

# UPLC 结合一测多评法测定药典中淫羊藿的 13 种化学成分

刘鑫<sup>1</sup>, 何小英<sup>2</sup>, 刘柏龙<sup>2\*</sup>, 宋平顺<sup>2\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省药品检验研究院 国家中药材及饮片  
质量控制重点实验室 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 甘肃 兰州 730030)

**[摘要]** 建立淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 中 13 种化学成分新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 的一测多评法, 考察该方法在评价不同产地和不同品种的淫羊藿药材质量中具有一定的可行性和准确性。通过对实验方法的科学性 & 准确性考察, 采用外标法测定淫羊藿中 13 种化学成分的含量, 同时, 以淫羊藿苷为内标, 分别建立淫羊藿苷与新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 的相对校正因子, 计算淫羊藿中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 的含量, 实现用一测多评法测定其含量, 最后比较实测值与计算值的差异, 来验证一测多评法在测定中的准确性及科学性。各成分相对校正因子重复性较好, 外标法测定结果与一测多评测定结果无显著性差异。以淫羊藿苷为内标, 同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 的一测多评法可用于淫羊藿的定量分析。

**[关键词]** UPLC; 一测多评法; 淫羊藿; 淫羊藿苷; 相对校正因子

## Determination of 13 chemical components of *Epimedium Folium* in pharmacopoeia by UPLC method combined with quantitative analysis of multicomponents by single-marker

LIU Xin<sup>1</sup>, HE Xiao-ying<sup>2</sup>, LIU Bo-long<sup>2\*</sup>, SONG Ping-shun<sup>2\*</sup>

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Provincial Engineering  
Laboratory of Chinese and Tibetan Medicine Inspection and Testing Technology, National Key Laboratory of  
Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, Gansu Institute of Pharmaceutical  
Inspection and Control, Lanzhou 730030, China)

**[Abstract]** The quantitative analysis of multicomponents by single-marker (QAMS) was established for 13 chemical components of *Epimedium Folium*, including neoglycolic acid, chlorogenic acid, cryo-chlorogenic acid, magnolidine, hypericin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, baohuoside II, sagittatoside A, icariin subside I, and baohuoside I, so as to investigate the feasibility and accuracy of this method in evaluating the quality of *Epimedium Folium* materials from different origins and different varieties. Through the scientific and accurate investigation of the experimental method, the external standard method was used to determine the content of 13 chemical components in *epimedium brevicornu*. At the same time, icariin was used as the internal standard, and the relative correction

**[收稿日期]** 2023-09-30

**[基金项目]** 甘肃省药品监督管理局科技项目(2021GSMPA-KL01, 2021GSMPA-KL02)

**[通信作者]** \* 刘柏龙, 副主任药师, E-mail: 352433835@qq.com; \* 宋平顺, 主任药师, 硕士生导师, E-mail: 2530517601@qq.com

**[作者简介]** 刘鑫, 硕士研究生, E-mail: 1778720917@qq.com

factors of icariin with neoglycolic acid, chlorogenic acid, cryo-chlorogenic acid, magnolidine, hypericin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, baohuoside II, sagittoside A, icariin subside I, and baohuoside I were established, respectively. The contents of neoglycolic acid, chlorogenic acid, cryo-chlorogenic acid, magnolidine, hypericin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, baohuoside II, sagittoside A, icariin subside I, and baohuoside I in Epimedii Folium were calculated by QAMS. Finally, the difference between the measured value and the calculated value was compared to verify the accuracy and scientific nature of QAMS in the determination. The relative correction factor of each component had better repeatability, and there was no significant difference between the results of the external standard method and those of QAMS. With icariin as the internal standard, QAMS simultaneously determining neoglycolic acid, chlorogenic acid, cryo-chlorogenic acid, magnolidine, hypericin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, baohuoside II, sagittoside A, icariin subside I, and baohuoside I can be used for quantitative analysis of Epimedii Folium.

[Key words] UPLC; quantitative analysis of multicomponents by single-marker; Epimedii Folium; icariin; relative correction factor

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20231115.103

淫羊藿首次收载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>,据《中国植物志》记载的淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 为淫羊藿种属中主要的药用品种,2020年版《中国药典》中记载淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *E. brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效<sup>[2]</sup>。其化学成分复杂多样,现有研究发现,提取分离得到黄酮、多糖、生物碱等成分260多种,其含黄酮类成分最多,且淫羊藿苷作为其主要的活性成分<sup>[3-4]</sup>,在现代药理研究中,具体体现在生殖功能、神经保护、骨保护、心血管保护等作用<sup>[5-10]</sup>。

淫羊藿具有较高的临床价值,含有大量的黄酮类成分,但是其品种繁杂,化学成分多,给淫羊藿品质评价及鉴定方面带来很大的困扰。已有相关研究,通过建立一测多评法(QAMS)建立淫羊藿苷与朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C的相对校正因子较外标法无显著性差异,因此用一测多评法评价淫羊藿的含量具有可行性<sup>[11-13]</sup>。因此,本研究是以淫羊藿苷为内标物,建立淫羊藿中13种化学成分与淫羊藿苷的相对校正因子,外标法和QAMS法测定结果进行比较,通过一测多评方法学考察验证,判定其校正因子的准确性和科学性,这在一定程度上节省大量对照品费用的同时,也为淫羊藿多指标成分的测定及质量评价提供参考价值。

