

HPLC-MSⁿ 法分析知母中的皂苷类成分

明继阳, 陆园园, 罗建光, 孔令义*

(中国药科大学天然药物化学教研室, 南京 210009)

摘要 目的:应用 HPLC-MSⁿ 方法分析知母中的甾体皂苷成分。方法:采用 Heder ODS-2 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm D, 5 μm), 流动相:乙腈-水梯度洗脱, ELSD 检测器, ESI 离子源, 正负离子模式下采集数据。结果:根据负离子模式下的准分子峰和正离子模式下的二、三级质谱裂解规律, 结合文献并与部分对照品比较, 鉴定了 15 个甾体皂苷。结论:该法选择性强、灵敏度高、操作简便, 适用于知母甾体皂苷类化合物的定性分析。

关键词 知母; 甾体皂苷; 液质联用

中图分类号 R284 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2009)05-0400-06

HPLC-MSⁿ analysis of saponins in *Rhizoma Anemarrhenae*

MING Ji-yang, LU Yuan-yuan, LUO Jian-guang, KONG Ling-yi*

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

Abstract **Aim:** To investigate the steroidal saponins of *Rhizoma Anemarrhenae* through HPLC-MSⁿ analysis. **Methods:** The chromatographic conditions were as follows: Heder ODS-2 (250 mm × 4.6 mm D, 5 μm) column; water (A) and acetonitrile (B), gradient elute, ELSD detector, the ESI source was used and the data in negative and positive mode were acquired. **Results:** The molecular ions in negative ion modes and product ions in positive ion were observed for molecule mass information and steroidal skeleton, and the structures were elucidated in comparison with the reference data and the standards. Fifteen steroidal saponins were identified. **Conclusion:** The method is simple and rapid for the identification of the steroidal saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bge.

Key words *Rhizoma Anemarrhenae*; saponins; LC/MS

知母为百合科知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 具有清热泻火, 生津润燥的作用。临床用于外感风寒, 高热烦渴, 肺热燥咳, 骨蒸潮热, 内热消渴, 肠燥便秘^[1]。

现代药理学研究表明, 知母中的皂苷成分有多种的药理活性, 多种皂苷及苷元对 Na⁺-K⁺-ATP 酶具有极为显著的抑制作用; 知母皂苷也有降低转氨酶作用; 多种知母甾体皂苷对血小板聚集有显著的抑制作用, 同时具有抗菌杀虫等作用^[2]。故本实验采用 HPLC-MSⁿ 方法对知母甾体皂苷成分分析, 通过研究表明: 此方法不仅克服了知母皂苷紫外吸收弱的特点, 而且是一种灵敏度高, 选择性好的快速鉴定方法。共鉴定了 15 个甾体皂苷 (如图 1):

知母皂苷 E₁ (An-E₁) 或知母皂苷 N (TN) (1); 知母皂苷 D (TD, 2); 知母皂苷 B⁻ (TB⁻, 3); 知母皂苷 B⁻ (TB⁻) 或知母皂苷 B⁻ (TB⁻) (4, 5); 知母皂苷 C (An-C, 6); 知母皂苷 B⁻ (TB⁻, 7); 知母皂苷 或 (An⁻ 或 An⁻, 8); 知母皂苷 F (An-F, 9); 知母皂苷 (An⁻) 或知母皂苷 (TA⁻) 或 Schidigerasaponin F₂ (10 ~ 12); 知母皂苷 a (An⁻ a, 13); 知母皂苷 A⁻ (TA⁻, 14); 知母皂苷 A⁻ (TA⁻, 15)。

材 料

1.1 药材与试剂

知母药材购于安徽亳州, 经中国药科大学中药

* 收稿日期 2009-04-29 * 通讯作者 Tel: 025-85391232 E-mail: cpu_lykong@126.com

学院中药资源教研室秦民坚教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的根茎。TB⁻ 及 TB⁻ 和 TA⁻ 对照品由沈阳药科大学中药学院宋少江教授提供。乙腈(美国 Merck 公司), 甲醇(分析纯), 水(自制重蒸水)。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪; 美国 Alltech 2000 ES 型蒸发光散射检测器; Agilent 1100 LC-MSD Series trap, 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), ESI 接口的离子阱质谱检测器。

