

HPLC同时测定黔产红禾麻中4种儿茶素类成分含量

汪石丽¹, 李勇军¹, 廖尚高¹, 郑林², 孙佳², 周雯², 王爱民^{1*}

- (1. 贵阳医学院药学院, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;
2. 贵阳医学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定红禾麻中 4 种儿茶素类成分含量的方法。方法:采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 35 ℃。结果:(-)-没食子儿茶素、(±)-表没食子儿茶素、(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素线性范围分别为 0.050 50 ~ 1.010 μg ($r = 0.999 9$), 0.050 05 ~ 1.001 μg ($r = 0.999 9$), 0.025 75 ~ 0.515 0 μg ($r = 0.999 9$), 0.016 65 ~ 0.333 0 μg ($r = 0.999 9$);平均加样回收率分别为 97.39%, 98.45%, 99.17%, 97.87%。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于红禾麻药材的质量控制。

[关键词] 红禾麻; 高效液相色谱; (-)-没食子儿茶素; (±)-表没食子儿茶素; (+)-儿茶素; (-)-表儿茶素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.201421091

Simultaneous Determination of Four Catechins in *Laportea bulbifera* by HPLC

WANG Shi-li¹, LI Yong-jun¹, LIAO Shang-gao¹, ZHENG Lin², SUN Jia², ZHOU Wen², WANG Ai-min^{1*}

(1. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of four catechins in *Laportea bulbifera*. **Method:** The chromatography separation was performed on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a gradient solvent system of acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature was kept at 35 ℃. **Result:** The linear ranges of (-)-gallocatechin, (±)-epigallocatechin, (+)-catechin, (-)-epicatechin were 0.050 50-1.010 μg ($r = 0.999 9$), 0.050 05-1.001 μg ($r = 0.999 9$), 0.025 75-0.515 0 μg ($r = 0.999 9$) and 0.016 65-0.333 0 μg ($r = 0.999 9$), respectively. The average recoveries of four components were 97.39%, 98.45%, 99.17% and 97.87%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and repeatable, and could be used to control the quality of *L. bulbifera*.

[Key words] *Laportea bulbifera*; HPLC; (-)-gallocatechin; (±)-epigallocatechin; (+)-catechin; (-)-epicatechin

红禾麻具有祛风除湿、活血化瘀的功效,用于治疗风湿痹痛、肢体麻木、跌扑损伤、骨折等,分布于贵州、云南、四川、湖南等省区^[1-2]。文献^[3]报道红禾麻主要有内酯、糖类、鞣质和香豆素等多种化学成

分,其乙醇提取物和水溶部分具有较明显的镇痛作用^[4]。目前未见对红禾麻质量控制相关文献报道,其质量控制仅停留在性状鉴别上^[2]。课题组对红禾麻化学成分研究发现其含有大量鞣质类成分,并

[收稿日期] 20140108(015)

[基金项目] 贵州省科技厅项目(20122030,20134001);贵阳市中药现代化项目(201120416);贵州省卫生厅科技基金项目(2012-5)

[第一作者] 汪石丽,在读硕士,从事中药质量控制及天然产物研究,Tel:0851-6908468,E-mail:136412584@qq.com

[通讯作者] *王爱民,教授,硕士生导师,从事中药质量评价与新药研究,Tel:0851-6908468,E-mail:gywam100@163.com

从有效部位分离得到 4 个具有代表性和含量较高的儿茶素类化学成分 (-)-没食子儿茶素, (±)-表没食子儿茶素, (+)-儿茶素, (-)-表儿茶素, 现代药理研究表明, 儿茶素类成分具有抗炎、神经保护、抗肿瘤等多方面的生物活性^[5-6]; 经调查, 民间将珠芽艾麻根和全草均做为药材使用, 本文收集的 28 批样品中包括根和全草, 并以这 4 个化合物为对照品, 建立高效液相色谱法测定红禾麻中该 4 种活性成分的含量, 该方法可用于红禾麻药材的质量控制。