## 1 材料

Agilent 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),DA Detector 检测器,Empower470 色谱工作站;SQP 万分之一分析天平[型号 QUINTIX224-1CN,塞

多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-300DB 超声提取仪(昆山市超声仪器有限公司,500 W,40 kHz);超纯水制备机(美国默克密理博公司)。绿原酸(批号 110753-202119,纯度 99.58%),隐绿原酸(批号 JV15785,纯度 ≥98%),新绿原酸(批号 IV16715,纯度 ≥98%),木兰花碱(批号 112090-202201,纯度 99.34%),金丝桃苷(批号 111521-201809,纯度 94.90%),朝藿定 A(批号 J12HB184811,纯度 ≥98%),朝藿定 B(批号 J12HB184812,纯度 ≥98%),朝藿定 C(批号 111780-201905,纯度 98.27%),淫羊藿苷(批号 110737-202017,纯度 98.10%),箭藿苷 A(批号 J15HB181573,纯度 ≥98%),宝藿苷 II(批号 P16N11S131051,纯度 ≥98%),淫羊藿次苷 I(批号 112084-202101,纯度 98.55%),淫羊藿次苷 II(批号 A20GB158231,纯度 ≥98%)由中国食品药品检定研究院提供;100%甲酸、甲醇、乙腈均为色谱级。

2022—2023 年收集了甘肃、吉林、四川、贵州、重庆、湖北、湖南、陕西和安徽等产区或市场流通的淫羊藿 37 份样品,经甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师鉴定为《中国药典》品种,淫羊藿 *E. brevicornu*、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* 的干燥叶,见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取木兰花碱、绿原酸、金丝桃苷、新绿原酸、淫羊藿苷、隐绿原酸、淫羊藿次苷 I、箭藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I、宝藿苷

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

No.	产地/购买地	植物来源
1	陕西	箭叶淫羊藿
2	陕西	箭叶淫羊藿
3	甘肃岷县	淫羊藿
4	湖南	淫羊藿
5	甘肃岷县	淫羊藿
6	甘肃岷县	淫羊藿
7	甘肃商品	淫羊藿
8	吉林通化	朝鲜淫羊藿
9	甘肃岷县	淫羊藿
10	陕西	箭叶淫羊藿
11	陕西	箭叶淫羊藿
12	甘肃	淫羊藿
13	甘肃	淫羊藿
14	湖北宜昌	箭叶淫羊藿
15	甘肃陇南	淫羊藿
16	甘肃康县	淫羊藿
17	甘肃成县	柔毛淫羊藿
18	甘肃岷县	淫羊藿
19	甘肃岷县	淫羊藿
20	甘肃兰州榆中	淫羊藿
21	甘肃宕昌	淫羊藿
22	甘肃礼县	淫羊藿
23	甘肃漳县	淫羊藿
24	甘肃岷县	淫羊藿
25	甘肃陇南	淫羊藿
26	甘肃漳县	淫羊藿
27	陕西	淫羊藿
28	湖北神农架	箭叶淫羊藿
29	甘肃	淫羊藿
30	广州市淮山堂	淫羊藿
31	甘肃岷县	箭叶淫羊藿
32	甘肃	淫羊藿
33	甘肃渭源	淫羊藿
34	四川绵阳	柔毛淫羊藿
35	安徽六安	箭叶淫羊藿
36	四川广元	柔毛淫羊藿
37	陕西安康	箭叶淫羊藿

II 13 个对照品各约 10 mg 于 10 mL 量瓶内,然后加甲醇定容至 10 mL 量瓶中,配制成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,分别精密量取各对照品储备液 1 mL 放置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成质量浓度分别为 42.12、39.90、44.88、42.60、56.00、55.32、42.28、37.20、46.60、47.00、42.60、54.04、34.12  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,于 3 °C 冰箱中备用。

## 2.2 供试品溶液的制备

精密称取淫羊藿粉末(过 4 号筛) 50 mg 于 5 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声提取 1 h,用甲醇定容至 5 mL 量瓶,摇匀,过滤,然后将上清液经 0.2  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜过滤即得,放置于 3 °C 冰箱中备用。

## 2.3 色谱条件

色谱柱为 CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  柱(2.0 mm $\times$ 100 mm,2  $\mu\text{m}$ ),流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) -乙腈(B),梯度洗脱(0~4 min,5%~10% B;4~6 min,10%~20% B;6~9 min,20%~23.5% B;9~18 min,23.5%~30% B;18~20 min,30%~35% B;20~31 min,35%~50% B;31~33 min,50%~5% B;33~35 min,5% B),流速 0.3 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ;进样量 1  $\mu\text{L}$ ;检测波长 270 nm,柱温 30 °C,柱平衡时间 10 min。上述色谱条件下,各组分之间分离度良好,见图 1。

