

HPLC-MS 鉴定塔中栽培肉苁蓉药材的 17 个成分

南泽东¹, 任华忠¹, 赵明波², 姜勇², 屠鹏飞^{2*}

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000;

2. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 目的:通过 HPLC-MS 对新疆塔中荒漠栽培肉苁蓉 *Cistanche deserticola* 药材 60% 甲醇提取物的色谱图进行鉴定。方法:采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-水(含 0.1% 的甲酸)为流动相进行梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。结果:在相同色谱条件下,通过与已分离得到的对照品的保留时间、相对分子质量以及碎片离子进行比较,对新疆塔中荒漠栽培肉苁蓉药材的 16 个色谱峰中的 17 个成分进行了准确的鉴定,分别确定为松柏苷,去甲紫丁香苷,紫丁香苷,松果菊苷,肉苁蓉苷 A,类叶升麻苷(管花苷 A),肉苁蓉苷 B,异类叶升麻苷,2'-乙酰基肉苁蓉苷 A,肉苁蓉苷 C,异肉苁蓉苷 C,2'-乙酰基类叶升麻苷,管花苷 B,epimeridinoside A,肉苁蓉苷 K,肉苁蓉苷 J。结论:该研究方法适用于肉苁蓉 60% 甲醇提取物色谱峰的鉴定,为全面分析该药材的化学成分提供了一定的科学数据。

[关键词] 荒漠肉苁蓉; 肉苁蓉属; 液质联用; 甲醇提取物

[中图分类号] R284.1;R289;R2-031;R25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0062-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181613

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180524.1636.004.html>

[网络出版时间] 2018-05-25 15:09

Identification of Seventeen Components in *Cistanches Herba* Cultured in Tarim Desert by HPLC-MS

NAN Ze-dong¹, REN Hua-zhong¹, ZHAO Ming-bo², JIANG Yong², TU Peng-fei^{2*}

(1. Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000, China;

2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the chromatographic components of 60% methanol extract in *Cistanches Herba* cultured in Tarim desert by HPLC-MS. **Method:** HPLC-MS analysis was performed on a Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution by gradient elution at the flow rate of 1 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 254 nm. The column temperature was set at 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Result:** Sixteen chromatographic peaks/seventeen components were accurately identified by comparing the retention time, molecular weights and fragment ions of the compounds we isolated and identified. These chromatographic components were determined as coniferin, demethyl syringin, syringin, echinacoside, cistanoside A, verbascoside (tubuloside A), cistanoside B, isoverbascoside, 2'-acetylcistanoside A, cistanoside C, isocistanoside C, 2'-acetylverbascoside, tubuloside B, epimeridinoside A, cistanoside K and cistanoside J.

[收稿日期] 20171208(013)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09201201-001,2012ZX09301002-002-002,2012ZX09304-005)

[第一作者] 南泽东,博士,讲师,从事生药学研究,E-mail:nanzdchem@163.com

[通信作者] *屠鹏飞,教授,从事天然药物研究,Tel/Fax:010-82802750,E-mail:pengfeitu@vip.163.com

Conclusion: The HPLC-MS method is suitable for the identification of the chromatographic components of 60% methanol extract in *Cistanches Herba*. This study will provide the scientific evidence for comprehensively analyzing the chemical constituents of this medicinal herb.

[**Key words**] *Cistanches Herba*; *Cistanche*; HPLC-MS; methanol extract

肉苁蓉又名“大芸”，为著名的补益中药，在我国内蒙古、宁夏、甘肃及新疆都有分布^[1]。具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效，临床常用于治疗男子阳痿、女子不孕、腰膝冷痛、血枯便秘等^[2-3]。2015 年版《中国药典》一部收录的肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉和管花肉苁蓉的干燥肉质茎^[4]。本课题组多年来对肉苁蓉属植物进行了系统深入的研究，该属植物化学成分主要为苯乙醇苷类，除此还有环烯醚萜及其苷类、木脂素及其苷类、苯甲醇苷类等^[5]。现代药理学研究表明该属植物主要成分苯乙醇苷类化合物，具有神经保护、抗氧化、保肝、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎等作用^[6-11]。

