

HPLC-DAD-ELSD 法测定黄芪经九州虫草双向固体发酵前后 8 种成分的含量[△]

杜以晴*, 于钦辉, 文冉, 菅彤彤, 容蓉, 吕青涛, 张国英[#](山东中医药大学药学院, 济南 250355)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)23-2841-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.23.05

摘要 目的:建立同时测定黄芪经九州虫草双向固体发酵前后毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷Ⅳ、异黄芪皂苷Ⅱ、环黄芪醇、异黄芪皂苷Ⅰ等8种成分含量的方法,并探讨发酵处理对黄芪中上述8种成分含量的影响。方法:采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光检测器联用技术(HPLC-DAD-ELSD)进行含量测定。色谱柱为Agilent 5 TC-C₁₈;流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱;流速为1 mL/min;柱温为30 ℃;DAD检测波长为260 nm;ELSD蒸发管温度为100 ℃;雾化器温度为80 ℃;载气流速为1.6 L/min;进样量为15 μL。结果:8种成分在各自质量浓度范围内线性关系良好(R^2 均大于0.999 0);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%($n=3$ 或 $n=6$);平均加样回收率为97.88%~101.32%,RSD为1.22%~2.39%($n=6$)。以未发酵黄芪中相应成分含量为100%计算,经九州虫草双向固体发酵后,黄芪中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷Ⅳ、异黄芪皂苷Ⅱ、环黄芪醇、异黄芪皂苷Ⅰ的含量变化率分别为-98.51%、-96.41%、-94.74%、-96.40%、289.20%、20.25%、-75.05%、562.46%。结论:黄芪经过九州虫草发酵后,有利于增加其主要活性成分黄芪皂苷Ⅳ、异黄芪皂苷Ⅰ、异黄芪皂苷Ⅱ的含量。

关键词 黄芪;九州虫草;双向固体发酵;高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光检测器联用技术;含量测定

Content Determination of 8 Components in *Astragalus membranaceus* before and after Bidirectional Solid Fermentation with *Cordyceps kyushuensis* by HPLC-DAD-ELSD

DU Yiqing, YU Qinhui, WEN Ran, JIAN Tongtong, RONG Rong, LYU Qingtao, ZHANG Guoying (School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of calycosin glucoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, isoastragaloside II, cycloastragenol and isoastragaloside I in *Astragalus membranaceus* before and after bidirectional solid fermentation with *Cordyceps kyushuensis*, and to investigate the effects of fermentation on the contents of above 8 components in *A. membranaceus*. METHODS: HPLC-DAD-ELSD was adopted. The determination was performed on Agilent 5 TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃. DAD detection wavelength was set at 260 nm, ELSD evaporation tube temperature was 100 ℃, atomizer temperature was 80 ℃, carrier gas flow rate was 1.6 L/min; injection volume was 15 μL. RESULTS: The eight components had a good linear relationship within their respective ranges of concentration (all $R^2 > 0.999 0$); RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 3% ($n=3$ or $n=6$); the recoveries was 97.88% -101.32%, and RSDs were 1.22% -2.39% ($n=6$). Setting the content of components in unfermented *A. membranaceus* as 100%, after bidirectional solid fermentation with *C. kyushuensis*, the change rates of 8 components were -98.51%, -96.41%, -94.74%, -96.40%, 289.20%, 20.25%, -75.05%, 562.46%, respectively. CONCLUSIONS: After fermentation with *C. kyushuensis*, the contents of active components as astragaloside IV, isoastragaloside I and isoastragaloside II can be increased significantly in *A. membranaceus*.

KEYWORDS *Astragalus membranaceus*; *Cordyceps kyushuensis*; Bidirectional solid fermentation; HPLC-DAD-ELSD; Content determination

黄芪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^[1], 是传

统补气要药之一。黄芪含有皂苷类、黄酮类、多糖类和氨基酸类等有效成分^[2], 具有增强免疫功能、保护心脏、双向调节血压、降血糖、抗衰老、抗肿瘤、抗病毒、抗过敏性鼻炎和保护神经等作用^[3-4], 在临床上广泛应用于治疗病毒性心肌炎、糖尿病、肝纤维化、肿瘤、上呼吸道感染等病症^[5]。

九州虫草 *Cordyceps kyushuensis* Kob 为寄生于豆天

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21807066)

