

文章编号: 1006-2858(2010)08-0652-04

# RP-HPLC 法测定朝鲜淫羊藿提取物中 4 种成分的含量

董自艳<sup>1</sup>, 彭 纓<sup>1</sup>, 黄 怡<sup>1</sup>, 李 迅<sup>2</sup>, 赵玲誉<sup>1</sup>, 张 玮<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 格林制药有限公司, 辽宁 沈阳 110000)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定朝鲜淫羊藿提取物中淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 含量的方法。方法 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水梯度洗脱 [0~25 min, w(甲醇) = 55%~70%; 25~40 min, w(甲醇) = 70%~90%; 40~45 min, w(甲醇) = 90%~55%; 45~60 min, w(甲醇) = 55%], 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 270 nm, 柱温为 25℃。结果 淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 的线性关系良好, 线性范围分别为 16.5~82.5, 96.0~480.0, 30.6~153.0, 1.5~7.5 mg·L<sup>-1</sup>, 平均回收率分别为 103.7%、100.9%、102.2%、100.1%, RSD 分别为 1.4%、2.9%、1.2%、2.5% (n=5)。结论 该方法可作为朝鲜淫羊藿提取物的含量测定方法, 为其质量控制提供参考依据。

**关键词:** 淫羊藿苷 A; 淫羊藿苷; 朝藿定 B; 淫羊藿次苷 II; 朝鲜淫羊藿; 反相高效液相色谱法  
中图分类号: R 917 文献标志码: A

朝鲜淫羊藿 (*Epimedium koreanum* Nakai) 为小檗科淫羊藿属植物, 是 2005 年版《中华人民共和国药典》一部收载的淫羊藿药材品种<sup>[1]</sup>, 主产于辽宁、吉林、黑龙江等地, 主要功效补肾阳, 强筋骨, 祛风湿, 临床用于阳痿遗精, 筋骨痿软, 风湿痹痛, 麻木拘挛, 更年期高血压。药典规定淫羊藿药材质量控制的指标为总黄酮含量和淫羊藿苷含量。然而, 淫羊藿含有数十种类黄酮成分, 不同品种不同来源的药材成分差别很大, 在药材质量控制过程中, 只有综合考察淫羊藿苷、朝藿定 B 等成分, 才可能客观地反映淫羊藿的内在质量。淫羊藿次苷 II 是淫羊藿苷的代谢物<sup>[2]</sup>, 具有促进成骨细胞增殖, 抑制前成骨细胞增殖的活性<sup>[3]</sup>, 而其含量测定鲜有报道, 故测定其含量对朝鲜淫羊藿的质量控制也有参考价值。

现从朝鲜淫羊藿中分离出了淫羊藿苷、淫羊藿苷 A、淫羊藿次苷 II、朝藿定 B 等成分, 并鉴定了它们的结构, 用 RP-HPLC 梯度洗脱法同时测定了这四种成分的含量, 既能兼顾主要成分的质量控制, 又能对这一鲜有含量研究的淫羊藿次苷 II 提供参考。淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 的分子结构式如图 1 所示。

## 1 仪器与材料

Perkin Elmer 高效液相色谱仪 (包括 LC295 紫外-可见检测器、series LC200 泵, 美国 Perkin Elmer 公司), AE240 电子分析天平 (梅特勒 托利多上海有限公司), SB5200DTD 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

甲醇 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司), 水 (娃哈哈纯净水)。

对照品淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 均为实验室自行分离精制, 用光谱方法鉴定结构, 并用 HPLC 面积归一化法测定其纯度质量分数均大于 98%。

淫羊藿药材为辽宁省售, 经沈阳药科大学中药学院宋少江教授鉴定为朝鲜淫羊藿, 实验室制得其提取物。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

Diamonsil 色谱柱: C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水梯度洗脱 [0~25 min, w(甲醇) = 55%~70%; 25~40 min, w(甲醇) = 70%~90%; 40~45 min, w(甲醇) = 90%~55%];

