

高效液相色谱 - 质谱联用法研究 巫山淫羊藿黄酮类成分*

□谭 鹏 徐 娟 仲玲利 雷海民 杨 蕾 李 飞**

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘 要 :目的 :采用高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MSⁿ) 研究巫山淫羊藿中的黄酮类成分。方法 :70%乙醇提取,大孔树脂柱纯化得到总黄酮 ;运用 HPLC-MSⁿ 联用技术得到各化合物的总离子流图和多级质谱图。结果 :从巫山淫羊藿药效部位中鉴定出 12 个化合物,其中有 3 对化合物互为同分异构体。结论 :HPLC-MSⁿ 法可用于巫山淫羊藿中黄酮类成分的结构鉴定,为建立快速、准确的质量评价方法和分析炮制前后成分变化提供了参考。

关键词 巫山淫羊藿 黄酮 HPLC-MSⁿ

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.03.024

巫山淫羊藿来源为小檗科植物巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 的干燥叶,目前成分研究的报道不多^[1-3],其中已分离鉴定的有淫羊藿苷、巫山淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 C 等成分^[4],且各成分的药理作用有所差异^[5-7]。2010 年版《中国药典》将巫山淫羊藿单列,而淫羊藿项下包括淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、朝鲜淫羊藿 4 个品种,二者质量标准中含量测定也不相同,其中巫山淫羊藿研究相对较薄弱,有必要对其所含的黄酮类成分进行深入研究。液相色谱-质谱联用技术 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 已广泛应用于混合物组成成分的结构分析和鉴定,通过高效液相色谱对混合物进行有效分离,各化合物依次进入质谱仪测定,得到准分子离

子峰及多级质谱,以及成分结构信息。目前已有采用液质联用方法对朝鲜淫羊藿、心叶淫羊藿、淫羊藿等黄酮类成分进行分析的报道^[8-11]。本文采用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MSⁿ) 技术研究巫山淫羊藿黄酮类成分的结构和裂解途径,分析化合物结构,特别是同分异构体的质谱鉴别,为探讨巫山淫羊藿炮制前后成分变化规律,阐释油炙增效机理提供参考。

一、仪器与试剂

1. 仪器

Agilent 1100 LC-MSD series trap (双高压溶剂泵,在线真空脱气机,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器,ESI 离子阱质谱检测器)。

2. 试剂

乙腈 (Fisher 公司) 为色谱纯,水为超纯水,其他

收稿日期:2011-07-15

修回日期:2011-08-03

* 国家自然科学基金项目 (30873436) 巫山淫羊藿油炙增效机理的研究,负责人 李飞。

** 通讯作者 李飞,教授,硕士生导师,主要研究方向 :中药炮制原理研究,Tel 010-84738616,E-mail lf668@sina.com。

试剂为分析纯(北京化工厂)。巫山淫羊藿药材由贵州同济堂制药有限公司提供,经北京中医药大学生药系陈玉婷教授鉴定为巫山淫羊藿(*Epimedium wushanense* T. S. Ying)。

二、方法与结果

1. 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 流动相:水(A)-乙腈(B) 梯度洗脱, 0~5 min, 20% B; 5~10 min, 20%~25% B; 10~28 min, 25%~28% B; 28~35 min, 28%~35% B; 35~55 min, 35%~40% B; 55~60 min, 40%~60% B; 柱温 30℃; 检测器: DAD 检测器; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL。

2. 质谱检测条件

扫描范围: 200~1000 u; 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 10.0 L·min⁻¹; 雾化室压力: 40.0 psi; 电喷

雾电压: 4000 V; 离子模式: ESI(+)

3. 供试品溶液的制备

取巫山淫羊藿叶片粗粉(过 40 目筛) 适量, 用 70% 乙醇超声提取 2 次, 滤过, 合并两次提取液, 回收溶剂得到提取物, 经石油醚脱脂, AB-8 大孔树脂纯化, 水-乙醇梯度洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 回收溶剂, 减压干燥, 得到总黄酮。精密称取巫山淫羊藿总黄酮适量, 甲醇溶解, 制成 1 mg·mL⁻¹ 的样品溶液。

