

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00759

优化的 HPLC-DAD 法同时测定罗布麻中 4 种黄酮类成分的含量

梁珊珊, 赵亮, 张海, 贾静, 李悦悦, 张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 建立优化的 HPLC 方法同时测定不同产地罗布麻药材中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷以及槲皮素含量。**方法** 采用 Shiseido C₁₈ (3.0 μm, 3.0 mm×100 mm) 色谱柱; 以乙腈: 甲醇=10: 1 作为 A 相-0.1% 甲酸水溶液作为 B 相, 梯度洗脱(0~4 min, 5%→16% A; 4~15 min, 16%→23% A; 15~20 min, 23%→35% A; 20~22 min, 35%→55% A), 流速 0.6 ml·min⁻¹; 二极管阵列检测器检测波长: 360 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 5 μl。**结果** 芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素在 22 min 内基线分离, 线性范围分别为 0.308 4~30.84 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.877 6~87.76 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.902 0~90.20 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.249 8~24.98 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$)。方法学考察表明, 日内和日间精密度、最低检测限和定量限的范围均符合相关标准, 加样回收率($n=3$) 分别为: 芦丁 102.0%、96.40%、103.8%; 金丝桃苷 98.50%、101.0%、102.9%; 异槲皮苷 98.40%、100.4%、101.4%; 槲皮素 104.4%、103.1%、103.5%。测定了 9 个产地的罗布麻中 4 个黄酮类成分的含量。**结论** 本法快速、准确、简便, 具有良好的重复性, 可以为罗布麻药材质量控制提供依据。

[关键词] 高压液相色谱法; 罗布麻; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素

[中图分类号] R 931.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0759-04

Optimized HPLC-DAD in simultaneous determination of 4 flavonoids in *Apocynum venetum*

LIANG Shan-shan, ZHAO Liang, ZHANG Hai, JIA Jing, LI Yue-yue, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To establish an optimized HPLC method for simultaneous determination of rutin, hyperoside, isoquercitrin, and quercetin in *Apocynum venetum* obtained from different locations. **Methods** The separation was performed on a Shiseido C₁₈ (3.0 μm, 30 mm×100 mm) column by gradient elution with acetonitrile: methanol=10: 1 as the mobile phase A and 0.1% formic acid as the mobile phase B (0-4 min, 5%→16% A; 4-15 min, 16%→23% A; 15-20 min, 23%→35% A; 20-22 min, 35%→55% A) at a flow rate of 0.6 ml·min⁻¹. The detection wave length of DAD was set at 360 nm, and the column temperature was 30℃. The injection volume was 5 μl. **Results** Rutin, hyperoside, isoquercitrin, and quercetin were separated at base line within 22 min with good linearity ($r=0.999\ 9$), with the linearity range being 0.308 4~30.84 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.877 6~87.76 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.902 0~90.20 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), and 0.249 8~24.98 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 9$), respectively. The result of intra-day and inter-day precisions, limits of detection and quantitation were all within the normal ranges. The recovery rates ($n=3$) were 102.0%, 96.40%, and 103.8% for rutin, 98.50%, 101.0%, and 102.9% for hyperoside, 98.40%, 100.4%, and 101.4% for isoquercitrin, and 104.4%, 103.1%, and 103.5% for quercetin. The contents of the above 4 flavonoids were determined in *Apocynum venetum* from 9 different locations. **Conclusion** The method developed in this study is rapid, simple, accurate, reliable, and with good repeatability; the method provides evidence for the quality control of *Apocynum venetum*.

[Key words] high pressure liquid chromatography; *Apocynum venetum*; rutin; hyperoside; isoquercitrin; quercetin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 759-762]

罗布麻为夹竹桃科植物 *Apocynum venetum* L. 的干燥叶^[1], 又称为野麻、茶叶花, 耐旱、耐盐碱、耐严寒和酷暑, 广泛生长在盐碱、沙荒地, 集中在新疆、内蒙古、甘肃、青海等省区, 因最早发现于新疆罗布泊, 故命名为罗布麻^[2]。罗布麻内含黄酮类化合

物、强心苷、生物碱、氨基酸和多种微量元素(如 K、Ca、Fe、Zn 等), 对预防和治疗高血压、高血脂、冠心病、哮喘病、气管炎等疾病有较好的效果^[3]。

黄酮类成分是罗布麻药材中的主要成分^[4]。已有的文献^[5-7]报道只对其中的 1 种或者 2 种的成分

[收稿日期] 2011-02-22 **[接受日期]** 2011-06-09

[作者简介] 梁珊珊, 硕士. E-mail: shanshan0543401@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

