

基于 UPLC-MS/MS 法研究淫羊藿属植物品种品质与生长海拔、植物类群间关系

秦伟瀚^{1,2}, 阳勇^{1,2*}, 刘翔^{1,3}, 张小梅¹, 赵纪峰^{1,3}, 郭延奎¹

¹重庆市中药研究院; ²重庆市中药药理学评价工程技术研究中心; ³重庆市中药资源学重点实验室, 重庆 400065

摘要:应用 UPLC-MS/MS 法对 10 种淫羊藿属植物主成分含量差异进行比较研究, 以探讨药材品种品质与生长海拔、植物类群间联系。采用 Phenomenex-C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 3 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min; 质谱离子源为 ESI, 多反应监测正离子模式进行检测。淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 分别在 0.995 ~ 9950.000、0.992 ~ 9920.000、1.021 ~ 10210.000、1.035 ~ 10350.000 ng/mL 浓度范围内显示出良好的线性关系 ($r \geq 0.9996$), 平均加样回收率为 98.7% ~ 101.2%, RSD 为 1.7% ~ 2.4%; 结果表明, 不同品种淫羊藿主成分含量差异较大, 且含量有随海拔升高而降低的趋势, 小花类群各成分含量均明显高于大花。本研究证明了品种品质与生长海拔、植物类群间具有相关性; 该方法准确、快速、灵敏度高, 适用于淫羊藿药材的质量控制。

关键词:淫羊藿; UPLC-MS/MS; 海拔高度; 植物类群; 质量分析

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.017

Correlations Between Quality and Species, Altitude, Taxa of *Epimedium* Plants by UPLC-MS/MS

QIN Wei-han^{1,2}, YANG Yong^{1,2*}, LIU Xiang^{1,3}, ZHANG Xiao-mei¹, ZHAO Ji-feng^{1,3}, GUO Yan-lei¹

¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica; ²Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Traditional Chinese Medicine; ³Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource, Chongqing 400065, China

Abstract: In this study, the content of the main components in *Epimedium* was compared by UPLC-MS/MS analysis to explore the correlation between *Epimedium* quality, growth altitude and plant groups. The analysis was performed on a Phenomenex-C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (B) and 0.1% formic acid (A) were used for gradient elution. The flow rate was 0.2 mL/min. The ion source of MS were ESI with multiple reaction monitoring mode. A good linear relationship between icariin, epidemin A, epidemin B and epidemin C were found in the concentration range of 0.995-9950.000, 0.992-9920.000, 1.021-10210.000 and 1.035-10350.000 ng/mL, respectively. The average recovery rate were 98.7%-101.2% and the RSD were 1.7%-2.4%. The result showed that the content of main components were significantly different in different species of *Epimedium*, and the content decreased with the increasing of elevation. The content of each components in small-flowered taxa of *Epimedium* were significantly higher than the small-flowered taxa. This methods were accurate, rapid, highly sensitive and suitable for the qualitative analysis of main component of *Epimedium*.

Key words: *Epimedium*; UPLC-MS/MS; altitude; plant groups; quality analysis

淫羊藿属 (*Epimedium* Linn.) 植物在我国有悠

久的药用历史, 早在汉代的《神农本草经》中就有记载。其味辛甘性温, 归肝肾经。具有补肾壮阳、强健筋骨、祛风除湿之功效。主治阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛等症。目前全世界已知淫羊藿属植物约 55 种, 我国约有 45 种, 是淫羊藿属植物的现代地理分布中心, 主要集中分布于四川、重庆、湖南、贵州等省市, 生长在海拔 650 ~ 3500 m 的林下、

收稿日期: 2016-09-09 接受日期: 2016-11-22

基金项目: 国家重大新药创制重大新药专项 (2013ZX0101108); 重庆市科委前沿与应用基础研究 (cstc2014jcyjA10128); 重庆市科委基本科研业务 (2015cstc-jbky-01902); 重庆市卫生局中医药科技项目 (ZY20132071)