在我国，肉苁蓉分布于内蒙古西部、新疆北疆及青海的柴达木盆地，在新疆南疆的塔里木盆地无自然分布。20 世纪 90 年代末，为了保护塔中油田，治理沙漠，油田指挥部在塔中油田周围及沙漠公路两侧引种了大量的梭梭 *Haloxylon ammodendron*，同时在梭梭上接种了肉苁蓉，至今已有 10 多年的时间。由于南疆地区温暖的气候，加上石油基地良好的滴灌条件，其肉苁蓉产量很高，亩产鲜肉苁蓉达到 500 kg 以上^[8]。肉苁蓉药材中很多化学成分由于取代基连接位置不同而产生了大量的同分异构体，这就给对该药材色谱峰的鉴定工作带来很大的困难，如果单纯依靠 LC-MS 而没有单体化合物作为对照很难准确鉴定色谱峰的成分，因此，前期很少有文献报道这方面的工作。作者前期从塔中荒漠栽培肉苁蓉中分离得到很多单体化合物^[9-11]，通过前期得到的这些单体化合物，对肉苁蓉 60% 甲醇提取物的 HPLC 部分色谱峰进行准确的鉴定。这样不仅可以避免后面研究肉苁蓉化学成分中对于一些已知化合物的重复鉴定工作，也为进一步对于该药材质量控制等方面的研究有一定的借鉴作用。本文主要通过 HPLC-MS 鉴定了荒漠肉苁蓉 60% 甲醇提取物的 17 个成分。

1 材料

Inova-500 型核磁共振仪(美国 Varian 公司); 6320 Ion Trap 型 LC-MS 质谱仪, Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司); QUINTIX313-1CN 型 1/1 万电子天平(赛多利

斯公司); KQ-500DV 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司); KMUP-I 痕量分析型超纯水发生系统(成都浩纯仪器设备有限公司)。

本实验所用的 39 个对照品均是笔者前期从塔中荒漠栽培肉苁蓉中分离得到，并且通过 NMR 等波谱技术确定其结构。39 个对照品结构分别鉴定为肉苁蓉苷 J, 肉苁蓉苷 K, 肉苁蓉苷 L, 肉苁蓉苷 M, 肉苁蓉苷 N, epimeridinoside A, 异肉苁蓉苷 C, 管花苷 B, 异类叶升麻苷, 异角胡麻苷, 肉苁蓉苷 D, 肉苁蓉苷 C, 类叶升麻苷, 2'-乙酰基肉苁蓉苷 A, 2'-乙酰基类叶升麻苷, 肉苁蓉苷 B, 肉苁蓉苷 A, 松果菊苷, 管花苷 A, 肉苁蓉苷 E, 红景天苷, 6'-乙酰基红景天苷, salsaside B, 紫丁香苷, 去甲基紫丁香苷, 松柏苷, (2E, 6E)-3, 7-dimethyl-8-hydroxyoctadien-1-O-β-D-glucoside, (+)-丁香脂素, (+)-丁香脂素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷, (+)-isoeucommin A, eucommin A, (+)-松脂素单甲基醚-β-D-葡萄糖苷, 落叶松脂醇-4'-O-β-D-葡萄糖苷, 落叶松脂醇-4-O-β-D-葡萄糖苷, conicaoside, dehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranoside, 橙皮素 A, 阿拉善苷 A, 6-去氧梓醇。以上所有对照品纯度均 > 98.0%。乙腈为色谱纯(美国 DikmaPure), 水为超纯水, 其他试验过程中用到的试剂均为分析纯试剂, 由北京化工厂生产。

本实验所用药材肉苁蓉于 2010 年 11 月采自新疆塔中荒漠地区, 经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* 的干燥肉质茎, 标本存放于北京大学中医药现代研究中心(标本编号 CD201011)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 取前期从肉苁蓉中得到的 39 个对照品各约 1 mg, 精密称定, 分别置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得各单一对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 参考 2015 年版《中国药典》, 取本品粉末(过四号筛)约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 棕色瓶中, 精密加入 60% 甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 浸泡 30 min, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 加 50% 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,

