

基于高分辨质谱的淫羊藿花型性状与黄酮醇次生代谢 相关性分析

秦伟瀚¹ 兰小中² 阳勇¹ 张小梅¹ 冉继春¹ 刘翔^{*1}

¹(重庆市中药研究院, 重庆 400065) ²(西藏农牧学院食品科学学院, 林芝 860000)

摘 要 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS)研究了淫羊藿花型性状与主要黄酮醇成分代谢积累的相关性。采用电喷雾离子源正离子扫描加信息关联采集质谱,解析以去甲淫羊藿素为母核的黄酮醇次生代谢途径,归纳总结主要的生化反应类型;采用SIMCA软件建立正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型;结合PeakView软件、在线数据库及二级碎片裂解规律鉴定区分花型类群的潜在生物标志物;采用MultiQuant软件对淫羊藿药材中的8种活性成分进行定量分析;建立了黄酮醇成分筛查数据表,提取24批72个样品中68种成分的离子强度,分析了整个途径次生代谢产物的积累变化规律。OPLS-DA聚类结果显示,两个花型类群样品数据区分明显。本研究共鉴定出5种潜在的生物标志物,其中1种为新成分,其余4种黄酮醇成分均为甲基转移反应的产物。含量测定结果显示,小花淫羊藿的黄酮醇成分及总黄酮含量明显高于大花淫羊藿,并且小花淫羊藿甲基转移反应产物的含量会明显增高。通过代谢流分析发现,母核C-4'位甲基转移反应为该途径的关键反应步骤。本研究发现大花淫羊藿与小花淫羊藿花型类群间化学差异明显,并且小花淫羊藿药用品质明显优于大花淫羊藿。是否存在某种关联关键基因、转录因子、中介蛋白等协同调控使得花表型与黄酮代谢显著相关,还有待于后续进一步研究证明。本研究结果为淫羊藿品质提升和品种选育等提供了参考。

关键词 淫羊藿; 类群; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; 黄酮醇; 次生代谢; 相关性

淫羊藿为小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(*Epimedium* L.)多种植物的干燥叶^[1]。淫羊藿属植物按照花型分为两大类群: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)^[2-3]。2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)收录了淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、巫山淫羊藿(*Epimedium wushanense* T. S. Ying)和箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.)等5个种类以及含有淫羊藿的50余种中成药^[4]。研究表明,淫羊藿具有多种药效功能,主要集中在免疫、生殖、心脑血管和抗肿瘤等方面^[5-7]。淫羊藿的主要活性成分是以2-苯基色原酮为母核,在C-8、C-7、C-5、C-3和C-4'位上具有异戊烯基、羟基、糖基和甲氧基的黄酮醇类衍生物^[8-9]。目前,已经鉴定出68种该类化合物,其代表性成分为淫羊藿苷、朝藿定和宝藿苷等^[10-12]。现代药理学研究表明,具有C-8位异戊烯基的黄酮醇类衍生物是淫羊藿对心血管及免疫促进活性的主要功效成分,并且具有抗肿瘤活性^[13-21]。淫羊藿素软胶囊作为2022年国家药品监督管理局药品审评中心批准上市的首个国产创新药,为晚期肝细胞癌治疗提供了新的选择。因此,研究淫羊藿中的黄酮醇类成分,对于中药创新药物的研制具有重要价值。

淫羊藿是我国重要的补益类中药材,虽然临床疗效确切,物质基础较为明确,但由于淫羊藿品种较多(中国境内已报道的有58种)^[22],市场上药用品种混杂,现作为商品流通品种就有10余种,药材质量参差不齐^[23],迄今,很多文献报道了不同产地淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷含量达不到《中国药典》规定限量的情况^[24-26]。因此,提高主要活性成分的含量是提高淫羊藿药材质量的切实途径。目前,提高淫羊藿主

2022-03-30 收稿; 2023-09-11 接受

国家重大新药创制项目(No. 2017ZX09101002-002-004)、重庆市自然科学基金项目(No. cstc2019jcyj-msxmX0464)和重庆市科技局项目(Nos. cc-cstc-CA-19-2, cstc2020jxjl10004)资助。

* E-mail: zysliux@163.com

要活性成分含量有两种方法: (1)建立中药材规范化种植(GAP)基地,实现品种选育^[27]; (2)分子育种,以调控关键基因的表达。第一种方法已在全国主要产区较好地实施,但是第二种方法进展缓慢,主要因为淫羊藿黄酮醇次生代谢途径尚不明确,并且未发现有效的突破点以探究该生物合成途径中导致主要活性成分积累的关键基因和关键酶。目前,对于淫羊藿黄酮醇生物合成途径探讨仅有少量研究报道。张华峰等^[28]认为淫羊藿苷和朝藿定等是以黄酮醇为底物,经过一系列酶促反应形成,酶促反应类型主要包括异戊烯基取代、酰基化、甲基化或转糖基反应等,其中,母核 C-3 位上活泼羟基的糖苷化作用尤为重要。近年来,已有研究者对调控淫羊藿类黄酮合成的基因及转录因子进行了研究^[29-30]。本课题组前期通过解析黄酮代谢途径,已推导出了数十种新化合物,为淫羊藿黄酮醇次生代谢途径的阐释和完善做了有益铺垫^[31]。

本研究借助高分辨质谱分析平台,通过解析黄酮醇次生代谢途径,结合正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)、多指标含量分析及代谢物流分析,探讨了造成不同花表型淫羊藿化学差异的关键反应步骤和关键酶。调控花性状的基因是区分不同淫羊藿品种且能稳定遗传的基因。是否存在某种关联关键基因、转录因子、中介蛋白等在协同调控使得花表型与黄酮代谢显著相关,还有待于后续进一步的研究证明。本研究通过对淫羊藿花类群与黄酮醇次生代谢的相关性探讨,为淫羊藿品质提升和品种选育等提供了有价值的参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UPLC-30A 型超高效液相色谱仪、UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); TripleTOF 4600™ 型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪,包括 Analyst 1.6 工作站、PeakView 1.2.0.3 数据处理软件和 MultiQuant 2.1 数据处理软件(美国 Applied Biosystems 公司); KQ-500V 型超声清洗机(昆山舒美超声仪器有限公司); ME204 型万分之一分析天平(瑞士梅特勒托利多公司); SM-1X 型电热恒温鼓风干燥箱(上海徐吉电气有限公司); FW1000A 型高速多功能粉碎机(常州市金坛友联仪器公司)。

