

鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定

边宝林, 王宏洁, 司 南

(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

摘要:目的: 通过高效液相色谱法、薄层色谱法建立了道地药材鸡血藤中有效成分表儿茶素的含量测定及刺芒柄花素薄层鉴别方法。方法: 采用 HPLC 及 TLC 法测定。结果: 对不同地区市售的药材进行了表儿茶素的含量测定及刺芒柄花素鉴别。结论: 为道地药材鸡血藤质量控制方法的建立奠定了基础。

关键词: 鸡血藤; 表儿茶素; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)06-0031-03

鸡血藤为豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)干燥藤茎, 始载于《本草备要》, 为常用活血化瘀中药, 具有补血、活血、通络作用; 临床用于月经不调, 血虚萎黄, 麻木瘫痪, 风湿痹痛等疾病。国内外学者近 30 多年来从鸡血藤中分离出 30 多种化合物, 主要为黄酮类、三萜类、香豆素类、甾醇类等^[1-6], 由于所含成分的含量较低, 至今为止尚未见有关成分的含量测定的相关报道。我们从豆科植物密花豆分离出表儿茶素及刺芒柄花素, 并首次对其中的表儿茶素进行了含量测定方法学研究及刺芒柄花素的薄层色谱鉴别方法研究。从而建立了鸡血藤药材中的表儿茶素含量测定方法及刺芒柄花素的薄层色谱鉴别方法。

1 仪器、试剂

安捷伦 HP-1100, KQ-100 超声波清洗器: 昆山市超声技术有限公司。甲醇: (色谱级) 北京化工厂。水: 重蒸水。聚酰胺: 江苏临江试剂化工厂。表儿茶素自制。

2 方法与结果

2.1 鉴别 刺芒柄花素对照品纯度检查。刺芒柄花素对照品的纯度在 90% 以上, 符合薄层鉴别的要求(见附图 1)。根据鸡血藤所含化学成分及化合物刺芒柄花素的理化性质, 经过反复摸索, 最终确定提取方法为取本品粉末 1.0g, 加入 95% 乙醇 100mL, 回流提取 1h, 滤过, 滤液蒸干, 用甲醇 2mL 溶解, 加入硅胶 1g 拌匀, 挥干溶剂, 倾入硅胶层析柱中(100~200 目, 2g, 内径 1.0cm, 干法装柱), 依次用石油醚(60~90℃) 30mL、氯仿 40mL 洗脱, 收集氯仿洗脱液, 蒸干,

用氯仿 0.5mL 溶解, 作为供试品溶液。另取刺芒柄花素对照品, 加甲醇制成每 mL 含 1.0mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B) 试验, 吸取上述两种溶液 5~10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇(15:0.5) 为展开剂, 展开, 展距约 10cm, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。对 10 个不同地区的市售药材进行薄层色谱鉴别, 结果见附图 2。

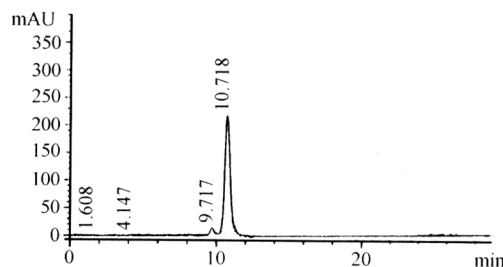


图 1 刺芒柄花素 HPLC 色谱纯度图

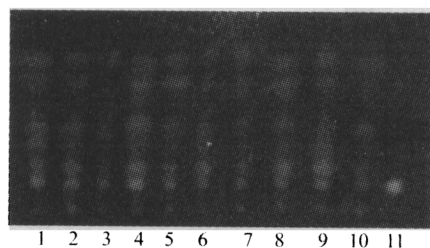


图 2 十个产地药材的薄层鉴别色谱

1. 上海 2. 杭州 3. 山东 4. 北京 5. 南京
6. 河南 7. 山西 8. 陕西 9. 湖北 10. 广西
标: 刺芒柄花素

2.2 含量测定

2.2.1 色谱分析条件 色谱柱: 日本产 YMC C₁₈ (4 μ m 4.6 \times 150mm) No: 041583435 (W); 流动相: 0.01mol/L 柠檬酸水溶液-甲醇(80:20); 流速:

0.6mL/min; 波长: 280nm; 柱温: 30℃。

2.2.2 对照品纯度检查 表儿茶素对照品的纯度在 98% 以上, 符合含量测定的要求。(见附图 3)

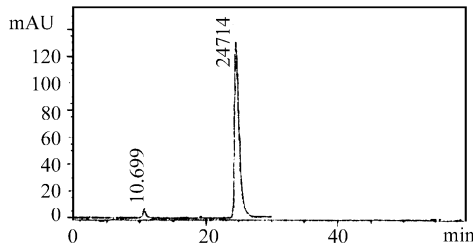


图 3 表儿茶素 HPLC 色谱纯度图

2.2.3 提取条件选择 根据有关文献的记载及被测成分的理化性质, 我们比较了使用水、50% 甲醇、100% 甲醇作为提取溶剂, 结果显示, 使用 50% 甲醇提取, 表儿茶素提取率均高于水及 100% 甲醇。

2.2.4 提取方法选择 我们比较了回流提取、超声波振荡的提取方法, 结果显示回流提取表儿茶素重现性较超声波振荡提取差, 故我们采用超声波振荡的提取方法的方法提取样品。

2.2.5 提取时间选择 我们比较了超声振荡提取 20 30 40min, 结果显示提取 20 30min 的表儿茶素提取率相同, 故选用超声振荡提取 30min。

