

不同生境中柔毛淫羊藿形态特征 及其有效成分差异分析

权秋梅, 高泽梅, 黎云祥*

(西华师范大学 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637000)

摘要: 采用高效液相色谱法和紫外分光光度法分别测定了不同生境中柔毛淫羊藿的有效成分, 并运用 one-way ANOVA 统计分析了不同生境中柔毛淫羊藿有效成分的差异以及形态参数和生物量的差异。结果表明: 3 个生境中, 相对光照强度较低的生境, 其形态参数和植株各个部位的生物量均要低于光照强度相对较强的生境, 但 3 个生境中的整体叶形基本一致; 三个生境中淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷含量在光照强度较高的生境中要大于光照较低的生境; 柔毛淫羊藿植株各个部位的有效成分大小为叶 > 根 > 茎; 在不同生境中柔毛淫羊藿叶片的黄酮和淫羊藿苷含量都能达到用药标准, 其余的部位则不能达到用药标准。因此在人工栽培柔毛淫羊藿时, 应模拟野外生长条件, 以期提高柔毛淫羊藿质量, 替代和保护野生资源。

关键词: 柔毛淫羊藿; 形态特征; 有效成分; 不同生境

中图分类号: Q946.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)03-0350-05

Comparative analysis of morphological characteristics and effective composition contents of *Epimedium pubescens* in different habitats

QUAN Qiu-Mei, GAO Ze-Mei, LI Yun-Xiang*

(Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation, China West Normal University, Nanchong 637000, China)

Abstract: Morphological characteristics and effective composition contents of *Epimedium pubescens* in different habitats were studied. The effective composition contents were determined in different habitats by HPLC and UV, and the difference of morphological parameters and effective composition contents were analysed using one-way ANOVA statistical analysis. The results indicated that morphological parameters and biomass were higher in high light intensity habitats than in low light intensity habitats, but the shape of leaves were same in three habitats. In the relatively high light intensity, the flavonoid and icariin contents of *E. pubescens* were significantly lower than the low light intensity habitats. The effective component in various parts of the *E. pubescens* was leaf > root > stem. According to the Chinese Pharmacopoeia, both the icariin and flavonoid contents only in *E. pubescens* leaves can meet the standard. To improve the quality of *Epimedium*, substitute and protect of wild resources, we should simulate field growth conditions in artificial cultivation.

Key words: *Epimedium pubescens*; morphological characteristics; effective composition contents; different habitats

柔毛淫羊藿 (*Epimedium pubescens*) 为小檗科淫羊藿属 (*Epimedium*) 多年生草本植物, 在《神农

本草经》中列为中品, 已有 2000 多年的应用历史, 是中国应用最为广泛、最为悠久的中药之一。淫羊藿

* 收稿日期: 2011-08-05 修回日期: 2012-02-08

基金项目: 西华师范大学科研启动项目(11B016); 重点实验室开放基金(XNYB09-04)[Supported by Startup Project for Scientific Research of China West Normal University(11B016); the Open Foundation of Key Laboratory(XNYB09 04)]

作者简介: 权秋梅(1981-), 女, 四川宜宾人, 教师, 主要从事生殖生态的研究, (E-mail)meimeiq@163.com。

* 通讯作者: 黎云祥, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生态学和分子生态学研究, (E-mail)yx_li@263.net。

属植物在全世界约 60 种,我国约有 50 种。淫羊藿全草入药,其主要有效成分为黄酮和淫羊藿苷(国家药典委员会,2010)。由于淫羊藿属植物具有较高的药用价值,因此市场对淫羊藿植物的需求量增大,导致野生资源被肆意挖掘,加上人们不合理的利用和放牧,致使野生淫羊藿资源十分匮乏,对其保护利用的研究已经是迫在眉睫。目前淫羊藿属植物在药理作用、化学成分等方面有了较深入的研究,而生态学方面的研究相对较少(杨子松等,2008)。许多研究表明:人工栽培的淫羊藿植物的有效成分能够替代野生资源。因此本文按不同生境对柔毛淫羊藿进行采样,进行形态参数和有效成分的测定分析,探讨生境异质性对柔毛淫羊藿形态特征及其有效成分的影响,为科学合理开发利用野生资源及规范化栽培提供理论依据。

