

黄芪药材 RRLC-UV-MS 指纹图谱研究

苏娴^{1,2}, 吴立军¹, 屠鹏飞^{2*}

(1. 沈阳药科大学 天然药物化学系, 辽宁 沈阳 110016;

2. 北京大学 药学院 天然药物学系, 北京 100091)

[摘要] 目的: 建立黄芪的 RRLC/UV-MS 指纹图谱分析方法。方法: 采用 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱; 流速 0.3 mL · min⁻¹, 进样量 0.5 μL; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm。结果: 建立了黄芪药材 RRLC/UV-MS 指纹图谱分析方法, 对 11 批样品进行了分析, 其相似度均达到 0.92 以上, 并对其中 7 个色谱峰进行了初步归属。结论: 本方法快速高效, 可用于黄芪指纹图谱的测定, 并为其全面质量控制提供参考。

[关键词] 黄芪; 指纹图谱; RRLC-MS

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。近年来对黄芪药材指纹图谱的研究以色谱法为主, 其中包括 HPLC-UV, HPLC-ELSD, HPLC-MSD 等方法^[1-2], 其中 HPLC-MS 方法对于药材中各种化合物均有较好的响应^[3], 对于含有多类成分, 特别皂苷类成分的黄芪, 具有较好的检测灵敏度。为了建立黄芪药材有效、快速的指纹图谱分析方法, 本研究首次采用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统(1200 系列 RRLC 系统), 使用亚二微米填料 RRHT 色谱柱进行分离, 实现了黄芪中各类成分的快速高效分离, 采用 MS 技术, 对部分色谱峰进行了鉴定, 建立了黄芪药材 RRLC-UV-MS 指纹图谱的分析方法, 并对 11 个产地的药材进行了分析, 为其质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 RRLC 系统, 含在线真空脱气机, 高压二元梯度泵, 恒温自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器(PDA), 电喷雾离子化(ESI)接口; LC-MS Solution 工作站。

乙腈(色谱纯, 彪仕奇有限公司); 重蒸馏水(自制); 其他试剂均为分析纯。对照品毛蕊异黄酮-7-

O-β-D-葡萄糖苷, 芒柄花素-7-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷, 毛蕊异黄酮, 黄芪甲苷, 黄芪皂苷 II, 黄芪皂苷 I, (6aR, 11aR)-3-羟基-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*-β-D-葡萄糖苷, 均为作者从黄芪提取物中分离得到, 纯度 >98%。黄芪药材, 购于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、四川等 11 个产地, 见表 1, 粉碎过 0.45 mm 筛, 置于干燥阴凉处备用。指纹图谱相似度评价软件为国家药典委员会编制《中药色谱指纹图谱相似度评价软件》2004A 版。

表 1 样品来源及相似度

No.	产地及来源	相似度
S1	黑龙江林口	0.985
S2	吉林东丰	0.978
S3	辽宁抚顺	0.992
S4	山西浑源	0.978
S5	山西万荣	0.993
S6	四川岷县	0.979
S7	河北安国	0.928
S8	河北沽源	0.979
S9	陕西西安	0.983
S10	内蒙古库伦	0.996
S11	甘肃陇西	0.973

2 方法与结果

2.1 实验条件

2.1.1 色谱条件 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 相为 0.1% 甲酸溶液, B 相为乙腈; 线性梯度洗脱, B 相含量随时间的变化: 10% (0 ~ 5 min), 10% ~ 32% (5 ~ 25 min), 32% ~ 44% (25 ~ 30 min), 44% ~ 65% (30 ~ 50 min), 65% ~ 85% (50 ~ 60min); 流速 0.3 mL ·

[收稿日期] 2009-03-23

[基金项目] 国家自然科学基金杰出青年科学基金项目(30525043)

[通信作者] *屠鹏飞, 教授, 博士生导师, Tel: (010) 82802750, E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

min⁻¹;柱温 30 ℃;进样量 0.5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离(ESI);检测模式为负离子;扫描范围 m/z 200 ~ 1 000;干燥气(N₂)流速 10.0 L · min⁻¹;雾化器压力 20.0 Psi;干燥气温度 300 ℃;裂解电压 110 V;毛细管电压 3 500 V。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品 2.5 mg 于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品贮备液(0.5 g · L⁻¹)。精密量取 0.5 mL 贮备液于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度(0.05 g · L⁻¹)作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取药材粉末 2.5 g,加入 100 mL 80% 甲醇,索氏提取 1 h,蒸干甲醇,所得残渣用 20 mL 水溶解,再用正丁醇提取 3 次(20, 20, 20 mL),分取正丁醇层,回收溶剂至干,残渣用甲醇超声溶解,定容至 2 mL,0.45 μm 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得,置于 4 ℃ 冰箱保存。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 按照按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,记录样品色谱图,采用指纹图谱相似度评价软件进行相似度评价,各时间点的色谱指纹图谱相似度均大于 0.99,表明样品在 12 h 内稳定性较好。

