

HPLC 法测定山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷

王鑫波¹, 高敏^{2,3}, 童丽姣¹, 叶姣云², 石森林^{2*}

1. 临安市中医院, 浙江 临安 311300

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

3. 上海睿智化学研究有限公司, 上海 201203

摘要: 目的 建立山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷的 HPLC 测定方法。方法 色谱柱为 Zorbax SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~10% A; 5~10 min, 10%~18% A; 10~30 min, 18% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 334 nm, 柱温 30 ℃。结果 牡荆素鼠李糖苷在 4.296~64.440 μg/mL 与峰面积值线性关系良好 ($r=1.0000$), 平均回收率为 100.83%, RSD 为 2.12%。结论 建立的测定方法简便、准确、灵敏, 可用于山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷的测定。

关键词: 山楂叶总黄酮; 磷脂复合物; 牡荆素鼠李糖苷; 大豆磷脂; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02

文献标志码: B

文章编号: 0253-2670(2011)07-1341-03

Determination of rhamnosylvitexin in hawthorn leaves flavonoids phospholipid complex by HPLC

WANG Xin-bo¹, GAO Min^{2,3}, TONG Li-jiao¹, YE Jiao-yun², SHI Sen-lin²

1. Lin'an Chinese Medical Hospital, Lin'an 311300, China

2. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. Shanghai Chempartner Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Key Words: hawthorn leaves flavonoids; phospholipid complex; rhamnosylvitexin; soybean phospholipids; HPLC

山楂叶总黄酮 (商品名为益心酮) 主要含有槲皮素、金丝桃苷、牡荆素、牡荆素鼠李糖苷、山柰酚、芦丁等, 主要用于治疗心血管疾病, 有降压、增加冠脉血流量、调血脂、耐缺氧、强心、改善血液流变、抗心肌缺血、抗心律失常等作用^[1-6]。其中牡荆素鼠李糖苷是重要有效成分之一, 具有扩张冠状血管、保护实验性心肌缺血、改善心肌供血量、调血脂等作用^[7-8]。

国内已上市的益心酮制剂主要有片剂、滴丸、胶囊剂等口服固体剂型, 目前存在的主要问题是其口服生物利用度较低, 药效不理想。其原因可能是山楂叶总黄酮中黄酮类化合物大多以黄酮苷形式存在, 由于糖基的连接, 具有较大的亲水性和相对分子质量, 经小肠的吸收较差。为解决该问题, 本课题组采用磷脂复合物固体分散技术, 制备了山楂叶

总黄酮磷脂复合物, 磷脂的加入可有效提高药物的亲脂性, 提高生物利用度。本实验采用反相 HPLC 法, 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 对山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷进行定量测定, 为其质量控制提供科学而适用的分析和评价手段。

1 仪器与材料

UV-2450 紫外分光光度计 (日本岛津); Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦色谱工作站); KH-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山禾创市超声仪器有限公司); JA2003N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); XS105 分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

牡荆素鼠李糖苷对照品 (批号 111668-200401, 中国药品生物制品检定所); 山楂叶总黄酮磷脂复合物 (自制, 山楂叶总黄酮与磷脂按质量比 1:2 制备,

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 浙江省中医药科技项目 (2008CA090)

作者简介: 王鑫波 (1965—), 男, 副主任中药师, 主要从事中药制剂新技术和新剂型的研究。Tel: 13506815300 E-mail: hzlawxb@163.com

*通讯作者 石森林 Tel: 13157106148 E-mail: pjstone@163.com

批号 090702、090703、090704、090705); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为去离子水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择

取牡荆素鼠李糖苷对照品、山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号 090705) 适量, 用甲醇溶解并适当稀释, 于 200~800 nm 波长进行扫描, 由扫描结果确定检测波长为 334 nm。

2.2 色谱条件

Zorbax SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~10% A; 5~10 min, 10%~18% A; 10~30 min, 18% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 334 nm; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.3 对照品溶液的制备

