

黄芪中异黄酮类成分的研究

覃红萍^{1,2}, 鲁静^{*}, 林瑞超¹, 倪坤仪³

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 广西食品药品检验所, 南宁 530021; 3. 中国药科大学基础部, 南京 210009)

摘要 目的: 利用 LC-ESI-MS/MS 技术对黄芪中毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 4 种异黄酮类成分进行确证, 并对不同产地和不同种黄芪中的这 4 种成分的相对含量进行比较。方法: Waters 2695 型高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器; Agilent G6300 系列 LC-MSD Trap 液质联用仪; Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长 260 nm; 柱温 35 °C; 色谱图记录时间为 90 min。结果: 运用 LC-ESI-MS/MS 技术, 可对同类成分进行定性分析; 不同来源的黄芪药材中 4 种异黄酮类成分的相对含量有所差异。结论: 本研究有助于加强黄芪药材的质量控制, 通过 4 种成分的相对含量的比较, 可以初步区别黄芪与其他相关样品。

关键词: HPLC-ESI-MS/MS 异黄酮; 黄芪

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0746-06

Study on isoflavonoids in Radix Astragali

QIN Hong-ping^{1,2}, LU Jing^{*}, LIN Rui-chao¹, NIKun-yi³

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China; 3. China Pharmaceutical University, School of Basic Sciences, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective To corroborate the structures of the four isoflavonoids (calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside, calycosin and formononetin) in Radix Astragali by LC-MS/MS method and compare their relative contents in Radix Astragali from different sources. **Methods** HPLC-DAD analysis was performed with a Waters 2695 high performance liquid chromatogram, equipped with a Waters 2996 diode array detector. LC-MS/MS analysis was performed with an Agilent G6300 series LC-MSD Trap. The separation was carried out by using an Alltima C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of acetonitrile-water solution, which column temperature, flow rate and detector wavelength were set at 35 °C, 0.8 mL·min⁻¹ and 260 nm. The analytes were eluted within 90 min. **Results** The LC-MS/MS technique could be applied to the qualitative analysis of the chemical component in the same type. There was difference in the content of four isoflavonoids from Radix Astragali of different sources. **Conclusion** The developed method here is useful to control the quality of Radix Astragali and distinguish Radix Astragali from the other samples by the simultaneously qualitative analysis of the four isoflavonoids.

Key words HPLC-ESI-MS/MS; isoflavonoid; Radix Astragali

黄芪为常用传统中药之一, 药用历史悠久, 临床应用十分广泛, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌的作用。中国药典 2005 年版一部规定黄芪来源于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var *mongolicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。我国

各地方中药材标准收载的黄芪药材有 7 种, 分别为东俄洛黄芪 *A. tongolensis* Ubr., 多花黄芪 *A. floridus* Benth., 金翼黄芪 *A. chrysoptenus* Bge., 马河山黄芪 *A. mahoschanicus* Hand.-Mazz., 青海黄芪 *A. tanguticus* Bat., 梭果黄芪 *A. ernestii* Camb., 直立黄芪 *A. adsurgens* Pall. 黄芪的化学成分种类繁多, 主要有黄

* 通讯作者 Tel: (010) 67095313 E-mail: lujing5512@yahoo.com.cn

酮类、皂苷类和多糖类^[1], 以及多种氨基酸和微量元素等^[2~4]。药理学研究表明异黄酮是黄芪的有效成分之一, 具有抗病毒、降血脂、抗氧化等作用^[5]。本文利用 LC-ESI-MS/MS 技术对黄芪药材中的异黄酮类成分进行了分析、鉴定, 确证了毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 4 种异黄酮类成分, 比较了其在不同产地和不同种黄芪药材中的相对含量。

1 仪器、试样和试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, Millennium³² 色谱工作站; Agilent G6300 系列 LC-MSD Trap 液质联用仪, ChemStation 色谱工作站; MILLI-Q 纯水发生器; KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器。

