

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.04

催情散中总多糖、总黄酮及 4 种活性成分的含量测定

高馨¹, 王婉莹², 华永丽^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

[收稿日期] 2023-06-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0033-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立催情散中总多糖、总黄酮含量测定方法, 并建立同时测定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷有效成分含量方法, 为催情散的质量控制提供全面的依据。运用比色法测定催情散中总多糖和总黄酮的含量, 应用高效液相色谱法(HPLC)分析催情散中主要成分并测定其含量。不同生产厂家的催情散中主要化学成分的含量存在一定差异, 催情散中总多糖平均含量为 3.35%, 总黄酮平均含量为 1.30%, 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的平均含量分别为 0.0137%、0.0131%、0.1106%、0.0764%。建立了催情散中总多糖、总黄酮及 4 种活性成分测定方法, 此方法具有较好的稳定性和重复性, 可以作为催情散质量控制的标准。

[关键词] 催情散; 比色法; 高效液相色谱法。

Determination of Total Polysaccharides, Total Flavonoids and Four Action Components in Aphrodisiac Powder

GAO Xin¹, WANG Wan-ying², HUA Yong-li^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Life science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Corresponding author: HUA Yong-li, E-mail: huayongli2004@163.com

Abstract: To establish a method for the determination of total polysaccharides and total flavonoids in aphrodisiac powder, and to establish a method for the simultaneous determination of the action components of icaritin A, icaritin B, icaritin C and icariin, so as to provide a comprehensive basis for the quality control of aphrodisiac powder. The content of total polysaccharides and total flavonoids in aphrodisiac powder was determined by colorimetry, and the main components in aphrodisiac powder were analyzed and their contents were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). There were some differences in the contents of the main chemical components in aphrodisiac powder from different manufacturers. The average content of total

基金项目: 2020 年甘肃农业大学省级大学生创新创业训练计划项目(S202010733014); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-37)

作者简介: 高馨, 从事兽用中药方向研究。

通讯作者: 华永丽。E-mail: huayongli2004@163.com

polysaccharides in aphrodisiac powder was 3.35%, the average content of total flavonoids was 1.30%, and the average contents in aphrodisiac powder were 0.0137%, 0.0131%, 0.1106% and 0.0764% for Icaritin A, Icaritin B, icaritin C and icariin, respectively. A method for the determination of total polysaccharides, total flavonoids and four action components in aphrodisiac powder was established, which has good stability and reproducibility and can be used as a standard for quality control of aphrodisiac powder.

Key words: aphrodisiac powder; colorimetry; high performance liquid chromatography

催情散是淫羊藿、当归、香附、益母草、菟丝子等中药粉碎、过筛、混匀制得的中兽药散剂,成品为淡灰色粉末,气香,味微苦、微辛。在畜禽生产中,催情散被广泛用于治疗母畜乏情不孕,能促进卵泡发育、排卵^[1],治疗公畜肾虚滑精、脾肾虚泻等证候^[2]。催情散中主要有效部位为总黄酮和总多糖^[3],研究表明,催情散总黄酮具有催情促孕,提高繁殖力的作用,能够促进排卵数、产仔数与泌乳力^[4]。菟丝子总黄酮及总多糖提取物能增强囊胚滋养层细胞的增殖活性,减少细胞衰亡,具补肾安胎的药效^[5]。《中国兽药典》中催情散质量控制只有性状、鉴别及检查,未见其活性成分总多糖、总黄酮及其活性成分含量质量标准,对于控制催情散质量未提出明确依据。因此本论文以兽医临床常用中药复方催情散为研究对象,通过高效液相色谱法测定其中主要化学成分,为中兽药质量控制提供依据,也为新兽药开发提供科学数据。

