

基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析淫羊藿炮制前后黄酮组分的变化规律

李明雨¹, 孙 娥^{1,2*}, 徐凤娟², 徐金娣², 贾晓斌^{1,3*}

1. 南京中医药大学第三临床医学院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

3. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘要: 目的 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术建立淫羊藿炮制前后指纹图谱, 对其全成分进行分析并找出标志性化学成分, 以明确淫羊藿炮制前后黄酮组分的变化规律。方法 采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术, 在正离子模式下采集淫羊藿生品及炮制品样品数据, 并在此基础上根据正交-偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 整体探究 9 个不同产地、批次的淫羊藿炮制前后化学成分的差异。结果 从淫羊藿生品及炮制品中寻找并鉴定出 9 个标志性化学成分, 即 8-乙烯-山柰酚、淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、淫羊藿素-3-O-葡萄糖苷、异戊醇基箭藿苷 B、1,3-异戊二烯基朝藿定 C、1,3-异戊二烯基-箭藿苷 B-7-O-葡萄糖醛酸、3-O-(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(间二乙酰氧基)葡萄糖-淫羊藿苷及其同分异构体。结论 淫羊藿炮制后黄酮组分结构发生变化, 次级糖苷增加, 多级糖苷减少, 淫羊藿黄酮组分总体向低糖苷组分转化, 进一步阐明了淫羊藿加热炮制后黄酮组分的变化规律。

关键词: 淫羊藿; 朝鲜淫羊藿; 加热炮制; 黄酮; 组分结构; UPLC-Q/TOF-MS; 正交-偏最小二乘判别分析; 8-乙烯-山柰酚; 淫羊藿素; 淫羊藿次苷 I; 淫羊藿素-3-O-葡萄糖苷; 异戊醇基箭藿苷 B; 1,3-异戊二烯基朝藿定 C

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2900-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.007

Analysis changes of *Epimedium Folium*'s flavonoids before and after processing based on UPLC-Q/TOF-MS

LI Ming-yu¹, SUN E^{1,2*}, XU Feng-juan², XU Jin-di², JIA Xiao-bin^{1,3}

1. School of Third Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective Based on UPLC-Q/TOF-MS technology, the fingerprint of *Epimedium koreanum* before and after processing was established to analyze the whole composition and find out the iconic chemical composition to clarify the change rule of flavonoids.

Methods The data of *E. koreanum* raw and processed products were collected in positive ion mode using UPLC-Q/TOF-MS technology, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) method was used to explore the differences in chemical composition of *E. koreanum* before and after processing in nine different origins and batches. **Results** Nine iconic chemical constituents from *E. koreanum* raw and processed products were found and identified, including 8-ethylene-kaempferol, icaritin, icariin I, icartin-3-O-glucoside, isoamyl alcohol sagittatoside B, 1,3-prenyl epimedin C, 1,3-prenyl-sagittatoside B-7-O-glucuronic acid, 3-O-((4-acetoxy) rhamnose-2-O-(m-2acetoxy) glucose) icariin and its isomers. **Conclusion** The structures of *E. koreanum*'s flavonoids changed after the processing, the secondary glycosides of flavonoids increased, the polyglycosides decreased, and the flavonoids were generally converted to low glycoside components, which further clarified the change rule of *E. koreanum*'s flavonoids after processing.

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503253); 国家自然科学基金资助项目 (81274088); 国家自然科学基金资助项目 (30973944); 国家自然科学基金资助项目 (30572372); 江苏省青年医学重点人才项目 (QNRC2016635)

作者简介: 李明雨 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂与炮制。Tel: (025)52362109 E-mail: limingyu_f@163.com

***通信作者** 孙 娥, 副研究员, 研究方向为中药炮制与制剂。Tel: (025)52362109 E-mail: sune0825@163.com

贾晓斌, 教授, 研究方向为中药制剂与炮制。Tel: (025)86185239 E-mail: jiaxiaobin2015@163.com

Key words: *Epimedii Folium*; *Epimedium koreanum* Nakai; heat processing; flavonoids; structural composition of multi-components; UPLC-Q/TOF-MS; OPLS-DA; 8-ethylene-kaempferol; icaritin; icariin I; icartin-3-*O*-glucoside; isoamyl alcohol sagittatoside B; 1,3-prenyl epimedin C

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* Maxim、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用，常用于肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨萎软、风湿麻痹、麻木拘挛等病症^[1]。淫羊藿炮制方法出自《雷公炮制论》，临床研究发现淫羊藿炮制前后功效迥异，生品侧重于祛风湿而炙品侧重于补肾阳。为阐明其原理，结合现代分析手段对淫羊藿炮制后化学成分的改变有较多相关研究，张琴等^[2]通过测定总黄酮及淫羊藿苷的含量考察淫羊藿炮制前后的成分变化，本课题组^[3]在前期研究中以朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含量变化评价淫羊藿炮制后总黄酮的变化规律。不难发现之前的研究多以 1 个或几个活性成分作为研究对象，但这并不能代表炙淫羊藿物质基础的整体变化规律。

