

基于 HPLC 指纹图谱和多指标定量不同淫羊藿品种的比较研究

刘鑫¹, 蔺瑞丽², 倪琳², 宋平顺^{2*}, 杨玲霞^{2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2. 甘肃省药品检验研究院 国家中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 兰州 730030)

摘要 **目的:** 调查市售淫羊藿来源, 采用 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定, 对市售淫羊藿药材进行质量研究, 为其质量评价和资源开发提供参考。**方法:** 收集到 40 批市售淫羊藿药材, 采用 HPLC 指纹图谱分析, HPLC 测定总黄酮醇苷、UV 法测定总黄酮含量, 并测定浸出物含量, 应用化学计量学分析方法, 完成不同淫羊藿药材的综合质量评价。**结果:** 市售淫羊藿有 9 种不同植物来源; 5 种正品淫羊藿质量良好, 地方品种以粗毛淫羊藿、湖南淫羊藿含量较高, 而黔岭淫羊藿、四川淫羊藿含量甚微; 用主成分分析法进行综合质量排序, 淫羊藿、箭叶淫羊藿和柔毛淫羊藿排序靠前, 同一品种随产地排序变化较大, 黔岭淫羊藿及掺假的淫羊藿商品排序最后; 聚类分析显示在植物来源、产地、炮制和含量方面有较好区分意义; 以淫羊藿 (*E. brevicornu*) 建立共有模式, 9 种淫羊藿共标定了 8 个共有峰, 相似度范围在 0.066 ~ 0.979, 不同品种间存在一定差异。**结论:** 指纹图谱相似度和含量测定的化学模式均能良好的评价淫羊藿品种和质量。

关键词: 淫羊藿; 指纹图谱; 含量测定; 主成分分析; 聚类分析; 相似度评价; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)09 - 1613 - 11

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0419

Comparative study of different species of *Epimedium* based on HPLC fingerprint and multi - index assay

LIU Xin¹, LIN Rui - li², NI Lin², SONG Ping - shun^{2*}, YANG Ling - xia^{2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. National Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, Gansu Provincial Engineering Laboratory of Chinese and Tibetan Medicine Inspection and Testing Technology, Gansu Institute of Pharmaceutical Inspection and Control, Lanzhou 730030, China)

Abstract **Objective:** To investigate the source and quality of commercially available *Epimedium* based on HPLC fingerprint and multi - index assay, so as to provide reference for its quality evaluation and resource development. **Methods:** Forty batches of commercially available epimedium were collected. Fingerprint analysis and determination of the total flavonoid glycosides were performed by HPLC method. The total flavonoid glycosides were determined by UV method. And the contents of their extracts were determined. Stoichiometric analysis was employed to perform the comprehensive quality evaluation of different medicinal materials of *Epimedium*. **Results:** There were 9 different plant sources of *Epimedium* in the market. The five authentic *Epimedium* were of good quality, and the local varieties were coarse *Epimedium*. The contents were high in *Epimedium* from Hunan, while the contents

* 通信作者 宋平顺 Tel:13359318852; E - mail:2530517601@qq.com

杨玲霞 Tel:13909427927; E - mail:yanglingxia009@126.com

第一作者 Tel:13233036034; E - mail:1778720917@qq.com

were low in *Epimedium* from Qianling and Sichuan. The comprehensive quality ranking of *Epimedium* indicated that *Epimedium* Fletchum and *Epimedium* Fletchum ranked first by the principal component analysis method. The ranking of the same variety varied greatly with different habitats, and the Qianling *Epimedium* and adulterated *Epimedium* ranked last. The results of cluster analysis and principal component analysis were basically consistent. The cluster analysis showed distinguishing significance in plant sources, habitats, processing methods and contents. Based on the common pattern of *E. brevicornu*, a total of 8 common peaks were identified for 9 species of *E. Brevicornu*, and their similarities ranged from 0.066 to 0.979. Differences were observed among different species. **Conclusion:** Both the fingerprint similarity and the chemical model of content determination can be used to evaluate the species and quality of *Epimedium*.

Keywords: *Epimedium*; fingerprints; content determination; principal component analysis; cluster analysis; similarity evaluation; quality evaluation

淫羊藿为常用中药材,《中华人民共和国药典》(《中国药典》)收载为淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、箭叶淫羊藿(*E. sagittatum* (Sieb. et. Zucc.) Maxim.)、柔毛淫羊藿(*E. pubescens* Maxim.)和朝鲜淫羊藿(*E. koreanum* Nakai)的干燥叶。具有补肾阳、强筋骨和祛风湿的功效,主要用于治疗肾阳虚衰、风湿痹痛和麻木拘挛^[1]等。现代研究表明,淫羊藿含有黄酮类、木脂素类、生物碱等成分,具有助孕,抗骨质疏松,控制糖尿病,提高免疫力和抑制肿瘤等药理药效作用^[2-5]。淫羊藿广泛应于医药、化妆品、保健品领域,市场需求量很大,是国内最具开发潜力的中药之一^[6]。

我国淫羊藿属(*Epimedium* Linn.)植物约40种,药用植物15种^[7-8]。淫羊藿属植物没有广布种,4种药用淫羊藿具有明显的地域分布特色,以多种来源的狭布种组成的药用淫羊藿在中药界不多见。我国中部和西南地区的淫羊藿比较丰富,有6种地方习用药材^[9]。我国药用淫羊藿品种较多,国内学者主要关注《中国药典》收载的不同品种、不同产地的淫羊藿药材质量^[10-13],少有地方品种的研究^[14-15]。近年,随着各地发掘利用本省的淫羊藿资源,市售淫羊藿日趋复杂,其品种来源不甚了解,也鲜见质量状况的评价研究。淫羊藿品种的多样性和质量差异性会给临床用药的有效安全带来隐患,成为了药品市场监管的突出问题;与此同时,不同品种的淫羊藿是否具有潜在开发利用价值,也是值得深入研究的课题。

鉴于目前对商品淫羊藿缺乏系统的品种调查和质量研究,2021年以来调查了全国淫羊藿主产区和

市售淫羊藿,收集了9个省产地的40份样品,经鉴定为9种不同的植物来源。在此基础上进行了HPLC指纹图谱分析,考虑到不同品种来源的质量评价的等效性与可比性,采用《中国药典》收载的总黄酮醇苷、淫羊藿总黄酮及浸出物含量指标,通过多元统计学进行质量分析,完成淫羊藿的质量研究。为不同品种、不同产地的淫羊藿质量评价、淫羊藿种质资源的开发利用以及了解市售的淫羊藿品种现状提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦1260型高效液相色谱仪,KQ-300DB数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),UV-2450紫外分光光度仪(岛津公司),QUINTIX224-1CN万分之一分析天平,9240A鼓风干燥箱(北京兰贝石恒温技术有限公司)。

