基于 PMP 柱前衍生化 -HPLC 法的淫羊藿多糖的单糖指纹图谱研究

黄春跃[1]，杨子璇[1]，孙宜春[2]，李慧馨[2]，胡　晓[1]*

（1. 中国医药工业研究总院有限公司，上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203；
2. 国药集团同济堂（贵州）制药有限公司，贵州贵阳 550009）

摘要：建立了淫羊藿多糖酸水解的柱前衍生化单糖 HPLC 指纹图谱方法。淫羊藿多糖经 2.0 mol/L 盐酸水解，再经 1-苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮（PMP）衍生化处理后，用 HPLC 法测定其单糖组成。采用 YMC-Pack ODS-A 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以磷酸盐缓冲液 - 乙腈为流动相，流速为 0.8 mL/min，检测波长为 254 nm。采用 2012 年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》，建立了 40 批淫羊藿样品的共有指纹图谱，确立了 10 个共有峰，通过与对照品比对，指认了 8 个共有峰，分别为 D- 甘露糖、D- 葡萄糖醛酸、鼠李糖、半乳糖醛酸、D- 无水葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。通过相似度结合正交偏最小二乘法，对 7 批巫山淫羊藿进行分析。结果显示，相似度小于 0.9，并得到 4 个差异性单糖成分。建立的指纹图谱方法简单、易操作，可为淫羊藿药材的质量评价提供参考。

关键词：淫羊藿；多糖；单糖；柱前衍生化；HPLC；指纹图谱

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2024）01-0081-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.010

Monosaccharide Fingerprint of *Epimedium* Polysaccharides Based on PMP Pre-column Derivatization and HPLC Method

HUANG Chunyue[1], YANG Zixuan[1], SUN Yichun[2], LI Huixin[2], HU Xiao[1]*

（*1. National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203;*
2. China National Pharmaceutical Group Corporation Tongjitang（Guizhou）Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550009）

ABSTRACT: The monosaccharide HPLC fingerprint method of *Epimedium* polysaccharides using acid hydrolysis by pre-column derivatization was established. The *Epimedium* polysaccharides were hydrolyzed into monosaccharides by 2.0 mol/L hydrochloric acid and derivatized by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone（PMP）. Then, the monosaccharide components were detected by HPLC. The YMC-Pack ODS-A column（4.6 mm×250 mm, 5 μm）was used with a mixture of phosphate buffer and acetonitrile as the mobile phase, in a flow rate of 0.8 mL/min and at a detection wavelength of 254 nm. The common fingerprints of forty batches of *Epimedii Folium* were established with ten common peaks by Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM（Version 2012）. Eight peaks in which were identified as D-mannose, D-glucuronic acid, rhamnose, galacturonic acid, D-glucose, galactose, xylose and arabinose by reference substances. Similarity analysis and orthogonal partial least squares analysis were applied to investigate the differences between *Epimedium* and seven batches of *E. wushanense* T.S.Ying. The similarities were less than 0.9, and four monosaccharides showing significant differences were distinguished. The established method is simple and repeatable, which can provide references for the quality evaluation of *Epimedium*.

Key Words: *Epimedii Folium*; polysaccharide; monosaccharide; pre-column derivatization; HPLC; fingerprint

淫羊藿（*Epimedii Folium*）为小檗科淫羊藿属 *Epimedium* Linn. 植物，始载于《神农本草经》，是我国传统补益类中药。目前从淫羊藿中分离得到了黄酮、生物碱、木脂素，以及其他挥发性成分[1]。现代药理学研究表明，淫羊藿对骨骼、免疫、生殖及心脑血管等多种系统具有广泛的药理作用[2]。淫羊藿药材也是历版药典中的多基原药材之一，《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）规定淫羊藿为淫羊藿 *E. brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*（Sieb. et Zucc.）Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 和朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效，主治肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨萎软、风湿麻痹等病症。目前市场上流通的药材商品种类多达 15 种[3]，产地主要分布在甘肃、山西、四川、贵州以及东北各省区，华北及南方其他省区也有少量分布。由于淫羊藿属植物基原鉴别困难，而现有的淫羊藿质量评价体系又不完善，导致淫羊藿市场长期存在品种混乱的问题[4—5]。

