不同扩繁模式对朝鲜淫羊藿有效成分累积的影响

王 晶[1]，董 焱[1]，何立华[2]，贾凌云[1]，刘蓬蓬[1]，路金才[1*]

1. 沈阳药科大学中药学院，辽宁 沈阳 110016
2. 沈阳药科大学医疗器械学院，辽宁 沈阳 110016

摘 要：目的 研究不同扩繁模式对朝鲜淫羊藿有效成分累积的影响，为朝鲜淫羊藿规范化栽培提供理论依据。**方法** 采用紫外可见分光光度法与 HPLC 法测定不同扩繁模式下朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷的量。**结果** 不同扩繁模式下，朝鲜淫羊藿有效成分量存在显著差异，50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的总黄酮和淫羊藿苷量受采收期和采收年限的影响较小，有效成分量高。**结论** 朝鲜淫羊藿以 50%遮光人工栽培扩繁模式最佳。

关键词：朝鲜淫羊藿；总黄酮；淫羊藿苷；扩繁模式；HPLC

中图分类号：R282.21 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)13 - 1827 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.024

Effects of different propagation modes on accumulation of active components in *Epimedium koreanum*

WANG Jing[1], DONG Yan[1], HE Li-hua[2], JIA Ling-yun[1], LIU Peng-peng[1], LU Jin-cai[1]

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
2. Faculty of Medical Instrumentation, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To study the effects of the different propagation modes on the accumulation of active components in *Epimedium koreanum*, and to provide the guidance for the standardized cultivation of *E. koreanum*. **Methods** The contents of total flavonoids and icariin in the different propagation modes of *E. koreanum* were measured by HPLC and ultraviolet spectrophotometry. **Results** The contents of the active components had the significant difference in *E. koreanum* of different propagation modes. By cultivating under the 50% man-made shade and under the sun, the contents of the active components were far higher and more stable, but little impacted by harvest time and growth year. **Conclusion** When cultivated under the 50% man-made shade, *E. koreanum* is the best of the four propagation modes.

Key words: *Epimedium koreanum* Nakai; total flavonoids; icariin; propagation mode; HPLC

朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 是《中国药典》2010 年版收载的淫羊藿主要来源之一，为小檗科淫羊藿属多年生草本植物，地上部分入药[1]。野生朝鲜淫羊藿每年 3 月初返青，4 月下旬～5 月中旬开花，果期为 5～6 月。东北地区通常在 7～9 月份采收。其主要含有黄酮类和淫羊藿苷类化合物[2]，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用。临床发现其对阳痿、筋骨酸软、更年期高血压、心脑血管疾病等具有显著疗效[3]。朝鲜淫羊藿是北方市场的主流品种，价格是其他种类的 2～3 倍[4]。但由于抢收、滥收及采收方法不当，造成该资源贮量骤减[4]。文献报道[5-6]其栽培技术，目的都是为了加快朝鲜淫羊藿的扩繁进度，提出了野生抚育、林下仿生栽培，人工栽培等扩繁途径。但不同扩繁途径下，其有效成分累积效果综合对比则鲜有报道[7-8]。本实验主要对扩繁途径下生长的朝鲜淫羊藿有效成分累积变化进行对比分析，旨在更加全面地探讨不同扩繁模式下，不同采收时间和不同生长年限对朝鲜淫羊藿有效成分积累的影响，为朝鲜淫羊藿无公害规范化生产技术示范基地建设提供指导依据。

1 仪器与材料

Lab Alliance-Series III 型高效液相色谱仪；Model

收稿日期：2013-01-05

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81102755）

作者简介：王 晶（1977—），女，博士，讲师，主要从事中药资源的研究和开发。Tel: (024)23986499 E-mail: wangjingyk@126.com

