

HPLC-DAD-MS 研究黄芪的化学成分

王 平^{1,2*}, 梁逸曾²

1. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044

2. 中南大学, 湖南 长沙 410083

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD-MS 快速分离分析黄芪 *Astragali Radix* 化学成分的方法。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil-Hypurity C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) 分析柱, 柱温 40 ℃, 流动相水-甲醇(梯度洗脱), 体积流量 0.25 mL/min。二极管阵列扫描范围 200~370 nm。质谱采用大气压化学电离 (APCI⁺) 离子源, 扫描范围 *m/z* 100~650。结果 通过与已有文献报道的质谱、紫外光谱和保留行为比较可以初步定性 5 个化合物, 分别为 calycosin-7-*O*-β-*D*-glycoside、ononin、calycosin、formononetin、(3*R*)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan。结论 因为能够同时提供相对分子质量、紫外光谱和保留行为, 所以 HPLC-DAD-MS 是一种分析中药化学成分的有力方法。

关键词: 黄芪; HPLC-DAD-MS; calycosin-7-*O*-β-*D*-glycoside; (3*R*)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan; calycosin

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0226-04

Chemical composition analysis of *Astragali Radix* by HPLC-DAD-MS

WANG Ping^{1,2}, LIANG Yi-zeng²

1. Dalian Medical University, Dalian 116044, China

2. Central South University, Changsha 410083, China

Abstract: Objective To study a method of chemical constituents of *Astragali Radix* by HPLC-DAD-MS. **Methods** The compounds were separated by using Thermo Hypersil-Hypurity C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) analytical column. The oven temperature was adjusted at 40 ℃. Mobile phase consisted of methanol and water using a gradient elution. The flow rate was set at 0.25 mL/min. UV spectra were obtained by scanning from 200 to 370 nm. The APCI-MS spectra were obtained in the positive ion mode scanning from *m/z* 100 to 650. **Results** The peaks can be identified by comparing their UV spectra, the molecular weights and retention behaviors with data reported in the literature. At least five compounds were tentatively identified as calycosin-7-*O*-β-*D*-glycoside, ononin, calycosin, formononetin, and (3*R*)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan. **Conclusion** Because of providing UV and molecular mass as well as retention time, HPLC-DAD-MS is a powerful tool for chemical analysis of traditional Chinese material medica.

Key words: *Astragali Radix*; HPLC-DAD-MS; calycosin-7-*O*-β-*D*-glycoside; (3*R*)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan; calycosin

黄芪是豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根。其味甘, 性温, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1-2]。黄芪的化学成分复杂, 主要含有三萜皂苷类、黄酮类、多糖类以及氨基酸类等^[3]。目前, 尽管许多质谱法已用于研究黄芪的化学成分, 如液相-飞行时间质谱 (LC-TOFMS)^[4]、HPLC-MS^[5]、LC-ESI/MS^[6]、液相-离子阱质谱 (LC-ITMS)^[7], 但用质谱法分析黄芪成分时会产生一些质谱碎片, 这些化学成分仍需

与对照品的保留时间、紫外光谱和质谱进行对照, 实现定性分析。由于中药成分十分复杂, 只依靠对照品定性中药的许多化学成分是不现实的, 而且常规的提取分离中药的单一化学成分极其繁琐费时, 同时还要消耗大量的药品试剂。HPLC-DAD-MS 能同时提供化合物的质谱和紫外信息, 特别适于分析复杂的中药样品。

本实验主要利用 HPLC-DAD-MS 方法快速分离分析黄芪化学成分。化合物可以通过与已有文献报道的质谱、紫外光谱和保留行为比较, 实现黄芪的一些化合物的初步定性。本方法可用于快速分析

收稿日期: 2010-05-17

基金项目: 辽宁省教育厅科研计划资助项目 (2008174)

*通讯作者 王 平 E-mail: error_114@163.com

黄芪化学成分,并为黄芪的质量控制提供有效的研究方法。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LCMS—2010 高效液相色谱-质谱联用仪,包括 2 台 LC—10ADvp 泵,FCV—10ALvp 四元低压梯度流路阀,DGU—14AM 在线真空脱气机,CTO—10Avp 柱温箱,7725i 进样阀(Rheodyne,美国),SPD—M10Avp 二极管阵列检测器,质谱为 LC-MS—2010 单级四极杆,大气压化学电离离子源,数据采集处理由 LCMS solution 2.02 软件完成。

1.2 试剂

黄芪甲苷(质量分数>95.1%)购于中国食品药品检定研究院。黄芪购于甘肃省岷县 GAP 种植基地。乙腈和甲醇为色谱纯。其他试剂为分析纯,所用水均为二次去离子蒸馏水。

2 方法

2.1 液相色谱、二极管阵列和质谱的测定条件

液相色谱条件:色谱柱为 Thermo Hypersil-Hypurity C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) 分析柱,柱温 40 ℃。色谱洗脱条件:流动相组成为 B (H₂O)-A (甲醇);洗脱剂 A 在 0~50 min 为 20%~70%,在 50~60 min 为 70%,在 60~70 min 为 70%~20%,在 70~82 min 为 20%。体积流量为 0.25 mL/min。使用前流动相经 0.22 μm 滤膜滤过并超声脱气。

