

UPLC-MS/MS法测定不同温度定向炮制黄芪中8种苷类和4种苷元成分的含量^Δ

刘蓬蓬^{1,2,3*}, 张凡^{1,2,3}, 史辑^{1,2,3}, 单国顺^{1,2,3}, 贾天柱^{1,2,3#}(1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2.国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室, 辽宁大连 116600; 3.辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)03-0287-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.03.07

摘要 目的:建立测定黄芪中8种苷类(黄芪皂苷I、II、III、IV和毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪异黄酮苷、黄芪紫檀烷苷)及4种苷元(毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪异黄酮、黄芪紫檀素)成分含量的方法,并考察不同炮制温度对上述12种成分含量的影响。方法:分别以生黄芪和不同温度(120、140、160、180、200℃)炮制后的黄芪为样品,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定其中12种成分的含量。色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T₃,流动相为0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液(梯度洗脱),流速为0.5 mL/min,柱温为30℃,检测波长为260 nm,进样量为2 μL。采用电喷雾离子源,在正离子模式下进行监测扫描,扫描范围为质荷比50~1 500,毛细管电压为2 000 V,离子源温度为100℃,脱溶剂温度为400℃,雾化气(N₂)流速为40 L/h,脱溶剂气(N₂)流速为800 L/h,碰撞能量为20~30 V,数据采集速率为0.5 s/scan。结果:黄芪皂苷I、黄芪皂苷II、黄芪皂苷III、黄芪皂苷IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素的检测质量线性范围分别为0.001 16~0.232 0、0.000 276~0.055 2、0.000 22~0.044 0、0.000 225~0.045 0、0.000 734~0.587 0、0.001 17~0.234 0、0.000 742~0.148 0、0.001 30~0.260、0.003 98~0.795 0、0.000 476~0.476 0、0.001 89~0.378 0、0.000 336~0.336 0 μg(*R*²均不低于0.999 2);检测限分别为6.2×10⁻⁶、4.8×10⁻⁶、3.8×10⁻⁶、3.4×10⁻⁶、5.8×10⁻⁶、4.8×10⁻⁶、4.2×10⁻⁶、3.2×10⁻⁶、5.8×10⁻⁶、2.6×10⁻⁶、4.2×10⁻⁶、6.4×10⁻⁶ μg;定量限分别为12.6×10⁻⁶、16.2×10⁻⁶、14.4×10⁻⁶、14.8×10⁻⁶、18.8×10⁻⁶、16.4×10⁻⁶、15.4×10⁻⁶、10.8×10⁻⁶、20.2×10⁻⁶、12.4×10⁻⁶、14.6×10⁻⁶、23.4×10⁻⁶ μg;精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于3.0%(*n*=6);平均加样回收率分别为99.1%、100.2%、98.7%、101.9%、98.6%、102.1%、99.2%、100.3%、98.7%、99.2%、99.3%、100.8%,RSD分别为1.9%、2.2%、2.4%、1.8%、2.1%、1.7%、2.3%、1.9%、2.4%、1.8%、2.2%、1.9%(*n*=6)。含量测定结果显示,黄芪皂苷I、II、III的含量随着炮制温度的升高而逐渐降低,黄芪皂苷IV的含量随着温度的升高而逐渐升高;黄酮苷类成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪异黄酮苷、黄芪紫檀烷苷的含量均随着炮制温度的升高而降低,而对应的苷元成分毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪紫檀素的含量均随着炮制温度的升高而先升高后降低;黄芪异黄酮的含量随着炮制温度的升高而降低。结论:所建立的UPLC-MS/MS法可用于黄芪中12种成分含量的测定;黄芪经不同温度炮制后,苷类成分含量总体呈降低趋势,苷元成分含量总体呈升高趋势。

关键词 黄芪;超高效液相色谱-串联质谱法;苷类;苷元;含量测定;定向炮制

Determination of 8 Glycosides and 4 Aglycones in Directionally Processed *Astragalus membranaceus* under Different Temperatures by UPLC-MS/MS

LIU Pengpeng^{1,2,3}, ZHANG Fan^{1,2,3}, SHI Ji^{1,2,3}, SHAN Guoshun^{1,2,3}, JIA Tianzhu^{1,2,3}(1.College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2.Key Laboratory of Processing Theory Analysis, State Administration of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 3.Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 8 glycosides (astragaloside I, II, III, IV and calycosin glucopyranoside, 2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside and 9, 10-dimethoxy-pterocarpan-glucoside) and 4 aglycones (calycosin, formononetin, 7, 2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan and 3-hydroxy-9, 10-dimethoxy-pterocarpan) in *Astragalus membranaceus*, and to investigate the effects of different processing temperatures on the contents of above 12

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81803726);国家中医药管理局“中药炮制技术传承基地建设”项目(No.国中医药科技中药便函[2015]132号)

* 讲师,博士。研究方向:中药炮制原理。电话:0411-85890154。E-mail:liupengpeng0411@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制。电话:0411-85890135。E-mail:tianzhuja0411@163.com

components. METHODS: The contents of 12 components in *A. membranaceus* and samples processed under different temperatures (120, 140, 160, 180, 200℃) were determined by UPLC-MS/MS. The determination was performed on ACQUITY UPLC HSS T₃ column with mobile phase consisted of 0.1 mol/L formic acid water solution-0.1 mol/L formic acid acetonitrile solution (gradient elution) at the flow rate of 0.5

mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 260 nm, and sample size was 2 μL. Electrospray ion source (ESI) was used under positive ion mode (ESI⁺). The mass scanning range was mass ratio (*m/z*) of 50-1 500, with capillary voltage of 2 000 V and ion source temperature of 100 °C. The desolvation temperature was 400 °C; flow rate of atomizing gas (N₂) was 40 L/h, and that of desolvation was 800 L/h; collision energy (CE) was 20-30 V; data acquisition rate was 0.5 s/scan.

