

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20250905005

黄芪中皂苷类成分 UHPLC-ELSD 分析方法的建立与应用

蒋惠¹, 刘伟¹, 程雪梅¹, 郑立明², 毛新民², 赵璐³, 马璇³, 季志红³, 李建光², 王长虹¹

1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室(上海 201203); 2. 新疆第二医学院药学院(新疆 克拉玛依 834000); 3. 新疆奇沐医药研究院(新疆 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 建立简便、快速、可行的分析黄芪中主要皂苷类成分黄芪皂苷 I (AS I)、异黄芪皂苷 I (Iso-AS I)、黄芪皂苷 II (AS II)、异黄芪皂苷 II (Iso-AS II)、黄芪皂苷 III (AS III)、黄芪甲苷(ASIV)及环黄芪醇(CA)的含量测定方法, 为黄芪质量标准的改进奠定基础。方法 通过单因素考察和响应面 Box-Behnken 设计对样品前处理方法的主要因素提取时间、提取溶剂和料液比进行优化。采用超高效液相色谱仪联用蒸发光散射检测器(UHPLC-ELSD)对黄芪中主要皂苷类成分进行含量测定。色谱条件: Waters HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为 A(0.1% 甲酸水溶液)-B(乙腈), 梯度洗脱程序: 0~1 min, 28% B~35% B; 1~6 min, 35% B~35% B; 6~13 min, 35% B~48% B; 13~17 min, 48% B~48% B。进样体积为 8 μL, 流速为 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 漂移管温度为 60 °C, 雾化器温度 70 °C, 气体流速 1.6 标准升每分钟(SLM)。结果 样品前处理优化的最佳条件为加热回流提取 2 h, 提取溶剂为体积分数 70% 甲醇溶液, 料液比为 1:60。建立的含量测定方法专属性良好, AS I、Iso-AS I、AS II、Iso-AS II、AS III、AS IV 及 CA 等 7 种成分的精密度实验 RSD 为 0.30%~2.89%, 加样回收率为 95.65%~105.18%; 除 CA 外的其他 6 个成分的重复性 RSD 和 48 h 内样品稳定性 RSD 分别小于 2.92% 和 2.83%(黄芪样品中 CA 低于检测限, 无重复性和稳定性数据), 方法学验证符合要求。含量测定结果表明, 黄芪皂苷类化合物之间存在显著正相关关系, 且含量与产地和生长年限相关; 黄芪皂苷类化合物含量遵循 AS I > AS II > Iso-AS I ≥ AS IV > Iso-AS II > AS III 的规律, CA 水平低于检测限。结论 建立了一个简便、快速、高效、分离度好的含量测定方法, 实现对多个黄芪皂苷类成分精准、快速测定, 为黄芪皂苷类成分质量标志物的选择及科学的黄芪质量标准建立奠定了基础。

【关键词】 黄芪; 黄芪皂苷; 超高效液相色谱仪联用蒸发光散射检测器; 质量控制; 中药研究

Development and application of an UHPLC-ELSD method for analysis of saponins in Astragali Radix

JIANG Hui¹, LIU Wei¹, CHENG Xuemei¹, ZHENG Liming², MAO Xinmin², ZHAO Lu³, MA Xuan³, JI Zhihong³, LI Jianguang², WANG Changhong¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/The MOE Laboratory of Standardization of Chinese Medicines/National Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Xinjiang Second Medical College, Karamay, Xinjiang 834000, China; 3. Xinjiang Qimu Pharmaceutical Research Institute, Urumqi, Xinjiang 830000, China

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2022YFC3501701); 克拉玛依市重点研发计划项目(2025BA0090); 新疆维吾尔自治区科技计划项目(2024LQ03007)

[作者简介] 蒋惠, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础与体内过程研究工作

[通信作者] 李建光, 教授, 博士研究生导师; E-mail: xjykdx_ljg@163.com。王长虹, 研究员, 博士研究生导师; E-mail: wchcxm@163.com

Abstract: Objective To establish a simple, rapid and practical quantitative analysis method for multiple astragalosides, including astragaloside I (AS I), isoastragaloside I (Iso-AS I), astragaloside II (AS II), isoastragaloside II (Iso-AS II), astragaloside III (AS III), astragaloside IV (AS IV) and cycloastragenol (CA) in Astragali Radix and to lay a foundation for improving the quality standard of Astragali Radix. **Method** The sample pretreatment method was optimized through single-factor experiments and response surface methodology (Box-Behnken design), focusing on three key parameters: extraction time, extraction solvent, and solid-to-liquid ratio. Quantitative analysis of astragalosides in Astragali Radix was performed using ultra-performance liquid chromatography coupled with an evaporative light scattering detector (UHPLC-ELSD). The chromatographic separation was achieved on a Waters HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) using a mobile phase consisting of A (0.1% formic acid aqueous solution) and B (acetonitrile) and eluted at a flow rate of 0.3 mL/min by the following gradient program: 0-1 min, 28% B to 35% B; 1-6 min, 35% B to 35% B; 6-13 min, 35% B to 48% B; 13-17 min, 48% B to 48% B. The injection volume was 8 μL, and the column temperature was maintained at 30 °C. The evaporator temperature and nebulizer temperature were set at 60 °C and 70 °C respectively with a gas flow rate of 1.6 SLM. **Results** The optimal sample pretreatment conditions were determined as follows: 2 h of heated reflux extraction using 70% methanol as the solvent and a solid-to-liquid ratio of 1:60. The established quantitative method demonstrated excellent specificity. The precision validation showed RSD values ranging from 0.30% to 2.89%, and the recovery rates ranged from 95.65% to 105.18%. The RSDs for repeatability and 48-hour sample stability were within 2.92% and 2.83%, respectively (no repeatability or stability data were available for CA in Astragali Radix samples due to its content being below the detection limit). All validation results complied with acceptance criteria for quantitative analysis. Quantitative results revealed significant positive correlations among astragalosides, and their contents were related to geographical origin and growth years. The content of astragalosides followed the order: AS I > AS II > Iso-AS I ≥ AS IV > Iso-AS II > AS III, with the level of CA below the detection limit. **Conclusions** A simple, rapid, efficient, and well-separated quantitative method is established, enabling accurate and simultaneous determination of multiple astragalosides. This approach provides a foundation for selecting quality markers among astragalosides and establishing scientific quality standards for Astragali Radix.

