

不同干燥方式对淫羊藿黄酮类成分含量及抗氧化活性影响

王燕萍, 贾旭森, 王 艳, 周 静, 王子夏, 李 雪, 张 菊, 徐巧红, 史文博, 胡芳弟*

兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 比较不同干燥方式对淫羊藿黄酮类成分含量及抗氧化活性的影响, 优选淫羊藿的最佳干燥方式。**方法** 分别采用冷冻干燥、阴干、微波干燥、炒干、蒸制后阴干以及不同温度 (50、75、100、125、150、175、200 °C) 烘干的方式, 制得 12 个样品。以淫羊藿黄酮类成分含量、醇浸出物含量、指纹图谱中共有峰峰面积与称样量的比值和 (比值和) 及自由基清除能力为指标进行评价。**结果** 不同干燥方式对 5 种黄酮朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I 的含量影响较大, 微波干燥样品 (S10) 中 5 种黄酮总量最高; 冷冻干燥样品 (S8) 的总黄酮含量和醇浸出物含量最高; 175 °C 烘干样品 (S6) 的比值和最高; 以上述 4 个指标进行综合评分, 发现微波干燥样品 (S10) 的综合得分最高。自由基清除实验表明微波干燥样品 (S10) 的稀乙醇提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力最强, 高温烘干样品 (S5~S7) 对羟自由基的清除能力较强。**结论** 综合考虑黄酮类成分含量和抗氧化活性, 建议淫羊藿最佳的干燥方式为微波干燥, 但是微波干燥是否能用于淫羊藿工业生产的干燥步骤, 有待进一步研究。

关键词: 淫羊藿; 黄酮; 干燥方式; 抗氧化活性; 指纹图谱; 冷冻干燥; 微波干燥; 阴干; 烘干; 炒干; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4193-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.009

Effects of different drying methods on flavonoids content and antioxidant activity of *Epimedium Folium*

WANG Yan-ping, JIA Xu-sen, WANG Yan, ZHOU Jing, WANG Zi-xia, LI Xue, ZHANG Ju, XU Qiao-hong, SHI Wen-bo, HU Fang-di

College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different drying methods on the flavonoids content and antioxidant activity of *Epimedium Folium* (EF), so as to optimize the best drying method for EF. **Methods** A total of 12 samples were prepared by freeze-drying, shade drying, microwave drying, stir-frying, shade drying after steaming and drying at different temperatures (50, 75, 100, 125, 150, 175, and 200 °C). The flavonoids content, alcohol extract content, the ratio of the total peak area of the fingerprint to the volume of the sample (ratio of sum) and free radical scavenging rate were used as the indexes for detection. **Results** Drying method had a great influence on the contents of five flavonoids, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, and baohuoside I, the microwave-dried (S10) sample had the highest contents of five flavonoids. The freeze-dried sample (S8) had the highest contents of total flavonoids and alcohol extracts. The ratio of sum of dried sample at 175 °C (S6) was the highest. It was found that the microwave-dried sample (S10) had the highest comprehensive score based on the above four indexes. The free radical scavenging experiments showed that microwave-dried sample (S10) had the strongest scavenging ability on DPPH free radical and superoxide anion free radical, while the high-temperature dried sample (S5—S7) had the strongest scavenging ability on hydroxyl free radical. **Conclusion** Considering the content of flavonoids and antioxidant activity, microwave drying is recommended as the best drying method for EF, but whether microwave drying can be used in the industrial production of EF remains to be further studied.

Key words: *Epimedium Folium*; flavonoids; drying mode; antioxidant activity; fingerprint; freeze-drying; microwave drying; shade drying; oven drying; stir frying; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icariin; baohuoside I

收稿日期: 2021-03-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706300); 国家重点研发计划项目 (2018YFC17063003); 甘肃省技术创新引导计划-民生专项 (20CX4FK014); 兰州市人才创新创业项目 (2017-RC115); 兰州市人才创新创业项目 (2020-RC-41)

作者简介: 王燕萍, 女, 博士研究生, 主要从事中药成分分离分析研究。Tel: 18394010528 E-mail: ypwang13@lzu.edu.cn

***通信作者:** 胡芳弟, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药成分分离分析及中药新药开发研究。Tel: 13919780068 E-mail: hufd@lzu.edu.cn

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicomum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶^[1]。现代药理学研究表明,淫羊藿具有增强免疫^[2]、抑制肿瘤^[3-4]、抗炎^[5]、抗骨质疏松^[6-8]和抗氧化^[9]等多种药理活性。目前,淫羊藿在临床上常用于治疗肾阳虚衰、阳痿遗精等症,上述功效与氧化应激高度相关。肾损伤患者因血清中氧化物活性增加且抗氧化物活性降低而导致氧化应激反应增加,进而导致肾功能障碍的发生^[10-11],有研究表明淫羊藿总黄酮可以通过改善氧化应激,减少炎症反应,并通过抗凋亡途径来减少顺铂引起的小鼠肾损伤^[12]。

