

不同产地和品种淫羊藿中淫羊藿苷的 HPLC 分析

徐玲玲 黄礼杰¹ 顾国献(上海 200437 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院;¹上海 200332 上海中医药大学)

摘要 目的:对中药淫羊藿中淫羊藿苷的含量分析进行方法学研究,并测定淫羊藿的不同产地、不同品种、不同药用部位的淫羊藿苷的含量。方法:采用 RP-HPLC 技术对 7 个品种 23 个样品进行测定。以 PERKIN-ELMER-SH/5C₁₈柱为分析柱,流动相为乙腈-水-36%乙酸(25:73.5:1.5)流速 1.0 ml/min。UV 检测波长 270 nm。结果:本方法测定淫羊藿苷含量在 0.0212~0.127 μg,0.53~1.696 μg 范围内呈良好的线性关系。不同产地、不同品种、不同药用部位的淫羊藿其淫羊藿苷的含量为 0.00307%~1.55%。同一植株不同部位中淫羊藿苷的含量分布叶>叶茎>茎>根。结论:淫羊藿由于产地不同、品种不同其淫羊藿苷的含量相差悬殊。本测定方法为筛选优良品种和扩大药源提供了简便易行的方法。

关键词 淫羊藿;淫羊藿苷;RP-HPLC;含量测定

HPLC analysis of icariin of heiba epimebii in different variety and different planting areas

Xu Lingling (Xu LL) ,Huang Lijie (Huang LJ) ,Gu Guoxian (Gu GX) (Yue Yang Hospital , Shanghai College of Traditional Chinese Medicine , Shanghai 200043)

ABSTRACT OBJECTIVE: The methodology of quantitative analysis of icariin in Chinese herb Heiba Epimebii was investigated and the content of ICARIINE OF HEIBA EPIMEBII in different parts ,different variety and different planting areas of the plant was also measured . **METHOD:** The 23 samples in seven variety of Heiba Epimebii were measured with RP-HPLC technique . The analysis column of this method was PERKIN-ELMER-SH/5C₁₈ column , the flow phase was CH₃CN-water-36 % acetic acid (25: 73 . 5: 1 . 5) and flow velocity was 1 . 0 ml/ min . The wavelength of UV for the analysis was 270 nm . **RESULTS :** There are excellent linear correlation in two ranges , 0 . 0212 ~ 0 . 127 μg and 0 . 53 ~ 1 . 696 μg , with this quantitative method . The content of icariin in different parts , different variety and different planting areas of the plant were 0 . 00307 % ~ 1 . 55 % . The quantitative distribution of icariin in a plant of Heiba Epimebii is leaf > leaf stalk > stem > root . **CONCLUSION:** The content of icariin was obviously variable in different variety and different planting areas of Heiba Epimebii . This quantitative measurement method is an easy way to select good variety and extend source of this kind of Chinese medicine

KEY WORDS Heiba Epimebii , icariin , RP-HPLC , content measurement

淫羊藿为小檗科淫羊藿属 *Epimedium* 植物。1995 年版《中华人民共和国药典》载有 5 种淫羊藿为药用植物,分别为淫羊藿 *Epimedium Breuicornum* Maxim、箭叶淫羊藿 *Epimedium Sagittatum* Maxim、柔毛淫羊藿 *Epimedium Pubescens* Maxim、巫山淫羊藿 *Epimedium Washanense* T.Syng、朝鲜淫羊藿 *Epimedium Koreanum* Maxim 的干燥地上部分。淫羊藿性辛、甘、温,有补肝肾,强筋骨,祛风湿的功效。《本草纲目》曰:“淫羊藿味甘,气香,性温不寒,能益精气,乃手足阳明三焦命门药也。”它作为传统的补肾壮阳药,因其独特的化学成分和显著的生物活性一直成为国内外研究的热点之一。据多种药理实验表明,淫羊藿苷 icariin 为其主要化学

成分。有关淫羊藿苷的含量测定方法有一阶导数光谱法^[1],二阶导数光谱法^[2],薄层扫描法^[3,4],紫外分光光度法^[5,6],高效液相色谱法^[7-14]等。本文采用高效液相色谱法对不同品种不同产地及不同药用部位淫羊藿属植物中的淫羊藿苷进行含量测定,该法简便易行,结果准确,为筛选优良品种,扩大药用资源提供了质量控制的科学依据。

