

罗布麻定时脉冲片中 5 种酚酸及黄酮类成分的含量测定

尹小英, 江一帆, 杨华生, 付剑江, 刘红宁, 罗永明* (江西中医学院药学院, 南昌 330004)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定罗布麻定时脉冲片中 5 种酚酸及黄酮类成分含量的方法。方法 采用 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm) 色谱柱, 乙腈-10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵缓冲液 (pH 4, 醋酸调节) 为流动相, 洗脱程序: 0 min, 10% 乙腈; 8 min, 15% 乙腈; 16 min, 17% 乙腈; 40 min, 38% 乙腈。流速 1.0 mL · min⁻¹。检测波长为 256 nm。结果 2 种酚酸及 3 种黄酮成分的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r > 0.999 0$); 加样回收率为 (94.3 ± 1.80)% ~ (102.4 ± 2.89)%。结论 该方法简单、准确, 重现性较好, 可用于罗布麻定时脉冲片内在质量的控制和评价。

关键词: 罗布麻叶; 定时脉冲给药系统; 酚酸成分; 黄酮类成分; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)20-1605-04

Determination of 5 Flavonoids and Phenolic Acids in Luobuma Time-Controlled Pulse Tablets

YIN Xiao-ying, JIANG Yi-fan, YANG Hua-sheng, FU Jian-jiang, LIU Hong-ning, LUO Yong-ming* (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine College of Pharmacy, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of 5 caffeoylquinic acids and flavonoids in Luobuma time-controlled Pulse tablet by HPLC. **METHODS** The HPLC method was performed on a Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile-10 mmol · L⁻¹ ammonium acetate aqueous solution (pH 4.0, adjusted with acetic acid solution) at a flow rate of 1 mL · min⁻¹. The gradient elution procedure was as follows: 0 min, 10% acetonitrile, 8 min, 15% acetonitrile, 16 min, 17% acetonitrile, 40 min, 38% acetonitrile. The UV detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** The calibration curves for the 2 caffeoylquinic acids and 3 flavonoids showed good linearity ($r > 0.999 0$) in the range of the tested concentrations. The average recoveries of the 5 compounds were in the range of (94.3 ± 1.80)% - (102.4 ± 2.89)%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used to control and evaluate the quality of Luobuma time-controlled pulse tablet.

KEY WORDS: *Apocynum venetum* L.; time-controlled pulsatile drug delivery system; phenolic acids; flavonoids; determination

罗布麻定时脉冲片 (Luobuma time-controlled pulse tablets, LTPT) 是基于新型定时脉冲给药系统, 以夹竹桃科植物罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 单味药材为原料研制而成的新型制剂。由于一些节律性发作的疾病, 如心绞痛、高血压等, 发作时都呈现出昼夜节律变化, 对这类疾病的最佳治疗方案是能按照生理和治疗的需要定时、定量地给药。LTPT 就是针对上述疾病特征而研制的新药, 与已上市的罗布麻叶片 (LLT) 相比, 定时脉冲片可以在恰当的时间释放适当的剂量, 大大提高药物的疗效并降低了毒性, 达到安全合理用药的目的。

现行 LLT 执行标准采用紫外分光光度法测定总黄酮量以槲皮素计, 亦有文献^[1-2]报道采用毛细管电泳法、高效液相色谱法等测定罗布麻叶中黄酮类

成分含量。由于提取工艺及辅料的差异, LTPT 的质量控制标准需进一步研究。本实验采用高效液相法建立了多指标成分同时测定的方法, 对其中活性酚酸类及黄酮类成分进行了定量分析, 并对其中绿原酸及隐绿原酸进行了定量, 为 LTPT 质量标准的建立奠定基础。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), Sartorius BT25S 电子天平 (0.01 mg 德国 Sartorius 公司), KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 色谱柱 (Hypersil OSD2 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连依利特仪器有限公司)。

绿原酸和金丝桃苷对照品 (批号分别为

基金项目 “十一五”重大新药创制资助项目“中药新型给药系统技术平台”(2009ZX09310-005)

作者简介: 尹小英, 女, 博士, 教授 研究方向: 药物分析 * 通讯作者: 罗永明, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 中药分析 Tel: (0791) 7118850 E-mail: jxluoyongming@163.com