方 法

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hadera ODS-2 (250 mm × 4.6 mm D, 5 μm); 流动相: 水(A) 乙腈(B) 梯度洗脱: 0 ~ 12 min, 5% ~ 15% B; 20 ~ 40 min,

23% ~ 30% B; 60 ~ 75 min, 50% ~ 50% B; 流速: 1 mL/min; 进样量 5 μL; 柱温: 30 °。

2.1.2 质谱检测条件 m/z 扫描范围: 100 ~ 1 400; 干燥气温度: 310 °; 干燥气流速: 10 L/min; 雾化气压力: 0.28 MPa; 离子化方式: ESI(+) 和 ESI(-); 电喷雾电压: 3 500 V。

2.2 提取和纯化

取干燥知母药材 4.0 g, 甲醇索氏提取, 浓缩成稠浸膏, 稠膏上 MCI 柱, 用 0%, 20%, 50%, 100% 甲醇梯度洗脱, 收集 100% 甲醇洗脱液, 富集皂苷, 干燥。取适量, 用甲醇溶解配制成 1.5 mg/mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

结 果

知母中的甾体皂苷主要分为螺甾皂苷和呋甾皂苷两类, 本文共鉴定螺甾皂苷 6 个, 呋甾皂苷 9 个, 总离子流色谱图如图 1。

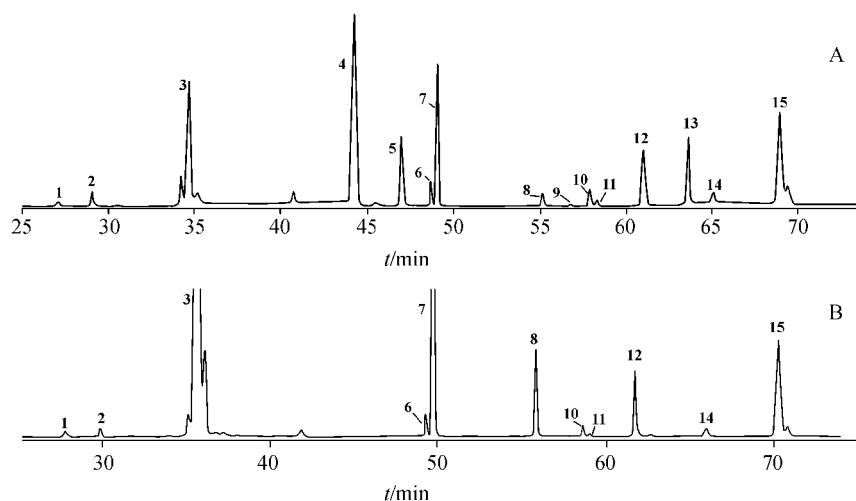


Figure 1 HPLC-ES/MS total ion current(TIC) (A) and HPLC-ELSD chromatogram (B) of Rhizoma Anemarrhenae

3.1 呋甾化合物

在总离子流色谱图中共鉴定 9 个呋甾皂苷, 有色谱峰 1 ~ 8, 13。结构如图 2, TB⁻ 是知母呋甾皂苷中的主要成分, 以其为例说明呋甾皂苷的结构鉴定。

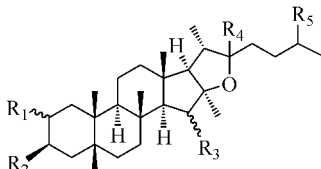
化合物 3 (t_R : 34.2 ~ 34.4 min) 其质谱图如图 3。

化合物 3 在负离子模式下, 一级质谱给出 m/z 955 $[M + Cl]^-$, 以 m/z 955 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 919 $[M - H]^-$, 三级质谱以 m/z 919 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 757 $[M - H - Glc]^-$, 595 $[M - H - Glc - Gal]^-$, 确定其相对分子

