

用 LC/ESI-MS/MS 研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物

王义明¹, 张思巨², 罗国安^{1*}, 胡亚男¹, 扈继萍², 刘丽², 朱瑛¹, 王宏洁²

(1. 清华大学化学系, 北京 100084; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的 研究正品肉苁蓉及其习用品盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉中的苯乙醇苷类化合物的种类和含量。方法 采用 LC/ESI-MS/MS 方法对正品肉苁蓉及其习用品盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉中的 7 种苯乙醇苷类化合物进行定性分析及相对含量测定。结果 正品肉苁蓉中鉴别出 7 种苯乙醇苷类化合物; 而盐生肉苁蓉中只含 6 种; 管花肉苁蓉中只含 5 种, 而且 3 种肉苁蓉中苯乙醇苷含量也有差别。结论 3 种肉苁蓉中苯乙醇苷类化合物的种类和含量是区别各种肉苁蓉的特征成分之一。

关键词: 液相色谱/电喷雾-串联质谱联用技术; 肉苁蓉; 苯乙醇苷类

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)11-0839-04

肉苁蓉是传统的补益壮阳药。其化学成分中苯乙醇苷类^[1-7]化合物海胆苷(echinacoside)、麦角甾苷(acteoside)、顺式麦角甾苷(cisacteoside)、异麦角甾苷(isoacteoside)、2'-乙酰基麦角甾苷(2'-acetylacteoside)、肉苁蓉苷 A(cistanoside A)、os manthuside B(结构见图 1)有增强学习记忆功能和助阳等功能, 是肉苁蓉中分离出来的有效成分^[1-7]。中国药典 1995 年版规定, 肉苁蓉以列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. D. Ma 为正品, 而全国不少地区将同属植物盐生肉苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey) G. Beck 和管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight 也作为肉苁蓉入药。这两个品种能否代替正品入药, 是一个亟待解决的问题。

中药通常含有多种活性成分。因此, 用传统的分析方法如 TLC, HPLC, GC/MS 等对其进行分析存在一定困难。而液相色谱与串联质谱联用技术(LC/MS/MS)有灵敏度高、专一性强等优点, 非常适合中药的分析。在复杂样品分析中, LC/MS/MS 比 LC/MS 更具优势。在 LC/MS 中, 由于使用了软电离技术, 通常很难得到分子的碎片信息。而在 LC/MS/MS 中, 通过碰撞激发解离, 可使母离子在中性气体的碰撞作用下生成一些能表征其结构信息的碎片离子。

本文首次利用 LC/MS/MS 方法对 3 种肉苁蓉中的苯乙醇苷类成分进行了研究。

材料与方 法

样品与试剂 正品肉苁蓉产地为内蒙阿左旗; 盐生肉苁蓉产地为内蒙阿左旗; 管花肉苁蓉产地为新疆, 购于四川, 3 个品种的肉苁蓉均经中医研究院谢宗万研究员鉴定。苯乙醇苷类标准品均由日本养命酒制造(株)中央研究所提供。

所用甲醇、乙腈为 HPLC 级; 水为自制重蒸水; 冰醋酸为分析纯。

仪器与测定条件 HPLC 条件: 使用美国 PE Serials 200 液相色谱泵, Zorbax Rx-C₁₈, 4.6 mm × 250 mm 色谱柱填料粒径为 5 μm。流动相为乙腈-甲醇-1%醋酸(10:15:75), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 334 nm。

MS 条件: 美国 PE Sciex API 3000 型串联四级杆质谱仪, 使用 ESI 离子源。所有实验均在负离子扫描方式下进行。在 LC/MS 条件下, 第一级四级杆处于全扫描模式, 扫描范围 m/z 400.0 ~ 1000.0, 而第三级四级杆处于 RF-ONLY 模式。在进行 LC/MS/MS 实验时, 质谱仪可在子离子扫描(product ion scan)、多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)和母离子扫描(precursor ion scan)方式下工作。

在碰撞激发解离(CAD)过程中, 被选定进入碰撞室的母离子在氮气的碰撞下产生碎片。对碰撞能量进行优化, 使得能够产生表征化合物结构的子离子。

收稿日期: 2000-01-17

基金项目: 国家重大基础研究计划资助项目(G1999054404)

作者简介: 王义明, 女, 副教授。

罗国安, 男, 教授, 博士生导师。

* 联系人 Tel: (010) 62781688, Fax: (010) 62784764,

E-mail: galuo@chem.tsinghua.edu.cn

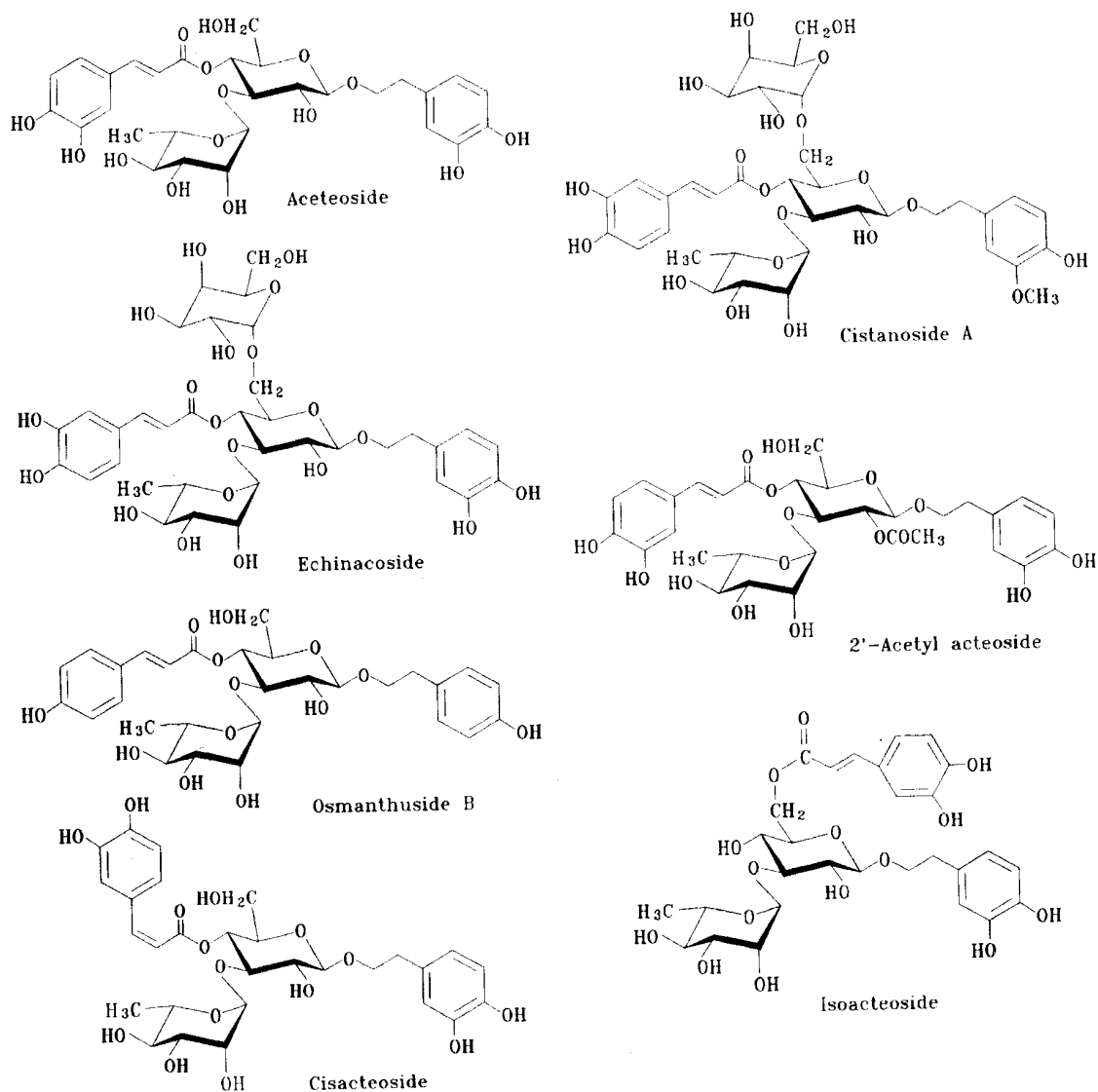


Fig 1 The structures of phenylethanoid glycosides in *Cistanche*

将待测化合物进行直接进样一级质谱分析,可找到该化合物的母离子,然后再进行二级质谱分析,找出该化合物特征的子离子。

样品的制备 分别准确称取 3 种肉苁蓉粉末 (60 目) 1 g, 置于 100 mL 棕色瓶中, 加入甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定, 浸泡 30 min, 超声提取 40 min。取出, 放气, 再称定, 用甲醇补足减失的重量。摇匀, 离心, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔膜过滤。滤液置于棕色瓶中, 即得供试品。

结果与讨论

在 LC/MS/MS 测定中, 对于质谱图中显示的每种化学成分, 均可以得到其分子量、二级质谱图及保留时间的信息, 将这 3 方面信息与标准品相对照,

即可对化合物精确定性。

1 子离子扫描

采用电喷雾 (ESI) 离子源, 在负离子扫描方式下, 经过对碰撞能量和仪器参数的优化, 得到现有肉苁蓉中苯乙醇苷类标准品的二级质谱数据。这些标准品包括: 海胆苷 (echinacoside, $M_r = 786$)、麦角甾苷 (acteoside, $M_r = 624$)、顺式麦角甾苷 (cisacteoside, $M_r = 624$)、异麦角甾苷 (isoacteoside, $M_r = 624$)、2'-乙酰基麦角甾苷 (2'-acetylacteoside, $M_r = 666$)、肉苁蓉苷 A (cistanoside A, $M_r = 800$)、osmanthuside B ($M_r = 592$)。