***通信作者** 路金才 Tel: (024)23986500 E-mail: jincailu@yahoo.com.cn

500 型紫外检测器（美国 Alliance 公司）；UV—2600A 型紫外可见分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）；Sarturius—BS124S 电子天平（北京赛多利斯天平有限公司）；KQ5200E 型数控超声清洗机（昆山市超声仪器有限公司）；FW100 型高速万能粉碎机（24 000 r/min）（天津市泰斯特仪器有限公司）。

淫羊藿苷对照品（批号 110737-200413）购自中国药品生物制品检定所，乙腈、甲醇（色谱纯，天津市西华特种试剂厂），水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。

朝鲜淫羊藿样品于 6、7、8、9、10 月按十字采样法采自辽宁丹东凤凰山（6 年生的朝鲜淫羊藿进行野生抚育）和在沈阳药科大学药草园实验基地的 3 个栽培小区，经沈阳药科大学药用资源开发实验室路金才教授鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimediu koreanum* Nakai.。将采集于凤凰山 6 年生的朝鲜淫羊藿根茎在沈阳药科大学药草园实验基地分别进行林下仿生栽培、50%遮光人工栽培及自然光下人工栽培，用洁净镰刀于各样点割取地上全株，并捆成小把，于室内阴干，备用。

2 方法

2.1 HPLC 法测定淫羊藿苷[9]

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Inertsil C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（26∶74）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 272 nm；进样量 10 μL；柱温为室温。理论塔板数按淫羊藿苷峰计不低于 1 500，淫羊藿苷色谱峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5，拖尾因子在 0.95～1.05，色谱峰见图 1。

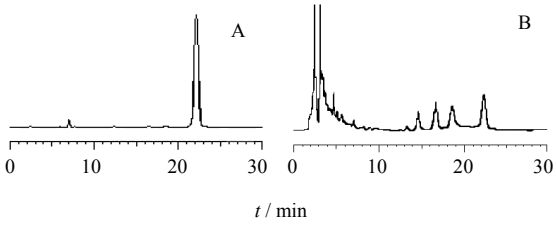

图 1 淫羊藿苷对照品 (A) 与样品 (B) 的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of icariin reference substance (A) and sample (B)

2.1.2 供试品溶液的制备 将样品粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精确加入稀乙醇 20 mL，称定质量，超声处理 1 h，再称定质量，用稀乙醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量，加甲醇制成 0.1 mg/L 的对照品溶液。

2.1.4 精密度试验 精密称取淫羊藿苷对照品 0.2 g，按“2.1.1”项色谱条件测定，连续进样 6 次，记录淫羊藿苷的峰面积，计算得 RSD 为 1.55%，说明色谱系统精密度符合要求。

2.1.5 线性关系考察 取“2.1.3”对照品溶液，精密吸取 3、6、9、12、15、18 μL 进样，按“2.1.1”项色谱条件测定，以进样量为横坐标（X），峰面积值为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得回归方程式：$Y=2\times10^9 X+1\ 375.2$，$r=0.999\ 9$。结果表明，淫羊藿苷在 0.3～1.8 μg 进样量与色谱峰面积呈良好的线性关系。

2.1.6 稳定性试验 精密称取 7 月份阴干样品，按“2.1.1”色谱条件，分别在制备样品后的 0、1、2、4、8、12 h，吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪，记录淫羊藿苷的峰面积，计算相对标准偏差。结果表明，RSD 为 2.30%，说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取 7 月份阴干样品 6 份，每份 0.2 g，精密称定，按“2.1.2”项方法制备供试品溶液，按“2.1.1”色谱条件测定，记录淫羊藿苷的峰面积，计算 RSD 为 0.10%，说明本方法的重现性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取 7 月份阴干样品 6 份，各约 0.1 g，分别精密加入淫羊藿对照品溶液（0.1 mg/L）3 mL，按“2.1.2”项方法制备样品溶液，按“2.1.1”色谱条件测定，记录淫羊藿苷的峰面积并计算其量，加样回收率为 99.43%，RSD 为 0.29%（$n=6$）。