试验用药材样品经中国药品生物制品检定所中药室张继副主任药师鉴定, 分别为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch) Bge var *mongholicus* (Bge) Hsiao, 膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch) Bge、梭果黄芪 *A. enesi* Camb 和红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz, 对照品毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷 (HPLC 归一化法试验, 纯度 $\geq 98\%$) 由北京大学中医药现代研究中心屠鹏飞教授惠赠, 芒柄花素由中国药品生物制品检定所提供 (批号: 111703-200501, 供含量测定用)。

乙腈为色谱纯试剂, 水为超纯水。

2 试验条件

2.1 色谱条件 采用 Alltima C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱 (乙腈-水比例: 0~60 min 10:90 $\rightarrow$ 40:60 60~65 min, 40:60 $\rightarrow$ 50:50 65~90 min, 50:50 $\rightarrow$ 100:0), 预平衡时间为 10 min, 流速 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 260 nm, 进样量 10 μ L, 色谱图记录时间为 90 min。

2.2 质谱条件 ESI 源, 正离子模式检测, 干燥气为氮气, 干燥气流速: 9.0 L $\cdot$ min⁻¹, 干燥气温度: 300 $^{\circ}$ C, 扫描范围: m/z 100~1000。

3 溶液制备

3.1 对照品溶液 分别精密称取对照品毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷和芒柄花素适量, 分别加甲醇溶解制成每 1 mL 含 20 μ g 的溶液, 摇匀, 即得。

3.2 供试品溶液 取黄芪药材粉末 (过 2 号筛) 2 g 精密称定, 加入甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 (功率 560 W, 频率 45 kHz) 30 min, 放冷至室温, 称重, 用

甲醇补足减失的重量, 过滤, 滤渣用适量甲醇洗涤, 合并滤液, 蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次 (20 10, 10 mL), 合并正丁醇提取液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

4 主要色谱峰的结构确证

4.1 主要色谱峰的紫外吸收光谱鉴别 采用 260 nm 检测的色谱 (图 1-A) 中, 不同产地黄芪药材的供试品溶液色谱中主要显示有 4 个色谱峰, 其中峰 1 和峰 4 的保留时间、紫外吸收光谱及 HPLC/MS 分子离子峰分别与毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷和芒柄花素对照品的一致, 峰 1 至峰 4 的 DAD 紫外吸收图谱 (200~400 nm) 见图 1-B。4 个色谱峰具有相似的紫外吸收光谱, 即由异黄酮的 A-环苯甲酰结构形成的主吸收峰分别在 257 和 248 nm; 由于 B-环与吡喃环上的羟基共轭较弱, 而使在主吸收峰的长波方向 286 和 302 nm 处分别显示一较弱的肩峰^[6], 为典型的异黄酮类化合物的紫外吸收光谱。因此, 可以由紫外光谱初步判断色谱峰 2 和峰 3 可能为异黄酮类成分。

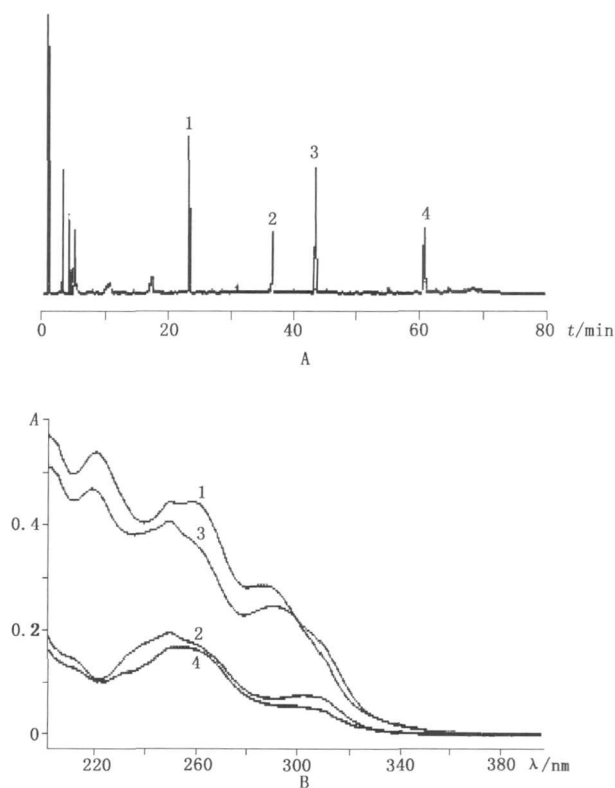


图 1 黄芪药材 (1 号样品) 的 HPLC 色谱图 (A) 及 HPLC 色谱图中峰 1~4 的紫外吸收光谱 (B)