1.2 试剂

2021—2022年收集了甘肃、吉林、四川、贵州、重庆、湖北、湖南、陕西和安徽等产区或市场流通的淫羊藿40份样品,经甘肃省食品药品检验所宋平顺主任药师鉴定,认为市场上流通的“淫羊藿”来源复杂,除《中国药典》淫羊藿*Epimedium brevicornu* 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* Ying.外,尚包括地方中药材标准收载的粗毛淫羊藿*E. acuminatum* Franch.、湖南淫羊藿*E. hunanense* (Hand. - Mazz.) Hand. Mazz.、黔岭淫羊藿*E. leptorrhizum* Stearn和四川淫羊藿*E. sutchuenense*

Franch., 样品中包括 4 批掺假淫羊藿和 1 批伪品(树木类植物的叶片, 品种不详)。40 批淫羊藿商品的原植物及产地信息见表 1。9 种淫羊藿类药材的性状鉴定特征比较, 见表 2。

对照品淫羊藿苷(批号 110737 - 202017, 纯度 98.1%)、金丝桃苷(批号 111521 - 201809, 纯度 94.9%) 购自中国食品药品检定研究院, 对照品朝藿

定 A(批号 P10J11F118161, 纯度 $\geq 98\%$)、朝藿定 B(批号 P19A11F121806, 纯度 $\geq 98\%$)、朝藿定 C(批号 R01J11F118161, 纯度 $\geq 98\%$)、和宝藿苷 I(批号 T19D9Z77828, 纯度 $\geq 98\%$), 乙腈(默克股份两合公司, 批号 20240131, 色谱纯), 乙醇(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20210810, 分析纯), 水为屈臣氏水。

表 1 40 批淫羊藿药材信息

 Tab. 1 Sample information of *Epimedium*

编号 (No.)	产地 (habitat)	来源 (source)	编号 (No.)	产地 (habitat)	来源 (source)	编号 (No.)	产地 (habitat)	来源 (source)
S1	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S14	甘肃商品 (Shangpin Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S27	湖南常德 (Changde Hunan)	箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)
S2	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S15	甘肃 (Gansu)	炙淫羊藿 (grilled <i>Epimedium</i>)	S28	湖南邵阳 (Shaoyang Hunan)	湖南淫羊藿 (<i>Epimedium Hunan</i>)
S3	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S16	甘肃天水 (Tianshui Gansu)	炙淫羊藿 (grilled <i>Epimedium</i>)	S29	湖南宜昌 (Yichang Hunan)	粗毛淫羊藿 (<i>Epimedium acuminatum</i>)
S4	甘肃武都 (Wudu Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S17	甘肃康县 (Kangxian Gansu)	柔毛淫羊藿 (soft woolly <i>Epimedium</i>)	S30	湖北恩施 (Enshi Hubei)	粗毛淫羊藿 (<i>Epimedium acuminatum</i>)
S5	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S18	甘肃成县 (Chengxian Gansu)	柔毛淫羊藿 (soft woolly <i>Epimedium</i>)	S31	湖北神农架 (Shennongjia Hubei)	四川淫羊藿 (<i>Epimedium</i> in Sichuan)
S6	甘肃商品 (Shangpin Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S19	甘肃 (Gansu)	淫羊藿(掺假) [<i>Epimedium</i> (adulterate)]	S32	吉林通化 (Tonghua Jilin)	朝鲜淫羊藿 (Korean <i>Epimedium</i>)
S7	甘肃成县 (Chengxian Gansu)	混合品 (Blend)	S20	甘肃 (Gansu)	淫羊藿(掺假) [<i>Epimedium</i> (adulterate)]	S33	四川广元 (Guangyuan Sichuan)	柔毛淫羊藿 (soft woolly <i>Epimedium</i>)
S8	甘肃礼县 (Lixian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S21	陕西汉中 (Hanzhong Shanxi)	箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)	S34	安徽六安 (Luan Anhui)	混合品 (blend)
S9	甘肃漳县 (Zhangxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S22	陕西汉中 (Hanzhong Shanxi)	箭叶淫羊藿(掺假) [<i>Epimedium sagittatum</i> (adulterate)]	S35	新疆 (Xinjiang)	淫羊藿(掺假) [<i>Epimedium</i> (adulterate)]
S10	甘肃西和 (Xihe Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S23	陕西 (Shanxi)	淫羊藿(掺假) (<i>Epimedium</i> (adulterate))	S37	贵州毕节 (Bijie Guizhou)	粗毛淫羊藿 (<i>Epimedium acuminatum</i>)
S11	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S24	陕西汉中 (Hanzhong Shanxi)	柔毛淫羊藿 (soft woolly <i>Epimedium</i>)	S38	四川乐山 (Leshan Sichuan)	巫山淫羊藿 (<i>Epimedium Wushanense</i>)
S12	甘肃岷县 (Minxian Gansu)	淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	S25	陕西安康 (Ankang Shanxi)	箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)	S39	贵州安顺 (Anshun Guizhou)	黔岭淫羊藿 (<i>Epimedium Qianling</i>)
S13	甘肃商品 (Shangpin Gansu)	混合品 (blend)	S26	陕西 (Shanxi)	箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)	S40	重庆万县 (Wanxian Chongqing)	四川淫羊藿 (<i>Epimedium</i> in Sichuan Province)

注(note): 来源是指商品淫羊藿的具体原植物, 以植物中文名表示; S7、S13 号混合品为淫羊藿与柔毛淫羊藿, S34 号混合品为粗毛淫羊藿与柔毛淫羊藿, S19、S20、S23 和 S35 为淫羊藿中掺有伪品, S22 为箭叶淫羊藿中掺有伪品, S36 号为新疆地产淫羊藿商品(伪品, 表中未列入) [The source referred to the specific original plant of the commercial *Epimedium*, which was expressed by the Chinese name of the plant; S7 and S13 were mixtures of *Epimedium* and soft woolly *Epimedium*, S34 was a mixture of coarse *Epimedium* and soft woolly *Epimedium*, S19, S20, S23 and S35 were *Epimedium* mixed with counterfeit, S22 was fletch leaf *Epimedium* medium mixed with counterfeit, and S36 was laocal *Epimedium* from Xinjiang (counterfeit, not included in the table)]

2 方法与结果

2.1 总黄酮醇苷的含量测定^[1]

