

淫羊藿茎叶中 5 种黄酮类成分分析及质量评价

郭青¹, 吴晓燕², 宁青², 吕霞³

1. 江苏省食品药品检验所, 江苏 南京 210008

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029

3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 测定不同品种和产地淫羊藿茎叶中朝藿定 A、B、C、宝藿苷 I、淫羊藿苷 5 个黄酮类成分的量, 分析结果差异, 并依照《中国药典》2010 年版进行质量评价。方法 建立 HPLC 方法, 色谱条件为 HederTM ODS-2 C₁₈ 柱 (300 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱, 0~8 min, 17% A; 8~32 min, 27% A; 60~70 min, 85% A; 70~80 min, 90% A。检测波长 270 nm。结果 5 种黄酮类化合物在 48.0~2 197.5 μg 线性关系良好, *r* 值均大于 0.999 0 (*n*=8); 平均回收率为 97.8%~100.35%, RSD 为 1.37%~2.48% (*n*=6)。27 批淫羊藿叶中有 20 批淫羊藿苷的量低于《中国药典》规定, 16 批淫羊藿茎中只有 4 批检出淫羊藿苷。结论 淫羊藿中各黄酮量随品种、部位和产地不同而不同, 药用部位叶中的量是茎的 10 倍至数十倍, 品种差异是各黄酮量变化的主要因素。

关键词: 淫羊藿; 质量评价; 黄酮; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2028-05

Analysis and quality evaluation on five flavonoids in folium and rhizome of *Epimedii Folium*

GUO Qing¹, WU Xiao-yan², NING Qing², LV Xia³

1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Key words: *Epimedii Folium*; quality evaluation; flavones; HPLC; fingerprint

淫羊藿 *Epimedii Folium* 为小檗科淫羊藿属多年生草本植物, 地上部分入药, 为补肾壮阳要药。我国有 40 种淫羊藿植物, 药用商品 15 种, 资源分布量大的有 7 个种^[1]。其中淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 和巫山淫羊藿 *E. wushanense* T. S. Ying 为《中国药典》收载^[2]。此外,《贵州中药材、民族药材标准》中还收载了粗毛淫羊藿 *E. acuminatum* Franch.、天平山淫羊藿 *E. myrianthum* Stearn (毡毛淫羊藿 *E. coactum* H. R. Liang W. M. Yan) 和黔岭淫羊藿 *E. leptorrhizum* Stearn^[3]。淫羊藿原植物分布广, 药材基源和产地多, 来源渠道复杂, 临床中药处方和中成药生产中使用量大, 其质量须得到关注。众多文献已对淫羊藿中

的主要活性成分进行了考察^[4-8], 结果表明黄酮的量在淫羊藿品种、采收期、部位间差异很大, 但这些报道所测定的样品多为采集的植物标本, 缺乏流通领域商品药材的代表性。此外,《中国药典》2010 年版要求淫羊藿叶中淫羊藿苷不得少于 0.5%, 巫山淫羊藿叶中朝藿定 C 不得少于 1.0%^[2], 然而实际情况中淫羊藿叶中的淫羊藿苷量经常达不到 0.5%^[8]。因此, 有必要对多渠道的淫羊藿药材进行考察, 了解黄酮成分的分布, 探究造成差异的原因, 达到如实反映淫羊藿药材质量, 合理评价其质量的目的。本实验选择淫羊藿苷类的 5 个黄酮化合物作为指标, 建立其反相高效液相色谱测定方法分别对 27 批淫羊藿药材的叶和茎进行了考察。样品来源具有较广泛的代表性, 其测定结果为淫羊藿的质量评价分析提供了真实可靠的依据。

收稿日期: 2010-12-26

作者简介: 郭青 (1964—), 女, 主任药师, 理学博士, 研究方向为中药质量研究和评价。Tel: (025)86632807 E-mail: guoqing850@yahoo.cn

1 材料与仪器

27批淫羊藿药材分别来源于我国不同省份的药材市场、药材公司、企业和种植基地,产地涉及12个省份(表1),共6个种。1~18样品由江苏省食品药品检验所刘舞霞主任药师鉴定,19~27样品由中国药品生物制品检定所标本馆张继主任药师