国内外学者对淫羊藿药材的质量控制研究主要集中于淫羊藿苷以及朝藿定 A、B 和 C 等多种黄酮类成分的定性和定量分析[6—8]，以及利用指纹图谱结合化学计量学手段对淫羊藿药材进行质量评价[9—11]。淫羊藿多糖（*Epimedium* polysaccharides，**1**）是淫羊藿的主要活性组分之一，具有提高免疫[12]、抗氧化[13—14]等多种药理活性。目前对 **1** 的研究主要集中在提取工艺、分离、纯化以及生物活性等方面[15]；尚未见不同品种 **1** 单糖组成的系统研究。由于单糖类物质本身无紫外吸收基团，无法用紫外检测器直接分析，多采用 1- 苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮（1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone，PMP）柱前衍生化 -HPLC 法进行检测。PMP 和单糖在碱性、温和条件下形成的衍生物能被紫外检测器检出[16—18]。

笔者前期已经对 ChP 2020 收载的淫羊藿和巫山淫羊藿 *E. wushanense* T.S.Ying 的 HPLC-PDA 指纹图谱进行了深入研究[10]，因此本研究以 **1** 和巫山淫羊藿多糖（*E. wushanense* polysaccharides，**2**）为研究对象，采用盐酸水解和 PMP 柱前衍生化 -HPLC 法分析其单糖组成并建立指纹图谱，进一步通过相似度分析结合化学计量学的研究，为淫羊藿药材的整体质量评价提供参考。

1　仪器与试药

U3000 型高效液相色谱仪［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］；MS204S 型电子天平（精度 0.1 mg）、MS105DU 型电子天平（精度 0.1 mg）（瑞士梅特勒 - 托利多公司）。

D- 甘露糖（**3**，批号 200642-190401）、D- 无水葡萄糖（**4**，批号 110833-201908）、半乳糖（**5**，批号 100226-201506）均购自中国食品药品检定研究院；D- 葡萄糖醛酸（**6**，批号 P1706627）、半乳糖醛酸（**7**，批号 P1434497）均购自阿达玛斯贝塔（上海）化学试剂有限公司；鼠李糖（**8**，批号 020048-202007）、木糖（**9**，批号 130033-202007）均购自上海鸿永生物科技有限公司；阿拉伯糖（**10**，成都德斯特生物技术有限公司，批号 DSTDB13302）；以上所有对照品的质量分数均大于 98.0%。PMP（国药集团化学试剂有限公司，含量≥ 99.0%，批号 20170810）；乙腈为色谱级，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

淫羊藿（编号 S1 ～ S10）、朝鲜淫羊藿（编号 S11 ～ S20）、柔毛淫羊藿（编号 S21 ～ S30）、箭叶淫羊藿（编号 S31 ～ S40）和巫山淫羊藿（编号 S41 ～ S47），均由国药集团同济堂（贵州）制药有限公司提供，由中国医药工业研究总院有限公司吴彤研究员分别鉴定为淫羊藿 *E. brevicornu* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*（Sieb. et Zucc.）Maxim. 和巫山淫羊藿 *E. wushanense* T.S.Ying. 的干燥叶，样品详细信息如表 1 所示。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 YMC-Pack ODS-A 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液（KH_2PO_4-NaOH，pH 7.2）和乙腈（体积比 81 ∶ 19），等度洗脱；

收稿日期：2023-05-11

基金项目：国家自然科学基金项目（32270421）、上海市自然科学基金项目（21ZR1461800）、中央引导地方科技发展资金项目（GZIM 202001-9-2）

作者简介：黄春跃（1977—），女，副研究员，从事中草药的活性成分及质量控制研究。

通信作者：胡　晓（1983—），男，研究员，从事天然先导化合物发现及中药药效物质基础研究。

E-mail：xjtuyxhx@126.com

检测波长 254 nm；柱温 30 ℃；流速 0.8 mL/min；进样量 5 μL。

2.2 1 的提取及溶液配制

1 的提取（多糖样品的制备）：取淫羊藿药材粉末［编号 S6，过 3 号筛［筛孔内径为（355±55）μm］］适量，采用回流提取法，按料液比 1 ∶ 25 加入试验用水，提取温度为 100 ℃，提取 3 次，每次 1.5 h。滤液合并后减压浓缩至 10 mL，加入 1/3 体积的 Sevag 试剂（氯仿和正丁醇，体积比 4 ∶ 1），摇床振摇 30 min，离心（5 200×*g*）取上清液，加入无水乙醇使含乙醇含量达到 80%，于 4 ℃放置 12 h，离心（5 200×*g*）取沉淀，低温干燥，即得到多糖样品。

