

巫山淫羊藿饮片 HPLC 特征图谱研究及朝藿定 C 的定量分析

朱砂, 梁晋如, 何姣, 孙文基*

(西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069)

摘要 目的:建立巫山淫羊藿饮片中朝藿定 C 的含量测定方法及巫山淫羊藿饮片的 HPLC 特征图谱。方法:采用 HPLC 法对 20 批巫山淫羊藿饮片进行特征图谱研究,建立 HPLC 特征图谱共有模式,进行相似度比较,并将巫山淫羊藿饮片与淫羊藿饮片进行相似度比对。色谱条件:采用 Welchrom C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 25 °C。结果:朝藿定 C 进样量在 0.0996 ~ 4.980 μg (r = 0.9996) 范围内线性关系良好,巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品中的平均加样回收率 (n = 6) 分别为 100.7% (RSD = 0.64%) 和 99.78% (RSD = 1.5%);建立了巫山淫羊藿的 HPLC 特征图谱,确定了 5 个共有峰,巫山淫羊藿饮片生品和羊油炙品的平均相似度为 0.91;巫山淫羊藿饮片与淫羊藿饮片的平均相似度为 0.84,二者特征图谱差异明显。结论:巫山淫羊藿饮片和淫羊藿饮片特征图谱差异明显,可以作为饮片辨识和鉴别的参考方法。且该方法简便、准确,专属性强,为 2010 年版中国药典一部增订巫山淫羊藿饮片含量测定项进行了研究。

关键词: 饮片; 淫羊藿; 朝藿定 C; 高效液相色谱; 特征图谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)08-1500-06

Determination of epimedin C and study on HPLC specific chromatogram of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying

ZHU Sha, LIANG Jin - ru, HE Jiao, SUN Wen - ji*

(Biology and Medicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of epimedin C and the HPLC specific chromatogram of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying. **Methods:** HPLC was applied to establish the specific chromatogram of 20 batches of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying, and the similarity of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying and *Epimedium brevicornum* Maxim. was contrasted. Welchrom C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted and a mixture liquid of acetonitrile - water solution as mobile phase in a gradient elution, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was at 270 nm and the column temperature at 25 °C. **Results:** The linear range of epimedin C was 0.9996 - 4.980 μg (r = 0.9996), the average recoveries of cut crude drug processed and cut crude drug processed with oil of *Epimedium wushanense* T. S. Ying were 99.78% (RSD = 1.5%) and 100.7% (RSD = 0.64%), respectively; The method provided specific chromatogram with excellent separation and 5 common peaks were confirmed, the similarity of cut crude drug processed and cut crude drug processed with oil of *Epimedium wushanense* T. S. Ying was 0.91, the similarity of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying and decoction pieces of *Epimedium brevicornum* Maxim. was 0.84, significant difference was observed between them. **Conclusion:** The specific chromatogram of decoction pieces of *Epimedium wushanense* T. S. Ying and decoction pieces of *Epimedium brevicornum* Maxim. have significant difference which can be used as reference method in identification. The method is simple, accurate, creditable and provides a reference for the quality control.

Key words: decoction pieces; epimedium herb; epimedin C; HPLC; specific chromatogram

