

基于UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E技术的栽培淫羊藿质量研究

周茗^{1,2,3}, 郑伟², 郭宝林^{3*}, 陈安家^{1*}, 马百平^{2*}

(1. 山西医科大学, 山西太原 030001; 2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 采用UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E通过定性和相对定量方法对栽培箭叶淫羊藿、天平山淫羊藿、柔毛淫羊藿进行质量研究。本文以箭叶、天平山、柔毛淫羊藿的栽培种质、相应野生种质以及来自国内其他野生种质为研究对象, 采用UHPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI数据分析平台快速鉴定淫羊藿中化合物32个, 同时利用主成分分析(PCA)法对3个种栽培及野生样本进行比较, 结果表明栽培与相应野生样本化学成分组成比较一致。最后利用UHPLC-PDA对所有样本中12个黄酮类成分及总黄酮进行相对定量, 结果表明3个种的栽培与相应野生种质化学成分相对含量较相似, 且栽培后淫羊藿质量稳定性较好。本文利用UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E结合UNIFI数据分析平台和PCA方法建立的定性和相对定量方法可用于栽培淫羊藿的质量研究, 同时研究结果也为淫羊藿药材的栽培推广和资源合理开发利用提供了科学依据。

关键词: 淫羊藿; 栽培; UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E; 质量研究

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0995-09

Evaluation of cultivated and wild *Herba Epimedii* using UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E

ZHOU Ming^{1,2,3}, ZHENG Wei², GUO Bao-lin^{3*}, CHEN An-jia^{1*}, MA Bai-ping^{2*}

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: Qualitative and relatively quantitative methods were used to study the quality of cultivated *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim., *Epimedium myrianthum* Stearn, and *Epimedium pubescens* Maxim by ultra high-performance liquid chromatography coupled with photo-diode array and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E). Thirty-two compounds in cultivated and wild samples of *E. sagittatum*, *E. myrianthum* and *E. pubescens* were identified using UHPLC-Q-TOF/MS^E combined with the UNIFI data analysis platform. Principal component analysis (PCA) was used to compare the cultivated and wild samples of these three species. The results show that the chemical compositions of cultivated samples were consistent with the corresponding wild samples. UHPLC-PDA was used to determine the relative content of 12 flavonoids as well as total flavonoids in all samples. The results show that the relative chemical content of these flavonoids in cultivated and wild samples is similar and the quality of cultivated *Epimedium* is more stable. These qualitative and relatively quantitative methods using UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E combined with the UNIFI data analysis platform and PCA

收稿日期: 2019-11-07; 修回日期: 2019-12-29.

基金项目: 健康科技创新工程经费资助 (2017-I2M-3-013).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833172, E-mail: guobaolin010@163.com;

Tel: 86-351-4690071, E-mail: chenanjia888@163.com;

Tel: 86-10-66930265, E-mail: mabaiping@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0885

can be used to study the quality of cultivated Herba Epimedii. This research provides a scientific basis for the cultivation and rational development and utilization of *Epimedium* medicinal materials.

Key words: *Epimedium*; cultivation; UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E; quality study

淫羊藿作为我国传统中药已有上千年的药用历史,始载于《神农本草经》,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用,常用于治疗肾虚阳衰、阳痿遗精、筋骨萎软、风湿痹痛等^[1]。现代药理学研究表明,淫羊藿在调节免疫、改善心血管功能、抗癌、抗骨质疏松、抗衰老等方面均有很好的疗效^[2-6]。除2015版《中国药典》淫羊藿项下收录的4种淫羊藿外,该属植物还有其他种作为药材商品在市场上流通^[7,8],其中天平山淫羊藿于1998年由Stearn^[9]从箭叶淫羊藿变种宽序淫羊藿 *Epimedium sagittatum* var. *pyramidale* (Franch) Stearn 提升为独立种,被《贵州省中药材、民族药材质量标准》收录作为“黔淫羊藿”药用来源之一,因其优异的质量而受到广泛关注^[10-12]。该物种和箭叶淫羊藿关系非常密切,药材性状难以区分,在贵州、重庆、湖南、湖北等地资源量很大,常被作为箭叶淫羊藿应用。由于淫羊藿属植物种内变异大,关系复杂,一直有物种分类过细的问题,部分物种经分类学研究后被合并^[13],天平山淫羊藿可能作为箭叶淫羊藿的一个变种更为合适,分类学工作正在进行中。

目前,淫羊藿药材需求日益增加^[4,15],野生资源的过度采挖,已经导致资源严重短缺,价格不断飙升,而淫羊藿属植物含有的有效成分,淫羊藿苷类化合物在不同种类,甚至同一个物种的不同居群中变异极大^[12]。因此,选择优良种质大规模栽培是解决淫羊藿药材需求的有效途径之一^[16-18]。本实验前期对野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿进行了全国范围内的资源调查和优良种质遴选,最终分别确定了箭叶、天平山、柔毛淫羊藿质量较优异的野生种质进行栽培。但生长方式变化对栽培后淫羊藿化学成分组成的影响以及规模化种植后淫羊藿化学成分的含量变化还有待研究。因此,本文以箭叶、天平山、柔毛淫羊藿的栽培种质、相应野生种质以及来自国内其他野生种质为研究对象,采用UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E结合UNIFI数据分析平台和主成分分析(PCA)方法对栽培淫羊藿进行了较全面的质量研究,旨在为淫羊藿药材栽培推广以及资源合理开发利用提供科学依据。