“组分结构理论”强调整体出发，借“结构”概括中药物质基础的特性，“结构”指组成整体的各要素（组分、成分）的搭配和安排^[4]，即成分/组分的改变会引起整体“结构”的改变，从而发挥不同的作用。中药炮制前后其药性、作用往往会发生或大或小的改变，那么中药炮制过程也可以看做是组分结构或者组分配伍发生变化的过程^[5]。故本实验基于 UPLC-Q-TOF-MS 对淫羊藿炮制前后的黄酮组分进行分析，并在此基础上采用正交偏最小二乘判别分析法（OPLS-DA）整体探究淫羊藿黄酮组分炮制前后的变化规律，以期进一步科学阐明淫羊藿加热炮制后物质基础的整体变化规律。

1 仪器与材料

ACQUITY UPLC 高分辨液质联用系统（UPLC-Q/TOF-MS），配有电喷雾电离源（ESI），Masslynx V 4.1 工作站（美国 Thermo Fisher 公司）；Mass FragmentTM 数据处理系统和数据分析软件 MetaboLynx（美国 Waters 公司）；METTLER AB135-S 型电子天平（梅特勒托利多仪器有限公司）；KQ-100B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q 纯水系统（美国 Millipore 公司）；电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9070A 型（上海精宏实

验设备有限公司）。

淫羊藿饮片，来自重庆、山西和东北地区，共 9 个批次（分别购自太行山药材行，批号 080706；亳州市场，批号 080603、080816；吉林敖东力源药业有限公司，批号 080815；亳州市京皖中药饮片厂，批号 081101；药都集团茗都中药饮片有限公司，批号 080201；安徽滕王药业，批号 080501；亳州市千草药业饮片厂，批号 080709、081012，均经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭宝林教授鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai）；羊脂油（淡味羊脂，安徽牧洋油脂有限公司，批号 S130402）；甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备

取淫羊藿饮片分为 2 份，1 份经粉碎后过三号筛（50 目），作为生品待用；1 份加入羊脂油（每 100 克淫羊藿饮片加入 20 g 羊脂油），放入电热恒温鼓风干燥箱中 170 ℃烘烤 7 min，粉碎后过三号筛，作为炮制品待用。分别取生品、炮制品粉末约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇 20 mL，称定质量后超声处理 1 h，再称定质量，并用稀乙醇补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2 淫羊藿炮制前后黄酮成分分析

2.2.1 质谱条件^[6] 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温 35 ℃，样品室温度 10 ℃；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0~0.5 min，5% B；0.5~6.0 min，5%~15% B；6.0~12.0 min，15%~25% B；12.0~22.0 min，25% B；22.0~25.0 min，25%~35% B；25.0~28.0 min，35%~45% B；28.0~33.0 min，45%~55%；33.0~34.0 min，55%~95% B；34.0~35.0 min，95% B；35.0~35.2 min，95%~5% B；35.2~36.0 min，5% B；进样体积 2 μL。

质谱系统 Synapt Q-TOF MS，电离方式 ESI⁺，毛细管电压 2.5 kV，低能量扫描时传输碰撞能量为 25 eV，高能量扫描时传输碰撞能量为 40 eV，采样锥孔电压 40 V，提取锥孔电压 4 V，源温度 100 ℃，去溶剂化气流温度 450 ℃，锥孔气流 50 L/h，去溶剂化

气流量 800 L/h, 质谱检测质量范围 m/z 100~1 500。

2.2.2 淫羊藿炮制前后黄酮成分析 采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术, 在正离子模式下, 对淫羊藿生品 (太行山药材行, 批号 080706) 和炮制品的总离子流色谱图 (图 1) 进行分析, 标出 40 个共有峰, 对其进行了指认。

淫羊藿黄酮类成分在 ESI-MS 裂解过程中容易发生脱糖基、脱水、脱甲基, 故可将糖基及苷元离子作为鉴别该类化合物的特征离子。化合物 **14** ($t_R=16.56$ min) 在正离子模式下准分子离子峰 m/z 839.299 0 $[M+H]^+$, 同时失去 1 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖形成基峰离子 m/z 531.187 6 $[M+H-162-146]^+$, 离子 m/z 531.187 6 再失去 1 分子葡萄糖和异戊烯基产生基峰离子 m/z 369.134 2 $[M+H-162-146-132]^+$, 并结合文献报道^[8], 确定该化合物为朝藿定 A, 化合物 **15~17** 具有相同的二级碎片离子, 故根据准分子离子峰的不同判断化合物 **15** 为朝藿定 B、**16** 为朝藿定 C、**17** 为淫羊藿苷。化合物 **20** 准分子离子峰 m/z 837.282 0 $[M+H]^+$, 化合物 **21** 准分子离子峰 m/z 821.282 0 $[M+H]^+$, 分别比朝藿定 A 及朝藿定 C 少 2 且二级碎片离子峰相同, 故通过对比文献报道^[9], 确定化合物 **20** 为 1,3-异戊二烯基朝藿定 A、**21** 为 1,3-异戊二烯基朝藿定 C。化合物 **39** 准分子离子峰 m/z 825.256 5 $[M+H]^+$, 比朝藿定 B 多 16, 结合文献报道^[8]确定为异戊烯醇基朝藿定 B。