* 通讯作者 Tel: (029) 88304569; E-mail: cxbml@nwwu.edu.cn

巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 为小檗科淫羊藿属植物,主产于陕西、四川、贵州等地,系中国药典 1990 年版至 2005 年版收载的淫羊藿药材的植物来源之一^[1]。淫羊藿药材 4 个来源种箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、淫羊藿 *E. brevicornum* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 和柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 中的主要成分淫羊藿苷和宝藿苷 I 适合作为含量测定的指标成分。而巫山淫羊藿中的主要有效成分为朝藿定 C,若以淫羊藿苷和宝藿苷 I 为含量测定成分则不合格,故中国药典 2010 年版将巫山淫羊藿单列,并对其重新制定了标准,以朝藿定 C 为含量测定的指标成分^[1]。巫山淫羊藿饮片有 2 种制法,一种为巫山淫羊藿药材除去杂质,喷淋清水,稍润切丝,干燥即得生品 (cut crude drug processed); 另一种为取羊脂油加热融化,加入巫山淫羊藿丝,用文火炒至均匀有光泽取出,放凉即得羊油炙品 (cut crude drug processed with oil)。巫山淫羊藿与淫羊藿特征相似,饮片外观上不易鉴别,如若制成饮片则更加难以区别,参考前人对巫山淫羊藿药材特征图谱的研究情况,本文对巫山淫羊藿饮片的特征图谱进行研究,建立巫山淫羊藿饮片的特征图谱,同时用 HPLC 法测定巫山淫羊藿饮片中朝藿定 C 的含量,以达到既有特征图谱又有含量测定的目的^[2,3]。为巫山淫羊藿饮片的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695 - 2487 高效液相色谱仪,包括 Waters 2695 Separations Module, Waters 2487 DualAbsorbanceDetector, Empower 工作站。BP211D 型精密电子天平 (德国 Sartorius 公司)。HAMILTON 自动进样器 (HAMILTON 公司); 0.45 μm 微孔滤膜 (天津市色谱科学技术公司); YCQ - 300 型超声波清洗器 (上海凯波超声设备有限公司)。

朝藿定 C 对照品为本实验室自行分离精制,经 UV、IR、FAB - MS、¹H - NMR、¹³C - NMR 鉴定结构,并通过 HPLC - MS 检测纯度 > 98%。乙腈 (HPLC 级,天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲醇 (HPLC 级,天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙醇 (分析纯,天津市协和昊鹏色谱科技有限公司); 水为双蒸水并经 0.45 μm 水系滤膜过滤。

巫山淫羊藿饮片包括生品和羊油炙品,购自药

材市场,低温烘干,粉碎后过 40 目筛,保存,备用。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 取朝藿定 C 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.0996 mg 的对照品溶液,即得^[4]。

2.2 供试品溶液 取样品粉末 (过 40 目筛) 约 0.2 g,精密称定,置于具塞的锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL,称定重量,超声处理 (300 W, 25 kHz) 30 min,放置至室温,再称定重量,用 70% 乙醇补至原重量,摇匀,滤过,即得^[4]。

3 色谱条件

色谱柱: WELCHROM - C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 柱,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 30% A $\rightarrow$ 27% A; 5 ~ 25 min, 27% A; 25 ~ 30 min, 30% A), 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 270 nm; 进样量 10 μL 。在上述色谱条件下,朝藿定 C 能够与其他成分达到基线分离^[4]。对照品及样品色谱图见图 1 - A、B、C。

4 巫山淫羊藿饮片特征图谱的建立

4.1 稳定性试验 精密称取巫山淫羊藿饮片的羊油炙品和生品粉末,按“2.2”项下的方法制备供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样 20 μL ,进行检测,记录色谱图。结果表明,各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均在 1.6% 以内,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

4.2 精密度试验 分别精密称取巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品粉末,按“2.2”项下的方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图。考察各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果各特征峰的相对保留时间和其相对峰面积的 RSD 均在 2.0% 以内,表明测定仪器的精密度良好。

4.3 重复性试验 精密称取同一份巫山淫羊藿饮片 6 份,按“2.2”项下的方法制备供试品溶液,进行测定,记录色谱图。考察各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果表明各特征峰的相对保留时间和其相对峰面积的 RSD 均在 0.7% 以内,说明试验方法的重复性良好。

4.4 样品分析

4.4.1 特征图谱共有峰的确定 分别取羊油炙品和生品的样品各 10 批,按“2.2”项下方法操作,制备所需溶液,在上述色谱条件下各取 10 μL 进样,得到各 10 批 HPLC 色谱图。根据上述共 20 批巫山淫

