

## 淫羊藿大花类群花序性状与黄酮成分含量相关性研究

秦伟瀚,危永胜,阳 勇,李 卿,刘 翔\*

重庆市中药研究院,重庆 400065

**摘要:**采用三重四级杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)分析淫羊藿大花类群总状花序品种与圆锥状花序品种间主要黄酮成分含量差异。质谱采用电喷雾离子源正离子模式( $ESI^+$ )采集,通过多反应监测(MRM)同时对淫羊藿药材中的14种有效成分进行定量分析。含测结果显示圆锥状花序品种黄酮成分含量要明显高于总状花序,而朝鲜淫羊藿成分含量及变化趋势则异于其它花序品种;聚类结果显示,总状花序品种与圆锥状花序品种区分明显,朝鲜淫羊藿在PCA及PLS-DA的得分图中被单独归为一类,与含量分析结果一致,这与朝鲜淫羊藿归于淫羊藿属 sect. *Macroceras* 组,而其它中国种类属于 sect. *Diphyllon* 组有关。该检测方法灵敏、准确、快速,适用于淫羊藿的定量分析,该实验结果为淫羊藿质量控制、品种选育等提供科学支撑。

**关键词:**淫羊藿;大花类群;总状花序;圆锥状花序;三重四级杆串联质谱法;14种黄酮成分;含量差异

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)4-0633-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.4.013

## Study on the correlation between inflorescence characteristics and flavonoid content of large-flowered taxa of *Epimedium*

QIN Wei-han, WEI Yong-shen, YANG Yong, LI Qin, LIU Xiang\*

Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China

**Abstract:** The difference of flavonoid content between raceme and panicle varieties of large-flowered taxa of *Epimedium* was analyzed by UPLC-MS/MS. Mass spectrometry was collected by electrospray ion source positive ion mode ( $ESI^+$ ), and quantitative analysis of 14 active ingredients in *Herba Epimedii* was carried out by multiple reaction monitoring (MRM). The results showed that the content of flavonoids in the panicle was significantly higher than that in the raceme. The content and variation trend of *E. koreanum* were different from other inflorescence varieties. The results of clustering showed that the racemes and panicles were clearly distinguished, and the *E. koreanum* was classified as a category in PCA and PLS-DA, which was consistent with the results of content analysis. This was consistent with *E. koreanum* belonging to sect. *Macroceras* group, while other Chinese species belonged to sect. *Diphyllon* group. The method is sensitive, accurate and rapid, and suitable for quantitative analysis of *Epimedium*. The results provide scientific support for quality control and breed selection of *Epimedium* herb.

**Key words:** *Epimedium* herb; large-flowered taxa; raceme; panicle; LC-MS/MS; 14 flavonoids; content difference

淫羊藿为小檗科(*Berberidaceae*)淫羊藿属(*Epimedium* L.)多年生草本植物<sup>[1]</sup>,是我国常用且重要的中药材,最早记载于《神农本草经》。具有补肾壮阳、祛风除湿之功效;主要用于治疗骨质疏松、更年

期综合征、乳房肿块、高血压、冠心病等症<sup>[2-6]</sup>;药理学研究证明该药材具有抗衰老、抗肿瘤、抗艾滋病等作用,因此备受国内外学者关注<sup>[7-10]</sup>。据统计淫羊藿在中国境内有超过50个种,是世界上淫羊藿属植物地理分布的中心<sup>[11]</sup>。按照花型大小可以将淫羊藿分为大花类群(花瓣远长于内轮萼片,花直径大于1 cm)和小花类群(花瓣短于内轮萼片,花直径小于1 cm),在中国大花类群就有27种之多<sup>[12-14]</sup>。由于淫羊藿品种繁多,市场上混用的就有10余个种,仅2015年版《中国药典》就收录了5个品种<sup>[15]</sup>,药

收稿日期:2019-11-26 接受日期:2020-04-15

基金项目:国家重大新药创制项目(2017ZX09101002-002-004);重庆市科技局项目(cc-cstc-cA-19-2, cstc2019jxjl-jbky01017);重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0464, cstc2018jcyjAX0316);重庆市卫生局项目(ZY201802117)

\*通信作者 Tel:86-23-89029192; E-mail: zysliux@163.com

材质量参差不齐。据文献报道,小花品种的药效黄酮含量要明显高于大花<sup>[1]</sup>,但有些大花品种如朝鲜淫羊藿、巫山淫羊藿、粗毛淫羊藿等的药用品质却并不低,通过进一步研究发现大花类群的花序可以分为总状花序和圆锥状花序。花型、花序等可作为淫羊藿分类重要标准,表明该属植物调控花性状的某种基因是区分不同品种且能稳定遗传的基因<sup>[16]</sup>;淫羊藿黄酮醇成分大多具有相同母核(去甲淫羊藿素),造成花表型与黄酮代谢具有显著相关性,可能存在某种关联关键基因在进行调控,还有待于进一步研究证明。本研究于重庆、四川、湖南、湖北、吉林等省市实地采集了33个批次14个品种的大花淫羊藿,采用UPLC-MS/MS法对14种含异戊烯基的主要黄酮醇成分进行了含量测定,探讨了大花淫羊藿花序类型与黄酮含量的相关性,为淫羊藿质量控制、品种选育等提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

LC-30A型超高效液相色谱仪(日本,岛津公司);二元高压泵、自动进样器、柱温箱;API4000型三重四极杆串联质谱仪(美国,Applied Biosystems公司);Analyst 1.5.2定量处理软件;BJ-100型超高

速中药粉碎机(中国,德清拜杰电器有限公司);VGT-2013QT型超声清洗机(中国,固特超声公司);BSA224S-CW型万分之一分析天平(德国,赛多利斯公司)。

### 1.2 试药

对照品淫羊藿苷(批号:489-32-7)、淫羊藿次苷I(批号:56725-99-6)、淫羊藿次苷II(批号:113558-15-9)、朝藿定A(批号:110623-72-8)、朝藿定B(批号:110623-73-9)、朝藿定C(批号:110642-44-9)、箭叶淫羊藿苷A(批号:118525-35-2)、箭叶淫羊藿苷B(批号:118525-36-3)、鼠李糖淫羊藿次苷II(批号:135293-13-9)、宝藿苷II(批号:55395-07-8)、淫羊藿属苷A(批号:39012-04-9)、去甲淫羊藿素(批号:28610-31-3)、宝藿苷V(批号:118544-18-6)、粗毛淫羊藿苷(批号:143601-07-4),质量分数均大于98%,均购于成都埃法生物科技有限公司;乙腈(色谱级,德国Merck公司)、甲酸(色谱级,美国ACS公司),其余试剂为分析纯;水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。不同品种淫羊藿样品均采自于重庆、四川、湖北、湖南等地,经重庆市中药研究院生药研究所刘翔副研究员鉴定为小檗科多年生草本植物淫羊藿的地上部分。33批样品信息见表1。