质量为 920。结合正离子模式下的数据(如路线 1)。

呋甾皂苷在正离子模式下, 当 22 位有 OH 或 OCH_3 时, 一般不会出现 $[M + H]^+$ 准离子峰, 会出现 $[M + H - H_2O]^+$ 或是 $[M + H - CH_3OH]^+$ 离子峰。以 $[M + H - H_2O]^+$ 或 $[M + H - CH_3OH]^+$ 离子峰为母离子进行裂解, 其裂解规律^[3]与甾体皂苷裂解规律相似。化合物 3, 在正离子模式下, 通过二级质谱以 m/z 903 $[M + H - H_2O]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 741, 579, 435, 417, 以及三级质谱以 m/z 417 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 273, 255。结合文献^[4]并通过对照品比较, 确定化合

物 3 为 TB⁻。依据上述裂解规律,在知母中鉴定 9 个呋甾皂苷,与化合物 3 的裂解规律相似。



Compd.	Peak	Substituted groups				
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Anemarthenasaponin-I	8	H	OGal ² - ¹ Glc	OH (α)	OH (S)	H
Anemarthenasaponin-II	8	H	OGal ² - ¹ Glc	OH (β)	OH (S)	H
Anemarthenasaponin-Ia	13	H	OGal ² - ¹ Glc	OH	OCH ₃	H
Timosaponin B-I	4, 5	H	OGal ² - ¹ Glc	H (S)	OCH ₃	OGlc
Timosaponin B-V	4, 5	H	OGal ² - ¹ Glc	H (R)	OCH ₃	OGlc
Timosaponin B-II	3	H	OGal ² - ¹ Glc	H (S)	OH	OGlc
Timosaponin B-III	7	H	OGal ² - ¹ Glc	H (S)	²¹ (²²)	OGlc
Anemarsaponin-C	6	H	OGlc ² - ¹ Glc	H (S)	²¹ (²²)	OGlc
Anemarsaponin-E ₁	1	H	OGal ² - ¹ Glc	OH	OH	OGlc
Timosaponin T-N	1	OH	OGal ² - ¹ Glc	OH (S)	H	OGlc
Timosaponin T-D	2	OH	OGal ² - ¹ Glc	H	²¹ (²²)	OGlc

Figure 2 Structures of furostanol saponins in *Rhizoma Anemartheneae*

化合物 1 (t_R : 26.5 ~ 26.7 min) 在负离子模式下,通过 m/z 971 $[M + Cl]^-$, 935 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 936,结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 959 $[M + Na]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 941 $[M + Na - H_2O]^+$ 和三级质谱以 m/z 941 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 779 $[M + Na - H_2O - Glc]^+$, 617 $[M + Na - H_2O - Glc - Gal]^+$, 结合文献 [5 - 6] 推测此化合物为 An-E₁ 或 T-N。

化合物 2 (t_R : 28.9 ~ 29.1 min) 在负离子模式下,通过 m/z 955 $[M + Cl]^-$, 917 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 918,结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 m/z 901 $[M - H_2O + H]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 739 $[M + H - H_2O - Glc]^+$, 577 $[M + H - H_2O - Glc - Gal]^+$, 415 $[M + H - H_2O - Glc - Gal - Glc]^+$ 和三级质谱以 m/z

739 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 577, 415, 397, 结合文献 [7] 推测此化合物为 T-D。

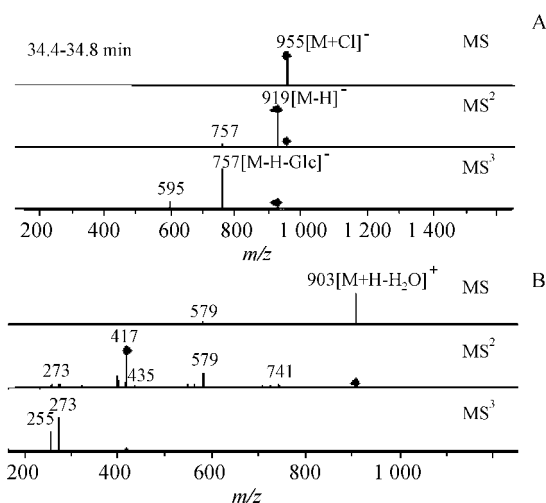
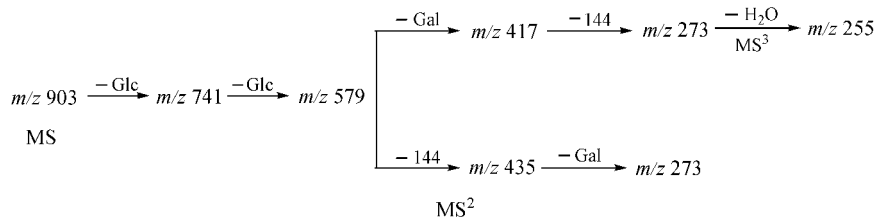