Fig 1 HPLC chromatogram of Radix Astragali (No. 1 sample) (A) and UV absorption spectrum of peaks 1-4 (B)

4.2 色谱峰 2 的质谱分析 色谱峰 2 的一级质谱显示准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 431, 主要碎片峰 m/z 269 $[M - Glu + 1]^+$ 。以 m/z 431 $[M + H]^+$ 为母离子的二级质谱, 显示 m/z 269 离子, 为由 $[M + H]^+$ 丢失 1 个六碳糖基的碎片离子, 即 $[M + H - 162]^+$, 见图 2-A; 以 m/z 269 为母离子的三级质谱分析, 可观察到产生的碎片离子 m/z 254, 237, 213 等, 提示分别丢失了 $-CH_3$ (m/z 15), $-CH_3OH$ (m/z

z 32), $2CO$ (m/z 56), 图 2-B。同时, 对芒柄花素 (m/z 268) 对照品 MSMS 分析得到的 m/z 254, 237, 213 等碎片离子 (见图 2-C) 比较, 色谱峰 2 除失去 1 个六碳糖基后的 m/z 269 碎片离子外, 其他碎片离子与芒柄花素对照品的相同, 进一步证明了色谱峰 2 裂解特征与芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷的结构相符。

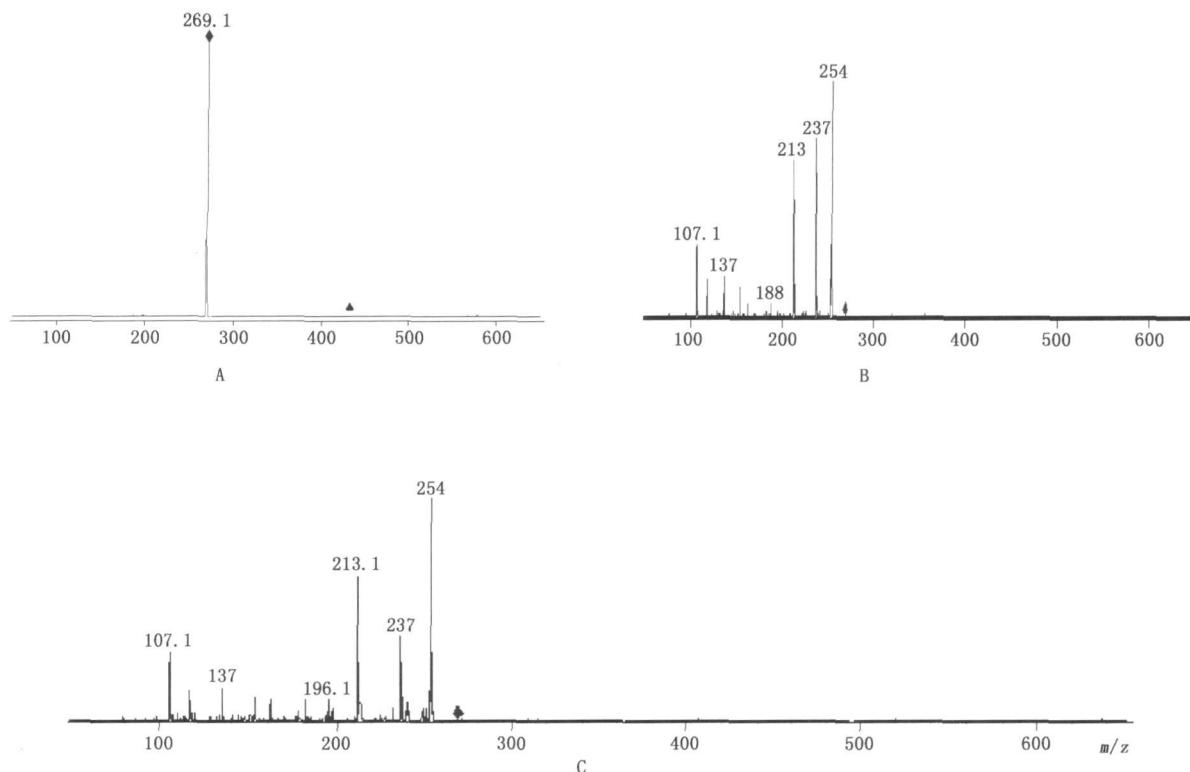


图 2 色谱峰 2 的二级 MS 图 (A)、三级 MS 图 (B) 及芒柄花素对照品的二级 MS 图 (C)

Fig 2 MS^2 (A), MS^3 (B) spectra of peak 2 and MS^2 spectrum of formononetin (C)

