

HPLC – MS 法分析不同提取方法黄芪三七配伍的化学成分变化*

张靖¹ 徐文¹ 吴钉红¹ 朱大元² 卢传坚^{1**} 丘小惠^{1**}

(广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006, 中国科学院上海药物研究所, 上海 211203)

摘要 目的: 研究采用两种不同提取方法时, 黄芪和三七配伍前后化学成分的变化。方法: 用 HPLC 法对单药及两药的水提醇沉法和醇提法提取液进行检测和比较分析, 并结合 LC – MS 提供的分子量信息, 推测产生变化的化学成分的结构。结果: 黄芪和三七的水提醇沉法与醇提法的提取液相比, 化学成分人参皂苷 Rh₁ 和 Rg₂ 的含量明显增加, 且人参皂苷 Rh₄、三七皂苷 Fe 及三七皂苷 T₅ 等化学成分仅在水提醇沉提取液有检出; 另有 4 个化学成分峰仅存在于醇提法的低极性部位, 而在水提醇沉提取液中未检出。结论: 单药及两药的提取液比较并没有新成分产生, 仅在化学成分的含量上存在差异。而采用不同提取方法, 黄芪和三七配伍的化学成分溶出种类及含量均有明显差别, 尤其对三七化学成分的溶出影响较大。

关键词: 黄芪; 三七; 化学成分; 高效液相色谱; 质谱; 生产工艺

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)06 – 1131 – 06

HPLC study on chemical component changes in compatibility of Astragali Radix with Notoginseng Radix et Rhizoma by different extraction*

ZHANG Jing¹ , XU Wen¹ , WU Ding – hong¹ , ZHU Da – yuan² ,

LU Chuan – jian^{1**} , QIU Xiao – hui^{1**}

(1. The Second Affiliated Clinical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 211203, China)

Abstract Objective: To explore the chemical constituents changes in compatibility of Astragali Radix (AR) with Notoginseng Radix et Rhizoma (NRR) by two different Extraction. **Methods:** HPLC was used to determine and analyze the peak changes of single and co – decoction by water extraction with alcohol precipitation and by 80% alcohol extraction along with molecular information supporting by LC – MS in order to speculate the changing components. **Results:** The content of ginsenoside Rh₁ and Rg₂ were increased in the water extract, which compared with the alcohol extract and ginsenoside Rh₄, notoginsenoside Fe, notoginsenoside T₅ were detected in the water extract only. Another four peaks were found in the lower polarity part of the alcohol extract instead of the water extract. **Conclusion:** The content of components were varied when comparing the single and co – decoction, but no new compound was detected from them. The species and content of dissolved composition in compatibility of AR with NRR had significant difference while using different extract method, especially for the compounds of NRR.

Key words: astragali radix; notoginseng radix et rhizoma; chemical component; HPLC; productive technology

以黄芪(Astragali Radix, AR)与三七(Notoginseng Radix et Rhizoma, NRR)为主药配伍的三芪口服液(原用名“通脉口服液”,制剂批准文号粤Z20071155)是广东省中医院针对慢性肾炎基本病机而研制的医院制剂。既往研究表明^[1, 2], 该制剂可抑制肾小球系膜细胞的过度增殖, 延缓肾纤维化,

有效改善慢性肾炎患者的临床症状及肾功能。

中药复方在提取过程中, 由于采用不同溶剂的极性差别, 以及各药味的化学成分相互影响, 使复方中提取的有效成分发生变化, 直接影响中药复方的药效。为进一步研究不同提取方法对黄芪和三七有效成分变化的影响, 本文采用高效液相色谱^[3]及液

* 2010 年广东省中医院“中医特色与优势临床专项(第二批)”; 2009 年广东省科技计划项目(2009A030100006)

** 通讯作者 卢传坚 Tel/Fax: (020) 81887233; E – mail: luchuanjian888@vip.sina.com

丘小惠 Tel/Fax: (020) 39318571; E – mail: gxhqxh@medmail.com.cn, luchuanjian888@vip.sina.com