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A) - 水(B) 为流动相, 梯度洗脱(0 ~ 30 min, 24% A → 26% A; 30 ~ 31 min, 26% A → 45% A; 31 ~ 45 min, 45% A → 47% A), 检测波

长 270 nm, 柱温 30 °C, 流量 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液 取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 48 μg · mL⁻¹ 浓度的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 分别取 40 批淫羊藿样品的叶片粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密

表 2 9 种淫羊藿类药材性状鉴别特征比较

Tab. 2 Comparison of the identification characteristics of 9 species of *Epimedium*

品种 (species)	叶形 (leaf shape)	叶背颜色 (back color)	叶质 (food value of leaf)	叶尖 (leaf apex)	侧身叶基裂片 (lateral basal lobe)	叶齿 (leaf dent)	叶背纹饰 (leaf back decoration)	叶背面被毛 (abaxial leaf coat)
淫羊藿 (<i>Epimedium</i>)	卵圆形或近圆形 (ovate or subround)	灰绿或黄绿色 (grey-green or yellow-green)	纸质 (papery)	短渐尖 (short acuminate)	稍偏斜 (slightly skew)	毛刺 (rag)	鱼鳞 (scale)	疏被柔毛或近无毛 (sparsely pubescent or subglabrous)
箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)	卵圆形至卵状披针形 (ovate to lanceolate)	灰绿色 (celadon)	革质 (keratin)	渐尖, 急尖 (tapering, sharp)	显著偏斜 (significant deflection)	三角形针刺 (triangular needling)	鱼鳞或乳突 (fish scale or mastoid process)	疏被平直短伏毛或近无毛 (sparsely coated flat short or subglabrous)
柔毛淫羊藿 (soft woolly <i>Epimedium</i>)	卵圆形至卵状披针形 (ovate to lanceolate)	灰白色 (incanus)	革质或厚纸质 (leathery or thick paper)	长渐尖 (long taper)	显著偏斜 (significant deflection)	三角形针刺 (triangular needling)	鱼鳞 (scale)	密被缠绕扭曲长柔毛 (densely twisted puberulent hair)
朝鲜淫羊藿 (Korean <i>Epimedium</i>)	宽卵形, 近圆形 (broadly ovate, nearly rounded)	灰绿色 (celadon)	纸质 (papery)	急尖短渐尖 (sharp point short, tapering)	明显偏斜 (clear deflection)	毛刺 (rag)	鱼鳞 (scale)	疏被短柔毛或近无毛 (sparsely coated flat short or subglabrous)
巫山淫羊藿 (<i>Epimedium Wushanense</i>)	卵状披针形, 长卵形 (ovate-lanceolate, long ovate)	灰白色 (incanus)	革质 (keratin)	渐尖, 长渐尖 (tapering, long tapering)	显著偏斜 (significant deflection)	针刺 (acupuncture)	鱼鳞 (scale)	被卷曲柔毛或近无毛 (frizzly or subglabrous)
粗毛淫羊藿 (<i>Epimedium acuminatum</i>)	宽卵形, 披针形 (broadly ovate, lanceolate)	灰白色 (incanus)	近革质 (adkeratin)	长渐尖 (long tapering)	显著偏斜 (significant deflection)	针刺 (acupuncture)	乳突 (mastoid process)	被粗短伏贴毛 (covered with coarse and short fur)
四川淫羊藿 (<i>Epimedium</i> in Sichuan Province)	卵形或狭卵形 (ovate or narrowly ovate)	灰白色 (incanus)	近革质 (adkeratin)	长渐尖 (long tapering)	明显偏斜 (clear deflection)	毛刺 (rag)	鱼鳞 (scale)	疏被柔毛 (sparsely pubescent)
湖南淫羊藿 (<i>Epimedium Human</i>)	卵圆形或狭卵形 (ovate or narrowly ovate)	灰白色 (incanus)	革质 (keratin)	急尖长渐尖 (tapering, long tapering)	明显偏斜 (clear deflection)	针刺 (acupuncture)	乳突 (mastoid process)	疏被伏贴的平直毛或无毛 (sparsely coated flat short or subglabrous)
黔岭淫羊藿 (<i>Epimedium Qianling</i>)	狭卵形或卵形 (narrowly ovate or ovoid)	灰白色 (incanus)	革质 (keratin)	短尾尖 (brachycercal tip)	显著偏斜 (significant deflection)	针刺 (acupuncture)	乳突 (mastoid process)	主脉疏被褐色柔毛 (main vein sparse brown pilose)

加入稀乙醇 20 mL, 称量, 超声(功率 400 W, 频率 50 kHz) 处理 1 h, 放冷, 再称量, 用稀乙醇补足减失的

量, 摇匀, 滤过, 即得。对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 色谱图见图 1。

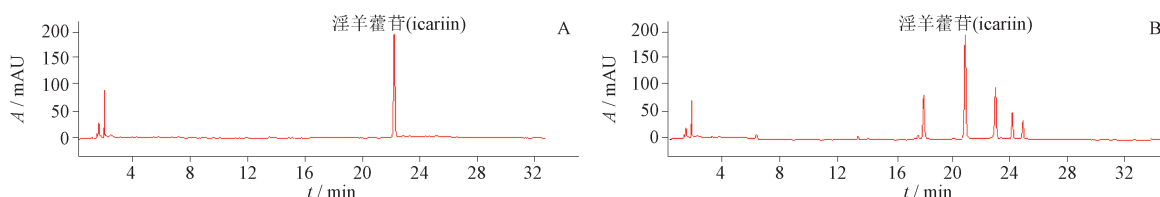


图 1 淫羊藿苷对照品溶液(A)、供试品溶液(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of icariin reference solution (A) and test solution (B)

2.1.4 测定法 分别吸取“2.1.2”项下对照品溶液和“2.1.3”项下供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 记录色谱图, 即得。结果见表 3。

2.2 总黄酮含量测定^[1]

2.2.1 对照品溶液制备 取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 12.5 μg · mL⁻¹ 浓度的溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取“2.1.3”供试品溶液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。

2.2.3 测定法 分别取对照品溶液和 40 批供试品溶液, 并以稀乙醇为空白, 在 270 nm 测定吸收度, 计算含量。40 批样品测定结果见表 3。

2.3 浸出物含量测定^[1]

取供试品约 4 g, 精密称定, 置 250 ~ 300 mL 的锥形瓶中, 精密加水 100 mL, 密塞, 冷浸, 前 6 h 振摇, 再静置 18 h, 用干燥滤器迅速滤过, 精密量取续滤液 20 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水