Keywords: Astragali Radix; astragalosides; UHPLC-ELSD; quality control; research of Chinese materia medica

黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气升阳、固表止汗等功效^[1]。黄芪中皂苷类成分是代表性成分之一,目前已从黄芪中分离鉴定出 160 余种皂苷类成分,其中以环黄芪醇

(Cycloastragenol, CA) 为母核的黄芪皂苷类化合物是最重要的药效物质,包含黄芪皂苷 I ~ VII (Astragaloside I ~ VII, AS I ~ VII)、异黄芪皂苷 I ~ II (Iso astragaloside I ~ II, Iso-AS I ~ II) 和乙酰基黄芪皂苷, AS IV 也称为黄芪甲苷^[2-4]。化学结构如图 1 所示。

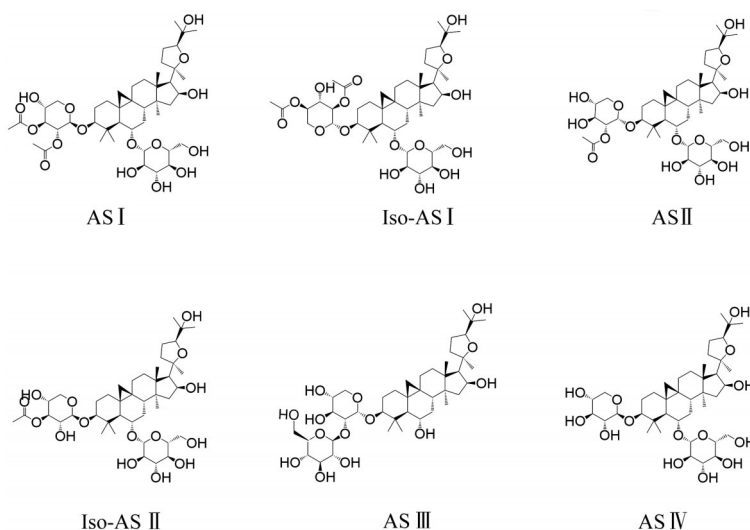


图 1 黄芪皂苷 I ~ IV (AS I ~ IV)、异黄芪皂苷 I ~ II (Iso-AS I ~ II) 的化学结构图

黄芪皂苷类化合物具有抗炎、调节免疫功能、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[5-10],其中 CA 在激

活端粒酶、抗衰老等医学领域更是备受瞩目^[11-12]。现行的《中华人民共和国药典(2025 年版):一部》^[13]

中采用毛蕊异黄酮苷和 ASⅣ 作为黄芪的质量控制指标,但 ASⅣ 在药材中含量极低,作为黄芪质量标志物存在较大争议,应从更深入全面的角度寻找更科学、合理的质量标志物^[14-15]。

黄芪皂苷类化合物可以被肠道菌群等微生物代谢转化为 CA^[16-17],研究^[18]显示 ASⅠ~Ⅳ 在人源肠道菌群中的生物转化率可达 50% 以上,推测 CA 才是黄芪皂苷类化合物发挥药效的物质基础。但 CA 在药材中含量微乎其微,CA 难以成为指标成分进行药材质量控制。ASⅠ 和 ASⅢ 转化为 CA 的效率高,且 ASⅠ 在药材中含量可观,相较于 ASⅡ 和 ASⅣ,ASⅠ 和 ASⅢ 转化速率更快^[19]。ASⅣ 转化为 CA 的效率低,在黄芪药材中的丰度低,继续采用 ASⅣ 作为黄芪质量标志物值得进一步研究探讨。因此,ASⅠ 和 ASⅢ 等其他皂苷类成分更有理由成为黄芪质量标志物。

本研究建立了一个超高效液相色谱仪联用蒸发光散射检测器(UHPLC-ELSD)的方法同时测定 7 个黄芪皂苷类成分,同时对所收集的黄芪样品中黄芪皂苷类化合物的含量进行测定和分析,以期将 ASⅠ 等黄芪皂苷类成分作为黄芪质量标志物以及制定更为客观的黄芪质量控制标准奠定基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 分析纯(AR)级甲醇(批号:20250822),国药集团化学试剂有限公司;色谱级乙腈(批号:20250314),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ASⅠ(批号:TC0233-240615)、ASⅡ(批号:TC0234-240615)、ASⅣ(批号:TC0231-240329)、CA(批号:TC0247-230825),四川精粹天成药物科技有限公司;ASⅢ(批号:TC0233-240615),四川恒诚致远生物科技有限公司;Iso-ASⅠ(批号:BP1719)、Iso-ASⅡ(批号:BP1630),成都普瑞法科技开发有限公司。

本研究共收集了 11 批种植于甘肃、山西、陕西、新疆等地区不同生长年限的黄芪样品,编号为 Q1 至 Q11。黄芪药材植物样本由上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定,凭证标本存放于上海中医药大学中药研究所。详细样品信息见表 1。

1.2 主要仪器 UHPLC-ELSD(型号:1290 Infinity II),安捷伦(中国)科技有限公司;万分之一电子天平(型号:BCE124I-1CCN),北京赛多利斯科学仪器有限公司;十万分之一电子天平(型号:QUINTIX65-1CN),北京赛多利斯科学仪器有限公司;Milli-Q 纯水仪(型号:Advantage A10),美国 Merck 公司;电热