1 实验材料

1.1 仪器与色谱条件

仪器:PE 公司的 HPLC 仪;PE 1022 LC PLUS 色谱工作站;PE 235C DETECTOR DAD 检测仪;PE SERIES 200 IC PUMP 泵;电子天平 MD100-1 SHANGPING;离心

机 80-1(上海手术器械厂)。

色谱条件:色谱柱:PERKIN-ELMER-SH/5C₁₈;流动相:乙腈-水-36%乙酸(25:73.5:1.5);流速:1.0ml/min;检测波长:270nm;柱温:室温。

1.2 试剂 对照品及样品

甲醇(HPLC级);双蒸水;乙酸(分析纯);淫羊藿苷标准品(由中国药品生物制品鉴定所提供);样品由上海医科大学施大文教授鉴定并提供。

	样品	部位	来源
1	黔岭淫羊藿	叶	贵州黔岭山
2	<i>E. Leptorrhizum</i>	叶	上海药材公司
3		茎	贵州黔岭山
4	巫山淫羊藿	叶茎	贵州
5	<i>E. Washanense</i>	根	陕西安康
6		茎	陕西安康
7		叶	陕西安康
8	箭叶淫羊藿	茎	陕西安康
9	<i>E. Sagittatum</i>	叶	陕西安康
10		叶	安徽
11		茎	安徽
12		叶	广西灵山
13	宝兴淫羊藿	叶	云南
14	<i>E. Davidii</i>	茎	云南
15		叶茎	湖南
16	柔毛淫羊藿	茎	四川灌县
17	<i>E. Pubescens</i>	叶	四川灌县
18	朝鲜淫羊藿	叶	洛阳
19	<i>E. Grandiflorum</i>	茎叶	辽宁
20		叶茎	青海药检所
21	淫羊藿	叶茎	无锡
22	<i>E. Brevicornum</i>	叶茎	浙江临安
23		叶茎	陕西

2 实验方法

2.1 吸收波长选择

取上述淫羊藿苷的标准品溶液,分别在波长 235~360nm 间,采用 DAD 紫外检测器,分别在淫羊藿色谱峰的顶点和两侧各取一点进行扫描,表明该组分在 270nm 处有较大吸收,见图 1。故选择 270nm 为测定波长。

2.2 线性范围考查

取淫羊藿苷标准品,甲醇溶解,经 0.45μm 滤膜过滤,定容,得浓度为 0.106mg/ml 的淫羊藿苷标准溶液,在本实验条件下,分别进样 5, 8, 12 和 16μl, 求出峰面积与淫羊藿苷量之间的线性关系,结果表明在 0.53~1.696μg 范围内呈良好线性关系,标准曲线见图 2。并

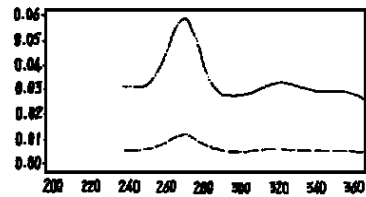


图 1 淫羊藿紫外吸收曲线

求得回归方程为 $Y_1 = 1.75791 \times 10^7 + 9.12783 \times 10^7 X$ 。相关系数 $r = 0.99892$ 。考虑到有些样品的淫羊藿苷含量很低,所以又制备了低浓度的标准曲线:另取经稀释的 0.0106μg 淫羊藿苷标准溶液,分别进样 2, 5, 8, 12 和 14μl, 结果表明在 0.0121~0.127μg 淫羊藿苷范围内,峰面积与淫羊藿苷量线性良好。标准曲线见图 3。得回归方程 $Y_2 = 7.14382 \times 10^5 + 8.91207 \times 10^7 X$, 相关系数 $r = 0.99941$ 。