1 试剂与仪器

1.1 材料和试剂 催情散样品共 7 种,即 1 号样品(河北某药业公司,批号 20040901),2 号样品(四川某药业公司,批号 20200901),3 号样品(四川某药业公司,批号 190807),4 号样品(山西某生物公司,批号 190901),5 号样品(甘肃某药业公司,批号 20200803),6 号样品(辽宁某药业公司,批号 20190601),7 号样品(甘肃某药业公司,批号 20200909)。朝藿定 A(批号为 Yz010523)、朝藿定 B(批号为 Yz1127221)、朝藿定 C(批号为 Yz052522)、淫羊藿苷(批号为 Yz180724)、芦丁(批号为 Yz101323)对照品均购自南京源植生物科技有限公司,D-无水葡萄糖(上海易恩化学技术有限公司,批号为 RH227560),硫酸、苯酚、亚硝酸钠、

硝酸铝、氢氧化钠、乙醇均为分析纯,乙腈、甲醇为色谱纯;水为超纯水。

1.2 仪器 Agilent1260 型高效液相色谱仪,Agilent Zorbax SB C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm,美国安捷伦公司),旋转蒸发仪 SY-2000(上海亚荣生化仪器厂),冷冻干燥机(北京博医实验仪器有限公司),AL104 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 催情散供试品溶液制备

2.2.1 催情散中总多糖和总黄酮测定的供试品溶液制备 准确称取 7 批不同厂家干粉 10 g 置于圆底烧瓶中,加入 150 mL 水,超声 30 min,加热至微沸,回流提取 1 h,离心。滤渣按料液比 1:8,加热至微沸,回流提取 30 min,合并滤液,浓缩,冷冻干燥,4 °C 冷藏备用。精密称取冻干粉 20.00 mg,溶于 40 mL 的蒸馏水,混匀,离心,取上清,即得总多糖测定的供试品溶液。精密称取冻干粉约 50.00 mg,溶于 20 mL 60% 的乙醇,离心,取上清液,即得总黄酮测定的供试品溶液。

2.2.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷测定的供试品溶液制备 精密称取催情散样品 10 g,置于圆底烧瓶中,加 80% 乙醇 150 mL,加热微沸 2 h,过滤,取滤渣于烧瓶中,用上述方法继续加热回流 2 h,滤过,两次滤液合并,浓缩、干燥即得冻干粉。称取冻干粉约 0.2 g,加 80% 的甲醇溶液 2 mL,定容,超声 30 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 色谱条件 Zorbax SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱;流动相以水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 min, 22% B; 15 min, 28% B; 20 min, 35%

B);流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 25 °C;紫外检测波长 270 nm;进样量 40 μL。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系考察

2.3.1.1 催情散中总多糖标准曲线绘制 称取无水葡萄糖对照品 40.00 mg,用水定容至 200 mL 容量瓶中,即得 0.2 mg/mL 的葡萄糖对照品。各取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的葡萄糖对照品溶液于试管中,补水至 2 mL。加 5% 的苯酚试剂 1 mL,混匀,加 5 mL 浓硫酸,放置 10 min,40 °C 保温 15 min,冷却至室温,在 490 nm 紫外分光光度计测定其吸光度 A。以吸光度 A 对葡萄糖浓度 C 进行回归,得回归方程为: $Y = 54.097x + 0.0073$, $R^2 = 0.9987$,表明其在 0.0025 ~ 0.025 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.1.2 催情散中总黄酮标准曲线绘制 称取芦丁对照品 5.90 mg,用 60% 的乙醇定容至 50 mL 容量瓶中,即得 0.118 mg/mL 的芦丁对照品。各取 0、1、2、3、4、5 mL 的芦丁对照溶液于试管中,加 0.3 mL 10% NaNO₂,摇匀,放置 6 min 后加 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃,放置 6 min,加 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液,混匀,补水至 10 mL,静置 15 min,510 nm 紫外分光光度计测定其吸光度 A。以吸光度 A 对芦丁浓度 C 进行回归,得回归方程为: $Y = 13.395x - 0.0936$, $R^2 = 0.9968$,表明其在 0.0118 ~ 0.059 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.1.3 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷标准曲线绘制 精密称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷对照品,用甲醇制备成质量浓度分别为 0.54、0.54、0.54、0.52 mg/mL 的单一对照品储备液。取上述对照品,加甲醇制成每 1 mL 含朝藿定 A 0.108 mg、朝藿定 B 0.108 mg、朝藿定 C 0.162 mg 和淫羊藿苷 0.156 mg 的混合对照品溶液,4 °C 避光保存。取混合对照品配置 2、4、8、16、32、64 倍浓度稀释的对照品混合溶液。按照色谱条件测定对照品的峰面积,以对照品峰面积 Y 对质量浓度 X 进行回归。结果表明,各成分分离度良好,在线性范围内,色谱峰面