表 1 样品信息

编号	生长时间/年	产地	批号或收集时间
Q1	2~3	甘肃定西	2023.03.27
Q2	2~3	甘肃定西	G03221014-01
Q3	2~3	甘肃定西	2025.06.10
Q4	2~3	甘肃定西	2025.06.10
Q5	2	新疆阿勒泰	2025.08.06
Q6	2	新疆阿勒泰	2024.10.09
Q7	2	新疆阿勒泰	2024.10.09
Q8	2	新疆阿勒泰	2024.10.09
Q9	7	山西大同	2025.08.06
Q10	2	宁夏固原	2025.08.06
Q11	7	陕西榆林	2024.10.08

恒温水浴锅(型号:HWS-28),上海一恒科学仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);流动相为 A(0.1% 甲酸水溶液)-B(乙腈),梯度洗脱程序为:0~1 min,28% B~35% B;1~6 min,35% B~35% B;6~13 min,35% B~48% B;13~17 min,48% B~48% B。进样体积为 8 μL,流速为 0.3 mL/min,柱温 30 °C,漂移管温度为 60 °C,雾化器温度 70 °C,气体流速 1.6 标准升每分钟(SLM)。

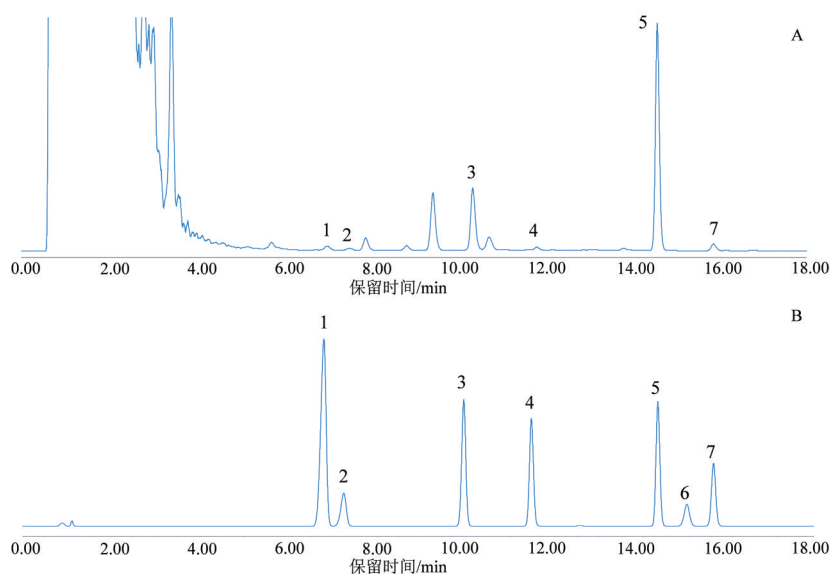
2.2 对照品溶液的制备 精密称定 ASⅠ、ASⅡ、ASⅢ、ASⅣ、CA、Iso-ASⅠ、Iso-ASⅡ 对照品适量,加入甲醇溶解于容量瓶中,分别配置成浓度为 1.01、1.00、1.00、1.02、1.00、1.02、1.00 g/L 的储备液,储存于 4 °C 条件下备用。分别取上述储备液适量,制成 ASⅠ、ASⅡ、ASⅢ、ASⅣ、CA、Iso-ASⅠ、Iso-ASⅡ 浓度分别为 0.70、0.26、0.06、0.06、0.02、0.07、0.02 g/L 的混合对照品溶液,测定时分别进样 2 μL 和 5 μL,采用外标两点法进行计算。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定黄芪药材粉末(过四号筛)1 g 于圆底烧瓶中,加入适量体积分数 70% 甲醇溶液,称定质量,加热回流法提取,冷却后再次称定质量,用体积分数 70% 甲醇溶液补足质量,摇匀,4 000 r/min 转速下离心 10 min,取 20 mL 上清液蒸干,用体积分数 70% 甲醇溶液复溶残渣,定容至 2 mL,过 0.22 μm 滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 精密吸取对照品溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。各色谱峰分离度良好,符合专属性实验要求。对照品和供试

品色谱图见图 2。



注:A为供试品色谱图,B为混合对照品色谱图。1为黄芪皂苷(AS)Ⅳ,2为ASⅢ,3为ASⅡ,4为异黄芪皂苷(Iso-AS)Ⅱ,5为ASⅠ,6为环黄芪醇(CA),7为Iso-ASⅠ。

图2 超高效液相色谱仪联用蒸发光散射检测器(UHPLC-ELSD)色谱图

2.4.2 线性关系考察 取“2.2”项下各单成分对照品储备液适量,用甲醇依次稀释,得系列浓度对照品溶液,按“2.1”项色谱条件分别进样,记录峰面积。

以浓度(mg/L)为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,7个黄芪皂苷类化合物的回归曲线方程如表2所示。

表2 黄芪皂苷类化合物的标准曲线

化合物	线性范围/(mg/L)	线性方程	r^2	噪声
ASⅠ	6~100	$y = 1.5587x + 7.0937$	0.9995	0.1066
ASⅡ	25~500	$y = 1.9053x + 6.9786$	0.9993	0.1066
ASⅢ	12~400	$y = 1.5816x + 5.8101$	0.9995	0.1066
ASⅣ	12~400	$y = 1.9089x + 6.9328$	0.9993	0.1066
CA	5~100	$y = 1.3278x + 6.0838$	0.9993	0.1066
Iso-ASⅠ	6~100	$y = 1.6997x + 6.9095$	0.9992	0.1066
Iso-ASⅡ	25~100	$y = 1.7659x + 6.7345$	0.9995	0.1066