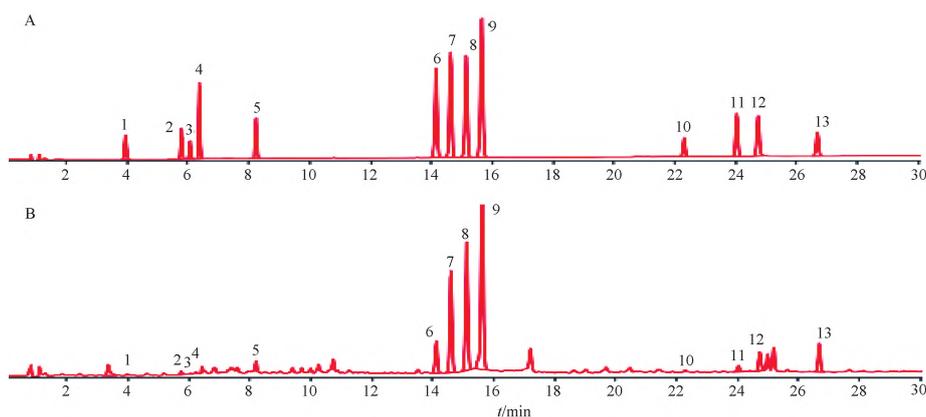
## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系考察** 取 2.1 项下的混合对照品溶液,分别稀释 25、50、75、100、125 倍,按 2.3 项下色谱条件进样,以峰面积对浓度进行回归分析,得线性回归方程,见表 2。

**2.4.2 精密度** 取淫羊藿混合对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件下进样 6 针,每针进样量 2  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 这 13 个成分的精密度 RSD 分别为 2.1%、2.3%、1.8%、1.2%、0.77%、0.51%、0.69%、0.65%、0.73%、0.82%、0.69%、1.1%、0.73%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性** 取同一淫羊藿供试品溶液,分别在制备后 2、4、6、8、10、12 h,按 2.3 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 这 13 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.6%、1.4%、0.72%、0.80%、1.3%、0.61%、1.3%、0.73%、1.1%、1.2%、1.3%、0.74%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性,仪器状态良好。

**2.4.4 重复性** 精密称取同一批淫羊藿供试品粉末,按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进样,记录各色谱峰峰面积,计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃



A.淫羊藿混合对照品;B.淫羊藿样品;1.新绿原酸;2.绿原酸;3.隐绿原酸;4.木兰花碱;5.金丝桃苷;6.朝藿定 A;7.朝藿定 B;8.朝藿定 C;9.淫羊藿苷;10.宝藿苷 II;11.箭藿苷 A;12.淫羊藿次苷 I;13.宝藿苷 I。

图1 淫羊藿对照品(A)和样品(B)的UPLC图

Fig.1 UPLC of reference substance (A) and sample (B) of Epimedii Folium

表2 淫羊藿中13种黄酮类化合物的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of 13 flavonoids in Epimedii Folium

成分	线性回归方程	$R^2$	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
新绿原酸	$y = 3\ 034.6x - 0.506\ 5$	0.999 8	0.46 ~ 21.30
绿原酸	$y = 2\ 589.7x - 0.557\ 3$	0.999 9	0.50 ~ 24.88
隐绿原酸	$y = 2\ 041.8x - 0.108\ 4$	1.000 0	3.32 ~ 16.60
木兰花碱	$y = 6\ 461.4x + 0.807\ 8$	0.998 2	0.42 ~ 21.06
金丝桃苷	$y = 6\ 006.9x - 0.252\ 4$	1.000 0	0.27 ~ 13.46
朝藿定 A	$y = 5\ 623.8x - 0.436\ 7$	1.000 0	0.93 ~ 46.64
朝藿定 B	$y = 5\ 140.5x - 0.412\ 9$	1.000 0	1.22 ~ 61.05
朝藿定 C	$y = 5\ 504.9x - 0.326\ 3$	1.000 0	1.11 ~ 55.43
淫羊藿苷	$y = 6\ 503.8x - 0.429\ 4$	1.000 0	1.34 ~ 67.25
宝藿苷 II	$y = 7\ 698.5x + 0.011\ 2$	1.000 0	0.14 ~ 6.82
箭藿苷 A	$y = 6\ 361.9x - 0.183\ 1$	0.999 9	0.37 ~ 18.60
淫羊藿次苷 I	$y = 5\ 776.5x + 0.270\ 9$	0.999 3	0.44 ~ 21.94
宝藿苷 I	$y = 9\ 110.7x + 0.274\ 6$	0.999 8	0.16 ~ 8.20

苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 这 12 个成分峰面积的 RSD 分别 3.6%、2.4%、3.9%、4.7%、4.2%、3.1%、3.3%、3.5%、2.9%、4.2%、4.7%、2.6%、4.3%，表明该方法的重复性良好。