供试品溶液：取上述多糖样品 100 mg，精密称定，置顶空瓶中，加入 2 mol/L 盐酸 0.5 mL，封口，混匀，于 110 ℃水解 1 h，放冷，用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 中性，加水定容至 10 mL，得多糖水解液；精密吸取上述多糖水解液 400 μL，加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 200 μL，混合后加入 0.5 mol/L PMP- 甲醇溶液 480 μL，混匀，置 70 ℃水浴中反应 90 min，冷却后加入 0.5 mol/L 盐酸 200 μL，混匀，用三氯甲烷洗涤 3 次，每次 4 mL，弃去三氯甲烷相，水层用 0.22 μm 滤膜过滤后即得。

对照品溶液：取 **3** ～ **10** 对照品适量，精密称定，分别加入甲醇，制成每 1 mL 含 **3** ～ **10** 0.4 mg 的溶液；精密吸取上述溶液各 12 μL 于离心管中，混匀后加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 50 μL，混匀，加入 0.5 mol/L PMP- 甲醇溶液 120 μL，置 70 ℃水浴中加热 90 min，立即冷却，加入 0.5 mol/L 盐酸 50 μL，混匀，加氯仿 1 mL 振摇 30 s，吸弃氯仿层，重复萃取 2 次，水相用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

取“**2.2**”项下的对照品溶液，按“**2.1**”项下的色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，分别计算共有峰 1 ～ 10 的峰面积及保留时间的 RSD。结果

表 1 40 批淫羊藿（编号 S1 ～ S40）**和 7 批巫山淫羊藿**（编号 S41 ～ S47）**样品的来源信息**

Tab.1 Source Information on Forty Batches of *Epimedii Folium*（No.S1 – S40）and Seven Batches of *E. wushanense* T.S.Ying（No.S41 – S47）

编号	来源	产地	编号	来源	产地
S1	淫羊藿	甘肃省平凉市华亭县西华镇	S25	柔毛淫羊藿	四川省
S2	淫羊藿	甘肃省平凉市华亭县马峡镇	S26	柔毛淫羊藿	四川省
S3	淫羊藿	甘肃省平凉市崆峒区大寨乡	S27	柔毛淫羊藿	四川省
S4	淫羊藿	甘肃省陇南市礼县城关镇	S28	柔毛淫羊藿	四川省
S5	淫羊藿	甘肃省陇南市礼县石桥镇	S29	柔毛淫羊藿	四川省
S6	淫羊藿	甘肃省陇南市礼县龙林镇	S30	柔毛淫羊藿	四川省
S7	淫羊藿	甘肃省天水市武山县城关乡	S31	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县丹江镇桃子寨
S8	淫羊藿	甘肃省定西市漳县殪虎桥镇	S32	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县丹江镇桃子寨
S9	淫羊藿	甘肃省陇南市宕昌县理川镇	S33	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县丹江镇脚雄村
S10	淫羊藿	甘肃省五都市安化镇	S34	箭叶淫羊藿	贵州省雷山基地
S11	朝鲜淫羊藿	吉林省通化县西江镇	S35	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S12	朝鲜淫羊藿	辽宁省本溪市	S36	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S13	朝鲜淫羊藿	吉林省白山市抚松县	S37	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S14	朝鲜淫羊藿	吉林省白山市抚松县	S38	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S15	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S39	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S16	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S40	箭叶淫羊藿	贵州省雷山县螺蛳桥
S17	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S41	巫山淫羊藿	贵州省雷山基地
S18	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S42	巫山淫羊藿	贵州省雷山基地沿河
S19	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S43	巫山淫羊藿	贵州省
S20	朝鲜淫羊藿	吉林省通化市集安市	S44	巫山淫羊藿	贵州省
S21	柔毛淫羊藿	四川省乐山市	S45	巫山淫羊藿	贵州省
S22	柔毛淫羊藿	四川省成都市同心乡	S46	巫山淫羊藿	贵州省
S23	柔毛淫羊藿	四川省眉山市本溪乡	S47	巫山淫羊藿	贵州省雷山基地
S24	柔毛淫羊藿	四川省青神县白果乡			