取续滤液即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C; 以乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~20 min, 5%~15% A; 20~50 min, 15%~30% A; 50~60 min, 30%~50% A; 60~70 min, 50%~95% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.4 质谱条件 毛细管温度 350 °C; 毛细管电压 3 500 V; 夹套气(氮气)流速 12.0 L·min⁻¹; 辅助气(氮气)压力 206.8 kPa; 质谱全扫描范围为 *m/z* 50~1 000; 碰撞气体氦气, 试验过程中碰撞能量自动选择; 正负离子模式各采集 1 针。

2.5 对照品测试 分别将 2.1 项下制备的 39 个对照品溶液在 2.3 项色谱条件以及 2.4 项质谱条件下进行测试, 并记录其保留时间和相对分子质量(表 1)。

2.6 供试品溶液测定 取采自新疆塔中荒漠地区的肉苁蓉药材, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.3 项下的色谱条件以及 2.4 项下的质谱条件进行测试, 测定其 HPLC 色谱图以及正负离子模式下的质谱图(图 1~3)。

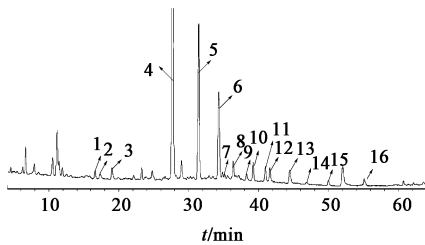


图1 肉苁蓉 60% 甲醇提取物的 HPLC 色谱
Fig.1 HPLC chromatogram of 60% methanol extract of Cistanches Herba

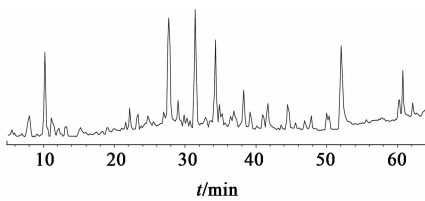


图2 荒漠肉苁蓉 60% 甲醇提取物正离子模式下总离子流
Fig.2 Positive TIC MS chromatogram of 60% methanol extract of Cistanches Herba

2.7 药材 HPLC 色谱图鉴定 在同一条件下(2.3 项色谱条件以及 2.4 项质谱条件), 通过比较供试品和对照品的保留时间以及相对分子质量进行成分鉴定, 供试品色谱峰(图 1)具体鉴定过程如下。

2.7.1 色谱峰 1 的鉴定 色谱峰 1 的保留时间为

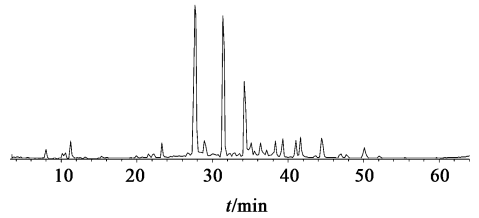


图3 荒漠肉苁蓉 60% 甲醇提取物负离子模式下总离子流
Fig.3 Negative TIC MS chromatogram of 60% methanol extract of Cistanches Herba

16.67 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 365 为 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 387 $[M + COOH]^-$, 确定峰 1 的相对分子质量为 342。同时给出碎片离子 *m/z* 179, 来源于苷键断裂失去 1 分子葡萄糖 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 1 鉴定为松柏苷。

2.7.2 色谱峰 2 的鉴定 色谱峰 2 的保留时间为 17.36 min, 负离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 357 $[M - H]^-$, 393 $[M + Cl]^-$, 确定峰 2 的相对分子质量是 358。同时给出碎片离子 *m/z* 195, 来源于苷键断裂失去 1 分子葡萄糖 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 2 鉴定为去甲紫丁香苷。

2.7.3 色谱峰 3 的鉴定 色谱峰 3 的保留时间为 19.04 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 395 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 417 $[M + HCOO]^-$, 确定峰 3 的相对分子质量是 372。同时给出碎片离子 *m/z* 209, 来源于苷键断裂失去 1 分子葡萄糖 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 3 鉴定为紫丁香苷。