2.2 UV 法测定总黄酮量[9]

2.2.1 供试品溶液的制备 精密量取“2.1.2”项供试品溶液 0.5 mL，置 50 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量，加甲醇制成 10 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 测定方法 以甲醇作为空白溶液，在 270 nm 波长处分别测定供试品溶液与对照品溶液的吸光度（A）值。

3 结果与讨论

3.1 不同采收期朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷的量变化

不同采收期中朝鲜淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷的量变化趋势见表 1、2。50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的总黄酮和淫羊藿苷量受采收期的影响

表 1 不同采收期下各扩繁模式中朝鲜淫羊藿总黄酮量的变化

Table 1 Contents of total flavonoids in *E. koreanum* by various propagation modes during different collection periods

扩繁模式	总黄酮 / %				
	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月
野生抚育	7.10	10.94	8.35	8.22	8.00
50%遮光人工栽培	9.89	11.39	11.81	11.93	11.86
自然光下人工栽培	11.35	11.07	11.31	11.39	11.42
林下仿生栽培	6.90	8.44	7.21	7.03	7.08

表 2 不同采收期下各扩繁模式中朝鲜淫羊藿淫羊藿苷量的变化

Table 2 Contents of icariin in *E. koreanum* by various propagation modes during different collection periods

扩繁模式	淫羊藿苷 / %				
	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月
野生抚育	0.50	0.38	0.37	0.20	0.12
50%遮光人工栽培	0.34	0.54	0.58	0.44	0.43
自然光下人工栽培	0.49	0.55	0.61	0.56	0.61
林下仿生栽培	0.27	0.31	0.29	0.26	0.25

较小，8 月份总黄酮量比 7 月份的分别高 3.69%和 2.65%；8 月份淫羊藿苷量比 7 月份的分别高 7.41%和 10.91%，而且这两种扩繁模式的朝鲜淫羊藿中有效成分在各个采收期都显著高于野外抚育和林下仿生栽培的朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷量。在这 4 种扩繁模式下，以 50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷量累积效果最佳。且在 6 月份以后，50%遮光人工栽培的朝鲜淫羊藿中总黄酮量都普遍高于自然光下人工栽培的朝鲜淫羊藿，淫羊藿苷量略低于自然光下人工栽培的朝鲜淫羊藿。

3.2 不同采收年限朝鲜淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷量的变化

由表 3、4 所知，50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的总黄酮和淫羊藿苷量在不同生长年限下也都明显高于野生抚育和林下仿生栽培，在第 5 年时 50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的总黄酮积累量基本是野生抚育和林下仿生栽培的 2 倍。其

表 3 不同采收年限各扩繁模式中朝鲜淫羊藿中总黄酮量变化

Table 3 Contents of total flavonoids in *E. koreanum* by various propagation modes in different har vest years

扩繁模式	总黄酮 / %			
	1 年	2 年	3 年	5 年
野生抚育	6.30	5.37	6.25	6.21
50%遮光人工栽培	10.93	10.81	11.54	12.12
自然光下人工栽培	11.17	12.01	12.23	12.46
林下仿生栽培	5.46	8.25	6.54	6.01

表 4 不同采收年限各扩繁模式中朝鲜淫羊藿中淫羊藿苷的量变化

Table 4 Contents of icariin in *E. koreanum* by various propagation modes in different harvest years

扩繁模式	淫羊藿苷 / %			
	1 年	2 年	3 年	5 年
野生抚育	0.12	0.13	0.11	0.17
50%遮光人工栽培	0.44	0.46	0.48	0.52
自然光下人工栽培	0.47	0.49	0.55	0.52
林下仿生栽培	0.25	0.34	0.27	0.21