材料与amp;方法

仪器 Waters ACQUITY I-Class 超高效液相色谱系统(Waters公司, Milford, MA, 美国); VION-IMS-QTOF 质谱系统(Waters公司, Wilmslow, 英国); UNIFI 1.9.4 软

件、Umetrics Ezinfo 3.0 软件(Waters公司, Manchester, 英国); Waters ACQUITYTM 超高效液相色谱系统和 Waters ACQUITYTM PDA 检测器(Waters公司, Milford, MA, 美国); Heatmap Illustrator 软件。色谱柱: Waters ACQUITYTM HSS T3 C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, Waters, 爱尔兰); Sartorius BP211D 1/10 万电子天平(美国 Sartorius 公司); 舒美 KQ-600E 数控超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司); 0.22 μm 微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂)。

试剂与样品 乙腈(色谱纯, Fisher, 美国); 甲酸(色谱纯, Acros Co. Ltd., NJ, 美国); 屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏蒸馏水有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。对照品朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、3''-羰基-2''-β-L-喹诺糖基淫羊藿苷、淫羊藿次苷II、2''-O-鼠李糖基淫羊藿次苷II、箭藿苷A、箭藿苷B均为本实验室自制, HPLC 面积归一化法测定纯度大于98%。

样品包括箭叶、天平山、柔毛淫羊藿的栽培种质、相应野生种质以及国内其他野生种质, 详见表1, 其中栽培箭叶淫羊藿样本引种年限为8年, 种源来自湖南新宁; 栽培天平山淫羊藿样本引种年限为7年, 种源来自贵州沿河; 栽培柔毛淫羊藿样本引种年限为5年, 种源来自四川乐山。各样本均由中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定为小檗科植物箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、天平山淫羊藿 *Epimedium myrianthum* Stearn、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 的干燥叶。

色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITYTM HSS T3 C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~1.5 min, 21%~24% B; 1.5~3 min, 24%~25% B; 3~4 min, 25%~29% B; 4~5 min, 29% B; 5~6.5 min, 29%~32% B; 6.5~7 min, 32%~44% B; 7~8 min, 44%~45% B; 8~9 min, 45%~46% B; 9~11 min, 46%~95% B; 流速0.6 mL·min⁻¹; 柱温40℃; 进样量2 μL; PDA 检测波长270 nm。

质谱条件 电喷雾电离离子源(ESI), 离子化模式为正、负离子模式, 离子源温度为110.0℃, 脱溶剂气体为氮气, 流速为850 L·h⁻¹, 温度为450℃。正离子模式下毛细管电压为3 kV, 负离子模式下毛细管电压为2.5 kV, 锥孔电压为50 V, 扫描范围为100~1 600 Da。

Table 1 Summary of analyzed samples

Sample No.	Sample name	Geographical origin	Sample type	Sample No.	Sample name	Geographical origin	Sample type
JY-ZP-1	<i>E. sagittatum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	TPS-0323	<i>E. myrianthum</i>	Wanshan, Guizhou Province	Wild
JY-ZP-2	<i>E. sagittatum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	TPS-0325	<i>E. myrianthum</i>	Yuping, Guizhou Province	Wild
JY-ZP-3	<i>E. sagittatum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	TPS-0406	<i>E. myrianthum</i>	Tianzhu, Guizhou Province	Wild
JY-ZP-4	<i>E. sagittatum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	TPS-0401	<i>E. myrianthum</i>	Duyun, Guizhou Province	Wild
JY-0403	<i>E. sagittatum</i>	Xinning, Hunan Province	Wild (corresponding to cultivation)	TPS-0421	<i>E. myrianthum</i>	Sangzhi, Hunan Province	Wild
JY-0501	<i>E. sagittatum</i>	Jimzhai, Anhui Province	Wild	TPS-0405	<i>E. myrianthum</i>	Huitong, Hunan Province	Wild
JY-0514	<i>E. sagittatum</i>	Quanzhou, Guangxi Province	Wild	TPS-0465	<i>E. myrianthum</i>	Enshi, Hubei Province	Wild
JY-20181005	<i>E. sagittatum</i>	Shangli, Jiangxi Province	Wild	RM-ZP-1	<i>E. pubescens</i>	Leshan, Sichuan Province	Cultivation
JY-0509	<i>E. sagittatum</i>	Anji, Zhejiang Province	Wild	RM-ZP-2	<i>E. pubescens</i>	Leshan, Sichuan Province	Cultivation
JY-0507	<i>E. sagittatum</i>	Huangshan, Anhui Province	Wild	RM-ZP-3	<i>E. pubescens</i>	Leshan, Sichuan Province	Cultivation
JY-0506	<i>E. sagittatum</i>	Xiuning, Anhui Province	Wild	RM-LS	<i>E. pubescens</i>	Leshan, Sichuan Province	Wild (corresponding to cultivation)
JY-0516	<i>E. sagittatum</i>	Lianzhou, Ghuangdong Province	Wild	RM-0456	<i>E. pubescens</i>	Nanzheng, Shaanxi Province	Wild
JY-201214	<i>E. sagittatum</i>	Luotian, Hubei Province	Wild	RM-0525	<i>E. pubescens</i>	Bazhong, Sichuan Province	Wild
JY-0515	<i>E. sagittatum</i>	Jianghua, Hunan Province	Wild	RM-0616	<i>E. pubescens</i>	Hongya, Sichuan Province	Wild
TPS-ZP-1	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0535	<i>E. pubescens</i>	Chengdu, Sichuan Province	Wild
TPS-ZP-2	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0711-15	<i>E. pubescens</i>	Jiange, Sichuan Province	Wild
TPS-ZP-3	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0711-17	<i>E. pubescens</i>	Tongnan, Chongqing City	Wild
TPS-ZP-4	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0711-8	<i>E. pubescens</i>	Qionglai, Sichuan Province	Wild
TPS-ZP-5	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0711-11	<i>E. pubescens</i>	Pingwu, Sichuan Province	Wild
TPS-ZP-6	<i>E. myrianthum</i>	Leishan, Guizhou Province	Cultivation	RM-0711-18	<i>E. pubescens</i>	Longchang, Sichuan Province	Wild
TPS-0338	<i>E. myrianthum</i>	Yanhe, Guizhou Province	Wild (corresponding to cultivation)	RM-0711-16	<i>E. pubescens</i>	Dazu, Chongqing City	Wild
TPS-0324	<i>E. myrianthum</i>	Shibing, Guizhou Province	Wild	RM-0711-9	<i>E. pubescens</i>	Beichuan, Sichuan Province	Wild
TPS-0415	<i>E. myrianthum</i>	Zhijiang, Hunan Province	Wild				