去甲淫羊藿素(批号: 28610-31-3)、宝藿苷 V(批号: 118544-18-6)、宝藿苷 II(批号: 55395-07-8)、淫羊藿次苷 II(批号: 113558-15-9)、淫羊藿属苷 A(批号: 39012-04-9)、淫羊藿苷(批号: 489-32-7)、脱水淫羊藿素(批号: 116554-17-5)和朝藿定 C(批号: 110642-44-9)对照品(>98%,成都埃法生物科技有限公司); 甲醇(色谱级,德国 Merck 公司); 甲酸(色谱级,美国 ACS 公司)。其余试剂均为分析纯,实验用水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。8 种淫羊藿于 2015~2016 年采自重庆市、四川省、贵州省和湖南省,并全部种植于重庆市中药研究院标本园,2021 年 5 月 16 日同批采集取样。全部样品经重庆市中药研究院生药研究所刘翔研究员鉴定,凭证标本保存于重庆市中药研究院博物馆(SM),详细信息见表 1 和图 1。

1.2 实验方法

1.2.1 混合对照品溶液制备

准确称取适量去甲淫羊藿素、脱水淫羊藿素、宝藿苷 II、淫羊藿次苷 II、淫羊藿属苷 A、淫羊藿苷、宝藿苷 V 和朝藿定 C,以 70%(V/V)甲醇溶液溶解并定容至 50 mL,得到含去甲淫羊藿素(20.4 μg/mL)、脱水淫羊藿素(19.8 μg/mL)、宝藿苷 II(22.2 μg/mL)、淫羊藿次苷 II(21.0 μg/mL)、淫羊藿属苷 A(19.6 μg/mL)、淫羊藿苷(20.2 μg/mL)、宝藿苷 V(21.2 μg/mL)和朝藿定 C(20.8 μg/mL)的混合对照品溶液,于 4℃避光保存。

1.2.2 供试品溶液的制备

准确称取淫羊藿粉末 0.2 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 70%(V/V)的甲醇溶液,称定重量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)60 min,冷却至室温,再次称定,用 70%(V/V)甲醇溶液补足减失的量,摇匀,过 0.22 μm 滤膜。移取滤液 1 mL 于 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,供紫外-可见光谱检测。移取滤液 1 mL 于 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,供质谱检测。

表1 淫羊藿样品采集信息表

Table 1 *Epimedium* sample collection information table

药材基源 Base source	类群 Group	来源地点 Collection location	凭证标本 Voucher specimen
竹山淫羊藿 <i>Epimedium zhushanense</i> K. F. Wu et S. X. Qian	大花 Large flower	重庆市巫溪县 Wuxi, Chongqing	LiuX15050
黔岭淫羊藿 <i>Epimedium leptorrhizum</i> Steam	大花 Large flower	重庆市武隆县 Wulong, Chongqing	LiuX15064
保靖淫羊藿 <i>Epimedium baojingense</i> Q. L. Chen et B. M. Yang	大花 Large flower	湖南省张家界市 Zhangjiajie, Hunan	LiuX16005
腺毛淫羊藿 <i>Epimedium glandulosopilosum</i> H. R. Liang	大花 Large flower	重庆市巫溪县 Wuxi, Chongqing	LiuX15042
柔毛淫羊藿 <i>Epimedium pubescens</i> Maxim.	小花 Small flower	四川省隆昌县 Longchang, Sichuan	LiuX15036
黔北淫羊藿 <i>Epimedium borealiguizhouense</i> S. Z. He & Y. K. Yang	小花 Small flower	重庆市酉阳县 Youyang, Chongqing	LiuX15066
天平山淫羊藿 <i>Epimedium myrianthum</i> Stearn	小花 Small flower	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing	LiuX15035
德务淫羊藿 <i>Epimedium dewuense</i> S. Z. He	小花 Small flower	贵州省务川县 Wuchuan, Guizhou	LiuX15001



图1 淫羊藿花型性状图片(A~D,大花类型;E~H,小花类型): (A) 竹山淫羊藿; (B) 黔岭淫羊藿; (C) 保靖淫羊藿; (D) 腺毛淫羊藿; (E) 柔毛淫羊藿; (F) 黔北淫羊藿; (G) 天平山淫羊藿; (H) 德务淫羊藿
Fig.1 The Herba Epimedii cultivars (A–D, Large flower; E–H, Small flower): (A) *Epimedium zhushanense*; (B) *E. leptorrhizum*; (C) *E. baojingense*; (D) *E. glandulosopilosum*; (E) *E. pubescens*; (F) *E. borealiguizhouense*; (G) *E. myrianthum*; (H) *E. dewuense*

1. 2. 3 液相色谱条件

ACQUITY Premier BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液,采用梯度洗脱(0~2.2 min, 6.5% B; 2.2~8.5 min, 6.5%~68% B; 8.5~14.5 min, 68%~90% B; 14.5~17.0 min, 90% B; 17.0~17.5 min, 90%~6.5% B; 17.5~20.0 min, 6.5% B); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 35 ℃; 进样量: 2 μL。

1. 2. 4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 采集模式: 正离子扫描(POS)+信息关联采集(IDA); 离子源喷雾电压(IS): 5500 V; 离子源温度(TEM): 550 ℃; 气帘气(CUR): 103 kPa; 雾化气(GS1): 365 kPa; 辅助气(GS2): 345 kPa; 簇裂解电压(DP): 60 V; 碰撞能量(CE): 40 V; 碰撞能量滚动范围(CES): 20 V; 质