RESULTS: The linear range of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside III, astragaloside IV, calycosin-glucopyranoside, calycosin, ononin, formononetin, 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan, 9,10-dimethoxy-pterocarpan-glucoside and 3-hydroxy-9,10-dimethoxy-pterocarpan were 0.001 16-0.232 0, 0.000 276-0.055 2, 0.000 22-0.044 0, 0.000 225-0.045 0, 0.000 734-0.587 0, 0.001 17-0.234 0, 0.000 742- 0.148 0, 0.001 30-0.260, 0.003 98-0.795 0, 0.000 476-0.476 0, 0.001 89-0.378 0, 0.000 336-0.336 0 μg (all $R^2 \geq 0.999 2$), respectively. The limits of detection were 6.2×10^{-6} , 4.8×10^{-6} , 3.8×10^{-6} , 3.4×10^{-6} , 5.8×10^{-6} , 4.8×10^{-6} , 4.2×10^{-6} , 3.2×10^{-6} , 5.8×10^{-6} , 2.6×10^{-6} , 4.2×10^{-6} , 6.4×10^{-6} μg, respectively. The limits of quantitation were 12.6×10^{-6} , 16.2×10^{-6} , 14.4×10^{-6} , 14.8×10^{-6} , 18.8×10^{-6} , 16.4×10^{-6} , 15.4×10^{-6} , 10.8×10^{-6} , 20.2×10^{-6} , 12.4×10^{-6} , 14.6×10^{-6} , 23.4×10^{-6} μg, respectively. RSDs of precision, stability (24 h) and repetition tests were all lower than 3.0% ($n=6$). The average recoveries were 99.1%, 100.2%, 98.7%, 101.9%, 98.6%, 102.1%, 99.2%, 100.3%, 98.7%, 99.2%, 99.3% and 100.8%, with the RSDs of 1.9%, 2.2%, 2.4%, 1.8%, 2.1%, 1.7%, 2.3%, 1.9%, 2.4%, 1.8%, 2.2% and 1.9% ($n=6$), respectively. The results showed that the contents of astragaloside I, II and III decreased gradually with the increase of processing temperature; the content of astragaloside IV increased gradually with the increase of temperature. The content of flavonoid glycosides, such as calycosin glucopyranoside, ononin, 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside and 9,10-dimethoxy-pterocarpan-glucoside decreased with the increase of temperature; the corresponding aglycone components as flavonoid glycosides, formononetin, 3-hydroxy-9,10-dimethoxy- pterocarpan increased firstly and then decreased with the increase; the content of 7,2'-dihydroxy-3',4'- dimethoxy-isoflavan decreased with the increase of temperature.

CONCLUSIONS: Established UPLC-MS/MS method can be used for determination of 12 components in *A. membranaceus*. After processed under different temperature, the contents of glycosides decreased in general, while the contents of aglycones increased in general.

KEYWORDS *Astragalus membranaceus*; UPLC-MS/MS; Glycosides; Aglycones; Content determination; Directional processing

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membrana-*
ceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄
芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 的干燥根, 主
要有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通
痹、敛疮生肌之功^[1]。现代研究发现, 黄芪中主要以黄芪
皂苷 I、II、III、IV 等皂苷类成分, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花
苷等黄酮苷类和少量其对应的苷元类成分及多糖类成
分为有效成分^[2]。有学者研究发现, 中药的苷类成分经
口服进入肠道后, 由肠道内的微生物代谢转化, 脱掉糖
基成为次级苷或苷元而发挥药效^[3-4]。本课题组前期研
究发现, 黄芪中的黄酮苷类成分主要以脱掉糖基生成对
应的苷元成分而吸收入血, 进入体循环。

黄芪传统炮制方法有净制、切制、蒸制、炙制、炒制、
煨制等 16 种。在 2015 年版《中国药典》(一部) 中收载的
黄芪炮制品主要是生黄芪和蜜炙黄芪^[1]。黄芪蜜炙时需
用文火加热炒制, 而中药中的苷类成分在炮制过程中由
于受温度的影响会发生脱掉糖基生成苷元的转化过
程。那么, 黄芪中的苷类成分在炒制过程中是否会受温
度的影响而发生变化? 该问题尚未见报道。基于此, 本
研究通过模拟炮制的方式, 将黄芪在不同温度下进行烘
制, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技
术分析不同烘制温度下黄芪中 8 种苷 (黄芪皂苷 I、II、

