UFLC-ESI-IT-TOF 鉴定六味地黄丸中的化学成分和代谢成分*

□赵新峰 孔宏伟 汪江山 许国旺**

（中国科学院大连化学物理研究所代谢组学研究中心 大连 116023）

摘 要：目的：鉴定六味地黄丸中的化学成分和代谢成分。方法：采用超快液相色谱梯度洗脱，飞行时间质谱正负离子同时检测。结果：在六味地黄提取物中鉴定了 40 种化学成分，在大鼠血中鉴定了 6 种原型药物和 9 种代谢产物，并推断了以上产物的代谢途径。结论：UFLC-ESI-IT-TOF 方法适合于复杂中成药样品的分析，有助于全面了解六味地黄丸中的化学成分和代谢成分。

关键词：超快液相色谱 飞行时间质谱 六味地黄丸 化学成分 代谢成分

六味地黄丸在中成药中具有极其重要的地位，自宋代创方以来，应用已有几百年的历史。经历代发展，本方临床应用极广，近代运用创新尤多。六味地黄丸主要功能为滋阴补肾，用于肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、消渴等。中国药典 2005 版处方为：熟地黄 160g；山茱萸（制）80g；牡丹皮 60g；山药 80g；茯苓 60g；泽泻 60g。以上 6 味，粉碎成细粉，过筛，混匀。每 100g 粉末加炼蜜 35~50g 与适量的水，泛丸，干燥，制成水蜜丸。

六味地黄丸成分复杂，有必要全面研究其化学成分和代谢产物，以保证药品质量的安全、有效和一致性。张洁等[1]采用高效液相色谱建立了六味地黄丸的指纹图谱，并结合中药相似度软件和主成分分析法对全指纹图谱和其精细指纹图谱进行了模式识别研究。唐涛等[2]采用二维液相色谱技术分离六味地黄丸，提高了系统的分辨率和峰容量，对六味地黄丸有效成分的研究具有一定意义。刘养清[3]等将红外光谱法用于六味地黄丸的定性鉴别，可以将不同生产厂家、不同剂型、不同批次的六味地黄丸进行准确的区分。刘小平等[4]建立了六味地黄丸的 X-射线衍射指纹图谱用于鉴定六味地黄丸及其相应的组成药材。赵新峰等[5~7]采用胶束电动毛细管色谱和液相色谱质谱联用法对六味地黄丸进行了定性和定量分析。王喜军等[8]对 11 种六味地黄丸血中移行成分进行了分离和结构鉴定，共得到了 8 个化合物。高分辨飞行时间质谱以精确质量数定性，与超快液相色谱联用适合于分析复杂中成药样品的化学成分和代谢成分。本文采用该技术对六味地黄丸及其在大鼠血中的代谢产物进行了分析，在六味地黄提取物中鉴定了 40 种化学成分，在大鼠血中鉴定了 6 种原型药物和 9

收稿日期：2008-11-27

修回日期：2009-01-06

* 国家科技支撑计划（2006038079037）：基于代谢组学的人参皂苷 Rh2、四物汤等研究，负责人：许长江；国际科技合作项目（2007DFA31060）：代谢组学用于中药质量控制的方法学研究，负责人：许长江。

** 联系人：许国旺，本刊编委，博士研究生导师，研究员，主要研究方向：代谢组学平台及其在中药、疾病、工业生物技术的研究，E-mail：xugw@dicp.ac.cn。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

种代谢产物，并初步推断了以上产物的代谢途径。

一、实验部分

1. 试剂与样品

乙腈为 HPLC 级，美国 TEDIA 公司；95%乙醇为分析醇，山东禹王实业有限公司；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。六味地黄丸(水蜜丸)为北京同仁堂产。