谱扫描范围: m/z 50~1000。仪器监测响应阈值为 1000 cps,超过该阈值的化合物才能获得子离子信息。

1.2.5 差异性分析数据处理方法

建立淫羊藿属植物已知成分筛查数据表;采用 1.2.2 节的方法制备供试品溶液,高分辨质谱采集数据,将结果导入 Notepad 软件,自动提取离子精确质荷比、保留时间和强度等信息,并对每个离子进行编号。将 Notepad 软件提取的数据采用 SIMCA-P 14.1 软件进行 OPLS-DA 拟合,得到 Scatter 得分图及 S-plots 图,筛选出区分大花、小花类群样品的显著差异性离子,并将该离子信息输入 PeakView 软件,结合软件 Formula Finder 和 Mass Calculators 等功能、在线数据库(Human Metabolome Database 和 Pub Chem、Chemical Book 等)及二级碎片裂解规律进行差异性化合物的结构解析。

1.2.6 多指标定量分析方法

取淫羊藿样品,按照 1.2.2 节的方法制备供试品溶液,按照 1.2.3 节和 1.2.4 节的色谱和质谱条件进样检测,采用外标法计算样品中去甲淫羊藿素、脱水淫羊藿素、宝藿苷 II、淫羊藿次苷 II、淫羊藿属苷 A、淫羊藿苷、宝藿苷 V 和朝藿定 C 的含量。分别取上述供试品溶液和淫羊藿苷对照品溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)适量,以相应试剂为空白,采用紫外分光光度法,在 270 nm 波长处测定吸光度,计算总黄酮含量^[4]。高分辨质谱定量分析方法部分参数见表 2。

表2 8种黄酮醇成分的高分辨质谱定量分析方法

Table 2 Quantitative analysis of 8 kinds of flavonol components by high resolution mass spectrometry

化合物名称 Compound name	母离子范围 Parent ion range (m/z)	定量离子范围 Quantitative ion range (m/z)	定性离子范围 Qualitative ion range (m/z)
去甲淫羊藿素 Noricaritin	355.11~355.13	298.91~298.93	287.13~287.13
脱水淫羊藿素 Anhydroicaritin	369.32~369.34	313.16~313.17	301.24~301.26
宝藿苷 II Baohuoside II	501.34~501.36	355.12~355.14	299.14~299.15
淫羊藿次苷 II Icariside II	515.37~515.39	369.21~369.22	313.15~313.16
淫羊藿属苷 A Epimedoside A	663.28~663.31	355.10~355.12	517.23~517.25
淫羊藿苷 Icariin	677.34~677.35	531.34~531.36	369.22~369.24
宝藿苷 V Baohuoside V	809.41~809.43	517.14~517.15	663.32~663.33
朝藿定 C Epmedin C	823.41~823.43	531.30~531.32	677.43~677.46

1.2.7 代谢物流分析方法

根据解析的淫羊藿黄酮醇次生代谢途径,收集已知成分的化合物信息,包括化学式和化学结构等,采用 PeakView 软件,在对化学结构及二级碎片解析基础上,提取 24 批次 72 个样品中 68 种黄酮醇成分的离子强度,并将离子强度按照淫羊藿品种进行平均,按照所总结的生化反应类型分析整个黄酮醇途径次生代谢产物的积累变化规律。

2 结果与讨论

2.1 淫羊藿黄酮醇次生代谢途径的解析

文献中报道的淫羊藿中的黄酮醇类成分共 68 种^[8-12]。根据已有的生物化学反应类型,采用 Chem-BioDraw 软件绘制出淫羊藿黄酮醇的次生代谢途径(见电子版文后支持信息图 S1)。此途径的母核为去甲淫羊藿素,主要的生化反应类型有 6 种: X1 为母核 C-4'位羟基发生甲基转移反应, X2 为母核 C-3 位

羟基发生鼠李糖苷化反应, X3 为母核 C-7 位羟基发生葡萄糖苷化反应, X4 为母核 C-3 位发生鼠李糖苷化后再结合一分子木糖苷, X5 为母核 C-3 位发生鼠李糖苷化后再结合一分子鼠李糖苷, X6 为母核 C-3 位发生鼠李糖苷化后再结合一分子葡萄糖苷。由代谢网络图(电子版文后支持信息图 S2)可知, 2020 年版《中国药典》淫羊藿药材测定含量的 4 种成分(淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C)^[4]均在去甲淫羊藿素→宝藿苣 II→淫羊藿属苷 A 这条代谢途径上, 并且均为 C-4'位甲基转移反应的产物。

2.2 差异性分析结果

对 8 个淫羊藿品种 72 个样品中所有检测到的高分辨质谱信息进行提取处理, 建立 OPLS-DA 模型, 结合 S-plots 分析、PeakView 软件和在线数据库等鉴定潜在生物标志物。由 OPLS-DA 得分图(图 2A)可知, 大花类群与小花类群样品数据点区分明显, 表明两者的化学成分有明显差异。在 S-plots 分析中共筛选到 18 个显著差异性离子, 其中重复离子和同位素离子各占 4 个, 鉴定出 5 种潜在生物标志物, 包括 1 种黄酮新成分和 4 种黄酮醇成分, 分析结果及质谱裂解规律见表 3、图 2B 和图 3。为了验证此模型的准确性和有效性, 对 OPLS-DA 进行排列检验(图 4); R^2Y 及 Q^2 原始值分别为 0.886 和 0.815, 说明此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 0.306 和 -0.526, 表明此模型无过度拟合。同时, 按此模型某 X 变量对 Y 变量的解释能力(Variable influence on projection, VIP)大小进行排序,

