

# HPLC同时测定罗布麻叶药材及其 提取物中6种黄酮的含量

张群林<sup>1\*</sup>, 吴亮<sup>1</sup>, 言安定<sup>2</sup>, 胡飞燕<sup>1</sup>, 袁野<sup>1</sup>, 汪骏程<sup>1</sup>

(1. 安徽医科大学药学院, 安徽合肥230032;

2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽合肥230022)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定罗布麻叶药材及其提取物中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量的方法。方法: 采用HPLC法, Shim pack ODS色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温40 °C, 以0.2%磷酸水溶液和0.2%磷酸乙腈溶液为流动相进行液相色谱梯度洗脱, 检测波长360 nm, 流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>。结果: 6种黄酮成分在40 min内均达到基线分离, 线性关系良好( $R^2 > 0.9997$ ,  $n = 6$ ), 日内、日间精密度RSD ≤ 2.0%。该法成功地应用于罗布麻药材及其提取物中6种黄酮含量的测定, 药材和提取物样品溶液中6种黄酮的平均回收率分别为97.30% ~ 105.8% (RSD ≤ 3.6%) 和98.70% ~ 103.1% (RSD ≤ 2.2%)。结论: 本方法操作简单、结果准确, 具有较好的重复性和稳定性, 为罗布麻叶药材及其提取物质量控制提供了一个很好的依据。

**[关键词]** 罗布麻叶; 提取物; 黄酮; 高效液相色谱法; 质量标准

罗布麻叶为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 的干燥叶。罗布麻遍布于我国华北、西北及黄河流域的盐碱沙荒地区, 资源丰富。罗布麻叶在我国作茶饮和药用历史悠久。罗布麻叶作为茶剂, 因其不含有咖啡因, 比绿茶具有更好的保健作用且更安全, 随着工艺的改进, 其口感味道逐渐改善, 接近人们惯用的茶叶, 近年市场逐渐扩大。罗布麻性凉, 味甘、苦, 归肝经, 具有平肝安神、清热利水之功效, 用于肝阳眩晕, 心悸失眠, 浮肿尿少<sup>[1]</sup>。随着对罗布麻叶研究的不断深入, 其药用范围逐渐扩大。近年来药理研究表明, 罗布麻叶中黄酮类成分具有抗抑郁<sup>[2]</sup>、抗焦虑<sup>[3]</sup>、降血压<sup>[4]</sup>等作用。目前, 罗布麻叶药材及其提取物中的黄酮成分多采用HPLC进行含量测定, 已有报道对其中单一或多种成分进行定量分析<sup>[5-8]</sup>, 但作者采用HPLC-DAD同时测定罗布麻叶中6种黄酮成分(芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚)尚属首次。应用本实验法对不同产地的药材和不同厂家的提取物中黄

酮含量进行分析, 为完善罗布麻叶药材及其提取物质量控制方法提供了理论与数据支持。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 高效液相色谱仪(LC-20, 日本岛津公司), DAD检测器; 电子天平(BP211D, 德国 Sartorius); 超纯水机(Milli-Q, 美国 Millipore); 医用数控超声波清洗器(KQ-500E, 昆山市超声仪器有限公司); 中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司)。

**1.2 试剂** 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号100080-200707), 金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号111521-200303), 异槲皮苷对照品(上海融禾医药科技发展有限公司, 批号100406), 紫云英苷对照品(上海融禾医药科技发展有限公司, 批号100320), 槲皮素对照品(上海融禾医药科技发展有限公司, 批号100325), 山柰酚对照品(南京泽朗医药科技有限公司), 以上对照品纯度均大于98.5% (HPLC); 乙腈(色谱纯), 磷酸(分析纯), 甲醇(分析纯)。

3批罗布麻叶药材分别购于合肥皖健大药房(批号20100527)、合肥百姓缘大药房(批号20100614)和合肥友好医院药剂科(批号20100309), 其产地分别为安徽、辽宁和新疆, 均经安徽中医学院彭华胜教授鉴定为 *A. venetum* 的干燥叶。罗布麻叶提取物1(总黄酮质量分数2%, 批号

