

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.011

基于高效液相色谱指纹图谱和多成分含量的淫羊藿传统饮片、破壁粉与破壁饮片比较*

李友露¹, 徐 剑^{1,2,3△}, 缪艳燕^{1,2,3}, 曹国琼^{1,2,3}, 田洪星¹, 张永萍^{1,2,3}

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025; 3. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 评价淫羊藿破壁饮片质量。方法 淫羊藿饮片经粉碎, 过 80 目筛, 得传统饮片; 再经超微粉碎成超微粉($D_{90} < 45 \mu\text{m}$), 得破壁粉; 经成型工艺, 得破壁饮片。建立 12 批淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 计算指标性成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含量, 色谱柱采用 OdyssiL C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。结果 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 质量浓度分别在 0.04~1.84 mg/mL、0.03~1.69 mg/mL、0.03~1.81 mg/mL、0.02~0.15 mg/mL、0.03~1.99 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.999\ 0, n = 7$); 平均加样回收率分别为 101.01%, 103.84%, 99.25%, 103.40%, 102.65%, RSD 分别为 1.37%, 0.95%, 0.74%, 0.81%, 0.31% ($n = 9$); 精密度和重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$)。传统饮片、破壁粉与破壁饮片共标定 13 个共有峰; 共有模式相关性分析显示, 传统饮片、破壁粉及破壁饮片与对照图谱(R)的相似度分别为 0.996, 0.998, 0.998, 相似度均大于 0.990; 5 个黄酮类指标性成分总含量从高到低依次为破壁粉 > 破壁饮片 > 传统饮片, 质量分数分别为 6.43%, 5.76%, 5.43%。结论 在相同提取工艺下, 淫羊藿经破壁粉碎、成型后可提高黄酮类成分含量, 同时保证破壁前后质量的稳定性。

关键词:淫羊藿; 传统饮片; 破壁粉; 破壁饮片; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 多成分含量
中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)09-0044-06

Comparison of Traditional Decoction Pieces, Cell-Wall Broken Powder and Cell-Wall Broken Decoction Pieces of Epimedii Folium Based on HPLC Fingerprint and Multi-Component Content

LI Youlu¹, XU Jian^{1,2,3}, MIAO Yanyan^{1,2,3}, CAO Guoqiong^{1,2,3}, TIAN Hongxing¹, ZHANG Yongping^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550025; 2. Guizhou Engineering Technology Research Center for Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550025; 3. National Engineering Technology Research Center for Miao Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550025)

Abstract: Objective To evaluate the quality of Epimedii Folium cell-wall broken decoction pieces. **Methods** Epimedii Folium decoction pieces were crushed and passed through an 80-mesh sieve to obtain the traditional decoction pieces. Then they were crushed into ultrafine powder ($D_{90} < 45 \mu\text{m}$) to obtain the cell-wall broken powder. Through the molding process, the cell-wall broken decoction pieces were obtained. The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of 12 batches of Epimedii Folium traditional decoction pieces, cell-wall broken powder and cell-wall broken decoction pieces were established, and the content of index components epimedin A, epimedin B, epimedin C, icaritin and baohuoside I was calculated. The chromatographic column was OdyssiL C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 270 nm, the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$ and the injection volume was 10 μL . **Results** The linear ranges of epimedin A, epimedin B, epimedin C, icaritin and baohuoside I were 0.04–1.84 mg/mL, 0.03–1.69 mg/mL, 0.03–1.81 mg/mL, 0.02–0.15 mg/mL, 0.03–1.99 mg/mL ($r = 0.999\ 0, n = 7$). The average recoveries of epimedin A, epimedin B, epimedin C, icaritin and baohuoside I were 101.01%, 103.84%, 99.25%, 103.40% and 102.65% with RSDs of 1.37%, 0.95%, 0.74%, 0.81% and 0.31% ($n = 9$). RSDs of precision and repeatability tests were less than 2.0% ($n = 6$). Thirteen common peaks were obtained for traditional decoction pieces, cell-wall broken powder and cell-wall broken decoction pieces. The correlation analysis of common patterns showed that the similarities of traditional decoction pieces, cell-wall broken powder and cell-wall broken decoction pieces with the reference chromatograms (R) were 0.996, 0.998 and 0.998, respectively, all of which were greater than 0.990. The total content of five flavonoid index components was the highest in the cell-wall broken powder, followed by the cell-wall broken decoction pieces and traditional decoction pieces, and the mass fractions were 6.43%, 5.76% and 5.43%, respectively. **Conclusion** Under the same extraction process, the content of flavonoids in Epimedii Folium can be increased after the cell-wall breaking, crushing and molding for the Epimedii Folium, and the quality