显示，共有峰 1 ～ 10 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.89%、0.13%、0.53%、1.06%、1.04%、0.75%、0.93%、1.08%、0.53%、0.75%，均小于 2%；10 个共有峰的保留时间 RSD（*n*=6）分别为 0.41%、1.29%、1.17%、1.35%、1.51%、1.65%、0.97%、1.10%、1.95%、1.43%，均小于 2%，说明仪器的精密度良好。

2.3.2　重复性试验

取 **1** 样品（S6），按“**2.2**”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录色谱图，分别计算各共有峰的峰面积及保留时间的 RSD。结果显示，10 个共有峰的峰面积 RSD（*n*=6）分别为 2.52%、2.47%、2.55%、2.71%、2.90%、2.53%、2.98%、2.88%、2.99%、2.50%，均小于 3%；供试品溶液中 10 个共有峰的保留时间 RSD（*n*=6）分别为 0.41%、1.29%、1.17%、1.35%、1.51%、1.65%、0.97%、1.10%、1.95%、1.43%，均小于 2%，表明方法的重复性良好。

2.3.3　稳定性试验

取 **1** 样品（S6），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件检测，记录色谱图，分别计算各共有峰峰面积及保留时间的 RSD。结果显示，24 h 内 10 个共有峰的峰面积 RSD（*n*=7）分别为 2.79%、1.24%、2.19%、2.88%、2.90%、2.95%、2.46%、2.98%、2.30%、2.97%，均小于 3%；保留时间 RSD（*n*=7）分别为 1.93%、1.84%、1.57%、1.83%、1.16%、1.64%、1.60%、1.77%、1.95%、1.96%，均小于 2%，表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.4　**1** 的 PMP 柱前衍生化 -HPLC 指纹图谱的建立及评价

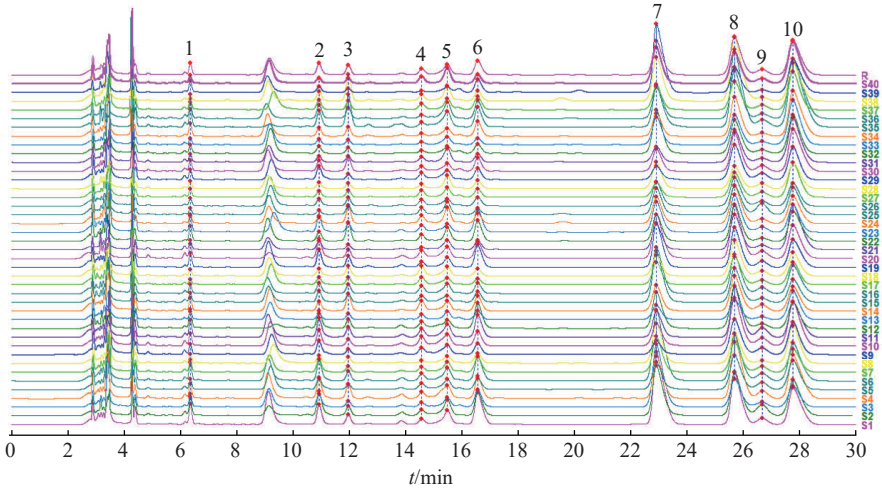
2.4.1　**1** 的单糖指纹图谱的建立

取 **1** 样品（S1 ～ S40），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，将 HPLC 的色谱图原始数据转换成 CDF 格式文件，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件（2012 年版），选择 S1 作为参照图谱，采用中位数法，时间宽度为 0.1 min，经多点校正后的匹配结果如图 1 所示，相似度评价结果如表 2 所示，确定共有峰有 10 个，依次为峰 1 ～峰 10。

由表 2 的相似度结果可见，除淫羊藿（S3）和箭叶淫羊藿（S39）与对照图谱 R 的相似度小于 0.900 外，其他 38 批次的 **1** 样品与对照图谱 R 的相似度均大于 0.930，说明 **1** 的 4 个基原样品的单糖组成相似度较高，差异不明显。

2.4.2　共有峰的指认

按“**2.2**”项下方法制备对照品溶液和 **1**、**2** 供



3—**3**；4—**6**；5—**8**；6—**7**；7—**4**；8—**5**；9—**9**；10—**10**。

图 1　1 水解的单糖 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 R

Fig.1　Monosaccharide HPLC Fingerprints and Reference Fingerprint R of Hydrolyzed **1**

