



李晓杰,魏鹏,穆赢通,等. UPLC-MS 快速测定蒙古黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量方法的建立[J]. 黑龙江农业科学, 2021(11):65-68,69.

# UPLC-MS 快速测定蒙古黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量方法的建立

李晓杰,魏 鹏,穆赢通,王俊杰

(内蒙古农业大学 草原与资源环境学院,内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**为了促进蒙古黄芪药材质量的快速测定,采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(UPLC-MS)对不同产地当年移栽蒙古黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量进行测定。利用超声法辅助甲醇法提取目标产物,Thenmo-C18(Hypersil GOLDaO,100 mm×2.1 mm,1.9 μm)色谱柱检测,在多反应监测(MRM)模式下,以447/142.98 m/z和447/284.64 m/z为定性离子对,447/142.98 m/z为定量离子对,用外标法进行定量。结果表明:毛蕊异黄酮葡萄糖苷在0.018 75~0.600 00 μg·mL<sup>-1</sup>浓度范围内有良好的线性关系( $r=0.992$ ),平均加样回收率为96.6%,RSD为2.701%。不同产地药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定结果显示,通辽市奈曼旗产的含量为0.031%,赤峰市林西县产的含量为0.033%,呼和浩特市产的含量为0.065%,呼和浩特市显著高于通辽市和赤峰市。可见,超声波辅助甲醇 UPLC-MS 法具有操作简单、灵敏、快捷,结果稳定可靠的特点,适合蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的快速测定。

**关键词:**蒙古黄芪;超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(HPLC-MS);多反应监测;毛蕊异黄酮葡萄糖苷

毛蕊异黄酮葡萄糖苷是传统药材蒙古黄芪[Astragalus membranaceus (Fisch.) Bunge var. mongholicus(Bunge.) Hsiao]中的主要有效成分之一,《中华人民共和国药典》规定黄芪药材为豆科多年生草本植物蒙古黄芪和膜荚黄芪的干燥根<sup>[1]</sup>。现代药理研究发现黄芪中含有的皂苷类、多糖类、黄酮类等成分具有调节血压、抗糖尿病等作用,在现代医学上有着良好的药理效果<sup>[2]</sup>。黄芪中异黄酮类化合物主要由异黄酮和异黄酮苷两类组分组成,分别以毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素为主要代表成分,研究表明不同的产地和不同加工方式对其含量有一定影响<sup>[3-7]</sup>。毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量是检测蒙古黄芪药材质量的关键因子,目前对异黄酮类含量的测定主要采用紫外分光光度法、荧光光谱法、高效液相色谱等方法,这些方法满足黄芪药材中各类成分的分析,其中高效液相色谱法(HPLC)是目前《药典》中规定测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的主要方法,测得

的成分含量较为准确,逐渐运用到黄芪中异黄酮类成分的含量测定上,但高效液相色谱法(HPLC)存在耗时长、干扰因子过多、检测灵敏度及分离度不高等问题<sup>[8-11]</sup>。

本研究对不同产地蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量进行测定,建立的超声波辅助甲醇(UPLC-MS)法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的方法具有快速准确、高效灵敏的特点,可为蒙古黄芪药材主要有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的快速测定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试蒙古黄芪药材采集于内蒙古地区(产地及采集时间详见表1)。由内蒙古农业大学草原与资源环境学院王俊杰教授鉴定为蒙古黄芪。

供试毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品为北京恒元启天化工技术研究院提供。甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸为质谱专用,试验用水为娃哈哈牌矿泉水。

供试仪器有超高效液相色谱仪(Ulti-Mate3000 美国 Thermo Scientific 公司)、三重四极杆质谱仪(TSQ Quantum Access Mass 美国 Thermo Scientific 公司)、超声波清洗器(SB25-12DTDN 型宁波新芝生物科技股份有限公司)、

收稿日期:2021-07-07

基金项目:内蒙古科技重大专项“饲药两用地蒙药材标准化种植产业体系研究”(zdzx2018049);国家中药标准化项目“玉屏风颗粒的全过程控制与标准化研究”(ZYBZH-C-GD-08)。