2.7.4 色谱峰 4 的鉴定 色谱峰 4 的保留时间为 27.66 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 804 $[M + NH_4]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 785 $[M - H]^-$, 确定峰 4 的相对分子质量是 786。同时给出碎片离子 *m/z* 623, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量鉴定色谱峰 4 为松果菊苷。

2.7.5 色谱峰 5 的鉴定 色谱峰 5 的保留时间为 31.48 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 818 $[M + NH_4]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 *m/z* 799 $[M - H]^-$, 确定峰 5 的相对分子质量是 800。同时给出碎片离子 *m/z* 637, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量确认色谱峰 5 为肉苁蓉苷 A。

2.7.6 色谱峰 6 的鉴定 色谱峰 6 的保留时间为

表 1 39 个对照品保留时间及其相对分子质量

Table 1 Molecular weight and retention time (t_R) of 39 standard compounds

| 编号 | 名称 | t_R /min | 相对分子质量 | 准分子离子峰 |
|----|--|------------|--------|---------------------------------------|
| 1 | 肉苁蓉苷 J | 55.36 | 694 | $717[M + Na]^+$, $693[M - H]^-$ |
| 2 | 肉苁蓉苷 K | 49.90 | 680 | $703[M + Na]^+$, $679[M - H]^-$ |
| 3 | 肉苁蓉苷 L | 51.46 | 666 | $689[M + Na]^+$, $665[M - H]^-$ |
| 4 | 肉苁蓉苷 M | 46.05 | 622 | $645[M + Na]^+$, $621[M - H]^-$ |
| 5 | 肉苁蓉苷 N | 43.44 | 842 | $860[M + NH_4]^+$, $641[M - H]^-$ |
| 6 | epimeridoside A | 46.67 | 652 | $675[M + Na]^+$, $651[M - H]^-$ |
| 7 | 异肉苁蓉苷 C | 40.82 | 638 | $661[M + Na]^+$, $637[M - H]^-$ |
| 8 | 管花苷 B | 44.29 | 666 | $689[M + Na]^+$, $665[M - H]^-$ |
| 9 | 异类叶升麻苷 | 36.17 | 624 | $647[M + Na]^+$, $623[M - H]^-$ |
| 10 | 异角胡麻苷 | 46.86 | 652 | $675[M + Na]^+$, $651[M - H]^-$ |
| 11 | 肉苁蓉苷 D | 44.36 | 652 | $675[M + Na]^+$, $651[M - H]^-$ |
| 12 | 肉苁蓉苷 C | 39.04 | 638 | $661[M + Na]^+$, $637[M - H]^-$ |
| 13 | 类叶升麻苷 | 34.17 | 624 | $647[M + Na]^+$, $623[M - H]^-$ |
| 14 | 2'-乙酰基肉苁蓉苷 A | 38.20 | 842 | $865[M + Na]^+$, $841[M - H]^-$ |
| 15 | 2'-乙酰基类叶升麻苷 | 41.48 | 666 | $684[M + NH_4]^+$, $665[M - H]^-$ |
| 16 | 肉苁蓉苷 B | 35.34 | 814 | $832[M + NH_4]^+$, $813[M - H]^-$ |
| 17 | 肉苁蓉苷 A | 31.48 | 800 | $818[M + NH_4]^+$, $799[M - H]^-$ |
| 18 | 松果菊苷 | 27.66 | 786 | $804[M + NH_4]^+$, $785[M - H]^-$ |
| 19 | 管花苷 A | 34.17 | 828 | $851[M + Na]^+$, $827[M - H]^-$ |
| 20 | 肉苁蓉苷 E | 15.94 | 476 | $477[M + H]^+$, $475[M - H]^-$ |
| 21 | 红景天苷 | 11.79 | 300 | $323[M + Na]^+$, $299[M - H]^-$ |
| 22 | 6'-乙酰基红景天苷 | 25.31 | 342 | $365[M + Na]^+$, $341[M - H]^-$ |
| 23 | salsaside B | 42.91 | 578 | $601[M + Na]^+$, $577[M - H]^-$ |
| 24 | 紫丁香苷 | 19.04 | 372 | $395[M + Na]^+$, $417[M + HCOO]^-$ |
| 25 | 去甲基紫丁香苷 | 17.36 | 358 | $381[M + Na]^+$, $357[M - H]^-$ |
| 26 | 松柏苷 | 16.67 | 342 | $365[M + Na]^+$, $387[M + HCOO]^-$ |
| 27 | (2E,6E)-3,7-dimethyl-8-hydroxyoctadien-1-O-β-D-glucoside | 26.48 | 332 | $355[M + Na]^+$, $331[M - H]^-$ |
| 28 | (+)-丁香脂素 | 49.49 | 418 | $861[2M + Na]^+$, $417[M - H]^-$ |
| 29 | (+)-丁香脂素 4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 | 36.54 | 580 | $598[M + NH_4]^+$, $579[M - H]^-$ |
| 30 | (+)-isoeucommin A | 35.51 | 550 | $568[M + NH_4]^+$, $549[M - H]^-$ |
| 31 | eucommin A | 36.31 | 550 | $568[M + NH_4]^+$, $549[M - H]^-$ |
| 32 | (+)-松脂素单甲基醚-β-D-葡萄糖苷 | 35.07 | 534 | $557[M + Na]^+$, $333[M - H]^-$ |
| 33 | 落叶松脂醇 4'-O-β-D-葡萄糖苷 | 30.15 | 522 | $540[M + NH_4]^+$, $521[M - H]^-$ |
| 34 | 落叶松脂醇 4-O-β-D-葡萄糖苷 | 31.56 | 522 | $540[M + NH_4]^+$, $521[M - H]^-$ |
| 35 | conicaoside | 32.69 | 552 | $570[M + NH_4]^+$, $551[M - H]^-$ |
| 36 | dehydrodicoumaroyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranoside | 32.85 | 520 | $538[M + NH_4]^+$, $565[M + HCOO]^-$ |
| 37 | 橙皮素 A | 24.84 | 538 | $556[M + NH_4]^+$, $537[M - H]^-$ |
| 38 | 阿拉善苷 A | 23.62 | 538 | $556[M + NH_4]^+$, $537[M - H]^-$ |
| 39 | 6-去氧梓醇 | 10.16 | 346 | $369[M + Na]^+$, $345[M - H]^-$ |

