

HPLC 测定罗布麻叶中总黄酮的含量

光琴^{1*}, 周亚球²

(1. 合肥市第六人民医院, 合肥 230022; 2. 安徽中医学院, 合肥 230038)

[摘要] 目的: 建立罗布麻叶中总黄酮的 HPLC 含量测定方法。方法: 药材经提取水解后用 HPLC 通过测定其槲皮素和山奈酚的含量来确定总黄酮的含量, 采用岛津 C₁₈ 色谱柱; 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (45:40) 为流动相; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 360 nm; 柱温为 30 °C; 结果: 槲皮素在 5.52 ~ 55.2 mg·L⁻¹ 线性关系良好, $r=0.9999$ ($n=6$), 平均回收率为 98.76%, RSD 为 1.01% ($n=6$); 山奈酚在 3.505 ~ 35.05 mg·L⁻¹ 线性关系良好, $r=0.9999$ ($n=6$), 平均回收率为 98.62%, RSD 为 1.14% ($n=6$); 3 批样品中总黄酮含量为 17.08, 16.54, 16.81 mg·g⁻¹。结论: 该方法准确可靠, 重复性好, 可以作为罗布麻叶总黄酮的含量测定方法。为完善罗布麻叶质量标准提供依据, 同时为罗布麻叶的进一步研究奠定基础。

[关键词] 罗布麻叶; 总黄酮; 高效液相色谱法; 含量测定; 水解

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0103-04

Determination of Flavonoids in the Leaves of *Apocynum venetum* by HPLC

GUANG Qin^{1*}, ZHOU Ya-qiu²

(1. Hefei 6th People's Hospital, Hefei 230022, China;

2. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of total flavonoids in the leaves of *Apocynum venetum* by HPLC. **Method:** The total quercetrin and kaempferol content in the flavonoids was determined by HPLC after hydrolysis. The assay was performed on Shim-pack CLC-ODS column; methanol-0.4% phosphoric acid (45:40) was used as mobile phase; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength was at 360 nm, temperature of column was at 30 °C. **Result:** Quercetrin was linear in the range of 5.52 – 55.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$); the average recovery and relative standard deviation were 98.76% and 1.01% ($n=6$) respectively. Kaempferol was linear in the range of 3.505 – 35.05 g·L⁻¹ ($r=0.9999$, $n=6$); the average recovery and relative standard deviation were 98.62% and 1.14% ($n=6$) respectively. The content of total flavonoids in three samples was 17.08, 16.54 and 16.81 mg·g⁻¹ respectively. **Conclusion:** This method was accurate and reliable. It can be used for the determination of the flavonoids in the leaves of *A. venetum*. It will provide the basis for the quality standards of Luobuma leaves and further study.

[Key words] *Apocynum venetum* leaves; total flavonoids; HPLC; determination; hydrolysis

罗布麻叶为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 的干燥叶^[1], 是传统的平肝息风药, 在我国主要产于天津、新疆、陕西、山西和山东等地。据

《中国植物志》记载, 国内罗布麻叶有两属三种, 即罗布麻属罗布麻 *A. venetum* Line, 别名红麻, 白麻属有 2 种为大叶白麻 *Poacynum hendersonii* (Hook. f.) Woodson 和白麻 *P. pictum* (Schrenk) Baill. 其中红麻为正品, 收载于《中国药典》2005 年版一部。大量药理研究和各种文献报道^[2-4], 总黄酮是罗布麻叶中主要有效部位之一, 对预防和治疗高血压、高血脂、心脑血管缺血以及肝炎等疾病均有较好的效果。

[收稿日期] 20100927(006)

[通讯作者] * 光琴, 药师, 硕士, 研究方向: 中药新技术与新剂型, Tel: 13865933736, Fax: 0551-3362933, E-mail: guangqin1982@163.com

目前国内外关于罗布麻叶中总黄酮的含量测定方法没有统一的标准,2005 年版药典收录的罗布麻叶也只测定其中槲皮素含量而没有对总黄酮含量做出要求,鉴于这种情况,本文选择具有代表性的正品天津罗布麻叶,采用 HPLC 法测定罗布麻叶中总黄酮的含量。罗布麻叶中主要含有芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、黄芪苷、三叶豆苷、6"-O-乙酰基异槲皮苷、6"-O-乙酰基黄芪苷、6"-O-乙酰基金丝桃苷^[4-7] 和山奈酚-7-鼠李糖苷等黄酮醇苷,它们水解后转变为总黄酮苷元槲皮素和山奈酚^[8]。在定量时,先通过酸水解后测定槲皮素和山奈酚这种苷元的含量,再换算成相对应的原黄酮醇苷的含量。此方法经过方法的验证,准确可靠,重复性好,为建立和完善罗布麻叶质量标准提供依据,同时为罗布麻叶的进一步研究奠定基础。

