

淫羊藿中化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析

甘井山, 马 艳, 王宗艳, 刘秀书, 刘 莹
天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

摘要: 目的 建立淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 中化学成分的超高压液相色谱 - 飞行时间质谱 (UPLC/Q-TOF-MS) 的分析方法。方法 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈, 梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温为 45 °C; 进样量为 2 μL。质谱检测采用正、负离子模式, 电压分别为 3.0、2.5 kV; 离子源温度 110 °C; 雾化温度 400 °C; 雾化气体积流量 800 L/h。结果 在 10 min 内完成淫羊藿中 40 个化学成分的鉴定。结论 建立了一种简单、快速、高效的 UPLC/Q-TOF-MS 方法对淫羊藿中化学成分进行了鉴定, 为全面控制淫羊藿的质量和机理研究提供了基础。

关键词: 淫羊藿; 超高压液相色谱 - 飞行时间质谱; 淫羊藿苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2014)04 - 0349 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.04.005

Analysis on chemical constituents in *Epimedium Herba* by UPLC/Q-TOF-MS

GAN Jing-shan, MA Yan, WANG Zong-yan, LIU Xiu-shu, LIU Ying
Second Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: Objective To establish a method for the analysis on the chemical constituents in *Epimedium Herba* by UPLC/Q-TOF-MS. **Methods** The method was performed on Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), and the mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile with gradient elution program. The injection volume was 2 μL at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was 45 °C. Both positive and negative modes were selected for qualitative analysis. The capillary voltages were set at 3.0 and 2.5 kV. The ion source temperature and atomization temperature were 110 and 400 °C. The flow rate of nebulization gas was 800 L/h. **Results** The main peaks were separated clearly and respectively in 10 min, and 40 compounds were identified. **Conclusion** The established method for the determination of the chemical constituents in *E. brevicornu* using UPLC/Q-TOF-MS is simple, rapid, and reliable, and paves a way for the quality control and further study of *Epimedium Herba*.

Key words: *Epimedium Herba*; UPLC/Q-TOF-MS; icariin

淫羊藿 *Epimedium Herba* 为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、巫山淫羊藿 *E. wushanense* Ying 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的地上部分。全球的淫羊藿属植物有 50 余种, 主要分布在亚洲、中东和欧洲的温带和亚热带地区。我国有 40 多种, 主产于陕西、辽宁、山西、四川等地, 占全球总量一半以上^[1-2]。淫羊藿是我国传统的补益中药, 辛、甘、温, 归肝、肾经, 具有温肾壮阳、强筋骨、祛风湿的功效, 用于治疗肾阳虚阳痿、不孕、尿频, 肝肾不足所致筋骨痹痛、风湿拘挛麻木等证^[3-4]。淫羊藿中含有多种生物活

性的化学成分, 主要为黄酮类化合物、木脂素、酚酸、生物碱、挥发油等^[5]。据文献报道, 淫羊藿中分离得到了 130 多种化合物, 其中大多数为黄酮类化合物。因此, 对于黄酮类化合物的测定也是控制淫羊藿质量的重要指标^[6-7]。近年来, 因酚酸、挥发油等成分也具有较弱的生物活性, 对其研究也越来越深入^[8-10]。UPLC/Q-TOF-MS 联用技术是有效研究中药复杂体系中化学成分分析和鉴定的工具^[11], 其分析周期短、灵敏度高, 可在获得化合物的准确分子质量碎片信息的基础上, 对被测成分进行快速分析鉴别。本研究建立了淫羊藿中化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 的分析方法, 为全面控制淫羊藿的质量和机制研究提供基础。

收稿日期: 2014-01-22

作者简介: 甘井山 (1978—), 男, 河北唐山市人, 主管药师, 研究方向为药物合理应用。Tel: 13752074334 E-mail: 535266007@qq.com

1 仪器与试剂

美国 Waters Acquity 超高效液相色谱仪, 包括二元超高压溶剂系统、自动进样器、柱温箱, Q-TOF Premier 质谱仪包括电喷雾离子源 (ESI) 和 MassLynx V4.1 工作站 (美国 Waters 公司), Xevo G2 Q-TOF 电喷雾离子源 - 四极杆 - 时间飞行串联质谱仪。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司)、甲酸 (色谱纯, 美国 Acros 公司), 超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。