积与浓度间线性关系良好,见表 1。

2.3.2 精密度考察

2.3.2.1 催情散中总多糖和总黄酮精密度考察 在线性范围内取对照品,按照“2.3.1”项下方法测定其吸光度 A 并计算其 RSD 值。结果表明,在总多糖精密度考察中,0.4 mL 对照品的 RSD 为 0.13% ($n = 6$),总黄酮中,4 mL 对照品的 RSD 为 0.15% ($n = 6$),仪器精密度良好。

表 1 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的回归方程
Tab 1 Results of the regression equations for icaritin A, B and C and icaritin

化学成分	回归方程	R^2	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
朝藿定 A	$Y = 40.004X - 12.089$	0.9999	1.687 ~ 54.0
朝藿定 B	$Y = 38.500X - 1.8004$	0.9999	1.687 ~ 54.0
朝藿定 C	$Y = 31.623X + 13.233$	0.9999	2.531 ~ 81.0
淫羊藿苷	$Y = 34.494X + 21.546$	0.9999	2.437 ~ 78.0

2.3.2.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷精密度考察 线性范围内取上述混合对照品溶液,8 倍稀释后,连续进样 6 次,按照“2.3.1”项下方法测定各对照品色谱峰的峰面积,计算其 RSD。结果表明,朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 1.18%、0.53%、1.20% 和 0.95%,仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性考察

2.3.3.1 催情散中总多糖和总黄酮稳定性考察 按照“2.1”项下方法制备供试品溶液,于 0、10、20、30、40、60 min 连续测定其吸光度 A 并计算 RSD 值。结果表明,在总多糖稳定性考察中,0.4 mL 6 号样品 RSD 为 0.36% ($n = 6$),总黄酮中,3 mL 4 号样品 RSD 为 2.81% ($n = 6$),溶液在 60 min 内的稳定性良好。

2.3.3.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷稳定性考察 制备供试品溶液并分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样,测定其峰面积,计算其 RSD 值。结果表明,6 号样品中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 1.36%、

3.53%、3.21% 和 2.98%，表明该供试品溶液在 12 h 内的稳定性良好。

2.3.4 重复性考察

2.3.4.1 催情散中总多糖和总黄酮重复性考察

按照“2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，测定其吸光度 A 并计算 RSD 值。结果表明，在总多糖重复性考察中，0.4 mL 4 号样品 RSD 为 0.44% ($n=6$)，总黄酮中，4 mL 3 号样品 RSD 为 0.18% ($n=6$)，方法重复性良好。

2.3.4.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷重复性考察

平行制备供试品溶液 6 份，分别测定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的峰面积。结果表明，2 号样品中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的 RSD 分别为 1.93%、

3.49%、2.47% 和 3.76%，该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率考察

2.3.5.1 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷加样回收率考察

称取 6 份相同浓度且已知含量的冻干粉溶于 2 mL 的容量瓶中，按待测样品体积的 1:1 分别添加已知含量的混合对照品溶液，超声 30 min，过滤，即得。按 2.2 项下色谱条件检测，计算其回收率。结果见表 2，0.2 g 6 号样品中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的回收率分别为 91.34%、85.84%、86.73% 和 85.68%；RSD 值分别为 3.37%、3.28%、1.71% 和 1.89%。各物质回收率均在 80% 以上，且 RSD 值均小于 5%，表明该方法回收率良好。

