

· 资源与质量评价 ·

# 不同产地巫山淫羊藿指纹图谱的主成分、因子和聚类分析

王悦云\*, 王雪飞, 刘娇, 徐文芬\*  
(贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的:采用 HPLC 建立巫山淫羊藿的指纹图谱,结合主成分、因子和聚类分析对不同产地巫山淫羊藿综合品质进行研究,为其质量评价提供理论基础。方法:采用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,25%~26% A;5~6 min,26%~34% A;6~11 min,34%~38.5% A;11~17 min,38.5%~100% A;17~20 min,100% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 270 nm,柱温 30 ℃。结果:聚类分析较好地对不同产地的巫山淫羊藿进行分类,贵州产巫山淫羊藿和重庆巫山淫羊藿在聚类分析中明显分为二类,相距较远,说明由于环境气候的影响,不同产地的淫羊藿在品质上存在差异。主成分、因子分析结果,重庆巫山淫羊藿质量总体优于贵州产巫山淫羊藿,其中 CQWS-02(重庆市巫山县官阳镇鸦鹊村),CQWS-10(重庆市巫山县官阳镇河湾)两个产地的样品在优质品种筛选时可重点考虑。另外,1号(朝藿定 A),2号(朝藿定 B),4号(淫羊藿苷),5号(未知成分)共有峰可作为巫山淫羊藿质量评价指标成分。结论:通过主成分、因子和聚类分析,可实现快速分析,发挥各自优势,互相验证和补充,多方面综合评判不同产地巫山淫羊藿药材的质量。

**[关键词]** 巫山淫羊藿; 高效液相; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

**[中图分类号]** R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0165-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190717

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181217.1807.011.html>

**[网络出版时间]** 2018-12-19 11:04

## Fingerprint of *Epimedium wushanense* Based on Principal Component, Factor and Cluster Analysis

WANG Yue-yun\*, WANG Xue-fei, LIU Jiao, XU Wen-fen\*

(Pharmaceutical College of Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprint of *Epimedium wushanense* by HPLC, and study the comprehensive quality of *E. wushanense* by combining principal components, factors and cluster analysis, so as to provide theoretical basis for its quality evaluation. **Method:** The chromatographic column was Agilent infinitylab poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> (3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm), the flow phase was acetonitrile (A) -water (B) with a gradient of 0-5 min, 25% -26% A; 5-6 min, 26% -34% A; 6-11 min, 34% -38.5% A; 11-17 min, 38.5% -100% A; 17-20 min, 100% A, the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 270 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The cluster analysis better classified *E. wushanense* from different producing areas. *E. wushanense* from Guizhou province and *E. wushanense* from Chongqing were classified as class II. *E. wushanense* from Guizhou province and Chongqing were far apart, indicating that the quality of *E. wushanense* varies from place to place affected by environment and climate. The results of principal component

**[收稿日期]** 20180510(019)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360624);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合 ZY 字[2013]3007 号);贵州省国内一流学科建设项目(GNYL[2017]008);贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合 KY 字[2017]018);贵州省 2017 年一流大学(一期)重点建设项目(黔教高发[2017]158)

**[第一作者]** 王悦云, 硕士, 副教授, 从事药用植物系统学与质量研究工作, E-mail: yueyun\_wang@126.com

**[通信作者]** \* 徐文芬, 教授, 从事药用植物质量评价与研究, E-mail: 736588202@qq.com

analysis showed that the quality of *E. wushanense* produced in Chongqing was better than that of *E. wushanense* produced in Guizhou. Among them, CQWS-02 (Yaque village, Guanyang town, Wushan county, Chongqing) and CQWS-10 (Hewan, Guanyang town, Wushan county, Chongqing) can be considered in the selection of high-quality varieties. In addition, No. 1 common peak (epimedin A), No. 2 common peak (epimedin B), No. 4 common peak (icariin) and No. 5 common peak (unknown component) in the fingerprint of the test samples could be used as the evaluation index components of *E. wushanense* quality. **Conclusion:** Principal components, factors and cluster analysis are used to achieve the rapid analysis, and their respective advantages are brought into full play for mutual verification and supplement. And the quality of *E. wushanense* in different origins can be comprehensively evaluated in all-round ways.

[**Key words**] *Epimedium wushanense*; high performance liquid phase; fingerprint; principal component analysis; cluster analysis

巫山淫羊藿为小檗科淫羊藿属多年生宿根性草本药用植物,该属植物我国目前分布约 40 余种,多数种类在当地做淫羊藿药材入药,其中 5 种被 2015 年版《中国药典》收载,即巫山淫羊藿、柔毛淫羊藿、淫羊藿、朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿。淫羊藿药材含有以黄酮类化合物为主的多种生理活性化学成分,具有补肝肾、助阳益精、祛风湿、降血压、降血糖、抗衰老、抗肿瘤等功效,是最为广泛利用、最具开发潜力的传统中药之一<sup>[1-7]</sup>,也是国际上多年来重点研究的药用植物,受到了国内外学者的高度重视。巫山淫羊藿中的主要活性成分有淫羊藿苷和朝藿定 C,其中朝藿定 C 的含量远高于淫羊藿苷,因此巫山淫羊藿的质量控制指标有区别于其他淫羊藿,2015 年版《中国药典》(一部)将其单列,表明巫山淫羊藿有其独特之处,但迄今对巫山淫羊藿的研究中,其质量研究的指标成分过于单一,不能较全面反映其他成分的情况,且指标间存在一定的相关性和独立性,难以真正控制其质量,加之过度采集、放牧和长期不合理的利用,致使其野生资源日益枯竭,因此保护这一重要资源,并加以进一步的合理开发和利用是很有必要的<sup>[8-9]</sup>。采用 HPLC 建立巫山淫羊藿的指纹图谱,结合主成分、因子和聚类分析对巫山淫羊藿综合品质进行研究,以期有效利用资源、减少药材产地带来的质量差异、筛选质量评价指标成分,为淫羊藿药材的鉴定和质量评价提供科学依据。