浴上蒸干后,于 105 ℃ 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定。除另有规定外,以干燥品 计算供试品中水溶性浸出物的含量。结果见表 3。

表 3 40 批淫羊藿样品测定结果 (%)

 Tab. 3 Determination results of 40 batches of *Epimedium* samples

编号 (No.)	含量(content)/%						
	朝藿定 A (epimedia A)	朝藿定 B (epimedia B)	朝藿定 C (epimedia C)	淫羊藿苷 (icariin)	黄酮醇苷总量 (flavonol glycoside)	总黄酮 (flavone)	浸出物 (extracts)
S1	0.323	0.645	1.476	0.848	3.29	6.25	27.7
S2	0.251	1.145	0.431	0.285	2.11	4.73	25.1
S3	0.324	1.112	1.009	1.121	3.57	6.26	27.0
S4	0.301	0.413	1.391	0.474	2.58	5.70	27.2
S5	0.246	1.051	0.639	0.474	2.41	5.42	22.8
S6	0.300	1.321	0.473	0.829	2.92	5.38	25.7
S7	0.267	0.385	1.779	0.098	2.53	5.95	21.2
S8	0.221	0.628	0.898	0.591	2.34	5.72	29.8
S9	0.167	0.897	0.167	0.251	1.48	6.25	21.1
S10	0.432	0.572	2.381	2.429	5.81	12.53	30.5
S11	0.312	1.086	0.944	1.008	3.35	6.21	27.6
S12	0.206	1.231	0.359	0.258	2.05	7.03	26.8
S13	0.188	0.416	0.528	0.394	1.53	6.72	20.5
S14	0.301	1.423	0.626	0.911	3.26	8.31	20.4
S15	0.188	0.533	0.991	0.638	2.35	5.03	21
S16	0.206	0.608	0.737	0.788	2.34	5.56	21.2
S17	0.213	0.302	1.781	0.316	2.61	5.98	23.1
S18	0.155	0.203	1.394	0.487	2.24	5.52	14.2
S19	0.021	0.042	0.156	0.021	0.24	8.73	19.0
S20	0.044	0.071	0.331	0.042	0.49	6.97	18.6
S21	0.348	1.235	0.558	0.181	2.32	5.56	24.1
S22	0.049	0.113	0.239	0.022	0.42	2.53	25.5
S23	0.022	0.051	0.031	0.029	0.13	5.71	25.8
S24	0.247	0.314	0.913	0.519	1.99	5.67	20.0
S25	0.216	0.353	2.666	0.154	3.39	12.53	20.1
S26	0.851	2.474	2.358	1.399	7.08	12.17	20.9
S27	0.141	0.143	7.126	2.586	10.01	9.47	37.3
S28	0.004	0.006	0.147	0.015	0.17	3.47	15.4
S29	0.189	0.301	0.781	0.402	1.67	3.21	23.2
S30	0.131	0.108	0.816	0.381	1.44	4.27	28.3
S31	0.046	0.015	0.026	0.108	0.21	5.21	15.6
S32	0.204	0.341	0.151	0.491	1.19	5.09	19.7
S33	0.226	0.296	1.463	0.339	2.32	7.32	14.8
S34	0.074	0.065	1.988	0.097	2.22	7.29	20.2
S35	0.0	0.0	0.022	0.009	0.03	5.63	23.4
S36	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.94	20.8
S37	0.310	0.290	0.943	0.411	1.95	5.21	20.4
S38	0.084	0.041	0.471	0.301	0.71	5.94	20.1
S39	0.0	0.003	0.021	0.002	0.02	3.68	19.4
S40	0.104	0.001	0.031	0.081	0.22	4.73	21.8

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 采用 C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 乙腈(A) - 水(B) 为流动相, 洗脱梯度(0 ~ 40 min, 30% A; 40 ~ 50 min, 30% A → 32% A; 50 ~ 70 min, 32% A → 35% A; 70 ~ 75 min, 35% A → 45% A; 75 ~ 80 min, 30% A), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 270 nm。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I 对照品适量, 加甲醇分别制成浓度为 20.1、25.5、19.1、31.9、58.1 和 27.3 μ g · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液制备 分别称取 40 批淫羊藿样品的叶片(过 3 号筛) 约 0.3 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称量, 超声(功率 400 W, 频率 50 kHz) 处理 30 min, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过。

2.4.4 精密度试验 取同一供试品(S1 号) 溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱峰。以淫羊藿苷(6 号峰) 为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.8%, 相对峰面积 RSD 均 < 1.1%, 说明仪器的精密度良好。

2.4.5 稳定性考察 取同一供试品(S1 号) 溶液, 按

“2.4.1”项下色谱条件分别在 0、6、12、18、24 h 进样, 记录色谱峰。以淫羊藿苷(6 号峰) 为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.2%, 相对峰面积 RSD 均 < 1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批供试品(S1 号), 按“2.4.3”项方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样检测, 记录色谱峰。以淫羊藿苷(6 号峰) 为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.3%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.1%, 表明本方法重复性良好。

2.4.7 指纹图谱建立 将 40 批淫羊藿样品所得色谱图分别导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件进行处理, 得到 40 批淫羊藿药材的 HPLC 图谱, 见图 2。以 10 批淫羊藿 *E. brevicornu* (S1 ~ S6, S8 ~ S11) 建立对照图谱, 设定 S1 号样品为参照图谱, 时间窗宽度为 0.5, 按中位数法生成对照图谱, 按照峰面积大于淫羊藿苷峰峰面积 0.1% 和分离度大于 1.5 的条件共选定了 8 个共有峰, 与对照品指纹图谱比较, 指认其中的 6 个峰, 见图 3。9 种淫羊藿的 HPLC 图, 见图 4。