1 仪器与试剂

罗布麻叶(购于安徽亳州永刚中药饮片厂有限公司,产地天津,经安徽中医学院生药教研室王德群教授鉴定为正品罗布麻叶),槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406),山奈酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110861-200405)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。岛津 SPD-10Avp 高效液相色谱仪,浙大 N2000 色谱工

作站,岛津 C₁₈(6.0 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,安捷伦 6010 型紫外-可见分光光度计,赛多利斯 BT 25S 型电子天平。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液(45:40),检测波长为 360 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。在此条件下槲皮素与山奈酚能与其他成分达到较好的分离,且理论塔板数均不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 11.04 mg,山奈酚对照品 7.01 mg 置于同一 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液(槲皮素浓度为 110.4 mg·L⁻¹,山奈酚浓度为 70.1 mg·L⁻¹)。

2.3 样品溶液的制备 取罗布麻叶粉末约 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加 80% 甲醇 100 mL,密塞,称定质量,加热回流 1h,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL,加入盐酸 1 mL,置 90 °C 水浴中加热回流 1h,取出,立即冷却,转移至 25 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。再制备罗布麻叶水解前的样品溶液,取水解前和水解后供试品和对照品溶液各 20 μL 进样。结果见图 1。

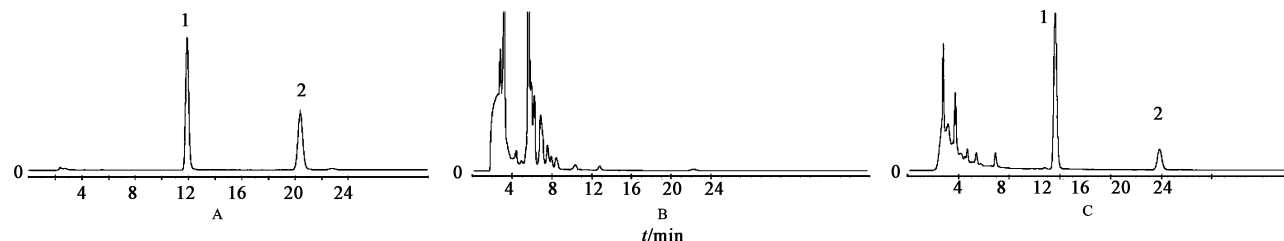


图 1 对照品、罗布麻叶水解前后样品溶液色谱图

A. 对照品; B. 罗布麻叶水解前; C. 罗布麻叶水解后; 1. 槲皮素; 2. 山奈酚

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取 2.2 混合对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别用流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液(45:40) 稀释至 10 mL, 摇匀, 取 20 μL 按照 2.1 色谱条件进样测定峰面积, 以峰面积(Y)与浓度(X)绘制标准曲线, 槲皮素的回归方程为 $Y = 1.43 \times 10^5 X + 1.97 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 山奈酚的回归方程为 $Y = 1.72 \times 10^5 X + 3.79 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。结果槲皮素在 5.52 ~ 55.2 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 山奈酚在 3.505 ~ 35.05 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品储备液 2.0 mL

至 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀(槲皮素浓度为 22.08 mg·L⁻¹,山奈酚质量浓度为 14.02 mg·L⁻¹),按 2.1 色谱条件进样 20 μL。连续进样 6 次,测得槲皮素和山奈酚 6 次峰面积的 RSD 分别为 1.13% 和 1.28%。

2.6 样品溶液稳定性试验 取 2.3 的样品溶液,按照 2.1 色谱条件在 0, 4, 8, 12, 24 h 分别进样 20 μL, 测得槲皮素峰面积的 RSD 0.93%, 山奈酚峰面积的 RSD 1.07%。

2.7 重复性试验 取罗布麻叶(批号 050925) 细粉 6 份,按照 2.3 样品溶液制备方法制备 6 份样品溶

液,分别精密吸取 20 μL 进样,测得峰面积后计算每份样品中槲皮素和山奈酚的含量,得 6 份样品中槲皮素质量分数分别为 8.71,8.53,8.62,8.72,8.55,8.67 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 0.93%,山奈酚质量分数分别为 1.55,1.56,1.53,1.60,1.57,1.55 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 1.52%。