表 2 1 水解的单糖 HPLC 指纹图谱相似度结果

Tab.2 Similarity Results of Monosaccharide HPLC Fingerprints of **1**

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.949	S11	0.972	S21	0.968	S31	0.933
S2	0.982	S12	0.975	S22	0.985	S32	0.984
S3	0.867	S13	0.962	S23	0.984	S33	0.962
S4	0.984	S14	0.986	S24	0.986	S34	0.967
S5	0.998	S15	0.939	S25	0.986	S35	0.970
S6	0.947	S16	0.975	S26	0.998	S36	0.966
S7	0.981	S17	0.996	S27	0.948	S37	0.976
S8	0.984	S18	0.978	S28	0.989	S38	0.967
S9	0.960	S19	0.978	S29	0.959	S39	0.884
S10	0.969	S20	0.985	S30	0.970	S40	0.981

试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录 HPLC 色谱图，结果如图 2 所示。通过与对照品的保留时间对比，结果指认出共有峰峰 3 到峰 10，按照保留时间顺序依次为 **3**、**6**、**8**、**7**、**4**、**5**、**9**、**10**，共 8 个单糖。

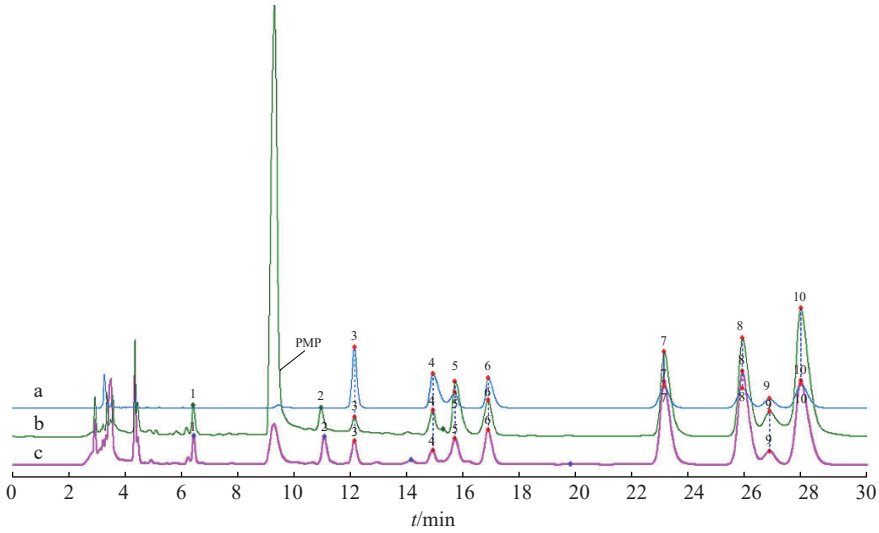
2.4.3 巫山淫羊藿相似度的评价

取 7 批巫山淫羊藿样品（S41 ～ S47），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，将 HPLC 的色谱图原始数据转换成 CDF 格式文件，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件（2012 年版），选择淫羊藿对照指纹图谱 R 为参照图谱，采用中位数法，时间宽度为 0.1 min，经多点校正后进行峰匹配，匹配结果如图 3 所示，计算出 S41 ～ S47 相似度较低，均低于 0.900，分别为 0.815、0.864、0.844、0.845、0.838、0.617 和 0.678。由图 3 可见，**2** 的水解单糖与 **1** 的水解单糖在种类上是相同的，但还是具有一定的差异。

2.4.4 主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）

为了进一步分析 **2** 与 **1** 水解所得单糖的差异，将 7 批巫山淫羊藿与 40 批淫羊藿的 10 个单糖共有峰的峰面积通过 SPSS 18.0 软件进行标准化处理，然后将数据导入 SIMCA-P13.0 统计分析软件。以 10 个共有峰峰面积经标准化处理后的值为变量 *X*、各样品的批次为变量 *Y*，进行 PCA 和 OPLS-DA 处理，结果如图 4 和图 5 所示。OPLS-DA 处理得到的变量重要性投影（VIP）如图 6 所示。

由图 4 可见，淫羊藿、朝鲜淫羊藿、柔毛淫羊藿、箭叶淫羊藿聚在一起，但互有交叉，说明 4 种基原淫羊藿多糖部位的相似度很高，差异不明显；巫山淫羊藿与淫羊藿之间的点没有交叉，说明相互之间差异较大。由图 5 可见，通过 OPLS-DA 处理可将巫山淫羊藿与淫羊藿分离开，说明巫山淫羊藿



