表 3 不同生长期黄芩的干根质量、鲜根质量和折干率

Table 3 Weight of dry root, fresh root, and ratio of S. baicalensis in different growth periods

采收日期/月-日	鲜根质量/g	干根质量/g	折干率/%
09-12	602.3	319.2	53
09-27	596.7	310.3	52
10-12	632.9	348.1	55
10-27	665.3	385.9	58
11-19	629.8	346.4	55
11-30	586.4	304.9	52
12-05	572.4	257.6	45
01-06	554.9	244.2	44

条件及次生代谢产物的合成和积累规律有一定的内在联系。从产量和 3 种黄酮类成分的量两方面因素综合考虑,认为陕西商洛地区栽培黄芩的最佳采收时期应为栽培后第二年的 10 月和 11 月。

中药的药效为多成分协同作用的结果,这已成为共识。而在现有的多数文献中,仅以单一的化学成分黄芩苷为指标来评价黄芩药材质量,具有其局限性。本实验以黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 3 个指标综合反映药材有效成分的量并总结其内在规律,能更科学地反映药材综合质量。

参考文献:

[1] 中国药典 [S]. 2005.

[2] Kovács G, Kuzovkina I N, Szőke É, *et al*. HPLC Determination of flavonoids in hairy-root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Chromatogr Supple*, 2004, 60(1): 81-85.

[3] 李 林, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 黄芩苷对不同刺激剂诱导的小鼠 T 淋巴细胞体外活化的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1188-1191.

[4] 张喜平, 田 华, 程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(11): 1212-1215.

[5] Li H B, Jiang Y, Chen F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812(1-2): 277-290.

[6] 朱陵群, 李伟华, 王硕仁, 等. 黄芩苷对神经细胞缺氧糖-再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 238-241.

[7] 梁 英, 韩鲁佳. 黄芩中黄酮类化合物药理学作用研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(6): 9-14.

[8] 徐 峰, 闫龙民, 车 勇. 黄芩的高产栽培技术 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5): 464.

[9] 张淑兰, 吴维凤, 辛玉霞. 黄芩高产栽培技术 [J]. 中国农村小康科技, 2005, 4: 38-39.

[10] 杜连恩. 水浇地黄芩生育规律及栽培技术的研究 [J]. 衡水师专学报, 2002, 4(4): 59.

[11] 宋双红, 张 媛, 王喆之. HPLC 测定不同产地黄芩中黄酮化合物的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 598-600.

生长期巫山淫羊藿不同部位 5 种黄酮类成分的动态积累研究

谢娟平[1], 孙文基[2]*

(1. 安康学院 化学化工系, 陕西 安康 725000; 2. 西北大学 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘 要: **目的** 研究生长期巫山淫羊藿根、茎、叶中 5 种黄酮类成分朝藿定 C、双藿苷 A、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 A 和淫羊藿属苷 C 的量,揭示几种活性成分的动态积累规律。**方法** 采用 RP-HPLC 方法,以美国 Waters Sunfire™-C_{18} 为色谱柱(带预柱),检测波长 270 nm,流动相为乙腈-水,梯度洗脱,体积流量为 1 mL/min。**结果** 在 20 min 内分离测定了 5 种异戊烯基黄酮,得到了这 5 种异戊烯基黄酮在生长期巫山淫羊藿不同部位中的分布积累规律。发现巫山淫羊藿不同部位中双藿苷 A 的量分别为:根 1.090%～3.661%,茎 0.001%～0.033%,叶 0.095%～0.217%;淫羊藿属苷 A 的量分别为:根 0.177%～0.971%,茎 0.010%～0.089%,叶 0.089%～0.323%;朝藿定 C 的量分别为:根 0.223%～0.748%,茎 0.024%～0.147%,叶 0.905%～2.228%;淫羊藿苷的量分别为:根 0.009%～0.128%,茎 0.003%～0.044%,叶 0.258%～0.929%;淫羊藿属苷 C 的量分别为:根 0.080%～1.857%,茎 0.002%～0.022%,叶 0.004%～0.058%。**结论** 巫山淫羊藿叶中淫羊藿苷除 4、5、7 月份外,其余月份的量都低于 0.5%,而朝藿定 C 的量平均在 1.586%。巫山淫羊藿叶在其生长的任何月份都是朝藿定 C 的量远大于淫羊藿苷的量,积累高峰期有 3 个,朝藿定 C 是巫山淫羊藿叶中的主要成分。巫山淫羊藿根在其生长的任何月份都是双藿苷 A 的量远大于朝藿定 C 的量,质量分数平均在 2.763%,双藿苷 A 为巫山淫羊藿根中的主要成分。