**[稿件编号]** 20100822002

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973674); 安徽省优秀青年科技基金项目(10040606Y12); 安徽省自然科学基金项目(070413113)

**[通信作者]** \* 张群林, 主要从事中药色谱、光谱分析, Tel: (0551) 5161176, E-mail: qunlinehang@163.com

010713);罗布麻叶提取物2(总黄酮质量分数30%,批号N010720),分别购于西安2个生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Shim pack ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温40℃;流动相A为0.2%磷酸水溶液,B为0.2%磷酸乙腈溶液,梯度洗脱。0 min,A-B 85:15;9 min,A-B 85:15;20 min,A-B 75:25;30 min,A-B 55:45;40 min,A-B 40:60。检测波长360 nm,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL。按照上述色谱条件进行测定,6种黄酮与其他共存峰得到很好的分离,分离度均大于1.5,各成分理论塔板数不低于3 000,对照品及样品的色谱图见图1。

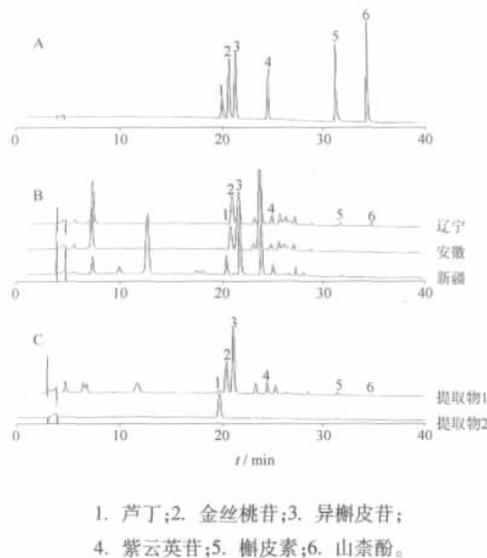


图1 对照品溶液(A)、药材样品(B)和提取物样品溶液(C)的HPLC图

**2.2 对照品溶液配制** 分别精密称取芦丁2.40 mg,金丝桃苷2.38 mg,异槲皮苷5.37 mg,紫云英苷5.27 mg,槲皮素5.25 mg,山柰酚5.10 mg置50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得芦丁0.048 0 g·L<sup>-1</sup>,金丝桃苷0.047 6 g·L<sup>-1</sup>,异槲皮苷0.107 4 g·L<sup>-1</sup>,紫云英苷0.105 4 g·L<sup>-1</sup>,槲皮素0.105 0 g·L<sup>-1</sup>,山柰酚0.102 0 g·L<sup>-1</sup>的对照品贮备液。分别精密量取1.0 mL芦丁,2.0 mL金丝桃苷,1.0 mL异槲皮苷,0.5 mL紫云英苷,0.5 mL槲皮素和0.5 mL山柰酚对照品溶液,置10 mL量瓶

中,得到混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的配制** 取各产地罗布麻药材粉末(过60目筛)约0.1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加入80%甲醇80 mL,超声处理60 min,冷却至室温后,用80%甲醇定容至刻度,过0.22 μm微孔滤膜,作为罗布麻叶药材供试品溶液。

分别取罗布麻叶提取物1约0.2 g和提取物2约0.1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加入80%甲醇80 mL,超声处理5 min,冷却至室温后,用80%甲醇定容至刻度,过0.22 μm微孔滤膜,即得罗布麻叶提取物1和提取物2的供试品溶液。提取物2供试品溶液测定时,精密量取1 mL用80%甲醇定容至100 mL。

**2.4 线性关系的考察** 将2.2项下混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释成系列浓度的混合对照品溶液,分别进样20 μL,以峰面积为纵坐标,以对照品质量浓度(mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数,见表1。

表1 6种黄酮成分的线性关系

化合物	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>
芦丁	$Y = 25\,482.9X - 665.4$	0.999 9	0.076 ~ 4.800
金丝桃苷	$Y = 36\,960.4X - 763.5$	0.999 9	0.076 ~ 3.808
异槲皮苷	$Y = 33\,302.8X - 162.5$	0.999 9	0.086 ~ 10.74
紫云英苷	$Y = 42\,804.5X - 202.8$	0.999 9	0.042 ~ 2.108
槲皮素	$Y = 67\,189.3X - 1\,412.1$	0.999 7	0.042 ~ 2.100
山柰酚	$Y = 79\,133.9X - 1\,160.9$	0.999 8	0.041 ~ 2.040