表 2 加样回收实验测定结果 ($n=6$)

Tab 2 Results of experimental measurements of spiked recovery experiments ($n=6$)

化学成分	样品中的含量/ μg	加入量/ μg	检出量/ μg	平均回收率/%	RSD/%
朝藿定 A	1.596	5.400	6.529	91.34	3.37
朝藿定 B	0.672	5.400	5.307	85.84	3.28
朝藿定 C	1.210	8.100	8.235	86.73	1.71
淫羊藿苷	1.274	7.800	7.956	85.68	1.89

2.4 含量测定

2.4.1 催情散中总多糖和总黄酮含量测定

取 7 种样品按照 2.1 项下方法制备供试品溶液，选取最

佳稀释浓度测定其吸光度 A，并计算催情散中总多糖及总黄酮含量。结果见表 3、表 4。

表 3 待测样品中总多糖含量

Tab 3 Total polysaccharide content of sample to be tested

样品	1	2	3	4	5	6	7
OD 值	1.054	0.957	0.802	0.908	0.770	0.863	1.034
提取物中总多糖含量/%	3.870	3.510	2.940	3.330	2.820	3.160	3.800

表 4 待测样品总黄酮含量

Tab 4 Total flavonoid content of the sample to be tested

样品	1	2	3	4	5	6	7
OD 值	0.648	0.243	0.479	0.315	0.289	0.470	0.257
提取物中总黄酮含量/%	1.840	1.010	1.430	1.220	1.140	1.400	1.050

2.4.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷含量测定 取 7 种样品制备供试品溶液,依次测定样品提取物中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量。结果见表 5 及图 1,7 种样品中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的平均含量为 0.0137%、0.0131%、0.1106%、0.0764%。

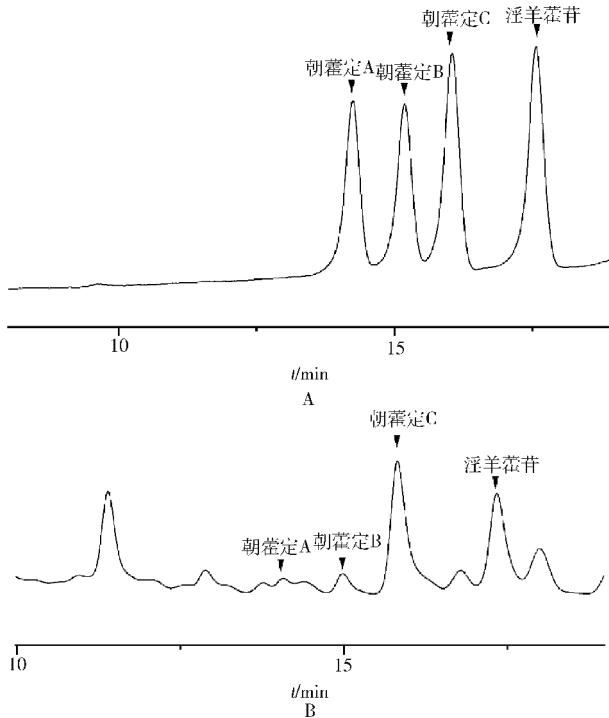


图 1 混合对照品 (A) 的 HPLC 色谱图及样品 1 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed control (A) and HPLC chromatogram of sample 1 (B)

表 5 样品提取物中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量

Tab 5 Content of icaritin A, Icaritin B, icaritin C and icariin in the samples

样品编号	朝藿定 A/%	朝藿定 B/%	朝藿定 C/%	淫羊藿苷/%
1	0.0094	0.0132	0.1340	0.0900
2	0.0066	0.0122	0.0493	0.0640
3	0.0340	0.0180	0.4602	0.0942
4	0.0231	0.0294	0.0685	0.2218
5	0.0041	0.0062	0.0307	0.034
6	0.0161	0.0064	0.0100	0.0183
7	0.0026	0.0060	0.0214	0.0124

