

偏斜淫羊藿化学成分研究

廖思红^{1,2}, 陈建军¹, 王 瑛^{1*}

(1. 中国科学院植物种植创新与特色农业重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 采用 70% 乙醇超声波辅助提取偏斜淫羊藿 (*Epimedium truncatum* H. R. Liang) 叶片中的类黄酮化学成分, 利用 LC-MS 联用技术鉴定其化合物组成, 利用 HPLC 方法测定其主要活性成分的含量并与药典规定药材箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 主要活性成分的含量进行比较。结果从偏斜淫羊藿叶片中鉴定出 6 个化合物: 朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、3, 5, 7-三羟基 4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃鼠李糖苷、槲皮素-3-O-鼠李糖甙、山奈苷。该 6 个化合物均为首次在该植物中发现。偏斜淫羊藿富含朝藿定 C, 其含量显著高于箭叶淫羊藿主要活性成分的总含量。结果表明 LC-MS 可以简单、快速地对淫羊藿化学成分进行定性和定量分析, 偏斜淫羊藿富含朝藿定 C, 具有潜在的药用价值。

关键词: 偏斜淫羊藿; 类黄酮; 超声提取; LC-MS

中图分类号: Q946.8; Q949.746.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)04-0385-06

Chemical Constituents of *Epimedium truncatum*

LIAO Si-Hong^{1,2}, CHEN Jian-Jun¹, WANG Ying^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Flavonoids of *Epimedium truncatum* were extracted by ultrasonic assisted extraction with 70% ethanol. The extract was analyzed by capillary liquid chromatography-mass spectrometry, and the main active compounds were determined by HPLC and compared with that of *Epimedium sagittatum*. Six constituents, including epimedin B, epimedin C, icariin, quercetin-3-O-rhamnoside, kaempferin and 3, 5, 7-Trihydroxyl-4'-methoxyl-8-prenylflavone-3-O- α -L-rhamno-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside, were isolated and identified from leaves of *E. truncatum* for the first time. Leaves of *E. truncatum* contained high levels of epimedin C, which exceeded that of *E. sagittatum* significantly. Results showed that LC-MS was a quick and easy method for compound analysis of herba epimedii. *E. truncatum* is a good plant resource for epimedin C and worth further exploration.

Key words: *Epimedium truncatum*; Flavonoid; Ultrasonic assisted extraction; LC-MS

淫羊藿为小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 (*Epimedium* L.) 植物, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用, 主要用于阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛和更年期高血压等症, 具有重要的药用价值。《中国药典》收录的淫羊藿有 5 种, 即巫山淫羊藿 (*Epimedium wushanense* T. S. Ying)、

箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum* (Sieb. & Zucc.) Maxim.)、朝鲜淫羊藿 (*Epimedium koreanum* Nakai)、柔毛淫羊藿 (*Epimedium pubescens* Maxim.) 和淫羊藿 (*Epimedium brevicornu* Maxim.)^[1]。长期以来, 淫羊藿药材几乎全部依赖于野生植物资源, 随着淫羊藿中药材的市场

收稿日期: 2013-01-09, 修回日期: 2013-04-22。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900076); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-20); 中国科学院国家外国专家局“创新团队国际合作伙伴计划”。

作者简介: 廖思红 (1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物代谢组学研究 (E-mail: sihongliao@gmail.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: yingwang@wbgcas.cn)。