1 研究区概况

研究区域为人工林,位于四川盆地中部南充市与广安市交界地金城山(106°28' E,30°45' N),地处北亚热带,属亚热带暖气候区,年均温度 17.15 °C,年均降水量在 1 100 mm 左右(胥晓等,1999)。

2 方法

2.1 取样方法

2007 年 3 月在金城山森林公园选取具有柔毛淫羊藿生长的区域,根据柔毛淫羊藿的生态环境特征,选取了具有代表性的 3 个典型生境(赵刚等,2011)作为样地(表 1)。生境 A 为多岩石,乔木层有白栎(*Quercus fabric*)、柏木(*Cupressus fueris*),灌木层主要有十大功劳(*Mahonia fortunei*)、女贞(*Ligustrum lucidum*)、长尖叶蔷薇(*Rosa longicuspis*),草本主要有冷水花(*Pilea notata*)和细柄草(*Capilipedium proiflorum*);生境 B 为林缘,乔木层有白栎、柏木、杉木(*Cunninghamia lanceolata*),灌木层有十大功劳、白筋(*Acanthopanax trifoliatum*)、女贞、喜阴悬钩子(*Rhododendron mesogaeus*)等,草本主要为有冷水花、鸢尾(*Iris tectorom*)和细柄草;生境 C 为水沟旁乔木层有白栎、柏木、杉木,灌木层有十大功劳、女贞、长尖叶蔷薇(*Rosa longicuspis*),油茶(*Camellia oleifera*)等,草本主要是冷水花、鸢尾、细柄草、蛇莓(*Duchesnea indica*)、(*Artemisia vulgari*)、水麻(*Debengeasia edulis*)等。在 3

表 1 不同生境的采样点

Table 1 The sampling sites of different habitats

项目 Item	样地 A Plot A	样地 B Plot B	样地 C Plot C
经纬度 Latitude and longitude	106°27'52.2" E, 30°45'49.7" N	106°27'41.2" E, 30°45'51.7" N	106°28'12.4" E, 30°45'52.6" N
海拔 Altitude (m)	790	643	568
坡度坡向 Slope gradient and aspect	NW80°	WN13°	ES8°
土壤含水量 Soil moisture (%)	16.12	19.23	23.02
土壤有机质含量 Content of soil organic matter (%)	2.29	3.26	2.23
相对光照强度 Relative light intensity (%)	31.78	42.95	52.98
湿度 Air humidity (%)	89	90	94

个生境中其中样地 C 的植株个体较大,植株较高,因此生境 C 为柔毛淫羊藿的适生环境。在每个生境中,在 5 m×5 m 的样方中选取能代表生境中柔毛淫羊藿植物基本长势和健康的完整植株,将完整植株带回实验室后测定每个样地内植株的叶宽、叶长、株高。植株的地下、地上生物量测定以在 60~70 °C 的烘箱中烘 48 h,样品烘干后用电子天平称重。

2.2 淫羊藿苷与黄酮成分测定

除了在每个生境中挖取 10 株完整植株外,同时采取 5 个植株,并将各生境的材料分为主根、须根、茎和叶 4 个部分,阴干后作为供试样。

2.2.1 仪器与试剂 Agilent 公司 1100 型高效液相色谱仪(含脱气机、四元梯度泵、自动进样器进样、柱温箱、DAD 检测器),Sartorius 公司 BP211D 型电子天平,Millipope 公司 MilliQ 型纯水仪,Labarey 公司微量移液器,Autoscience 公司溶剂过滤器。日本岛津 UV-2450 型紫外分光光度计。淫羊藿苷对照品购于成都曼思特生物科技有限公司(CAS: 489-32-7, Icariin HPLC≥98%);甲醇(上海陆都化学试剂厂)为色谱纯;无水乙醇为分析纯。