*基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合平台人才[2017]5655]; 贵州省国内一流建设学科项目[GNYL[2017]008]。

第一作者: 李友露, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药及民族药制剂新工艺及新剂型, (电子信箱)892653288@qq.com。

△通信作者: 徐剑, 男, 硕士, 教授, 研究方向为中药及民族药制剂新工艺及新剂型, (电子信箱)tw8489@126.com。

stability can be guaranteed before and after cell – wall breaking.

Key words: Epimedium Folium; traditional decoction pieces; cell – wall broken powder; cell – wall broken decoction pieces; HPLC; fingerprint; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icaritin; baohuoside I ; multi – components content

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicomu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶,主产于贵州、湖北、四川、辽宁、陕西、湘西等地^[1-2],主要活性成分为黄酮类成分。现代药理学研究表明,淫羊藿黄酮类成分具有抗氧化^[3]、抗肿瘤^[4]、抗炎^[5]和抗骨质疏松^[6]等作用,临床应用广泛^[7]。超微粉碎技术因其破壁后与原传统饮片的物质基础一致,可加快有效成分溶出,提高生物利用度,且具有携带方便、用药灵活等优势,能解决市场需求量大、资源紧缺的问题^[8-10]。淫羊藿破壁饮片是利用超微粉碎技术将传统饮片粉碎到粉体粒径(D_{90})小于45 μm 的破细胞壁粉体,再采用成型技术加工成40~80目的干燥颗粒状饮片。文献^[1,11-12]表明,淫羊藿黄酮类成分易受生长环境、产地加工、炮制、储存等因素影响,可导致有效成分提取不均匀、稳定差等问题。但破壁技术也面临一系列问题,如经粉碎工艺后失去了原饮片的外观性状、显微结构特征,比表面积显著增大,以及破壁过程中的高速摩擦、滚动产生的热量对黄酮类成分产生影响,进而影响临床疗效^[13-14]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法建立了12批淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片的指纹图谱,并对其进行相似度评价,同时建立了5个指标性成分的含量测定方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

XT – A400型多功能粉碎机(永康市红太阳机电有限公司);HBM – 109型超微粉碎机(瑞安市瀚博机电有限公司);GZX – 9240MBE型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司);ATY224型电子分析天平(日本岛津公司,精度为100 mg);KQ – 500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);1260型Agilent高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Milli – Q型超纯水仪(德国默克密理博公司)。

1.2 试剂

朝藿定A对照品(批号为MUST – 14060312),朝藿定B对照品(批号为MUST – 14062312),纯度均大于98%,购于成都曼思特生物科技有限公司;朝藿定C对照品(批号为110756 – 200110),淫羊藿苷对照品(批号为110737 – 201516),宝藿苷I对照品(批号为111852 – 201603),纯度均大于98%,购于中国食品药品检定研

究院;水为自制超纯水;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;淫羊藿饮片购自贵州同济堂药材有限公司,经贵州中医药大学何顺志教授鉴定为淫羊藿 *Epimedium brevicomu* Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 和朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai。详见表1。

表1 12批淫羊藿饮片信息

Tab. 1 Information of 12 batches of Epimedium Folium decoction pieces

序号	种属	产地	采集时间
1	淫羊藿	甘肃陇南	2017 – 08 – 10
2	淫羊藿	甘肃榆中县兴隆山	2017 – 07 – 22
3	淫羊藿	四川广元青川县	2017 – 09 – 05
4	淫羊藿	甘肃岷县西江	2017 – 08 – 15
5	柔毛淫羊藿	四川青城山	2017 – 07 – 06
6	柔毛淫羊藿	四川峨眉山	2017 – 09 – 14
7	柔毛淫羊藿	陕西太白山	2017 – 10 – 06
8	柔毛淫羊藿	湖北武当山	2017 – 09 – 11
9	朝鲜淫羊藿	黑龙江宁安县	2017 – 07 – 25
10	箭叶淫羊藿	江西抚州南丰县	2017 – 08 – 15
11	箭叶淫羊藿	四川成都	2017 – 06 – 17
12	箭叶淫羊藿	贵州普定	2017 – 05 – 14