III、IV 和毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪异黄酮苷、黄芪
紫檀烷苷) 及 4 种苷元 (毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪异黄
烷、黄芪紫檀素) 的含量, 考察温度对黄芪中苷类及苷元
成分含量变化的影响, 为开展黄芪的现代化、创新性的
炮制转化工艺研究提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY I-CLASS 型 UPLC 仪 (包括二极管阵列
检测器、二元高压泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温
箱, 数据采集与处理采用 Masslynx 软件) 和 XEVO
G2-XS 型 UPLC-MS 仪均购自美国 Waters 公司; AE240
型十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司);
FA1004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司);
YP5102 型电子天平 (上海光正医疗仪器有限公司);
KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限
公司); Milli-Q 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); DX-200
型粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); WGL-125B 型电
热鼓风干燥箱 (天津泰斯特仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪药材于 2017 年 10 月采自山西省五寨县黄芪
“中药材生产质量管理规范”(GAP) 种植基地, 经辽宁中
医药大学药学院王冰教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪的

干燥根。黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号: MUST-16012906、MUST-16031010、MUST-16090204、MUST-16022804、MUST-16031205、MUST-16120911、MUST-16031111、MUST-16031005,纯度均不低于98%);2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷葡萄糖苷(黄芪异黄烷苷)、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷(黄芪异黄烷)对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:160217、160816,纯度均不低于98%);9,10-二甲氧基紫檀烷葡萄糖苷(黄芪紫檀烷苷)对照品(上海普誉科贸有限公司,批号:16112732,纯度:≥98%);3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷(黄芪紫檀素)对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y29D7H27839,纯度:≥98%);甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参考文献[5-6]设置色谱条件。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T₃(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 预柱为 ACQUITY UPLC HSS T₃(5 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 18% B→30% B; 5~8 min, 30% B→36% B; 8~10 min, 36% B; 10~12 min, 36% B→40% B; 12~13 min, 40% B→48% B; 13~15 min, 48% B→70% B; 15~16 min, 70% B→90% B; 16~19 min, 100% B; 19~22 min, 18% B); 检测波长为 260 nm; 流速为 0.5 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 2 μL。

2.2 MS 条件

采用电喷雾离子源(ESI), 在正离子模式下(ESI⁺) 进行监测扫描, 扫描范围为质荷比(*m/z*)50~1 500; 离子源温度为 100 °C; 毛细管电压为 2 000 V; 脱溶剂温度为 400 °C; 雾化气(N₂)流速为 40 L/h, 脱溶剂气(N₂)流速为 800 L/h; 碰撞能量(CE)为 20~30 V, 数据采集速率为 0.5 s/scan。采用质量锁定(Lock-Mass) 技术以亮氨酸-脑啡肽(LE, ESI⁺: *m/z* 556.277 1) 调谐液作为校正溶液, 时时校正确保质量数的准确测定, 其流速为 10 μL/min, 切换频率为 20 s/次^[7-8]。

2.3 黄芪样品的制备

生黄芪: 取净制黄芪 20 g, 粉碎, 过 65 目筛, 备用。烘制黄芪: 取净制黄芪 5 份, 每份 20 g, 分别在 120、140、160、180、200 °C 温度下烘制 30 min, 取出, 放凉, 粉碎, 过 65 目筛, 备用。

2.4 溶液的制备

2.4.1 供试品溶液 称取生黄芪和不同温度下模拟炮

制的烘制黄芪粉末各约 1 g, 精密称定, 分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz) 1 h, 取出放至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得^[9-10]。

2.4.2 对照品溶液 精密称取黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄烷苷、黄芪异黄烷、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素各对照品适量, 用甲醇溶解并制成质量浓度分别为 0.116 3、0.138 2、0.110 1、0.112 5、0.293 6、0.117 2、0.148 4、0.130 1、1.193、1.191、1.135、1.008 g/L 的对照品贮备液。取上述各贮备液等量, 以甲醇制备成 8 种黄酮类成分(毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄烷苷、黄芪异黄烷、黄芪紫檀烷苷和黄芪紫檀素)的混合对照品溶液 1 以及 4 种黄芪皂苷类成分(黄芪皂苷 I、II、III、IV)的混合对照品溶液 2。将以上溶液 4 °C 贮藏备用, 使用时用甲醇稀释至所需质量浓度即可。

2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1、混合对照品溶液 2 适量, 制备成 5 个质量浓度梯度的混合对照线性溶液, 按“2.1”“2.2”项下条件进行测定, 记录峰面积, 以各对照品的进样量(μg) 为横坐标(*x*)、峰面积为纵坐标(*y*) 绘制标准曲线。结果表明, 各对照品的进样量与峰面积均呈良好的线性关系。黄芪中 12 种成分的标准曲线及线性范围见表 1。

