

UFLC-MS/MS 法同时测定黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量

崔悦, 高兴, 韩丽琴, 范琢玉, 汤鑫森, 冯波, 关皎, 朱鹤云(吉林医药学院药学院, 吉林 吉林 132013)

摘要: **目的** 建立超快速液相色谱-串联质谱(UFLC-MS/MS)法同时测定黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。**方法** 液相测定采用 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱; Shim-Pack XR-ODS 柱(75 mm×3.0 mm, 2.2 μm); 流速为 0.4 mL·min⁻¹。质谱测定采用三重四极杆串联质谱仪, 电喷雾电离源(ESI 源), 负离子模式检测。**结果** 黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷分别在 1~50 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$)、2~100 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$) 范围内线性关系良好。黄芪甲苷含量为 0.132%~0.140%, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为 0.055 1%~0.064 3%。**结论** 与《中国药典》方法比较, 该方法供试品提取简单, 分析快速、准确, 可用于黄芪的质量控制研究。

关键词: 黄芪; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 超快速液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1855-04

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.016

Simultaneous Determination of Astragaloside IV and Calycosin-7-O-β-D-Glucopyranoside in Astragali Radix by UFLC-MS/MS

CUI Yue, GAO Xing, HAN Liqin, FAN Zhuoyu, TANG Xinmiao, FENG Bo, GUAN Jiao, ZHU Heyun(School of Pharmacy, Jilin Medical University, Jilin 132013 Jilin, China)

Abstract: **Objective** To develop an ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS) method for simultaneous determination of astragaloside IV and calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside in Astragali radix. **Methods** Chromatographic separation was performed on Shim-Pack XR-ODS column (75 mm×3.0 mm, 2.2 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water(A) and acetonitrile(B). The two analytes were determined with gradient elution at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Detection was performed on mass spectrometry equipped with electro-spray ionization source under negative ionization mode. **Results** The linear ranges were 1-50 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$) for astragaloside IV and 2-100 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$) for calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside. The content ranges of two components in six batches were 0.132%-0.140% for astragaloside IV, 0.055 1%-0.064 3% for calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside. **Conclusion** Compared with the content determination methods being included in Pharmacopoeia of the People's Republic of China, the current method is rapid and accurate, with simple sample preparation, which can be used for the quality control of Astragali radix.

Keywords: Astragali radix; Astragaloside IV; calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside; UFLC-MS/MS

黄芪(Astragali Radix), 又称黄耆、绵芪等, 始载于《神农本草经》, 被列为上品。2020 年版《中国药典》记载其为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus*

membranaceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 可补气生血、利水消肿。黄芪具有

收稿日期: 2021-60-04

作者简介: 崔悦, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药效物质基础。Email: cuiyue002@163.com。通信作者: 关皎, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药质量控制及药代动力学。Email: rainbowguanjiao@sina.com。朱鹤云, 男, 教授, 博士, 研究方向: 中药质量控制。Email: zhy19820903@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703683); 吉林省科技厅项目(YDZJ202101ZYTS074); 吉林省教育厅课题(JJKH20210492KJ; JJKH20191071KJ); 吉林省中医药管理局项目(2021168; 2021169); 吉林省卫生健康科技创新项目(20192c006); 吉林省大学生创新创业训练计划项目(202013706016)。