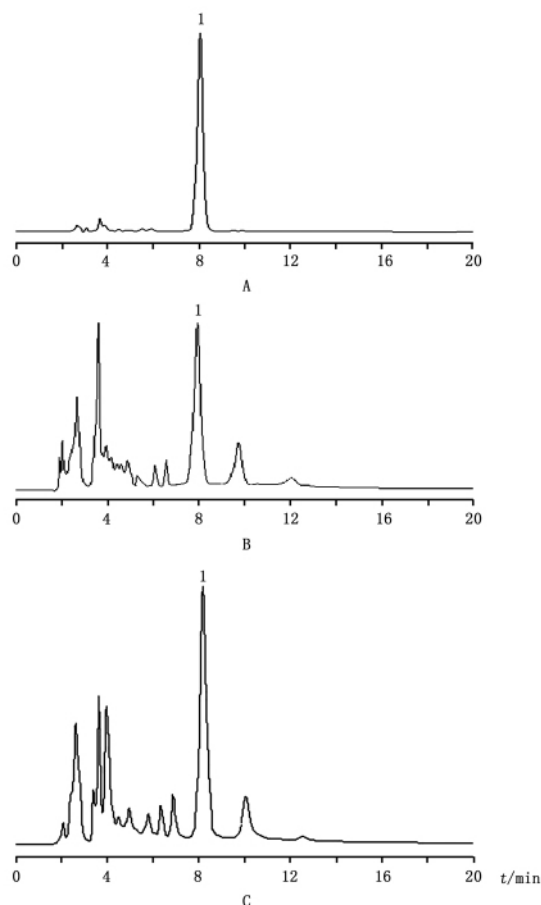


图1 对照品(A)、巫山淫羊藿饮片羊油炙品(B)及巫山淫羊藿饮片生品(C)的HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), cut crude drug processed with oil of *E. wushanense*(B), and cut crude drug processed of *E. wushanense*(C)

1. 朝藿定 C(epimedin C)

羊藿饮片的检测结果进行分析,选择稳定性较好,吸收强,特征明显的色谱峰为共有峰,共标定5个峰,见图2~4。其中羊油炙品图谱中3号峰为朝藿定C。因3号峰朝藿定C为有效成分峰,与前后峰的分度度 >1.5 ,特征鲜明,因此选其为参照峰,各共有峰相对保留时间及相对峰面积见表1、表2,而生品图谱中4号峰为朝藿定C。因4号峰为特征成分峰且分离度较好,因此选其为参照峰,各共有峰相对保留时间及相对峰面积见表1、表2。又取淫羊藿饮片样品10批,按“2.2”项下方法操作,制备所需溶液,在上述色谱条件下各取 $10\mu\text{L}$ 进样,得到10批

HPLC 色谱图。与巫山淫羊藿样品共30份样品进行分析,选择稳定性好,吸收强,特征明显的色谱峰为共有峰,共标定4个峰,见图5。

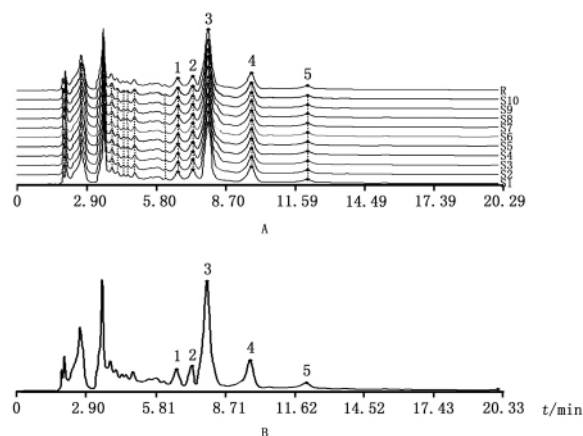


图2 10批巫山淫羊藿饮片羊油炙品HPLC特征图谱(A)及特征峰(B)色谱图

Fig 2 HPLC specific chromatograms for 10 batches(A) and chromatogram for specific peaks(B) of cut crude drug processed with oil of *E. wushanense*

3. 朝藿定 C(epimedin C)