含量或者总黄酮的含量进行测定。虽然也有对罗布麻叶中的多种黄酮类成分的含量测定的研究,但是分析时间长,条件繁琐^[8]。本研究在先前研究的基础上,采用高效液相色谱法,首次选用粒径为 3.0 μm 的快速液相柱,在 22 min 内同时测定了罗布麻中 4 种主要黄酮类成分的含量,并且做了全面的方法学考察,有利于更全面、有效、快速地控制罗布麻药材的质量。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 安捷伦 1100 系列高效液相色谱仪(Agilent,美国),包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器;十万分之一电子天平(梅特勒,美国);高速离心机(ABBORT,美国);上海淀久 DJ-04 药材粉碎机;SB3200-T 超声发生器(50 kHz, 120 W)。

1.2 试剂 9 罗布麻药材分别从当地医药公司购买,经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定均为夹竹桃科植物罗布麻(*Apocynum venetum* L.)的干燥叶。对照品金丝桃苷、槲皮素(纯度>99.0%)均购于上海诗丹德生物制品有限公司,对照品芦丁、异槲皮苷(纯度>99.0%)均购于成都曼斯特生物制品有限公司,乙腈为色谱纯(Fisher,美国),水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 混合对照品储备液制备 精密称取经减压干燥至恒重的对照品芦丁 7.71 mg、金丝桃苷 10.97 mg、异槲皮苷 11.28 mg,槲皮素 6.25 mg,置 25 ml 量瓶中,用 80% 甲醇分别配制成浓度为 308.4、438.8、451.0、249.8 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的单一对照品储备液。精密量取芦丁和槲皮素的上述单一对照品各 0.5 ml、金丝桃苷以及异槲皮苷各 1 ml 置同一 10 ml 量瓶中,用 80% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备 罗布麻药材粉碎,过 2 号筛,精密称取粉末 0.5 g,加入 80% 甲醇 50 ml,称质量,加热回流 90 min,放冷,然后用 80% 甲醇补足质量,过滤,滤液用 80% 甲醇定容至 50 ml 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.3 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱:Shiseido C₁₈(3.0 μm ,3.0 mm×100 mm)色谱柱;流动相为乙腈:甲醇=10:1 作为 A 相,0.1% 甲酸作为 B 相,梯度洗脱(0~4 min,5%→16% A;4~15 min,16%→23% A;15~20 min,23%→35% A;20~22

min,35%→55% A),流速 0.6 ml·min⁻¹;DAD 检测器检测波长:360 nm;柱温:30℃;进样量:5 μl 。在上述色谱条件下,芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,理论塔板数均大于 7 000,对称因子在 0.95~1.05 之间。色谱图见图 1。

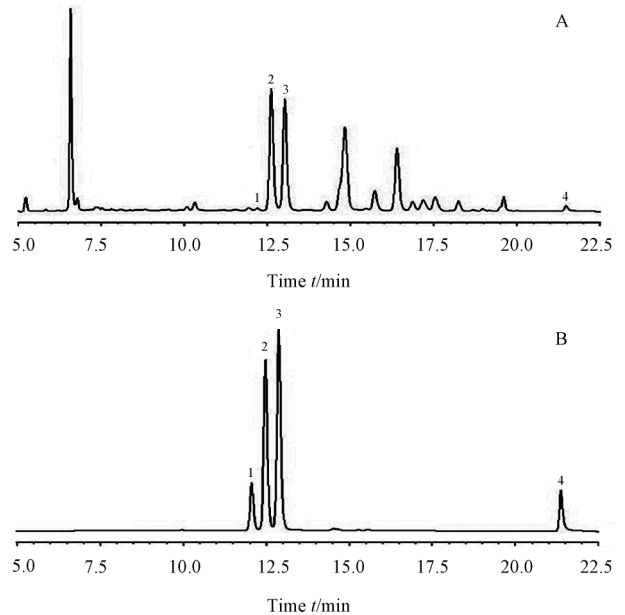


图 1 2 号样品(A)及对照品(B)的色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of sample No. 2(A) and reference substances(B)