* 硕士研究生。研究方向:中药及复方活性成分与质量控制研究。E-mail:1638558099@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药用真菌活性成分研究。E-mail:zhangguoying2000@126.com

蛾 *Clanis bilineata* Walker 幼虫体上的虫草真菌^[6],具有良好的清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力,其抗氧化性能与冬虫夏草基本相当^[7-8],且其不同提取物对非小细胞肺癌、人白血病细胞株 U937、HL-60 以及人肝癌细胞株 Bel-7402 等均有显著的抑瘤作用^[9-11],呈现出良好的抗肿瘤药用前景。双向固体发酵是将传统中药与现代生物技术的优势相结合,使用中药材作为药性基质取代或添加至真菌培养基,药性基质与真菌相互作用,基质提供真菌发酵过程中所需的营养成分,真菌在中药材所含活性成分基础上通过发酵产生新的成分,可提高中药药效、产生新的性味和功能、降低毒副作用^[12-13]。例如,板蓝根经槐耳真菌双向固体发酵后的发酵物被证实具有抑制肿瘤细胞增殖和转移的作用^[14]。

本课题组前期研究已证实,将具有抗肿瘤活性的九州虫草真菌与具有类似或协同作用的抗癌中药黄芪共同进行发酵后,发酵黄芪对非小细胞肺癌细胞 A549 生长和增殖的抑制作用显著增强。为探讨黄芪经九州虫草双向固体发酵前后的主要化学成分的变化,本研究选择黄芪中 4 种主要黄酮类成分(毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素)及 4 种主要皂苷类成分(黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I)为考察指标,采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光检测器(HPLC-DAD-ELSD)联用技术检测黄芪经九州虫草双向固体发酵前后 8 种成分的含量,用于研究九州虫草双向固体发酵对黄芪化学成分的影响,为阐明黄芪-九州虫草双向固体发酵的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

R-300EL 型旋转蒸发仪[瑞士 Buchi 实验室设备贸易(上海)有限公司];1260 Infinity II 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);116B 型摇摆式高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240 型十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪药材购自山东省济南市建联大药房(批号:20181001),经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var 的干燥根;毛蕊异黄酮苷对照品(批号:M-020-170926)、芒柄花苷对照品(批号:M-013-160906)、毛蕊异黄酮对照品(批号:M-021-170517)、芒柄花素对照品(批号:C-018-160304)、黄芪皂苷 IV 对照品(批号:H-045-160721)、异黄芪皂苷 II 对照品(批号:Y-139-171012)、环黄芪醇对照品(批号:H-051-170426)、异黄芪皂苷 I 对照品(批号:Y-137-171011)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均大于 98%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为实验室自制超纯水。

1.3 菌种

野生九州虫草采自山东蒙山天麻林场,由中科院北京微生物研究所郭英兰研究员鉴定其无性型菌株为九州轮枝菌;人工九州虫草系由无性型菌株回接人工固体培养基栽培后获得,九州虫草菌丝体系无性型菌株液体培养获得,由山东大学微生物技术国家重点实验室提供。本研究九州虫草菌株与文献[15]中涉及的为同一菌株,且培育方法一致。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

分别称取毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I 对照品各适量,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇制成各成分质量浓度分别为 0.320、0.120、0.100、0.128、1.000、0.400、0.800、0.800 mg/mL 的混合对照品溶液,于 4 °C 冷藏,备用。

2.2 九州虫草-黄芪双向固体发酵物的制备

按文献方法^[13]进行九州虫草菌种固体斜面培养和九州虫草液体菌种培养。在此基础上进行黄芪双向固体发酵:称取黄芪药材 4 g、大米 16 g,置于 500 mL 罐头瓶中,加入 35 mL 营养液(以每克大米的质量为标准,葡萄糖含量为 0.5%,蛋白胍含量为 1%,磷酸二氢钾含量为 1%,硫酸镁含量为 0.075%,维生素 B₁ 含量为 0.1%,玉米面含量为 1%,酵母膏含量为 0.7%),覆以封口膜;在 121 °C 下高压灭菌 20 min 后,冷却,每瓶接种 5 mL 九州虫草液体菌种,快速均匀喷撒在固体培养基表面,以上操作均在无菌条件下进行;在 23 °C 避光培养 7 d,然后转为光照培养 13 d,湿度均为 60%,即得九州虫草-黄芪双向固体发酵物(以下简称“发酵黄芪”)。同时,以不加黄芪的发酵物作为空白样品,同法分别平行发酵 3 份。将发酵黄芪、空白样品在阴凉处风干,粉碎后过 40 目筛,置于 -20 °C 冰箱中保存,备用。另外,以黄芪药材作为未发酵样品对照,粉碎后过 40 目筛,置于干燥器中保存,备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取黄芪药材 4 g 以及“2.2”项下发酵黄芪和空白样品各 10 g(均相当于黄芪药材 4 g),精密称定,分别置于 250 mL 圆底烧瓶中,加 20 倍量甲醇(mL/g)回流提取 2 次;每次提取 2.0 h,分别合并提取液,减压浓缩,然后转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得黄芪供试品溶液、发酵黄芪供试品溶液和空白样品供试品溶液。

