

HPLC 法同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的含量

张华峰^{1,2}, 高翔^{1,2}, 卢大炎¹, 王瑛¹

(1. 中国科学院武汉植物园 植物保育遗传学重点实验室, 湖北 武汉 430074;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 建立了同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷含量的高效液相色谱方法。淫羊藿样品经超声波提取, 以 50% (Φ) 乙醇溶液为溶剂, 在温度 50 °C、料液比 1 : 60 条件下超声波提取 30 min, 共提取 2 次。色谱条件: ZORBAX SB-C₈ 色谱柱 (5 μm, 4.6 × 250 mm); 流动相 A 为乙腈, B 为 1% 乙酸溶液; 梯度洗脱; 紫外检测波长为 270 nm。上述 4 种类黄酮的标准曲线在 6.6~33.0 mg/L (朝藿定 A、淫羊藿苷) 或 6.6~55.0 mg/L (朝藿定 B、C) 范围内呈良好的线性关系 ($r > 0.99$); 加标回收率在 97%~102% 之间; 相对标准偏差小于 2% ($n = 5$)。测得不同产地心叶淫羊藿叶片中 4 种类黄酮的质量分数差异较大; 朝藿定 A 广泛分布于淫羊藿属中。本方法在淫羊藿药材质量控制中具有一定的参考价值。

关键词: 高效液相色谱; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 淫羊藿

中图分类号: O657.72; R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)02 - 0198 - 04

Simultaneous Determination of Epimedin A, B, C and Icaritin in Herba Epimedii by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Hua-Feng^{1,2}, GAO Xiang^{1,2}, LU Da-yan¹, WANG Ying¹

(1. Key Laboratory of Plant Conservation Genetics, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A simple HPLC method has been developed for simultaneous determination of epimedin A, epimedin B, epimedin C and icaritin in Herba Epimedii, a traditional Chinese medicinal material. The sample was ultrasonically extracted with 50% (Φ) ethanol at 50 °C for 30 min in two run. HPLC analysis was performed on an ZORBAX SB-C₈ column with acetonitrile and 1% (Φ) acetic acid solution as mobile phase in gradient elution. The detection was performed at the wavelength of 270 nm. The linear ranges of the calibration curves for both epimedin A and icaritin were 6.6 - 33.0 mg/L and for both epimedin B and epimedin C were 6.6 - 55.0 mg/L. The recovery range of the four flavonoids were 97% - 102% and the relative standard deviations (RSDs) for retention time and flavonoid content were less than 2% ($n = 5$). Mass fractions of the four flavonoids in leaves of *E. brevicornu* from different origins varied significantly. Epimedin A was proved to occur widely across the species of *Epimedium* L. This method can be used for the quality control of Herba Epimedii.

Key words: High performance liquid chromatography; Epimedin A; Epimedin B; Epimedin C; Icaritin; Herba Epimedii

淫羊藿 (Herba Epimedii) 是我国应用历史最悠久、最广泛、最具开发潜力的中草药之一^[1]。迄今已经报道了约 55 种淫羊藿, 但是仅有 5 种符合《中国药典》规定^[2-3]。长期以来, 由于淫羊藿药材几乎全部来源于野生资源, 各产区品种混杂, 质量参差不齐, 加之药材质量控制体系存在不完善之处, 使得淫羊藿的医药学应用受到严重影响, 同时也影响了淫羊藿药材的现代化与国际化进程^[1]。《中国药典》规定淫羊藿药材质量控制的指标为淫羊藿苷。然而, 淫羊藿含有数十种类黄酮成分, 在药材质量控制过程中, 只有综合考察淫羊藿苷、朝藿定 B 和朝藿定 C 等的含量, 才可能客观地反映淫羊藿的内在质量^[4]。朝藿定 A 也是重要的淫羊藿类黄酮组分 (见下文), 但是关于朝藿定 A 在淫羊藿属 (*Epimedium* L.) 内的分