2. 仪器及条件

Shimadzu FPLC-ESI-IT-TOF 液相色谱—质谱联用仪及工作站。色谱条件：色谱柱为 C18 柱(5μm，2.1mm×150 mm)；流动相为二元梯度系统，其中溶剂 A 为 10mM 乙酸铵溶液，溶剂 B 为乙腈，梯度洗脱程序为 0~30min，2%B~95%B，95%B 保持 10 min；自动进样 2μL。质谱条件：ESI 离子源；扫描范围 m/z100-800；接口电压 4.5kV；IT 真空 1.2×10^{-2}Pa，TOF 真空 1.2×10^{-4}Pa；仪器温度 40℃；雾化气 N_2 流速 1.5L/min；干燥气 N_2 压力 0.2MPa；CDL 和加热块温度 200℃；阳极电压 4.5kV；阴极电压-3.5kV；离子累积时间 20msec。

3. 样品的处理

(1)六味地黄提取物处理

将六味地黄丸粉碎，称取粉末 3g，加入 95%乙醇约 50mL，超声波振荡提取 3 次，每次 15min，合并提取液，过滤。将滤液减压浓缩，用 95% 乙醇定容至 50mL，定容后用 0.45μm 微孔滤膜过滤，滤液作为 HPLC/MS 分析样品，质谱总离子流图见图 1。

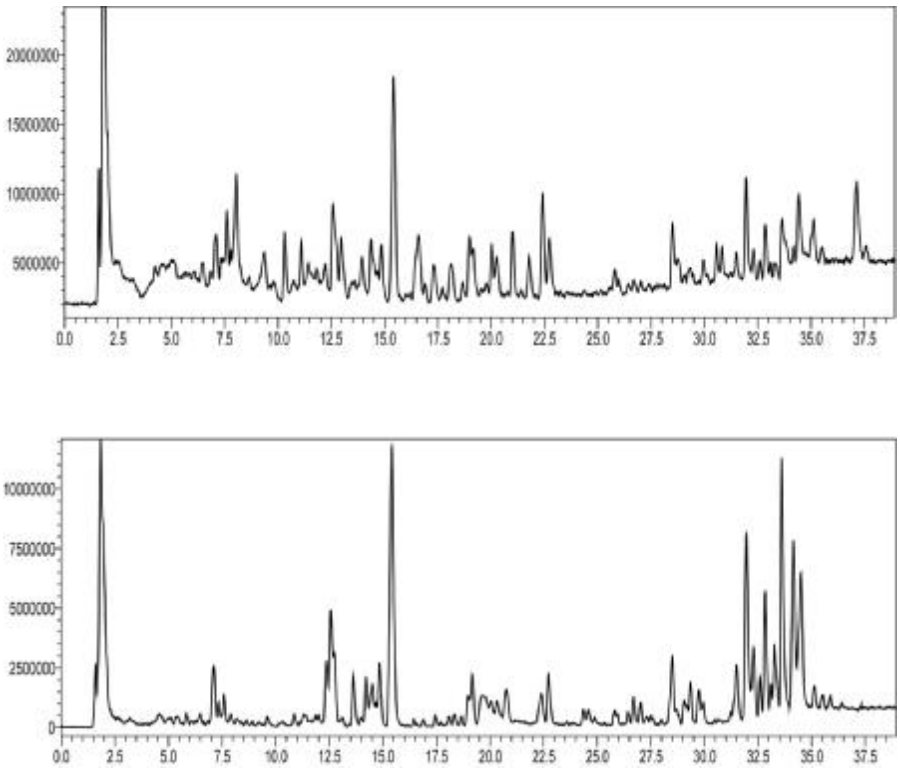
(2)大鼠血清样品处理

取 SD 大鼠(体重约 200g)灌胃给药(5g/Kg)，1h 后尾静脉采血约 0.5mL，室温放置 0.5h，10000 r/min 离心 5min，取上清液，加入 3 倍量乙腈，涡旋混匀，15000r/min 离心 10min，取上清液冻干，加入甲醇 100μL，涡旋混匀，20000r/min 离心 15min，取上清液做为分析样品。