4.3 色谱峰 3 的质谱分析 色谱峰 3 的一级质谱显示准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 285, 二级质谱显示 m/z 270 离子, 为由 $[M + H]^+$ 母离子丢失 1 分子 $-CH_3$ 的碎片离子; m/z 253, 225, 136 等碎片离子, 提示 $[M + H]^+$ 离子分别丢失了 $-CH_3OH$ (m/z 32), 继而丢失了 CO (m/z 28); 由 m/z 270 中吡喃环发生 RDA 裂解掉 m/z 133 而得的 m/z 136 碎片离子 (见图 3-A); 以 m/z 270 为母离子的三级质谱, 产生了 m/z 253, 214, 137 等碎片离子, 分别为丢失了 $-OH$ (m/z 17), $2CO$ (m/z 56) 和由吡喃环发生 RDA 裂解失去 m/z 133 而得的碎片离子 (见图 3-B)。同时, 对毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷 (m/z 446) 对照品的 MSMS 分析显示, 失去葡萄糖 (m/z 162) 后得到的碎片离子 m/z 285 的碎片离子 m/z

270, 253, 225, 137 等与色谱峰 3 的二级质谱相同 (见图 3-C), 更进一步证明了色谱峰 3 裂解特征与毛蕊异黄酮的结构相符。

色谱峰 2 和色谱峰 3 可能的裂解途径如图 4 所示。

5 黄芪药材中 4 种异黄酮类成分的相对含量的比较

对不同种及相同种不同产地的黄芪药材的 HPLC 色谱 (见图 5) 系统考察显示, 大部分黄芪药材均含有毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷, 且较稳定, 故选择毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷为参照物, 采用峰面积比较, 计算其余 3 种成分 (芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素) 的相对含量。结果见表 1。