**2.4.5 加样回收试验** 取已知含量的淫羊藿供试品 0.5 g，精密称定，平行 9 份样品，分别加入不同浓度的混合对照品溶液，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.3 项下色谱条件进样测定，计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 这 13 个成分的平均

均加样回收率分别为 101.0%、101.1%、101.7%、101.9%、101.3%、99.10%、100.5%、101.9%、102.0%、100.4%、102.6%、101.1%、99.75%，RSD 分别为 1.1%、1.3%、1.6%、1.1%、1.1%、0.24%、1.3%、0.70%、1.0%、1.3%、1.1%、0.57%、0.22%，表明该方法的准确性良好。

**2.4.6 相对校正因子的计算** 按照 2.3 项色谱条件下操作，测定不同进样体积时，以淫羊藿苷 (Y) 为参照物，利用公式  $f_{sk} = f_s / f_k = (A_s / C_s) / (A_k / C_k)$ ，其中  $f$  为相对校正因子， $A_s$  为内标参照物的峰面积， $C_s$  为内标参照物的浓度， $A_k$  为被测成分的峰面积， $C_k$  为被测成分的浓度。然后计算新绿原酸 (X)、绿

原酸(L)、隐绿原酸(YL)、木兰花碱(M)、金丝桃苷(J)、朝藿定 A(CA)、朝藿定 B(CB)、朝藿定(CC)、宝藿苷 II(B2)、箭藿苷 A(JA)、淫羊藿次苷 I(YC1)、宝藿苷 I(B1)的相对校正因子 $f_{sk}$ ,见表3。

表3 淫羊藿各成分相对校正因子

Table 3 Relative correction factors of various components of Epimedii Folium

不同进样体积/ $\mu\text{L}$	$f_{Y/X}$	$f_{Y/L}$	$f_{Y/YL}$	$f_{Y/M}$	$f_{Y/J}$	$f_{Y/CA}$	$f_{Y/CB}$	$f_{Y/CC}$	$f_{Y/B2}$	$f_{Y/JA}$	$f_{Y/YC1}$	$f_{Y/B1}$
0.50	2.07	2.55	3.25	1.01	1.09	1.16	1.27	1.18	0.85	1.04	1.12	0.71
1.00	2.25	2.58	3.22	1.01	1.10	1.17	1.27	1.18	0.87	1.03	1.14	0.71
1.20	2.19	2.50	3.20	1.01	1.09	1.16	1.27	1.18	0.86	1.04	1.13	0.71
1.50	2.05	2.55	3.19	1.01	1.09	1.16	1.27	1.18	0.86	1.03	1.14	0.71
2.00	2.11	2.50	3.20	1.00	1.09	1.17	1.27	1.18	0.90	1.08	1.17	0.72

注:Y.淫羊藿;X.新绿原酸;L.绿原酸;YL.隐绿原酸;M.木兰花碱;J.金丝桃苷;CA.朝藿定 A;CB.朝藿定 B;CC.朝藿定 C;B2.宝藿苷 II;YC1.淫羊藿次苷 I;B1.宝藿苷 I(表4~7同)。

## 2.5 相对校正因子( $f$ )耐用性考察

考察了2种不同色谱柱 CAPCELL PAK  $C_{18}$  柱(2.0 mm $\times$ 100 mm, 2  $\mu\text{m}$ );SVEA  $C_{18}$  柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ )、柱温(20、25、30、35  $^{\circ}\text{C}$ )、流速(0.2、0.3、0.4、0.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ )对校正因子的影响,并且计算相对校正因子 RSD。

**2.5.1 不同色谱柱对校正因子的影响** 本实验分别试验2种不同型号的色谱柱 CECPLL PAK  $C_{18}$  柱(2.0 mm $\times$ 100 mm, 2  $\mu\text{m}$ )和 SVEA  $C_{18}$  柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ),对 $f$ 的影响,结果表明不同色谱柱测得的 $f$ 较接近,RSD也较小,说明不同色谱柱对各成分 $f$ 无显著性差异,见表4。

表4 采用不同色谱柱测得的相对校正因子

Table 4 Relative correction factors measured by different chromatographic columns

色谱柱	$f_{Y/X}$	$f_{Y/L}$	$f_{Y/YL}$	$f_{Y/M}$	$f_{Y/J}$	$f_{Y/CA}$	$f_{Y/CB}$	$f_{Y/CC}$	$f_{Y/B2}$	$f_{Y/JA}$	$f_{Y/YC1}$	$f_{Y/B1}$
CECPLL PAK $C_{18}$ 柱	3.26	2.63	3.42	1.63	1.08	1.16	1.27	1.17	0.83	1.02	1.15	0.70
SVEA $C_{18}$ 柱	2.29	2.65	3.27	1.03	1.03	1.16	1.27	1.18	0.80	1.02	1.07	0.69
平均值	2.78	2.64	3.34	1.33	1.06	1.16	1.27	1.18	0.81	1.02	1.11	0.69
RSD/%	0.25	0	0.030	0.32	0.033	0	0	0	0.029	0	0.052	0.013