注:AS为黄芪皂苷,CA为环黄芪醇,Iso-AS为异黄芪皂苷。

2.4.3 精密度、重复性和稳定性考察 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液适量,连续重复进样测定6次,记录峰面积,计算ASⅠ、ASⅡ、ASⅢ、ASⅣ、CA、Iso-ASⅠ、Iso-ASⅡ的相对标准偏差(RSD)值,测试仪器的日内精密度;连续3d重复进样,记录峰面积,计算ASⅠ、ASⅡ、ASⅢ、ASⅣ、CA、Iso-ASⅠ、Iso-ASⅡ的RSD值,测试仪器的日间精密度。

按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别进样,记录峰面积,计算RSD值,测试方法的重复性。取同一份供试品溶液,于室温下放置0、2、4、8、12、24、48h时分别进样,记录峰面积,计算峰面积的RSD值,测试样品溶液在48h内的稳定性。由于所

收集的黄芪药材样品中的CA均低于检测限,因此无法计算CA的重复性与稳定性。测定结果见表3,实验结果表明仪器的日间、日内精密度良好,该方法下黄芪皂苷类化合物的重复性良好,供试品48h内的稳定性良好。

2.4.4 准确度考察 精密称取黄芪粉末样品9份,分别精密加入含样品化合物含量约50%、100%、150%的对照品适量,各浓度制备3份平行样品,同时跟随制作3份未添加对照品的供试品进行计算和对照。按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,记录峰面积,计算加样回收率及RSD。结果见表4,表明方法的回收率较好,符合实验要求。

表 3 黄芪皂苷类化合物的精密度、重复性和稳定性(RSD, %)

化合物	对照品浓度/ (mg/L)	日内精 密度	日间精 密度	重复性	48 h 稳定性
AS I	500	0.30	1.85	2.71	2.83
AS II	50	0.30	1.71	2.63	2.72
AS III	50	1.64	2.63	1.71	2.13
AS IV	50	1.26	2.71	2.89	2.59
CA	20	2.24	2.89	\	\
Iso-AS I	50	1.46	2.64	2.92	1.86
Iso-AS II	50	1.22	2.63	2.11	1.52

注:AS为黄芪皂苷,CA为环黄芪醇,Iso-AS为异黄芪皂苷,“\”表示无,RSD为相对标准偏差。

表 4 黄芪皂苷类化合物的加样回收率

化合物	样品含 量/mg	标准品含 量/mg	实测含 量/mg	回收 率/%	RSD/%
AS I	1.175 0	0.350 0	1.520 9	98.83	0.93
	1.175 0	0.700 0	1.844 6	95.65	1.05
	1.175 0	1.050 0	2.181 7	96.88	1.15
AS II	0.297 1	0.130 0	0.431 5	103.32	0.53
	0.297 1	0.259 0	0.552 4	98.44	1.28
	0.297 1	0.388 0	0.673 9	96.78	0.23
AS III	0.078 7	0.030 0	0.109 3	101.92	0.52
	0.078 7	0.060 0	0.138 1	98.96	1.31
	0.078 7	0.090 0	0.166 3	97.32	1.17
AS IV	0.099 4	0.030 0	0.129 9	101.98	0.74
	0.099 4	0.060 0	0.160 9	105.18	2.21
	0.099 4	0.090 0	0.187 5	97.59	0.27
CA	0.025 0	0.012 5	0.025 8	103.32	2.48
	0.050 0	0.025 0	0.052 2	104.41	0.80
	0.075 0	0.037 5	0.076 9	102.48	0.65
Iso-AS I	0.095 8	0.035 0	0.132 2	103.99	0.51
	0.095 8	0.070 0	0.166 8	101.46	1.33
	0.095 8	0.105 0	0.204 3	103.37	0.07
Iso-AS II	0.052 9	0.012 5	0.065 5	104.71	0.87
	0.052 9	0.025 0	0.078 7	103.20	1.03
	0.052 9	0.037 5	0.091 1	101.98	0.95

注:AS为黄芪皂苷,CA为环黄芪醇,Iso-AS为异黄芪皂苷,RSD为相对标准偏差。

2.5 样品前处理条件优化

2.5.1 提取方法考察 分别采用超声和加热回流两种常用的提取方式对供试品进行提取。设定提取溶剂为体积分数 80% 甲醇水溶液,料液比为 1:40,超声和加热回流提取时间分别设计为 1 h,考察不同提取方式对 AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II 含量的影响,实验平行 3 次。考