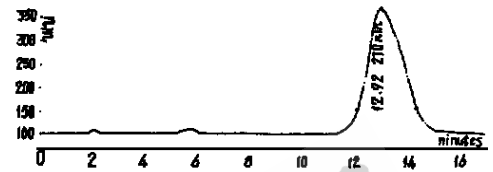


图 2 高浓度的标准曲线

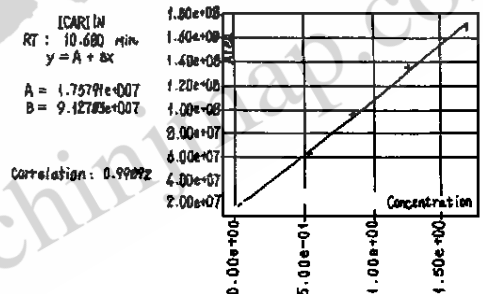


图 3 低浓度的标准曲线

2.3 实验条件考察

2.3.1 流动相选择 本实验比较了甲醇-水(20:80);乙腈-水(25:75);乙腈-水-36%乙酸(25:73.5:1.5)三种不同的流动相,结果表明乙腈-水-36%乙酸(25:73.5:1.5)作流动相时,从分析时间及峰形看都较其它两者为

好。

2.3.2 提取溶剂考察 以9号箭叶淫羊藿(叶)作分析样品,用不同溶剂超声提取30min,以淫羊藿苷含量作指标,结果见表1。

表1 提取溶剂的考察

提取溶剂	含量
无水乙醇	0.665%
70%乙醇	1.27%
70%甲醇	1.42%
甲醇	1.48%

结果表明,以甲醇作溶剂提取淫羊藿苷效果最好。

2.3.3 超声提取时间的考察 以9号箭叶淫羊藿(叶) 20号朝鲜淫羊藿(叶茎) 21号淫羊藿(叶茎)作为样品,甲醇为溶剂,进行超声提取,以淫羊藿苷含量作指标,结果见表2。

表2 超声提取时间的考察/含量%

样品编号	时间/min			
	10	20	30	40
9	1.07	1.36	1.49	1.42
20	0.165	0.331	0.375	0.388
21	0.128	0.293	0.343	0.339

结果表明,超声提取30min基本上可将样品中淫羊藿苷提取完全,故本实验采用甲醇作溶剂,超声提取30min来制备样品液。

2.4 精密度实验

以6号巫山淫羊藿(茎)及17号柔毛淫羊藿(叶)为样品。分别连续进样8次,每次进样20 μ l。测得淫羊藿苷及峰面积含量,求得RSD。结果见表4-1、表4-2。

表4-1 6号样品的精密度实验

	面积	含量/%	RSD/%
1	23799936	0.0311	
2	21318832	0.0278	
3	22352960	0.0292	
4	23429920	0.0306	4.55
5	22707808	0.0296	
6	22607808	0.0295	
7	21693648	0.0283	
8	20810912	0.0272	

2.5 回收率实验

精密称取适量的6号巫山淫羊藿(茎)、17号柔毛淫羊藿(叶)、23号淫羊藿(叶茎)样品,分别定量加入淫羊藿苷标准品溶液后,按上述供试品溶液制备法制备

表4-2 17号样品的精密度实验

	面积	含量/%	RSD/%
1	298129376	1.56	
2	308934592	1.62	
3	318512384	1.68	
4	288472096	1.52	4.205
5	286131072	1.49	
6	283377216	1.48	
7	297444928	1.56	
8	286574251	1.51	

供试液,根据回归方程1分别测得淫羊藿苷回收率,见表5-1A、5-1B、5-1C。

表5-1A 6号样品加样回收率

样品称量/g	淫羊藿苷量/mg	加入标准品量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.406	0.116	0.30	0.404	95.74		
0.351	0.101	0.35	0.439	96.57	95.57	1.322
0.195	0.056	0.45	0.4797	94.15		

表5-1B 17号样品柔毛淫羊藿

样品称量/g	淫羊藿苷量/mg	加入标准品量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.088	1.35	0.80	2.14	98.75		
0.090	1.38	1.2	2.55	97.5	96.25	3.436
0.091	1.39	1.6	2.87	92.5		

表5-1C 23号样品加样回收率

样品称量/g	淫羊藿苷量/mg	加入标准品量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.1	0.537	0.3	0.84	101.6		
0.103	0.553	0.4	0.946	98.25	97.42	4.781
0.102	0.548	0.5	1.01	92.4		

