

HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS 分析肉苁蓉拟雌激素活性部位入血成分

李文兰^{1,2}, 白晶^{1,2}, 臧宝珊^{1,2}, 刘梦娇^{1,2},
许颖^{1,2}, 陈婧^{1,2}, 季宇彬^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:为深入研究肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Ma.)活性部位体内作用的物质基础,应用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF MS)技术对肉苁蓉拟雌激素活性部位入血成分进行分析,并与空白血清、肉苁蓉拟雌激素活性部位和对照品之间的色谱图和质谱碎片信息进行对比,共鉴别出13个化学成分,其中包括6个药材原型:京尼平苷酸、红景天苷、肉苁蓉苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷D;7个代谢成分:3,4-二羟基苯乙醇苷、甲基化毛蕊花糖苷、乙酰化肉苁蓉苷G、3,4-二羟基苯乙醇、乙酰基管花苷B、肉苁蓉苷B葡萄糖醛酸代谢物、甲基化3,4-二羟基苯乙醇苷。该方法可为进一步研究肉苁蓉药理活性和作用机理提供理论支持。

关键词:肉苁蓉;含药血清;拟雌激素活性;高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2015)03-0223-06

doi:10.7538/zpxb.2015.36.03.0223

Analysis of Absorbed Components in Rat Plasma after Oral Administration of Quasi Estrogen Fraction of Cistanche by HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS

LI Wen-lan^{1,2}, BAI Jing^{1,2}, ZANG Bao-shan^{1,2}, LIU Meng-jiao^{1,2},
XU Ying^{1,2}, CHEN Qiang^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

(1. Center of Research on Life Sciences and Environmental Sciences,

Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Engineering Research Center of Natural Antineoplastic Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China)

Abstract: To analyze and identify the constituents in rat plasma after oral administration of the active fraction of cistanche, the components in rat plasma were detected by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-Q-TOF MS). Structures of the components were elucidated by comparing their retention times and MS/MS spectra with those of reference com-

收稿日期:2014-08-18;修回日期:2014-11-06

基金项目:国家自然科学基金(81073015);哈尔滨市科技创新人才研究专项资金(2011RFXXS069)资助

作者简介:李文兰(1967—),女(汉族),河北人,教授,从事中药药效物质基础的研究。E-mail:lwldzd@163.com

pounds and reported data in the literatures. 13 chemical compositions are identified, including 6 prototype components, such as Geniposidic acid, Salidroside, Cistanoside A, Echinacoside, Acteoside, Cistanoside D, 7 metabolites components, such as 3,4-Dihydroxyphenylethanol glycosides, methylation acteoside, acetylation Cistanoside G, 3,4-Dihydroxyphenylethanol, acetyl tubuloside B, Cistanoside B glucuronide metabolite and methylation-3,4 Dihydroxyphenylethanol. The results can provide essential data for illuminate the therapeutic basis of quasi estrogen regulation activity of cistanche.

Key words: cistanche; serum containing drug; quasi estrogen; high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-Q-TOF MS)

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Ma.)是一种寄生在沙漠树木(如梭梭、红柳等)根部的植物,作为一种滋补、强壮的名贵中药,具有滋补肾阳、调节免疫力、延缓衰老、抗辐射、保护中枢神经系统等多种药理功效,素有“沙漠人参”之称^[1-2]。目前,国内外对肉苁蓉的活性研究大多局限于对药理活性的评价^[3-9],而其药效物质基础尚未阐明,这严重阻碍了肉苁蓉的合理开发和应用。

中药成分复杂多样,以适当途径给药后,在体内经过吸收、代谢等过程,最终入血的成分才可能是中药的药效物质基础。这些有效成分可能是中药的原型或代谢产物,也可能是中药中各成分相互反应所形成的新成分,还可能是药物直接作用于机体生成的内源性生理活性物质。因此,这些入血成分能够代表中药及复方的药效物质基础。分析口服给药后能进入血液的成分及其代谢产物,寻找成分间的相互作用规律,可以为药效物质基础研究提供一定的依据。

采用小鼠子宫增重法和 MTT 比色法,对肉苁蓉拟雌激素活性部位及给药剂量进行筛选。前期实验结果表明,用肉苁蓉的乙醇(95%)提取物、每天 30 g/kg 的剂量,灌胃给药后能使性未成熟小鼠的子宫系数显著增加,且其含药血清对 MCF-7 细胞增殖的促进作用显著($P < 0.01$),为肉苁蓉拟雌激素作用的活性部位^[10]。

