

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00817

射干异黄酮类化学成分的 HPLC-DAD/ESI-MS 分析

冯超,周婷婷,范国荣*,魏华

第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**通过高效液相色谱-二极管阵列光谱检测/电喷雾离子化质谱(HPLC-DAD/ESI-MS)联用技术定性分析射干中的主要化学成分。**方法:**以70%乙醇超声辅助提取中药射干原药材。高效液相色谱条件:选择 YMC ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)色谱柱,以20%甲醇水溶液 A-70%乙腈水溶液 B(0→30→45→65 min, 20%→30%→90%→100% B)梯度洗脱,流速为0.45 ml/min,检测波长为265 nm。ESI质谱条件:正离子扫描模式,喷针电压5 000 V,毛细管电压20 V,干燥气(N₂)压力20 psi(1 psi=6 894.8 Pa),质量扫描范围 m/z 250~550,雾化温度300℃。**结果:**通过 HPLC-DAD/ESI-MS 联用技术,分离检测并鉴定出射干中9个主要异黄酮类化学成分。**结论:**通过 HPLC-DAD/ESI-MS 联用技术,为鉴定射干中的化学成分建立起了一种快速、高效的分析方法,也为中药射干的质量控制提供更多的科学依据。

[关键词] 射干;高效液相色谱-二极管阵列光谱检测/电喷雾离子化质谱联用;化学成分

[中图分类号] R 931.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0817-04

HPLC-DAD/ESI-MS in analyzing chemical constituents of *Rhizoma belamcanda*

FENG Chao, ZHOU Ting-ting, FAN Guo-rong*, WEI Hua

Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the chemical constituents of *Rhizoma belamcandae* by using high-performance liquid chromatography-diode array detector/electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-DAD/ESI-MS). **Methods:** Dried *Belamcanda chinensis* powder was extracted with 70% ethanol by sonication. The chromatographic separation was performed on a YMC ODS-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm) with a mobile phase composed of 20% CH₃OH(A)-70% ACN(B) (0→30→45→65 min, 20→30→90→100 B), eluted at a flow rate of 0.45 ml/min, and the UV detection wavelength was set at 265 nm. Positive ionization mode with a needle voltage of 5 000 V, a capillary voltage of 20 V, a gas(N₂) press of 20 psi and a temperature of the drying gas of 300℃ was selected. Relative molecular mass data acquisition was performed from m/z 250 to 550 in full MS scan mode. **Results:** Nine major isoflavones were identified from *Rhizoma belamcandae* based on their retention behavior obtained on-line by their UV spectra and the HPLC-DAD/ESI-MS. **Conclusion:** A rapid and efficient HPLC-DAD/ESI-MS method for identifying the chemical constituents of *Belamcandae chinensis* has been established, which provides more scientific information for quality control of *Rhizoma belamcandae*.

[KEY WORDS] *Belamcandae chinensis*; HPLC-DAD/ESI-MS; chemical constituents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7): 817-820]

射干为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 的干燥根茎。春初刚发芽或秋末茎叶枯萎时采挖,除去须根及泥沙,干燥,用于清热解毒,消痰利咽。适用于热毒痰火郁结,咽喉肿痛,痰涎壅盛,咳嗽气喘^[1]。射干始载于《神农本草经》,性味苦寒,入肝、肺经。药理及临床实验表明:射干中异黄酮类化合物具有显著的抗炎^[2-3]、抗菌^[4-5]、抗病毒^[3,6]、清除自由基^[7]、防治心血管疾病^[8]等重要的生物活性与药理作用。其中鸢尾苷、野鸢尾苷等异黄酮是射

干中的主要活性成分。

通过高效液相色谱法(HPLC)对射干中的一种或多种异黄酮进行分析^[9-11],可以确定其中主要组分并测定其含量。但此法必须在有标准对照品的情况下,才能通过保留时间的比对来进行组分的定性和定量分析。据此所建立的射干质量控制方法大多只针对鸢尾苷等少数异黄酮,不够全面。

