

一测多评法测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 A、B、C

徐文芬¹, 杨 雯¹, 何顺志^{1*}, 王悦云¹, 杨相波², 贺 勇²

1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

2. 贵州同济堂制药有限公司, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 建立一测多评(QAMS)法测定淫羊藿中的黄酮类成分, 以提高淫羊藿药材的质量控制水平。方法 采用 HPLC 法, 检测波长为 270 nm, 在一定的线性范围内, 测定淫羊藿苷与朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的相对校正因子, 并考察不同色谱柱、不同仪器测定各成分相对校正因子的重现性, 以淫羊藿苷为对照品, 用所建立的相对校正因子计算淫羊藿药材中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的量; 同时采用外标法测定 100 批淫羊藿药材中 4 种成分的量, 以验证 QAMS 法的准确性和科学性。结果 所建立各成分的相对校正因子重现性良好, 分别为 1.352、1.384、1.340, 其 RSD 值均小于 5%, 采用该校正因子计算的朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的量与外标法实测值之间没有显著性差异。结论 该方法准确可靠, 简便可行, 且节约对照品及检测成本, 该方法可以作为淫羊藿药材多指标成分测定质量控制方法。

关键词: 淫羊藿; 一测多评法; 相对校正因子; 外标法; 质量控制方法; 淫羊藿苷; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0130-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.020

Determination of icariin, epimedin A, epimedin B, and epimedin C in *Epimedii Herba* by QAMS

XU Wen-fen¹, YANG Wen¹, HE Shun-zhi¹, WANG Yue-yun¹, YANG Xiang-bo², HE Yong²

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

2. Guizhou Tongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for determining the flavonoids in *Epimedii Herba* and improve the level of quality control of *Epimedii Herba* by applying multi-index components control. **Methods** To detect a relative correction factor (RCF) of epimedin A, epimedin B, epimedin C, and icariin at detection wavelength of 270 nm by HPLC in the range of a linear, to investigate the reproducibility of RCF in different chromatographic columns and different instruments as well, to consider icariin as an internal standard, to calculate the contents of epimedin A, epimedin B, and epimedin C in *Epimedii Herba* by using RCF; Meanwhile, to analyze the content of the four components in 100 *Epimedii Herba* by external standard method (ESM) and verify the accuracy and scientificity of QAMS. **Results** The RCF had a good reproducibility, which were 1.352, 1.384, and 1.340. The values of RSD were less than 5%; No significant differences were found in the quantitative results of epimedin A, epimedin B, and epimedin C determined by using RCF and ESM. **Conclusion** This method could be accurate and reliable, simple and feasible, which could save the reference and costs of testing. It further validates that this approach can be used as a quality control method for the determination of multi-component index in *Epimedii Herba*.

Key words: *Epimedii Herba*; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; external standard method; quality control method; icariin; epimedin A; epimedin B; epimedin C

淫羊藿 *Epimedii Herba* 为用药悠久的传统中药之一, 也是贵州常用的重要苗药, 来源于小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 *Epimedium* L. 植物, 具

有补肾阳、强筋骨、助阳益精等功效, 主治阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛等症。现代临床上还常用于治疗骨质疏松、更年期综合症、乳房

收稿日期: 2015-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160506); 贵阳市科技局科技特派员项目 (筑科合[2011207]21 号); 贵州省科技厅和贵阳中医学院联合资金资助项目 [黔科合中药字 (2010) LKZ7026 号]

作者简介: 徐文芬 (1964—), 女, 教授, 主要从事中药、民族药质量控制研究。Tel: 13885036055 E-mail: wenfenu@126.com

*通信作者 何顺志 (1954—), 男, 教授, 主要从事中药资源及质量控制研究。Tel: (0851)5924317 13985142971 E-mail: hesz8899@126.com

肿块、高血压、冠心病等疾病,另外尚具有免疫增强、抗衰老、抗肿瘤、抗艾滋病等作用,受到国内外广泛关注。淫羊藿药材为多来源品种,《中国药典》2010年版收载5种,即淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai、巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying^[1]。《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003年版收载4种,分别为粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum* Franch.、天平山淫羊藿 *Epimedium myrianthum* Stearn、毡毛淫羊藿 *Epimedium coactum* H. R. Liang et W. M. Yah、黔岭淫羊藿 *Epimedium leptorrhizum* Stearn^[2]。