二极管阵列检测条件:检测方式 Maxplot,扫描范围 200~370 nm。

质谱条件:大气压化学电离(APCI)离子源,离子化模式为正离子模式;全离子扫描,扫描范围 m/z 100~650;探针温度 400 ℃。曲型脱溶剂装置(CDL)温度 200 ℃,加热块温度 200 ℃,探针电压-4.0 kV,检测电压 1.6 kV;Q-array 电压:DC -20 V,RF 150 V;雾化气体体积流量 2.5 L/min。

2.2 药材样品溶液的制备

黄芪样品粉碎,过 40 目筛,40 ℃下烘干 5 h。180 g 黄芪用 1.8 L (10 倍量) 70%乙醇-水浸泡过夜,超声提取 1 h,滤过,1.44 L 70%乙醇-水(8 倍量)超声进行二次提取 40 min。合并两次滤液,在真空旋转蒸发器(50 ℃)中浓缩至 1.8 g/mL,置 4 ℃冰箱中备用。

3 结果与讨论

3.1 测定条件的选择

以基峰的强度为标准选择 LC-MS 的离子化模

式。为了确定离子化模式,分别在电喷雾和大气压化学电离的正负离子模式下测定试液。研究表明,不同电离模式的 HPLC-MS 有很大差异。HPLC-APCI(+)-MS 检测到的峰比较多,且响应值也比较高。所以,在本实验中选择大气压化学正电离模式研究黄芪的化学成分。

在选择扫描范围时,要考虑到作为黄芪的主要活性成分之一的黄芪甲苷(相对分子质量 784)。首先,扫描范围为 m/z 100~850 来检测黄芪甲苷对照品,结果表明在此条件下,基峰的 m/z 是 437。同时,在已有的关于黄芪的文献报道中,小分子物质最大的 m/z 是 551。所以,选择 m/z 100~650 来研究黄芪的化学成分。

基于色谱峰的对称性和良好的分离来选择色谱分离条件,分别用水-甲醇和乙腈-水试验流动相组成,前者得到了很好的分离。因此,选择水-甲醇作为流动相。为了得到良好的分离,反复优化色谱条件。

3.2 LC-DAD-MS 快速分析黄芪的化学成分

黄芪是一个包含了几百个化合物的复杂混合物。但是只有少数化合物发挥了其生物活性。快速分析中药的化学成分不仅对新药开发,而且对中药质量控制有重要的意义。一些化合物不具有或具有非常弱的紫外吸收。所以,二极管阵列检测器不适合检测这些化合物。然而,质谱检测器可以解决这一问题。HPLC-DAD-MS 因能够提供更多的信息而比 HPLC-DAD 和 HPLC-MS 更具有优越性。图 1 显示了黄芪的化学成分指纹图谱。图 1-A 显示了黄芪的 HPLC-MS 指纹图谱,而图 1-B 显示的是黄芪的 HPLC-DAD (220 nm) 指纹图谱。在图 1 中,1~25 表示了黄芪的化学成分。表 1 列出了 25 个组分的质谱、紫外光谱和保留时间。这一信息对新药开发、中药的质量控制有重要的意义。

3.3 化合物鉴定

因为能够同时提供相对分子质量、紫外光谱和保留行为,所以 HPLC-DAD-MS 是推测化合物结构的有力工具。化合物可以通过与已有文献报道的质谱、紫外光谱和保留行为相比较来初步定性^[6,8]。其 5 个化合物可以进行初步定性:calycosin-7-O-β-D-glycoside (峰 1)、ononin (峰 5)、calycosin (峰 6)、formononetin (峰 8)、(3R)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan (峰 9)。通过与黄芪甲苷对照品的保留时间和质谱对比,峰 18 可以确定为黄芪甲苷。另外,峰 8 和 9 是包埋峰,其紫外光谱通过化

