

HPLC 法测定七厘散中儿茶素和表儿茶素的含量

谭生建^①, 贺业谦^②, 李勉珊^①, 史 宁^①, 薛克昌^①

[摘要] 目的 建立七厘散中儿茶素和表儿茶素的含量测定方法。方法 HPLC 法, 采用 Prevail Select C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温: 35℃; 以乙腈-水-磷酸 (100:900:1) 为流动相; 流速: 1 ml/min; 检测波长: 278 nm。结果 儿茶素、表儿茶素线性浓度范围分别为 30.08 ~ 150.4 μg/ml, $r = 0.9999$; 12.24 ~ 61.20 μg/ml, $r = 0.9999$; 回收率分别为 99.1% 和 97.4%, RSD 分别为 1.1% 和 1.2%。结论 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于七厘散中儿茶素和表儿茶素的含量测定。

[关键词] HPLC 法; 七厘散; 儿茶素; 表儿茶素

[中图分类号] R927.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-072-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.21

Determination of Catechin and Epicatechin in *Qili San* by HPLC

TAN Sheng-jian^①, HE Ye-qian^②, LI Mian-shan^①, SHI Ning^①, XUE Ke-chang^①

^①Department of Pharmacy, Hospital 306 of PLA, Beijing 100101, China;

^②Beijing Huangsi Cosmetic Surgery Hospital, Beijing 100011, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining catechin and epicatechin in *Qili San*. **Methods** HPLC was used for the determination. The chromatographic column was Prevail Select C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the column temperature was 35℃. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-phosphoric acid (100:900:1). The flow rate was 1 ml/min and monitored at 278 nm. **Results** The linear range of catechin was 30.08–150.4 μg/ml, $r = 0.9999$. The average recovery of catechin was 99.1% and RSD was 1.1%. The linear range of epicatechin was 12.24–61.20 μg/ml, $r = 0.9999$. The average recovery of epicatechin was 97.4% and RSD was 1.2%. **Conclusion** This method is simple, time-saving and accurate. It can be used for routine analysis of catechin and epicatechin in *Qili San*.

[Key words] HPLC; *Qili San*; catechin; epicatechin

七厘散收载于《中国药典》2010 年版(一部), 由血竭、儿茶、乳香(制)、没药(制)、红花、冰片、人工麝香和朱砂加工制成。儿茶中所含的儿茶素和表儿茶素是七厘散中的活性成分。儿茶中儿茶素和表儿茶素的含量测定方法《中国药典》有收载^[1], 某些含儿茶制剂中儿茶素和表儿茶素的含量测定方法报道有 HPLC 法^[2-4], 七厘散中儿茶素和表儿茶素的含量测定方法未见报道。本文建立了 HPLC 法测定七厘散中儿茶素和表儿茶素含量的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 包括 G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1315B 二极管阵列检测器,

G2170BA 色谱工作站, G1316A 柱温箱和 G1379B 在线脱气机(美国 Agilent 1200 系列)。儿茶素对照品、表儿茶素对照品(均为中国药品生物制品检定所)。七厘散(规格: 5 g/瓶, 本院制剂室制备, 批号: 20110311-1、20110311-2、20110311-3)。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备 (1) 对照品溶液 取儿茶素对照品、表儿茶素对照品, 精密称定, 分别加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得儿茶素对照品溶液 (225.6 μg/ml) 和表儿茶素对照品溶液 (183.6 μg/ml)。(2) 混合对照品溶液 精密量取儿茶素对照品溶液 20 ml 和表儿茶素对照品溶液 10 ml 混匀, 即得(每 1 ml 含儿茶素 150.4 μg, 含表儿茶素 61.20 μg)。(3) 供试品溶液 取七厘散约 150 mg(约相当于儿茶 20 mg), 精密称定, 置 100 ml 具塞磨口锥

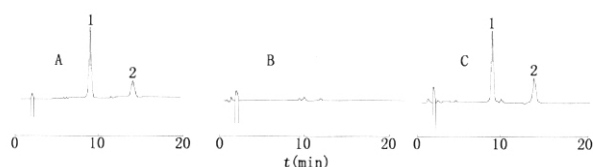
作者简介: 谭生建, 主任药师。研究方向: 药物分析。Tel: (010) 66356172; E-mail: tansj163@163.com

作者单位: ① 100101 北京, 解放军 306 医院药学部; ② 100011 北京, 北京黄寺美容外科医院

形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 ml,称定重量,超声 (500 W, 50 Hz) 处理 30 min,擦干瓶壁,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(4) 阴性对照溶液 按七厘散处方及工艺制备不含儿茶的阴性样品,取阴性样品约 130 mg,置 100 ml 具塞磨口锥形瓶中,按照(3)方法操作,即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Prevail Select C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 35℃; 以乙腈-水-磷酸 (100:900:1) 为流动相; 流速: 1 ml/min; 检测波长: 278 nm; 进样量: 10 μl。