1: Rutin; 2: Hyperoside; 3: Isoquercitrin; 4: Quercetin

2.4 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、2.0、5.0、10.0 ml 至 10 ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度混合对照品溶液。取各系列浓度混合对照品溶液在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,以各对照品溶液的浓度(X)为横坐标,以各成分色谱峰面积(Y)为纵坐标,计算被测化合物的线性回归方程。芦丁回归方程为 $Y = 11.74X - 0.389$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.3084~30.84 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$;金丝桃苷回归方程为 $Y = 15.59X + 1.174$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.8776~87.76 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$;异槲皮苷回归方程为 $Y = 18.43X + 1.482$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.9020~90.20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$;槲皮素回归方程为 $Y = 12.53X - 3.223$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.2498~24.98 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.5 定量限和检测限考察 将罗布麻中黄酮类成分对照品溶液进行逐级稀释,以信噪比 10:1 时确定其最低定量限;以信噪比 3:1 时,确定其最低检测限。芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的最低定量限分别为 0.3084、0.8776、0.9020、0.2498 $\mu\text{g} \cdot$

ml^{-1} , 最低检测限分别为 0.137 4、0.378 6、0.394 7、0.103 1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.6 精密性试验 在上述色谱条件下, 取 2.1 项下制备的混合对照品溶液的第 3、4、5 三个点作为低、中、高 3 个浓度点, 在 1 d 以内分别进样 3 次, 以及连续 3 d 分别进样, 根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密性。结果 4 种黄酮类成分的日内精密性低浓度点均 $< 2.0\%$, 中、高浓度点均 $< 1.5\%$; 日间精密性低、中浓度点均 $< 2.0\%$, 高浓度点均 $< 1.5\%$ 。表明方法的精密性良好。

2.7 重复性试验 取同一批罗布麻药材粉末(甘肃), 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 5 份, 在上述色谱条件下测定。结果芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素平均含量分别为 0.861 7、32.93、26.19、1.516 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.7%、0.9%、0.3%、0.8%。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液(甘肃)分别放置于 0、2、4、6、8、12、24 h 重复进样, 测得芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的峰面积的 RSD($n=7$) 分别为 1.5%、0.6%、0.6%、0.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的罗布麻药材粉末(甘肃)9 份, 每份约 0.5 g, 按低、中、高浓度分别精密加入各单一对照品储备液适量, 每一浓度 3 份。按 2.2 项下方法制备所需溶液, 在上述

色谱条件下进样测定, 计算回收率及其 RSD, 见表 1。结果表明, 采用本方法测定罗布麻药材中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷以及槲皮素含量回收率良好, 准确度良好。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery test

Compound	Content $m/\mu\text{g}$	Added amount $m/\mu\text{g}$	Measured amount $m/\mu\text{g}$	Average Recovery (%)	RSD (%)
Rutin	42.41	30.84	74.74	102.0	0.91
		77.10	115.2	96.40	0.46
		308.4	364.4	103.8	0.25
Hyperoside	1 622	87.76	1 685	98.50	0.42
		219.4	1 859	101.0	0.19
		877.6	2 571	102.9	0.21
Isoquercitrin	1 284	90.20	1 352	98.40	0.43
		225.5	1 516	100.4	0.10
		902.0	2 215	101.4	0.08
Quercetin	73.44	24.98	102.8	104.4	1.10
		62.45	140.1	103.1	1.00
		249.9	334.7	103.5	0.68

2.10 样品的测定 取收集到的不同产地的 9 批罗布麻干燥药材粉末按 2.2 项下方法操作, 在上述色谱条件下进行分析, 用外标法计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of sample determination

(mg \cdot g⁻¹, $n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Sample No.	Source	Rutin	Hyperoside	Isoquercitrin	Quercetin
1	Anhui	1.123 ± 0.009	44.33 ± 0.090	34.73 ± 0.031	1.729 ± 0.022
2	Gansu	0.848 ± 0.010	32.44 ± 0.060	25.67 ± 0.098	1.469 ± 0.009
3	Hebei	0.809 ± 0.015	25.58 ± 0.089	25.89 ± 0.032	1.864 ± 0.015
4	Jilin	1.196 ± 0.039	45.86 ± 0.079	39.19 ± 0.049	4.580 ± 0.022
5	Inner Mongolia	0.849 ± 0.011	43.29 ± 0.086	34.08 ± 0.089	1.247 ± 0.012
6	Shandong	—	1.271 ± 0.025	34.40 ± 0.023	3.620 ± 0.028
7	Shaanxi	0.712 ± 0.008	1.104 ± 0.032	33.49 ± 0.119	1.208 ± 0.007
8	Tianjin	0.722 ± 0.006	34.89 ± 0.115	33.17 ± 0.030	6.080 ± 0.042
9	Xinjiang	5.650 ± 0.039	0.593 ± 0.004	45.57 ± 0.158	1.302 ± 0.024

—: Not detected

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 比较了超声提取和加热回流提取, 结果显示回流提取效率更高, 因此选择了回流提取。在提取溶剂方面, 考察了甲醇、