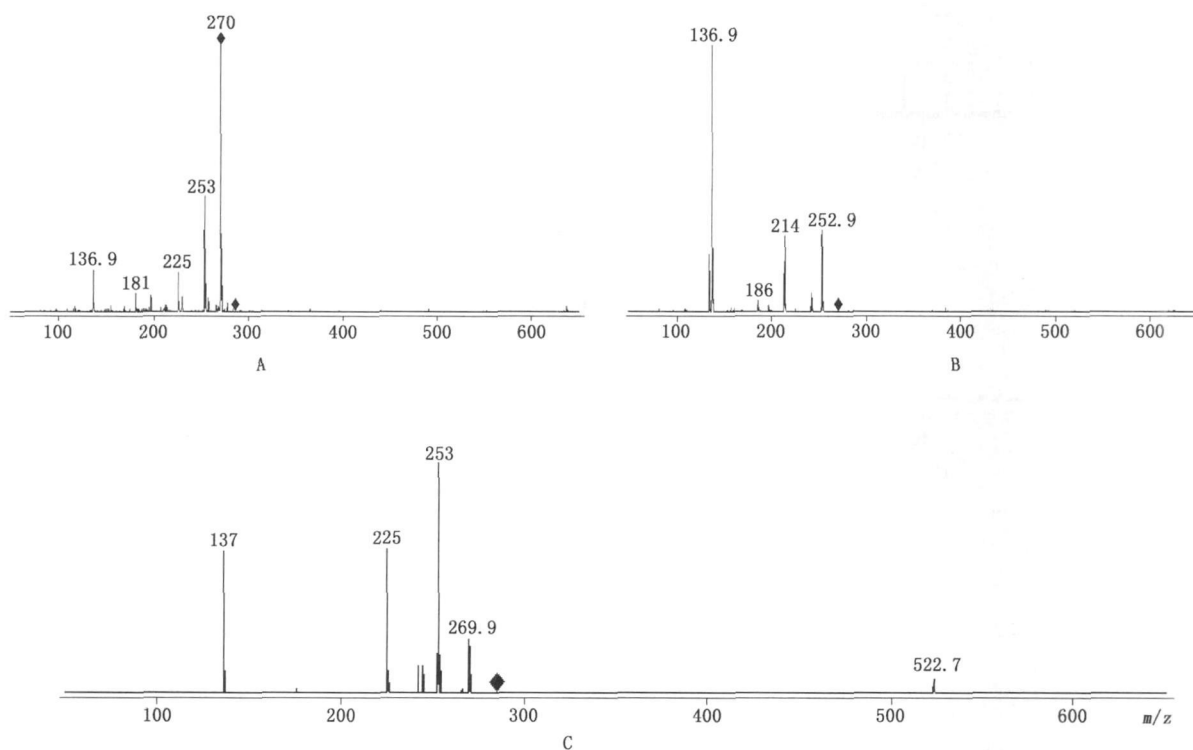


图3 色谱峰3的二级 MS 图(A)、三级 MS 图(B)及毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品的三级 MS 图(C)

Fig 3 MS² (A), MS³ (B) spectra of peak 3 and MS³ spectrum of calycosin-7-O-β-D-glucoside (C)

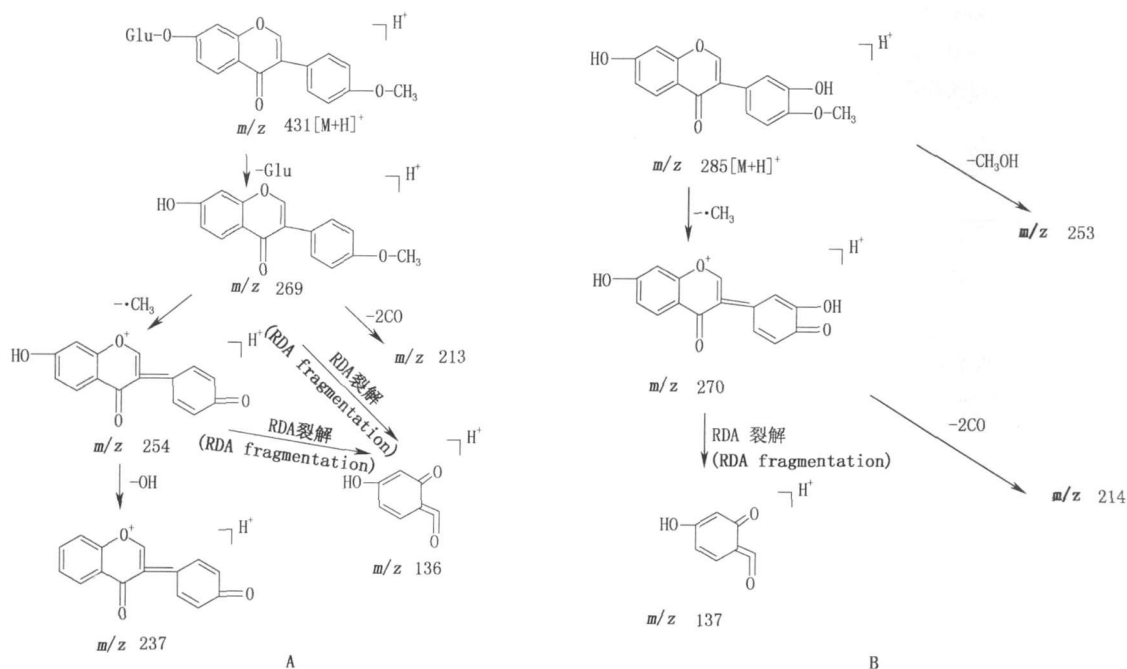


图4 色谱峰2(A)、色谱峰3(B)裂解规律

Fig 4 Fragmentation law of peak 2 (A) and peak 3 (B)