2.3 专属性试验 取混合对照品溶液、阴性样品溶液和供试品溶液,照 2.2 项下色谱条件,记录色谱图,见图 1。七厘散中儿茶以外的成分对儿茶素和表儿茶素的测定无干扰,儿茶素和表儿茶素保留时间分别约为 8.6 和 13.6 min; 与相邻峰的分度均大于 1.5; 理论板数按儿茶素和表儿茶素计分别约为 5000 和 6000。



A: 混合对照品; B: 阴性对照; C: 供试品; 1: 儿茶素; 2: 表儿茶素

图 1 HPLC 图

2.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 (每 1 ml 含儿茶素 150.4 μg, 表儿茶素 61.20 μg) 2、4、6、8、10 ml, 分别置 10 ml 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为儿茶素 30.08、60.16、90.24、120.32、150.40 μg/ml, 表儿茶素 12.24、24.48、36.72、48.96、61.20 μg/ml 的混合对照品溶液,进样 10 μl,记录色谱峰面积,以进样浓度 (X, μg/ml) 对峰面积 (Y) 线性回归,儿茶素、表儿茶素的回归方程分别为

$$Y = 0.1501X + 0.3368, r = 0.9999$$

$$Y = 0.1715X + 1.232, r = 0.9999$$

儿茶素、表儿茶素的线性范围分别为 30.08 ~ 150.40 μg/ml 和 12.24 ~ 61.20 μg/ml。

2.5 定量限考察 取混合对照品溶液用 50% 甲醇稀释后,进样测定,至峰高约为基线噪音的 10 倍时,测得儿茶素和表儿茶素的定量限分别为 0.005、0.007 μg。

2.6 精密度试验 精密量取 2.1 项下的混合对照品溶液,连续进样 5 次,儿茶素和表儿茶素色谱峰面积平均值分别为 1001.1 和 349.5, RSD 分别为

0.11% 和 0.34%, 表明精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一样品 (批号: 20110311-2) 按 2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液,分别测定含量,儿茶素和表儿茶素含量平均值分别为 10.70 和 6.461 mg/g; RSD 分别为 1.8% 和 1.5%, 表明重复性符合要求。

2.8 稳定性试验 取同一样品 (批号: 20110311-2) 按 2.1 项下方法制备供试品溶液,分别于 0、1、2、3、4、11、12、23、24 h 重复进样 9 次,儿茶素和表儿茶素色谱峰面积 RSD 分别为 0.71% 和 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的七厘散 (批号: 20110311-4, 儿茶素 10.41 mg/g, 含表儿茶素 6.345 mg/g) 6 份,每份约 150 mg,精密称定,分别精密加入儿茶素对照品溶液 (儿茶素 78.96 μg/ml) 20 ml、表儿茶素对照品溶液 5 ml (儿茶素 183.6 μg/ml) 和 50% 甲醇 25 ml,称定重量,超声 (500W, 50Hz) 处理 30 min,擦干瓶壁,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 5ml 稀释至 10ml,按照含量测定方法测定并计算回收率。见表 1。

表 1 儿茶素及表儿茶素的加样回收率测定结果

成分	取样量 (g)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
儿茶素	0.1463	1.524	1.579	3.070	97.9		
	0.1452	1.512	1.579	3.062	98.1		
	0.1433	1.492	1.579	3.061	99.3		
	0.1436	1.495	1.579	3.051	98.5	99.1	1.1
	0.1468	1.529	1.579	3.114	100.4		
	0.1456	1.516	1.579	3.099	100.2		
表儿茶素	0.1463	0.928	0.918	1.832	98.5		
	0.1452	0.921	0.918	1.823	98.2		
	0.1433	0.909	0.918	1.788	95.7		
	0.1436	0.911	0.918	1.794	96.2	97.4	1.2
	0.1468	0.931	0.918	1.828	97.7		
	0.1456	0.924	0.918	1.823	97.9		

2.8 含量测定 按 2.1 项下方法制备儿茶素和表儿茶素混合对照品溶液和七厘散供试品溶液。精密量取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μl 进样测定,外标法以峰面积计算。测定了 3 批七厘散的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n = 3)

样品批号	儿茶素含量 (mg/g)	表儿茶素含量 (mg/g)
20110311-1	10.41	6.345
20110311-2	10.70	6.461
20110311-3	10.83	6.489

(下转 76 页)

伤的逆转,可能的机制是复杂而多方面的。例如,对葡萄糖的利用能力(细胞葡萄糖阈值、摄取率)的作用,对糖原储备的影响,对氧气利用的影响等等。这其中,乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等酶的活性,血红蛋白含量即代表携带氧的能力,尿素氮等代谢产物水平都是反映药物作用机制的很好指标。黄酮类化合物的药理活性,以及他们的药理作用机制和相互之间的协同作用与抗缺氧抗疲劳药效之间的关系有待进一步考察。