本工作拟采用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF MS)分析鉴定大鼠灌服肉苁蓉拟雌激素活性部位后的入血成分和其原型成分及代谢产物,并对代谢途径进行

推测,以期能为肉苁蓉拟雌激素作用的药效物质基础研究提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters-600 型液相色谱仪:美国 Waters 公司产品,配有四元梯度泵、自动进样器、真空脱气机、柱温箱、DAD 检测器、Empower 化学工作站;Agilent-1290 型 6530 系列 Q-TOF LC-MS 质谱联用仪:美国 Agilent 公司产品;XW-80A 旋涡混合器:上海宇工机械有限公司产品;DK-80 电热恒温水浴锅:上海一恒科技有限公司产品;ALC-110.4 分析天平:上海人和科学仪器有限公司产品;H66MC 超声震荡仪:美国 Ohaus 科技有限公司产品。

肉苁蓉:购自三棵树药材市场,由哈尔滨商业大学张德连教授鉴定为 *Cistanche deserticola* Ma.;毛蕊花糖苷(批号 111530-200505)、松果菊苷(批号 111670-200503)、红景天苷(批号 110736-200628):均由中国药品生物制品检定所提供;乙烯雌酚:广州市汉普医药有限公司产品;甲醇、乙腈:均为 HPLC 级,山东禹王试剂有限公司产品;其余试剂均为分析纯;实验用水:市售某品牌纯净水。

雌性 Wistar 大鼠:批号 SCXK-(吉)2003—2004,体重(220±20) g,由长春国家生物产业基地实验动物中心提供。

1.2 灌胃药液的制备

将肉苁蓉药材粗粉用 95%乙醇回流提取,依次以 8 倍量溶剂提取 150 min、6 倍量溶剂提取 75 min、6 倍量溶剂再提取 75 min,然后将 3 次提取液合并,减压浓缩,得到浸膏,保存于冰

箱中,备用。使用前,用蒸馏水配制成浓度约为 1.5 g/mL 的灌胃药液。

1.3 对照品溶液的制备

精密量取适量的毛蕊花糖苷、红景天苷及松果菊苷,用甲醇充分溶解,配制成 1 mL 混合对比液,3 种对照品各含 0.2 mg,将对照品溶液过 0.45 μm 滤膜,备用。

1.4 含药血清及空白血清的制备

含药血清的制备:称量雌性 Wistar 大鼠体重,按每天 1 mL/100 g 的剂量给药,分别给予大鼠蒸馏水和灌胃药液,灌胃分早晚两次,连续给药 3 天,末次给药 60 min 后,用 10% 水合氯醛以 2 mL/kg 腹腔注射麻醉,肝门静脉取血,充分凝血后,以 3 000 r/min 离心 10 min,上清液即为含药血清。

空白血清的制备:每天以等体积的蒸馏水给大鼠灌胃,其他制备方法同含药血清。

取 2 mL 含药血清,加入 5 倍量甲醇,于离心管中充分涡旋 10 min,再以 14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,挥干溶剂。用微量移液器精密加入 0.5 mL 甲醇,充分溶解残留物,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,进行色谱分析。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱: Waters Symmetry Shield™ RP18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μm);预柱: Nova-PakC18 Guard-Pak™;流速: 0.5 mL/min;进样量: 10 μL ;流动相: 乙腈-0.2% 甲酸水溶液;梯度条件: 0~35 min、5%~34% 乙腈,35~65 min、24%~26% 乙腈;柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长: 254 nm。

1.5.2 质谱条件 离子源: 大气压电喷雾电离源(ESI);流速: 0.5 mL/min;雾化气压力: 0.2 MPa;干燥气流速: 8.0 L/min;干燥气温度: 30 $^{\circ}\text{C}$;毛细管电压: 3.5 kV;鞘气流速: 12.0 L/min;鞘气温度: 400 $^{\circ}\text{C}$ 。选择正负离子扫描方式,质量扫描范围 m/z 100~3 000。

2 结果与讨论

2.1 肉苁蓉拟雌激素活性部位含药血清化学成分 HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS 分析

肉苁蓉拟雌激素活性部位大鼠含药血清样品通过 ESI-MS 检测器进行定性分析,分别使用正离子模式和负离子模式进行扫描,结果示于图 1。对比图 1 中 2 种扫描模式的一级质谱总离子流图,发现负离子模式下得到的总离子流特征性较强、灵敏度较高,故本实验选择负离子模式扫描。