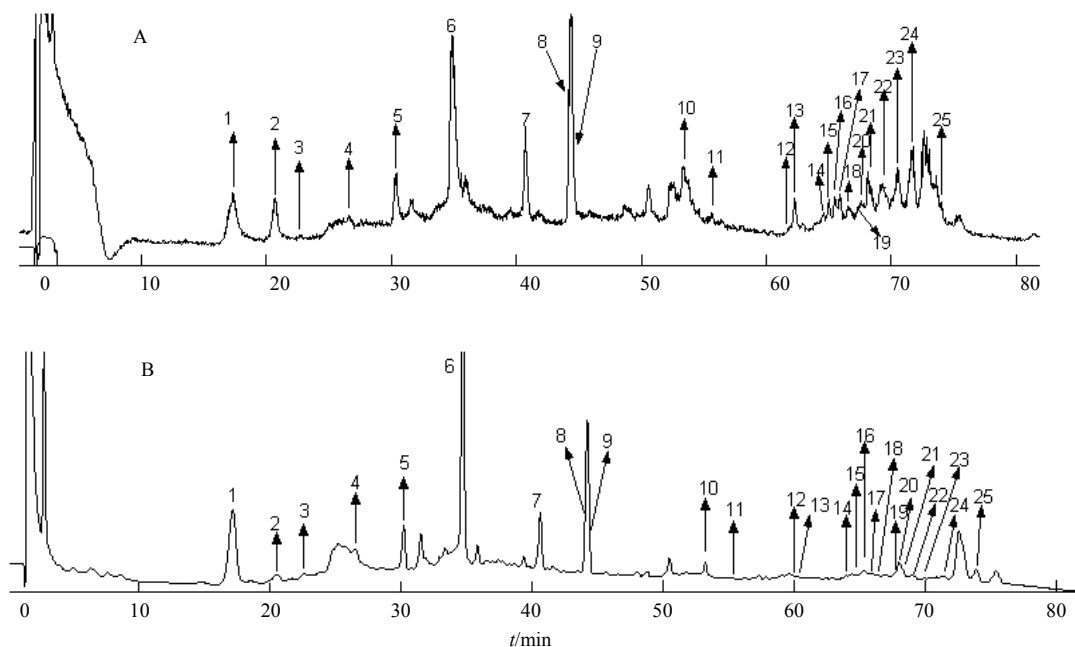


图 1 黄芪的 HPLC-APCI-MS (A) 和 HPLC-DAD (B) 色谱指纹图谱

Fig. 1 Chromatographic fingerprints of *Astragali Radix* by HPLC-APCI-MS (A) and by HPLC-DAD (B)

表 1 黄芪 HPLC-DAD-MS 指纹图谱中各色谱峰的保留时间、质谱和紫外光谱数据

Table 1 Retention time, ion mass peaks, and UV $\lambda_{\max}$ values of peaks appearing in *Astragali Radix*

峰号	t/min	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	质谱(m/z)	化合物
1	17.336	258, 288	447, 285	calycosin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glycoside
2	20.730	280, 325	217	
3	22.752	280, 325	224	
4	26.642	280, 325	489, 285	
5	30.390	250, 300	431, 269	ononin
6	34.898	248, 288	285	calycosin
7	40.733	230, 282	301	
8	44.394	250, 300	269	formononetin
9	44.394	280	303	(3 <i>R</i>)-7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone
10	53.372	230	295, 293, 348	
11	55.662	—	295, 227, 311	
12	61.692	—	245	
13	62.250	—	313, 295, 277	
14	64.555	—	279	
15	65.001	—	297, 279, 315	
16	65.483	—	279	
17	65.884	—	297, 279, 315	
18	66.585	—	437, 455, 419	astragaloside IV
19	67.312	—	293	
20	67.562	280	361, 277	
21	68.126	230	277	
22	69.266	—	353	
23	70.505	280	295, 296	
24	71.616	280	295	
25	74.030	230	279	

学计量学的分辨方法得到。在初步定性的化合物中, 黄酮类(峰 1、5、6、8、9)和三萜皂苷(峰 18)均是文献中报道的黄芪主要活性成分。

以峰 6 为例说明化合物的鉴定过程。首先, 仔细观察峰 6 的质谱。可以观察到, m/z 285 $[M+H]^+$ 与文献中报道的 calycosin 相一致^[6,8]。进一步观察其紫外光谱, 发现其紫外光谱与文献中报道的 calycosin 相一致^[6,8], 所以峰 6 初步定性为 calycosin。其他 4 个化合物以相同的方法来鉴定。研究表明, 利用 HPLC-DAD-MS 可以同时快速地分析黄芪的多个成分, 其中 5 个活性成分可以通过与已有的文献报道的质谱、紫外光谱和保留行为对比分析实现初步定性, 这对于新药开发和中药质量控制有重大的意义。

参考文献

- [1] 谢竹藩, 楼之岑. 汉英中医药分类词典 [M]. 北京: 新世界出版社, 1994.
- [2] Rios J L, Waterman P G. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus* [J]. *Phytother Res*, 1997, 11(6): 411-418.
- [3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998.
- [4] Wang D, Song Y, Li S L, *et al.* Simultaneous analysis of seven astragalosides in *Radix astragali* and related preparations by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(13): 2012-2022.
- [5] Li X, Zhu Z Y, Wang B, *et al.* Determination of three constituents in *Radix Astragali* by HPLC-MS [J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, 41(8): 793-796.
- [6] Lin L Z, He X G, Lindenmaiera M, *et al.* Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus* [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 876(1-2): 87-95.
- [7] Xiao H B, Krucker M, Putzbach K, *et al.* Capillary liquid chromatography-microcoil 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for on-line structure elucidation of isoflavones in *Radix Astragali* [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1067(1-2): 135-143.
- [8] Wangner H, Bauer R, Xiao P G, *et al.* Chinese drug monographs and analysis [C]. Geneva: World Health Organization, 1997.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签订数字出版独家合作协议, 在协议期间, 中国药学会主办的 19 本科技期刊(包括天津中草药杂志社出版的 3 本期刊《中草药》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志)的网络版由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社(其出版和信息服务网站为“中国知网”)独家出版发行, 读者可登陆“中国知网”(www.cnki.net)查阅浏览全文。

天津中草药杂志社