-质联用技术,比较了三芪口服液制剂工艺过程中采用水提醇沉法和直接采用醇提法两种不同提取方法黄芪和三七化学成分的变化,为今后的制剂工艺以及活性组分的研究与开发提供化学依据。

1 仪器与材料

美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪及色谱工作站,二极管阵列检测器; Thermo fisher LTQ - Orbitrap XL; AB135 - S 型十万分之一电子分析天平, Sartorius 万分之一电子分析天平。

乙腈(色谱纯)购自 Dikma 公司,乙醇及甲醇为分析纯,购自天津市百世化工有限公司;超纯水由 Millipore 制得;黄芪、三七饮片购于康美药业公司,经本实验室鉴定均为现行版中国药典(一部)收载品种,为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,五加科植物三七 *Panax no-*

toginseng(Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎;对照品人参皂苷 R_{g_1} (批号 110703 - 200726) 购自中国药品生物制品检定所,人参皂苷 R_{g_2} 、 R_{h_1} 对照品为自制品,光谱分析鉴定为人参皂苷 R_{g_2} 、 R_{h_1} ,经 DAD 检测器检测,采用峰面积归一化法计算其纯度 > 98%。

2 色谱条件

色谱柱: Kinetex C_{18} 柱(2.6 μ L, 100 mm \times 4.6 mm);流动相: 乙腈 - 水梯度洗脱(15: 85 \rightarrow 97: 3);流速: 1.8 mL \cdot min⁻¹,检测波长: 205 nm;柱温: 30 $^{\circ}$ C;洗脱时间: 50 min;进样体积: 5 μ L。所采用的色谱条件,对黄芪及三七的混合提取液各主要成分峰实现有效分离,黄芪/三七水提醇沉液及醇提液的重叠色谱图见图 1。

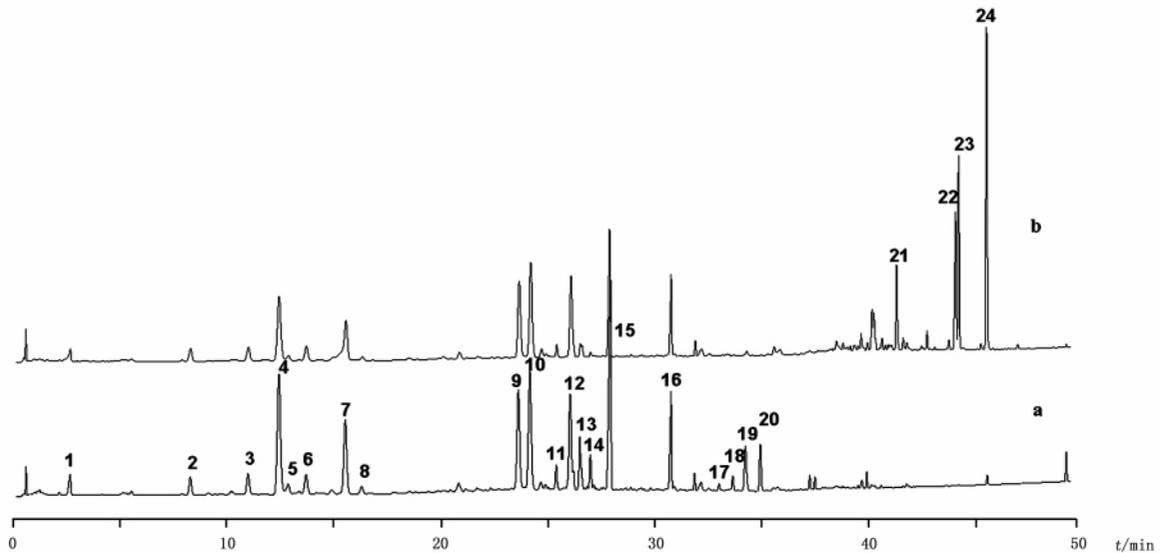


图 1 黄芪/三七水提醇沉液(a)及 80% 醇提液(b)的重叠色谱图

Fig 1 Full overlapped chromatograms at 205 nm of AR and NRR co - decoction by water extraction with alcohol precipitation(a) and by 80% alcohol extraction(b);