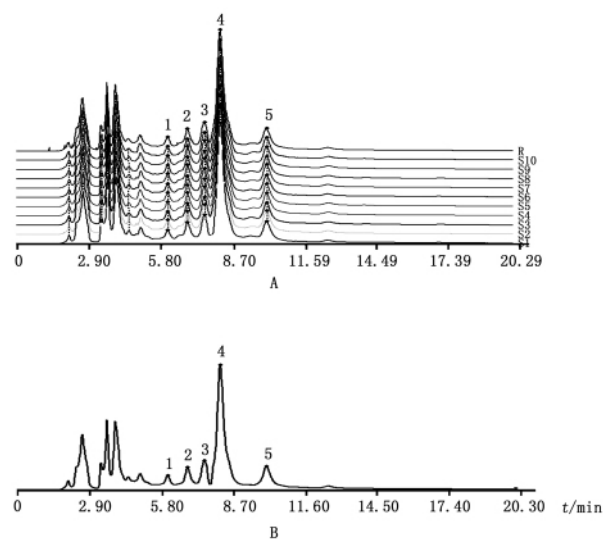


图3 10批巫山淫羊藿饮片生品HPLC特征图谱(A)及特征峰(B)色谱图

Fig 3 HPLC specific chromatograms for 10 batches(A) and of chromatogram for specific peaks(B) of cut crude drug processed of *E. wushanense*

4. 朝藿定 C(epimedin C)

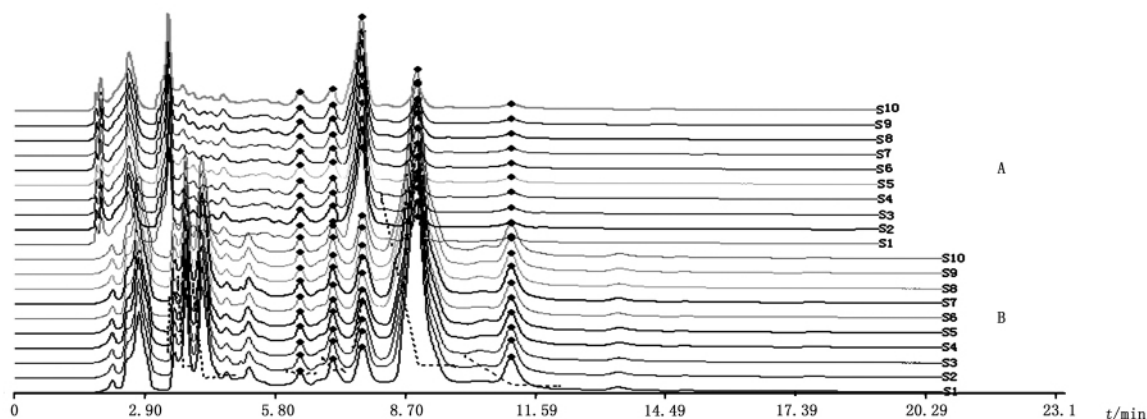


图4 巫山淫羊藿饮片羊油炙品(A) 和生品(B) HPLC 特征色谱

Fig 4 HPLC specific chromatograms of cut crude drug processed with oil(A) and cut crude drug processed(B) of *E. wushanense*