二、结果与讨论

1. 六味地黄提取物中化学成分的鉴定

六味地黄提取物中化学成分十分复杂，等度洗脱难以得到满意的分离结果。本研究首先以乙腈—0.1% 甲酸为洗脱溶剂，在质谱正离子检出模式下，泽泻和山茱萸中主要化学成分响应较好。泽泻中主要含三萜类化学成分，包括泽泻醇 A、B、C(alisol A，B，C)，泽泻醇 A 乙酸酯(alisol A monoacetate)，泽泻醇 B 乙酸酯(alisol B monoacetate)，泽泻醇 C 乙酸酯(alisol C monoacetate)等，文献报道该类成分在质谱正离子检出模式下响应较好[9]。山茱萸中主要苷类成分番木鳖苷(loganin)、莫罗忍冬苷(morroniside)、当药苷(sweroside)等在该条件下响应也较好，与文献报道



(A 为正离子模式，B 为负离子模式)

图 1　六味地黄提取物的质谱总离子流图

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

相符[10]。熟地、牡丹皮和茯苓中主要化学成分在该条件下检出较少。以乙腈—水为洗脱溶剂进行梯度洗脱，在负离子检出模式下熟地、牡丹皮和茯苓中主要化学成分响应较好。熟地中主要含地黄苷A、B、C、D，益母草苷，桃叶珊瑚苷等环烯醚萜苷类化合物，牡丹皮中主要化学成分为芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷等二萜苷类化合物，茯苓中主要有效成分为茯苓酸、去氢茯苓酸等化合物，这些成分在负离子检出模式下响应均较好，与文献报道相符[11~13]。将洗脱溶剂换为乙腈-10mM乙酸铵溶液时，能够兼顾质谱正负离子检测模式，检出尽可能多的化学成分，溶剂系统最终确定为乙腈-10mM乙酸铵溶液。以检出化学成分的数目和信号强度为指标，对质谱的接口电压、雾化气N_2流速和干燥气N_2流速等质谱参数进行了优化，最终确定为：接口电压4.5kV；雾化气N_2流速1.5L/min；干燥气N_2压力0.2MPa；CDL和加热块温度200℃；阳极电压4.5kV；阴极电压-3.5kV；离子累积时间20msec。在该条件下，通过飞行时间质谱的精确质量数及二级质谱相关碎片，在正负离子检测模式下共鉴定了六味地黄提取物中的40种化学成分（见表1）。