2.2.2 淫羊藿苷标准及样品溶液的配制

2.2.2.1 标准溶液配制 精密称取淫羊藿苷对照品

10.00 mg, 置入 100 mL 容量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.10 mg/mL 的标准品母液。精密量取 1, 2, 3, 4, 5 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 备用。标准溶液在 4 °C 下保存。

2.2.2.2 样品溶液配制 称取 1.00 g 已粉碎的柔毛淫羊藿供试样品(过 40 目筛), 加 70% 无水乙醇 100 mL, 回流浸提 30 min, 趁热过滤, 冷却后用 70% 无水乙醇定容到 100 mL。取浸提液适量, 过 0.45

μm 孔径的滤膜, 成为液相色谱试样。每个材料重复测定 3 次(《中国药典》, 2005)。

2.2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Shim2pack Vp2 ODS (150 mm \times 4.6 mm); 流动相为乙腈: 水=30:70; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测器波长 270 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL 。

2.2.2.4 样品分析 取样品溶液及标样按“2.2.2.3”色谱条件进样, 按峰面积外标法计算含量。

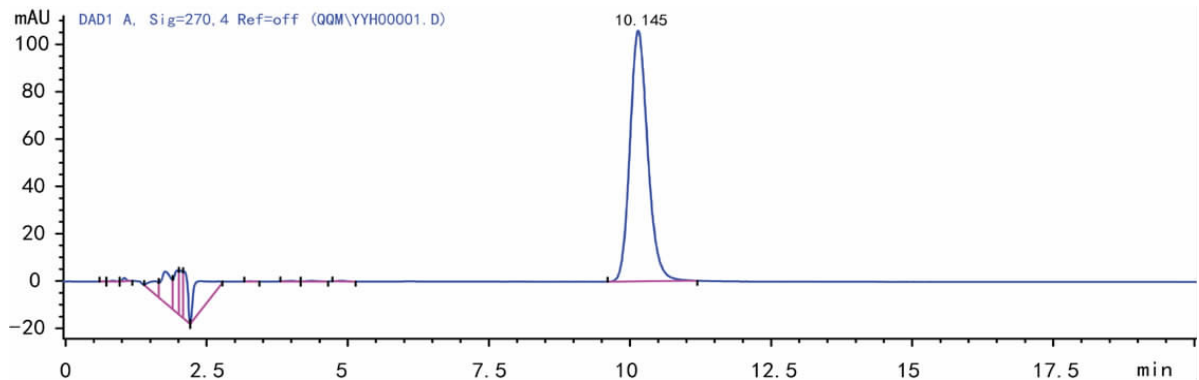


图 1 对照品保留时间

Fig. 1 Retention time of reference substances

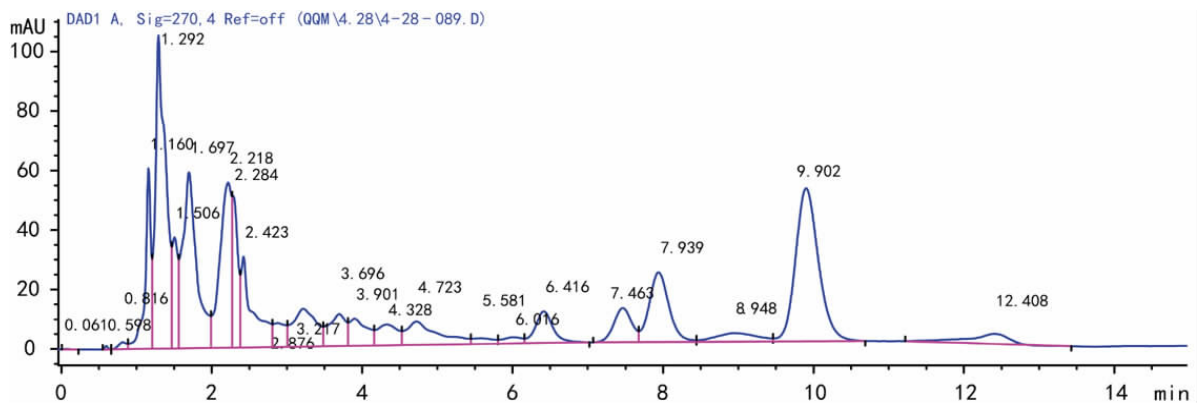


图 2 样品保留时间

Fig. 2 Retention time of sample

2.2.3 黄酮的测定 取上述“2.2.2.2”法制备的样品液 0.5 mL, 定容到 50 mL 的量瓶中, 加 70% 无水乙醇至刻度, 摇匀作为供试样品。分别取供试样品和对照样品溶液, 以相应的试剂为空白, 用紫外分光光度法, 在 270 nm 波长处测定。

3 结果与分析

3.1 色谱分离

在本色谱条件下, 对照品的淫羊藿苷的保留时

间为: 10.145 min(图 1), 样品(生境 A 植株叶)分析过程中淫羊藿苷的保留时间为 9.902 min(图 2), 与对照品的保留时间误差小于 ± 0.5 , 整个分离过程仅需 12 min。

3.2 方法学考查