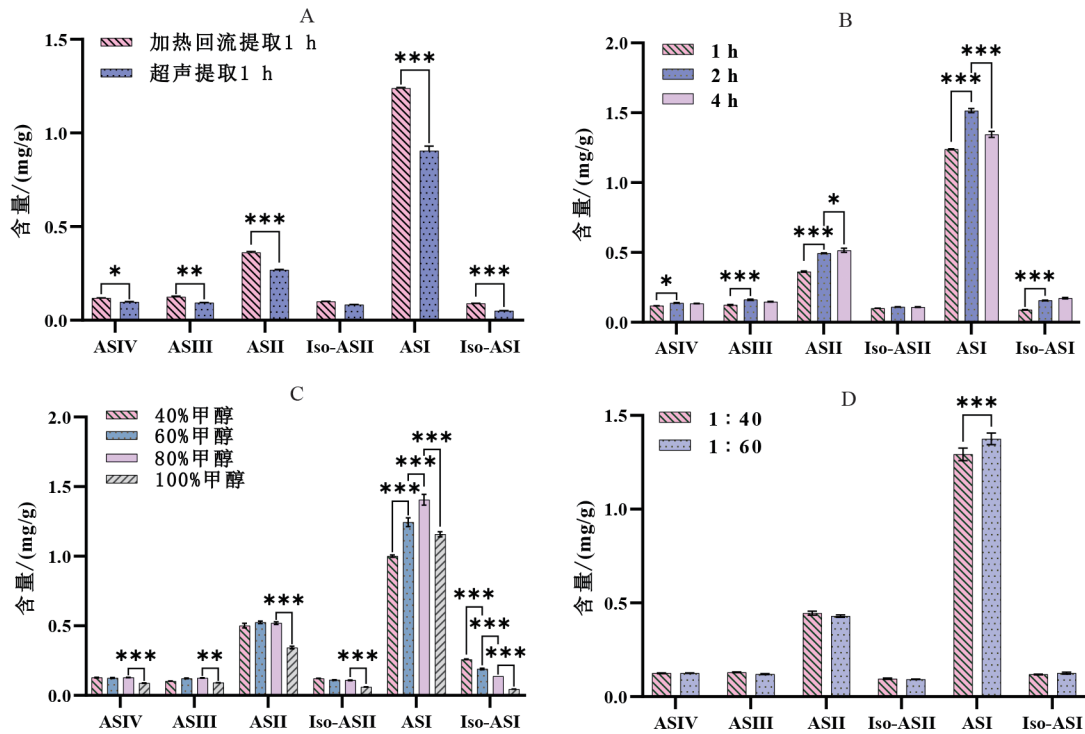
察结果见图 3A,采用加热回流法提取出的化合物含量均显著高于超声提取法。

2.5.2 提取时间考察 黄芪皂苷类化合物浸出随着提取时间增加而增加,但黄芪皂苷类化合物在长时间的高温环境下也会发生转化^[20],因此为了考察最佳提取时间,设定提取方式为加热回流,提取溶剂为体积分数 80% 甲醇水溶液,料液比为 1:40,加热回流提取时间分别设计为 1、2、4 h,考察不同提取时间对 AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II 含量的影响,实验平行 3 次。考察结果见图 3B,对比实验结果发现,与 1 h 相比,提取 2 h 的化合物含量显著上升;与 2 h 提取效果相比,提取 4 h 后 AS II 含量略有增加,而 AS I 的含量显著下降,因此选择 2 h 作为提取时长。

2.5.3 提取溶剂考察 为了响应绿色、简便的设计初衷,尽量还原药材含量真实情况,因此摒弃使用氨水,选择甲醇水溶液作为提取溶剂。设定提取方式为加热回流,料液比为 1:40,提取时间为 2 h,分别设计含体积分数 40%、60%、80%、100% 甲醇的水溶液作为提取溶剂,考察不同提取溶剂对 AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II 含量的影响,实验平行 3 次。考察结果如图 3C 所示,观察实验结果发现,甲醇含量从 40% 变化至 80% 时,AS II、AS III、AS IV、Iso-AS II 的含量没有显著性差异,AS I 的含量上升,相反地,Iso-AS I 含量显著下降;而甲醇含量从 80% 提高至 100% 时黄芪皂苷类化合物的含量均显著下降。相较于 AS I,Iso AS I 在药材中的含量较低,而且含量随着提取溶剂变动的幅度较小,对总体提取率的影响更小。因此,选择体积分数 80% 甲醇溶液作为提取溶剂。

2.5.4 料液比考察 提取溶剂用量的设计需要在尽量提高提取率的同时又能节约资源和劳动力。设定提取方式为加热回流,提取时间为 2 h,体积分数 80% 甲醇溶液作为提取溶剂,分别采用 1:40、1:60 的料液比,考察不同溶剂体积对 AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II 含量的影响,实验平行进行 3 次。考察结果如图 3D 所示,观察实验结果发现,与料液比 1:40 相比,料液比为 1:60 时,AS I 含量显著升高,因此优选 1:60 的料液比。

2.6 响应面 Box-Behnken 法优化提取工艺 在单因素实验的基础上根据 Box-Behnken 法,称取黄芪粉末 1 g,以 A(提取时间/h)、B(甲醇占比/%)和 C(溶剂



注:A为提取方式考察,B为提取时间考察,C为提取溶剂考察,D为料液比考察。AS为黄芪皂苷,CA为环黄芪醇,Iso-AS为异黄芪皂苷。Y轴变量为黄芪皂苷类化合物的含量(mg/g)。*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图3 单因素考察结果

体积/mL)进行方案优化。以黄芪皂苷类化合物的含量之和为响应值,采用三因素三水平的响应曲面分析方法,共17个试验点,其中12个为析因点,5个为零点,以估计误差,实验设计见表5。利用Design-Expert 10.0软件对表5进行多元非线性回归分析,得到二次多项回归方程 $Total\ content = 1.92 + 0.043A - 0.089B + 0.030C + 0.046AB + 0.062AC - 0.016BC - 0.028A^2 - 0.29B^2 + 0.066C^2$,模型复合相关系数 $r^2 = 0.9000$,校正决定系数 $r^2_{Adj} = 0.7713$,表明有77.13%的响应值可用该模型进行解释,用此数学模型和二次回归方程分析和预测黄芪皂苷类化合物的总含量较可靠。模型的变异系数(CV)=4.88%,小于10%,说明该模型可信度及实际情况的拟合度高,模型方程可较好地反映真实的实验值。二次分析模型及方差分析结果见表6,该模型的P值为0.0089 ($P<0.01$),差异极显著,失拟项P值为0.3713 ($P>0.05$),表明失拟项差异不显著,说明所建模型的拟合度良好。比较F值可知,各因素对综合评分的影响由大到小排序为: $B>A>C$,说明提取溶剂对黄芪皂苷类化合物总含量的影响较大。其中一次项效应B、交互项 B^2 对黄芪皂苷类化合物总含量的影响极显著($P<0.01$),一次项A、C和交互项AB、AC、