多种药理活性作用,包括抗氧化、抗病毒、降糖、提高机体免疫力、保护心血管等^[1-4]。其含有多种化学成分,主要包括多糖、皂苷、黄酮。其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷为黄芪中的黄酮类成分,具有抗氧化、改善心肌功能等作用^[5]。黄芪甲苷,即黄芪皂苷IV,属皂苷类化合物,是黄芪中活性最强的皂苷,对心脑血管系统疾病、糖尿病具有很好的治疗效果^[6-7]。此外,其还具有抗炎作用和免疫调节功能^[8-9]。《中国药典》2020年版将黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为黄芪药材质量控制的指标性成分,2个成分的提取方法和测定方法各不相同。虽然2个成分均采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定,但黄芪甲苷采用蒸发光散射检测器,毛蕊异黄酮葡萄糖苷采用紫外检测器。现有的检测方法存在操作复杂、分析时间长、灵敏度低、专属性差等缺点,尚不能实现对黄芪药材的快速质量控制需求。超快速液相色谱-质谱联用(UFLC-MS/MS)技术是近年来逐渐兴起的一种快速、灵敏的检测技术。该项技术由色谱系统和质谱系统组成,其中色谱系统采用的是UFLC(ultra-fast liquid chromatography),其较常规的HPLC分析效果更佳,分析时间更短。如有报道^[10]采用UFLC技术实现了当归芍药散中的3个有效成分的快速定量分析,极大地缩短了分析时间,而质谱具有极高的灵敏度、极强的选择性和定量准确度。UFLC-MS/MS技术已经广泛地应用到了中药材的质量控制研究中^[11-13]。本研究首次建立UFLC-MS/MS法同时测定黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,相较于《中国药典》方法分析时间明显缩短、分析效率显著提高,可为黄芪的质量标准提升提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 药品及试剂 黄芪甲苷对照品(批号:110781-202118,纯度>98%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201907,纯度>98%)均购自中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇、乙腈(美国Fisher科技公司);黄芪药材购自吉林大药房,经吉林医药学院李景华副教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

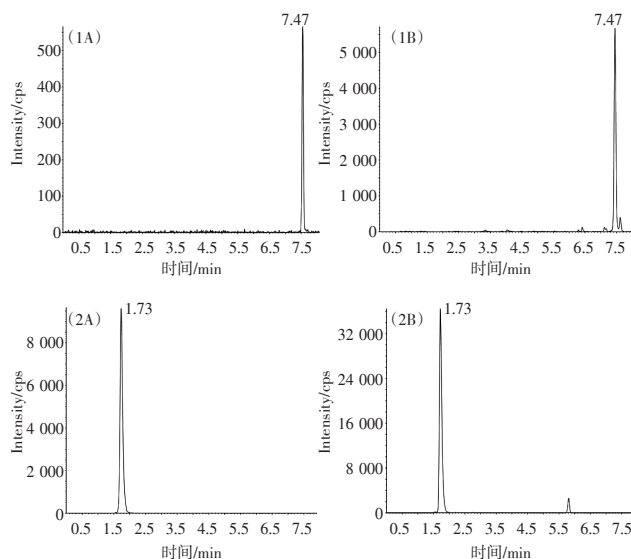
1.2 仪器 3200 QTRAP 质谱仪(美国 AB Sciex 公司), Prominence 型 UFLC 超快速液相色谱仪(日本岛津公司), CPA 225D 型十万分之一天平(德国赛多利斯公司); FW80 型粉碎机(天津泰斯特公司)。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Shim-Pack XR-ODS 色谱柱(75 mm×3.0 mm, 2.2 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)流动相, 梯度洗脱(0~5 min, 25%→45% B; 5~8 min, 45%→60% B); 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 柱温: 35 ℃; 进样量: 5 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI 源), 负离子模式检测, 源喷雾电压 4 500 V, 气帘气、雾化气压力分别为 20、50 psi, 多反应监测(MRM)的定量离子分别为 m/z 829.5→ m/z 829.5(黄芪甲苷)、 m/z 491.2→ m/z 283.1(毛蕊异黄酮葡萄糖苷), 碰撞能(CE)分别为 -5、-25 eV。混合对照品和样品的 MRM 色谱图见图 1。