主成分分析和因子分析的主要目的是以最少的信息丢失为代价将众多的观测变量浓缩为少数几个因素,从而简化问题,或发现事物的内在联系,因子分析最常用的因子提取法就是主成分法<sup>[10-11]</sup>。聚类分析是将样本划为不同类群进行相似性评价的方法<sup>[12]</sup>,具一定可靠性<sup>[13]</sup>,当样本量较大时,聚类分析会比较困难,主成分、聚类分析的结合应用,可以

避免各自的一些弊端<sup>[14-16]</sup>。

## 1 材料

Ulti Mate 3000 型高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器,UV 检测器,自动进样系统, Thermo chromeleon7 色谱工作站,美国 Thermo Fisher 公司), InfinityLab Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm, 美国 Agilent 公司), AG135 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); SG8200HPT 型数控超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司), DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

无水乙醇、甲醇为分析纯(天津富宇精细化工有限公司),实验用水为重蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司)。

10 批重庆产巫山淫羊藿,23 批贵州产巫山淫羊藿,均由本课题组野外采集,并经贵阳中医学院王悦云副教授鉴定为小檗科巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense*,叶片阴干打粉过 3 号筛备用。产地详情见表 1。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备**<sup>[2,17]</sup> 对淫羊藿药材供试品溶液进行了提前方法、提取溶剂、提取时间、料液比及提取次数的考察和选择,确定供试品溶液的制备方法。取淫羊藿药材粉末 0.2 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 20 mL,称定质量,超声处理 40 min(功率 100 W,频率 40 Hz),冷却至常温,用 50% 乙醇溶液补足减失质量,摇匀过滤,过 0.22 μm 有机微孔滤膜,取续滤液,即得。分别精密称取朝藿定 A, B, C 和淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解分别制成含 0.225 6, 0.221 2, 1.310, 0.450 0 g·L<sup>-1</sup> 的储备液。精密吸取上述朝藿定 A, B, C 和淫羊藿苷对照品储备液 1, 1, 0.8,

表 1 巫山淫羊藿样品产地信息

Table 1 Sample origin information of *Epimedium wushanense* leaves

| 批次      | 采集时间       | 采集地点         | 海拔/m      | 经度         | 纬度          |
|---------|------------|--------------|-----------|------------|-------------|
| WS-01   | 2015-04-18 | 贵州省龙里县湾寨乡姨妈寨 | 1 045.00  | 26. 272 59 | 106. 933 03 |
| WS-02   | 2015-04-18 | 贵州省龙里县湾寨乡姨妈寨 | 1 128. 50 | 26. 272 90 | 106. 932 27 |
| WS-03   | 2015-04-18 | 贵州省龙里县湾寨乡姨妈寨 | 1 150. 40 | 26. 271 98 | 106. 932 42 |
| WS-04   | 2015-04-19 | 贵州省龙里县龙山镇猫猫头 | 1 114. 50 | 26. 443 91 | 106. 942 76 |
| WS-05   | 2015-05-01 | 贵州省雷山县丹江镇桃子寨 | 812. 60   | 26. 733 20 | 108. 060 90 |
| WS-06   | 2015-05-01 | 贵州省雷山县丹江镇桃子寨 | 996. 70   | 26. 433 20 | 108. 060 90 |
| WS-07   | 2015-05-01 | 贵州省雷山县郎德镇也改村 | 893. 30   | 26. 497 50 | 108. 036 80 |
| WS-08   | 2015-05-01 | 贵州省雷山县郎德镇也改村 | 892. 10   | 26. 497 50 | 108. 036 80 |
| WS-09   | 2015-05-02 | 贵州省雷山县西江镇    | 920. 10   | 26. 499 30 | 108. 038 40 |
| WS-10   | 2015-05-02 | 贵州省雷山县西江镇白碧  | 920. 10   | 26. 489 00 | 108. 155 60 |
| WS-11   | 2015-05-02 | 贵州省雷山县西江镇连成村 | 818. 90   | 26. 482 50 | 108. 142 60 |
| WS-12   | 2015-07-13 | 贵州省雷山县郎德镇也改村 | 951. 60   | 26. 500 79 | 108. 037 85 |
| WS-13   | 2015-07-13 | 贵州省雷山县郎德镇也改村 | 989. 60   | 26. 502 07 | 108. 036 52 |
| WS-14   | 2015-07-13 | 贵州省雷山县郎德镇也改村 | 944. 00   | 26. 490 00 | 108. 030 00 |
| WS-15   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县望丰乡五星村 | 1 147. 90 | 26. 361 79 | 108. 023 61 |
| WS-16   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县望丰乡五星村 | 1 163. 00 | 26. 360 00 | 108. 020 00 |
| WS-17   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县望丰乡五星村 | 1 152. 60 | 26. 359 93 | 108. 022 56 |
| WS-18   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县望丰乡五星村 | 1 154. 10 | 26. 360 93 | 108. 023 53 |
| WS-19   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县丹江镇羊排村 | 858. 20   | 26. 371 94 | 108. 093 85 |
| WS-20   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县丹江镇羊排村 | 640. 60   | 26. 370 12 | 108. 095 01 |
| WS-21   | 2015-07-14 | 贵州省雷山县丹江镇羊排村 | 852. 60   | 26. 368 26 | 108. 093 72 |
| WS-22   | 2015-07-15 | 贵州省雷山县丹江镇党高村 | 919. 30   | 26. 366 38 | 108. 084 93 |
| WS-23   | 2015-07-15 | 贵州省雷山县丹江镇党高村 | 934. 30   | 26. 363 88 | 108. 086 93 |
| CQWS-01 | 2015-05-31 | 重庆市巫山县官阳镇马王寨 | 1 024. 00 | 31. 339 66 | 109. 916 70 |
| CQWS-02 | 2015-06-01 | 重庆市巫山县官阳镇鸦鹊村 | 1 113. 90 | 31. 315 87 | 109. 916 72 |
| CQWS-03 | 2015-06-02 | 重庆市巫山县官阳镇雪马村 | 1 117. 90 | 31. 315 88 | 109. 916 72 |
| CQWS-04 | 2015-06-02 | 重庆市巫山县官阳镇雪马村 | 1 122. 00 | 31. 317 67 | 109. 917 01 |
| CQWS-05 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 386. 80 | 31. 365 96 | 109. 812 01 |
| CQWS-06 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 264. 90 | 31. 353 75 | 109. 848 51 |
| CQWS-07 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 338. 00 | 31. 352 69 | 109. 853 71 |
| CQWS-08 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 126. 10 | 31. 353 26 | 109. 838 13 |
| CQWS-09 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 281. 10 | 31. 354 63 | 109. 837 92 |
| CQWS-10 | 2015-06-03 | 重庆市巫山县官阳镇河湾  | 1 246. 30 | 31. 362 24 | 109. 839 46 |