需求量与日俱增,野生资源正受到严重破坏,蕴藏量急剧下降。为了在保护野生资源的同时又能满足市场用药需求,必须对淫羊藿药材进行深入的研究,例如建立淫羊藿规范化栽培和保护抚育基地,并规模化示范推广,这对于保证无公害药材质量、保护野生淫羊藿资源与可持续利用有着重要意义。另外在药源调查方面,除《中国药典》收藏的5种淫羊藿外,对淫羊藿属植物中分布广、具有高活性成分含量,以及有潜在药用价值的物种应加大研究力度^[2]。目前野生朝鲜淫羊藿资源已经濒临枯竭,巫山淫羊藿分布范围较窄,市场上收购淫羊藿药材以心叶淫羊藿(*Epimedium elachyphyllum* Stearn)和箭叶淫羊藿为主,因此寻找一些可替代的、野生资源蕴藏量高、分布相对广泛的候选淫羊藿物种十分必要。据《中国植物志》记载,偏斜淫羊藿(*Epimedium truncatum* H. R. Liang)主要产于湖南,在海拔600~1000 m的范围内均有广泛分布^[3]。尽管偏斜淫羊藿未被记入药典,但民间偏方很早就将其入药^[4],偏斜淫羊藿活性成分的研究对于是否可以将其作为替代药材非常关键,而目前关于偏斜淫羊藿的化学成分的研究甚少。根据文献报道^[5],绝大多数淫羊藿物种以朝藿定A(Epimedin A)、朝藿定B(Epimedin B)、朝藿定C(Epimedin C)和淫羊藿苷(Icariin)这4种成分含量最为丰富,它们是具有8-异戊烯基的黄酮醇活性物质,有学者建议将这4种成分作为评价淫羊藿属药材质量的标准之一^[5-7]。本研究选取采自湖南省保靖县的偏斜淫羊藿为研究对象,用超声波辅助提取方法提取叶片中的醇溶性化学成分,并对其进行LC-MS分析,旨在鉴定其中的主要化合物,通过与药典收录的主要淫羊藿物种的比较,分析主要活性成分含量,探讨其作为《中国药典》记载的5种淫羊藿之外的替代物种的可能性。

1 实验材料

1.1 实验仪器

电子天平(METTLER TOLEDO AG204, 瑞士),超声仪(DS-7510 DTH, 美国),真空抽滤器(中国),高效液相色谱仪(Agilent 1100, 美国),质谱仪(Thermo TSQ quantum Access Max, 美国)。

1.2 化学试剂

冰乙酸(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、高效液相色谱甲醇(色谱纯)均购自中国国药集团,乙腈购自美国Tedia公司。朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷标准品均购自Chroma Dex公司(Chroma Dex Inc, USA),纯度为98%。流动相于0.45 μm 醋酸纤维素滤膜抽滤超声脱气后使用。

1.3 植物材料

偏斜淫羊藿(*Epimedium truncatum* H. R. Liang)于2009年采自湖南保靖县清水坪镇。箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* (Sieb. & Zucc.) Maxim.)于2005年采自湖南怀化罗旧镇。所采植物样本均由中国科学院武汉植物园李建强研究员和张燕君博士鉴定。将两个品种栽培于武汉植物园资源过渡圃,2011年4月中旬采集当年生三出复叶的中间小叶,于样品袋中硅胶干燥。

2 实验方法

2.1 样品制备

分别取两种淫羊藿干燥叶片加液氮研磨,过40目筛,精确称取50.0 mg干燥粉末,加5 mL 70%乙醇,震荡混匀,40℃超声提取30 min。冷却至室温,补足至原来的体积,震荡混匀。用5 mL注射器和0.22 μm 有机滤膜针头过滤。取1 mL滤液于2 mL液相色谱样品瓶中备用,样品分析前于4℃保存。

2.2 色谱条件

Agilent 1100 高效液相色谱仪,色谱柱为Agilent TC-C18, (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), Agilent C18 保护柱(4.6 mm $\times$ 7.5 mm, 5 μm),检测波长:272 nm。流动相为1%乙酸水(A)和乙腈(C),流速1.0/min;柱温25℃;进样量5 μL 。梯度洗脱0~5 min C为25%,5~10 min C为28%,10~15 min C为33%,15~20 min C为35%,20~25 min C为40%,25~30 min C为25%。

2.3 质谱条件

Thermo TSQ quantum Access Max 质谱仪, m/z 扫描范围150~1200 amu;喷雾电压3000 eV;溶剂汽化温度250℃;毛细管温度350℃;鞘气压

力 40 psi; 辅助气压力 10 psi 压力; 离子化方式 ESI(电喷雾电离源); 离子模式 ESI(+).