3—**3**；4—**6**；5—**8**；6—**7**；7—**4**；8—**5**；9—**9**；10—**10**。

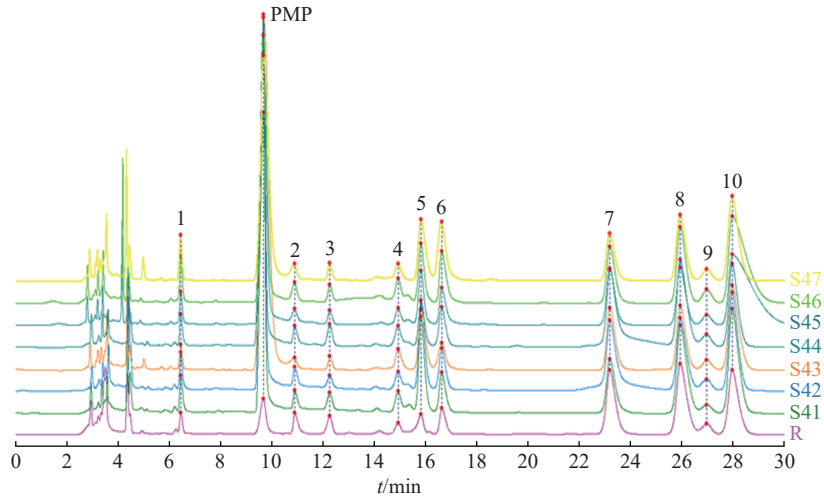
图 2 混合单糖对照品（a）、2 水解样品（b）和 1 水解样品（c）的 PMP 衍生化色谱图

Fig.2 HPLC Chromatograms of the Mixed Monosaccharide Standards (a), **2** Hydrolyzed Polysaccharides (b) and **1** Hydrolyzed Polysaccharides (c) by PMP Derivatization

与淫羊藿之间差异较明显。VIP 值是筛选差异性化合物的重要指标，VIP 值越高，对组间差异的影响越大。以 VIP 值 >1 为阈值，可筛选出 4 个单糖成分，按 VIP 值大小排序依次为峰 5(**8**) > 峰 1> 峰 4(**6**) > 峰 6(**7**)，提示这 4 个成分是 **2** 水解样品与 **1** 水解样品的主要差异性单糖成分。

3　讨论

本试验还对供试品前处理方法进行了考察，主要从水解试剂（盐酸和三氟乙酸）、2.0 mol/L 盐酸用量（0.5、1、2、3、4 mL）、水解时间（0.5、1、2、3、4 h）、衍生化试剂 PMP- 甲醇溶液用量（30、60、120、180 μL）以及衍生化反应时间（15、30、