13. 人参皂苷 R_{h_1} (ginsenoside - R_{h_1}) 14. 人参皂苷 R_{g_2} (ginsenoside - R_{g_2}) 15. 人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside - R_{g_1})

3 样品制备

将黄芪、三七饮片适量烘干粉碎,过筛(二号筛),备用。

黄芪/三七水提醇沉液(a)供试品制备:精密称取黄芪 1.5 g 和三七 0.5 g,混和均匀,用 100 mL 纯水浸泡 40 min 后回流提取 2 h;过滤,洗涤药渣,药液合并后浓缩至 30 mL,缓慢加乙醇至 80% 并不停搅拌,置冰箱存放 24 h,过滤,用 80% 乙醇洗涤残渣,合并滤液,并定容至 25 mL。分别称取黄芪 1.5 g、三七 0.5 g,同法制得黄芪水提醇沉液、三七水提醇沉液。

黄芪/三七醇提液(b)供试品制备:精密称取黄芪 1.5 g 和三七 0.5 g,混和均匀,用 100 mL 80% 乙醇浸泡 40 min 后回流提取 2 h;过滤后回收溶剂,转移样品并定容至 25 mL;滤过,取续滤液。

分别称取黄芪 1.5 g、三七 0.5 g,同法制得黄芪醇提液、三七醇提液。

4 方法考察

4.1 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 6 次,测得人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{h_1} 和 R_{g_2} 峰面积值 RSD 分别为 1.2%、1.6%、1.3%;相对保留时间 RSD 分别为 0.12%、0.17%、0.10%。结果表明进样精密度良好。

4.2 稳定性试验 取供试品溶液于配制后 0、2、6、12、24、36 h 测定,测得人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{h_1} 和 R_{g_2} 峰面积值 RSD 分别为 1.7%、1.5%、1.2%; 相对保留时间 RSD 分别为 0.23%、0.34%、0.27%。结果表明供试品溶液在 36 h 内保持稳定。

4.3 重复性试验 精密称定供试品 6 份,照“2.2”项下方法制备供试品溶液并测定,测得人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{h_1} 和 R_{g_2} 峰面积值 RSD 分别为 2.7%、3.1%、2.4%; 相对保留时间 RSD 分别为 0.26%、0.38%、0.24%。结果表明重复性良好。

5 样品的图谱分析比较

5.1 两药配伍前后化学成分峰比较 分别比较两药配伍提取液和单药提取液化学成分变化,利用保留时间初步确定峰 13、14、17、18、19、20、21 来源于三七,峰 23 来源于黄芪,峰 22、24 为共流出峰,其中峰 22 主要来源于黄芪,峰 24 主要来源于三七。两种提取方法配伍前后均没有新成分产生,但水提醇沉法配伍液峰 13~20 较单药提取液峰面积明显增加,醇提法配伍液峰 15、16、21~24 较单药提取液峰面积明显增加。