1 mL,置于 5 mL 量瓶中混合,加甲醇溶液定容至刻度,摇匀,制得混合对照品溶液。

**2.2 色谱条件** InfinityLab Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 25% ~ 26% A; 5 ~ 6 min, 26% ~ 34% A; 6 ~ 11 min, 34% ~ 38.5% A; 11 ~ 17 min, 38.5% ~ 100% A; 17 ~ 20 min, 100% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 270 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 空白试验** 取 50% 乙醇溶液,按 2.2 项下色谱条件进行测定,结果试剂及流动相对淫羊藿指纹图谱测定没有干扰。

**2.3.2 完整性试验** 取 CQWS-05 号样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行检测。考察特征图谱记录的完整性,记录 20 min 后以梯度结束时的流动相比比例继续洗脱,并记录色谱图至 60 min。色谱图中 20 min 后未出现色谱峰,

表明采集 20 min 色谱图可基本完整记录淫羊藿药材化学成分信息。

**2.3.3 精密度试验** 取 CQWS-05 号样品,按照 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行检测,连续进样 6 次。记录色谱图,并计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0 ~ 1.1%,各共有峰相对峰面积 RSD 在 0.8% ~ 1.8%;将 6 次进样所得图谱导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件(以下简称相似度软件)进行处理。结果各色谱图与对照图谱相似度均 > 0.99,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取 CQWS-05 号样品 6 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件分别进样分析,各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0 ~ 1.0%,各共有峰的相对峰面积 RSD 在 0.8% ~ 2.8%;将 6 份样品图谱导入相似度软件进行处理,结果各色谱图与对照图谱的相似度均 > 0.99,说明所用方法重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取 CQWS-05 号样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件分别进样分析,分别在第 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 进样,记录其色谱图,计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0 ~ 1.0%,各共有峰相对峰面积 RSD

在 0.9% ~ 2.9%;将所得图谱导入相似度软件进行处理,结果各色谱图与对照图谱相似度均 > 0.98,表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

**2.4 巫山淫羊藿指纹图谱的建立** 取 33 批巫山淫羊藿样品按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行检测。将所得色谱图分别导入相似度软件进行处理,得到 33 批巫山淫羊藿药材的 HPLC 图谱,见图 1。设 CQWS-01 为参照图谱,进行多点校正并自动匹配,设定时间窗宽度为 0.5,按中位数法生成对照图谱,得到不同产地巫山淫羊藿指纹图谱相似度在 0.609 ~ 0.998,见表 2。

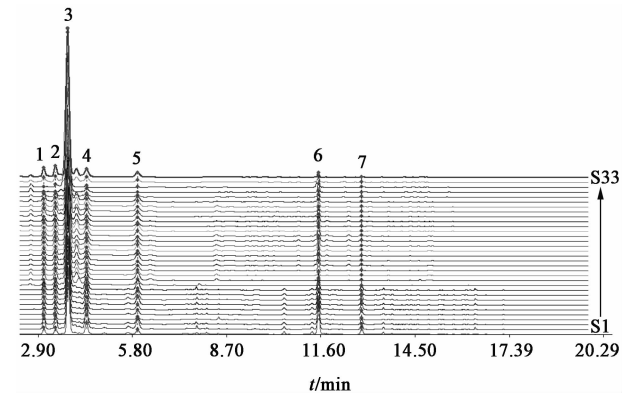


图 1 33 批巫山淫羊藿的 HPLC 叠加  
Fig. 1 HPLC overlapping chromatographic of 33 batches of *Epimedium wushanense*

表 2 33 批不同产地巫山淫羊藿指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of fingerprints of *Epimedium wushanense* of 33 batches in different regions