在负离子模式下,应用 ESI-MS 检测器对肉苁蓉拟雌激素活性部位给药后的大鼠血清进行定性分析,通过对比分析空白血清与给药血清的一级扫描总离子流图,共标示出 13 个分子离子峰,示于图 2。通过分析含药血清与肉苁蓉体外药材,推测 2、3、5、7、9、10 号峰为原型成分,1、4、6、8、11、12、13 号峰为代谢成分。

根据各色谱峰在负离子模式下检出的分子离子峰,以及相应的特征碎片给出的相对分子质量,共标出 13 个质谱峰;对照各标准品的紫外光谱-质谱信息,并参考文献报道的成分,鉴别出 13 个峰的化学成分,列于表 1。其中包括

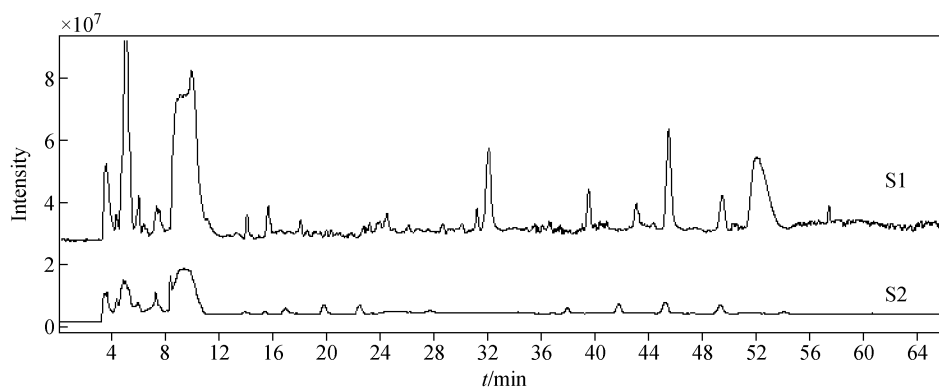
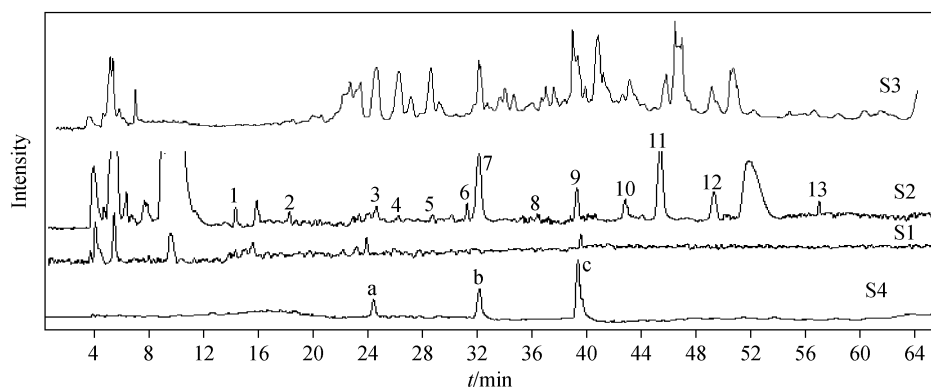


图 1 含药血清负离子模式(S1)和正离子模式(S2)扫描的总离子流图对比

Fig. 1 Comparison of total ion current chromatograph of medicated serum in negative ion mode (S1) and in positive ion mode (S2)



注: a. 红景天苷; b. 松果菊苷; c. 毛蕊花糖苷

图2 空白血样(S1)、给药血样(S2)、药材(S3)、标准对照品(S4)的负离子扫描总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatograph of blank serum (S1), medicated serum (S2), medicine sample (S3) and reference substances (S4) in negative ion mode