3.2.1 线性关系的测定 精密吸取淫羊藿苷标样 5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μL 进样, 以峰面积为纵轴(y), 进样量为横轴(x)绘制标准曲线, 回归方程为 $y = 14898x + 7.477$ ($r = 0.9995$)。结果表明, 淫羊藿苷标样的线性关系良好。

表 2 不同生境中柔毛淫羊藿植株的形态特征比较
Table 2 Contrast of the morphological characteristics of *E. pubescens* in different habitats

项目 Item	A	B	C	F
叶长 Leaf length (cm)	5.91±0.68a	7.62±0.59b	7.33±0.82b	1.68*
叶宽 Leaf width (cm)	3.25±0.35a	4.65±0.41b	4.01±0.52b	2.60*
叶长宽比 The ratio of length to width	1.86±0.12a	1.66±0.05a	1.86±0.08a	1.83
株高 Individual height (cm)	9.01±1.05b	20.32±1.57a	20.36±1.78a	19.89**
主根生物量 Taproot biomass(g)	0.80±0.14b	1.05±0.06b	1.37±0.09a	8.20**
须根生物量 Fibrous root biomass (g)	0.40±0.03a	0.27±0.02b	0.18±0.02c	18.00**
茎生物量 Stem biomass (g)	0.43±0.02b	0.48±0.03b	1.04±0.06a	64.83**
叶生物量 Leaf biomass (g)	1.29±0.22b	1.69±0.16ab	2.20±0.14a	5.93*

注: A-生境 1; B-生境 2; C-生境 3; **和*分别表示 1%和 5%的显著水平。 Note: A-habitat 1; B-habitat 2; C-habitat 3; ** and * represent significances at 0.01 and 0.05 respectively.

3.2.2 精密度试验 取 10 μL 淫羊藿苷标准液连续进样 5 次,测得其相对标准偏差(RSD)为 1.18%,表明仪器进样精密度良好。

3.2.3 空白回收率试验 取适量的淫羊藿苷标准品,按“1.2.2.2”制备方法同时配制 3 份,其回收率为(102±12)%。表明该试验采用了较为合适的淫羊藿苷提取方法。

3.2.4 稳定性试验 精密吸取淫羊藿苷标准液及供式样品溶液 20 μL ,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定,标准品相对标准偏差(RSD)分别为 0.39%。结果表明标准品及样品在 10 h 内有良好的稳定性。