6 讨论

6.1 本实验分别考察了不同的提取溶剂如 95% 乙醇、50% 乙醇、甲醇、50% 甲醇和不同的提取方法如

超声、热回流、索氏提取,在考察了提取时间、溶剂用量、提取次数和药材粒度对提取效率的影响后,最终确定了供试品溶液制备方法。

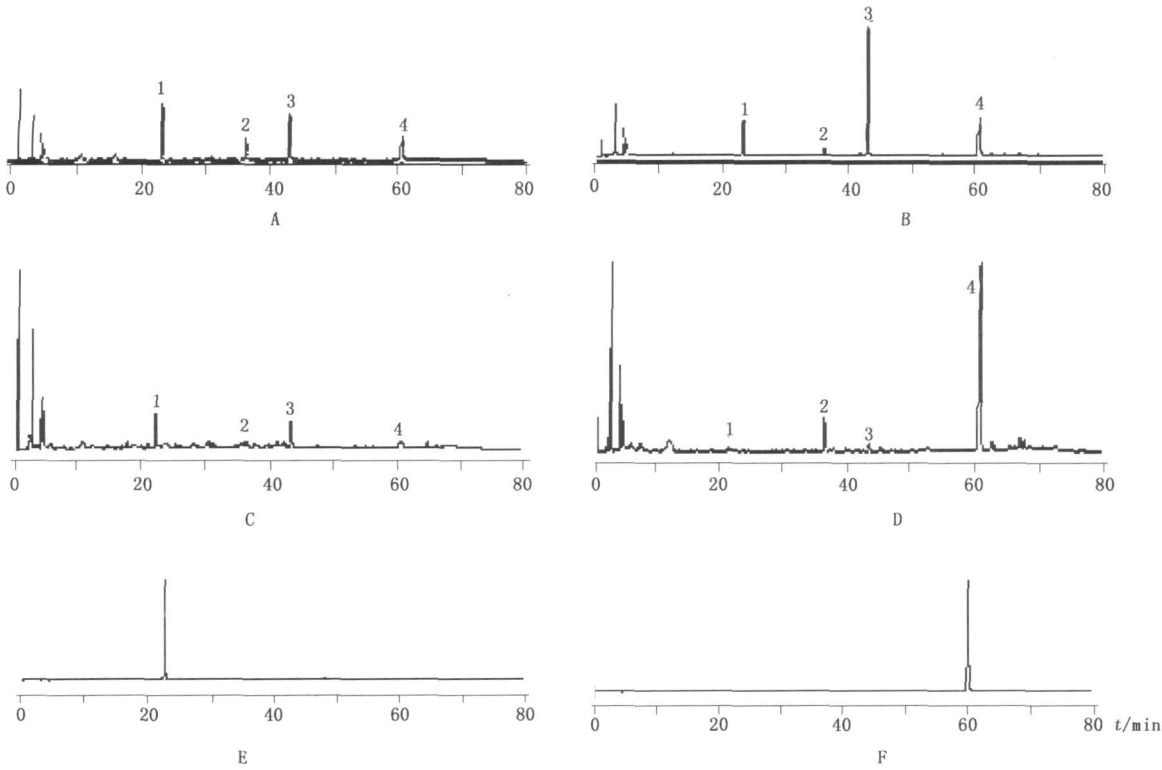


图 5 不同黄芪药材异黄酮类成分的 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of isoflavonoids from different sources