关键词: 巫山淫羊藿; 异戊烯基黄酮; 动态积累; 不同部位; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.6 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2670(2009)09-1480-04

* **收稿日期**: 2008-11-12

基金项目: 安康学院高层次人才启动经费资助项目(AYQDZR200801)

作者简介: 谢娟平(1972—),女,陕西宝鸡人,硕士,讲师,研究方向为天然产物有效成分分离分析与开发,已发表论文多篇。Tel: 13359155713 E-mail: xjp_731205@163.com

巫山淫羊藿为《中国药典》品种之一,具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿等功能,用于治疗阳痿遗精、风湿痹痛等症,民间亦将巫山淫羊藿称为"小黄连",常用于抗菌、抗炎和抗风湿[1~3]。双藿苷 A(diphylloside A)、淫羊藿属苷 A(epimedoside A)、朝藿定 C(epimedin C)、淫羊藿苷(icariin)、淫羊藿属苷 C(epimedoside C)是巫山淫羊藿中所含的 5 种重要的异戊烯基黄酮类化合物。建立巫山淫羊藿中这 5 种异戊烯基黄酮的动态积累检测对巫山淫羊藿 GAP 种植和建立质量评价体系具有重要意义。

巫山淫羊藿中淫羊藿苷及总黄酮类成分的定量测定,文献多有报道,分别采用薄层扫描法、高效液相色谱法[4]等,但同时测定 5 种异戊烯基黄酮尤其是双藿苷 A 和朝藿定 C 在根、茎、叶中的动态积累规律,国内尚未见报道。本实验在以往研究[5,6]的基础上,反相高效液相色谱方法,对巫山淫羊藿 5 种异戊烯基黄酮的动态积累进行了考察,此方法在实际样品的检测分析中取得了满意的结果。

1 仪器、试剂及样品

1.1 仪器:Waters 高效液相色谱仪,包括 2695 泵,2487 紫外检测器,Empower 色谱工作站;微孔滤膜(直径 13 mm,0.45 μm)(天津市色谱科学技术公司);YCQ —300 型超声波清洗器(上海凯波超声设备有限公司)。

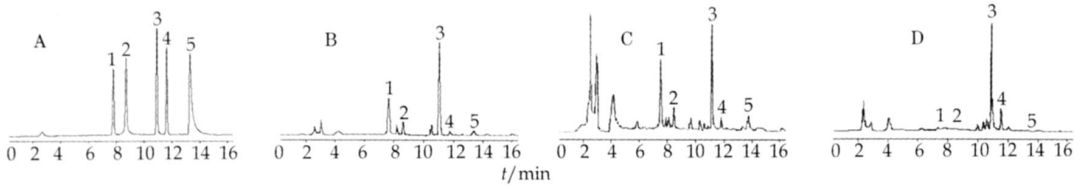
1.2 试剂:乙腈为色谱纯,水为双蒸水并经 0.45 μm 水系滤膜滤过。

1.3 对照品:均为自行分离精制,并以 UV、IR、FAB-MS、^{1}HNMR、^{13}CNMR 鉴定结构,HPLC 检测,面积归一化法计算质量分数,均大于 98 %。