第一作者:李晓杰(1995-),女,在读博士,从事饲草生产与药用植物栽培研究。E-mail:916562002@qq.com。

通信作者:王俊杰(1962-),男,博士,教授,博导,从事药用植物与牧草种质资源育种研究。E-mail:jjw62@163.com。

循环多用真空泵(SHB-3 型, 郑州长城科工贸有限公司)、旋转蒸发仪(RE-52 型, 上海振捷实验设备有限公司)、万分之一天平(XPR2 型)。

表 1 供试材料

编号	产地	收集时间/(年-月-日)
1	通辽市奈曼旗	2019-10-25
2	赤峰市临西县	2019-09-28
3	呼和浩特市黄合少镇	2019-10-31

1.2 方法

供试蒙古黄芪药材于 2019 年 12 月在内蒙古农业大学草原与资源环境学院药用植物栽培与鉴定实验室进行样品打磨、过筛, 2019 年 1 月在草地资源教育部重点实验室对各份样品进行提取测定。

1.2.1 对照品溶液制备 精密称定毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 300  $\mu\text{g}$ , 加甲醇溶解制成 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准储备液。0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜滤过, 定容于 10 mL 棕色容量瓶即得。

1.2.2 供试品溶液制备 精密称取蒙古黄芪药材样品粉末(过 80 目筛)各 2.0 g, 放置在具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量后密塞, 摇匀, 超声处理 3 次, 每次 30 min, 取出后放冷, 再称定质量, 用甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 40  $^{\circ}\text{C}$  以下减压回收溶剂至干, 残渣精密加入超纯水溶解, 定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 即得。

1.2.3 质谱条件 离子源为电喷雾电离  $\text{ESI}^{+}$ , 喷雾电压值 3.00 kV, 雾化温度 350  $^{\circ}\text{C}$ , 鞘气压力 35, 辅助气值 12, 毛细管温度 300  $^{\circ}\text{C}$ , 定性离子对、定量离子对、锥孔电压碰撞能量参数详见表 2。

表 2 质谱检测参数

名称	定性离子 对( $m/z$ )	定量离子 对( $m/z$ )	锥孔电 压/V	碰撞能 量/eV
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447/142.98	447/142.98	85	32
	447/284.64			

1.2.4 色谱条件 色谱柱: Thenmo-C18 柱(Hypersil GOLDAO, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 0.1% 甲酸溶液, 采用多步梯度洗脱条件, 流速: 0.3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 洗脱比例详见

表 3; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量为 5  $\mu\text{L}$ 。

1.2.5 数据分析 质谱数据分析系统为 Xcaliber 2.1, 数据处理采用 SAS 9.0 和 DPS 7.5 对不同产地药材成分含量进行单因素方差分析, 图像处理采用 Excel 2016。

表 3 流动相组成

时间/min	流速/ ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0.1% 甲酸溶液	乙腈
0	0.3	30	70
1.5	0.3	30	70
1.5	0.3	70	30
10.0	0.3	70	30

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用电喷雾正离子模式对毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液在 50~1 000  $m/z$  范围内对分子量 447 进行质谱全扫描分析, 在正离子模式下获得毛蕊异黄酮葡萄糖苷的分子离子峰为 447  $m/z$ , 在该模式下, 对分子离子进一步做子离子扫描, 142.98  $m/z$  和 284.64  $m/z$  的峰度最高, 因此以 447  $m/z$  作为反应监测的母离子, 以 142.98  $m/z$  和 284.64  $m/z$  作为反应监测的子离子。对各项质谱条件逐一优化后确定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质谱检测条件。

2.2 色谱检测结果

在 1.2.4 色谱条件下蒙古黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 MRM 离子流图详见图 1, 可知毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留时间为 1.14 min。

2.3 线性关系考察

精密吸取稀释后浓度为 0.600 00, 0.300 00, 0.150 00, 0.075 00, 0.037 50 和 0.018 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 以峰面积(Y)为纵坐标, 对照品进样量( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $Y=0.006X+42\ 857$ ,  $r=0.999\ 9$ 。结果表明, 在 0.018 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  情况下信噪比等于 3 027, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量在 0.018 75~0.600 00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

取供试样品溶液 5  $\mu\text{L}$ , 按 1.2.4 色谱条件连续进样 6 次, 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的峰面积