淫羊藿的黄酮成分朝藿定 A、朝藿定 B、淫羊藿苷等在清除自由基、防止生物体过氧化过程中具有重要作用^[13-14],可作为天然抗氧化剂,且朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷为《中国药典》2020 年版中淫羊藿药材的指标性成分,说明上述黄酮是淫羊藿的重要活性成分。淫羊藿黄酮类成分的含量因品种^[15]、产地^[15]、种植模式^[16]和采收时间^[17]等不同而具有较大的差异,而采收后的干燥过程也会对其黄酮类成分产生较大的影响^[18]。淫羊藿历来多以野生品供药用,药农采集药材后,随手扎把悬挂于山坡树叉上或房前屋后自然阴干或晒干,存在耗时长、较难规模化生产等缺点。有研究采用不同温度对朝鲜淫羊藿鲜叶进行了干燥,发现干燥温度与异戊二烯基黄酮类成分的含量呈反比^[18]。

本实验采用不同干燥方式对淫羊藿鲜叶进行干燥,以黄酮类成分和醇浸出物含量以及抗氧化活性为指标,优选淫羊藿的最佳干燥方式,为其进一步开发利用提供理论依据。

1 仪器与材料

CPA225D 十万分之一分析天平,德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;FA2004 万分之一分析天平,上海良华仪器仪表有限公司;安捷伦 1260II 高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器,安捷伦科技

(中国)有限公司;KQ-400KDE 超声波清洗仪,常州诺基仪器有限公司;UV-1700 紫外分光光度计,日本 Shimadzu 公司。

淫羊藿鲜药材,来源于甘肃省礼县中坝乡,为野生品,5 月初采集,采集后置于有冰袋的泡沫箱中,24 h 内送至实验室进行相关实验,由甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *E. brevicomum* Maxim. 的叶。

对照品朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I,批号分别为 110623-72-8、110623-73-9、110642-44-9、489-32-7 和 113558-15-9,质量分数均为 98%,购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;甲醇、乙腈,色谱纯,瑞典 Oceanpak 公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 样品制备

称取 500 g 淫羊藿鲜叶 36 份,分别用不同温度(50、75、100、125、150、175、200 °C)烘干、冷冻干燥、自然阴干、微波干燥、炒干、蒸后阴干,制得样品 S1~S12,每个样品平行 3 份。样品信息见表 1。

2.2 水分含量测定

参照《中国药典》2020 年版四部项下 0832 烘干法测定^[9],结果通过 Excel 2013 进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示(下同),结果见表 2。《中国药典》2020 年版规定淫羊藿的水分不得高于 12%,根据表 2,不同干燥方式制得的淫羊藿样品水分均低于 12%,满足药典要求。

2.3 5 种黄酮类成分含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2020 年版“淫羊藿”项下总黄酮醇苷的制备方法^[1]。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取 5 种黄酮对照品适量,加甲醇制成对照品储备液(朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I 的质量浓度分别为 2.95、2.70、2.50、2.48、2.58 mg/mL),取 5 种对照品储备液各 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,制成

表 1 淫羊藿不同干燥方式及所需时间

Table 1 Different drying methods and required time of *Epimedium Folium*

编号	干燥方式	所需时间	编号	干燥方式	所需时间	编号	干燥方式	所需时间
S1	50 °C 烘干	1 h	S5	150 °C 烘干	5 min	S9	阴干	4 d
S2	75 °C 烘干	47 min	S6	175 °C 烘干	4 min	S10	微波干燥	3 min
S3	100 °C 烘干	31 min	S7	200 °C 烘干	3 min	S11	150 °C 炒干	6 min
S4	125 °C 烘干	16 min	S8	冷冻干燥	24 h	S12	蒸 1 h, 切丝, 阴干	1 h+4 d

表 2 水分测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Moisture measurement results ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	含水量/%	编号	含水量/%	编号	含水量/%
S1	7.07±0.14	S5	5.31±0.14	S9	5.52±0.40
S2	6.83±0.37	S6	4.73±0.07	S10	4.43±0.03
S3	6.53±0.11	S7	3.68±0.07	S11	6.31±0.20
S4	5.82±0.18	S8	5.82±0.92	S12	7.47±0.01

混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 270 nm; 流动相为水-乙腈, 洗脱程序参照《中国药典》2020 年版淫羊藿项下总黄酮醇苷的测定方法^[1], 具体为 0~29 min, 25% 乙腈; 29~30 min, 25%~41% 乙腈; 30~55 min, 41% 乙腈。色谱图见图 1。

2.3.4 线性关系考察 将上述混合对照品溶液稀释成系列对照品溶液 (朝藿定 A: 1.15、2.30、4.61、9.22、18.44、36.88、73.75、147.50、295.00、590.00 μg/mL; 朝藿定 B: 1.05、2.11、4.22、8.44、16.88、33.75、67.50、135.00、270.00、540.00 μg/mL; 朝藿定 C: 0.98、1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 μg/mL; 淫羊藿苷: 0.97、1.94、3.88、7.75、15.50、31.00、62.00、124.00、248.00、496.00 μg/mL; 宝藿苷 I: 1.01、2.01、4.02、8.05、16.09、32.19、64.38、128.75、257.50、515.00 μg/mL), 注入液相色谱仪 10 μL, 根据峰面积绘制标准曲线, 进行线性回归, 得 5 种成分的回归方程与线性范围分别为朝藿定 A $Y=1150.9X-137.38$, $R^2=0.9993$, 线性范围 2.30~590.00 μg/mL; 朝藿定 B $Y=1341.6$