鉴定。淫羊藿苷对照品购自中国药品生物制品检定所,朝藿定A、B、C、宝藿苷I对照品均由江苏省中医药研究院提供,质量分数大于98%。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯,由南京化学试剂有限公司出品。

高效液相色谱仪 Shimadzu LC—10ADvp(日本

表1 淫羊藿样品和产地

Table 1 Samples and habitats of *Epimedii Folium*

编号	样品	拉丁名	产地	药材部位	编号	样品	拉丁名	产地	药材部位
1	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	四川	叶、茎	15	淫羊藿	<i>E. brevicornum</i>	安徽	叶
2	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	重庆	叶	16	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	安徽	叶
3	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	贵州	叶、茎	17	柔毛淫羊藿	<i>E. pubescens</i>	安徽	叶、茎
4	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	贵州	叶、茎	18	柔毛淫羊藿	<i>E. pubescens</i>	湖北	叶、茎
5	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	吉林通化	叶	19	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	吉林通化	叶、茎
6	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	吉林通化	叶、茎	20	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i>	云南	叶、茎
7	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	陕西渭南	叶、茎	21	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i>	贵州	叶、茎
8	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	陕西安康	叶、茎	22	淫羊藿	<i>E. brevicornum</i>	陕西安康	叶
9	淫羊藿	<i>E. brevicornum</i>	甘肃	叶	23	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	陕西安康	叶
10	淫羊藿	<i>E. brevicornum</i>	湖南	叶	24	柔毛淫羊藿	<i>E. pubescens</i>	陕西安康	叶
11	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	湖南	叶、茎	25	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	陕西安康	叶
12	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	湖南	叶、茎	26	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	陕西安康	叶
13	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	湖南	叶、茎	27	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	广西	叶、茎
14	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i>	湖南	叶、茎					

岛津),Precisa 92SM—202A 电子天平(瑞士 Precisa 仪器有限公司)、Satorius BS21S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)、JL—720DT 超声波清洗机(50 W, 250 kHz, 上海杰理科技有限公司),Hedera™ ODS-2 C₁₈ 色谱柱(300 mm×4.6 mm, 5 μm)(江苏汉邦科技有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

Hedera™ ODS-2 C₁₈ 色谱柱(300 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,0~8 min, 17% A; 8~32 min, 27% A; 60~70 min, 85% A; 70~80 min, 90% A; 检测波长 270 nm, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取淫羊藿苷、朝藿定A、B、C、宝藿苷I对照品,精密称定,加50%乙醇溶解并稀释成0.1 mg/mL的溶液。取各对照品溶液,用50%乙醇稀释成合适质量浓度的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取淫羊藿药材,60℃干燥24 h,将叶和茎分别粉碎成细粉,各取0.2 g,精密称定,加50%乙醇10 mL,称定质量,超声1 h,取出,放置,用50%

乙醇补足质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

取含朝藿定A、B、C、淫羊藿苷、宝藿苷I分别为52.8、4.8、73.25、52.8、52.0 mg/mL的混合对照品溶液,分别进样1、2、5、10、15、20、25、30 μL,测定峰面积,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表2。5种黄酮化合物在48.0~2197.5 μg线性关系良好, $r \geq 0.9990$ 。

表2 5种黄酮成分线性关系(n=8)

Table 2 Linear relationship of five flavonoids (n=8)

对照品	标准曲线	r	线性范围/μg
朝藿定A	$Y=153.63X+468.9$	0.9997	52.8~1584
朝藿定B	$Y=231.52X+1301.9$	0.9997	48.0~1440
朝藿定C	$Y=125.05X-80.9$	0.9997	73.25~2197.5
淫羊藿苷	$Y=192.35X-160.4$	0.9997	52.8~1584
宝藿定I	$Y=185.41X-129.27$	0.9990	52.0~1560