收稿日期: 2010-01-08

作者简介: 董自艳 (1985-), 女 (汉族), 江苏连云港人, 硕士研究生; 彭纓 (1972-), 女 (满族), 山东兖州人, 副教授, 主要从事药品质量标准和药动学方面的研究, Tel 024-23986361, Email yingpeng1999@ yahoo.com.cn

45~60 min (甲醇) = 55%], 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 波长: 270 nm, 柱温: 25 °C, 进样量: 5 μL。

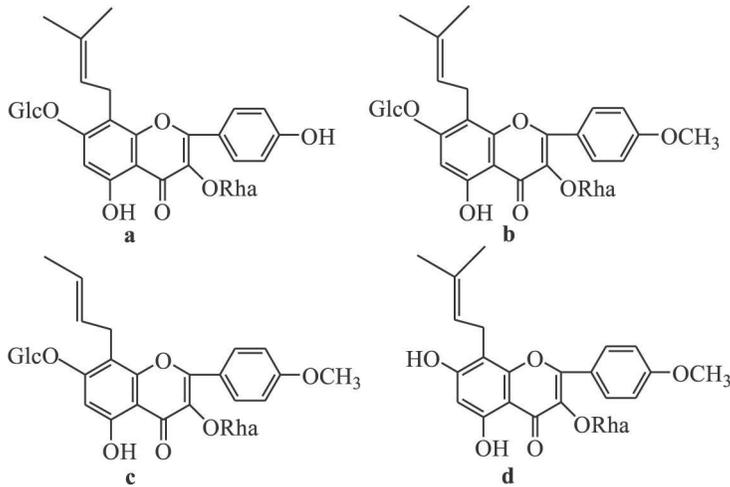


Fig 1 The structures of epimedin A (a), icaritin (b), epimedin B (c) and icariside II (d)

在上述色谱条件下, 淫羊藿苷 A、朝藿定 B、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II 对照品和供试品的色谱图见图 2 各色谱峰与相邻色谱峰的分离度大于

1.5 理论塔板数按淫羊藿苷计算不低于 3 000 拖尾因子在 0.95~1.05 之间。

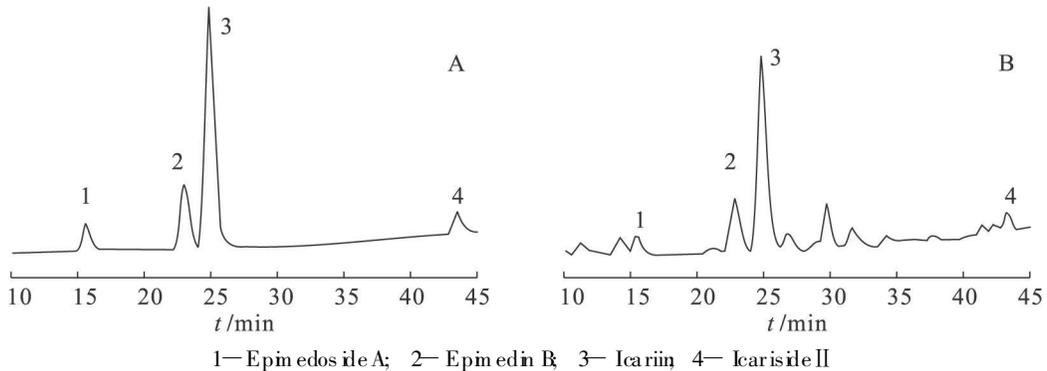


Fig 2 HPLC chromatography of standard solution (A) and sample solution (B)

## 2.2 溶液的制备

### 2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品淫羊藿苷 A、朝藿定 B、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II 各适量, 以甲醇配成质量浓度分别为 1.65、3.06、9.60、0.15 g·L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液, 分别取等量各对照品溶液, 混合, 摇匀, 即得混合对照品储备液。每 1 mL 含淫羊藿苷 A 0.413 mg、朝藿定 B 0.765 mg、淫羊藿苷 2.400 mg、淫羊藿次苷 II 0.038 mg。