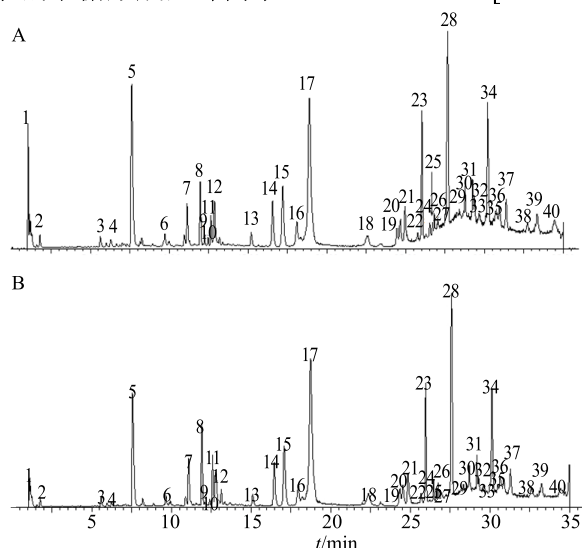


图 1 淫羊藿生品 (A)、炮制品 (B) 总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram between raw (A) and processed *Epimedium Folium* (B)

化合物 **34** 准分子离子峰 m/z 515.192 0 $[M+H]^+$, 比淫羊藿苷少 162 且二级碎片离子峰相同, 比对文献数据^[8], 推断化合物 **34** 为淫羊藿苷脱去 1 分子葡萄糖得到的淫羊藿次苷 II (宝藿苷 I), 化合物 **32** ($t_R=29.36$ min) 准分子离子峰 m/z 661.249 6 $[M+H]^+$, 比淫羊藿次苷 II 多 146 (鼠李糖残基), 结合文献报道^[8]推断为鼠李糖基淫羊藿次苷 II, 并根据化合物 **33** ($t_R=29.70$ min) 的准分子离子峰 m/z 677.241 7 $[M+H]^+$ 比化合物 **32** 多 16, 推测化合物 **33** 为异戊烯醇基鼠李糖基淫羊藿次苷 II。

化合物 **30** ($t_R=28.77$ min) 在正离子模式下准分子离子峰 m/z 677.243 8 $[M+H]^+$, 二级质谱以母离子失去 1 分子葡萄糖残基 (m/z 162) 和 1 分子鼠李糖残基 (m/z 146) 产生 m/z 369.133 1 $[M+H-162-146]^+$ 的碎片离子, 该碎片离子再断键得到 m/z 313.070 4 $[M+H-162-146-132]^+$ 的碎片离子, 通过文献报道^[8], 推断化合物 **30** 为箭藿苷 A, 化合物 **31** 具有相同的二级碎片离子, 故根据准分子离子峰的不同判断为箭藿苷 B, 化合物 **12** ($t_R=12.89$ min) 一级正离子给出 m/z 663.229 6 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 二级质谱 m/z 355.118 2 $[M+H]^+$, m/z 299.055 1 $[M+H]^+$, 均比箭藿苷 A 少 14, 结合文献报道^[8], 推断为去甲基箭藿苷 A, 化合物 **36** 准分子离子峰 m/z 675.229 4 $[M+H]^+$, 比箭藿苷 A 少 2 且二级碎片离子峰相同, 通过对比文献报道^[8]确定化合物 **36** 为 1,3-异戊二烯基箭藿苷 A。

化合物 **11** ($t_R=12.63$) 一级正离子给出 m/z 905.680 6 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 二级质谱以母离子失去 1 分子水 (m/z 18) 产生 m/z 905.680 6 $[M+H]^+$ 的碎片离子, 该碎片离子再断键得到 m/z 453.343 8 $[M+H-18-162-146]^+$ 和 m/z 239.105 7 $[M+H-18-162-146-132]^+$ 的碎片离子。

将质谱信息和文献信息^[7-9]进行比对, 共解析出 32 个化合物, 结果见表 1, 除槲皮素外其余化合物均有 3 位和/或 7 位的糖基取代。根据质谱裂解规律, 淫羊藿黄酮上的糖基极易脱去变为次级糖苷, 同时 8 位异戊烯基易发生双键的断裂、加成反应且末位甲基及 C 环 4'位甲基易被羟基取代发生羟基化反应。

2.3 淫羊藿炮制前后黄酮组分变化规律研究

2.3.1 色谱方法^[6] 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温 35 $^{\circ}$ C, 样品

