

LC-TOF/MS 快速鉴定女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物 模拟清蒸品的化学成分

宋梦晗, 张学兰*, 李慧芬, 姜秋, 蒋海强, 崔伟亮, 吴鹏, 王均秀, 赵鑫
(山东中医药大学, 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地, 济南 250355)

[摘要] 目的:通过 LC-TOF/MS 快速鉴定女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物(特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷、女贞苷)模拟清蒸品的化学成分,探讨女贞子蒸制过程中环烯醚萜苷类成分的转化机制。方法:色谱条件为流动相乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,7%~12% A;5~20 min,12%~25% A;20~30 min,25%~40% A;30~35 min,40%~100% A),流速 0.2 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 3 μL,检测波长 240 nm;质谱使用 Agilent 6230 型 LC-TOF/MS 联用系统,在 ESI/MS 正离子模式下采集数据。通过对照品定位、质谱数据及文献参照分析 4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的化学成分。结果:4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品中均检出了橄榄酸;特女贞苷模拟清蒸品中还检出红景天苷和 2 种特女贞苷异构体;新女贞苷模拟清蒸品中鉴定出了 3,4-二羟苯基-β-D-葡萄糖苷;橄榄苦苷和女贞苷模拟清蒸品中分别检出其各自的苷元羟基酪醇和酪醇。结论:女贞子中环烯醚萜苷类成分性质不稳定,加水、加热可使其水解生成次级苷或者苷元,特女贞苷在模拟炮制过程中可转化为其异构体。女贞子酒蒸后补肝肾药效增强与其环烯醚萜苷类成分水解密切相关。

[关键词] 环烯醚萜苷类;清蒸品;转化机制;女贞子;特女贞苷;橄榄酸

[中图分类号] R284.1;O657.7+2;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016160014

Rapid Identification of Chemical Components in Ligustri Lucidi Fructus by Simulation of Its Steamed Products with Four Secoiridoid Glycosides

SONG Meng-han, ZHANG Xue-lan*, LI Hui-fen, JIANG Qiu, JIANG Hai-qiang,
CUI Wei-liang, WU Peng, WANG Jun-xiu, ZHAO Xin

(Heritage Base of Traditional Chinese Medicine (TCM) Processing Technology, State Administration of TCM, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To identify chemical components in Ligustri Lucidi Fructus by simulation of its steamed products with four secoiridoid glycosides, and discuss transformation mechanism of secoiridoid glycosides in Ligustri Lucidi Fructus during steaming process. **Method:** HPLC was employed with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution and detection wavelength at 240 nm. Agilent 6230 LC-TOF/MS coupling system was adopted. Chemical components in Ligustri Lucidi Fructus by simulation of its steamed products with four secoiridoid glycosides were determined by reference positioning, mass spectrometry data and literature reference. **Result:** Olivanic acid was determined in four simulation of steamed products; salidroside and two kinds of specnuezhenide isomers were detected in specnuezhenide simulation of steamed products; 3, 4-dihydroxy-ethyl-β-D-glucoside was identified in neoneuzhenide simulation of steamed products; oleuropein and ligustroside simulation of steamed products were detected their respective glycosides of hydroxytyrosol and tyrosol. **Conclusion:** Property of secoiridoid glycosides in Ligustri Lucidi Fructus is instable, water and heating can make

[收稿日期] 20151118(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373968);国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目(2015)

[第一作者] 宋梦晗,在读硕士,从事中药新药研发与中药炮制原理研究,Tel:15169100933,E-mail:menghansong1014@163.com

[通讯作者] *张学兰,硕士生导师,教授,从事中药炮制与中药新药研发研究,Tel:0531-89628081,E-mail:zhang8832440@sina.com

them hydrolysis to produce its secondary glycosides or glycosides, specnuezhenide can convert into its isomer during simulation process. The enhancement of tonifying liver and kidney efficacy of Ligustri Lucidi Fructus is closely related to hydrolysis of its secoiridoid glycosides.

[Key words] secoiridoid glycoside; steamed products; transformation mechanism; Ligustri Lucidi Fructus; specnuezhenide; olivanic acid