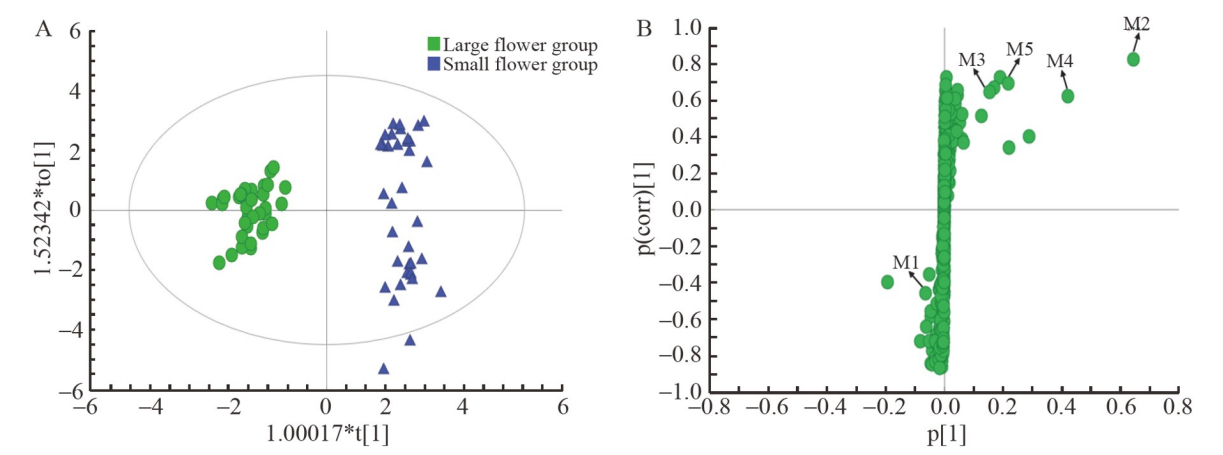


图2 (A) 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)的得分图; (B) OPLS-DA 的 S-plots 拟合图
Fig.2 (A) Scores chart of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA); (B) S-plots chart of OPLS-DA

表3 区分淫羊藿花类群的潜在生物标志物鉴定结果

Table 3 Identification results of potential biomarkers for distinguishing *Epimedium* flower groups

化合物编号 No.	保留时间 Retention time/ min	质荷比 Mass-to-charge ratio (m/z)		分子式 Molecular formula	鉴定结果 Identification result	甲基转移反应 Methyl transfer reaction
		理论值 Theoretical	实测值 Measured			
M1	7.06	433.11384	433.11408	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	波斯菊甙 ^a Cosmosiin	—
M2	7.24	531.18806	531.18877	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	淫羊藿次苷 I Icariside I	产物 Product
M3	7.35	823.30617	823.30548	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	朝藿定 C Epmedin C	产物 Product
M4	7.49	677.24683	677.24834	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	淫羊藿苷 Icariin	产物 Product
M5	8.13	369.13407	369.13511	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	脱水淫羊藿素 Anhydroicaritin	产物 Product

注: ^a 淫羊藿样品中鉴定的新成分。
Note: ^a A new component identified from *Epimedium* samples.

