

淫羊藿水提部位化学成分的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析

刘丽萍¹, 徐晓芳², 孙东东^{1*}, 严世海³, 程建明^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046;
3. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**采用高效液相-电喷雾四级杆飞行时间串联质谱(HPLC-ESI-Q-TOF-MS)技术对淫羊藿水提取部分中的化学成分进行定性分析。**方法:**采用液相色谱-串联质谱(LC-MS-MS), C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱;质谱使用ESI离子源,正离子与负离子模式下采集数据。**结果:**通过正、负离子质谱信息及元素组成,分析与相关文献数据对照,共鉴定出10个化合物。**结论:**通过超高效液相色谱分离,质谱测定相对分子质量及相关文献数据信息检索确定淫羊藿水提取部分中的化学成分,为阐明淫羊藿水提部分的药效物质基础提供有力的证据。

[关键词] 淫羊藿水提部位; 化学成分; 高效液相-电喷雾四级杆飞行时间串联质谱

[中图分类号] R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0112-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190112

Analysis on Chemical Components from Water Extract of Epimedii Folium by HPLC-ESI-Q-TOF-MS

LIU Li-ping¹, XU Xiao-fang², SUN Dong-dong^{1*}, YAN Shi-hai³, CHENG Jian-ming^{1*}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
3. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to conduct a qualitative analysis on chemical components in water extract of Epimedii Folium by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-ESI-Q-TOF-MS). **Method:** LC-MS-MS was adopted, using C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol-0.1% formic acid as the mobile phase for gradient elution; ESI ion source was used for mass spectra, and data were collected in positive and negative mode. **Result:** Ten compounds from water extract of Epimedii Folium were identified by analyzing positive and negative ion mass spectra information and element composition, and comparing controls of data from relevant literatures. **Conclusion:** After the separation by ultra high performance liquid chromatography, relative molecular mass was determined by mass spectra, and chemical compounds in water extract of Epimedii Folium were determined by information search through relevant literature data, in order to provide powerful therapeutic material basis for water extract of Epimedii Folium.

[Key words] water extract of Epimedii Folium; chemical components; HPLC-ESI-Q-TOF-MS

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、或朝鲜淫羊藿的干燥叶,味辛、甘,性温。归

[收稿日期] 20130927(006)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZYX6-014);江苏省2012年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ12-0626);江苏省中医药局科技项目(LZ13013)

[第一作者] 刘丽萍, 硕士, 从事中药成分分析及中药剂型研究, Tel:025-85811001, E-mail:llp_sdd_08@163.com

[通讯作者] *程建明, 博士, 副研究员, 从事中药药剂及分析研究, Tel:025-85811524, E-mail:cjm7895@163.com;

*孙东东, 博士, 助理研究员, 从事中药化学成分分析研究, Tel:025-85811006, E-mail:sun_21373@163.com

肝、肾经。具有补肾阳,强筋骨,祛风湿功能,用于肾阳虚衰,阳痿遗精,筋骨痿软,风湿痹痛,麻木拘挛^[1]。液相色谱-串联质谱(LC-MS-MS)技术在化学成分研究中的应用已显优势^[2]。本文采用 LC-MS-MS 技术,对淫羊藿水提取部分中的主要化学成分进行鉴定,便于进一步阐明淫羊藿水提取部分的药效物质基础。

1 材料

AB SCIEX Triple ToF 5600 质谱仪(美国 AB 公司),LC-20A 型快速液相(配有 DGU-20A3 在线脱气机,LC-20AD XR 泵,SIL-20A XR 自动进样器及 CTO-20AC 柱温箱,日本 Shimadzu 公司),TF1.6 software, Shortcut to peskview (Analyst), FA1104N 1/1 万电子天平(上海精密科学仪器有限公司),EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司);色谱甲醇(HPLC,江苏汉邦科技有限),甲酸(分析纯,Merck 公司),超纯水(自制)。淫羊藿药材采于陕西,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 的干燥叶。