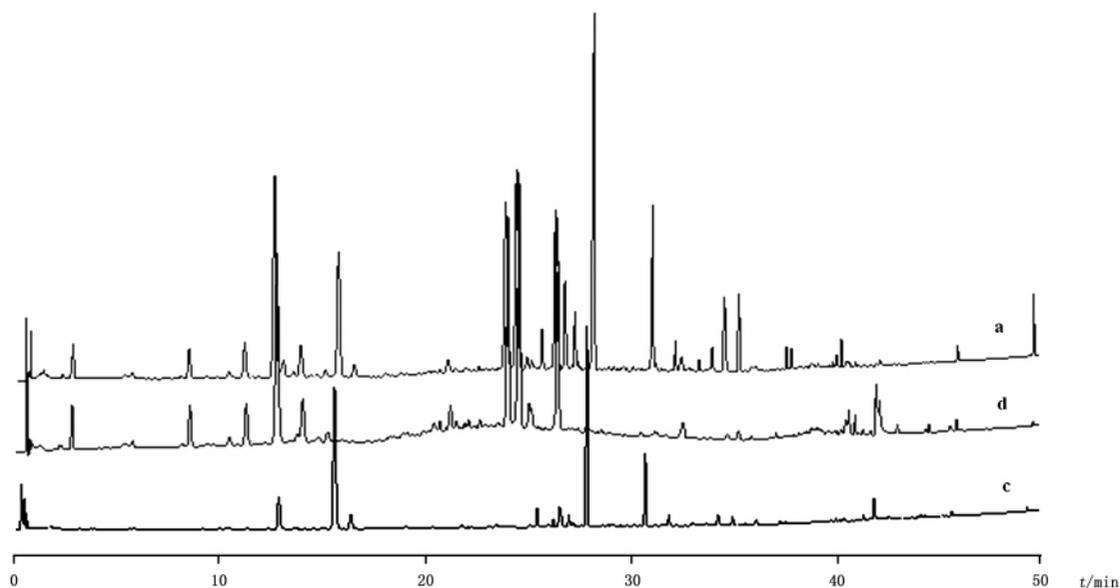


图2 黄芪水提醇沉液(d)、三七水提醇沉液(c)及黄芪/三七水提醇沉液(a)的重叠色谱图
Fig 2 Full overlapped chromatograms of NRR(c),AR(d) and their co-decoction(a) by water extraction with alcohol precipitation

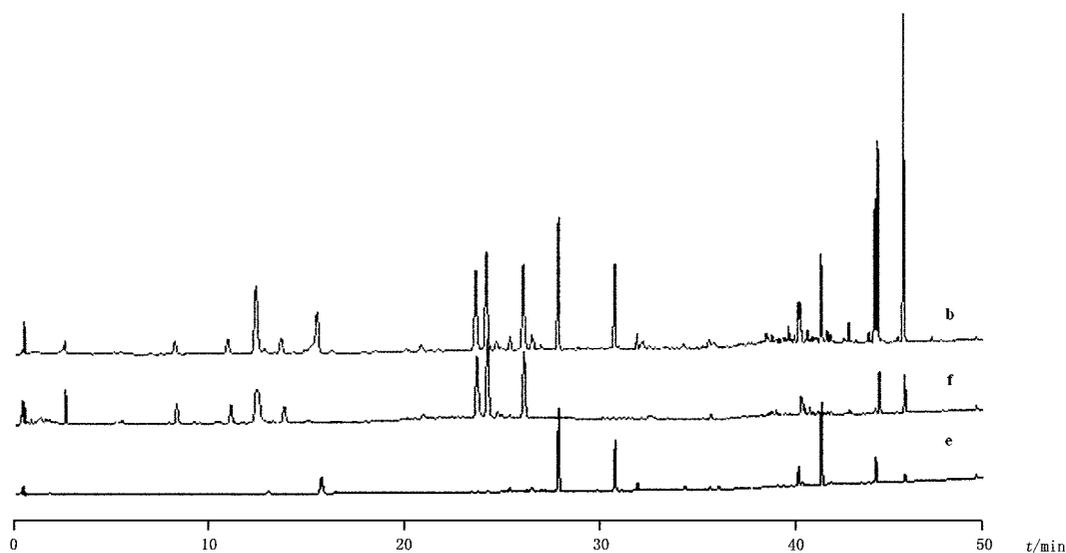


图3 黄芪醇提液(f)、三七醇提液(e)及黄芪/三七醇提液(b)的重叠色谱图
Fig 3 Full overlapped chromatograms of NRR(e),AR(f) and their co-decoction(b) by 80% alcohol extraction