近年来,已有采用外标法(ESM)同时测定淫羊藿中朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷4个指标成分的报道^[3-5],这些方法由于朝藿定A、B、C对照品的价格昂贵且不容易获得,难以在实际工作中广泛应用,限制了该药材多指标成分质量控制模式的实现。针对这一问题,王智民等^[6]进行了“一测多评”(QAMS)的研究,即利用有效化学成分间内在的函数关系和比例关系,只测定1个成分(对照品可得到、廉价者),来实现对多个成分(对照品没有或难以得到者)的同步监控,该研究思路已经在众多药材或复方制剂中得到验证和广泛应用^[7-10],于霄等^[11]虽然建立QAMS法测定了巫山淫羊藿、柔毛淫羊藿及朝鲜淫羊藿共计12批药材含量,但根据QAMS法建立的技术指南,测定样品数据要求应 ≥ 30 批验证QAMS法的可行性,方法可行性和可重复性的再验证样品应 ≥ 10 批^[12]。所以对于该方法是否可作为淫羊藿药材多指标成分质控方法,有必要以更多样品测定进一步验证方法的可靠性。笔者自20世纪90年代以来对中国淫羊藿属药用植物的种类、地理分布、质量控制及民间用药情况等进行了研究,相继发现一些新种,目前中国淫羊藿属药用植物的种类近50种,除上述标准中收载的种类以外,其余大部分种类在贵州民间特别是苗族聚居地区长期作淫羊藿入药^[13-16],本实验收集了包括标准收载种类共计39种100批淫羊藿药材,采用HPLC法,以淫羊藿苷(易得、廉价、有效)为内参物,进行QAMS方法学考察试验研究,同时采用ESM同步测定,以大量样本进一步验证QAMS法测定淫羊藿药材中多个黄酮类成分的方法可行性及适用性,为实现淫羊藿药材多成分的同时测定提供

可靠的相对校正因子,计算朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C量及其色谱峰保留值定位,克服多指标成分同时测定质量控制模式存在的对照品短缺、操作繁琐及检测成本高等缺点,为提高淫羊藿药材质量水平及相关产业生产提供理论依据,同时也为淫羊藿优良物质资源的内在品质评价奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100和1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),安捷伦液相色谱系统化学工作站,DAD检测器;Waters2487型高效液相色谱仪(美国Waters公司);岛津LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。AG135型电子分析天平(Mettler Toledo)。色谱柱Agilent Zorbax SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),Agilent Zorbax XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),Agilent Zorbax Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Diamondsil(钻石)-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Phenomenex(250 mm×4.6 mm, 5 μm);依利特Hypersil-ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Agilent Zorbax SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm, USCM030053)等。

1.2 试剂

朝藿定A对照品(批号MUST-13040209,质量分数 $\geq 98\%$),朝藿定B对照品(批号MUST-13062312,质量分数 $\geq 98\%$),均购于北京神州科创生物科技有限公司;淫羊藿苷对照品(批号110737-200312)、朝藿定C对照品(批号110756-200110),均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯),实验用水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。所有供试淫羊藿药材的叶,均于2013年4~5月在淫羊藿主产地贵州、四川、陕西、湖南、湖北、重庆、吉林等采集,并经贵阳中医学院何顺志教授鉴定,晒干,粉碎过三号筛,置于硅胶干燥器中备用,供试淫羊藿药材采集信息详见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(23:77);体积流量1.0 mL/min;检测波长270 nm;柱温30℃;进样量10 μL。

2.2 混合对照品溶液制备

分别精密称取朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解并分别制成质量浓度分别为0.2256 mg/mL的朝藿定A溶液,0.2212