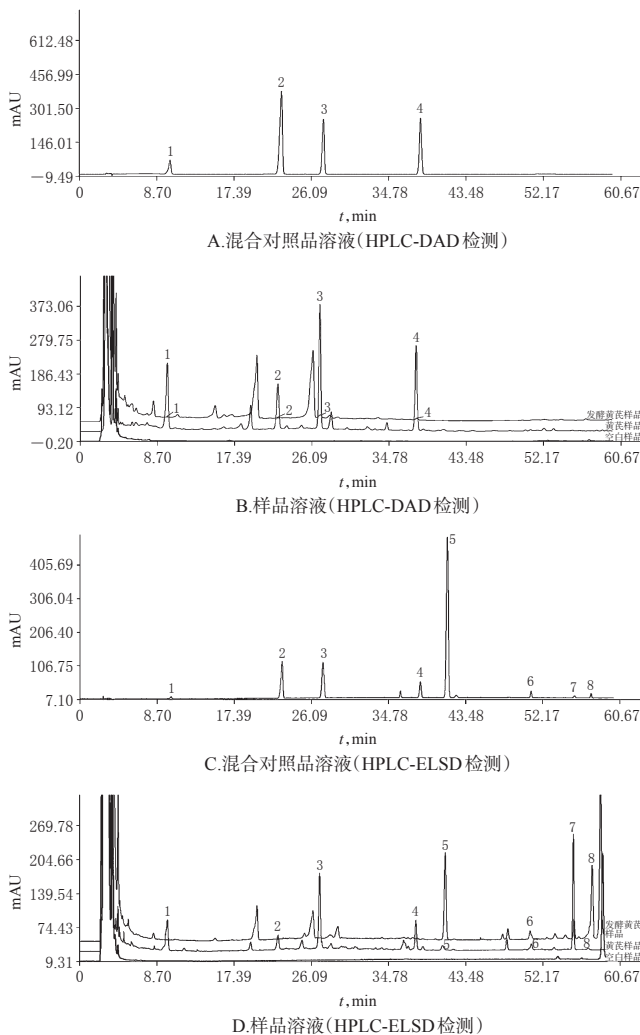
2.4 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 °C;流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 18% A; 10~32 min, 18% A→35% A; 32~40 min, 35% A; 40~57 min, 35% A→53% A; 57~67 min, 53% A→68% A);流速:1.0 mL/min;进样量:15 μL;后运行:10 min。检测方式:HPLC-DAD-ELSD 串联

检测;DAD检测波长:260 nm;ELSD参数:增益值为4,漂移管温度为100 ℃,雾化器温度为80 ℃,载气流速为1.6 L/min。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取“2.1”项下混合对照品溶液及“2.3”项下黄芪供试品溶液、发酵黄芪供试品溶液和空白样品供试品溶液,分别按“2.4”项下色谱条件分析测定,记录色谱图。结果,各待测成分色谱峰与相邻峰间的分离度良好,分离度均大于1.5,理论板数按毛蕊异黄酮苷峰计不低于7 000,且空白样品对待测成分的测定无干扰。色谱图见图1。



注:1.毛蕊异黄酮苷;2.芒柄花苷;3.毛蕊异黄酮;4.芒柄花素;5.黄芪皂苷IV;6.异黄芪皂苷II;7.环黄芪醇;8.异黄芪皂苷I

Note: 1. calycosin glucoside; 2. ononin; 3. calycosin; 4. formononetin; 5. astragaloside IV; 6. isostragaloside II; 7. cycloastragenol; 8. isostragaloside I