2. 血清化学成分及代谢产物的鉴定

表1 六味地黄提取物质谱数据及峰归属

Peak no	Retention time (min)	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ or $[M-H]^-$	Attribution
1	2.113	$[M-H]^-$ 169.01	gallic acid
2	2.332	$[M-H]^-$ 363.13	dihydrocatalpol
3	5.984	$[M-H]^-$ 361.11	catalpol
4	8.070	$[M+H]^+$ 127.04	5-HMF
5	8.316	$[M-H]^-$ 685.22	rehmannioside D
6	9.834	$[M-H]^-$ 509.19	rehmannioside C
7	10.252	$[M-H]^-$ 347.13	leonuride
8	11.330	$[M-H]^-$ 345.12	aucubin
9	12.200	$[M-H]^-$ 635.09	1,2,3-tri-O-galloyl-glucose
10	12.567	$[M+Na]^+$ 429.14	morroniside
11	13.160	$[M+Na]^+$ 519.15	oxypaeoniflorin
12	14.067	$[M-H]^-$ 787.10	1,2,3,6-tetro-O-galloyl-glucose
13	14.853	$[M+H]^+$ 359.13	sweroside
14	15.360	$[M-H]^-$ 165.06	paeonol
15	15.400	$[M+Na]^+$ 503.15	paeoniflorin
16	15.433	$[M+Na]^+$ 413.14	loganin
17	15.920	$[M-H]^-$ 647.16	trioxybenzoyloxypaeoniflorin
18	17.947	$[M-H]^-$ 631.17	dioxybenzoyloxypaeoniflorin
19	18.353	$[M-H]^-$ 615.17	oxybenzoyloxypaeoniflorin
20	19.747	$[M-H]^-$ 541.16	cornuside
21	19.822	$[M-H]^-$ 523.17	rehmmannioside A or B
22	20.313	$[M-H]^-$ 599.18	oxybenzoylpaeoniflorin
23	20.780	$[M-H]^-$ 599.18	benzoyloxypaeoniflorin
24	20.988	$[M-H]^-$ 523.17	rehmmannioside A or B
25	22.773	$[M+Na]^+$ 607.18	benzoylpaeoniflorin
26	26.660	$[M+Na]^+$ 527.33	16-oxoalisol A
27	28.500	$[M+Na]^+$ 509.32	16-oxoalisol B
28	28.510	$[M+H]^+$ 487.34	alisol C
29	29.330	$[M+H]^+$ 529.35	alisol C-23-aceate
30	29.953	$[M+H]^+$ 471.35	11-deoxyalisol C
31	31.930	$[M+Na]^+$ 513.36	alisol A
32	31.970	$[M+H]^+$ 473.66	alisol B
33	32.307	$[M-H]^-$ 525.36	dehydropachymic acid
34	32.310	$[M+H]^+$ 515.37	alisol B-23-aceate
35	32.323	$[M+Na]^+$ 555.37	alisol A-23-aceate
36	32.802	$[M-H]^-$ 527.37	pachymic acid
37	33.380	$[M+Na]^+$ 497.36	11-deoxyalisol A
38	34.330	$[M+Na]^+$ 479.35	11-deoxyalisol B
39	34.360	$[M+H]^+$ 501.32	16-oxo-alisol C
40	34.570	$[M-H]^-$ 455.35	ursolic acid

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

通过飞行时间质谱的精确质量数及二级质谱相关碎片，在正负离子检测模式下共鉴定了大鼠血清中 6 种原型化合物和 9 种代谢产物（见表 2）。

王喜军等[8]采用高效液相色谱法对大鼠灌胃给予六味地黄丸后的血清化学成分进行了分析，通过保留时间结合紫外光谱鉴定了 8 个化合物，其中莫诺苷、獐牙菜苷和马钱子苷 3 种直接入血的原型成分为山茱萸所引入，5-羟甲基-2-糠酸（5-HMFA）为 5-羟甲基-糠醛（5-HMF）的代谢物，2-羟基-苯乙酮-4-葡萄糖醛酸苷、4-甲氧基-5-磺酸基苯乙酮-2-葡萄糖醛酸苷、2,4-二羟基-苯乙酮、2,5-二羟基-4-甲氧基苯乙酮 4 种化合物为丹皮酚的代谢产物。本研究共鉴定了大鼠血清中的 6 种原型化合物，分别为丹皮酚（paeonol）、莫罗苷（morroniside）、番木鳖苷（loganin）、当药苷（sweroside）、茯苓酸（pachymic acid）和去氢茯苓酸（dehydropachymic acid）。5-羟甲基-糠醛（5-HMF）的代谢产物中除发现其氧化产物 5-HMFA 外，还鉴定了 5-HMFA 进一步的氧化产物 5-FDCA，由此推断 5-HMF 的主要代谢途径为图 2-A。除文献报道的 3 种丹皮酚的代谢产物 2,4-二羟基-苯乙酮（M3）、2,5-二羟基-4-甲氧基苯乙酮（M6）和 2-羟基-苯乙酮-4-葡萄糖醛酸苷（M7）外，本研究同时鉴定了另外 4 种丹皮酚代谢产物，分别为 2-羟基-4-甲氧基-5-磺酸基苯乙酮（M1），2-磺酸基-4-甲氧基苯乙酮（M2），2,4-二羟基-磺酸基苯乙酮（M4）和 2-磺酸基-4-羟基苯乙酮（M5），由此推断六味地黄丸中丹皮酚的代谢途径为图 2-B。另有大量代谢物结构需进一步推断。