* 通讯作者 Tel: 86-23-89029061; E-mail: yangychem@126.com

沟边灌丛中或山坡阴湿处^[1-7]。重庆是我国淫羊藿主产区之一,也是该药材品种最混乱的地区^[8-13]。本实验样品均为实地采集,并实时记录采集地点的海拔及经纬度,确保数据真实可靠。淫羊藿的主要有效成分为淫羊藿苷类黄酮化合物,其结构为 8 位具异戊烯基的黄酮醇及苷类,近年研究发现,具生理活性的不仅限于淫羊藿苷(Icariin),从化学结构看,朝藿定 A、B、C 分别比淫羊藿苷多一个葡萄糖、木糖、鼠李糖,并且在光、热等外部条件作用下,可向淫羊藿苷部分转化^[14]。现代药理研究显示朝藿定 A、B、C 均具有与淫羊藿的补肾壮阳、抗衰老等功效有关的药理活性^[15]。因此,对淫羊藿药材的质量评价,朝藿定 A、B、C 含量也值得考虑。本文首次运用 UPLC-MS/MS 法同时快速定量检测 10 种淫羊藿属植物中朝藿定 A、B、C 及淫羊藿苷 4 个主要有效成分含量,通过对不同品种淫羊藿主要成分含量进行比较,探讨品种、生长海拔及植物类群与品质之间联系。本实验结果可为淫羊藿属植物药材质量评价、新药组方药材选择、中药药效机理研究、药材种植品种及基地选择提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(日本岛津公司);二元高压泵、自动进样器、柱温箱;API4000 型三重四极杆液

相色谱质谱联用仪(美国 AB 公司);Analyst 1. 6. 2 工作站、MultiQuant 3. 0 数据处理软件;高速中药粉碎机(广东新丰机械公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);101A-1 型数显电热鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品淫羊藿苷(批号 110737-201516,含量以 94.2% 计)、朝藿定 C(批号 111780-201503,含量以 95.5% 计),均由中国食品药品检定研究院提供;朝藿定 A(批号 20141002)、朝藿定 B(批号 20140622)购自宝鸡市辰光生物科技公司,质量分数均大于 98%。乙腈、水(色谱级)德国 Merck 公司,甲酸(色谱级)美国 ACS 公司,乙醇(分析纯)重庆川东化工公司。

1.3 样品采集与预处理

10 个品种淫羊藿药材样品分别采自重庆周边的各个区县,由重庆市中药研究院生药所刘翔副研究员鉴定,凭证标本存放于重庆市中药研究院标本馆(SM)。样品带回实验室后,用纯净水洗净,置烘箱中 60 ℃ 烘干,取干燥叶片于高速粉碎机中粉碎,过 3 号筛备用。根据淫羊藿花开放大小,将花瓣明显短于内轮萼片定为小花类群,花瓣长于内轮萼片定为大花类群^[8,9]。样品采集信息见表 1。

表 1 样品采集信息

Table 1 Sample collection information

编号 No.	植物名 Plant name	采集地点 Collection site	采集时间 Collection time	海拔 Elevation (m)	类群 Plant groups
1	黔北淫羊藿 <i>Epimedium boreali-guizhouense</i> S. Z. He et Y. K. Ying	重庆市酉阳县	2015-08-21	400	小花
2	天平山淫羊藿 <i>Epimedium yrianthum</i> Stearn	重庆市长寿区	2015-03-19	385	小花
3	柔毛淫羊藿 <i>Epimedium pubescens</i> Maxim.	重庆市荣昌区	2015-11-11	344	小花
4	长蕊淫羊藿 <i>Epimedium dolichostemon</i> Stearn	重庆市万州区	2015-04-12	996	小花
5	川鄂淫羊藿 <i>Epimedium fargesii</i> Franch.	重庆市城口县	2015-03-19	1400	小花
6	粗毛淫羊藿 <i>Epimedium acuminatum</i> Franch.	重庆市南川区	2015-03-20	850	大花
7	腺毛淫羊藿 <i>Epimedium glandulosopilosum</i> H. R. Liang	重庆市巫溪县	2015-04-10	1255	大花
8	黔岭淫羊藿 <i>Epimedium leptorrhizum</i> Stearn	重庆市万州区	2015-04-11	1118	大花