| 批次      | CQWS-01 | CQWS-02 | CQWS-03 | CQWS-04 | CQWS-05 | CQWS-06 | CQWS-07 | CQWS-08 | CQWS-09 | CQWS-10 | WS-01 | WS-02 | WS-03 | WS-04 | WS-05 | WS-06 | WS-07 | WS-08 | WS-09 |  |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| CQWS-01 | 1       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-02 | 0.957   | 1       |         |         |         |         |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-03 | 0.939   | 0.969   | 1       |         |         |         |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-04 | 0.804   | 0.803   | 0.859   | 1       |         |         |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-05 | 0.938   | 0.955   | 0.993   | 0.878   | 1       |         |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-06 | 0.949   | 0.959   | 0.992   | 0.870   | 0.990   | 1       |         |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-07 | 0.943   | 0.974   | 0.945   | 0.842   | 0.938   | 0.939   | 1       |         |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-08 | 0.968   | 0.986   | 0.952   | 0.813   | 0.944   | 0.944   | 0.974   | 1       |         |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-09 | 0.958   | 0.945   | 0.902   | 0.798   | 0.904   | 0.900   | 0.950   | 0.980   | 1       |         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| CQWS-10 | 0.902   | 0.963   | 0.939   | 0.804   | 0.920   | 0.934   | 0.941   | 0.941   | 0.890   | 1       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| WS-01   | 0.874   | 0.942   | 0.869   | 0.672   | 0.841   | 0.838   | 0.903   | 0.934   | 0.901   | 0.902   | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| WS-02   | 0.792   | 0.891   | 0.901   | 0.740   | 0.875   | 0.865   | 0.848   | 0.856   | 0.790   | 0.882   | 0.899 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |  |
| WS-03   | 0.804   | 0.903   | 0.910   | 0.745   | 0.884   | 0.876   | 0.860   | 0.867   | 0.801   | 0.894   | 0.912 | 0.995 | 1     |       |       |       |       |       |       |  |
| WS-04   | 0.884   | 0.950   | 0.882   | 0.681   | 0.853   | 0.855   | 0.911   | 0.939   | 0.901   | 0.913   | 0.995 | 0.902 | 0.914 | 1     |       |       |       |       |       |  |
| WS-05   | 0.845   | 0.932   | 0.932   | 0.750   | 0.905   | 0.900   | 0.886   | 0.896   | 0.827   | 0.917   | 0.929 | 0.969 | 0.982 | 0.935 | 1     |       |       |       |       |  |
| WS-06   | 0.797   | 0.889   | 0.900   | 0.740   | 0.874   | 0.866   | 0.845   | 0.853   | 0.788   | 0.880   | 0.900 | 0.992 | 0.991 | 0.903 | 0.969 | 1     |       |       |       |  |
| WS-07   | 0.871   | 0.927   | 0.851   | 0.660   | 0.822   | 0.823   | 0.891   | 0.925   | 0.903   | 0.885   | 0.979 | 0.878 | 0.888 | 0.975 | 0.916 | 0.873 | 1     |       |       |  |
| WS-08   | 0.800   | 0.892   | 0.852   | 0.659   | 0.822   | 0.826   | 0.850   | 0.855   | 0.791   | 0.887   | 0.887 | 0.899 | 0.900 | 0.895 | 0.897 | 0.899 | 0.868 | 1     |       |  |
| WS-09   | 0.817   | 0.909   | 0.867   | 0.672   | 0.837   | 0.840   | 0.866   | 0.872   | 0.807   | 0.903   | 0.907 | 0.888 | 0.899 | 0.914 | 0.924 | 0.884 | 0.901 | 0.868 | 1     |  |

续表 2

| 批次    | CQWS-01 | CQWS-02 | CQWS-03 | CQWS-04 | CQWS-05 | CQWS-06 | CQWS-07 | CQWS-08 | CQWS-09 | CQWS-10 | WS-01 | WS-02 | WS-03 | WS-04 | WS-05 | WS-06 | WS-07 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| WS-10 | 0.846   | 0.929   | 0.891   | 0.687   | 0.861   | 0.867   | 0.884   | 0.892   | 0.825   | 0.918   | 0.926 | 0.895 | 0.907 | 0.939 | 0.932 | 0.896 | 0.897 |
| WS-11 | 0.844   | 0.932   | 0.930   | 0.760   | 0.901   | 0.900   | 0.886   | 0.895   | 0.826   | 0.925   | 0.934 | 0.968 | 0.979 | 0.943 | 0.988 | 0.967 | 0.906 |
| WS-12 | 0.795   | 0.888   | 0.907   | 0.745   | 0.881   | 0.874   | 0.845   | 0.851   | 0.787   | 0.877   | 0.901 | 0.970 | 0.977 | 0.910 | 0.970 | 0.966 | 0.869 |
| WS-13 | 0.712   | 0.797   | 0.760   | 0.609   | 0.732   | 0.754   | 0.758   | 0.765   | 0.708   | 0.886   | 0.811 | 0.779 | 0.788 | 0.823 | 0.802 | 0.778 | 0.782 |
| WS-14 | 0.850   | 0.885   | 0.801   | 0.642   | 0.774   | 0.777   | 0.853   | 0.895   | 0.891   | 0.838   | 0.962 | 0.820 | 0.829 | 0.964 | 0.846 | 0.818 | 0.950 |
| WS-15 | 0.781   | 0.870   | 0.827   | 0.645   | 0.800   | 0.813   | 0.827   | 0.834   | 0.771   | 0.915   | 0.897 | 0.855 | 0.868 | 0.907 | 0.885 | 0.857 | 0.856 |
| WS-16 | 0.870   | 0.928   | 0.850   | 0.671   | 0.822   | 0.822   | 0.891   | 0.925   | 0.901   | 0.888   | 0.994 | 0.879 | 0.892 | 0.991 | 0.909 | 0.881 | 0.977 |
| WS-17 | 0.816   | 0.912   | 0.869   | 0.678   | 0.839   | 0.850   | 0.872   | 0.879   | 0.812   | 0.954   | 0.919 | 0.896 | 0.908 | 0.919 | 0.926 | 0.891 | 0.903 |
| WS-18 | 0.783   | 0.875   | 0.832   | 0.648   | 0.804   | 0.816   | 0.832   | 0.841   | 0.776   | 0.925   | 0.901 | 0.861 | 0.874 | 0.907 | 0.893 | 0.865 | 0.862 |
| WS-19 | 0.806   | 0.902   | 0.859   | 0.668   | 0.830   | 0.839   | 0.859   | 0.867   | 0.798   | 0.942   | 0.918 | 0.892 | 0.906 | 0.922 | 0.920 | 0.891 | 0.885 |
| WS-20 | 0.800   | 0.895   | 0.850   | 0.663   | 0.824   | 0.819   | 0.851   | 0.862   | 0.791   | 0.886   | 0.911 | 0.898 | 0.911 | 0.910 | 0.923 | 0.895 | 0.882 |
| WS-21 | 0.793   | 0.884   | 0.840   | 0.656   | 0.814   | 0.810   | 0.839   | 0.852   | 0.781   | 0.874   | 0.900 | 0.892 | 0.903 | 0.899 | 0.913 | 0.891 | 0.872 |
| WS-22 | 0.713   | 0.795   | 0.843   | 0.720   | 0.823   | 0.810   | 0.756   | 0.764   | 0.705   | 0.788   | 0.800 | 0.922 | 0.929 | 0.802 | 0.934 | 0.918 | 0.817 |
| WS-23 | 0.761   | 0.854   | 0.873   | 0.724   | 0.849   | 0.839   | 0.812   | 0.819   | 0.757   | 0.845   | 0.862 | 0.943 | 0.950 | 0.865 | 0.964 | 0.939 | 0.879 |
| R     | 0.857   | 0.956   | 0.910   | 0.707   | 0.880   | 0.881   | 0.909   | 0.917   | 0.847   | 0.947   | 0.958 | 0.935 | 0.949 | 0.963 | 0.968 | 0.933 | 0.935 |