2.4 偏斜淫羊藿和箭叶淫羊藿主要活性成分含量测定

2.4.1 标准曲线制作

分别精确称量朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷标准品各 1.8、1.7、5.5、4.7 mg, 用色谱甲醇溶解, 稀释成 7 个浓度梯度。线性关系如下:

朝藿定 A: $\text{Area} = 7.0786 \times \text{Amt} + 4.6858$, $R^2 = 0.99954$;

朝藿定 B: $\text{Area} = 8.3276 \times \text{Amt} - 1.9018$, $R^2 = 0.99933$;

朝藿定 C: $\text{Area} = 78.0899 \times \text{Amt} - 20.5469$, $R^2 = 0.99957$;

淫羊藿苷: $\text{Area} = 11.5410 \times \text{Amt} + 61.8619$, $R^2 = 0.99936$ 。

式中 Area 是峰面积, Amt 是浓度。

2.4.2 分析方法评价

精确度实验: 对已知浓度样品连续进样 6 次, 计算色谱图峰面积的相对标准偏差 RSD。

稳定性实验: 对已知浓度的某样品, 每隔 2 h 进样 1 次, 计算色谱图峰面积的相对标准偏差 RSD。

加样回收率: 取已知浓度样品, 分别加入高中低 3 个浓度的标准品, 计算加入的标准品的回收率以及相对标准偏差 RSD。

2.4.3 样品主要活性成分含量测定

取制备好的样品溶液, 按 2.2 所述色谱方法进行分析。

3 结果与分析

3.1 偏斜淫羊藿化学成分

通过查阅文献和天然产物数据库收集淫羊藿中所有化合物的分子质量、分子结构和波谱学信息。LC-MS 一级质谱能给出类黄酮化合物的总离子流图(图 1), 从而找到化合物的准分子离子峰, 这样通过化合物的相对分子质量可以缩小鉴定化合物的范围。通过 LC-MS/MS 对目标母离子进行二级质谱分析, 对照信息库鉴定出了偏斜淫羊藿中的 6 个

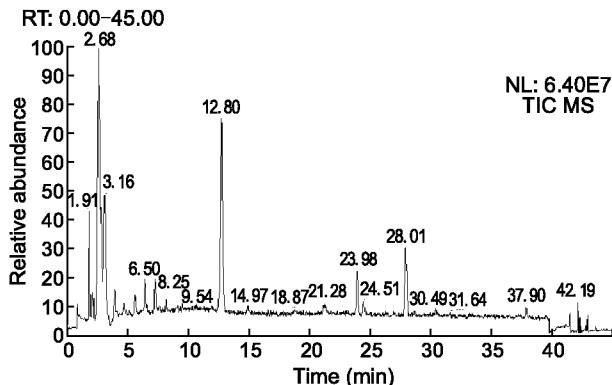


图 1 偏斜淫羊藿叶片提取物的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of *Epimedium truncatum* leaf extract

化合物, 该 6 个化合物均为首次在偏斜淫羊藿中发现。

化合物 1: 保留时间 6.50 min 时的一级质谱图给出 449.32 m/z ($M+H$), 二级质谱图分别给出产物离子峰 m/z 302.38 ($M-Rha+H$) 和 m/z 286.68 [$M-(Rha+O)+H$] (图 2: Compound 1)。一级质谱和二级质谱信息与槲皮素-3-*O*-鼠李糖甙 (Quercetin-3-*O*-rhamnoside) 基本一致^[8], 并且符合槲皮素-3-*O*-鼠李糖甙裂解规律。由此可以鉴定 m/z 449.07 为 Quercetin-3-*O*-rhamnoside 的准分子离子峰。