表1 淫羊藿样品采集信息表

Table 1 *Epimedium* sample collection information table

样品编号 Sample No.	植物基源 Botanic origin	学名 Scientific name	类群 Phyto-group	花序类型 Inflorescence type	采集地点 Collection location
S1	腺毛淫羊藿	<i>E. glandulosopilosum</i> H. R. Liang	大花	总状花序	重庆市巫溪县通城乡
S2	腺毛淫羊藿	<i>E. glandulosopilosum</i> H. R. Liang	大花	总状花序	重庆市奉节县荆竹乡
S3	黔岭淫羊藿	<i>E. leptorrhizum</i> Stearn	大花	总状花序	重庆市万州区铁峰山
S4	黔岭淫羊藿	<i>E. leptorrhizum</i> Stearn	大花	总状花序	重庆市石柱县六塘乡
S5	黔岭淫羊藿	<i>E. leptorrhizum</i> Stearn	大花	总状花序	重庆市石柱县三星乡
S6	黔岭淫羊藿	<i>E. leptorrhizum</i> Stearn	大花	总状花序	重庆市忠县石子乡
S7	四川淫羊藿	<i>E. sutchuenense</i> Franch.	大花	总状花序	重庆市巫溪县乌龙乡
S8	四川淫羊藿	<i>E. sutchuenense</i> Franch.	大花	总状花序	重庆市巫溪县上横镇
S9	四川淫羊藿	<i>E. sutchuenense</i> Franch.	大花	总状花序	四川省万源市
S10	木鱼坪淫羊藿	<i>E. franchetii</i> Stearn	大花	总状花序	重庆市巫溪县花台乡
S11	木鱼坪淫羊藿	<i>E. franchetii</i> Stearn	大花	总状花序	湖北省巴东县大支坪乡
S12	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i> Nakai	大花	总状花序	吉林省临江市卧虎山
S13	直距淫羊藿	<i>E. mikinorii</i> Stearn	大花	总状花序	湖北省咸丰县黄金洞
S14	直距淫羊藿	<i>E. mikinorii</i> Stearn	大花	总状花序	湖北省恩施市
S15	保靖淫羊藿	<i>E. baojingense</i> Q. L. Chen et B. M. Yang	大花	总状花序	湖南省张家界市尹家溪镇
S16	保靖淫羊藿	<i>E. baojingense</i> Q. L. Chen et B. M. Yang	大花	总状花序	湖南省张家界市
S17	竹山淫羊藿	<i>E. zhu shanense</i> K. F. Wu et S. X. Qian	大花	总状花序	重庆市巫溪县
S18	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	重庆市南川区槐坪
S19	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	重庆市南川区金佛山

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品编号 Sample No.	植物基源 Botanic origin	学名 Scientific name	类群 Phyto-group	花序类型 Inflorescence type	采集地点 Collection location
S20	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	重庆市武隆县白马镇
S21	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	重庆市南川区黄草坪
S22	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	重庆市武隆县蒲板乡
S23	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i> Franch.	大花	圆锥状花序	四川省峨眉山市龙池镇
S24	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i> Hand. -Mazz.	大花	圆锥状花序	湖南省新宁县紫云山
S25	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i> Hand. -Mazz.	大花	圆锥状花序	湖南省新宁县
S26	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i> Hand. -Mazz.	大花	圆锥状花序	湖南省新宁县
S27	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i> Hand. -Mazz.	大花	圆锥状花序	湖南省新宁县
S28	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i> Hand. -Mazz.	大花	圆锥状花序	湖南省新宁县
S29	单叶淫羊藿	<i>E. simplicifolium</i> Ying	大花	圆锥状花序	重庆市南川区庙坝
S30	单叶淫羊藿	<i>E. simplicifolium</i> Ying	大花	圆锥状花序	重庆市彭水县大同镇
S31	薄叶淫羊藿	<i>E. membranaceum</i> K. Meyer	大花	圆锥状花序	四川省安县
S32	金城山淫羊藿	<i>E. jinchengshanense</i>	大花	圆锥状花序	重庆市渝北区
S33	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i> Ying	大花	圆锥状花序	湖北省巴东县溪丘湾乡

### 1.3 测定方法的建立

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱为 ACE Execl 3 Super<sub>C</sub><sub>18</sub> 柱 (10 mm × 2.1 mm, 3.0 μm); 柱温 40 °C; 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 体积流量 0.2 mL/min; 梯度洗脱: 0 ~ 2.0 min, 15% 乙腈; 2.0 ~ 15.0 min, 15% → 80% 乙腈; 15.0 ~ 17.0 min, 80% 乙腈; 17.0 ~ 17.1 min, 80% → 15% 乙腈; 17.1 ~ 20.0 min, 15% 乙腈; 进样量 2 μL。