注: 1. 黄芪甲苷; 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

图 1 混合对照品(A)和样品(B)MRM 色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of mixed reference substances (A) and sample(B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量, 加甲醇配制成浓度均为 1.0 mg·mL⁻¹的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取黄芪药材粉末 1 g, 置具塞锥形瓶, 加入 4%浓氨试液的 80%甲醇溶液 50 mL, 加热回流 1 h, 取续滤液 25 mL, 蒸干后的残渣用 80%甲醇溶解至 5 mL 容量瓶中; 取 0.5 mL, 再次用 80%甲醇定容置 5 mL 容量瓶中作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察 取“2.2.1”项下的各对照品溶液适量, 用 80%甲醇配制成黄芪甲苷浓度分别为 1、

2.5、5、12.5、25 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，毛蕊异黄酮葡萄糖苷浓度分别为 2、5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。依次注入超快速液相色谱-质谱联用仪，测定峰面积。以对照品的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标，峰面积的积分值为纵坐标，拟合线性方程。黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性回归方程分别为： $Y=1\,240.9X+1\,057.4(r=0.999\,6)$ 、 $Y=21\,919X+31\,187(r=0.999\,8)$ 。结果表明，2 个成分分别在 1~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系。

2.4 精密度的试验 取“2.3”项下制备的黄芪甲苷(12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)混合对照品溶液，连续进样 6 次，2 个待测成分峰面积的 RSD 分别为 1.1%、0.83%，表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性的试验 取同一份供试品溶液，室温下放置 0、2、4、8、12 和 24 h 后测定。2 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.6%、2.5%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定，对测定结果无影响。

2.6 重复性的试验 取同一批黄芪粉末样品 6 份制备供试品溶液，测定分析。2 个测定成分的含量平均值($n=6$)分别为 0.139%、0.061 6%，RSD 分别为 2.7%、2.4%，说明方法重复性可靠。

2.7 加样回收率的试验 取已知含量的同一批次黄芪样品 9 份，每份 0.5 g，分别加入相当于样品中 2 个待测成分含量 80%、100%、120% 的对照品溶液各 3 份，制备供试品溶液。2 个成分的回收率和 RSD 结果见表 1。

表 1 黄芪样品中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的加样回收率($n=3$)

Table 1 Recoveries of Astragaloside IV and calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside in Astragali radix($n=3$)

组分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
黄芪甲苷	0.069 5	0.055 6	0.124	98.0	1.2	98.5
	0.069 5	0.069 5	0.138	98.6	0.9	
	0.069 5	0.083 4	0.152	98.9	0.7	
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.030 8	0.024 6	0.055 1	98.6	1.5	99.1
	0.030 8	0.030 8	0.061 4	99.4	0.4	
	0.030 8	0.037 0	0.067 5	99.3	1.1	

2.8 样品含量测定 称取 6 批黄芪样品，制备供试品溶液，进样分析。样品含量测定结果见表 2。

表 2 6 批黄芪样品中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量(%， $n=3$)

Table 2 The contents of Astragaloside IV and calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside in six batches of Astragali radix samples

批次	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
2021001	0.133	0.055 1
2021002	0.140	0.064 3
2021003	0.140	0.055 3
2021004	0.140	0.063 9
2021005	0.132	0.055 2
2021006	0.139	0.062 9

3 讨论

3.1 色谱和质谱条件的优化 2020 年版《中国药典》对黄芪中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定分别采用不同的分离条件。前者采用乙腈-水(32 : 68)进行等度洗脱，后者采用乙腈-0.2%甲酸水进行梯度洗脱，且分析时长为 30 min。本研究对分离的色谱条件进行了优化，分别考察了不同种类有机相和水相对黄芪药材的分离和检测的影响，最终选择了乙腈-0.1%甲酸水溶液。该体系能获得最佳的分离效果，且 2 个待测物可在同一条件下检测，方法简单、快速。

黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 ESI 源负离子模式下可获得较高的响应。2 个待测物形成的准分子离子分别为 m/z 785 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 m/z 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。通过对定量结果影响较大的碰撞能(CE)进行优化发现，设置不同的 CE 时，毛蕊异黄酮葡萄糖苷可以形成稳定的碎片离子，但黄芪甲苷不能很好地发生裂解，不能形成稳定的碎片离子，最终优化的黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 CE 值分别为-5、-25 eV。采用本研究建立的 UFLC-MS/MS 分析方法，分析时间仅为 8 min，与常规 HPLC 相比^[14-16]，分析时间明显缩短，优势明显。

3.2 提取方法及提取溶剂的选择 2020 版《中国药典》中分别采用不同提取方法和提取溶剂提取黄芪药材中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷。其中，前者采用 4%浓氨试液的 80%甲醇提取，回流 1 h；后者采用甲醇加热回流 4 h。方法较繁琐，且提取时间较长。本研究对上述提取方法和提取溶剂进行了优化，仅用 1 种提取方法和 1 种提取溶剂就可同时实

现对2个成分的提取。此外,分别对比了回流法和超声法的提取效果。结果表明,回流1 h所得供试品中2个成分的含量明显高于超声法。参考《中国药典》和相关报道^[14-16],考察了不同浓度的甲醇和乙醇溶液、含4%浓氨试液作为提取溶剂的提取效果,最终选择了综合提取效率最高的4%浓氨试液的80%甲醇溶液。

3.3 黄芪药材含量分析 本研究用所建立的UFLC-MS/MS法同时测定黄芪中的黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,6批黄芪中上述2个活性成分的平均含量分别为0.137%、0.059 4%,均符合2020年版《中国药典》的规定(前者不少于0.080%,后者不少于0.020%)。本方法样品提取简单,分析快速、准确可靠,可为黄芪的质量控制方法提升提供一定参考。

参考文献:

- [1] 胡妮娜,张晓娟. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(1): 76-82.
- [2] 姜辉,顾胜龙,张玉婷,等. 黄芪化学成分和药理作用研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 93-96.
- [3] 张甲翠,魏海东,王海燕,等. 黄芪多糖减轻氯化钴致人肺动脉内皮细胞损伤[J]. 江苏医药, 2020, 46(6): 576-580.
- [4] 张国欣,李能莲,舍雅莉,等. 黄芪多糖对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(3): 376-379.
- [5] 李亮亮,黄金智. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷药理作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(2): 156-160.
- [6] 孔祥琳,吕琴,李运伦,等. 黄芪甲苷对心脑血管疾病的现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 218-223.
- [7] 尤良震,林逸轩,方朝晖,等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4700-4706.
- [8] LI J, HUANG L, WANG S, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory reaction via activating immune function of regulatory T-cells inhibited by HMGB1 in mice[J]. Pharm Biol, 2016, 54(12): 3217-3225.
- [9] 靳晓飞,高维娟. 黄芪甲苷生物活性及神经保护作用研究进展[J]. 河北中医药学报, 2017, 32(3): 54-57.
- [10] 关皎,杨昊瑾,候鑫淼,等. UFLC法同时测定当归芍药散中3种活性成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 777-780.
- [11] 张雷,杨秀伟. UFLC-MS/MS法分析不同来源白芷中9个新型呋喃香豆素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 214-220.
- [12] 杨宝田,关皎,贾桐,等. UFLC-MS/MS法同时测定枳实中6个活性成分的含量[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(4): 91-96.
- [13] 潘卫东,胡玉涛,胡旭,等. UFLC-MS/MS检测胡桃楸不同部位有效成分的含量[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 195-198.
- [14] 王法宇,吴迪,赵凤明,等. 袁家欣. HPLC法测定消栓颗粒剂中黄芪甲苷的含量[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(1): 31-33.
- [15] 张岑玥,王国香,全姬善. HPLC测定血复生片中黄芪甲苷的含量[J]. 人参研究, 2020, 32(2): 52-54.
- [16] 韩明阳,王雪梅,李媛媛,等. 孟宪丽. HPLC法测定康复春口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷和人参皂苷Rb1[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 37-40.

(编辑: 梁进权)