表 1 样本信息

Table 1 Information of samples

序号	种类	拉丁学名	产地	序号	种类	拉丁学名	产地
1	柔毛淫羊藿	<i>E. pubescens</i>	四川	51	拟巫山淫羊藿		贵州
2	柔毛淫羊藿		陕西南镇	52	拟巫山淫羊藿		贵州雷山连城河口
3	箭叶淫羊藿	<i>E. sagittatum</i>	广东	53	拟巫山淫羊藿		贵州雷山黄泥
4	箭叶淫羊藿		湖南	54	拟巫山淫羊藿		贵州龙里湾寨
5	箭叶淫羊藿		安徽黄山	55	拟巫山淫羊藿		贵州雷山西江
6	箭叶淫羊藿		不详	56	拟巫山淫羊藿		贵州雷山桃子寨
7	箭叶淫羊藿		安徽金寨	57	拟巫山淫羊藿		贵州龙里猴子沟
8	朝鲜淫羊藿	<i>E. koreanum</i>	吉林	58	直距淫羊藿	<i>E. mikinorii</i>	湖北恩施
9	淫羊藿	<i>E. brevicornu</i>	甘肃榆中	59	直距淫羊藿		湖北咸丰
10	巫山淫羊藿	<i>E. wushanense</i>	不详	60	直距淫羊藿		不详
11	巫山淫羊藿		四川巴中	61	直距淫羊藿		不详
12	巫山淫羊藿		不详	62	直距淫羊藿		不详
13	巫山淫羊藿		湖北巴东	63	绿药淫羊藿	<i>E. chlorandrum</i>	不详
14	巫山淫羊藿		不详	64	绿药淫羊藿		不详
15	粗毛淫羊藿	<i>E. acuminatum</i>	不详	65	湖南淫羊藿	<i>E. hunanense</i>	湖南新宁
16	粗毛淫羊藿		重庆武隆	66	湖南淫羊藿		广西资源
17	粗毛淫羊藿		不详	67	湖南淫羊藿		湖北鹤峰
18	粗毛淫羊藿		贵州	68	德务淫羊藿	<i>E. dewuense</i>	贵州德江
19	粗毛淫羊藿		贵州	69	竹山淫羊藿	<i>E. zhushanense</i>	湖北竹山
20	粗毛淫羊藿		贵州龙里草原	70	保靖淫羊藿	<i>E. baojingense</i>	湖南吉首
21	粗毛淫羊藿		贵州贵阳二戈寨	71	保靖淫羊藿		湖南永顺
22	粗毛淫羊藿		贵州贵定	72	保靖淫羊藿		湖南城步
23	粗毛淫羊藿		贵州龙里湾寨	73	偏斜淫羊藿	<i>E. truncatum</i>	湖南张家界
24	粗毛淫羊藿		贵州桐梓	74	无距淫羊藿	<i>E. ecalcaratum</i>	四川宝兴
25	粗毛淫羊藿		贵州贵阳永乐	75	川鄂淫羊藿	<i>E. fargesii</i>	重庆巫溪
26	粗毛淫羊藿		贵州开阳	76	恩施淫羊藿	<i>E. ensiense</i>	湖北恩施
27	粗毛淫羊藿		贵州龙里大草原	77	长蕊淫羊藿	<i>E. dolichostemon</i>	湖北利川
28	粗毛淫羊藿		贵州务川	78	长蕊淫羊藿		贵州务川
29	粗毛淫羊藿		贵州贵阳乌当水田	79	单叶淫羊藿	<i>E. simplicifolium</i>	贵州绥阳
30	粗毛淫羊藿		贵州贵阳乌当百宜	80	黔北淫羊藿	<i>E. boreali-guizhouense</i>	贵州沿河
31	粗毛淫羊藿		贵州金沙	81	普定淫羊藿	<i>E. pudingense</i>	贵州普定
32	天平山淫羊藿	<i>E. myrianthum</i>	贵州天柱 1	82	时珍淫羊藿	<i>E. lishihchenii</i>	江西
33	天平山淫羊藿		贵州	83	时珍淫羊藿		贵州万山
34	天平山淫羊藿		湖南	84	木鱼坪淫羊藿	<i>E. franchetii</i>	不详
35	天平山淫羊藿		贵州江口	85	木鱼坪淫羊藿		湖北建始
36	天平山淫羊藿		不详	86	茂汶淫羊藿	<i>E. platypetalum</i>	四川泸定
37	天平山淫羊藿		湖南芷江	87	星花淫羊藿	<i>E. stellulatum</i>	不详
38	天平山淫羊藿		广东革乐	88	腺毛淫羊藿	<i>E. glandulosopilosum</i>	不详
39	天平山淫羊藿		贵州天柱 2	89	天全淫羊藿	<i>E. flavum</i>	不详
40	天平山淫羊藿		贵州剑河	90	膜质淫羊藿	<i>E. membranaceum</i>	贵州赫章
41	天平山淫羊藿		贵州	91	膜质淫羊藿		不详
42	天平山淫羊藿		湖南桑植	92	膜质淫羊藿		不详
43	天平山淫羊藿		令同	93	少花淫羊藿	<i>E. pauciflorum</i>	四川汶川
44	黔岭淫羊藿	<i>E. leptorrhizum</i>	不详	94	四川淫羊藿	<i>E. sutchuenense</i>	贵州务川
45	黔岭淫羊藿		贵州	95	宝兴淫羊藿	<i>E. davidii</i>	四川宝兴
46	黔岭淫羊藿		贵州龙里猴子沟	96	方氏淫羊藿	<i>E. fangii</i>	四川
47	黔岭淫羊藿		贵州余庆兴关	97	川西淫羊藿	<i>E. elongatum</i>	四川
48	毡毛淫羊藿	<i>E. coactum</i>	贵州剑河南脚	98	贵州淫羊藿	<i>E. sagittatum</i> var. <i>guizhouense</i>	贵州开阳
49	毡毛淫羊藿		贵州剑河岩寨	99	万山淫羊藿 (待定)	<i>E. wanshanense</i>	贵州万山
50	拟巫山淫羊藿	<i>E. pseudowushanense</i>	贵州	100	荔波淫羊藿 (待定)	<i>E. liboense</i>	贵州荔波