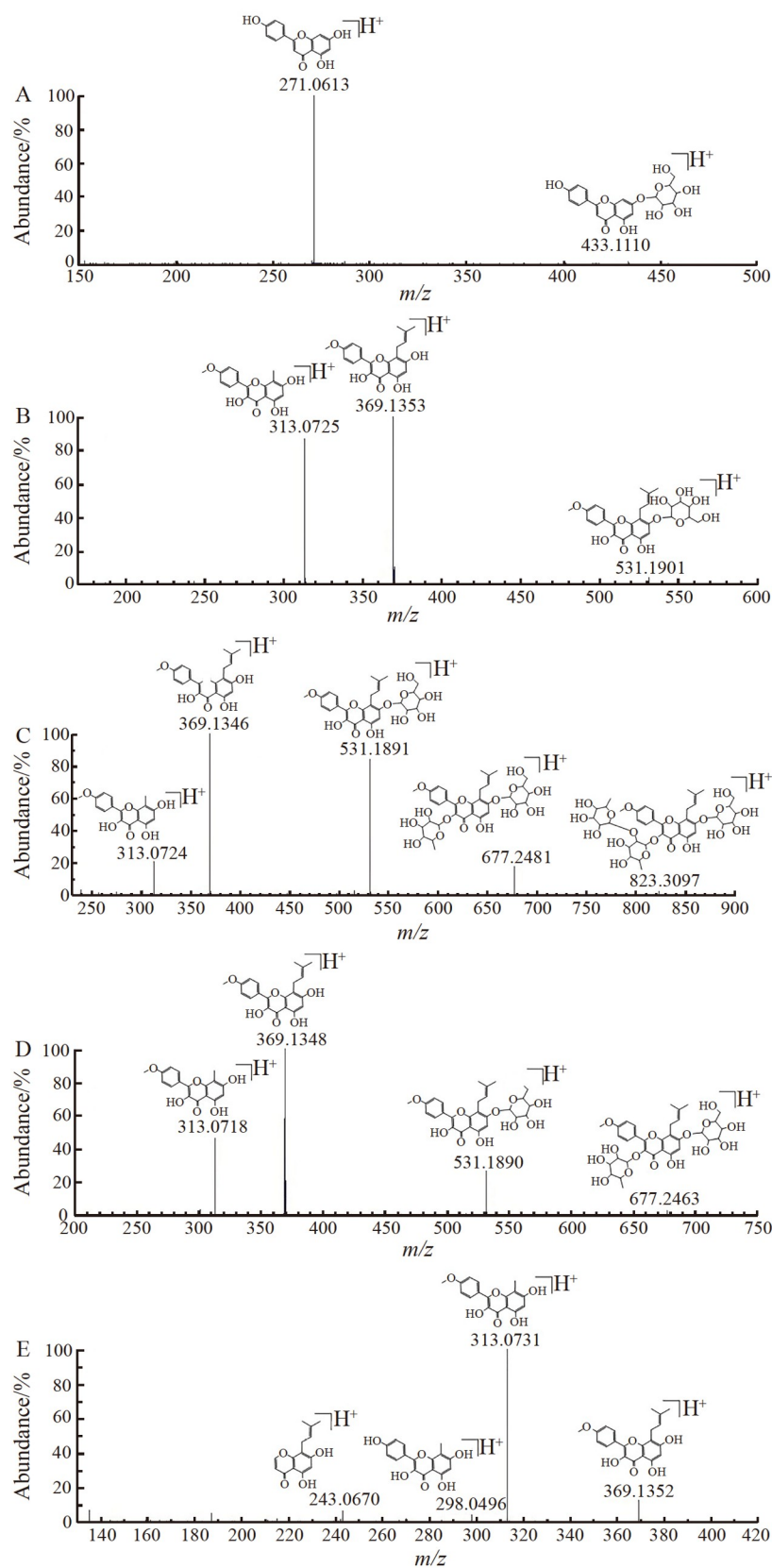


图3 潜在生物标志物二级质谱裂解规律图: (A) 波斯菊甙; (B) 淫羊藿次苷 I; (C) 朝藿定 C; (D) 淫羊藿苷; (E) 脱水淫羊藿素

Fig.3 Potential biomarker secondary mass spectrometry fragmentation diagram: (A) Cosmosiin; (B) Icarisid I; (C) Epmedin C; (D) Icarin; (E) Anhydroicaritin

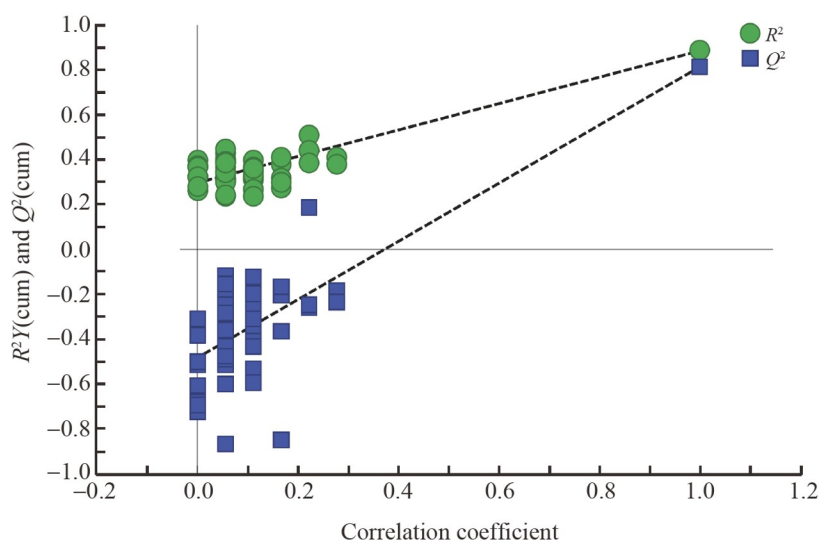


图4 OPLS-DA 的排列检验图

Fig.4 OPLS-DA permutations check chart

VIP>1 所筛选的差异离子与 S-plots 筛选结果一致。由差异性分析结果可知,鉴定出的 4 种黄酮醇成分均为母核 C-4'位甲基转移反应的产物,据此推测甲基转移反应是区分大花和小花淫羊藿黄酮醇次生代谢的关键反应步骤,需要通过定量分析和代谢物流分析进一步确证。

2.3 多指标定量分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对淫羊藿大花、小花品种中的主要黄酮醇成分进行定量分析。这些主要的黄酮成分均为甲基转移反应的产物和底物(图 5),含量测定结果(见电子版文后支持信息表 S1)表明,小花淫羊藿中各检测成分的含量均高于大花淫羊藿,并且小花淫羊藿中甲基转移反应底物的含量会急剧增高,提示小花淫羊藿中甲基转移酶的活性或会更强。由淫羊藿品种、黄酮成分及含量值拟合合成的 3D 折线图(图 6)可知,与小花淫羊藿相比,大花淫羊藿中各成分含量差异明显,以淫羊藿苷和朝藿定 C 尤为显著。2020 年版《中国药典》对淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿及朝鲜淫羊藿中淫羊藿苷、朝藿定 A、

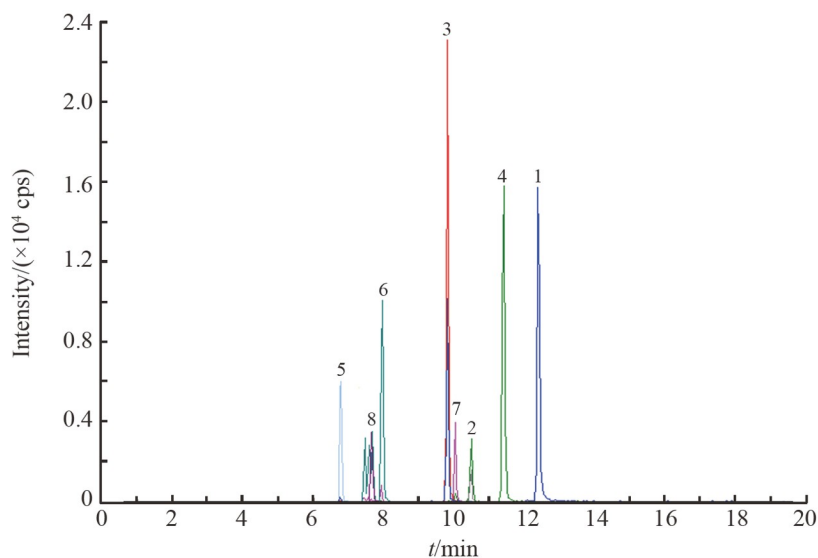


图5 8 种黄酮醇成分的总离子色谱图(TIC)图

1. 去甲淫羊藿素; 2. 脱水淫羊藿素; 3. 宝藿苷 II; 4. 淫羊藿次苷 II; 5. 淫羊藿属苷 A; 6. 淫羊藿苷; 7. 宝藿苷 V; 8. 朝藿定 C

