

HPLC-MS 鉴定黄芪水煎液中黄酮类成分

谭雪霞¹, 朱宏明¹, 唐 铖^{2*}, 王 雪^{2*}

1. 天津医科大学中新生态城医院 药剂科, 天津 300467

2. 天津医科大学 药学院, 天津 300070

摘要: 目的 建立黄芪水煎液中黄酮类成分 HPLC-MS 鉴定方法。方法 黄芪水煎液采用 C₁₈ 固相萃取小柱获得黄酮类化学成分。采用 HPLC-DAD-MS 的方法对黄芪水煎液中黄酮类成分进行了定性研究, 对比所建立化合物库的化学成分与实测的化学成分质荷比信息以及化合物的裂解规律确定各化学成分。结果 液相色谱质谱联用技术可对黄芪水煎液所含黄酮类成分进行快速鉴别。根据相对分子质量信息确定了黄芪水煎液所含 22 个黄酮类化学成分的结构信息。结论 高效液相-质谱联用技术可快速对黄芪水煎液所含黄酮类成分进行表征, 为其药效物质基础研究提供新思路。

关键词: 黄芪水煎液; 黄酮; 高效液相色谱-质谱联用; 鉴定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)02-0231-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.02.004

HPLC-MS identification on flavonoids in *Astragali Radix* decoction

TAN Xue-xia¹, ZHU Hong-ming¹, TANG Cheng², WANG Xue²

1. Department of Pharmacy, Sino-Singapore Eco-city Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300467, China

2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish an identification method for flavonoid chemical constituents in *Astragali Radix* decoction by HPLC-MS. **Methods** The samples were prepared by SPE C₁₈ column. HPLC-DAD-MS method was used to identify the flavonoids in *Astragali Radix* decoction. The chemical constituents of the library were compared with the measured mass charge ratio of chemical composition in *Astragali Radix* decoction, and the chemical constituents was determined by the pyrolysis law of the compounds. **Results** HPLC-MS provided high analysis efficiency of chemical components in *Astragali Radix* decoction. Based on the mass information and MS fragmentation behaviors of the chemical components, 22 compounds in *Astragali Radix* decoction were identified. **Conclusion** HPLC-MS technology can quickly characterize the flavonoids in *Astragali Radix* decoction, and provide a new idea for the study of its pharmacodynamic material basis

Key words: *Astragali Radix* decoction; flavonoids; HPLC-MS; identification

黄芪为豆科蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fish) Bunge var. *Mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有益气、固表、托毒生肌、利水退肿的功效, 为历代医家最常用的中药之一。黄芪之所以能够发挥药效与其所含的化学成分是密不可分的。在以往的研究中, 人们对其所含的黄芪甲苷等三萜苷类化学成分研究较多。近年的研究表明黄芪所含的黄酮类成分也具有较强烈的生物活性^[1]。然而黄酮类化合物在黄

芪中的含量相对较低, 采用传统先分离再鉴定化合物结构的方法来研究这类化合物的困难较大, 对于含黄芪的复方中药的化学成分研究更是如此。近年来, 人们逐渐将高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS) 应用于分析、鉴定黄芪中化学成分收到了较好的效果^[2-3]。但这些研究均以黄芪醇提液为研究目标, 而中医临床用药常以水煎煮汤剂为主要治疗手段。不同极性的提取溶液中所含的化学成分不完全相同, 这一点已引起学者们的重视^[4], 2016

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (18JCYBJC95100)

作者简介: 谭雪霞 (1984—), 女, 河南郸城人, 主管药师, 医学硕士, 从事临床药理学和药物分析研究。E-mail: xuexia1984@163.com

*通信作者: 唐 铖, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: tangcheng@tmu.edu.cn

王 雪, 博士, 实验师, 从事中药化学成分及药理活性研究。E-mail: wangxue@tmu.edu.cn

年国家药典委员会也要求进一步重视“经典名方”（大都是以水煎剂的形式为历代医家收载）的研究，并提出了标准煎剂的概念。黄芪作为“补气圣药”是中医临床应用较多的中药之一，在经典方剂中又多以“君药”的形式呈现，深入研究黄芪水煎液中化学成分分析方法是十分必需的。故本研究通过 HPLC-MS 联用技术并结合固相萃取技术对黄芪水煎液中化学成分进行研究，建立一种快速鉴定黄芪水煎液所含黄酮类成分的分析方法。