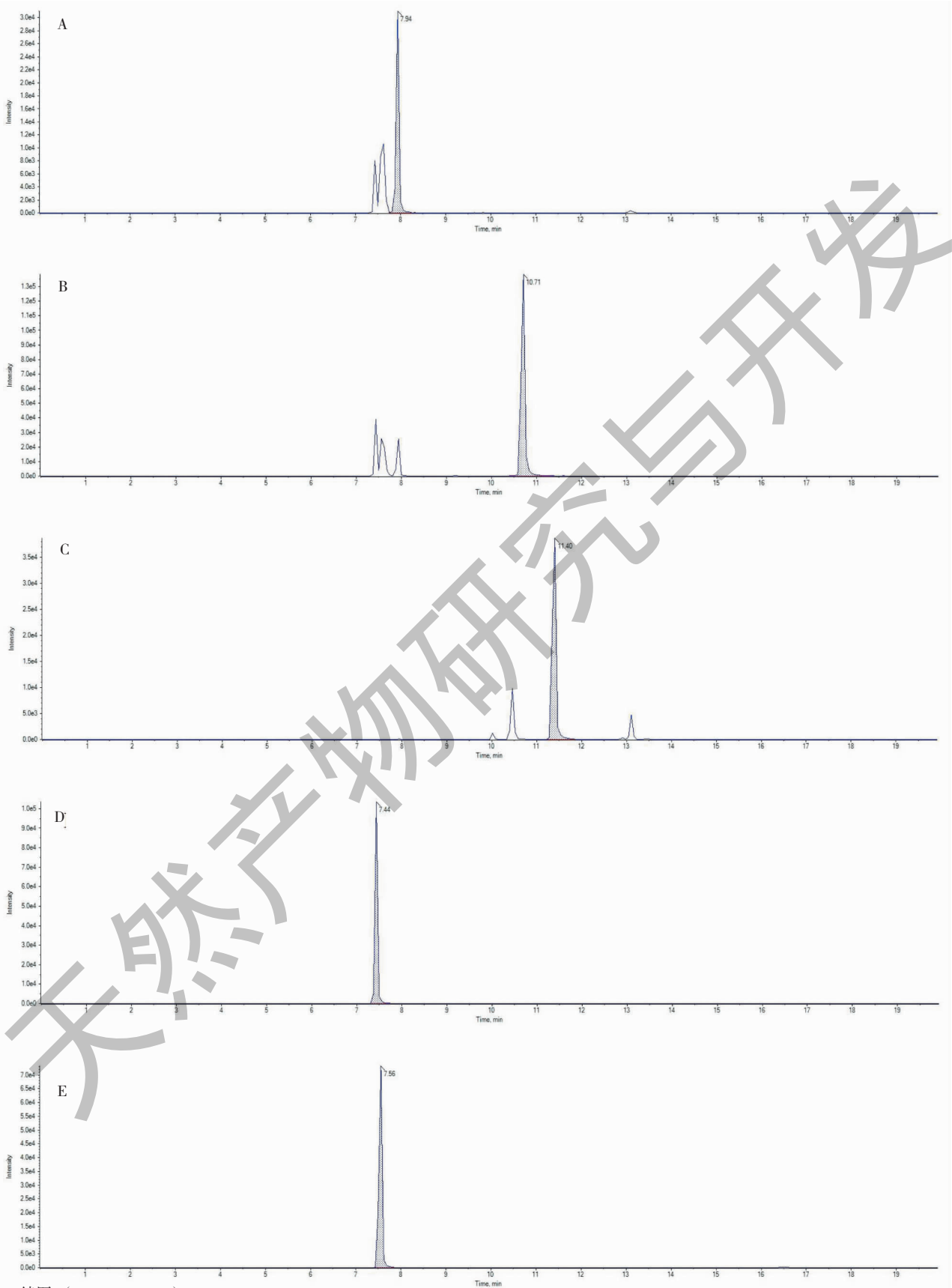
#### 1.3.2 质谱条件

质谱为电喷雾离子源: 正离子模式 (ESI<sup>+</sup>); 多反应监测 (MRM); 离子源喷雾电压 5500 V; 雾化温度 550 °C; 气帘气 (CUR): 103.3 kPa; 雾化气 (GS1): 378.9 kPa; 辅助气 (GS2): 378.9 kPa; 碰撞气 (CAD): 27.5 kPa。质谱数据的相关参数见表 2。样品和对照品的 14 种黄酮成分质谱图见图 1 和图 2。

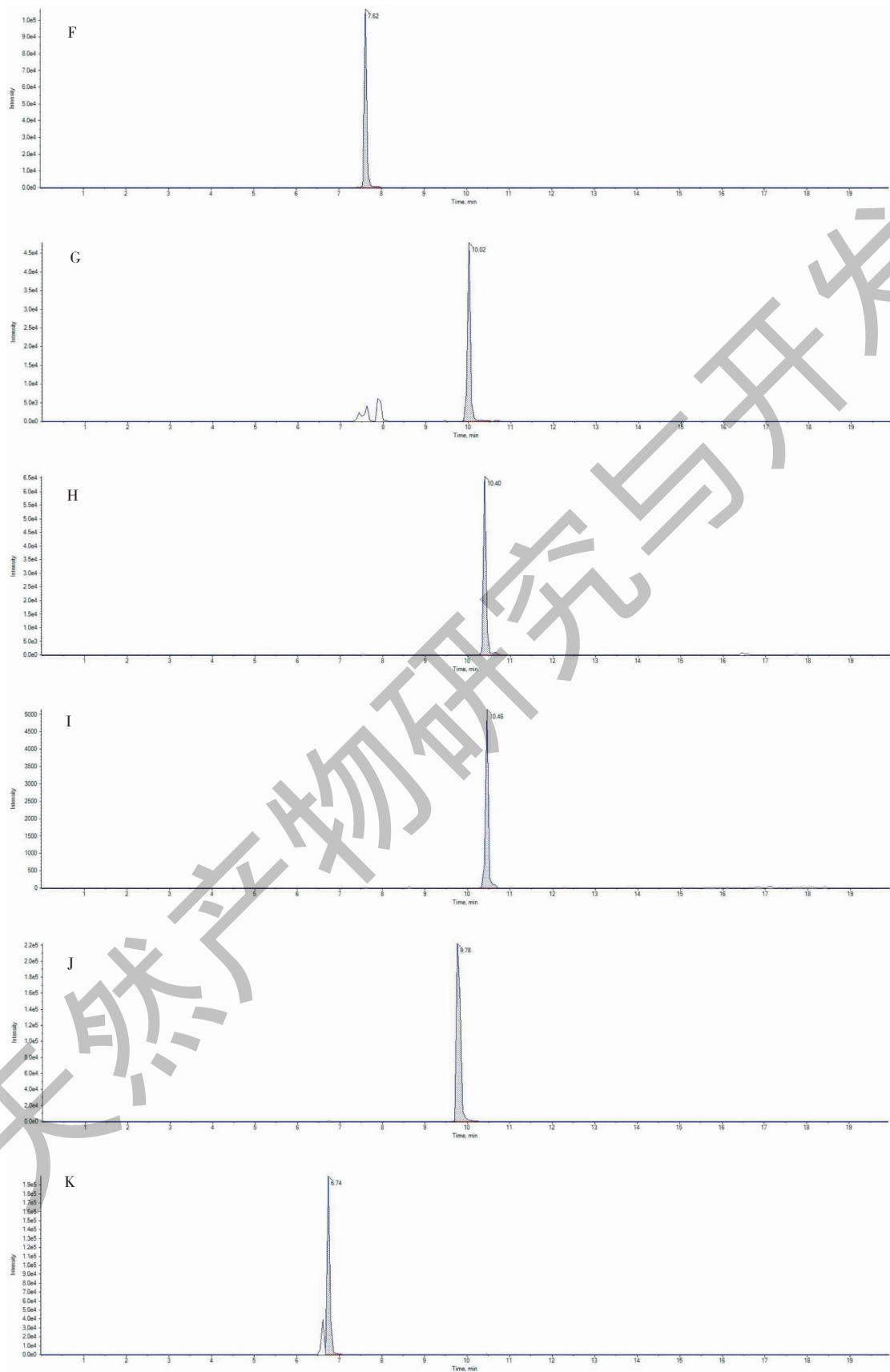
表 2 14 种黄酮成分的质谱定量分析方法

Table 2 Quantitative analysis of 14 flavonoids by mass spectrometry

化合物名称 Compound name	母离子 Precursor ion ( <i>m/z</i> )	定量离子 Quantitative ion ( <i>m/z</i> )	定性离子 Qualifier ion ( <i>m/z</i> )	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞电压 Collision energy (V)
淫羊藿苷 Icaritin	677.3	531.3	369.2	63.7	23.9
淫羊藿次苷 IIcariside I	531.3	369.2	313.3	61.9	26.9
淫羊藿次苷 IIIcariside II	515.3	369.2	313.1	43.7	13.1
朝藿定 A Epimedin A	839.4	531.2	677.4	51.1	31.1
朝藿定 B Epimedin B	809.3	531.3	677.3	52.9	27.7
朝藿定 C Epimedin C	823.4	531.3	677.4	73.2	26.3
箭叶淫羊藿苷 ASagittatoside A	677.2	369.2	313.2	53.9	17.9
箭叶淫羊藿苷 BSagittatoside B	647.3	369.2	515.3	57.3	12.3
鼠李糖淫羊藿次苷 IIRhamnosylcariside II	661.4	369.2	515.1	56.1	17.4
宝藿苷 IIBaohuaside II	501.3	355.1	299.1	39.9	12.7
淫羊藿属苷 AEpimedeside A	663.3	355.1	517.2	49.1	41.9
去甲淫羊藿素 Desmethyl icaritin	355.1	298.9	287.1	52.2	25.1
宝藿苷 VBaohuaside V	809.4	517.1	663.3	54.9	28.8
粗毛淫羊藿苷 Acuminatin	513.3	367.2	129	27.0	18.8