2.2.6 样品处理选择 根据鸡血藤药材中被测成分表儿茶素的特性, 提取液经过 D₁₀₁-SP₈₂₅-HP-20 大孔吸附树脂柱层析、硅胶柱层析、聚酰胺柱层析等方法的多次筛选, 最后确定使用聚酰胺柱层析, 即可以除去绝大部分干扰测定的杂质, 而又不影响样品含量测定。

2.2.7 供试品溶液的制备 取鸡血藤药材粗粉(过 20 目筛)约 1.0g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50mL, 称定重量, 超声处理(功率 100W, 频率 40kHz) 30min, 放至室温后, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 提取液离心(3000 转/min, 15min)。取上清液浓缩至小体积, 拌入 1g 的聚酰胺(过 100 目筛)拌匀, 挥干溶剂, 加到聚酰胺干柱(100 目, 3g, 内径 1cm)上, 用水 50mL、20% 甲醇 50mL 50% 甲醇 50mL 依次洗脱, 收集 50% 甲醇洗脱液, 至 50mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45μm)即得。

2.2.8 线性关系考察 精密称取表儿茶素对照品 1.077mg, 加入甲醇—水(1:1)溶液, 制成浓度为 0.1mg/mL 的对照品溶液, 摇匀。精密量取对照品溶液 1mL, 置干燥的 2mL 量瓶中加甲醇—水(1:1)溶液至刻度, 摇匀, 分别取 1、5、10、15、20μL 注入高效液

相色谱仪, 测定, 以对照品峰面积的积分值为纵坐标, 以对照品进样量为横坐标绘制工作曲线图, 测定数据计算得回归方程: $Y = -2.75555756 + 1151.380665X$, $r = 0.9999$ 。线性范围 0.05~1.08μg。

2.2.9 精密度试验 精密称取对照品, 制成浓度为每 1mL 含 0.05mg 溶液, 进行精密度试验。RSD(%) 为 0.18。

2.2.10 重复性试验 称取样品按供试品溶液的制备方法提取, 平行试验 5 份, 进行含量测定, RSD(%) 为 2.13。可见该方法有良好的重现性。

2.2.11 稳定性试验 取同一供试品溶液, 每间隔一定时间测定一次含量, 测至 12h, RSD(%) 为 0.53。可见样品溶液中表儿茶素的含量至少在 12h 内稳定性良好。

2.2.12 回收率 精密取表儿茶素 11.423mg, 至 10mL 量瓶中, 加入甲醇—水(1:1)溶液至刻度, 精密吸取 1.5mL, 分别加入到样品中, 按供试品溶液方法制备供试品溶液。测定, 计算回收率。结果见表 1, 平均回收率为 101.34%, RSD 为 1.58%。

表 1 回收率测定结果

取样量 (mg)	样品中表儿茶素量 (mg)	添加表儿茶素量 (mg)	测出表儿茶素量 (mg)	回收率 (%)
2015.0	1.9189	1.71345	3.6777	102.64
2083.1	1.9838	1.71345	3.7245	101.59
2047.6	1.9499	1.71345	3.6652	100.10
2209.0	2.1037	1.71345	3.8745	103.35
2199.7	2.0948	1.71345	3.7911	99.00

2.2.13 药材的测定 于不同产地购买市售药材, 经本所何希荣老师鉴定为豆科植物密花豆 (*Spatholobus suberectus* Dunn) 干燥藤茎。样品粉碎后, 按供试品溶液的制备方法进行含量测定, 结果见下表。

表 2 不同产地购买市售药材含量测定结果

序号	样品产地	表儿茶素含量 (%)
1	南京	0.1878
2	陕西	0.1039
3	上海	0.0416
4	湖北	0.0133
5	河南	0.1122
6	山东	0.1141
7	山西	0.1205
8	北京	0.1387
9	杭州	0.0286
10	广西	0.0848

3 结论

鸡血藤的基原植物涉及 5 科 20 多种(豆科、黄化豆等;木通科:大血藤;五味子科:黄龙藤等;葡萄科:大血藤;紫金牛科:白花酸藤子),其中 80% 的商品鸡血藤来源于豆科植物密花豆。中国药典 90 版、95 版及 2000 年版中所收录的鸡血藤为豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)干燥藤茎,在研究中发现,鸡血藤的活性部位为水溶性成分^[7-8],经实验证明,其抗凝活性成分为以表儿茶素、儿茶素为基本单位构成的单宁类大分子物质。本文首次对其中的表儿茶素进行了含量测定方法学研究及刺芒柄花素的薄层色谱鉴别方法研究。为更好的控制药材质量,进一步深入研究中药鸡血藤提供了一定的试验基础。

参考文献:

[1] 材茂,李守珍.密花豆化学成分研究[J].中草药.1989,

20(2):5.

- [2] 催艳君,刘屏,陈若芸.鸡血藤化学成分研究[J].药学学报,2002,37(10):26.
- [3] 严新启,林萍,王迪.鸡血藤脂溶性成分研究[J].中国药科大学学报,2001,32(5):336.
- [4] 李静,张炜,许津.鸡血藤化学成分研究[J].中国药学杂志,1999:34(10):686.
- [5] Yoshiyasu Fukuyama, Invitro Fibrinolytic Phytosterols Isolated from the Root[J]. Plant Medica, 1986: 5(1): 34.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 一部, 151.
- [7] 胡利平, 樊良卿, 杨锋, 等. 鸡血藤对小鼠 LAK NK 细胞的影响[J]. 浙江中医学院学报. 1997: 21(6): 29.
- [8] 江涛, 唐春萍, 李娟好, 等. 鸡血藤对大鼠主动脉环收缩反应的影响[J]. 广东药学院学报, 1996. 12(1): 33-35.