表 1 淫羊藿生品、炮制品中的化学成分

Table 1 Chemical constituents in raw and processed *Epimedium Folium*

峰号	t_R/min	[M+H] ⁺ (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子	文献
		实测值	理论值					
1	1.04	194.940 8	—	—	—	unknown		
2	1.79	276.144 5	—	—	—	unknown		
3	5.62	163.039 4	—	—	—	unknown		
4	6.30	194.061 2	—	—	—	unknown		
5	7.61	342.170 7	—	—	—	unknown		
6	9.73	303.051 0	303.243 6	0.19	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素	285.040 2 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 229.050 4 [M+H-H ₂ O-2CO] ⁺ , 153.019 7 [M+H-H ₂ O-2CO-C ₆ H ₄] ⁺	7
7	11.13	679.512 5	679.642 5	0.13	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	hexandraside E	515.259 8 [M+H-Glu] ⁺	8
8	11.96	792.595 8	—	—	—	unknown		
9	12.26	825.281 4	825.783 7	0.50	C ₃₈ H ₄₈ O ₂₀	氢化朝藿定 C	517.171 3 [M+H-Rha-Glu] ⁺ , 355.118 7 [M+H-2Rha-Glu-CH ₂ -2H] ⁺	8
10	12.46	795.271 8	795.757 7	0.49	C ₃₇ H ₄₆ O ₁₉	淫羊藿新苷 E	517.170 8 [M+H-Rha-Xyl] ⁺ , 355.118 0 [M+H-Rha-Xyl-Glu] ⁺	7
11	12.63	905.680 6	905.825 3	0.14	C ₄₂ H ₄₈ O ₂₂	3-甲基-3-丁烯-1-炔-山柰酚-3-O-((4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(3-乙酰氧基)葡萄糖)-7-O-葡萄糖苷	887.668 2 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 453.343 8 [M+H-H ₂ O-Rha-Glu-2OAc] ⁺ , 239.105 7 [M+H-H ₂ O-Rha-2Glu-2OAc-C ₄ H ₄] ⁺	9
12	12.89	663.229 6	663.643 1	0.41	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅	去甲基箭藿苷 A	355.118 2 [M+H-Rha-Glu] ⁺ , 299.055 1 [M+H-Rha-Glu-C ₄ H ₈] ⁺ , 285.055 1 [M+H-Rha-Glu-C ₄ H ₈ -CH ₃] ⁺	8
13	15.22	501.175 0	501.502 5	0.33	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	淫羊藿素-7-O-木糖苷	369.135 9 [M+H-Xyl] ⁺	7
14	16.56	839.299 0	839.810 2	0.51	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	朝藿定 A	531.187 6 [M+H-Rha-Glu] ⁺ , 369.134 2 [M+H-Rha-2Glu] ⁺ , 313.071 2 [M+H-Rha-2Glu-C ₄ H ₈] ⁺	9
15	17.21	809.287 8	809.784 3	0.50	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	朝藿定 B	531.187 4 [M+H-Rha-Xyl] ⁺ , 369.134 0 [M+H-Rha-Xyl-Glu] ⁺ , 313.071 1 [M+H-Rha-Xyl-Glu-C ₄ H ₈] ⁺	9
16	18.12	823.303 8	823.810 8	0.50	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	朝藿定 C	531.187 1 [M+H-2Rha] ⁺ , 369.133 9 [M+H-2Rha-Glu] ⁺ , 313.070 7 [M+H-2Rha-Glu-C ₄ H ₈] ⁺	9
17	18.89	677.244 9	677.669 6	0.42	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	淫羊藿苷	531.187 3 [M+H-Rha] ⁺ , 369.133 6 [M+H-Rha-Glu] ⁺ , 313.070 7 [M+H-Rha-Glu-C ₄ H ₈] ⁺	8
18	22.54	821.287 5	821.751 9	0.46	C ₃₈ H ₄₄ O ₂₀	1,3-异戊二烯基箭藿苷 B-7-O-葡萄糖醛酸	369.133 3 [M+H-Rha-Xyl-GluA+2H] ⁺	8
19	24.44	881.308 3	881.846 9	0.54	C ₄₁ H ₅₂ O ₂₁	朝藿苷丙	719.253 4 [M+H-Glu] ⁺ , 531.186 8 [M+H-Rha-Glu-OAc] ⁺ , 369.133 4 [M+H-Rha-2Glu-OAc] ⁺ , 313.071 1 [M+H-Rha-2Glu-OAc-C ₄ H ₈] ⁺	8
20	24.67	837.282 0	837.794 4	0.51	C ₃₉ H ₄₈ O ₂₀	1,3-异戊二烯基朝藿定 A	531.186 7 [M+H-Rha-Glu+2H] ⁺ , 369.133 6 [M+H-Rha-2Glu+2H] ⁺ , 313.070 8 [M+H-Rha-2Glu-C ₄ H ₈ +2H] ⁺	9
21	24.97	821.287 8	821.795 0	0.51	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	1,3-异戊二烯基朝藿定 C	531.188 4 [M+H-2Rha+2H] ⁺ , 369.134 3 [M+H-2Rha-Glu+2H] ⁺ , 313.071 3 [M+H-2Rha-Glu-C ₄ H ₈ +2H] ⁺	9
22	25.75	803.276 3	803.779 7	0.50	C ₃₉ H ₄₆ O ₁₈	3-O-(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(间二乙酰氧基)葡萄糖-淫羊藿苷或其同分异构体	369.133 0 [M+H-Rha-Glu-3OAc] ⁺ , 313.070 3 [M+H-Rha-Glu-3OAc-C ₄ H ₈] ⁺	8