编号 No.	植物名 Plant name	采集地点 Collection site	采集时间 Collection time	海拔 Elevation (m)	类群 Plant groups
9	四川淫羊藿 <i>Epimedium sutchuenense</i> Franch.	重庆市巫溪县	2015-04-12	950	大花
10	镇坪淫羊藿 <i>Epimedium ilicifolium</i> Stearn	重庆市巫溪县	2015-04-12	1400	大花

2 实验方法

2.1 色谱分析条件

UPLC 条件: 色谱柱 Phenomenex C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 3 μm); 流动相: A 为甲酸水溶液 (0.1%), B 为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0 ~ 8 min, 40% ~ 53% B; 8 ~ 8.1 min, 40% B; 8.1 ~ 10 min, 40% B。流速: 0.2 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样

量: 2 μL。

2.2 质谱分析条件

MS/MS 质谱条件: 喷雾电压: 5500 V; 雾化气压: 55 Psi; 气帘气压力: 15 Psi; 辅助气压力: 55 Psi; 离子源温度: 600 °C; 检测模式: MRM⁺; 碰撞气: Medium。定量离子对、定性离子对去簇电压 (Declustering potential, DP)、碰撞能量 (Collision energy, CE) 见表 2。

表 2 4 种化合物的主要质谱参数

Table 2 Main mass parameters of four components

化合物 Compound	母离子 Parent ions (m/z)	子离子 Product ions (m/z)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞电压 Collision energy (V)
淫羊藿苷 Icarrin	676.7	531.3*, 369.2	65.9	21.8
朝藿定 A Epimedin A	838.9	531.2*, 677.3	54.1	31.1
朝藿定 B Epimedin B	808.9	531.2*, 677.3	64.8	29.1
朝藿定 C Epimedin C	822.9	531.2*, 677.3	52.9	26.0

注: * 定量离子对。

Note: * Quantitative ion pairs.

2.3 对照品储备液制备

分别取淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对照品适量, 精密称定, 置于同一容量瓶中, 加甲醇适量使溶解, 制成含淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 分别为 0.0995、0.0992、0.1021、0.1035 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.4 供试品溶液制备

取淫羊藿药材粉末约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 40% 乙醇适量, 超声处理 (功率 240 W, 频率 45 kHz) 40 min, 取出, 放冷至室温, 再以

40% 乙醇定容至刻度, 混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围

取“2.3”项下混合对照品储备液适量, 用色谱甲醇逐级稀释为系列不同浓度的混合对照品溶液, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按上述检测条件分别进样 2 μL, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 以进样浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算得到回归方程、相关系数及线性范围, 结果见表 3。

表 3 4 种黄酮类成分的回归方程及参数

Table 3 Liner equations and factors of four flavonoids

对照品 Standard	回归方程 Liner equation	相关系数 r	线性范围 Liner range (ng/mL)
淫羊藿苷 Icarrin	$Y = 12.37437X + 783.65865$	0.9997	0.995 ~ 9950
朝藿定 A Epimedin A	$Y = 8.11183X + 387.48287$	0.9996	0.992 ~ 9920
朝藿定 B Epimedin B	$Y = 21.32889X + 1137.01528$	0.9997	1.021 ~ 10210
朝藿定 C Epimedin C	$Y = 12.99240X + 926.11437$	0.9997	1.035 ~ 10350

2.5.2 精密度实验

精密量取混合对照品溶液(含淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 浓度分别为:497.5、496.0、510.5、517.5 ng/mL),按照上述色谱、质谱条件连续进样 5 次,记录峰面积。计算峰面积 RSD 值,结果淫羊藿苷为 1.24%、朝藿定 A 为 1.06%、朝藿定 B 为 0.71%、朝藿定 C 为 0.57%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性实验

