

# RP-HPLC法测定罗布麻叶中金丝桃苷和罗布麻甲素的含量

周春玲<sup>1,2</sup>, 孙苓苓<sup>2</sup>, 毕开顺<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016 2 辽宁省药品检验所, 沈阳 110023)

**摘要** 目的: 建立测定罗布麻叶中金丝桃苷和罗布麻甲素含量的方法。方法: 采用 Zorbax- C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-1.0% 醋酸溶液 (14:86) 为流动相, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 360 nm, 柱温 30 ℃。结果: 金丝桃苷和罗布麻甲素的线性范围分别为 0.024~0.487 μg 和 0.028~0.551 μg 平均回收率 ( $n=9$ ) 分别为 98.7% 和 99.8%。结论: 所建立的 HPLC 法可用于同时测定罗布麻叶中金丝桃苷和罗布麻甲素的含量。

**关键词:** 罗布麻叶; 金丝桃苷; 罗布麻甲素; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1001-03

## RP-HPLC analysis of hyperoside and isoquercitrin in *Apocynum venetum* L.

ZHOU Chun-ling<sup>1,2</sup>, SUN Ling-ling<sup>2</sup>, BIKai-shun<sup>1</sup>

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China 2. Liaoning Provincial Institute for Drug Control Shenyang 110023 China)

**Abstract Objective** To establish the quantitative analysis of hyperoside and isoquercitrin by RP-HPLC. **Methods** The determination of hyperoside and isoquercitrin was conducted by RP-HPLC using a Zorbax- C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile-1.0% acetic acid solution (14:86) with the flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 360 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. **Results** In HPLC analysis, the linear ranges of hyperoside and isoquercitrin were 0.024-0.487 μg and 0.028-0.551 μg respectively. The average recoveries ( $n=9$ ) were 98.7% and 99.8%, respectively. **Conclusion** The established method can be used to determine the contents of hyperoside and isoquercitrin in *Apocynum venetum* L. simultaneously.

**Key words** *Apocynum venetum* L.; hyperoside; isoquercitrin; RP-HPLC

罗布麻叶为一种常用的中药, 系夹竹桃科罗布麻属红麻 (*Apocynum venetum* L.) 的干燥叶。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、高血压、神经衰弱、肾炎浮肿<sup>[1]</sup>。在我国东北地区和日本, 罗布麻叶被当作茶叶常年饮用。近年来临床用于利尿、消肿、降压并具有不同程度的抗辐射、免疫、降血脂、抗衰老和镇静作用<sup>[2,3]</sup>。文献报道黄酮类物质是其主要有效成分<sup>[4]</sup>, 本文采用高效液相色谱法同时测定了金丝桃苷和罗布麻甲素的含量, 该方法简便、快捷、准确。

### 1 仪器与试剂

岛津 2010 高效液相色谱仪 (包括四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器),

Hu102608 超声波清洗器 (天津奥特塞恩斯仪器有限公司 42 kHz, 280 W), 希波氏 C<sub>18</sub> 固相萃取小柱 (天津市富集科技有限公司, 250 mg 6 mL), Mettler Toledo XP26 电子天平 (百万分之一), Sartorius BP110S 电子天平 (万分之一)。

乙腈 (Tedia United States of America) 为色谱纯, 重蒸馏水, 冰醋酸 (天津市博迪化工有限公司) 为分析纯。

金丝桃苷对照品 (批号: 111521-200303 供含量测定用) 购自中国药品生物制品检定所, 罗布麻甲素 (纯度 ≥98%) 购自 Sigma 公司。

不同来源的罗布麻叶样品从全国各地收集并经辽宁省食品药品检验所王维宁老师鉴定为正品。

\* 通讯作者 Tel: (024) 23986259 E-mail: bikaishun@yahoo.com

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得金丝桃苷对照品储备液 ( $0.122\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 精密称取罗布麻甲素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得罗布麻甲素对照品储备液 ( $0.276\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。分别精密量取金丝桃苷对照品储备液 2 mL、罗布麻甲素对照品储备液 1 mL 置同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 即得。