续图 1 (Continued Fig.1)



续图 1 (Continued Fig.1)

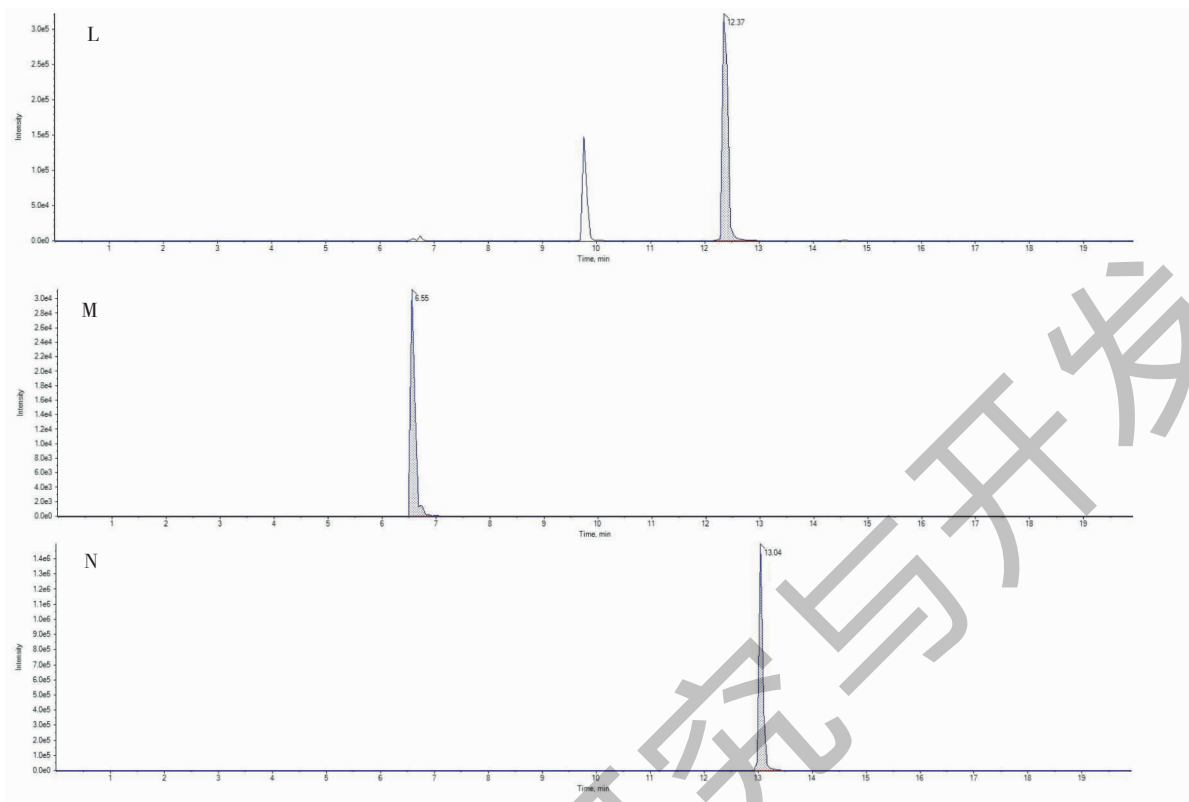


图 1 14 个黄酮成分标准品质谱图

Fig. 1 Mass spectrometry of 14 flavonoids

注: A. 淫羊藿苷; B. 淫羊藿次苷 I; C. 淫羊藿次苷 II; D. 朝藿定 A; E. 朝藿定 B; F. 朝藿定 C; G. 箭叶淫羊藿苷 A; H. 箭叶淫羊藿苷 B; I. 鼠李糖淫羊藿次苷 II; J. 宝藿苷 II; K. 淫羊藿属苷 A; L. 去甲淫羊藿素; M. 宝藿苷 V; N. 粗毛淫羊藿苷, 图 3、4、7 同。Note: A. Icaritin; B. Icariside I; C. Icariside II; D. Epimedin A; E. Epimedin B; F. Epimedin C; G. Sagittatoside A; H. Sagittatoside B; I. Rhamnosyl-icariside II; J. Baohuoside II; K. Epimedeside A; L. Desmethyl icaritin; M. Baohuoside V; N. Acuminatin, Fig. 3, 4 and 7 are the same.

### 1.3.3 混合对照品溶液制备

精密称取淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷适量于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇-水(1:1)溶解并稀释至刻度, 得含淫羊藿苷(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、淫羊藿次苷 I(17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、淫羊藿次苷 II(14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、朝藿定 A(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、朝藿定 B(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、朝藿定 C(14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、箭叶淫羊藿苷 A(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、箭叶淫羊藿苷 B(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、鼠李糖淫羊藿次苷 II(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、宝藿苷 II(17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、淫羊藿属苷 A(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、去甲淫羊藿素(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、宝藿苷 V(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、粗毛淫羊藿苷(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的混合对照品溶液, 备用, 低温避光保存。

### 1.3.4 供试品溶液的制备

取淫羊藿样品粉末约 0.1 g, 精密称定, 置具塞

锥形瓶中, 精密加入 50% 的乙醇水溶液 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率: 300 W, 频率: 40 kHz) 60 min, 放冷, 再次称定质量, 用 50% 乙醇溶液补足减失质量, 摇匀, 精密量取 1 mL 提取液于 10 mL 容量瓶中, 加色谱甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过于进样瓶中, 即得。

### 1.3.5 线性关系考察

精密吸取“1.3.3”项下的混合对照品溶液 5 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加色谱甲醇定容至刻度, 摇匀后按照此方法以 2 倍比例逐级稀释至 1.5 ng/mL; 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述系列混合对照品溶液各 2  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录峰面积值, 并以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 回归方程见表 3。

### 1.3.6 精密度实验

精密吸取同一混合对照溶液(1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 重复进样 6 次, 记录峰面积。结果显示, 淫羊藿

表3 淫羊藿中14种主要黄酮成分的线性方程

Table 3 Linear equation of 14 major flavonoids in *Epimedium*

化合物名称 Compound name	回归方程 Calibration curve	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range (ng/mL)
淫羊藿苷 Icaritin	$Y = 92.74164X + 13797.49582$	0.99905	1.6 ~ 16000
淫羊藿次苷 IIcariside I	$Y = 562.35151X + 49109.8$	0.99987	1.7 ~ 17000
淫羊藿次苷 IIIcariside II	$Y = 182.10734X + 10819.76332$	0.99993	1.4 ~ 14000
朝藿定 AEpimedin A	$Y = 34.60425X + 1243.71116$	0.99995	1.6 ~ 16000
朝藿定 BEpimedin B	$Y = 37.88948X - 3475.45149$	0.99980	1.6 ~ 16000
朝藿定 CEpimedin C	$Y = 47.83151X + 213.42525$	0.99999	1.4 ~ 14000
箭叶淫羊藿苷 ASagittoside A	$Y = 13.51632X + 1793.61807$	0.99977	1.5 ~ 15000
箭叶淫羊藿苷 BSagittoside B	$Y = 21.44996X + 218.09230$	0.99999	1.5 ~ 15000
鼠李糖淫羊藿次苷 IIRhamnosylcariside II	$Y = 12.58950X - 310.85771$	0.99985	1.5 ~ 15000
宝藿苷 IIBaohuoside II	$Y = 116.21702X + 17072.07634$	0.99955	1.7 ~ 17000
淫羊藿属苷 AEpimedeside A	$Y = 105.29943X + 3890.46089$	0.99996	1.5 ~ 15000
去甲淫羊藿素 Desmethyl icaritin	$Y = 192.20455X + 16287.91011$	0.99971	1.5 ~ 15000
宝藿苷 VBaohuoside V	$Y = 20.53485X - 1182.67302$	0.99974	1.6 ~ 16000
粗毛淫羊藿苷 Acuminatin	$Y = 503.59642X - 9455.52345$	0.99996	1.5 ~ 15000

苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷的峰面积 RSD 值分别为 0.56%、1.02%、1.13%、0.49%、0.73%、1.27%、0.84%、1.42%、1.29%、0.53%、0.75%、0.77%、1.06%、1.01%，表明仪器精密度良好。

### 1.3.7 稳定性实验

精密吸取同一供试品溶液(S18号)各2 μL,按“1.3.1”和“1.3.2”项下色谱质谱条件分别于0、2、4、8、10、12、18、24 h 进样检测,结果显示淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷的平均质量分数 RSD 均小于 1.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 1.3.8 重复性实验

取淫羊藿样品(S18号)6份,按照“1.3.4”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3.1”和“1.3.2”项下的色谱质谱条件进样检测,结果显示,淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊

藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷的平均质量分数的 RSD 分别为 1.33%、1.45%、1.02%、1.10%、0.78%、0.96%、1.52%、1.18%、0.55%、1.42%、1.07%、0.89%、0.91%、0.74%，表明该方法重复性良好。

### 1.3.9 加样回收率实验

取淫羊藿样品(S18号)6份,每份约0.05 g,精密称定,按照已知质量分数的50%加入对照品溶液,按照“1.3.4”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3.1”和“1.3.2”项下的色谱质谱条件进样检测,计算回收率。淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷的平均回收率分别为 95.4%、97.2%、101.5%、102.3%、96.3%、97.1%、102.1%、100.8%、98.8%、99.2%、101.4%、95.8%、96.2%、101.3%，RSD 分别为 0.55%、1.01%、0.89%、0.98%、1.14%、0.62%、0.88%、0.75%、1.15%、0.92%、0.72%、1.24%、1.21%、0.64%，表明方法回收率良好。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品含测结果及与花序性状相关性探讨

取收集到的33批淫羊藿样品,按照“1.3.4”项

下方法制备供试品溶液,按照“1.3.1”和“1.3.2”项下的色谱质谱条件进行进样检测,用外标法计算样品中淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭叶淫羊藿苷 A、箭叶淫羊藿苷 B、鼠李糖淫羊藿次苷 II、宝藿苷 II、淫羊藿属苷 A、去甲淫羊藿素、宝藿苷 V、粗毛淫羊藿苷的含量,结果见表 4。根据 2015 年版中国药典淫羊藿项下规定,巫山淫羊藿中朝藿定 C 的含量不得低于 1.0%<sup>[15]</sup>,课题组仅采集到了一个批次的巫山淫羊藿,其朝藿定 C 的含量为 0.5%,未达到药典要求,可能与样品数量、气候、环境等因素相关,并不能全面反映巫山淫羊藿药材的质量;药典对淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿及朝鲜淫羊藿的淫羊藿苷的要求为不得低于 0.5%<sup>[15]</sup>,本研究中所有批次样品仅朝鲜淫羊藿(0.56%)、粗毛淫羊藿(0.85%、0.59%、1.26%)、湖南淫羊藿(0.53%)达到药典要求;成分含量最高的是粗毛淫羊藿(S22)的朝藿定 C,为 24 282.9  $\mu\text{g/g}$ ,该样品总黄酮含量也是最高,为 4.54%,接近药典 5% 的要求<sup>[15]</sup>。与课题组前期研究结果相比较,证明大花类群多个品种的药用质量同样优良。

按照大花淫羊藿花序类型对所有黄酮成分的含量进行叠加,建立黄酮生物量的柱状图(图 2),由柱状图可以看出,圆锥状花序的总黄酮含量是总状花序的 10 倍,说明两种花序类别的黄酮总量上有着巨

大差异,朝鲜淫羊藿虽然属于大花总状,但其一个品种就占到了总状花序黄酮总量的 25%。按照淫羊藿品种,将所有成分含量进行平均后,拟合出 3D 折线图(图 3),由该图可以看出,除了朝鲜淫羊藿外,所有总状花序品种的折线趋势都较为平坦,且与圆锥状花序品种差异明显;再按照花序类型对化学成分含量平均后拟合成 2D 折线图(图 4),并将朝鲜淫羊藿单列,由该图可以看出圆锥状花序、总状花序和朝鲜淫羊藿在化学成分含量及变化趋势上有明显差异。由上述结果可知,淫羊藿大花类群总状花序与圆锥状花序化学差异明显,且圆锥状花序的药用品质明显要优于总状花序品种。中国药典收录了 2 个淫羊藿的大花品种,一个是巫山淫羊藿(大花圆锥状),一个是朝鲜淫羊藿(大花总状),巫山淫羊藿被药典单列出来,检测指标由淫羊藿苷变为了朝藿定