化合物 2: 保留时间 7.33 min 时的一级质谱图给出 809.88 m/z ($M+H$), 二级质谱图分别给出产物离子峰 m/z 676.32 ($M-Xyl+H$)、 m/z 530.66 [$M-(Xyl+Rha)+H$]、 m/z 368.73 [$M-(Xyl+Rha+Glc)+H$]、 m/z 312.77 [$M-(Xyl+Rha+Glc+C_4H_8)+H$] (图 2: Compound 2)。一级质谱和二级质谱信息与朝藿定 B (Epimedin B) 基本一致^[8,9], 符合朝藿定 B 裂解规律。由此可以鉴定 m/z 809.88 为 Epimedin B 的准分子离子峰。

化合物 3: 保留时间 9.54 min 时的一级质谱图给出 433.10 m/z ($M+H$), 二级质谱图分别给出产物离子峰 m/z 286.69 ($M-Rha+H$) 和 m/z 270.71 [$M-(Rha+O)+H$] (图 2: Compound 3)。一级质谱和二级质谱信息与山奈苷 (kaempferin) 基本一致^[8], 并且符合山奈苷裂解规律。由此可以鉴定 m/z 433.10 为 kaempferin 的

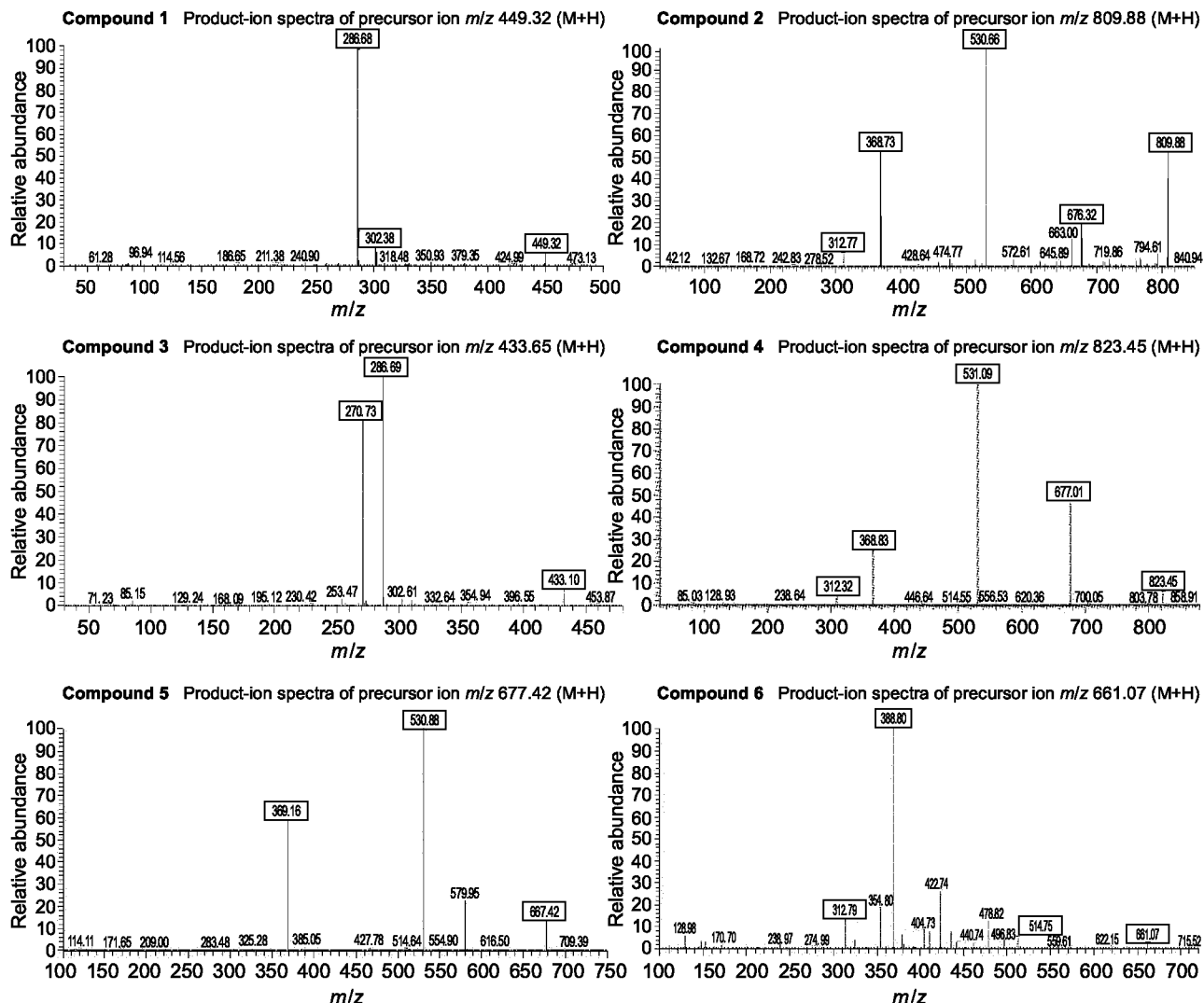


图2 偏斜淫羊藿叶片中化合物1至化合物6的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectra of compound 1 to compound 6 found in leaves of *E. truncatum*

准分子离子峰。

化合物4: 保留时间 12.65 ~ 12.90 min 内的一级质谱图给出 823.45 m/z (M+H), 二级质谱图分别给出产物离子峰 m/z 677.01 (M-Xyl + H)、 m/z 531.09 [M-(Xyl + Rha) + H]、 m/z 368.83 [M-(Xyl + Rha + Glc) + H]、 m/z 312.32 [M-(Xyl + Rha + Glc + C₄H₈) + H] (图2: Compound 4)。一级质谱和二级质谱信息与朝藿定 C (Epimedin C) 一致^[10,11], 符合朝藿定 C 裂解规律。由此可以鉴定 m/z 823.45 为 Epimedin C 的准分子离子峰。