收稿日期: 2006 - 03 - 29; 修回日期: 2006 - 06 - 02

基金项目: 中国科学院武汉植物园“百人计划”项目 (05045112); 武汉市晨光计划项目 (20055003059 - 45); 中国科学院院长基金

作者简介: 张华峰 (1975 -), 男, 陕西华县人, 讲师, 博士研究生; 王瑛, 联系人, Tel: 027 - 87510675,

E-mail: yingwang@wbpcas.cn

布及其在淫羊藿药材质量控制中的意义鲜见报道。当前,测定淫羊藿类黄酮含量的方法主要包括高效液相色谱(HPLC)法、薄层扫描法^[5]、紫外分光光度法、毛细管电泳法^[6]等,这些方法的测定范围大多局限于一种类黄酮成分(主要是淫羊藿苷)。也有学者报道了同时测定淫羊藿中多种类黄酮成分的HPLC方法^[7],但是均未涉及朝藿定 A 成分的测定,亦未对类黄酮成分的提取工艺条件做深入探讨。鉴此,本文报道了一种简便的淫羊藿中朝藿定 A、B、C与淫羊藿苷的超声波提取与同时测定方法,并利用该方法研究了多种淫羊藿叶片中上述 4 种类黄酮的质量分数以及朝藿定 A 在淫羊藿属内的分布,为淫羊藿药材质量控制提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试材

美国 Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪,配备 Agilent 1100 工作站与 G1313A 自动进样器;超声波发生器;电子天平以及其它实验室常用设备。

朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷标准品(ChromaDex 制);乙腈(HPLC 级,美国 Fisher 公司);纯净水;冰乙酸、乙醇等(分析纯)。

淫羊藿在花期阶段分别采自陕西、河南、甘肃、湖北、贵州、湖南等省份,凭证标本存于中国科学院武汉植物园标本馆与本研究室。

1.2 样品处理

将淫羊藿叶片清洗、阴干、粉碎、过筛(孔径 0.355 mm),在 80 °C 干燥 4 h,尔后精密称取 0.2 g,置具塞三角瓶中,加入 50% (Φ) 的乙醇溶液 12 mL,摇匀,称重,50 °C 超声波(频率 28 kHz,功率 500 W)提取 30 min 后再次称重(如果重量减少则需补足损失溶剂),共提取 2 次。提取液经一次性针头式过滤器(0.45 μm)过滤后即得样品溶液。样品溶液如果不立即进行色谱测定,应置 4 °C 冰箱密封、避光保存。

1.3 同时测定 4 种类黄酮的色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₈, 5 μm, 4.6 × 250 mm;柱温: 25 °C;流动相: A 为乙腈, B 为 1% (Φ) 的乙酸溶液;经文献调研^[4]和实验优化,将梯度洗脱程序定为: 0~10 min (20% A), 10~40 min (20%~25% A), 40~42 min (25%~50% A), 42 min (50%~20% A);紫外检测波长: 270 nm;进样量: 5 μL;流速: 1 mL/min;外标法定量。

1.4 淫羊藿干叶中 4 种类黄酮质量分数的计算

将 HPLC 分析测得的类黄酮峰面积 $Y(\text{mAU} \cdot \text{s})$ 带入标准工作曲线方程,求得“1.2 中淫羊藿样品溶液中类黄酮的质量浓度 $X(\text{mg/L})$,再乘以换算系数 0.1 即为淫羊藿干叶中类黄酮的质量分数 $w(\text{mg/g 干重})$ 。

2 结果与讨论

2.1 超声波提取工艺的优化

从淫羊藿叶片中提取类黄酮的方法很多,诸如乙醇回流提取法、微波辅助提取法、超临界流体萃取法^[8]、超声波提取法等。本文选用提取效率高、操作简便、成本低的超声波提取法。采用单因素试验与正交试验相结合的方法,对超声波功率、超声波作用时间、乙醇浓度、固液比、提取温度、提取次数等超声波提取因素进行优化,得到淫羊藿叶片中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的最佳提取工艺条件。经实验发现,以 50% 乙醇溶液为溶剂,当料液比为 1:60 (g/mL)、提取温度为 50 °C、超声波(频率 28 kHz,功率 500 W)作用时间为 30 min、提取次数为 2 次时,叶片中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的相对提取率均可达到 99% 以上。

2.2 标准工作曲线与线性范围

以 50% 乙醇溶液为溶剂,精密配制朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷质量浓度均为 6.6、11.0、22.0、33.0、44.0、55.0 mg/L 的系列标准溶液,并按“1.3 中的色谱条件进行 HPLC 分析,以峰面积 Y 对质