2.5 精密度试验

取0.1 mg/mL混合对照品溶液,连续进样6次,测定峰面积。淫羊藿苷、朝藿定A、B、C、宝藿苷I峰面积的RSD分别为1.02%、1.20%、1.11%、0.75%、0.15%。

2.6 稳定性试验

取7号淫羊藿的叶的供试品溶液,每隔2h测定1次,连续考察40h。结果淫羊藿苷、朝藿定A、B、C、宝藿苷I峰面积值的RSD分别为3.68%、2.76%、3.89%、1.63%、1.65% ($n=7$),5种成分在40h内稳定。

2.7 重现性试验

取7号陕西渭南产商品淫羊藿的叶,按“2.3”项方法制备5份供试品溶液,进样测定。朝藿定A、B、C、淫羊藿苷、宝藿苷I质量分数的RSD分别为2.54%、1.73%、1.24%、2.77%、1.98%。

2.8 加样回收率试验

取7号样品,精密称取0.1g,精密加入含朝藿定

A、B、C、淫羊藿苷、宝藿苷I分别为6.42、5.82、54.5、1.54、2.65 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液20mL。按“2.3”项制备,进样,测定,计算回收率。5种成分的加样回收率分别为100.35%、99.10%、98.86%、98.31%、97.82%,RSD分别为2.48%、1.79%、1.37%、2.22%、2.08%。

2.9 样品测定

取27批样品按“2.3”项制备供试品溶液,每批2份,进样,测定。除箭叶淫羊藿外,另外5种淫羊藿的茎、叶HPLC色谱图见图1。由于箭叶淫羊藿中的黄酮成分很低或缺失,所以单独进行分析,其茎叶HPLC色谱图见图2。外标一点法计算27批样

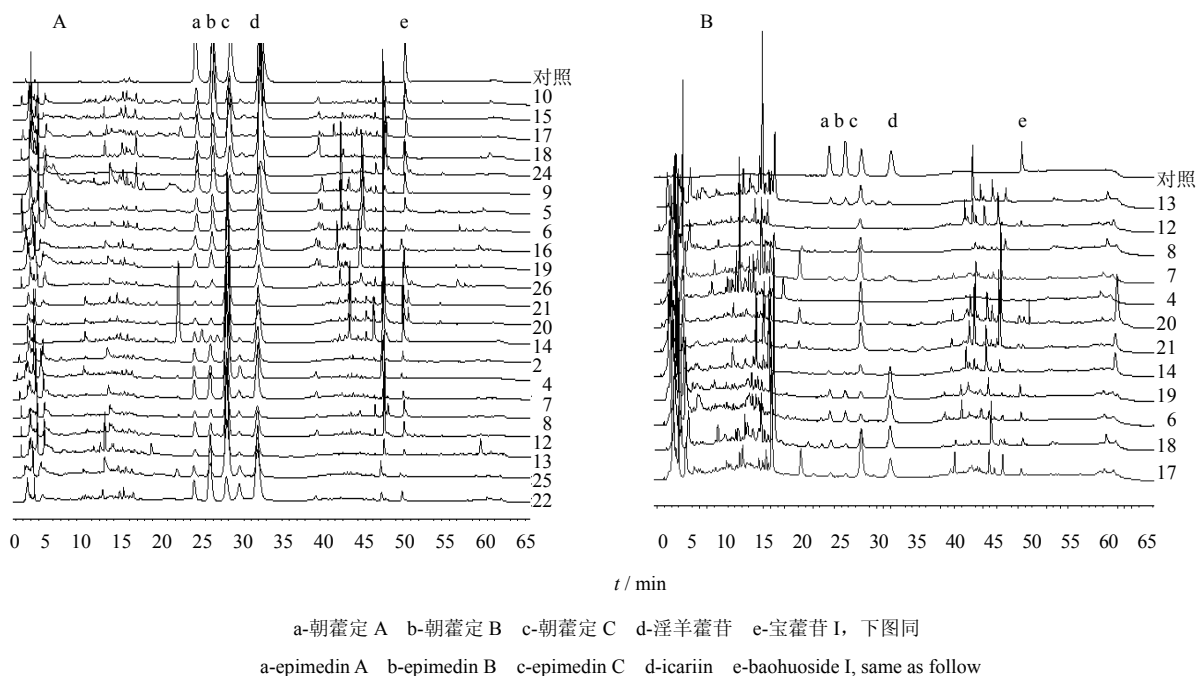


图1 5种淫羊藿叶(A)和茎(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC fingerprint of folia (A) and rhizomes (B) from five species of *Epimedium Folium*