续表 1

峰号	t_R/min	$[M+H]^+(m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子	文献
		实测值	理论值					
23	26.02	923.319 8	923.883 6	0.57	$C_{43}H_{54}O_{22}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)鼠李糖-2- <i>O</i> -(2-乙酰氧基)葡萄糖]-7- <i>O</i> -葡萄糖苷或其同分异构体	$531.187\ 5\ [M+H-Rha-Glu-2OAc]^+$, $369.134\ 4\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc]^+$, $313.071\ 1\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc-C_4H_8]^+$	8
24	26.55	923.317 7	923.883 6	0.57	$C_{43}H_{54}O_{22}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)鼠李糖-2- <i>O</i> -(2-乙酰氧基)葡萄糖]-7- <i>O</i> -葡萄糖苷或其同分异构体	$531.187\ 5\ [M+H-Rha-Glu-2OAc]^+$, $369.134\ 4\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc]^+$, $313.071\ 1\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc-C_4H_8]^+$	8
25	26.74	923.316 7	923.883 6	0.57	$C_{43}H_{54}O_{22}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)鼠李糖-2- <i>O</i> -(2-乙酰氧基)葡萄糖]-7- <i>O</i> -葡萄糖苷或其同分异构体	$531.187\ 5\ [M+H-Rha-Glu-2OAc]^+$, $369.134\ 4\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc]^+$, $313.071\ 1\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc-C_4H_8]^+$	8
26	26.84	923.318 1	923.883 6	0.57	$C_{43}H_{54}O_{22}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)鼠李糖-2- <i>O</i> -(2-乙酰氧基)葡萄糖]-7- <i>O</i> -葡萄糖苷或其同分异构体	$531.187\ 5\ [M+H-Rha-Glu-2OAc]^+$, $369.134\ 4\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc]^+$, $313.071\ 1\ [M+H-Rha-2Glu-2OAc-C_4H_8]^+$	8
27	27.07	747.248 6	747.716 4	0.48	$C_{36}H_{42}O_{17}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)木糖-7- <i>O</i> -(3-乙酰氧基)葡萄糖苷	$369.133\ 6\ [M+H-Xyl-2Glu-2OAc]^+$, $313.070\ 0\ [M+H-Xyl-2Glu-2OAc-C_4H_8]^+$	8
28	27.68	965.329 5	965.920 3	0.59	$C_{45}H_{56}O_{23}$	朝藿苷 A/朝藿苷 B	$803.270\ 8\ [M+H-Glu]^+$, $531.187\ 0\ [M+H-Glu-Rha-3OAc]^+$, $369.133\ 8\ [M+H-2Glu-Rha-3OAc]^+$, $313.070\ 7\ [M+H-2Glu-Rha-3OAc-C_4H_8]^+$	8
29	28.40	965.328 4	965.920 3	0.59	$C_{45}H_{56}O_{23}$	朝藿苷 A/朝藿苷 B	$803.270\ 8\ [M+H-Glu]^+$, $531.187\ 0\ [M+H-Glu-Rha-3OAc]^+$, $369.133\ 8\ [M+H-2Glu-Rha-3OAc]^+$, $313.070\ 7\ [M+H-2Glu-Rha-3OAc-C_4H_8]^+$	8
30	28.77	677.243 8	677.669 6	0.42	$C_{33}H_{40}O_{15}$	箭藿苷 A	$369.133\ 1\ [M+H-Rha-Xyl]^+$, $313.070\ 4\ [M+H-Rha-Xyl-C_4H_8]^+$	8
31	29.24	647.233 3	647.643 7	0.41	$C_{32}H_{38}O_{14}$	箭藿苷 B	$369.133\ 6\ [M+H-Rha-Xyl]^+$, $313.071\ 0\ [M+H-Rha-Xyl-C_4H_8]^+$	8
32	29.36	661.249 6	661.670 2	0.42	$C_{33}H_{40}O_{14}$	鼠李糖基淫羊藿次苷 II	$369.133\ 2\ [M+H-Rha]^+$, $313.070\ 6\ [M+H-Rha-C_4H_8]^+$	8
33	29.70	677.241 7	677.669 6	0.43	$C_{33}H_{40}O_{15}$	异戊烯醇基鼠李糖基淫羊藿次苷 II	$369.133\ 0\ [M+H-Rha-O]^+$, $313.070\ 6\ [M+H-Rha-O-C_4H_8]^+$	8
34	30.20	515.192 0	515.529 0	0.34	$C_{27}H_{30}O_{10}$	宝藿苷 I	$369.134\ 0\ [M+H-Rha]^+$, $313.071\ 4\ [M+H-Rha-C_4H_8]^+$	8
35	30.70	659.232 5	659.654 4	0.42	$C_{33}H_{38}O_{14}$	淫羊藿素-3- <i>O</i> -呋喃鼠李糖苷	$513.371\ 9\ [M+H-Rha]^+$, $369.132\ 5\ [M+H-Rha-furan\ acid]^+$, $313.070\ 4\ [M+H-Rha-furan\ acid-C_4H_8]^+$	8
36	30.97	675.229 4	675.653 8	0.42	$C_{33}H_{38}O_{15}$	1,3-异戊二烯基箭藿苷 A	$369.133\ 0\ [M+H-Rha-Glu+2H]^+$, $313.070\ 4\ [M+H-Rha-Glu+2H-C_4H_8]^+$	8
37	31.39	761.265 4	761.743 0	0.48	$C_{37}H_{44}O_{17}$	3- <i>O</i> -[(4-乙酰氧基)鼠李糖-2- <i>O</i> -(4-乙酰氧基)葡萄糖]淫羊藿苷	$369.132\ 9\ [M+H-Glu-Rha-2OAc]^+$, $313.070\ 2\ [M+H-Glu-Rha-2OAc-C_4H_8]^+$	8
38	32.75	803.276 1	—	—	—	unknown		
39	33.36	825.256 5	825.783 7	0.53	$C_{38}H_{49}O_{20}$	异戊烯醇基朝藿定 B	$369.132\ 6\ [M+H-Rha-Xyl-Glu-O]^+$, $313.069\ 9\ [M+H-Rha-Xyl-Glu-O-C_4H_8]^+$	9
40	34.47	282.279 5	—	—	—	unknown		