5.2 配伍后 2 种提取方法化学成分峰比较

比较两药水提醇沉法和醇提法提取液的化学成分峰变化,差别比较显著的是峰 13、14、15、17~24。其中在重叠色谱图(图 1)的 20~40 min 中等极性段中,与两药的醇提液相比,水提醇沉液的峰 13、14、15 含量明显增大,峰 17、18、19、20 仅在水提醇沉液中有测出;而在 40~50 min 的低极性段中,醇提液中出现峰 21、22、23、24,在水提醇沉液中未检

出。不同提取方法成分变化主要来自于三七化学成分的区别,表明不同提取方法对三七化学成分的溶出影响较大。

2 种提取液中峰面积最大的为黄芪/三七水提醇沉液色谱图(a)中人参皂苷 R_{g1} 色谱峰(峰 15)。为便于比较,用两药提取液中各峰的峰面积除以水提醇沉液中峰 15 的峰面积,得到各峰的相对峰面积,两种提取方法的相对峰面积和峰归属见表 1。

表 1 黄芪/三七水提醇沉液(a)和醇提法提取液(b)的相对峰面积及峰信号归属
Tab 1 Confirmation of peaks in both water extraction with alcohol precipitation(a) and alcohol extraction(b) of AR and NRR

峰序号 (peak No.)	t _R /min	来源于黄芪 (from AR)	来源于三七 (from NRR)	a 液相对峰面积 (relative peak area of a)	b 液相对峰面积 (relative peak area of b)	峰面积变化 (marked change of area)
1	2.65	√		0.10	0.10	
2	8.27	√		0.09	0.10	
3	10.96	√		0.12	0.11	
4	12.41	√		0.83	0.59	↓
5	12.84		√	0.08	0.06	
6	13.68	√		0.13	0.13	
7	15.51		√	0.49	0.42	
8	16.28		√	0.06	0.04	
9	23.60	√		0.57	0.54	
10	24.14	√		0.71	0.68	
11	25.37		√	0.08	0.09	
12	26.02	√	√	0.57	0.49	↓
13	26.47		√	0.25	0.12	↓
14	26.96		√	0.12	0.03	↓
15	27.90		√	1.00	0.58	↓
16	30.74		√	0.35	0.30	
17	32.982		√	0.03	-	↓
18	33.63		√	0.06	-	↓
19	34.21		√	0.21	-	↓
20	34.91		√	0.17	-	↓
21	41.28		√	-	0.25	↑
22	44.01	√	√	-	0.38	↑
23	44.19	√		-	0.43	↑
24	45.49	√	√	-	0.66	↑

注(note):峰归属“√”(peak ascription);b 相对 a 峰面积降低↓(reduced peak);b 相对 a 峰面积升高↑(increased peak)

6 确定峰归属及质谱分析

结合色谱保留时间和紫外光谱对照,比较两药配伍提取液和单药提取液色谱图(图 2、图 3),确立了三七黄芪混合提取液中 24 个化学成分峰的归属(表 1)。其中 9 个化学成分峰来自黄芪,14 个峰来

自于三七,另有 3 个共流出峰,分别为峰 12、22、24。进一步通过质谱检测对发生变化的化学成分峰 13、14、15、17~24 进行 LC-MS 分析,根据分子离子峰及 MS/MS 裂解信号,推测其可能的化合物分子式及结构,并结合已有的对照品进行确证(质谱检测采

用相同色谱条件,出峰情况与 HPLC 谱图基本一致,图略)。

峰 13、14、15 的分子离子峰分别为 637.4302 [M - 1]⁻、783.4877 [M - 1]⁻ 和 799.4844 [M - 1]⁻ 给出其分子式分别为 C₃₆H₆₂O₉、C₄₂H₇₂O₁₃ 和 C₄₂H₇₂O₁₄ 结合文献测定数据^[4,5] 推测为人参皂苷 Rh₁、Rg₂ 和 Rg₁ 通过与对照品的保留时间和紫外光谱对照,得到进一步证实。峰 17 分子离子峰 915.5297 [M - 1]⁻, MS/MS 质谱裂解碎片中含有 782.93 [M - Ara]⁻ 及 621.32 [M - Ara - Glc]⁻ 峰 18 分子离子峰为 751.4620 [M - 1]⁻, 质谱裂解碎

