

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.08

黄芪发酵前后黄酮含量及指纹图谱比较研究

侯美如,尹琚伊,王 岩,刘 宇,陈楠楠,秦平伟,史同瑞*,杨淑萍

(黑龙江省兽医科学研究所,黑龙江齐齐哈尔 161006)

[收稿日期] 2017-08-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0049-07 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 应用 HPLC-UV 法比较发酵前后黄芪中 4 种黄酮含量及色谱图变化,旨在为发酵黄芪制品提供质控数据。采用色谱条件为 Inertsustain C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水系统,梯度洗脱,检测波长:254 nm,柱温:25 ℃,流速:1 mL/min,进样量:20 μL。该方法中毛蕊异黄酮苷在 12.34~790 mg/L、刺芒柄花苷在 5.0~320 mg/L、毛蕊异黄酮在 4.53~290 mg/L、芒柄花素在 9.53~610 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系,不同成分色谱峰分离程度较好。测定结果表明,黄芪经发酵后,毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素含量发生显著变化,其中发酵黄芪含量分别为 12.236 ± 0.232 、 0.201 ± 0.021 和 0.737 ± 0.041 mg/g,对照黄芪含量分别为 0.327 ± 0.013 、 5.453 ± 0.078 和 12.847 ± 0.118 mg/g;发酵前后色谱图差异显著,说明生物发酵可使黄芪成分及其含量发生较大变化,试验可为黄芪发酵制品的质量控制提供借鉴。

[关键词] 固体发酵;黄酮;HPLC-UV

Comparative Research on Composition of Flavonoid Content and Fingerprint Before and After Astragalus Fermentation

HOU Mei-ru, YIN Jun-yi, WANG Yan, LIU Yu, CHEN Nan-nan,

QIN Ping-wei, SHI Tong-rui*, YANG Shu-ping

(Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Heilongjiang Qiqihaer, 161006, China)

Corresponding author: SHI Rui-tong, E-mail: systr@sina.com

Abstract: To provide an HPLC-UV method for the content and chromatogram change of four kinds of flavonoids in Astragalus and Astragalus fermentation. Four kinds of flavonoids were successfully analyzed on a Inertsustain C18 column (150 mm×4.6 mm,5 μm) with methanol and water as the mobile phase in gradient elution. The column temperature was 25 ℃ and the detection wavelength was 254 nm, set flow rate as 1 mL/min and set sample size as 20 μL. The linear ranges of four kinds of flavonoids were over 12.34~790 mg/L (Calycosin-7-glucoside), 5.0~320 mg/L (pureonebio), 4.53~290 mg/L (calycosin) and 9.53~610 mg/L (formononetin), the chromatographic peaks of four kinds of flavonoids were well separated. The results show that, the contents of

基金项目: 黑龙江科技计划项目:生物发酵中药制剂的研究与开发(GC13B404)

作者简介: 侯美如,硕士,中级研究员,从事家畜传染病与微生物的研究。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

Calycosin-7-glucoside, calycosin and formononetin were 12.236 ± 0.232 mg/g, 0.201 ± 0.021 mg/g and 0.737 ± 0.041 mg/g in fermentation group, while the contents were 0.327 ± 0.013 mg/g, 5.453 ± 0.078 mg/g and 12.847 ± 0.118 mg/g in control group. The chromatograms were significant differences in Astragalus group and Astragalus fermentation group, which is indicated that the fermentation could caused great change in the components and contents. This study provide a reference for the quality standard of Radix Astragali fermentation products.