取牡荆素鼠李糖苷对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品储备液。精密量取对照品储备液 10 mL

置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取山楂叶总黄酮磷脂复合物 75 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声处理 30 min, 取出放凉, 用甲醇定容至刻度, 密塞, 摇匀, 滤过, 取续滤液备用; 精密量取各续滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.5 系统适用性试验

精密量取对照品储备液适量, 以甲醇稀释至适当质量浓度; 同时配制相应的山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号为 090705) 和大豆磷脂的甲醇溶液, 在上述色谱条件下进行系统适用性试验, 结果表明牡荆素鼠李糖苷保留时间约为 18 min, 理论塔板数大于 6 000、分离度大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.05, 符合分析要求, 大豆磷脂对测定无干扰。色谱图见图 1。

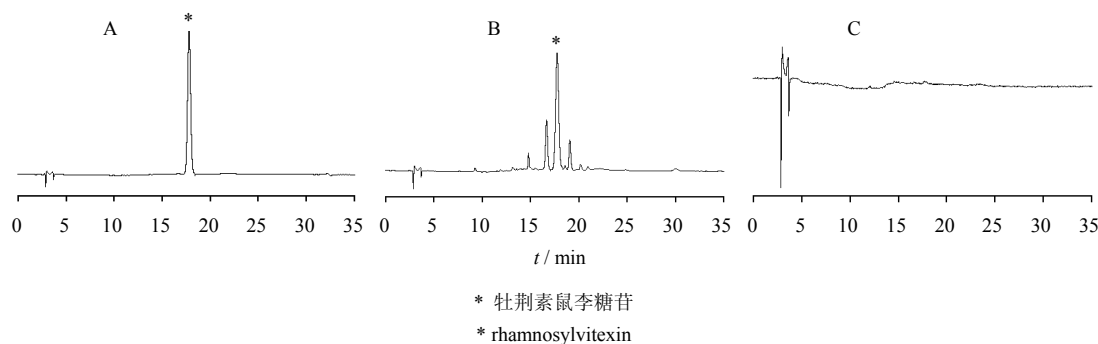


图1 牡荆素鼠李糖苷对照品(A)、山楂叶总黄酮磷脂复合物(B)和大豆磷脂(C)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of rhamnosylvitexin reference substance (A), hawthorn leaves flavonids phospholipid complex (B), and soybean phospholipids (C)

2.6 线性关系考察

精密称取牡荆素鼠李糖苷对照品适量, 用色谱纯甲醇配成 107.4 μg/mL 对照品储备液。分别精密量取上述对照品储备液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、4.0、6.0 mL, 置 10 mL 量瓶中以甲醇稀释至刻度, 配成不同质量浓度的系列牡荆素鼠李糖苷对照品溶液, 按上述色谱条件分别进样 5 μL, 记录色谱图, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=8.7201X-0.3664$, $r=1.0000$, 表明牡荆素鼠李糖苷在 4.296~64.440 μg/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.7 精密度试验

精密量取山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号

090705) 供试品溶液 5 μL, 按上述色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算得牡荆素鼠李糖苷峰面积的 RSD 为 0.32%。

2.8 稳定性试验

精密量取山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号 090705) 供试品溶液 5 μL, 按上述色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 以及连续 7 d 测定, 记录峰面积, 计算得牡荆素鼠李糖苷日内峰面积的 RSD 为 1.07%, 日间峰面积的 RSD 为 1.34%, 表明供试品溶液的稳定性良好。

2.9 重现性试验

取山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号 090705) 6 份, 每份 75 mg, 精密称定, 制备供试品溶液。分

别按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算得山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷质量分数的 RSD 为 1.58%。

2.10 加样回收率试验

取山楂叶总黄酮磷脂复合物(批号 090705)6 份,每份 75 mg,精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,各加入牡荆素鼠李糖苷对照品约 2.8 mg,精密称定,制备供试品溶液。按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算得牡荆素鼠李糖苷的平均回收率为 100.83%,RSD 为 2.12%。