4. 样品分析结果

取总黄酮样品溶液, 进样 10 μL, 经 HPLC 分离, 进入质谱检测器检测, 得到总离子流图及 HPLC 图, 见图 1。

三、质谱的解析

淫羊藿属中药的黄酮类成分多数以 8-异戊烯基黄酮为母核(见图 2), 取代基的糖种类和数目不

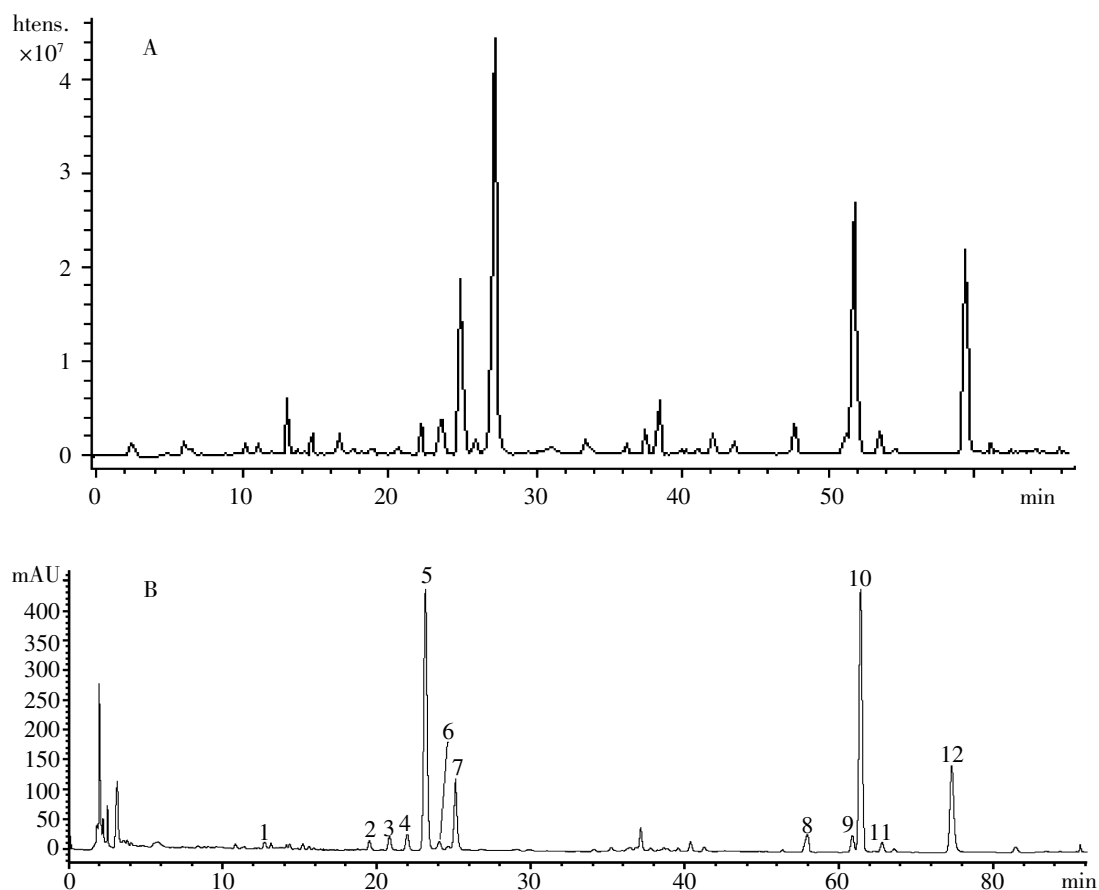


图 1 巫山淫羊藿总黄酮的总离子流图(A)和 HPLC 图(B)

注: 1. 淫羊藿苷 A, 2. Hexandraside F, 3. 朝藿定 A, 4. 朝藿定 B, 5. 朝藿定 C, 6. 宝藿苷 VI, 7. 淫羊藿苷, 8. 箭藿苷 A, 9. 箭藿苷 B, 10. 2-鼠李糖基淫羊藿次苷 II, 11. 淫羊藿次苷 I, 12. 淫羊藿次苷 II。

同。根据各化合物的准分子离子峰判断其分子量,结合多级质谱图中的离子碎片分析其裂解规律,结构鉴定如下:

化合物 1 14.8 min 的一级质谱图给出 m/z 663.3 $[M+H]$ 的峰,二级质谱以 m/z 663.1 为母离子进行裂解给出 m/z 517.3 $[M-146+H]$, 355.1 $[M-146-162+H]$, 299.1 $[M-146-162-56+H]$ 。根据淫羊藿黄酮类化合物含有糖结构的特点可知, m/z 517.3 $[M-鼠李糖基+H]$, 355.1 $[M-鼠李糖基-葡萄糖基+H]$, 299.1 $[M-鼠李糖基-葡萄糖基-C_4H_8+H]$, 根据糖失去的顺序和文献报道^[12], 化合物 1 符合淫羊藿苷 A (Epimodoside A) 的裂解规律, 鉴定化合物 1 为淫羊藿苷 A, 结构见表 1。