Key words: solid fermentation; flavone; HPLC-UV

黄芪是我国一种传统药材,为豆科植物蒙古黄芪或膜荚的干燥根。性温、味甘,为常用补气药。黄芪含黄酮类、多糖类、皂苷类、氨基酸及多种微量元素等活性成分。其中,黄酮类是含量较高的一类成分,具有清除自由基、调节免疫、抗病毒等多方面的药理作用,是黄芪中重要的有效成分,因此黄酮类成分常作为黄芪药材的质量控制指标之一,黄酮化合物主要包括毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷及芒柄花素等^[1]。为此,选择以上 4 种黄酮作为参考指标,用于评价固体发酵对黄芪成分的影响。

中药发酵作为中药加工的一种炮制工艺已具有悠久的历史,目前,应用现代生物技术发酵转化中药也已成为中药领域的研究热点。应用具有分解和转化能力的微生物发酵中药,可保护中药活性成分免受煎、煮、熬、炼、蒸、浸等传统工艺造成的破坏,能够提高中药有效成分的提取率,降解中药大分子物质,产生新的活性物质,降低中药毒副作用^[2-4]。然而,发酵中药作为中药产品的一种新型制剂尚无规范性的质量标准,这严重影响了发酵中药质量的有效控制和临床应用。随着,液相色谱技术的发展,为探究中药发酵前后成分及含量的变化提供了有效手段。在适宜的色谱条件下,可将中药中不同成分在不同时间节点洗脱,并由检测器检测,从而直观的显示出中药不同成分及相对含量,这为比较发酵前后成分差异提供了可靠依据^[5]。研究应用 HPLC-UV 方法,对产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌发酵黄芪散剂中 4 种黄酮含量及色谱图进行了比较,旨在为其质量控制提供技术支撑,为生产应用提供质量保障。

1 材料与方法

1.1 仪器 日本岛津 SPD-20A 紫外检测器,LC-20AT 二元泵,Labsolution 色谱工作站,日本岛津公司产品;KQ5200B 超声清洗仪,昆山市超声仪器有限公司产品;电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;ZNCL-S 自能恒温磁力搅拌器,上海美强仪器设备有限公司产品;PINE-TREE 帕恩特标准试剂级超纯水机,北京湘顺源科技有限公司产品;恒温振荡器 HZQ-FX 型,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司产品。

1.2 菌株与试剂 产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌 SSYB 株,由本研究室分离鉴定并保存;刺芒柄花苷、芒柄花黄素含量、毛蕊异黄酮苷含量、毛蕊异黄酮(含量均 $\geq 98\%$,批号分别为:R04J6F2、KO1014CB14、PS0912SA13、P29M6R2),上海源叶生物科技有限公司产品;黄芪,河北凯达药业有限公司产品;乙腈(色谱纯,批号:20161210),天津市科密欧化学试剂有限公司产品;甲醇(色谱纯,批号:20161108),天津市科密欧化学试剂有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标准品制备 精密称取标准品毛蕊异黄酮苷 7.9 mg,刺芒柄花苷 3.2 mg,毛蕊异黄酮 2.9 mg,芒柄花素 6.1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入适量甲醇,超声溶解,定容至刻度,备用。

1.3.2 发酵黄芪及对照品制备 发酵黄芪:按照黄芪粉 30%、黄豆粉 10%、 CaCO_3 0.2%、水 59.8%组分制备发酵培养基。取解淀粉芽孢杆菌种子液,以 2%接种量接种黄芪发酵培养基,在 37 °C 发酵培养 72 h,发酵物中活菌数约为 7.67×10^8 CFU/g。

对照黄芪:另外取无菌肉汤,按 2%接种量接种黄芪固态发酵培养基,按照发酵黄芪制备方法进行处理。

1.3.3 成分提取 取发酵黄芪与非发酵黄芪各 5 g,分别加入甲醇 30 mL,超声提取 30 min,重复提取 3 次,合并提取液,于 70 ℃水浴挥干溶剂,加 8 mL 甲醇溶液超声溶解,待完全溶解后定容至 10 mL,摇匀,经 0.45 μm 滤膜过滤,超声除气,备用。

1.3.4 检测方法建立

1.3.4.1 色谱条件 Inertsustain C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈和水,检测波长:254 nm,柱温:25℃,流速:1 mL/min,进样量:20 μL,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Conditions of gradient elution		
时间/min Time/min	乙腈/% Etonitrile/%	水/% Water/%
0	10.0	90.0
8	22.0	78.0
22	28.3	71.7
32	32.3	67.7
42	61.7	38.3