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[15]

色谱柱:Odyssil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:水(A) – 乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min时75%A~74%A, 10~38 min时74%A, 38~43 min时74%A~59%A, 43~49 min时59%A~58%A, 49~55 min时58%A, 55~64 min时58%A~35%A, 64~85 min时35%A~15%A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:270 nm;进样量:10 μL 。

2.2 样品及溶液制备

2.2.1 样品制备

传统饮片:称取淫羊藿饮片适量,置多功能粉碎机中粉碎40 s,粉末过80目筛,密封,备用(编号为A₁ – A₁₂)。

破壁粉:取上述细粉适量,使用超微粉碎机调整粗细旋转轴长度为0.6 cm,粉碎1次,密封,备用(编号为B₁ – B₁₂)。

破壁饮片:取上述破壁粉适量,混匀,加入15%乙醇,按料液比0.62:1(m/V)制成软材,35目筛网制得湿颗粒,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥70 min,过筛整粒,密封,备用(编号为C₁ – C₁₂)。

2.2.2 溶液制备

供试品溶液:取淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片各0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇20 mL,密塞,称定质量,超声处理(频率为40 kHz,功率为500 W)45 min,冷却至室温,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,离心(转速为14 000 r/min)10 min,取上清液,即得。

对照品溶液:取淫羊藿苷、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、宝藿苷I对照品各适量,精密称定,置5 mL容量瓶中,加甲醇制成每1 mL分别含1.84,1.69,1.81,1.50,1.99 mg的溶液,摇匀,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 参照峰确定

本研究中所建立指纹图谱中淫羊藿苷的色谱峰分离良好,峰面积较大,保留时间适中,且为所有样品共有,参照2020年版《中国药典(一部)》淫羊藿项下淫羊藿苷的含量测定方法^[15],以淫羊藿苷为参照峰。

2.3.2 方法学考察

精密度试验:取2.2.1项下淫羊藿传统饮片(编号为A₁)、破壁粉(编号为B₁)和破壁饮片(编号为C₁)各适量,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果共有峰相对保留时间的RSD分别为0.02%~0.14%、0.05%~0.09%、0.09%~0.18%(n=6),相对峰面积的RSD分别为1.44%~2.88%、2.46%~2.92%、1.57%~2.64%(n=6),表明仪器精密度良好。