unknown-未鉴定出; —未提供

unknown-not certified; —not supported

室温度 10 ℃；流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱：0~1 min，5% B；1~10 min，5%~95% B；10~12 min，95% B；12~13 min，95%~5% B；13~15 min，5% B；进样体积 2 μ L，体积流量 0.4 mL/min。质谱条件与“2.2.1”项相同，样品为 9 个批次淫羊藿的生品及炮制品。

2.3.2 数据处理、分析 采用 Waters 公司 Markerlynx V4.1 软件进行色谱峰自动识别以及峰匹配，数据导入后进行主成分分析 (PCA)，并在此基础上采用 OPLS-DA 对不同组间的数据进行模式识别，通过 Scores Plot 图观察淫羊藿生品和炮制品的分布情况，通过 S-plot 图初步筛选差异代谢产物，使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析，对各差异成分相对峰面积进行 t 检验，进一步确定造成显著性差异的黄酮成分。

2.3.3 淫羊藿生品和炮制品 UPLC-QTOF/MS 模式识别 正离子模式下的总离子流色谱图 (TIC) 如图 2 所示，A 为淫羊藿生品的 TIC，B 为淫羊藿炮制品的 TIC。从图中可以看出，两者的图谱基本一致。采用 Waters 公司 Markerlynx V4.1 软件对色谱峰进行自动识别以及峰匹配，将数据导入后进行 PCA 并采用 OPLS-DA 对不同组间的数据进行模式识别，结果见图 3、4。

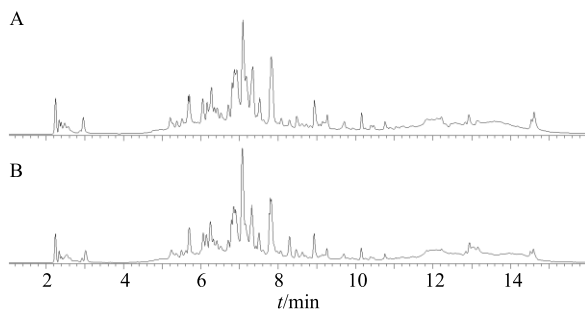


图 2 淫羊藿生品 (A) 和炮制品 (B) 的 TIC 色谱
Fig. 2 Total ion chromatogram between raw (A) and processed *Epimedium Folium* (B)

由图 3 可以看到生品组和炮制品组分为 2 簇，图 4-A 可以看出淫羊藿生品和炮制品分别聚为 2 类，表明生品和炮制品所含化学成分存在较大差异，图 4-B 中正轴方向代表淫羊藿生品，负轴代表淫羊藿炮制品，依据 VIP 值勾选出差异性化学成分，同时进一步对差异性化学成分的平均峰面积进行 t 检验，确定了 11 个显著性差异的标志物，并鉴定了其中 9 个 (表 2 和图 5)，其中标志物 1、2、3，标志

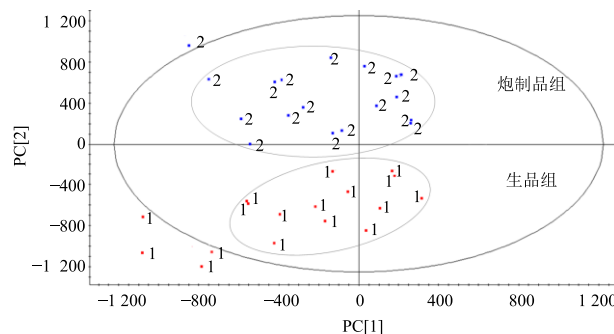


图 3 淫羊藿生品与炮制品的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plot of raw and processed *Epimedium Folium*

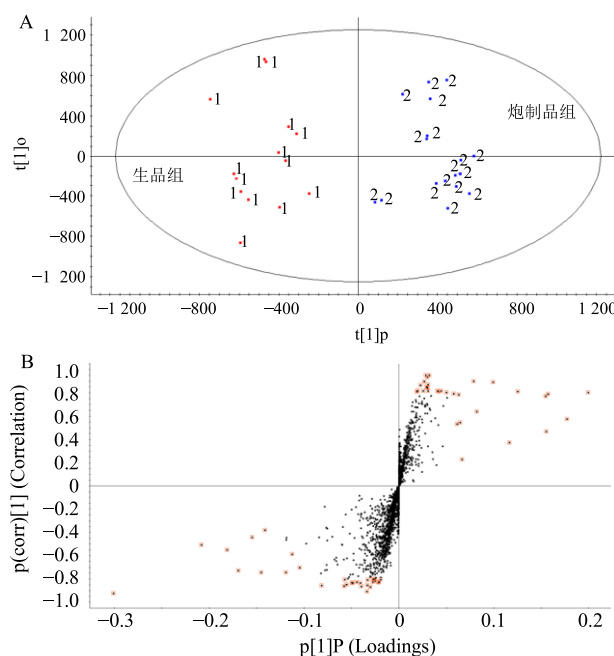


图 4 淫羊藿生品与炮制品的 OPLS-DA (A-Score plot; B-S-plot)