低能量扫描时能量为4 eV, 高能量扫描时能量为30~50 eV。准确质量数用 leucineenkephalin 作校正液。

混合对照品溶液的制备 称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、3'''-羧基-2''- β -L-喹诺糖基淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II、2''-O-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、箭藿苷 A、箭藿苷 B 各 0.3 mg, 分别加入 70% 甲醇 1 mL 溶解, 摇匀, 制得各对照品储蓄液。再分别取各对照品储蓄液 100 μ L, 混匀即得。

供试品溶液的制备 取淫羊藿药材粉末 0.2 g (过 40 目筛), 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇溶液 20 mL, 密塞, 摇匀, 称重, 超声处理 1 h, 冷却至室温, 用 50% 乙醇补足失重, 0.22 μ m 针式过滤器滤过, 取续滤液, 即得。

UNIFI 数据库及分析方法的建立 应用 UNIFI 1.9.4 软件的数据库管理系统, 建立淫羊藿药材全化学成分数据库 (249 个化合物), 包括化合物中英文名称、分子式、化学结构式和碎片离子信息等, 并导入 UNIFI 软件中, 构建淫羊藿化学成分专属数据库。分析方法中设定 3D 峰检测参数的强度阈值 (高能量为 25 计数, 低能量为 200 计数), 加合离子峰的种类 (负离子模式为 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$, 正离子模式为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+H-H_2O]^+$)。

PCA 分析 利用 Umetrics Ezinfo 3.0 软件对采集到的所有淫羊藿样品在 0~11 min 内的 UHPLC-Q-TOF/MS^E 指纹图谱进行主成分分析, 得到 PCA 得分图以便更直观的了解栽培与野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿样本间的差异情况。

结果

1 淫羊藿化学成分的鉴定

采用所建立的 UHPLC-Q-TOF/MS^E 方法快速分析

箭叶、天平山、柔毛淫羊藿, 样品 BPI 图见图 1。在 UNIFI 软件中创建分析方法并对采集数据进行分析, 软件自动标识经处理后的可信数据, 给出保留时间、化学式、质量数误差、标识的高能量碎片数目等信息。通过与对照品总结得出的裂解规律及相关文献^[19-23]的匹配与确证, 共利用 UNIFI 鉴定箭叶、天平山、柔毛淫羊藿中化合物 32 个, 见表 2。

淫羊藿中主要化学成分多为 8-异戊烯基取代的黄酮苷类成分, 在 C-3 位和 C-7 位多连有糖基, 糖基种类多为葡萄糖、鼠李糖和木糖。通过对照品的裂解碎片可知, 在负离子模式下出现 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 且大多数化合物会伴随较高丰度的 $[M+HCOO]^-$ 以及 $[M+2H_2O-H]^-$ 加合离子峰。此外在负离子模式下先丢失 7 位所连糖基, 而在正离子模式下更倾向于丢失 3 位上的糖基。

色谱峰 10 在负离子模式下存在 m/z 661.214 3 $[M-H]^-$ 、707.219 4 $[M+HCOO]^-$ 和 697.189 5 $[M+2H_2O-H]^-$ 的母离子以及碎片离子 m/z 499.159 9 $[M-H-162]^-$ 和 353.103 5 $[M-H-162-146]^-$ 。正离子模式下显示 m/z 663.226 8 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰以及碎片离子 m/z 517.168 9 $[M+H-146]^+$ 和 355.117 4 $[M+H-146-162]^+$, 推测其 3 位连有 1 个甲基五碳糖 (鼠李糖), 7 位连有 1 个六碳糖 (葡萄糖), 与文献核对后认为其为 epimedinoside A, 同时与 UNIFI 自动鉴定结果一致, 最终确定色谱峰 10 为 epimedinoside A。

在负离子模式下, 色谱峰 20 存在 m/z 819.271 5 $[M-H]^-$ 、865.276 9 $[M+HCOO]^-$ 和 855.245 7 $[M+2H_2O-H]^-$ 的准分子离子峰, 负离子高能量时依次出现碎片离子 m/z 657.218 7 $[M-H-162]^-$ 、513.175 9 $[M-H-162-144]^-$ 和 367.118 4 $[M-H-162-144-146]^-$ 以及母核 4' 位上甲基断裂后碎片离子 m/z 352.093 6 $[M-H-162-144-$