女贞子具有滋补肝肾、明目乌发的功效,其炮制方法主要有蒸、酒蒸、酒拌、九蒸九晒等。酒蒸时间一般为 2~8 h,但《北京市中药饮片炮制规范》2008 年版要求“加黄酒,加适量水,密封,蒸 15~24 h”^[1]。酒蒸女贞子可增强其滋补肝肾的作用,故在临床用药中女贞子多以酒制品入药^[2]。女贞子中主要含有环烯醚萜苷类、三萜类、苯乙醇类等成分。环烯醚萜苷类成分主要有特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷等^[3],苯乙醇类成分主要有红景天苷、酪醇、羟基酪醇等。女贞子环烯醚萜总苷具有保肝利胆、抗肝纤维化、抗肿瘤、降血脂、降血糖作用^[4-5],特女贞苷具有免疫调节作用^[6]。橄榄苦苷具有抗氧化、抗炎、抗癌、降血糖作用^[7-8]。红景天苷为红景天的主要活性成分,具有抗肝纤维化、抗肾纤维化、抗心肌缺血等作用。酪醇具有保护心血管作用^[9-12]。羟基酪醇具有抗癌、降血糖、抗骨质疏松等作用^[13-14]。

本课题组前期研究表明女贞子经酒蒸或清蒸后,特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷、女贞苷和女贞苷 G13 含量均显著降低,而红景天苷、酪醇、羟基酪醇、女贞酸含量显著升高^[15-17],而酒蒸品与清蒸品中各指标成分含量差别不大。据此推测,女贞子中部分环烯醚萜苷类成分性质不稳定,加水、加热可使其水解生成其次级苷或者苷元,且女贞子中环烯醚萜苷类的水解只与加水、加热有关,而与是否加黄酒无关。但女贞子蒸制过程中环烯醚萜苷类成分的转化机制尚不明确。本实验采用 LC-TOF/MS 技术分析女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的化学成分,探讨女贞子蒸制过程中环烯醚萜苷类成分的转化机制,为揭示女贞子酒蒸增效机制提供科学依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪和 6230 型液相质谱联用仪(美国 Agilent 公司),FA1604N 型 1/10 万电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。特女贞苷、新女贞苷对照品(自制,纯度均 >98%),橄榄酸对照品(上海一林生物科技有限公司,批号 2014040319),橄榄苦苷、羟基酪醇对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20121020, 20121112),女贞苷对照品(云南西力生物科技有限

公司,批号 35897-92-8),红景天苷、酪醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110818-200404,111676-200401),水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的制备 称取特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷、女贞苷对照品适量,分别加适量水超声使溶解,取各对照品溶液适量,分别置离心管中,密闭,隔水蒸制 24 h^[1],取出,放凉,备用。

2.2 供试品溶液的制备 取 2.1 项下各化合物模拟清蒸品,于蒸发皿中蒸干,取剩余残渣,加入 50% 甲醇 1 mL 超声使溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别称取特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷、女贞苷、红景天苷、酪醇、羟基酪醇对照品适量,置同一 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,备用。另称取橄榄酸对照品适量,置 5 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,备用。

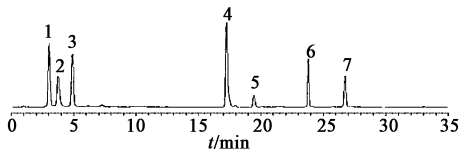
2.4 LC-TOF/MS 分析模拟清蒸品的化学成分

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 7%~12% A; 5~20 min, 12%~25% A; 20~30 min, 25%~40% A; 30~35 min, 40%~100% A),流速 0.2 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 3 μL,检测波长 240 nm。

2.4.2 质谱条件 在电喷雾(ESI)电离质谱正离子模式下采集数据。离子源为电喷雾离子源,雾化器压力 30 Pa,干燥气流量 10 L·min⁻¹,离子阱质谱的脱溶剂温度 350 °C,质谱扫描范围 m/z 100~2 000。

2.4.3 模拟清蒸品的成分分析 按 2.4.1 项下色谱条件分析得对照品溶液 HPLC,见图 1,2。4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品质谱总离子流图见图 3~6。化合物通过质谱数据解释、已知对照品定位并参考文献进行鉴别,见表 1。以特女贞苷为例说明其水解过程见图 7。根据特女贞苷、新女贞苷、橄

榄苦苷、女贞苷模拟清蒸品正离子模式下主要化合物的质谱数据,由文献及相应化合物在反相柱上的保留值可知,在图3~6中均获得 t_R 18.294 min的8号峰,分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 243.085 8,其 t_R 和相对分子质量与橄榄酸对照品一致,故鉴定为橄榄酸。LC-TOF/MS成分分析结果表明4种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品中均检出了橄榄酸;特女贞苷模拟清蒸品中还检出红景天苷和2种特女贞苷异构体,新女贞苷模拟清蒸品中鉴定出了3,4-二羟基苯乙基- β -D-葡萄糖苷,橄榄苦苷和女贞苷模拟清蒸品中分别检出其各自的苷元羟基酪醇和酪醇。



1. 羟基酪醇;2. 红景天苷;3. 酪醇;4. 新女贞苷;5. 特女贞苷;6. 橄榄苦苷;7. 女贞苷(图3~6同)

