

鹿心雪茶 *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog 属地衣类, 梅花衣科植物, 产于云南海拔3 800 m 的高山雪地, 是云南藏族的传统保健饮品。据《本草纲目》记载, 本品开水冲泡, 色红如血。鹿心雪茶叶体洁白, 品位纯正, 民间用于神经衰弱、体虚等病症的治疗和保健, 是一种天然的食疗珍品。为开发利用这一天然资源, 本课题组对鹿心雪茶化学成分进行了研究。从其乙醇提取液中分离得到2个化合物, 经理化性质和光谱解析确定其结构分别为3-醛基-6-甲基-2, 4-二羟基苯甲酸乙酯(I)和4-甲基-2, 6-二羟基苯甲醛(II)。这2个化合物均为首次分得的新化合物。

1 材料

鹿心雪茶采自云南省香格里拉地区, 经中国科学院云南植物研究所鉴定。

2 仪器和分析条件

质谱用VG Auto Spec-300型质谱仪测定;¹H-NMR和¹³C-NMR谱均用Bruker AM-400型仪测定。柱色谱和薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品。薄层色谱条件: 硅胶板, 石油醚-氯仿(1:1), 石油醚-氯仿(7:3), 石油醚-氯仿(9:1)展开, 碘蒸气显色。提取试剂为化学纯, 鉴定试剂均为分析纯。

3 样品的提取

鹿心雪茶500 g, 80%乙醇回流提取3次, 合并提取液, 回收乙醇, 得粗提物。用900 mL水溶解, 再用醋酸乙酯分2次萃取, 每次800 mL, 将醋酸乙酯层回收溶剂至干; 然后再用石油醚萃取, 得石油醚部分。取石油醚部分0.5 g反复进行硅胶柱色谱分离, 石油醚-氯仿(1:1)洗脱, 薄层色谱追踪观察, 将相同组份合并, 分别得化合物I和II。

4 鉴定

化合物I: 白色棒状结晶。EIMS m/z 224 [M]⁺, 196[M-CO]⁺, 178[M-CH₃CH₂OH]⁺, 150[M-CH₃CH₂OC=OH]⁺, 122[150-CO]⁺。¹H-NMR δ 1.41(3H, t, -CH₃), 2.51(3H, s, -CH₃), 4.40(2H, t, -CH₂), 10.30(1H, s, -CHO), 6.25(1H, s, -H)。¹³C-NMR (CDCl₃) δ 14.1(C-11), 25.2(C-9), 61.8(C-10), 103.9(C-1), 108.4(C-3), 112.0(C-5), 116.5(C-4), 152.3(C-6), 168.3(C-2), 171.5(C-7), 193.8(C-CHO)。经波谱解析鉴定化合物I为3-醛基-6-甲基-2, 4-二羟基苯甲酸乙酯, 其化学结构见图1。

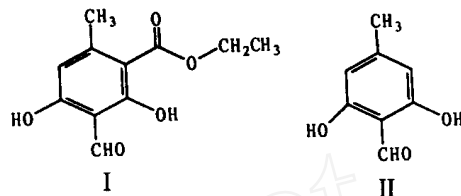


图1 化合物I和II的结构

Fig. 1 Structures of compounds I and II

化合物II: 黄色棒针状结晶。EIMS m/z : 151 [M]⁺, 93[M-OH]⁺, 59[M-CH]⁺。¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.30(3H, t, -CH₃), 10.22(1H, s, -CHO), 6.13(1H, s, -H)。¹³C-NMR (CDCl₃) δ 22.3(C-7), 107.3(C-3), 108.4(C-1), 150.4(C-4), 181.9(C-2), 193.6(C-CHO)。经波谱解析鉴定化合物II为4-甲基-2, 6-二羟基苯甲醛。

Reference:

- [1] Yang Q H, Ma N, Li L. Study on the chemical constituents of Dajiangjun [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(12): 898, 943.