表1 HPLC-ESI-MS数据及成分鉴定结果

Table 1 Informations of HPLC-ESI-MS and identification results of compounds

序号	保留时间/ min	质谱信息(m/z)		相对 分子质量	化合物推测结果	备注
		一级碎片 $[M-H]^-$	二级碎片			
1	13.987	315.1112	297.1133 271.0533 153.2412	316.1122	3,4-二羟基苯乙醇苷 3,4-Dihydroxyphenethyl glycoside	代谢
2	18.407	373.1135	211.0607	374.1139	京尼平苷酸 Geniposidic acid	原型
3	24.309	299.3088	219.8433	300.3087	红景天苷 Salidroside	原型
4	26.787	637.1977	475.1922 167.0783	638.1945	甲基化毛蕊花糖苷 Methyl acteoside	代谢
5	28.569	799.2626	637.2139	800.2623	肉苁蓉苷 A Cistanoside A	原型
6	31.759	487.3066	327.1075	488.3062	乙酰化肉苁蓉苷 G Acetylation cistanoside G	代谢
7	32.028	785.2623	623.2037	786.2627	松果菊苷 Echinacoside	原型
8	36.104	153.0553	123.0045	154.0543	3,4-二羟基苯乙醇 3,4-Dihydroxyphenylethanol	代谢
9	39.061	623.2255	461.1615	624.2251	毛蕊花糖苷 Acteoside	原型
10	43.117	651.2293	458.1324	390.2295	肉苁蓉苷 D Cistanoside D	原型
11	44.974	707.2102	543.1533	708.2121	乙酰基管花苷 B Acetylation tubuloside B	代谢
12	48.961	989.3021	827.3042 651.0284	990.3019	肉苁蓉苷 B 葡萄糖醛酸代谢物 Cistanoside B glucuronide metabolite	代谢
13	57.965	329.2345	137.0675	330.2342	甲基化 3,4-二羟基苯乙醇苷 Methyl 3,4-dihydroxyphenethyl glycoside	代谢

6 个原型成分,分别为京尼平苷酸、红景天苷、肉苁蓉苷 A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 D;7 个代谢成分,分别为 3,4-二羟基苯乙醇苷、甲基化毛蕊花糖苷、乙酰化肉苁蓉苷 G、3,4-二羟基苯乙醇、乙酰基管花苷 B、肉苁蓉苷 B 葡萄糖醛酸代谢物及甲基化-3,4 二羟基苯乙醇。在 7 个代谢产物中,推测 1 号峰(3,4-二羟基苯乙醇)、8 号峰(3,4-二羟基苯乙醇)、13 号峰(甲基化 3,4-二羟基苯乙醇苷)为肉苁蓉中苯乙醇苷类化合物水解的片段;4 号峰(甲基化毛蕊花糖苷)为毛蕊花糖苷的代谢产物;6 号峰(乙酰化肉苁蓉苷 G)为肉苁蓉苷 G 的代谢产物;11 号峰(乙酰基管花苷 B)为管花苷 B 的代谢产物;12 号峰(肉苁蓉苷 B 葡萄糖醛酸代谢物)为肉苁蓉苷 B 的代谢产物。

13 种成分解析如下:1 号峰($t_R=13.987$ min) m/z 315 为 $[M-H]^-$ 峰,推测为母离子失去鼠李糖基, m/z 297 为 $[M-H-H_2O]^-$ 峰,推测为 3,4-二羟基苯乙醇苷;2 号峰($t_R=18.407$ min) m/z 373 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 211 为 $[M-H-gluc]^-$ 峰,为母离子失去 β -D-葡萄糖基(162 u)而得,推测为京尼平苷酸;3 号峰($t_R=24.309$ min) m/z 299,推测为红景天苷,与标准品对照一致;4 号峰($t_R=26.787$ min) m/z 637 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 475 为 $[M-H-caff]^-$ 峰, m/z 167 为 $[M-H-caff-\alpha$ -L-rhamnopyl-Glc] $^-$ 峰,推测为甲基化毛蕊花糖苷;5 号峰($t_R=28.569$ min) m/z 799 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 637 为 $[M-H-Caff]^-$ 峰,为母离子失去咖啡酰基(162 u)而得,推测为肉苁蓉苷 A^[11];6 号峰($t_R=31.759$ min) m/z 487 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 327 为母离子失去鼠李糖基,推测为乙酰化肉苁蓉苷 G;7 号峰($t_R=32.028$ min) m/z 785 为 $[M-H]^-$ 峰,为松果菊苷失去一个氢特征,推测为松果菊苷,与标准品对照一致;8 号峰($t_R=36.104$ min) m/z 153 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 123 为 $[M-H-CH_3O]^-$ 峰,推测为 3,4-二羟基苯乙醇;9 号峰($t_R=39.061$ min) m/z 623 为 $[M-H]^-$ 峰,为毛蕊花糖苷失去一个氢特征,推测为毛蕊花糖苷,与标准品对照一致;10 号峰($t_R=43.117$ min) m/z 651 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 459 为 $[M-H-Fr]^-$ 峰,为中性丢失反式阿魏酸所得,推测为肉苁蓉苷 D^[12];11 号峰($t_R=44.974$ min) m/z 707 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 543 为 $[M-H-\alpha$ -L-rhamnopyl-H₂O] $^-$ 峰,推测为乙酰化管花苷 B;12 号峰($t_R=48.961$ min) m/z 989 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 827 为 $[M-H-gluc]^-$ 峰, m/z 651 $[M-H-gluc-glucuronyl]^-$ 峰为在 m/z 827 基础上失去葡萄糖醛酸基,推测为肉苁蓉苷 B 葡萄糖醛酸代谢物;13 号峰($t_R=57.965$ min) m/z 329 为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 137 为 $[M-H-gluc-OCH_3]^-$ 峰,推测为甲基化 3,4-二羟基苯乙醇苷。