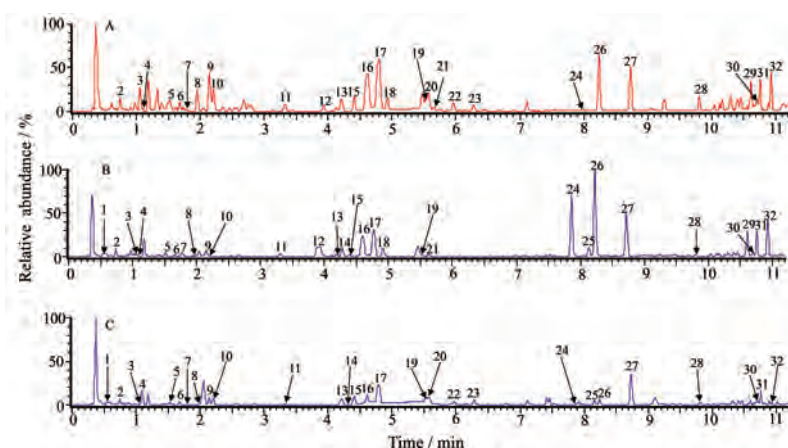


Figure 1 BPI chromatograms of three *Epimedium* species in negative ion mode by UHPLC-Q-TOF/MS^E analysis. A: *E. sagittatum* (JY-ZP-1); B: *E. myrianthum* (TPS-ZP-1); C: *E. pubescens* (RM-ZP-1). The peak numbers hereby are consistent with those in Table 2

Table 2 Identification results of chemical constituents in three *Epimedium* species by UHPLC-Q-TOF/MS^E. *Compound identified by comparing with reference standard. *E. s.*: *E. sagittatum*; *E. m.*: *E. myrianthum*; *E. p.*: *E. pubescens*. (-): Negative ion mode; (+): Positive ion mode

Peak No.	<i>t_R</i> /min	Precursor ion	Experimental mass	Error (mDa)	Formula	Fragment ion	Identification	<i>E. s.</i>	<i>E. m.</i>	<i>E. p.</i>	Ref.
1	0.56	[M-H] ⁻	353.086 7	-0.7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191, 179, 173, 135 (-)	Chlorogenic acid	-	+	+	[19,20]
2	0.75	[M-H] ⁻	337.093 2	0.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191, 173, 163, 137 (-)	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	+	+	+	[19]
3	1.05	[M-H] ⁻	463.087 3	-0.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301 (-)	Hyperoside	+	+	+	[19,20]
4	1.10	[M-H] ⁻	577.154 8	-0.9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	431, 285 (-)	Kaempferol-3- <i>O</i> -dirhamnoside	+	+	+	[19]
		[M+H] ⁺	579.171 0	-0.4		433, 287 (+)	or its isomers				
5	1.53	[M-H] ⁻	447.093 5	-0.8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	301, 271, 255 (-)	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	449.108 4	-1.1		303, 273, 257 (+)					
6	1.68	[M-H] ⁻	677.208 8	0.6	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₆	515, 353 (-)	Hexandraside E	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	679.222 6	-1.2		517, 355 (+)					
7	1.79	[M-H] ⁻	823.264 9	-1.2	C ₃₈ H ₄₈ O ₂₀	661, 515, 353 (-)	Diphyllaside A or its isomers	+	+	+	[19]
		[M+H] ⁺	825.278 9	-2.8		663, 517, 355 (+)					
8	1.95	[M-H] ⁻	563.138 4	-1.7	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	284 (-)	Kaempferol-7- <i>O</i> -rhamnopyranosyl-xylopyranoside	+	+	+	[22]
		[M+H] ⁺	565.156 6	0.9		433, 287 (+)					
9	2.14	[M-H] ⁻	431.098 1	0.3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	285 (-)	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	+	+	+	[20]
		[M+H] ⁺	433.110 9	-2.4		287 (+)					
10	2.21	[M-H] ⁻	661.214 3	1.1	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅	499, 353 (-)	Epimedeside A	+	+	+	[19]
		[M+H] ⁺	663.226 8	-2.1		517, 355 (+)					
11	3.32	[M-H] ⁻	837.281 5	-0.2	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	675, 529, 383 (-)	Sagittasine A	+	+	+	[19]
		[M+H] ⁺	839.297 4	2.3		693, 547, 385 (+)					
12	3.92	[M-H] ⁻	837.281 5	-0.2	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	675, 367, 352 (-)	Epimedin A I*	+	+	-	[19,20]
		[M+H] ⁺	839.293 4	-4.0		677, 531, 369, 313 (+)					
13	4.20	[M-H] ⁻	837.281 5	-0.2	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	675, 367, 352 (-)	Epimedin A*	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	839.297 4	-1.4		677, 531, 369, 313 (+)					
14	4.29	[M-H] ⁻	807.270 0	-1.2	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	645, 367, 352 (-)	Isomer of 15	-	+	+	
		[M+H] ⁺	809.281 5	-5.3		677, 531, 369, 313 (+)					
15	4.41	[M-H] ⁻	807.270 1	-1.2	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	645, 367, 352 (-)	Epimedin B*	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	809.281 5	-5.3		677, 531, 369, 313 (+)					
16	4.62	[M-H] ⁻	821.285 2	-1.6	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	659, 513, 367, 351 (-)	Epimedin C*	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	823.297 6	-4.9		677, 531, 369, 313 (+)					
17	4.79	[M+HCOO] ⁻	721.235 6	1.2	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	513, 367, 351 (-)	Icariin*	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	677.240 0	-4.5		531, 369, 313 (+)					
18	4.92	[M-H] ⁻	819.271 5	0.3	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	657, 513, 367, 352 (-)	Isomer of 19	+	+	-	[19]
		[M+HCOO] ⁻	865.276 9	0.3							
19	5.51	[M-H] ⁻	819.271 5	0.3	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	657, 513, 367, 352 (-)	3'''-Carbonyl-2''- β -L-quinovosyl-icariin*	+	+	+	
		[M+H] ⁺	821.285 9	-0.9		531, 369, 313 (+)					
20	5.54	[M-H] ⁻	819.271 5	0.3	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	657, 513, 367, 352 (-)	Isomer of 19	+	-	+	
		[M+H] ⁺	821.285 9	-0.9		531, 369, 313 (+)					
21	5.66	[M-H] ⁻	821.288 8	2.0	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	659, 513, 367, 352 (-)	Baohuoside VI	+	+	-	[19]
22	5.93	[M-H] ⁻	717.239 3	-0.2	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₆	571, 513, 367, 351 (-)	Anhydroicaritin-3- <i>O</i> -(acetyl)-glucopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside	+	-	+	[22]
		[M+HCOO] ⁻	763.244 9	-0.1							
23	6.25	[M-H] ⁻	819.271 5	0.3	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	657, 513, 367, 352 (-)	Isomer of 19	+	-	+	
24	7.87	[M-H] ⁻	675.217 3	-1.2	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	367, 352 (-)	Sagittatoside A*	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	677.244 5	-1.2		369, 313 (+)					
25	8.14	[M-H] ⁻	645.217 3	-1.0	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄	367, 352 (-)	Sagittatoside B*	-	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	647.234 1	-0.1		369, 313 (+)					
26	8.24	[M-H] ⁻	659.234 6	0.6	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₄	367, 352 (-)	2''- <i>O</i> -rhamnopyranosyl	+	+	+	[19,20]
		[M+H] ⁺	661.249 6	-1.5		369, 313 (+)	Icariside II*				
27	8.73	[M-H] ⁻	513.175 9	-0.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	366, 351, 323 (-)	Icariside II*	+	+	+	[21]
		[M+H] ⁺	515.191 0	-0.7		369, 313 (+)					
28	9.80	[M-H] ⁻	337.107 2	-0.4	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	282 (-)	Yinyanghuo D or its isomers	+	+	+	[23]
		[M+H] ⁺	339.123 2	-2.2		283 (+)					
29	10.62	[M-H] ⁻	421.166 8	1.7	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	351, 296 (-)	Yinyanghuo B or its isomers	+	+	-	[20,23]
		[M+H] ⁺	423.178 5	-2.3		405, 353, 296 (+)					