2.8 加样回收率试验 取罗布麻叶(批号 050925)细粉约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,按照 100% 准确加入槲皮素对照品和山奈酚对照品,按 2.3 项下自“精密加 80% 甲醇 100 mL…”起处理,所得样品进样后计算回收率,结果表明槲皮素平均回收率为 98.76%,RSD 1.01%,山奈酚平均回收率为 98.62%,RSD 1.14%。结果见表 1,2。

表 1 槲皮素加样回收率测定

No.	取样量 /g	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.502 3	4.335	8.686	100.03		
2	0.510 5	4.406	8.730	99.4		
3	0.505 6	4.363	8.635	98.2	98.76	1.01
4	0.508 4	4.387	8.629	97.5		
5	0.508 7	4.390	8.666	98.3		
6	0.498 6	4.303	8.614	99.1		

注:加入量均为 4.35 mg。

表 2 山奈酚加样回收率测定

No.	取样量 /g	样品中含 量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.502 3	0.784	1.575	100.2		
2	0.510 5	0.796	1.577	98.8		
3	0.505 6	0.789	1.565	98.3	98.62	1.14
4	0.508 4	0.793	1.558	96.8		
5	0.508 7	0.794	1.571	98.4		
6	0.498 6	0.778	1.561	99.2		

注:加入量均为 0.79 mg。

2.9 样品的含量测定 3 批罗布麻叶样品细粉,每批取 2 份,每份 1 g,按 2.3 项下处理得 6 份供试品溶液,精密吸取供试品溶液 20 μL 进样,每份进样两次。结果,罗布麻叶中的黄酮苷水解后的绝大部分成为槲皮素和山奈酚。根据测得的槲皮素和山奈峰面积计算槲皮素和山奈酚的含量。将 6"-O-乙酰基异槲皮苷分子量 505.4 和 6"-O-乙酰基黄芪苷相对分子质量 490.4 相加之和除 2 得平均分子质量为 497.9 的黄酮醇乙酸酯苷作为总的罗布麻叶黄酮醇

苷的代表,根据苷元槲皮素分子量为 302.23 和山奈酚分子量为 286.23,计算出黄酮醇乙酸酯苷对槲皮素和山奈酚的转换因子分别为 1.65 和 1.74,再根据下式计算罗布麻叶中总黄酮醇苷的含量^[9]。结果见表 3。

罗布麻叶总黄酮醇苷含量 = 槲皮素含量 \times 1.65 + 山奈酚含量 \times 1.74

表 3 罗布麻叶样品总黄酮醇苷含量测定

批号	取样量 /g	槲皮素 /mg \cdot g ⁻¹	山奈酚 /mg \cdot g ⁻¹	总黄酮 /mg \cdot g ⁻¹	平均 /mg \cdot g ⁻¹
050925	1.002 4	8.72	1.56	17.10	17.08
	1.010 9	8.67	1.58	17.05	
051208	1.021 7	8.44	1.47	16.48	16.54
	1.000 8	8.48	1.50	16.60	
060322	0.998 6	8.52	1.55	16.76	16.81
	1.033 1	8.56	1.57	16.86	

3 讨论

目前,国内报道最多的罗布麻叶中总黄酮测定方法主要有亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法,三氯化铝-醋酸钠比色法,三氯化铝-(醋酸-醋酸钠)显色法。亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法的显色反应发生在 B 环的 3',4'-邻二酚羟基部位^[10],在 500 nm 左右有最大吸收,虽然罗布麻叶中有部分黄酮苷具有这样的邻二酚羟基结构,但同时罗布麻叶中含有不具有邻二酚羟基结构的黄酮苷,如黄芪苷,三叶豆苷,6"-O-乙酰基黄芪苷和山奈酚-7-鼠李糖苷等,它们加入亚硝酸钠、硝酸铝和氢氧化钠试剂是不显色的,并且罗布麻叶中含有邻二酚羟基结构的非黄酮类成分(如鞣质和原花色苷等)可与其反应显色,这就造成测定结果的不准确,说明此法测定罗布麻叶总黄酮专属性不强。三氯化铝-醋酸钠比色法的反应原理^[11-12]是黄酮苷母核的 5 位—OH、4 位 C = O 和 B 环的 3',4'-邻二酚羟基部位同时与其显色,罗布麻叶中的黄酮苷均具有 5 位—OH、4 位 C = O 结构,但不是所有黄酮苷都有邻二酚羟基结构。同时含有邻二酚羟基结构的还有非黄酮类成分,结果导致此方法也不专属。三氯化铝-(醋酸-醋酸钠)显色法的原理^[11-12]为,在酸性环境下,仅黄酮苷母核的 5 位—OH、4 位 C = O 与 Al³⁺ 络合产生络合物,在 400 nm 左后有最大吸收,且这个反应有专属性。罗布麻叶中黄酮类成分芦丁、新异芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、三叶豆苷、黄芪苷、6"-O-乙酰基黄芪苷、6"-