A. 蒙古黄芪 [*A. membranaceus* (Fisch) Bge. var *mongholicus* (Bge.) Hsiao] B. 膜荚黄芪 [*A. membranaceus* (Fisch) Bge.] C. 梭果黄芪 (*A. emestii* Camb) D. 红芪 (*Hedysarum polybotrys* Hand. - Mazz) E. 毛蕊异黄酮 - 7- *O* - β - *D* - 葡萄糖苷对照品 (calycosin- 7- *O* - β - *D* - glucoside reference substance) F. 芒柄花素对照品 (formononetin reference substance)
1 毛蕊异黄酮 - 7- *O* - β - *D* - 葡萄糖苷 (calycosin- 7- *O* - β - *D* - glucoside) 2 芒柄花素 - 7- *O* - β - *D* - 葡萄糖苷 (formononetin- 7- *O* - β - *D* - glucoside) 3 毛蕊异黄酮 (calycosin) 4 芒柄花素 (formononetin)

表 1 不同黄芪药材中异黄酮类成分相对含量 (%, *n* = 2)
Tab 1 The relative content of isoflavone in different Astragalus

编号 (No)	药材品种 (species of sample)	来源 (source)	芒柄花素 - 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> - 葡萄糖苷 (formononetin- 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucoside)	毛蕊异黄酮 (calycosin)	芒柄花素 (formononetin)
1	蒙古黄芪 (泡茶料) [<i>A. membranaceus</i> (Fisch) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao] (for make tea)	山西浑源 (Hunyuan Shanxi)	0. 36	0. 83	0. 47
2	蒙古黄芪 (礼品芪) [<i>A. membranaceus</i> (Fisch) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao] (for gift)	山西浑源 (Hunyuan Shanxi)	0. 50	0. 72	0. 45
3	蒙古黄芪 (极品芪) [<i>A. membranaceus</i> (Fisch) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao] (the highest grade)	山西浑源 (Hunyuan Shanxi)	0. 47	1. 14	0. 74
4	蒙古黄芪 [<i>A. membranaceus</i> (Fisch.) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao]	黑龙江 (Heilongjiang)	0. 41	0. 89	0. 50
5	蒙古黄芪 [<i>A. membranaceus</i> (Fisch.) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao]	内蒙古 (Nei Mongol)	0. 24	1. 91	0. 74
6	蒙古黄芪 [<i>A. membranaceus</i> (Fisch.) Bge. var <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao]	北京同仁堂 (Beijing Tongrentang's)	0. 39	2. 36	1. 38

续表 1

编号 (No)	药材品种 (species of sample)	来源 (resource)	芒柄花素- 7- O - β - D - 葡萄糖苷 (fom ononetin- 7- O - β - D - glucoside)	毛蕊异黄酮 (calycosin)	芒柄花素 (fom ononetin)
7	蒙古黄芪(野生) [A. membranaceus(Fisch) Bge. var mongholicus(Bge.)H siao] (w ikl)	河北张家口 (Zhangjiakou Hebei)	0. 28	0. 28	—
8	膜荚黄芪 [A. membranaceus(Fisch) Bge]	中国药品生物制品检定所 (Na- tional Institute for the Control of Phar- maceutical and Biological Products)	0. 13	2. 18	2. 26
9	膜荚黄芪 [A. membranaceus(Fisch) Bge]	日本栽培 (cultivanted in Japan)	0. 24	4. 94	0. 19
10	膜荚黄芪 [A. membranaceus(Fisch) Bge]	山西大同 (Datong, Shanxi)	0. 41	5. 83	2. 64
11	膜荚黄芪 [A. membranaceus(Fisch) Bge]	黑龙江哈尔滨 (Harbin Hei- longjiang)	0. 90	2. 89	1. 76
12	梭果黄芪 (A. ernestii Camb)	成都莲花池 (Lianhuachi Chengdu)	—	1. 40	—
13	梭果黄芪 (A. ernestii Camb)	成都药市 (Herbal medicine mar- ket in Chengdu)	0. 25	1. 27	0. 51
14	梭果黄芪 (野生) (A. ernestii Camb) (w ikl)	四川甘孜康定 (Ganzi Kangding Sichuan)	0. 72	0. 65	0. 49
15	红芪 (Hedysarum polybotrys Hand. - Mazz)	四川成都 (Chengdu, Sichuan)	24. 26	7. 83	116. 73
16	红芪 (Hedysarum polybotrys Hand. - Mazz)	四川成都 (Chengdu, Sichuan)	79. 23	18. 54	307. 15
17	红芪 (Hedysarum polybotrys Hand. - Mazz)	广西玉林 (Yulin Guangxi)	—	—	—
18	红芪 (Hedysarum polybotrys Hand. - Mazz)	黑龙江哈尔滨 (Harbin Hei- longjiang)	—	—	—