110753-200413 和 111521-200303 ,中国药品生物制品检定所) 隐绿原酸(纯度 99% ,上海源叶生物科技有限公司) ,异槲皮素(批号 17793 ,纯度 99% 以上 ,BIOSZUNE LIFE SCIENCES DEP.) ,黄芪苷(批号 100320 ,上海融禾医药科技发展有限公司) ;罗布麻对照药材(批号 120979 ,中国药品生物制品检定所) ,罗布麻定时脉冲片为我院自行研发(批号分别为 20100201 ,20100202 ,20100203) ,商品罗布麻叶片(批号 100604061 ,陕西利君现代中药有限公司) ;乙腈和甲醇为色谱纯 醋酸及醋酸铵为分析纯;水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮素、黄芪苷对照品适量 ,加体积分数 40% 甲醇制成每 1 mL 含上述对照品分别为 390 ,220 ,70 ,120 ,55 μg 的混合溶液 ,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品去糖衣 ,研细 ,精密称取 0.25 g ,置具塞锥形瓶中 ,精密加入 25 mL 体积分数 40% 甲醇水溶液 ,密塞 ,称定重量 ,加热回流 1 h ,放冷 ,再称定重量 ,用纯水补足减失的重量 ,摇匀 ,滤过 ,取续滤液 ,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性实验

采用 Hypersil C₁₈ (4.6 mm \times 200 mm ,5 μm) 色谱柱 ,乙腈-40 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(pH 4 ,醋酸调节)为流动相 ,洗脱程序:0 min ,10% 乙腈;8 min ,15% 乙腈;16 min ,17% 乙腈;40 min ,38% 乙腈。流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹。检测波长为 256 nm。理论板数按金丝桃苷计算应不低于 2 000。

2.3 线性关系的考察

精密称取绿原酸 ,隐绿原酸 ,金丝桃苷 ,异槲皮素 ,黄芪苷对照品适量 ,分别置 25 mL 量瓶中 ,加体积分数 40% 甲醇溶解 ,并稀释至刻度 ,摇匀 ,作为贮备液 ,其质量浓度分别为 3 899 ,364.2 ,727.6 ,1 231 ,554.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,再分别精密吸取

0.5 ,1 ,2 ,4 ,6 ,8 mL 分别置于 10 mL 的量瓶中 ,用体积分数 40% 甲醇稀释至刻度。分别精密吸取上述不同质量浓度的对照品溶液各 20 μL ,照“2.2”色谱条件依法测定 ,结果见表 1。相关系数(r^2)结果表明 ,各成分在下表所列线性范围内峰面积与成分的质量浓度成良好的线性关系。

2.4 精密度实验

精密吸取“2.1.1”项下 5 种对照品贮备液各 1 mL 于 10 mL 量瓶中 ,用体积分数 40% 甲醇稀释至刻度。重复进样 6 次 ,计算 5 种化合物的峰面积及保留时间的相对标准偏差 ,以考察仪器的精密度。绿原酸 ,隐绿原酸 ,金丝桃苷 ,异槲皮素 ,黄芪苷峰面积的 RSD 分别为 0.47% ,0.34% ,0.10% ,0.20% ,0.15% ,其保留时间的 RSD 分别为 0.35% ,0.29% ,0.10% ,0.16% ,0.14%。

2.5 稳定性实验

将按“2.1.2”供试品溶液配制方法制备的样品溶液分别放置 2 ,4 ,8 ,12 h 后 ,在“2.2”色谱条件下进行检测。绿原酸 ,隐绿原酸 ,金丝桃苷 ,异槲皮素 ,黄芪苷峰面积的 RSD 分别为 1.68% ,0.67% ,0.52% ,0.42% ,0.69% ,表明供试品溶液在 12 h 内放置成分基本保持不变。

2.6 重复性实验

取 20100201 LTPT 样品 ,按照“2.1.2”供试品溶液配制项方法配制 6 份样品溶液 ,在“2.2”色谱条件下进行测定。样品中绿原酸 ,隐绿原酸 ,金丝桃苷 ,异槲皮素 ,黄芪苷的百分含量 RSD 分别为 1.6% ,0.59% ,0.2% ,0.8% ,1.0%。表明方法的重复性良好。该供试品溶液色谱图见图 1。

2.7 回收率实验

取 20100201 LTPT 样品 ,精密称定 0.25 g ,共 9 份 ,按 5 种化学成分量的 80% ,100% 和 120% 分别加入 5 种化合物对照品溶液 ,每一水平浓度配制 3 份共 9 份供试样品 ,然后按“2.1.2”项下供试品制备方法进行处理 ,按“2.2”项下色谱条件下进行检测 ,计算平均加样回收率 ,结果见表 2。

表 1 5 种化学成分线性范围和检测限

Tab. 1 The regression equations and detection limits for 5 analytes

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Limits/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Chlorogenic acid	$y = 0.4154x + 632.8$	0.999 0	0.195 - 3.90	1.5
Cryptochlorogenic acid	$y = 0.4414x + 51.12$	0.999 2	0.018 - 0.364	1.2
Hyperoside	$y = 1.274x - 4.191$	0.999 7	0.036 - 0.728	0.72
Isoquercitrin	$y = 2.813x + 0.1268$	0.999 3	0.062 - 1.23	0.50
Astragaln	$y = 0.9911x - 8.799$	0.999 0	0.028 - 0.554	1.1