mg/mL 的朝藿定 B 溶液, 1.310 mg/mL 的朝藿定 C 溶液, 0.450 0 mg/mL 的淫羊藿苷单一对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取淫羊藿药材粉末约 0.2 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 20 mL, 称定质量, 超声提取 (功率为 100 W) 1 h, 取出放冷, 再称定质量, 加稀乙醇补足减失质量, 滤过, 取续滤液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 专属性考察试验

精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定, 记录色谱图, 结果表明, 供试品图谱中 1、2、3、4 号色谱峰的保留时间和与 4 个对照品一致, 且其纯度因子依次为 979.820、981.999、987.338、975.646, 峰纯度良好, 表明该方法具有专属性, 结果见图 1。

2.5 标准曲线的绘制

分别精密吸取不同体积“2.2”项下制备的单一对照品储备液, 混合稀释制成 6 个系列质量浓度混合对照品溶液 (朝藿定 A: 4.230、14.10、28.20、56.40、112.8、225.6 $\mu\text{g/mL}$; 朝藿定 B: 4.148、13.82、27.63、

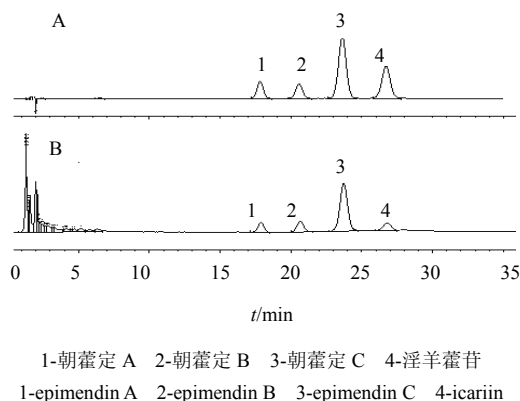


图 1 混合对照品 (A) 和淫羊藿样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and sample (B)

55.30、110.6、221.2 $\mu\text{g/mL}$; 朝藿定 C: 13.41、33.54、83.84、209.6、524.0、1 310 $\mu\text{g/mL}$; 淫羊藿苷: 2.304、11.52、28.80、72.00、180.0、450.0 $\mu\text{g/mL}$), 分别精密吸取系列质量浓度混合对照品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定其峰面积, 每个质量浓度重复进样 3 次, 取平均值, 以对照品进样量为横坐标 (X), 峰面积平均值为纵坐标 (Y), 进行回归计算, 得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的回归方程及相关系数, 结果见表 2。

表 2 淫羊藿药材中 4 个黄酮成分回归方程和线性范围

Table 2 Standard curves of four flavonoids in *Epimedii Herba*

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
朝藿定 A	$Y=1\ 604.758\ 45\ X+3.667\ 073\ 9$	0.999 99	0.042 30~2.256
朝藿定 B	$Y=1\ 560.200\ 06\ X+8.349\ 361\ 1$	0.999 99	0.041 48~2.212
朝藿定 C	$Y=1\ 606.268\ 97\ X+48.535\ 437$	0.999 97	0.134 10~13.100
淫羊藿苷	$Y=2\ 178.084\ 11\ X+2.801\ 849\ 7$	1.000 00	0.023 04~4.500

2.6 校正因子的计算

分别精密吸取“2.5”项下制备的系列质量浓度混合对照品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下, 进样测定, 以淫羊藿苷为内参物, 按公式 $f_{si}=f_s/f_i=(A_s \times C_i)/(A_i \times C_s)$ (A_s 、 C_s 分别为内参物对照品的峰面积和浓度, A_i 、 C_i 分别为待测成分对照品的峰面积和浓度) 计算淫羊藿苷 (简称 S) 对朝藿定 A (简称 A)、朝藿定 B (简称 B)、朝藿定 C (简称 C) 的相对校正因子 $f_{S/A}$ 、 $f_{S/B}$ 、 $f_{S/C}$, 结果见表 3。

2.7 精密度试验

精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下, 重复进样 7 次, 测得峰面积, 计算峰面积的 RSD, 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的 RSD 分别为 0.74%、0.96%、0.51%、0.33%, 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

表 3 淫羊藿药材中 4 个黄酮成分的相对校正因子

Table 3 RCFS of four flavonoids in *Epimedii Herba*

实验编号	$f_{S/A}$	$f_{S/B}$	$f_{S/C}$
1	1.334	1.376	1.331
2	1.365	1.390	1.368
3	1.341	1.380	1.322
4	1.352	1.377	1.332
5	1.366	1.384	1.331
6	1.354	1.395	1.356
平均值	1.352	1.384	1.340
RSD/%	0.940	0.55	1.300