量浓度 X 进行线性回归, 得标准工作曲线 (表 1)。可知, 4 种类黄酮在一定浓度范围内均呈良好的线性, 相关系数皆在 0.99 以上。

表 1 4 种类黄酮测定的回归方程与线性范围
Table 1 Regression equations and linear ranges for the four flavonoids

Flavonoid	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range
		r	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
Ep imedin A	$Y = 12.676 X + 3.714$	0.994 74	6.6~33.0
Ep imedin B	$Y = 7.458 X + 6.193$	0.992 48	6.6~55.0
Ep imedin C	$Y = 7.543 X + 3.566$	0.999 12	6.6~55.0
Icariin	$Y = 16.036 X + 7.049$	0.998 27	6.6~33.0

2.3 精密度与稳定性

将 4 种类黄酮标准品溶液按“1.3 中的色谱条件进行 HPLC 分析, 重复进样 5 次, 发现朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷保留时间的相对标准偏差 (RSD) 依次为 0.14%、0.14%、0.14% 与 0.13%, 质量浓度的 RSD 依次为 0.76%、0.78%、1.03% 与 0.53%, 说明本方法重复性良好。

按“1.2 中的样品处理方法制备样品溶液, 室温避光放置, 每隔 3 h 按“1.3 中的色谱条件进样分析 1 次, 连续分析 12 h, 发现样品溶液在 12 h 内较稳定 (RSD < 2%)。

2.4 回收率

取朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷标准溶液 (质量浓度依次为 11.0、44.0、33.0 与 11.0 mg/L) 各 10 mL, 加入三角瓶中挥干溶剂, 然后与已知 4 种类黄酮含量的淫羊藿叶片 (事先称重) 混合, 再进行样品处理、HPLC 分析, 求得加标回收率 (表 2)。

表 2 4 种类黄酮测定的回收率
Table 2 Recoveries for the four flavonoids

Flavonoid	Background	Added	Found	Recovery
	$m/\mu\text{g}$	$m_A/\mu\text{g}$	$m_F/\mu\text{g}$	$R/\%$
Ep imedin A	143.20	110.00	253.86	101
Ep imedin B	1 212.85	440.00	1 650.76	100
Ep imedin C	349.55	330.00	687.13	102
Icariin	342.50	110.00	449.02	97

2.5 样品测定

测定发现, 不同产地心叶淫羊藿 (*E. brevicomu*) 叶片中 4 种类黄酮成分的含量差异较大 (表 3)。4 种类黄酮标准品与样品色谱图见图 1。

表 3 不同产地心叶淫羊藿叶片中 4 种类黄酮的质量分数
Table 3 Mass fraction of the four flavonoids in *E. brevicomu* from different origins

Origin (Locality)	Mass fraction of flavonoid (mg/g dry weight)			
	Ep imedin A	Ep imedin B	Ep imedin C	Icariin
Shaanxi	2.125	15.249	5.884	11.179
Henan	2.864	24.257	6.991	6.850
Gansu	2.170	18.625	13.472	9.603

《中国药典》规定淫羊藿药材质量控制的指标为淫羊藿苷。郭宝林等^[4]研究认为, 除淫羊藿苷外, 朝藿定 B、C 也应当作为淫羊藿质量控制指标。进一步研究发现, 朝藿定 C 在柔毛淫羊藿 (*E. pubescens*)、箭叶淫羊藿 (*E. sagittatum*)、朝鲜淫羊藿 (*E. koreanum*) 中均有存在^[9], 并且朝藿定 B、C 都具有重要的生物活性^[10-11]。本研究发现, 朝藿定 B、C 亦存在于心叶淫羊藿、粗毛淫羊藿、湖南淫羊藿 (*E. hunanense*)、偏斜淫羊藿 (*E. truncatum*)、天全淫羊藿 (*E. flavum*) 等的叶片中, 这为将朝藿定 B、C 列为淫羊藿质量控制指标提供了新的证据。本研究还发现, 朝藿定 A 不仅广泛分布于心叶淫羊藿、朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿、粗毛淫羊藿、宝兴淫羊藿 (*E. davidii*)、黔岭淫羊藿 (*E. leptorrhizum*)、湖南淫羊藿、