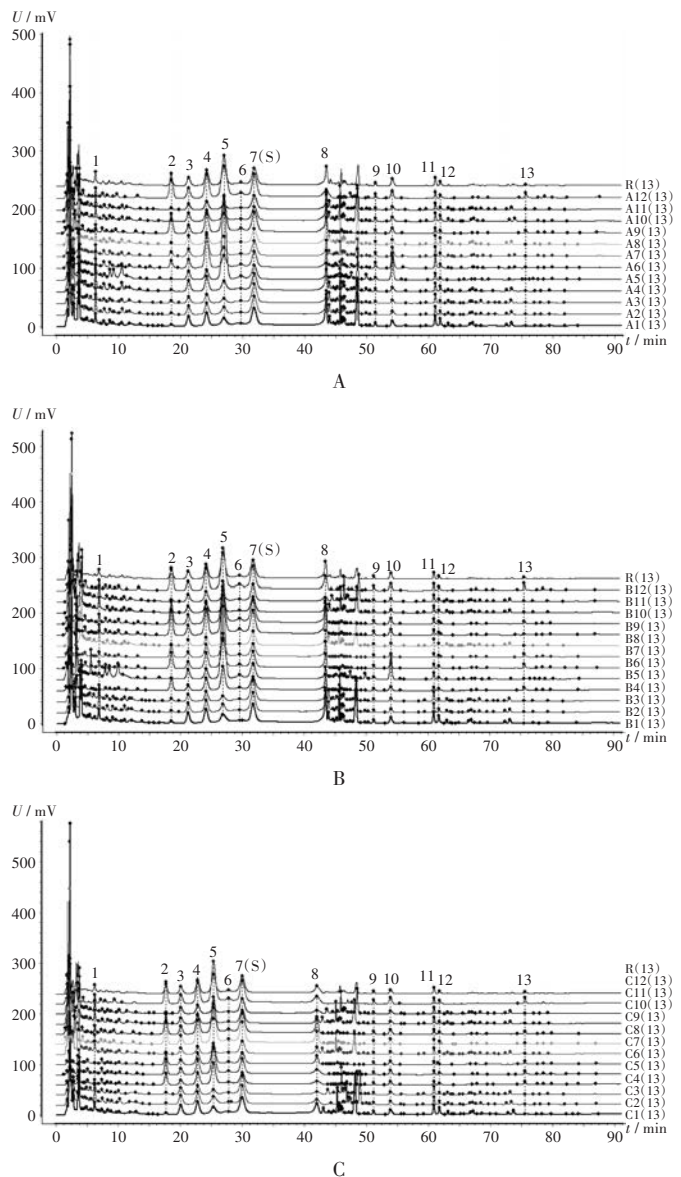
重复性试验:取精密度试验项下供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别进样测定6次,记录色谱图。结果共有峰相对保留时间的RSD为0.07%~0.15%、0.03%~0.16%、0.01%~0.24%(n=6),相对峰面积的RSD为1.97%~2.70%、1.05%~2.82%、1.90%~2.86%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取精密度试验项下供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于0,3,6,9,12,18,24 h时进样测定,记录色谱图。结果共有峰相对保留时间的RSD为0.02%~1.27%、0.05%~1.35%、0.05%~1.29%(n=7),相对峰面积的RSD为1.74%~2.55%、1.44%~2.99%、1.20%~2.89%(n=7),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.3 指纹图谱建立及共有峰指认

取12批淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得图谱录入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件,以中位数法分析,设置参照图谱。其中,传统饮片为编号A₁~A₁₂、破壁粉

为编号B₁~B₁₂、破壁饮片为编号C₁~C₁₂,各自生成12批淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片指纹图谱与对照指纹图谱叠加图(图1)。共标定13个共有峰,结合对照品指认了其中的5个共有峰,其中3号峰为朝藿定A,4号峰为朝藿定B,5号峰为朝藿定C,7号峰为淫羊藿苷,11号峰为宝藿苷I。



A. 传统饮片 B. 破壁粉 C. 破壁饮片

图1 高效液相色谱叠加指纹图谱

A. Traditional decoction pieces B. Cell-wall broken powder

C. Cell-wall broken decoction pieces

Fig.1 HPLC superimposed fingerprints

2.3.4 相似度评价

12批淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片各自生成的共有模式图谱即为对照图谱(R),评价12批样品与各自对照图谱(R)之间的相似度,结果见表2至表4。淫羊藿传统饮片为0.419~1.000,破壁粉为0.435~1.000,破壁饮片为0.425~1.000。12批传统饮片A₁~A₄和

A₁₁,破壁粉B₁ - B₃和B₁₁,以及破壁饮片C₁ - C₃和C₁₁之间的相似度较高(>0.90);破壁粉(编号为B₁ - B₃,B₇,B₁₀ - B₁₁)、壁破饮片(编号为C₁ - C₃,C₇,C₁₀ - C₁₁)间的相似度较高,表现出近似的变化规律,表明淫羊藿种属的不同、产地或时间的不同导致其成分含量有所不同^[1,3,16-17],质量稳定性有待提升。

表2 12批淫羊藿传统饮片指纹图谱相似度评价结果

Tab. 2 Evaluation results of fingerprint similarity of 12 batches of Epimedii Folium traditional decoction pieces												
编号	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂
A ₁	1.000											
A ₂	0.986	1.000										
A ₃	0.945	0.981	1.000									
A ₄	0.991	0.992	0.949	1.000								
A ₅	0.526	0.521	0.419	0.573	1.000							
A ₆	0.885	0.873	0.828	0.888	0.532	1.000						
A ₇	0.934	0.927	0.889	0.937	0.516	0.989	1.000					
A ₈	0.996	0.984	0.934	0.996	0.566	0.890	0.937	1.000				
A ₉	0.820	0.801	0.718	0.835	0.845	0.820	0.822	0.839	1.000			
A ₁₀	0.992	0.975	0.926	0.989	0.519	0.877	0.931	0.995	0.813	1.000		
A ₁₁	0.976	0.998	0.984	0.986	0.528	0.871	0.923	0.975	0.796	0.962	1.000	
A ₁₂	0.818	0.818	0.754	0.839	0.856	0.825	0.822	0.834	0.984	0.794	0.823	1.000
R	0.938	0.935	0.873	0.954	0.765	0.904	0.924	0.951	0.952	0.928	0.933	0.958

