

HPLC同时测定 21种淫羊藿中朝藿定 C和淫羊藿苷的含量^{*}

李晓龙^{1,2}, 刘虹宇^{1,2}, 曹佩雪¹, 潘卫东¹, 孙超³, 梁光义^{1,2*}

(1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002 2 贵阳中医学院, 贵阳 550002 3 贵州省植物园, 贵阳 550000)

摘要 目的: 建立同时测定淫羊藿药材中朝藿定 C和淫羊藿苷含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Elite SinoChrom ODS-AP(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~8 min, 27% A; 8~30 min, 27% A→29% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm。结果: 朝藿定 C进样量在 0.130~3.89 μg 淫羊藿苷在 0.0294~1.47 μg 范围内呈良好线性关系($r=0.9999$); 朝藿定 C和淫羊藿苷平均回收率($n=9$)分别为 103.9%, 100.0%; 淫羊藿药材中朝藿定 C和淫羊藿苷的含量分别为 0.02%~7.80%, 0.01%~1.74%。结论: 该方法简便、快速、准确, 重复性好, 可作为淫羊藿药材中朝藿定 C和淫羊藿苷的含量测定方法。

关键词: 高效液相色谱; 淫羊藿; 朝藿定 C; 淫羊藿苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0931-04

HPLC simultaneous determination of epimedin C and icariin in 21 species of *Epimedium*^{*}

LIXiao-long^{1,2}, LU Hong-yu^{1,2}, CAO Pei-xue¹, PAN Wei-dong¹,
SUN Chao³, LIANG Guang-yi^{1,2**}

(1. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences Guiyang 550002, China 2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China 3. Guizhou Botanical Garden, Guiyang 550000, China)

Abstract **Objective** To develop an HPLC method for simultaneous determination of epimedin C and icariin in 21 species of *Epimedium*. **Methods** The samples were separated on Elite SinoChrom ODS-AP column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile(A)-water(B) (0~8 min, 27% A; 8~30 min, 27% A→29% A) as the mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 270 nm. **Results** The linear ranges of epimedin C and icariin were 0.130~3.89 μg($r=0.9999$), 0.0294~1.47 μg($r=0.9999$) respectively. The average recoveries($n=9$) of epimedin C and icariin were 103.9%, 100.0% respectively. The contents of epimedin C and icariin were 0.02%~7.80%, 0.01%~1.74% respectively. **Conclusion** This method is simple, quick, sensitive, reliable and reproducible. It is the best choice for the determination of epimedin C and icariin in *Epimedium*.

Key words HPLC; *Epimedium*; epimedin C; icariin

淫羊藿(Herba Epimedii)具有益精气, 坚筋骨, 补腰膝, 强心力之功效。迄今已经报道的淫羊藿属植物约 50 种^[1], 2010 年版药典收载 4 种^[2], 贵州约 10 多种, 是全国淫羊藿药材产量最大的地区。淫羊藿总黄酮的主要有效成分为淫羊藿苷和朝藿定 C^[3~5], 但目前淫羊藿药材以淫羊藿苷为指标对其进行质量评估^[2]。多数淫羊藿药材中朝藿

定 C 含量较高, 而淫羊藿苷的含量较低^[6,7]。仅以淫羊藿苷为质量控制指标, 导致一大批朝藿定 C 含量高的淫羊藿药材得不到有效的利用。本文以淫羊藿苷、朝藿定 C 为双检测指标, 建立一种更合理、更全面、更准确评价淫羊藿药材的方法, 通过该方法对全国范围内的 21 种(含贵州十品种)淫羊藿药材进行了淫羊藿苷及朝藿定 C 的含量测

* 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项, 黔科合社字[2008] 5029号

** 通讯作者 Tel: (0851)5652109 E-mail: guangyi_liang@21.cn.com

定, 对全国范围的淫羊藿药材的黄酮类成分进行初步评估, 从整体上把握贵州淫羊藿的黄酮类成分分布的特点。根据含测结果为贵州产主流淫羊藿药材的质量评价以及扩大合格淫羊藿药材的资源提供科学依据, 并对含淫羊藿药材的中成药的质量控制具有一定的参考价值。