Fig.5 Total ion chromatogram (TIC) of 8 kinds of flavonol components

1. Noricarin; 2. Anhydroicarin; 3. Baohuoside II; 4. Icariside II; 5. Epimedeside A; 6. Icarin; 7. Baohuoside V; 8. Epmedin C

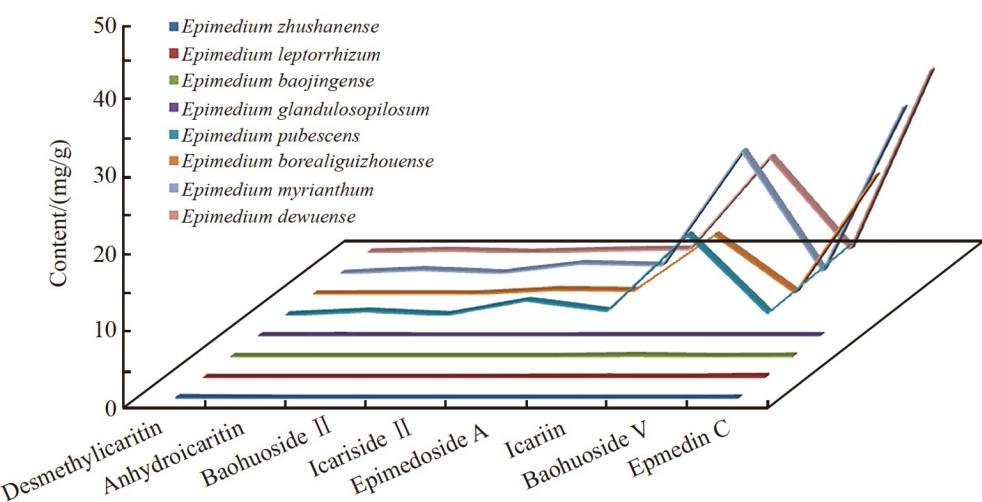


图6 8种淫羊藿特征黄酮醇成分含量折线图
Fig.6 Broken line diagram of characteristic flavonol content of 8 kinds of *Epimedium*

朝藿定 B 和朝藿定 C 的总含量要求为: 朝鲜淫羊藿不得低于 0.5%(5000 $\mu\text{g/g}$), 淫羊藿、箭叶淫羊藿和柔毛淫羊藿不得低于 1.5%(15000 $\mu\text{g/g}$)^[4], 参照一测多评的校正因子计算, 大花品种均未达到药典要求, 而小花品种均能达到药典的规定值。同时, 药典规定总黄酮含量不得低于 5%, 大花品种中仅黔岭淫羊藿达到要求(5%), 而小花品种均为药典规定值的 2 倍左右。由上述分析结果可知, 小花淫羊藿的药用品质明显优于大花品种^[32-33]。然而, 本研究仅比较了淫羊藿的 8 个品种, 由于样本数量所限, 该结论还有待于进一步验证。

2.4 代谢物流分析

依据 2.1 节解析的淫羊藿黄酮醇次生代谢途径, 在对已知成分定性鉴定的基础上, 提取采集数据中所有目标化合物的离子强度。根据反应前后物质质量的变化, 探讨此途径的代谢物流变化规律。通过对不同类群品种淫羊藿中 68 个成分离子强度变化规律以及相应的生化反应类型进行深入分析发现, 小花淫羊藿在此代谢途径中所能鉴定的黄酮醇类成分(如去甲淫羊藿素-脱水淫羊藿素、宝藿苷 II-淫羊藿次苷 II、Ikariside F-箭叶淫羊藿甙 B、Ikariside B-淫羊藿苷等)在 C-4'位羟基发生甲基转移反应前后, 离子强度会有显著增加, 化合物类型涉及到苷元、单糖苷、二糖苷和三糖苷; 而大花淫羊藿相应成分的物质质量无明显变化, 甚至有相当一部分化合物的离子强度还略有降低(见图 7 及电子版文后支持信息

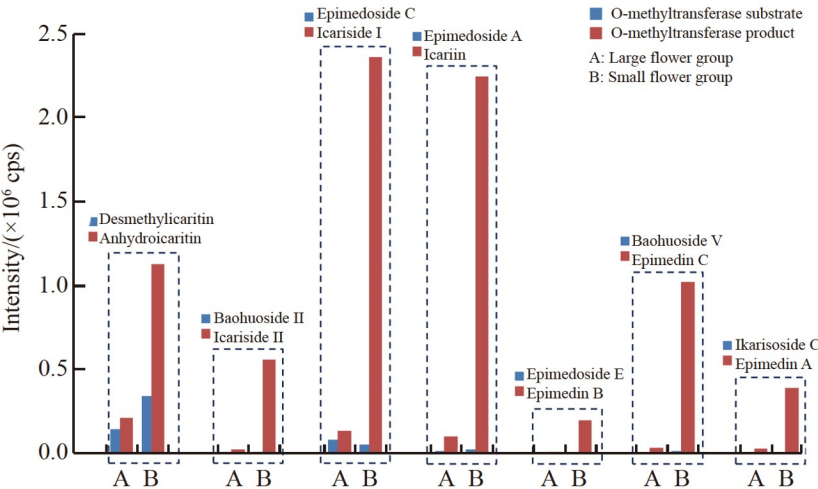


图7 淫羊藿不同类群品种中甲基转移反应前后物质质量变化图
Fig.7 Changes of substance quality before and after methyl transfer reaction in different groups and varieties of *Epimedium*