| 批次      | WS-08 | WS-09 | WS-10 | WS-11 | WS-12 | WS-13 | WS-14 | WS-15 | WS-16 | WS-17 | WS-18 | WS-19 | WS-20 | WS-21 | WS-22 | WS-23 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CQWS-01 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| ∴       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-09   | 0.971 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-10   | 0.965 | 0.98  | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-11   | 0.901 | 0.919 | 0.943 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-12   | 0.864 | 0.881 | 0.907 | 0.983 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-13   | 0.775 | 0.791 | 0.822 | 0.828 | 0.799 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-14   | 0.813 | 0.830 | 0.868 | 0.871 | 0.842 | 0.777 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-15   | 0.846 | 0.866 | 0.905 | 0.908 | 0.883 | 0.964 | 0.854 | 1     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-16   | 0.871 | 0.890 | 0.913 | 0.922 | 0.889 | 0.805 | 0.978 | 0.89  | 1     |       |       |       |       |       |       |       |
| WS-17   | 0.885 | 0.907 | 0.915 | 0.925 | 0.886 | 0.932 | 0.836 | 0.956 | 0.897 | 1     |       |       |       |       |       |       |
| WS-18   | 0.854 | 0.872 | 0.905 | 0.909 | 0.880 | 0.968 | 0.845 | 0.995 | 0.890 | 0.971 | 1     |       |       |       |       |       |
| WS-19   | 0.881 | 0.894 | 0.917 | 0.928 | 0.891 | 0.947 | 0.849 | 0.981 | 0.903 | 0.983 | 0.986 | 1     |       |       |       |       |
| WS-20   | 0.968 | 0.973 | 0.965 | 0.916 | 0.873 | 0.779 | 0.822 | 0.866 | 0.890 | 0.905 | 0.875 | 0.911 | 1     |       |       |       |
| WS-21   | 0.969 | 0.971 | 0.961 | 0.906 | 0.864 | 0.771 | 0.813 | 0.857 | 0.880 | 0.893 | 0.865 | 0.902 | 0.998 | 1     |       |       |
| WS-22   | 0.776 | 0.822 | 0.799 | 0.909 | 0.930 | 0.693 | 0.729 | 0.764 | 0.784 | 0.804 | 0.771 | 0.793 | 0.799 | 0.79  | 1     |       |
| WS-23   | 0.833 | 0.881 | 0.859 | 0.940 | 0.947 | 0.747 | 0.785 | 0.822 | 0.845 | 0.865 | 0.828 | 0.851 | 0.852 | 0.842 | 0.982 | 1     |
| R       | 0.927 | 0.947 | 0.959 | 0.969 | 0.927 | 0.832 | 0.874 | 0.913 | 0.939 | 0.954 | 0.920 | 0.948 | 0.947 | 0.936 | 0.834 | 0.897 |

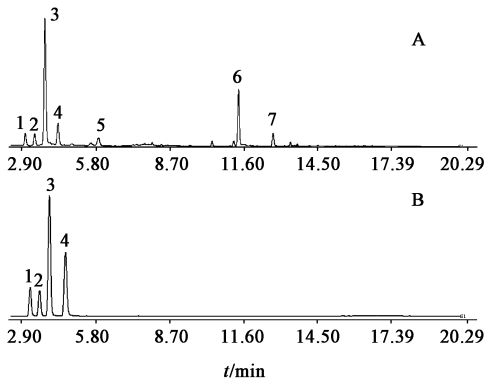
**2.5 巫山淫羊藿共有峰的标定及指认** 33 批巫山淫羊藿共标定 7 个共有峰, 设 CQWS-01 为参照图谱。其中 1, 2, 3, 4 号峰分别与朝藿定 A, B, C, 淫羊藿苷对照品保留时间一致, 见图 2。