化合物 2、3 20.8 min 和 22.3 min 两个化合物的一级质谱都给出分子离子峰 m/z 839.3 $[M+H]$, 二级质谱有 m/z 677.3, 531.3, 根据裂解规律可知 m/z 677.3 $[M-葡萄糖基+H]$, 531.2 $[M-葡萄糖基-鼠李糖基+H]$, 369.2 $[M-葡萄糖基-鼠李糖基-葡萄糖基+H]$, 可能是 Hexandraside F 或朝藿定 A, 文献报道^[13]Hexandraside F 与朝藿定 A (epimedin A) 为同分异构体, 仅 3 位糖苷键鼠李糖 (rha) 与葡萄糖 (glc) 的连接碳位不同, 前者为 3-O-rha⁴glc, 后者为 3-O-rha²glc, 前者出峰时间稍早于后者, 所以化合物 2 为 Hexandraside F, 化合物 3 为朝藿定 A, 结构见表 1。

化合物 4 23.9 min 的一级质谱给出 m/z 809.3 $[M+H]$, 二级质谱的碎片离子峰为 m/z 677.3 $[M-木糖基+H]$, 531.3 $[M-木糖基-鼠李糖基+H]$, 369.2 $[M-木糖基-鼠李糖基-葡萄糖基+H]$, 符合朝藿定 B 的裂解规律, 和文献报道^[14]一致, 可知化合物 4 是朝藿定 B, 结构见表 1。

化合物 5、6 24.9 min 和 26.1 min 两个化合物的一级质谱都给出分子离子峰 m/z 823.4 $[M+H]$, 化合物 5 的二级质谱碎片离子峰为 531.3 $[M-鼠李糖基-鼠李糖基+H]$, 化合物 6 的二级质谱碎片离子峰为 677.3 $[M-鼠李糖基+H]$, 可能为朝藿定 C (Epimedin C) 或宝藿苷 VI (Baohuoside VI), 二者为同分异构体, 仅 3 位糖苷键鼠李糖 (Rha) 与鼠李糖 (Rha) 的连接碳位不同, 前者为 3-O-rha⁴rha, 后者为 3-O-rha⁴rha, 结合前期研究结果, 通过自提的朝藿定 C 标准品 (纯度>98%) 比对, 确定化合物 5 为朝藿定 C, 化合物 6 为宝藿苷 VI。

化合物 7、8 27.5 min 和 47.5 min 两个化合物的一级质谱都给出分子离子峰 m/z 677.3 $[M+H]$, 可能为淫羊藿苷 (Icariin) 或箭藿苷 A (Sagittatoside A), 二者为同分异构体, 化合物 7 的二级质谱碎片离子峰为 m/z 531.3 $[M-鼠李糖基+H]$ (见图 3), 369.2 $[M-鼠李糖基-鼠李糖基-葡萄糖基+H]$, 符合淫羊藿苷的裂解规律, 和文献报道^[8]一致, 鉴定化合物 7 为淫羊藿苷, 结构见表 1。化合物 8 的二级质谱碎片离子峰为 515.2 $[M-葡萄糖基+H]$ (见图 4), 符合箭