1 仪器与试剂

1.1 材料

乙腈、甲醇（色谱纯，百灵威公司）；水为超纯水，其他试剂均为国产分析纯。黄芪药材购自安国药材市场，经天津医科大学药学院唐铎副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fish) Bunge var. *Mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根。

1.2 仪器

高效液相色谱（Agilent 1200）-质谱（Bruker HCT）联用仪；BSA124S 型十万分之一电子天平（赛多利斯股份公司）；循环水式真空泵（上海翔雅仪器设备有限公司）；旋转蒸发器（上海申生科技有限公司）；KQ-200VED 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

取适量黄芪药材，粉碎，过 30 目筛，精密称取 2 g 粉末加入水 50 mL，煎煮 2 h，冷却至室温，即得。取 1 mL 水煎液加入 C₁₈ 固相萃取小柱，依次加入 5 mL 水、15 mL 50% 甲醇洗脱。收集 50% 甲醇洗脱部分，浓缩至 200 μ L，即得水煎液样品溶液，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 化学成分库的建立

采用 Scencedirect、Springer、Pubmed、CNKI 等数据库检索黄芪化学成分研究的文献，收集黄芪所含的化学成分名称、相对分子质量信息共 66 个。采用 Chemicaldraw13.0 软件根据各个化学成分碳、氢、氧的个数计算化合物的相对分子质量，建立了包括化合物名称、分子式、[M+H]⁺、[M+Na]⁺、[M-H]⁻、[M-H+HCOOH]⁻ 等常见分子离子峰相应化学成分数据库。

2.3 定性分析

采用 HPLC-DAD-MS 法对黄芪水煎液中黄酮类成分进行定性研究。经过优化，确定了适用于分

析黄芪水煎液中化学成分的最佳色谱条件。在此色谱条件下，所有色谱峰均能够实现较为完全的分离（图 1），通过进一步对质谱数据进行归属，对化学成分进行指认（图 2）。

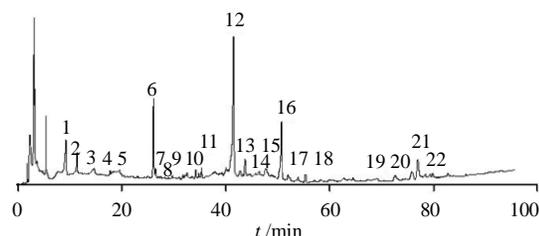


图 1 黄芪水煎液的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV chromatogram of *Astragali Radix* decoction

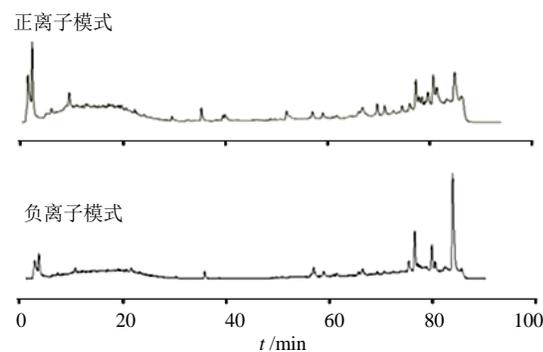


图 2 黄芪水煎液的总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of *Astragali Radix* decoction

色谱条件：Agilent XDB C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μ m）；流动相 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B）梯度洗脱（0~10 min，85%~80% A；10~30 min，80%~70% A；30~60 min，70%~30% A；60~90 min，30%~10% A；90~95 min，10%~0% A）；检测波长：247 nm；柱温：30 $^{\circ}$ C；体积流量：0.8 mL/min。

质谱参数：ESI 源，正、负离子交替模式，雾化气为高纯氮气。毛细管电压 3 500 V，干燥气温度 300 $^{\circ}$ C，干燥气流量 8 mL/min，雾化气压力 172 kPa（25 psi），碎片电压 180 V，扫描范围 m/z 200~1 000。

2.4 鉴别结果

综合考虑各个色谱峰的质谱信号、紫外吸收特征确定了黄芪水煎液中黄酮类化学成分的组成。从结果上看，黄芪水煎液中所含黄酮类成分在正、负离子条件下均有响应。其中正离子信号主要由[M+H]⁺、[M+Na]⁺组成，负离子信号主要由[M-H]⁻、