**2.5 精密度试验** 将2.2项下混合对照品稀释成适宜浓度的混合对照品溶液,进样20 μL,每小时进样1次,连续进样6次。芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的日内精密度RSD(n=5)分别为1.2%,1.0%,0.80%,0.90%,1.9%,1.3%;连续3 d进以上浓度的混合对照品溶液,每天进3次,其日间精密度RSD(n=9)分别为1.6%,1.0%,1.4%,1.6%,2.0%,1.8%。日内、日间精密度RSD均≤2.0%,表明该方法的日内和日间精密度均良好。

**2.6 重复性试验** 分别按2.3项下罗布麻药材和提取物供试品溶液制备方法,平行制备5份罗布麻叶药材(批号20100614)和提取物1(批号010713)供试品溶液,按照样品测定方法操作,记录峰面积,根据当天随行标准曲线,计算样品各黄酮成分含量。

药材样品中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.0%, 0.80%, 2.4%, 0.80%, 0.60%; 提取物样品中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量的 RSD 分别为 0.4%, 0.8%, 0.2%, 1.4%, 0.60%, 1.0%, 表明该实验的重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 分别取罗布麻叶药材(批号 20100614)和提取物 1(批号 010713)的供试品溶液,分别于 0, 3, 6, 12, 24 h 进样 20 μL, 记录峰面积, 根据当天随行标准曲线, 计算样品各成分含量。药材样品中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量 RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 2.6%, 1.8%, 0.60%, 1.4%; 提取物样品中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量 RSD 分别为 1.1%, 1.3%, 1.0%, 2.6%, 1.0%, 2.3%, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收率** 取已知含量的罗布麻叶药材(批号 20100614)粉末(过 60 目筛) 6 份, 每份约 0.05 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加入芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚对照品溶液适量, 按 2.3 项下罗布麻叶药材供试品制备方法制备, 进样 20 μL, 计算各对照品的平均加样回收率和 RSD, 见表 2, 6 种黄酮的平均回收率在 97.30% ~ 105.8%, RSD 均 ≤ 3.6%。

取已知含量的罗布麻叶提取物 1(批号 010713) 6 份, 每份约 0.025 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚对照品溶液适量, 按 2.3 项下罗布麻叶提取物供试品制备方法制备, 进样 20 μL, 计算各对照品的平均加样回收率和 RSD 值, 6 种黄酮的平均回收率在 98.70% ~ 103.1%, RSD 均 ≤ 2.2%。

**2.9 样品测定** 在 2.1 项色谱条件下, 取不同产地的罗布麻药材供试品溶液和不同公司生产的罗布麻叶提取物供试品溶液, 分别进样 20 μL。罗布麻叶药材、提取物中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的含量结果分别见表 3, 4。对照品溶液、药材样品和提取物样品溶液的色谱图见图 1。

### 3 讨论

**3.1 流动相的选择** 芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的苷元均为槲皮素, 且金丝桃苷和异槲皮苷仅在糖基部分一个羟基的构型不同, 极性极为相似。作者选

表 2 罗布麻叶药材加样回收率(n=6)

化合物	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
芦丁	7.47	4.80	12.03	95.08	99.3	3.6
	7.51		12.19	97.46		
	7.49		12.45	103.27		
	7.50		12.44	103.0		
	7.48		12.33	101.0		
	7.45		12.07	96.25		
金丝桃苷	161	167	333	103.0	105.8	1.3
	162		339	105.9		
	162		339	106.5		
	162		340	106.8		
	162		339	106.4		
	161		339	106.4		
异槲皮苷	195.28	214.80	410.75	102.4	103.4	1.0
	196.41		415.15	104.0		
	195.86		412.44	102.9		
	196.02		416.36	104.7		
	195.67		415.29	104.3		
	195.75		414.88	102.0		
紫云英苷	35.38	52.70	85.51	95.11	97.30	1.8
	35.59		86.29	96.22		
	35.49		88.20	100.02		
	35.52		86.65	97.04		
	35.45		86.52	96.91		
	35.47		87.31	98.37		
槲皮素	8.69	11.55	19.97	97.66	98.10	2.6
	8.74		20.37	100.65		
	8.72		20.30	100.33		
	8.72		19.62	94.33		
	8.71		19.80	96.03		
	8.73		20.26	99.83		
山柰酚	7.24	9.18	16.62	102.18	102.5	1.3
	7.28		16.79	103.58		
	7.26		16.82	104.11		
	7.27		16.63	102.00		
	7.26		16.46	100.29		
	7.25		16.68	102.72		