片中含有 619.26 [M - 132]⁻ 与文献相关数据^[6,7] 基本一致,推测峰 17、18 分别为三七皂苷 Fe 及 T₅。

峰 19、20 的分子离子峰均为 619.4200 [M - 1]⁻ 给出其分子式为 C₃₆H₆₀O₈ 结合文献^[8] 推测两者可能为人参皂苷 Rh₄ 及其同分异构体。此外,峰 21 - 24 质谱信号杂乱,分子离子峰不明显,不能为化合物结构分析提供有用的质谱裂解信息,或所提供信息尚不能被归纳及推导。

以上数据结果表明,采用不同提取方法,对三七黄芪配伍后的人参皂苷 Rh₁、Rg₂、Rg₁、Rh₄ 及三七皂苷 Fe、T₅ 的溶出有明显的影响。

表 2 HPLC 中成分变化的色谱峰在负离子 ESI - MS 图中的质谱信号及结果分析

Tab 2 Negative electrospray ionization - mass spectra (ESI - MS) of the changed peaks in HPLC

峰序号 (peak No.)	分子离子峰及 MS/MS 裂解碎片 (molecular ion peak and MS/MS product ion) /m/z	分子离子峰理论值 (theoretical value)	分子式 (molecular formula)	可能对应的化合物名称 (possible compound)	已与对照品对照的化合物 (compared with ref. substance)
13	637.4302 [M - 1] ⁻	637.4299	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	Ginsenoside - Rh ₁	√
14	783.4877 [M - 1] ⁻	783.4875	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	Ginsenoside - Rg ₂	√
15	799.4844 [M - 1] ⁻	799.4838	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	Ginsenoside - Rg ₁	√
	636.91 [M - 162] ⁻ , 474.92 [PPT - H] ⁻				
17	915.5297 [M - 1] ⁻ , 782.93 [M - Ara] ⁻ , 621.32 [M - Ara - Glc] ⁻	915.5295	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	Notoginsenoside - Fe	
18	751.4620 [M - 1] ⁻ , 619.26 [M - 132] ⁻	751.4614	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₂	Notoginsenoside - T ₅	
19	619.4200 [M - 1] ⁻	619.4194	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	Ginsenoside - Rh ₄	
20	619.4200 [M - 1] ⁻	619.4194			
21 - 24	-		-	-	

PPT: 原人参三醇 (protopanaxatriol) (M = 476)

7 讨论

7.1 血清药理学实验结果表明^[9], 三七口服液中黄芪和三七的配伍剂量比为 3:1, 其对肾小球系膜细胞增殖的抑制作用最强。因此本文选择黄芪和三七配伍剂量比 3:1 进行研究。

7.2 醇提法提取时选择不同醇浓度进行比较, 分别用 60%、70%、80% 乙醇溶液进行提取, 所得色谱图及各化学成分峰基本一致, 仅在低极性化学成分峰的峰面积上差别较明显, 其中 80% 乙醇溶液的提取液的峰面积较大, 表明其化学成分溶出较多, 因此选用 80% 乙醇溶液进行醇提法提取。

7.3 两药配伍前后提取液未检测到新化学成分, 但配伍后提取液中一些化学成分的含量增加。而不同

提取方法下, 个别化学成分的种类及含量均存在明显差异, 且这些变化及差异主要来自于三七化学成分溶出的差别, 表明不同提取方法对三七的化学成分溶出影响比较大, 其中人参皂苷 Rh₁、Rg₂、Rg₁、Rh₄ 及三七皂苷 Fe、T₅ 的溶出有较明显的变化。

