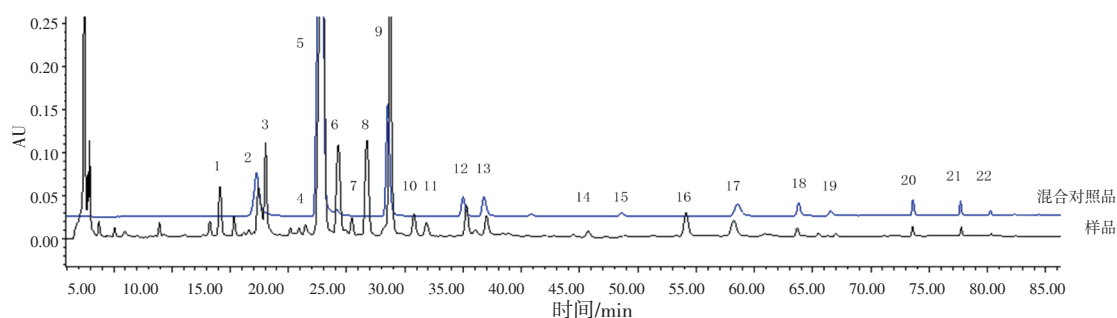
图。以大豆苷为参照峰,计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.4%;峰相对保留时间的 RSD 均小于 3.1%;采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)处理,结果相似度均大于 0.97,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 指纹图谱的建立及特征峰的标定^[1]

2.1.5.1 10 批 C 液 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 取 10 批 C 液,依照“2.1.3”项下方法分别制备 10 批 C 液样品溶液,依据“2.1.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)对 10 批样品数据进行分析,自动匹配后计算相似度,结果各批之间相似度均在 0.98 以上。

2.1.5.2 特征峰的确定及主要色谱峰的指认 通过比较 10 批 C 液的色谱图,共标定 22 个共有特征色谱峰,22 个共有特征色谱峰的面积占总面积大于 90%。通过与对照品比对,分别指认了 12 个色谱峰,其中 2 号峰为 3-OH 葛根素、5 号峰为葛根素、9 号峰为大豆苷、12 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、13 号峰为染料木苷、15 号峰为橙皮苷、17 号峰为大豆苷元、18 号峰为毛蕊异黄酮、19 号峰为染料木素、20 号峰为芒柄花素、21 号峰为川陈皮素、22 号峰为桔皮素,保留时间分别为 14.34、23.11、29.16、35.74、37.55、49.46、58.91、63.99、67.31、73.74、77.88、80.44 min。9 号峰(大豆苷)的保留时间在 29 min 左右,由于该峰分离度理想、峰强度较高,且为共有峰,因此以该峰作为参照峰。结果见图 1。

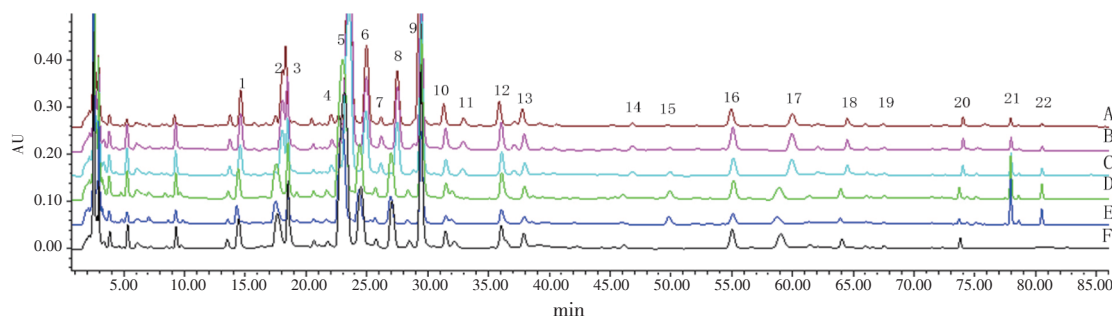
2.1.6 样品测定 取黄芪-葛根-广陈皮不同配比药液(A、B、C、D、E、F),依照“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液,依据“2.1.1”项下色谱条件分别进样,测得色谱图,见图 2。



注: 2. 3-OH 葛根素; 5. 葛根素; 9. 大豆苷; 12. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 13. 染料木苷; 15. 橙皮苷; 17. 大豆苷元; 18. 毛蕊异黄酮; 19. 染料木素; 20. 芒柄花素; 21. 川陈皮素; 22. 桔皮素