34.17 min, 正离子模式下给出 2 个准分子离子峰 m/z 846, 642 $[M + NH_4]^+$, 负离子模式下也给出 2 个准分子离子峰 m/z 827, 623 $[M - H]^-$, 推测峰 6 可能含有 2 个化合物, 相对分子质量分别为 828,

624。同时分别给出碎片离子 m/z 665, 461, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da, 碎片离子 m/z 622 来源于乙酰基酯键断裂。这 2 个化合物都分离得到, 结合对照品的保留时间和相对分子质量

鉴定色谱峰 6 为类叶升麻苷和管花苷 A 的混合物。

2.7.7 色谱峰 7 的鉴定 色谱峰 7 的保留时间为 35.34 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 832 $[M + NH_4]^+$, 837 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 813 $[M - H]^-$, 得出峰 7 的相对分子质量是 814。同时给出碎片离子 m/z 637, 来源于酯键断裂失去 1 分子阿魏酰基 177 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量鉴定色谱峰 7 为肉苁蓉苷 B。

2.7.8 色谱峰 8 的鉴定 色谱峰 8 的保留时间为 36.17 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 647 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 623 $[M - H]^-$, 确定峰 8 的相对分子质量是 624。同时给出碎片离子 m/z 461, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量鉴定色谱峰 8 为异类叶升麻苷。

2.7.9 色谱峰 9 的鉴定 色谱峰 9 的保留时间为 38.20 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 860 $[M + NH_4]^+$, 865 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 841 $[M - H]^-$, 877 $[M + Cl]^-$, 确定峰 9 的相对分子质量是 842。同时给出碎片离子 m/z 679, 636 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da 以及 1 分子乙酰基 43 Da。与对照品的保留时间和相对分子质量一致, 鉴定色谱峰 9 为 2'-乙酰基肉苁蓉苷 A。