$X-171.33$, $R^2=0.9992$, 线性范围 2.11~540.00 μg/mL; 朝藿定 C $Y=1190.4X-122.67$, $R^2=0.9993$, 线性范围 1.95~500.00 μg/mL; 淫羊藿苷 $Y=1593.3X-193.31$, $R^2=0.9990$, 线性范围 1.94~496.00 μg/mL; 宝藿苷 I $Y=2258.3X-148.44$, $R^2=0.9995$, 线性范围 1.01~515.00 μg/mL。

2.3.5 样品测定 取各供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 根据回归方程计算各黄酮类成分含量, 结果见表 3。《中国药典》2020 年版规定淫羊藿药材中 4 种黄酮类成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量和不得少于 1.5%, 本实验中除高温烘干样品 (S5~S7) 中 4 种黄酮含量和不满足药典要求外, 其他样品中 4 种黄酮含量均符合要求。相比于阴干样品, 微波干燥样品 (S10) 的 4 种黄酮总量最高, 达到了 4.00%。

考虑到宝藿苷 I 也是淫羊藿中重要黄酮类成分, 也具有抗氧化^[24]、抗骨质疏松^[25]等活性, 因此本实验将宝藿苷 I 的含量也作为评价指标之一。高温烘干样品 (S5~S7) 和蒸制后阴干样品 (S12) 中宝藿苷 I 含量较高, 均达到了 1.0% 以上。

综合考虑 4 种黄酮类成分总量和宝藿苷 I (5 种黄酮) 的含量, 发现微波干燥样品 (S10) 中 5 种黄酮总量最高, 达到了 4.43%。不同干燥方式所得淫羊藿样品中 5 种黄酮类成分含量差异较大, 可能与黄酮苷类成分受水解酶的影响在干燥过程中发生水解反应有关。

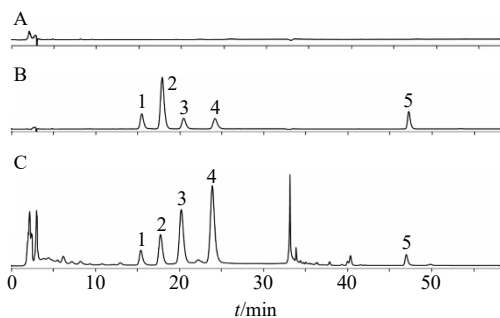
2.4 总黄酮含量测定^[1]

2.4.1 供试品溶液制备 具体方法同“2.3.1”项。

2.4.2 对照品溶液的制备 取淫羊藿苷对照品 2.50 mg, 加甲醇制成 0.500 mg/mL 的对照品储备液, 分别取对照品储备液 0、100、200、300、400、500 μL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得系列质量浓度的淫羊藿苷对照品溶液。

2.4.3 线性关系考察 以空白溶剂校零, 在 270 nm 波长下测定淫羊藿苷系列对照品溶液的吸光度 (A) 值, 测定 3 次, 取平均值, 以淫羊藿苷对照品的质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=36.877X-0.0275$, $R^2=0.9960$, 线性范围为 0.005~0.025 mg/mL。

2.4.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 50 μL, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀。测定 A 值, 平行 3 份, 根据 A 值计算总黄酮含量, 结果见



1-朝藿定 A 2-朝藿定 B 3-朝藿定 C 4-淫羊藿苷 5-宝藿苷 I
1-epimedinin A 2-epimedinin B 3-epimedinin C 4-icariin 5-baohuoside I

图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品 (B) 和淫羊藿样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solvent (A), mixed reference substances (B), and *Epimedii Folium* sample (C)

表 3 5 种黄酮类成分测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Determination results of five kinds of flavonoids ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	朝藿定 A/%	朝藿定 B/%	朝藿定 C/%	淫羊藿苷/%	4 种黄酮总量*/%	宝藿苷 I/%	5 种黄酮总量/%
S1	0.24±0.01	0.27±0.00	0.76±0.01	0.52±0.01	1.79±0.02	0.72±0.01	2.51±0.02
S2	0.31±0.01	0.35±0.01	1.26±0.03	0.85±0.01	2.78±0.04	0.62±0.01	3.39±0.03
S3	0.29±0.00	0.33±0.00	1.11±0.02	0.76±0.00	2.49±0.02	0.59±0.00	3.09±0.02
S4	0.29±0.01	0.34±0.00	1.04±0.04	0.76±0.05	2.42±0.08	0.61±0.01	3.04±0.29
S5	0.00±0.00	0.16±0.00	0.00±0.00	0.28±0.02	0.44±0.08	1.83±0.05	2.27±0.07
S6	0.00±0.00	0.15±0.00	0.00±0.00	0.28±0.00	0.43±0.01	2.47±0.17	2.90±0.16
S7	0.00±0.00	0.15±0.00	0.00±0.00	0.23±0.01	0.39±0.01	2.18±0.03	2.56±0.04
S8	0.26±0.00	0.31±0.00	0.97±0.02	0.69±0.02	2.23±0.02	0.78±0.01	3.01±0.03
S9	0.32±0.01	0.37±0.01	1.45±0.05	0.99±0.00	3.13±0.05	0.50±0.00	3.63±0.03
S10	0.35±0.01	0.40±0.01	1.90±0.03	1.34±0.08	4.00±0.08	0.44±0.01	4.43±0.18
S11	0.26±0.01	0.30±0.00	0.90±0.02	0.69±0.00	2.15±0.02	0.76±0.02	2.91±0.12
S12	0.28±0.00	0.33±0.00	0.97±0.01	1.35±0.02	2.91±0.03	1.06±0.02	3.98±0.05