3 讨论

3.1 催情散中总多糖和总黄酮测定及作用 催情散中含有多糖、黄酮等化学成分,淫羊藿总黄酮能增强免疫、提高雄性生殖系统功能,促进雌性激素体内生物合成^[6],当归提取物可提高卵泡数量及质量,促进卵泡释放^[7],对母畜卵巢组织和器官功能具有积极作用。本实验采用水提法提取催情散中总多糖和总黄酮,其中蒽酮-硫酸法^[9]存在方法繁琐、反应要求高、反应时间长的缺点,因此采用苯酚-硫酸法^[8]测定总多糖含量。总多糖为生物大分子,测定时需水解为单糖,与强酸作用形成醛及其衍生物后发生显色反应,而无水葡萄糖是一种单糖,无需水解,可直接参与显色反应,确保实验的精准度,因此选用无水葡萄糖为对照品。本实验比较了 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 与 AlCl_3 比色法^[10]在总黄酮含量测定中的差异,并考察实验过程中试剂用量和反应时间,确定其测定方法。此外,由于芦丁和槲皮素是黄酮类化合物中常见的成分,其含量较高,易于测定,能够准确反映样品中总黄酮的含量,但芦丁较槲皮素吸收值高,因此在总黄酮的测定中以芦丁为对照品。

结果显示,不同厂家中总多糖和总黄酮含量有差异,总多糖含量范围在 2.82% ~ 3.87%,总黄酮含量范围在 1.01% ~ 1.84%,黄酮含量较低,查阅文献,多糖有较强亲水性,易溶于水,总黄酮易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂^[11],因此水提法可能更适合于提取总多糖,而对总黄酮含量造成一部分损失,使得黄酮得率降低。因此,建议催情散中总多糖含量大于 2.80%,总黄酮含量大于 1.00%,但这仍需要更多药理研究和临床应用支持。

总多糖和总黄酮是催情散中的主要有效成分,采用比色法测定催情散中总多糖和总黄酮的含量,该方法简便、准确,为催情散定量分析和质量评价提供了有效的方法。

3.2 催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷测定及作用 黄酮苷类易溶于水、甲醇、乙醇等强极性的溶剂中,乙醇回流法得率高且耗能少^[12],操作简单。盛茂银等^[13]研究表明,醇提优于

水提,且 80% 乙醇提取效果好,杂质少。因此,本实验选择 80% 乙醇作为溶剂提取催情散中的黄酮成分。高效液相色谱法在中兽药成分确定及质量检测中具有重要作用,本研究对淫羊藿中 4 种活性成分的色谱条件进行了考察,对比流动相磷酸水-乙腈^[14]、乙腈-水^[15]、甲醇-水^[16]的洗脱效果后,确定乙腈-水为流动相,各色谱峰分离度好且保留时间稳定。

本研究测定了催情散中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的含量,其含量分别为 0.0026% ~ 0.034%, 0.006% ~ 0.0294%, 0.01% ~ 0.4602%, 0.0124% ~ 0.2218%, 对比马清娟^[17]等人对淫羊藿药材中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷等含量发现,其含量与本研究各物质含量相近,说明本研究具有一定可信度。此外,研究表明,4 种活性成分为催情散的主要有效成分^[18],其与雌激素活性表现出良好的相关性^[19],另有文献报道,朝藿定 B 在大鼠组织中的浓度分布顺序为:肝 > 卵巢 > 子宫 > 肺 > 肾 > 脾 > 心 > 脑,表明生殖系统是朝藿定 B 对雌性大鼠的主要靶器官^[20]。淫羊藿苷在卵巢、子宫、睾丸等器官中调节性激素基因的表达^[21],能抗睾丸衰老,增强精子数量和活力^[22],保护卵巢颗粒细胞免受损伤,提高细胞活力^[23]。测定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷对于评价催情散滋阴补阳、改善生殖功能具有重要作用。