2 方法

2.1 LC 检测条件 Hanbon LichrospherTM HPLC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱 0 ~ 5 min, 10% A, 5 ~ 10 min, 10% ~ 30% A, 10 ~ 15 min, 30% ~ 85% A, 15 ~ 20 min, 85% ~ 100% A, 20 ~ 23 min, 100% A, 23 ~ 25 min, 100% ~ 10% A, 24 ~ 30 min, 10%, 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.2 MS 检测条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,多反应监测(MRM),离子喷雾电压(ion spray voltage, IS)分别为 5 500.00, -4 500.00 V;去簇电压(decustering potential, DP)分别为

80, -80 V;碰撞电压(collision, CE)分别为 45.0, -30.0 V;雾化气(ion source gas1)55.00 psi;辅助加热器(ion source gas 2)55.00 psi。气帘气(CUR)为 40.00 pis, 去溶剂温度(TEM)为 500.00 °C;TOF MASSES(DA):Min 100.000 0, Max 1 200.000 0;碰撞活化扫描(collisational excitation scanning, CES)为 20.0。

2.3 样品溶液的制备 称取 80 g 淫羊藿药材,加入 8 倍量水,煎煮 3 次,每次分别 1, 1, 0.5 h 过滤,合并滤液,合并后水提取液体积 1 000 mL,再加入 1 100 mL 95% 乙醇密封,静置 48 h 后,抽滤取上清液,将上清液放在 80 °C 水浴锅上烘干。烘干恒重后,称取 0.100 0 g 用 50% 甲醇定容到 100 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

3 结果

3.1 LC-MS 成分鉴定 用 LC-MS-MS 对淫羊藿水提取部分中化学成分进行定性分析,(-)ESI-MS 和(+)ESI-MS 的质谱总离子流(TIC)见图 1。

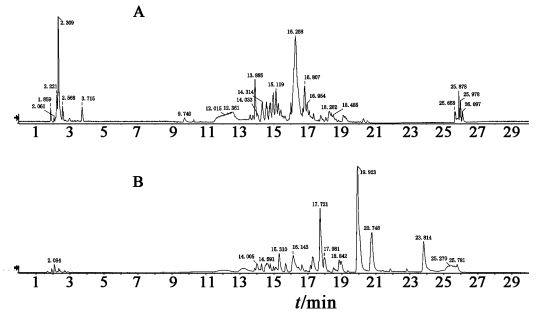


图 1 淫羊藿水提取部分中负离子(A)和正离子(B)模式的总离子流

3.2 淫羊藿水提取部分化学成分分析 通过 LC-MS 检测得到淫羊藿水提取部分中各化学成分的保留时间和质谱信息,并结合提取离子流图及与对照品、相关文献数据对比进行化学成分确认,见表 1。

表 1 淫羊藿化学成分分析

No.	t_R /min	负离子模式		正离子模式		分子式	化合物
		实测相对分子质量	理论相对分子质量	实测相对分子质量	理论相对分子质量		
1	2.30	179.057 6	179.056 1			C ₆ H ₁₂ O ₆	肌醇
2	12.23	463.089 6	463.088 2	465.102 2	465.103 8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷
3	13.04	807.276 5	807.271 7			C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	朝藿定 B
4	13.56	867.296 3	867.291 7			C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	朝藿定 C
5	13.56	837.285 6	837.288 1	839.304 4	839.303 7	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	朝藿定 A
6	13.58	675.232 1	675.229 4			C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	淫羊藿苷
7	14.31	285.040 9	285.040 5			C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素
8	16.04	513.178 7	513.176 6	515.190 1	515.192 2	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	淫羊藿次苷 II
9	17.66	269.046 5	269.045 5			C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄素
10	24.66	281.249 6	281.248 6			C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸

3.3 根据质谱裂解特征鉴定的成分 t_R 为 2.30 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 179 $[M - H]^-$, 脱去 OH 后形成特征碎片 m/z 161 $[M - H - H_2O]^-$; 脱去二个氧等后形成特征碎片 m/z 134 $[M - H - CH_2O]^-$ 等碎片峰, 见图 2-A, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_6H_{12}O_6$, 据文献报道淫羊藿中存在肌醇其相对分子质量 180, 据此推测该化合物为肌醇^[3]。

t_R 为 12.23 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 463 $[M - H]^-$, 脱去后形成特征碎片 m/z 300 $[M - H - C_6H_{11}O_5]^-$ 等碎片峰, 见图 2-B, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 据文献报道淫羊藿中存在金丝桃苷其相对分子质量 464, 据此推测该化合物为金丝桃苷^[4]。