3—**3**；4—**6**；5—**8**；6—**7**；7—**4**；8—**5**；9—**9**；10—**10**。

图 3　2 水解的单糖指纹图谱

Fig.3　Monosaccharide HPLC Fingerprints of Hydrolyzed **2**

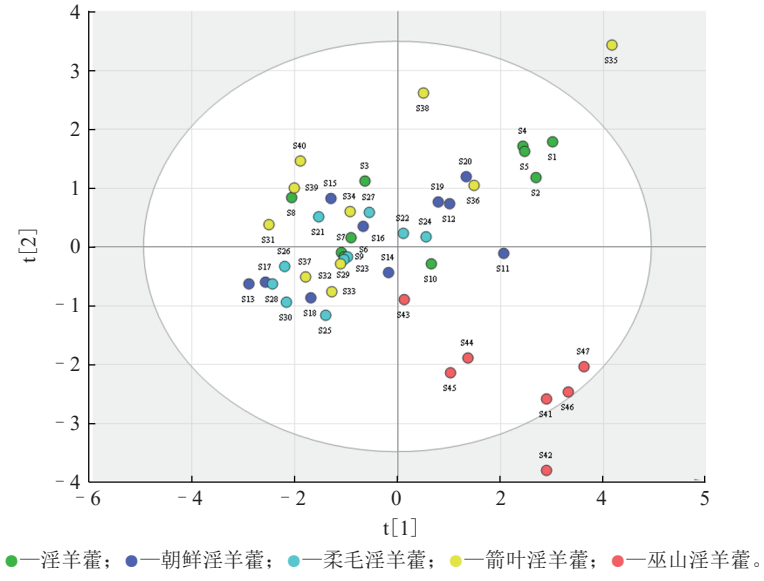


图 4　样品的 PCA 得分

Fig.4　PCA Scores of Samples

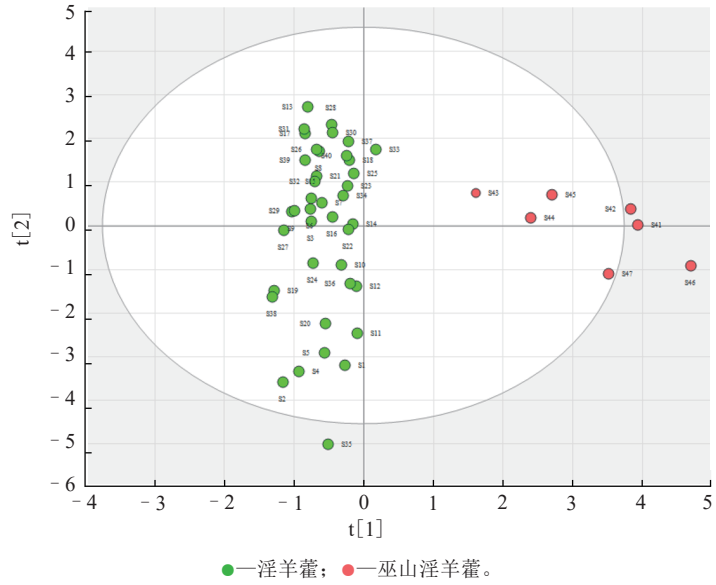


图 5 样品 OPLS-DA 得分

Fig.5 OPLS-DA Scores of Samples

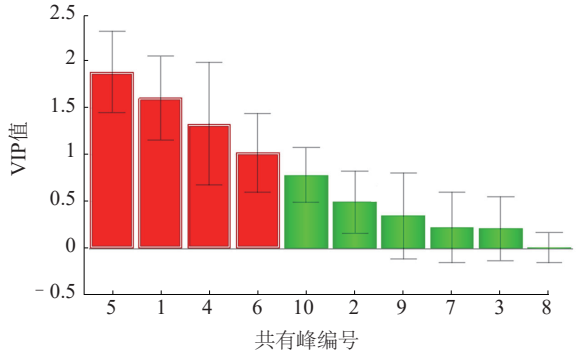


图 6 共有峰的 VIP 值

Fig.6 VIP Values of Common Components

60、90、120 min）等多方面对 **1** 样品水解后所得 10 个共有峰的影响进行考察。综合多方面因素，最终得到如上所示的 **1** 供试品溶液制备参数。本试验还考察了 HPLC 流动相中水相组分磷酸盐缓冲液的不同 pH 值（6.8、7.2 和 7.4）对洗脱效果的影响，观察到 pH 7.2 时各色谱峰的分离度较高、基线较为平稳。同时，考察了 XBridge®C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Halo® C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，2.7 μm）、Atlantis®T3 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）和 YMC-Pack ODS-A 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）对分离效果的影响。结果显示，采用 YMC-Pack ODS-A 色谱柱时，各个峰的分离度较好。此外，还考察了柱温分别为 25、30、35 ℃时的分离效果，结果柱温为 30 ℃时各个峰的分离度较好；调节流速为 0.6、0.8、1.0 mL/min，结果显示 0.8 mL/min 时各个峰的分离度较好。分别采用 U3000 型高效液相色谱仪和 1260 Infinity 型高效液相色谱仪检测，各峰的出峰时间和分离度差别不大，表明该方法的仪器耐用性良好。

本试验建立了基于 PMP 柱前衍生化 -HPLC 法的 **1** 水解单糖指纹图谱。该方法精密度、稳定性和重复性均符合规定，确定了 10 个峰作为共有峰。经与对照品比对，指认了 8 个共有峰。**1** 主要由 6 种中性单糖（**3**、**8**、**4**、**5**、**9** 和 **10**）、2 种酸性单糖（**6** 和 **7**）组成。对 40 批 **1** 的相似度评价结果显示，4 个不同基原淫羊藿之间单糖组成一致，相似度较高；与同属 7 批巫山淫羊藿的相似度评价结果显示，巫山淫羊藿与淫羊藿之间相似度小于 0.90，表明二者差异较大，所建立的淫羊藿对照指纹图谱具有一定的鉴别能力。进一步对 10 个共有峰的峰面积进行 PCA 和 OPLS-DA 处理，观察到淫羊藿、朝鲜淫羊藿、柔毛淫羊藿和箭叶淫羊藿之间互有交叉，也表明差异不明显，验证了相似度评价所得出的结果；