图 1 混合对照品与样品 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of sample and reference substances mixture



注: A. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 1.25); B. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 2.5); C. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 5); D. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 10); E. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 20); F. 黄芪-葛根药对(30 : 10)

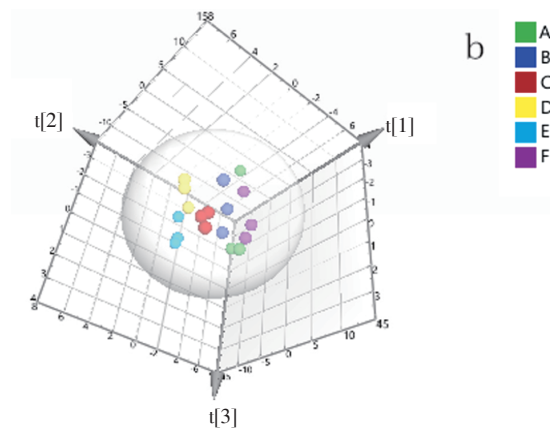
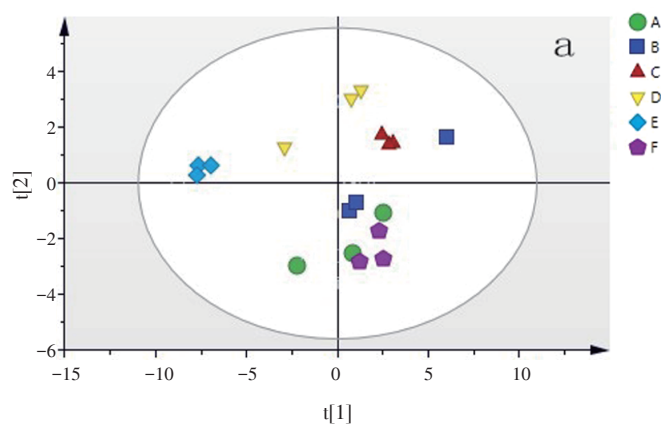
图2 广陈皮配伍黄芪-葛根药对不同比例的高效液相色谱(HPLC)指纹谱图

Figure 2 HPLC fingerprint of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium(CRCP)and Astragali radix-Puerariae lobatae radix in different proportions

2.1.7 统计学分析

2.1.7.1 主成分分析(PCA) 采用SIMCA-P 14.1软件进行PCA。以A、B、C、D、E、F样品22个共有峰的峰面积作为X变量,以每份样品作为Y变量,进行无监督分析。结果表明,广陈皮配伍黄芪-葛根药

对不同比例A、B、C、D、E、F各组药液在得分图中处于不同的空间聚落,区分效果明显,表明A、B、C、D、E、F各组药液具有一定差异性。结果见图3。



注: a. PCA得分图; b. 3D图。A. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 1.25); B. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 2.5); C. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 5); D. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 10); E. 黄芪-葛根-广陈皮(30 : 10 : 20); F. 黄芪-葛根药对(30 : 10)