淫羊藿药材购于广州致信中药饮片有限公司, 产地为江西, 经天津中医药大学第二附属医院刘宗昌副主任药师鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取淫羊藿药材 10 g, 60%乙醇 200 mL 超声提取 2 次, 每次 30 min, 合并提取液, 50 °C 旋蒸浓缩至稠膏状, 干燥成粉末。精密称取上述粉末 50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~2 min, 2%B; 2~5 min, 5%~60%B; 5~8 min, 60%~45%B; 8~9 min, 45%~85%B; 9~10 min, 85%~95%B; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温为 45 °C; 进样量为 2 μL。

2.3 质谱条件

采用正、负离子模式; 毛细管电压分别为 3.0、2.5 kV; 锥孔电压分别为 45、30 V; 离子源和脱溶剂气温度分别为 110、400 °C; 脱溶剂氮气和锥孔气体积流量分别为 800、50 L/h; 采样频率为 0.1 s, 间隔 0.02 s; 相对分子质量记录范围为 50~1 800, 采用亮氨酸 - 脑啡肽 ($[M+H]^+ = 556.277$ 1, $[M-H]^- = 554.261$ 5) 对其进行实时校正。数据采集模式采用 MSE 模式, 碰撞能量分别采用 20、30、40、50 eV。

2.4 成分的鉴定

从淫羊藿的 UPLC/Q-TOF-MS 图 (图 1) 看出, 化合物的性质不同, 部分在正、负离子模式下均有较高的响应, 也有部分化合物只在某一种离子模式下有响应, 因此, 对供试品进行正、负两种离子模式测定很必要。飞行时间质谱测得的精确相对分子质量, 应用 MassLynx 质谱分析软件计算可能的分子组成 (误差 < δ 5), 并结合各个成分峰的二级质

谱碎片信息和淫羊藿化合物的文献报道^[8-9], 对色谱峰进行分析, 鉴定了其中的 40 个成分, 见表 1。

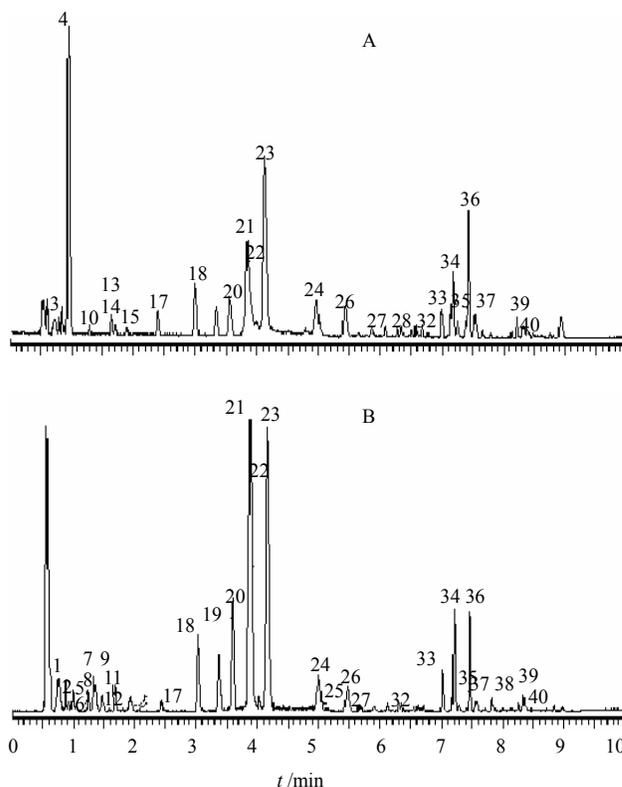


图 1 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下淫羊藿的 UPLC/Q-TOF-MS 图

Fig. 1 UPLC/Q-TOF-MS chromatogram of *Epimedium Herba* under positive ion (A) and negative ion (B) mode

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备

实验考察了超声提取和加热回流提取方法对化合物提取效率的影响, 结果表明超声提取法的操作简便, 效率较高, 色谱图化合物峰信息量较大, 并且加热回流会导致部分热不稳定的化合物分解。实验还考察了不同提取溶剂 (水、甲醇、乙醇、70% 甲醇、70% 乙醇、50% 乙醇) 对提取效率的影响, 结果表明 70% 乙醇提取效率最高。