**2.5.2 不同柱温对校正因子的影响** 采用 Agilent 1290 超高效液相色谱系统和 CAPCELL PAK  $C_{18}$  柱(2.0 mm $\times$ 100 mm, 2  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,考察分别在不同

流速(20、25、30、35  $^{\circ}\text{C}$ )条件下对淫羊藿混合对照品进行了测定,结果表明 RSD $\leq$ 3.0%,无显著差异,见表5。

表5 采用不同柱温测得的相对校正因子

Table 5 Relative correction factors measured with different column temperatures

柱温/ $^{\circ}\text{C}$	$f_{Y/X}$	$f_{Y/L}$	$f_{Y/YL}$	$f_{Y/M}$	$f_{Y/J}$	$f_{Y/CA}$	$f_{Y/B}$	$f_{Y/CC}$	$f_{Y/B2}$	$f_{Y/JA}$	$f_{Y/YC1}$	$f_{Y/B1}$
20	2.12	2.54	3.25	1.01	1.07	1.15	1.26	1.18	0.84	1.02	1.21	2.08
25	2.11	2.52	3.20	1.02	1.08	1.16	1.27	1.18	0.84	1.03	1.21	0.71
30	2.11	2.28	2.99	1.00	1.06	1.16	1.26	1.18	0.84	1.03	1.21	0.71
35	2.11	2.38	3.09	1.01	1.05	1.16	1.27	1.18	0.84	1.03	1.21	0.71
平均值	2.11	2.43	3.14	1.01	1.07	1.16	1.27	1.18	0.84	1.03	1.21	1.05
RSD/%	0	0.051	0.037	0.007 8	0.014	0	0	0	0	0	0	0.65

**2.5.3 不同流速对校正因子的影响** 取混合对照品溶液,按2.3项下分别记录不同流速(0.2、0.3、0.4、0.5

mL $\cdot$ min $^{-1}$ )条件下峰面积。以淫羊藿苷为参照物,计算各成分的 $f$ ,结果表明偏差无显著性差异,见表6。

表6 采用不同流速测得的相对校正因子

Table 6 Relative correction factors measured with different flow rates

流速/mL · min <sup>-1</sup>	$f_{Y/X}$	$f_{Y/L}$	$f_{Y/YL}$	$f_{Y/M}$	$f_{Y/J}$	$f_{Y/CA}$	$f_{Y/B}$	$f_{Y/CC}$	$f_{Y/B2}$	$f_{Y/JA}$	$f_{Y/YCI}$	$f_{Y/B1}$
0.2	2.19	2.65	3.49	1.02	1.08	1.16	1.28	1.18	0.85	1.02	1.10	0.71
0.3	2.16	2.51	3.18	1.00	1.09	1.16	1.27	1.18	0.85	1.02	1.13	0.71
0.4	2.04	2.45	3.07	1.01	1.08	1.15	1.27	1.18	0.86	1.03	1.14	0.71
0.5	2.02	2.39	3.03	1.00	1.07	1.16	1.27	1.19	0.85	1.04	1.13	1.04
平均值	2.10	2.50	3.19	1.01	1.08	1.16	1.27	1.18	0.85	1.03	1.13	0.79
RSD/%	0.040	0.045	0.065	0.013	0.009 6	0	0	0	0	0.009 6	0.015	0.21

## 2.6 $f$ 的确定

在以上对校正因子的考察,再进行最终校正因子的确定,计算其平均值,即新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝

藿定 C、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 校正因子分别为 2.28、2.53、3.22、1.09、1.07、1.16、1.27、1.18、0.84、1.03、1.15、0.81,结果见表 7。

表7 采用不同方法测得的相对校正因子平均值

Table 7 Averages of relative correction factors measured by different methods

项目	$f_{Y/X}$	$f_{Y/L}$	$f_{Y/YL}$	$f_{Y/M}$	$f_{Y/J}$	$f_{Y/CA}$	$f_{Y/CB}$	$f_{Y/CC}$	$f_{Y/B2}$	$f_{Y/JA}$	$f_{Y/YCI}$	$f_{Y/B1}$
不同进样体积	2.14	2.54	3.21	1.01	1.09	1.16	1.27	1.18	0.87	1.04	1.14	0.71
不同柱温	2.11	2.43	3.14	1.01	1.07	1.16	1.27	1.18	0.84	1.03	1.21	1.05
不同流速	2.10	2.50	3.19	1.01	1.08	1.16	1.27	1.18	0.85	1.03	1.13	0.79
不同色谱柱	2.78	2.64	3.34	1.33	1.06	1.16	1.27	1.18	0.81	1.02	1.11	0.69
平均值	2.28	2.53	3.22	1.09	1.07	1.16	1.27	1.18	0.84	1.03	1.15	0.81
RSD/%	0.34	0.035	0.027	0.15	0.015	0	0	0	0.028	0.098	0.039	0.20