1.3.4.2 适应性考察 取标准品溶液,经超声,过 0.45 μm 滤膜后进样 20 μL,考察 4 种黄酮对上述色谱条件的适应性。

1.3.4.3 线性关系考察 用甲醇稀释标准品溶液,分别为原浓度的 1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 倍,摇匀,经 0.45 μm 滤膜过滤,超声除气,备用。按上述色谱条件对毛蕊异黄酮苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 4 种黄酮含量进行测定,以液相色谱峰峰面积(A)对浓度(mg/L)(C)绘制标准曲线。

1.3.4.4 精密度试验 精密吸取标准品溶液20 μL,

重复进针 6 次,测定 4 种黄酮峰面积,对精密度试验进行考察。

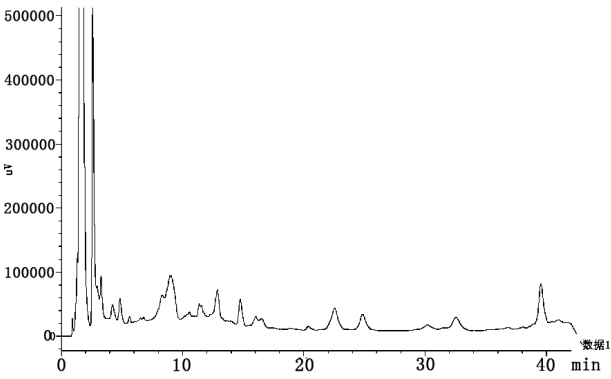
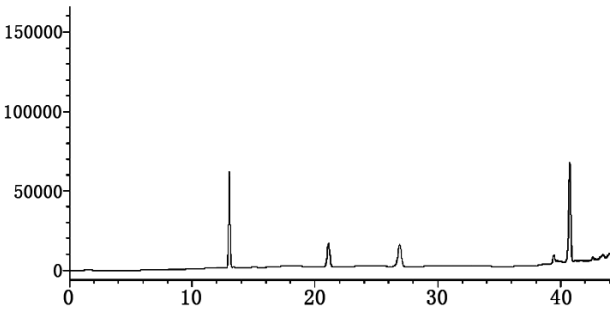
1.3.4.5 稳定性试验 取标准品溶液分别于放置 0、2、4、6、8、10 h 进针 1 次,测其峰面积,对稳定性试验进行考察。

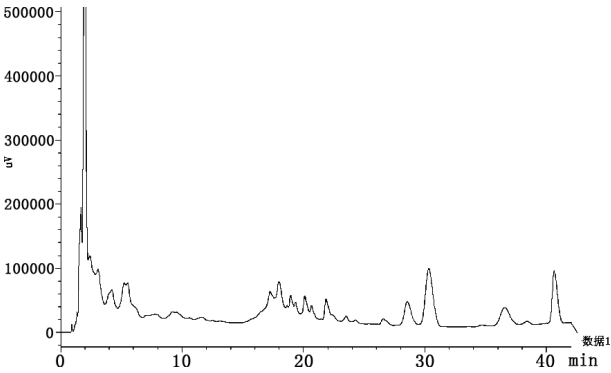
1.3.5 黄酮含量的测定 取发酵黄芪及对照黄芪提取液各 20 μL,按上述色谱条件对两种提取液样品中的黄酮含量进行测定。

2 结果

2.1 检测方法建立

2.1.1 适应性考察 取标准品溶液,经超声,过 0.45 μm 滤膜后进样 20 μL,结果见图 1。毛蕊异黄酮苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素标准品分别在 13.024、21.102、26.900、40.749 min 出现独立峰 I、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ。发酵组及对照组中的目标峰分离效果较好,且对不同成分峰的分离程度较为理想,可用于比较黄芪发酵前后成分的变化。





I : 毛蕊异黄酮苷; II : 刺芒柄花苷; III : 毛蕊异黄酮; IV : 芒柄花素
I: Calycosin 7-O-glucoside; II: Ononin; III: Calycosin; IV: Formononetin

图 1 标准品 (A)、黄芪发酵组 (B) 及黄芪对照组 (C) 色谱图

Fig 1 Standard product chromatogram (A), Astragalus fermentation chromatogram (B) and Radix astragalus chromatogram (C).