图1 混合对照品溶液、样品溶液及空白样品溶液的HPLC-DAD-ELSD色谱图

Fig 1 HPLC-DAD-ELSD chromatograms of mixed control solution, sample solution and blank sample solution

2.5.2 线性关系、检测限和定量限考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液适量,分别用甲醇溶剂稀释成系列不同质量浓度的对照品溶液,每种化合物至少配制6个适当质量浓度的系列对照品溶液。各成分的线性关系考察的质量浓度具体设置如下:毛蕊异黄酮苷为0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5、0.001 25 mg/mL;芒柄花苷为0.12、0.06、0.03、0.015、0.007 5、0.003 75、0.001 88、0.000 94 mg/mL;毛蕊异黄酮为0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25、0.003 13、0.001 56 mg/mL;芒柄花素为0.128、0.064、0.032、0.016、0.008、0.004、0.002、0.001 mg/mL;黄芪皂苷IV为1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL;异黄芪皂苷II为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5 mg/mL;环黄芪醇为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL;异黄芪皂苷I为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL。各系列对照品溶液按“2.4”项下色谱条件分析测定,记录色谱图。其中,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素以峰面积为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x, mg/mL)进行线性回归,计算回归方程;黄芪甲苷、异黄芪皂苷II、环黄芪醇、异黄芪皂苷I以峰面积的对数值为纵坐标(lgy)、质量浓度的对数值为横坐标(lgx, mg/mL)进行线性回归,计算回归方程。另取“2.1”项下混合对照品溶液适量,以甲醇溶剂逐级稀释后按“2.4”项下色谱条件进样测定,以信噪比3:1、10:1分别计算检测限和定量限。结果显示,各待测成分在其各自进样质量浓度范围内呈现良好的线性关系(R^2 均大于0.999 0),检测限和定量限均满足测定要求,结果见表1。

表1 各待测成分的回归方程、定量限及检测限测定结果

Tab 1 Determination results of regression equation, quantification limit and detection limit of each component

待测成分	回归方程	R^2	线性范围,mg/mL	检测限,ng	定量限,ng
毛蕊异黄酮苷	$y=24\ 266x-27\ 821$	1.000 0	0.001 25~0.32	5.6	17.3
芒柄花苷	$y=40\ 106x-18\ 853$	1.000 0	0.000 94~0.12	7.8	25.8
毛蕊异黄酮	$y=68\ 144x-57\ 358$	1.000 0	0.001 56~0.1	6.4	22.5
芒柄花素	$y=70\ 894x-50\ 899$	1.000 0	0.001~0.128	4.3	14.9
黄芪皂苷IV	$\lg y=1.828\ 6\lg x+4.698\ 8$	0.999 1	0.031 25~1	69.0	220.0
异黄芪皂苷II	$\lg y=1.718\ 4\lg x+4.597\ 1$	0.999 5	0.012 5~0.4	57.0	180.0
环黄芪醇	$\lg y=1.318\ 4\lg x+3.972\ 1$	0.999 8	0.025~0.8	98.0	326.0
异黄芪皂苷I	$\lg y=1.684\ 1\lg x+4.685\ 4$	0.999 7	0.025~0.8	45.0	152.0

2.5.3 精密度的试验 取“2.1”项下的混合对照品溶液适量,按“2.4”项下色谱条件进样测定,连续测定6次,记录色谱图并计算峰面积的RSD值,以考察日内精密度的。每天测定2次,连续测定3 d,记录色谱图并计算峰面积的RSD值,以考察日间精密度的。结果显示,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷IV、异黄芪皂苷II、环黄芪醇、异黄芪皂苷I的日内精密度的RSD分

别为 0.72%、0.23%、0.78%、0.65%、0.88%、1.15%、0.66%、1.15% ($n=6$), 日间精密度的 RSD 分别为 1.02%、0.36%、0.98%、0.94%、1.04%、1.45%、1.09%、1.54% ($n=3$), 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取“2.3”项下黄芪供试品溶液, 分别于制备后室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时, 按“2.4”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果显示, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I 峰面积的 RSD 分别为 1.41%、1.38%、0.79%、1.29%、1.35%、1.12%、1.02%、1.60% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内具有良好的稳定性。