## 2.7 待测组分色谱峰的定位

以淫羊藿苷为内标物,精密吸取 2.3 项色谱峰条件下的混合对照品溶液,得到对应的色谱峰的保留时间,通过对不同色谱柱,不同进样体积,不同流速,不同柱温的考察,记录各自的保留时间,采用相对保留时间值法对待测成分色谱峰进行准确定位,保留时间计算待测成分与参照物的相对保留值( $r_{vs} = t_{R_x} / t_{R_s}$ ,其中  $t_{R_x}$ 、 $t_{R_s}$  分别为待测成分、参照物的保留时间)及其 RSD,结果可知,各待测成分的 RSD 均小于 5%,因此,相对保留时间可用于待测成分色谱峰定位,见表 8。

## 2.8 样品测定

取 37 批淫羊藿药材,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下的色谱条件,进行样品测定,记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木兰花碱、金丝桃苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II、箭藿苷 A、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I 这 13 个化学成分色谱峰的峰面积,分别采用外标一点法和一测多评法(QAMS),分别计算 13 个化学成分的

含量,并且对 2 种方法进行比较,结果见表 8。

## 3 结论

在实验前期提取方面,分别用回流法和超声提取法提取,发现超声提取 1 h 效果最好;在色谱条件的筛选中,首先在相同柱温、相同流速和相同的梯度洗脱条件下,用不同的流动相,如 0.1% 甲酸水-乙腈、水-乙腈、0.1% 甲酸-0.01% 乙腈水-乙腈,结果显示 0.1% 甲酸水-乙腈流动相配比分离效果最好。

本实验采用超高效液相色谱(UPLC)对淫羊藿 13 个化学成分进行含量测定,可以充分解决多成分测定中耗时、耗溶剂这个缺点,也在一定程度上提高含量测定的准确性。研究淫羊藿中 13 个化学成分,其中成分淫羊藿苷不仅价廉易得,而且其含量相对稳定,因此选取淫羊藿苷为内标物质,建立一测多评的分析方法,进一步弥补了对照品昂贵及不足的缺陷。

采用高效液相色谱仪,用不同的色谱柱,改变不同流速、不同柱温、不同进样体积,分别考察相对校正因子的准确性和科学性,从 RSD 可以看出一测多

表 8 一测多评法与外标法含量测定结果比较

Table 8 Comparison of content determination results between quantitative analysis of multicomponents by single-marker and external standard method