2.11 样品测定

取批号 090702、090703、090704、090705 的山楂叶总黄酮磷脂复合物各 3 份,每份 75 mg,精密称定,制备供试品溶液。按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷的质量分数,结果见表 1。

表 1 样品测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of sample ($n=3$)

批 号	牡荆素鼠李糖苷/%
090702	2.92
090703	2.91
090704	2.95
090705	2.93

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备

样品处理中采用超声提取牡荆素鼠李糖苷,可减少加热对黄酮苷的破坏,同时该方法简单,效果好;采用单因素试验考察了提取溶剂(甲醇、乙醇、无水乙醇)和提取时间(30、60、90 min)对提取效果的影响,结果表明甲醇作为提取溶剂时提取效果最好,而超声时间对测定结果几乎无影响,因此供试品溶液的制备采用超声方法,以甲醇为溶剂提取 30 min。

3.2 流动相的选择

在实验过程中,发现流动相体系的选择比较困难,参考文献方法^[9-11]选用甲醇-0.1%磷酸水体系、乙腈-0.1%磷酸水体系、甲醇-0.5%冰醋酸水体系、乙腈-0.5%冰醋酸水体系,以及在体系中加入四氢呋喃、异丙醇等分离效果均不理想,在反复摸索中选用乙腈-水体系进行梯度洗脱,分离效果较好,色谱峰对称性好,分析时间 30 min,符合实验要求,同

时未引入毒性大的四氢呋喃,所选用的流动相安全、经济。

3.3 方法专属性

《中国药典》2010 年版一部收载了山楂叶总黄酮及其制剂山楂叶总黄酮片,其质控指标成分均为金丝桃苷,金丝桃苷虽为主要活性成分之一,但量非常低(金丝桃苷不少于 0.40%),且为非专属性成分。而牡荆素鼠李糖苷为山楂叶、山楂叶总黄酮和益心酮片中重要的药理活性成分,且量较高(山楂叶总黄酮原料中为 9.00%),且为专属性成分^[12],更适宜作为山楂叶总黄酮、山楂叶总黄酮磷脂复合物及其制剂的质量控制指标。

参考文献

- [1] 赵玉平,王春霞,杜连祥. 山楂属植物果实和叶中化学成分的研究综述 [J]. 饮料工业, 2002, 5(6): 8-12.
- [2] 李 红,张 爽,纪影实,等. 山楂叶总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 794-798.
- [3] 杨宇杰,林 静,王春民,等. 山楂叶总黄酮对大鼠高脂血症早期干预的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1848-1850.
- [4] 杨宇杰,王春民,党晓伟,等. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血管功能损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1687-1690.
- [5] 吴士杰,李秋津,肖学风,等. 山楂化学成分及药理作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 316-319.
- [6] 宋玉超,连超杰,雷海民,等. 山楂叶及其制剂对心血管作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 25-28.
- [7] 李连达,靖雨珍. 中医药研究 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001.
- [8] 龚 青,张叶萍,祝 明. RP-HPLC 法测定山楂叶中牡荆素鼠李糖苷及牡荆素葡萄糖苷的含量 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 448-449.
- [9] 王超群,郭 敏,易敏之,等. 山楂化学成分及高效液相色谱分析方法研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11): 93-95.
- [10] 马 国,蒋学华,黄 婷,等. HPLC 同时测定山楂叶提取物中的 5 种主要成分 [J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(5): 547-549.
- [11] 李宏伟,张守勤,窦建鹏,等. 不同生长期山楂叶中黄酮类化合物的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 773-774.
- [12] 孙敬勇,杨书斌,李贵海. 山楂鉴别用对照品牡荆素鼠李糖苷的专属性考察 [J]. 中药材, 2001, 24(12): 859-861.