3.2.5 重现性试验 取柔毛淫羊藿样品,按“2.2.2.2”制备方法同时配制 3 份,进样 20 μL ,测得淫羊藿苷相对标准偏差(RSD)为 1.81%,表明该方法的重现性较好。

3.3 不同生境中淫羊藿植株的形态特征比较

在不同生境中叶长宽比都无显著差异(表 2),而株高、主根生物量、须根生物量和茎生物量的差异极其显著($P < 0.01$),叶长、叶宽和叶的生物量差异分别达到显著水平($P < 0.05$)。在叶长和叶宽中,生境 A 的形态参数均要显著低于生境 B 和 C,而 B 和 C 之间的形态参数无显著差异。在 B 和 C 生境中,株高无显著差异,分别为(20.32±1.57) cm 和(20.36±1.78) cm,显著高于 A 生境中柔毛淫羊藿的株高为(9.01±1.05) cm;在主根生物量中,生境 C 为(1.37±0.09)%显著高于 A(0.80±0.14)%和 B 生境(1.05±0.06)%;在生境须根生物量为 A>B>C,茎的生物量中 A 和 B 无显著差异,但是两者要显著低于 C;在叶的生物量中,C 的生物量为最高,而 A 的生物量为最低。

3.4 不同生境中柔毛淫羊藿黄酮的含量

由图 3 可知,不同生境中柔毛淫羊藿主根,须根

和茎的黄酮含量差异极其显著($P < 0.01$),而在不同生境中柔毛淫羊藿叶的黄酮含量差异不显著($P > 0.05$)。其中生境 C、B 和 A 的柔毛淫羊藿分别在主根(4.67±0.11)%、须根(3.65±0.05)%和茎(2.96±0.29)%中的黄酮含量达到最高值,而生境 B 和 A 分别在柔毛淫羊藿主根(2.29±0.08)%和须根(1.86±0.03)%的黄酮含量中为最低值;在茎的黄酮含量中,生境 B 和 C 分别为(2.08±0.01)%和(1.60±0.06)% ,两者无显著差异($P > 0.05$)。

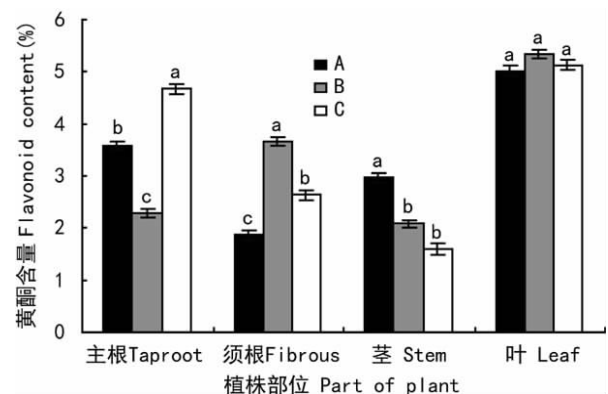


图 3 不同生境中柔毛淫羊藿黄酮含量的差异

Fig. 3 Difference of flavonoid content of *E. pubescens* in different habitats

3.5 不同生境中柔毛淫羊藿淫羊藿苷的含量

在不同生境中淫羊藿苷含量的差异极其显著($P < 0.01$)(图 4)。生境 B 和 C 中,主根和须根的淫羊藿苷含量无显著差异($P > 0.05$),在生境 A 中主根和须根的淫羊藿苷的含量均显著低于生境 B 和 C($P < 0.01$)。茎中的淫羊藿苷含量在 A(0.11±0.01)%和 B(0.12±0.05)%生境中无显著差异($P > 0.05$),且 A 和 B 生境的淫羊藿苷的含量显著高于 C 生境(0.08±0.01%)($P < 0.01$)。3 个生境中淫羊藿苷含量为 B>C>A,分别为(0.78±

