

HPLC法测定藤梨根中表儿茶素的含量^Δ

赫 军*,马秉智,梁莹莹,王晓雪,刘 晓*(中日友好医院药学部,北京 100029)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0378-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.31

摘要 目的:建立测定藤梨根中表儿茶素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-0.2%乙酸溶液(15:85, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:表儿茶素的检测质量浓度线性范围为10.47~167.52 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为98.07%~101.71%,RSD=1.39%($n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确,适用于藤梨根中表儿茶素的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;藤梨根;表儿茶素;含量测定

Content Determination of *L*-epicatechin in *Actinidia arguta* by HPLC

HE Jun, MA Bingzhi, LIANG Yingying, WANG Xiaoxue, LIU Xiao (Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of *L*-epicatechin in *Actinidia arguta*. METHODS: HPLC was performed on the column of Kromasil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% Acetic acid solution (15:85, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 210 nm, column temperature was 25 ℃, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range of *L*-epicatechin was 10.47-167.52 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; average recovery was 98.07%-101.71% (RSD=1.39%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and suitable for the content determination of *L*-epicatechin in *A. arguta*.

KEYWORDS HPLC; *Actinidia arguta*; *L*-epicatechin; Content determination

并计算连翘量含量,结果见表2。

3 讨论

本试验中TLC研究所得的色谱斑点清晰,供试品与对照品色谱对应良好,且阴性对照无干扰,可作为本品的鉴别方法。HPLC条件分离效果好,峰形对称,保留时间适宜,杂质峰达到基线分离,阴性无干扰,可用于本品的含量测定。本试验也曾对方中另外几味药(夏枯草、乌梅、茯神等)进行TLC鉴别,结果表明,以上3种药材的阴性对照与对照药材或对照品均在相同位置出现相同颜色的斑点,考虑枳壳、连翘在处方中药理作用甚为明显,所以采用TLC法对本品中的枳壳、连翘进行定性鉴别。

在色谱条件的选取中,曾考虑用双波长检测法,用相同的流动相乙腈-水(23:77, V/V)时,主峰柚皮苷不能完全分开;流动相为乙腈-水(25:75, V/V)时,在连翘苷出峰的位置有干扰;流动相为乙腈-水(20:80, V/V)时,连翘苷出峰时间太晚。也曾考虑用梯度洗脱的方法,但效果不是很明显。最后确定两种成分以不同方法检测。

综上所述,本研究所建标准可用于舒痛安I号胶囊的质量控制。

^Δ 基金项目:北京市自然科学基金资助项目(No.7154237);中日友好医院青年课题(No.2014-1-QN-2)

* 主管药师,博士。研究方向:中药药效物质基础及质量标准。E-mail: hj811229@126.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:010-84206020。E-mail: liuxiao@liuxiao.com

参考文献

- [1] 林丽美,王智民,王金华,等.金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):473.
- [2] Hayakawa T, Takanaga A, Tanaka K, et al. Ultrastructure of the rostral ventral respiratory group neurons in the ventrolateral medulla of the rat[J]. *Brain Res*, 2004, 153(2):94.
- [3] 邢学锋.金银花、连翘药对配伍的化学成分研究[D].广州:第一军医大学,2006.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:70.
- [5] 彭凯丽,李新民,李元林,等.正交试验优选复方桑菊口服液中药材的提取工艺[J].中国药房,2014,25(3):243.
- [6] 张艳艳,曹淑娟,陈汝红,等.HPLC法测定接骨七厘片中柚皮苷的含量[J].中国药房,2014,25(28):2676.
- [7] 叶良红,龚晓红,李芸霞,等.青翘和老翘中多种成分含量比较[J].中药与临床,2013,4(2):6.
- [8] 曹晓燕,王东浩,思培峰,等.连翘不同部位连翘苷含量的比较[J].中成药,2009,31(4):642.
- [9] 夏晖,刘峰群,周艳萍,等.HPLC法同时测定连翘中连翘苷和连翘酯苷A的含量[J].解放军药学报,2014,30(1):60.

(收稿日期:2015-09-22 修回日期:2015-11-19)

(编辑:张 静)

藤梨根为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)的干燥根,主要产于福建、浙江等省。其性凉,味苦、涩,归肾、胃经;具有清热解毒、活血散结、祛风利湿之功效,临床上常用于治疗胃癌、乳腺癌、风湿性关节炎、淋巴性结核、跌扑损伤、痈疔等疾病^[1]。现代药理学研究表明,藤梨根在抗肿瘤方面具有较好的药理活性^[2]。本课题组前期对藤梨根水提取物中的化学成分进行了系统研究,发现藤梨根水提取物中含有大量的黄烷类、绿原酸类和香豆素类成分^[3-5]。但目前尚无有关藤梨根中此3种成分含量的报道。因此,本课题组采用高效液相色谱(HPLC)法对藤梨根中黄烷类代表成分表儿茶素进行含量测定,旨在为藤梨根质量控制方法的完善提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G-1322C型在线真空脱气机、G-1311C型高压四元泵、G-4212B型二极管阵列检测器(DAD)及Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);BSA4235-CW型电子天平(德国Sartorius公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

藤梨根[北京华邈中药工程技术开发中心,产地:四川,批号:209061;北京卫仁中药饮片厂,产地:浙江,批号:113612101;北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,产地:河北,批号:001003287],均经中日友好医院中药库唐永和药师鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃的干燥根;表儿茶素对照品(中日友好医院自制,纯度>98%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%乙酸溶液(15:85,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,表儿茶素峰的保留时间为8.8 min,各组分分离良好,其他成分对测定无干扰色谱,分离度>1.5,理论板数以表儿茶素峰计不低于3 000。色谱见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取表儿茶素对照品10.47 mg,置于50 ml量瓶中,用50%甲醇溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品细粉1.0 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 ml,称定质量,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 空白对照溶液 精密移取50%甲醇50 ml,置于100 ml锥形瓶中,称定质量,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,

滤过,取续滤液,即得。

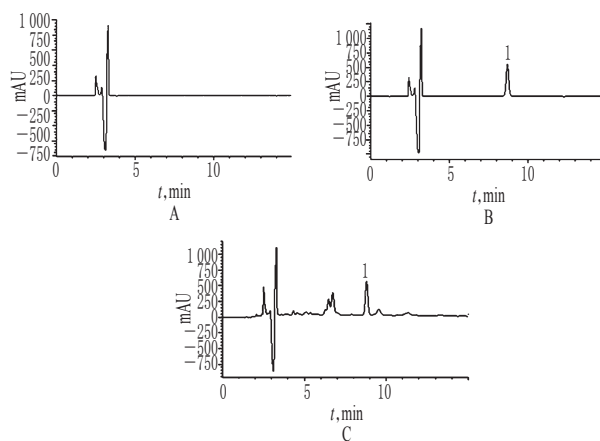


图1 高效液相色谱图

A.空白对照;B.对照品;C.供试品;1.表儿茶素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank control;B.reference substance;C.test sample; 1.L-epicatechin

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下表儿茶素对照品溶液0.5、1、2、4、8 ml,置于10 ml量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列对照品溶液。分别精密吸取系列对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以表儿茶素的峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y = 75.076x + 180.35$ ($r = 0.9999$)。结果表明,表儿茶素的检测质量浓度线性范围为10.47~167.52 μg/ml。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下表儿茶素对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.35% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取样品(批号:209061)细粉适量,按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定并记录峰面积。结果,RSD=0.90% ($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取样品(批号:209061)细粉适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.54% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知表儿茶素含量的样品(批号:209061)细粉6份,每份0.5 g,分别精密加入质量浓度为0.209 0 mg/ml的表儿茶素对照品溶液5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”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1。

2.8 样品含量测定

分别称取不同产地和批号的样品细粉适量,各3份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进

样测定,按外标法计算样品中表儿茶素的含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of sample recovery test($n=6$)

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,%
1.029 1	1.045 0	2.058 7	98.53		
1.033 2	1.045 0	2.071 5	99.36		
1.024 0	1.045 0	2.074 6	100.54	99.80	1.39
1.065 0	1.045 0	2.089 8	98.07		
1.053 7	1.045 0	2.116 6	101.71		
1.031 2	1.045 0	2.082 3	100.58		

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3$)

样品产地	表儿茶素含量,mg/g
四川	2.04
浙江	0.54
河北	3.25

3 讨论

3.1 测定指标的选择

本课题组前期从藤梨根药材的水提取物中分离鉴定了多个黄酮类单体成分,其中分离得到的表儿茶素较多^[3-4]。且表儿茶素具有多种药理活性,如抗肿瘤、抗氧化等^[6-7],是藤梨根发挥药理作用的主要活性成分之一。同时,经过稳定性考察发现,表儿茶素具有较好的稳定性,故本研究以黄酮类代表成分表儿茶素含量为测定指标来控制藤梨根药材的质量。

3.2 提取方法的选择

在供试品溶液制备方面,笔者查阅相关文献,选取了50%甲醇作为提取溶剂^[8-9],同时对提取方法(超声与回流)和提取时间(30与60 min)进行了考察。最终,采用50%甲醇、超声处理时间为30 min作为提取方法对藤梨根中表儿茶素进行提取。

3.3 色谱条件的选择

表儿茶素结构中具有多个酚羟基,在溶剂中以游离型和有机酸盐的形式共同存在,加入少量乙酸可使有机酸盐转化为游离酸。因此,经预试验验证最终选用乙腈-0.2%乙酸溶液(15:85, V/V)作为流动相,且此流动相制备简便,样品各组分分离度亦较好。本课题组还曾采用DAD在190~400 nm波长

范围对待测成分进行紫外扫描,结果表儿茶素在210 nm波长处有较大吸收,且基线平稳、图谱分离较好。故选择210 nm作为检测波长。

3.4 启示

从含量测定结果可以看出,3个不同产地的藤梨根药材中表儿茶素的含量在0.54~3.25 mg/g之间,不同产地样品表儿茶素含量相差较大,可在一定程度上说明地域因素对其影响明显。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,适用于藤梨根中表儿茶素的含量测定。

参考文献

- [1] 北京市药品监督管理局.北京市中药饮片炮制规范[S].2008年版.北京:化学工业出版社,2008:107.
- [2] 赫军,李栋,马秉智,等.藤梨根化学成分和抗肿瘤药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):213.
- [3] 赫军,马秉智,赵铁,等.藤梨根的化学成分研究[J].中国药理学杂志,2014,49(3):184.
- [4] Zhao T, He J, Wang XX, *et al.* Rapid detection and characterization of major phenolic compounds in radix actinidia chinensis plant by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014,98(10):311.
- [5] 马秉智,周宇,赫军,等.HPLC法测定藤梨根中异秦皮苷的含量[J].中国药房,2015,26(15):2150.
- [6] Yu Y, Deng Y, Lu BM, *et al.* Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy[J]. *Apoptosis*, 2014,19(1):1.
- [7] 黄仁术,易凡,何惠利,等.金荞麦(-)-表儿茶素抗氧化活性研究[J].食品科学,2014,35(15):118.
- [8] 边宝林,王宏结,司南.鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(6):31.
- [9] 张旭,杨万青,苏聪,等.HPLC法测定茅莓根中表儿茶素的含量[J].中国新药杂志,2014,23(24):2915.

(收稿日期:2015-06-12 修回日期:2015-09-12)

(编辑:刘柳)

关于长治市三宝生化药业有限公司等4家企业复方肝浸膏片(胶囊)检出高含量铬的通告(2015年第106号)

近日,在国家药品抽检中,经西安市食品药品检验所检验,发现标示为长治市三宝生化药业有限公司生产的复方肝浸膏片(8批)、山东中泰药业有限公司生产的复方肝浸膏片(3批)、陕西博森生物制药股份有限公司生产的复方肝浸膏胶囊(2批)、重庆申高生化制药股份有限公司生产的复方肝浸膏胶囊(1批)检出含有铬成分(胶囊壳铬含量符合规定),有10个批次检出值在300~1200 mg/kg,存在安全风险。

复方肝浸膏片(胶囊)属补血制剂,主要成分为铁元素,没有规定铬的限量标准。为保障公众用药安全,国家食品药品监督管理局要求山西省、山东省、重庆市、陕西省食品药品监督管理局监督上述4家企业立即停止生产,查清复方肝浸膏

片(胶囊)生产、销售情况和具体销售流向并及时向社会公布相关信息,召回市场全部批次产品,并报告产生问题的原因。调查处置情况于2016年1月10日前报告国家食品药品监督管理局总局。

各省(区、市)食品药品监督管理局要监督行政区域内相关企业及单位立即停止销售和使用上述企业生产的复方肝浸膏片(胶囊),并配合做好召回工作,发现患者服用该药后出现不良反应及时报告。

国家食品药品监督管理局已组织调查组进行调查,调查情况及时向社会公布。

国家食品药品监督管理局