以2号黔岭淫羊藿(叶)、12号箭叶淫羊藿(叶)作样品,在其生药中分别定量加入对照品溶液后,同上述供试品溶液制备法制备进样液,根据回归方程2分别测得回收率,见表5-2A、5-2B。

表5-2A 2号样品加样回收率

样品称量/g	淫羊藿苷量/mg	加入标准品量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.294	9.03	5	12.9	77.4		
0.296	9.09	10	17.14	88.5	82.16	6.95
0.303	9.3	15	21.4	80.6		

2.6 样品测定

称取淫羊藿叶的样品约0.08g,淫羊藿根或茎的样

表 5 - 2B 12 号样品加样回收率

样品称量/g	淫羊藿苷量/mg	加入标准品量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.316	24.1	40	60.3	88.0		
0.316	24.1	80	106	81.8	83.2	5.14
0.318	24.2	100	104	79.8		

品约 0.3g,以 10ml 甲醇超声提取 30min,冷却,定容 10ml,离心,上清液经 0.45um 滤膜滤过,进样 20ul,分别测得各种样品中淫羊藿苷的含量,综合结果见表 6 - A.6 - B.6 - C 色谱图见图 4。

表 6 - A 不同品种的叶中淫羊藿苷含量的比较

品 种	部 位	来 源	含量/%			平均含量/%	CV/%
黔岭淫羊藿	叶	市售	0.00299	0.00312	0.00311	0.00307	0.0921
黔岭淫羊藿	叶	贵州	0.00349	0.00384	0.00357	0.00363	5.0495
巫山淫羊藿	叶	陕西	0.456	0.423	0.450	0.443	3.968
箭叶淫羊藿	叶	陕西	1.49	1.60	1.48	1.55	4.37
箭叶淫羊藿	叶	安徽	0.0351	0.0393	0.0361	0.0368	5.963
箭叶淫羊藿	叶	广西	0.328	0.3312	0.341	0.334	1.997
宝兴淫羊藿	叶	云南	0.538	0.559	0.588	0.562	4.468
柔毛淫羊藿	叶	四川	1.54	1.51	1.54	1.53	1.132
朝鲜淫羊藿	叶	洛阳	0.727	0.725	0.698	0.717	2.26

表 6 - B 不同品种的茎中淫羊藿苷含量的比较

品 种	部 位	来 源	含量/%			平均含量/%	RSD/%
黔岭淫羊藿	茎	贵州	0.0446	0.0472	0.0429	0.0449	4.8
巫山淫羊藿	茎	陕西	0.0278	0.0292	0.0291	0.0287	2.72
箭叶淫羊藿	茎	陕西	0.0351	0.393	0.0361	0.0368	5.963
箭叶淫羊藿	茎	安徽	0.00775	0.00796	0.00715	0.00762	5.516
宝兴淫羊藿	茎	云南	0.0412	0.0391	0.0383	0.0395	3.789
柔毛淫羊藿	茎	四川	0.0521	0.0529	0.0512	0.0521	1.634

表 6 - C 不同品种的叶茎中淫羊藿苷含量的比较

品 种	部 位	来 源	含量/%			平均含量/%	RSD/%
巫山淫羊藿	叶茎	贵州	0.0758	0.0748	0.0754	0.0753	0.812
宝兴淫羊藿	叶茎	湖南	0.0362	0.0384	0.0372	0.0373	2.956
朝鲜淫羊藿	叶茎	辽宁	0.362	0.382	0.394	0.379	4.267
朝鲜淫羊藿	叶茎	青海	0.399	0.407	0.410	0.405	1.408
淫羊藿	叶茎	无锡	0.372	0.346	0.357	0.358	3.647
淫羊藿	叶茎	浙江	0.745	0.683	0.715	0.714	4.343
淫羊藿	叶茎	陕西	0.536	0.549	0.528	0.537	1.98
巫山淫羊藿	根	陕西	0.0518	0.0532	0.0529	0.0526	1.40

3 讨 论

3.1 本文采用 RP-HPLC 技术对不同产地、不同品种淫羊藿中淫羊藿苷的含量进行了比较研究。为探求高质量的淫羊藿品种和产地,筛选优良品种和扩大药源提供了简便易行的方法。