HPLC-MS² 法分析朝鲜淫羊藿中的化学成分

袁杰, 龚又明, 鞠鹏, 孔令义

(中国药科大学天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 研究朝鲜淫羊藿中的化学成分。方法 采用Merck LiChroCAR 分析柱, 乙腈-水-冰醋酸梯度洗脱, 流速: 1 mL/min, 检测波长: 270 nm, 质谱记录总离子流图(TIC)。结果 从朝鲜淫羊藿中鉴定出9个化合物。结论 HPLC-MS²能快速、准确的鉴定出天然产物中的化学成分。

关键词: 朝鲜淫羊藿; 黄酮苷类化合物; HPLC-MS²

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0371-04

收稿日期: 2003-07-12

作者简介: 袁杰(1974-), 男, 安徽砀山人, 中国药科大学天然药物化学专业2000级硕士研究生, 研究方向为天然产物研究与开发。

* 通讯作者 Tel: (025)5391289 Fax: (025)5301528

HPLC-MS² analysis of chemical constituents in *Epimedium koreanum*

YUAN Jie, GONG You-ming, JU Peng, KONG Ling-yi

(Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Object** To investigate the chemical constituents of *Epimedium koreanum* Nakai. **Methods** Separation was performed by HPLC on a Merck LiChroCAR analytical column with the mobile phase consisting of acetonitrile-water-acetic acid as gradient eluent at the flow rate of 1 mL/min, the UV detection was set at 270 nm and TIC was recorded by an electrospray ionization mass spectrometer in positive mode. **Results** Nine compounds were identified by HPLC-MS². **Conclusion** The method is rapid and accurate to identify the chemical constituents of the natural product.

Key words: *Epimedium koreanum* Nakai; flavonoids; HPLC-MS²

液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 技术是一种近十几年来新发展起来的分析技术。基本原理是通过高效液相色谱 (HPLC) 把天然产物中化合物进行有效分离后, 依次进入质谱测定, 通过质谱所提供的结构信息鉴定化合物。现在的 LC-MS 技术所用的接口大多是电喷雾电离 (ESI) 及大气压化学电离 (APCI) 接口, 具有极为广泛的应用领域。它不但使离子化效率得到很大提高, 而且有 ESI(+), ESI(-) 等多种离子化模式并能使热不稳定化合物得到高丰度的准分子离子峰。这种多级质谱串联技术用于天然产物化学成分的研究, 取得了很好的结果。

朝鲜淫羊藿是 2000 年版《中华人民共和国药典》记载的 5 种淫羊藿正品之一, 现代药理学研究证明淫羊藿中黄酮类化合物具有抗骨质疏松等多种药理活性。HPLC-MS 法能快速分析出朝鲜淫羊藿的化学成分。

1 仪器、试剂和材料

Agilent 1100 LC/DAD/MSD 系统, 该系统包括: 双高压溶剂泵, 在线真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 光二极管阵列检测器 (DAD), 电喷雾离子化接口的离子阱质谱检测器和 HP 化学工作站。

乙腈 (色谱纯), 冰醋酸 (分析纯), 分析用水 (乐百氏纯净水, 抽滤)。

朝鲜淫羊藿采自辽宁省本溪, 经沈阳药科大学生药学教研室孙启时教授鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai。

2 方法和结果

2.1 样品的制备: 取干燥的朝鲜淫羊藿 (地上部分) 粗粉 (过 40 目筛) 适量, 70% 乙醇提取 2 次, 滤过, 合并两次提取液, 回收乙醇, 浓缩提取液, 冷藏, 滤过, 收集滤液。滤液用醋酸乙酯萃取, 回收醋酸乙酯至干, 粉碎成粉末。取样品粉末适量, 用甲醇溶解制成

240 μg/mL 的样品溶液。

2.2 液相色谱条件与质谱检测条件: 色谱柱: Merck LiChroCAR (250 mm × 4 mm, 5 μm); 进样量: 30 μL; 柱温: 30 °C; 液相色谱检测器: DAD 检测器; 检测波长: 270 nm; 流动相: 乙腈-水-冰醋酸梯度洗脱; *m/z* 扫描范围: 200~1 000 amu; 干燥气温度: 325 °C; 干燥气流速: 10.0 L/min; 雾化室压力: 27.6 Pa; 离子化方式: ESI (电喷雾电离源); 电喷雾电压: 4 000 V; 离子模式: ESI(+)。

2.3 样品的分析结果: 取 30 μL 样品溶液, 注入 HPLC-MS。样品经 HPLC 分离, 依次进入质谱检测器检测, 分别得到一级质谱离子流图、总离子流图以及化合物的多级质谱图, 见图 1。