Continued

Peak No.	t_R /min	Precursor ion	Experimental mass	Error (mDa)	Formula	Fragment ion	Identification	<i>E. s.</i>	<i>E. m.</i>	<i>E. p.</i>	Ref.
30	10.71	[M-H] ⁻	367.118 4	0.2	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	309, 297, 281 (-)	Icaritin	+	+	+	[20]
31	10.77	[M-H] ⁻	405.170 3	0.1	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	350 (-)	5,7,4'-Trihydroxy-8,3'-di-	+	+	+	[21]
		[M+H] ⁺	407.185 6	-0.2		351, 295 (+)	prenyl-flavone or its isomers				
32	10.94	[M-H] ⁻	405.170 3	0.1	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	350 (-)	5,7,4'-Trihydroxy-8,3'-di-	+	+	+	[21]
		[M+H] ⁺	407.185 6	-0.2		351, 295 (+)	prenyl-flavone or its isomers				

146-CH₃]⁻。正离子模式下显示母离子 m/z 821.285 9 [M+H]⁺ 以及碎片离子 m/z 531.184 9 [M+H-144-146]⁺ 和 369.132 0 [M+H-144-146-162]⁺ 以及母核 8 位上异戊烯基断裂后碎片离子 m/z 313.070 5 [M+H-144-146-162-C₄H₇]⁺，推测该化合物 7 位连有一个葡萄糖，3 位连有一个鼠李糖和与 3'''-羰基-2''-β-L-喹诺糖分子量相同的基团。该化合物母离子及碎片裂解信息与峰 19 相同，因此判断该化合物与峰 19 互为同分异构体。

2 栽培与相应野生淫羊藿指纹图谱与 PCA 分析

采用所建立的 UHPLC-Q-TOF/MS^E 方法快速分析所有淫羊藿样品，并将采集的所有样品在 0~11 min 内指纹图谱进行 PCA 分析，所得 PCA 得分图见图 2。图中的点代表不同的样品，较为聚集表示其化学成分组成相似，反之，则差异较大。PCA 结果表明栽培与相应野生的箭叶、天平山、柔毛淫羊藿化学成分差异较小，说明栽培环境和生长方式等因素的改变并没有对栽培后淫羊藿化学成分组成产生较大影响。

3 栽培与野生淫羊藿化学成分相对含量分析

采用所建立的 UHPLC-PDA 方法对所有淫羊藿样品在紫外 ($\lambda=270$ nm) 下有较高响应的 12 个黄酮类化合物进行相对定量 (以 12 个化合物峰面积值代表其相对含量)，这 12 个化合物分别为峰 10 (epimedeside A)、峰 12 (epimedin A I)、峰 13 (epimedin A)、峰 14 (isomer of epimedin B)、峰 15 (epimedin B)、峰 16 (epimedin C)、峰 17 (icariin)、峰 19 (3'''-carbonyl-2''-β-L-quinovosyl-icariin)、峰 24 (sagittatoside A)、峰 25 (sagittatoside B)、