*表示《中国药典》2020 年版中淫羊藿药材的指标性成分朝藿定 A~C 和淫羊藿苷 4 种黄酮的总量

*denote the total amount of for flavonoids, epimedin A—C and icariin, which are the indicator components of *Epimedium Folium* in the Chinese Pharmacopoeia (2020)

表 4。《中国药典》2020 年版规定淫羊藿的总黄酮含量不得少于 5.0%，根据表 4，不同干燥方式制得的 12 个淫羊藿样品中总黄酮含量均满足药典要求，总黄酮在 (9.06±0.15)%~(10.39±0.11)%，其中冷冻干燥样品 (S8) 和微波干燥样品 (S10) 的总黄酮含量较高。

2.5 醇浸出物含量测定

按《中国药典》2020 年版四部 2201 项下的热浸法测定^[9]，结果见表 4。不同干燥方式所得样品中醇浸出物质量分数在 (16.25±0.57)%~(29.72±0.13)%，高温烘干样品 (S5~S7) 的醇浸出物含量均低于 20%，冷冻干燥样品 (S8) 的醇浸出物含量最高，达到 29.72%。

2.6 指纹图谱研究

2.6.1 供试品溶液制备 同“2.3.1”项。

表 4 总黄酮和醇浸出物含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Total flavones and alcohol extract contents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	总黄酮/%	醇浸出物/%	样品	总黄酮/%	醇浸出物/%
S1	9.73±0.14	28.22±0.72	S7	9.06±0.15	16.27±0.32
S2	10.23±0.20	28.50±0.67	S8	10.39±0.11	29.72±0.13
S3	9.80±0.14	28.56±0.61	S9	9.98±0.25	26.86±0.32
S4	9.98±0.14	27.74±0.91	S10	10.33±0.14	27.49±0.85
S5	9.41±0.18	16.25±0.57	S11	9.90±0.20	26.54±0.59
S6	9.60±0.21	17.06±0.56	S12	9.39±0.25	22.69±0.53

2.6.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 20 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长 270 nm; 流动相为 0.5% 乙酸水溶液-甲醇-乙腈; 洗脱程序参考文献报道^[20]，稍作调整，具体见表 5。

2.6.3 指纹图谱的建立及结果分析 按“2.6.2”项下色谱条件测定，得 12 批不同干燥方式所得淫羊藿样品的指纹图谱。本实验共标定了 12 个共有峰，通过与对照品比对 (图 2)，指认出了其中的 3 个，

表 5 梯度洗脱程序

Table 5 Gradient elution program

t/min	0.5% 乙酸水溶液/%	甲醇/%	乙腈/%
0	88	0	12
30	75	0	25
45	75	0	25
45.01	65.5	11	23.5
53	65.5	11	23.5
55	61	4	35
75	61	4	35
77	65	0	35
85	65	0	35
95	50	0	50
105	0	0	100
110	0	0	100
117	88	0	12

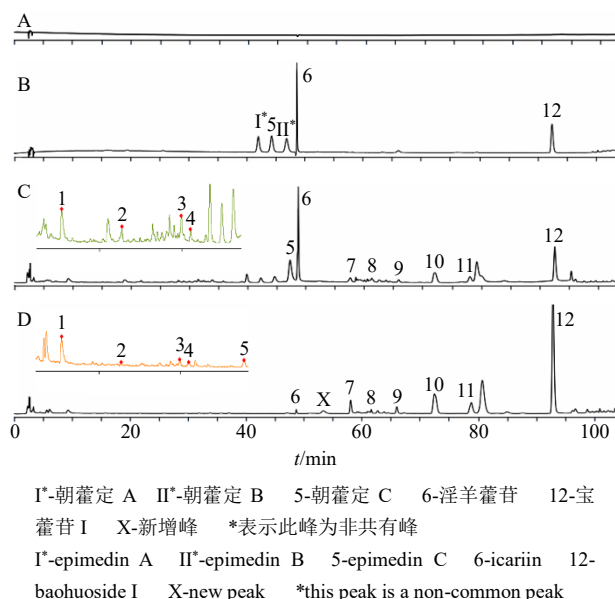


图 2 空白溶剂 (A)、混合对照品 (B)、阴干样品 (C) 和 200 °C 烘干样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of blank solvent (A), mixed reference substances (B), shade drying sample (C) and sample dried at 200 °C (D)