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 (15 号样品) 10 μL , 分别于 0、3、6、9、12、24 h, 注入液相色谱仪进行分析, 计算各组峰面积的 RSD, 朝藿定 A、朝

藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的 RSD 分别为 0.42%、0.35%、0.32%、1.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取同一淫羊藿样品（15 号样品）6 份，每份约 0.2 g，精密称定，按“2.3”项方法制备供试液，在上述色谱条件下进行测定，计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的平均质量分数分别为 0.28%、0.36%、1.71%、0.21%，其 RSD 分别为 2.2%、2.1%、2.0%、2.2%，结果表明用本法测定时重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已测定的淫羊藿样品（15 号样品）9 份，每份约 0.1 g，精密称定，分别精密加入朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷对照品溶液适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下分别测定，分别计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的平均回收率依次为 102.21%、100.56%、104.15%、100.44%，RSD 值依次为 2.5%、2.3%、0.63%、1.2%，表明本方法测定准确度高。

2.11 不同仪器及色谱柱对相对校正因子的影响

本实验考察了 4 个实验室的“1.1”项下的 4 种高效液相色谱系统和 8 只不同型号色谱柱。分别精密吸取“2.5”项下制备的系列质量浓度混合对照品

溶液 10 μL，在上述色谱条件下，进样测定，计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对淫羊藿苷的相对校正因子，依次在 1.274~1.361、1.330~1.494、1.242~1.340，不同仪器不同色谱柱所得相对校正因子的 RSD 值在 0.74%~3.7%，不同仪器同一色谱柱所得相对校正因子的 RSD 值在 0.28%~4.8%，表明不同仪器和色谱柱对各成分的相对校正因子无显著影响，结果见表 4。

2.12 待测组分色谱峰的定位参数考察

建立 QAMS 法的目的是只使用一种对照品即淫羊藿苷，利用待测成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对于淫羊藿苷的保留时间差或相对保留时间作为定位标准，本实验考察了这 2 个参数在不同仪器和不同规格色谱柱中的重复性。结果表明：不同仪器不同色谱柱各成分的保留时间差波动较大，RSD 值为 40.6%~49.2%。而在同样条件下，不同仪器不同色谱柱各成分的相对保留时间波动较小，朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 相对保留时间的 RSD 值分别为 0.65%~0.74%、0.75%~0.84%、0.86%~0.95%，不同仪器、不同色谱柱各成分的相对保留时间 RSD 值为 2.8%~3.5%，不同仪器、同一色谱柱各成分相对保留时间的 RSD 值为 0.57%~1.8%。因此认为选用相对保留时间这一参数作为淫羊藿药材中待测成分色谱峰的定位指标是比较合理的，结果见表 4。

表 4 相对校正因子、保留时间差及相对保留时间考察结果 (n = 3)

Table 4 Investigation on RCF, retention time difference, and relative retention time (n = 3)

仪器型号	色谱柱	相对校正因子			保留时间差/min			相对保留时间		
		$f_{S/A}$	$f_{S/B}$	$f_{S/C}$	Δt_A	Δt_B	Δt_C	t_{RA}	t_{RB}	t_{RC}
Agilent 1100 型	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM014766)	1.274	1.332	1.301	8.96	6.21	3.12	0.67	0.77	0.88
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM030053)	1.282	1.346	1.311	8.98	6.18	2.86	0.68	0.78	0.90
	Agilent Zorbax XDB-C ₁₈	1.309	1.354	1.309	8.15	5.65	2.73	0.67	0.77	0.89
	Agilent Zorbax Extend-C ₁₈	1.301	1.365	1.340	8.76	6.26	3.14	0.68	0.77	0.88
	Phenomenex synergi 4u Hydro-RP 80A	1.332	1.349	1.309	17.46	11.40	4.06	0.71	0.81	0.93
	依利特 Hypersil-ODS2	1.343	1.379	1.333	11.32	7.09	2.25	0.74	0.84	0.95
	Welchrom-C ₁₈	1.337	1.364	1.300	18.35	12.41	4.89	0.70	0.80	0.92
	Diamonsil (钻石)-C ₁₈	1.354	1.494	1.242	24.34	15.83	6.90	0.70	0.80	0.92
RSD/%		2.200	3.700	2.300	45.30	43.00	40.60	3.40	3.10	2.80