0.02)%, (0.73±0.03)%和(0.55±0.01)%。

4 结论与讨论

本研究结果表明,在相对光照强度较低的 A 生境中,其形态参数和植株各个部位的生物量均要低于光照强度相对较强的生境 B 和 C,这与杨利民等(2007)的研究结果一致,即随着生境光照强度的降低,朝鲜淫羊藿种群密度和产量水平在下降,个体变小。但在 3 个生境中叶长宽比的差异并不显著,说明在不同生境中的整体叶形是基本一致的,此结果同权秋梅等(2008)的研究结果一致。

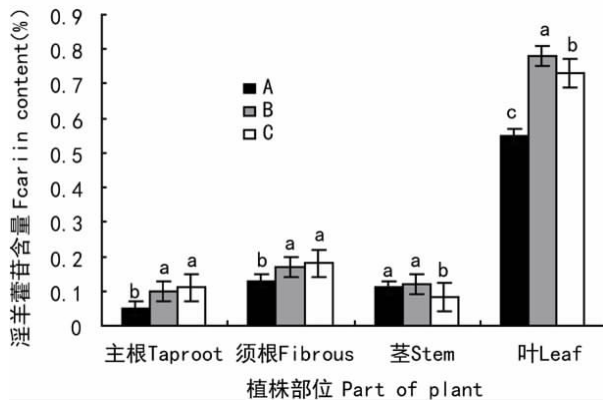


图 4 不同生境中柔毛淫羊藿的淫羊藿苷含量差异
Fig. 4 Difference of icariin content of *E. pubescens* in different habitats

淫羊藿属植物叶片的总黄酮及淫羊藿苷含量均表现出强光区高于弱光区,说明适宜光照可能有利于黄酮类成分的积累(董然等,2003;秦佳梅等,2006;张崇禧等,2009)。在本研究中,三个生境的柔毛淫羊藿叶片的有效成分变化也有一致的变化趋势,即淫羊藿总黄酮虽然没有显著差异,但是数值上却是光照强度较高的生境 B 和 C 要大于光照较低的生境 A;而淫羊藿苷含量为光照强度较高生境 B 和 C 显著高于光照较低生境 A。

根据《中国药典》的标准,淫羊藿的黄酮含量不得少于 5%,淫羊藿苷的含量不得少于 0.5%。在不同生境中柔毛淫羊藿叶片的黄酮和淫羊藿苷含量都能达到用药标准,其余的部位则不能达到用药标准。而对于淫羊藿属植物不同部位的有效成分含量一直为叶>根>茎和根>叶>茎,本研究表明柔毛淫羊藿黄酮含量为叶>根>茎,与陈惠玲等(2000)研究中的箭叶淫羊藿和粗毛淫羊藿结果一致,但与郭宝

林(1996)研究结果不一致;而柔毛淫羊藿淫羊藿苷含量为叶>根>茎,与贾敏鸽等(2005)研究结果一致。说明不同淫羊藿物种中有效成分在各个植株部位含量具有差异,在以后的研究中更需要对整个属的植物进行系统研究。

参考文献:

- 国家药典委员会. 2005. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社:229-232
- Chen HL(陈惠玲), Wu ZY(吴珍云), Wei SH(魏升华), et al. 2000. Total flavonoids in different parts of the content determination and utilization of resources about three kinds of *Epimedium* in Guizhou(三种黔产淫羊藿不同部位总黄酮的含量测定及资源利用)[J]. *J Guiyang Coll Trad Chin Med*(贵阳中医学院学报), 22(4):57-59
- Dong R(董然), Feng YC(冯玉才), Qin JM(秦佳梅), et al. 2003. Comparative analysis of effective composition content of *Epimedium koreanum* in different growing areas of Changbai Mountains(长白山区不同产地朝鲜淫羊藿有效成分含量对比分析)[J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*(特产研究), (2):35
- Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根). 1996. Determination of flavonoids in different parts of five *Epimedium* plants(5种淫羊藿的不同部位的黄酮类成分分析)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药志), 21(9):523-526
- Hou JR(侯集瑞), Sheng JM(盛吉明), Wang XQ(王秀全), et al. 2004. Advances in studies on Herba *Epimedium*(淫羊藿研究进展)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 26(1):59-65
- Jia MG(贾敏鸽), Sun WJ(孙文基), Zhu ZD(朱朝德), et al. 2005. RP-HPLC determination of rouhuoside and icariin in Herba *Epimedium* of different species and part used(RIP-HPLC测定淫羊藿不同品种和部位中柔藿苷和淫羊藿苷)[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 25(1):64-68
- Qin JM(秦佳梅), Dong R(董然), Zhang WD(张卫东). 2006. Component analysis of *Epimedium koreanum* herb grown in different environment(不同生境朝鲜淫羊藿有效成分分析)[J]. *Jiangsu J Trad Chin Med*(江西中医药), 27(5):50-51
- Quan QM(权秋梅), Li YX(黎云祥). 2008. Effects of population density on morphological characteristics of *Epimedium sagittatum* in different growth periods(密度制约作用对箭叶淫羊藿有性繁殖时期形态特征的影响)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 28(1):85-89
- Xu X(胥晓), Su ZX(苏智先), Li YX(黎云祥). 1999. Analysis on fuzzy mathematics of forest communities at Jincheng Mountain in Nanchong region in Jialing River(嘉陵江流域南充金城山森林群落的模糊数学分析)[J]. *J Sichuan Teachers Coll: Nat Sci Edit*(四川师范学院学报·自然科学版), 20(2):182-189
- Yang LM(杨利民), Han M(韩梅), Wu JS(吴劲松), et al. 2007. Population biomass and renewal potential of *Epimedium koreanum* in different habitats, Linjiang, Northeast China(朝鲜淫羊藿不同生境种群生物量与更新潜力)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 27(6):2251-2258
- Yang ZS(杨子松), Li YX(黎云祥), Qian BY(钱宝英), et al. (下转第 325 页 Continue on page 325)



图 1 1-7. 毛瓣牛眼睛 1. 花枝; 2. 花, 除去花被, 示雄蕊; 3. 除去花被片及雄蕊, 示雌蕊和腺体; 4. 萼片; 5. 具腺体萼片; 6. 花瓣; 7. 具腺体花瓣。

Fig. 1 1-7. *Capparis zeylanica* L. var. *pubipetala* S. Y. Liu, X. Q. Ning et Y. F. Tan 1. Flowering branch; 2. Flower, showing stamens; 3. Pistil and gland; 4. Sepal; 5. Sepal with a gland; 6. Petal; 7. Petal with a gland.

参考文献:

广西科学院广西植物研究所编辑委员会. 1964. 广西植物志 [M]. 南宁:广西科技出版社, 1:421
中国科学院中国植物志编辑委员会. 1999. 中国植物志 [M].

北京:科学技术出版社, 32:504-505

陈封怀. 1987. 广东植物志 [M]. 广州:广东科技出版社, 1:68
陈焕镛. 1964. 海南植物志 [M]. 北京:科技出版社, 1:350
覃海宁, 刘演. 2010. 广西植物名录 [M]. 北京:科技出版社

(上接第 354 页 Continue from page 354)

2008. A research of Herba *Epimedii*(淫羊藿属植物研究)[J]. *J Southwest Univ Nat: Nat Sci Edit* (西南民族大学学报·自然科学版), 34(4):716-724
Zhang CX(张崇禧), Ma XJ(马晓静), Zhang YY(张莹莹), et al. 2009. Study of the best harvest time of *Epimedium koreanum* (朝鲜淫羊藿最佳采收期的研究)[J]. *Chin Trad Pat Med*(中

成药), 31(4):576-579

Zhao G(赵刚), Quan QM(权秋梅), Li YX(黎云祥), et al. 2011. Research on biomass and reproductive allocation of *Epimedium pubescens*(柔毛淫羊藿生物量与生殖配置研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 31(1):81-86