2.4.2 重复性试验 取同一批药材,按 2.3 项下方法分别制备供试品溶液 6 份,进样检测。各色谱指纹图谱相似度均大于 0.98,表明方法的重复性良好。

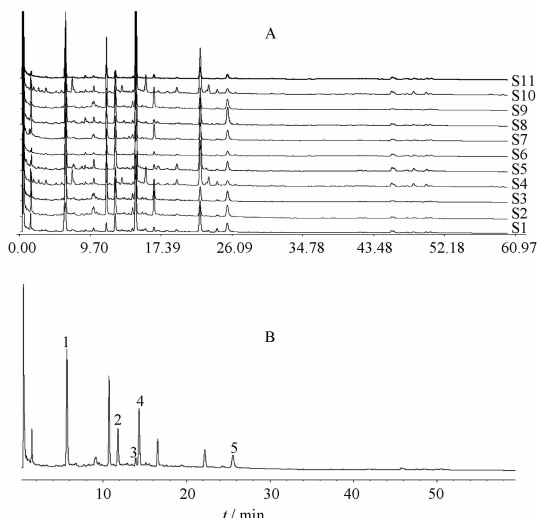
2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,计算各色谱指纹图谱相似度,结果相似度均大于 0.99,表明精密度良好。

2.4.4 相似度评价 将 11 批各地黄芪药材,分别按供试品溶液制备方法制备溶液并检测,采用相似度评价软件计算 11 批药材指纹图谱的相似度,结果见表 1。11 批黄芪药材的指纹图谱及其共有模式的色谱图见图 1。在测定黄芪药材 RRLC-UV 指纹图谱的同时,对其 RRLC-MS 指纹图谱也进行了测定,见图 2。

3 结果

3.1 HPLC-UV 指纹图谱

用梯度洗脱的方法使黄芪药材 RRLC-UV-MS 指纹图谱中各色谱峰得到了较好的分离。通过对



1. 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷;2. 芒柄花素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷;3. (6aR, 11 aR)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷;4. 毛蕊异黄酮;5. 黄芪甲苷。
图 1 11 批黄芪药材的 RRLC/UV 指纹图谱(A)及共有模式指纹图谱(B)

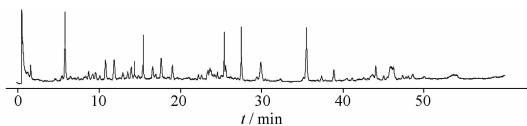


图 2 黄芪药材 RRLC-MS 指纹图谱

11 批药材的测定分析发现整体特征相似,由此标定了 12 个共有峰,非共有峰占总面积的 10% 以下。同时计算了这些药材的相似度发现它们的相似度均在 0.92 以上,说明了所采购 11 批各产地及不同规格的黄芪药材之间虽然存在差异但同时具有较好的相似性。通过实验证实该测定方法稳定可靠,可用于黄芪药材的 HPLC 指纹谱检测。

3.2 RRLC-MS 指纹图谱

在本实验条件下,对黄芪药材供试品分别进行了质谱的负离子检测,参考对照品谱图,并根据质荷比及相关文献^[4-10],对色谱图中的部分色谱峰进行了归属。结果见表 2。

4 讨论

4.1 样品制备方法的优化

本实验优化了样品制备方法,首先考察了水和甲醇两种提取溶剂浸渍(100%, 80%, 60%, 40%)和不同的提取方法(超声、浸渍、索氏提取),结果表明,80% 甲醇索氏提取较完全。进一步分别以 80%

表 2 黄芪药材 RRLC-MS 指纹图谱中 7 个色谱峰的归属

t_R /min	负离子	正离子	相对分子质量	紫外最大吸收波长/nm	成分推测
5.8	491.2	447.2	446	200,220,	毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
	[M + HCOO] ⁻	[M + H] ⁺			
11.9	475.2	431.2	430	250,258	芒柄花素-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷
	[M + HCOO] ⁻	[M + H] ⁺			
14	507.4	485	462	254	(6aR,11aR)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
	[M + HCOO] ⁻	[M + Na] ⁺			
14.4	283.2	285.2	284	300 (sh)	毛蕊异黄酮
	[M + H] ⁻	[M + H] ⁺			
25.4	829.7	786	784.9	206,284	黄芪甲苷
	[M + HCOO] ⁻	[M + H] ⁺			
27.5	871.8	828	827	230 (sh)	黄芪皂苷 II
	[M + HCOO] ⁻	[M + H] ⁺			
35.5	913.8	870	869	220,250	黄芪皂苷 I
	[M + HCOO] ⁻	[M + H] ⁺			