分别为朝藿定 B (5 号峰), 淫羊藿苷 (6 号峰) 和宝藿苷 I (12 号峰)。将 cdf 格式的数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行分析, 设置 S9 (阴干样品) 为参照指纹图谱, 采用多点校正后进行匹配, 12 批样品的指纹图谱叠加图见图 3。通过图 3 可以看出不同干燥方式对化学成分的影响较大, 高温烘干样品 (S5~S7) 在 0~50 min 共有峰较少且峰面积较小, 50 min 以后共有峰峰面积增加, 其中峰 12 (宝藿苷 I) 增幅最大, 在 50~55 min,

出现了 1 个新峰 X。猜测淫羊藿在高温处理过程中存在着黄酮糖苷之间的转化, 由多糖苷 (朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷) 脱去了 C7 位的葡萄糖, 转化为了低糖苷 (箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II 和宝藿苷 I), 以淫羊藿苷转化为宝藿苷 I 为例, 转化过程见图 4, 查阅相关文献可证实淫羊藿在炮制过程中黄酮糖苷之间确实存在转化的现象^[26-27], 转化机制有待进一步研究。

将 12 个样品共有峰的比值和进行归一化处理, 结果见表 6。可见, 高温烘干 (S5~S9) 样品的指纹图谱中共有峰的比值和较高, 其中 175 °C 烘干样品 (S6) 的共有峰的比值和最高。

2.7 综合评分分析及结果

参照罗春丽等^[23]采用综合评分法, 评价不同干燥方式对黄酮类成分含量的综合影响。根据所测成分在淫羊藿中的重要性, 以总黄酮醇苷 (以 5 种黄酮总含量计) 为 40 分, 总黄酮含量为 30 分, 醇浸出物含量为 10 分, 比值和为 20 分, 满分 100 分, 每个样品的综合得分 = (5 种黄酮含量和/最大 5 种黄酮含量和) × 40 + (总黄酮含量/最大总黄酮含量) × 30 + (醇浸出物含量/最大醇浸出物含量) × 10 + (比值和/最大比值和) × 20。综合得分结果见表 7, 可以看出, 微波干燥样品 (S10) 的综合得分最高, 达到了 92.50, 因此, 通过黄酮类成分含量优选的干燥方式为微波干燥。

2.8 抗氧化活性测定

2.8.1 供试品溶液制备 同“2.3.1”项。

2.8.2 测定方法

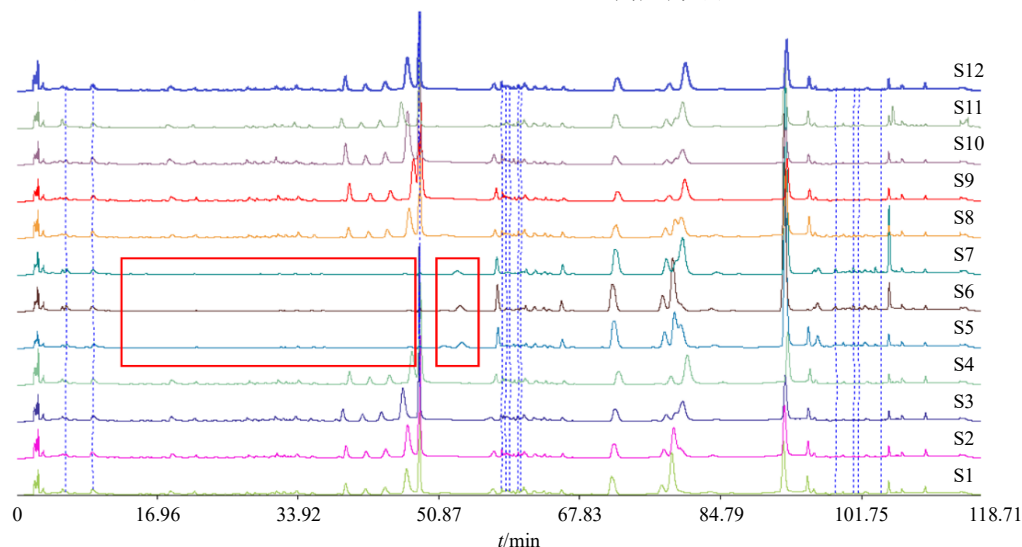


图 3 不同干燥方式指纹图谱比较

Fig. 3 Comparison of fingerprint of different drying modes

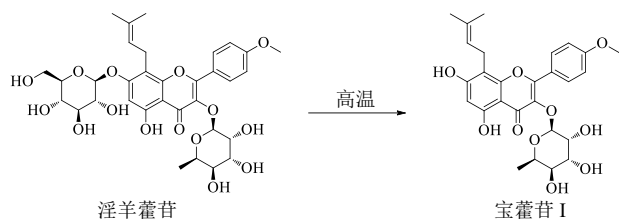


图 4 淫羊藿苷转化为宝藿苷 I

Fig. 4 Transformation of icaritin into baohuoside I

表 6 指纹图谱共有峰峰面积与称样量比值和 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Sum of ratio of common peak area to sample weight in fingerprint ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	共有峰峰面积与称样量 的比值和 (归一化)	样品	共有峰峰面积与称样量 的比值和 (归一化)
S1	0.96±0.02	S7	1.53±0.01
S2	1.04±0.02	S8	1.03±0.06
S3	0.97±0.02	S9	1.00±0.05
S4	0.98±0.04	S10	1.10±0.04
S5	1.37±0.03	S11	1.03±0.03
S6	1.65±0.05	S12	1.16±0.00