化合物5: 保留时间 14.97 min 内的一级质谱图给出 677.42 m/z (M+H), 二级质谱图分别给

出产物离子峰 m/z 530.88 (M-Rha + H)、 m/z 369.16 [M-(Rha + Glc) + H] (图2: Compound 5)。一级质谱和二级质谱信息与淫羊藿苷 (icariin) 一致^[8,11], 符合淫羊藿苷裂解规律。由此可以鉴定 m/z 677.42 为 Icariin 的准离子峰。

化合物6: 保留时间 28.02 min 内的一级质谱图给出 661.07 m/z (M+H), 二级质谱图分别给出产物离子峰 m/z 514.75 (M-Rha + H)、 m/z 368.80 [M-(Rha + Rha) + H]、 m/z 312.79 [M-(Rha + Rha + C₄H₈) + H] (图2: Compound 6)。一级质谱和二级质谱信息与 3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮-3-O-L-鼠李吡喃糖基(1→2)-α-鼠李吡喃糖基(3,5,7-Trihydroxyl-4'-methoxyl-

8-prenylflavone-3-O-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamno-pyranoside)一致^[12,13]，符合3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮-3-O-L-鼠李吡喃糖基(1→2)-α-鼠李吡喃糖苷的裂解规律。由此可以鉴定 m/z 661.42 为3,5,7-三羟基-4'-甲氧基-8-异戊烯基黄酮-3-O-L-鼠李吡喃糖基(1→2)-α-鼠李吡喃糖苷的准分子离子峰。