2.1.2 线性关系考察 按上述色谱条件对毛蕊异黄酮苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 4 种黄酮含量进行测定,以液相色谱峰峰面积 (A) 对浓度 (mg/L) (C) 绘制标准曲线。建立回归方程,分别为: $A_I = 640.91C + 246.75$ ($r = 0.9992$); $A_{II} = 716.96C + 174.57$ ($r = 0.9991$); $A_{III} = 119.86C + 253.17$ ($r = 0.9995$); $A_{IV} = 1270.93C + 194.64$ ($r = 0.9992$)。结果表

明,4 种黄酮色谱峰面积与浓度呈良好线性的浓度范围分别是 12.34~790、5.0~320、4.53~290、9.53~610 mg/L。

2.1.3 精密度试验 精密吸取标准品溶液 20 μ L,重复进针 6 次,测定 4 种黄酮峰面积。RSD 分别为 1.21%、0.98%、1.64% 和 1.12%。结果表明,进样精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取标准品溶液分别于放置 0、2、4、6、8、10 h 进针 1 次,测其峰面积。4 种黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.42%、1.03%、1.83% 和 1.34%。结果表明,供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2 黄酮含量的测定 取发酵黄芪及对照黄芪提取液各 20 μ L,按上述色谱条件对两种提取液样品中的黄酮含量进行测定。由表 2 可知,发酵黄芪与对照黄芪提取液中均含有黄酮中的 3 种成分,即毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素。发酵黄芪含量分别为 12.236 ± 0.232 、 0.201 ± 0.021 和 0.737 ± 0.041 mg/g;对照黄芪含量分别为 0.327 ± 0.013 、 5.453 ± 0.078 和 12.847 ± 0.118 mg/g。发酵黄芪中毛蕊异黄酮苷含量显著高于对照黄芪 ($P < 0.01$),而毛蕊异黄酮和芒柄花素含量显著低于对照黄芪 ($P < 0.01$)。

表 2 黄芪发酵前后 4 种黄酮含量 ($\bar{X} \pm SD$, mg/g)

Tab 2 The content of four flavonoids before and after fermentation ($\bar{X} \pm SD$, mg/g)

组别 Group	毛蕊异黄酮苷 Calycosin 7-O-glucoside	刺芒柄花苷 Ononin	毛蕊异黄酮 Calycosin	芒柄花素 Formononetin
发酵组 Fermentation group	12.236±0.232	—	0.201±0.021	0.737±0.041
对照组 The control group	0.327±0.013	—	5.453±0.078	12.847±0.118

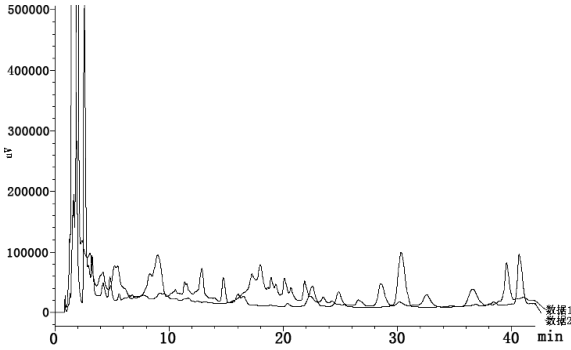
“—”未在相对保留时间出现色谱峰

2.3 发酵黄芪色图谱比对 发酵黄芪与对照黄芪色谱图比较发现,两者指纹图谱差异较大,相似度低,说明黄芪经发酵后成分发生了很大变化,见图 2。经比对分析可知,发酵黄芪与对照黄芪保留时间点一致的吸收峰 ($RSD < 1\%$) 共有 15 个,占出峰总数的 30%~33%,但相同保留时间点的吸收峰面积差