[M+HCOO]⁻、[2M-H]⁻组成。

在黄酮类成分的二级质谱中常裂解获得的碎片主要为 (*m/z* 162) 葡萄糖基。因黄酮结构中存在 2-苯基色原酮结构, 故在多级质谱裂解碎片中也可

检出因 RDA 裂解产生的碎片。总之通过对比所建立化合物库的化学成分与实测的化学成分质荷比信息以及化合物的裂解规律共确定了 22 个化学成分, 见表 1。

表 1 黄芪水煎液 HPLC-MS 质谱数据
Table 1 MS data of *Astragali Radix* decoction

序号	<i>m/z</i>	化合物名称	相对分子质量	分子式	裂解方式
1	491.5	毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[5]	446.4	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻
2	463.2	红车轴草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[6]	462.4	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺
3	477.3	3'-羟基-6,4'-二甲氧基异黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[5]	476.4	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	[M+H] ⁺
4	421.3	芒果苷 ^[7]	422.3	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻
5	483.3	6,4'-二甲氧基异黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[3]	460.4	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	[M+Na] ⁺
6	449.3	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[8]	448.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺
	447.5				[M-H] ⁻
7	279.4	甘草素 ^[8]	256.3	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+Na] ⁺
8	477.6	染料木苷 ^[9]	432.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻
9	453.3	芒柄花苷 ^[5]	430.4	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+Na] ⁺
10	461.5	9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[5]	462.4	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	[M-H] ⁻
11	463.5	2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[5]	464.5	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻
12	285.5	毛蕊异黄酮 ^[8]	284.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺
	283.5				
13	253.5	7,4'-二羟基异黄酮 ^[10]	254.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻
14	303.5	槲皮素 ^[8]	302.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺
15	539.3	染料木素 ^[8]	270.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[2M-H] ⁻
16	267.5	芒柄花素 ^[5]	268.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻
17	241.5	3-羟基二氢黄酮 ^[7]	240.3	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	[M+H] ⁺
18	301.6	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮 ^[5]	302.3	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	[M-H] ⁻
19	313.5	熊竹素 ^[11]	314.3	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻
20	285.5	汉黄芩素 ^[11]	284.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻
	283.5				
21	285.5	千层纸素 A ^[12]	284.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻
	283.5				
22	339.5	异鼠李素 ^[11]	316.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+Na] ⁺

以化合物 6 说明解析过程, 色谱峰 6 的[M+H]⁺峰 *m/z* 449.3 以及[M-H]⁻峰 *m/z* 447.5。其二级质谱有[M+H-162]⁺信号, 推测该化合物与一分子己糖成苷。通过与所建立的化合物库中的数据比对确定该化合物为山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷。同法推断化合物 4、8、9、10 分别为芒果苷、染料木苷、芒柄花苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*-葡萄糖苷。

毛蕊异黄酮、汉黄芩素和千层纸素 A 互为同分

异构体, 相对分子质量均为 284.3, 在正、负离子模式下提取[M+H]⁺ *m/z* 285.5; [M-H]⁻ *m/z* 283.5, 得到了化合物 12、20、21 的色谱峰。毛蕊异黄酮属于异黄酮类, 汉黄芩素和千层纸素属于黄酮类, 根据化合物的结构判断, 异黄酮类结构中 B 环由于受吡喃酮环羰基的立体障碍, 分子的平面性降低, 极性增加。故推断化合物 12 为毛蕊异黄酮。根据文献报道^[13-14]汉黄芩素相比千层纸素更容易

被分离, 故推断化合物 20 为汉黄芩素, 化合物 21 为千层纸素 A。

3 讨论

黄芪甲苷等化学成分通常被用于黄芪的质量控制研究, 但黄芪所含黄酮类化学成分的生物活性正在为人们所重视。该类化学成分具有降血糖、抗凋亡、抗氧化、抗肿瘤、抗炎等活性^[15-16]。与传统的乙醇提取法得到黄芪的化学成分相比较, 采用水煎液中所含毛蕊异黄酮苷等水溶性黄酮类化学成分较多。