4 结 论

本论文测定了催情散中总多糖和总黄酮含量,并成功建立了高效液相色谱法测定了催情散中的朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的含量。催情散中有效化学成分的含量反映了催情散的质量及临床疗效,这也为兽医临床治疗提供了用药参考,为中兽药质量控制提供了科学的理论依据。

参考文献:

[1] 唐斯嘎,韩乌兰图雅,娜仁花,等. 中草药“催情散”及其在治疗母畜乏情症中的应用研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2019,40(03):92-98.

Tang S G, Hang W L T Y, Na R H, *et al.* Progress of research on the Chinese herbal medicine " aphrodisiac powder " and its application in the treatment of anestrus in female animals [J]. *Livestock and Feed Science*, 2019, 40(03): 92-98.

[2] 王钟翔,李前勇,邓科敏,等. 中药“催情散”中硒含量分析[J]. 中兽医学杂志,2008(02):7-9.

Wang Z Y, Li Q Y, Deng K M, *et al.* Analysis of selenium content in the Chinese medicine " aphrodisiac powder " [J]. *Journal of Chinese Veterinary Medicine*, 2008(02):7-9.

[3] 张吉鹏. 母猪催情中草药组学产品的研制[J]. 养猪,2019(06):34-36.

Zhang J K. Development of herbal histological products for estrus in sows[J]. *Swine farming*, 2019(06): 34-36.

[4] 张吉鹏. 母猪催情的营养调控研究[J]. 中国猪业,2019,14(04):25-30.

Zhang J K. Research on the nutritional regulation of estrus in sows[J]. *China Swine Industry*, 2019, 14(04): 25-30.

[5] 刘新玉,刘昱磊,罗颂平. 菟丝子提取物含药血清对人早孕滋养层细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国生化药物杂志,2016,36(05):43-50.

Liu X Y, Liu Y L, Luo S P. Effect of Cuscuta extract containing serum on proliferation and apoptosis of human early pregnancy trophoblast cells [J]. *Chinese Journal of Biochemical Drugs*, 2016, 36(05): 43-50.

[6] Yang L, Lu D, Guo J, *et al.* Icarin from *Epimedium brevicornum* Maxim promotes the biosynthesis of estrogen by aromatase (CYP19). *J Ethnopharmacol.* 2013 Feb 13;145(3): 715-21.

[7] 马韵冀,钮红丽,范宏芳,等. 当归提取物对卵巢功能不全大鼠卵巢功能的作用[J]. 西北药学杂志,2023,38(01):78-83.

Ma Y Y, Niu H L, Fan H F, *et al.* Effects of *Angelica sinensis* extract on ovarian function in rats with ovarian insufficiency [J]. *Northwest Journal of Pharmacy*, 2023, 38(01): 78-83.

[8] 王悦云,徐文芬,何顺志. 贵州产淫羊藿药材不同药用部位中多糖的含量测定[J]. 时珍国医国药,2009,20(02):367-368.

Wang Y Y, Xu W F, He S Z, Determination of polysaccharide content in different medicinal parts of *Epimedium* from Guizhou Province [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2009, 20(02): 367-368.

[9] 孙晓燕,蔡昌利,徐丽莉,等. 多糖含量测定方法的比较[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(03):58-62.