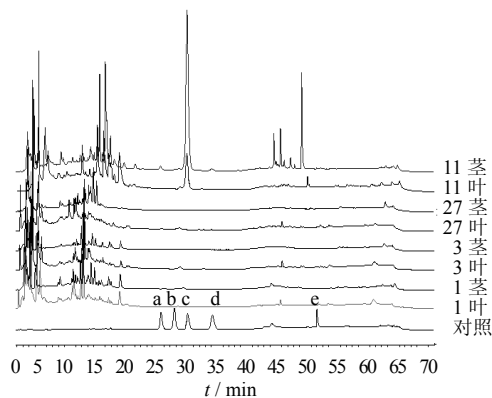


图2 箭叶淫羊藿叶和茎HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC fingerprint of folium and rhizome of *E. sagittatum*

品中5种成分的量,结果见表3。

3 讨论

本实验采用30cm长色谱柱,以17%→90%乙腈为洗脱系统,可将淫羊藿中极性较大和较小的组分基本分开并展现在同一个色谱图中,同时将淫羊藿苷类的核心组峰分出9个(14号样品),且全部达基线分离。因此,指纹谱不仅信息量大,而且分离也较彻底,尤其是在淫羊藿苷类核心组峰(A→D)之前的组峰展现得比较完整,这组峰在黄酮量较低的茎的指纹图中得到了较好体现。