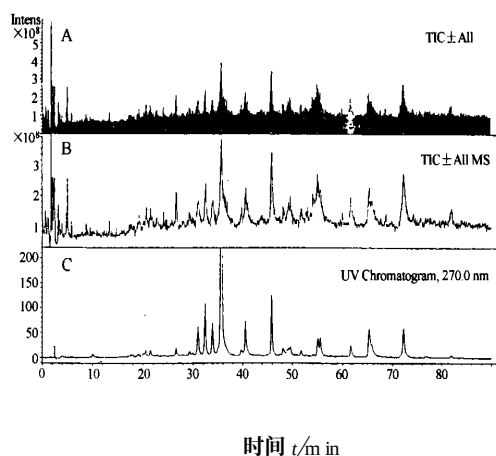


图 1 A: 总离子流图 (TIC), B: 朝鲜淫羊藿的一级质谱离子流图 (TIC, MS) 和 C: UV 色谱图

Fig. 1 Chromatogram: A: of TIC, B: of first TIC, and MS of *E. koreanum*, and C: of UV

3 质谱的解析

3.1 朝鲜淫羊藿中化合物及相对分子质量的文献检索: HPLC-MS 技术的一级质谱能给出化合物的准分子离子峰, 这样通过化合物的相对分子质量可以排除大部分化合物, 大大缩小了鉴定化合物的范

围。因此,检索化合物的相对分子质量是解析多级质谱,鉴定化合物的第一步。通过文献的检索及相对分子质量的计算,得到朝鲜淫羊藿中的56个化合物及其相对分子质量。

3.2 化合物的解析

化合物 I: 21.4~21.5 min 的一级质谱图给出 m/z 663.1 ($M^+ + H$) 的峰,对照淫羊藿化合物的相对分子质量,此峰可能是淫羊藿苷 A (epimedin A) 的准分子离子峰。二级质谱以 m/z 663.1 为母离子进行裂解给出 m/z 517.0 ($M^+ - 146 + H$), 355.1 ($M^+ - 146 - 162 + H$), 299.0 ($M^+ - 146 - 162 - 56 + H$)。根据朝鲜淫羊藿黄酮类化合物的结构特点可知 m/z 517.0 ($M^+ -$ 鼠李糖基 + H), 355.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基-葡萄糖基 + H , 即苷元), 299.0 ($M^+ -$ 鼠李糖基-葡萄糖基- $C_4H_8 + H$), 各峰能得到合理的解释并和文献报道^[1]一致,也符合淫羊藿苷 A 的裂解规律。由以上信息鉴定 m/z 663.1 为淫羊藿苷 A 的准分子离子峰。

化合物 II: 29.3 min 的一级质谱给出 m/z 839.0 ($M^+ + H$), 和化合物的相对分子质量对照,只有朝藿定 A (epimedin A) 的相对分子质量是 838, 所以此峰可能为朝藿定 A 的准分子离子峰。是否为朝藿定 A, 要通过二级质谱给出的碎片峰确定。二级质谱给出碎片离子峰 m/z 677.1 ($M^+ - 162 + H$), 531.0 ($M^+ - 162 - 146 + H$), 369.0 ($M^+ - 162 - 146 - 162 + H$), 313.0 ($M^+ - 162 - 146 - 162 - 56 + H$)。根据淫羊藿黄酮类化合物的结构特点可知 m/z 677.1 ($M^+ -$ 葡萄糖基 + H), 531.0 ($M^+ -$ 葡萄糖基-鼠李糖基 + H), 369.0 ($M^+ -$ 葡萄糖基-鼠李糖基-葡萄糖基 + H , 即苷元), 313.0 ($M^+ -$ 葡萄糖基-鼠李糖基-葡萄糖基- $C_4H_8 + H$), 各峰能得到合理解释也符合朝藿定 A 的裂解规律。由以上信息可鉴定 m/z 839.0 为朝藿定 A 的准分子离子峰与文献^[2]报道一致。