Figure 3 Negative ion ESI (A) and positive ion ESI (B) mass spectrum and MS², MS³ spectra of timosaponin B-



Scheme 1 ESHMSMS²-MS³ fragmentation pathways of timosaponin B-II on the basis of positive spectra

化合物 4, 5 (t_R : 44.1 ~ 44.6 min, 47.0 ~ 47.5 min) 二者的分子离子峰及产物离子峰无显著差异,在负离子模式下,通过 m/z 969 $[M + Cl]^-$, 933 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 934,结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 m/z 903 $[M$

+ H - CH₃OH]⁺ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 741, 579, 435, 417 和三级质谱以 m/z 417 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 273, 255, 结合文献 [8] 推测化合物 4, 5 为 TB⁻ 或 TB⁻。

化合物 6, 7 (t_R : 48.5 ~ 48.9 min, 48.9 ~

49.3 min) 在负离子模式下,通过 m/z 937 $[M + Cl]^-$, 901 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 902,结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 m/z 903 $[M + H]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 741, 579, 417 和三级质谱以 m/z 579 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 435, 273, 255, 结合文献^[9] 推测可能是 An-C 或 TB-, 通过对照品比较, 化合物 6 是 An-C, 化合物 7 是知母皂苷 TB-。

化合物 8 (t_R : 55.2 ~ 55.6 min) 在负离子模式下,通过 m/z 793 $[M + Cl]^-$, 757 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 758, 结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 m/z 741 $[M + H - H_2O]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 579 $[M + H - H_2O - Glc]^+$, 381, 253 和三级质谱以 m/z 579 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 561 $[M - 2H_2O + H - Glc]^+$, 399, 253, 结合文献 [10] 推测可能是

An- 或 An-。

化合物 13 (t_R : 63.2 ~ 63.5 min) 在负离子模式下,通过 m/z 807 $[M + Cl]^-$, 771 $[M - H]^-$ 离子峰确定其相对分子质量为 772, 结合正离子模式下的数据,通过二级质谱以 m/z 741 $[M + H - CH_3OH]^+$ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 579 $[M + H - CH_3OH - Glc]^+$, 561 $[M + H - CH_3OH - H_2O - Glc]^+$ 和三级质谱以 m/z 561 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 399, 381, 251, 结合文献^[11] 推测此化合物为 An- a。

3.2 螺甾皂苷

在总离子流色谱图中共鉴定 6 个螺甾皂苷, 色谱峰 9 ~ 12, 14, 15, 结构如图 4。知母皂苷 A- 是知母螺甾皂苷中的主要成分, 以其为例说明螺甾皂苷的结构鉴定。