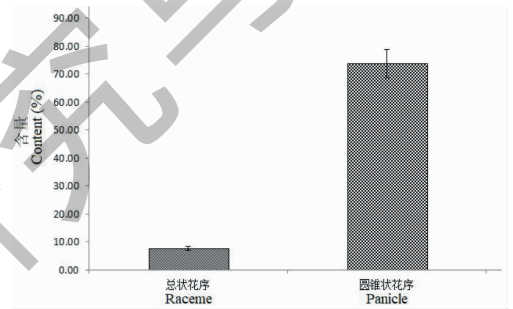


图 2 总黄酮含量柱状图

Fig. 2 Total flavonoid content histogram

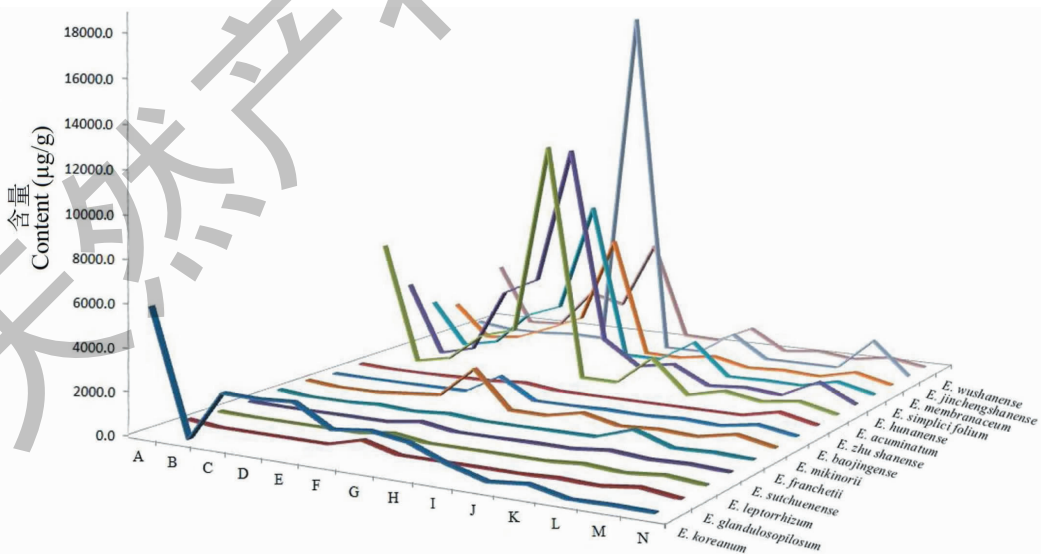


图 3 14 个大花品种样品的 3D 折线图

Fig. 3 3D line chart of 14 large flower varieties



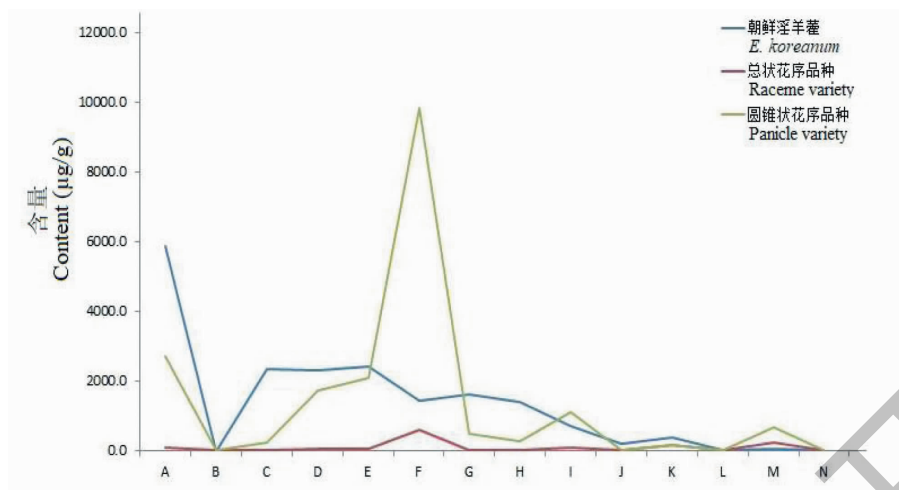


图4 总状花序和圆锥状花序样品折线图

Fig. 4 Raceme and cone inflorescence sample line chart

表4 淫羊藿中14种黄酮有效成分的含量测定结果(n=3)

Table 4 Determination of the content of 14 kinds of flavonoids in *Epimedium*(n=3)

样品 编号 Sample No.	质量分数 Mass fraction(µg/g)														总黄酮 Total flavonoids (%)
	淫羊 藿苷 Icarin	淫羊藿 次苷 I Icariside I	淫羊藿 次苷 II Icariside II	朝藿 定 A Epmedin A	朝藿 定 B Epmedin B	朝藿 定 C Epmedin C	箭藿 苷 A Sagittat oside A	箭藿 苷 B Sagittat oside B	鼠李糖 基淫羊 藿次苷 II 2-O- Rhamn osylcariside II	宝藿苷 II Baohuo side II	淫羊藿 属苷 A Epimedo side A	去甲淫 羊藿素 icaritin	宝藿苷 V Baohuo side V	粗毛淫 羊藿苷 Acumi natin	
S1	18.6	5.8	-	-	-	50.5	-	-	-	-	5.5	17.9	9.3	-	0.01
S2	345.6	-	-	-	-	838.0	-	-	31.1	-	157.7	-	446.1	0.1	0.18
S3	54.1	5.1	-	-	-	147.0	-	-	-	-	394.6	10.0	336.4	-	0.09
S4	105.1	-	-	-	32.3	258.6	-	-	12.4	-	112.9	-	123.7	-	0.06
S5	63.2	-	-	-	-	165.5	-	-	23.0	-	11.3	-	22.5	-	0.03
S6	5.2	-	-	8.8	29.1	375.3	-	6.5	7.0	-	25.8	-	199.4	4.8	0.07
S7	22.8	-	6.6	2.6	-	50.2	-	-	71.5	18.1	12.7	138.0	5.1	-	0.03
S8	106.7	-	-	32.7	25.9	233.6	-	-	26.2	27.9	583.5	18.9	271.1	-	0.13
S9	54.4	-	-	31.6	29.9	491.4	-	-	19.0	-	-	-	37.2	-	0.07
S10	171.5	-	-	43.9	18.1	71.8	-	-	-	-	12.9	5.9	3.9	-	0.03
S11	112.2	-	-	163.3	-	207.5	-	-	46.8	69.1	1211.7	17.5	161.0	-	0.20
S12	5873.2	-	2348.5	2302.0	2408.2	1429.8	1629.0	1388.6	704.7	212.2	382.9	8.0	57.0	24.7	1.88
S13	256.2	-	8.4	91.4	190.4	1196.2	33.7	11.5	135.8	15.6	165.7	2.7	385.8	-	0.25
S14	49.2	-	4.6	238.6	460.7	2440.5	70.2	46.2	655.7	-	56.1	23.6	345.5	4.7	0.44
S15	66.0	-	0.1	43.4	60.8	1288.1	-	-	95.2	12.2	200.4	13.8	594.4	-	0.24
S16	0.0	-	-	2.2	-	712.0	-	5.7	13.0	-	8.5	12.9	7.6	4.8	0.08
S17	87.3	-	-	53.8	82.2	211.3	7.7	-	-	-	2.3	2.7	392.7	-	0.08
S18	8537.1	8.6	434.5	3437.1	3979.5	14682.9	336.0	282.9	1729.8	5.7	467.6	131.5	248.0	1.8	3.43
S19	3135.4	-	118.9	1568.0	1781.0	6248.6	81.8	121.2	439.9	-	360.2	231.8	443.1	0.8	1.45
S20	5939.4	13.2	302.8	1417.1	1955.8	8475.7	81.3	102.8	721.9	0.3	295.7	51.4	220.9	4.2	1.96
S21	3454.7	-	246.7	906.9	1397.4	7177.8	93.6	147.1	1328.2	4.2	178.4	602.5	228.9	2.1	1.58
S22	12603.1	0.5	557.3	2201.4	2790.8	24282.9	194.9	103.3	668.9	33.5	1151.3	-	808.2	-	4.54
S23	1692.7	-	510.1	889.2	1460.0	8759.1	560.5	482.0	5017.9	124.8	219.0	-	551.9	-	2.03

续表 4(Continued Tab. 4)