异较大,其中,在 0.928、1.326、9.017、14.762、22.538、24.850、41.657 h 7 个保留时间点,发酵黄芪的吸收峰面积均较对照黄芪有所增大,增大幅度为 170%~810%,差异极显著 ($P < 0.01$)。而另 8 个保留时间点的吸收峰面积均较对照黄芪缩小,其中有 1 个保留时间点的吸收峰面积缩小 69.08%,其它

7 个保留时间点均缩小 90% 以上。

以大于色谱峰总面积 2% 的单峰为目标峰, 发酵黄芪中有 8 个, 而对照黄芪有 15 个, 其中, 发酵黄芪在 1.560、1.752、2.604、3.279、8.338、39.546 h 出现 6 个新的吸收峰, 而在 1.675、1.965、2.417、5.240、7.779、17.988、20.109 h 的 7 个原有吸收峰消失。此外, 与对照黄芪比较, 发酵黄芪在 1.560、1.752 h 新出现 2 个极高峰, 其峰面积分别占总面积的 33.4%、22.2%, 而在 1.965 h 点处峰面积占总面积 23.29% 的 1 个原有极高峰消失, 见图 3、图 4。试验结果表明, 黄芪发酵后产生了许多新的特征吸收峰, 同时原有的多数吸收峰消失, 这说明黄芪经发酵后, 原有成分及含量发生了变化, 一些原有成分消失, 同时也产生了新的物质。



数据 1: 发酵黄芪色谱图; 数据 2: 对照黄芪色谱图

Data1 Fermentation of astragalus chromatogram;

Data2 Control of astragalus chromatogram

图 2 黄芪发酵前后液相色谱对比图

Fig 2 Comparison diagram of liquid chromatography before and after fermentation of astragalus