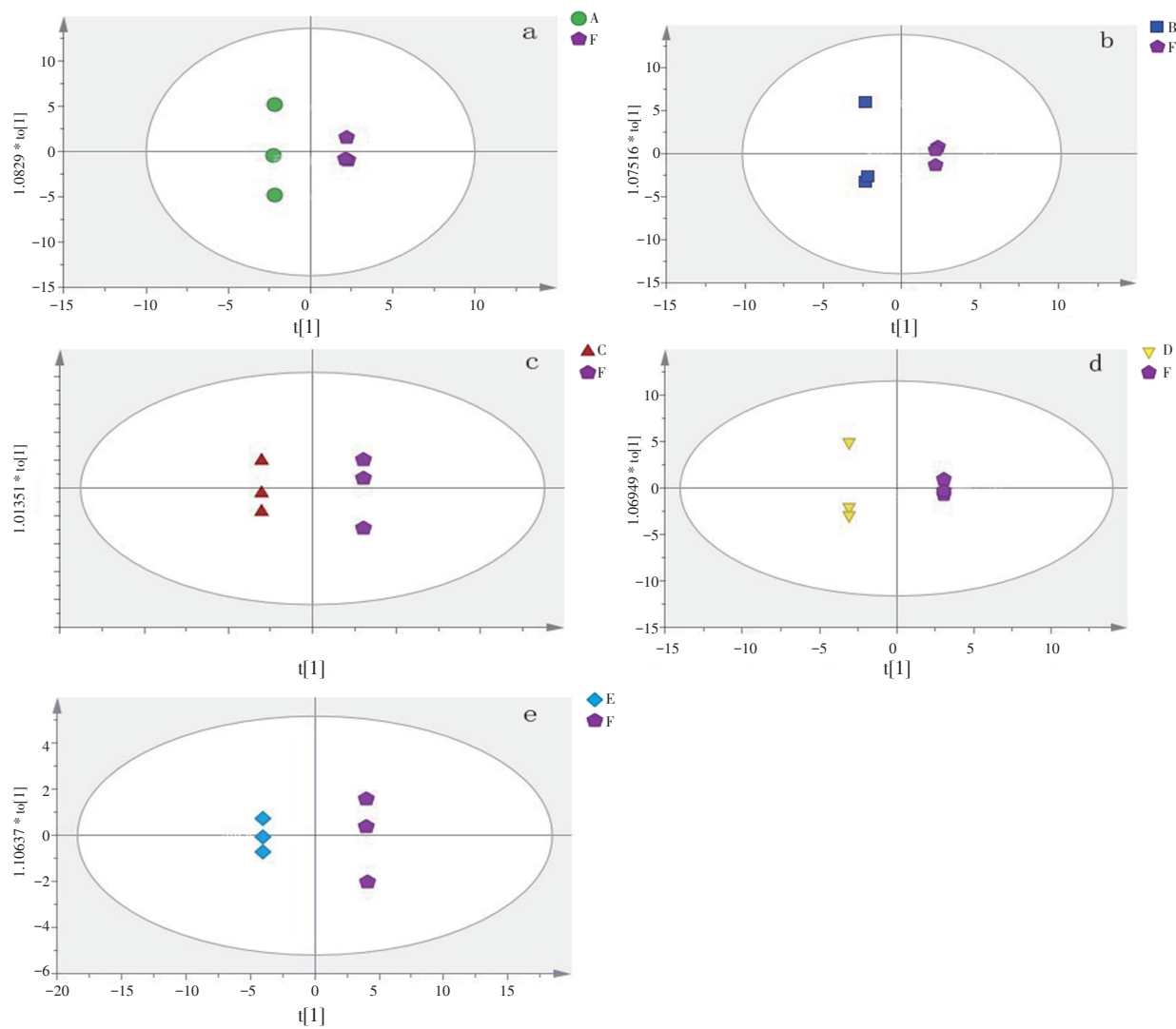
图3 广陈皮配伍黄芪-葛根药对不同比例的PCA得分图及3D图

Figure 3 The scattered plots of PCA and 3D of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium(CRCP)and Astragali radix-Puerariae lobatae radix in different proportions

2.1.7.2 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA) 在PCA的基础上进行有监督的OPLS-DA分析,可进一步比较各组药液的差异。F液分别与A、B、C、D、E药液进行OPLS-DA,结果模型的解释度 R^2_Y 分别为0.975、0.995、0.986、0.978、0.991,模型的预测度 Q^2_Y 分别为0.930、0.988、0.968、0.952、0.983。A、B、C、D、E、F各组药液处于不同的空间聚落,区分效果明显,表明广陈皮对黄芪-葛根药对的化学成分有影响,此结果与以上PCA的结果相吻合。结果

见图4。

以药液19个共有峰峰面积作为变量[除去峰15(橙皮苷)、峰21(川陈皮素)、峰22(桔皮素)3个陈皮成分],A、B、C、D、E各组药液与F(黄芪-葛根药对)组数据进行 t 检验。结果显示,E液19个峰均减小;除E液外,峰11、峰18(毛蕊异黄酮)和峰20(芒柄花素)等3个峰均增大;峰1、峰5(葛根素)、峰6、峰10等4个峰均减少。结果见表1。其中C液共有峰面积明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。因



注：A. 黄芪-葛根-广陈皮(30：10：1.25)；B. 黄芪-葛根-广陈皮(30：10：2.5)；C. 黄芪-葛根-广陈皮(30：10：5)；D. 黄芪-葛根-广陈皮(30：10：10)；E. 黄芪-葛根-广陈皮(30：10：20)；F. 黄芪-葛根药对(30：10)