27批淫羊藿叶中有4批未检出淫羊藿苷,另有16批检出的淫羊藿苷低于《中国药典》2010版规

表 3 淫羊藿中 5 种黄酮类成分的测定

Table 3 Determination of five flavonoids in *Epimedium Folium*

样品	朝藿定 A/(mg·g ⁻¹)		朝藿定 B/(mg·g ⁻¹)		朝藿定 C/(mg·g ⁻¹)		淫羊藿苷/(mg·g ⁻¹)		宝藿苷 I/(mg·g ⁻¹)		总和/(mg·g ⁻¹)	
	叶	茎	叶	茎	叶	茎	叶	茎	叶	茎	叶	茎
1	—	—	—	—	—	0.041 9	—	—	0.027 4	—	0.027 4	0.041 9
2	0.921 6	\	0.946 4	\	8.221 3	\	2.947 0	\	0.765 3	\	13.802 0	\
3	—	—	—	—	0.051 9	—	—	—	—	—	0.051 9	—
4	0.931 6	—	0.055 9	—	21.558 0	—	2.920 6	—	0.461 7	—	25.928 0	—
5	1.057 0	\	0.893 8	\	1.008 0	\	3.611 8	\	0.963 5	\	7.534 1	\
6	1.373 1	0.011 2	1.121 3	0.098 7	0.670 9	0.129 8	2.732 7	0.400 8	0.073 5	0.117 1	5.971 5	0.757 6
7	1.261 7	0.054 8	1.247 0	0.025 6	11.442 0	0.691 0	3.547 1	—	0.559 8	—	18.058 0	0.771 4
8	0.490 6	—	0.470 1	—	5.616 6	0.319 5	0.970 3	—	0.355 6	—	7.903 2	0.319 5
9	3.138 4	\	2.711 3	\	2.052 5	\	16.684 0	\	1.900 5	\	26.487 0	\
10	0.052 7	\	4.887 9	\	1.925 4	\	6.981 6	\	2.401 3	\	16.249 0	\
11	—	0.072 6	—	—	1.426 4	6.112 4	—	—	—	0.029 2	1.426 4	6.214 2
12	0.992 6	—	0.058 0	—	9.434 3	0.159 2	2.179 2	—	1.153 4	0.055 7	13.818 0	0.214 9
13	0.503 2	0.080 3	0.436 9	0.050 5	4.094 9	0.402 3	1.598 9	—	0.479 8	—	7.113 7	0.533 1
14	0.747 3	0.080 4	0.397 9	0.026 9	20.357 0	0.336 1	5.346 0	—	3.267 7	—	30.116 0	0.443 4
15	1.281 4	\	3.934 0	\	3.187 0	\	6.397 9	\	1.924 4	\	16.725 0	\
16	1.227 7	\	1.111 0	\	0.817 8	\	3.419 9	\	0.823 5	\	7.399 9	\
17	1.659 3	0.053 1	1.332 9	0.033 0	6.940 0	0.920 1	7.033 5	0.257 0	1.640 3	0.121 1	18.606 0	1.384 3
18	1.394 8	0.099 4	2.171 1	0.023 6	10.134 0	0.414 9	10.300 0	0.359 5	1.983 8	0.154 8	25.984 0	1.052 2
19	1.225 2	0.086 4	1.008 2	0.076 1	0.686 2	0.108 8	2.568 2	0.520 5	0.238 9	0.147 1	5.726 7	0.938 9
20	0.392 2	—	0.312 7	—	8.631 8	0.933 2	1.319 8	—	5.109 3	0.142 5	15.766 0	1.075 7
21	0.251 8	—	0.224 2	—	16.124 0	0.621 6	0.887 3	—	3.031 0	0.086 6	20.518 0	0.708 2
22	1.485 9	\	3.890 3	\	2.853 9	\	6.806 6	\	0.826 1	\	15.863 0	\
23	—	\	0.053 5	\	6.961 4	\	0.090 7	\	0.079 9	\	7.185 5	\
24	0.405 0	\	0.400 3	\	3.833 0	\	1.375 5	\	3.348 8	\	9.362 6	\
25	0.906 7	\	0.802 5	\	13.444 0	\	2.533 2	\	0.386 3	\	18.073 0	\
26	0.522 9	\	0.451 3	\	0.271 4	\	2.061 5	\	3.780 2	\	7.087 3	\
27	—	—	—	—	—	—	—	—	0.091 8	0.009 6	0.091 8	0.009 6

“—” 未检出 “\” 样品没有茎

“—” undetected “\” samples without stems

定 (5 mg/g); 淫羊藿茎共测定了 16 批, 仅 4 批检出淫羊藿苷, 且全部低于 0.6 mg/g。因此, 如果按照《中国药典》2010 版对淫羊藿苷的限量规定, 本实验所测淫羊藿叶有 70% 多不符合规定, 如果仅以淫羊藿苷单指标进行衡量, 淫羊藿茎由于含淫羊藿苷太低则不适合作为药用部位。根据测定结果, 黄酮主要分布在叶中, 16 批样品的茎中有 68.8% 未检测到黄酮, 检出的茎中黄酮含量也只占叶的 1.7%~16.8%。除药用部位外, 不同品种间的各黄酮量差异也很大, 总体上, 淫羊藿苷在淫羊藿中最高, 在

柔毛淫羊藿中次高, 在巫山和粗毛淫羊藿中较低, 在箭叶淫羊藿中非常低或没有。此外, 淫羊藿苷并不是淫羊藿药材中含量最高的黄酮成分, 朝藿定 C 在箭叶、巫山和粗毛淫羊藿中比淫羊藿苷的量高数千至数百倍, 在柔毛淫羊藿中也比淫羊藿苷的量稍高或相等, 只在淫羊藿中较低和朝鲜淫羊藿中非常低。根据本实验统计分析的结果, 各黄酮量在品种间的差异远高于同品种产地间的差异, 因而基因在各黄酮的分布比例上起了决定性作用。测定结果也表明, 黄酮总和在品种间的差异相对较小, 这大多