积分比值计算 RSD 的值为 1.392 3%,说明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取 1.2.2 中供试品溶液,按 1.2.4 中色谱条

件进样检测,分别于 0,2,4,8,12,24 h 依次进样测定,每次进样 5 μL。测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积积分比值 RSD 的值为 2.164 7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

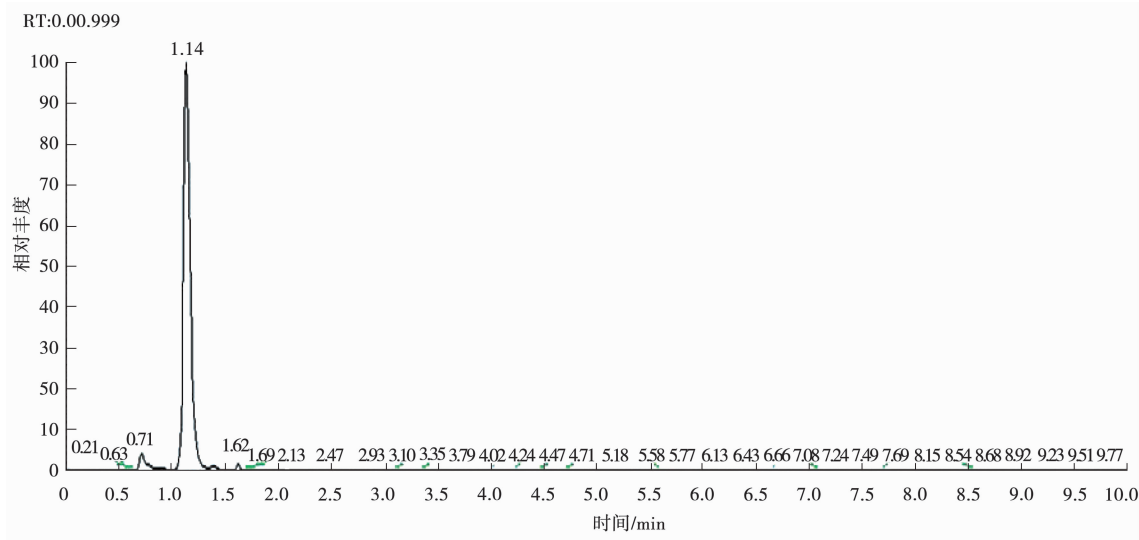


图 1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 MRM 离子流图

2.6 重现性试验

精密称取同一批次蒙古黄芪药材,按 1.2.2 的方法制备成供试品溶液 6 份,按 1.2.4 的色谱条件进样测定,进样量为 5 μL,计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量平均值为 0.063%,RSD 值为 2.600 4%,表明特征图谱的测定方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品粉末 2 g,共 5 份,分别精密称取相应量的毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准品,按照 1.2.2 的方法制备供试品溶液,并按照 1.2.4 的色谱条件进行测定,进样量为 5 μL,计算回收率,结果详见表 5。

表 5 加样回收率结果

成分	样品量/g	样品含量/μg	加入量/μg	测得值/μg	回收率/%	RSD/%
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2	395.3	180	570.4	97	2.701
	2	618.8	171	776.6	92	
	2	563.4	312	869.5	98	
	2	534.4	283	811.4	97	
	2	261.8	30	291.7	99	

2.8 不同产地样品成分含量测定

按照 1.2.2 的方法制备供试品溶液 3 份,精密吸取 5 μL,按 1.2.4 的色谱条件对内蒙古自治区通辽市奈曼旗、赤峰市临西县、呼和浩特市黄合少镇蒙古黄芪药材样品有效成分含量进行测定。从表 6 中可以看出,3 个产地蒙古黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量均符合药典要求的最低限度 0.02%,其中,呼和浩特产药材毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量较其他两个地区高 50%,可以看出,不同

产地和不同的收获时间的药材主要有效成分含量有较大差异。

表 6 3 种不同产地蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量

产地	毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量/%
通辽市奈曼旗	0.031±0.004 b
赤峰市林西县	0.033±0.007 b
呼和浩特市黄合少镇	0.065±0.015 a