图 4 广陈皮配伍黄芪-葛根药对不同比例的 OPLS-DA 图

Figure 4 The OPLS-DA score plot of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium(CRCP)and Astragali radix-Puerariae lobatae radix in different proportions

此选用黄芪-葛根药对(F)与 C 液进行 OPLS-DA 分析，确定变量投影重要度(VIP) > 1 的差异变量(特征峰)。结果见图 5。VIP 大小排序为：峰 20(芒柄花素)、峰 17(大豆苷元)、峰 18(毛蕊异黄酮)、峰 4，峰 2(3-OH 葛根素)、峰 13(染料木苷)、峰 5(葛根素)。其中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮的 VIP 值均 > 1.2，表明这 3 个组分可能为广陈皮对黄芪-葛根药对不同配比产生影响的主要化学成分。

2.2 HPLC 法测定大豆苷元、芒柄花素、毛蕊异黄酮的含量

- 2.2.1 色谱条件 依照“2.1.1”项下色谱条件。
- 2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆苷元、毛蕊

异黄酮、芒柄花素对照品适量，加甲醇配成浓度分别为 12.00、6.15、3.98 μg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液，于 4℃ 保存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 A、B、C、D、E、F 药液，依照“2.1.3”项下进行制备，备用。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备 取广陈皮(缺黄芪、葛根)适量，依照 1.3.1 项下，制备广陈皮(同时缺黄芪、葛根)水煎液。取广陈皮水煎液依照“2.1.3”项下制备同时缺黄芪、葛根的阴性供试品溶液。

2.2.5 方法学考察

2.2.5.1 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液、缺黄芪-葛根药对阴性溶液各 10 μL 进样，所得

表 1 广陈皮对黄芪-葛根药对 19 个共有峰面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 1 The effect of Citri reticulatae Chachiensis pericarpium (CRCP) on 19 common peaks of Astragali radix-Puerariae lobatae radix ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

共有峰	A	B	C	D	E	F
1	11.43 ± 1.50	12.70 ± 2.17	12.26 ± 0.53	10.68 ± 1.36	6.78 ± 0.38*	13.61 ± 1.53
2(3-OH 葛根素)	19.05 ± 5.53	20.80 ± 3.35	24.35 ± 1.30*	22.12 ± 3.45	12.98 ± 0.45**	20.87 ± 1.50
3	18.75 ± 2.49	20.96 ± 3.37	19.56 ± 0.43	15.60 ± 2.21	9.81 ± 0.39**	19.13 ± 1.00
4	2.91 ± 0.35	3.18 ± 0.68	3.74 ± 0.18*	3.05 ± 0.50	1.72 ± 0.33**	3.23 ± 0.09
5(葛根素)	136.81 ± 13.69	136.39 ± 14.63	134.46 ± 3.39	117.61 ± 15.58*	73.79 ± 2.92**	151.62 ± 14.09
6	33.65 ± 8.50	36.13 ± 5.84	38.05 ± 1.41	32.63 ± 4.61	18.87 ± 0.76**	38.30 ± 0.66
7	3.68 ± 0.78	4.14 ± 0.42	4.81 ± 0.44	3.59 ± 0.44	2.82 ± 0.71*	4.35 ± 0.53
8	27.10 ± 3.68	28.23 ± 3.41	26.45 ± 0.69	22.98 ± 3.12	13.58 ± 0.35**	27.71 ± 1.84
9(大豆苷)	61.77 ± 10.43	67.02 ± 11.81	64.26 ± 1.19	54.57 ± 7.45	33.85 ± 1.04**	63.22 ± 3.73
10	6.70 ± 1.88	6.35 ± 1.36	6.95 ± 0.28	5.43 ± 0.75*	3.29 ± 0.15**	7.07 ± 0.27
11	3.83 ± 0.36	3.68 ± 0.30	3.74 ± 0.10	3.74 ± 0.49	1.99 ± 0.12**	3.68 ± 0.20
12(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)	8.35 ± 1.64	11.18 ± 1.28	10.32 ± 0.14	12.20 ± 1.83	7.04 ± 0.18	11.06 ± 1.79
13(染料木苷)	5.99 ± 1.44	7.06 ± 1.17	5.89 ± 0.22	5.38 ± 0.64	3.41 ± 0.16**	6.41 ± 0.39
14	1.83 ± 0.19	2.15 ± 0.24	2.24 ± 0.10	1.78 ± 0.32	1.00 ± 0.10**	2.11 ± 0.07
15(橙皮苷)	0.55 ± 0.14**	1.01 ± 0.29*	2.23 ± 0.02**	3.86 ± 0.55**	4.13 ± 0.11**	0
16	8.53 ± 1.29	10.14 ± 1.95	10.33 ± 0.36	9.32 ± 1.26	5.62 ± 0.16*	9.03 ± 1.45
17(大豆苷元)	6.80 ± 0.75	9.80 ± 1.48*	10.68 ± 0.11**	9.26 ± 1.22*	5.34 ± 0.16**	7.00 ± 0.43
18(毛蕊异黄酮)	2.07 ± 0.51	3.12 ± 0.89	3.49 ± 0.32**	3.47 ± 0.46*	1.87 ± 0.08	1.95 ± 0.08
19(染料木素)	0.71 ± 0.07	1.09 ± 0.339	1.00 ± 0.14	0.75 ± 0.11	0.46 ± 0.03*	0.79 ± 0.17
20(芒柄花素)	1.69 ± 0.49	2.27 ± 0.81	2.93 ± 0.03**	2.53 ± 0.34*	1.43 ± 0.03*	1.66 ± 0.11
21(川陈皮素)	1.26 ± 0.35*	2.97 ± 0.90*	5.04 ± 0.18**	8.57 ± 1.15**	9.72 ± 0.30**	0
22(桔皮素)	0.37 ± 0.17	0.84 ± 0.09**	1.55 ± 0.02**	2.87 ± 0.38**	3.20 ± 0.15**	0

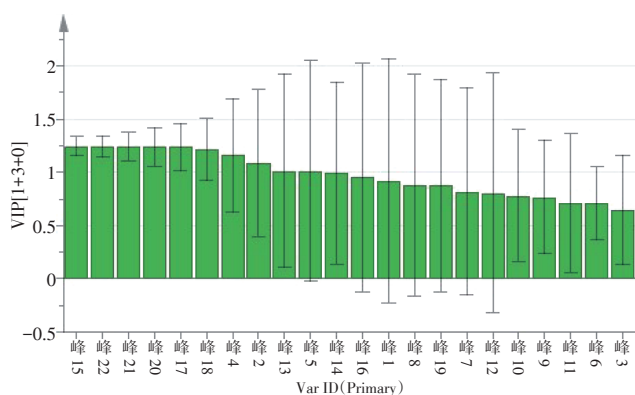
注: 与 F 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图 5 22 个共有峰对分组的贡献值(VIP 值)

Figure 5 Variable importance of the 22 common peaks to grouping(VIP)

HPLC 图谱显示对照品溶液和供试品溶液在同一保留时间出峰, 且阴性对照品溶液图谱在相应保留时间未出峰, 色谱图见图 6。表明阴性对照溶液对大豆苷元、芒柄花素、毛蕊异黄酮的含量测定无干扰, 证明方法专属性良好。

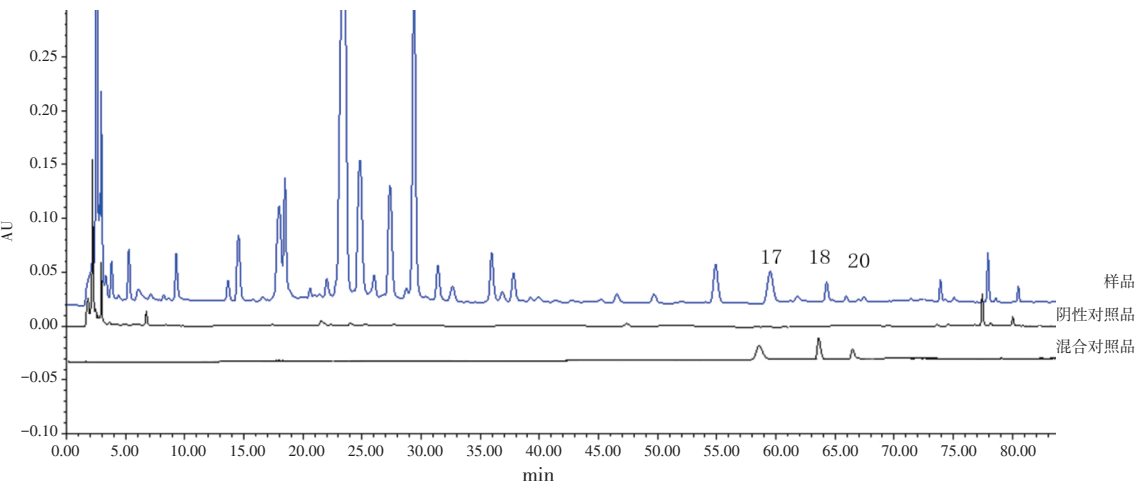
2.2.5.2 线性回归 精密吸取“2.2.2”项下的混合对

照品储备液, 按照“2.1.1”项下色谱条件分别进样 4、8、12、16、20 μL , 以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标作线性回归, 得到回归方程及线性范围, 结果分别为大豆苷元 $Y=5.18 \times 10^6 X + 4.2 \times 10^5$, $r=0.9997$, 线性范围 0.048 0~0.240 0 μg ; 毛蕊异黄酮 $Y=4.61 \times 10^6 X - 1.8 \times 10^4$, $r=0.9995$, 线性范围 0.024 6~0.123 0 μg ; 芒柄花素 $Y=5.22 \times 10^6 X - 6.8 \times 10^3$, $r=0.9996$, 线性范围 0.015 9~0.079 5 μg 。

2.2.5.3 精密性考察 取同一批号的 C 液, 依照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 依照“2.1.1”项下色谱条件连续重复进样 6 份, 计算大豆苷元、毛蕊异黄酮、芒柄花素的峰面积 RSD% 分别是 0.63%、0.67%、0.72%, 表明仪器精密性良好。

2.2.5.4 重复性考察 取同一批号的 C 液 6 份, 依照“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液 6 份, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样, 计算大豆苷元、毛蕊异黄酮、芒柄花素的峰面积 RSD 分别是 1.53%、1.80%、1.14%, 表明本法重复性良好。

2.2.5.5 稳定性考察 取同一批号的 C 液, 依照



注：17. 大豆苷元；18. 毛蕊异黄酮；20. 芒柄花素

图 6 样品、阴性对照品及混合对照品高效液相色谱(HPLC)色谱图

Figure 6 HPLC chromatograms of sample, negative control and reference substances mixture

“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 依次进行测定。结果大豆苷元、毛蕊异黄酮、芒柄花素的峰面积 RSD% 分别是 1.05%、1.69%、2.83%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5.6 加样回收率考察 结果见表 2。取已知含量的供试品溶液，分别按照已测成分含量的 100% 加入

含大豆苷元、毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品，按照“2.1.1”项下色谱条件测定，记录 3 种成分的峰面积并计算回收率，结果见表 2。

2.2.5.7 样品测定 取 A、B、C、D、E、F 药液，依照“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液，依照“2.1.1”项下色谱条件测定大豆苷元、毛蕊异黄酮、芒柄花素含量。结果显示，随着广陈皮的比例增加，芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮的含量呈现先增加后减少的趋势，其中 C 液中含有量均最高，C 液与 F 液中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮含量比分别为 1.55 : 1, 1.39 : 1, 1.53 : 1。结果见表 3。

表 2 加样回收率结果(n=6)

Table 2 Load recovery results(n=6)

指标成分	样品量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
大豆苷元	99.05	100.00	197.40	98.35	99.47	0.03
	99.05	100.00	202.80	103.75		
	99.05	100.00	198.90	99.85		
	99.05	100.00	200.58	101.53		
	99.05	100.00	194.52	95.47		
	99.05	100.00	196.91	97.86		
毛蕊异黄酮	39.78	40.00	78.82	97.60	99.08	0.03
	39.78	40.00	78.37	96.48		
	39.78	40.00	80.15	100.91		
	39.78	40.00	81.32	103.84		
	39.78	40.00	78.53	96.87		
	39.78	40.00	79.28	98.76		
芒柄花素	28.71	28.00	56.95	100.86	98.94	0.02
	28.71	28.00	55.83	96.86		
	28.71	28.00	56.69	99.93		
	28.71	28.00	57.15	101.57		
	28.71	28.00	55.83	96.85		
	28.71	28.00	56.03	97.59		