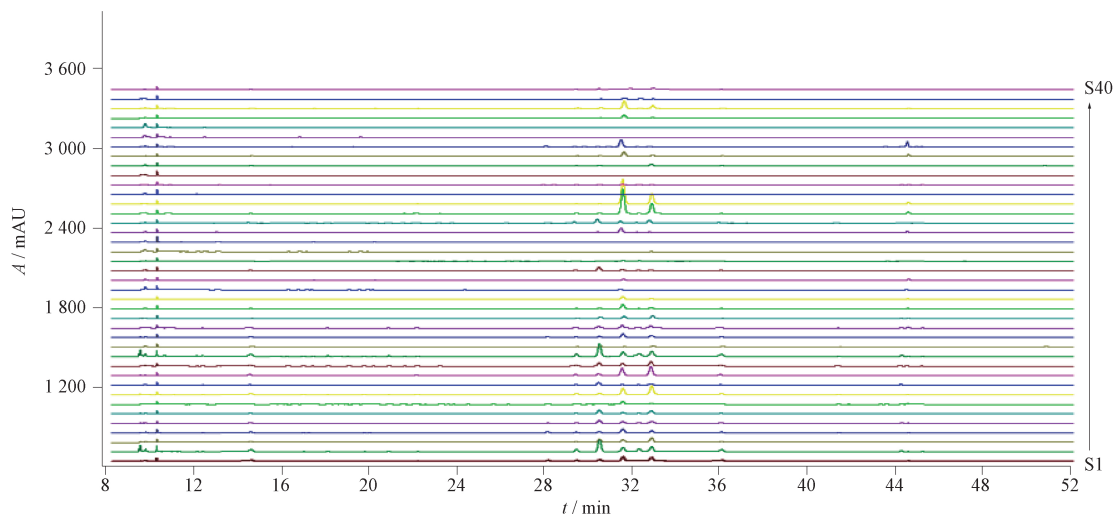


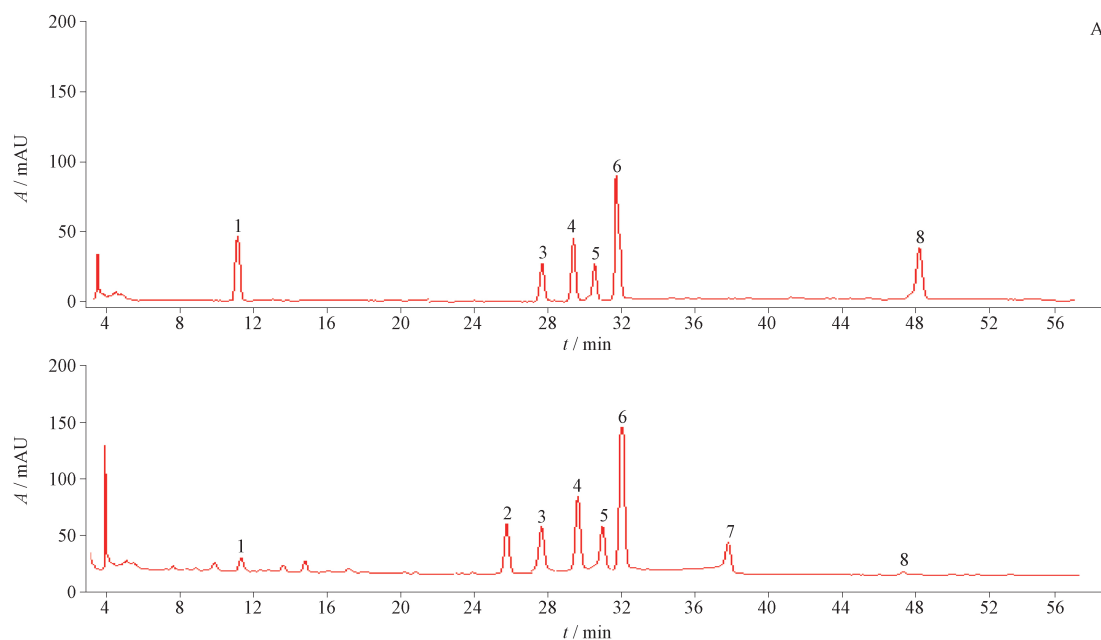
图 2 40 批样品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 40 batches of samples

2.5 化学模式评价分析^[16]

2.5.1 主成分分析(PCA) 将 40 批淫羊藿的 7 种含量指标导入 SPSS 25.0 软件进行主成分分析, 经过

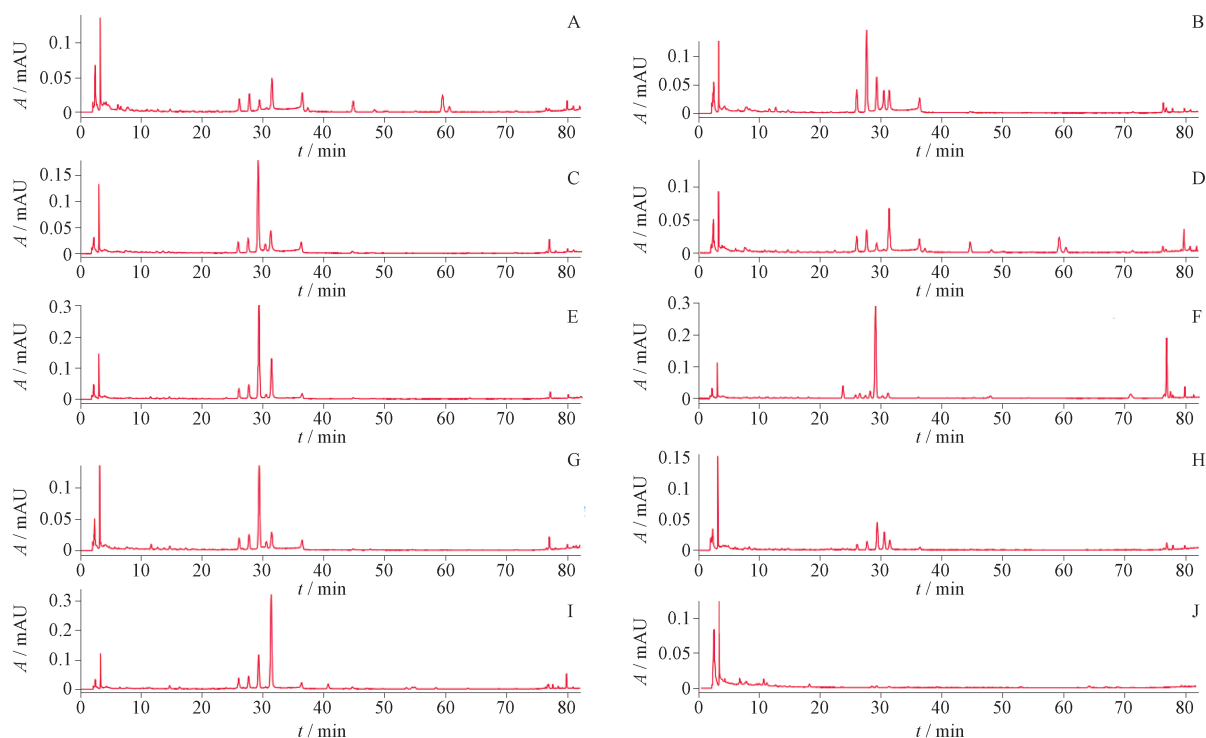
标准化数据处理, 特征值大于 1 的主成分有 2 个, 累计贡献率为 80.66%, 见表 4。以主成分为变量, 得到主成分矩阵, 见表 5。