中林下仿生栽的样品有效成分第 1、2 年变化很大，其总黄酮和淫羊藿苷的量第2年比第1年明显增加，但第 3 年与第 2 年相比两者量都有明显下降趋势。

4 讨论

多年生的中药材在不同的采收时期和年限的条件下，其有效成分的量存在着明显的变化。当归在不同的生长期挥发性成分组成及量相差较大，该类成分的合成与其生长周期密切相关。对不同产地不同采收期当归主要活性部位挥发性成分的动态积累规律分析评价表明，当归药材传统采收期在秋末冬初是适宜的[10]。文献报道野生朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷量的高低，主要受采收期的影响[3]，多在 7 月份收获，产量和有效成分都较高，7 月以后则明显降低，野生抚育的朝鲜淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷量累积趋势与报道一致。50%遮光人工栽培和自然光下人工栽培的总黄酮和淫羊藿苷量受采收期和不同采收年限的影响较小，质量分数稳定，而且这两种扩繁模式的朝鲜淫羊藿中有效成分在各个采

收期和采收年限下都远远高于野外抚育和林下仿生栽培的朝鲜淫羊藿中总黄酮和淫羊藿苷量。可能是林下栽培的朝鲜淫羊藿周边的灌木长大使其遮荫度增大，光合产物积累减少所致。

本实验中不同年生各样品总黄酮均超过《中国药典》2010 年版标准（总黄酮＞5%），但淫羊藿苷量有的低于《中国药典》2010 年版标准，主要是由于本试验选取材料为地上全株，包括茎和叶，而地上茎中淫羊藿苷量明显低于叶中[11]。自然光下栽培的朝鲜淫羊藿中总黄酮、淫羊藿苷的量要明显高于野生抚育和林下仿生栽培，再次证明朝鲜淫羊藿有效成分积累与光照条件密切相关[12]，但田间观察发现其植株稀疏、矮小（10～15 cm），在 7 月份后生长缓慢，有的甚至枯萎、坏死。说明强光虽有助于它有效成分的积累，但会使其植株生理受到伤害，严重影响产量。50%遮光人工栽培的植株生长健壮，说明适度遮光人工栽培的朝鲜淫羊藿不但可以明显提高有效成分的量，而且有效成分稳定，在朝鲜淫羊藿规范化生产中可以进行推广。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 韩 惠, 单 淇, 周福军, 等. 淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 78-82.

[3] 张华峰, 杨晓华, 郭玉蓉, 等. 药用植物淫羊藿资源可持续利用现状与展望 [J]. 植物学报, 2009, 44(3): 363-370.

[4] 徐艳琴, 陈建军, 葛 菲, 等. 淫羊藿药材质量评价研究现状与思考 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 661-666.

[5] 申新春, 娄殿民, 赵 刚, 等. 朝鲜淫羊藿林下人工栽培技术 [J]. 林业实用技术, 2008(5): 42.

[6] 秦佳梅, 张卫东, 孙 华. 朝鲜淫羊藿林下仿生栽培技术 [J]. 通化师范学院学报, 2006, 27(4): 72-74.

[7] 秦佳梅, 董 然, 张卫东. 不同年生朝鲜淫羊藿有效成分分析 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 901-902.

[8] 秦佳梅, 董 然, 张卫东. 栽培的朝鲜淫羊藿有效成分积累规律研究 [J]. 通化师范学院学报, 2006, 27(2): 82-84.

[9] 单 娜, 路金才, 王 晶, 等. 辽宁产朝鲜淫羊藿不同药用部位有效成分含量的测定 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 48-50.

[10] 葛月兰, 钱大玮, 段金廒, 等. 不同产地不同采收期当归挥发性成分的动态积累规律与适宜采收期分析 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 517-523.

[11] 孙 超, 张勇民, 林昌虎, 等. 野生和栽培粗毛淫羊藿苷含量变化分析 [J]. 资源开发与市场, 2006, 22(3): 209-210.

[12] 董 然, 冯玉才, 刘丽娟, 等. 光照对野生朝鲜淫羊藿有效成分含量的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(4): 413.