BC、 A^2 、 C^2 对黄芪皂苷类化合物总含量的影响不显著($P>0.05$)。

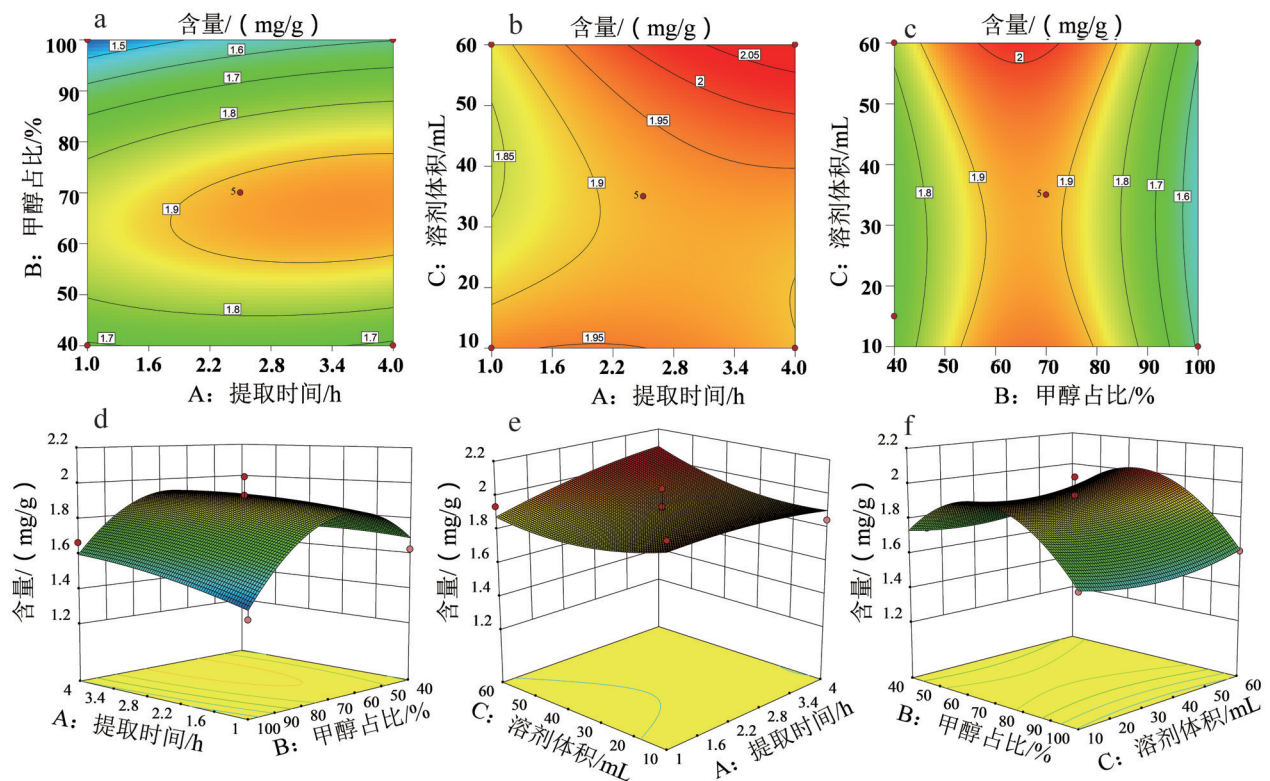
表5 Box-Behnken 实验方案设计

序号	提取时间/h	甲醇占比/mL	溶剂体积/mL	黄芪皂苷总含量/(mg/g)
1	4.0	70	10	1.85
2	2.5	40	15	1.73
3	2.5	100	60	1.61
4	1.0	70	10	2.00
5	2.5	100	10	1.58
6	2.5	70	35	1.87
7	2.5	70	35	1.92
8	1.0	70	60	1.94
9	2.5	70	35	1.82
10	2.5	70	35	2.04
11	2.5	40	60	1.83
12	1.0	100	35	1.37
13	1.0	40	35	1.62
14	4.0	100	35	1.66
15	2.5	70	35	1.93
16	4.0	70	60	2.03
17	4.0	40	35	1.73

表6 黄芪皂苷类化合物含量测定方法优化模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	平均方差	F值	P值
模型	0.484 0	9	0.053 8	6.996 3	0.008 9
A(提取时间/h)	0.014 9	1	0.014 9	1.936 7	0.206 6
B(甲醇占比/%)	0.063 5	1	0.063 5	8.256 8	0.023 9
C(溶剂体积/mL)	0.006 9	1	0.006 9	0.901 9	0.373 9
AB	0.008 4	1	0.008 4	1.087 5	0.331 7
AC	0.015 3	1	0.015 3	1.994 8	0.200 7
BC	0.000 9	1	0.000 9	0.121 1	0.738 0
A ²	0.003 2	1	0.003 2	0.419 2	0.538 0
B ²	0.354 0	1	0.354 0	46.060 7	0.000 3
C ²	0.016 6	1	0.016 6	2.155 4	0.185 5
残差	0.053 8	7	0.007 7		
失拟项	0.027 3	3	0.009 1	1.374 5	0.371 3
纯误差	0.026 5	4	0.006 6		
总离差	0.537 8	16			

为确定提取时间、提取溶剂、料液比3个因素及其交互作用对黄芪皂苷类化合物总含量的影响,根据回归方程绘制响应曲面图与等高线图。图4a中等高线沿提取溶剂轴线变化更密集且略呈椭圆形,表明提取溶剂对黄芪皂苷类化合物总含量的影响大。图4b图形非圆形,表明提取时间与料液比对黄芪皂苷类化合物总含量的影响作用较弱。图4c显示提取溶剂对黄芪皂苷类化合物总含量的影响有极值,而料液比对黄芪皂苷类化合物总含量的影响无规律。图4d、4e、4f响应面图分别与等高线图对应,当提取时间为1.9~4.0 h、提取溶剂为体积分数60%~70%甲醇溶液时,具有较高的提取量。此响应面分析结论与方差结果基本一致,进一步验证并完善了方差分析的结果。



