

HPLC法同时测定淫羊藿药材中的 5个黄酮类成分

夏爱军¹, 黄河舟², 高 岗², 张 海³, 朱臻宇², 柴逸峰² (1. 中国人民解放军第 303 医院, 广西南宁 530021; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘要 目的: 建立同时测定淫羊藿药材中 5 种成分的 HPLC 方法。方法: 采用 Diamonsil-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈和甲酸水 (pH = 3.0), 梯度洗脱; 流速: 0.9 mL/min; DAD 检测, 检测波长: 270 nm。结果: 淫羊藿药材中 5 个主要黄酮类成分朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、宝藿苷 分别在 0.780 0 ~ 83.20 μg/mL、2.081 ~ 222.0 μg/mL、3.288 ~ 350.7 μg/mL、0.8311 ~ 88.65 μg/mL、0.3518 ~ 37.52 μg/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系, 最低检测限分别为 0.50、0.75、0.87、0.32、0.12 μg/mL。重复性、稳定性实验结果的 RSD < 3%; 各成分平均回收率均小于 107%, RSD < 6%。结论: 该方法快速简便、准确可靠, 各主要化学成分均能达到基线分离, 适用于淫羊藿药材的质量控制。

关键词 朝藿定 A; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 箭藿苷 A; 宝藿苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)03-0284-03

Simultaneous determination of five flavone constituents in *Epimedium Brevicomum* by HPLC

XIA Ai-jun¹, HUANG He-zhou², GAO Gang², ZHANG Hai³, ZHU Zhen-yu², CHAI Yi-feng² (1. Department of pharmacy, 303th Hospital of PLA, Nanning 530021, China; 2. School of pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a HPLC method for simultaneous determination of five flavone constituents in *Epimedium Brevicomum*. **Methods:** The determination was performed on Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Dikma). The mobile phase was consisted of acetonitrile-formic acid aqueous solution with a flow rate of 0.9 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm. **Results:** A method has been established for determination of epimedin A₁, epimedin B, icariin, sagittatoside A, baohuoside I in one run by HPLC. **Conclusion:** The established method is simple, convenient, accurate and reliable, and suitable for the quality control of *Epimedium Brevicomum*.

KEY WORDS epimedin A₁; epimedin B; icariin; sagittatoside A; baohuoside I; HPLC

小檗科 (*Berberidaceae*) 淫羊藿 (*Epimedium Brevicomum*) 属为多年生草本植物。中国是淫羊藿属最主要分布区, 约占世界总量的 70%, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效^[1]。其有效成分主要包括黄酮类成分^[2]。目前对于淫羊藿药材的质量控制方面, 多是采用 HPLC 法测定其中单个或几个黄酮类成分, 采用 HPLC 法同时测定了淫羊藿中 5 种黄酮类成分的文献未见发表^[3-9]。本研究采用 HPLC 法同时测定淫羊藿药材中朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、宝藿苷 5 种主要药效成分, 可用于淫羊藿药材的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (自动进样器、四元泵、在线脱气机、二极管阵列紫外检测器); 减压旋转蒸发仪; SB3200-T 型超声仪 (上海必能胜超声有限公司); 80-2B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), 十万分之一 AE240 型电子天平 (梅特勒, 美国)。

淫羊藿去根药材: 经第二军医大学药学院生药教研室孙连娜副教授鉴定为小檗科淫羊藿 (*Epimedium brevicomum* Maxim) 的干燥地上部分, 药材来源及编号为: 01, 购自安徽; 02, 购自陕西; 03, 购自甘肃; 04, 采自四川; 05, 购自四川。乙腈为色谱纯 (fisher); 重蒸甲酸; 水为娃哈哈纯净水。朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、宝藿苷 对照品由第二军医大学药学院生药教研室孙连娜副教授提取并

作者简介: 夏爱军 (1964-), 男, 学士, 副主任药师。Tel: (0771) 2870265, E-mail: singerxaj2002@yahoo.com.cn.
通讯作者: 柴逸峰。Tel: (021) 81875571, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

纯化,经 MS、NMR 和 HPLC 面积归一化检测其相对纯度均在 98% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm, Dikma); 流动相为甲酸水 (pH = 3.0, A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱, 流速 0.9 mL/min, 检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μL。洗脱程序见表 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序表

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.9	75	25
3	0.9	75	25
20	0.9	70	30
35	0.9	55	45
45	0.9	27	73