7.4 中药复方制剂传统用药多为水煎液, 而现代天然药物研究中多采用醇提法。前者有利于水溶性成分的溶出, 后者则更利于低极性成分的溶出。有效部位和活性组分的研究, 应考虑提取方法对于化学成分溶出的影响。实验表明, 不同提取方法使黄芪三七配伍的化学成分溶出的含量及种类均产生一定变化, 因此药物研发的制剂工艺研究应充分考虑提取方法的因素。此外, 目前对于该复方的药效物质

基础尚不明晰,而选择采取何种提取方法更有利于有效化学成分的溶出及药效的发挥,需要进行相应的物质基础研究及药效学实验研究。

参考文献

1 YANG Ni - zhi(杨霓芝) ,BAO Kun(包昆) ,WANG Li - xing(王立新) *et al.* Pharmacodynamic study of Tongmai oral liquid for chronic nephritis rat model with Qi - deficiency and blood - stasis syndrome (通脉口服液对慢性肾炎气虚血瘀证大鼠模型的药效学研究) . *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报) 2000 ,17 (4) : 332

2 ZHONG Dan(钟丹) ,YANG Ni - zhi(杨霓芝) ,ZHAO Dai - xin(赵代鑫) *et al.* Effects of Tongmai oral solution on cell proliferation and interleukin - 1 β production in mesangial cells(中药复方“通脉口服液”对肾小球系膜细胞增殖及分泌 IL - 1 β 的影响) . *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药) 2008 ,19(1) : 4

3 HUANG Zhao - gang(黄赵刚) ,ZHANG Guo - hua(张国华) ,LI Jun(李俊) *et al.* Simultaneous determination of 11 compounds of saponins of panax notoginseng by RP - HPLC(RP - HPLC 法测定三七中 11 种皂苷的含量) . *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) , 2006 26(9) : 1281

4 Ma XQ ,Liang XM ,Xu Q *et al.* Identification of ginsenosides in Roots of *Panax ginseng* by HPLC - APCI/MS. *Phytochem. Anal* ,2005 ,16

(3) : 181

5 Song FR ,Liu ZQ , Liu SY *et al.* Differentiation and identification of ginsenoside isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005 531 (1) : 69

6 Masayuki Y ,Toshio M ,Yousuke K *et al.* Structures of new dammarane - type triterpene saponins from the flower buds of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen and hepatoprotive effects of principal ginseng saponins. *J Nat Prod* 2003 66 (7) : 922

7 Teng RW ,Li HZ ,Wang DZ *et al.* Hydrolytic reaction of plant extracts to generate molecular diversity: new dammarane glycosides from the mild acid hydrolysate of Root Saponins of *Panax notoginseng*. *Helvetica Chimica Acta* 2004 87 (5) : 1270

8 Ho Park ,Na Young Kim ,Sang Beom Han *et al.* Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng. *Arch Pharm Res* , 2002 25 (4) : 428

9 LIU Ming - pin(刘明平) ,HUANG Zhao - sheng(黄兆胜) ,WU Qing - guang(吴庆光) *et al.* Effect on proliferation of glomerular mesangial cell by the dose compatible proportion between Radix Astragalii and Radix Notoginseng in Tongmai oral liquid(黄芪、三七不同剂量配伍对肾小球系膜细胞增殖的影响) . *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)* [西安交通大学学报(医学版)] 2009 30 (3) : 378

(本文于 2010 年 12 月 20 日收到)

《中国药材标准名录》已出版

科学出版社于 2011 年 4 月出版了由中国食品药品检定研究院林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》,该书是在国家药监局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所积极配合下,从 2004 年开始,收集整理历版药典、部颁标准、地方标准等大量资料,历时 6 年,进行了细致归纳整理,编写了权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了 4700 余种药材,涉及 530 个科,内容涵盖药材名、科名、拉丁科名、类别(动物、植物或矿物)原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等;本书科学性强、编写简明、内容实用,是企业、医院、中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价 298.00 元。

邮购联系人:温晓萍;电话:010 - 64034601 ,64019031;地址:100717 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社 温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。