峰 26 (2''-O-rhamnopyranosyl icariside II)、峰 27 (icariside II)，所得 UHPLC-PDA 图见图 3。将箭叶、天平山、柔毛淫羊藿的栽培与相应野生以及其他野生样本中 12 个黄酮类化合物相对含量结果分别以热图形式呈现，其中黄色字编号代表栽培淫羊藿，紫色字编号代表与栽培相应的野生淫羊藿，黑色字编号代表其他野生淫羊藿，结果见图 4。

由于选择栽培的相应野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿样本是从大量野生样本中遴选出的较优种质，其淫羊藿苷 (Peak17) 相对含量较其他野生样本高。由图 4 可知，栽培与相应野生的箭叶、天平山、柔毛淫羊藿分别聚为一类，说明二者有着相似的化合物含量分布。其次栽培样本的淫羊藿苷相对含量也较高，说明人工栽培及生长方式等因素的改变并未对栽培淫羊藿化学成分含量产生较大变化，且相应野生样本的高含量特性可以遗传和延续。

4 栽培与野生淫羊藿总黄酮相对含量分析

将 12 个黄酮类成分的相对含量相加得到总黄酮相对含量^[24,25]，栽培与相应野生以及其他野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿总黄酮相对含量如图 5 所示，其中黄色代表栽培样本，紫色代表与栽培相应的野生样本，蓝色代表其他野生样本。

由于选择栽培的相应野生淫羊藿为较优种质，其总黄酮相对含量均高于其他野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿。将该野生种质进行大规模栽培后，栽培箭叶、天平山、柔毛淫羊藿样本总黄酮相对含量与相应野生样

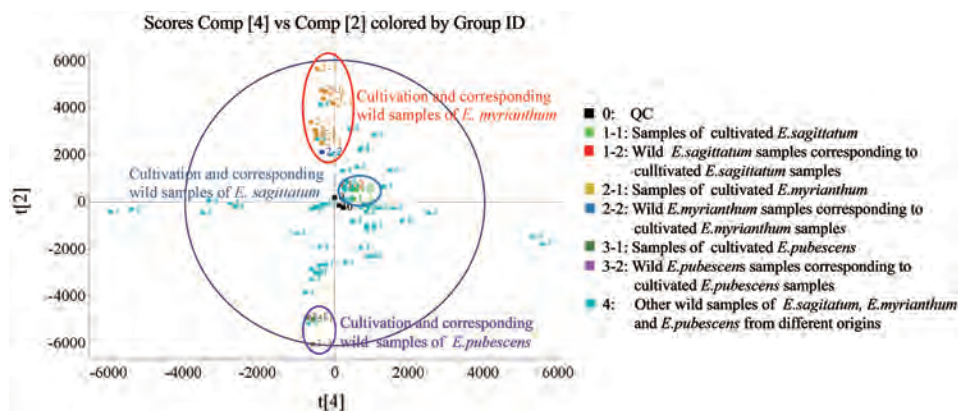


Figure 2 PCA/Scores plot of three *Epimedium* species

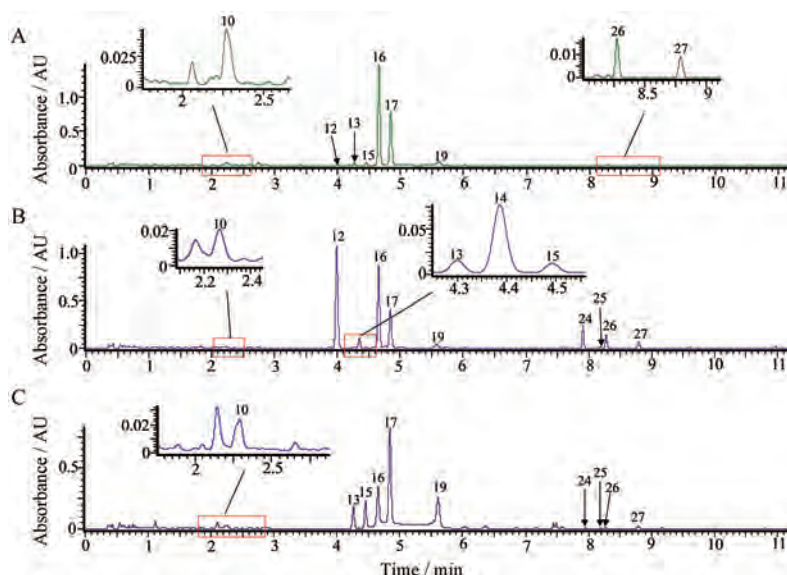


Figure 3 UHPLC-PDA chromatograms of three cultivated *Epimedium* species. A: *E. sagittatum* (JY-ZP-1); B: *E. myrianthum* (TPS-ZP-1); C: *E. pubescens* (RM-ZP-1); Peak numbers are consistent with Table 2