表 S2); 结合 OPLS-DA 和定量分析结果, C-4'位的甲基转移反应是不同花表型淫羊藿中调控该次生代谢途径代谢流的关键步骤。生化反应的底物结构类似,并且均发生在同一活性部位或基团,因此催化该反应的酶应为同一种或同一类酶,而酶是基因表达的产物,酶的活性同样会受到基因的调控。在两个淫羊藿类群中,代谢途径和甲基转移反应均相同,但代谢产物积累模式却截然相反,这可能是调控花性状的基因和调控黄酮代谢的基因不在同一条染色体上,他们中间存在某种基因、转录因子或中介蛋白等可协同调控淫羊藿花型性状和黄酮醇次生代谢,这还需要进一步通过转录组和代谢组等实验加以证明。

3 结论

淫羊藿是我国药用历史悠久且重要的补益类中药材,但一直存在品种混杂、药材质量难以控制等问题。本研究以解析的黄酮醇次生代谢途径为基础,结合 OPLS-DA、多指标定量分析及代谢物流分析发现,花型性状与黄酮醇代谢相关性明显,并且小花淫羊藿的药用品质明显优于大花品种,母核 C-4'位的甲基转移反应是该途径的关键反应步骤,两个类群重要活性成分代谢积累存在差异的根本原因是能够调控 O-甲基转移酶活性的基因或蛋白不同。详细的机理尚需进一步的研究加以证明。

References

- [1] LIU X, ZHANG Y X, ZHANG C, XU C Q, QIN W H, SHEN G A, GOU B L. Mitochondrial DNA, Part B, 2021, 6(11): 3289-3291.
- [2] WANG Yue-Yun, HE Shun-Zhi, XU Wen-Fen. Guizhou Sci. , 2009, 27(4): 43.
王悦云, 何顺志, 徐文芬. 贵州科学, 2009, 27(4): 43.
- [3] XU Wen-Fen, HE Shun-Zhi. J. Chin. Med. Mater. , 2005, 28(4): 267.
徐文芬, 何顺志. 中药材, 2005, 28(4): 267.
- [4] Pharmacopoeia Commission of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 174, 340.
中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 174, 340.
- [5] YE Li-Ka, CHEN Ji-Min. China J. Chin. Mater. Med. , 2001, 26(5): 5-7.
叶丽卡, 陈济民. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 5-7.
- [6] KIM D R, LEE J E, SHIM K J, CHO J H, LEE H C, PARK S K, CHANG M S. Mol. Med. Rep. , 2017, 15(1): 125-130.
- [7] ZHANG Wei-Ping, DENG Yang-Yang, REN Jian-Xun, LI Jing-Jin, CHEN Tao, GAO Shan-Shan. China J. Chin. Mater. Med. , 2016, 41(18): 3400-3405.
张卫萍, 邓杨阳, 任建勋, 李晶瑾, 陈涛, 郜姗姗. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3400-3405.
- [8] MENG Ning, KONG Kai, LI Shi-Weng. Acta Bot. Bor. Occid. Sin. , 2010, 30(5): 1063-1073.
孟宁, 孔凯, 李师翁. 西北植物学报, 2010, 30(5): 1063-1073.
- [9] LI Li, DOU Jian-Peng, WU Wei, LIU Zhi-Qiang, LIU Shu-Ying. Chin. J. Anal. Chem. , 2005, 33(3): 317-320.
李丽, 窦建鹏, 吴巍, 刘志强, 刘淑莹. 分析化学, 2005, 33(3): 317-320.
- [10] ZHOU M, ZHENG W, SUN X, YUAN M, ZHANG J, CHEN X, YU K, GUO B, MA B. J. Pharm. Biomed. Anal. , 2021, 198: 113984.
- [11] ZHANG H, WANG H, WEI J, CHEN X, SUN M, OUYANG H, HAO J, CHANG Y, DOU Z, HE J. Molecules, 2018, 23(7): 1656.
- [12] ZHAO Y, CHEN S, WANG Y, LV C, WANG J, LU J. J. Food Drug Anal. , 2018, 26(2): 796-806.
- [13] YU Z, GUO J, HU M, GAO Y, HUANG L. ACS Nano, 2020, 14(4): 4816-4828.
- [14] ZHANG C J, SUI X X, JIANG Y D, WANG X Y, WANG S M. Discov. Med. , 2020, 29(156): 5-16.
- [15] ZHANG D W, CHENG Y, WANG N L, ZHANG J C, YANG M S, YAO X S. Phytomedicine, 2008, 15(1-2): 55-61.
- [16] QUAN K, ZHANG X, FAN K, LIU P X, YUE Q, LI B, WU J F, LIU B J, XU Y, HUA W, ZHU W. Am. J. Transl. Res. , 2017, 9(5): 2508-2519.
- [17] HE C Y, WANG Z, SHI J S. Adv. Pharmacol. , 2020, 87: 179-203.
- [18] SONG L, CHEN X, MI L, LIU C, ZHU S, YANG T, LUO X, ZHANG Q, LU H, LIANG X. Cancer Sci. , 2020, 111(11): 4242-4256.
- [19] HSIEH T P, SHEU S Y, SUN J S, CHEN M H, LIU M H. Phytomedicine, 2010, 17(6): 414-423.
- [20] CHEN G, CAO Z, SHI Z, LEI H, CHEN C, YUAN P, WU F, LIU C, DONG M, SONG Y, ZHOU J, LU Y, ZHANG L. Biomed. Pharmacother. , 2021, 140: 111542.