1 材料

Prominence LC-20A 型高效液相色谱仪系列 (包括 LC-20AD 二元梯度溶剂输送泵、DGU-20A3 在线真空脱气机、SIL-20AHT 自动进样器、CBM-20A Lite 系统控制器、CTO-10ASvp 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器、LC-Solution 色谱工作站, 日本岛津), CQ-250A-DST 型超声仪 (上海龙跃仪器设备有限公司), 超纯水机 (四川沃特科技发展有限公司), AE240 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

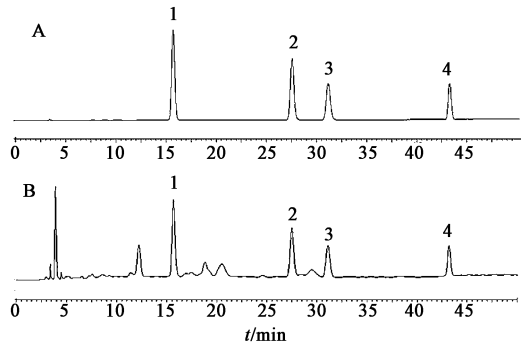
(-)-没食子儿茶素、(±)-表没食子儿茶素、(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素对照品均为实验室自制, 经核磁共振光谱鉴定, 旋光度测定, TLC 纯度检查和 HPLC 检查以峰面积归一化法计算, 纯度均 > 98.0%; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水; 实验用 28 批红禾麻药材采收于贵州省, 经贵阳医学院药用植物与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为荨麻科植物珠芽艾麻 *Laportea bulbifera* (Sieb. et Zucc.) Wedd. 的新鲜或干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相梯度洗脱 (0~35 min, 5%~11% A, 35~50 min, 11%~20% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。在该色谱条件下, 对照品与供试品各成分分离度良好, 见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取 (-)-没食子儿茶素、(±)-表没食子儿茶素、(+)-儿茶素和 (-)-表儿茶素对照品适量置棕色量瓶中, 用甲醇配成分别为 0.050 50, 0.050 05, 0.025 75, 0.016 65 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取红禾麻药材粉末 (过 40 目筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇 30 mL, 摇匀, 称重, 加热回流 4 h, 放冷, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。



A. 混合对照品; B. 供试品;

1. (-)-没食子儿茶素; 2. (±)-表没食子儿茶素;
3. (+)-儿茶素; 4. (-)-表儿茶素

图 1 混合对照品及红禾麻供试品 HPLC

精密吸取续滤液 20 mL, 蒸干, 残渣加水 10 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣用 80% 乙醇 5 mL 溶解, 过聚酰胺柱 (聚酰胺 30~60 目, 2.0 g, 内径 1.2 cm), 用 80% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集流穿液和洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2 项混合对照品溶液 1, 2, 4, 8, 16, 20 μL 依次进样, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y)、进样量为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 测定各峰面积, 结果 (-)-没食子儿茶素, (±)-表没食子儿茶素, (+)-儿茶素, (-)-表儿茶素峰面积 RSD 分别为 0.7%, 0.3%, 0.6%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于制备后的 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样, 测定峰面积, 结果 (-)-没食子儿茶素, (±)-表没食子儿茶素, (+)-儿茶素, (-)-表儿茶素峰面积 RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 1.4%, 0.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批红禾麻药材粉末约 0.5 g, 精密称定 6 份, 按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 按 2.1 项下方法测定, 结果 (-)-没食子儿茶素, (±)-表没食子儿茶素, (+)-儿茶素, (-)-表儿茶素平均质量分数分别为 0.823 1, 0.792 3, 0.504 3, 0.334 5 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.3%, 1.3%, 2.2%, 2.0%, 表明重复性良好。