### 2.2.2 供试品溶液的制备

精密称取朝鲜淫羊藿提取物约 25.0 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 甲醇-水 (体积比为 60:40) 溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

## 2.3 线性关系考察

精密吸取混合对照品储备液 1.0、2.0、3.0

4.0、5.0 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按色谱条件测定峰面积, 以对照品峰面积 A 为纵坐标, 以对照品溶液的质量浓度 ρ 为横坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程 (n = 5)。淫羊藿苷 A:  $A = 7.393 \times 10^6 \rho - 5.049 \times 10^4$ ,  $r = 0.9993$ ; 淫羊藿苷:  $A = 1.774 \times 10^7 \rho - 5.048 \times 10^5$ ,  $r = 0.9992$ ; 朝藿定 B:  $A = 1.130 \times 10^7 \rho - 5.308 \times 10^4$ ,  $r = 0.9998$ ; 淫羊藿次苷 II:  $A = 2.327 \times 10^7 \rho - 1.273 \times 10^4$ ,  $r = 0.9992$ 。

结果淫羊藿苷 A 质量浓度在 16.5~82.5 mg·L<sup>-1</sup> 内, 淫羊藿苷质量浓度在 96.0~480.0 mg·L<sup>-1</sup> 内, 朝藿定 B 质量浓度在 30.6~153.0 mg·L<sup>-1</sup> 内, 淫羊藿次苷 II 质量浓度在 1.5~7.5 mg·L<sup>-1</sup> 内, 与峰面积具有良好的线性关系。

## 2.4 精密度试验

取混合对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样 5 次,每次 5  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,结果淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 峰面积的 RSD 分别为 1.0%、1.2%、0.6%、1.1%。

## 2.5 重复性试验

取供试品 5 份,制成供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 的平均含量分别为 1.79%、10.21%、3.89%、0.47%,RSD 分别为 1.1%、1.8%、1.0%、1.4%。

## 2.6 稳定性试验

将供试品溶液按上述色谱条件,分别在制备样品后的 0.4、6、8、10、12 h 进样,测定峰面积,结果淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 的 RSD 分别为 0.9%、0.9%、1.3%、1.2%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

## 2.7 回收试验

取已知含量的样品 5 份,各约 12.5 g 精密称定,分别精密加入 0.210  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿苷 A、1.280  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿苷、0.510  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 朝藿定 B、0.050  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿次苷 II 对照品溶液各 1.0 mL,按供试品溶液制备方法处理,测定峰面积,计算回收率,结果见表 1。

Table 1 The results of the recovery test ( $n = 5$ )

Substance	$m_{\text{sample}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%
Pim edoside A	0.213	0.210	0.430	103.3	103.7	1.4
	0.218	0.210	0.431	101.4		
	0.212	0.210	0.431	104.3		
	0.215	0.210	0.435	104.8		
	0.219	0.210	0.439	104.8		
Icarin	1.280	1.280	2.530	97.7	100.9	2.9
	1.240	1.280	2.500	98.4		
	1.240	1.280	2.570	103.9		
	1.230	1.280	2.520	100.8		
	1.280	1.280	2.610	103.9		
Epimed in B	0.518	0.510	1.040	102.4	102.2	1.2
	0.523	0.510	1.050	103.3		
	0.518	0.510	1.030	100.4		
	0.532	0.510	1.050	101.6		
	0.553	0.510	1.080	103.3		
Icariside II	0.053	0.050	0.103	100.4	100.1	2.5
	0.053	0.050	0.103	100.4		
	0.061	0.050	0.109	96.8		
	0.050	0.050	0.102	103.8		
	0.054	0.050	0.104	99.2		

## 2.8 样品测定

取淫羊藿提取物,按供试品制备方法操作,按

色谱条件测定峰面积,以外标法计算含量,结果见表 2。

Table 2 The results of epim edoside A, icar in, epimed in B and icar iside II of different samples