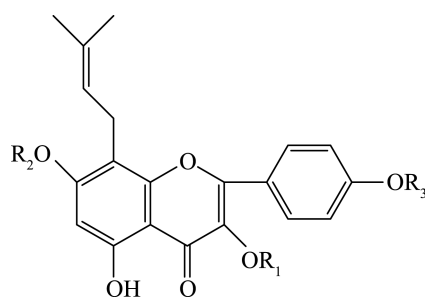


图 2 8-异戊烯基黄酮母核

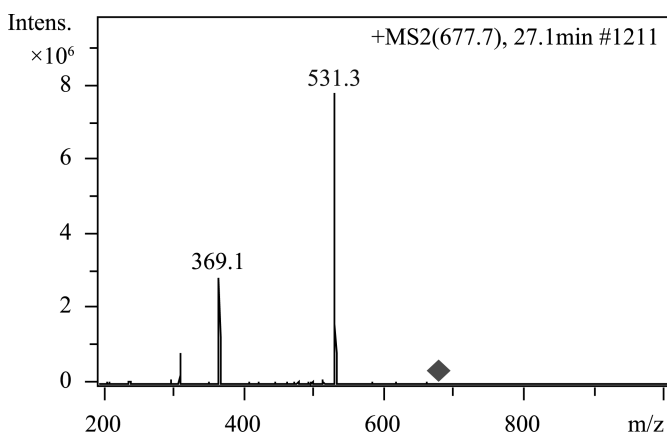


图 3 淫羊藿苷的二级质谱图

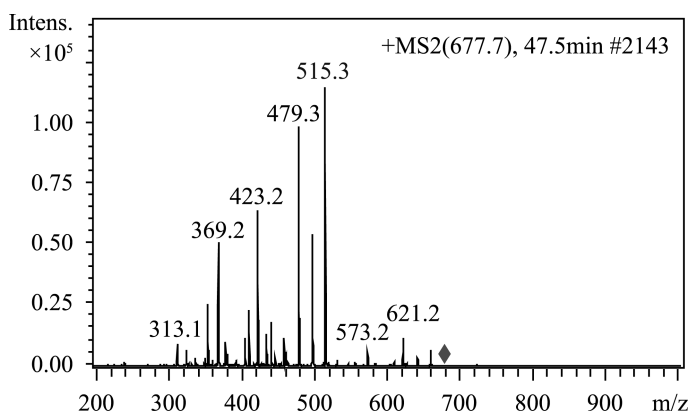


图 4 箭藿苷 A 的二级质谱图

表 1 巫山淫羊藿黄酮类化合物

	R ₁	R ₂	R ₃	英文名	中文名	M+H	MS ²	MS ³
1	Rha	Glc	H	Epimedoside A	淫羊藿苷 A	663.3	517.2	
2	Rha ³ glc	Glc	Me	Hexandraside F		839.3	677.3	
3	Rha ² glc	Glc	Me	Epimedin A	朝藿定 A	839.3	677.3	531.2
4	Rha ² xyl	Glc	Me	Epimedin B	朝藿定 B	809.3	677.3	531.2
5	Rha ² rha	Glc	Me	Epimedin C	朝藿定 C	823.4	531.2	
6	Rha ⁴ rha	Glc	Me	Baohuoside VI	宝藿苷 VI	823.4	677.3	531.2
7	Rha	Glc	Me	Icariin[ICA]	淫羊藿苷	677.3	531.3	369.1
8	Rha ² glc	H	Me	Sagittatoside A	箭藿苷 A	677.3	515.3	
9	Rha ² xyl	H	Me	Sagittatoside B	箭藿苷 B	647.3	515.3	
10	Rha ² rha	H	Me	2 ^m -O-rhamosy Icariside II	2-鼠李糖基淫羊藿次苷 II	661.3	515.3	
11	Rha ⁴ rha	H	Me	Icariside I	淫羊藿次苷 I	661.3	531.3	
12	Rha	H	Me	Icariside II	淫羊藿次苷 II	515.2	313.1	

藿苷 A 的裂解规律,并和文献^[12]一致,确定化合物 8 为箭藿苷 A,结构见表 1。二者的二级质谱裂解规律不同,可作为鉴定这两个化合物的方法。

化合物 9 51.0 min 的一级质谱给出 m/z 647.3 $[M+H]$,二级质谱的碎片离子峰为 m/z 515.2 $[M-\text{木糖基}+H]$,符合箭藿苷 B (Sagittatoside B) 的裂解规律,和文献报道^[12]一致,确定化合物 9 为箭藿苷 B,结构见表 1。

化合物 10 51.7 min 的一级质谱给出 m/z 661.3 $[M+H]$,二级质谱的碎片离子峰为 m/z 515.2 $[M-\text{鼠李糖基}+H]$,符合鼠李糖基淫羊藿次苷 II (2^m-O-rhamosy icariside II) 的裂解规律,和文献报道^[15]一致,确定化合物 10 为鼠李糖基淫羊藿次苷 II,结构见表 1。

化合物 11 52.2 min 的一级质谱给出 m/z 531.3 $[M+H]$,二级质谱的碎片离子峰为 m/z 369.2 $[M-\text{葡萄糖基}+H]$,符合淫羊藿次苷 I (Icariside I) 的裂解规律,和文献报道^[16]一致,确定化合物 11 为淫羊藿次苷 I,结构见表 1。

化合物 12 59.4 min 的一级质谱给出 m/z 515.2 $[M+H]$,二级质谱的碎片离子峰为 313.0 $[M-146-56+H]$,符合淫羊藿次苷 II (Icariside II) 的裂解规律,和文献报道^[17]一致,确定化合物 11 为淫羊藿次苷 II,结构见表 1。

四、讨 论

电喷雾 (ESI) 质谱正离子模式提供的分子离子

峰以 $[M+H]^+$ 的形式存在,由此可得到化合物的分子量;同时多级质谱串联提供的碎片离子信息,可进一步推断化合物的结构,从而快速、准确分析混合物中的组分结构,是研究没有对照品的中药成分的有效手段,用于巫山淫羊藿的黄酮类成分分析,取得了良好的效果。