No.	新绿原酸		绿原酸		隐绿原酸		木兰花碱		金丝桃苷		朝 A		朝 B		朝 C		淫羊藿苷		宝藿甘 II		简藿甘 A		淫羊藿次苷 I		宝藿甘 I		
	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标	QAMS	外标										
1	-	-	0.564	0.540	0.224	0.211	1.779	1.192	1.575	1.559	3.265	3.263	13.074	13.068	5.432	5.459	3.245	3.245	-	-	0.238	0.241	0.057	0.057	0.266	0.264	
2	-	-	0.192	0.184	-	-	0.147	0.147	0.801	0.793	0.440	0.440	1.126	1.126	2.333	2.345	0.203	0.203	-	-	0.172	0.174	0.337	0.337	0.172	0.171	
3	0.177	0.176	0.407	0.389	0.160	0.151	0.180	0.171	0.403	0.398	2.801	2.799	6.354	6.351	14.304	14.375	9.947	9.947	0.035	0.035	0.412	0.418	0.030	0.030	0.796	0.794	
4	-	-	0.074	0.071	-	-	0.696	0.690	0.095	0.094	1.560	1.559	1.660	1.659	80.072	80.467	31.632	31.632	-	-	0.176	0.178	-	-	1.989	1.989	
5	0.148	0.140	0.544	0.521	0.078	0.074	0.414	0.277	0.230	0.227	2.260	2.259	11.804	11.799	4.627	4.650	3.393	3.393	-	-	0.217	0.220	0.521	0.521	0.439	0.440	
6	-	-	0.699	0.670	0.065	0.062	0.196	0.131	0.548	0.542	2.826	2.824	10.915	10.909	9.482	9.529	12.603	12.603	0.016	0.016	0.146	0.148	0.343	0.343	0.557	0.553	
7	-	-	0.542	0.519	0.209	0.197	0.055	0.057	0.779	0.771	2.471	2.469	3.828	3.827	12.535	12.597	6.228	6.228	0.123	0.123	0.256	0.259	0.128	0.128	0.281	0.326	
8	0.080	0.068	1.405	1.345	0.262	0.247	0.550	0.503	0.812	0.810	1.716	1.715	2.571	2.570	1.024	1.029	4.621	4.621	0.511	0.518	0.271	0.274	0.045	0.045	0.961	0.962	
9	0.195	0.166	0.272	0.261	0.042	0.040	0.289	0.287	0.431	0.427	1.390	1.389	4.825	4.823	5.746	5.775	7.353	7.353	0.035	0.035	0.248	0.251	0.864	0.864	0.904	0.908	
10	0.157	0.134	1.008	0.965	0.410	0.386	0.046	0.048	0.234	0.232	0.206	0.206	0.357	0.357	0.291	0.293	0.412	0.412	0.173	0.175	0.022	0.023	0.006	0.006	0.061	0.062	
11	0.289	0.299	2.309	2.211	0.418	0.394	0.207	0.206	3.067	3.035	0.022	0.022	0.339	0.339	0.077	0.077	0.096	0.096	0.036	0.036	0.019	0.019	-	-	0.014	0.016	
12	0.191	0.195	0.453	0.433	0.093	0.088	0.234	0.234	0.417	0.413	2.479	2.477	12.601	12.595	3.988	4.007	9.081	9.081	0.019	0.019	0.217	0.220	0.030	0.030	0.715	0.713	
13	0.126	0.108	0.243	0.232	-	-	0.322	0.323	0.427	0.423	1.391	1.390	4.614	4.612	7.217	7.253	6.279	6.279	0.060	0.061	0.228	0.231	0.107	0.107	0.835	0.837	
14	0.036	0.030	1.350	1.293	0.136	0.128	0.224	0.224	3.340	3.306	0.013	0.013	0.035	0.035	0.049	0.049	0.046	0.046	-	-	0.016	0.016	0.118	0.118	0.007	0.008	
15	0.176	0.150	2.730	2.614	0.212	0.199	0.427	0.420	5.032	4.980	1.806	1.805	3.094	3.093	13.093	13.158	1.153	1.153	-	-	0.048	0.048	0.020	0.020	0.039	0.034	
16	-	-	0.356	0.341	0.072	0.068	0.277	0.277	0.724	0.717	1.549	1.548	2.510	2.509	13.774	13.842	2.966	2.966	-	-	0.064	0.065	0.125	0.125	0.235	0.237	
17	-	-	0.112	0.107	-	-	0.200	0.201	0.679	0.672	0.915	0.915	1.519	1.518	8.315	8.356	3.221	3.221	-	-	0.200	0.202	0.118	0.118	0.521	0.523	
18	0.192	0.164	0.339	0.324	0.065	0.062	0.328	0.327	0.768	0.760	2.014	2.013	6.921	6.918	7.273	7.309	7.057	7.057	0.031	0.032	0.201	0.203	0.698	0.698	0.793	0.791	
19	0.184	0.181	1.085	1.038	0.450	0.424	0.149	0.147	1.154	1.152	0.274	0.273	0.448	0.448	0.561	0.564	0.640	0.640	0.231	0.234	0.034	0.034	-	-	0.085	0.087	
20	0.236	0.201	0.547	0.524	0.153	0.145	0.294	0.293	1.179	1.166	2.710	2.709	6.121	6.118	15.010	15.084	12.894	12.894	0.098	0.099	0.180	0.182	0.233	0.233	0.685	0.689	
21	0.091	0.078	0.498	0.477	0.431	0.407	0.516	0.514	0.788	0.779	3.899	3.896	10.103	10.098	15.670	15.747	11.966	11.966	0.053	0.054	0.391	0.396	0.387	0.387	0.466	0.463	
22	0.104	0.088	0.411	0.394	0.088	0.083	0.312	0.316	0.585	0.579	2.485	2.483	4.583	4.581	12.342	12.403	11.373	11.373	0.212	0.215	1.720	1.742	0.885	0.885	3.323	3.323	
23	0.202	0.172	0.272	0.260	0.096	0.090	0.392	0.393	0.599	0.592	2.307	2.305	4.255	4.253	11.168	11.223	10.229	10.229	0.147	0.149	0.447	0.453	0.025	0.025	0.901	0.900	
24	0.281	0.240	0.785	0.752	0.204	0.192	0.192	0.191	0.749	0.741	2.889	2.888	11.224	11.219	9.387	9.433	11.866	11.866	0.035	0.036	0.197	0.200	0.822	0.822	0.753	0.756	
25	0.226	0.192	0.404	0.387	0.118	0.112	0.063	0.063	0.313	0.310	3.645	3.643	5.604	5.601	21.761	21.869	25.614	25.614	0.085	0.086	0.145	0.147	0.078	0.078	0.907	0.901	
26	0.185	0.157	0.429	0.411	0.186	0.175	0.235	0.233	0.730	0.723	1.556	1.555	9.125	9.120	1.675	1.684	3.543	3.543	0.047	0.047	0.384	0.389	1.956	1.955	1.025	1.025	
27	0.199	0.169	0.959	0.918	0.249	0.235	0.415	0.412	0.986	0.976	3.840	3.838	12.746	12.740	5.955	5.984	7.059	7.059	0.012	0.012	0.200	0.203	0.048	0.048	0.434	0.433	
28	0.180	0.153	0.319	0.305	0.038	0.036	0.561	0.563	0.386	0.382	0.018	0.018	0.179	0.179	0.091	0.091	0.084	0.084	0.024	0.024	0.011	0.011	-	-	0.022	0.026	
29	0.709	0.604	0.594	0.579	0.147	0.139	0.323	0.323	0.692	0.685	0.161	0.161	0.247	0.247	1.374	1.381	2.259	2.259	0.042	0.042	0.112	0.114	-	-	0.180	0.186	
30	0.298	0.275	0.542	0.519	0.153	0.144	0.354	0.354	0.325	0.321	0.399	0.398	0.589	0.589	3.387	3.404	4.437	4.437	0.052	0.052	0.151	0.153	0.013	0.013	0.216	0.251	
31	0.271	0.231	1.005	0.962	0.401	0.378	0.242	0.243	0.311	0.308	1.865	1.864	12.824	12.818	3.834	3.853	3.542	3.542	0.008	0.008	0.257	0.260	-	-	0.324	0.375	
32	0.130	0.110	2.378	2.277	0.320	0.301	0.640	0.643	0.488	0.483	1.423	1.422	2.257	2.256	1.544	1.551	3.410	3.410	1.597	1.619	0.150	0.152	0.015	0.015	0.365	0.365	
33	0.178	0.170	0.513	0.491	0.112	0.106	0.102	0.102	0.497	0.491	2.594	2.592	14.108	14.101	5.461	5.488	10.102	10.102	0.021	0.021	0.233	0.236	-	-	0.915	0.913	
34	0.280	0.238	0.752	0.720	0.293	0.276	0.131	0.135	0.808	0.800	0.052	0.052	0.252	0.252	0.102	0.102	0.181	0.181	-	-	-	-	-	-	0.038	0.032	
35	0.023	0.020	0.024	0.023	0.118	0.111	0.736	0.738	0.034	0.034	0.653	0.652	0.776	0.776	21.277	21.382	1.041	1.041	0.080	0.081	1.556	1.577	-	-	0.874	0.874	
36	-	-	0.092	0.088	0.120	0.113	0.121	0.122	0.350	0.347	2.049	2.048	3.076	3.075	14.023	14.092	4.084	4.084	0.045	0.045	0.510	0.517	0.016	0.016	0.907	1.051	
37	0.059	0.059	0.736	0.705	0.052	0.049	0.235	0.234	1.499	1.484	0.994	0.994	1.912	1.912	13.963	14.032	1.094	1.094	0.004	0.004	0.281	0.285	0.024	0.024	0.310	0.301	