表 1 黄芪中 12 种成分的标准曲线及线性范围

Tab 1 Standard curves and linear range of 12 components in *A. membranaceus*

成分	标准曲线	R ²	线性范围, μg
黄芪皂苷 I	$y=5\ 963\ 279.093\ 2x+7\ 527.185\ 3$	0.999 9	0.001 16~0.232
黄芪皂苷 II	$y=7\ 967\ 977.702\ 7x-2\ 408.055\ 2$	0.999 8	0.000 276~0.055 2
黄芪皂苷 III	$y=10\ 680\ 459.186\ 4x+532.514\ 0$	0.999 3	0.000 22~0.044 0
黄芪皂苷 IV	$y=8\ 727\ 882.226\ 6x+3\ 395.831\ 8$	0.999 2	0.000 225~0.045 0
毛蕊异黄酮苷	$y=1\ 748\ 801.286\ 2x+1\ 862.222\ 6$	0.999 9	0.000 734~0.587
毛蕊异黄酮	$y=10\ 172\ 803.189\ 8x+14\ 783.270\ 6$	0.999 9	0.001 17~0.234
芒柄花苷	$y=2\ 904\ 222.824\ 9x+4\ 069.706\ 5$	0.999 4	0.000 742~0.148
芒柄花素	$y=7\ 009\ 131.058\ 6x-17\ 874.841\ 2$	0.999 7	0.001 30~0.260
黄芪异黄烷苷	$y=414\ 192.176\ 9x-959.788\ 5$	0.999 6	0.003 98~0.795
黄芪异黄烷	$y=3\ 265\ 080.835\ 7x-6\ 483.105\ 5$	0.999 8	0.000 476~0.476
黄芪紫檀烷苷	$y=430\ 966.634\ 8x-492.121\ 2$	0.999 7	0.001 89~0.378
黄芪紫檀素	$y=12\ 339\ 367.482\ 0x+5\ 388.947\ 9$	0.999 8	0.000 336~0.336

2.6 检测限与定量限考察

精密量取“2.4.2”项下混合对照品溶液 1、混合对照品溶液 2 适量, 以甲醇倍比稀释, 然后按“2.1”“2.2”项下条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 3:1、10:1 时分别得检测限、定量限。结果显示, 黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、

毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素的检测限分别为 6.2×10^{-6} 、 4.8×10^{-6} 、 3.8×10^{-6} 、 3.4×10^{-6} 、 5.8×10^{-6} 、 4.8×10^{-6} 、 4.2×10^{-6} 、 3.2×10^{-6} 、 5.8×10^{-6} 、 2.6×10^{-6} 、 4.2×10^{-6} 、 6.4×10^{-6} μg ，定量限分别为 12.6×10^{-6} 、 16.2×10^{-6} 、 14.4×10^{-6} 、 14.8×10^{-6} 、 18.8×10^{-6} 、 16.4×10^{-6} 、 15.4×10^{-6} 、 10.8×10^{-6} 、 20.2×10^{-6} 、 12.4×10^{-6} 、 14.6×10^{-6} 、 23.4×10^{-6} μg 。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一生黄芪供试品溶液，分别在室温下放置0、2、4、6、12、24 h后，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积。结果显示，黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷和黄芪紫檀素峰面积的RSD分别为2.0%、1.8%、2.1%、2.1%、2.5%、1.9%、1.8%、2.2%、2.3%、1.7%、2.0%和1.9% ($n=6$)，表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定。

2.8 精密度试验

精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液1、混合对照品溶液2适量，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，重复进样6次，记录峰面积。结果显示，黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素峰面积的RSD分别为1.2%、1.1%、1.1%、1.5%、1.3%、1.7%、1.2%、1.8%、1.3%、1.1%、1.4%、1.3% ($n=6$)，表明仪器精密度良好。

2.9 重复性试验

精密称取同一批生黄芪样品6份，按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液，然后按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积并计算各成分的含量。结果显示，黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素含量的RSD分别为1.7%、2.2%、2.3%、1.9%、2.6%、2.1%、1.8%、2.3%、2.2%、1.8%、2.5%、2.0% ($n=6$)，表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取同一批已知含量的生黄芪样品1 g，平行6份，精密称定，按已知成分含量的50%加入相应量对照品，按“2.4.1”方法制备供试品溶液后，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积并计算各成分的加样回收率。结果显示，12种成分的平均加样回收率在98.7%~102.1%之间，RSD在1.7%~2.4%之间 ($n=6$)，表明该方法的准确度较好，结果见表2。