表 7 综合得分

Table 7 Composite scores

样品	综合得分	样品	综合得分	样品	综合得分
S1	72.04	S5	69.75	S9	82.79
S2	82.38	S6	79.63	S10	92.50
S3	77.53	S7	73.31	S11	76.33
S4	77.56	S8	79.72	S12	84.85

(1) DPPH 自由基清除实验^[21-22]: 精密移取 1 mL 稀释 10 倍后的供试品溶液与 1 mL 80 $\mu\text{g/mL}$ DPPH 溶液于试管中, 摇匀, 避光反应 30 min, 以蒸馏水为空白调零, 在 517 nm 波长下测定 A 值 (A_1)。用稀乙醇代替供试品, 测定 A 值 (A_0)。根据公式自由基清除率 = $(1 - A_1/A_0)$ 计算 DPPH 自由基清除率, 每个样品重复 3 份, 求平均值。

(2) 羟自由基清除实验^[21-22]: 移取供试品溶液 0.2 mL, 依次加入反应液 [20 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 2.67 mmol/L 脱氧核糖, 100 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)] 0.6 mL、0.4 mmol/L 的硫酸亚铁胺溶液 0.2 mL、10 mmol/L 过氧化氢溶液 0.2 mL, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15 min, 再分别加入 1% 的硫代巴比妥酸 (TBA) 溶液和 2% 的三氯乙酸 (TCA) 溶液各 1 mL, 终止反应, 然后沸水浴加热 15 min 后冷却至室温, 以蒸馏水为空白调零, 在 532 nm 下测定 A 值 (A_1)。用稀乙醇代替供试品, 测定 A 值 (A_0)。

根据公式计算, 每个样品重复 3 份, 求平均值。

(3) 超氧阴离子自由基清除实验^[21-22]: 超氧阴离子自由基在吩噻嗪硫酸甲酯 (PMS)-还原型辅酶 I (NADH) 体系中生成, 用于氯化氮蓝四唑 (NBT) 还原的检测。取供试品溶液 1 mL, 加入 Tris-HCl 缓冲液 (16 mmol/L, pH 8.0)、NADH-2Na (338 mmol/L)、PMS (30 mmol/L)、NBT (72 mmol/L) 各 1 mL, 混匀后, 在室温反应 5 min, 用蒸馏水校零, 在 560 nm 处测定 A 值 (A_1)。用稀乙醇代替供试品, 测定 A 值 (A_0)。根据计算, 每个样品重复 3 份, 求平均值。

2.8.3 抗氧化活性结果及谱效关联分析 不同干燥方式所得样品的稀乙醇提取液的自由基清除能力有较大差异, 其中微波干燥样品 (S9) 的稀乙醇提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力较强, 高温烘干样品 (S5~S7) 的稀乙醇提取物对羟自由基的清除能力较强, 结果见表 8。为了进一步阐述上述结果, 本实验采用偏最小二乘法 (partial least square method, PLS) 对 12 个样品的指纹图谱和自由基清除活性进行了相关性分析, 以各样品对 3 种自由基的清除率为因变量 (Y), 以各批样品醇提取物指纹图谱中共有峰的峰面积与称样量的比值为自变量 (X) 进行拟合, 结果见图 5。12 个共有峰中有 6 个共有峰与 DPPH 自由基清除率呈正相关, 分别为峰 1、2、5~7、12, 其中峰 5、6、12 分别为朝藿定 B、淫羊藿苷和宝藿苷 I。5 个共有峰与

表 8 淫羊藿稀乙醇提取液清除自由基活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Comparison of free radical scavenging activities of *Epimedium Folium* dilute ethanol extract ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	清除率/%		
	DPPH 自由基	羟自由基	超氧阴离子自由基
S1	25.09±1.67	23.28±1.14	62.39±0.70
S2	26.54±2.83	21.12±0.79	71.00±7.07
S3	20.38±3.93	18.08±1.01	66.27±6.58
S4	27.14±2.92	19.58±0.67	67.44±0.69
S5	13.40±3.93	34.54±2.11	42.71±2.00
S6	26.88±4.94	33.12±1.63	44.27±7.43
S7	21.28±0.26	36.96±0.40	44.55±1.43
S8	22.52±2.77	26.68±1.93	72.30±4.29
S9	29.74±0.44	23.46±0.32	70.28±0.90
S10	31.37±5.01	18.95±1.26	75.94±4.65
S11	24.19±2.80	22.15±1.80	64.30±1.94
S12	27.52±2.47	20.55±0.80	68.44±2.75