2.5.5 重复性试验 取同一批次黄芪样品适量, 共 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法分别制备 6 份黄芪供试品溶液, 然后按“2.4”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 根据标准曲线回归方程计算各成分含量。结果显示, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I 的平均含量分别为 0.368 9、0.166 5、0.198 1、0.144 1、0.121 9、0.113 3、0.908 6、0.047 78 mg/g, RSD 分别为 1.69%、0.94%、1.82%、1.48%、1.05%、1.20%、1.47%、1.38% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率测定 取已知含量的黄芪样品 2.00 g, 共 6 份, 精密称定, 分别定量加入毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I 对照品各适量, 再按“2.3”项下方法制成供试品溶液, 然后按“2.4”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 根据标准曲线回归方程计算各成分的加样回收率。结果显示, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 II、环黄芪醇、异黄芪皂苷 I 的平均加样回收率分别为 101.32%、98.66%、99.28%、100.04%、100.21%、100.37%、99.71%、97.88%, RSD 分别为 1.71%、2.39%、1.37%、1.63%、1.22%、1.95%、2.01%、1.74% ($n=6$), 表明本方法准确度较好, 详见表 2。

2.6 样品含量测定

取黄芪和发酵黄芪各适量, 按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液, 然后分别按“2.4”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 并根据标准曲线回归方程计算各待测成分含量。平行 3 份操作。采用 SPSS 22.0 软件对两组样品进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。以未发酵黄芪中各成分含量为 100% 计, 计算发酵黄芪中各成分的变化率[变化率(%) = (发酵黄芪中平均含量 - 未发酵黄芪中平均含量) / 未发酵黄芪中平均含量 $\times 100\%$]。结果显示, 发酵后黄芪中 8 种成分的含量较发酵前均发生了显著变化 ($P < 0.05$), 其中黄芪皂苷 IV、黄芪皂苷 IV、异黄芪皂苷 I 的含量均显著增加, 其余 5 种成分含量均显著减少, 结果见表 3。

表 2 加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests ($n=6$)

待测成分	样品中含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
毛蕊异黄酮	0.751 8	0.750 0	1.517 6	102.10	101.32	1.71
	0.750 3	0.750 0	1.487 9	98.35		
	0.753 5	0.750 0	1.527 7	103.23		
	0.751 4	0.750 0	1.504 8	100.45		
	0.751 0	0.750 0	1.511 3	101.37		
	0.752 6	0.750 0	1.520 8	102.43		
芒柄花素	0.339 0	0.340 0	0.669 6	97.24	98.66	2.39
	0.340 1	0.340 0	0.685 0	101.45		
	0.340 5	0.340 0	0.671 6	97.37		
	0.335 8	0.340 0	0.669 3	98.09		
	0.334 9	0.340 0	0.661 6	96.08		
	0.334 9	0.340 0	0.680 7	101.72		
毛蕊异黄酮	0.401 5	0.400 0	0.793 1	97.89	99.28	1.37
	0.400 7	0.400 0	0.795 8	98.16		
	0.403 2	0.400 0	0.799 4	99.05		
	0.401 9	0.400 0	0.797 6	98.92		
	0.398 8	0.400 0	0.799 1	100.07		
	0.402 1	0.400 0	0.808 3	101.56		
芒柄花素	0.281 5	0.280 0	0.562 5	100.35	100.04	1.63
	0.283 6	0.280 0	0.563 2	99.87		
	0.280 7	0.280 0	0.557 8	100.77		
	0.287 0	0.280 0	0.569 2	100.80		
	0.285 3	0.280 0	0.572 4	102.54		
	0.287 0	0.280 0	0.554 4	97.75		
黄芪皂苷 IV	0.253 8	0.250 0	0.501 7	99.14	100.21	1.22
	0.250 5	0.250 0	0.501 1	100.23		
	0.250 7	0.250 0	0.502 5	100.72		
	0.251 5	0.250 0	0.503 6	100.84		
	0.254 0	0.250 0	0.508 8	101.93		
	0.252 4	0.250 0	0.498 8	98.56		
异黄芪皂苷 II	0.238 0	0.230 0	0.464 8	98.59	100.37	1.95
	0.230 9	0.230 0	0.458 7	99.05		
	0.230 0	0.230 0	0.457 0	98.71		
	0.234 8	0.230 0	0.470 6	102.54		
	0.235 4	0.230 0	0.466 2	100.34		
	0.230 7	0.230 0	0.467 6	102.98		
环黄芪醇	1.833 4	1.800 0	3.659 7	101.46	99.71	2.01
	1.800 5	1.800 0	3.616 0	100.86		
	1.813 4	1.800 0	3.565 0	97.31		
	1.831 6	1.800 0	3.605 3	98.54		
	1.800 2	1.800 0	3.565 5	98.07		
	1.830 2	1.800 0	3.670 7	102.15		
异黄芪皂苷 I	0.123 7	0.120 0	0.239 6	96.61	97.88	1.74
	0.121 5	0.120 0	0.238 4	97.44		
	0.120 4	0.120 0	0.243 1	96.23		
	0.121 5	0.120 0	0.242 3	100.70		
	0.123 0	0.120 0	0.241 9	99.12		
	0.124 0	0.120 0	0.240 6	97.18		