2.8 样品含量测定

在“2.2”色谱条件下对3批罗布麻定时脉冲片中上述5种成分进行了检测,结果见表3。结果表明这3批LTPT之间5种成分含量差异较大,但这5种成分的含量均要大于商品罗布麻叶片中相应化合物的含量。商品罗布麻叶片供试品溶液色谱图见图2。

3 讨论

3.1 供试品提取方法研究

3.1.1 提取溶剂选择 由于LTPT片采用水提工艺从罗布麻叶中提取活性成分,所得活性成分主要是极性较强的酚酸和黄酮类成分,参照2010年版《中国药典》罗布麻叶提取溶剂,并比较了30%、40%、50%甲醇水溶液,结果以体积分数40%甲醇水作为提取溶剂得到成分数目及含量最大,故确定体积分数40%甲醇溶液为提取溶剂。

3.1.2 提取方式 比较了回流、索氏提取、超声波提取3种提取方式,结果表明,在提取时间相同条件下,采用回流提取方式提取效率最高。进而确定回流时间,对回流40、60、80 min所得5种化合物的总量进行比较,发现回流80 min的提取量与60 min所得结果接近,因此,确定回流时间为60 min。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 流动相的选择 比较了甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.2%冰醋酸,乙腈-10 mmol·L⁻¹醋酸铵缓冲液(pH 4,醋酸调节)不同组成的流动相所分离

组分的数目、峰形及最难分离物质对的分离度等参数,确定最后一组洗脱系统较好,并以各组分的分离度及最后色谱峰的保留时间为依据,对洗脱程序进行优化,得到较好的梯度洗脱条件,见色谱条件部分。

3.2.2 波长的选择 利用DAD检测器获得了色谱图中每个组分的紫外光谱图,酚酸成分的最大吸收峰在293、325 nm,以槲皮素为苷元的黄酮最大吸收峰在256、354 nm,以山奈酚为苷元的最大吸收峰在266、350 nm,确定检测波长为256 nm。

3.3 片剂中酚酸及黄酮类成分的定性分析与上市片剂的成分比较

前期采用HPLC-MS结合DAD检测器对LTPT色谱图中分离的7个主要成分进行了结构推测,初步确定了它们的结构^[3],并对其中酚酸类成分绿原

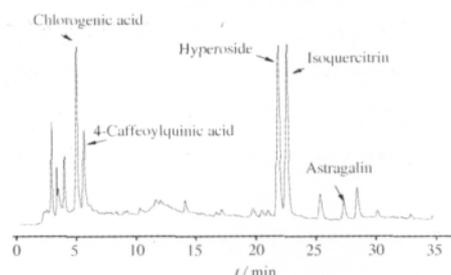


图1 罗布麻定时脉冲片供试品溶液色谱图

Fig.1 Chromatograms of the extract of Luobuma time-controlled pulse tablet

表2 罗布麻定时脉冲片中主要成分加样回收率实验结果. $n=9, \bar{x} \pm s$

Tab.2 The recoveries in this method for the Luobuma time-controlled pulse tablet. $n=9, \bar{x} \pm s$

Ingredient	Original amount ¹⁾	Added amount	Found	Recovery	RSD
	/mg				
Chlorogenic acid	9.78	7.83 ± 0.02	17.10 ± 0.10		
	9.78	9.80 ± 0.02	19.20 ± 0.03	94.3 ± 1.80	2.0
	9.78	11.72 ± 0.04	20.80 ± 0.30		
Cryptochlorogenic acid	5.41	4.32 ± 0.02	9.59 ± 0.06		
	5.41	5.42 ± 0.02	10.66 ± 0.05	95.7 ± 2.07	2.2
	5.41	6.52 ± 0.01	11.50 ± 0.11		
Hyperoside	9.09	7.26 ± 0.02	16.29 ± 0.08		
	9.09	9.10 ± 0.02	18.36 ± 0.05	101.1 ± 1.76	1.8
	9.09	10.93 ± 0.01	20.28 ± 0.08		
Isoquercitrin	3.86	3.03 ± 0.01	6.86 ± 0.09		
	3.86	3.86 ± 0.01	7.80 ± 0.03	100.2 ± 2.44	2.5
	3.86	4.64 ± 0.02	8.48 ± 0.15		
Astragalgin	1.18	0.94 ± 0.02	2.11 ± 0.11		
	1.18	1.20 ± 0.01	2.43 ± 0.11	102.4 ± 2.89	2.9
	1.18	1.41 ± 0.01	2.66 ± 0.02		

注: ¹⁾原有量指0.25 g罗布麻脉冲片样品中各化合物的质量

Note: ¹⁾ original amount is the amount of compounds in 0.25 g samples for Luobuma time-controlled pulse tablet