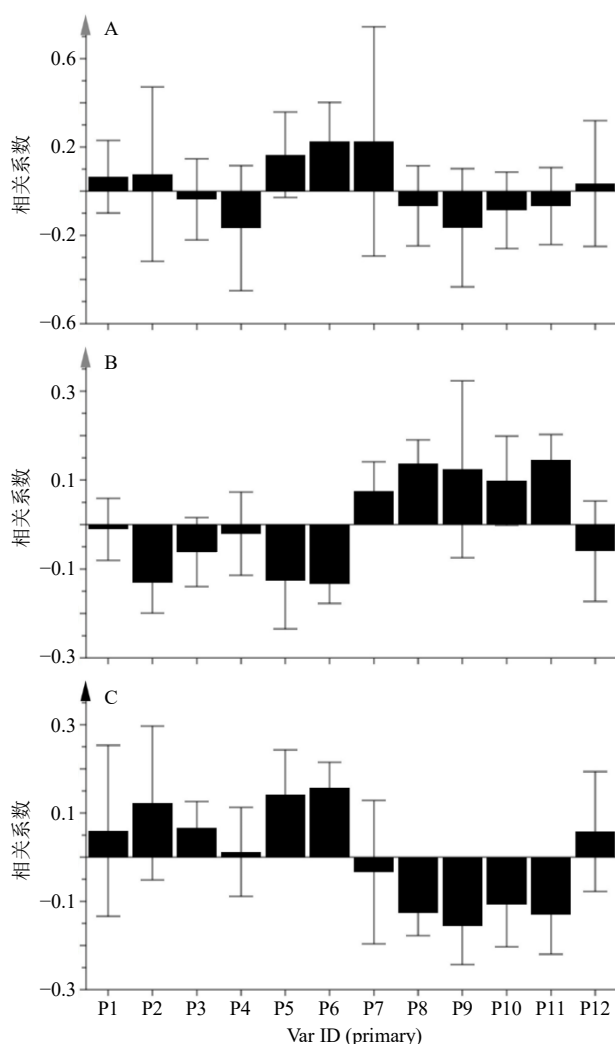


图 5 谱效关联分析 DPPH 自由基 (A)、羟自由基 (B) 和超氧阴离子自由基 (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Spectral correlation analysis of DPPH radical (A), hydroxyl radical (B) and superoxide anion radical (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

羟自由基清除率呈正相关, 分别为峰 7~11。7 个共有峰与超氧阴离子自由基清除率呈正相关, 分别为峰 1~3、5、6、12, 其中峰 5、6、12 分别为朝藿定 B、淫羊藿苷和宝藿苷 I。谱效关联结果表明, 与 DPPH 和超氧阴离子自由基清除活性呈正相关的成分主要集中在极性较大的部分, 其中朝藿定 B、淫羊藿苷均是和 DPPH 和超氧阴离子自由基清除活性呈正相关的成分, 而微波干燥样品中这 2 个成分较高, 进一步证明了优选工艺的合理性; 而与羟自由基清除活性成正相关的主要色谱峰多分布在极性较小的部分, 高温烘干样品 (S5~S7) 的极性较小部分含量较高, 因此, 高温烘干样品的羟自由基清除能力相对较高。

3 讨论

本实验将淫羊藿鲜药材采用不同干燥方式处理, 制得 12 个样品, 通过测定指标性成分含量, 采用综合评分法初步筛选最佳的干燥方式, 再通过比较不同样品对 3 种自由基的清除能力, 综合黄酮类成分含量和抗氧化活性优选最佳的干燥方式。

本实验选择评价指标时, 首先选取了药典中淫羊藿项下的 4 种指标性成分朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷, 考虑到宝藿苷 I 是淫羊藿苷在体内的主要代谢产物^[28-29], 在抗氧化^[24]、抗骨质疏松^[25]等方面具有显著的生物活性。相比与二糖苷淫羊藿苷, 单糖苷宝藿苷 I 具有更强的抗氧化活性^[24], 且极性较小, 在体内更容易通过细胞膜。因此, 将宝藿苷 I 的含量也作为指标性成分进行考察, 因此, 本实验重点关注了上述 5 种黄酮的含量。淫羊藿的主要成分为黄酮类, 总黄酮也是药典规定的评价指标之一, 而其醇浸出物在一定程度上也能反映黄酮的含量, 因此, 将总黄酮含量和醇浸出物含量也作为评价指标。指纹图谱中的共有峰能够从整体、定量地把握样品的质量, 因此将比值和也作为评价指标之一。

以上述 4 个指标通过综合评分法评价, 发现微波干燥样品的综合得分最高, 因此, 通过黄酮类成分的含量优选的干燥方式为微波干燥。体外自由基清除实验证明微波干燥样品对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力均最强; 高温烘干样品对羟自由基的清除能力较高。谱效关联结果表明与 DPPH 和超氧阴离子自由基清除活性呈正相关的成分主要集中在极性较大部分, 其中朝藿定 B、淫羊藿苷均是和 DPPH 和超氧阴离子自由基清除活性呈正相关的成分, 而微波干燥样品中这 2 个成分较高, 进一步证明了优选工艺的合理性。

