

鸡血藤提取物的 TLC 鉴别及儿茶素和表儿茶素的含量测定

陆雪丽^{1,2}, 潘晓鹃^{1,2*}, 邓萌萌², 吴佳欣^{1,2}, 赵俊红²

(1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:建立鸡血藤提取物的薄层色谱法(TLC)鉴别及其有效成分儿茶素和表儿茶素总量的高效液相色谱法(HPLC)测定,为该药材的质量控制提供参考。方法:TLC以0.7%羧甲基纤维素钠硅胶G作为吸附剂,三氯甲烷-丙酮-正丁醇-甲醇-甲酸(67:13:14:3:3)为展开剂,5%香草醛硫酸溶液为显色剂。儿茶素、表儿茶素总量测定的HPLC采用Kinetex® C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇-0.02%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样量5 μL,检测波长280 nm。结果:鸡血藤提取物的TLC中,在与儿茶素、表儿茶素对照品相对应的位置上显相同颜色、相同形状的斑点,且斑点清晰、分离度好。在HPLC定量分析中,儿茶素、表儿茶素的线性范围(质量浓度与峰面积积分值)分别为9.9~198.8,20.6~412.4 mg·L⁻¹,相关系数均为0.999 9;儿茶素、表儿茶素的平均回收率分别为98.12%和97.94%,RSD分别为1.7%和1.4%。结论:该研究建立的TLC专属性强、分离度好;建立的测定儿茶素、表儿茶素总量的HPLC准确度高、重复性好,可用于鸡血藤提取物的质量控制。

[关键词] 鸡血藤; 提取物; 薄层色谱法; 儿茶素; 表儿茶素; 含量测定

[中图分类号] R22;R282;R284;R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0088-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181611

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1537.016.html>

[网络出版时间] 2018-05-25 9:26

TLC Identification and Determination of Catechin and Epicatechin in Spatholobi Caulis Extract

LU Xue-li^{1,2}, PAN Xiao-juan^{1,2*}, DENG Meng-meng², WU Jia-xin^{1,2}, ZHAO Jun-hong²

(1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;
2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To identify Spatholobi Caulis extract with thin layer chromatography (TLC) and determine total content of catechin and epicatechin in it with high performance liquid chromatography (HPLC), in order to provide a reference for the quality control of Spatholobi Caulis. **Method:** TLC was put into effect with 0.7% sodium carboxymethylcellulose (CMC-Na) silica gel G as adsorbent, chloroform-acetone- (*n*-butanol) - methanol-formic acid (67:13:14:3:3) as developing solvent and 5% vanillin sulfuric acid solution as chromogenic agent. HPLC was carried out with the Kinetex® C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and methanol-0.02% phosphoric acid water solution as mobile phase to perform gradient elution; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 25℃, the injection volume was 5 μL, and the detection wavelength was 280 nm. **Result:** In the TLC, the color and shape of the extract spots were the same as those of catechin and epicatechin references at the corresponding positions, and those spots were clear and well separated. In the

[收稿日期] 20180319(011)

[基金项目] 四川省科院所科技成果转化项目(14010101);四川省公益性科研院所基本科研业务费项目(A-2013N-22)

[第一作者] 陆雪丽,在读硕士,从事中药学研究,E-mail:18835792253@139.com

[通信作者] *潘晓鹃,研究员,硕士生导师,从事中药新剂型、新制剂研究,Tel:028-85256112,E-mail:panxiaojuan1@163.com

quantitative analysis of HPLC, catechin and epicatechin had good linear relationships in the range of 9.9-198.8 mg · L⁻¹ and 20.6-412.4 mg · L⁻¹, respectively; and their correlation coefficients were all 0.999 9. The average recoveries of catechin and epicatechin was 98.12% and 97.94% with RSD of 1.7% and 1.4%, respectively. **Conclusion:** The TLC established in this experiment has strong specificity and good separating degree. The HPLC which was used to determine total content of catechin and epicatechin in the extract has high accuracy and good repeatability. The established methods can be used to control quality of *Spatholobi Caulis* extract.