2.7.10 色谱峰 10 的鉴定 色谱峰 10 的保留时间为 39.04 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 656 $[M + NH_4]^+$, 661 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 637 $[M - H]^-$, 673 $[M + Cl]^-$, 确定峰 10 的相对分子质量是 638。同时给出碎片离子 m/z 475, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da。与对照品的保留时间和相对分子质量一致, 鉴定色谱峰 10 为肉苁蓉苷 C。

2.7.11 色谱峰 11 的鉴定 色谱峰 11 的保留时间为 40.82 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 661 $[M + Na]^+$, 677 $[M + K]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 637 $[M - H]^-$, 673 $[M + Cl]^-$, 可以确定峰 11 的相对分子质量是 638。同时给出碎片离子 m/z 475, 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 11 鉴定为异肉苁蓉苷 C。

2.7.12 色谱峰 12 的鉴定 色谱峰 12 的保留时间为 41.48 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z

684 $[M + NH_4]^+$, 689 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 665 $[M - H]^-$, 可以确定峰 12 的相对分子质量是 666。同时给出碎片离子 m/z 503, 460 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da 以及 1 分子乙酰基 43 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 12 鉴定为 2'-乙酰基类叶升麻苷。

2.7.13 色谱峰 13 的鉴定 色谱峰 13 的保留时间为 44.29 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 689 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 665 $[M - H]^-$, 得出峰 13 的相对分子质量是 666。同时给出碎片离子 m/z 503, 460 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da 以及 1 分子乙酰基 43 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 13 鉴定为管花苷 B。

2.7.14 色谱峰 14 的鉴定 色谱峰 14 的保留时间为 46.67 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 675 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 651 $[M - H]^-$, 得出峰 14 的相对分子质量是 652。同时给出碎片离子 m/z 475, 来源于酯键断裂失去 1 分子阿魏酰基 177 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 14 鉴定为 epimeridinoside A。

2.7.15 色谱峰 15 的鉴定 色谱峰 15 的保留时间为 49.90 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 698 $[M + NH_4]^+$, 703 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 679 $[M - H]^-$, 715 $[M + Cl]^-$, 得出峰 15 的相对分子质量是 680。同时给出碎片离子 m/z 517, 474 来源于酯键断裂失去 1 分子咖啡酰基 163 Da 以及 1 分子乙酰基 43 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 15 鉴定为肉苁蓉苷 K。

2.7.16 色谱峰 16 的鉴定 色谱峰 16 的保留时间为 55.36 min, 正离子模式下给出准分子离子峰 m/z 717 $[M + Na]^+$, 负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 693 $[M - H]^-$, 729 $[M + Cl]^-$, 得出峰 16 的相对分子质量是 694。同时给出碎片离子 m/z 517, 474 来源于酯键断裂失去 1 分子阿魏酰基 177 Da 以及 1 分子乙酰基 43 Da。结合对照品的保留时间和相对分子质量将色谱峰 16 鉴定为肉苁蓉苷 J。

以上采用 HPLC-MS 技术并结合已分离得到的对照品的相对分子质量、保留时间以及碎片离子对肉苁蓉 60% 甲醇提取物色谱峰进行鉴定, 结果对 16 个色谱峰中的 17 个成分进行了准确的鉴定 (表 2)。

表 2 被鉴定的肉苁蓉色谱峰及相对应的对照品

Table 2 Identified chromatographic peaks of *Cistanches Herba* and reference standard compounds

| 色谱峰 | 对照品 | 色谱峰 | 对照品 |
|-----|--------------|-----|-------------------|
| 1 | 松柏苷 | 9 | 2'-乙酰基肉苁蓉苷 A |
| 2 | 去甲紫丁香苷 | 10 | 肉苁蓉苷 C |
| 3 | 紫丁香苷 | 11 | 异肉苁蓉苷 C |
| 4 | 松果菊苷 | 12 | 2'-乙酰基类叶升麻苷 |
| 5 | 肉苁蓉苷 A | 13 | 管花苷 B |
| 6 | 类叶升麻苷, 管花苷 A | 14 | epimeridinoside A |
| 7 | 肉苁蓉苷 B | 15 | 肉苁蓉苷 K |
| 8 | 异类叶升麻苷 | 16 | 肉苁蓉苷 J |