择 0.1% 磷酸水溶液和 0.1% 磷酸甲醇溶液作流动相时, 考察了不同的梯度洗脱程序, 芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷都无法达到基线分离; 后改用 0.2% 磷酸水溶液和 0.2% 磷酸乙腈溶液作为流动相后, 混合对照品和样品中 6 种黄酮类成分均达到了基线分离; 同时流动相中的磷酸比例的增加, 增加了色谱峰的对称性, 减少了峰的拖尾现象。

**3.2 检测波长的选择** 本研究采用二极管阵列检测器, 在分析对照品的同时进行了 190 ~ 400 nm 全波长紫外扫描, 结果芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云

表3 不同产地罗布叶药材中的6种黄酮类成分的质量分数( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

样品	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	紫云英苷	槲皮素	山柰酚
安徽	0.112 ± 0.004	2.689 ± 0.067	3.491 ± 0.073	0.429 ± 0.010	0.081 ± 0.001	0.033 ± 0.001
辽宁	0.149 ± 0.004	3.220 ± 0.032	3.807 ± 0.038	0.706 ± 0.178	0.173 ± 0.002	0.144 ± 0.001
新疆	2.306 ± 0.010	0.140 ± 0.002	6.265 ± 0.033	0.778 ± 0.006	0.097 ± 0.001	0.042 ± 0.001

表4 罗布麻叶提取物中6种黄酮类成分的质量分数( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

样品	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	紫云英苷	槲皮素	山柰酚
提取物1	0.270 ± 0.002	1.890 ± 0.011	3.900 ± 0.224	0.444 ± 0.006	0.070 ± 0.001	0.020 ± 0.001
提取物2	395.227 ± 8.162	-	-	-	6.530 ± 0.100	-

英苷、槲皮素、山柰酚的  $\lambda_{\max}$  分别为 255,355 nm; 255,354 nm; 254,354 nm; 265,347 nm; 255,370 nm; 265,366 nm。实验分别提取 254,350,360,370 nm 下各样品溶液的色谱峰进行比较,结果在 360 nm 下的各黄酮成分峰形好,基线平稳,各色谱峰之间的分离度高,兼顾6种黄酮成分的最大吸收,故检测波长定为 360 nm。

**3.3 药材供试品溶液制备方法的选择** 参照《中国药典》2005年版罗布麻叶含量测定方法,选用80%甲醇作为提取溶剂,对辽宁产罗布麻叶药材进行回流提取和超声提取分析。结果发现,药材中含量较高的金丝桃苷和异槲皮苷超声提取率稍低,对于含量较低的槲皮素和山柰酚,2种提取方法的提取率没有显著的差异,但超声提取操作简单,节省时间,易于平行获取供试品溶液,故选择超声提取法。

**3.4 含量分布** 本实验选择了辽宁、安徽和新疆3个产地的罗布麻叶药材和2家公司出售的罗布麻叶提取物进行研究。结果发现辽宁和安徽产罗布麻叶中的黄酮含量接近,而新疆产罗布麻叶金丝桃苷的含量极低,而芦丁含量相对较高,这可能是新疆产地的特殊生态环境影响罗布麻叶药材有效成分积累的结果;购于西安某生物科技有限公司的罗布麻叶提取物2中只检测到芦丁和槲皮素,未见罗布麻叶提取物 HPLC 图谱的特征,且主要成分为芦丁,质量分数达到了 395.2 mg · g<sup>-1</sup>,疑为添加芦丁所得,而非罗布麻叶提取物。