液质联用技术(HPLC-MS)结合了高效液相色谱的高分辨率和质谱检测的高灵敏度,是目前广泛

[收稿日期] 2008-12-17 **[接受日期]** 2009-03-18

[作者简介] 冯超,硕士生. E-mail: nick617534@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871260, E-mail: Guorfan@yahoo.com.cn

应用的分析方法之一。利用液相色谱的高效分离能力对被分析样品进行分离,再以质谱为检测器在线提供化合物的分子量信息,随着电喷雾(ESI)软电离质谱技术的出现,液质联用技术为研究热不稳定和无紫外吸收的化合物提供了简捷快速的分析方法,而多级串联质谱技术还可以提供被分析成分的结构信息。在传统的分离过程中,有些微量、痕量成分和无紫外吸收的化合物很可能被忽略,而MS具有高度的灵敏性,最低能检测到皮克级的物质,因此很容易发现这些化合物的存在^[12]。目前,HPLC-MS技术已被广泛用于植物有效成分的分离及结构鉴定中。

本研究首次采用HPLC-DAD/ESI-MS联用技术对射干中的主要异黄酮类成分进行鉴定,该法操作简便、快速、灵敏度高、专属性强,为全面控制射干药材的质量提供了依据,对阐明其药效物质基础、质量控制、开发现代中药新药和充分利用我国的药材资源等具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Varian ProStar 高效液相色谱仪-质谱联用仪(美国Varian公司),配备ProStar 210泵、ProStar 410自动进样器、Prostar 330二极管阵列光谱检测器、Varian 1200L三重四极杆电喷雾质谱仪和Varian 1200L色谱-质谱工作站。SENCO R系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);TGL-16G型离心沉淀机(浙江托普仪器有限公司);KUDOS SK5200 H超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),FAI604电子天平(上海天平仪器厂)。

乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merck公司),其余所用试剂均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司),实验用水为Milli-Q纯水系统(美国Millipore公司)制备并经微孔滤膜过滤。射干药材购于上海童涵春药房。

1.2 色谱及质谱条件

1.2.1 色谱条件 YMC ODS-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm I. D., 5 μm);流动相:A为20%甲醇水溶液,B为70%乙腈水溶液,梯度洗脱:0~30 min,20%~30%B;30~45 min,30%~90%B;45~65 min,90%~100%B。流速:0.45 ml/min;柱温:室温;检测波长:265 nm;进样量:10 μl。

1.2.2 ESI-MS条件 电喷雾离子化源,正离子模式扫描,喷嘴电压:5 000 V,毛细管电压:20 V,雾化气(N₂)压力为20 psi(1 psi=6 894.8 Pa),干燥气温度为300℃,质量扫描范围:m/z 250~550。

1.3 样品制备 称取药材粗粉20 g,用200 ml 70%乙醇超声提取30 min,提取2次,将滤液合并,减压挥干有机相,得射干粗提取粉末。

1.4 供试品溶液的制备 精密称取射干提取物粉末2 mg置于离心管中,加5 ml 20%乙腈涡旋溶解,离心12 750×g 10 min后取上清,经0.45 μm微孔滤膜过滤,得待测样品。

2 结果

2.1 色谱行为 供试品的色谱行为如图1所示,流动相为20%甲醇水溶液A:70%乙腈水溶液B,梯度洗脱:0~30 min,20%~30%B;30~45 min,30%~90%B;45~65 min,90%~100%B,流速0.45 ml/min的条件下,不仅能使各色谱峰得到较好的分离,而且不存在峰拖尾现象,可见此色谱条件对射干中的主要化学成分具有较好的分离效果。