1. 金丝桃苷(hyperoside) 2. 未知物(unknown) 3. 朝藿定 A(epimedia A) 4. 朝藿定 B(epimedia B) 5. 朝藿定 C(epimedia C) 6. 淫羊藿苷(icariin) 7. 未知物(unknown) 8. 宝藿苷 I (baohuoside I)

图3 混合对照品溶液(A)、淫羊藿(*E. brevicornu*)供试品溶液(B) HPLC图

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference solution (A) and *E. brevicornu* test solution (B)



A. 淫羊藿(*Epimedium*) B. 箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum*) C. 柔毛淫羊藿(soft woolly *Epimedium*) D. 朝鲜淫羊藿(Korean *Epimedium*) E. 巫山淫羊藿(*Epimedium Wushanense*) F. 粗毛淫羊藿(*Epimedium acuminatum*) G. 黔岭淫羊藿(*Epimedium* in Qianling) H. 湖南淫羊藿(*Epimedium* Hunan) I. 四川淫羊藿(*Epimedium* in Sichuan Province) J. 伪品(spurious mode)

图4 9种淫羊藿及伪品 HPLC图

Fig. 4 HPLC chromatograms of 9 species of *Epimedium* and their counterfeits

表 4 主成分特征值及方差

Tab. 4 Eigenvalues and variances of principal components

主成分 (principal component)	特征值 (eigenvalue)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累积方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%
PC1	4.24	61.01	61.01
PC2	1.16	19.65	80.66
PC3	0.66	9.42	90.08
PC4	0.51	6.22	96.3
PC5	0.28	1.12	97.42

表 5 主成分矩阵

Tab. 5 Principal component matrix

主成分 (principal component)	矩阵(matrix)						
	总黄酮醇苷总量 (total flavonol glycosides total)	淫羊藿苷 (icariin)	朝藿定 C (asauridin C)	朝藿定 A (asauridin A)	总黄酮 (general flavone)	浸出物 (extractum)	朝藿定 B (asauridin B)
PC1	0.99	0.83	0.67	0.88	0.73	0.44	0.79
PC2	-0.05	0.25	-0.57	-0.05	-0.41	0.69	0.32

根据公式 $PCA_1 = \alpha_1 / \sqrt{\lambda_1} = \alpha_1 / \sqrt{4.24}$; $PCA_2 = \alpha_2 / \sqrt{\lambda_2} = \alpha_2 / \sqrt{1.16}$; (其中, λ 为特征值, α 为因子得分, PCA 为主成分得分) 分别计算出主成分 1、2 的得分 PCA_1 、 PCA_2 , 根据公式 $F = (61.01\% PCA_1 + 19.65\% PCA_2) / 80.66\%$, 计算 40 批样品的综合得分 F , 得到 40 批淫羊藿样品的得分排名, 如下表 6。

表 6 主成分综合得分结果

Tab. 6 Comprehensive scores of principal components

排名/序号 (ranking/No.)	排名/序号 (ranking/No.)	排名/序号 (ranking/No.)
1/S25	14/S15	27/S2
2/S10	15/S11	28/S20
3/S26	16/S8	29/S32
4/S34	17/S30	30/S12
5/S7	18/S29	31/S22
6/S17	19/S16	32/S19
7/S1	20/S5	33/S40
8/S33	21/S21	34/S28
9/S4	22/S27	35/S9
10/S18	23/S13	36/S31
11/S37	24/S14	37/S23
12/S24	25/S38	38/S35
13/S3	26/S6	39/S39
		40/S36

通过排序认为, 9 种淫羊藿植物来源中, 载入《中国药典》中淫羊藿品种较地方中药材标准中记载其品种相比, 整体排名较靠前, 质量较优, 如箭叶淫羊藿、淫羊藿和柔毛淫羊藿; 产于陕西的箭叶淫羊藿排名第 1 和第 3, 可能与其总黄酮及浸出物含量较高有关; 产于甘肃的淫羊藿排名比较分散, 这与其采收季节^[17]以及生长年限^[18]有关; 朝鲜淫羊藿和巫山淫羊藿质量居中; 地方习用药材中粗毛淫羊藿质量良好, 而湖南淫羊藿、四川淫羊藿质量较次以及黔岭淫羊藿最差, 排序靠后; 掺假淫羊藿和伪品排序在最后。主成分分析法能够反映出淫羊藿的质量状况, 可用于淫羊藿类药材质量的系统性评价, 对于不同品种、同品种不同产地淫羊藿有良好的预测性, 有助于进一步分析其资源利用价值和筛选质量优良的药材产区。

2.5.2 聚类分析(CA) 以测得的 40 批次不同种淫羊藿样品中 7 个成分的含量作为评价指标, 运用 Origin 软件进行热图分析, 见图 5。

结果显示, 从含量指标分析, S10、S25、S26 和 S27 号 4 份样品总黄酮醇苷最高, 相聚一类; S36(伪品)与 S19、S20、S22、S23(4 批掺假淫羊藿)、S35、S39、S40(3 批总黄酮醇苷很低)的基本相聚一类; 从产地分析, 甘肃的 20 批样品中, 有 12 批基本相聚一类; 从炮制加工分析, S15、S16(2 批羊油制淫羊藿)