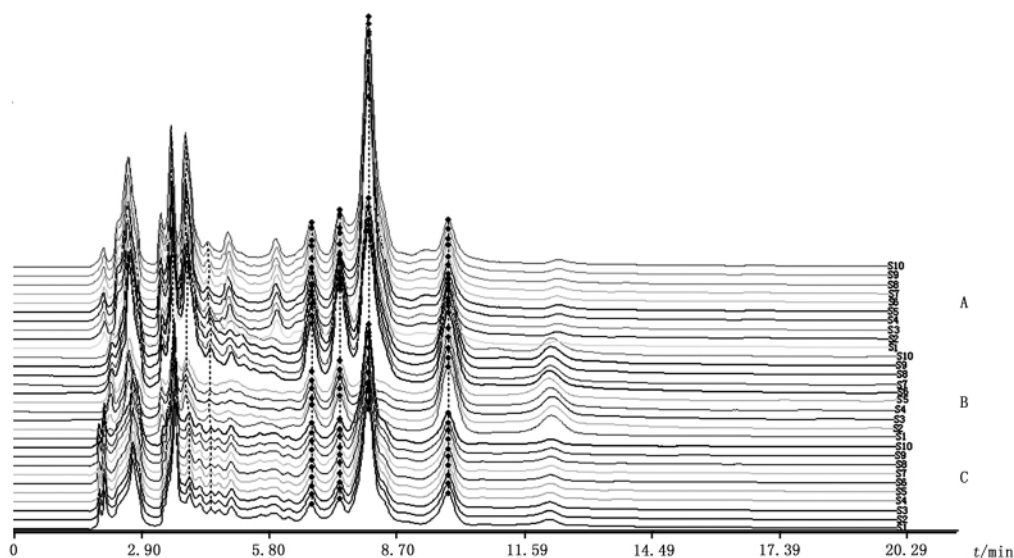


图5 巫山淫羊藿饮片羊油炙品(A)、生品(B)与淫羊藿饮片(C) HPLC 特征色谱

Fig 5 HPLC specific chromatograms of cut crude drug processed with oil of *E. wushanense* T. S. Ying(A), cut crude drug processed of *E. wushanense* T. S. Ying(B), and decoction pieces of *E. brevicornum* Maxim. (C)

4.4.2 相似度评价 特征图谱相似度评价采用国家药典委员会开发的《中药色谱特征图谱相似度评价系统研究版(2004A)》^[9],对巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品各10批进行相似度评价。对羊油炙品和生品做了相似度比较,20批样品的相似度为0.883,0.878,0.876,0.878,0.874,0.871,0.869,0.87,0.87,0.866,0.964,0.962,0.966,0.958,0.96,平均相似度为0.91(RSD=5.0%)。又将巫山淫羊藿生品和羊油炙品与淫羊藿饮片做了相似度比较,30批样品的相似度为0.883,0.879,0.874,0.877,0.872,0.869,0.866,0.867,0.867,0.863,0.634,0.578,0.574,

0.483,0.61,0.883,0.85,0.877,0.893,0.864,0.926,0.921,0.929,0.919,0.922,0.926,0.921,0.929,0.919,0.922,平均相似度为0.84(RSD=14.8%)。

5 巫山淫羊藿饮片中朝藿定C的定量分析

5.1 线性考察 精密吸取上述对照品溶液依次进样1,5,10,20,30,40,50 μL ,按色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值Y为纵坐标,以对照品进样量X为横坐标,进行线性回归,得朝藿定C线性回归方程为:

$$Y = 9.326 \times 10^5 X + 6.956 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

结果表明朝藿定C进样量在0.0996~4.980 μg 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

表 1 相对保留时间
Tab 1 Relative retention time

样品 (sample)	批次号 (batch No.)	峰号(peak No.)				
		1	2	3	4	5
羊油炙品(cut crude drug processed with oil)	1	0. 841	0. 922	1. 000	1. 226	1. 237
	2	0. 841	0. 920	1. 000	1. 227	1. 237
	3	0. 841	0. 921	1. 000	1. 226	1. 238
	4	0. 840	0. 920	1. 000	1. 227	1. 237
	5	0. 841	0. 919	1. 000	1. 227	1. 238
	6	0. 841	0. 921	1. 000	1. 226	1. 238
	7	0. 841	0. 920	1. 000	1. 227	1. 239
	8	0. 841	0. 919	1. 000	1. 226	1. 240
	9	0. 841	0. 920	1. 000	1. 227	1. 240
	10	0. 840	0. 919	1. 000	1. 227	1. 239
	均值 (mean)	0. 841	0. 920	1. 000	1. 227	1. 238
生品(cut crude drug processed)	1	0. 739	0. 841	0. 922	1. 000	1. 228
	2	0. 741	0. 838	0. 922	1. 000	1. 229
	3	0. 738	0. 841	0. 922	1. 000	1. 229
	4	0. 741	0. 838	0. 922	1. 000	1. 228
	5	0. 743	0. 838	0. 923	1. 000	1. 228
	6	0. 740	0. 839	0. 920	1. 000	1. 227
	7	0. 742	0. 836	0. 922	1. 000	1. 227
	8	0. 740	0. 838	0. 921	1. 000	1. 228
	9	0. 742	0. 844	0. 925	1. 000	1. 232
	10	0. 744	0. 839	0. 925	1. 000	1. 229
	均值 (mean)	0. 741	0. 839	0. 922	1. 000	1. 229