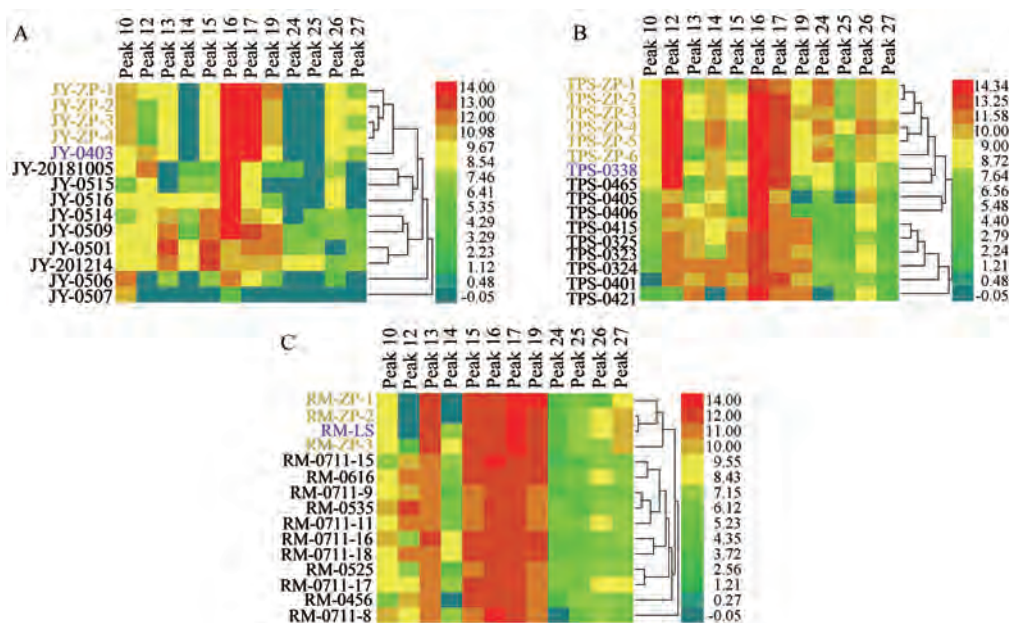


Figure 4 Heatmap of relative content distribution of 12 flavonoids in three *Epimedium* species. A: *E. sagittatum*; B: *E. myrianthum*; C: *E. pubescens* (Sample number and peak number are consistent with Table 1 and Table 2, respectively)

本较接近,且与其他野生箭叶、天平山、柔毛淫羊藿相比,栽培淫羊藿样本质量稳定性较好。

讨论

UHPLC是一种具高分离度和高速度特性的现代分离技术,具有良好的分离效果和更高的峰容量;Q-TOF/MS^E作为检测器具有高灵敏度的特点,在优化的条件下可以使中药中大多数结构类型的化合物均有响应,并通过测定精确分子量推测化合物的元素组成及分子式,还可通过解析其中碎片离子信息了解化合物裂解

的碎片结构,从而进行化合物的结构鉴定。UHPLC-Q-TOF/MS^E技术可以更好地用于中药指纹图谱的表征与化学成分的快速鉴定,UHPLC-Q-TOF/MS^E指纹图谱具有表征全成分的特点,进行质量分析可以体现中药成分组成的整体性;结合PCA分析方法可以全面了解多基原、多产地等中药所含化学成分的差异性问题^[26,27]。再将其与UHPLC-PDA相结合,对中药化学成分进行相对定量,从而对药材进行较全面的质量分析和控制^[28]。

本文基于UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E从定性和相

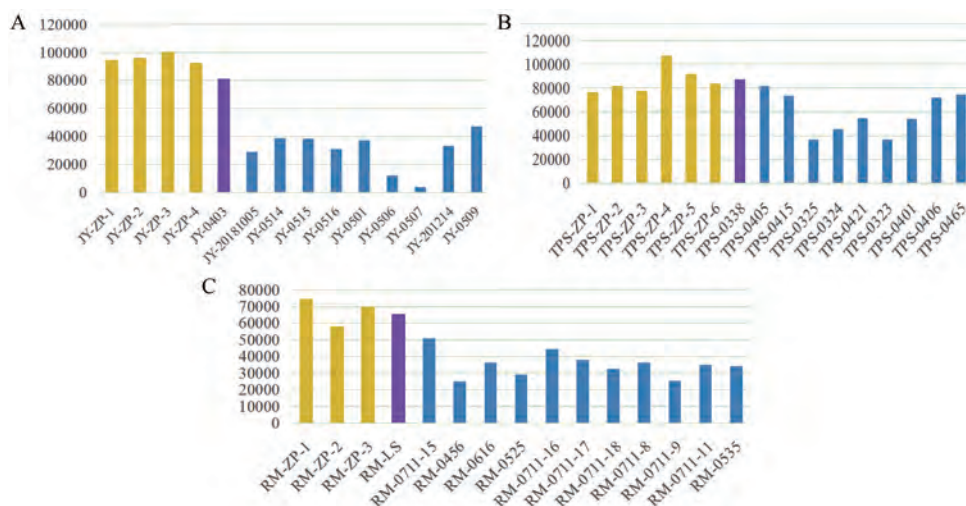


Figure 5 The relative content of total flavonoids in three *Epimedium* species. A: *E. sagittatum*; B: *E. myrianthum*; C: *E. pubescens*. Sample numbers are consistent with Table 1

对定量两方面成功建立了栽培淫羊藿药材的质量分析方法, 实现了对栽培箭叶、天平山、柔毛淫羊藿化学成分的整体性评价。结果表明栽培后箭叶、天平山、柔毛淫羊藿化学成分组成及含量与相应野生淫羊藿较相似, 从而说明栽培环境和生长方式等因素的改变并未对大规模栽培后淫羊藿样本化学成分组成及含量产生较大影响, 且通过大量野生样本遴选出的优质种质的高含量特性可以遗传和延续, 因此对箭叶、天平山、柔毛淫羊藿的栽培是成功的。本实验为淫羊藿药材栽培推广及资源合理开发利用提供了科学依据, 同时也为其他中药材的质量评价提供了一种方法和模式。

致谢: 本论文的栽培样品来自于国药集团同济堂(贵州)药业有限公司贵州雷山基地和四川乐山基地, 由杨相波、李砾、姜志海和金华提供。

References

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 327-328.