苯乙醇苷类化合物的结构由 3 部分组成, 即咖啡酸 (caffeic acid, I)、苯乙醇苷元 (aglycone, II)、糖 (glucose, rhamnose, III)。发现苯乙醇苷类化合物

的负离子有一些特征的碎片： m/z 461, m/z 315, m/z 179, m/z 161 等。

在标准品的二级质谱中(表1),acteoside 的 m/z 461 的碎片是由于酯键的断裂产生的; m/z 315 的碎片是 m/z 461 的碎片中性丢失端基糖 146 产生; m/z 179 是由于糖苷键断裂产生的 $[I - H]^-$;而 m/z 161 的碎片则是 m/z 179 脱水得到。 m/z 153 是 $[III - H]^-$ 的碎片, m/z 135 是 153 脱水产生的。对于 os manthuside B,它与 acteoside 相比,在 I,II 两部分的苯环上都只有一个羟基,因此产生 m/z 445(m/z 461 - 16)的碎片。 m/z 163 是 C 方式断裂产生 $[I - H]$ 的碎片。 m/z 145 是 m/z 163 脱水,即 163 - 18 碎片。 $2'$ -acetylacteoside 是 acteoside 的中心 glucose 2 位羟基乙酰化。 m/z 623 是该酯键断裂产生的碎片,其结构与 m/z 623 相同,这一点从两者的子离子谱基本相同也可得到证明。Cistanoside A m/z 637 的碎片是分子离子峰 m/z 799 中性丢失端基 glucose,即 799 - 162 产生的。Echinacoside 比 acteoside 多一个 glucose,出现 m/z 477 的峰而非 461 的峰,而 cistanoside A 也出现 m/z 491(cistanoside A 在 II 部分的苯环上有一个羟基和一个甲氧基,echinacoside 在 II 部分的苯环上有两个羟基,分子量相差 14),可初步确定该碎片可能是由多的一个 glucose 发生环内裂解产生的,碎片包括 II 部分。Cisacteoside 和 isoacteoside 的二级质谱图与 acteoside 基本相似。