注:等高线图(a为提取时间与提取溶剂关系;b为提取时间与料液比关系;c为提取溶剂与料液比关系);响应面图(d为提取时间与提取溶剂关系;e为提取时间与料液比关系;f为提取溶剂与料液比关系)。

图4 实验因素交互作用对黄芪皂苷含量影响的等高线图与响应面图

经响应面优化分析得到黄芪皂苷类化合物最佳提取条件为提取时间4 h,提取溶剂为体积分数66.9%甲醇溶液(考虑实际操作,优化为70%),料液比为1:60,预测实验结果为2.091 mg/g,对此条件进

行实验验证。由于AS I 长时间加热不稳定,且提取时间为非显著影响因素,同时展开提取时间为2 h,提取溶剂为体积分数70%甲醇溶液,料液比为1:60的对照试验,均进行3次平行实验。实验结果见表

7, 证明提取时间为 2 h 时能达到预测值, 提取时间为 4 h 时 AS I 出现了下降的情况, 因此后续实验采用提取时间为 2 h 的实验条件。

表 7 响应面最优条件验证实验

提取时间/h	含量/(mg/g)							
	AS I	AS II	AS III	AS IV	CA	Iso-AS I	Iso-AS II	黄芪皂苷类化合物总量
4	0.919 6	0.546 6	0.094 0	0.138 6	-	0.212 3	0.121 9	2.032 9
2	1.072 5	0.499 1	0.093 0	0.129 2	-	0.189 9	0.110 3	2.094 0

注:“-”表示化合物含量低于检测限。AS 为黄芪皂苷, CA 为环黄芪醇, Iso-AS 为异黄芪皂苷。

2.7 含量测定 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每批样品平行制作 3 份, 测定 11 批黄芪样品含量。测定结果见表 8, 含量测定结果显示, 所测的所有样品含量都遵循 AS I > AS II > Iso-AS I ≥ AS IV >

Iso-AS II > AS III 的规律, 其中 CA 均低于检测限。对黄芪皂苷类化合物含量测定结果进行皮尔逊分析和主成分分析(PCA), 皮尔逊分析结果见表 9, PCA 分析结果见图 5。

表 8 样品测定结果 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

样品编号	含量/(mg/g)							
	AS I	AS II	AS III	AS IV	CA	Iso-AS I	Iso-AS II	
Q1	0.682 6±0.010 5	0.231 3±0.003 4	0.046 4±0.000 3	0.072 8±0.000 9	-	0.074 0±0.001 1	0.039 2±0.000 1	
Q2	1.008 8±0.024 6	0.306 1±0.001 9	0.066 2±0.000 7	0.103 0±0.002 5	-	0.127 9±0.001 9	0.056 0±0.000 1	
Q3	0.848 4±0.016 0	0.304 0±0.004 9	0.056 0±0.001 1	0.090 9±0.001 3	-	0.135 4±0.001 5	0.058 8±0.000 9	
Q4	0.652 7±0.004 3	0.194 7±0.003 0	0.045 4±0.000 5	0.050 5±0.000 5	-	0.105 4±0.001 3	0.042 6±0.000 5	
Q5	0.679 3±0.007 6	0.221 6±0.001 4	0.053 1±0.000 6	0.076 0±0.000 3	-	0.073 8±0.000 8	0.044 5±0.000 4	
Q6	0.503 4±0.008 6	0.258 4±0.004 2	0.036 1±0.000 4	0.061 3±0.000 4	-	0.105 7±0.001 8	0.050 9±0.000 6	
Q7	0.698 4±0.011 8	0.211 4±0.002 7	0.039 6±0.000 8	0.051 9±0.000 7	-	0.119 1±0.001 9	0.035 5±0.000 6	
Q8	1.364 1±0.023 4	0.513 1±0.007 4	0.070 7±0.000 8	0.104 1±0.000 8	-	0.246 3±0.003 4	0.080 5±0.001 2	
Q9	3.671 1±0.065 6	1.143 2±0.010 3	0.100 9±0.000 5	0.331 6±0.002 3	-	0.621 5±0.010 7	0.189 4±0.002 1	
Q10	1.123 7±0.008 9	0.364 2±0.001 6	0.036 1±0.000 2	0.081 7±0.000 7	-	0.204 5±0.000 9	0.065 9±0.000 6	
Q11	2.064 4±0.029 9	0.599 7±0.009 4	0.063 8±0.000 7	0.184 3±0.001 6	-	0.392 8±0.004 4	0.096 0±0.001 2	

注:AS 为黄芪皂苷, CA 为环黄芪醇, Iso-AS 为异黄芪皂苷。“-”表示化合物含量低于检测限。

表 9 皮尔逊相关分析

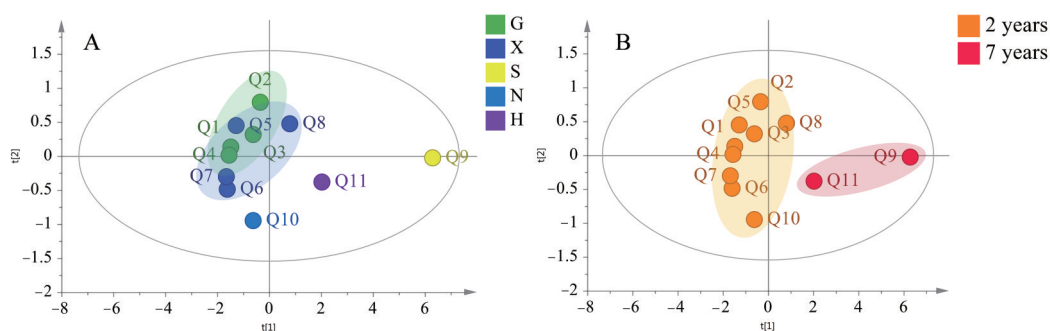
变量	AS I	AS II	AS III	AS IV	Iso-AS I	Iso-AS II
AS I	1					
AS II	0.987**	1				
AS III	0.856**	0.856**	1			
AS IV	0.982**	0.976**	0.874**	1		
Iso-ASI	0.955**	0.791**	0.980**	0.986**	1	
Iso-ASII	0.977**	0.850**	0.995**	0.979**	0.970**	1