表2 加样回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄芪皂苷 I	1.013 8	1.373 4	0.696 0	2.057 6	98.3	99.1	1.9
	1.035 6	1.402 9	0.696 0	2.114 2	102.2		
	1.008 3	1.365 9	0.696 0	2.041 7	97.1		
	1.011 7	1.370 5	0.696 0	2.056 1	98.5		
	1.016 6	1.377 2	0.696 0	2.077 4	100.6		
	1.021 6	1.384 0	0.696 0	2.066 8	98.1		
黄芪皂苷 II	1.013 8	0.151 4	0.069 0	0.220 5	100.1	100.2	2.2
	1.035 6	0.154 6	0.069 0	0.221 9	97.5		
	1.008 3	0.150 5	0.069 0	0.220 3	101.2		
	1.011 7	0.151 0	0.069 0	0.222 6	103.7		
	1.016 6	0.151 8	0.069 0	0.221 1	100.5		
	1.021 6	0.152 5	0.069 0	0.220 2	98.1		
黄芪皂苷 III	1.013 8	0.024 8	0.011 0	0.035 4	96.5	98.7	2.4
	1.035 6	0.025 4	0.011 0	0.036 4	100.2		
	1.008 3	0.024 7	0.011 0	0.035 9	101.8		
	1.011 7	0.024 8	0.011 0	0.035 7	99.5		
	1.016 6	0.024 9	0.011 0	0.035 7	98.8		
	1.021 6	0.025 0	0.011 0	0.035 5	95.3		
黄芪皂苷 IV	1.013 8	0.002 2	0.001 1	0.003 3	100.5	101.9	1.8
	1.035 6	0.002 3	0.001 1	0.003 5	102.8		
	1.008 3	0.002 2	0.001 1	0.003 3	101.9		
	1.011 7	0.002 2	0.001 1	0.003 3	102.3		
	1.016 6	0.002 2	0.001 1	0.003 3	99.2		
	1.021 6	0.002 2	0.001 1	0.003 4	104.4		
毛蕊异黄酮苷	1.013 8	4.960 2	2.495 6	7.493 2	101.5	98.6	2.1
	1.035 6	5.066 9	2.495 6	7.515 1	98.1		
	1.008 3	4.933 3	2.495 6	7.441 4	100.5		
	1.011 7	4.949 9	2.495 6	7.353 2	96.3		
	1.016 6	4.973 9	2.495 6	7.389 6	96.8		
	1.021 6	4.998 4	2.495 6	7.451 6	98.3		
毛蕊异黄酮	1.013 8	0.900 9	0.468 8	1.383 3	102.9	102.1	1.7
	1.035 6	0.920 2	0.468 8	1.399 9	102.5		
	1.008 3	0.896 0	0.468 8	1.381 2	103.5		
	1.011 7	0.899 0	0.468 8	1.373 4	101.2		
	1.016 6	0.903 4	0.468 8	1.390 0	103.8		
	1.021 6	0.907 8	0.468 8	1.370 0	98.6		
芒柄花苷	1.013 8	2.077 9	1.038 8	3.115 7	99.9	99.2	2.3
	1.035 6	2.122 6	1.038 8	3.180 1	101.8		
	1.008 3	2.066 6	1.038 8	3.121 0	101.5		
	1.011 7	2.073 6	1.038 8	3.093 7	98.2		
	1.016 6	2.083 6	1.038 8	3.078 8	95.8		
	1.021 6	2.093 9	1.038 8	3.113 0	98.1		
芒柄花素	1.013 8	1.089 6	0.520 0	1.599 7	98.1	100.3	1.9
	1.035 6	1.113 1	0.520 0	1.640 4	101.4		
	1.008 3	1.083 7	0.520 0	1.614 6	102.1		
	1.011 7	1.087 4	0.520 0	1.592 8	97.2		
	1.016 6	1.092 6	0.520 0	1.616 8	100.8		
	1.021 6	1.098 0	0.520 0	1.626 9	101.7		
黄芪异黄酮苷	1.013 8	0.965 5	0.477 1	1.439 7	99.4	98.7	2.4
	1.035 6	0.986 3	0.477 1	1.457 2	98.7		
	1.008 3	0.960 3	0.477 1	1.418 8	96.1		
	1.011 7	0.963 5	0.477 1	1.441 6	100.2		
	1.016 6	0.968 2	0.477 1	1.425 3	95.8		
	1.021 6	0.973 0	0.477 1	1.459 2	101.9		
黄芪异黄酮	1.013 8	1.289 0	0.666 4	1.950 7	99.3	99.2	1.8
	1.035 6	1.316 8	0.666 4	1.967 2	97.6		
	1.008 3	1.282 1	0.666 4	1.962 5	102.1		

续表 2

Continued tab 2

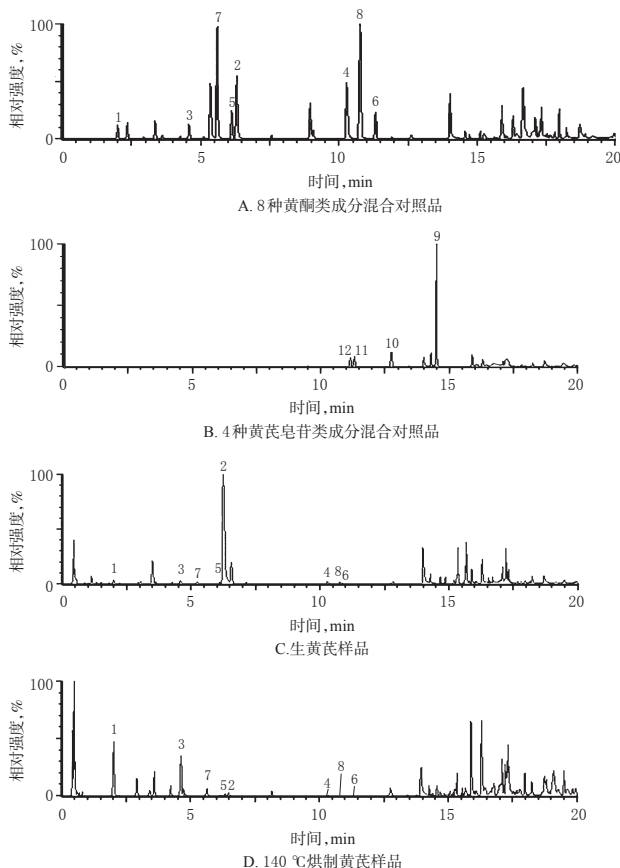
待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄芪异黄酮	1.011 7	1.286 4	0.666 4	1.954 1	100.2		
	1.016 6	1.292 6	0.666 4	1.951 7	98.9		
	1.021 6	1.299 0	0.666 4	1.946 7	97.2		
黄芪紫檀烷苷	1.013 8	1.812 4	0.851 4	2.649 3	98.3	99.3	2.2
	1.035 6	1.851 3	0.851 4	2.682 3	97.6		
	1.008 3	1.802 5	0.851 4	2.672 6	102.2		
	1.011 7	1.808 6	0.851 4	2.676 2	101.9		
	1.016 6	1.817 4	0.851 4	2.659 4	98.9		
	1.021 6	1.826 3	0.851 4	2.649 6	96.7		
黄芪紫檀素	1.013 8	0.249 7	0.126 0	0.374 3	98.9	100.8	1.9
	1.035 6	0.255 1	0.126 0	0.382 1	100.8		
	1.008 3	0.248 3	0.126 0	0.377 8	102.8		
	1.011 7	0.249 2	0.126 0	0.378 4	102.5		
	1.016 6	0.250 4	0.126 0	0.378 4	101.6		
	1.021 6	0.251 6	0.126 0	0.375 2	98.1		