采用上述方法,我们在正品肉苁蓉中检测出 7 个苯乙醇苷类化合物,海胆苷、麦角甾苷、顺式麦角甾苷、异麦角甾苷、 $2'$ -乙酰基麦角甾苷、肉苁蓉苷 A 和 os manthuside B。将正品肉苁蓉提取液中此 7 种化合物的二级质谱图和相应标准品溶液的二级质谱图(谱图在相同的实验条件下获得)相比较,发现二者裂解碎片基本吻合。

2.3 种肉苁蓉提取液中苯乙醇苷类化合物比较

对比正品肉苁蓉、盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉的 LC/MS 谱(图 2),发现正品肉苁蓉中含有海胆苷、麦角甾苷、 $2'$ -乙酰基麦角甾苷、肉苁蓉苷 A、顺式麦角甾苷、异麦角甾苷和 os manthuside B 这 7 种苯乙醇苷类化合物;盐生肉苁蓉中无 os manthuside B;而管花肉苁蓉中则不含肉苁蓉苷 A 和 os manthuside B。此外,由于样品浓度较低时,LC/MS/MS 的总离子流图(TIC)中的峰高与进样液中化合物的含量成正比,且各肉苁蓉提取液的样品浓度及 LC/MS/MS 进样量都相同,因此可以看出 3 种肉苁蓉中苯乙醇

Tab 1 Fragment ions observed (m/z) in the CAD spectra from standards by using $[M - H]^-$ as the precursor ions

Compound	Precursor ion		Product ion (m/z)
	$[M - H]^-$ (m/z)		
Acteoside	623		461 315 179 161 153 135
$2'$ -Acetylacteoside	665 623		461 315 179 161 153 135
Cistanoside A	799 637 491		161
Cisacteoside	623		461 315 179 161 153 135
Os manthuside B	591		445 145
Echinacoside	785 623		477 315 179 161 153 135
Isoacteoside	623		461 315 179 161 153 135

苷类化合物含量也有较大差别。例如,盐生肉苁蓉和管花肉苁蓉中海胆苷、顺式麦角甾苷含量较高,而异麦角甾苷及 $2'$ -乙酰基麦角甾苷含量较低。正品肉苁蓉中异麦角甾苷及 $2'$ -乙酰基麦角甾苷含量较高,而海胆苷含量较低。

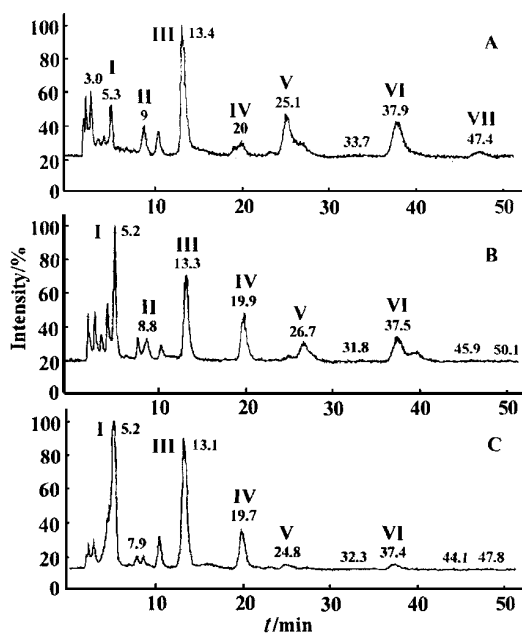


Fig 2 TIC for phenylethanoid glycosides in *Cistanche deserticola* Y.D. Ma (A), *C. salsa* (C.A. Mey) G. Beck (B) and *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight (C)

I. Echinacoside; II. Cistanoside A; III. Acteoside; IV. Cisacteoside; V. Isoacteoside; VI. $2'$ -Acetylacteoside; VII. Os manthuside B

本实验采用 LC/MS/MS 分析了肉苁蓉与二种习用品中苯乙醇苷类化合物。通过对 $[M - H]^-$ 离子的 CAD 裂解的碎片的研究,发现该类化合物的特征断裂方式,包括糖苷键、脂键、端基糖的中性丢失等。结合 LC 的保留时间精确对该类化合物定性,