不同产地巫山淫羊藿的各共有峰相对保留时间 RSD 在 0.4% ~ 1.0%, 各共有峰的相对峰面积 RSD 在 27.7% ~ 117.3%。

**2.6 巫山淫羊藿指纹图谱聚类分析** 将 33 批不同产地巫山淫羊藿指纹图谱共有峰峰面积导入 SPSS 16.0 软件进行 Q 型聚类分析。运用组间连接法进行系统聚类分析, 其中样品间距离的计算采用欧氏平方距离法, 聚类结果见图 3。

巫山淫羊藿聚类分析表明, CQWS-04, WS-21, WS-20 首先聚为一类, 其余批次为一类, 在上述的分类基础上, 其余批次分为两类, 其中 CQWS-02, CQWS-10, CQWS-09, CQWS-07, CQWS-08, CQWS-03, CQWS-05, CQWS-06, CQWS-01 聚为一类, WS-14, WS-04, WS-13, WS-06, WS-03, WS-01, WS-22, WS-19, WS-10, WS-11, WS-05, WS-09, WS-08, WS-02, WS-23, WS-12, WS-18, WS-17, WS-07, WS-16, WS-15 聚为一类。

**2.7 巫山淫羊藿指纹图谱主成分、因子分析** 用 SPSS 16.0 软件对 33 个不同产地巫山淫羊藿药材的 7 个共有峰(变量)峰面积原始数据进行标准化处



A. 混合对照品; B. 对照图谱 (CQWS-01); 1. 朝藿定 A; 2. 朝藿定 B; 3. 朝藿定 C; 4. 淫羊藿苷

图 2 巫山淫羊藿药材 HPLC 对照谱

Fig. 2 HPLC control map of *Epimedium wushanense*

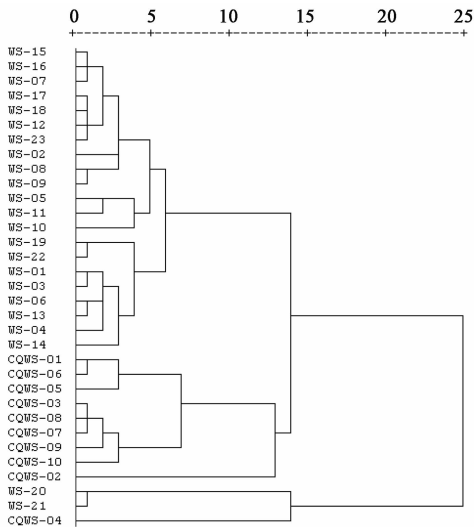


图 3 巫山淫羊藿指纹谱聚类树状关系

Fig. 3 Cluster tree diagram of fingerprint of *Epimedium wushanense*

理,以主成分的特征值及贡献率为依据,进行主成分因子分析,计算相关系数矩阵,主成分特征值、累积贡献率并计算主成分综合得分,对各产地淫羊藿品质进行评价。根据因子分析结果可得总方差解释表,对各变量进行因子提取和因子旋转的结果,结果见表 3,碎石图见图 4。

结合图 4 和表 3,巫山淫羊藿主成分分析中前 2 个主成分的特征值较大(均 > 1)且连线较陡峭,累积方差贡献率 85.049%,以因子的方差累计贡献率达到 85% 以上作为主成分提取的标准,提取前 2 个主成分进行分析较为合适,前 2 个主成分累计方差贡献率为 85.049%,前 2 个主成分可以反映整体指标 85.049% 的信息。其中提取主成分 1 的特征值为 3.407,其贡献率为 48.669%;提取主成分 2 的特征值为 2.547,贡献率为 36.380%。

表 3 巫山淫羊藿总方差解释变量

Table 3 Variance of total variance interpretation of *Epimedium wushanense*

| 成分 | 初始特征值 |        |         | 提取平方和载入 |        |        | 旋转平方和载入 |        |        |
|----|-------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
|    | 合计    | 方差 /%  | 累计 /%   | 合计      | 方差 /%  | 累计 /%  | 合计      | 方差 /%  | 累计 /%  |
| 1  | 3.407 | 48.669 | 48.669  | 3.407   | 48.669 | 48.669 | 3.390   | 48.430 | 48.430 |
| 2  | 2.547 | 36.38  | 85.049  | 2.547   | 36.380 | 85.049 | 2.563   | 36.619 | 85.049 |
| 3  | 0.543 | 7.754  | 92.803  |         |        |        |         |        |        |
| 4  | 0.257 | 3.672  | 96.475  |         |        |        |         |        |        |
| 5  | 0.154 | 2.204  | 98.679  |         |        |        |         |        |        |
| 6  | 0.075 | 1.068  | 99.747  |         |        |        |         |        |        |
| 7  | 0.018 | 0.253  | 100.000 |         |        |        |         |        |        |

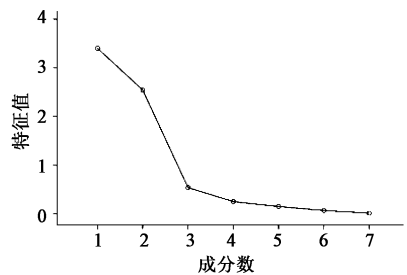


图 4 巫山淫羊藿碎石图

Fig. 4 Gravel map of *Epimedium wushanense*

每个样本都是由数个变量属性特征构成的,这些属性特征之间的关系,则可以利用载荷图来对图像特征进行描述,载荷的绝对值越大,对于主成分的影响就越大,而这种影响可以通过载荷所代表的点到原点之间的距离来衡量,见图 5。

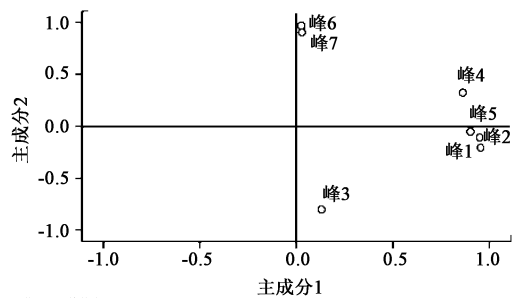


图 5 巫山淫羊藿共有峰指纹谱载荷

Fig. 5 Load diagram of fingerprint spectrum of common peak of *Epimedium wushanense*