2.2 质谱行为 根据供试品的总离子流图(图2)、准相对分子质量、及有关文献报道^[13-15],鉴定出射干中9种化合物的可能结构,其中鸢尾苷、野鸢尾苷、鸢尾苷元、野鸢尾苷元和次野鸢尾黄素为射干中主要的5种异黄酮类化合物。经过高速逆流色谱分离纯化后,通过¹H NMR、¹³C NMR结构解析并与文献^[16-17]比对,进行了结构确证。各色谱峰的解析与鉴定如下:

峰1(保留时间为25.2 min)相对分子质量为462,紫外最大吸收波长为265 nm和334 nm,m/z分别为463.1、485.1和501.0,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的[M+H]⁺、[M+Na]⁺和[M+K]⁺峰。因此推断为鸢尾苷(tectoridin)。

峰2(保留时间为26.4 min)相对分子质量为492,紫外最大吸收波长为266 nm,m/z分别为493.0、515.1和531.1,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的[M+H]⁺、[M+Na]⁺和[M+K]⁺峰。因此推断为鸢尾新苷B(iristectorin B)。

峰3(保留时间为31.3 min)相对分子质量为522,紫外最大吸收波长为266 nm和346 nm,m/z分别为523.1和545.0,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的[M+H]⁺和[M+Na]⁺峰。因此推断为野鸢尾苷(iridin)。

峰4(保留时间为42.4 min)相对分子质量为316,紫外最大吸收波长为265 nm,m/z分别为317.1和355.2,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的[M+H]⁺和[M+K]⁺峰。因此推断为irilin D。

峰5(保留时间为50.8 min)相对分子质量为

300, 紫外最大吸收波长为 266 nm, m/z 分别为 301.0 和 323.1, 是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常

见的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。因此推断为鸢尾苷元 (tectorigenin)。

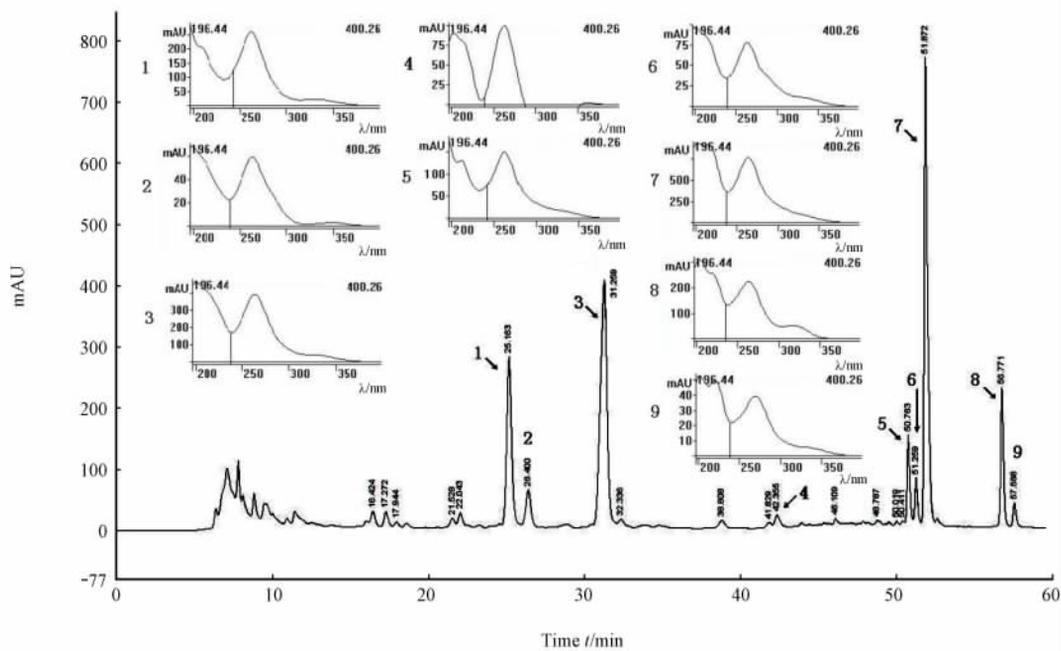


图 1 射干粗提取的高效液相色谱图和紫外吸收图

Fig 1 HPLC-UV chromatogram of purified extract from *Belamcanda chinensis*

1: Tectoridin; 2: Iristectorin B; 3: Iridin; 4: Irlin D; 5: Tectorigenin; 6: Iristectorigenin B; 7: Irigenin; 8: Irisflorentin; 9: Dichtomitin

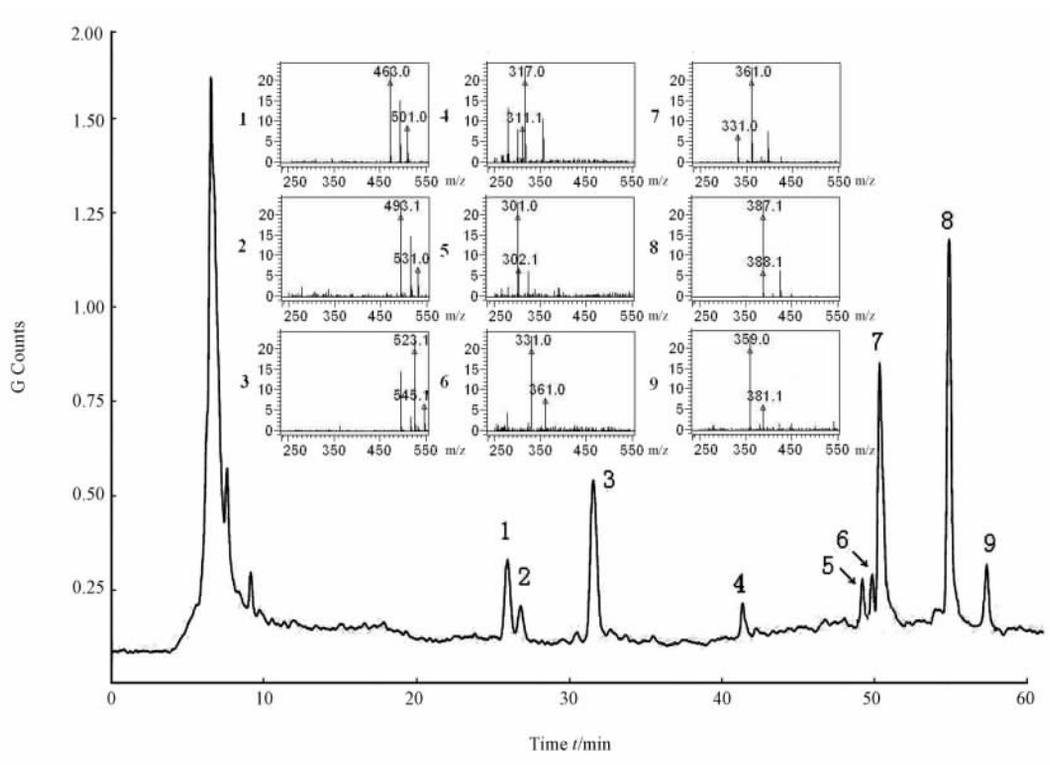


图 2 射干粗提物的 HPLC-ESI/MS 的正离子流图

Fig 2 TIC chromatogram of purified extract from *Belamcanda chinensis* (positive ion mod)

1: Tectoridin; 2: Iristectorin B; 3: Iridin; 4: Irlin D; 5: Tectorigenin; 6: Iristectorigenin B; 7: Irigenin; 8: Irisflorentin; 9: Dichtomitin

峰6(保留时间为51.3 min)相对分子质量为330,紫外最大吸收波长为266 nm, m/z 为331.0,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的 $[M+H]^+$ 峰。因此推断为鸢尾甲黄素 B(iristectorigenin B)。

峰7(保留时间为51.9 min)相对分子质量为360,紫外最大吸收波长为266 nm, m/z 分别为361.0和 m/z 为383.0,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。因此推断为野鸢尾黄素(irigenin)。

峰8(保留时间为56.8 min)相对分子质量为386,紫外最大吸收波长为266 nm和325 nm, m/z 分别为387.1和409.2,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。因此推断为次野鸢尾黄素(irisfloreantin)。

峰9(保留时间为57.6 min)相对分子质量为358,紫外最大吸收波长为271 nm, m/z 分别为359.0和381.0,是异黄酮类化合物在正离子检测方式下常见的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。因此推断为白射干素(dichtomitin)。

3 讨论

色谱分离条件本文考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇水-乙腈水,发现甲醇-水对分离鸢尾苷类化合物有优势,而乙腈-水对分离鸢尾苷元类化合物有优势,所以最终采用了20%甲醇水-70%乙腈水溶液的溶剂体系梯度洗脱,获得了良好的分离效果。对于检测波长的选择,经过DAD在线全波长扫描,射干中各异黄酮类化学成分在265 nm附近均有较大的吸收。

结果表明,运用HPLC-DAD/ESI-MS技术能够有效、快速地对射干中的化学成分进行分析测定,为射干的质量控制以及指纹图谱的建立提供了可靠的

依据。

[参考文献]

- [1] 中国人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M] 北京: 化学工业出版社, 2005: 200.
- [2] 李国信, 秦文艳, 齐越, 陈贺, 赵金明. 射干提取物抗炎及镇痛药理实验研究[J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22: 3-4.
- [3] 齐建红, 李宏卫. 射干的化学成分、药理作用及临床应用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21: 111-113.
- [4] 孟军华, 刘合刚. 射干的研究进展[J]. 湖北中医学院学报, 2004, 6: 49-50.
- [5] 王云, 于军, 于红. 射干提取液对绿脓杆菌 P₂₉ 株 R 质粒体内外消除作用研究[J]. 长春中医学院学报, 1999, 15: 64.
- [6] 韩杨, 孔红, 李宜平. 射干的抗病毒实验研究[J]. 中草药, 2004, 35: 306-308.
- [7] 秦民坚, 吉文亮, 刘峻, 赵俊, 余国奠. 射干中异黄酮成分清除自由基的作用[J]. 中草药, 2003, 34: 640-641.
- [8] 王红武, 张明发, 沈雅琴, 朱自平. 射干对消化系统及实验性血栓的影响[J]. 中医药研究, 1997, 13: 43-45.
- [9] 黄德林, 刘仲义, 韦浩. RP-HPLC 法测定射干和鸢尾中射干甙、鸢尾甙的含量[J]. 华西药学杂志, 1997, 12: 115-116.
- [10] 秦民坚, 吉文亮, 王峥涛. HPLC 测定射干中 6 种异黄酮含量的动态变化[J]. 中国中药杂志, 2006, 31: 1681-1683.
- [11] 王箭, 袁崇均, 游宇光, 陈帅. HPLC 法测定川射干中鸢尾黄酮苷的含量[J]. 中国药房, 2008, 19: 440-442.
- [12] 李卫中, 马燕. 液质联用技术在医药领域的发展与应用[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17: 66-70.
- [13] 邱鹰昆, 高玉白, 徐碧霞, 刘珂. 射干异黄酮类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2006, 16: 175-177.
- [14] 蔡鹰, 丁安伟. 射干药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2008, 19: 1398-1400.
- [15] Li J, Li W Z M, Huang W, Cheung A W H, Bi C W C, Duan R, et al. Quality evaluation of *Rhizoma belamcandae* [*Belamcanda chinensis* (L.) DC.] by using HPLC coupled with diode array detector and mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216: 2071-2078.
- [16] 赏后勤, 秦民坚, 吴新荣. 川射干化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5: 312-314.
- [17] 李蓉, 秦民坚. 薄叶鸢尾的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34: 122-124.

[本文编辑] 尹茶