注:-,未检出。

评方法的重复性及耐用性良好。

本实验共收集 37 批不同产地的淫羊藿药材,通过常规外标一点法和一测多评法建立了不同的方法学考察,然后对 37 批药材进行含量测定,最终结果表明,外标法与一测多评法无显著性差异,证明了一测多评法的准确性和可行性,可用于淫羊藿药材的质量评价,为淫羊藿药材的质量控制和评价体系奠定基础,不足就是淫羊藿品种繁杂,全国各地均有分布,但是变异种较多,使鉴定以及正品淫羊藿的准确判定带来困扰,实验样本量还需扩大范围,并且通过现代科学手段及方法更好地把有效含量高的正品淫羊藿服务于临床。

#### [参考文献]

- [ 1 ] 神农本草经[M].孙星衍辑校.呼和浩特:内蒙古人民出版社, 2007: 85.
- [ 2 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340.
- [ 3 ] 何丽君,杨彬彬,卓实,等.淫羊藿苷通过调节 RhoA/ROCK 信号通路改善 AD 神经元和树突损伤的机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(21):90.
- [ 4 ] 龚华乾,高敏,柴艺汇,等.淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J].湖北民族大学学报(医学版),2021,38(4):75.
- [ 5 ] ZHANG H, WANG H, WEI J, et al. Comparison of the active compositions between raw and processed *Epimedium* from different species[J]. *Molecules*, 2018, 23(7):1656.
- [ 6 ] 路宇仁,陈映冰,崔元璐,等.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):209.
- [ 7 ] SUN J, WANG D, LIN J, et al. Icariin protects mouse Leydig cell testosterone synthesis from the adverse effects of di (2-ethylhexyl) phthalate[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 378: 114612.
- [ 8 ] YU H, SHI J, LIN Y, et al. Icariin ameliorates Alzheimer's disease pathology by alleviating myelin injury in 3 × Tg-AD mice [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(4): 1049.
- [ 9 ] TANG D, JU C, LIU Y, et al. Therapeutic effect of icariin combined with stem cells on postmenopausal osteoporosis in rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(2): 180.
- [ 10 ] ZHANG Y, MA X, LI X, et al. Effects of icariin on atherosclerosis and predicted function regulatory network in ApoE deficient mice[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9424186.
- [ 11 ] 张龙,李珊珊,白雪,等.基于一测多评法的淫羊藿质量评价方法研究及验证[J].中国中药杂志,2021,46(11):2843.
- [ 12 ] 马越,李德坤,叶正良,等.基于一测多评法测定淫羊藿中 6 种黄酮类化合物的含量[J].中药材,2019,42(5):1071.
- [ 13 ] 吴蕾.一测多评法同时测定不同产地淫羊藿提取物中的 4 种黄酮类成份[J].中国兽药杂志,2022,56(8):80.

[责任编辑 吕冬梅]