3 讨论

3.1 检测成分的选择

黄酮类化合物和皂苷类化合物是黄芪的主要活性成分。现代药理研究表明, 黄芪中黄酮类化合物和皂苷类化合物在抗病毒、抗氧化、神经保护、抗肿瘤、抗炎等方面具有广泛的药理活性^[16-17]。其中, 毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮具有抗氧化、抗病毒等药理作用^[18-19]; 芒柄花

表3 黄芪发酵前后8种成分含量测定结果

Tab 3 Contents of 8 components in *A. membranaceus* before and after fermentation

待测成分	含量($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)		变化率, %
	黄芪	发酵黄芪	
毛蕊异黄酮苷	0.376 9 \pm 0.012 2	0.005 6 \pm 0.000 6 [*]	-98.51
芒柄花苷	0.169 9 \pm 0.005 0	0.006 1 \pm 0.000 7 [*]	-96.41
毛蕊异黄酮	0.201 7 \pm 0.009 5	0.010 6 \pm 0.002 4 [*]	-94.74
芒柄花素	0.144 4 \pm 0.002 0	0.005 2 \pm 0.000 2 [*]	-96.40
黄芪皂苷IV	0.126 9 \pm 0.009 2	0.493 9 \pm 0.005 5 [*]	289.20
异黄芪皂苷II	0.119 0 \pm 0.002 3	0.143 1 \pm 0.003 9 [*]	20.25
环黄芪醇	0.916 7 \pm 0.022 5	0.228 7 \pm 0.004 4 [*]	-75.05
异黄芪皂苷I	0.061 8 \pm 0.009 6	0.409 4 \pm 0.005 0 [*]	562.46

注:与黄芪(未发酵)比较, * $P < 0.05$

Note: vs. *A. membranaceus* (non-fermentation), * $P < 0.05$

苷、芒柄花素具有体外抗乳腺癌的药理作用^[20-21];黄芪皂苷IV具有抑制非小细胞肺癌(A549细胞)的生长和增殖^[22]、抗心力衰竭^[23]、抗衰老^[24]、保护心肌细胞^[25]等多种作用;异黄芪皂苷II具有抗炎^[26]作用;环黄芪醇具有激活端粒酶的活性、抗衰老^[27]等作用;异黄芪皂苷I具有抗炎^[28]、改善胰岛素抵抗和治疗糖尿病^[29]的作用。因此,本研究选择毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素4种黄酮类成分及黄芪皂苷IV、异黄芪皂苷II、环黄芪醇、异黄芪皂苷I 4种皂苷类成分同时作为指标性成分来探究双向固体发酵对黄芪有效活性成分的影响。

3.2 色谱条件的优化

因皂苷类化合物没有共轭双键,用紫外检测器检测的灵敏度较低,故DAD不适合用于黄芪中皂苷类化合物的检测。与DAD检测器的原理不同,ELSD检测器是质量型检测器,具有通用性好、响应信号不受其官能团影响的特性,适合用于检测皂苷类等没有紫外吸收的化合物,但其具有灵敏度低、检测下限高的缺点^[30]。因此,本研究选择DAD来检测样品中的黄酮类化合物,ELSD检测器来检测皂苷类化合物。在前期研究中,笔者比较了不同流动相系统(甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液等)的分离效果,发现0.1%甲酸水溶液可明显改善色谱峰峰形,而乙腈-0.1%甲酸水溶液明显比甲醇-0.1%甲酸水溶液分离度更好,因此本研究最终选择乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相系统。此外,通过优化雾化器和蒸发管的温度、干燥气流速等,提高了皂苷类化合物的检测灵敏度,最终建立了HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪发酵前后8种成分的定量方法。与王亚丽等^[31]建立的类似成分含量测定方法相比,本方法在缩短了检测时间的同时还获得了较好的分离度,节约了分析的时间成本,为多指标控制发酵黄芪的质量提供了方法基础。