表3 12批淫羊藿破壁粉指纹图谱相似度评价结果

Tab. 3 Evaluation results of fingerprint similarity of 12 batches of Epimedii Folium cell - wall broken powder												
编号	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀	B ₁₁	B ₁₂
B ₁	1.000											
B ₂	0.990	1.000										
B ₃	0.933	0.963	1.000									
B ₄	0.802	0.793	0.722	1.000								
B ₅	0.500	0.504	0.435	0.847	1.000							
B ₆	0.796	0.786	0.711	1.000	0.850	1.000						
B ₇	0.966	0.986	0.988	0.792	0.526	0.782	1.000					
B ₈	0.805	0.802	0.756	0.991	0.842	0.989	0.819	1.000				
B ₉	0.796	0.788	0.719	0.999	0.854	0.999	0.789	0.992	1.000			
B ₁₀	0.961	0.983	0.985	0.797	0.537	0.788	0.999	0.825	0.794	1.000		
B ₁₁	0.949	0.975	0.987	0.792	0.540	0.782	0.997	0.823	0.789	0.999	1.000	
B ₁₂	0.785	0.781	0.719	0.998	0.856	0.998	0.786	0.991	0.998	0.793	0.790	1.000
R	0.868	0.870	0.820	0.981	0.836	0.978	0.880	0.986	0.981	0.885	0.882	0.980

2.3.5 指纹图谱相关性分析

将上述12批淫羊藿传统饮片共有模式(S1)、破壁粉体共有模式(S2)、破壁饮片生成的图谱共有模式(S3)分别导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版),生成对照图谱(R),进行相似度比较,结果见图2和表5。结果表明,淫羊藿传统饮片、破壁粉及破壁饮片与对照图谱(R)之间的相似度较高(>0.99),表明

表4 12批淫羊藿破壁饮片指纹图谱相似度评价结果

Tab. 4 Evaluation results of fingerprint similarity of 12 batches of Epimedii Folium cell - wall broken decoction pieces												
编号	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
C ₁	1.000											
C ₂	0.984	1.000										
C ₃	0.926	0.971	1.000									
C ₄	0.788	0.771	0.709	1.000								
C ₅	0.783	0.772	0.425	0.995	1.000							
C ₆	0.797	0.777	0.714	1.000	0.994	1.000						
C ₇	0.978	0.998	0.973	0.783	0.784	0.788	1.000					
C ₈	0.809	0.802	0.761	0.989	0.996	0.990	0.812	1.000				
C ₉	0.815	0.803	0.759	0.992	0.996	0.993	0.813	0.998	1.000			
C ₁₀	0.963	0.990	0.985	0.790	0.804	0.795	0.992	0.832	0.830	1.000		
C ₁₁	0.958	0.986	0.986	0.790	0.805	0.795	0.989	0.834	0.831	1.000	1.000	
C ₁₂	0.774	0.752	0.683	0.999	0.992	0.999	0.764	0.985	0.989	0.770	0.769	1.000
R	0.902	0.900	0.858	0.968	0.971	0.971	0.907	0.981	0.982	0.917	0.917	0.960

淫羊藿传统饮片经破壁加工制成破壁粉、无添加成型工艺制备破壁饮片的过程中,有效成分的整体概貌没有发生明显变化,工艺流程质量稳定。

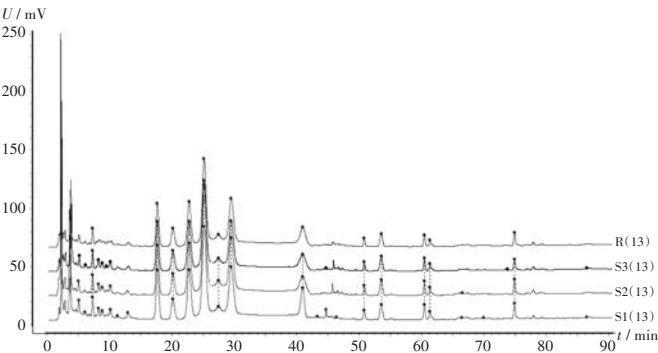


图2 淫羊藿传统饮片、破壁粉及破壁饮片指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common patterns of fingerprints of Epimedii Folium traditional decoction pieces, cell - wall broken powder and cell - wall broken decoction pieces