1 仪器与试药

1.1 仪器 HP1100型高效液相色谱仪(在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、VWD 检测器, ChemStation 色谱工作站), KQ-300DA 型超声波清洗器(250W, 40 kHz 昆山市超声仪器有限公司)。METTLE TOLEDO AG285 电子分析天平。

1.2 试药 朝藿定 C 对照品自制并鉴定结构, 经 HPLC 检测纯度大于 98%, 该对照品已申请专利(200610201222)并报中国药品生物制品检定所审核。淫羊藿苷, 批号 110737-200312 购于中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯, 水为乐百氏纯净水, 其他试剂均为分析纯。淫羊藿样品由中国医学科学院协和医科大学药用植物研究所提供并经郭宝林教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品朝藿定 C 和淫羊藿苷, 加适量 70% 乙醇制成浓度分别为 $1.296 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.470 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 淫羊藿样品粉末过 60 目筛, 80 °C 常压干燥 3 h 精密称取 0.2 g 分别置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加 70% 乙醇 20 mL, 超声提取(250W, 40 kHz) 1 h 取出, 放冷, 加 70% 乙醇补足减失重量, 摇匀, 经微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: 大连依利特分析仪器有限公司 SinoChrom ODS-AP(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 柱温: 25 °C; 流动相: 乙腈(A) - 水(B), 梯度洗脱(0~8 min 27% A; 8~30 min 27% $\rightarrow$ 29% A); 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 270 nm; 进样量: 10 μL 。在该色谱条件下的对照品和样品色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸“2.1”项下的朝藿定 C 对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0 mL 和淫羊藿苷的对照品溶液 0.2, 0.4, 1.0 mL, 分别置 1 号、2 号、3 号 10 mL 量瓶中, 再从 1 号瓶中取 1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL 置于 4 号、5 号、6 号 10 mL 量瓶中, 并加 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀。精密吸取上述

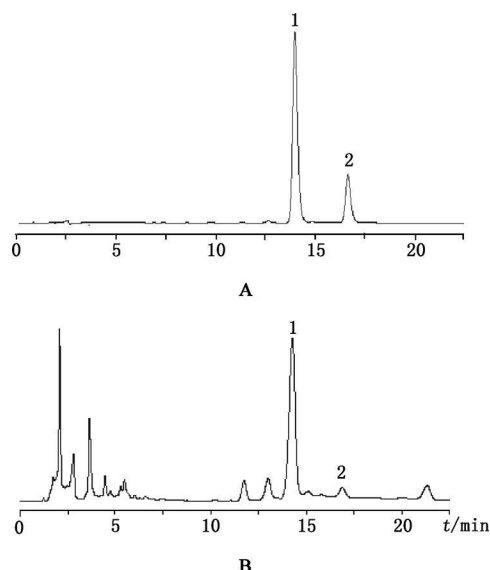


图 1 对照品(A)和粗毛淫羊藿样品(B)

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and *Epimedium Franch* sample(B)

1. 朝藿定 C(epimedin C) 2. 淫羊藿苷(icarin)

1~6号瓶中的 6 种混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按“2.3”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(Y)为纵坐标、对照品的量(X)为横坐标, 绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 2 种黄酮类成分的回归方程与线性范围($n=6$)

Tab 1 Regression equations and linear ranges for the two flavonoids

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range) / μg
朝藿定 C (epimedin C)	$Y = 2.001 \times 10^3 X - 12.38$	0.9999	0.130 ~ 3.89
淫羊藿苷 (icarin)	$Y = 2.092 \times 10^3 X - 2.097$	0.9999	0.0294 ~ 1.47

2.5 精密度考察 分别精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算朝藿定 C 和淫羊藿苷 RSD 值分别为 0.43% 和 0.49%。结果表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 精密吸取 10 μL , 分别于 0, 6, 8, 12, 14 h 注入高效液相色谱仪后测定峰面积, 计算 RSD, 分别为朝藿定 C 的 0.91%, 淫羊藿苷 1.05%, 结果表明, 对照品溶液中朝藿定 C 和淫羊藿苷在 14 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一粗毛淫羊藿药材干燥样