3.3 九州虫草双向固体发酵对黄芪中8种成分含量的影响

本研究测定了黄芪经九州虫草双向固体发酵前后8种成分的含量变化,其中发酵黄芪中黄芪皂苷IV的含量

与2015版《中国药典》(一部)(后文简称“药典”)中黄芪项下黄芪皂苷IV含量标准($\geq 0.040\%$)^[1]相比偏低。笔者分析原因可能是本研究的提取方法与药典的提取方法不同所致,由于药典方法中氨水洗涤会造成其他皂苷类成分向黄芪皂苷IV的转化,使黄芪皂苷IV含量偏高,如果应用到本研究中将无法解释黄芪皂苷IV含量增加的原因,故本研究选择了较为通用的甲醇回流提取方法。结果显示,本研究中黄芪皂苷IV的含量测定结果与文献^[32]的测定结果较一致。

本研究结果显示,发酵黄芪中4种黄酮类化合物的含量较未发酵黄芪均显著降低。文献研究表明,黄芪经解淀粉芽孢杆菌液体发酵后毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量显著降低^[33],这与本研究结果相似——4种皂苷类成分除环黄芪醇外,其他3种成分的含量均显著增加。侯美如等^[34]研究发现,黄芪经解淀粉芽孢杆菌固体发酵后,黄芪皂苷IV的含量仅增加了37.95%。但本研究中,发酵后黄芪的主要活性成分黄芪皂苷IV增加了289.20%。本课题组前期已证实经九州虫草双向固体发酵后的黄芪发酵物对A549细胞生长、增殖的能力显著增强,因此笔者推测黄芪皂苷IV含量的增加可能是发酵黄芪对A549细胞的抑制作用增强的原因之一。

环黄芪醇是黄芪皂苷IV合成的前体化合物^[35]。本研究中,黄芪在发酵后其环黄芪醇的含量显著下降,而黄芪皂苷IV的含量显著增加,因此笔者推测环黄芪醇有可能在发酵过程中转化成了黄芪皂苷IV。本研究结果表明,发酵前后黄芪中总皂苷含量几乎一致,但存在皂苷类化合物之间相互转化,如黄芪皂苷IV、异黄芪皂苷I、异黄芪皂苷II的含量显著增加,其中异黄芪皂苷II增加了20.25%、异黄芪皂苷I增加了562.46%。结合各成分的药理活性,笔者推测发酵黄芪的抗肿瘤、抗衰老、抗炎等作用也会显著增加,故可以采用九州虫草-黄芪双向固体发酵技术改变黄芪中活性成分的含量,生产出具有抗肿瘤、抗衰老等生物活性的产品。

综上所述,本研究建立了同时测定黄芪经九州虫草双向固体发酵前后8种成分含量测定的HPLC-DAD-ELSD法。结果表明,经九州虫草发酵后,黄芪中黄酮类成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量均显著下降;皂苷类成分除环黄芪醇含量显著下降(降幅75.05%)外,黄芪皂苷IV、异黄芪皂苷II、异黄芪皂苷I含量均显著增加。九州虫草双向固体发酵可显著改变黄芪中有效成分含量,但在此过程中具体产生了何种新物质及其发生的机制还有待于进一步研究。

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] 薛倩倩, 刘晓节, 李科, 等. 黄芪药材化学成分差异的研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(10):1259-1263.
- [3] 聂娟, 谢丽华, 马港圆, 等. 中药黄芪的化学成分及药理作