精密称取 1 号药材样品 6 份,按照“2.4”项下方法制备供试品溶液,按照上述色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积,计算 4 种成分的含量。结果显示淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的平均含量分别 0.54%、3.85%、0.49%、1.01%,RSD 分别为 1.47%、2.98%、2.14%、2.22%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性实验

取同一供试品溶液(1 号药材样品),分别于室温下放置 0、2、4、8、12 h,按照上述色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积。结果显示淫羊藿苷、朝藿定 A、朝

藿定 B、朝藿定 C 峰面积的 RSD 分别为 1.22%、1.09%、1.79%、2.01%,表明该方法稳定性良好。

2.5.5 加样回收率实验

取 1 号药材样品 5 份各 0.1 g,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,分别精密加入混合对照品 0.2 mL(含淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 质量浓度分别为:497.5、496.0、510.5、517.5 $\mu\text{g/mL}$),按“2.4”项下制备成供试品溶液,按照上述色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积。计算加样回收率及 RSD 值,淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的回收率分别为 98.9%、99.4%、98.7%、101.2%,RSD 值分别为 2.2%、1.7%、2.4%、2.0%。表明该方法回收率良好。

3 实验结果

精密称取不同产地淫羊藿药材粉末 0.2 g,按照“2.4”项下制备成供试品溶液,分别进样 2 μL 进行测定,记录峰面积并计算样品中淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的含量,结果见表 4,4 种化合物的 MRM⁺ 质谱图见图 1。

表 4 含量测定结果

Table 4 Content determination results

编号 No.	淫羊藿苷 Icarrin (%)	朝藿定 A Epimedin A (%)	朝藿定 B Epimedin B (%)	朝藿定 C Epimedin C (%)	总含量 Total content (%)
1	0.54	3.85	0.49	1.01	5.89
2	0.36	1.42	0.33	1.49	3.60
3	0.53	1.37	0.89	0.77	3.56
4	0.19	0.56	0.36	1.31	2.42
5	0.16	1.24	0.60	1.11	3.11
6	0.13	0.47	0.29	0.87	1.76
7	-	-	-	-	-
8	-	0.01	-	0.02	0.03
9	-	0.01	-	0.01	0.02
10	-	0.01	0.01	0.03	0.05

4 讨论

4.1 不同种属淫羊藿药材中主要成分的含量差异

根据 2015 版药典淫羊藿含量测定项下规定:淫羊藿苷含量不低于 0.50%,总黄酮不低于 5.0%。由含测结果可知,以淫羊藿苷评价仅黔北、柔毛淫羊藿均达到要求,分别为 0.54%、0.53%,4 个黄酮主成分总含量以黔北淫羊藿含量最高,天平山与柔毛

在总量上相差不大。在上述 10 个种中仅有柔毛淫羊藿被药典收录,从样品含测结果来看,黔北、天平山与柔毛各成分含量差异并不大,是否可以将其作为药典的替代品种,将进行进一步研究。腺毛、黔岭、四川、镇坪淫羊藿的淫羊藿苷均未检出,且总含量低。此类品种药用价值相对较低,但仍具有一定观赏性,可以作为观赏植物进一步开发利用。