罗布麻叶中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷等主要活性成分的苷元均为槲皮素,按照《中国药典》2005年版规定,测定水解后的槲皮素含量来控制罗布麻叶药材及其提取物的质量存在不合理性。

《中国药典》2010年版已经注意到了这一点并加以修订,现以金丝桃苷含量来对罗布麻叶药材进行质量控制,但也只是对于单一指标成分的定量分析。本实验对罗布麻叶药材及其提取物中6种黄酮成分进行了同时检测,为其质量标准的完善提供了理论和数据支持,以便更全面地控制药材的质量。

文献报道<sup>[9]</sup>,罗布麻叶提取物具有显著的抗抑郁作用,其活性成分主要为金丝桃苷和异槲皮苷等黄酮成分。本实验发现罗布麻叶药材及其提取物中金丝桃苷、异槲皮苷的含量均相对较高,为本课题组后期研究罗布麻叶抗抑郁的药理作用奠定了药效物质研究基础。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:147.
- [2] Butterweck V, Simbrey K, Seo S, et al. Long-term effects of an *Apocynum venetum* extract on brain monoamine levels and  $\beta$ -AR density in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*,2003,75(3):557.
- [3] Grundmann O, Nakajima J, Seo S, et al. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test [J]. *J Ethnopharmacol*,2007,110(3):406.
- [4] Kim D W, Yokozaw T, Hattori M, et al. Effects of aqueous extracts of *Apocynum venetum* leaves on spontaneously hypertensive, renal hypertensive and NaCl-fed-hypertensive rats [J]. *J Ethnopharmacol*,2000,72(1/2):53.
- [5] 韩利文,侯晋军,李云兰,等.高效液相色谱法比较不同种属和产地罗布麻叶中金丝桃苷的含量[J].*中国现代应用药学杂志*,2006,23(5):392.
- [6] 韩利文,杨官娥,李青山.不同种属罗布麻叶水解产物中槲皮素含量比较研究[J].*中国药品标准*,2007,8(3):45.
- [7] 郁韵秋,龚伟珈,李端,等.高效液相色谱法同时测定罗布麻浸膏粉中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的含量[J].*复旦学报:自然科学版*,2007,46(3):417.
- [8] 强静,李奇,刘训红,等.大花罗布麻叶黄酮类成分的分析[J].

新疆中医药,2009,27(5):31.  
[9] Butterweck V, Nishibe S, Sasaki T, et al. Antidepressant effects

of *Apocynum venetum* leaves in a forced swimming test [J]. Biol Pharm Bull,2001,24(7):848.

## Simultaneous determination of six flavonoids in *Apocynum venetum* by HPLC

ZHANG Qunlin<sup>1\*</sup>, WU Liang<sup>1</sup>, YAN Anding<sup>2</sup>, HU Feiyan<sup>1</sup>, YUAN Ye<sup>1</sup>, WANG Juncheng<sup>1</sup>

(1. Key Anhui Provincial key Lab of Natural Medicine Active Research, College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Pharmacy Department, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of rutin, hyperoside, isoquercetin, astragalulin, quercetin, and kaempferol in *Apocynum venetum* and its extracts. **Method:** The separation was carried out on a Shim pack ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column eluted with in mobile phases of water containing 0.2% phosphoric acid and acetonitrile containing 0.2% phosphoric acid in acetonitrile gradient mode. The column temperature was 40 °C, and the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 360 nm. **Result:** The good separation of six flavonoids was achieved within 40 min, with the relative standard deviations (RSD) of intra- and inter-day precision ≤ 2.0%. Calibration curves of rutin, hyperoside, isoquercetin, astragalulin, quercetin, and kaempferol showed good linear relationship ( $R^2 > 0.9997$ ,  $n = 6$ ). The average recoveries of the six flavonoids were within 97.30% ~ 105.8% (RSD 2.6%). Three batches of *A. venetum* and 2 batches of its extracts were determined. **Conclusion:** The developed method is simple, accurate, and repeatable, and can be readily used as a powerful tool for the quality control of *A. venetum* and its extracts.

[Key words] *Apocynum venetum*; extract; HPLC; flavonoid; quality standard

doi: 10.4268/cjmm20110516

[责任编辑 王亚君]