- 用研究进展[J].湖南中医杂志,2018,34(7):228-231.
- [4] 吴发宝,陈希元.黄芪药理作用研究综述[J].中药材,2004,37(3):232-234.
- [5] 孙洁.黄芪及其经方的临床应用研究进展[J].中国医院药学杂志,2019,39(12):1311-1314.
- [6] 郭英兰,李春燕.中国一新记录种:九州虫草[J].菌物系统,2000,19(2):296.
- [7] 罗毅,程显好,朱林,等.九州虫草的研究进展[J].中国食用菌,2009,28(3):3-6.
- [8] ZHANG GY, YIN QS, HAN T, et al. Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*[J]. *Industrial Crops & Products*, 2015, 69(3): 485-491.
- [9] YU X, LING J, LIU X, et al. Cordycepin induces autophagy-mediated c-FLIPL degradation and leads to apoptosis in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4):6691-6699.
- [10] ZHU ZY, DONG F, LIU X, et al. Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia[J]. *Carbohydr Polym*, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.12.053.
- [11] YOOU MS, JIN MH, LEE SY, et al. Cordycepin suppresses thymic stromal lymphopoietin expression via blocking caspase-1 and receptor-interacting protein 2 signaling pathways in mast cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(1): 90-96.
- [12] 庄毅.中药内的生物制药:固体发酵工程系列及其真菌药物[J].菌物研究,2013,11(2):63-71,88.
- [13] 高慧娟,余梦瑶,江南,等.双向固体发酵对川芎活血化淤的增效作用[J].时珍国医国药,2011,22(6):1370-1372.
- [14] LIU Z, TANG Y, ZHOU R, et al. Bi-directional solid fermentation products of *Trametes robiniophila* Murr with *Radix Isatidis* inhibit proliferation and metastasis of breast cancer cells[J]. *Chin Med Assoc*, 2018, 81(6): 520-530.
- [15] 赵璇.九州虫草微生物组学分析及基于系统药理学的生物活性初步研究[D].济南:山东大学,2019.
- [16] 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.
- [17] 马园园,王静,罗琼,等.黄芪总皂苷药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(7):153-157.
- [18] 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.
- [19] 张俊杰,钟婧,张淑静,等.毛蕊异黄酮对流感病毒感染HUVEC细胞通透性及其MLC磷酸化的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(6):1368-1372,1547-1548.
- [20] 左方,陈诚,任茜.芒柄花苷的体外抗乳腺癌作用及机制研究[J].中国药理学杂志,2020,55(3):194-198.
- [21] 贾绍华,刘丽娜,颜廷华.芒柄花素诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡及其氧化应激的机制[J].华西药理学杂志,2020,35(4):385-391.
- [22] DAI PC, LIU DL, ZHANG L, et al. Astragaloside IV sensitizes non-small cell lung cancer cells to gefitinib potentially via regulation of SIRT6[J]. *Tumour Biol*, 2017. DOI: 10.1177/1010428317697555.
- [23] ZANG Y, WAN J, ZHANG Z, et al. An updated role of astragaloside IV in heart failure[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110012.
- [24] LIU X, SHANG S, CHU W, et al. Astragaloside IV ameliorates radiation-induced senescence via antioxidative mechanism[J]. *Pharm Pharmacol*, 2020, 72(8): 1110-1118.
- [25] WU Y, FAN Z, CHEN Z, et al. Astragaloside IV protects human cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating miR-101a[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470(1/2):41-51.
- [26] LEE DY, NOH HJ, CHOI J, et al. Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus*[J]. *Molecules*, 2013, 18(4):3725-3732.
- [27] 李曼,王志菲.环黄芪醇的药理作用研究进展[J].中医学报,2020,35(5):983-989.
- [28] LIU H, HUANG F, WU H, et al. Isoastragaloside I inhibits NF- κ B activation and inflammatory responses in BV-2 microglial cells stimulated with lipopolysaccharide[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4):1270-1276.
- [29] XU A, WANG H, HOO RL, et al. Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(2):625-633.
- [30] 韩吴琦,黄永丽.ELSD-HPLC同时测定乳癖消片中三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁的含量[J].中医研究,2020,33(7):61-63.
- [31] 王亚丽,田曼,李江,等.HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪中10个成分的含量[J].中南药学,2018,16(9):1268-1271.
- [32] QI LW, YU QT, LI P, et al. Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1/2):162-169.
- [33] 侯美如,尹琚伊,王岩,等.黄芪发酵前后黄酮含量及指纹图谱比较研究[J].中国兽药杂志,2018,52(5):49-55.
- [34] 侯美如,尹琚伊,王岩,等.发酵对黄芪中黄芪甲苷含量的影响[J].动物医学进展,2018,39(4):55-58.
- [35] LIU T, LIAO JX, HU Y, et al. Synthetic access toward cycloastragenol glycosides[J]. *J Org Chem*, 2017, 82(8): 4170-4178.

(收稿日期:2020-05-29 修回日期:2020-10-27)

(编辑:林 静)