品,按“2.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液,在“2.3”色谱条件下测定。淫羊藿药材中朝藿定 C 和淫羊藿苷的平均含量分别为 0.931%, 0.153%; RSD 分别为 0.15%, 0.29%。结果表明该方法重现性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已测定含量的粗毛淫羊藿样品(朝藿定 C 含量为 0.931%,淫羊藿苷含量为 0.153%) 0.1 g 置锥形瓶中,分别按 80%, 100%, 120% 的比例加入已知浓度的对照品溶液(分别加入 0.972 mg· mL⁻¹的朝藿定 C 对照品溶液 0.8 1.0 1.2 mL 和 0.136 mg· mL⁻¹的淫羊藿苷对照品溶液 0.9, 1.1, 1.3 mL),每一质量浓度的溶液按“2.2”项下方法制备 3 份,进样测定,回收率结果见表 2。

表 2 粗毛淫羊藿中朝藿定 C 和淫羊藿苷的回收率 (n= 3)

Tab 2 Recoveries of epimedin C and icariin in <i>Epimedium acuminatum</i>				
成分 (component)	样品含量 (original) /mg	加标量 (added) /mg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
朝藿定 C (epimedin C)	0.931	0.778	104.1	0.45
	0.933	0.973	103.1	2.1
	0.929	1.17	104.5	0.69
淫羊藿苷 (icariin)	0.153	0.122	100.2	0.88
	0.154	0.149	100.0	2.4
	0.153	0.176	99.94	1.9

2.9 样品含量测定 取各淫羊藿样品分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,以外标法计算含量。结果见表 3。

表 3 淫羊藿中朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量测定结果 (% , n= 3)

Tab 3 Determination Results of epimedin C and icariin in <i>Epimedium</i>						
样品 (sample)	编号 (No)	来源 (source)	朝藿定 C (epimedin C)		淫羊藿苷 (icariin)	
			含量 (content) /%	RSD /%	含量 (content) /%	RSD /%
单叶淫羊藿 (<i>Epimedium simplicifolium</i>)	1	贵州绥阳 (Guizhou Suizhang)	3.03	0.31	0.42	0.04
小叶淫羊藿 (<i>Epimedium parvifolium</i>)	2	贵州印江 (Yijiang Guizhou)	4.66	0.04	0.19	0.06
黔岭淫羊藿 (<i>Epimedium leptorhizum</i>)	3	贵州贵阳 (Guiyang Guizhou)	0.29	0.31	0.03	0.23
毡毛淫羊藿 (<i>Epimedium coactum</i>)	4	贵州剑河 (Jianhe, Guizhou)	0.69	0.06	0.16	0.67
天平山淫羊藿 (<i>Epimedium myrianthum</i>)	5	贵州印江 (Yijiang Guizhou)	5.80	0.27	0.25	0.68
贵州淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i> var. <i>guizhouense</i>)	6	贵州开阳 (Kaiyang Guizhou)	3.32	0.10	0.05	0.79
保靖淫羊藿 (<i>Epimedium baqingense</i>)	7	贵州松桃 (Songtao Guizhou)	0.07	0.33	0.01	1.63
德务淫羊藿 (<i>Epimedium dewuense</i>)	8	贵州德江 (Dejiang Guizhou)	2.20	0.55	0.17	0.91
拟巫山淫羊藿 (<i>Epimedium pseudowushanense</i>)	9	贵州雷山 (Leishan Guizhou)	4.22	0.65	0.1	0.18
粗毛淫羊藿 (<i>Epimedium acuminatum</i>)	10	贵州贵阳 (Guiyang Guizhou)	1.02	0.93	0.18	1.88
箭叶淫羊藿 (<i>Epimedium sagittatum</i>)	11	贵州松桃 (Songtao Guizhou)	1.22	0.48	0.77	0.13
湖南淫羊藿 (<i>Epimedium hunanense</i>)	12	湖南新产 (Xinchang Hunan)	0.95	0.23	0.08	0.24
朝鲜淫羊藿 (<i>Epimedium koreanum</i>)	13	东北 (Dongbei)	0.41	0.72	0.50	0.08
木舌坪淫羊藿 (<i>Epimedium franchetii</i>)	14	湖北建始 (Jianshi Hubei)	3.99	0.01	0.02	2.65
偏斜淫羊藿 (<i>Epimedium trinatum</i>)	15	湖南张家界 (Zhangjiajie Hunan)	7.80	0.45	0.23	1.08
巫山淫羊藿 (<i>Epimedium wushanense</i>)	16	四川巴中 (Bazhong Sichuan)	0.48	0.61	1.74	0.38
宝兴淫羊藿 (<i>Epimedium davidii</i>)	17	四川宝兴 (Baoxing Sichuan)	0.27	0.62	0.40	0.76
四川淫羊藿 (<i>Epimedium sichuanense</i>)	18	湖北房县 (Fangxian Hubei)	1.69	0.15	0.53	0.29
柔毛淫羊藿 (<i>Epimedium pubescens</i>)	19	四川阆中 (Langzhong Sichuan)	0.28	0.30	0.14	0.58
川鄂淫羊藿 (<i>Epimedium fargesii</i>)	20	重庆巫溪 (Wuxi Chongqing)	0.02	0.07	0.01	1.89
直距淫羊藿 (<i>Epimedium mokinorii</i>)	21	湖北施恩 (Shien Hubei)	0.06	0.25	0.01	2.59