进行正交旋转,得到巫山淫羊藿 7 个指标在 2 个主成分中的旋转成分矩阵,见表 4。

结合图 5 和表 4,在巫山淫羊藿投影图中选取距离原点较远的几个点,第一主成分中的信息主要

表 4 巫山淫羊藿成分矩阵

Table 4 Composition matrix of *Epimedium wushanense*

| 共有峰 | 主成分 1  | 主成分 2  |
|-----|--------|--------|
| 1   | 0.956  | 0.026  |
| 2   | 0.974  | -0.069 |
| 3   | 0.240  | -0.775 |
| 4   | 0.809  | 0.441  |
| 5   | 0.900  | 0.074  |
| 6   | -0.098 | 0.901  |
| 7   | -0.110 | 0.964  |

来自色谱峰 1,2,4,5。其中 1 号峰为朝藿定 A,2 号共有峰为朝藿定 B,4 号共有峰为淫羊藿苷,5 号峰为未知成分。

根据表 3,4,以  $Y_1, Y_2$  代表 2 个主成分来作为 33 个产地巫山淫羊藿成分所表达的信息,建立巫山淫羊藿品质的评价模型,得出如下成分的线性关系表达式分别为  $Y_1 = 0.956F_1 + 0.974F_2 + 0.240F_3 + 0.809F_4 + 0.900F_5 - 0.098F_6 - 0.110F_7$ ,  $Y_2 = 0.026F_1 - 0.069F_2 - 0.775F_3 + 0.441F_4 + 0.074F_5 + 0.901F_6 + 0.964F_7$ 。表达式中各变量不是原始变量,而是标准化变量。

将上述所得表达式,与所对应的 2 个主成分的方差贡献率做内积,得到巫山淫羊藿质量综合评价函数的表达式为  $Y_{\text{综合得分}} = (Y_1 \times 48.669 + Y_2 \times 36.38) / 85.049$ ,根据以上表达式得到不同产地巫山淫羊藿得分值及排序,见表 5。

分值越高表示该品种越好,综合得分越高,表明质量越好<sup>[18-22]</sup>。巫山淫羊藿综合得分由高到低样品批次分别为 CQWS-02(重庆巫山,4.745),CQWS-10(重庆巫山,3.096),CQWS-03(重庆巫山,2.185),CQWS-08(重庆巫山,1.792),CQWS-09(重庆巫山,1.761),WS-08(贵州雷山,1.761),WS-10(贵州雷山,1.539),WS-09(贵州雷山,1.479),CQWS-07(重庆巫山,1.376),WS-23(贵州雷山,1.332),WS-12(贵州雷山,1.081),WS-11(贵州雷山,1.072),CQWS-01(重庆巫山,0.632),WS-17(贵州雷山,0.558),CQWS-06(重庆巫山,0.470),WS-18(贵州雷山,0.379),WS-07(贵州雷山,0.020),WS-02(贵州龙里,0.018),WS-15(贵州雷山,0.005),WS-16(贵州雷山,-0.164),WS-13(贵州雷山,-0.180),WS-05(贵州雷山,-0.397),WS-04(贵州龙里,-0.452),CQWS-05(重庆巫

表 5 巫山淫羊藿主成分得分及综合得分排名

Table 5 Ranking of main component scores and comprehensive scores of *Epimedium wushanense*

| 批次      | 主成分 1  | 主成分 2  | 综合得分   | 排名 |
|---------|--------|--------|--------|----|
| CQWS-01 | -3.164 | 5.710  | 0.632  | 13 |
| CQWS-02 | 5.757  | 3.393  | 4.745  | 1  |
| CQWS-03 | 0.454  | 4.501  | 2.185  | 3  |
| CQWS-04 | -6.667 | 1.541  | -3.156 | 31 |
| CQWS-05 | -3.629 | 3.106  | -0.748 | 24 |
| CQWS-06 | -2.818 | 4.868  | 0.470  | 15 |
| CQWS-07 | -0.070 | 3.310  | 1.376  | 9  |
| CQWS-08 | 0.749  | 3.187  | 1.792  | 4  |
| CQWS-09 | 1.184  | 2.534  | 1.761  | 5  |
| CQWS-10 | 3.103  | 3.087  | 3.096  | 2  |
| WS-01   | -0.609 | -2.233 | -1.304 | 28 |
| WS-02   | 1.953  | -2.571 | 0.018  | 18 |
| WS-03   | -0.461 | -2.168 | -1.191 | 27 |
| WS-04   | -0.094 | -0.931 | -0.452 | 23 |
| WS-05   | -0.593 | -0.134 | -0.397 | 22 |
| WS-06   | -0.789 | -1.578 | -1.127 | 25 |
| WS-07   | 1.120  | -1.452 | 0.020  | 17 |
| WS-08   | 3.373  | -0.394 | 1.761  | 6  |
| WS-09   | 3.316  | -0.980 | 1.479  | 8  |
| WS-10   | 2.543  | 0.196  | 1.539  | 7  |
| WS-11   | 1.801  | 0.096  | 1.072  | 12 |
| WS-12   | 3.549  | -2.220 | 1.081  | 11 |
| WS-13   | 0.617  | -1.246 | -0.180 | 21 |
| WS-14   | -1.810 | -0.356 | -1.188 | 26 |
| WS-15   | 1.648  | -2.192 | 0.005  | 19 |
| WS-16   | 1.355  | -2.196 | -0.164 | 20 |
| WS-17   | 2.609  | -2.186 | 0.558  | 14 |
| WS-18   | 2.681  | -2.701 | 0.379  | 16 |
| WS-19   | -3.354 | -1.793 | -2.686 | 30 |
| WS-20   | -8.373 | -2.137 | -5.705 | 33 |
| WS-21   | -8.271 | -2.102 | -5.632 | 32 |
| WS-22   | -1.733 | -0.885 | -1.370 | 29 |
| WS-23   | 4.623  | -3.071 | 1.332  | 10 |