### 3 讨论

#### 3.1 不同产地毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量比较

刘亚令等<sup>[12]</sup>测定了 16 批不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,结果表明,不同产地黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量差异明显,但未对不同产地材料毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量变化规律进行比较分析,因此课题组在后续试验中将继续对蒙古黄芪药材最佳收获时期展开具体探究。本研究结果显示,不同产地毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量存在较大差异,呼和浩特市毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量明显高于赤峰市和通辽市,而通辽市和赤峰市两个地区毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量之间没有显著差异,这可能与产地生态条件、田间栽培技术及药材采收时间有关,主要影响因子如土壤条件、温度、湿度、种植管理采收技术等。本试验中蒙古黄芪主产区内蒙古 3 个地区测得的药材成分含量均高于药典规定的不得少于 0.02% 的标准,显示出蒙古黄芪道地药材的重要性,可为蒙古黄芪药材规范化生产和道地产区区划建设提供参考。

#### 3.2 高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS) 测定成分含量

《中华人民共和国药典》中明确规定毛蕊异黄酮葡萄糖苷是蒙古黄芪药材的主要有效成分之一,因此毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量对药材质量的控制就显得格外重要,建立快速准确的含量测定方法有利于蒙古黄芪药材质量的控制。目前对毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的测定主要采用高效液相色谱-紫外检测法。姚雪莲等<sup>[13]</sup>采用 HPLC 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量出峰时间在 30~40 min 之间;也有采用 HPLC-ELSD 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量出峰时间在 10~20 min 之间的研究<sup>[12,14]</sup>;丁慧等<sup>[15]</sup>采用 HPLC 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量出峰时间在 5~10 min 之间。本文研究结果显示,采用超声波辅助高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS) 法测定蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量操作简单、灵敏度高、结果稳定准确,出峰时间在 1.14 min,较之前的测定方法相比大幅缩短了毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定时间。

### 4 结论

本试验方法学验证结果证明,该方法具有良好的线性、精密度及回收率,与其他测定方法相比,采用多反应测定 (MRM) 的两个碎片离子母离子 447 m/z 和子离子 142.98 m/z、284.64 m/z 对蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行定性和定量,受黄芪中其他物质的干扰较少,分离度好且分析时间大幅度缩短 (1.14 min),灵敏度高,可为蒙古黄芪药材质量的快速测定提供技术方法。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 302-303.
- [2] 闫晋晋, 姚妙, 杨薪正, 等. HPLC 测定不同生长年限蒙古黄芪中黄芪甲苷含量 [J]. 科技创新与应用, 2017(28): 85-87.
- [3] 国辉, 黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008(17): 1482-1485.
- [4] 邱勇波, 刘锦, 武飞. 黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国疗养医学, 2011, 20(5): 435-436.
- [5] 孙玉平, 龚苏晓, 曹煌, 等. 不同加工方法的蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素定量分析 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1678-1681.
- [6] 吴国学. 不同产地黄芪药材中黄酮类成分含量分析 [J]. 山西中医, 2018, 34(6): 59-60.
- [7] 林红强, 杨娜, 王涵, 等. 黄芪的化学成分、药理活性及临床应用研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(38): 45-47, 49.
- [8] 叶飞, 王亚丽, 魏娟娟, 等. 黄芪中黄芪甲苷含量测定的最新研究进展 [J]. 宁夏师范学院学报, 2018, 39(4): 52-56.
- [9] 刘宗彬, 孙英华, 陈凤清. 黄芪黄酮的超声辅助提取工艺研究 [J]. 白城师范学院学报, 2015, 29(5): 6-9.
- [10] 吴国学. 不同产地黄芪药材中黄酮类成分含量分析 [J]. 山西中医, 2018, 34(6): 59-60.
- [11] 张宝成, 吴剑, 秦亚东, 等. 三维同步荧光光谱法测定黄芪中芒柄花素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 67-70.
- [12] 刘亚令, 耿雅萍, 黄小苏, 等. 基于 HPLC 法测定不同产地黄芪总黄酮和异黄酮的含量 [J]. 山西农业大学学报 (自然科学版), 2019, 39(5): 54-61.
- [13] 姚雪莲, 裴彩云, 王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 797-801, 805.
- [14] 杜国军, 秦雪梅, 李震宇, 等. 蒙古黄芪主产区 2 种不同种植模式黄芪药材的质量比较 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3386-3393.
- [15] 丁慧, 许纪锋, 沈君子, 等. 黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 223-226.