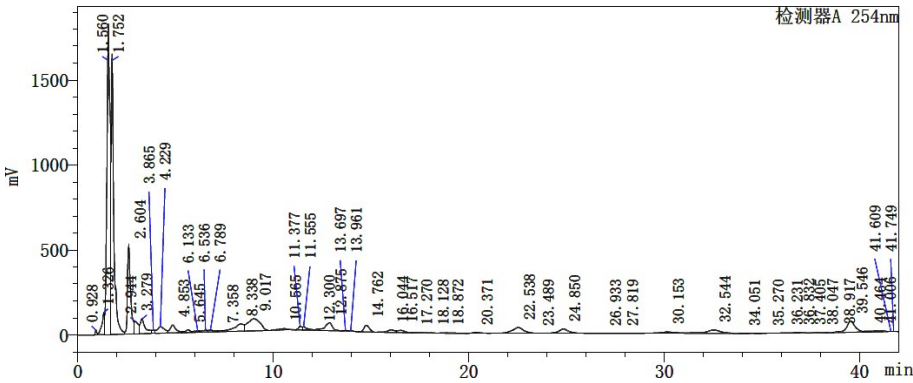


图 3 发酵黄芪色谱图

Fig 3 Fermentation of astragalus chromatogram

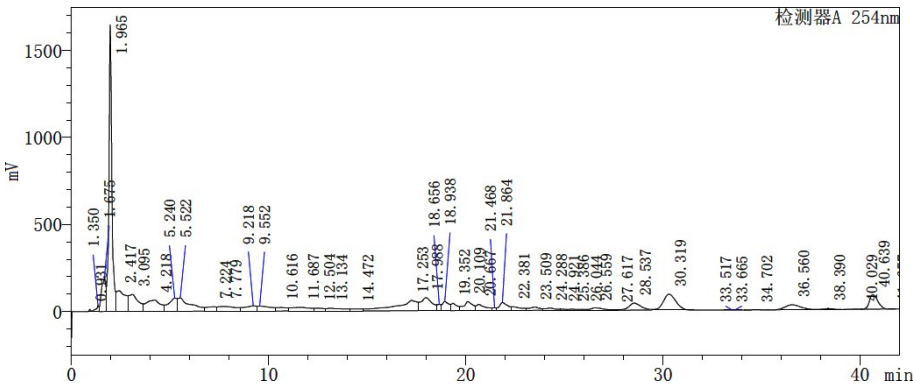


图 4 黄芪色谱图

Fig 4 Astragalus chromatogram

3 讨论与小结

中药发酵制品多以主要有效成分及其含量为质量控制制备,然而由于中药成分繁多,生物发酵过程复杂,仅以中药主要活性成分含量作为质量控制指标难以保证中药制品质量。一些学者提出,采用中药色谱指纹图谱技术,对中药及其制品进行整体性的质量控制与评价。史玉霞^[6]运用检测波长 254 nm,乙腈-磷酸为流动相,梯度洗脱,对何首乌提取液益生菌发酵前后化学成分进行研究,各共有峰相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.7%,该方法稳定性好,为评价何首乌药材不同炮制品的质量奠定了基础。李岗^[7]等运用 HPLC 法对消栓口服液发酵前后指纹图谱进行比较,发现二者指纹图谱间差异较大,相似度低,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对 15 批样品进行相似度评价,结果符合指纹图谱研究的技术要求。本试验采用乙腈和水为流动相,梯度洗脱,检测波长 254 nm,柱温 25 ℃;流速 1 mL/min,在此条件下,检测发酵黄芪与对照黄芪样品,结果目标峰及其他成分峰分离效果好,适于比较发酵黄芪成分的变化。

依据标准品在液相色谱中形成的目标峰,可以判断样品对应色谱峰的物质^[8]。试验选择了黄芪中 4 种黄酮成分作为参考指标,评估生物发酵对黄芪成分及其含量的影响。在检测的 4 种黄酮成分中,发酵黄芪毛蕊异黄酮苷含量显著升高,而毛蕊异黄酮和芒柄花素含量显著降低。这说明黄芪发酵后,一些物质转化生成成为毛蕊异黄酮苷,而毛蕊异黄酮和芒柄花素基本被转化为其他物质。黄芪经发酵后,虽然有 15 种成分未被全部转化利用,但其含量发生了显著变化,其中,有 7 种成分含量较对照黄芪升高了 1.7~8.1 倍,而另 8 种成分含量却显著降低,且其中 7 种成分近于消失。在单峰面积大于色谱峰总面积 2% 的 15 种成分中,黄芪经发酵后有 7 种成分消失,其中包括一种含量占 23.29% 的主要物质,同时又生成 6 种新物质,且有两种新生主要物质,含量分别为 33.4%、22.2%,为进一步考察黄芪中其他主要成分的变化,实验也分别运用

紫外分光光度法及液相色谱法对黄芪多糖、黄芪甲苷发酵先后质量变化进行了测定,对比发现,发酵后黄芪多糖及黄芪甲苷的含量均有升高,分别为升高了 39.59%^[9]、37.59%。由此推测,解淀粉芽孢杆菌生长代谢能将黄芪成分转化、利用,同时也产生了一些新物质,这一结果被许多学者研究证实。阮鸣等^[10]研究表明,在黄芪发酵过程中,黄芪甲苷被转化形成 6-O-B-D-葡萄糖基-环黄芪醇,该转化物具有显著的抗氧化效应,具有增效的作用。肖丽丽等^[11]经薄层层析检测证实,生物发酵可将黄芪总皂苷中的部分皂苷转化为黄芪甲苷。