5.2 定量限和检测限 稀释对照品溶液,进样测定,确定朝藿定 C 的检测限($S/N = 3:1$) 和定量限($S/N = 10:1$) 分别为 19 ng 和 60 ng。

5.2 精密度试验 取浓度为 0. 0996 mg · mL⁻¹ 的朝藿定 C 对照品溶液,连续进样测定 6 次,求得峰面积的 RSD 为 0. 47%。

5.3 重复性试验 称取粉碎至 40 目的样品粉末 0. 2 g 共 6 份,按“2. 2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,按回归方程计算朝藿定 C 含量。结果巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品中朝藿定 C 含量平

表 2 相对峰面积
Tab 2 Relative peaks areas

样品 (sample)	批次号 (batch No.)	峰号(peak No.)				
		1	2	3	4	5
羊油炙品(cut crude drug processed with oil)	1	0. 100	0. 139	1. 000	0. 267	0. 032
	2	0. 133	0. 157	1. 000	0. 261	0. 033
	3	0. 102	0. 136	1. 000	0. 266	0. 034
	4	0. 107	0. 137	1. 000	0. 266	0. 033
	5	0. 105	0. 136	1. 000	0. 267	0. 030
	6	0. 104	0. 132	1. 000	0. 268	0. 030
	7	0. 107	0. 132	1. 000	0. 270	0. 029
	8	0. 104	0. 133	1. 000	0. 266	0. 030
	9	0. 104	0. 131	1. 000	0. 264	0. 027
	10	0. 104	0. 130	1. 000	0. 271	0. 028
	均值 (mean)	0. 107	0. 136	1. 000	0. 267	0. 031
生品(cut crude drug processed)	1	0. 041	0. 113	0. 150	1. 000	0. 147
	2	0. 041	0. 102	0. 165	1. 000	0. 128
	3	0. 039	0. 116	0. 159	1. 000	0. 149
	4	0. 042	0. 116	0. 175	1. 000	0. 142
	5	0. 040	0. 101	0. 172	1. 000	0. 133
	6	0. 039	0. 116	0. 159	1. 000	0. 150
	7	0. 041	0. 107	0. 171	1. 000	0. 140
	8	0. 041	0. 114	0. 166	1. 000	0. 130
	9	0. 042	0. 115	0. 171	1. 000	0. 134
	10	0. 039	0. 099	0. 151	1. 000	0. 149
	均值 (mean)	0. 041	0. 110	0. 164	1. 000	0. 140

均值($n = 6$) 分别为 2. 12% 和 2. 61% ,RSD 分别为 0. 69% 和 0. 35% 。

5.4 加样回收率 取已知含量的巫山淫羊藿饮片羊油炙品和的生品样品各 6 份,每份 0. 1 g,各加入同一浓度 0. 0996 mg · mL⁻¹ 的朝藿定 C 对照品溶液 2 mL,在上述色谱条件下,注入高效液相色谱仪测定,计算巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品中朝藿定 C 平均回收率($n = 6$) 分别为 100. 7% 和 99. 78% , RSD 分别为 0. 64% 和 1. 5% 。

6 样品测定

将 20 批巫山淫羊藿饮片(羊油炙品和生品各 10 批) 按“2. 2”项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下,进样测定,根据回归方程计算其在巫山淫羊藿中的含量,结果见表 3。