样品编号 Sample No.	质量分数 Mass fraction( $\mu\text{g/g}$ )														总黄酮 Total flavonoids (%)
	淫羊藿苷 Icaritin	淫羊藿次苷 I Icariside I	淫羊藿次苷 II Icariside II	朝藿定 A Epmedin A	朝藿定 B Epmedin B	朝藿定 C Epmedin C	箭藿苷 A Sagittatoside A	箭藿苷 B Sagittatoside B	鼠李糖基淫羊藿次苷 II 2'-O-Rhamnosylcariside II	宝藿苷 II Baohuoside II	淫羊藿属苷 A Epimediside A	去甲基淫羊藿素 Desmethylicaritin	宝藿苷 V Baohuoside V	粗毛淫羊藿苷 Acuminatin	
S24	5 335.6	0.4	681.1	5 451.9	7 552.5	11 626.8	2 011.7	571.7	601.6	16.8	196.7	-	904.3	4.0	3.50
S25	3 255.6	-	192.1	3 458.4	3 701.3	11 243.9	1 449.6	354.1	737.7	4.7	199.3	-	637.0	-	2.52
S26	2 984.5	-	556.2	2 298.7	2 679.0	9 121.2	2 042.7	564.4	1 339.5	27.7	139.1	-	1 014.5	-	2.28
S27	3 245.5	-	495.9	3 398.0	4 017.4	12 677.3	2 466.0	777.9	996.6	29.0	151.4	-	966.7	-	2.92
S28	2 501.0	-	259.4	3 352.3	4 281.8	11 262.2	727.3	566.9	743.6	10.9	121.3	-	878.4	-	2.47
S29	1 450.8	-	413.7	1 320.5	1 645.8	6 026.1	574.3	532.1	1 778.0	4.6	29.6	-	212.1	-	1.40
S30	2 795.5	4.0	316.9	2 666.7	3 640.8	9 946.3	411.8	434.9	1 349.9	1.6	68.0	-	642.0	-	2.23
S31	1 610.9	-	195.5	885.3	1 631.8	5 897.5	153.7	116.7	399.5	7.1	105.4	-	432.4	-	1.14
S32	234.0	-	6.5	145.2	115.1	17 360.6	1.4	-	1 125.5	-	12.3	-	1 614.5	-	2.06
S33	2 972.0	-	111.5	2 026.6	1 586.1	5 010.6	259.0	202.8	1 020.3	-	211.9	-	295.6	1.1	1.37

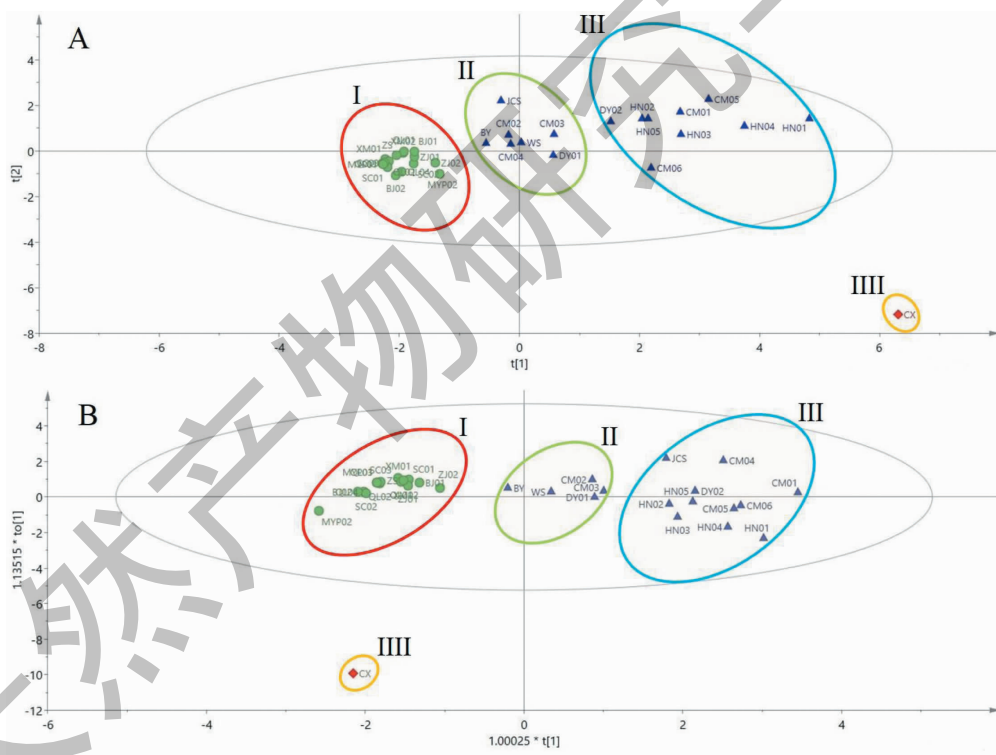


图 5 PCA(A)和 PLS-DA(B)的得分图

Fig. 5 Score chart of PCA (A) and PLS-DA (B)

C; 朝鲜淫羊藿虽然属于总状花序品种,但其药用品质同样优良,可能与独特的品种类型及生长环境等因素相关,该研究结果也佐证了药典收录两个大花品种的合理性。

## 2.2 聚类分析结果及讨论

采用无监督 PCA 方法对淫羊藿大花类群总状

花序品种和圆锥状花序品种间进行统计学分析。结果发现 PCA 得分图(图 5A)中总状花序(I)与圆锥状花序样品点(II、III)区分明显,说明淫羊藿大花总状花序品种的黄酮醇类成分含量与圆锥状花序品种有明显差异,由得分图可以看出大花总状花序(I)的所有数据点均聚于一处,而朝鲜淫羊藿(III)虽然