发酵中药作为一种中药新产品尚无规范性的质量标准,这严重影响了发酵中药质量的有效控制和临床应用,本文运用 HPLC 法,通过对解淀粉芽孢杆菌发酵黄芪有效成分及色谱图对比,发现黄芪发酵前后其成分发生了很大变化,但究竟转化利用了何物质,以及产生了何种新物质及其发生机理还有待进一步研究。中药成分复杂,要准确测定其各成分及含量难度较大,测定中药指纹图谱,可初步确定中药化学组成及含量差异。在中药指纹图谱测定中,高效液相色谱法具有流动相选择广,色谱柱可反复利用,简便,快速等特点,因此,本文对产纤维素酶解淀粉芽孢杆菌发酵黄芪的一些成分及色谱图进行了研究,旨在为发酵黄芪制品质量控制提供技术参考。

参考文献:

- [1] 李小兵, 谢晓梅, 周铜水. 高效液相色谱法同时测定黄芪中 4 种异黄酮的含量[J]. 安徽医药, 2008, 12(5): 413-414.
Li X B, Xie X M, Zhou T S, *et al.* Simultaneous determination of four isoflavonoids in radix astragali by HPLC[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2008, 12(5): 413-414.
- [2] 赵雯玮, 陈祥贵, 李 鑫, 等. 微生物发酵在中药研究中的应用[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(10): 3-5.
Zhao W W, Chen X G, Li X, *et al.* Microbial fermentation in the application of traditional Chinese medicine research[J]. Life Science Instruments, 2008, 6(10): 3-5.
- [3] Amachandra S R, Ravishankar G A. Plantcell cultures; Chemical Facories of secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances,

- 2002, 20(2): 101-103.
- [4] 张冬青, 揭广川. 现代发酵技术在提高中药药用效能方面的作用[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2005, 4(1): 34-37.
Zhang T Q, Jie G C. The role of modern fermentation technology in improving the medicinal potency of traditional chinese medicine [J]. Journal of Guangdong Industry Technical College, 2005, 4(1): 34-37.
- [5] 戴 焱. 中草药混菌发酵生产新型生物制剂的研究[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2013.
Dai Y. Study on the fermentation of chinese herbal medicine with mixed bacteria to produce new biologics[D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2013.
- [6] 史玉霞, 周洪雷, 王 真, 等. 何首乌提取液益生菌发酵前后化学成分变化研究[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(2): 161-163.
Shi Y X, Zhou H L, Wang Z, *et al.* studies on the changes of chemical components of polygonum multiflorum extract before and after fermentation [J]. Journal of Shandong University of TCM, 2014, 38(2): 161-163.
- [7] 李 岗, 周洪累, 史玉霞, 等. 不同制备工艺消栓口服液发酵前后 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1127-1130.
Li G, Zhou H L, Shi Y X, Comparative research on HPLC fingerprint of xiaoshuan oral liquid prepared by diferent processes before and after fermentation[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(5): 1127-1130.
- [8] 胡芳弟, 赵健雄, 封士兰, 等. 黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定[J]. 中药材, 2004, 27(11): 831-834.
Hu F D, Zhao J X, Feng S L, *et al.* Studies on chromatography fingerprint of huangqi by HPLC[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(11): 831-834.
- [9] 侯美如, 刘 宇, 王 岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌固态发酵黄芪中有效成分的变化[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(3): 64-68.
Hou M R, Liu Y, Wang Y, *et al.* Changs of effective components of Astragalus in the solid fermentation of bacillus amyloliquefaciens[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(3): 64-68.
- [10] 阮 鸣, 张李阳, 喻 斌, 等. 黄芪双向性固体发酵过程中黄芪甲苷的转化研究[J]. 中药材, 2010, 33(3): 339-343.
Ruan M, Zhang L Y, Yu B, Transformation of astragaloside IV in bidirectional solid fermenting of astragalus membranaceus[J], Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(3): 339-343.
- [11] 肖丽丽, 吴晓倩, 鱼红闪. 黄芪皂苷生物转化物质的分离提取[J]. 大连轻工业学院学报, 2006, 25(2): 86-88.
Xiao L L, Wu X Q, Yu H S. Separation and purification of astragaloside product from biotransformation[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2006, 25(2): 86-88.

(编辑:陈 希)