甲醇索氏提取样品 1,2,3 h,考察提取时间,结果不同提取时间所得样品的图谱相似,故选择 1 h,最后考察了萃取溶剂(醋酸乙酯、正丁醇),发现正丁醇萃取后有效成分更完全。

4.2 流动相及洗脱方式的优化

在流动相系统的选择中,分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05% 冰醋酸、乙腈-0.05% 甲酸、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.4% 磷酸等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱实验。结果表明,用乙腈-0.1% 甲酸进行梯度洗脱为佳。加入一定比例的甲酸,能够改善各峰间的分离状况和峰形;使用梯度洗脱,节省了出峰时间,且基线平稳,有利于指纹图谱的分析。

4.3 检测波长的选择

经对 DAD 三维光谱图进行考察,发现在 254 nm 处各吸收峰响应较好,基线平稳。峰形良好,故选择 254 nm 作为黄芪药材指纹图谱测定的检测波长。

4.4 质谱条件的优化

黄芪中主要含有黄酮类、皂苷类等成分,经同时选用正负离子模式检测,发现正离子模式下总离子流图基线噪音较大,且分离度不好,因此我们选择负离子模式。

4.5 RRLC-UV 与 HPLC-UV 的比较

同一样品制备条件下,应用 RRLC 后,进样量从 5 μ L 减少到 0.5 μ L,检测时间从 2 h 缩短到 1 h,且

分离度更好。所以 RRLC 的使用提供了一种更高效快速的检测技术。

LC-MS 联用技术在指纹图谱研究中的引入不仅弥补了紫外检测的不足,而且还提供了大量的化学成分信息,这为今后进一步的化学成分研究提供了参考,也为黄芪等基原混乱、成分复杂的中药材及其制剂的指纹图谱及化学成分研究提供了有效的手段。

[参考文献]

- [1] Normile D. Asian medicine. The new face of traditional Chinese medicine [J]. Science, 2003, 299(5604): 188.
- [2] 江纪武,肖庆祥. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986: 586.
- [3] 李翔;王彬,姜子洋,等. 黄芪药材 HPLC-MS 总离子流色谱指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志,2006, 41(22):1745.
- [4] 徐青,王加宁,肖红斌,等. 黄芪药材的指纹图谱研究方法的建立[J]. 分析测试学报, 2002, 21(2):89.
- [5] Zhao Jing, Yu Qingtao, Li Ping, et al. Determination of nine active components in Radix Hedysari and Radix Astragali using capillary HPLC with diode array detection and MS detection [J]. J Sep Sci, 2008, 31(2):255.
- [6] Lianwen Qi, Jun Cao, Ping Li, et al. Qualitative and quantitative analysis of Radix Astragali products by fast high-performance liquid chromatography-diode array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry through dynamic adjustment of fragmentor voltage [J]. J Chromatogr A, 2008, 1203(1):27.
- [7] Qi Lianwen, Yu Qingtao. Simultaneous determination of 15 marker constituents in various Radix Astragali preparations by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Sep



- Sci, 2008, 31(1):97.
- [8] 李翔,朱臻宇,王彬,等. HPLC-MS 测定黄芪药材中3种成分的含量[J]. 药学报, 2006, 41(8):793.
- [9] 夏之宁,庞媛,郑国灿,等. 基于毛细管电泳的黄芪抗氧化生物指纹图谱研究[J]. 分析化学, 2008, 36(6):745.
- [10] Kim Jin Hee, Park So-Young, Lim Hyun Kyun, et al. Quantitative evaluation of Radix Astragali through the simultaneous determination of bioactive isoflavonoids and saponins by HPLC/UV and LC-ESI-MS-MS[J]. Korean Chem Soc, 2007, 28(7):1187.

RRLC-UV-MS fingerprint of Radix Astragali

SU Xian^{1,2}, WU Lijun¹, TU Pengfei^{2*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine & Pharmacognosy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for detecting the fingerprint of Radix Astragali by RRLC-UV-MS. **Method:** Separation was performed on an Agilent Zorbax Extend C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm). Gradient elution was performed by the mobile phases consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid with the flow rate of 0.3 mL · min⁻¹, the detection wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 30 °C. **Result:** The method of fingerprint analysis on Radix Astragali by RRLC-UV-MS was established. Eleven samples of Radix Astragali were analyzed, the similarities were over 0.92, and seven peaks in the fingerprint were designated. **Conclusion:** The method can be applied to the quality control and studies on chemical constituents of Radix Astragali.

[Key words] Radix Astragali; fingerprint; RRLC-UV-MS; chemical constituents

doi: 10.4268/cjcm20100617

[责任编辑 王亚君]