表5 12批淫羊藿传统饮片、破壁粉及破壁饮片相似度评价结果

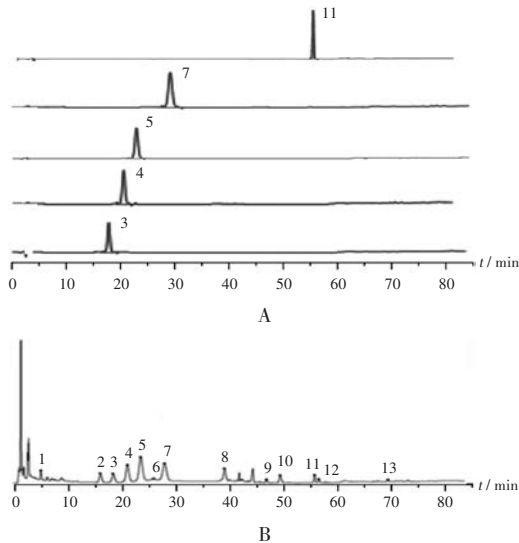
Tab. 5 Similarity evaluation results of 12 batches of Epimedii Folium traditional decoction pieces, cell - wall broken powder and cell - wall broken decoction pieces			
样品	传统饮片	破壁粉	破壁饮片
传统饮片	1.000		
破壁粉	0.990	1.000	
破壁饮片	0.990	0.994	1.000
R	0.996	0.998	0.998

2.4 多指标成分含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱条件同2.1项下。取2.3.2精密度试验项下供试品溶液(样品编号为A₁)和2.2.2项下对照品溶液,按2.1项下色谱条件分别进样10 μL测定。色谱图见图3。

结果朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 之间的分离度良好,相邻色谱峰间分离度均大于 1.5,对样品的测定无干扰。



3. 朝藿定 A 4. 朝藿定 B 5. 朝藿定 C 7. 淫羊藿苷 11. 宝藿苷 I
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 3 高效液相色谱图

3. Epimedin A 4. Epimedin B 5. Epimedin C 7. Icaritin 11. Baohuoside I
A. Reference solution B. Test solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

2.4.2 方法学考察

线性关系考察:精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液,加乙醇稀释成系列对照品溶液,朝藿定 A 质量浓度分别为 1.84, 0.92, 0.59, 0.30, 0.15, 0.07, 0.04 mg/mL,朝藿定 B 质量浓度分别为 1.69, 0.85, 0.42, 0.21, 0.11, 0.05, 0.03 mg/mL,朝藿定 C 质量浓度分别为 1.81, 0.90, 0.45, 0.23, 0.11, 0.06, 0.03 mg/mL,淫羊藿苷质量浓度分别为 1.50, 0.75, 0.38, 0.18, 0.09, 0.05, 0.02 mg/mL,宝藿苷 I 分别为 1.99, 1.00, 0.50, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 mg/mL。按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱峰峰面积,以质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 6。

表 6 线性关系考察结果($n=7$)

Tab. 6 Results of the linear relation test($n=7$)

成分	回归方程	r	线性范围(mg/mL)
朝藿定 A	$Y=16\,768X-0.921$	0.999 0	0.04~1.84
朝藿定 B	$Y=17\,151X-0.980$	0.999 0	0.03~1.69
朝藿定 C	$Y=17\,495X-2.443$	0.999 0	0.03~1.81
淫羊藿苷	$Y=21\,295X-10.613$	0.999 0	0.02~1.50
宝藿苷 I	$Y=29\,067X+2.527$	0.999 0	0.03~1.99

精密度试验:精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,测得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.24%, 0.14%, 0.12%, 0.15%, 0.48% ($n=6$),表