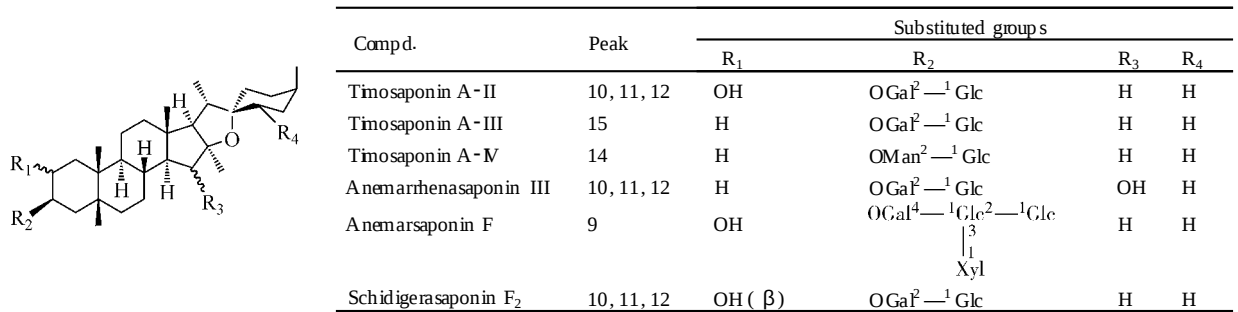


Figure 4 Structures of spirostanol saponins in Rhizoma Anemarrhenae

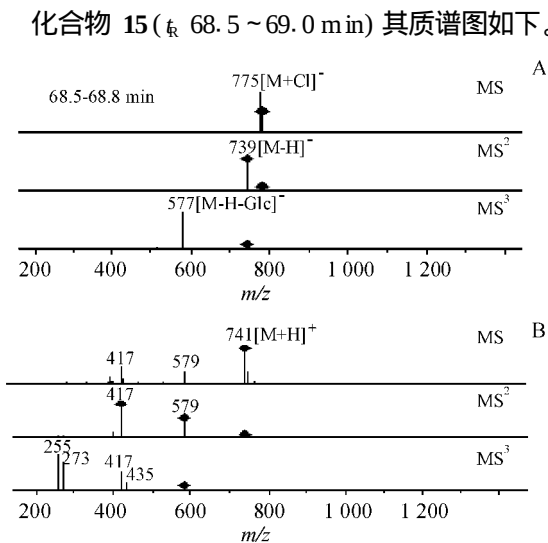
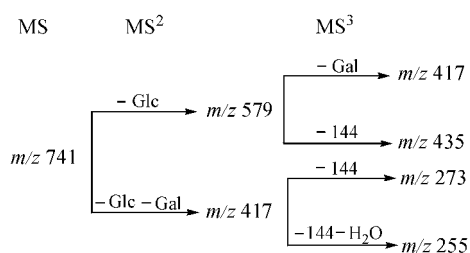


Figure 5 Negative ion ESI (A) and positive ion ESI (B) mass spectrum and MS², MS³ spectra of timosaponin A-III on the basis of positive spectra

化合物 15, 在负离子模式下一级质谱给出 m/z 775 $[M + Cl]^-$, 以 m/z 775 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 739 $[M - H]^-$, 三级质谱以 m/z 739 为母离子峰进行裂解的产物离子峰 m/z 577 $[M - H - Glc]^-$, 确定其相对分子质量为 740。结合正离子模式下的数据 (如路线 2)。

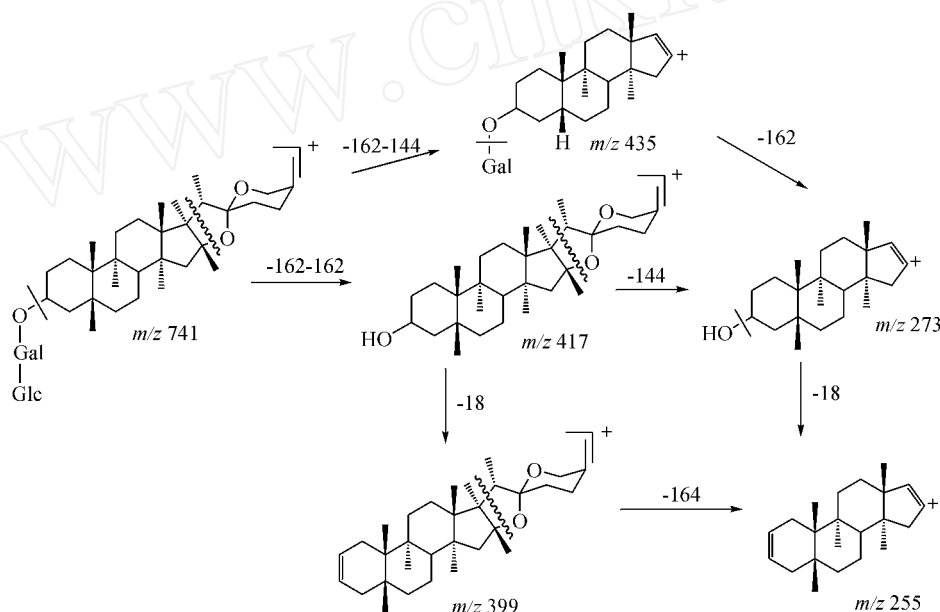
通过二级质谱以 m/z 741 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 579, 417, 以及三级质谱以 m/z 579 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 435, 417, 273, 255, 螺甾皂苷在正离子模式下的裂解规律如路线 3。结合文献^[12] 推测此化合物为 TA- 或 TA-, 最终通过对照品比较, 确定化合物 15 为 TA-。