注:AS 为黄芪皂苷, Iso-AS 为异黄芪皂苷。 **表示 $P < 0.001$, 变量质量相关性显著。

皮尔逊相关分析结果表明黄芪皂苷类化合物 AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II 的含量之间存在显著正相关关系。

根据不同产地和不同生长年限对含量测定的结果进行主成分分析, 图 5A 分析结果显示 Q1~Q8 样品聚集程度高, 结合图 5B 推测是因为种植年限相近, 均为 2 年生, Q10 的样品虽然也为 2 年生, 但相对

于 Q1~Q8 样品较离散, 可能是由于该批次样品为野生种植, 而其他样品为移栽种植; Q9 和 Q10 离散程度较高, 因为产地不同, 更重要的是生长年限为 7 年, 较其他样品更长, 黄芪皂苷类化合物的含量也更高。分析结果表明, 黄芪皂苷类化合物的含量可能与产地、生长年限具有密不可分的关系, 但这一结论还需大量样本进行验证。



注:A为按产地分类,B为按生长年限分类。G为甘肃,X为新疆,N为宁夏,S为山西,H为陕西,2 years为两年生,7 years为七年生。

图5 黄芪皂苷类化合物主成分分析图

3 讨论

本研究建立了同时测定7个黄芪皂苷类化合物的UHPLC-ELSD的方法,能快速、高效地实现对AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II的含量进行测定。虽然已有文献报道黄芪中6种皂苷类成分的HPLC-ELSD分析方法^[21-22],但分析时间较长,需要45~80 min。而本文基于UHPLC-ELSD法同时测定7种皂苷类成分,缩短了分析时间,在18 min内可以完成一个样品测试,且各成分均具有满意的分离度。

采用单因素考察和响应面法优化了黄芪皂苷类化合物含量测定的前处理方法。在考察提取方式时,观察提取过程发现,加热回流时提取溶剂达到沸点后带动药材粉末不断翻腾,使植物组织与溶剂充分混匀,接触面积增大,因此浸出物含量也增加,提取溶剂不断蒸发后反复冷凝回流,达到多次浸取的效果,这可能是加热回流提取法比超声提取法提取效率更高的原因。经响应面优化分析得到的最佳提取条件为提取时间4 h,验证实验表明与提取2 h相比,提取4 h时AS I含量显著下降,而AS II含量上升,推测长时间持续加热会对AS I稳定性产生负面影响,AS I会水解转化为AS II,黄芪皂苷类化合物之间发生相互转化,对响应面分析结果造成了一定偏差。但提取2 h所得6个黄芪皂苷含量之和与响应面得出的最佳理论值吻合,一定程度表明该模型预测的准确性。提取时间对黄芪皂苷类化合物总含量的影响不显著,结合样品前处理时间成本以及反映黄芪药材中黄芪皂苷类成分含量真实面貌的目的,最终选择2 h作为提取时间。本文优化的样品处理方法,避免了在样品处理阶段加氨水等碱性试剂将其他黄芪皂苷转化为AS IV,也摒弃了固相萃取小柱(SPE)富集黄芪皂苷类化合物的繁琐

操作,保持了黄芪药材中黄芪皂苷类化合物的原始状态,大大简化了样品处理过程,提高效率。

对收集的11批黄芪样品进行含量测定,并根据不同产地和不同生长年限对含量测定的结果进行主成分分析。分析结果提示AS I、AS II、AS III、AS IV、CA、Iso-AS I、Iso-AS II之间存在显著的正相关关系,所测的所有样品含量都遵循 $AS I > AS II > Iso-AS I \geq AS IV > Iso-AS II > AS III$ 的规律,其中CA均低于检测限,AS I在各批次黄芪样品中的丰度都远高于其他黄芪皂苷。但黄芪皂苷类化合物含量与种植产地、生长年限乃至栽培方式等都具有密不可分的关联,这一结论还需要更多样本加以验证。

综上,本研究建立的方法能够快速、高效检测黄芪样品中的主要黄芪皂苷类化合物的含量,为后续确立AS I为黄芪质量标志物、建立更科学合理的黄芪质量标准体系奠定基础。

参考文献:

- [1] 曾雯,周胜强,黄佳,等.黄芪免疫调节活性成分及其药理作用进展[J].上海中医药杂志,2025,59(1):80-88.
- [2] PENG Y, DENG X, YANG S S, et al. Progress in mechanism of *Astragalus membranaceus* and its chemical constituents on multiple sclerosis[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(1): 89-95.
- [3] WANG P, WANG Z, ZHANG Z, et al. A review of the botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacology, toxicology, and quality control of the *Astragalus membranaceus* [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1242318.
- [4] 蒋惠.黄芪皂苷类成分的生物合成、体内外转化、药理作用及质量控制研究进展[J].上海中医药杂志,2025,59(10):80-93.
- [5] 王祯,张俊令,焦宏基,等.黄芪有效成分的药理作用与质量控制研究进展[J].药物评价研究,2023,46(4):917-924.
- [6] ZHANG L, HU Y, QI S, et al. *Astragalus* saponins and its main constituents ameliorate ductular reaction and liver fibrosis in a mouse model of DDC-induced cholestatic liver disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 965914.

(下转第81页)