[2] Indran IR, Zhang SJ, Zhang ZW, et al. Selective estrogen receptor modulator effects of *Epimedium* extracts on breast cancer and uterine growth in nude mice [J]. *Planta Med*, 2014, 80: 22-28.

[3] Peng S, Zhang G, Zhang BT, et al. The beneficial effect of icaritin on osteoporotic bone is dependent on the treatment initiation timing in adult ovariectomized rats [J]. *Bone*, 2013, 55: 230-240.

[4] Liang HR, Vuorela P, Vuorela H, et al. Isolation and immunomodulatory effect of flavonol glycosides from *Epimedium humanense* [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 316-319.

[5] Yap SP, Shen P, Li J, et al. Molecular and pharmacodynamic properties of estrogenic extracts from the traditional Chinese

medicinal herb, *Epimedium* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113: 218-224.

[6] Jiang J, Cui L, Sun E, et al. Material basis for anti-osteoporosis efficacy of *Epimedium* flavonoids based on their *in vivo* metabolism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 721-729.

[7] Qin WH, Liu X, Zhang J, et al. Quality evaluation of fifteen varieties of *Epimedii Folium* from different growing areas [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2017, 39: 1889-1895.

[8] He SZ, Xu WF, Wang YY, et al. *Epimedium* medicinal plant germplasm resources [J]. *Guizhou Sci (贵州科学)*, 2012, 30: 9-14.

[9] Stearn WT. Four more Chinese species of *Epimedium* (Berberidaceae) [J]. *Kew Bull*, 1998, 53: 213-223.

[10] He SZ, Wang YY, Xu WF, et al. Research on flavonoids in leave of *Epimedium myrianthum* and *Epimedium acuminatum* in Guizhou for different growth phase [J]. *Guizhou Sci (贵州科学)*, 2008, 26: 34-37.

[11] Guo BL, Xiao PG. Review on the main types of Chinese herbal medicine *Epimedium* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2003, 28: 303-306.

[12] Pei LK, Huang WH, He TG, et al. Systematic study on the quality of the main resources of Chinese herbal medicine *Epimedium* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 2217-2222.

[13] Zhang YJ, Dang HS, Li SY, et al. Five new synonyms in *Epimedium* (Berberidaceae) from China [J]. *PhytoKeys*, 2015, 49: 1-12.

[14] Xu YQ, Chen JJ, Ge F, et al. Status and thoughts on quality assessment of *Herba Epimedii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2010, 41: 661-666.

[15] Zhang HF, Yang XH, Guo YR, et al. Current status and prospects of sustainable utilization of medicinal plant *Epimedium* resources [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2009, 44: 363-368.

[16] Guo BL, Huang WH, Sun E, et al. *Epimedium* medicinal herbs

- and decoction market survey [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 1687-1689.
- [17] He SZ, Guo BL. Study on the Quality of *Epimedium* in Guizhou [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16: 291-294.
- [18] Xu Y, Shi HJ, Liu SX, et al. Quality evaluation of *Epimedium sagittatum* in different populations based on icariin contents [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 2284-2290.
- [19] Yu XE, Qin JP, Li JC, et al. Rapid analysis on chemical constituents in Yinyanghuo Zonghuangtong capsule by UPLC/Q-TOF-MS/MS [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41: 4587-4597.
- [20] Ma WJ, Yao GZ, Jia Q, et al. Qualitative analysis on chemical constituents from *Epimedium brevicornu* by UPLC-Q-TOF MS/MS [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2019, 22: 1554-1558.
- [21] Sun XG, Zhang J, Zhao Y, et al. Comprehensive analysis and quality assessment of *Herba Epimedii* from multiple botanical origins based on ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and photodiode array detector [J]. *J Supercrit Fluid*, 2019, 149: 1-9.
- [22] Zhao HY, Sun JH, Fan MX, et al. Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1190: 157-181.
- [23] Gan JS, Ma Y, Wang ZY, et al. Analysis on chemical constituents in *Epimedii Herba* by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2014, 29: 349-352.
- [24] Chen XJ, Zhang QW, Ji H, et al. Comparison of UV spectrophotometry and HPLC on quantitative determination of total flavonoids of *Herba Epimedii* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27: 625-630.
- [25] Gao SY, Li K, Xiong YF, et al. Identification of growth years of Hengshan imitative wild culture *Astragali Radix* and investigation into the accumulation rules of flavonoids and saponins [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 147-154.
- [26] Guo LX, Li R, Liu K, et al. Structural characterization and discrimination of Chinese medicinal materials with multiple botanical origins based on metabolite profiling and chemometrics analysis: *Clematidis Radix et Rhizoma* as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1425: 129-140.
- [27] Zheng W, Wang FX, Sun XG, et al. Analysis of chemical markers in sulfur-fumigated *Anemarrhenae Rhizoma* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42: 3530-3536.
- [28] Wang J, Zhang J, Zhang CN, et al. The qualitative and quantitative analyses of *Gelsemium elegans* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 172: 329-338.