依据上述裂解规律, 在知母中鉴定 6 个螺甾皂苷, 与化合物 15 的裂解规律相似。



Scheme 2 ESI/MS/MS²-MS³ fragmentation pathways of timosaponin A-III on the basis of positive spectra

化合物 9 (t_R : 57.2 ~ 57.4 min) 在负离子模式下, 通过 m/z 1085 [$M + Cl$]⁻, 1049 [$M - H$]⁻ 离子峰确定其相对分子质量为 1050, 结合正离子模式下的数据, 通过二级质谱以 m/z 739 [$M + H - H_2O - \text{Xyl} - \text{Gal}$]⁺ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 577 [$M + H - H_2O - \text{Xyl} - \text{Glc} - \text{Gal}$]⁺, 415 [$M + H - H_2O - \text{Glc} - \text{Xyl} - \text{Glc} - \text{Gal}$]⁺ 和三级质谱以 m/z 415 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 271, 253, 结合文献^[12] 推测此化合物为知母皂苷 An-F。



Scheme 3 Proposed fragmentation pathways for timosaponin A-III

化合物 10, 11, 12 (t_R : 57.9 ~ 58.3 min, 58.3 ~ 58.6 min, 60.7 ~ 61.3 min) 在负离子模式下, 通过 m/z 791 [$M + Cl$]⁻, 755 [$M - H$]⁻ 离子峰确定其相对分子质量为 756, 结合正离子模式下的数据, 通过二级质谱 m/z 757 [$M + H$]⁺ 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 577 [$M + H - H_2O - \text{Glc}$]⁺, 433 [$M + H - \text{Glc} - \text{Gal}$]⁺ 和三级质谱以 m/z 577 为母离子进行裂解的产物离子峰 m/z 397 [$M + H - 2H_2O - \text{Glc} - \text{Gal}$]⁺, 253, 结合文献^[13-14] 推测化合物 10 ~ 12 为 An⁻ 或 TA⁻ 或 Schidigerasaponin F₂。

化合物 14, 15 (t_R : 64.4 ~ 64.6 min, 67.9 ~ 68.3 min) 在正负离子模式下的准离子峰及产物离子峰无显著差异, 结合文献^[13,15] 推测可能是 TA⁻ 或 TA⁻。通过对照品比较, 推测化合物 14 为 TA⁻, 确定化合物 15 为 TA⁻。

讨论

本实验采用 MCI 柱富集皂苷, 结合 HPLC-ELSD 与 HPLC-MSⁿ 对知母皂苷类成分进行分析和鉴定, 首次结合正、负离子的质谱裂解规律对知母皂苷结构鉴定, 通过负离子质谱提供的 [$M + Cl$]⁻ 与 [$M - H$]⁻ 离子峰来确定化合物的相对分子质量, 同时利用甾体皂苷的正离子裂解规律确定化合物类型, 加强了鉴定甾体皂苷的可靠性。当化合物结构非常相似, 质谱裂解规律相同时, 应用本方法不能准确归属化合物结构, 需要用对照品对照, 如文中的 An⁻ 和 TA⁻ 等化合物。本实验建立了一种适用于紫外吸收弱的中药复杂成分的定性方法, 此方法为此类化学成分的体外、体内的定量分析提供了可靠依据。