3.2 色谱条件

实验对流动相体系中乙腈、甲醇、不同体积分数甲酸、乙酸溶液的不同配比进行考察, 结果表明 0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈更适宜成分分析。甲酸为挥发性酸, 可直接用于质谱分析, 同时可实现液质联用。

3.3 质谱条件

实验对毛细管电压、离子源温度、脱溶剂气温度和流量等参数进行优化。实验采用 MSE 数据采集处理模式, 实现了一次进样分析, 得到丰富完整的离子

表 1 淫羊藿色谱峰鉴定结果

Table 1 Identification of chromatographic peak of *Epimedii Herba*

编号	t_R /min	离子	MS (m/z)	MS ² 碎片(m/z)	分子式	鉴定化合物
1	0.85	[M-H] ⁻	397.127 9	397、259、191、85	C ₂₂ H ₂₂ O ₇	宝藿素
2	0.88	[M-H] ⁻	479.083 7	479、337、191、119、93	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	异杨梅树皮苷
3	0.94	[M-H] ⁻	577.156 5	431、285、191、97	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	山柰苷
4	0.98	[M+H] ⁺	342.171 0	297、282、265、237、58	C ₂₀ H ₂₃ O ₄ N	木兰碱
5	1.01	[M-H] ⁻	337.091 7	191、173、163、119、93	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	3- <i>O-p</i> -coumaroylquinic acid
6	1.06	[M-H] ⁻	463.0882	463、301	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷
7	1.23	[M-H] ⁻	677.208 9	677、530、369、177、89	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	hexandraside E
8	1.32	[M-H] ⁻	677.208 8	677、515、353、261、219	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	大花淫羊藿苷 B
9	1.35	[M-H] ⁻	447.092 2	447、267	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	三叶豆苷
10	1.37	[M+H] ⁺	825.282 7	513、367	C ₃₈ H ₄₈ O ₂₀	二叶淫羊藿苷 B
11	1.49	[M-H] ⁻	447.092 4	447、301	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷
12	1.59	[M-H] ⁻	807.272 9	513、367	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	二叶淫羊藿苷 A
13	1.69	[M-H] ⁻	661.213 0	661、515、514、395、353	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅	淫羊藿属苷 A
14	1.74	[M-H] ⁻	691.224 2	529、409、367、367、 366、351	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₆	anhydroicaritin-3,7-di- <i>O</i> -glucoside
15	1.81	[M-H] ⁻	837.281 3	675、513、367	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	hexandraside F
16	1.89	[M+H] ⁺	433.114 1	287、147、179、85	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	kaempfern-3- <i>O-α</i> -rhamnoside
17	2.44	[M-H] ⁻	465.2120	465、285、241、119、 113、89	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	[4-(β- <i>D</i> -glucopyranosyloxy)-2,6-bis(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl](hydroxy)acetic acid
18	3.05	[M-H] ⁻	837.281 9	675、367	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	朝藿定 A
19	3.47	[M-H] ⁻	818.286 1	818、675、656、529、367	C ₃₉ H ₄₉ NO ₁₈	3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydro-1-tetracycl,3,6-trideoxy-3-[[4-ethoxy-4-(β- <i>D</i> -glucopyranuronosyloxy)butyl]amino}- <i>L</i> -xylo-hexopyranoside
20	3.60	[M-H] ⁻	807.270 5	675、367	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	朝藿定 B
21	3.88	[M-H] ⁻	821.286 8	659、367	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	朝藿定 C
22	4.03	[M-H] ⁻	821.286 8	659、587、367	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	宝藿苷 VI
23	4.17	[M-H] ⁻	721.236 3	529、513、409、367	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₇	淫羊藿苷
24	5.01	[M+H] ⁺	819.269 1	819、657、529、367、289	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	anhydroicaritin-3- <i>O</i> -rhamnoside(1-2)-furan acid-7- <i>O</i> -glucoside
25	5.10	[M-H] ⁻	907.288 3	907、745、515、353、233	C ₄₂ H ₅₂ O ₂₂	demethylcaritin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetyl)-glucosyl-(1-3)- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -acetyl)-rhamnoside-7- <i>O</i> -glucoside
26	5.47	[M-H] ⁻	717.238 7	529、513、409、367	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₆	箭藿苷 C
27	6.28	[M-H] ⁻	515.155 6	515、353、325、309、 297、219	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	淫羊藿苷 C
28	6.38	[M-H] ⁻	529.170 7	529、459、383、312、 97、269	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	宝藿苷 C
29	6.51	[M-H] ⁻	631.203 2	631、481、352、353	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₄	淫羊藿苷 F
30	6.71	[M-H] ⁻	963.315 3	801、759、367	C ₄₅ H ₅₆ O ₂₃	淫羊藿定 L
31	6.72	[M-H] ⁻	499.160 0	499、353、352	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	淫羊藿次苷 A