而巫山淫羊藿可与淫羊藿基本分开，表明两者之间具有较大差异，差异性成分主要为**8**、**6**、**7**和1个未知成分。

本研究首次开展了**1**的单糖组成研究，通过酸水解结合PMP柱前衍生化-HPLC法，建立了**1**水解的单糖指纹图谱。采用相似度分析和化学计量学分析明确了**1**与**2**的水解单糖指纹图谱具有较大差异，该试验结果可为淫羊藿的整体质量评价体系的建立提供参考。本研究的不足之处在于：①采用的巫山淫羊藿批次较少，后续可以采集更多不同产地的样品对试验内容做进一步充实和完善；②共有峰中还有2个是未知单糖峰（峰1和2），后续可以考虑采用GC-MS等技术进一步对**1**水解样品中的未知共有峰进行确证。

参考文献：

[1] JIANG J, SONG J, JIA X B. Phytochemistry and ethnopharmacology of *Epimedium L*. species [J]. *Chin Herb Med*, 2015, **7**(3): 204-222.

[2] 龚华乾, 高　敏, 柴艺汇, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. 湖北民族大学学报, 2021, **38**(4): 75-78.

[3] 袁　航, 曹树萍, 陈抒云, 等. 淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2014, **45**(24): 3630-3640.

[4] 康　帅, 鲁　静, 张　继, 等. 淫羊藿药典品的基原调查及性状显微鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2018, **43**(4): 696-703.

[5] 邓爱平, 方文韬, 周青罡, 等. 淫羊藿质量影响因素及质控对策分析[J]. 中国中药杂志, 2018, **43**(5): 1062-1070.

[6] 秦伟瀚, 刘　翔, 张　军, 等. 不同产地15个品种淫羊藿的质量评价[J]. 中成药, 2017, **39**(9): 1889-1895.

[7] 周　茗, 郑　伟, 郭宝林, 等. 基于UHPLC-PDA-Q-TOF/MSE技术的栽培淫羊藿质量研究[J]. 药学学报, 2020, **55**(5): 995-1003.

[8] 王常顺, 段吉平, 康　帅, 等. 淫羊藿药材及饮片质量分析与标准制定[J]. 中国现代中药, 2020, **22**(7): 1006-1015.

[9] QU L L, HUANG C Y, LI H X, *et al*. Chemical markers of four species of *Epimedium* used in drug Yin-Yang-Huo [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2020, **88**: 103983.

[10] XU N, ZHOU G, LI X, *et al*. Geographical classification of *Epimedium* based on HPLC fingerprint analysis combined with multi-ingredients quantitative analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, **31**(5): e3871.

[11] 姚林才, 陈　帅, 卿大双, 等. HPLC指纹图谱化学模式识别法评价淫羊藿药材质量一致性[J]. 亚太传统医药, 2017, **13**(5): 27-30.

[12] QIN T, REN Z, YI L, *et al*. Immunological modulation effects of an acid *Epimedium* polysaccharide on immune response in chickens [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **70**: 56-66.

[13] XIANG Y X, ZHANG J, LI H F, *et al*. *Epimedium* polysaccharide alleviates polyglutamine-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* by reducing oxidative stress [J]. *Rejuv Res*, 2017, **20**(1): 32-41.

[14] 李晓兵, 丁云录, 李驰坤, 等. 淫羊藿多糖的提取分离及体内抗氧化活性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2020, **36**(5): 908-912.

[15] KE L, DUAN X, CUI J, *et al*. Research progress on the extraction technology and activity study of *Epimedium* polysaccharides [J]. *Carbohyd Polym*, 2023, **1**: 120602.

[16] 杨艳君, 李　畅, 陈菲菲, 等. 淫羊藿多糖组成分析及其免疫调节作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, **47**(16): 4358-4364.

[17] 曹宇欣, 李　科, 秦雪梅, 等. 基于糖特征图谱及免疫细胞活性研究的不同产地黄芪的质量评价[J]. 药学学报, 2019, **54**(7): 1277-1287.

[18] 黄小兰, 何旭峰, 杨　勤, 等. PMP柱前衍生化HPLC法测定地参多糖的单糖组成[J]. 食品与发酵工业, 2020, **46**(7): 250-256.