保靖淫羊藿 (*E. baojingense*)等几十种淫羊藿的叶片中,而且含量较高,某些淫羊藿种中朝藿定 A 的含量甚至高于淫羊藿苷,朝藿定 A、B、C与淫羊藿苷含量之和占总类黄酮的大部分比重。从化学结构上看,朝藿定 A 只比淫羊藿苷多一个葡萄糖残基,与朝藿定 B、C 也分别仅有一个单糖残基的差异,它们之间可能发生转变。近期研究也显示朝藿定 A 具有防治心血管疾病等潜在功效^[7]。由此看来,朝藿定 A 也是淫羊藿类黄酮的重要组成部分之一,值得在淫羊藿药材质量控制中深入研究。

3 结 论

本文报道的淫羊藿中朝藿定 A、B、C与淫羊藿苷的超声波提取与 HPLC测定方法,具有操作简便、准确、重复性好等优点,在淫羊藿药材质量控制中具有一定的参考价值。本研究不仅为将朝藿定 B、C列为淫羊藿药材质量控制指标提供了新的证据,而且还证实,朝藿定 A 在淫羊藿属中广泛存在,是淫羊藿类黄酮的重要组成部分之一。今后,应当深入开展朝藿定 A 的生物活性、药理学或药物代谢动力学研究,尽快阐明朝藿定 A 在淫羊藿药材质量控制中的意义,推进淫羊藿药材的现代化与国际化进程。

参考文献:

- [1] 李作洲,徐艳琴,王 瑛,等.淫羊藿属药用植物的研究现状与展望[J].中草药,2005,36(2):289-295.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005年版,一部)[M].北京:化学工业出版社,2005:229.
- [3] 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):303-307.
- [4] 郭宝林,肖培根.淫羊藿属药用植物的质量评价和资源开发前景[J].天然产物研究与开发,1996,8(1):74-78.
- [5] 李 健,贾宪生.薄层扫描法测定淫羊藿中朝藿定 C 的含量[J].贵州医药,2004,28(2):190-191.
- [6] 王德先,杨更亮,宋秀荣,等.毛细管电泳法测定淫羊藿甙的 pKa 值及其在中药淫羊藿中的含量[J].色谱,2001,19(1):64-67.
- [7] ZHANG H F, DONG J Z, ZHU H T, et al Taxonomy and sustainable utilization of *Epimedium* L. [A]. In: The 3rd Global Botanic Garden Congress Proceedings[C]. Botanic Garden Conservation International, Wuhan, China(in press).
- [8] LU CM, ZHAO XL, LU ZQ, et al Isolation and extraction of total flavonoids from by supercritical fluid extraction[J]. Chem Res Chinese U, 2004, 20(6): 707-710.
- [9] 王明权,毕志明,李 萍,等.高效液相色谱法测定淫羊藿中淫羊藿定 C 和淫羊藿苷的含量[J].中国中药杂志,2003,28(11):1025-1027.
- [10] LU 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 and Chemical Toxicology, 2006, 44(2): 227-235.
- [11] MENG FH, LI YB, XDNG ZL, et al Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. Phytomedicine, 2005, 12: 189-193.

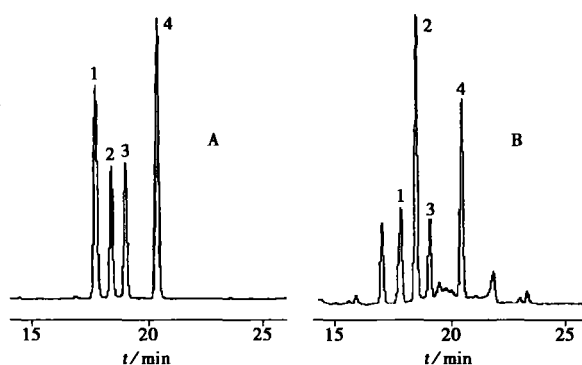


图 1 4 种类黄酮标准品 (A) 与样品 (B) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B) of the four flavonoids

1, 2, 3 and 4 represent epimedin A, B, C and icariin, respectively