续表 1

编号	t_R /min	离子	MS (m/z)	MS ² 碎片 (m/z)	分子式	鉴定化合物
32	6.81	[M-H] ⁻	529.170 3	367、352	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	淫羊藿苷 I
33	7.02	[M-H] ⁻	675.228 6	675、495、367	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	宝藿苷 VII
34	7.18	[M-H] ⁻	645.217 7	645、367、366	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄	箭藿苷 B
35	7.22	[M+H] ⁺	659.234 7	659、367、366、	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₄	2"-O-Rhamnosylkariside II
36	7.47	[M-H] ⁻	513.175 4	513、377、366、351、323	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	宝藿苷 I
37	7.57	[M+H] ⁺	369.132 9	369、313、243、135	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	去水淫羊藿黄素
38	7.94	[M-H] ⁻	337.107 3	337、309、265、197、91	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	淫羊藿 D
39	8.66	[M-H] ⁻	421.164 8	397、279、277	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	淫羊藿 B
40	8.69	[M-H] ⁻	419.148 9	283、197、91	C ₂₅ H ₂₄ O ₆	淫羊藿 A

碎片信息,包括母离子、子离子和中性丢失扫描的结果,以上工作都只需要一次进样即可完成,大大提高了分析效率和信息量。MSE 采集模式下需要不同的碰撞能量来适应不同类型化合物碎裂的需要。

本研究采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术快速分析鉴别了淫羊藿中的 45 种化学成分。采用 UPLC,在 10 min 内即可完成淫羊藿的指纹图谱和定性分析。与 HPLC 相比,UPLC 的分离效果和分析效率也具有较大幅度的提高,其将在中药成分分析中得到广泛应用。本研究未采用任何对照品,即对淫羊藿的成分进行了鉴定,也充分体现 Q-TOF-MS 技术在复杂体系中未知化合物鉴定工作中的应用优势。本研究对淫羊藿的化学成分进行了系统鉴定,为淫羊藿药材及制剂的质量控制和进一步的深入研究提供了良好的基础。

参考文献

- [1] 李晶,宋敏,罗晓,等.淫羊藿应用研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(8):514-516.
- [2] 李书桐,李铁军,郑钦岳,等.淫羊藿甙对小鼠体外脾脏细胞增殖及产生集落刺激因子样活性的影响[J].第二军医大学学报,1995,16(4):340-342.
- [3] 谢娟平,孙文基.淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J].海峡药学,2006,18(5):17-20.
- [4] 杨丽,朱晓峰,王攀攀,等.淫羊藿水提取物对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化的影响及其机制[J].中草药,2013,44(22):3182-3187.
- [5] Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, et al. Osteoblastic

proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3): 189-193.

- [6] Ma A, Qi S, Xu D, et al. Baohuoside-1, a novel immunosuppressive molecule, inhibits lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Transplantation*, 2004, 78(6): 831-838.
- [7] Liu T Z, Chen C Y, Yiin S J, et al. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by Epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(2): 227-235.
- [8] Clifford M N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7): 1033-1043.
- [9] Clifford M N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden [J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79(3): 362-372.
- [10] Tapiero H, Tew K D, Ba G N, et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2002, 56(4): 200-207.
- [11] Zhu W X, Yang J Z, Wei W, et al. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1207(1/2): 29-37.