化合物 III: 32.4 min 的一级质谱图给出 m/z 809.1 ($M^+ + H$), 对照化合物的相对分子质量,只有朝藿定 B (epimedin B) 的相对分子质量为 808, 判断此峰可能为朝藿定 B 的准分子离子峰。二级质谱给出 m/z 677.1 ($M^+ - 132 + H$), 531.0 ($M^+ - 132 - 146 + H$), 369.1 ($M^+ - 132 - 146 - 162 + H$), 313.0 ($M^+ - 132 - 146 - 162 - 56 + H$)。根据淫羊藿黄酮类化合物的结构特点可知 m/z 677.1 ($M^+ -$ 木糖基 + H), 531.0 ($M^+ -$ 木糖基-鼠李糖基 + H), 369.1 ($M^+ -$ 木糖基-鼠李糖基-葡萄糖基 + H , 即

苷元), 313.0 ($M^+ -$ 葡萄糖基-鼠李糖基-葡萄糖基- $C_4H_8 + H$), 符合朝藿定 B 的裂解规律, 并和文献^[2]报道一致。由以上信息可鉴定 m/z 809.1 为朝藿定 B 的准分子离子峰。

化合物 IV: 33.8 min 的一级质谱图给出 m/z 823.0 ($M^+ + H$), 对照化合物的相对分子质量,朝藿定 C (epimedin C) 的相对分子质量为 822, 因此 m/z 823.0 峰可能为朝藿定 C 的准分子离子峰。二级质谱以 m/z 823.0 为母离子进行裂解, 产生了碎片离子峰 m/z 678.1 ($M^+ - 146 + H + 1$), 531.0 ($M^+ - 146 - 146 + H$), 369.1 ($M^+ - 146 - 146 - 162 + H$), 313.1 ($M^+ - 146 - 146 - 162 - 56 + H$)。据文献报道的淫羊藿黄酮类化合物的裂解规律和结构特点可知 m/z 678.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基 + $H + 1$) 应为 m/z 677 ($M^+ -$ 鼠李糖基 + H) 的同位素峰, 531.0 ($M^+ -$ 鼠李糖基-鼠李糖基 + H), 369.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基-鼠李糖基-葡萄糖基 + H , 即苷元), 313.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基-鼠李糖基-葡萄糖基- $C_4H_8 + H$), 符合朝藿定 C 的裂解规律, 并和文献^[2]报道一致。由以上信息可鉴定 m/z 823.0 为朝藿定 C 的准分子离子峰。

化合物 V: 36.1 min 时的一级质谱图中给出了 m/z 677.1 ($M^+ + H$) 的峰, 对照化合物的相对分子质量只有淫羊藿苷 (icariin) 的相对分子质量为 676, 判断此峰可能为淫羊藿苷的准分子离子峰。二级质谱以 m/z 677.1 为母离子进行裂解, 分别有碎片离子峰 m/z 531.0 ($M^+ - 146 + H$), 369.1 ($M^+ - 146 - 162 + H$), 313.1 ($M^+ - 146 - 162 - 56 + H$)。根据文献报道的淫羊藿黄酮类化合物的裂解规律和结构特点可知, 531.0 ($M^+ -$ 鼠李糖基 + H), 369.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基-葡萄糖基 + H , 即苷元), 313.1 ($M^+ -$ 鼠李糖基-葡萄糖基- $C_4H_8 + H$), 符合淫羊藿苷的裂解规律, 并和文献^[3]一致。由以上信息可鉴定 m/z 677.1 为淫羊藿苷的准分子离子峰。

化合物 VI: 40.4 min 时的一级质谱图中给出了 m/z 881.0 ($M^+ + H$) 的峰, 对照化合物的相对分子质量, 只有朝藿苷丙 (korepin edo side C) 的相对分子质量为 880, 判断此峰可能为朝藿苷丙的准分子离子峰。二级质谱以 m/z 881.0 为母离子进行裂解, 分别有碎片离子峰 m/z 719.0 ($M^+ - 162 + H$), 530.9 ($M^+ - 162 - 188 + H$), 369.1 ($M^+ - 162 - 188 - 162 + H$)。根据文献报道的淫羊藿黄酮类化合物的裂解规律和结构特点可知 m/z 719.0 ($M^+ -$ 葡萄糖基 + H), 530.9 ($M^+ -$ 葡萄糖基-乙酰鼠李糖

基-葡萄糖基+H), 369.1(M^+ -葡萄糖基-乙酰鼠李糖基-葡萄糖基+H), 符合朝藿苣丙的裂解规律, 并和文献^[4]一致。由以上信息可鉴定 m/z 881.0 为朝藿苣丙的准分子离子峰。