2.2 供试品溶液制备 取罗布麻叶, 粉碎, 过 4 号筛, 混匀, 精密称取药材粉末 0.5 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇溶液 50 mL, 称定重量, 超声处理 60 min 再称定重量, 并用 75% 乙醇溶液补足减失的重量, 滤过, 取续滤液约 5 mL, 过  $\text{C}_{18}$  固相萃取小柱, 弃去约 3 mL 滤液, 接收其余滤液, 用  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  的滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: 安捷伦 Zorbax-  $\text{C}_{18}$  ( $4.6\text{ mm}\times150\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈 - 1.0% 醋酸溶液 (14: 86); 流速:  $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $360\text{ nm}$ ; 柱温:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。进样量:  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。在此条件下, 金丝桃苷峰和罗布麻甲素峰的保留时间分别为  $13.0\text{ min}$  和  $14.6\text{ min}$ , 两者的分离度为 2.0。在本文色谱条件下对照品与样品色谱图见图 1。

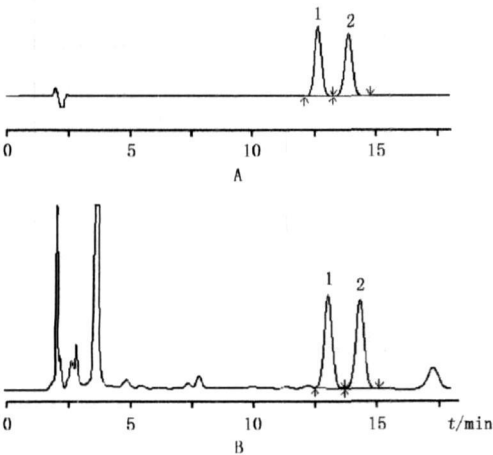


图 1 对照品 (A) 及江西产样品 (B) 色谱图  
Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample from Jiangxi(B)  
1. 金丝桃苷 (hyperoside) 2. 罗布麻甲素 (isoquercitrin)

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 15, 20  $\mu\text{L}$  分别注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以峰面积积分值对进样量 ( $\mu\text{g}$ ) 做线性回归曲线。金丝桃苷和罗布麻甲素回归方程分别为:

$Y = 2.524 \times 10^6 X - 632 \quad r = 0.9999$

$Y = 2.171 \times 10^6 X - 770 \quad r = 0.9999$

结果表明金丝桃苷进样量在  $0.024\sim0.487\text{ }\mu\text{g}$  罗布麻甲素进样量在  $0.028\sim0.551\text{ }\mu\text{g}$  范围内, 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取供试品溶液重复进样 6 次, 记录峰面积, 金丝桃苷和罗布麻甲素的 RSD 值分别为 0.2% 和 0.3%。

2.6 重复性试验 取同一批次罗布麻叶粉末 0.5 g 共 6 份, 分别精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。结果样品中金丝桃苷和罗布麻甲素的含量平均值 ( $n = 6$ ) 分别为 0.217% 和 0.253%, RSD 分别为 0.7% 和 1.0%。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样测定。结果金丝桃苷和罗布麻甲素峰面积的 RSD 均为 0.7%, 表明供试品溶液在 8 h 内均稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的金丝桃苷 (0.217%), 罗布麻甲素 (0.253%), 与“2.6”项同一批次的罗布麻叶药材粉末 0.25 g 精密加入金丝桃苷对照品溶液和罗布麻甲素对照品溶液适量, 按“2.2”项下方法制备溶液。进样测定。结果见表 1。金丝桃苷和罗布麻甲素平均回收率 ( $n = 9$ ) 分别为 98.7% 和 99.8%。

表 1 回收率试验结果 ( $n = 3$ )  
Tab 1 Results of recovery

| 成分<br>(component)        | 样品含量<br>(content)<br>/mg | 加入量 (add<br>amount)<br>/mg | 测得量 (found<br>amount)<br>/mg | 平均值<br>(average<br>recovery) % | RSD<br>% |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------|
| 金丝桃苷<br>(hyperoside)     | 0.5490                   | 0.2434                     | 0.796                        | 100.9                          | 1.3      |
|                          | 0.5660                   |                            | 0.808                        |                                |          |
|                          | 0.5680                   |                            | 0.816                        |                                |          |
|                          | 0.5855                   | 0.4868                     | 1.062                        | 97.9                           | 1.4      |
|                          | 0.6180                   |                            | 1.088                        |                                |          |
|                          | 0.5890                   |                            | 1.072                        |                                |          |
| 罗布麻甲素<br>(isoquercitrin) | 0.6090                   | 0.7302                     | 1.319                        | 97.2                           | 0.5      |
|                          | 0.6295                   |                            | 1.342                        |                                |          |
|                          | 0.6300                   |                            | 1.336                        |                                |          |
|                          | 0.6395                   | 0.2756                     | 0.912                        | 97.7                           | 1.6      |
|                          | 0.6595                   |                            | 0.924                        |                                |          |
|                          | 0.6620                   |                            | 0.933                        |                                |          |
|                          | 0.6825                   | 0.5512                     | 1.246                        | 101.4                          | 2.0      |
|                          | 0.7205                   |                            | 1.266                        |                                |          |
|                          | 0.6865                   |                            | 1.254                        |                                |          |
|                          | 0.7095                   | 0.827                      | 1.538                        | 100.4                          | 0.3      |
|                          | 0.7335                   |                            | 1.566                        |                                |          |
|                          | 0.7340                   |                            | 1.562                        |                                |          |