根据淫羊藿属中药中黄酮类成分的裂解规律,分析鉴定出的 12 个化合物,与淫羊藿、朝鲜淫羊藿、心叶淫羊藿中所含成分有区别,Hexandraside F、箭藿苷 A、鼠李糖基淫羊藿次苷 II 为首次通过 HPLC-MS 法从巫山淫羊藿黄酮类成分中分析鉴定。通过分析结构特点,初步区分其中的 3 对同分异构体:Hexandraside F 和朝藿定 A、朝藿定 C 和宝藿苷 VI、淫羊藿苷和箭藿苷 A。

本实验建立了一种快速分析巫山淫羊藿中黄酮类成分的方法,可为其质量控制提供参考。此外,巫山淫羊藿炮制过程中黄酮苷类成分会转化为次级苷或苷元,此方法也可用于炮制前后黄酮类成分变化规律的比较。

参考文献

- 1 梁海锐,闫文玖,李家实,等.巫山淫羊藿的化学研究.药学学报,1988,23(1):34.
- 2 周颖欣,贾敏鸽,涂光忠,等.巫山淫羊藿根的化学成分研究.中草药,2005,36(6):817.
- 3 王丹红,陈玉婷,李飞,等.巫山淫羊藿叶中挥发油成分的气相色谱-质谱分析.时珍国医国药,2007,18(12):3022.
- 4 肖培根主编.新编中药志(第二册).北京:化学工业出版社,2002:

- 324.
- 5 蔡曼玲,季晖,李萍,等.5种淫羊藿黄酮类成分对体外培养成骨细胞的影响.中国天然药物,2004,2(4):235~239.
 - 6 翟远坤,葛宝丰,陈克明,等.淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷Ⅱ对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究,中药材,2010,33(12):1896~1900.
 - 7 孙晓玲,段小群.淫羊藿苷及衍生物药理作用研究进展.华夏医学,2010,23(6):807~810.
 - 8 袁杰,龚又明,鞠鹏,等.HPLC-MS²法分析朝鲜淫羊藿中的化学成分.中草药,2004,25(4):371.
 - 9 童玉玺,徐德然,孔令义.HPLC-MS³法分析朝鲜淫羊藿有效部位化学成分.中国天然药物,2006,4(1):58.
 - 10 刘鹏飞,徐德然,孔令义. HPLC-MS³分析心叶淫羊藿有效部位的化学成分.中国中药杂志,2007,32(16):1666~1668.
 - 11 朱靖博,李丹凤,邱焕杰,王龙星,肖红斌. HPLC/ESI-MS分析淫羊藿黄酮苷类化合物.大连工业大学学报,2009,28(5):321~325.
 - 12 Mizuno M, Sakakibara N, Hanioka S, *et al.* Flavonol glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*,1988,27(11):3641.
 - 13 王超展,耿信笃.箭叶淫羊藿中5种黄酮类化合物的反相色谱分离制备.分析化学,2005,33(1):106.
 - 14 Ito Y, Hirayama F, Suto K, *et al.* Three flavonol glycosides from *Epimedium koreanum*.*Phytochemistry*,1988,27(3):911.
 - 15 Kang SS, Kang YJ, Lee MW. Flavonoids from *Epimedium koreanum*. *J Nat Prod*, 1991, 54(2):542.
 - 16 李文魁,张如意,肖培根.朝鲜淫羊藿化学成分的研究.中草药,1995,26(9):453.
 - 17 李枫,刘永滢.宝藿甙-I, VI, VII和宝藿素的分离和结构研究.药学报,1988,23(10):739.

HPLC-MSⁿ Analysis of Flavonoids in *Epimedium wushanense* T. S. Ying

Tan Peng, Xu Juan, Zhong Lingli, Lei Haimin, Yang Lei, Li Fei

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: This study was aimed to investigate the flavonoids of *Epimedium wushanense* T. S. Ying using HPLC-MSⁿ. The sample was extracted with 70% ethanol and purified by macroporous resin. The structures were detected by HPLC-MSⁿ experiments. The results showed that twelve compounds were identified from the effective part of *Epimedium wushanense* T. S. Ying. There are three pairs of isomeric compounds. It was concluded that this method can be used for rapid and accurate identification of flavonoids. It can also be used as reference in the analysis of chemical constituent changes before and after drug processing.

Keywords: *Epimedium wushanense* T. S. Ying, flavonoid, HPLC-MSⁿ

(责任编辑 李沙沙 张志华,责任译审 王 晶)