3.2 偏斜淫羊藿主要活性成分含量

3.2.1 分析方法评价

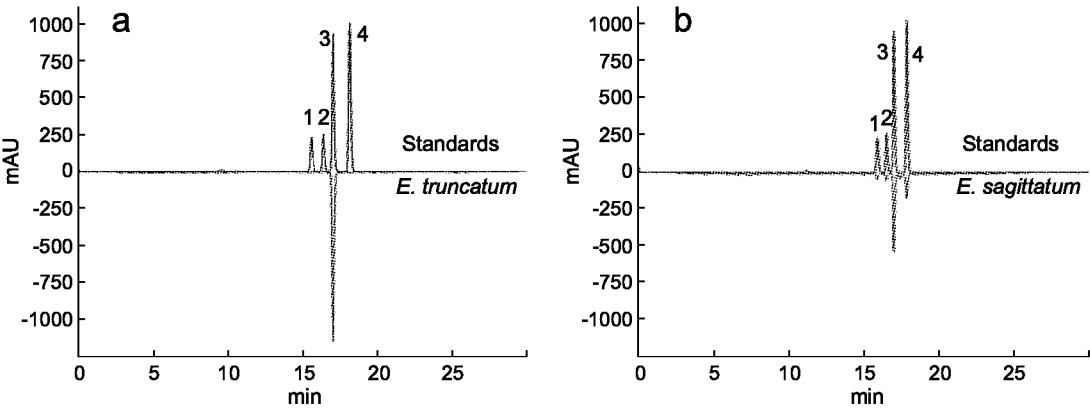
HPLC 分析表明，朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的精确性 RSD 分别为 1.44%、1.43%、1.40%、1.44%。稳定性考察表明，朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的稳定性 RSD 分别为 1.85%、1.81%、1.93% 和 1.66%。朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的加样回收率分别为 101.28% (RSD 1.52%)、100.95% (RSD 2.15%)、105.95% (RSD 3.48%) 和 103.25% (RSD 2.69)。以上数据表明，该分析方法稳定性、精确性和回收率良好。

3.2.2 主要活性成分含量

由 HPLC 指纹图谱(图3)可以看出，偏斜淫羊藿主要含有朝藿定 C，而箭叶淫羊藿中含有朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷，且以朝藿定 C 和淫羊藿苷为主，这与前人报道一致^[4]。在偏斜淫羊藿和箭叶淫羊藿居群中，分别随机抽取生长状况良好的 20 棵植株，测量朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷含量及 4 种成分总含量，结果见表 1。将偏斜淫羊藿和箭叶淫羊藿朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷含量及 4 种主要活性成分总含量作统计学分析，结果表明，偏斜淫羊藿与箭叶淫羊藿的化学组成有极显著差异，偏斜淫羊藿的朝藿定 C 含量显著高于箭叶淫羊藿 4 种主要活性成分总含量($p < 0.01$)。

4 结论

LC-MS 分析发现偏斜淫羊藿叶片中含有多种药用成分，通过与已报道的淫羊藿属化合物的光谱学信息进行对比，鉴定了 4 个 8-位异戊烯基类黄酮



图中峰 1、2、3、4 分别是朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的峰。
Peak 1, 2, 3, and 4 represent Epimedin A, Epimedin B, Epimedin C and Icarin respectively.

图 3 偏斜淫羊藿 (a) 和箭叶淫羊藿 (b) 叶片中的类黄酮在 272 nm 处的 HPLC 图谱
Fig. 3 HPLC chromatograms at 272 nm of flavonoids in leaves of *E. truncatum* (a) and *E. sagittatum* (b)

表 1 淫羊藿叶片中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷以及 4 种类黄酮总含量
Table 1 Epimedin A, epimedin B, epimedin C, icarlin and total contents of these four compounds in tested samples

物种 Species	样品数 n	朝藿定 A(mg/g) Epimedin A	朝藿定 B(mg/g) Epimedin B	朝藿定 C(mg/g) Epimedin C	淫羊藿苷(mg/g) Icarin	总量(mg/g) Total
<i>Epimedium truncatum</i>	20	—	—	120.219 ± 14.426	—	120.219 ± 14.42
<i>Epimedium sagittatum</i>	20	5.916 ± 1.482	5.442 ± 1.322	57.467 ± 11.796	19.328 ± 4.009	88.153 ± 16.366

注：“—”表示未检测到。
Note: “—”means not found in the sample.