表 2　大鼠血清中 6 种原型化合物和 9 种代谢产物的质谱数据及峰归属

Peak no	Retention time (min)	$[M+H]^+$,$[M+Na]^+$ or $[M-H]^-$	Attribution
1	0.640	$[M-H]^-$ 155.00	5-FDCA
2	1.653	$[M-H]^-$ 141.02	5-HMFA
3	9.400	$[M-H]^-$ 327.07	M1
4	11.133	$[M-H]^-$ 181.05	M2
5	11.453	$[M-H]^-$ 215.00	M3
6	12.520	$[M+Na]^+$ 429.14	morroniside
7	13.260	$[M-H]^-$ 151.04	M4
8	13.267	$[M-H]^-$ 231.00	M5
9	14.820	$[M+H]^+$ 359.13	sweroside
10	15.360	$[M-H]^-$ 165.06	paeonol
11	15.367	$[M+Na]^+$ 413.14	loganin
12	15.393	$[M-H]^-$ 245.01	M6
13	18.020	$[M-H]^-$ 229.02	M7
14	32.802	$[M-H]^-$ 527.37	pachymic acid
15	32.367	$[M-H]^-$ 525.36	dehydropachymic acid

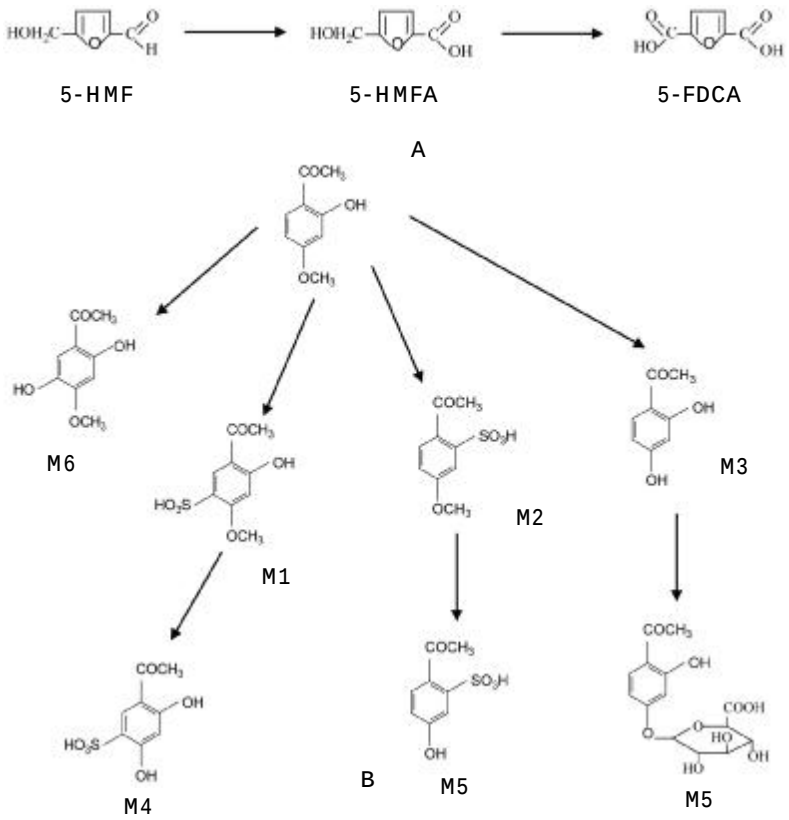


图 2　5-HMF（A）和丹皮酚（B）的代谢途径

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

三、结 论

本研究采用 UFLC-ESI-IT-TOF 技术对六味地黄丸及其在大鼠血中的代谢产物进行了分析，在六味地黄提取物中鉴定了 40 种化学成分，在大鼠血中鉴定了 6 种原型药物和 9 种代谢产物，并初步推断了以上产物的代谢途径。超快液相色谱与飞行时间质谱联用，适合于分离鉴定复杂中成药成分，有助于全面了解六味地黄丸的化学和代谢信息，为六味地黄丸的质量控制和潜在药效物质基础的探询提供了有力的工具。