Sample	$w(\text{epim edoside A})/\%$	$w(\text{icar in})/\%$	$w(\text{epimed in B})/\%$	$w(\text{icar iside II})/\%$
1	1.74	10.04	3.89	0.42
2	1.75	10.41	3.95	0.43
3	1.75	10.13	3.85	0.41

## 3 讨论

a. 在实验中作者分别对甲醇-水、乙腈-水、甲

醇体积分数为 0.5% 醋酸水、甲醇体积分数为 1.0% 醋酸水流动相系统进行研究,甲醇-水流动相系统的分离效果与乙腈-水流动相系统的分离

效果相当,而且加酸对峰形的改善作用不大,考虑到酸对色谱柱寿命的影响以及实验成本,所以选择甲醇-水系统;淫羊藿提取物含量测定方面,药典和相关文献中流动相大多选择乙腈-水、乙腈加酸或甲醇加酸<sup>[4-7]</sup>,本实验在甲醇-水流动相系统下也能够使组分达到分离,峰形较好,而且节约实验成本,故本文选择甲醇-水流动相系统。

b. 采用流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,能达到色谱峰的完全分离,还能保持较低的柱压,延长色谱柱的使用寿命。

c. 相关文献没有淫羊藿提取物中淫羊藿苷 A、淫羊藿苷、朝藿定 B、淫羊藿次苷 II 4 种成分同时测定的报道,本实验简便、可行,重现性好,结果准确,可作为淫羊藿提取物的含量测定方法,为其质量控制提供参考依据。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005 267-268
- [2] ZHANG Yaoping, YANG Ming, SHEN Ziyin, et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 45: 667-672
- [3] CHO IH J, EUN J S, KIM D K, et al. Icariside II from *Epinedium koreanum* inhibits hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  in human osteosarcoma cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 579: 58-65.
- [4] 张华峰, 高翔, 卢大炎, 等. HPLC 法同时测定淫羊藿中朝藿定 A、B、C 与淫羊藿苷的含量 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 198-201.
- [5] 谢娟平, 胥道宝, 孙文基. HPLC 法测定巫山淫羊藿中 4 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 437-440
- [6] 陈彦, 赵艳红, 贾晓斌, 等. RP-HPLC 法同时测定不同品种淫羊藿药材中 5 种主要黄酮类成分的含量 [J]. 中药分析与鉴定, 2008, 19(6): 431-433
- [7] 彭玉德, 黄文华, 郭宝林. 淫羊藿提取物的质量研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1858-1861.

## Detemination of contents of four components in the extract of *Epinedium koreanum* Nakai by RP-HPLC

DONG Z iyan<sup>1</sup>, PENG Y ing<sup>1</sup>, HUANG Y i<sup>1</sup>, LIX un<sup>2</sup>, ZHAO Ling-yu<sup>1</sup>, ZHANG W ei<sup>1</sup>  
( 1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China; 2. Green Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110000 China )

**Abstract Objective** To develop a method for the quantitative analysis of epin edoside A, icariin, epin edin B and icariside II in the extract of *Epinedium koreanum* Nakai. **Methods** The extract was determined by RP-HPLC. A Diamonsi C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol and water; gradient elution [ 0-25 min, w (methanol) = 55%-70%; 25-40 min, w (methanol) = 70%-90%; 40-45 min, w (methanol) = 90%-55%; 45-60 min, w (methanol) = 55% ]; The flow rate was  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The UV detection was set at 270 nm. The column temperature was 25 °C. **Results** The linear response ranges were 16.5-82.5, 96.0-480.0, 30.6-153.0, 1.5-7.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The recovery of the four compounds were 103.7%, 100.9%, 102.2%, 100.1%, respectively, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 3.0% (n=5). **Conclusions** This method can be used for the quality control of the extract of *Epinedium koreanum* Nakai.

**Key words** epin edoside A; icariin; epin edin B; icariside II; *Epinedium koreanum* Nakai; RP-HPLC