3 讨论

3.1 供试品制备方法的选择 本研究主要目的是鉴定肉苁蓉的 HPLC 色谱峰,因此,选择提取溶剂和提取方法都是基于能得到更多的 HPLC 色谱峰而进行的。课题组长期开展肉苁蓉药材的相关研究,在质量分析方面做了很多工作。本文选择肉苁蓉药材的提取溶剂和提取方法也是在参考课题组前期的一些分析工作以及 2015 年版《中国药典》基础上,最终选择采用 60% 甲醇溶剂超声提取 40 min 作为提取方法。

3.2 HPLC-MS 条件选择 本文对色谱柱的选择是在参考课题组前期对肉苁蓉药材质量分析的基础上,考察了 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Dionex C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Thermo C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,最终选择 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 对肉苁蓉药材有较好的分离效果;39 个对照品包括苯乙醇苷、木脂素和苯丙素类型,因此,检测波长选择了 254 nm;同时考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 甲酸水等流动相对色谱分离和质谱检测的影响,最终选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相。

3.3 小结 本研究建立的方法对荒漠肉苁蓉 60% 甲醇提取物 16 个色谱峰中的 17 个成分进行了准确的鉴定。研究结果不仅对该药材进一步的质量分析有一定的借鉴作用,同时也可以避免对该药材已知化合物结构鉴定的一些重复工作。但是,总体上鉴定的色谱峰比较少,还有很多色谱峰由于未分到对照品而没有得到鉴定,大部分鉴定的成分是苯乙醇苷类化合物,木脂素类化合物很少。这可能是由于参考 2015 年版《中国药典》的提取方法主要针对苯乙醇苷类化

合物,也可能因为该药材提取物中松果菊苷和类叶升麻苷化合物含量太大,导致其他含量小的化合物难以检测到,具体原因有待于进一步阐明。

[参考文献]

[1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社,1990:86.

[2] 杨峻山. 沙漠人参——肉苁蓉[J]. 中国药理学杂志, 2011,46(12):881.

[3] 屠鹏飞,姜勇,郭玉海,等. 肉苁蓉研究及其产业发展[J]. 中国药理学杂志,2011,46(12):882-887.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:135.

[5] JIANG Y, TU P F. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216 (11):1970-1979.

[6] PAN J, YUAN C S, LIN C J, et al. Pharmacological activities and mechanisms of natural phenylpropanoid glycosides[J]. Pharmazie,2003,58(11):767-775.

[7] FU G M, PANG H H, Wong Y. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics [J]. Curr Med Chem, 2008, 15 (25): 2592-2613.

[8] 罗德梅,龙梅,杜文静,等. 新疆肉苁蓉提取液对 M-KOOPG 小鼠抗骨质疏松的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(10):138-142.

[9] 马慧,尹若熙,郭敏,等. 肉苁蓉多糖对 D-半乳糖致衰老模型小鼠 CREB 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):137-141.

[10] 陶义存,李建英,许永华,等. 肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠高原肺水肿的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(15):134-138.

[11] 周海涛,曹建民,林强. 肉苁蓉对大鼠力竭游泳能力和心肌线粒体抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):229-233.

[12] NAN Z D, ZHAO M B, ZENG K W, et al. Anti-inflammatory iridoids from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim desert [J]. Chin J Nat Med,2016,14(1):61-65.

[13] NAN Z D, ZENG K W, SHI S P, et al. Phenylethanoid glycosides with anti-inflammatory activities from the stems of *Cistanche deserticola* cultured in Tarim desert [J]. Fitoterapia,2013,89:167-174.

[14] 南泽东,赵明波,姜勇,等. 塔中栽培荒漠肉苁蓉化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (16): 2665-2670.

[15] 南泽东,赵明波,姜勇,等. 塔中栽培荒漠肉苁蓉中的木脂素类成分 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (3): 463-468.

[责任编辑 顾雪竹]