缺氧、寒冷等高原极端环境下,保持运动能力对于高原驻军、高原施工队、运动员等特殊人群来说比单纯的延长存活时间更加具有意义。对于承担高原应急处突任务的低海拔人群来说,药物短时间内起效同样具有相当的实战意义。本课题组试图利用低压舱模拟高原环境,通过力竭游泳来考察枳椇子提取物短时间内(5 d)对小鼠模拟高原环境下运动能力的影响。实验结果证明,短暂的服用枳椇子提取物 1 和 2(5 d)可以显著延长低压缺氧环境下小鼠游泳至力竭的时间,为枳椇子提取物能够提高小鼠高原环境下运动能力提供了实验证据。

一般来说,未经高原习服的人群进入海拔 3000 m 以上地区时会发生高原反应。鉴于小鼠的适应能力强于人类,我们选择 5000 m 海拔相当氧分压作为实验条件。发现小鼠在低压力竭游泳的时间比常压常氧力竭游泳时间长,原因可能是在急性低压时小鼠毛发腠理中的气泡膨胀增加了小鼠在水中的浮力,抵消了低氧对小鼠游泳能力的负面影响。洗衣粉饱和溶液起到润湿剂的作用,可以使小鼠毛发很快润湿,并且使抽气过程中水中溶解的空气在析出时不会粘附在小鼠身上,迫使小鼠不停的运动。因实验所用低压舱空间有限,致使游泳箱体积受限,为使同组小鼠同时进舱游泳,又不至于因小鼠密度太大而至相互踩踏而干扰结果,我们引进了栅栏,用来分隔小鼠。栅栏内壁应光滑,直径要适当,避免小鼠撑在壁上休息。

(上接 73 页)

3 讨论

本文采用 50% 甲醇为溶剂,超声(500 W, 50 Hz)处理 30 min 提取,试验证明可行。在线光谱显示儿茶素和表儿茶素最大吸收波长均在 278 nm 左右,故确定 278 nm 作为检测波长。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中

[参考文献]

- [1] 梁 赓,詹 莉. 人参和枳椇子对小鼠乙醇急性中毒保护作用及其机制研究[J]. 医学新知杂志, 2006, 16(2): 82-83
- [2] 刘秀玲,张 洪,王 飞. 枳椇子提取物对实验大鼠肝组织中 TIMP-1 与 MMP-13 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1097-1100
- [3] 嵇 扬,王文俊,孙 芳. 枳椇子水提取液对小鼠综合体能的影响[J]. 中医药学报, 2003, 31(3): 47-49
- [4] 伊 佳,嵇 扬. 枳椇子乙酸乙酯提取物对小鼠耐缺氧能力及糖原含量影响实验研究[J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 130-131
- [5] Li G, Min BS, Zheng C, et al. Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(7): 804-809
- [6] 张永昕,俞 发. 枳椇子总黄酮治疗酒精性肝病及其作用机制研究[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1782-1785
- [7] 王 飞,张 洪,刘秀玲. 枳椇子各部位清除羟自由基作用的比较[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(1): 48-50
- [8] Tan GY, Zhang MH, Feng JH, et al. Effects of Pretreatment by the Flavanol Ampelopsin on Porcine Kidney Epithelial Cell Injury Induced by Hydrogen Peroxide[J]. *Agricultural Sci China*, 2010, 4(9): 598-604
- [9] Abalea V, Cillard J, Dabos MP, et al. Repair of Iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures[J]. *Free Radic Bio Med*, 1999, 26: 1457-1466
- [10] Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, et al. Neuroprotective effects of antioxidant flavonoids quercetin (1)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* [J]. *Brain Res*, 2003, 965: 130-136
- [11] Muthukumaran S, Sudheer AR, Menon VP, et al. Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats [J]. *Toxicology*, 2008, 243: 207-215
- [12] Renugadevi J, Prabu SM. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2010, 62: 471-481

(收稿日期: 2011-11-01; 修回日期: 2012-01-03)

(本文编辑 魏 萍)

国医药科技出版社, 2010. 9-10

- [2] 路 飏,彭咏梅. HPLC 测定心脑血管滴丸中儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 78-83
- [3] 谭生建,刘 刚,张 锋,等. 高效液相色谱法测定茶黄酐中儿茶素、表儿茶素和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 64-66
- [4] 阮桂平,袁旭江. HPLC 法同时测定珠黄吹喉散中儿茶素和盐酸小檗碱的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 296-298

(收稿日期: 2011-04-02; 修回日期: 2011-07-20)

(本文编辑 梁爱君)