Fig. 4 OPLS-DA analysis of raw and processed *Epimedium Folium* (A-Score plot; B-S-plot)

物 5、6，以及标志物 8、9 互为同分异构体。

3 讨论

本实验通过建立 UPLC-Q/TOF-MS 方法，对淫羊藿生品和炮制品进行了分析，共标出 40 个化合物，结合文献解析出 32 个黄酮类成分；并在此基础上挑选不同产地、不同批次共 9 份淫羊藿饮片分别对其进行炮制，采用 OPLS-DA 对生品组和炮制品组间数据进行模式识别，得到 Scores Plot 图和 S-plot 图，Scores Plot 直观显示淫羊藿生品和炮制品分别聚为 2 类，说明生品和炮制品的组分结构存在着较大差异。经 S-plot 图及 t 检验进一步确定了 11 个显

表 2 淫羊藿生品与炮制品差异标志物的相对峰面积比较

Table 2 Comparison of relative peak areas of differential markers between raw and processed *Epimedii Folium*

峰号	t_R/min	$[M+H]^+(m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物名称	碎片离子	平均峰面积		文献
		实测值	理论值					生品组	炮制品组	
1	7.26	313.071 1	313.281 5	0.21	$C_{17}H_{12}O_6$	8-乙烯-山柰酚	$285.130\ 9\ [M+H-C_2H_4]^+$	3 605.100	7 862.700 $\uparrow$	7
2	9.28	313.071 5	313.281 5	0.21	$C_{17}H_{12}O_6$	—		13.978	338.610 $\uparrow$	
3	6.08	313.071 3	313.281 5	0.21	$C_{17}H_{12}O_6$	—		35 727.900	53 963.300 $\uparrow$	
4	9.26	369.133 0	369.387 8	0.25	$C_{21}H_{20}O_6$	淫羊藿素	$313.069\ 9\ [M+H-C_4H_8]^+$	594.960	3 219.700 $\uparrow$	7
5	7.28	531.186 2	531.528 4	0.34	$C_{27}H_{30}O_{11}$	淫羊藿次苷 I/淫羊藿素-3-O-葡萄糖苷	$369.133\ 7\ [M+H-Glu]^+$, $313.071\ 0\ [M+H-Glu-C_4H_8]^+$	875.603	13 665.600 $\uparrow$	7
6	7.61	531.186 1	531.528 4	0.34	$C_{27}H_{30}O_{11}$	淫羊藿次苷 I/淫羊藿素-3-O-葡萄糖苷	$369.133\ 7\ [M+H-Glu]^+$, $313.071\ 0\ [M+H-Glu-C_4H_8]^+$	1 880.220	9 788.390 $\uparrow$	7
7	9.28	663.203 4	663.643 1	0.44	$C_{32}H_{38}O_{15}$	异戊醇基箭藿苷 B	$369.133\ 6\ [M+H-Rha-Xyl-O]^+$, $313.071\ 0\ [M+H-Rha-Xyl-O-C_4H_8]^+$	0.000	298.839 $\uparrow$	8
8	7.28	803.275 9	803.779 7	0.50	$C_{39}H_{46}O_{18}$	3-O-(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(间二乙酰氧基)葡萄糖-淫羊藿苷或其同分异构体	$369.133\ 0\ [M+H-Rha-Glu-3OAc]^+$, $313.070\ 3\ [M+H-Rha-Glu-3OAc-C_4H_8]^+$	2 095.200	23 367.100 $\uparrow$	8
9	6.87	803.275 5	803.779 7	0.50	$C_{39}H_{46}O_{18}$	3-O-(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(间二乙酰氧基)葡萄糖-淫羊藿苷或其同分异构体	$369.133\ 0\ [M+H-Rha-Glu-3OAc]^+$, $313.070\ 3\ [M+H-Rha-Glu-3OAc-C_4H_8]^+$	1 900.350	14 539.900 $\uparrow$	8
10	6.17	821.286 1	821.795 0	0.51	$C_{39}H_{48}O_{19}$	1,3-异戊二烯基朝藿定 C	$531.188\ 4\ [M+H-2Rha+2H]^+$, $369.134\ 3\ [M+H-2Rha-Glu+2H]^+$, $313.071\ 3\ [M+H-2Rha-Glu-C_4H_8+2H]^+$	90 292.600	56 691.600 $\downarrow$	9
11	5.90	821.286 0	821.751 9	0.46	$C_{38}H_{44}O_{20}$	1,3-异戊二烯基-箭藿苷 B-7-O-葡萄糖醛酸	$531.187\ 0\ [M+H-Rha-Xyl-CH_2+2H]^+$, $369.133\ 3\ [M+H-Rha-Xyl-CH_2+2H-Glu]^+$	34 293.600	19 722.500 $\downarrow$	8