3 讨论

3.1 样品的前处理方法考察 以粗毛淫羊藿为样品,以朝藿定 C 和淫羊藿苷为双指标单因素考察了提取方法、提取溶剂、溶剂体积、提取时间、提取次数,结果优选出的条件为: 70% 乙醇 20 mL 超声提取 1 h。

3.2 检测波长的选择 在 270 nm 波长下能同时有效检测朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量^[2,8]。

3.3 结论 实验结果表明,大部分淫羊藿药材中淫羊藿苷的含量达不到中国药典标准 0.5%,而朝藿定 C 的含量往往较高。因朝藿定 C 是淫羊藿总黄酮类中的主要有效成分,建议可将朝藿定 C 加入淫羊藿药材和成药的质量控制体系,使药材的质量控制更为合理。

3.4 含量测定建议 本文还对全国范围的不同品种淫羊藿进行了淫羊藿苷和朝藿定 C 的含测,结果发现,2010 年版中国药典收载的朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿均达到淫羊藿苷大于 0.5% 的药典标准,其中偏斜淫羊藿等 9 个品种中朝藿定 C 的含量较高,均大于 1.5%,直距淫羊藿、保靖淫羊藿、川鄂淫羊藿的两者含量均较低,应慎用。对贵州产不同品种淫羊藿含量测定发现:天平山、单叶、小叶、粗毛淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 C 的总体含量较高,可考虑入药,而含量较低的黔岭淫羊藿应慎用。

参考文献

- 1 GUO Bao-lin(郭宝林), XIAO Pei-gen(肖培根). A review of main species of Chinese *Epimedium brevicornum* Maxim. (中药淫羊藿主要种类评述). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 28(4): 303
- 2 ChP(中国药典). 2010. Vol1 (一部): 306
- 3 LI Yong(李勇), JI Hui(季晖), LI Ping(李萍), et al. Effects of *Epimedium pubescens* flavonoids on osteoblasts in vitro(淫羊藿总黄酮对体外培养成骨细胞的影响). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(1): 49
- 4 Lin TZ, Chen CY, Yin SJ et al. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21Cip1 and p27Kip1. *J Food Chem Toxicol* 2006, 44(2): 227
- 5 Meng FH, Li YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. *J Phytomed*, 2005, 12: 189
- 6 GUO Bao-lin(郭宝林), XIAO Pei-gen(肖培根). The analysis of flavonoids in different parts and 5 species(5种淫羊藿的不同部位的黄酮类成分分析). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(9): 523
- 7 PEI Li-kuan(裴利宽), GUO Bao-lin(郭宝林). The study progress of *Epimedium* and its produces in recent decade(近 10 年淫羊藿药材及饮片研究进展). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(6): 467
- 8 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

(本文于 2010 年 6 月 28 日收到)