2.11 样品含量测定

取生黄芪和不同温度下模拟炮制的烘制黄芪样品适量,平行3份,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,并取“2.4.2”项下8种黄酮类成分混合对照品溶液1和4种黄芪皂苷类混合对照品溶液2,分别按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,计算样品中12种成分的含量,并分析其在不同烘制温度下的变化情况。结果显示,黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 的含量随着烘制温度的升高而逐渐降低,提示其转化生成了其他化合物,使得含量降低;黄芪皂苷 IV 含量随着烘制温度的升高而逐渐升高,表明黄芪在不同温度下进行烘制后,黄芪中的某些成分可能转化生成了黄芪皂苷 IV,使得黄芪皂苷 IV 含量增加。黄酮苷类成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、黄芪异黄酮苷和黄芪紫檀烷苷的含量均随着烘制温度的升高而降低,而对应的苷元成分毛蕊异黄酮、芒柄花素和黄芪紫檀素的含量均随着烘制温度的升高而先升高再降低。这提示毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷和黄芪紫檀烷苷在烘制后脱掉糖基定向转化成了对应的苷元成分,从而使上述黄酮苷类成分含量降低,对应的苷元成分含量增加;然而随着烘制温度的升高,黄酮苷元成分又进一步转化生成了其他化合物,使得苷元类成分含量降低。此外,黄芪异黄酮含量随着烘制温度的升高而降低。各样品的总离子流图见图1,黄芪中12种成分的含量测定结果见表3,140℃烘制黄芪样品中12种成分的提取离子流图见图2。

3 讨论

本研究选取黄芪中的主要皂苷类成分黄芪皂苷 I、II、III、IV 和既存在苷类又存在对应苷元的黄酮类成分(毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮、芒柄花苷和芒柄花素、黄芪异黄酮苷和黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷和黄芪紫檀



注:1.毛蕊异黄酮苷;2.毛蕊异黄酮;3.芒柄花苷;4.芒柄花素;5.黄芪异黄酮苷;6.黄芪异黄酮;7.黄芪紫檀烷苷;8.黄芪紫檀素

Note: 1. calycosin glucopyranoside; 2. calycosin; 3. ononin; 4. formononetin; 5. 2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside; 6. 7, 2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan; 7. 9, 10-dimethoxy-pterocarp-an-glucoside; 8. 3-hydroxy-9, 10-dimethoxy-pterocarp-an