参 考 文 献

- [1] 余传隆 (Yu CL), 黄泰康 (Huang TK), 丁志尊 (Ding ZZ), 等. 中药辞海: 第二卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 849 - 852.
- [2] 杨丽蓉 (Yang LR). 知母的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 国外医学: 中医中药分册 [Foreign Med Sci (Chin Med Sec)], 2002, 24 (4): 207 - 209.
- [3] Feng L iang, L ijun L i, Z eper Abliz, et al. Structure characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16 (12): 1 168 - 1 173.
- [4] 马百平 (Ma BP), 董俊兴 (Dong JX), 王秉伋 (Wang BJ), 等. 知母中呋甾皂甙的研究 [J]. 药学学报 (Acta Pharm Sin), 1996, 31 (4): 271 - 277.
- [5] 康利平 (Kang LP), 马百平 (Ma BP), 史天军 (Shi TJ), 等. 知母中的两种新呋甾皂苷 [J]. 药学学报 (Acta Pharm Sin), 2006, 41 (6): 527 - 532.
- [6] 孟志云 (Meng ZY), 徐绥绪 (Xu SX), 孟令宏 (Meng LH). 知母皂甙 E₁ 和 E₂ [J]. 药学学报 (Acta Pharm Sin), 1998, 33 (9): 693 - 696.
- [7] 孟志云 (Meng ZY), 徐绥绪 (Xu SX), 周晓棉 (Zhou XM). 知母中新的呋甾皂苷 [J]. 沈阳药科大学学报 (J Shenyang Pharm Univ), 1998, 15 (4): 254 - 257.
- [8] 张玉晶 (Zhang YJ), 宋少江 (Song SJ), 马志强 (Ma ZQ), 等. 中药知母中的一个新皂苷 [J]. 沈阳药科大学学报 (J Shenyang Pharm Univ), 2008, 25 (4): 278 - 281.
- [9] Zhang JY, Meng ZY, Zhang MY, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood [J]. Clin Chim Acta, 1999, 289 (1-2): 79 - 88.
- [10] Saito S, Nagase S, Ichinose K. New steroidal saponins from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (Liliaceae) [J]. Chem Pharm Bull, 1994, 42 (11): 2 342 - 2 345.
- [11] 孟志云 (Meng ZY), 徐绥绪 (Xu SX). 知母中的皂苷成分 [J]. 中国药物化学杂志 (Chin J Drug Chem), 1998, 8 (2): 135 - 140.
- [12] Ma B, Wang B, Dong J et al. New spirostanol glycosides from *Anemarrhena asphodeloides* [J]. Planta Med, 1997, 63 (4): 376 - 379.
- [13] Kawasaki T, Yamauchi T. Saponins of tino (*Anemarrhena Rhizoma*). II. Structure of tinosaponin A-III [J]. Chem Pharm Bull, 1963, 11 (10): 1 221 - 1 224.
- [14] Niva A, Takeda O, Ishimaru M, et al. Screening test for platelet aggregation inhibitor in natural products. The active principle of *Anemarrhenae Rhizoma* [J]. Yakugaku Zasshi, 1988, 108 (6): 555 - 561.
- [15] 郭冬 (Guo D), 李书 (Li S), 池群 (Chi Q), 等. 知母中一个新皂甙的分离和结构鉴定 [J]. 药学学报 (Acta Pharm Sin), 1991, 26 (8): 619 - 621.

· 校园信息 ·

2009年中国药科大学国家自然科学基金资助项目 (一)

批准号	项 目 名 称	负责人
30973650	甘露糖化壳聚糖介导的抗动脉粥样硬化 DNA 疫苗经黏膜免疫	宗 莉
30973003	慢性前列腺炎 (CP/CPPS) 中 TRPM8 触发并维持神经源性炎症的机理研究	周晓辉
30973649	肿瘤细胞选择性穿膜肽及其复合纳米载体技术的研究	周建平
30901878	基于光化学传感器的非标记高通量药物筛选检测模型的构建	郑 枫
30901377	乳酸菌表达载体的构建及其在黏膜疫苗传递中的应用	赵文锋
30973608	新型抗阿尔茨海默氏病药物的设计、合成和生物活性研究	张奕华
30973638	G004 抗 TXA ₂ 受体介导的血管并发症机制及受体作用模式的研究	张惠斌
30973607	松香烷内酯型大戟二萜类似物的合成及其 K^{B} 激酶抑制活性研究	张大永
30973965	基于活性整合指纹图谱技术的中药复方药效活性物质间的协同作用及机理研究	余伯阳
30973667	胰高血糖素样肽 -1 的分子重构及构效关系研究	姚文兵
20902111	检测 β 内酰胺酶体内体外表达的荧光小分子探针的研究	姚和权
30973610	以天然活性产物冬凌草甲素结构为模板的创新药物分子设计与评价的探索研究	徐进宜

(本刊编辑部)