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定朝藿定对照品 A 16.64 mg, 朝藿定 C 对照品 44.40 mg, 箭藿苷 A 对照品 17.73 mg 于 20 mL 容量瓶中, 精密称定淫羊藿苷对照品 10.96 mg 于 50 mL 容量瓶中, 宝藿苷 I 对照品 18.76 mg 于 100 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得对照品母液。精密移取各种对照品母液至 10 mL 容量瓶, 中间以干燥氮气流挥干部分溶剂至 10 mL 以下。以 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 制得各浓度对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备 取淫羊藿药材粉末约 1 g, 精密称定, 以滤纸包好, 置 250 mL 烧瓶中, 定量加入 40 mL 水, 室温浸泡 12 h。直火煮沸, 回流 2 h 后收集煎煮液至烧瓶。补充 40 mL 水至烧瓶中, 继续回流提取 2 h, 合并煎煮液至锥形瓶; 以 20 mL 水分两次荡洗烧瓶, 荡洗液并入锥形瓶。提取液 70 °C 恒温真空减压蒸干, 得提取物浸膏, 置烘箱 70 °C 烘干。往浸膏中精密加入 70% 乙醇 50 mL, 超声处理 30 min 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。精密吸取续滤液 5.0 mL 至 10 mL 容量瓶, 以 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 将上述对照品溶液依次减半稀释得到一系列浓度的对照品溶液。依次进样 20 μL, 记录峰面积。以峰面积 (Y) 为横坐标, 相应的浓度 (X) 为纵坐标, 所得 5 个成分的标准曲线分别为: 朝藿定 A: $Y = 0.07115X + 0.04248$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 0.7800 ~ 83.20 μg/mL; 朝藿定 C: $Y = 0.06576X + 0.3291$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 2.081 ~ 222.0 μg/mL; 淫羊藿苷: $Y = 0.06275X + 0.4572$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 3.288 ~ 350.7 μg/mL; 箭藿苷 A: $Y = 0.06011X + 0.07627$ ($r = 0.9999$), 线性范围为

0.8311 ~ 88.65 μg/mL; 宝藿苷 I: $Y = 0.04385X - 0.009284$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 0.3518 ~ 37.52 μg/mL。

2.4.2 最低检测限 经一系列稀释的标准溶液测定, 以信噪比 (S/N) 为 3:1 计, 朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、宝藿苷 I 的最低检测限分别为 0.50、0.75、0.87、0.32、0.12 μg/mL。

2.4.3 精密度的实验 分别取朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、宝藿苷 I 高、中、低 3 种浓度的标准液, 在 1 d 之内连续进样 3 次, 考察日内精密度的 RSD (%) 分别为: 1.50、1.20、2.38; 0.62、0.66、2.47; 0.30、0.74、2.34; 0.53、0.60、0.43; 0.58、0.65、0.87。连续测定 5 d, 考察日间精密度的 RSD (%) 分别为: 2.33、1.11、1.97; 1.24、1.95、3.00; 1.11、2.07、3.50; 1.76、2.10、0.92; 1.56、2.15、4.51。

2.4.4 稳定性实验 取各化学成分的对照品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 依次进样分析, 记录峰面积, 各成分峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明 5 个黄酮类成分在 24 h 内稳定。

2.4.5 重现性实验 精密称取 4 号样品 5 份, 每份 0.2 g, 依法制得供试品溶液, 进样 20 μL, 记录峰面积, 计算各组分含量。各组分平均含量分别为 0.2305、0.9671、1.223、0.03735、0.07212, RSD 分别为 1.81%、2.32%、2.19%、2.86%、2.03%, 表明该测定方法的重现性良好。

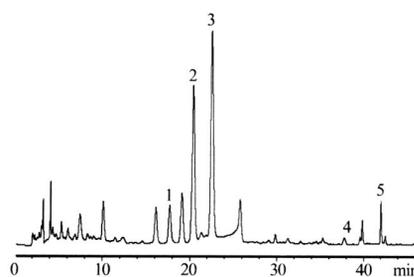


图 1 四川产淫羊藿药材 HPLC 色谱图 (检测波长 270 nm)
1 朝藿定 A; 2 朝藿定 C; 3 淫羊藿苷; 4 箭藿苷 A; 5 宝藿苷

2.4.6 回收率实验 精密称取 4 号淫羊藿药材 9 份, 每份 0.2 g, 分别准确加入高、中、低浓度的 5 种成分的对照品, 按照“2.1.2 项下方法进行提取, 得供试品溶液。依次进样分析, 记录峰面积并取平均值, 分别计算平均回收率。结果高、中、低浓度的平均回收率 (%) 朝藿定 A 为 (106.0 ± 1.22) %、(102.4 ± 1.25) %、(101.8 ± 1.45) %, 朝藿定 C 为 (104.9 ± 1.97) %、(101.6 ± 2.27) %、(97.15 ± 2.10) %, 淫羊藿苷为 (105.4 ± 1.83) %、(102.6 ± 2.10) % (下转第 288 页)

2.12 样品测定 取样品溶液(10个批号)和对照品溶液,按上述色谱条件进样,用外标法测定其金丝桃苷的含量,结果见表 2。

表 2 山楂麦曲颗粒中金丝桃苷的含量 ($n=5$)

批号	含量 ($\mu\text{g}/\text{袋}$)	RSD (%)
060701	55.165 5	0.86
060702	62.164 5	0.75
060703	64.876 5	0.84
070601	49.142 3	0.52
070602	52.671 3	0.65
070603	50.234 6	0.58
080104	56.174 2	0.68
080105	51.768 7	0.71
080511	48.728 7	0.81
080512	60.312 4	0.65

