

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00306

• 研究快报 •

RRLC-TOF/MS 快速鉴别中药淫羊藿中 43 种化学成分

吕磊, 张海, 赵亮, 贾静, 李悦悦, 张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 运用快速液相-高分辨飞行时间质谱(RRLC-TOF/MS)技术对中药淫羊藿化学成分进行快速鉴别。**方法** 色谱分离采用 SHISEIDO MG C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 3 μm) 色谱柱;流动相为乙腈和 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱,A 相比比例随时间的变化:5%~19%(0~3 min),19%~32%(3~13 min),32%~52%(13~25 min),52%~70%(25~30 min);柱温 25℃;流速 0.6 ml/min,柱后分流比为 3:1。质谱定性采用飞行时间质谱,电喷雾离子源(ESI),正离子模式,质量数扫描范围 m/z 100~1 000。**结果** 一次性鉴别出淫羊藿中 43 种的化学成分。**结论** 建立了一种基于 RRLC-TOF/MS 技术对淫羊藿中的化学成分进行快速鉴别的方法,为中药淫羊藿的质量控制及体内的深入研究奠定了基础。

[关键词] 淫羊藿;化学成分;鉴别;飞行时间质谱法**[中图分类号]** R 284.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0306-05

RRLC-TOF/MS in rapid identification of 43 chemical constituents of epimedium

LÜ Lei, ZHANG Hai, ZHAO Liang, JIA Jing, LI Yue-yue, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To use rapid-resolution liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (RRLC-TOF/MS) for analyzing the chemical constituents of epimedium. **Methods** The separation was performed on a SHISEIDO MG C₁₈ reverse phase column (3.0 mm×100 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid; acetonitrile was used as gradient elute. The gradient of A phase was as following: 5%-19%(0-3 min), 19%-32%(3-13 min), 32%-52%(13-25 min), and 52%-70%(25-30 min). The flow rate was 0.6 ml/min, post-column split ratio was 3:1, and the temperature of column was 25℃. Time-of-flight mass spectrometer(TOF/MS) and electrospray ion source (ESI) was applied for qualitative analysis under the positive ion mode, and mass scan range was m/z 100-1 000. **Results** A total of 43 chemical constituents were identified from epimedium by RRLC-TOF/MS in one run. **Conclusion** A rapid and efficient RRLC-TOF/MS approach for identifying the chemical constituents of epimedium has been successfully established, which paves a way for quality control and further *in vivo* studies of epimedium.

[Key words] *Epimedium brevicornum*; chemical constituents; identification; time of flight mass spectrometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):306-310]

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥地上部分,是我国传统的补益中药,始载于《神农本草经》,在中医上常用于补肾阳,强筋骨,祛风湿^[1]。其主要活性成分为黄酮类,以淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿次苷 II 为主^[2]。近年来对于淫羊藿的研究以几个主要黄酮类成分的含量测定居多^[3-4],另外对于指纹图谱研究^[5-6],大多仅限于淫羊藿药材色谱图的共有峰和相似度计算,对于色谱图中各个峰归属并不明确。现代证明,药材中所含各种化学成分具有不同的药理作用,明确淫羊藿色谱图中各个色谱峰归属对于

药材的质量控制及体内研究具有重要意义研究^[7-8]。

到目前为止,对淫羊藿中化学成分分析已有文献^[9-10]报道,以采用传统的植物化学的方法进行分离提取居多。RRLC 与 TOF/MS 串联技术对于中药复杂体系中化学成分分析和鉴定非常有效^[11-12],其灵敏度高,可以在短时间获得化合物的准确相对分子质量,通过比对已建立的已知化学成分数据库,能对被测成分进行快速分析鉴别。因此,相比于传统的中药分离手段,在线联用技术具有显著的优越性。本文运用 RRLC-TOF/MS 技术快速鉴别出淫羊藿中 43 种化学成分,在我们看来,这是国内首次报道

[收稿日期] 2011-01-11**[接受日期]** 2011-02-22**[作者简介]** 吕磊,硕士生,药师。E-mail: k_owen2002@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com

的运用快速液相与 TOF/MS 联用技术对淫羊藿中化学成分的定性分析和鉴别。

1 材料和方法

1.1 仪器 Agilent 1200 系列快速液相色谱仪(美国安捷伦公司),配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器;Agilent 6220 高分辨飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司),配有标准电喷雾离子源(ESI),分析软件为 MassHunter 在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件。DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司);Mettler AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);Kudos-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司)。

1.2 药品与试剂 淫羊藿苷及朝霍定 A、朝霍定 B 和朝霍定 C 对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度 > 99.0%),乙腈和甲酸为色谱纯(Fisher, USA),其余试剂均为分析纯,水为纯水。淫羊藿药材产自湖北,购自上海德康大药房(批号 20101020),经第二军医大学药学院生药学教研室黄宝康教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥地上部分。

1.3 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷、朝霍定 A、朝霍定 B 和朝霍定 C 对照品 5.35、5.12、5.40 及 5.57 mg,置 10 ml 容量瓶中,加甲醇稀释定容,配成浓度分别为 535、512、540 和 557 $\mu\text{g/ml}$ 的混合母液,精密吸取母液 1 ml 置于 100 ml 容量瓶,加甲醇定容后,即得对照品混合溶液。

1.4 供试品溶液的制备 精密称取淫羊藿药材粉末 1 g(过 40 目筛),置 100 ml 锥形瓶中,加 70%乙醇 50 ml,称定质量,超声处理 30 min,放置室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得淫羊藿样品溶液。

1.5 色谱条件 色谱柱:SHISEIDO MG C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 3 μm),流动相 A 相为乙腈,B 相为水(含 0.1%甲酸),梯度洗脱,A 相比例随时间的变化:5%~19%(0~3 min);19%~32%(3~13 min);32%~52%(13~25 min);52%~70%(25~30 min)。进样量:5 μl ;流速:0.6 ml/min;柱温 25℃;运行时间 30 min;柱后分流比为 3:1。

1.6 质谱条件 采用 ESI 源,正离子模式,雾化气为高纯氮气。具体质谱参数:毛细管电压 4 000 V,干燥气温度 350℃,干燥气流速 9 L/min,雾化气压力 35 psi(1 psi=6 894.8 Pa),碎片电压 180 V;参比离子 m/z 121.050 8、 m/z 922.009 7;质量数扫描范围 m/z 100~1 000。测定样品之前,使用调谐液校准质量轴,以保证质量精度误差小于 1×10^{-6} 。

1.7 淫羊藿化学成分数据库的建立 根据国内外专业数据库 Pubmed、ChemSpider、中国科学院化学专业数据库等及国内外相关研究文献,收集了淫羊藿各种化学成分名称及分子式共 100 个。采用安捷伦“formula-database generator”软件(含各元素精确质量数),根据各成分碳、氢、氧的个数,计算精确相对分子质量,建立了包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量、M+H 和 M+Na 准分子离子峰相对分子质量的相应的化学成分数据库。

2 结果和讨论

2.1 实验条件的优化 首先考察了提取方法,本试验选择了较为简便的溶剂超声法。对于提取溶剂,由于淫羊藿主要成分为黄酮类,根据其成分特点,考察了甲醇、50%甲醇以及 70%乙醇,发现采用 70%的乙醇提取获得的峰容量最大,故采用 70%乙醇超声为提取方法。

对色谱条件的摸索,考察了甲醇-水、乙腈-水系统,发现乙腈的洗脱效果优于甲醇,且各色谱峰分离效果更好,加入 0.1%甲酸可以改善峰拖尾,并提高质谱响应。故采用乙腈-水(0.1%甲酸)为流动相。质谱检测比较了正、负离子两种扫描模式,结果发现正模式下峰容量大、质谱响应更好,故实验最终选择在正模式下进行。淫羊藿样品溶液的总离子流图见图 1。

2.2 利用精确质量数和同位数分布鉴别化合物

以 7 号峰 hyperoside 为例说明淫羊藿中色谱峰的鉴别过程。保留时间为 8.01 min 色谱图中的准分子离子包括 465.103 4、487.085 5。利用 Qualitative Analysis 数据分析软件的计算工具(calculator)计算精确质量数的可能元素组成($<3\times 10^{-6}$),并比对数据库中已知化合物的质荷比,确定元素组成分别为 C₂₁H₂₁O₁₂、C₂₁H₂₀O₁₂Na。计算 C₂₁H₂₁O₁₂ 和 C₂₁H₂₀O₁₂Na 的核素分布情况,与实际情况进行对比,从图 2A、2B 可知核素分布的理论值与实际值吻合良好,确定此峰为 hyperoside。同理可知 40 号峰 icaraside II 解析过程(图 2C、2D)。

2.3 利用对照品鉴别同分异构体 实验中采用朝霍定 A(epimedin A)、朝霍定 B(epimedin B)、朝霍定 C(epimedin C)和淫羊藿苷(icariin)的对照品,结合文献^[13-14]报道,无偏差地区分了其中 4 组同分异构体,分别为峰 19 和峰 20、峰 14 和峰 21、峰 22 和峰 23、峰 24 和峰 36,混合对照品的总离子流图见图 3。

2.4 利用油水分配系数区别同分异构体 从淫羊藿药材中鉴别出 6 组同分异构体,除用对照品区分的 4 组外,实验中采用 ACD/Chemdraw 软件计算化

化合物的亲水亲油平衡值 logP 判断出峰顺序。如 10 号峰 hexandraside E 和 12 号峰 ikarisoside B,在

RRLC-TOF/MS 总离子流图中,提取 m/z 为 679.223 8 的离子,结果见图 4。

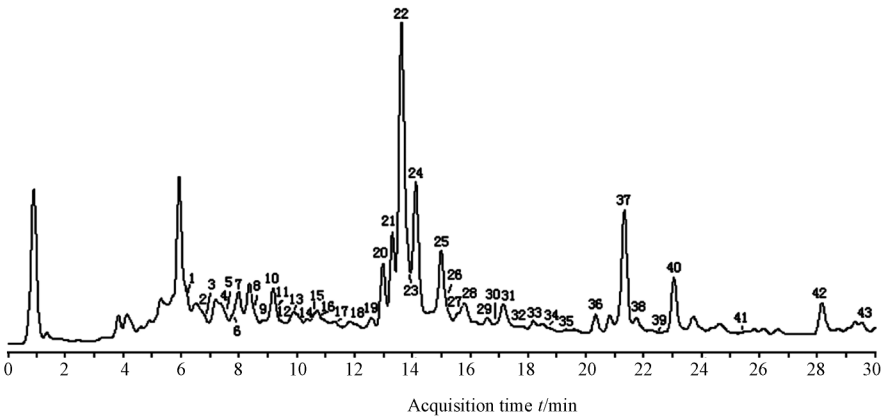


图 1 淫羊藿药材提取物 TOF/MS 总离子流图

Fig 1 Total ion current chromatography of epimedium extracts

1-43: Peaks

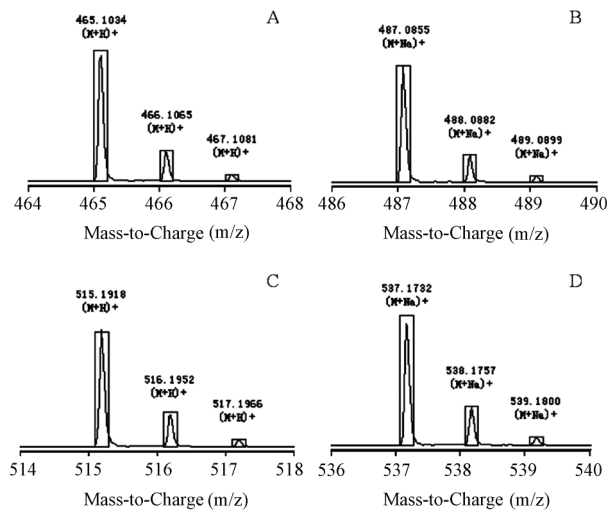


图 2 7 号峰 hyperoside(A,B)和 40 号峰 icarisside II (C,D)的准确质量及核素分布图

Fig 2 Accurate mass and isotopic distribution mass spectrogram of peak 7 hyperoside(A, B) and peak 40 icarisside II (C, D)

The boxes show the theoretical values

采用软件计算的 hexandraside E 和 ikarisoside B 的 logP 值分别为-1.25 和-1.15,表明两个化合物中 ikarisoside B 疏水更强,根据化合物在反相液相层析的保留原则,疏水性越强,出峰越晚,结合其保留时间可判断出峰 10 为 hexandraside E,峰 12 为 ikarisoside B。同理鉴别出峰 11 和峰 15。

2.5 淫羊藿中化学成分的鉴别结果 根据飞行时间质谱测得的精确相对分子质量,比对所建数据库,应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算分子组成,将理论值与实测值进行比对(误差<3×10⁻⁶),

结合上述对同分异构体的鉴别及相关文献^[13-14]报道,对淫羊藿所得色谱图上色谱峰进行分析,初步鉴别出 43 个化学成分,见表 1。

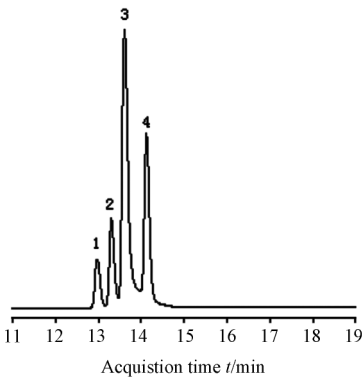


图 3 淫羊藿混合对照品 TOF/MS 总离子流图

Fig 3 Total ion current chromatography of mixed reference substance

1: Epimedin A; 2: Epimedin B; 3: Epimedin C; 4: Icaritin

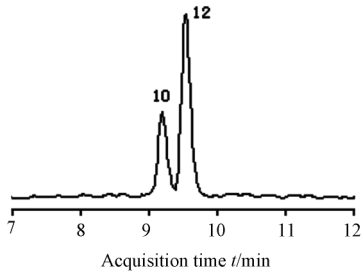


图 4 10 号峰 hexandraside E 和 12 号峰 ikarisoside B 的提取离子流图

Fig 4 Extract ion chromatography of peak 10 hexandraside E and peak 12 ikarisoside B

表 1 淫羊藿药材提取物中 43 种化学成分的鉴别分析结果

Tab 1 Qualitative analysis of 43 chemical constituents in epimedium extracts

No.	R. T. <i>t</i> /min	Identification	Formula	M+X	m/z		Error
					Theoretical	Experimental	
1	6.15	Icariside E6	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₂	M+Na	563.210 4	563.209 1	-2.39
2	6.71	3-Hexenyl glucoside	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	M+Na	285.131 4	285.130 6	-2.83
3	6.84	Isomyricitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	M+H	481.098 2	481.097 6	-1.28
				M+Na	503.080 2	503.079 3	-1.71
4	7.56	Baohuosu	C ₂₂ H ₂₂ O ₇	M+H	399.144 4	399.143 7	-1.70
5	7.72	Dilignol	C ₂₀ H ₂₆ O ₇	M+Na	401.157 6	401.157 0	-1.55
6	7.92	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	M+H	303.050 5	303.050 2	-0.92
7	8.01	Hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	M+H	465.103 3	465.103 4	0.21
				M+Na	487.085 2	487.085 5	0.52
8	8.60	Icariside E7	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	M+Na	603.205 4	603.2051	-0.43
9	8.82	Blumenol C glucoside	C ₁₉ H ₃₂ O ₇	M+Na	395.204 6	395.203 6	-2.46
10	9.17	Hexandraside E	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	M+H	679.223 8	679.224 3	0.72
				M+Na	701.205 8	701.204 7	-1.50
11	9.43	Ttrifolin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	M+H	449.108 4	449.109 1	1.59
				M+Na	471.090 3	471.090 5	0.36
12	9.56	Ikarisoside B	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	M+H	679.223 8	679.223 0	-1.19
				M+Na	701.205 8	701.205 5	-0.36
13	9.83	Diphyllloside B	C ₃₈ H ₄₈ O ₂₀	M+H	825.281 7	825.281 1	-0.75
				M+Na	847.263 7	847.263 1	-0.66
14	10.36	Diphyllloside A	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	M+H	809.286 8	809.288 1	1.60
				M+Na	831.268 7	831.267 2	-1.86
15	10.52	Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	M+H	449.108 4	449.109 5	2.48
				M+Na	471.090 3	471.091 3	2.06
16	10.65	Epimedeside A	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅	M+H	663.228 9	663.227 3	-2.41
				M+Na	685.210 8	685.208 9	-2.83
17	11.13	Kaempferin(-3-O- α - rhamnoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	M+H	433.113 5	433.112 4	-2.47
				M+Na	455.095 4	455.095 3	-0.26
18	12.07	Anhydroicaritin-3,7-di-O- glucoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₆	M+H	693.239 5	693.237 7	-2.54
				M+Na	715.221 4	715.219 6	-2.52
19	12.60	Hexandraside F	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	M+H	839.297 4	839.298 5	1.35
				M+Na	861.279 3	861.278 3	-1.18
20	12.98	Epimedin A	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	M+H	839.297 4	839.298 0	0.75
				M+Na	861.279 3	861.279 8	0.57
21	13.32	Epimedin B	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	M+H	809.286 8	809.286 7	-0.13
				M+Na	831.268 7	831.268 3	-0.54
22	13.62	Epimedin C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	M+H	823.302 5	823.302 9	0.54
				M+Na	845.284 4	845.285 3	1.07
23	13.84	Baohuoside VI	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	M+H	823.302 5	823.301 7	-0.92
				M+Na	845.284 4	845.283 0	-1.65
24	14.12	Icariin	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	M+H	677.244 5	677.245 8	1.85
				M+Na	699.226 5	699.226 0	-0.70
25	15.01	Anhydroicaritin-3-O-rhamnoside(1-2)- furan acid-7-O-glucoside	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	M+H	821.286 8	821.286 6	-0.25
				M+Na	843.268 7	843.268 0	-0.89
26	15.13	Demethylicaritin-3-O-(6"-O-acetyl)- glucosyl-(1-3)-O-(4"-O-acetyl)- rhamnoside-7-O-glucoside	C ₄₂ H ₅₂ O ₂₂	M+H	909.302 8	909.302 1	-0.82
				M+Na	931.284 8	931.282 4	-2.57
27	15.43	Icaritin-3-O- α -rhamnoside	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₁	M+H	533.202 3	533.202 5	0.40
				M+Na	555.184 2	555.184 7	0.84
28	15.83	Icariside I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	M+H	531.186 6	531.187 2	1.06
				M+Na	553.168 6	553.167 0	-2.86
29	16.78	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	M+H	271.060 6	271.059 9	-2.76
30	16.99	Tricin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	M+H	331.081 8	331.081 7	-0.24

(续下表)

(接上表)

No.	R. T. <i>t</i> /min	Identification	Formula	M+X	m/z		Error
					Theoretical	Experimental	
31	17.17	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	M+H	287.055 6	287.055 7	0.35
32	17.62	Epimedeside C	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	M+H	517.171 0	517.170 5	−0.94
				M+Na	539.152 9	539.153 1	0.31
33	18.23	Icariside F	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₄	M+H	633.218 3	633.216 9	−2.26
				M+Na	655.200 3	655.198 6	−2.56
34	18.61	5,5'-Dimethoxy dilignol	C ₂₂ H ₃₀ O ₉	M+H	311.237 5	311.238 0	1.64
35	19.33	Baohuoside II	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	M+H	501.176 1	501.175 4	−1.34
				M+Na	523.158 0	523.157 9	−0.22
36	20.40	Baohuoside VII	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	M+H	677.244 5	677.242 9	−2.43
				M+Na	699.226 5	699.225 4	−1.56
37	21.34	2"-O-Rhamnosylikarisoside A	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄	M+H	647.234 0	647.233 1	−1.36
				M+Na	669.215 9	669.215 0	−1.38
38	21.83	2"-O-Rhamnosylikariside II	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₄	M+H	661.249 6	661.248 6	−1.56
				M+Na	683.231 6	683.230 9	−0.99
39	22.59	Sagittatoside C	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₆	M+H	719.255 1	719.253 7	−1.96
				M+Na	741.237 1	741.235 8	−1.69
40	23.10	Icariside II	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	M+H	515.191 7	515.191 8	0.15
				M+Na	537.173 7	537.173 2	−0.87
41	25.65	Desmethylanhydroicaritin	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	M+H	355.118 2	355.118 4	0.67
				M+Na	377.100 1	377.100 4	0.78
42	28.20	Anhydroicaritin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	M+H	369.133 8	369.133 7	−0.31
				M+Na	391.115 8	391.116 5	1.90
43	29.60	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	M+H	281.248 1	281.248 0	−0.20
				M+Na	303.230 0	303.229 8	−0.66

Error: (experimental molecular mass−theoretical molecular mass)/theoretical molecular mass×10⁶

3 结 论

本文运用 RRLC-TOF/MS 技术快速鉴别出淫羊藿中 43 种化学成分,其中主要活性成分黄酮及黄酮苷类 38 种,其他类 5 种。该方法在指纹图谱研究的基础上对色谱峰进一步明确化,为淫羊藿药材的质量控制及体内的深入研究奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 229.

[2] 谢娟平, 孙文基. 淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2006, 18: 17-20.

[3] 张华峰, 高翔, 卢大炎, 王瑛. HPLC 法同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的含量[J]. 分析测试学报, 2007, 26: 198-201.

[4] 夏爱军, 黄河舟, 高岗, 张海, 朱臻宇, 柴逸峰. HPLC 法同时测定淫羊藿药材中的 5 个黄酮类成分[J]. 药学实践杂志, 2009, 27: 284-288.

[5] 王彬, 黄河舟, 朱臻宇, 张海, 纪松岗, 柴逸峰. 淫羊藿药材 HPLC 指纹图谱的勾兑研究[J]. 药学实践杂志, 2008, 26: 432-434.

[6] 宋剑, 李知遥, 贾继明, 刘兴国. 不同品种淫羊藿药材的指纹图谱研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24: 16-18.

[7] 石椒鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21: 2967-2968.

[8] 刘颖. 浅议当归的化学成分与临床药理作用[J]. 中国医药指南, 2010, 8: 51-53.

[9] 韩广轩, 王麦莉, 张军东, 肖建华, 尹建设, 魏冬霞, 等. 淫羊藿化学成分研究进展[J]. 药学实践杂志, 2002, 20: 359-361.

[10] Wang G J, Tsai T H, Lin L C. Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum* [J]. Phytochemistry, 2007, 68: 2455-2464.

[11] Zhao L, Lou Z Y, Zhu Z Y, Zhang H, Zhang G Q, Cai Y F. Characterization of constituents in *Stellera chamaejasme* L. by rapid-resolution liquid chromatography-diode array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22: 64-72.

[12] Zhang H, Gong C G, Lv L, Xu Y J, Zhao L, Zhu Z Y, et al. Rapid separation and identification of furocoumarins in *Angelica dahurica* by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23: 2167-2175.

[13] Chen X J, Guo B L, Li S P, Zhang Q W, Tu P F, Wang Y T. Simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2007, 1163: 96-104.

[14] Zhao H Y, Sun J H, Fan M X, Fan L, Zhou L, Li Z, et al. Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1190: 157-181.

[本文编辑] 尹 茶