酸、隐绿原酸、黄酮类成分金丝桃苷、异槲皮素、黄芪苷采用对照品进行了结构确证。

提取溶剂、提取方式的差异会导致提取化合物的成分有所不同^[2,4]。从图1,2中可以看出,色谱峰个数和组成是一致的,表明罗布麻叶的提取溶剂相同,但各组分的峰高差异大,从表3中可以明显看出,LTPT各主要成分的含量远远高于LLT。其药效的差异还需进一步比较。

3.4 影响罗布麻定时脉冲片质量稳定因素分析

从表3中可以发现,3批LTPT成品中5种化学成分含量差异较大,为了寻找产生这种结果的原因,对20100201、20100203批LTPT样品的原药材中这5种成分含量进行了检测,参照成品含量测定的方法,结果见表4。上述3批成品的原药材产地分别为陕西、天津和吉林,并将其与标准对照药材进行了比较。从表4中可以看出,3个不同产地罗布麻叶药材中5种成分含量有一些差异,但各成分含量均高于标准对照药材。3个不同产地药材之间5种成分的含量差异较3批成品间的相应成分含量差异要小,表明不同批次成品间主要成分含量差异大,不仅来源于药材产地的差异,同时可能还存在其他一些

影响因素,如生产工艺等。LTPT生产工艺主要涉及提取工艺、提取液纯化工艺、脉冲片成型工艺和包衣工艺等,可见生产环节较多,因此要确保LTPT成品的质量稳定,需进一步优化各主要生产过程中的参数指标,提高生产工艺稳定性,同时需固定药材来源。

4 结论

对罗布麻定时脉冲片中主要的5个成分进行了定量分析,比较了LTPT与上市片剂LLT的化学成分的差异,为进一步有效控制其质量以及改进提取工艺、建立有效药效评价方法提供了重要的参考。

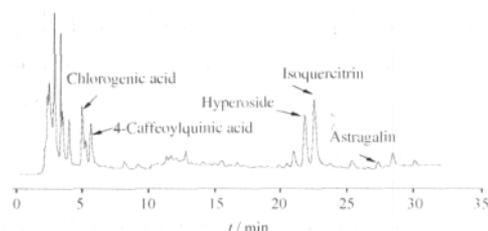


图2 罗布麻叶片供试品溶液色谱图

Fig.2 Chromatograms of the extract of Luobumaye tablet

表3 3批罗布麻定时脉冲片及商品罗布麻叶片中5种化合物的含量结果,mg, n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab.3 Assay results of 5 compounds from Luobuma Time Pulse tablet sample of 3 batches and Luobumaye tablet, mg, n=3, $\bar{x} \pm s$

Compound	20100201	20100202	20100203	Luobumaye tablet
Chlorogenic acid	9.00 ± 0.11	5.42 ± 0.10	4.37 ± 0.09	1.98 ± 0.09
Cryptochlorogenic acid	4.98 ± 0.08	3.08 ± 0.06	2.54 ± 0.06	2.59 ± 0.05
Hyperoside	8.36 ± 0.13	7.47 ± 0.11	6.89 ± 0.09	2.33 ± 0.07
Isoquercitrin	3.55 ± 0.09	3.06 ± 0.08	2.80 ± 0.04	1.30 ± 0.02
Astragaln	1.09 ± 0.06	0.870 ± 0.02	1.68 ± 0.03	0.838 ± 0.02

注:平均片重0.23 g

Note: the average weight of each tablet is 0.23 g

表4 不同产地罗布麻叶中酚酸和黄酮类成分含量测定结果

Tab.4 Assay results of flavonoids and phenolic acids of extracts in leaves of *Apocynum venetum* L. from different producing area

Peak no.	Compound	Shanxi /%	Tianjin /%	Jilin /%	Standard medicine /%
1	Chlorogenic acid	3.9	3.3	2.9	2.1
2	Cryptochlorogenic acid	0.71	0.49	0.18	-
3	Hyperoside	2.2	1.5	1.1	1.8
4	Isoquercitrin	0.87	0.68	0.47	0.74
5	Astragaln	0.30	0.19	0.24	0.34

REFERENCES

- [1] LIU X H, ZHANG Y C, LI J S, et al. Simultaneous determination of four flavonoids in folium apocyni veneti by HPLC-DAD [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(6): 464-467.
- [2] MENG M J, ZENG H S, LI J, et al. CZE Determination of five flavonoids in *Apocynum venetum* from different regions [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2010, 30(3): 405-408.
- [3] YIN X Y, FU J J, YANG H S, et al. 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering, December 25-26, 2010 [C]. Qiqihar, IEEE, 2010, vol. 3, 285-288.
- [4] KAMATA K, SEO S, NAKAJIMA J. Constituents from leaves of *Apocynum venetum* L [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(2): 160-163. (收稿日期: 2011-04-25)