续表 4

仪器型号	色谱柱	相对校正因子			保留时间差/min			相对保留时间		
		$f_{S/A}$	$f_{S/B}$	$f_{S/C}$	Δt_A	Δt_B	Δt_C	t_{RA}	t_{RB}	t_{RC}
Agilent 1260 型	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM014766)	1.306	1.366	1.332	7.00	4.93	2.70	0.66	0.76	0.87
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM030053)	1.297	1.362	1.338	7.01	4.92	2.50	0.67	0.77	0.88
	Agilent Zorbax XDB-C ₁₈	1.300	1.352	1.337	6.31	4.47	2.35	0.66	0.76	0.87
	Agilent Zorbax Extend-C ₁₈	1.304	1.357	1.332	7.51	5.44	2.92	0.67	0.76	0.87
	Phenomenex synergis 4u Hydro-RP 80A	1.293	1.330	1.310	15.46	10.29	4.15	0.70	0.80	0.92
	依利特 Hypersil-ODS2	1.318	1.355	1.338	9.69	6.23	2.31	0.73	0.83	0.94
	Welchrom- C ₁₈	1.285	1.346	1.334	15.40	10.67	4.79	0.69	0.78	0.90
	Diamonsil (钻石) -C ₁₈	1.314	1.350	1.321	20.54	13.69	6.66	0.68	0.79	0.90
	RSD/%	0.830	0.820	0.740	47.80	45.80	43.60	3.50	3.20	2.90
日本岛津 LC-20AT 型	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM014766)	1.291	1.345	1.308	8.15	5.83	3.38	0.65	0.75	0.86
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM030053)	1.299	1.342	1.318	8.25	5.86	3.16	0.66	0.76	0.87
	Agilent Zorbax XDB-C ₁₈	1.300	1.346	1.326	7.27	5.22	2.91	0.66	0.75	0.86
	Agilent Zorbax Extend-C ₁₈	1.295	1.352	1.331	8.79	6.41	3.56	0.67	0.76	0.87
	Phenomenex synergis 4u Hydro-RP 80A	1.308	1.355	1.293	18.51	12.50	5.37	0.70	0.80	0.91
	依利特 Hypersil-ODS2	1.330	1.366	1.329	11.55	7.48	2.97	0.72	0.82	0.93
	Welchrom- C ₁₈	1.302	1.358	1.317	17.77	12.49	5.92	0.68	0.78	0.89
	Diamonsil (钻石) -C ₁₈	1.361	1.440	1.320	24.86	16.77	8.69	0.67	0.78	0.89
	RSD/%	1.800	2.4000	0.940	49.20	47.10	45.40	3.40	3.20	2.80
Waters 2487 型	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM014766)	1.299	1.358	1.328	8.51	6.01	3.33	0.65	0.75	0.86
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ (USCM030053)	1.304	1.363	1.333	8.47	5.77	3.00	0.67	0.77	0.88
	Agilent Zorbax XDB-C ₁₈	1.304	1.341	1.319	7.40	5.27	2.81	0.67	0.76	0.87
	Agilent Zorbax Extend-C ₁₈	1.298	1.348	1.325	9.42	6.77	3.63	0.66	0.76	0.87
	Phenomenex synergis 4u Hydro-RP 80A	1.293	1.336	1.307	18.99	12.79	5.16	0.71	0.80	0.92
	依利特 Hypersil-ODS2	1.326	1.365	1.333	12.19	7.71	2.89	0.72	0.83	0.94
	Welchrom-C ₁₈	1.301	1.361	1.327	18.66	12.94	5.84	0.68	0.78	0.90
	Diamonsil (钻石) -C ₁₈	1.327	1.361	1.303	25.37	16.85	8.22	0.68	0.79	0.90
	RSD/%	0.98	0.82	0.86	48.30	46.70	44.00	3.50	3.40	3.10

2.13 样品测定

取淫羊藿药材样品, 共计 100 批次, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 进样测定, 记录朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷色谱峰峰面积, 分别采用外标一点法和 QAMS 法, 分别计算干品药材中 4 个成分的量, 并对 2 种方法测定结果进行比较, 结果见表 5。

3 讨论

本实验无论是不同仪器、不同色谱柱还是不同仪器、同一色谱柱, 测定得到淫羊藿各成分相对校正因子、相对保留时间的 RSD 均小于 5%,

符合 QAMS 法方法学研究的耐用性考察要求, 所测定的各成分相对校正因子重现性好, 相对保留时间定位准确。采用 ESM 测定淫羊藿各成分的含量与通过 QAMS 法计算得到的量进行比较, t 检验结果为 $P > 0.05$, 表明两种方法测定所得的量没有显著性的差异, 结果准确可靠, 方法可行且适用性强, 进一步验证了 QAMS 法可作为淫羊藿药材多指标成分质控方法, 各成分峰位以其相对保留时间定位, 应在规定值的 5%~5% 内, 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的相对保留时间/相对校正因子规定值分别为 0.68/1.352、0.78/1.384、0.90/1.340。