1.4 药材样品:巫山淫羊藿植物样品由陕西省安康市药品检验所中药室胥道宝副主任药师鉴定并提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性:Waters Sunfire™-C_{18} 柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水,梯度洗脱(乙腈:0 min,20 %;10 min,40 %;15 min,45 %;20 min,60 %;26 min,60 %;30 min,20 %),柱温:25 ℃;灵敏度 0.02 AUFS;体积流量:1 mL/min;检测波长 270 nm。在此条件下,各对照品及样品的色谱图见图 1。5 种成分保留时间分别为 7.7、8.6、10.8、11.5 和 13.2 min,色谱峰理论塔板数分别为 8 710(1 号峰)、4 850(2 号峰)、21 195(3 号峰)、19 862(4 号峰)、2 828(5 号峰),峰间分离度分别为 2.15(1,2 峰)、5.53(2,3 峰)、2.25(3,4 峰)2.33(4,5 峰)。由图中可以看出,5 种异戊烯基黄酮得到了很好的分离,且峰形良好。以 3 倍信噪比求得检出限,由回归分析得到的 5 种组分的校正曲线列于表 1。



1-双藿苷 A 2-淫羊藿属苷 A 3-朝藿定 C 4-淫羊藿苷 5-淫羊藿属苷 C
A-对照品 B-巫山淫羊藿根 C-巫山淫羊藿茎 D-巫山淫羊藿叶
1-diphylloside A 2-epimedoside A 3-epimedin C 4-icariin 5-epimedoside C
A-reference substances B-roots of *E wushanense* C-stems of *E wushanense* D-leaves of *E wushanense*

图 1 对照品及样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances and samples

2.2 对照品溶液制备:精密称取各对照品适量,制备成一定质量浓度的对照品,混合后使质量浓度分别为双藿苷 A 0.060 mg/mL,淫羊藿属苷 A 0.047 0 mg/mL,朝藿定 C 0.070 5 mg/mL,淫羊藿苷 0.054 0 mg/mL,淫羊藿属苷 C 1.658 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备:取各淫羊藿样品的干燥植物,于 60 ℃下烘 3 h,取烘干品,粉碎,过 40 目筛,精密称取约 0.2 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 70 % 乙醇 30 mL,称质量,超声提取 1 h,称质量并补足减失质量,滤过,弃去初滤液,取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察:精密吸取上述对照品溶液,依次进样 1、5、10、15、20、25、30、35、40 μL,按色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,以对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线。双藿苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷和淫羊藿属苷 C 的线性回归方程见表 1。

2.5 精密度试验:精密吸取混合对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,测定峰面积,结果 5 种成分的 RSD 分别为双藿苷 A 1.46 %,淫羊藿属苷A 1.19 %,

表 1 对照品线性回归结果

Table 1 Results of linear equations of reference substance

对照品	线性方程	线性范围/μg	r
双藿苷 A	$Y = 2 \times 10^6 X + 97\ 327$	0.060～2.400	0.999 2
淫羊藿属苷 A	$Y = 2 \times 10^6 X + 22\ 973$	0.047～1.880	0.999 9
朝藿定 C	$Y = 2 \times 10^6 X + 23\ 082$	0.071～2.820	0.999 9
淫羊藿苷	$Y = 2 \times 10^6 X + 9\ 803.1$	0.054～2.160	0.999 9
淫羊藿属苷 C	$Y = 3 \times 10^6 X - 518\ 634$	0.149～5.952	0.999 7

朝藿定 C 0.39 %,淫羊藿苷 0.45 %和淫羊藿属苷 C 1.74 %。

2.6 重现性试验:取同一样品 6 份,制备供试品溶液,各取 20 μL 进样,测定峰面积,计算得 5 种成分质量分数的 RSD 分别为淫羊藿属苷 A 0.85 %,双藿苷 A 1.58 %,朝藿定 C 0.36 %,淫羊藿苷1.69 %,淫羊藿属苷 C 1.69 %。

2.7 稳定性试验:精密吸取混合对照品溶液 20 μL,分别于配制后的 0、4、8、16、24、48 h 内进样,测定峰面积。计算 5 种成分淫羊藿属苷 A、双藿苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷和淫羊藿属苷 C 的 RSD 分别为 0.9 %、0.6 %、0.8 %、0.4 %、0.7 %,结果表明,对照品溶液在 48 h 内稳定。