t_R 为 13.04 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 807 $[M - H]^-$, 脱去糖基形成特征碎片 m/z 645 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$; 脱去形成特征碎片 m/z 514 $[M - H - C_{11}H_{18}O_8 - CH_3]^-$; 脱去形成特征碎片 m/z 351 $[M - H - C_{21}H_{28}O_{11}]^-$ 等碎片峰, 见图 2-C, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{38}H_{48}O_{19}$, 据文献报道淫羊藿中存在朝藿定 B 其相对分子质量 808, 据此推测该化合物为朝藿定 B^[5]。

t_R 为 13.56 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 867 $[M + COOH]^-$, 脱去形成特征碎片 m/z 675 $[M + COOH - C_6H_{11}O_4 - COOH]^-$; 脱去形成特征碎片 m/z 367 $[M + COOH - C_{21}H_{27}O_{10} - COOH]^-$ 等碎片峰, 见图 2-D, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{39}H_{50}O_{19}$, 据文献报道淫羊藿中存在其相对分子质量朝藿定 C, 据此推测该化合物为朝藿定 C^[5]。

t_R 为 13.56 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 837 $[M - H]^-$, 脱去糖基形成特征碎片 m/z 675 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$ 等碎片峰, 见图 2-E, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{39}H_{50}O_{20}$, 据文献报道淫羊藿中存在朝藿定 A 其相对分子质量 838, 据此推测该化合物为朝藿定 A^[6]。

t_R 为 13.58 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 675 $[M - H]^-$, 脱去糖基等后形成特征碎片 m/z 366 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - C_6H_{11}O_4]^-$; 脱去 $C_{16}H_{20}O_7$ 后形成特征碎片 m/z 351 $[M - H - C_{16}H_{20}O_7]^-$ 等碎片峰, 见图 2-F, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{33}H_{40}O_{15}$, 据文献报道淫羊藿中存在淫羊藿苷其相对分子质量 676, 据此推测该化合物为淫羊藿苷^[7]。

t_R 为 14.31 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 285 $[M - H]^-$, 脱去后形成特征碎片 m/z 133 $[M - H - C_7H_4O_4]^-$ 等碎片峰, 见图 2-G, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{15}H_{10}O_6$, 据文献报道淫羊藿中存在木犀草素其相对分子质量 286, 据此推测该化合物为木犀草素^[8]。

t_R 为 16.04 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 513 $[M - H]^-$, 脱去糖基等后形成特征碎片 m/z 366 $[M - H - C_6H_{12}O_4]^-$, 再脱去一个氧后形成特征碎片 m/z 351 $[M - H - C_6H_{11}O_4 - O]^-$; 脱去等后形成特征碎片 m/z 323 $[M - H - C_{11}H_{10}O_3]^-$ 等碎片峰, 见图 2-H, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{33}H_{40}O_{15}$, 据文献报道淫羊藿中存在淫羊藿次苷 II 其相对分子质量 514, 据此推测该化合物为淫羊藿次苷 II^[9]。

t_R 为 17.66 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 269 $[M - H]^-$, 脱去 CO 后形成特征碎片 m/z 241 $[M - H - CO]^-$; 脱去后形成特征碎片 m/z 225 $[M - H - C_2H_4O]^-$ 等碎片峰, 见图 2-I, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{15}H_{10}O_5$, 据文献报道淫羊藿中存在大黄素其相对分子质量 270, 据此推测该化合物为大黄素^[10]。

t_R 为 24.66 min 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 281 $[M - H]^-$, 脱去丁基形成特征碎片 m/z 223 $[M - H - C_4H_{10}]^-$; 脱去形成特征碎片 m/z 207 $[M - H - C_3H_6O_2]^-$ 等碎片峰, 见图 2-J, 根据元素组成分析, 该化合物分子式 $C_{18}H_{34}O_2$, 据文献报道淫羊藿中存在油酸其相对分子质量 282, 据此推测该化合物为油酸^[11]。