表 3 广陈皮与黄芪-葛根药对不同配比药液中各成分含量结果($\bar{x} \pm s$, mg·mL⁻¹; n=3)

Table 3 Average contents of three components in the formulations with different proportions($\bar{x} \pm s$, mg·mL⁻¹; n=3)

样品	大豆苷元	毛蕊异黄酮	芒柄花素
A	0.15 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
B	0.21 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.02
C	0.22 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.00
D	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01
E	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
F	0.16 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00

3 讨论

3.1 供试品取样量的确定 为考察广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分的影响，要求各供试品溶液中含等量黄芪、葛根药材量，因此制备供试品溶液时 A、B、C、D、E、F 药液的取样量分别为 825、850、900、1 000、1 200、800 μL，以保证各药液所含黄芪、葛根药材量相等。

3.2 确定 VIP>1 的差异变量(特征峰) PCA 和 OPLS-DA 分析显示, 黄芪-葛根药对、各黄芪-葛根-广陈皮不同配比之间均具有明显的差异。通过 A、B、C、D、E 各组药液与 F 液(黄芪-葛根药对)组数据进行 *t* 检验, 显示 C 液共有峰面面积明显增大 ($P<0.01$), 因此选择 F 液与 C 液进行 OPLS-DA 分析。按变量对分组的贡献率(VIP)大小排序为, 峰 20(芒柄花素)、峰 17(大豆苷元)、峰 18(毛蕊异黄酮)、峰 4, 峰 2(3-OH 葛根素)、峰 13(染料木苷)、峰 5(葛根素), 且 VIP 均大于 1, 其中峰 20、峰 17、峰 18 的 VIP>1.2。

3.3 HPLC 验证指标确定 为了进一步验证 OPLS-DA 分析结果, 研究广陈皮对黄芪-葛根药对化学成分影响。根据芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮 VIP 值均>1.2, 选取这 3 个化学成分作为 HPLC 含量测定验证指标。结果显示, 在黄芪-葛根药对中, 随着广陈皮的增加, 芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮的含量呈现先增加后减少的趋势, 其中以配比为 30:10:5(C)时含量最高。这与前期工艺及药效研究结果一致^[4,6], 表明广陈皮配伍黄芪-葛根药对有协同增效作用。C 液与 F 液中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮含量比分别为 1.55:1, 1.39:1, 1.53:1, 表明这 3 个组分为广陈皮对黄芪-葛根药对产生影响的化学成分; C 液为广陈皮对黄芪-葛根药对中芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮影响最大复方配比。HPLC 含量测定进一步验证了 OPLS-DA 的

分析结果。芪葛颗粒养胃护肝的物质基础可能与复方配伍后的芒柄花素、大豆苷元、毛蕊异黄酮含量增高有关, 其确切的机制尚有待进一步药效研究。

参考文献:

- [1] 柯雪红, 罗艳, 李东晓, 等. 芪葛颗粒HPLC指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 668-672.
- [2] 黄可儿, 李东晓, 罗艳, 等. 正交试验法优选芪葛颗粒的提取工艺[J]. 中国药师, 2017, 20(11): 1976-1979.
- [3] 罗娇艳, 高英, 王春怡, 等. 黄芪散及黄芪葛根汤调脂作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 221-226.
- [4] 李东晓. 芪葛颗粒处方配比、质量标准及其药效物质研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [5] 朱恬. 芪葛颗粒对酒精性肝损伤的保护作用及代谢组学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [6] 来慧丽, 林静瑜, 桂雪虹, 等. 正交试验优选黄芪葛根汤保护胃黏膜的水煎工艺[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(1): 117-120.
- [7] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第13册[S]. 北京: 卫生部药典委员会, 1997: 141.
- [8] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第19册[S]. 北京: 卫生部药典委员会, 1998: 94.
- [9] 周远, 苏式兵. 中药复方配伍的研究方法及其进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 202-208.
- [10] 宋芳娇, 曾克武, 王学美. 中药复方有效成分组相关研究方法的研究进展[J]. 环球中医药, 2012, 5(12): 951-955.
- [11] 黄张杰, 陈炜璇, 施旭光. 补中益气汤不同配伍对脾虚证大鼠尿液代谢组学的影响[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2901-2905.

(编辑: 梁进权)