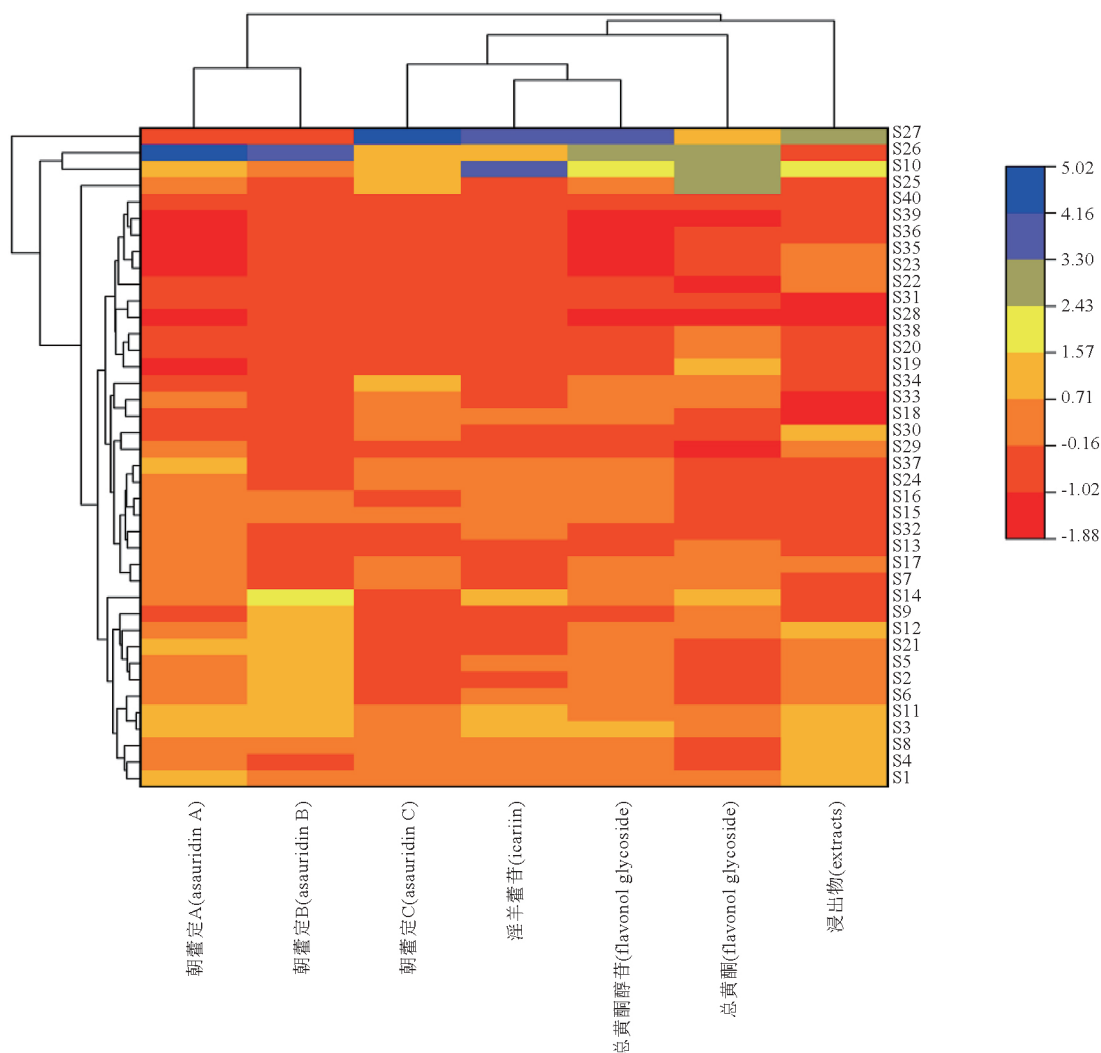


图5 40批淫羊藿样品成分差异热图

Fig. 5 Heat map of composition difference of 40 batches of *Epimedium* samples

单独相聚;从淫羊藿品种分析,淫羊藿和箭叶淫羊藿的多数分别相聚一类,4种地方习用药材大致相聚一类。

在品种来源、产地、炮制和含量方面,聚类分析显示较好或一定预见的区分意义,说明淫羊藿的品种、产地以及不同生长环境等都影响了聚类效果。

3 讨论与总结

3.1 含量测定指标的综合评价

对40批9种不同淫羊藿来源中所含黄酮醇苷、总黄酮及浸出物测定结果分析,所测定的3个成分含量平均值,淫羊藿分别为2.75%、6.44%和24.73%;柔毛淫羊藿分别为3.56%、7.75%、18.20%;箭叶淫羊藿分别为2.936%、6.59%、

25.15%;朝鲜淫羊藿分别为1.19%、5.09%、19.7%;粗毛淫羊藿等4种地方药材所含3个成分含量差异明显。结果不同品种、同一品种的不同产地之间差异较大,需要采用多元统计方法进一步分析。

3.2 指纹图谱技术的质量评价

以生成的对照图谱对40批样品进行分析,结果产于甘肃的淫羊藿(*E. brevicornu*)相似度为0.979~0.855,大部分样品相似度在0.9以上,柔毛淫羊藿相似度为0.879~0.873,箭叶淫羊藿相似度为0.869~0.726,朝鲜淫羊藿相似度为0.708,巫山淫羊藿相似度为0.887,湖南淫羊藿相似度为0.829,粗毛淫羊藿相似度为0.806,四川淫羊藿相似度为0.124,黔岭淫羊藿相似度为0.146,掺假样品相似度在0.141~0.829,范围变化幅度较大,这

与其掺假比例和淫羊藿品种有关联,伪品相似度为 0.066。

3.3 化学模式质量评价

通过主成分分析,认为淫羊藿(*E. brevicornu*)、箭叶淫羊藿和柔毛淫羊藿整体质量良好,质量排序在前列,除粗毛淫羊藿外,地方习用药材的整体质量较差,排序在最后。

聚类分析表明,在植物来源、产地、炮制和含量方面,聚类分析都显示较好且有一定预见的区分意义,聚类体现了植物、产地以及不同生长环境等的综合影响。

4 批掺假的淫羊藿和 1 批伪品与含量低的黔岭淫羊藿、四川淫羊藿基本相聚一类,与主成分分析排序结果靠后基本一致。

3.4 总结

我国药用淫羊藿野生资源丰富、产区广泛,随着市场需求的增长,各地不断发掘利用本地淫羊藿资源,致使商品淫羊藿更加复杂。调查发现,除《中国药典》载的 5 种淫羊藿品种外,尚有粗毛淫羊藿(*E. acuminatum*)、黔岭淫羊藿(*E. leptorrhizum*)、湖南淫羊藿(*E. hunanense*)和四川淫羊藿(*E. sutchuenense*),前 2 种在产地长期被视为“淫羊藿”收购^[8],这些属于地方习用药材,在全国范围流通应予高度重视。

通过对 9 种植物 40 份样品的含量测定,认为箭叶淫羊藿中朝藿定 C、总黄酮醇苷和总黄酮含量整体较高;淫羊藿(*E. brevicornu*)中淫羊藿苷、朝藿定 B 的含量整体较高;柔毛淫羊藿中朝藿定 C 含量整体较高,这与文献报道一致^[12-15,19];巫山淫羊藿仅测定了 1 批,总黄酮含量较高,而不是同属植物中最高的,这与文献报道不一致^[20]。同一植物来源的不同产地、不同植物来源的淫羊藿药材的指标成分含量存在较大差异。40 批市售淫羊藿中有 6 批掺有伪品(未知植物),淫羊藿的掺假现象比较突出,应加大我国淫羊藿检验的监管力度。