80% 甲醇、90% 乙醇; 对提取时间(30、60、90 min)、提取溶剂用量(30、40、50 ml)进行考察, 而提取次数影响不大, 通过比较确定用 50 ml 80% 甲醇回流提取 90 min, 提取效果最好(89.96 mg/g)。正交试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthoganol experiment

No.	Solvent	Volume of solvent V/ml	Time of extraction t/min	Total contents of flavonoids (mg · g ⁻¹)
1	Methanol	30	30	82.12
2	Methanol	40	60	83.41
3	Methanol	50	90	85.34
4	80% Methanol	30	30	84.30
5	80% Methanol	40	60	86.73
6	80% Methanol	50	90	89.96
7	90% Ethanol	30	30	78.37
8	90% Ethanol	40	60	79.76
9	90% Ethanol	50	90	80.98

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 色谱柱 本实验选用不同厂家的色谱柱,如 Agilent C₁₈ 色谱柱(5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm)及 Shiseido C₁₈(3.0 μm, 3.0 mm × 100 mm)色谱柱进行比较。长柱有利于提高分离度,但会延长分析时间,3.0 μm 粒径的短柱能有效提高柱效并缩短分析时间,还能获得良好的分离度。Shiseido C₁₈(3.0 μm, 3.0 mm × 100 mm)色谱柱是一种溶剂节省柱,比 4.6 mm 内径色谱柱节省溶剂 40%,甚至更多^[9]。这意味着在溶剂上的起始花费更少,溶剂处理费用更低。在此基础上,4 个化合物均在 22 min 内得到较好的分离,分离时间短,分离效果好。因此选用 Shiseido C₁₈(3.0 μm, 3.0 mm × 100 mm)色谱柱。

3.2.2 流动相 分别选用甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈:甲醇=10:1-0.1%甲酸水溶液进行流动相选择试验。结果表明以乙腈:甲醇=10:1-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱,对 4 个成分分离最好,使各成分均达到基线分离。

3.2.3 温度和流速 温度和流速对分离的影响较大,降低温度能有效提高黄酮类成分的分离度,但由于降低温度会增加流动相的黏度,这样明显会增加系统的压力,综合考虑选择室温 30℃ 为运行温度。低流速有利于提高分离度但会延长分析时间,实验表明,0.6 ml/min 的流速既能保证分离度又能良好

控制分析时间,因此选为最佳流速。

3.2.4 检测波长 本实验采用的是 HPLC-DAD 检测器,利用 DAD 检测器在 200~400 nm 范围内紫外扫描其吸收光谱,结果表明 360 nm 色谱图峰形最好,出峰数目最多,各色谱峰相互之间分离度最好,基线平稳,故检测波长定为 360 nm。

本实验所建立的 HPLC-DAD 法对 9 个产地的罗布麻药材中的 4 种黄酮类成分进行了含量测定,分析速度快、分离度好、测定结果可靠,能同时测定黄酮类化合物中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素的含量。不同产地的金丝桃苷的含量相差较大,可能是不同的生活环境对药物的成分有一定的影响,可进一步研究不同产地金丝桃苷和异槲皮苷的含量差异,可以为罗布麻叶质量控制提供借鉴。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医学科学出版社,2010:196.
- [2] 方学良,廖代富. 塔里木盆地大叶白麻土壤生长环境类型[J]. 植物生态学与地植物学学报,1986,10:52-58.
- [3] 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]. 中国药物标准,2007,8:45-47.
- [4] Zhang Y, Liu C, Zhang Z, Wang J, Wu G, Li S. Comprehensive separation and identification of chemical constituents from *Apocynum venetum* leaves by high-performance counter-current chromatography and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878: 3149-3155.
- [5] 代光秀. 高效液相色谱法测定罗布麻茶中槲皮素的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 5: 52-53.
- [6] 周丽,王效山,黄和平,周亚球. 不同产地罗布麻叶总黄酮的含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19: 37-38.
- [7] 周春玲,孙苓苓,毕开顺. RP-HPLC 法测定罗布麻叶中金丝桃苷和罗布麻甲素的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29: 1001-1003.
- [8] 李奇,张月婵,宋建平,刘训红,王丽娟. 不同产地罗布麻叶黄酮类成分分析[J]. 中药材, 2009, 32: 1359-1362.
- [9] 朱彭龄. 一个节省 HPLC 流动相溶剂的有效途径[J]. 分析测试技术与仪器, 2011, 17: 59-61.

[本文编辑] 尹茶