表3 不同批次样品中朝藿定 C 的含量测定结果 (%)

Tab 3 Determination results of epimedin C in different batches

批次号 (batch No.)	羊油炙品(cut crude drug processed with oil)	生品(cut crude drug processed)
1	2.24	2.76
2	2.37	2.84
3	2.23	2.96
4	2.27	2.78
5	2.30	2.84
6	2.20	2.69
7	2.23	2.72
8	2.30	2.82
9	2.21	2.91
10	2.20	2.70

7 讨论

7.1 含量差异讨论 本文测定了 20 批巫山淫羊藿饮片中朝藿定 C 的含量,并对其建立特征图谱。由测定结果及叠加后的色谱图可知,此 20 批样品中 2 种制法羊油炙品和生品的饮片含量差异比较明显,原因为炙品中加入羊脂油(100:20),油脂占一定重量。

7.2 含量限度的确立 因 2010 年版中国药典规定巫山淫羊藿药材中朝藿定 C 含量限定不少于 1.0%^[1],并且综合上述测定结果考虑,本饮片生品按干燥品计算含朝藿定 C($C_{39}H_{50}O_{17}$) 不得少于 1.0%,而羊油炙品按干燥品计算含朝藿定 C($C_{39}H_{50}O_{17}$) 的含量限度暂定为不得少于 0.8%。已列入 2010 年版中国药典增补本。

7.3 特征图谱的讨论 因市场上无论是巫山淫羊藿还是淫羊藿多为饮片,在外观上比较难以鉴别和辨别,故对巫山淫羊藿饮片羊油炙品和生品的特征图谱进行比较,与此同时,对巫山淫羊藿饮片和淫羊藿饮片的特征图谱进行比较,得出结论,巫山淫羊藿

饮片的生品和羊油炙品的平均相似度为 0.91。而巫山淫羊藿饮片与淫羊藿饮片的平均相似度为 0.84,二者相差都明显,可以作为饮片和药材辨识和鉴别的参考依据。

7.4 小结

7.4.1 含量测定 目前关于巫山淫羊藿饮片的含量测定已有一些报道,但 2010 年版中国药典中还未收载其含量测定方法,本实验的结果已充分证明以朝藿定 C 作为巫山淫羊藿饮片含量测定的指标具有实际意义。并且采用 HPLC 法同时测定巫山淫羊藿饮片中朝藿定 C 的含量,经过精密度、加样回收率试验等方法学考察,均符合要求,该方法灵敏、快速、准确。且我们已完成中国药典 2010 年版增补本有关巫山淫羊藿饮片含量的测定项。

7.4.2 特征图谱 通过特征图谱的建立,可以控制巫山淫羊藿饮片的内在质量,可以鉴别巫山淫羊藿饮片中的两类,即羊油炙品和生品的显著差异,也可以在外观相似不易鉴别的情况下明显区别巫山淫羊藿饮片与其他种类淫羊藿饮片,为巫山淫羊藿饮片的内在质量提供可靠的参考依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 155
- 2 XIE Juan - ping(谢娟平), SUN Wen - ji(孙文基), XIE Bin(谢斌). HPLC determination of epimedin C and primary investigation on specific chromatogram of *Epimedium wushanense* T. S. Ying(巫山淫羊藿中朝藿定 C 的含量测定及特征图谱初步研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志). 2009,29(8): 1316
- 3 XIE Juan - ping(谢娟平), XU Dao - bao(胥道宝), SUN Wen - ji(孙文基). RP - HPLC determination four components in *E. wushanense* T. S. Ying(RP - HPLC 法测定巫山淫羊藿中 4 种成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007,27(3): 437
- 4 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委). Similarity Evaluation System for Specific Chromatograms of TCM (Version 2004 A) (中药色谱特征图谱相似度评价系统的操作规范 版本 2004 A)

(本文于 2011 年 5 月 19 日修改回)