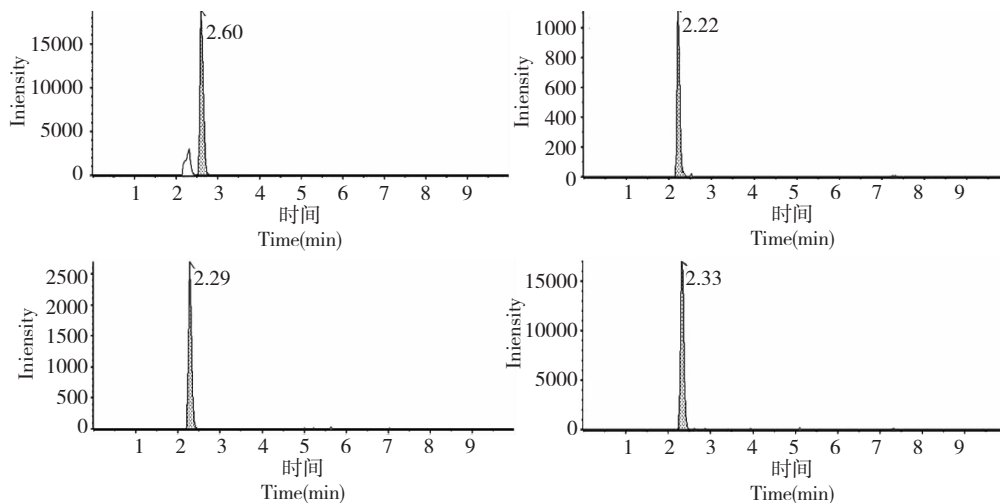


图1 4种化合物 MRM 质谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of four compounds

4.2 不同海拔生长淫羊藿药材中主要成分的含量差异

本文将海拔高度分为 300 ~ 500 m、500 ~ 1000 m、1000 ~ 1500 m 三段, 10 个品种淫羊藿样品均采集自重庆市各区县, 由于生长在同一区域, 土壤、气候等环境因素差异不会太大, 以使不同生长海拔淫羊藿主成分含量更具可比性, 将每段海拔相对应样品中各成分含量及总含量分别进行平均后拟合成折线图(图 2), 由图可知, 包括淫羊藿苷在内的主成分及总含量都有随海拔高度增加而逐渐降低的趋势, 能否就此推论淫羊藿药用价值更高的品种应该生长在低海拔地区, 有待更深入研究。

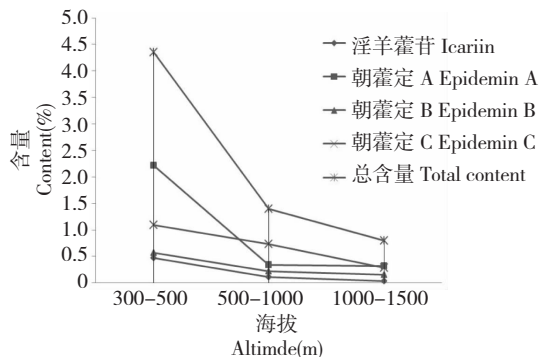


图2 不同海拔下淫羊藿药材中主要成分的含量

Fig. 2 The contents of the 4 main components in *Epimedium* from different elevations

4.3 不同类群淫羊藿药材中主要成分的含量差异

由采集信息表可知, 柔毛、天平山、黔北、川鄂、长蕊淫羊藿均属于小花类群, 其余 5 种为大花, 将小

花和大花类群的各主要成分含量平均值及总含量平均值($n=3$)拟合成柱形图(图 3), 由图可知, 小花类群主成分及总含量都明显高于大花, 是否可以将小花类群作为良种选育的优先选择, 还有待于进一步研究。