化合物VII: 5.18 min 间的一级质谱图给出 m/z 633.0(M^+ +H)峰, 和化合物的相对分子质量对照, 只有大花淫羊藿苷F (ikarisoide F) 的相对分子质量为 632, 判断此峰可能为大花淫羊藿苷F 的准分子离子峰。二级质谱图分别给出 m/z 501.0(M^+ -132+H), 356.0(M^+ -132-145+H)。根据文献报道的淫羊藿黄酮类化合物裂解规律和结构特点可知 m/z 501.0(M^+ -木糖基+H), 从图谱上看 m/z 356 为 m/z 355 的同位素峰, m/z 356.0(M^+ -木糖基-鼠李糖基+H+1, 即苷元), 以上裂解峰符合大花淫羊藿苷F 裂解规律, 并和文献^[5]报道基本一致。由以上信息可鉴定 m/z 633.0 为大花淫羊藿苷F 的准分子离子峰。

化合物VIII: 65.7 min 时的一级质谱给出 m/z 531.1(M^+ +H), 和化合物相对分子质量对照, 淫羊藿次苷I (icarisoide I) 和朝藿苣C (caohuoside C) 的相对分子质量都为 530, 必须通过二级质谱才能判断化合物的结构式。二级质谱给出 m/z 369.1(M^+ -162+H), 313.0(M^+ -162-56+H)。根据文献报道的淫羊藿黄酮类化合物的裂解规律和结构特点可知 m/z 369.1(M^+ -葡萄糖基+H, 即苷元), 313.0(M^+ -葡萄糖基-C₄H₈+H), 从而可知化合物结构中有葡萄糖基取代。在淫羊藿次苷I 和朝藿苣C 的结构中, 淫羊藿次苷I 在7位有葡萄糖取代, 而朝藿苣C 在3位有鼠李糖基取代。由以上信息可知 m/z 531.1 是淫羊藿次苷I 的准分子离子峰, 并和文献^[6]报道一致。

化合物IX: 在72.8 min 时, m/z 515.0 在一级质谱图中出现, 二级质谱选择 m/z 515.0 作为母离子。二级质谱图给出 m/z 369.1(M^+ -146+H), 说明化合物有鼠李糖取代, 结合母离子的质核比数, 化

合物的极性和色谱图的保留时间^[7], m/z 515.1 为宝藿苣I (baohuoside-) 的准分子离子峰。

通过解析多级质谱图, 从朝鲜淫羊藿总黄酮中鉴定出9个黄酮类化合物。

4 讨论

4.1 如果用HPLC-MSⁿ法分析天然产物的化学成分时, 首先要对所研究的对象进行全面的资料检索, 根据资料全面了解各化合物的结构特点、相对分子质量、极性、液相色谱行为和质谱裂解规律等。

4.2 HPLC-MSⁿ法分析鉴定化合物, 要了解电喷雾离子源的基本离子化原理及所研究化合物产生准分子离子峰的类型, 据此识别化合物准分子离子峰。

4.3 为进一步确认化合物, 还要核对化合物的极性与化合物色谱峰的保留时间的一致性。

4.4 当化合物的相对分子质量相同, 可以通过多级质谱的裂解碎片提供的信息进行鉴别。

References

- [1] Li F, Liu Y L. Studies on the isolation and structures of baohuoside II, III, IV, and V [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1988, 23(9): 672-681.
- [2] Ito Y, Hirayama F, Suto K, et al. Three flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(3): 911-913.
- [3] Li F, Liu Y L. Studies on the isolation and structures of baohuosides I, VI, VII, and baohuosu [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 23(10): 739-748.
- [4] Sun P Y, Wen Y, Xu Y, et al. Chemical constituents of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1988, 33(12): 919-922.
- [5] Li W K, Xiao P G, Zhang R Y. Chemical constituents from the aerial parts of *Epimedium koreanum* Nakai (II) [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(4): 12-18.
- [6] Li W K, Zhang R Y, Xiao P G. Chemical constituents from the aerial parts of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(9): 453-455.
- [7] Guo B L, Xiao P G. Prospects on the quality evaluation and resource utilization of medicinal plants from *Epimedium* L. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1996, 8(1): 74-78.

青藏高原红景天提取物

兰州汇元生物技术研究所

联系人: 李义富 电话: (0931) 7357097 手机: 13109366988