表 5 样品测定结果 (n = 3)

Table 5 Determination of samples (n = 3)

序号	淫羊藿苷/%		朝藿定 A/%		朝藿定 B/%		朝藿定 C/%		序号	淫羊藿苷/%		朝藿定 A/%		朝藿定 B/%		朝藿定 C/%	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
1	2.18	0.50	0.50	0.65	0.65	0.90	0.92	51	0.18	0.13	0.13	0.15	0.15	0.70	0.69		
2	0.56	0.36	0.36	0.57	0.57	1.29	1.31	52	0.49	0.30	0.31	0.35	0.39	4.75	4.58		
3	0.08	0.06	0.07	0.01	0.01	2.32	2.40	53	0.40	0.23	0.23	0.28	0.28	4.38	4.39		
4	2.51	0.18	0.18	0.22	0.22	5.92	5.98	54	0.36	0.16	0.16	0.17	0.17	5.23	5.26		
5	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.12	0.12	55	0.99	0.38	0.38	0.40	0.39	5.89	5.90		
6	0.36	0.12	0.13	0.17	0.17	3.64	3.67	56	1.02	0.29	0.29	0.31	0.31	8.77	8.81		
7	0.39	0.90	0.89	1.34	1.34	0.39	0.40	57	0.92	0.30	0.31	0.38	0.35	4.53	4.72		
8	1.62	0.46	0.45	0.80	0.80	0.49	0.48	58	0.06	0.04	0.04	0.03	0.04	0.27	0.25		
9	1.35	0.35	0.35	2.30	2.27	0.76	0.77	59	—	—	—	—	—	—	—		
10	0.34	0.20	0.20	0.25	0.25	3.13	3.15	60	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.63	0.62		
11	1.10	0.10	0.10	0.18	0.18	3.61	3.69	61	—	—	—	—	—	—	—		
12	0.35	0.24	0.24	0.24	0.28	3.22	3.25	62	0.01	0.01	0.01	—	—	0.09	0.04		
13	0.26	0.26	0.26	0.27	0.27	2.15	2.16	63	0.01	—	—	—	—	1.02	1.22		
14	0.16	0.12	0.13	0.17	0.19	1.00	1.06	64	0.63	—	—	—	—	0.01	0.01		
15	0.24	0.32	0.22	0.32	0.32	1.79	1.81	65	0.48	0.54	0.54	0.77	0.72	1.02	1.03		
16	0.41	0.32	0.33	0.44	0.44	1.11	1.12	66	0.21	0.13	0.13	0.19	0.18	0.49	0.49		
17	0.16	0.16	0.15	0.22	0.22	0.94	0.93	67	0.12	0.17	0.17	0.22	0.22	0.56	0.56		
18	0.30	0.22	0.23	0.37	0.37	1.79	1.80	68	0.32	0.30	0.30	0.27	0.33	2.67	2.70		
19	0.25	0.07	0.07	0.10	0.11	2.26	2.29	69	—	—	—	—	—	—	—		
20	0.73	0.31	0.31	0.36	0.36	2.71	2.72	70	—	—	—	—	—	—	—		
21	0.99	0.39	0.39	0.43	0.43	3.45	3.47	71	—	—	—	—	—	—	—		
22	1.80	0.83	0.84	0.97	0.97	8.65	8.71	72	—	—	—	—	—	—	—		
23	0.53	0.34	0.34	0.39	0.39	2.28	2.29	73	0.01	0.29	—	—	—	6.07	7.21		
24	0.19	0.06	0.07	0.11	0.11	0.58	0.59	74	0.83	0.42	0.42	0.50	0.50	0.83	0.83		
25	0.81	0.24	0.24	0.27	0.27	2.84	2.85	75	0.28	0.21	0.22	0.26	0.26	1.51	1.56		
26	0.43	0.23	0.23	0.26	0.26	1.53	1.55	76	—	—	—	—	—	—	—		
27	0.70	0.29	0.29	0.34	0.34	2.38	2.39	77	0.37	0.15	0.16	0.19	0.19	0.95	0.96		
28	0.97	0.41	0.41	0.46	0.46	3.15	3.17	78	0.19	0.08	0.08	0.10	0.10	0.49	0.48		
29	0.43	0.16	0.17	0.18	0.18	1.56	1.58	79	0.53	0.53	0.52	0.69	0.69	3.27	3.29		
30	0.44	0.26	0.27	0.31	0.31	1.42	1.44	80	1.07	0.41	0.41	0.00	0.00	3.19	3.20		
31	0.35	0.14	0.14	0.19	0.20	1.08	1.10	81	0.81	0.46	0.46	0.53	0.53	2.59	2.61		
32	0.28	0.05	0.05	0.18	0.18	6.76	6.91	82	—	—	—	—	—	—	—		
33	0.64	0.46	0.46	0.53	0.53	0.93	0.94	83	—	—	—	—	—	—	—		
34	0.58	0.62	0.62	0.72	0.72	4.29	4.31	84	—	—	—	—	—	—	—		
35	4.60	0.65	0.65	0.63	0.63	4.31	4.35	85	0.13	0.08	0.08	0.12	0.12	0.20	0.22		
36	0.50	0.40	0.40	0.38	0.38	0.89	0.90	86	0.60	0.24	0.25	0.28	0.28	0.79	0.80		
37	0.36	0.33	0.34	0.37	0.37	3.76	3.80	87	—	—	—	—	—	—	—		
38	0.07	—	—	—	—	4.58	4.62	88	—	—	—	—	—	—	—		
39	0.20	0.21	0.20	0.15	0.15	4.06	3.91	89	0.36	0.33	0.33	0.40	0.40	0.56	0.57		
40	0.25	0.27	0.27	0.23	0.23	2.43	2.46	90	0.50	0.14	0.10	0.13	0.14	1.19	1.20		
41	0.43	0.47	0.47	0.43	0.43	2.64	2.67	91	0.33	0.26	0.26	0.38	0.37	1.19	1.21		
42	0.44	0.56	0.56	0.66	0.67	2.92	2.95	92	0.65	0.34	0.34	0.45	0.45	0.57	0.58		
43	0.08	0.12	0.14	0.05	0.07	6.75	6.83	93	0.91	0.14	0.15	0.19	0.20	0.97	0.98		
44	—	—	—	—	—	—	—	94	—	—	—	—	—	—	—		
45	—	—	—	—	—	—	—	95	2.49	0.53	0.54	0.59	0.60	1.74	1.76		
46	—	—	—	—	—	—	—	96	2.91	0.55	0.56	0.49	0.50	4.47	4.49		
47	—	—	—	—	—	—	—	97	5.36	0.66	0.66	0.74	0.75	5.21	5.25		
48	0.25	—	—	0.04	0.04	12.93	12.75	98	0.07	0.00	—	0.20	0.22	3.92	4.65		
49	0.07	—	—	—	—	10.75	12.53	99	0.97	0.58	0.38	0.47	0.47	2.06	2.08		
50	0.29	0.22	0.22	0.27	0.27	3.93	3.94	100	1.80	0.35	0.35	0.39	0.39	5.62	5.66		