明仪器精密度良好。

重复性试验:取淫羊藿传统饮片(编号为 A_1) 0.2 g,按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次,测得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.98%, 0.84%, 0.52%, 0.65%, 1.14% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取淫羊藿传统饮片(编号为 A_1) 0.1 g,精密称定,共 9 份,按 80%, 100%, 120% 的比例加入朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果平均加样回收率分别为 101.01%, 103.84%, 99.25%, 103.40%, 102.65%, RSD 分别为 1.37%, 0.95%, 0.74%, 0.81%, 0.31% ($n=9$)。

2.5 多指标成分含量比较

通过对比淫羊藿传统饮片、破壁粉、破壁饮片的 HPLC 指纹图谱,发现其化学成分组成差异较小,但色谱峰峰面积存在一定差异。淫羊藿主要含有黄酮类成分,且朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 已纳入药典标准,上述成分是淫羊藿发挥药效的重要活性物质。本研究中采用 HPLC 法测定上述三者中多指标成分含量。

采用 SPSS 26.0 统计学软件对 5 个指标性成分进行多个独立样本非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。指标性成分总含量从高到低依次为破壁粉>破壁饮片>传统饮片分别为 6.43%, 5.76%, 5.43%。由表 7 可知,淫羊藿破壁粉及破壁饮片各指标性成分平均含量均高于传统饮片,但均无显著差异($P>0.05$)。

表 7 12 批淫羊藿传统饮片、破壁粉和破壁饮片多指标成分含量测定及非参数检验结果($\bar{X}\pm s, \%$)

Tab. 7 Content determination of multi-index components and nonparametric test results of 12 batches of Epimedium Folium traditional decoction pieces, cell-wall broken powder and cell-wall broken decoction pieces($\bar{X}\pm s, \%$)

样品	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	宝藿苷 I
传统饮片	0.62 ± 0.15	1.27 ± 0.56	1.94 ± 2.24	1.46 ± 0.25	0.14 ± 0.05
破壁粉	0.65 ± 0.15	1.33 ± 0.30	2.55 ± 2.55	1.75 ± 0.47	0.15 ± 0.05
破壁饮片	0.67 ± 0.10	1.29 ± 0.55	2.06 ± 1.67	1.57 ± 0.30	0.17 ± 0.04
χ^2 值	0.497	1.272	0.221	3.460	2.586
P 值	0.780	0.529	0.895	0.177	0.274

3 讨论

3.1 色谱条件优化

参照 2020 年版《中国药典(一部)》淫羊藿含量测定色谱条件,并进行优化,采用紫外-可见分光光度计对淫羊藿样品进行全波长扫描,270 nm 波长处检测信号较强,色谱峰数目较多,且分离度良好;曾比较色谱柱 Agilent C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Diamonsil C_{18} 柱

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)和OdyssiL C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), OdyssiL C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)的色谱峰分离效果较佳,峰形较好;曾比较乙腈-水、乙腈-0.1%醋酸、乙腈-0.1%磷酸流动相系统,选择乙腈-水作为流动相,色谱峰数目较多、峰形和分离度均较好,曾比较柱温25, 30, 35℃,发现柱温过高出峰时间较快、分离效果较差,柱温太低出峰时间延长,故柱温选择30℃。最终确定2.1项下色谱条件。

3.2 样品提取条件优化

不同提取条件会影响有效成分的提取^[18]。本研究中以共有峰峰面积/质量为评价指标,分别考察了提取方法(超声、回流、浸渍),提取溶剂(甲醇、无水乙醇、50%乙醇、80%乙醇),提取溶剂剂量(20, 30, 40 mL),提取时间(15, 45, 75 min)。结果发现,超声提取方便快捷,有利于节省时间,也能很好地把较多成分提取出来;提取溶剂为50%乙醇时色谱峰峰形和分离度均较好;提取45 min可提取完全;提高溶剂剂量,共有峰峰面积/质量增加幅度不大。同时,考虑溶剂成本,最终选择提取溶剂剂量为20 mL。