3 讨论

3.1 在对供试品溶液制备的研究中,曾对甲醇的用量、超声溶出的时间、聚酰胺的用量和粒度以及 70%乙醇的用量均做了比较,结果发现用甲醇 50 mL,超声处理 20 min,聚酰胺(60~100目)上柱量 2.0 g,并用 70%乙醇 60 mL 洗脱,是既能达到去除

杂质使有效成分充分溶出的目的,又能省时省试剂减少环境污染。

3.2 在系统适应性的研究中,流动相用乙腈-0.1%磷酸溶液(16:84)和乙腈-甲醇-四氢呋喃-0.5%冰醋酸溶液(1:1:19.4:78.6)均达不到理想的分离效果,而用本文所定的流动相,分离度和峰形都较为理想。

3.3 由于该产品所用药材山楂产地广,金丝桃苷的含量差别较大,同时检测允许有一定的误差范围,根据表 2 的结果,建议以本结果的 60%为下限建立本产品的含量限度,即含量限度定为本品每袋(15 g)含金丝桃苷($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$),不得少于 36.5 μg 。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 山楂麦曲颗粒 [S]. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十四册. 1997: 10.
- [2] 中国药典 2005 年版 [S]. 一部. 2005: 23, 159.
- [3] 邢秀芳,于宏芬. HPLC 法测定大山楂丸中金丝桃苷的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 712.
- [4] 李琛,谢沅书,张彬. HPLC 法测定山楂调中丸中金丝桃苷的含量 [J]. 山西中医, 2007, 23(5): 66.

收稿日期: 2008-12-03

(上接第 285 页)

2.34)%, (100.3 \pm 3.1)%, 箭藿苷 A (102.2 \pm 3.11)%, (97.75 \pm 1.25)%, (100.8 \pm 1.29)%, 宝藿苷 (106.2 \pm 1.41)%, (101.3 \pm 1.15)%, (100.6 \pm 1.02)%。

2.5 样品测定 取不同批次淫羊藿药材依法提取,制备供试品溶液。按“2.1 项下色谱条件依次进样 20 mL,记录峰面积,计算对应成分的百分含量。含量测定结果见表 2。

表 2 淫羊藿样品各组分含量测定结果 (%) ($n=3$)

药材	朝藿定 A	朝藿定 C	淫羊藿苷	箭藿苷 A	宝藿苷 I
1	0.201 5	0.325 6	1.204	0.004 017	0.011 42
2	0.119 2	0.057 6	0.741 6	0.007 867	0.022 79
3	0.135 2	0.592 5	1.230	0.009 114	0.014 00
4	0.159 0	0.629 4	1.299	0.011 58	0.026 28
5	0.107 0	0.923 7	0.637 2	0.008 334	0.019 12

3 讨论

3.1 提取方法的选择 煎煮提取方法参考生药学中药材提取方法确定。乙醇提取方法经参考文献及《中国药典》2005 版一部淫羊藿项下要求确定^[3]。考察了 20%乙醇的提取结果,主要黄酮类物质峰面积明显减少;同时更长超声时间(40 min)下的各峰面积无明显差异,显示提取已基本完全;重复性实验

亦表明采用该提取方法稳定可靠。

3.2 检测波长的选择 经采集色谱图 16 个主要组分峰的紫外吸收光谱,表明所检测各组分在 200 nm 附近、270 nm 处存在吸收峰。考虑所用流动相在 200 nm 波长附近有较大的末端吸收干扰,故最终选择 270 nm 为采集色谱图时的吸收波长。

参考文献:

- [1] 谢娟平,孙文基. 淫羊藿属植物化学成分及药理研究进展 [J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 17.
- [2] 葛淑兰,田景振. 淫羊藿及其有效成分的药理研究进展 [J]. 中国药师, 2005, 8(6): 462.
- [3] 中国药典 2005 版 [S]. 2005 (D): 229.
- [4] 李庆军,李海燕. HPLC 法测定引阳索颗粒的淫羊藿苷含量 [J]. 齐鲁药事, 2006, 25(11): 662.
- [5] 贾敏鸽,孙文基,朱朝德. RP-HPLC 测定淫羊藿不同品种和部位中柔藿苷和淫羊藿苷 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 64.
- [6] 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.
- [7] 李步海,武玉学,林爱华. 淫羊藿中有效成分淫羊藿甙分离纯化的研究 [J]. 中南民族学院学报(自然科学版), 2001, 20(4): 1.
- [8] 裴利宽,郭宝林,黄文华. 淫羊藿属主要资源种类的 HPLC 指纹图谱特征和种类鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1662.
- [9] 曾宝,黄晓其,苏子仁. HPLC 法同时测定益肾灵颗粒中淫羊藿苷、补骨脂素及异补骨脂素的含量 [J]. 中南民族学院学报(自然科学版), 2008, 19(6): 442.

收稿日期: 2008-11-20