山,-0.748),WS-06(贵州雷山,-1.127),WS-14(贵州雷山,-1.188),WS-03(贵州龙里,-1.191),WS-01(贵州龙里,-1.304),WS-22(贵州雷山,-1.370),WS-19(贵州雷山,-2.686),CQWS-04(重庆巫山,-1.304),WS-21(贵州雷山,-5.632),WS-20(贵州雷山,-5.705)。

### 3 讨论

每个样品的非共有峰面积占总峰面积的比值均 < 20%, 符合指纹图谱要求。巫山淫羊藿的相似度极高, 表明巫山淫羊藿的化学成分种类不存在显著差异, 各共有峰的相对峰面积 RSD 差异大, 化学成分含量有显著差异, 巫山淫羊藿各产地质量较一致。聚类分析较好地对不同产地的巫山淫羊藿进行分类, 贵州产巫山淫羊藿和重庆巫山淫羊藿在聚类分析中明显分为二类, 相距较远, 说明由于环境气候的影响, 不同产地的淫羊藿在品质上存在差异。因此, 研究淫羊藿道地性具有一定可行性。主成分因子分析结果中, 重庆产巫山淫羊藿的综合得分最高且高分比例较大。因此, 重庆巫山淫羊藿质量总体优于贵州产巫山淫羊藿, 其中 CQWS-02 (重庆市巫山县官阳镇鸦鹊村), CQWS-10 (重庆市巫山县官阳镇河湾) 两个产地的样品在优质品种筛选时可重点考虑。另外, 1号(朝藿定A), 2号(朝藿定B), 4号(淫羊藿苷), 5号(未知成分) 共有峰可作为巫山淫羊藿质量评价指标成分。

高效液相色谱法, 可较全面地反映巫山淫羊藿药材中所含化学成分的信息。本实验通过对提取条件和色谱条件的优化建立的高效液相色谱法简便可行、具有一定的重复性和专属性, 且在20 min内基本采集完巫山淫羊藿药材化学成分信息, 效率高且经济, 可用于巫山淫羊藿药材的鉴别及质量评价。通过主成分、因子和聚类分析, 可实现快速分析, 发挥各自优势, 互相验证和补充, 多方面综合评判巫山淫羊藿药材的质量, 对高品质巫山淫羊藿品种的筛选具有重要的意义。为从多角度多方位分析研究中药开发提供更加全面的新思路。

#### [参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 29卷[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 79.  
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 167.  
[3] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿药材质量控制的问题与对策[J]. 中草药, 2009, 40(1): 160-163.  
[4] WANG C C, SU J Y, CAI J Y, et al. Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from *Epimedium* polysaccharides and studies on its tumor immune activities[J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(9): 1464-1471.  
[5] WANG C C, FENG L, SU J Y, et al. Polysaccharides from *Epimedium koreanum* Nakai with

immunomodulatory activity and inhibitory effect on tumor growth in LLC-bearing mice[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 207(31): 8-18.  
[6] 孙勇. 淫羊藿苷对髓母细胞瘤细胞生长的作用及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.  
[7] ZHOU J, MA Y H, ZHOU Z, et al. Intestinal absorption and metabolism of *Epimedium* flavonoids in osteoporosis rats[J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(10): 1590-1600.  
[8] 权秋梅, 黎云祥. 巫山淫羊藿开花物候与生殖特征[J]. 生态学杂志, 2013, 32(4): 859-866.  
[9] 李作洲, 徐艳琴, 王瑛, 等. 淫羊藿属药用植物的研究现状与展望[J]. 中草药, 2005, 36(2): 289-295.  
[10] 刘仁权. SPSS 统计软件[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 150.  
[11] 聂韡, 朱培林, 房海灵, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量[J]. 中草药, 2017, 48(1): 185-191.  
[12] 刘威, 龚伟, 张嵩, 等. 基于多元统计分析的鹿茸品质评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 57-62.  
[13] 丁捷, 赵雪梅, 朱金艳, 等. 基于主成分、因子和聚类分析淡水鱼品种对速冻青稞鱼面品质的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 34-40, 51.  
[14] 张晓冬, 陈龙, 白玉, 等. 近红外光谱结合主成分分析和聚类分析鉴别炉甘石生品、伪品和炮制品[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 1-8.  
[15] 陈懿瑶, 罗阳, 闫燊, 等. HPAEC-PAD 法测定石斛属植物单糖组分与主成分聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 106-111.  
[16] 石召华, 叶利春, 关小羽, 等. 娑罗子药材 HPLC 色谱指纹图谱的建立及其在药材鉴定中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 52-56.  
[17] 杨雯. 中国淫羊藿属药用植物孢粉学及其药材品质评价研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2015.  
[18] 蔡晓洋, 张思获, 曾俊, 等. 基于主成分分析和聚类分析的栀子种质资源评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 30-37.  
[19] 公丽艳, 孟宪军, 刘乃侨, 等. 基于主成分与聚类分析的苹果加工品质评价[J]. 农业工程学报, 2014, 30(13): 276-285.  
[20] 谈小刚. 广东省旅游经济发展的区域差异及其影响因素分析[D]. 广州: 广州大学, 2013.  
[21] 黄娇. 指纹图谱和主成分分析法评价不同海拔高度的桔梗药材质量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 309-313, 320.  
[22] 宋江峰, 刘春泉, 姜晓青, 等. 基于主成分与聚类分析的菜用大豆品质综合评价[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 12-17.

[责任编辑 顾雪竹]