O-乙酰基异槲皮苷、6"-O-乙酰基金丝桃苷、山奈酚-7-鼠李糖苷、槲皮素和山奈酚,其结构均有 5 位—OH、4 位 C=O,该法适合于测定罗布麻叶中的总黄酮。但是,罗布麻叶总黄酮在测定前需要将其中的黄酮类成分提取分离出来,笔者经过试验研究,发现只有经过大孔树脂或聚酰胺才能将所需的黄酮类分离出来,而简单的乙醇-水体系的提取物中含有大量的杂质,干扰了测定。大孔树脂或聚酰胺分离纯化后的提取物经测定,结果很低,原因是大孔树脂或聚酰胺对所测成分有 30% 左右的不可逆吸附。这样样品前处理的复杂性造成了测定结果的不准确,三氯化铝-(醋酸-醋酸钠)显色法同样不适合定量罗布麻叶药材中的总黄酮。

关于流动相的选择,参照 2005 年版药典二部收录的罗布麻叶含量测定项下的流动相,用岛津 C₁₈ (6.0 mm × 150 mm) 色谱柱试验,发现流动相比比例为甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50)的情况下,槲皮素和山奈酚的保留时间过长,故将其比例调为甲醇-0.4% 磷酸溶液(45:40),结果槲皮素和山奈酚保留时间较合适。

本试验还测定了罗布麻叶药材经酸水解之前含有槲皮素和山奈酚的量,结果药材本身含有槲皮素和山奈酚的量很低,分别为 0.014% 和 0.009 6%,不影响水解后槲皮素和山奈酚量的计算,可以忽略不计。

本试验的含量,突破了 HPLC 常用于测定黄酮单体成分的局限。在定量时,先通过酸水解后测定槲皮素和山奈酚这 2 种主要苷元的含量,再换算成相对应的原黄酮苷的含量,体现了指标成分的完整性和有效性。

罗布麻叶药材标准收载于《中国药典》2005 年版一部,其含量测定项下只对水解后槲皮素进行了定量,而未定量总黄酮,建议有关部门尽早完善出更加合理的质量标准。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:147.
- [2] 王建华,陈红艳,杨新波,等.罗布麻提取物对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].解放军药理学学报,2006,22(3):177.
- [3] Veronika B S N,Tsutomu S K,Masaru U. Antidepressant effects of *apocynum venetum* leaves in a forced swimming test[J]. Biol Pharm Bull,2001,24(7):848.
- [4] 侯晋军,韩利文,杨官娥,等.罗布麻叶化学成分和药理活性研究进展[J].中草药,2006,37(10):附7.
- [5] Sansei Nishibe,Hitoshi Takemura,Toru Fujimoto, et al. Studies on the constituents of Chinese Medicine "Luobumaye" (1) on flavonoid glycosides of genera *apocynum* and *poacynum* leaves and their application to method for identification of origin of luobumaye products [J]. Shoyakugaku Zasshi,1993,47(1):27.
- [6] Xiong Q D, Fan W Z, Yasuhiro Tezuka, et al. Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents[J]. Plant Medica,2000,66(2):127.
- [7] 周亚球,王先荣.罗布麻属植物罗布麻叶总黄酮提取物、其制备及应用.中国:CN 200510123187.5[P].2007-03-21.
- [8] 王先荣,周亚球,光琴,等.一种有指纹图谱的罗布麻叶提取物及其制备和分析方法.中国:CN 200810124729.4[P].2008-08-29.
- [9] 谢东.国类银杏叶及其制剂定量分析方法现状[J].中草药,1998,29(增刊):18.
- [10] 郭亚健,范莉,王晓强,等.关于 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J].药物分析杂志,2002,22(2):97.
- [11] 韩利文.中药罗布麻叶及其有效部位的质量控制方法研究[D].大同:山西医科大学,2005:11.
- [12] 匡海学.中药化学[M].北京:中国中医药出版社,2003:158.

[责任编辑 蔡仲德]