图1 各样品的总离子流图

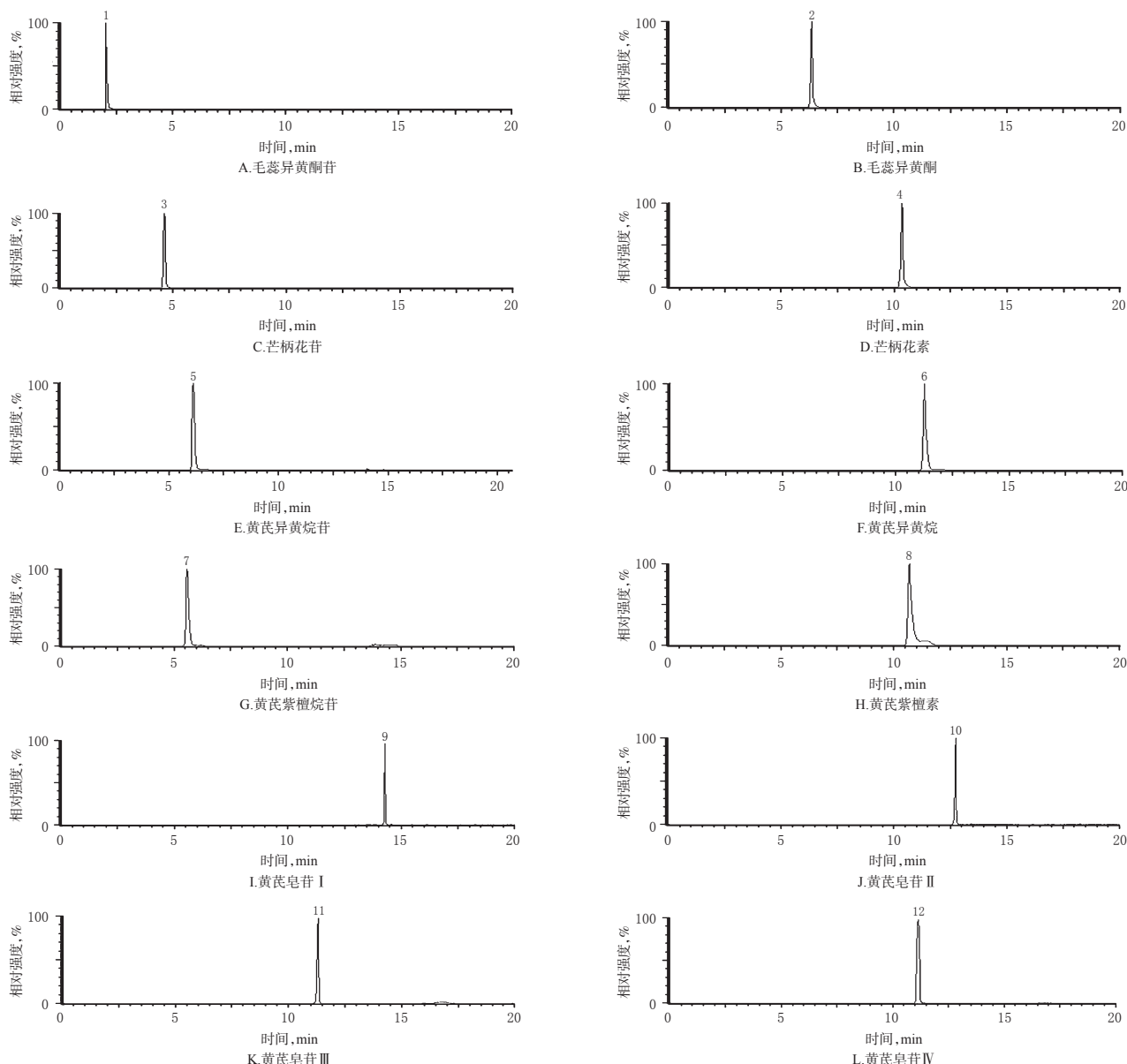
Fig 1 TIC of each sample

表3 黄芪中12种成分的含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 3 Content determination results of 12 components in *A. membranaceus*(mg/g, n=3)

成分	生黄芪含量	不同温度烘制后的黄芪样品含量				
		120℃	140℃	160℃	180℃	200℃
黄芪皂苷 I	1.354 7	1.204 5	1.009 0	0.736 9	0.401 4	0.117 9
黄芪皂苷 II	0.149 3	0.147 4	0.139 7	0.132 4	0.097 1	0.053 3
黄芪皂苷 III	0.024 5	0.017 8	0.017 4	0.014 0	0.008 3	0.005 6
黄芪皂苷 IV	0.002 2	0.002 6	0.003 0	0.004 4	0.006 6	0.009 9
毛蕊异黄酮苷	4.892 7	4.863 8	4.710 9	4.027 1	2.140 9	0.750 0
毛蕊异黄酮	0.888 6	1.101 7	1.154 6	1.202 3	1.273 5	1.779 1
芒柄花苷	2.049 6	1.260 3	1.226 6	1.135 6	0.774 4	0.244 8
芒柄花素	1.074 8	1.298 7	1.335 9	1.483 4	1.539 3	1.903 9
黄芪异黄酮苷	0.952 4	0.935 4	0.834 1	0.725 9	0.485 3	0.309 6
黄芪异黄酮	1.271 5	1.223 9	1.165 4	0.970 1	0.797 7	0.607 8
黄芪紫檀烷苷	1.787 7	1.437 6	1.315 3	1.202 1	0.930 2	0.580 4
黄芪紫檀素	0.246 3	0.312 2	0.269 7	0.098 7	0.016 5	未检出

素)作为含量测定研究的指标性成分。结果显示,黄芪经不同温度烘制后,苷类成分、黄酮苷元类成分含量均发生了变化;建立的UPLC-MS/MS方法可为不同温度定



注: 1.毛蕊异黄酮苷; 2.毛蕊异黄酮; 3.芒柄花苷; 4.芒柄花素; 5.黄芪异黄酮苷; 6.黄芪异黄酮; 7.黄芪紫檀烷苷; 8.黄芪紫檀素

Note: 1. calycosin glucopyranoside; 2. calycosin; 3. ononin; 4. formononetin; 5. 2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside; 6. 7, 2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan; 7. 9, 10-dimethoxy-pterocarpan-glucoside; 8. 3-hydroxy-9, 10-dimethoxy-pterocarpan

图2 140 °C烘制黄芪样品中12种成分的提取离子流图

Fig 2 Extraction ion current diagram of 12 components in *A. membranaceus* baked under 140 °C