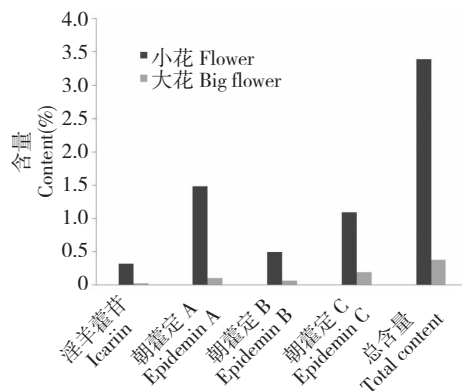


图3 不同类群淫羊藿药材中主要成分的含量

Fig. 3 The contents of the 4 main components in *Epimedium* from plant groups

5 结论

本研究建立了 UPLC-ESI-MS /MS 同时测定淫羊藿药材中淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 4 种活性成分的定量分析方法, 通过对比不同品种淫羊藿上述 4 种主要成分含量差异, 从而探讨了海拔高度、植物类群、品种与淫羊藿品质之间的联系。该方法简单、快速、准确, 为综合评价淫羊藿药材质量, 确保用药安全及良种选育等提供科学参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 327-328.
 - 2 Yuan H(袁航), Cao SP(曹树萍), Chen SY(陈抒云), et al. Research progress on chemical constituents and quality control of *Epimedii folium*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 24: 3630-3640.
 - 3 Li Q(李倩), Li X(李晓), Wei Y(魏悦), et al. Extraction of total flavonoid from Herba Epimedii Maxim using alkali solution. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1141-1144.
 - 4 Zang J(臧洁), Li BR(李宝茹), Wu T(吴涛), et al. Effects of icariin on swimming endurance time and biochemical parameters after exhaustion of mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1277-1280.
 - 5 Fan ZL(范曾丽), Quan QM(权秋梅). Research advances in the pharmacological effects of Herba Epimed II. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40: 9264-9266.
 - 6 Menga FH, Lia YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. *Phytomedicine*, 2005, 12: 189-193.
 - 7 Han H(韩惠), Shan Q(单淇), Zhou FJ(周福军), et al. Research progress in metabolites of active constituents from *Epimedii Herba*. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2013, 1: 78-82.
 - 8 He SZ(何顺志), Xu WF(徐文芬), Guo BL(郭宝林). Study on species and geographic distribution of small-flowered taxa of *Evimedium* L. in China. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2005, 40: 1217-1220.
 - 9 Xu WF(徐文芬), He SZ(何顺志). Study on species and geographic distribution of big-flowered taxa of *Evimedium* L. in China. *Chin Med Mat* (中药材), 2005, 28: 267-271.
 - 10 Stearn WT. The genus *Epimedium* and other herbaceous berberidaceae including the genus podophyllum. *Royal Botanic Gardens Kew*, 2002: 49.
 - 11 Lin MX(林茂祥), Liu ZY(刘正宇), Zhang J(张军), et al. Distribution and community characteristics of *Epimedium myrianthum* in Chongqing. *Chin Med Mat* (中药材), 2015, 9: 1825-1830.
 - 12 He SZ(何顺志), Xu WF(徐文芬), Wang YY(王悦云), et al. Study on germplasm resources of the medicinal plant of *Epimedium*. *Guizhou Sci* (贵州科学), 2012, 1: 9-14.
 - 13 Ran MX(冉懋雄), Wei DS(魏德生), Wang XC(王晓春), et al. Investigation of resource of Herba Epimedii in Guizhou. *Chin Med J Res Prac* (现代中药研究与实践), 2004, 18(1): 29-32.
 - 14 Guo BL(郭宝林), Wang CL(王春兰), Chen JM(陈建民), et al. Determination of 9 flavonoids in 5 species of *Epimedium* recorded in Chinese Pharmacopoeia. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1996, 31(4): 292.
 - 15 Zhang XY, Li YJ, Yang XD, et al. Inhibitory effect of *Epimedium* extract on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and bi-methylation. *Life Sci*, 2005, 78: 180.
-
- (上接第 277 页)
- 10 Li CQ(李昌勤), Wang JM(王金梅), Kang WY(康文艺). Determination of effective time of *Schizonepeta tenuifolia* pieces by classical constant temperature acceleration experiment. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 21: 3173-3175.
 - 11 Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, 2015. Vol I, 151.
 - 12 Hu XJ(扈晓佳), Yin S(殷莎), Yuan TT(袁婷婷), et al. Chemical constituents and pharmacological activities of *Carthamus tinctorius* L. *J Pharm Prac* (药学实践杂志), 2013, 3: 161-168.
 - 13 Tu YH, Xue YR, Guo DD, et al. Carthami flos: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications. *Rev Bras Farmacogn*, 2015, 25: 553-566.
 - 14 Yang XH(杨小虎), Wang DD(王丹丹), Zhu Y(朱彦). Recent research progress on hydroxysafflor yellow A. *J TCM Univ Hunan* (湖南中医药大学学报), 2013, 3: 102-106.