- [21] MA M, FAN A, LIU Z, YANG L, HUANG J, PANG Z, YIN F. *Front. Pharmacol.*, 2022, 13: 874952.
- [22] LIU Shao-Xiong, WANG Li-Jun, HE Ping-Ping, HU Sheng-Fu, ZHANG Mei-Hong, HE Tian-Tian, XU Yan-Qin. *Guihaia*, 2021, 41(11): 1767-1783.
刘少雄, 王李俊, 何平平, 胡生福, 张梅红, 何甜甜, 徐艳琴. *广西植物*, 2021, 41(11): 1767-1783.
- [23] XU Yan-Qin, CHEN Jian-Jun, GE Fei, LIU Xiao-Li, WANG Ying. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 2010, 41(4): 661-666.
徐艳琴, 陈建军, 葛菲, 刘小丽, 王瑛. *中草药*, 2010, 41(4): 661-666.
- [24] PEI Li-Kuan, HUANG Wen-Hua, HE Tian-Gu, GUO Bao-Lin. *China J. Chin. Mater. Med.*, 2007, 32(21): 2217-2222.
裴利宽, 黄文华, 何天谷, 郭宝林. *中国中药杂志*, 2007, 32(21): 2217-2222.
- [25] WANG Chang-Shun, DUAN Ji-Ping, KANG Shuai, YUAN Hao, LIU Yong-Li, FENG Li. *Mod. Chin. Med.*, 2020, 22(7): 1006-1015.
王常顺, 段吉平, 康帅, 袁浩, 刘永利, 冯丽. *中国现代中药*, 2020, 22(7): 1006-1015.
- [26] SHI Hui-Jun, LIU Shao-Xiong, XU Yan-Qin. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Form.*, 2016, 22(24): 26-31.
石慧君, 刘少雄, 徐艳琴. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 26-31.
- [27] ZHENG Wen-Ke, WEI Jian-He, CHEN Shi-Lin, SUN Xiao-Bo, MA Shuang-Cheng, ZHANG Bo-Li. *World Sci. Technol./Mod. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.*, 2018, 20(11): 1905-1910.
郑文科, 魏建和, 陈士林, 孙晓波, 马双成, 张伯礼. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(11): 1905-1910.
- [28] ZHANG Hua-Feng, WANG Ying, HUANG Hong-Wen. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 2006, 37(11): 1745.
张华峰, 王瑛, 黄宏文. *中草药*, 2006, 37(11): 1745.
- [29] HUANG W, KHALDUN A B M, LV H, DU L, ZHANG C, WANG Y. *Plant Cell Rep.*, 2016, 35(4): 883-894.
- [30] HUANG W, LV H, WANG Y. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8: 1274.
- [31] QIN Wei-Han, YANG Yong, GUO Yan-Lei, LI Qing, ZHANG Xiao-Mei, LIU Xiang. *Acta. Pharm. Sin.*, 2020, 55(9): 2176-2181.
秦伟瀚, 阳勇, 郭延垒, 李卿, 张小梅, 刘翔. *药学报*, 2020, 55(9): 2176-2181.
- [32] QIN Wei-Han, LIU Xiang, ZHANG Jun, WANG Chang-Hua, WEI Yong-Sheng, YANG Yong. *Chin. Tradit. Pat. Med.*, 2017, 39(9): 1889-1895.
秦伟瀚, 刘翔, 张军, 王昌华, 危永胜, 阳勇. *中成药*, 2017, 39(9): 1889-1895.
- [33] QIN Wei-Han, YANG Yong, LIU Xiang, ZHANG Xiao-Mei, ZHAO Ji-Feng, GUO Yan-Lei. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 2017, 29(2): 278-283.
秦伟瀚, 阳勇, 刘翔, 张小梅, 赵纪峰, 郭延垒. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(2): 278-283.

Correlation Analysis Between Flower Type Traits and Flavonol Secondary Metabolism of *Epimedium* Based on High Resolution Mass Spectrometry

QIN Wei-Han¹, LAN Xiao-Zhong², YANG Yong¹, ZHANG Xiao-Mei¹,
RAN Ji-Chun¹, LIU Xiang^{*1}

¹(Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China)

²(School of Food Sciences, Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China)

Abstract Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to study the correlation between flower type traits and major flavonol components from metabolic accumulation. Electrospray spray ion source using positive ion scanning and information correlation acquisition were used for mass spectrometry. A secondary metabolic pathway of flavonols with desmethylicaritin as the nucleus was constructed, and the main types of biochemical reactions were summarized. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was established by SIMCA software. The potential biomarkers for distinguishing flower type groups were identified by combining PeakView software, online database and secondary fragment fragmentation law. MultiQuant software was used for quantitative analysis of 8 kinds of active components in *Epimedium*. The screening data table of flavonol components was established, and the ionic strength of 68

components in 72 samples from 24 batches was extracted to analyze the accumulation and change of secondary metabolites in the whole pathway. OPLS-DA clustering results showed that the data points of the two flower type groups were clearly distinguished. Five potential biomarkers were identified, one of which was a new component, and the others were the products of methyl transfer reaction. The results showed that the contents of flavonol and total flavone in small flower varieties were significantly higher than those in large flower varieties. Compared with large flower *Epimedium*, the content of methyl transfer reaction products of small one was significantly higher. Through metabolic flux analysis, it was found that the methyl transfer reaction of C-4' in the mother nucleus was the key reaction step of this pathway. Through this study, it was found that there were significant chemical differences between the flower type groups of large flower and small flower *Epimedium*, and the medicinal quality of small flower was significantly better than that of large flower *Epimedium*. As a result, the flower phenotype of *Epimedium* was significantly related to the secondary metabolism of flavonol. There should be some genes, transcription factors and intermediary proteins that could co-regulate the flower type traits and O-methyltransferase (COMT) activity. The results were of great significance for the quality improvement and variety breeding of *Epimedium*.

Keywords *Epimedium*; Flower type group; Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; Flavonol; Secondary metabolism; Relevance

(Received 2022-03-30; accepted 2023-09-11)

Supported by the National Major New Drug Creation Project (No. 2017zx09101002-002-004), the Chongqing Natural Science Foundation Project (No. cstc2019jcyj-msxm0464) and the Project of Chongqing Science and Technology Bureau (Nos. cc-cstc-CA-19-2, cstc2020jxjl10004).