向炮制黄芪后其苷类和苷元成分含量影响的分析提供方法参考。

蜜炙法一般使用文火进行炒制,而文火温度通常为(130±10) °C,所以本研究将120 °C设为起始温度,然后以每次增加20 °C作为梯度依次递增至300 °C,以考察温度对黄芪中苷类和苷元成分含量变化的影响趋势。但由于温度在220~300 °C时黄芪皂苷、黄酮苷及其对应的苷元成分基本上都发生了分解,均未检出,故在结果中未展示这一温度范围烘制黄芪后苷类和苷元成分含量变化。

综上,所建立的UPLC-MS/MS法可用于黄芪中12

种成分含量的测定;黄芪经不同温度炮制后,苷类成分含量总体呈降低趋势,苷元成分含量总体呈升高趋势。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:302-303.
- [2] 蔡金坊,代云桃,肖永庆,等.系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的改变[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(8):47-52.
- [3] HATTORI M, KIM G, MOTOIKE S, et al. Metabolism of sennosides by intestinal flora[J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(4):1338-1346.

当归藤补血有效部位的筛选及其补血机制研究[△]

刘玟君*, 阙祖亮, 李金洲, 陈子隽, 黄周艳, 庞丹清, 陈良妮, 陈勇[#](广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)03-0293-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.03.08

摘要 目的:考察当归藤不同提取部位对血虚模型小鼠的补血作用,并探索其作用机制。方法:将70只小鼠随机分为空白对照组(水)、模型对照组(水)、阳性对照组(当归补血口服液,324 g/kg)和当归藤石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位组(给药剂量依次为4.2、10.64、22.07、5.0 g/kg,以提取部位浸膏计),每组10只。小鼠均灌胃给药,每天1次,连续给药14 d。除空白对照组外,其余各组小鼠均于开始给药的第12、13天时腹腔注射环磷酰胺(80 mg/kg)复制血虚模型。末次给药30 min后,采用全自动血细胞分析仪检测小鼠外周血象指标[白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、红细胞压积(HCT)、血小板计数(PLT)和血红蛋白浓度(HGB)]水平;采用酶联免疫吸附法测定小鼠血清中白细胞介素2(IL-2)、IL-3、IL-6、促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)水平;计算小鼠胸腺指数与脾指数。结果:与空白对照组比较,模型对照组小鼠各血象指标水平、血清中IL-2、IL-3、IL-6、EPO、G-CSF、M-CSF、VCAM-1水平以及胸腺指数均显著降低,脾指数显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,当归藤石油醚部位组小鼠上述指标差异均无统计学意义($P > 0.05$);当归藤乙酸乙酯部位组小鼠外周血RBC、HGB、PLT水平、血清中IL-2、IL-6、G-CSF、M-CSF、VCAM-1水平以及胸腺指数显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余指标差异无统计学意义($P > 0.05$);除当归藤水部位组小鼠WBC升高不显著外,当归藤正丁醇部位、水部位组小鼠上述各血象指标和血清因子水平及胸腺指数均显著升高,脾指数均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:当归藤乙酸乙酯、正丁醇和水部位均可提高血虚模型小鼠的免疫功能和造血因子的表达,具有一定的补血作用。

关键词 当归藤;补血作用;部位筛选;环磷酰胺;造血因子;免疫功能;小鼠

Study on Screening of Effective Components of *Embelia parviflora* for Tonifying Blood and Its Mechanism

LIU Wenjun, QUE Zuliang, LI Jinzhou, CHEN Zijun, HUANG Zhouyan, PANG Danqing, CHEN Liangni, CHEN Yong(College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the tonifying blood effects of different extract parts of *Embelia parviflora* on blood deficiency model mice, and to explore its mechanism. METHODS: Totally 70 mice were randomly divided into blank control

- [4] El-SEDAWY AI, HATTORI M, KOBASHI K, et al. Metabolism of gentiopicoside (gentiopicrin) by human intestinal bacteria[J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(9): 2435-2437.
- [5] 杜国军. 恒山黄芪道地药材质量标准研究[D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [6] 芮雯, 冯毅凡, 姜苗苗, 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.
- [7] 张桂平, 王东旭. HPLC-PDA法同时测定大黄蛰虫丸中6种成分的含量[J]. *中国药房*, 2019, 30(1): 54-58.
- [8] 陆文瑾, 窦志华, 曹瑞, 等. HPLC法同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分的含量[J]. *中国药房*, 2019, 30(14): 1975-1980.
- [9] 李翔, 朱臻宇, 柴逸峰, 等. HPLC-MS测定黄芪药材中3种成分的含量[J]. *药学学报*, 2006, 41(8): 793-796.
- [10] 张曦, 孙衍国, 梁鑫森, 等. 中药黄芪中异黄酮苷类化合物的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. *精细化工*, 2005, 22(12): 898-902.

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660701);广西自然科学基金项目(No.2016GXNSFAA380148);广西中药药效研究重点实验室(No.17-259-20);广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室(No.桂教科研[2014]6号);国家中医药管理局科研三级实验室中(壮)药化学与质量分析实验室(No.国中医药发2009[21]号)

* 硕士研究生。研究方向:药物质量控制。E-mail: 1509589627@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及其制剂质量分析。E-mail: cy6381@163.com

(收稿日期:2019-09-12 修回日期:2019-11-18)

(编辑:林静)