综上所述, 微波干燥样品中黄酮类成分、醇浸出物含量较高, 且微波干燥样品的稀乙醇提取物对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除活性较强, 综合考虑黄酮类成分含量及抗氧化活性, 建议最佳的干燥方式为微波干燥, 但是微波干燥需要特殊的设备, 因此, 此方法是否能用于淫羊藿工业化生产的干燥步骤, 还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 340-342.
- [2] Zheng X C, Chi C, Xu C Y, *et al.* Effects of dietary supplementation with icariin on growth performance,

- antioxidant capacity and non-specific immunity of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 90: 264-273.
- [3] Zhang X D, Kang Z C, Li Q J, *et al.* Antigen-adjuvant effects of icariin in enhancing tumor-specific immunity in mastocytoma-bearing DBA/2J mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 810-816.
- [4] Fang L, Xu W, Kong D D. Icarin inhibits cell proliferation, migration and invasion by down-regulation of microRNA-625-3p in thyroid cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2456-2463.
- [5] Sun X J, Deng X H, Cai W J, *et al.* Icarin inhibits LPS-induced cell inflammatory response by promoting GR α nuclear translocation and upregulating GR α expression [J]. *Life Sci*, 2018, 195: 33-43.
- [6] Lim R Z L, Li L, Yong E L, *et al.* STAT-3 regulation of CXCR4 is necessary for the prenylflavonoid icaritin to enhance mesenchymal stem cell proliferation, migration and osteogenic differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1862(7): 1680-1692.
- [7] Qian W Q, Su Y, Zhang Y J, *et al.* Secretome analysis of rat osteoblasts during icariin treatment induced osteogenesis [J]. *Mol Med Report*, 2018, 17: 6515-6525.
- [8] Kim B, Lee K Y, Park B. Icarin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF- κ B/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells [J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 181-190.
- [9] Li B, Zhang N, Wang D X, *et al.* Structural analysis and antioxidant activities of neutral polysaccharide isolated from *Epimedium koreanum* Nakai [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 196: 246-253.
- [10] Sureshbabu A, Ryter S W, Choi M E. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 208-214.
- [11] Magesh S, Chen Y, Hu L Q. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4): 687-726.
- [12] 杨舸. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷对顺铂致肾损伤的保护作用 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [13] 杨娟, 张华峰, 牛丽丽, 等. 不同地区商品淫羊藿中朝藿定、淫羊藿苷、总黄酮含量变异及抗氧化活性分析 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(16): 96-100.
- [14] Naseer S, Lone S H, Lone J A, *et al.* LC-MS guided isolation, quantification and antioxidant evaluation of bioactive principles from *Epimedium elatum* [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 989: 62-70.
- [15] 秦伟瀚, 刘翔, 张军, 等. 不同产地 15 个品种淫羊藿的质量评价 [J]. *中成药*, 2017, 39(9): 1889-1895.
- [16] Arief Z M, Shawl A S, Munshi A H. Altitudinal variation in pharmacologically active compounds of wild and cultivated populations of *Epimedium elatum* [J]. *J Appl Res Med Aromat*, 2016, 3(2): 48-51.
- [17] 谭苑芬, 梁文能. 柔毛淫羊藿中淫羊藿苷含量测定及最佳采收期研究 [J]. *中国药业*, 2019, 28(8): 8-10.
- [18] Zhao Y D, Chen S F, Wang Y D, *et al.* Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 796-806.
- [19] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 114-115, 232.
- [20] Xie P S, Yan Y Z, Guo B L, *et al.* Chemical pattern-aided classification to simplify the intricacy of morphological taxonomy of *Epimedium* species using chromatographic fingerprinting [J]. *J Pharm Biomed*, 2010, 52(4): 452-460.
- [21] Zhao B T, Zhang J, Guo X, *et al.* Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation [J]. *Food Hydrocolloid*, 2013, 31(2): 346-356.
- [22] 寇宁, 李磊强, 李钦, 等. 不同提取方法对红芪多糖体外抗氧化活性的影响研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(15): 100-103.
- [23] 罗春丽, 陆翔恩, 赵致, 等. 综合评分法优选何首乌的合理采收期 [J]. *贵州农业科学*, 2013, 41(9): 66-70.
- [24] Deng Y Y, Xiong D Q, Yin C X, *et al.* Icariside II protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via nuclear factor- κ B inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor up-regulation [J]. *Neurochem Int*, 2016, 96: 56-61.
- [25] Yang J, Lan J S, Du H Z, *et al.* Icariside II induces cell cycle arrest and differentiation via TLR8/MyD88/p38 pathway in acute myeloid leukemia cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 846: 12-22.
- [26] Shen Y P, Wang H Y, Lu Y, *et al.* Construction of a novel catalysis system for clean and efficient preparation of baohuoside I from icariin based on biphasic enzymatic hydrolysis [J]. *J Clean Prod*, 2018, 170: 727-734.
- [27] 周义. 淫羊藿炮制过程中物质基础的转化研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
- [28] Wu H L, Kim M, Han J. Icarin metabolism by human intestinal microflora [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1158-1167.
- [29] Cheng T, Zhang Y, Zhang T, *et al.* Comparative pharmacokinetics study of icariin and icariside II in rats [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21274-21286.