2.2 讨论

本实验应用 HPLC-Q-TOF MS 联用技术,在肉苁蓉拟雌激素活性部位给药后的血清中共标识了 13 个主要色谱峰,这些可能是肉苁蓉发挥拟雌激素活性的体内直接作用物质,同时也体现了中药药效的产生是多成分相互协调、互补或制约的结果。通过解析 13 个血中移行成分,证明了苯乙醇苷类是肉苁蓉的主要活性成分。在后续研究中,将建立相应的谱效关系进行药效相关性研究,以进一步明确药效物质基础,并建立多成分在体内不同时间点的量-时-效关系,从而揭示肉苁蓉的代谢途径和代谢方式。

2.2 讨论

3 结论

本实验采用 HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS 技术对肉苁蓉拟雌激素活性部位入血成分进行分析,共鉴别出 13 个化学成分,这对阐明肉苁蓉拟雌激素活性成分的药效物质基础研究具有重要意义,也可为肉苁蓉的进一步研究及临床用药提供可靠依据。

3 结论

参考文献:

- [1] 赵新杰,夏华玲,王苏静. 肉苁蓉的药理作用研究进展[J]. 中国药业,2009,18(17):77-79.
ZHAO Xinjie, XIA Hualing, WANG Sujing. Research on pharmacological activities of *Cistanche deserticola*[J]. China Pharmaceuticals, 2009, 18(17): 77-79(in Chinese).
- [2] 玄国东,刘春泉. 肉苁蓉苯乙醇苷对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗衰老作用研究[J]. 中药材,2008,31(9):1 385-1 388.
XUAN Guodong, LIU Chunquan. Research on the effect of phenylethanoid Glycosides (PEG) of the *Cistanche deserticola* on anti-aging in aged

- mice induced by D-galactose[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(9): 1 385-1 388(in Chinese).
- [3] HU G S, HUR Y J, JIA J M, et al. Effect of 2-aminoinidan-2-phosphonic acid treatment on the accumulation of salidroside and four pheylethanoid Glycosides in suspension cell culture of *Cistanche deserticola* [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(4): 665-674.
- [4] DONG J, YAO J, N FANG, et al. Structural characterization and immunological activity of two coldwater-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* Ma[J]. Carb-ohydrate Research, 2007, 342(3): 1 343-1 349.
- [5] CAI R L, YANG M H, SHI Y, et al. Antifatigue activity of phenylethanoid-rich extract from *Cistanche deserticola* [J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(2): 313-315.
- [6] SIU A H, KO K M. *Herba Cistanche* extract enhances mitochondrial glutathione status and respiration in rat hearts, with possible induction of uncoupling proteins[J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(5): 512-517.
- [7] ZHANG K, MA X, HE W J, et al. Extracts of *Cistanche deserticola* can antagonize immunosenescence and extend life span in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAM-P8) mice[J/OL]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 601383[2014-08-18]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/601383>.
- [8] TIAN X F, PU X P. Phenylethanoid glycosides from *Cistanches salsa* inhibit apoptosis induced by 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion in neurons[J]. Ethnopharmacology, 2005, 97(1): 1 259-1 260.
- [9] PAN J, YUAN C S, LIN C J, et al. Pharmacological activities and mechanisms of natural phenylpropanoid glycosides [J]. Pharmazie, 2003, 58(11): 767-775.
- [10] LI W L, CHEN Q, YANG B, et al. Screening of phytoestrogenic effective extracts and dose of *Cistanche deserticola* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2013, 5(4): 292-296.
- [11] JIANG Y, TU P F. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species[J]. J Chromatogr A, 2009, 1 216(11): 1 970-1 979.
- [12] WANG Y, HAO H, WANG G, et al. An approach to identifying sequential metabolites of a typical phenylethanoid glycoside, echinacoside, based on liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry analysis[J]. Talanta, 2009, 80(2): 572-580.