由朝藿定 C 贡献,如果同时考虑淫羊藿苷和朝藿定 C,二者之和在品种间的差异相比较于淫羊藿苷可缩小约 30%。因此,《中国药典》2010 年版采用总黄酮为指标衡量淫羊藿质量较合理,但选择淫羊藿苷单指标来进一步衡量则会导致较高的不合格率和不合理性。此外,仅出于淫羊藿苷单指标的考虑,将巫山淫羊藿分列,虽一定程度降低了淫羊藿苷不合格率,但并未从根本上解决问题,建议除淫羊藿苷外,将权重较大的朝藿定 C 也考虑在内,采用双指标或多指标的质量控制。

考察的 27 批样品出现了 5 批异常结果,与其品种和性状有相关性。1、3、11、27 号样品,除 3 和 11 号的叶以及 1 和 11 号的茎检出朝藿定 C 外,5 种黄酮在叶和茎中几乎均未检出,且检出的茎中朝藿定 C 高于叶中,结果发现这 4 个样品均为箭叶淫羊藿。表明该品种中黄酮易于消失或除朝藿定 C 外其他黄酮极低,这也导致了黄酮总量的降低。黄酮消失的箭叶淫羊藿在性状上具有某些共同点,叶表面不具光泽或光泽性差,泛白。此外,来源于湖南廉桥的 14 号家种粗毛淫羊藿中朝藿定 C 量极高,色谱峰数和黄酮总量、淫羊藿苷的量也均高于同品种样品。

本实验测定的样品在品种和产地上是随机的,各品种均具一定数量,因而具有统计意义。其色谱图表明,尽管同品种在不同产地的各黄酮峰数和含量有些差异,但大体上相同品种的淫羊藿具有相似的 HPLC 色谱图,不同品种的样品则色谱图相差较大。因此,通过对色谱图的统计分析寻找淫羊藿品种的特征性,并采用特征指纹谱来鉴定品种笔者认为可行的^[8-12]。除箭叶淫羊藿存在黄酮消失的情况,其原因有待进一步探究外,其他品种采用聚类分析软件进行分析,应可得到种的分类和远近结果,这部分工作有待继续。不可否认,淫羊藿种内的相似度会因产地差异而很低^[11],这也是其他药材所面临的共同问题,是药材使用时要求尽量固定

GAP 基地的缘由。淫羊藿品种的指纹特征规律是否鲜明,还有待今后谱库的积累,特征指纹谱的建立必须在大量随机样品的基础上。

致谢: 中国药品生物制品检定所标本馆、贵州同济堂制药股份有限公司、通化万通药业股份有限公司、太极集团重庆桐君阁药厂、江苏 707 天然制药有限公司,江苏天江药业有限公司协助样品收集;江苏省中医药研究院贾晓斌研究员提供对照品。

参考文献

- [2] 郭宝林,肖培根. 中药淫羊藿主要种类评述 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 303-306.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 彭玉德. 淫羊藿原料的质量研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [5] 张海艳,秦海林,赵天增,等. 光叶淫羊藿的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1719-1723.
- [6] 张萍,孔维军,鄢丹,等. 基于淫羊藿苷测定及 HPLC 指纹图谱分析的淫羊藿药材质量差异评价 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1901-1904.
- [7] 郭宝林,王春兰,肖培根,等. 箭叶淫羊藿的黄酮类成分分析和质量评价 [J]. 中草药, 1996, 27(10): 584-686.
- [8] 郭宝林,王春兰,陈建民,等. 药典内 5 种淫羊藿中黄酮类成分的反相高效液相色谱分析 [J]. 药学学报, 1996, 31(4): 292-295.
- [9] 郭青,张庆生. 反相高效液相色谱法测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量及采用其指纹图谱鉴定淫羊藿 [J]. 中国药事, 2004, 18(11): 687-688.
- [10] 黄朝瑜,赵陆华,梅玲华,等. 淫羊藿药材 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 146-149.
- [11] 郭宝林,肖培根. 淫羊藿属植物中的黄酮类成分及其分类学意义 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(3): 228-243.
- [12] 裴利宽,郭宝林,黄文华. 淫羊藿属主要资源种类的 HPLC 指纹图谱特征和种类鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1662-1668.
- [13] 郭宝林,裴利宽,肖培根. 淫羊藿属植物黄酮类化合物的分类学意义再探 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(6): 874-885.