[**Key words**] *Spatholobi Caulis*; extract; thin layer chromatography; catechin; epicatechin; content determination

鸡血藤具有活血补血、调经止痛、舒筋活络的作用^[1],主要含有黄酮类、有机酸、萜醌、甾体、三萜类等成分^[2-5]。其中,黄酮醇类成分儿茶素、表儿茶素等含量较高,而其他黄酮类成分含量普遍偏低^[6]。在2015年版《中国药典》中,鸡血藤项下薄层色谱法(TLC)鉴别仅使用对照药材而无对照品,含量测定缺项,说明其成分鉴别与含量测定存在一定难度。关于鸡血藤药材、提取物的质量控制,未见包含儿茶素、表儿茶素和芒柄花素的TLC同时鉴别的报道;关于含量测定,有采用紫外-可见分光光度法测定总黄酮^[7-8]的报道,高效液相色谱法(HPLC)测定儿茶素、表儿茶素含量的报道^[6,9-15]。但现有HPLC色谱条件仍可优化,使儿茶素、表儿茶素达到更好的分离。本实验以自制的鸡血藤提取物为研究对象,建立了同时鉴别儿茶素、表儿茶素的TLC以及测定儿茶素、表儿茶素总量的HPLC,以控制该提取物的质量,为鸡血藤药材中芒柄花素、儿茶素和表儿茶素的同时鉴别以及鸡血藤药材含量测定方法的建立提供参考。

1 材料

1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),D810型数码相机(日本尼康公司),MS205DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Milli-Q Integral-3型纯水/超纯水一体化系统(成都宝赛思科技有限公司)。儿茶素、表儿茶素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110877-201604,110878-200102,纯度依次为99.2%,100%),鸡血藤提取物(自制,鸡血藤经乙醇提取、有机溶剂萃取、柱色谱分离所得,鸡血藤药材购于河北省安国中药材专业市场,批号20160121,经四川省中医药科学院中药资源与种植研究所方清茂教授鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* 的干燥藤茎),薄层色谱法(TLC)硅胶G(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,成都市科龙化工试剂厂),

水为超纯水,HPLC用甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鸡血藤提取物的TLC鉴别 称取鸡血藤提取物约10 mg,加甲醇5 mL超声使溶解(功率250 W,频率59 kHz,下同),即得供试品溶液。分别取表儿茶素、儿茶素对照品适量,分别加甲醇制成1 mL约含0.5 mg对照品的溶液,即得2种对照品溶液。吸取供试品溶液和表儿茶素、儿茶素对照品溶液各2 μL,分别点于0.7% CMC-Na硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-丙酮-正丁醇-甲醇-甲酸(67:13:14:3:3)为展开剂,预饱和30 min后展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,105 °C加热至斑点显色清晰,见图1。结果发现鸡血藤提取物的TLC中,在与儿茶素、表儿茶素对照品相对应的位置上,显相同颜色、相同形状的斑点,且斑点清晰可见。



1. 表儿茶素对照品;2. 供试品;3. 儿茶素对照品

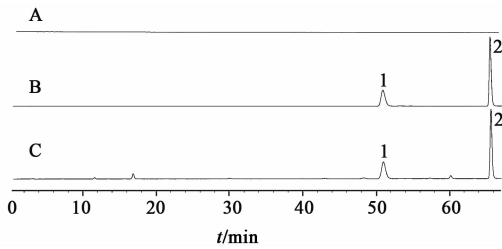
图1 鸡血藤提取物的TLC

Fig. 1 TLC of *Spatholobi Caulis* extract

2.2 儿茶素和表儿茶素总量的测定

2.2.1 色谱条件与系统适应性 Kinetex® C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.02%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 49.5 min, 5% ~ 9.5% A; 49.5 ~ 50.5 min, 9.5% ~ 18% A; 50.5 ~ 67 min, 18% ~ 22% A),流速1.0 mL · min⁻¹,

柱温 25 °C, 进样量 5 μL, 检测波长 280 nm。理论板数按儿茶素峰计算不低于 1 万。在该色谱条件下, 鸡血藤提取物中儿茶素与表儿茶素的分离度良好, 见图 2。



A. 空白试剂; B. 混合对照品; C. 供试品; 1. 儿茶素; 2. 表儿茶素

图 2 鸡血藤提取物的 HPLC 专属性试验

Fig. 2 HPLC specific experiment of *Spatholobi Caulis* extract

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取一定量干燥至恒重的儿茶素和表儿茶素对照品, 加甲醇配制成质量浓度分别为 0.994, 2.062 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 作为储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取鸡血藤提取物约 10 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声使溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 临用前过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.4 标准曲线的建立 精密量取儿茶素和表儿茶素混合对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 得系列混合对照品溶液, 临用前过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得儿茶素、表儿茶素的回归方程分别为 $Y = 3499.4X + 2.37$ ($r = 0.9999$), $Y = 3446.6X + 7.2138$ ($r = 0.9999$), 线性范围依次为 9.9 ~ 198.8, 20.6 ~ 412.4 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 取同一儿茶素、表儿茶素混合对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果儿茶素、表儿茶素峰面积的 RSD 均为 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取鸡血藤提取物约 10 mg, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样, 结果儿茶素、表儿茶素峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取鸡血藤提取物约 10 mg, 精密称定, 共 6 份, 分别照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 照 2.2.1 项下色谱条件分别测定, 计算供试品

中儿茶素、表儿茶素的平均质量分数分别为 18.70% 和 36.72%, RSD 分别为 1.3% 和 0.7%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 取鸡血藤提取物约 10 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 按低、中、高质量浓度对照品加入量分别与所取供试品中待测成分质量之比控制在 0.5:1, 1:1, 1.5:1 左右, 分别精密加入一定量儿茶素、表儿茶素混合对照品溶液, 每组质量浓度 3 份, 分别加甲醇超声使溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算儿茶素、表儿茶素的平均回收率分别为 98.12% 和 97.94%, RSD 分别为 1.7% 和 1.4%, 表明本方法回收率良好、准确度高, 见表 1。

表 1 鸡血藤提取物中儿茶素、表儿茶素的加样回收试验

Table 1 Recovery test of catechin and epicatechin in *Spatholobi Caulis* extract

成分	取样量 /mg	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
儿茶素	10.39	1.942 9	0.994 0	2.910 9	97.38	98.12	1.7
	10.62	1.985 9	0.994 0	2.998 7	101.90		
	11.43	2.137 4	0.994 0	3.123 4	99.20		
	10.56	1.974 7	1.988 0	3.918 5	97.77		
	11.41	2.133 7	1.988 0	4.048 8	96.34		
	12.49	2.335 6	1.988 0	4.294 0	98.51		
	11.35	2.122 5	2.982 0	5.038 0	97.77		
	10.67	1.995 3	2.982 0	4.909 1	97.71		
	11.01	2.058 9	2.982 0	4.936 0	96.48		
	表儿茶素	10.39	3.815 2	2.057 8	5.816 7	97.27	97.94
10.62		3.899 7	2.057 8	5.937 1	99.01		
11.43		4.197 1	2.057 8	6.219 2	98.27		
10.56		3.877 6	4.115 6	7.812 0	95.60		
11.41		4.189 8	4.115 6	8.171 5	96.75		
12.49		4.586 3	4.115 6	8.700 0	99.95		
11.35		4.167 7	6.173 4	10.258 4	98.66		
10.67		3.918 0	6.173 4	10.033 6	99.06		
11.01		4.042 9	6.173 4	10.026 4	96.92		

2.2.9 样品测定 取鸡血藤提取物约 10 mg, 精密称定, 共 3 份, 分别照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 照 2.2.1 项下色谱条件进样, 计算鸡血藤提取物中儿茶素、表儿茶素总质量分数平均值 55.64%, 见表 2。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别 本实验以 0.7% CMC-Na 硅胶 G 和聚酰胺薄膜作为吸附剂, 考察了乙酸乙酯-甲醇-

表 2 鸡血藤提取物中儿茶素、表儿茶素含量的测定

Table 2 Determination of catechin and epicatechin in *Spatholobi Caulis* extract

批号	称样量/mg	儿茶素质量分数/%	表儿茶素质量分数/%
20170501	11.40	18.78	36.68
20170705	11.32	18.98	36.50
20171018	11.57	19.11	36.87

甲酸(45:3:2), 甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸-水(20:10:10:1:1), 三氯甲烷-丙酮-正丁醇-甲醇-甲酸(67:13:14:3:3)3种展开剂系统, 考察了紫外光灯(254 nm)下检视、三氯化铝试液喷雾显色和5%香草醛硫酸溶液喷雾加热显色3种检识条件。结果显示以0.7% CMC-Na 硅胶 G 为吸附剂、三氯甲烷-丙酮-正丁醇-甲醇-甲酸(67:13:14:3:3)作展开剂和5%香草醛硫酸溶液作显色剂对鸡血藤提取物进行薄层色谱检识效果最佳。

3.2 HPLC 含量测定

3.2.1 检测波长的选择 通过二极管阵列检测器(DAD)200~800 nm 全波长扫描, 找到儿茶素与表儿茶素的吸收最大吸收波长均为280 nm, 故以280 nm 作为本实验的检测波长。

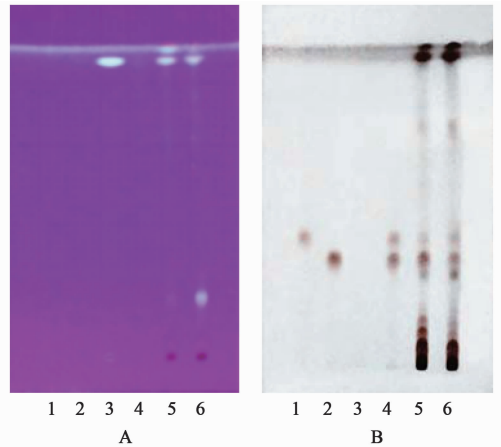
3.2.2 流动相的筛选 预试验发现甲醇-水和乙腈-水等度洗脱时对样品的分离效果较差。改用甲醇-水梯度洗脱, 经反复筛选, 发现选用甲醇(A)-0.02% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~49.5 min, 5%~9.5% A; 49.5~50.5 min, 9.5%~18% A; 50.5~67 min, 18%~22% A), 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温25℃, 进样量5 μL 等条件时, 鸡血藤提取物中儿茶素、表儿茶素峰的分度良好。

3.2.3 分析时间较长及其原因 本实验中儿茶素、表儿茶素出峰时间分别为51, 66 min 左右, 分析时间较长。因儿茶素峰前面紧挨1个色谱峰, 梯度变化过快二者会较快出峰, 但分离度差, 不能满足分析方法的要求, 通过反复实验筛选, 最后选定本实验色谱条件对鸡血藤提取物进行测定, 可达到分析要求。

3.3 建立的 TLC 与 HPLC 对鸡血藤药材质量控制的初步研究及建议

3.3.1 鸡血藤药材的 TLC 鉴别 取鸡血藤药材适量, 加乙醇超声提取, 滤液水浴挥干乙醇, 经乙酸乙酯萃取, 取上层挥干乙酸乙酯, 残渣加甲醇溶解并定容, 得供试液。采用本文建立的 TLC 条件, 即采用0.7% CMC-Na 硅胶 G 为吸附剂, 三氯甲烷-丙酮-正丁醇-甲醇-甲酸(67:13:14:3:3)作展开剂, 在紫外

光灯(254 nm)下检识芒柄花素, 再喷以5%香草醛硫酸溶液, 105℃加热至斑点显色清晰, 检识儿茶素、表儿茶素。在与对照品 TLC 相应的位置上, 显相同颜色的斑点。本方法采用1次色谱, 2种检识方法, 同时鉴别鸡血藤药材的芒柄花素、儿茶素、表儿茶素3个成分。结果表明该法可用于鸡血藤提取物、饮片、药材的 TLC 鉴别, 可对2015年版《中国药典》中鸡血藤的 TLC 鉴别进行补充与完善, 见图2。



A. 紫外光灯(254 nm)下; B. 日光下; 1. 儿茶素对照品; 2. 表儿茶素对照品; 3. 芒柄花素对照品; 4. 鸡血藤提取物; 5. 鸡血藤对照药材; 6. 鸡血藤药材

图 2 鸡血藤药材的 TLC

Fig. 2 TLC of *Spatholobi Caulis*

3.3.2 鸡血藤药材的 HPLC 含量测定 鸡血藤药材加50倍量甲醇超声处理, 照2.2.1项下色谱条件进行测定, 结果儿茶素、表儿茶素重复性试验的RSD分别为3.9%和3.1%, 24 h内稳定性试验的RSD分别为4.2%和2.2%, 平均加样回收率分别为93.24% (RSD 1.3%) 和92.89% (RSD 2.1%), 表明本文建立的 HPLC 可用于鸡血藤药材的含量测定。测得5批鸡血藤药材中儿茶素和表儿茶素的质量分数分别为0.023%~0.097%, 0.045%~0.240%。由于实验药材批数不够, 最终没有给出药材中儿茶素、表儿茶素的含量限度。2015年版《中国药典》中鸡血藤缺含量测定项, 可能因药材成分相对复杂、有效成分含量低、影响因素多等原因导致较难建立鸡血藤的 HPLC。从鸡血藤提取物与药材的 HPLC 色谱图比较来看, 提取物的色谱图基线比药材的更平稳, 说明成分复杂等因素影响了分离效果。如果对药材进行前处理, 可能会达到更好的分离分析结果, 后续会以该方法为参考, 对鸡血藤药材的含量测定方法进一步优化和完善。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:194.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:1688-1690.
- [3] 崔艳君,刘屏,陈若芸. 鸡血藤的化学成分研究[J]. 药学报,2002,37(10):784-787.
- [4] 廖辉,张凌,金晨,等. 丰城鸡血藤的化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):62-67.
- [5] 郑岩,刘桦,白焱晶,等. 鸡血藤黄酮类化合物的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(2):152-154.
- [6] 刘军民,安冉,翟明,等. 鸡血藤商品药材质量评析[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):573-575.
- [7] 程悦,王志宇,王冬梅,等. 不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):142-145.
- [8] 余燕影,彭志兵,曹树稳. 紫外分光光度法测定丰城鸡血藤中总黄酮[J]. 中草药,2005,36(11):1650-1651.
- [9] 李莹. 中药鸡血藤的化学成分和质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.
- [10] 安冉,刘军民. 不同肥料对鸡血藤药材质量的影响[J]. 中药材,2014,37(11):1932-1935.
- [11] 边宝林,王宏洁,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):31-32.
- [12] 李苗苗. 鸡血藤野生资源调查及其品质与自然生态因子相关性研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [13] 刘超,马林,陈若芸,等. 反相高效液相色谱法测定鸡血藤中儿茶素类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(18):1433-1435.
- [14] 刘静. 鸡血藤总黄酮固体分散体微孔渗透泵控释片的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2014.
- [15] 李小莹,周龙颖珍,赖丽嫦,等. 鸡血藤干、鲜品黄酮部位的高效液相指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):72-75.

[责任编辑 刘德文]