2.8 加样回收率:准确称取已测定的巫山淫羊藿样品 5 份,分别定量加入淫羊藿属苷 A、双藿苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷和淫羊藿属苷 C 对照品溶液,待自然挥干后,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条件测定峰面积,计算 5 种成分的平均回收率分别为 101.6 %、99.4 %、101.3 %、100.6 %、98.5 %。5 种成分的 RSD 分别为 1.1 %、1.1 %、1.2 %、0.9 %、1.3 %。

2.9 样品测定:取各供试品溶液,吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,测定,以药材不同部位中所含的双藿苷 A、淫羊藿属苷 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿属苷 C 5 种黄酮各自的质量分数对月份作表,结果见表 2～4。

表 2 不同生长季节巫山淫羊藿根中 5 种黄酮类成分测定结果(n = 3)

Table 2 Determination of five kinds of flavones in roots of E wushanense in different growth seasons (n = 3)

编号	采摘时间	双藿苷 A/ %	淫羊藿属苷 A/ %	朝藿定 C/ %	淫羊藿苷/ %	淫羊藿属苷 C/ %	黄酮总量/ %
1	2006-01-15	3.661	0.971	0.235	0.050	0.260	5.177
2	2006-02-15	2.876	0.535	0.626	0.075	0.080	4.192
3	2006-03-15	3.061	0.445	0.609	0.051	0.094	4.260
4	2005-04-16	2.780	0.352	0.338	0.060	0.359	3.889
5	2005-05-16	2.443	0.395	0.326	0.025	0.691	3.880
6	2005-06-15	2.382	0.520	0.492	0.075	0.473	3.942
7	2005-07-15	3.008	0.642	0.280	0.048	0.612	4.590
8	2005-08-18	2.283	0.352	0.642	0.059	0.481	3.817
9	2005-09-15	1.090	0.177	0.223	0.051	1.850	3.391
10	2005-10-15	3.555	0.623	0.627	0.103	0.326	5.234
11	2005-11-16	3.603	0.524	0.748	0.128	0.214	5.217
12	2005-12-15	2.419	0.353	0.712	0.064	0.767	4.315
平均质量分数/ %		2.763	0.491	0.488	0.066	0.517	4.325

表 3 不同生长季节巫山淫羊藿茎中 5 种黄酮类成分测定结果(n = 3)

Table 3 Determination of five kinds of flavones in stems of E wushanense in different growth seasons (n = 3)

编号	采摘时间	双藿苷 A/ %	淫羊藿属苷 A/ %	朝藿定 C/ %	淫羊藿苷/ %	淫羊藿属苷 C/ %	黄酮总量/ %
1	2006-01-15	0.010	0.027	0.072	0.005	0.004	0.118
2	2006-02-15	0.016	0.010	0.117	0.007	0.002	0.215
3	2006-03-15	0.015	0.021	0.101	0.006	0.002	0.145
4	2005-04-16	0.030	0.089	0.111	0.044	0.005	0.279
5	2005-05-16	0.006	0.015	0.089	0.017	0.012	0.139
6	2005-06-15	0.003	0.013	0.110	0.015	0.004	0.145
7	2005-07-15	0.001	0.011	0.078	0.016	0.003	0.109
8	2005-08-18	0.010	0.018	0.147	0.014	0.007	0.196
9	2005-09-15	0.001	0.010	0.024	0.003	0.022	0.060
10	2005-10-15	0.020	0.029	0.100	0.007	0.010	0.166
11	2005-11-16	0.009	0.018	0.086	0.012	0.005	0.130
12	2005-12-15	0.021	0.031	0.150	0.010	0.003	0.215
平均质量分数/ %		0.012	0.024	0.099	0.013	0.006	0.154

表 4 不同生长季节巫山淫羊藿叶中 5 种黄酮类成分测定结果 (n = 3)

Table 4 Determination of five kinds of flavones in leaves of E. wushanense in different growth seasons (n = 3)