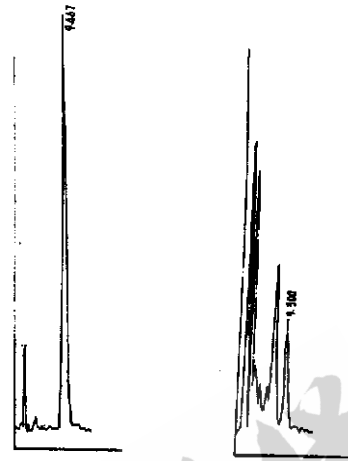


图 4 淫羊藿苷标准品与 21 号样品淫羊藿的 HPLC 图谱

1 - 淫羊藿苷标准品;2 - 21 号样品淫羊藿

3.2 实验结果表明,不同品种、不同产地、不同药用部位的淫羊藿中淫羊藿苷的含量相差是十分悬殊的,其在植株中的分布是叶 > 叶茎 > 茎 > 根。从药典的要求来看,叶中含量应 > 1%,在本实验所分析的样品中,仅陕西产的箭叶淫羊藿和上厂四川产的柔毛淫羊藿才符合药典标准,即使是药典收录的巫山和朝鲜淫羊藿也不合格(见表 6 - A)。

3.3 根据淫羊藿的药用部位为地上部分来看,不同产地的朝鲜淫羊藿和淫羊藿品种其淫羊藿苷含量均较高,可达 0.3% ~ 0.7%(见表 6 - C),不同品种不同产地的淫羊藿茎和根的含量甚低(见表 6 - B),不宜单独使用。

3.4 黔岭淫羊藿和宝兴淫羊藿为非药典收录品种,前者叶中淫羊藿苷的含量甚微,仅达十万分之几;后者叶中含量尚可,达 0.5%,但叶茎中含量甚低,其含量分布与药典收录的巫山淫羊藿接近。

参 考 文 献

- 1 朱品红,林红宁.一阶导数光谱法测定抗骨增生片中淫羊藿的总黄酮量.中成药,1991,13(8):12.
- 2 卢印英.二阶导数光谱法测定健阳片中淫羊藿甙的含量.中国中药杂志,1992,17(11):670.
- 3 杨锡,罗兴平.双波长高效薄层扫描法测定淫羊藿及其制剂雄风胶囊中淫羊藿甙含量.中草药,1993,24(10):520.
- 4 石上梅,田金改.高效薄层扫描法测定复方淫羊藿口服液中淫羊藿甙的含量.中药新药与临床药理,1994,5(2):41.
- 5 杨光,王远明,王哲.一阶导数紫外分光光度法测定复方巴戟天补肾胶囊中淫羊藿甙含量.中成药,1994,16(5):10.

- 6 代龙,何慧,朱武成.薄层紫外分光光度法测降压颗粒中淫羊藿甙的含量.中药新药与临床药理,1997,8(1):41.
- 7 何顺志,郭宝林.贵州产淫羊藿的质量研究.药物分析杂志,1996,16(5):291.
- 8 张艺,肖崇厚,钟国跃,等.HPLC法测川产淫羊藿属植物的淫羊藿甙含量.中国中药杂志,1995,20(5):265.
- 9 李小洪,吕居娴,郭增军,等.陕西产淫羊藿根茎组织构造的研究及HPLC法测定淫羊藿甙的含量.西安医科大学学报,1997,18(4):479.
- 10 郭宝林,肖培根.四川产淫羊藿属植物的黄酮类成分分析.华西药学杂志,1996,11(2):77.
- 11 郭宝林,王春兰,肖培根.HPLC法分析淫羊藿的黄酮类成分.西北药学杂志,1996,11(5):201.
- 12 郭宝林,肖培根.5种淫羊藿的不同部位的黄酮类成分分析.中国中药杂志,1996,21(9):523.
- 13 孔令义,李意.淫羊藿降压有效部位中活性成分淫羊藿甙含量.中草药,1997,28(11):656.
- 14 郭宝林,王春兰,陈健民,等.药典内5种淫羊藿中黄酮类成分的反相HPLC分析.药学学报,1996,31(4):292.

收稿日期:1999-03-22