赵洋,李俊杰,苏喆莹,等.白花桔梗不定根固体培养条件的优化研究[J].黑龙江农业科学,2021(11):69-73.

# 白花桔梗不定根固体培养条件的优化研究

赵 洋,李俊杰,苏喆莹,姜 雯,严一字,吴松权

(延边大学 农学院,吉林 延吉 133002)

**摘要:**为进一步提高白花桔梗的产量,本研究优化了白花桔梗不定根固体培养的条件,包括培养基类型、盐强度、激素浓度和不同生长期有效成分含量。结果表明:白花桔梗不定根培养基的最优条件为 1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 培养基添加 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 吲哚-3-丁酸(IBA),培养 35 d 时有效成分含量最高,且皂苷类化合物含量显著高于总黄酮量和多糖量。

**关键词:**桔梗不定根;固体培养基;外源激素;有效成分

桔梗为桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorus*)的干燥根,始载于《神农本草经》,性平,味苦、辛,归肺经,富含皂苷、类黄酮和多糖等化合物<sup>[1]</sup>。桔梗种质资源以花冠颜色为紫色的植株为主。但紫花株中,有少量白花,白花桔梗为桔梗种植资源带来了新的花色,具有较大的开发潜力<sup>[1-3]</sup>。桔梗具有宣肺、利咽、祛痰、排脓的功效,

临床上多用于治疗咳嗽痰多,胸闷不畅,咽痛音哑,肺痈吐脓等症。桔梗分布广泛,在我国南北方都适宜生长,但其野生资源匮乏,主要依赖于人工栽培<sup>[4]</sup>。不过在栽培过程中常发生病虫害,培养周期长(一般 2~3 年),难以保持遗传稳定性等问题,严重影响了桔梗的品质<sup>[5]</sup>。

不定根培养具有生长周期短、材料来源单一、遗传背景一致、经济方便、重复性强、效率高等优点。不定根培养应用于药用植物,可以快速大量获得药用植物不定根及次生代谢产物,是开发中药资源的一条新途径<sup>[6]</sup>。目前,人参不定根的研究较为系统且非常具有代表性,已达到了规模化

收稿日期:2021-08-18

基金项目:吉林省科研重点项目(20160204)。

第一作者:赵洋(1996—),女,在读硕士,从事特种植物资源与生物技术研究。E-mail:462479028@qq.com。

通信作者:吴松权(1972—),男,博士,副教授,从事特种植物资源与生物技术研究。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn。

## Determination of Calycosin 7-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside in Mongolian Milkvetch Root by UPLC-MS

LI Xiao-jie, WEI Peng, MU Ying-tong, WANG Jun-jie

(School of Grassland and Resources and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** In order to promote the rapid determination of the quality of mongolian milkvetch root the contents of calycosin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in transplanted mongolian milkvetch root from different habitats were determined by Ultra High-Performance Liquid Chromatography tandem triple quadrupole Mass Spectrometry (UPLC-MS). The target product was extracted by methanol method with the aid of ultrasound, and Thenmo-C18 (Hypersil Goldao, 100 mm×2.1 mm, 1.9  $\mu$ m) was detected by HPLC. Under the MRM mode, 447/142.98 m/z and 447/284.64 m/z were used as the qualitative ion pairs and 447/142.98 m/z as the quantitative ion pairs, quantitative analysis by external standard method. The results showed that there was a good linear relationship in the concentration range of 0.018 75-0.600 00  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.992$ ), the average recovery was 96.6%, RSD was 2.701%. The results showed that the content of Tongliao Naiman Banner was 0.031%, Linxi County, Inner Mongolia was 0.033% and Hohhot was 0.065%, respectively, the Hohhot was significantly higher than in Tongliao and Chifeng. The method established in this research is simple, sensitive, rapid and reliable. It is suitable for the determination of calycosin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in mongolian milkvetch root.

**Keywords:** Mongolian milkvetch root; HPLC-MS; multi-response monitoring; calycosin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside