

一测多评法同时测定降脂减肥保健品中儿茶素类活性成分的含量^Δ

谢静^{1*}, 韦杰¹, 周璐炜¹, 何金莲¹, 王乾龙², 杜蕾蕾^{3#} (1. 成都医学院药学院, 成都 610083; 2. 中国科学院成都生物研究所湖州生物资源利用与开发创新中心, 浙江湖州 313000; 3. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)18-2529-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.18.23

摘要 目的: 建立同时测定减肥降脂保健品中儿茶素类活性成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以表没食子基儿茶素没食子酸酯(EGCG)为内标, 计算其与没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(GCG)和没食子酰表儿茶素(ECG)的相对校正因子(RCF), 通过RCF计算样品中EGC、C、EC、GCG、ECG的含量, 以外标法测定的EGC、C、EC、GCG和ECG含量作实测值; 采用向量夹角余弦法评估实测值与计算值之间的相似性。结果: EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG检测质量浓度线性范围分别为0.006 5~0.130 5 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.000 5~0.010 7 mg/mL($r=0.999\ 7$)、0.002 0~0.040 0 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.015 3~0.305 3 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.000 8~0.015 5 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.004 0~0.079 2 mg/mL($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%; 加样回收率分别为95.07%~100.35% (RSD=1.94%, $n=6$)、95.24%~101.87% (RSD=2.79%, $n=6$)、96.08%~103.86% (RSD=3.01%, $n=6$)、97.51%~101.06% (RSD=1.45%, $n=6$)、96.01%~101.66% (RSD=2.27%, $n=6$)、96.20%~102.89% (RSD=2.71%, $n=6$)。实测值与计算值差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: 该方法操作简便, 精密性、稳定性、重复性好, 可用于减肥降脂保健品中儿茶素类活性成分的含量测定。

关键词 减肥; 保健品; 儿茶素; 一测多评法; 高效液相色谱法

Contents Determination of Catechins Active Components in Lipid-lowering Slimming Health Products by Quantitative Analysis of Multi-Components via Single Marker

XIE Jing¹, WEI Jie¹, ZHOU Luwei¹, HE Jinlian¹, WANG Qianlong², DU Leilei³ (1. College of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. Huzhou Center for Biological Resources Utilization and Innovation, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Zhejiang Huzhou 313000, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for contents determination of catechins active components in lipid-lowering slimming products. **METHODS:** HPLC method was adopted. Using epigallocatechin gallate (EGCG) as a reference, relative correction factor (RCF) of EGCG to gallic catechin (EGC), catechin (C), epicatechin (EC), gallic catechin gallate (GCG) and galloyl epicatechin (ECG) were calculated. The contents of EGC, C, EC, GCG and ECG in 5 batches of samples were calculated through RCF. The contents of EGC, C, EC, GCG and ECG determined by external standard method were used as measured value. The similarity of the value determined by external standard method with the value calculated by quantitative analysis of multi-components via single marker method (QAMS) was evaluated with vector included angle cosine method. **RESULTS:** The linear ranges of EGCG, EGC, C, EC, GCG and ECG were 0.006 5-0.130 5 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.000 5-0.010 7 mg/mL ($r=0.999\ 7$), 0.002 0-0.040 0 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.015 3-0.305 3 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.000 8-0.015 5 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.004 0-0.079 2 mg/mL ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 95.07%-100.35% (RSD=1.94%, $n=6$), 95.24%-101.87% (RSD=2.79%, $n=6$), 96.08%-103.86% (RSD=3.01%, $n=6$), 97.51%-101.06% (RSD=1.45%, $n=6$), 96.01%-101.66% (RSD=2.27%, $n=6$), 96.20%-102.89% (RSD=2.71%, $n=6$), respectively. There was no significant difference between measured value and calculated value. **CONCLUSIONS:** The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for contents determination of catechins active components in lipid-lowering slimming health products.

KEYWORDS Slimming; Health products; Catechins; Quantitative analysis of multi-components via single marker method;

HPLC

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81503361); 四川省教育厅科研计划项目(No. 16ZA0299)

* 讲师。研究方向: 天然产物活性成分。电话: 028-62308658。E-mail: aggie-xj@163.com

通信作者: 讲师。研究方向: 天然药物质量标准。电话: 028-85224504。E-mail: 934534055@qq.com

以儿茶素成分为主的茶多酚提取物对人体健康有积极影响^[1], 尤其是其具有降糖降脂等多种活性, 常作为降脂减肥的功能原料用于保健品中^[2]。目前, 对含茶多

酚保健品的质控方法仍以比色法测定为主^[3]。虽然有较多文献报道用高效液相色谱法(HPLC)外标法测定药材及其制剂中儿茶素成分的含量^[4-5],但由于儿茶素类多为成对光学异构体,纯化困难,价格较昂贵,从而导致文献所报道的外标法在生产和检验实际工作中应用有限。近年来提出的一测多评法可克服此不足^[6]。一测多评法通过测定1个成分(对照品供应充足、易得者)与其他组分(对照品难供应、昂贵者)之间的相对校正因子(RCF),而实现多个成分的同时测定。一测多评法已收录入2015年版《中国药典》并应用于多种药材中有效成分的定量分析^[7],本研究即基于一测多评建立的技术指南^[8],建立了以表没食子基儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)为内标,同时测定含表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、儿茶素(Catechin, C)、表儿茶素(Epicatechin, EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(Gallocatechin gallate, GCG)、没食子酰表儿茶素(Epicatechin gallate, ECG)含量的一测多评法,用于保健品中6种儿茶素成分的质量评价与控制。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010型HPLC仪,含LC-20AD二元高压泵、DGU-20A3R自动脱气机、SIL-20A自动进样器、MSD-M20A二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);KH5200B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz);GA110型电子分析天平(美国Ohaus公司)。

1.2 药品与试剂

某减肥胶囊(A公司,批号:150921,规格:0.30 g/粒,无茶多酚标示量);某减肥胶囊(B公司,批号:612165005,规格:0.45 g/粒,茶多酚标示量:14.1%);某减肥胶囊(C公司,批号:20160407,规格:0.40 g/粒,茶多酚标示量:3.67%);某减肥茶(D公司,批号:150502,规格:2 g/袋,茶多酚标示量:5.0%);某左旋多酚片(E公司,批号:151001,规格:0.80 g/片,茶多酚标示量:4.04%),上述5批样品编号为S1~S5;EGC对照品(批号:PS14110601)、C对照品(批号:PS15042901)、EGCG对照品(批号:PS15042701)、EC对照品(批号:PS15050901)、GCG对照品(批号:PS14102902)、ECG对照品(批号:PS1410202)均购自成都普思生物科技股份有限公司,纯度均>98.5%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 基本原理

化合物的量与其检测器响应值在一定线性范围内成正比($f=A/C$)。在多成分同时分析时,通过选取其中一种成分为内标物,建立该成分与其他成分之间的RCF(f_{km}):

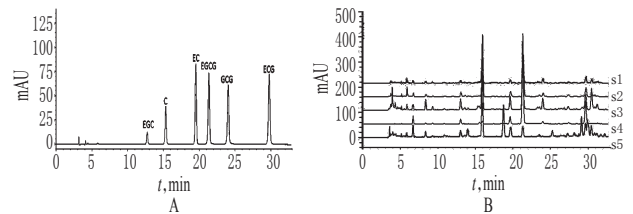
$$f_{km} = f_k / f_m = C_k \times A_m / C_m \times A_k$$

其中, C_k 、 C_m 分别为内标物、待测物的浓度, A_k 、 A_m 分别为内标物、待测物的检测器响应值。通过RCF,计算出样品中其他待测成分的含量:

$$C_m = C_k \times A_m / f_{km} \times A_k$$

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Wonda Cract ODS-2(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.5%乙酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~40 min,10%→30% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以EGCG峰计不少于10 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图1。



A.混合对照品;B.供试品

A. mixed control; B. test samples

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 分别取待测成分对照品各适量,加50%甲醇溶液制成EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG质量浓度分别为6.2、5.1、9.5、5.8、4.9、4.7 mg/mL的单一对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取样品(胶囊取内容物、片剂粉碎、袋泡茶直接取样)200 mg,精密称定,置于50 mL量瓶中,加50%甲醇溶液45 mL,超声提取15 min,静置至室温,加50%甲醇溶液定容,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

将“2.3.1”项下EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG对照品溶液以10:1:2:25:1.5:8(V/V/V/V/V/V)的比例混合,得工作溶液I(EGC、C、EC、EGCG、GCG、ECG质量浓度分别为0.130 5、0.010 7、0.040 0、0.305 3、0.015 5、0.079 2 mg/mL),加50%甲醇溶液逐级稀释得工作溶液II~V。精密量取上述工作溶液I~V各10 μL,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,mg/mL
EGC	$y=1\ 433\ 515x-822$	0.999 8	0.006 5~0.130 5
C	$y=4\ 036\ 738x+1\ 369$	0.999 7	0.000 5~0.010 7
EC	$y=12\ 365\ 713x-21\ 708$	0.999 9	0.002 0~0.040 0
EGCG	$y=7\ 399\ 901x+1\ 751$	0.999 8	0.015 3~0.305 3
GCG	$y=12\ 255\ 005x-1\ 032$	0.999 8	0.000 8~0.015 5
ECG	$y=15\ 629\ 836x-781$	0.999 9	0.004 0~0.079 2

2.5 精密度试验

取“2.3.2”项下供试品溶液(编号:S2)适量,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,EGC、C、EC、EGCG、GCG和ECG峰面积的RSD分别为0.55%、0.76%、0.47%、0.39%、0.51%、0.36%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.3.2”项下供试品溶液(编号:S2)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,EGC、C、EC、EGCG、GCG和ECG峰面积的RSD分别为1.02%、0.87%、1.15%、1.33%、0.79%、1.26%($n=5$),表明供试品溶液室温放置16 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:S2)适量,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,EGC、C、EC、EGCG、GCG和ECG峰面积的RSD分别为1.83%、1.45%、1.92%、1.76%、2.06%、1.13%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:S2)适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.9 RCF的计算

以EGCG为内标,按“2.1”项下公式计算,结合“2.4”项下系列混合对照品溶液所得峰面积数据,计算EGCG对EGC、C、EC、GCG和ECG的RCF。结果,EGCG对EGC、C、EC、GCG和ECG的RCF分别为0.54、0.35、0.41、0.89、0.60。

2.10 一测多评法的系统应用性考察

2.10.1 不同流速考察 精密量取“2.4”项下工作溶液I适量,分别考察0.8、1.0、1.3 mL/min的流速对RCF的影响,结果,EGCG对EGC、C、EC、GCG和ECG RCF的RSD分别为1.63%、1.39%、2.11%、2.53%、1.96%($n=3$),表明流速对RCF无显著影响。

2.10.2 不同柱温考察 精密量取“2.4”项下工作溶液I适量,分别考察柱温为25、35、40 °C对RCF的影响。结果,EGCG对EGC、C、EC、GCG和ECG RCF的RSD分别为1.05%、1.21%、1.73%、2.06%、1.64%($n=3$),表明柱温对RCF无显著影响。

2.10.3 不同进样量考察 精密量取“2.4”项下工作溶液I 5、10、20 μ L,考察不同进样量对RCF的影响。结果,EGCG对EGC、C、EC、GCG和ECG RCF的RSD分别为1.21%、1.29%、1.43%、1.81%、1.67%($n=3$),表明进样量对RCF无显著影响。

2.11 样品含量测定

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
GCG	202.8	6.368	6.2	12.315	96.03	97.43	1.94
	201.7	6.333	6.2	12.221	95.07		
	199.8	6.274	6.2	12.276	96.85		
	199.4	6.192	6.2	12.247	97.66		
	199.1	6.261	6.2	12.483	100.35		
	197.2	6.252	6.2	12.365	98.62		
C	202.8	20.730	20.4	40.180	95.44	98.05	2.79
	201.7	20.610	20.4	40.030	95.24		
	199.8	20.420	20.4	40.220	97.04		
	199.4	20.380	20.4	40.370	97.98		
	199.1	20.350	20.4	41.130	101.87		
	197.2	20.150	20.4	40.700	100.71		
EC	202.8	1.176	1.14	2.290	97.77	100.36	3.01
	201.7	1.170	1.14	2.264	96.08		
	199.8	1.159	1.14	2.297	99.83		
	199.4	1.157	1.14	2.318	101.85		
	199.1	1.155	1.14	2.339	103.86		
	197.2	1.144	1.14	2.315	102.75		
EGCG	202.8	8.477	8.7	17.000	97.97	99.53	1.45
	201.7	8.431	8.7	16.920	97.51		
	199.8	8.352	8.7	17.040	99.90		
	199.4	8.335	8.7	17.060	100.25		
	199.1	8.322	8.7	17.110	101.06		
	197.2	8.243	8.7	16.980	100.49		
GCG	202.8	0.750	0.735	1.461	96.77	98.49	2.27
	201.7	0.746	0.735	1.452	96.01		
	199.8	0.739	0.735	1.453	97.19		
	199.4	0.737	0.735	1.464	98.85		
	199.1	0.736	0.735	1.484	101.66		
	197.2	0.729	0.735	1.468	100.47		
ECG	202.8	0.425	0.47	0.882	96.76	99.26	2.71
	201.7	0.423	0.47	0.877	96.20		
	199.8	0.419	0.47	0.882	98.36		
	199.4	0.418	0.47	0.886	99.52		
	199.1	0.418	0.47	0.900	102.89		
	197.2	0.414	0.47	0.891	101.83		

取5批样品各适量,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,计算EGC、C、EC、GCG和ECG的实测值和计算值之间的夹角余弦值^[9],结果见表3(表中ES为实测值,QAMS为计算值,Cir为夹角余弦值)。结果表明,两种方法所得含量差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3 样品含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Results of contents determination of samples ($n=3, \%$)

样品编号	EGCG		EGC		C		EC		GCG		ECG	
	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS
S1	1.99	1.21	1.31	4.62	4.97	0.28	0.30	0.44	0.47	0.54	0.57	
S2	4.18	3.02	3.14	9.85	10.22	0.55	0.58	0.33	0.37	0.19	0.21	
S3	1.71	1.58	1.67	2.71	2.90	0.31	0.34	0.32	0.35	0.36	0.38	
S4	2.41	1.10	0.93	0.93	0.81	0.24	0.23	0.12	0.10	0.86	0.81	
S5	0.21	0.97	1.01	1.77	1.92	0.22	0.24	0.09	0.10	0.28	0.30	
Cir	0.998 521		0.999 784		0.999 397		0.998 885		0.998 205			

萝藦种子中脂肪油和挥发油成分分析^Δ

胡鹏^{1*}, 蔡静¹, 张园娇¹, 李祥^{1,2}, 陈建伟^{1,3#} (1.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2.江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210023; 3.江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210023)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)18-2532-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.18.24

摘要 目的:分析萝藦种子中脂肪油和挥发油成分。方法:采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析萝藦种子中脂肪油和挥发油成分;色谱柱为HP-5MS石英弹性毛细管柱,载气为高纯氮气,流速为1 mL/min,进样口温度为220 ℃,色谱柱初始温度为120 ℃(程序升温),柱压为80 kPa,分流进样,分流比为20:1,进样量为1 μL;质谱条件:离子源为电子轰击离子源,电子能量为70 eV,接口温度为250 ℃,质量扫描范围为 m/z 50~550,扫描间歇为1.0 s。采用顶空气相色谱-质谱联用法(HSGC-MS)分析炒制前后萝藦种子挥发油成分的差异;色谱柱为HP-5MS石英弹性毛细管柱,载气为高纯氮气,流速为1 mL/min,顶空加热温度为90 ℃,加热时间为30 min,色谱柱初始温度为80 ℃(程序升温),柱压为80 kPa,分流进样,分流比为20:1,进样量为1 μL;质谱条件:离子源为电子轰击离子源,电子能量为70 eV,接口温度为210 ℃,质量扫描范围为 m/z 50~550,扫描间歇为1.0 s。结果:从脂肪油中共鉴定出30个成分,其中亚油酸、油酸、棕榈油酸相对含量较高;从挥发油中共鉴定出54个成分,主要为萜烯类成分,其中衣兰油二烯、罗汉柏烯、脱氢香橙烯相对含量较高。炒制后多检测出4-萜烯醇,且二氢香芹醇相对含量较炒制前增加了1倍。结论:该研究基本明确了萝藦种子脂肪油和挥发油主要成分;炒制前后萝藦种子挥发油成分存在一定差异。

关键词 萝藦种子;脂肪油;挥发油;气相色谱-质谱联用法;顶空气相色谱-质谱联用法

Analysis of Volatile Oil and Fatty Oil in Seed of *Metaplexis japonica*

HU Peng¹, CAI Jing¹, ZHANG Yuanjiao¹, LI Xiang^{1,2}, CHEN Jianwei^{1,3} (1.School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China; 2.Jiangsu Key Laboratory for Chinese Materia Medica Processing, Nanjing 210023, China; 3.Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze fatty oil and volatile oil in seed of *Metaplexis japonica*. METHODS: Fatty oil and volatile oil in seed of *M. japonica* were analyzed by GC-MS: HP-5MS quartz capillary column, high purity nitrogen as carrier gas, flow rate of 1 mL/min, injector temperature of 220 ℃, primary column temperature of 120 ℃ (temperature programmed), column

3 讨论

本研究针对添加茶多酚的降脂减肥保健品中的儿茶素类成分进行定量分析,对一测多评法的技术适用性和实践可行性进行了充分的探讨。结果表明,一测多评法计算出的结果与常规外标法测得的结果之间具有较高的相似度,表明一测多评法可实现以较易获得的、便宜的EGCG为内标,通过确定RCF计算其余5种儿茶素的含量,实现多指标质量评价;而且一测多评法具有实验室间差别小的特点,方法成功建立后,可以在不同部门、不同单位之间直接使用,适合于药品生产企业及监管部门等的大批量常规检测。

参考文献

[1] 赵振军,刘宗岸,仓梅琴,等.茶多酚及儿茶素对人体健康

的影响[J].福建茶叶,2006,39(1):38-41.

[2] 李学鸣,孟宪军,彭杰.茶多酚降低小鼠营养性肥胖的效果[J].沈阳农业大学学报,2009,40(5):612-614.

[3] 丁友昌.分光光度法测定茶多酚保健品中茶多酚[J].中国公共卫生,1998,14(9):573-575.

[4] 袁和军,邱明丰.茶多酚检测方法综述[J].北方药学,2013,10(11):11-13.

[5] 刘振,余梦瑶,胡丹,等.好易升颗粒剂的含量测定及稳定性研究[J].华西药学杂志,2016,31(4):422-425.

[6] 左岚,孟胜男.一测多评法在中药药物分析中的应用进展[J].中国药房,2016,27(18):2589-2591.

[7] 徐彦,刘圆,吕露阳,等.一测多评法测定卷叶贝母中生物碱类成分含量[J].天然产物研究与开发,2012,24(11):1513-1515.

[8] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-659.

[9] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等.一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法:向量夹角法[J].药学学报,2002,37(9):713-715.

(收稿日期:2016-07-23 修回日期:2016-10-08)

(编辑:张静)

^Δ 基金项目:国家公益性行业科研专项(No.201407002);江苏高校优势学科建设工程项目(No.ysxk-2010)

* 硕士研究生。研究方向:中药资源化学及其利用。E-mail: hp381554489@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药资源化学与中药生物技术。电话:025-85811280。E-mail: chenjw695@126.com