注 (note): 参照物为毛蕊异黄酮- 7- O - β - D - 葡萄糖苷 (The reference substance is calycosin- 7- O - β - D - glucoside); “—”表示未检出 (‘—’ indicates not de-
tected)

6.2 通过对色谱柱的选择、流动相及洗脱方式的优化、检测波长的选择、参照物的选择、测定方法及方法学考察、离子源及干燥气流速等条件的考察后, 确定了本文的色谱及质谱条件。

6.3 利用 LC-DAD-ESIMS/MS 法, 对黄芪药材中的 2 个异黄酮类成分进行了结构推断和归属。通过对 2 个色谱峰 (色谱峰 2 和色谱峰 3) 的一级质谱和二级质谱分析, 推断出分别为芒柄花素- 7- O - β - D - 葡萄糖苷和毛蕊异黄酮。实验表明, 运用 LC-M S M S 技术, 可对同类成分进行定性分析, 增加对特征峰的认知程度, 可快速进行中药相关成分的系统分析。

6.4 从表 1 中可以看出, 蒙古黄芪、膜荚黄芪和梭果黄芪中的异黄酮类成分均以毛蕊异黄酮及其葡萄糖苷为主, 芒柄花素及其葡萄糖苷含量相对较低; 而红芪则相反。由此 4 种成分 (毛蕊异黄酮及其葡萄糖苷与芒柄花素及其葡萄糖苷) 的相对含量可以区别黄芪与红芪药材。

6.5 梭果黄芪和蒙古黄芪的野生品中 4 个成分 (毛蕊异黄酮及其葡萄糖苷与芒柄花素及其葡萄糖苷) 含量均低于其栽培品, 甚至检不出某些成分, 说明野生品与栽培品之间存在一定的差别。野生的梭果黄芪和野生的蒙古黄芪的相似度均低于其栽培品, 进一步说明了野生品与栽培品之间的化学成分可能存在较大

的差别, 因收集到的样品数较少, 需要进一步的研究。

参考文献

1 DUAN Ya- li(段亚丽), XIE Mei- dong(谢梅冬). Studies on the chemical components of Astragalus membranaceus and the method of determining effective constituent—astragaloside IV (黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状). Chin J Vet Drug (中国兽药杂志), 2005, 39(3): 35

2 TIAN Hong- yin(田宏印). A review on the studies of chemical constituents of Astragalus (黄芪化学研究及其有效成分). J Yunnan Inst Natl (Nat Sci Ed) (云南民族学院报 自然科学版), 1996, 5 (1): 75

3 Hilino H, Takahashi M, Oshina Y, et al. Hypotensive principle of Astragalus and Hedysarum root. Plant Med, 1976, 30: 297

4 YUN Qin- chuan(云秦川). Progress of pharmacological study of Astragalus (中药黄芪的药理研究进展). Nei Mongol J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2004, 6: 33

5 ZHANG Xi(张曦), SUN Yan- guo(孙衍国), ZHANG Feng(张峰), et al. Analysis of isoflavonoid glycosides from A. mongholicus by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry(中药黄芪药材中异黄酮类色谱峰的高效液相色谱-串联质谱分析). Fine Chem (精细化工), 2005, 22 (12): 898

6 Abbjasova LE, Tuzov DG. Method of synthesis of 4-aminobutyric acid. RU: 2202538, 2003-04-20

(本文于 2008 年 12 月 9 日修改回)