**2.9 样品的测定** 取不同来源罗布麻叶药材 7批, 每批取 3份样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下分别测定, 以外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ( $n=3$  %)

Tab 2 Results of determination

| 来源<br>(sources)    | 金丝桃苷<br>(hyperoside) | 罗布麻甲素<br>(isoquecitrin) |
|--------------------|----------------------|-------------------------|
| 吉林 (Jilin)         | 0.293(0.5)           | 0.345(1.0)              |
| 天津 (Tianjin) 1     | 0.232(0.8)           | 0.249(1.0)              |
| 天津 (Tianjin) 2     | 0.225(1.0)           | 0.288(0.9)              |
| 内蒙古 (Neimonggol) 1 | 0.229(0.9)           | 0.299(1.0)              |
| 河北 (Hebei)         | 0.225(0.5)           | 0.298(0.8)              |
| 内蒙古 (Neimonggol) 2 | 0.235(1.2)           | 0.311(0.8)              |
| 贵阳 (Guiyang)       | 0.283(0.8)           | 0.324(1.2)              |
| 江西 (Jiangxi)       | 0.217(0.7)           | 0.253(1.0)              |

注 (note): 括号内为 RSD (RSD in the parentheses %)

## 3 讨论

### 3.1 提取条件的考察

**3.1.1** 比较了甲醇、乙醇、70% 甲醇和 75% 乙醇等不同的提取溶剂, 结果表明以 75% 乙醇为溶剂提取的金丝桃苷和罗布麻甲素含量较高, 色谱峰的峰形好, 分离效果理想。

**3.1.2** 比较了超声 0.5 h、回流 1 h、索氏提取 5 h 这 3种提取方法, 实验表明 3种方法金丝桃苷和罗布麻甲素提取率没有明显差异, 考虑到超声提取方法简单, 成本低, 所以选择超声提取方法。

**3.1.3** 分别对 20、40、60 min 不同提取时间进行考察, 结果表明超声 60 min 提取较完全。

**3.2 流动相的筛选** 对甲醇-水、甲醇-2% 醋酸、甲醇-0.2% 冰醋酸、乙腈-水、乙腈-1% 醋酸等不同的流动相系统进行考察, 实验表明流动相为乙腈-1% 醋酸时, 样品中金丝桃苷和罗布麻甲素的色谱峰达到基线分离, 峰形好, 不拖尾。

**3.3** 本方法采用 75% 乙醇超声提取罗布麻叶中黄酮类物质, 用固相萃取预分离脱脂克服了用有机溶剂脱脂时间长、操作麻烦, 会造成黄酮类物质损失的缺点, 而且使样品的前处理操作更为简便快速。该方法的建立在一定程度上为罗布麻叶中黄酮类物质的快速测定提供了方便。

## 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (一部): 147
- 2 WEI Jian-ming(魏鉴明). The research status quo and outlook of *Apocynum venetum* in the pharmaceutical (罗布麻在医药方面的研究现状和展望). *Chin Pharm Bull*(药学通报), 1986 21(12): 741
- 3 Tagawa C, Kagawa T, Nakazawa Y, et al. Studies on antihypertensive effect of *Luohuma* (*Apocynum venetum* L.) leaf extract. *J Pharm Soc Jpn*, 2004 124(11): 851
- 4 CHEN Miao-hua(陈妙华), LIU Feng-shan(刘凤山). Studies on chemical constituents of *Apocynum venetum* L. in sedation (罗布麻叶镇静化学成分的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1991, 16(10): 609

(本文于 2008年 7月 10日收到)