由于样品中大部分产地的天平山淫羊藿 *Epimedium Herba* 药材中所含黄酮类成分种类较多,且量也较高,本实验在文献报道^[1]的基础上调整流动相为乙腈-水(23:77),才能使朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷彼此完全分离。供试品溶液的提取方法与文献方法^[1]不同,仍然采用《中国药典》记载淫羊藿测定项下方法^[3],以保证待测成分采用外标法测定与通过 QAMS 法计算得到结果的可靠性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 2003.
- [3] 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.
- [4] 谢娟平,胥道宝,孙文基. RP-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.
- [5] 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]. 中国药房, 2008, 19(6): 431-433.
- [6] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量标准评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [7] 何兵,刘艳,李春红,等. 一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中 6 种活性成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2160-2164.
- [8] 蓝天凤,王晓,王岱杰,等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [9] 王瑞,黄山君,王峥涛. 一测多评法测定赤芍中不同类型成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(8): 594-598.
- [10] 李安平,杨锡,丁永辉,等. 一测多评 HPLC 法测定丹参注射液中 7 个水溶性成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1534-1540.
- [11] 于霄,宋静,熊志立,等. 一测多评法测定淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3310-3313.
- [12] 王智民,钱忠直,张启伟,等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [13] 徐文芬,何顺志. 中国淫羊藿大花类群的种类与地理分布 [J]. 中药材, 2005, 28(4): 267-271.
- [14] 何顺志,徐文芬,郭宝林. 中国淫羊藿小花类群的种类与地理分布 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(16): 1217-1220.
- [15] 徐文芬,何顺志,黄敏,等. 高效液相色谱法测定贵州产淫羊藿药材不同药用部位中淫羊藿苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5): 1-3.
- [16] 何顺志,徐文芬,王悦云,等. 淫羊藿药用植物种质资源 [J]. 贵州科学, 2012, 30(1): 9-14.