4 讨论

本实验的色谱峰没有完全分开但是由于采用 LC-MS/MS 联用技术, 利用质谱的最快, 最灵敏的高分辨率, 精确质量测定的定性能力的优点。通过获得色谱峰准分子离子, 对淫羊藿水提取部分进行了化学成分分析, 鉴定出淫羊藿水提取部分中可能含有 22 种化学成分。其成分再通过二级质谱根据特征碎片离子峰加以确认。在正负离子模式检测的化学成分中, 由准确相对分子质量 (误差 $< 5 \times 10^{-6}$) 及元素组成分析确定的化合物为 10 个。这 10 个化学成分中主要为黄酮类化合物 (金丝桃苷、朝藿定 B、朝藿定 C、朝藿定 A、淫羊藿苷、木犀草素、淫羊藿次苷 II 等)。从淫羊藿总离子流图可以看出, 色谱峰在正离子模式及负离子模式下均有体现, 同时还有一些响应较好的

牡荆子的化学成分

宋妍, 杨雪, 葛红娟, 李建林, 汪冬庚, 黄金华, 陈广通*
(南通大学药学院, 江苏南通 226001)

[摘要] 目的: 研究牡荆子的化学成分。方法: 采用反复硅胶柱色谱、ODS、制备高效液相色谱法及重结晶等方法对牡荆子提取物进行分离纯化, 根据波谱数据结合理化性质解析所得化合物的结构。结果: 从牡荆子醋酸乙酯萃取部分分离得到8个化合物, 分别鉴定为紫花牡荆素 (casticin, **1**), 去四氢铁杉脂素 (detetrahydroconidendrin, **2**), 6-羟基-4 β -(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3 α -羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萘醛 (6-hydroxy-4 β -(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3 α -hydroxymethyl-7-methoxy-3,4-dihydro-2-naphthaldehyde, **3**), 对羟基苯甲酸乙酯 (ethyl p-hydroxybenzoate, **4**), 5,4'-二羟基-3,6,7,8,3'-五甲氧基黄酮 (5,4'-dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone, **5**), 5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone, **6**), 5,4'-二羟基-6,7,8,3'-四甲氧基黄酮 (5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone, **7**), 异落叶松脂素 (isolaricresinol, **8**)。结论: 化合物**4,5,7**为首次从该属植物中分得, 化合物**2**为首次从该植物中分得。

[关键词] 牡荆属; 牡荆子; 化学成分

[中图分类号] R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0116-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190116

Chemical Constituents of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* Fruits

SONG Yan, YANG Xue, GE Hong-juan, LI Jian-lin, WANG Dong-geng,
HUANG Jin-hua, CHEN Guang-tong*
(School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this article was to study the chemical constituents of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* fruits. **Method:** Constituents were separated and repeatedly purified through column chromatography on silica gel column, ODS and preparative HPLC. Their structures were elucidated by spectral analysis. **Result:** Eight compounds were obtained from the ethyl acetate extracts, their structures were identified as: casticin (**1**), detetrahydroconidendrin (**2**), 6-hydroxy-4 β -(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3 α -

[收稿日期] 20130922 (019)

[基金项目] 南通市科技项目 (AS2011019)

[第一作者] 宋妍, 硕士, 助理实验员, 从事天然药物研究与开发工作, Tel: 0513-85051758, E-mail: violet200599@ntu.edu.cn

[通讯作者] * 陈广通, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物研究与开发工作, Tel: 0513-85051749, E-mail: guangtong_chen@ntu.edu.cn

- [6] 窦建鹏, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 朝鲜淫羊藿的色谱指纹图谱及液相色谱/电喷雾串联质谱分析[J]. 化学学报, 2009, 67(22): 2613. [7] 窦建鹏, 刘志强, 刘淑莹. 淫羊藿苷的电喷雾质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(5): 837.
- [8] 李瑞明, 宋伟峰, 陈杰, 等. 高效液相色谱串联质谱法分析菊花水提取液的化学成分[J]. 今日药学, 2012, 22(9): 513.
- [9] 张依, 姚志红, 秦子飞, 等. LC-MS/MS 测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II [J]. 暨南大学学报, 2012, 33(3): 305.
- [10] 宋增锋, 彭娟, 马辰. LC-MS/MS 测定大鼠大黄素血药浓度及脑组织含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 926.
- [11] 周劲帆, 覃富景, 冯洁, 等. 二氧化碳超临界流体萃取两面针根挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 5.

[责任编辑 邹晓翠]