Sun X Y, Cai C L, Xu L L, *et al.* Comparison of methods for the

- determination of polysaccharide content [J]. Research and Practice of Modern Chinese Medicine. 2015, 29(03): 58-62.
- [10] 鄢又玉,夏婷,张育,等.三氯化铝比色测定火棘总黄酮方法的系统考察[J].食品研究与开发,2015,36(05):89-94.
- Yan Y Y, Xia T, Zhang Y, *et al.* Systematic investigation of the method for the colorimetric determination of total flavonoids in fire buckthorn by aluminium trichloride [J]. Food Research and Development, 2015, 36(05): 89-94.
- [11] 郭雪峰,岳永德.黄酮类化合物的提取·分离纯化和含量测定方法的研究进展[J].安徽农业科学,2007(26):8083-8086.
- Guo X F, Yue Y D. Progress of extraction, purification and content determination of flavonoids [J]. Anhui Agricultural Science, 2007(26): 8083-8086.
- [12] 申庆亮.正交设计法研究淫羊藿提取工艺条件[J].中成药,2001(05):67-68.
- Sheng Q L. Orthogonal design method to study the extraction process conditions of Epimedium [J]. Chinese patent medicine, 2001(05): 67-68.
- [13] 盛茂银,杨庆雄,陈庆富.粗毛淫羊藿黄酮提取物的制备工艺研究[J].时珍国医国药,2008(08):1899-1901.
- Sheng M Y, Yang Q X, Chen Q F. Preparation of flavonoid extract from Epimedium vulgare [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008(08): 1899-1901.
- [14] 欧阳露,夏勇,夏鹏,等.高效液相色谱法同时测定补肾化痰浸膏中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J].医药导报,2014,33(09):1224-1226.
- Ouyang L, Xia Y, Xia P, *et al.* Simultaneous determination of Icaritin and naringenin in Kidney tonic and stasis remover extract by high performance liquid chromatography [J]. Medicine Herald, 2014, 33(09): 1224-1226.
- [15] 徐文芬,杨雯,何顺志,等.一测多评法测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 A、B、C [J].中草药,2016,47(01):130-137.
- Xu W F, Yang W, HE S Z, *et al.* Determination of icaritin and icaritin A, B and C in Epimedium by one-test-multiple-evaluation method [J]. Chinese Herbal Medicine, 2016, 47(01): 130-137.
- [16] 张国霞,李平.高效液相色谱法测定养血扶正颗粒中淫羊藿苷的含量[J].中国药师,2007(04):318-320.
- Zhang G X, Li P. Determination of Icaritin in Nourishing Blood Fuzheng Granules by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Pharmacist, 2007(04): 318-320.
- [17] 马清娟,王晶,韩凌,等.HPLC法同时测定淫羊藿药材中8种黄酮类成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2014,31(12):970-978.
- Ma Q J, Wang J, Han L, *et al.* Simultaneous determination of eight flavonoid components in Epimedium herbs by HPLC [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2014, 31(12): 970-978.
- [18] 徐忠坤,殷洪梅,李芳,等.淫羊藿总黄酮胶囊中黄酮类成分含量测定及抗骨质疏松活性研究[J].中国中药杂志,2018,43(15):3140-3144.
- Xu Z K, Yin H M, Li F, *et al.* Determination of flavonoid composition content and anti-osteoporosis activity of Epimedium total flavonoid capsule [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 43(15): 3140-3144.
- [19] Islam M N, Kim U, Kim D H, *et al.* High-performance liquid chromatography-based multivariate analysis to predict the estrogenic activity of an Epimedium koreanum extract [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2012, 76(5): 923-927.
- [20] Feng Q, Xu S, Yu J, *et al.* Determination of epimedin B in rat plasma and tissue by LC-MS/MS: Application in pharmacokinetic and tissue distribution studies [J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017, 2017.
- [21] Zhou L, Poon C C W, Wong K Y, *et al.* Prenylflavonoid Icaritin Induces Estrogen Response Element-Independent Estrogenic Responses in a Tissue-Selective Manner [J]. Journal of the Endocrine Society, 2020, 4(2): bva025.
- [22] Zhao H, You X, Chen Q, *et al.* Icaritin improves age-related testicular dysfunction by alleviating sertoli cell injury via upregulation of the ER α /Nrf2-signaling pathway [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 677.
- [23] Li N, Wang J, Wang X, *et al.* Icaritin exerts a protective effect against d-galactose induced premature ovarian failure via promoting DNA damage repair [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 118: 109218.