黄酮是一类以 2-苯基色原酮为基本母核的化合物, 在母核中多个位置存在羟基, 且羟基又可与糖形成苷, 使得黄芪水提取液中含有多种黄酮及其苷类成分的同分异构体。对于同分异构体的判断, 本研究通过分析化合物结构与化合物的极性之间的关系以及二次裂解碎片来确定。在质谱信号中检出了除黄芪中常见的毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素外, 还检测到了 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-葡萄糖苷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮、7,4'-二羟基异黄酮等黄酮类化学成分。这些化学成分在水煎液发挥药效时必将起主导作用。更为重要的是中药水煎剂是传统中医临床用药的主流, 水煎煮更接近服用药物的真实情况。作为临床治疗常用中药之一的黄芪在黄芪桂枝五物汤、黄芪建中汤、补阳还五汤等经典名方中均作为君药, 且这些经典方剂均以水煎剂的形式应用于临床^[17]。研究黄芪水煎液中的黄酮类化学成分对于该类方剂的研究也是较为有益的。

研究表明黄芪水煎液中含有大量的糖类物质, 该类物质无论对于色谱分离还是对于质谱鉴定都有一定的影响。传统的方法是采用正丁醇萃取水煎液中的化学成分或大孔吸附树脂进行纯化, 但由于正丁醇的沸点较高, 浓缩时间相对较长; 而采用大孔吸附树脂的操作平行性相对较低。固相萃取 (SPE) 技术是近年新兴的一种用于萃取、分离、浓缩新技术^[18]。本研究采用了 C₁₈ 固相萃取柱对样品进行预处理, 收到了较好的效果。通过对比水, 10%、20%、50%、90% 甲醇溶液的洗脱效果, 最终确定先采用水洗脱黄芪水煎液中的糖类等极性较大的干扰物质, 再采用 50% 甲醇溶液洗脱该水煎液中的黄酮类物质。洗脱液用量研究结果表明采用 50% 甲醇溶液 15 mL 可以较为完全地把水提取液中黄酮类物质洗脱下来。

综上所述, 采用本研究方法可实现对黄芪水煎液中的多种黄酮类化学成分进行快速鉴定, 结合对主要化学成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定, 可实现从多维度全面评价黄芪水煎液的质量。与传统的黄芪中药效物质研究相比, 不仅具有可较为全面地评价水煎剂中的黄酮类化学成分组成的特点, 还在研究过程中避免了传统中药药效物质研究中先采用色谱分离化学成分再进行结构鉴定的步骤, 研究过程较为简洁, 可为黄芪中的药效物质研究提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘月涛, 贾璐, 秦雪梅. 多效黄芪物质基础的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1476-1480.
- [2] Wang Y L, Liang Y Z, Zhang J, et al. Simultaneous separation and determination of four main isoflavonoids in *Astragalus Radix* by an isocratic LC/ESI-MS method [J]. *J Cent South Univ*, 2016, 23(2): 303-309.
- [3] Zhang J, Xu X J, Xu W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(6): 945-952.
- [4] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [5] Liu X H, Zhao L G, Liang J, et al. Component analysis and structure identification of active substances for anti-gastric ulcer effects in *Radix Astragali* by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 43-51.
- [6] Zhang X, Xiao H B, Xue X Y, et al. Simultaneous characterization of isoflavonoids and astragalosides in two *Astragalus* species by highperformance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30: 2059-2069.
- [7] Du H W, Zhao X L, Zhang A H, et al. Rapid separation, identification and analysis of *Astragalus membranaceus* Fisch using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(3): 226-231.
- [8] Hao J, Li J, Li X X, et al. Aromatic constituents from the stems of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *Mongolicus* (Bge.) Hsiao [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 354-364.
- [9] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 基于超高效液相色谱-

- 四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液中化学成分分析 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 809-817.
- [10] 涂天智, 沈剑刚, 蒋建勤. 内蒙黄芪的化学成分研究 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(5): 466-468.
- [11] 芮雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611, 642.
- [12] 田华, 邓雁如, 周坤, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 70-73.
- [13] 杨丽宏, 袁子文, 纪鹏, 等. 黄连解毒汤中13种活性成分的 HPLC 检测及其有效部位的筛选 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3794-3801.
- [14] 葛迪, 葛秀允. 黄芩饮片质量控制方法研究 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(2): 91-94.
- [15] 于玲, 王知斌, 王秋红, 等. 黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(2): 104-108.
- [16] Fu J, Wang Z, Huang L, *et al.* Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(9): 1275-1283.
- [17] 代云桃, 靳如娜, 吴治丽, 等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.
- [18] 李文斌, 张晓惠, 王荣. 直接进样液相色谱法在生物样品分析中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(1): 122-127.

【责任编辑 解学星】