编号	采摘时间	双藿苷 A/ %	淫羊藿属苷 A/ %	朝藿定 C/ %	淫羊藿苷/ %	淫羊藿属苷 C/ %	黄酮总量/ %
1	2006-01-15	0.180	0.139	0.983	0.490	0.008	1.800
2	2006-02-15	0.119	0.137	1.988	0.282	0.004	2.530
3	2006-03-15	0.104	0.119	1.972	0.258	0.006	2.453
4	2005-04-16	0.217	0.323	0.955	0.929	0.013	2.387
5	2005-05-16	0.163	0.151	2.021	0.645	0.015	2.995
6	2005-06-15	0.122	0.148	1.864	0.497	0.010	2.641
7	2005-07-15	0.095	0.089	1.355	0.555	0.008	2.102
8	2005-08-18	0.121	0.108	1.249	0.262	0.060	1.800
9	2005-09-15	0.114	0.091	1.325	0.338	0.058	1.926
10	2005-10-15	0.177	0.146	2.228	0.376	0.012	2.939
11	2005-11-16	0.133	0.130	1.287	0.459	0.010	2.019
12	2005-12-15	0.115	0.108	1.810	0.323	0.012	2.368
平均质量分数/ %		0.138	0.141	1.586	0.451	0.018	2.334

3 讨论

3.1 检测波长的选择:5 种黄酮类均为异戊烯基黄酮,结构相似,在流动相中用紫外检测器测得紫外光谱最大吸收均在 270 nm,故选择 270 nm 为吸收波长。

3.2 流动相的组成对分离效果的影响:实验表明,流动相中乙腈和水的比例对峰形有较大影响,随着乙腈比例的升高,各物质出峰时间缩短,但由于同时分析 5 种黄酮类成分,各成分不能达到基线分离;当采用低比例乙腈时,各成分较好地达到基线分离,但各物质的出峰时间大大延长,分离物出现严重脱尾现象,最后一个化合物淫羊藿属苷 C 保留时间延长至 50 min 左右出峰,不适合于常规分析,故采用了乙腈和水不同比例的梯度洗脱程序,结果 5 种物质得到较好的分离。当体积流量为 1.0 mL/ min 时,5 种物质可在 20 min 内即可完成分离。考虑到加大体积流量对色谱柱及液相系统的影响以及所确定检测条件的普适性,因此选择流动相为乙腈-水梯度洗脱。

3.3 采用 RP-HPLC 方法对巫山淫羊藿药材不同部位一年生长期内 5 种黄酮类成分量的动态积累进行了研究,结果发现,巫山淫羊藿叶中淫羊藿苷除 4、5、7 月份外,其余月份的量都低于 0.5 %,而朝藿定 C 的量平均在 1.586 %。巫山淫羊藿叶在其生长的任何月份都是朝藿定 C 量远大于淫羊藿苷的量,朝藿定 C 是巫山淫羊藿叶中的主要成分;巫山淫羊藿叶中朝藿定 C 有 3 个生长高峰期,以 5 月和 10 月份采收的量最高;淫羊藿苷有两个生长高峰期,以 4 月份采收的量最高,3 个月后趋于稳定。巫山淫羊藿叶中 4 月份淫羊藿苷的量最高,而朝藿定 C 的量则达到最低,二者具有一定的相关性。巫山淫羊藿茎则在其生长的任何月份 5 种黄酮的量都较低。而巫山淫羊藿根在其生长的任何月份都是双藿苷 A 的量远大于朝藿定 C 的量,质量分数平均在 2.763 %,双藿苷 A 为巫山淫羊藿根中的主要成分。

参考文献:

[1] 江纪武. 药用植物辞典 [M]. 天津:天津科学出版社, 2005.
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社, 2001.
[4] 郭宝林, 肖培根. HPLC 法分析淫羊藿的黄酮类成分 [J]. 西北药学杂志, 1996, 10(5): 201.
[5] 郝振芳, 朱智甲. 二阶导数分光光度法测定益肾灵口服液中的淫羊藿苷 [J]. 光谱实验室, 1999, 16(5): 534-536.
[6] 沙 明, 薛雅民. 高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中淫羊藿甙的含量 [J]. 色谱, 1997, 13: 166-167.