参考文献

1 张洁，段继诚，梁振，等. 六味地黄丸的精细指纹图谱分析及模式识别分类研究. 分析化学，2006，34(10)：1423~1425.

2 唐涛，张维冰，李彤，等. 六味地黄丸组分的二维液相色谱分离，分析化学，2007，35(12)：767~1771.

3 刘养清，张晓薇，王爽，等. 中成药六味地黄丸的红外光谱研究. 光谱学与光谱分析，2006，26(2)：275~278.

4 刘小平，陈笑宇，宋青，等. 六味地黄丸的 X-衍射指纹图谱鉴定研究. 中药材，2005，28(3)：184~186.

5 Xinfeng Zhao, Yue Wang, Yuqing Sun. Simultaneous determination of four bioactive constituents in Liuwei Dihuang Pills by micellar electrokinetic chromatography, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007, 44(5), 1183~1186.

6 Xinfeng Zhao, Yue Wang, Yuqing Sun. Quantitative and qualitative determination of Liuwei Dihuang tablets by HPLC-UV-MS/MS, Journal of chromatographic science, 2007, 45(8), 549~552.

7 赵新峰，孙毓庆. 六味地黄丸的高效液相色谱-电喷雾电离-质谱分析，色谱，2003，21(5)：500~502.

8 王喜军，孙文军，张宁，等. 六味地黄丸血中移行成分的分离及结构鉴定，中国天然药物，2007，5(4)：277~280.

9 赵新峰，孙毓庆. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析泽泻中的活性成分，中成药，2007，29(12)，1805~1807.

10 赵新峰，孙毓庆. 高效液相色谱-电喷雾电离-质谱法分析山茱萸中的化学成分，中草药，2008，2，180~182.

11 赵新峰，李平，孙毓庆. 熟地黄的高效液相色谱-电喷雾电离一质谱分析，药物分析杂质，2007，27(6)：874~876.

12 Xinfeng Zhao, Yuqing Sun. Analysis of Paeoniae radix by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization-mass spectrometry, Analytical sciences, 2003, 19(9), 1313~1315.

13 于能江，郭继芬，赵毅民，等. 高效液相色谱-二极管阵列检测-质谱法鉴定茯苓中的三萜成分，分析化学，2004，32(7)：866~870.

Identification of Chemical and Metabolic Components of Liuwei Dihuang Pills by Ultra Fast Liquid Chromatography-Electrospray-Ion Trap-Time of Flight Mass Spectrometry

Zhao Xinfeng, Kong Hongwei, Wang Jiangshan, Xu Guowang

(Metabonomics Research Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

Objective: To identify the chemical and metabolic components. Method: UFLC gradient elution with TOF detection in positive and negative mode. Result: 40 chemical components were identified in Liuwei Dihuang extract. 6 original component and 9 metabolites were identified in rat serum. The proposed metabolic pathway was given. Conclusion: UFLC-ESI-IT-TOF was a powerful method in the analysis of complicated TCM samples. It helps the comprehensive understanding of the chemical and metabolic components of Liuwei Dihuang Pills.

Keywords: UFLC-ESI-IT-TOF; Liuwei Dihuang Pills; Chemical Components; Metabolic Components

（责任编辑：张志华）

更 正

本刊 2008 年 6 期封面图片更正："民族植物学研究室"应改为"民族植物学实验室"，"生物地理学实验室"应改为"生物地理与生态学研究室"。

（□ 本刊编辑部）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn