

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.03.0329

• 短篇论著 •

HPLC-TOF/MS 快速鉴别相思藤中的化学成分

付振贺¹, 黄玉凤¹, 黄超君¹, 谢从景¹, 吕磊¹, 杜红丽¹, 赵亮¹, 焦杨^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 广西医科大学药学院药理教研室, 南宁 530021

[摘要] **目的** 采用高效液相色谱-飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)分析技术对中药材相思藤的化学成分进行快速鉴别分析。**方法** 采用安捷伦“Formula-Database Generator”软件自建包括28个化合物的相思藤化学成分数据库,运用HPLC-TOF/MS技术采集相思藤提取物的总离子流色谱图,根据各化学成分的精确质荷比(m/z),通过自动比对的方法进行鉴别分析。色谱柱为安捷伦 Zorbax Eclipse SB-C₁₈(3.0 mm×100 mm, 3.5 μm)液相色谱柱,流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈,采用梯度洗脱,流速为0.4 mL/min,柱温25℃,紫外检测波长254 nm,进样量10 μL;质谱采用电喷雾离子(ESI)源,正离子模式和负离子模式监测,质量数扫描范围为 m/z 100~1 200。**结果** 共鉴别出相思藤中15种化学成分,其中正离子模式下10种、负离子模式下11种,正、负离子模式下均有响应6种。**结论** 建立了基于HPLC-TOF/MS的分析方法,可快速鉴别中药材相思藤中的化学成分,阐明了相思藤的化学物质基础,为相思藤的质量控制及药理机制研究奠定了基础。

[关键词] 相思藤; 高效液相色谱法; 飞行时间质谱; 化学成分

[中图分类号] R 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)03-0329-05

Rapid identification of chemical constituents in *Yine Abrus (Xiangsiteng)* by HPLC-TOF/MS

FU Zhen-he¹, HUANG Yu-feng¹, HUANG Chao-jun¹, XIE Cong-jing¹, LÜ Lei¹, DU Hong-li¹, ZHAO Liang¹, JIAO Yang^{2*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

[Abstract] **Objective** To rapidly identify the chemical constituents in a traditional Chinese medicine *Yine Abrus (Xiangsiteng)* by high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) analysis technique. **Methods** A formula database including 28 compounds of *Xiangsiteng* was developed by Agilent software “Formula-Database Generator”. The total ion chromatograms of the *Xiangsiteng* extracts were obtained by HPLC-TOF/MS, and the chemical components were identified by automatic matching method according to the exact mass-to-charge ratio of each chemical component. The separation was performed on a Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ column (3.0 mm×100 mm, 3.5 μm). The mobile phase composing of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution was used for gradient eluting. The flowing rate was 0.4 mL/min; the temperature of column was 25 °C; the UV detection wavelength was 254 nm; and the sample selection was 10 μL. The electrospray ionization (ESI) source was applied for MS analysis under positive ion and negative ion modes, with the mass scan range being m/z 100-1 200. **Results** HPLC-TOF/MS identified a total of 15 chemical components from *Xiangsiteng* extracts, including 10 in positive ion mode and 11 in negative ion mode, and 6 both in both positive and negative ion modes. **Conclusion** A rapid and efficient method for identifying the chemical components of traditional Chinese medicine *Xiangsiteng* by HPLC-TOF/MS has been established, and the chemical components of *Xiangsiteng* has been clarified, which lays a foundation for the quality control and further pharmacological study of *Xiangsiteng*.

[Key Words] *Yine Abrus*; high-performance liquid chromatography; time-of-flight mass spectrometer; chemical constituent

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(3): 329-333]

[收稿日期] 2017-12-28 [接收日期] 2018-03-06

[作者简介] 付振贺, 药师. E-mail: fuzhenhe0798@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0771-5358014, E-mail: jiaoyanggx@163.com

相思藤又被称为土甘草、山甘草、小人草等,是豆科相思子属植物相思子的干燥叶和茎^[1],产于广东、广西、福建、台湾等地,为民间常用草药。其味甘甜,性凉,入肝、肾、肺三经,具有益气化滞、生津利尿、润肺护肝、去湿消炎、清热解毒等药效作用,用于治疗咽痛、肺热、疮疖、咳嗽、肝炎等,具有很高的经济和药用价值,并受到国内外学者的广泛关注,这可能与它具有多种有效成分有关^[2-8]。

高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)与飞行时间质谱(time of flight mass spectrometry, TOF/MS)串联技术能快速鉴别分析中药材成分,具有检测灵敏度高、离子扫描范围广、测定化合物质荷比(m/z)精确等优点,为中药材化学成分的鉴别提供了快捷、准确、可靠的方法^[9-10],现已广泛用于中药材复杂体系的鉴别分析。高分辨 TOF/MS 近年来发展迅速,其通过在线获取样品中各成分离子的精确质荷比和分子式,再比对自建化学成分数据库,快速对中药多种化学成分进行鉴别分析^[11-13]。目前对于相思藤中化学成分的鉴别多采用传统的植物化学提取分离方法^[14-15]。本研究首次利用 HPLC-TOF/MS 串联技术对相思藤中的化学成分进行快速鉴别分析,进一步阐述了相思藤的化学物质基础,为相思藤药材的质量控制及临床合理应用提供依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配有在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱;G1969A 飞行时间质谱联用仪(美国安捷伦公司),配有电喷雾离子(electrospray ionization, ESI)源,分析软件为 MassHunter Data Acquisition 在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件;KUDOS SK2200H 型超声器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂 相思藤采自广西灵山县,由广西中医药研究院黄一峰副研究员鉴定为豆科植物相思子(*Abrus precatorius* L.)的干燥茎叶。乙腈和甲酸为色谱纯,购自美国 Honeywell 公司;乙醇为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;水为超

纯水。

2 方法和结果

2.1 样品溶液的提取 取相思藤药材 1 g,置于 10 mL 容量瓶中,加入 70% 乙醇 10 mL,超声 30 min 后取出,摇匀静置,冷却至室温,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液得样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱:Zorbax Eclipse SB-C₁₈ (3.0 mm \times 100 mm, 3.5 μm)液相色谱柱,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。采用梯度洗脱,洗脱程序如下:0~10 min, 15%~25% B; 10~20 min, 25%~55% B; 20~25 min, 55%~85% B; 25~30 min, 85% B。流速 0.4 mL/min;紫外检测波长为 254 nm,进样体积 10 μL 。

2.3 质谱条件 采用 ESI 源,正离子模式下检测参数:毛细管电压 4 000 V,雾化气压力 40 psi (1 psi=6 894.8 Pa),干燥气流速 9 L/min,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,碎片电压 160 V,参比离子 m/z 121.050 873 和 922.009 798;负离子模式下检测参数:毛细管电压 3 500 V,雾化器压力 40 psi,干燥气流速 9 L/min,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,碎片电压 160 V,参比离子 m/z 119.036 320 和 966.000 725;质量数采集范围均为 m/z 100~1 200。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 按 2.1 项下方法提取得到相思藤样品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样分析,以色谱峰的保留时间和峰面积为考察值,平行操作 5 份,测定日内精密度,结果显示各色谱峰保留时间及峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于 5%。按上述方法连续 5 d 每天各提取样品溶液 1 份并进样分析,考察日间精密度,结果显示各色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 均小于 5%。结果符合鉴定分析要求。

2.4.2 稳定性考察 按 2.1 项下方法提取得相思藤样品溶液,按 2.2 项下色谱条件分别于 0、1、4、8、24 h 时进样分析,检测样品室温放置的稳定性,结果显示各色谱峰峰面积的 RSD 均小于 5%。结果符合鉴定分析要求。

2.5 相思藤化学成分数据库的建立 根据 PubMed 数据库、ChemSpider 数据库、中国科学院化学数据库及相关研究文献^[16-20],共获得相思藤各化学

成分名称及分子式 28 个。利用安捷伦“Formula-Database Generator”软件(含有各元素的精确质量数),根据每种成分中碳、氢、氧的个数计算出精确的相对分子质量,建立包括化合物名称、相对分子质量、分子式、 $[M+H]^+$ 及 $[M-H]^-$ 准分子离

子峰相对分子质量的相应化学成分数据库。

2.6 相思藤总离子流图 按 2.1 项下方法提取得相思藤样品溶液,按 2.2 项下及 2.3 项下方法进样分析,得相思藤样品溶液的总离子流图,见图 1。

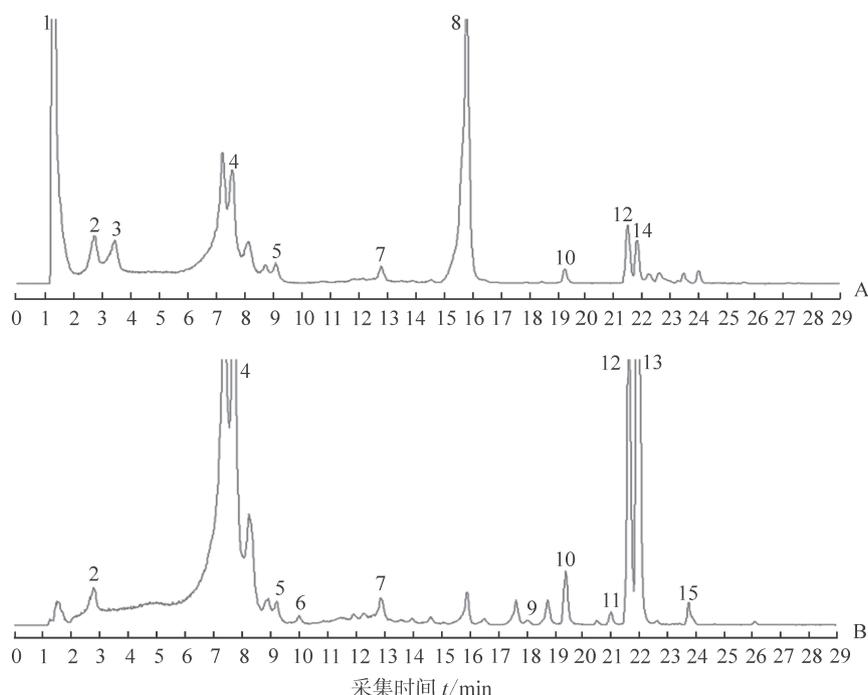


图 1 相思藤药材提取物的总离子流图

A: 正离子模式; B: 负离子模式. 1: 葫芦巴碱; 2: 相思豆碱; 3: 刺桐碱; 4: 异柚葡萄糖苷; 5: 牡荆碱; 6: 相思藤三萜苷; 7: 半齿泽兰素; 8: 相思子素; 9: 夏佛塔苷; 10: 粗毛豚草素; 11: 芒柄花黄素; 12: 蓟黄素; 13: 甘草酸; 14: 泽兰黄素; 15: 三羟黄烷苷

2.7 利用精确质量数和核素分布鉴别化合物 以 4 号峰异柚葡萄糖苷为例说明相思藤中各色谱峰的鉴别分析过程。4 号峰保留时间为 7.5 min, 色谱图中准分子离子的正离子质量数为 435.129 0, 负离子质量数为 433.114 2。利用 Qualitative Analysis 数据分析软件的计算工具(calculator)计算出精确质量数物质的可能元素组成(误差 $<5 \times 10^{-6}$),并与所建数据库中已知化合物的 m/z 进行比对,确定元素组成为 $C_{21}H_{22}O_{10}$, 并计算出 $C_{21}H_{22}O_{10}$ 的核素分布情况,与实际情况进行比对,核素分布的理论值与实际值吻合很好,最终确定此峰为异柚葡萄糖苷。见图 2。

2.8 相思藤中化学成分的鉴别结果 通过高分辨 TOF/MS 测得各峰精确的相对分子质量,并比对自建数据库,应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算出各分子组成,将理论值与实际值进行比对,结合上述化合物的鉴别过程和相关文献报道,对相思藤药材在正离子模式和负离子模式下所得色谱图

的色谱峰进行分析。初步鉴别出 15 种化学成分,其中正离子模式下 10 种、负离子模式下 11 种,正、负离子模式下均有响应的 6 种。见表 1。

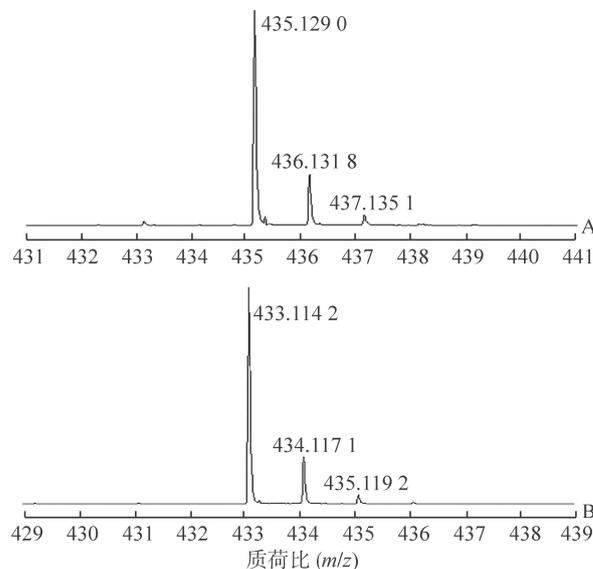


图 2 4 号峰异柚葡萄糖苷的准确质量数和核素分布图

A: 正离子模式; B: 负离子模式

表1 相思藤提取物中化学成分的定性分析结果

序号	化合物	分子式	保留时间 t/min	准分子离子	质荷比的实际值 m/z	质荷比的理论值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)
1	葫芦巴碱	C ₇ H ₇ NO ₂	1.3	[M+H] ⁺	138.054 5	138.054 3	1.45
2	相思豆碱	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	2.8	[M+H] ⁺	219.113 5	219.112 5	4.56
				[M-H] ⁻	217.098 1	217.097 9	0.92
3	刺桐碱	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	3.5	[M+H] ⁺	247.144 6	247.144 7	-0.40
4	异柚葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	7.5	[M+H] ⁺	435.129 0	435.128 6	0.92
				[M-H] ⁻	433.114 2	433.114 0	0.46
5	牡荆碱	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	9.2	[M+H] ⁺	433.112 2	433.112 9	-1.62
				[M-H] ⁻	431.097 6	431.098 4	-1.86
6	相思藤三萜苷	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	10.1	[M-H] ⁻	807.425 7	807.428 4	-3.34
7	半齿泽兰素	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	12.6	[M+H] ⁺	345.098 1	345.096 9	3.48
				[M-H] ⁻	343.082 1	343.082 3	-0.58
8	相思子素	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	15.8	[M+H] ⁺	477.137 7	477.139 1	-2.93
9	夏佛塔苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	17.9	[M-H] ⁻	563.140 6	563.140 5	0.18
10	粗毛豚草素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	19.2	[M+H] ⁺	301.070 5	301.070 7	-0.66
				[M-H] ⁻	299.054 8	299.056 1	-4.35
11	芒柄花黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	20.8	[M-H] ⁻	267.065 1	267.065 7	-2.25
12	蓟黄素	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	21.4	[M+H] ⁺	315.086 9	315.086 3	1.90
				[M-H] ⁻	313.071 0	313.071 8	-2.56
13	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	21.7	[M-H] ⁻	821.396 0	821.396 5	-0.61
14	泽兰黄素	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	21.8	[M+H] ⁺	485.326 3	485.326 7	-0.82
15	三羟黄烷苷	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₀	23.5	[M-H] ⁻	645.362 2	645.364 3	-3.25

3 讨论

3.1 提取条件的优化 为快速从相思藤药材中得到尽可能多的化学成分,本研究使用了超声提取法,考察了不同提取溶剂(甲醇、乙醇及70%乙醇)、不同提取时间(15、30、45 min)及不同溶剂量(10倍、20倍、30倍)对提取效果的影响。综合考察后发现用10倍量70%乙醇超声30 min提取药材所得色谱峰数目最多、峰面积最大,提取效果最好,故采用10倍量70%乙醇超声30 min。

3.2 色谱条件的优化 本研究考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相对样品中多种成分的洗脱能力,发现乙腈-0.1%甲酸水溶液系统较适合样品中成分的分离,而甲醇-水、乙腈-水系统分析时间均较长。同时考察了以乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相时不同梯度条件下的色谱分离结果,最终确定梯度洗脱方案。

本研究考察了不同填料种类、不同颗粒直径、不同长度及内径的色谱柱对样品中各化学成分分离结果的影响,将流速及进样体积等条件经Agilent Method_Translator_1.0软件转换后应用于

不同色谱柱。样品在Zorbax Eclipse SB-C₁₈(3.0 mm×100 mm, 3.5 μm)液相色谱柱中能够得到较满意的分离结果,其他色谱柱峰缺失现象较为严重,且分离度降低、色谱峰的形态较差。

考察了柱温(15、20、25、30、35℃)对各色谱峰分离度的影响,发现随着温度的升高色谱峰分离度减小,但分析时间也相应延长,综合考虑最后选择25℃作为分离柱温。

在考察流动相流速(0.3、0.4、0.5 mL/min)对各成分色谱峰分离度的影响时,发现流速为0.5 mL/min时分离度减小,个别色谱峰发生合并;流速为0.3 mL/min时保留时间延长,故最终选择0.4 mL/min作为流动相流速。

3.3 质谱条件优化 考察了相思藤提取液在ESI源正离子模式和负离子模式下的响应情况,正、负离子采集模式下均有响应。同时考察了毛细管电压、雾化气压力、干燥气流速及干燥气温度等参数对质谱响应的影响。最终选择正、负离子模式下均采集,质谱参数使用自动优化软件进行优化。这样综合考察了化合物在正离子模式和负离子模式下的质谱数据,提高了成分鉴别结果的可靠性。

综上, 本研究采用 HPLC-TOF/MS 技术快速鉴别出相思藤药材中的 15 种化学成分。该方法在传统的植物化学提取分离基础上对色谱峰进一步明确化, 为相思藤药材的质量控制提供了依据, 也为相思藤药材抗炎、抗过敏、抗肿瘤及保肝等药理作用的研究提供了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 冯娟娟, 陈红霞. 相思子属药用植物研究新进展[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30: 969-970.
- [2] ADEDAPO A A, OMOLOYE O A, OHORE O G. Studies on the toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Abrus precatorius* in rats[J]. Onderstepoort J Vet Res, 2007, 74: 31-36.
- [3] ADELOWOTAN O, AIBINU I, ADENIPEKUN E, ODUGBEMI T. The *in-vitro* antimicrobial activity of *Abrus precatorius* (L) fabaceae extract on some clinical pathogens[J]. Niger Postgrad Med J, 2008, 15: 32-37.
- [4] BAGAVAN A, RAHUMAN A A. Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors[J]. Asian Pac J Trop Med, 2011, 4: 29-34.
- [5] GUL M Z, AHMAD F, KONDAPI A K, QURESHI I A, GHAZI I A. Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts—an *in vitro* study[J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 53.
- [6] WAMBEBE C, AMOSUN S L. Some neuromuscular effects of the crude extracts of the leaves of *Abrus precatorius*[J]. J Ethnopharmacol, 1984, 11: 49-58.
- [7] 陈红霞, 吴咖, 黄仁彬, 冯艺萍, 焦杨. 相思藤总黄酮对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用及机制[J]. 广西医学, 2012, 34: 138-140.
- [8] 秦丹丹, 高南南, 赵秀云, 宋鑫, 李丽琴. 相思子蛋白 P2 抗肝癌作用及对端粒酶活性影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27: 1666-1671.
- [9] ZHAO L, LIANG S, LÜ L, ZHANG H, GUO-TAN G, CHAI Y, et al. Screening and analysis of metabolites in rat urine after oral administration of *Apocynum venetum* L. extracts using HPLC-TOF-MS[J]. J Sep Sci, 2014, 37: 515-526.
- [10] ZHU Z, ZHANG H, ZHAO L, DONG X, LI X, CHAI Y, et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 1855-1865.
- [11] 赵亮, 田文君, 吕磊, 张海, 王新霞, 张国庆. HPLC-TOF/MS 对中药复方扶正平消胶囊化学成分的鉴别[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33: 770-779.
- [12] ZHAO L, TIAN W J, LÜ L, ZHANG H, WANG X X, ZHANG G Q. HPLC-TOF/MS in identification of chemical constituents of *Fuzhengpingxiao* Capsule[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33: 770-779.
- [13] 周燕妮, 赵亮, 郑磊, 吕磊. HPLC-TOF-MS 对中药石见穿化学成分的快速鉴别[J]. 中国中药杂志, 2013, 38: 4109-4112.
- [14] 金柔男, 何丹, 战旗, 吕磊, 费扬, 赵亮. HPLC-TOF/MS 快速鉴别白狼毒药材中的化学成分[J]. 中南药学, 2012, 10: 571-577.
- [15] 黄士兰, 葛文漪, 褐霏霏, 覃斐章, 黄仁彬. 相思藤水提物对小鼠化学性及酒精性肝损伤保护作用的研究[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33: 401-404.
- [16] 吴咖, 陈红霞, 黄仁彬, 焦杨. 相思藤茶水提物的解酒作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18: 187-189.
- [17] GARANIYA N, BAPODRA A. Ethno botanical and Phytopharmacological potential of *Abrus precatorius* L.: a review[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2014, 4: S27-S34.
- [18] LIMMATVAPIRAT C, SIRISOPANAPORN S, KITTAKOOP P. Antitubercular and antiplasmodial constituents of *Abrus precatorius*[J]. Planta Med, 2004, 70: 276-278.
- [19] 黄平, 莫建光. 相思子属三种药材中的氨基酸分析比较[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32: 35-37.
- [20] 李春阳, 张平, 袁旭江. 相思子叶化学成分研究[J]. 广东药学院学报, 2014, 30: 24-27.
- [21] 李良波, 温秀萍, 何翊, 张平刚, 黄荣韶, 朱华结. 相思子化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 1371-1373.

[本文编辑] 曾奇峰