3.3 不同批次淫羊藿传统饮片、破壁粉及破壁饮片化学组分传递分析

所建立淫羊藿传统饮片、破壁粉及破壁饮片的HPLC指纹图谱共标定13个共有峰,整体形貌上无化学组分数、种类的变化,但其相似度波动范围较大(0.419~1.000, 0.425~1.000, 0.435~1.000),提示药材质量受品种、生长环境气候、产地等因素的影响较大。化学组分的差异即使采用相同工艺也会使中药成品质量不同,应加强把控淫羊藿药材的产地及加工方法。

为避免药材本身质量的不稳定性会放大制备流程中间体(破壁粉)、成品(破壁饮片)样品的差异性^[19],根据前期得到的各样品的共有模式进行相关性分析,结果显示其相似度较高(>0.900),传统饮片经破壁粉碎技术及成型技术制成破壁饮片成品的整个制备流程中对化学组分的影响较小,成分传递好,与邓雯等^[20]的研究结论一致。破壁过程中因高速滚动、摩擦,会产生大量的热,有可能造成淫羊藿主要含有的黄酮类成分分解、转化等,比较破壁前后淫羊藿黄酮类有效成分的含量之间的差异的研究鲜见报道。本研究结果表明,与传统饮片相比,破壁粉、破壁饮片淫羊藿黄酮类有效成分的提取率可得到提高,同时含量无明显差异。表明粉碎工艺的质量稳定、可靠,进一步提示淫羊藿利用该技术的可行性。

综上所述,本研究中从定性与定量2个角度对淫羊藿破壁饮片的黄酮类成分进行分析,为了更全面地理解破壁饮片制备过程的质量变化规律,后续仍可对其物理性质、生物利用度等进行进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 刘少雄,王李俊,何平平,等. 淫羊藿属植物形态分类性状评述[J]. 广西植物,2021,41(11):1767-1783.
- [3] 王燕萍,贾旭森,王艳,等. 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[J]. 中草药,2021,52(14):4193-4200.
- [4] 贾方,王秋月,李雪,等. 淫羊藿苷抗肿瘤的免疫调节作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2020,47(9):195-198.
- [5] 苏晓乾,夏长波,严福林,等. 基于网络药理学和分子对接研究淫羊藿治疗抑郁症的抗炎作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(17):162-169.
- [6] 刘谊民,许婷,张黄琴,等. 基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(16):177-184.
- [7] 曾华婷,郭健,陈彦. 淫羊藿素药理作用及其新型给药系统的研究进展[J]. 中草药,2020,51(20):5372-5380.
- [8] 丁圣清,郁省,王冬东,等. 中药饮片超微粉碎实现剂型改革的初步试验[J]. 中国药业,2016,25(23):38-42.
- [9] 陈明容,李晓明,李卿,等. 灵芝超微粉对大鼠血液学和血液生化学的影响[J]. 中国药业,2021,30(2):41-46.
- [10] 王春花. 超细粉体技术在中药制剂中的应用[J]. 中国药业,2011,20(10):15-17.
- [11] 邓爱平,方文韬,周青罡,等. 淫羊藿质量影响因素及质控对策分析[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1062-1070.
- [12] 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.
- [13] 杨杭,刘凤,练心洁,等. 灵芝孢子的破壁方法及其药理作用研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版),2017,36(4):364-368.
- [14] 蒲翔,姚元贵,谢宇,等. 丹参破壁饮片与传统饮片水溶性成分指纹图谱及丹酚酸B含量对比研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(2):169-173.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:340-342.
- [16] ZHAO YD, CHEN SF, WANG YD, et al. Effect of drying processes on prenyl flavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26(2):796-806.
- [17] 付亮,袁璟亚,杨瑞武,等. 正交试验优化淫羊藿总黄酮和多糖的分步提取工艺优化[J]. 食品科学,2012,33(24):56-60.
- [18] 方碧烟,甘均龙,史军杰,等. 不同产地红景天破壁饮片、破壁粉体和传统饮片HPLC指纹图谱相关性研究[J]. 现代中药研究与实践,2021,35(1):33-37.
- [19] 龙立慧,谢宇,李新建,等. 红景天破壁饮片与传统饮片指纹图谱对比研究[J]. 中药材,2019,42(3):594-597.
- [20] 邓雯,王慧玲,彭丽华,等. 淫羊藿破壁饮片HPLC指纹图谱研究[J]. 今日药学,2016,26(5):300-303.

(收稿日期:2021-08-11;修回日期:2021-12-14)