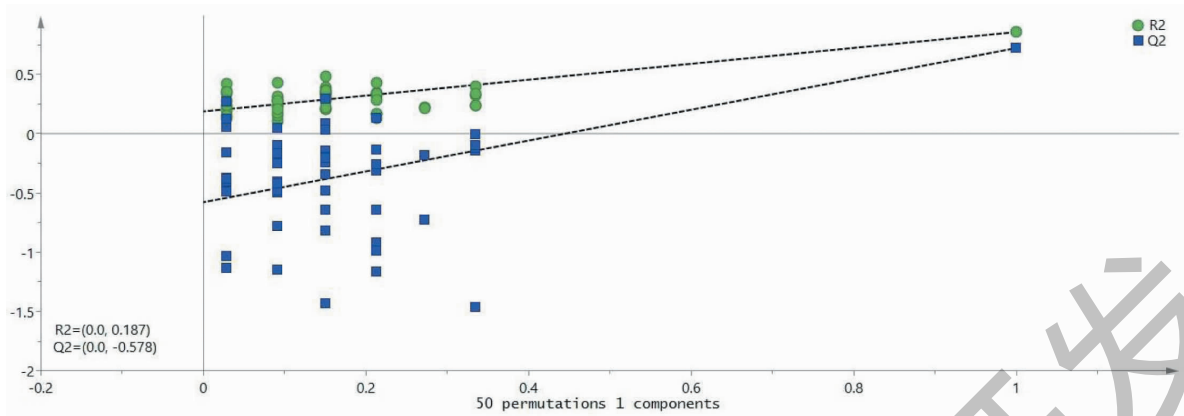


图6 PLS-DA 的排列检验图

Fig. 6 PLS-DA permutations check chart

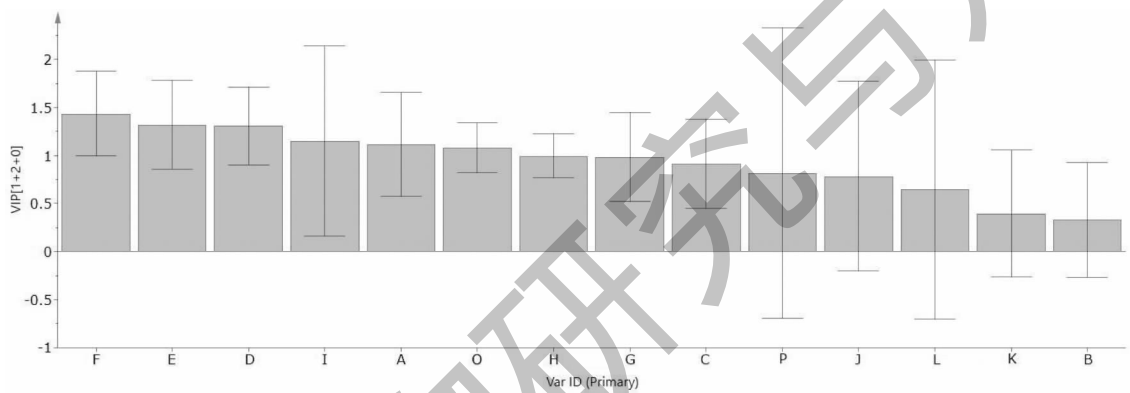


图7 PLS-DA 的VIP图

Fig. 7 VIP Diagram of PLS-DA

同属于大花总状,但其数据点远离总状和圆锥状样品的聚集区域, SIMCA 软件将其单独聚类,说明朝鲜淫羊藿主要有效成分与其它品种有较大差异。圆锥状花序品种被划分为了两个较集中的区域(II、III),其中巫山、薄叶、金城山及部分粗毛和单叶淫羊藿相对比较接近(II)。为了进一步探讨两类淫羊藿之间的变量差异,利用 PLS-DA 进行有监督的模式识别,由 PLS-DA 得分图(图 5B)可以看出,聚类结果与 PCA 分析一致。为了验证该模型的准确性、有效性,对 PLS-DA 进行排列检验,结果见图 6; $R^2 Y$  及  $Q^2$  原始值分别为 0.875、0.722,说明模型的拟合能力和预测能力良好,50 次随机排列后  $R^2$  和  $Q^2$  的截距为 0.171 和 -0.612,表明所建模型无过度拟合。同时按该模型某  $X$  变量对  $Y$  变量的解释能力(Variable influence on projection, VIP)大小进行排序(图 7),VIP 值大于 1 的成分分别为朝藿定 C、朝藿定 B、朝藿定 A、鼠李糖淫羊藿次苷 II、淫羊藿苷、宝藿苷

V,表明这些成分对分类具有重要贡献。

通过 PCA、PLS-DA 分析可以发现,除朝鲜淫羊藿数据点外,大花类群总状花序品种(I)完全聚为一类,表明这 7 个总状花序品种化学成分比较相似;圆锥状花序品种又大致聚为两类(II、III),巫山淫羊藿样品点与薄叶、金城山及部分粗毛和单叶淫羊藿较为靠近,而朝鲜淫羊藿虽然属于总状花序品种,其数据点既不靠近总状也不靠近圆锥状, SIMCA 软件将其单独聚为一类,该聚类结果与含量分析结果一致,这应与朝鲜淫羊藿在淫羊藿属中归于 sect. *Macroceras* 组,而其它中国种类属于 sect. *Diphyllon* 组有关。当然由于朝鲜淫羊藿样品采集于吉林省临江市卧虎山,该地的自然环境与南方省市有较大差异,也可能是造成朝鲜淫羊藿化学成分差异的原因,当地特殊的土壤、气候、海拔、光照等因素与黄酮醇类次生代谢产物积累的相关性,还有待课题组作进一步验证。

### 3 结论

淫羊藿是我国一个重要的中药品种,其功效确切,为历版药典所记载,但由于品种混杂,药材质量难以得到有效控制。课题组前期研究发现,淫羊藿小花类群品种的黄酮含量要明显高于大花,但有些大花品种药用品质却同样优良<sup>[16]</sup>,进一步探讨发现,大花总状和圆锥状花序品种黄酮成分含量存在较大差异,本研究采用 LC-MS/MS 法对 8 个总状花序和 6 个圆锥状花序品种中 14 种主要黄酮成分含量进行比较分析,结果显示除朝鲜淫羊藿外,总状花序品种的药效成分含量、药用品质要明显低于圆锥状花序品种。课题组拟在后期结合转录组和代谢组的方法解析同时调控花型性状和黄酮代谢的关联关键基因,以期通过表达和过表达目的基因以提高淫羊藿的药用品质,本研究实验结果为淫羊藿质量控制、品种选育等提供科学参考。

### 参考文献

- 1 Qin WH, Yang Y, Liu X, et al. Correlations between quality and species, altitude, taxa of *Epimedium* plants by UPLC-MS/MS[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 278-283.
- 2 Ouyang HZ, He J. Research progress on the quantitative analysis of chemical constituents in *Epimedium* herb and its pharmacokinetics[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报), 2019, 38: 219-227.
- 3 Luo L, Yuan ZY, Huang HY, et al. Advances in the chemical constituents and pharmacological studies of *Epimedium*[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2019, 15: 190-194.
- 4 Dong RX, Zu XD, Zhang Y, et al. Progress in the application of *Epimedium* and its main components in the treatment of premature ovarian failure[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医), 2019, 40: 678-680.
- 5 Li X, Wang MM, Gu Fei, et al. Research progress of herba epimedii and its main components in regulating AMPK pathway in prevention and treatment of heart failure[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2019, 53: 106-110.
- 6 Fang LY. Progress in pharmacological action and clinical application of *Epimedium* [J]. Smart Healthcare, 2017, 3: 25-27.
- 7 Chen Y, Wang JY, Jia XB, et al. Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in yinyanghuo[J]. Molecules, 2011, 16: 1336-1348.
- 8 Kang LS, Chen B, Reyes RA. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles[J]. Am J Physiol-Heart C, 2011, 300: 2105-2115.
- 9 Liang WN, Lin MN, Li XH, et al. Icarin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB1. 19 human osteoblastic cell line[J]. Int J Mol Med, 2012, 30: 889-895.
- 10 Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, et al. Flavonol glycosides from *epimedium sagittatum* and their neurite outgrowth activity on PC12 cells[J]. Planta Med, 2000, 66: 575.
- 11 Liu X, Fu CZ, Gao M, et al. Genetic relationship and population genetic diversity of *epimedium pubescens* and its related species based on ISSR and non-glandular hair characteristic [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42: 3090-3097.
- 12 Wang YY, Xu WF, He SZ. Research status of *epimedium floret* in China[J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med(贵阳中医学院学报), 2005, 27: 6-9.
- 13 He SZ, Xu WF, Guo BL. Study on species and geographic distribution of small-flowered taxa of *Epimedium* L. in China [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40: 1217-1220.
- 14 Xu WF, He SZ. Species and geographic distribution of large-flowered taxa of *Epimedium* in China[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 28: 267-271.
- 15 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 167, 327.
- 16 Yan FL, Wang B, Zu GF, et al. Research progress in taxonomy *Epimedium*[J]. Guizhou Sci(贵州科学), 2019, 37: 37-47.