表1 4种成分的线性关系和范围

名称	回归方程	线性范围/ μg
(-)-没食子儿茶素	$Y = 5.40 \times 10^6 X - 3.76 \times 10^4$	0.050 50 ~ 1.010
(±)-表没食子儿茶素	$Y = 4.30 \times 10^6 X + 4.33 \times 10^3$	0.050 05 ~ 1.001
(+)-儿茶素	$Y = 5.60 \times 10^6 X - 1.62 \times 10^4$	0.025 75 ~ 0.515 0
(-)-表儿茶素	$Y = 6.30 \times 10^6 X - 8.82 \times 10^3$	0.016 65 ~ 0.333 0

注:相关系数为0.999 9。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的红禾麻药材粉末6份,每份0.25 g,精密称定,置100 mL圆底烧瓶中,分别按各成分在药材中的含量精密加入对照品甲醇溶液,相当于(-)-没食子儿茶素0.206 5

mg,(±)-表没食子儿茶素0.198 5 mg,(+)-儿茶素0.130 5 mg,(-)-表儿茶素0.084 5 mg。按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法测定,计算回收率,结果见表2。

表2 红禾麻中4种成分加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
(-)-没食子儿茶素	0.250 3	0.206 0	0.206 5	0.408 7	98.16	97.39	2.4
	0.250 5	0.206 2	0.206 5	0.402 9	95.25		
	0.250 8	0.206 4	0.206 5	0.411 4	99.27		
	0.251 2	0.206 8	0.206 5	0.414 5	100.58		
	0.251 7	0.207 2	0.206 5	0.403 2	94.92		
	0.251 9	0.207 3	0.206 5	0.405 9	96.17		
(±)-表没食子儿茶素	0.250 3	0.198 3	0.198 5	0.390 8	96.98	98.45	1.4
	0.250 5	0.198 5	0.198 5	0.395 0	98.99		
	0.250 8	0.198 7	0.198 5	0.396 9	99.85		
	0.251 2	0.199 0	0.198 5	0.391 2	96.83		
	0.251 7	0.199 4	0.198 5	0.397 5	99.80		
	0.251 9	0.199 6	0.198 5	0.394 6	98.24		
(+)-儿茶素	0.250 3	0.126 2	0.130 5	0.254 7	98.47	99.17	1.6
	0.250 5	0.126 3	0.130 5	0.253 3	97.32		
	0.250 8	0.126 5	0.130 5	0.254 9	98.39		
	0.251 2	0.126 7	0.130 5	0.257 9	100.54		
	0.251 7	0.126 9	0.130 5	0.259 5	101.61		
	0.251 9	0.127 0	0.130 5	0.255 8	98.70		
(-)-表儿茶素	0.250 3	0.083 7	0.084 5	0.167 4	99.05	97.87	1.3
	0.250 5	0.083 8	0.084 5	0.166 3	97.63		
	0.250 8	0.083 9	0.084 5	0.166 8	98.11		
	0.251 2	0.084 0	0.084 5	0.167 3	98.58		
	0.251 7	0.084 2	0.084 5	0.167 4	98.46		
	0.251 9	0.084 3	0.084 5	0.164 9	95.38		

2.9 样品含量测定 分别精密称取28批不同产地的红禾麻药材粉末各0.5 g,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别吸取10 μL ,按2.1项下方法测定4种成分的含量,结果见表3。

3 讨论

供试品溶液制备时对不同提取方法(回流、索

式、超声),提取溶剂(甲醇/乙醇,70%甲醇/乙醇,50%甲醇/乙醇,30%甲醇/乙醇)及提取时间进行了考察,结果70%甲醇加热回流4 h效率最高。

采用DAD在190~400 nm对待测成分进行紫外扫描,4个待测成分在210 nm处均有较大吸收。经试验在210 nm进样测定,基线平稳,图谱分离较

表 3 28 批红禾麻药材 4 种成分含量测定

mg·g⁻¹

No.	批号	产地	(-)-没食子 儿茶素	(±)-表没 食子儿茶素	(+)- 儿茶素	(-)- 表儿茶素
1	20130501	贵州花江	0.424 8	0.999 5	0.127 6	0.160 2
2	20130503	贵州关岭	0.743 2	1.081 3	0.249 6	0.177 4
3	20130504	贵州凯里	0.310 3	0.481 6	0.157 4	0.144 2
4	20130505	贵州水城	0.403 5	0.317 6	0.139 5	0.086 9
5	20113506	贵州兴义	0.429 6	0.390 2	0.171 5	0.115 0
6	21030507	贵州贵阳	0.491 7	0.452 4	0.213 1	0.152 0
7	20130508	贵州花江	0.384 0	0.446 7	0.163 6	0.171 9
8	20130509	贵州都匀	0.477 0	0.476 4	0.261 5	0.200 6
9	20130510	贵州毕节	0.430 9	0.566 7	0.149 1	0.129 9
10	20130511	贵州大方	1.155 7	1.011 3	0.540 8	0.400 9
11	20130512	贵州贵阳	1.096 9	0.754 4	0.481 7	0.253 9
12	20130514	贵州毕节	0.895 3	1.312 5	0.423 0	0.318 5
13	20130601	贵州毕节	0.460 5	0.669 0	0.163 7	0.146 4
14	20130602	贵州水城	0.944 9	0.938 9	0.442 6	0.317 4
15	20130603	贵州兴义	0.439 1	0.365 2	0.171 6	0.197 4
16	20130604	贵州安顺	0.475 1	0.447 4	0.214 6	0.117 8
17	20130605	贵州关岭	0.655 0	0.700 7	0.334 4	0.243 6
18	20130606	贵州水城	0.643 2	0.745 4	0.324 7	0.265 3
19	20130607	贵州安顺	0.805 0	0.525 8	0.401 1	0.177 9
20	20130608	贵州花江	0.696 4	0.613 7	0.307 3	0.203 7
21	20130609	贵州安顺	1.246 4	1.886 4	0.299 2	0.249 1
22	20130610	贵州盘县	0.887 2	0.651 8	0.443 9	0.222 3
23	20130611	贵州龙江	0.793 4	1.549 3	0.286 8	0.749 1
24	20130612	贵州清镇	0.370 2	0.482 1	0.161 2	0.165 7
25	20130319	贵州毕节	0.753 7	0.752 1	0.299 1	0.217 1
26	20130412	贵州关岭	0.428 4	0.456 1	0.212 1	0.136 0
27	20130413	贵州兴义	0.634 5	0.757 8	0.308 2	0.271 4
28	20130423	贵州毕节	0.823 1	0.792 3	0.504 3	0.334 5

好,且峰形好,故选择 210 nm 作为检测波长。

作者在红禾麻药材化学成分研究过程中,发现其含有大量的鞣质成分,该类成分是导致样品在高效液相色谱上分离效果差、基线不平稳的主要原因;本文通过考察不同方法除鞣(正丁醇萃取,聚酰胺柱吸附,正丁醇萃取+聚酰胺柱吸附)液相图谱比较发现,单独用正丁醇萃取或聚酰胺柱吸附方法均无法将红禾麻中大量鞣质类成分除去,导致指标成分分离度较差,基线不平,而通过正丁醇萃取再过聚酰胺柱处理除去鞣质进行高效液相色谱分析,结果处理后样品分离效果良好,基线平稳,且作者对正丁醇萃取次数、洗脱溶剂类型及聚酰胺用量等因素进行了考察,结果重复性和回收率均较好,因此确定了供试品的制备方法。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.《中华本草-苗药卷》[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2005: 283.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社, 2003: 187.
- [3] 张莎莎,周红,李璐璐,等. 红活麻总香豆素的制备工艺研究[J]. 中药材, 2013, 36(4): 636.
- [4] 马琳,梁冰,朱珠,等. 民族药珠芽艾麻醇提物镇痛药理作用的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 34(1): 24.
- [5] 刘超,陈若芸. 儿茶素及其类似物的化学和生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(10): 1017.
- [6] 徐先祥. 儿茶素的药理作用研究综述[J]. 郑州轻工业学院学报, 2012, 27(4): 60.

[责任编辑 顾雪竹]