图1 混合对照品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances

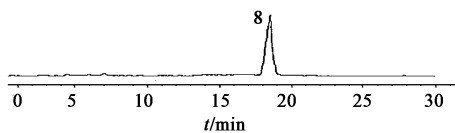


图2 橄榄酸(8)对照品 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatogram of olivanic acid(8) reference substances

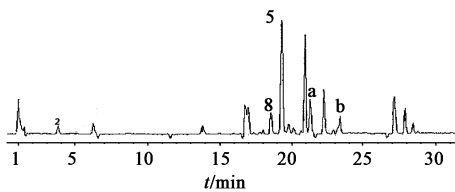
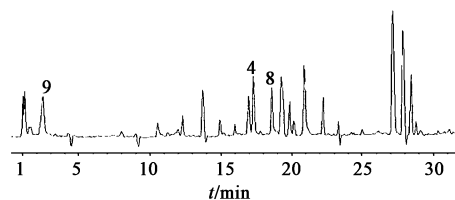


图3 特女贞苷总离子流

Fig. 3 Total ion chromatogram of specnuezhenide



9. 3,4-二羟基苯乙基- β -D-葡萄糖苷

图4 新女贞苷总离子流

Fig. 4 Total ion chromatogram of neonuezhenide

3 讨论

根据对照品定位、质谱解析并参照文献,采用LC-TOF/MS技术对女贞子中4种化合物模拟清蒸

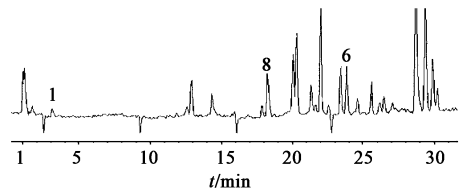


图5 橄榄苦苷总离子流

Fig. 5 Total ion chromatogram of oleuropein

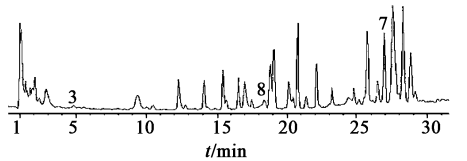


图6 女贞苷总离子流

Fig. 6 Total ion chromatogram of ligustroside

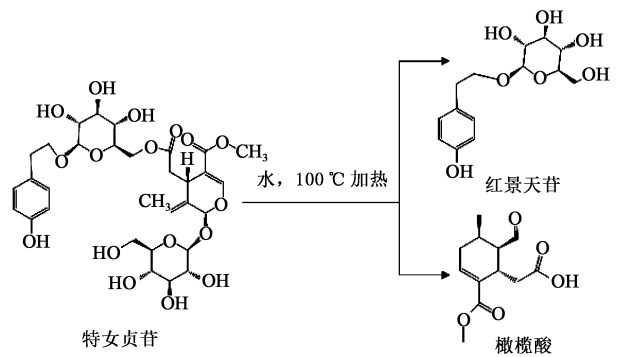


图7 特女贞苷水解过程

Fig. 7 Hydrolysis process of specnuezhenide

品进行分析和成分鉴别,结果表明该方法快速、灵敏、准确度高,可较为全面、准确地分析各化合物在炮制过程中的变化规律与转化机制,可为揭示女贞子成分转化机制提供科学依据。

本研究表明4种环烯醚萜苷类成分在加水、加热条件下均产生了橄榄酸,且4种环烯醚萜苷类成分模拟清蒸品中均检测到各自对应的苯乙醇类成分,说明特女贞苷、新女贞苷、橄榄苦苷、女贞苷性质不稳定,加水、加热(100℃)可使其裂环上的酯键和环烯醚萜部分的氧苷键水解断裂,生成其次级苷或者苷元。其中与红景天苷、酪醇或羟基酪醇等相连的酯键断裂产生苯乙醇类化合物,而断裂的另一部分氧化生成橄榄酸。这与前期研究中测定女贞子酒蒸过程中苯乙醇类成分随蒸制时间延长而含量增加的结论相吻合^[17],从而创新性地从炮制前后活性成分转化揭示了女贞子酒蒸变化的机制,同时也推测了单体成分模拟炮制技术的可行性。

本课题组前期曾对上述4种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品和模拟酒蒸品化学成分进行比较,结

表 1 女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品化学成分质谱数据及结构鉴定

Table 1 MS data and structure identification of chemical components in Ligustri Lucidi Fructus by simulation of its steamed products with four secoiridoid glycosides