以淫羊藿(*E. brevicornu*)建立的 HPLC 指纹图谱,与其他淫羊藿品种的相似度存在一定差异,对于伪品及其掺假伪品较高时的淫羊藿相似度差异比较明显,可以进行质量的评价,而掺假伪品低时,评价意义不大,需要根据伪品的特征性成分,建立掺假判别函数进行评价。要更加科学全面的分析淫羊藿类药材的质量优劣,需要做大量样品采集工作。本文

调查了商品淫羊藿的植物来源,研究和分析了淫羊藿类药材质量,为临床应用和开发利用提供了技术支持。

实验结果最终表明,淫羊藿类植物分布较广,不同植物来源的淫羊藿含量指标,可能因气候、土壤、地势地貌等因素的影响,导致次生代谢产物也存在一定差异,地理环境不仅造成淫羊藿种类的多样性,也是造成药材质量差异的主要因素。同一种淫羊藿(*E. brevicornu*)的不同产地相似度也有差异,可能受到采收时期不同或不同地方贮藏的影响所致。由于淫羊藿的品种复杂、采收加工和贮藏等不确定因素的影响,实现指纹图谱对不同品种来源及产地的淫羊藿品种质量评估,仍然需要大量的样品数据和建立不同化学成分指纹图谱等工作的探索研究。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 340
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:340
- [2] 龚华乾, 高敏, 柴艺汇, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. 湖北民族大学学报, 2021, 38(4): 75
GONG HQ, GAO M, CHAI YH, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Epimedium* [J]. J Hubei Univ Nat, 2021, 38(4): 75
- [3] CAO LH, QIAO JY, HUANG HY, et al. PI3K - AKT signaling activation and icariin: the potential effects on the perimenopausal depression - like rat model[J]. Molecules, 2019, 24(20): 3700
- [4] JIN J, WANG H, HUA X, et al. An outline for the pharmacological effect of icariin in the nervous system[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 842: 20
- [5] ZHAO H, SHAN Y, MA Z, et al. A network pharmacology approach to explore active compounds and pharmacological mechanisms of epimedium for treatment of premature ovarian insufficiency [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 2997
- [6] 乔韬, 许栋, 陈映冰, 等. 基于文献计量的淫羊藿苷研究热点和未来趋势分析[J]. 中草药, 2020, 52(23): 7293
QIAO T, XU D, CHEN YB, et al. Research hotspots and future trend of icariin based on bibliometric analysis [J]. Chin Herb Med, 2020, 52(23): 7293
- [7] 谢宗万. 中药材品种论述, 中册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 241
XIE ZW. Discussion on Varieties of Chinese Medicinal Materials, Volume [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1984:241
- [8] 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
GUO BL, XIAO PG. Review on main species of *Herba epimedii* [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2003, 28(4): 303

- [9] 林瑞超. 中国药材标准名录[M]. 北京:科学出版社, 2011: 468,561
LIN RC. Standard List of Chinese Medicinal Materials [M]. Beijing: Science Press, 2011:468, 561
- [10] 裴利宽, 郭宝林. 近10年淫羊藿药材及饮片研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(6): 466
PEI LK, GUO BL. Research progress of Chinese herbal medicine and decoction pieces in recent 10 years [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2007, 32(6): 466
- [11] 裴利宽, 郭宝林, 黄文华. 中药淫羊藿主要种类药材质量的系统研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21):2217
PEI LK, GUO BL, HUANG WH. Systematic study on the quality of main species of *Herba herba* [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2007, 32(21):2217
- [12] 成丽媛, 霍香香, 杨莉, 等. UPLC法测定不同基源淫羊藿中11种有效成分的含量[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(2): 237
CHENG LY, HUO XX, YANG L, *et al.* Determination of 11 active components in *Epimedium* from different base by UPLC [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2022, 41(2): 237
- [13] 陈肖家, 张庆文, 季晖, 等. 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2007,17(5): 625
CHEN XJ, ZHANG QW, JI H, *et al.* Comparative study on the content of total flavonoids in *Epimedium* by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2007,17(5): 625
- [14] 石慧君, 刘少雄, 徐燕琴, 等. 湖南省淫羊藿属植物种质分布及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 26
SHI HJ, LIU SX, XU YQ, *et al.* Germplasm distribution and quality evaluation of *Epimedium* in Hunan Province [J]. *Chin J Exper Formul*, 2016, 22(24): 26
- [15] 何顺志, 王悦云, 徐文芬, 等. 贵州淫羊藿药材种质资源的研究[J]. 种子, 2011, 30(5): 69
HE SZ, WANG YY, XU WF, *et al.* Study on germplasm resources of *Epimedium* in Guizhou [J]. *Seed*, 2011, 30(5): 69
- [16] 刘鑫, 宋平顺. 基于HPLC含量测定法结合化学统计学对甘肃地产淫羊藿的质量评价体系研究[J]. 中医药信息, 2023, 40(8): 29
LIU X, SONG PS. Study on quality evaluation system of real estate *Epimedium* in Gansu Province based on HPLC content determination combined with chemical statistics [J]. *Inf Chin Med*, 2019, 40(8):29
- [17] 李仁清, 田淑云, 李风琴, 等. 4种淫羊藿产量与质量的动态变化及最佳采收期研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1456
LI RQ, TIAN SY, LI FQ, *et al.* Study on dynamic changes of yield and quality of four *Epimedium* species and optimal harvesting time [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(6): 1456
- [18] 黄世琼, 张永东, 郑浩文, 等. 不同地区淫羊藿药材质量分析[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 55
HUANG SQ, ZHANG YD, ZHENG HW, *et al.* Quality analysis of *Epimedium* in different regions [J]. *Asian - Pac Tradit Med*, 2020,16(8): 55
- [19] 王常顺, 段吉平, 康帅, 等. 淫羊藿药材及饮片质量分析与标准制定[J]. 中国现代中药, 2022, 22(7): 1006
WANG CS, DUAN JP, KANG S, *et al.* Quality analysis and standard formulation of *Herba epimedium* [J]. *Chin J Mod Chin Med*, 2022, 22(7): 1006
- [20] 周政政, 罗建光, 郭宝林, 等. 不同产地主要淫羊藿品种中活性黄酮类成分分析及资源研究[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 146
ZHOU ZZ, LUO JG, GUO BL, *et al.* Analysis of active flavonoids in main *Epimedium* varieties from different regions and study on their resources [J]. *J China Pharm Univ*, 2010, 41(2): 146

(本文于2024年6月25日修改回)