研究肉苁蓉与其习用品中苯乙醇苷类化合物的差别,为对习用品能否代替正品入药的问题提供指导。此法的可靠性高于传统的 HPLC 的 UV 检测,例如,管花肉苁蓉在 7~9 min 出现了与盐生肉苁蓉类似的峰,但这几个峰的质谱数据证明不是肉苁蓉苷 A。此问题还需要进一步的药理研究来佐证。

LC/MS/MS 提供了一种快速、准确的测定中药有效成分的方法,与传统的 HPLC, TLC 等方法相比,LC/MS/MS 不需复杂的样品制备过程,并且具有快速、精确、灵敏度高等优点,必将在中药研究中起到越来越重要的作用。

REFERENCES:

- [1] Kobayashi H, Oguchi H, Takizawa N, *et al.* New phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, **32**(8):3009 - 3014.
- [2] Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, *et al.* Studies on the constituents of *Cistanche herba*. IV. isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, *cistanosides C and D* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, **32**(10):3880 - 3885.
- [3] Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, *et al.* Studies on the constituents of *Cistanche herba*. V. isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, *cistanosides E and F* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**(4):1452 - 1457.
- [4] Xu WH, Qiu SX, Shen LZ, *et al.* Comparison of the chemical constituents and pharmacological effects between *Rongcongrong* and *Yanshengrongcong* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (in Chinese), 1995, **26**(3):143 - 146.
- [5] Xu WH, Qiu SX, Zhao JH, *et al.* Studies on the chemical constituents of *desertliving cistanche (Cistanche deserticola)* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (in Chinese), 1994, **25**(10):509 - 513.
- [6] Tu PF, Wang B, Chu SW, *et al.* Analysis of phenylethanoid glycosides of *herba cistanche* by RP-HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, **32**(4):294 - 300.
- [7] Zhang SJ, Chen MH, Liu L. Acteoside content of crude and differently processed *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Pharm J* (in Chinese), 1996, **31**(6):335 - 337.

ANALYSIS OF PHENYLETHANOID GLYCOSIDES IN THE EXTRACT OF HERBA CISTANCHIS BY LC/ESI-MS/MS

WANG Yr ming¹, ZHANG Sr ju², LUO Guo an¹, HU Ya nan¹,
HU Jr ping², LIU Li², ZHU Ying¹, WANG Hong jie²

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2. China Academy of Chinese Traditional Medicine, Beijing 100700, China)

ABSTRACT: **AIM** To analyze the phenylethanoid glycosides in *Cistanche deserticola* Y.D. Ma and its alternatives. **METHODS** An HPLC/MS/MS method has been developed for the analysis of seven kinds of phenylethanoid glycosides in *Cistanche deserticola* Y.D. Ma, *C. salsa* (C.A. Mey) G. Beck and *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight. The [M - H]⁻ ions were observed for five standards and *Cistanche* extracts. The glycosidic linkages, the core, and the attached sugar (s) of the phenylethanoid glycosides can be determined from the collision-induced dissociation spectra of the molecular. **RESULTS** Seven kinds of phenylethanoid glycosides (echinacoside, acteoside, cisacteoside, isoacteoside, 2'-acetylacteoside, *cistanoside A*, *osmanthuside B*) in *Cistanche deserticola* Y.D. Ma, six kinds (echinacoside, acteoside, cisacteoside, isoacteoside, 2'-acetylacteoside and *cistanoside A*) in *C. salsa* (C.A. Mey) G. Beck and five kinds (echinacoside, acteoside, cisacteoside, isoacteoside and 2'-acetylacteoside) in *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight were detected. **CONCLUSION** The difference of the relative distribution of these phenylethanoid glycosides in each extract was found out. Phenylethanoid glycosides are the specific constituents in *Cistanche*, which can be used to distinguish different species in Genus *Cistanche*.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry; *Cistanche*; phenylethanoid glycosides