峰号	t_R /min	分子离子峰	m/z	推断化合物	相对分子质量/Da	分子式	化合物类型
1	3.092	$[M + NH_4]^+$	172.096 3	羟基酪醇 ^[18]	154	C ₈ H ₁₀ O ₃	苯乙醇
2	3.846	$[M + NH_4]^+$	318.142 9	红景天苷 ^[18-19]	300	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	苯乙醇苷
3	4.812	$[M + H]^+$	139.059 6	酪醇 ^[18]	138	C ₈ H ₁₀ O ₇	苯乙醇
4	17.247	$[M + NH_4]^+$	720.269 5	新女贞苷 ^[16,18]	702	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	环烯醚萜苷
5	19.334	$[M + NH_4]^+$	704.274 3	特女贞苷 ^[18-19]	686	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	环烯醚萜苷
6	23.827	$[M + Na]^+$	563.173 5	橄榄苦苷 ^[18-19]	540	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	环烯醚萜苷
7	26.912	$[M + NH_4]^+$	542.223 0	女贞苷 ^[19]	524	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	环烯醚萜苷
8	18.294	$[M + H]^+$	243.085 8	橄榄酸 ^[18]	242	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	有机酸
9	2.369	$[M + NH_4]^+$	334.149 4	3,4-二羟基苯乙基-β-D-葡萄糖苷	316	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	苯乙醇苷
a	21.188	$[M + NH_4]^+$	704.274 1	特女贞苷异构体 a	686	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	环烯醚萜苷
b	23.100	$[M + NH_4]^+$	704.275 0	特女贞苷异构体 b	686	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	环烯醚萜苷

果发现模拟酒蒸品的化学成分更加复杂,且在模拟酒蒸过程中黄酒中的成分也发生转化,但 4 种环烯醚萜苷类化合物在模拟酒蒸与模拟清蒸过程中的转化机制是一致的,而模拟清蒸较模拟酒蒸更能确切揭示其水解及转化机制。后期研究将对女贞子中环烯醚萜苷类化合物及其活性水解物进行大鼠体内药动学比较,以从活性成分转化与体内吸收角度阐述女贞子酒蒸增效机制。

【参考文献】

[1] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范 [S]. 北京:化学工业出版社,2008:31.

[2] 徐苹,张学兰. 女贞子炮制历史沿革研究[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(3):263-265.

[3] 赵丽丽,冯毅凡. 女贞子中三萜类和环烯醚萜类成分研究进展[J]. 广东药学院学报,2012,28(1):107-111.

[4] 刘净,梁敬钰,谢韬. 环烯醚萜类化合物近年研究进展[J]. 海峡药学,2004,16(1):14-19.

[5] 乔卫,张彦文,吴寿金. 天然环烯醚萜类化合物的生物活性[J]. 国外医学·植物药分册,2001,16(2):65-67.

[6] 蔡溱,石力夫,胡晋红,等. 特女贞甙体外对小鼠脾淋巴细胞转化和自然杀伤细胞活性的影响[J]. 第二军医大学学报,1998,19(1):76-78.

[7] Han J, Talorete T P, Yamada P, et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells[J]. Cytotechnology, 2009,59(1):45-53.

[8] Al-Azzawie H F, Alhamdani M S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits[J]. Life Sci,2006,78(12):1371-1377.

[9] 张奕,刘永刚. 红景天苷抗肝纤维化的实验研究[J]. 中国药房,2006,17(11):813-815.

[10] 张明发,沈雅琴. 红景天苷及其苷元酪醇的心血管保护作用[J]. 中国新药杂志,2012,21(21):2521-2525.

[11] Hashim Y Z, Rowland I R, McGlynn H, et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro* [J]. Int J Cancer, 2008, 122(3):495-500.

[12] Hamden K, Allouche N, Damak M, et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste *in vitro* and in rats [J]. Chem Biol Interact, 2009, 180(3):421-432.

[13] Zhi L, Liu Z B, Feng Z H, et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by pigment simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal epithelial cells [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(11):1089-1098.

[14] Hagiwara K, Goto T, Araki M, et al. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 662(1/3):78-84.

[15] 姜秋,蒋海强,张学兰,等. 女贞子酒蒸过程中 4 种裂环环烯醚萜苷类成分的动态变化[J]. 中成药,2014,36(12):2561-2564.

[16] 李转梅,张学兰,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中新女贞苷、木樨榄苷-11-甲酯和女贞酸的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):14-17.

[17] 姜秋,蒋海强,张学兰,等. 女贞子酒蒸过程中 5 种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):60-63.

[18] 梁晓,吴鹏,张学兰,等. 女贞子不同炮制品 HPLC 指纹图谱色谱峰的归属与比较[J]. 中药材,2015,38(11):2288-2291.

[19] 占方玲,张学兰,蒋海强,等. 女贞子生制品化学成分的 HPLC-ESI/MS 分析[J]. 中成药,2013,35(12):2707-2710.

【责任编辑 刘德文】