“ $\uparrow$ ”代表与生品比较含量升高;“ $\downarrow$ ”代表与生品比较含量降低。

“ $\uparrow$ ” Increased content compared to raw products; “ $\downarrow$ ” Reduced content compared to raw products

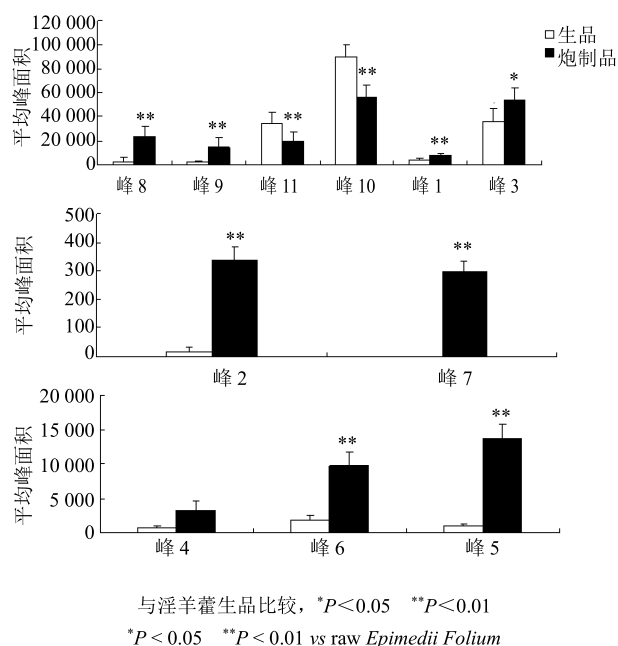


图 5 差异标志物在朝鲜淫羊藿生品、炮制品中的相对峰面积比较

Fig. 5 Comparison of relative peak areas of differential markers in raw and processed *Epimedii Folium*

著性变化的化成成分并鉴定出其中 9 个,分别为 8-乙烯-山柰酚、淫羊藿素、淫羊藿次苷 I、淫羊藿素-3-O-葡萄糖苷、异戊醇基箭藿苷 B、1,3-异戊二烯基朝藿定 C、1,3-异戊二烯基-箭藿苷 B-7-O-葡萄糖醛酸、3-O-(4-乙酰氧基)鼠李糖-2-O-(间二乙酰氧基)葡萄糖-淫羊藿苷及其同分异构体其中异戊醇基箭藿苷 B 只在炮制品中出现,同时 1,3-异戊二烯基朝藿定 C 和 1,3-异戊二烯基-箭藿苷 B-7-O-葡萄糖醛酸呈现出下降趋势,其余成分呈上升趋势,即次级糖苷增加,多级糖苷减少。

这与课题组前期研究结果相一致^[10],在炮制的“加热”过程中会使淫羊藿中的多级糖苷向次级糖苷转化,并且对淫羊藿生品及炮制品体内吸收代谢的研究表明,次级糖苷的吸收则高于多糖苷的吸收,在炮制过程中“加热”可以使淫羊藿主要活性黄酮的含量发生变化,产生更多易于吸收的生物活性黄酮,易于吸收的黄酮成分的增加可转化为血药浓度的增加进而表现为生物利用度的提高^[11],证明在炮制“加热”过程中会造成淫羊藿黄酮组分结构改变,通过诱导

多级糖苷向低级糖苷的转化进而增强其药效。

对于淫羊藿炮制后物质基础的变化规律, 本实验主要是对黄酮组分进行了分析, 未来还需要在中药物质基础“组分结构理论”指导下, 探究淫羊藿炮制前后其他组分如多糖组分等的改变以及明确各组分间的配比关系, 为进一步阐明炙淫羊藿炮制机理提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张 琴, 欧阳林旗, 杨 磊, 等. 不同炮制方法对黔淫羊藿化学成分及产品质量的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(1): 52-56.
- [3] 金晓勇, 贾晓斌, 孙 娥, 等. 炙淫羊藿炮制过程中 5 种黄酮类成分变化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2738-2742.
- [4] 贾晓斌. 基于整体观中药物质基础认识与创新中药研发 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(9): 1430-1434.
- [5] 秦昆明, 曹 岗, 杨 冰, 等. 基于组分结构理论的中药炮制现代研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(2): 35-45.
- [6] 徐凤娟. 基于代谢组学的炙淫羊藿炮制机理研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2014.
- [7] 孟 宁, 孔 凯, 李师翁. 淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 1063-1073.
- [8] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌, 等. 淫羊藿炮制前后 UPLC-PDA-MS 的指纹图谱研究 [J]. 化学学报, 2012, 70(5): 635-642.
- [9] 马文娟, 姚广哲, 贾 琪, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分 [J]. 中药材, 2019(7): 1554-1559.
- [10] 钱 浅. 基于中药黄酮药动学的炙淫羊藿炮制机理研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2012.
- [11] 孙 娥, 韦英杰, 张振海, 等. 基于黄酮成分吸收代谢的炙淫羊藿炮制机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 383-390.