[朝藿定 B、朝藿定 C、3,5,7-Trihydroxyl-4'-methoxyl-8-prenylflavone-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside 和淫羊藿苷] 以及 2 个其他化合物(槲皮素-3-O-鼠李糖甙、山奈苷)。其中 3,5,7-Trihydroxyl-4'-methoxyl-8-prenylflavone-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside 化合物目前仅在朝鲜淫羊藿和偏斜淫羊藿中有报道,本次研究为首次在偏斜淫羊藿中发现该成分。用 HPLC 方法测定淫羊藿主要活性成分含量的实验表明,HPLC 可以快速分离化合物并对有标准品且含量相对较高的化合物进行定量分析,但可能无法检测到含量较低的化合物。而 MS 与 HPLC 联用能在此基础上发现更多低含量的化合物,对照质谱信息数据库可快速而准确地对这些化合物进行鉴定,并进一步定量分析。本实验很好地说明了 LC-MS 方法在中药材化学成分的分析和质量研究中有重要作用。

目前已有研究将朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷 4 种成分的含量作为评价淫羊藿药材标准^[5-7]。通过比较同园栽培条件下,偏斜淫羊藿和箭叶淫羊藿叶片中的主要活性成分,发现偏斜淫羊藿含有丰富的朝藿定 C 且含量约为箭叶淫羊藿的 1.5 倍,并且朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷 4 种成分的总含量同样极显著高于箭叶淫羊藿($p < 0.01$),显示出极高的栽培开发价值。另外,前人也发现偏斜淫羊藿中还存在 Epimedin A、Epimedin C、Ikaridin A、Baohuoside III、Kaempferol-3-dirhamnoside、Hyperin、Oleanolic acid 等活性成分^[14],由此推知,偏斜淫羊藿具有极高的药用开发价值。在当今淫羊藿药材资源蕴藏量急剧下降并面临枯竭、中药材原料供不应求的情况下,一方面应该加强淫羊藿的人工栽培和 GAP 基地的建设,另一方面应加强对活性成分含量高的淫羊藿物种的安全性、药理特性及资源学的研究,在保证用药安全的前提下拓宽药材来源。偏斜淫羊藿活性成分含量极高,深入研究后可能有作为入药淫羊藿资源的替代资源的应用前景。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:229.
- [2] 张明月,石进校. 淫羊藿属植物研究进展[J]. 吉首大学学报,2009,30(1):107-113.
- [3] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第7卷[M]. 北京:科学出版社,1988:185-195.
- [4] 江苏新医学院. 中药大词典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2250.
- [5] Liu J J, Li S P, Wang Y T. Optimization for quantitative determination of four flavonoids in *Epimedium* by capillary zone electrophoresis coupled with diode array detection using central composite design[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1103(2):344-349.
- [6] 郭宝林,肖培根. 淫羊藿属药用植物的质量评价和资源开发前景[J]. 天然产物研究与开发,1996,8(1):74-79.
- [7] Shen P, Guo B L, Yong E L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68:1448-1458.
- [8] Zhao H Y, Sun J H, Fan M X, Fan L, Zhou L, Li Z, Han J, Wang B R, Guo D A. Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1190:157-181.
- [9] Ito Y, Hirayama F, Suto K, Sagara K, Yoshida T. Three flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(3):911-913.
- [10] Xie J, Sun W, Duan K, Zhang Y. Chemical constituents of roots of *Epimedium wushanense* and evaluation of their biological activities [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(7):600-605.
- [11] 李文魁. 朝鲜淫羊藿和万山淫羊藿化学成分的研究[D]. 北京:中国协和医科大学药用植物研究所,1995.
- [12] 程岩. 朝鲜淫羊藿的化学成分[J]. 沈阳医科大学学报,2006,23(10):644-648.
- [13] 李文魁,张如意. 朝鲜淫羊藿的化学成分(II)[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(4):12-18.
- [14] Ma H P, He X R, Yang Y, Li M X, Hao D J, Jia Z P, et al. The genus *Epimedium*: An ethnopharmacological and phytochemical review[J]. *J Ethnopharmacology*, 2011, 134:519-541.

(责任编辑:张平)