

# 鸡血藤药材中原儿茶酸的含量测定\*

林惠贞<sup>1</sup>, 刘浩文<sup>1</sup>, 韦 玮<sup>1</sup>, 李雯婷<sup>1</sup>, 赵志敏<sup>1</sup>, 陈建萍<sup>2</sup>, 王冬梅<sup>1</sup>  
(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;  
2. 香港大学中医药学院, 香港)

**摘 要:** 建立测定鸡血藤药材中原儿茶酸含量的方法, 并对制备供试品溶液的提取溶剂、提取方法、提取次数、药材粒度等进行了考察优化。采用高效液相色谱法, 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - φ = 0.5% 醋酸水 (体积比为 10:90); 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长为 260 nm。优化所得供试品溶液的制备方法, 药材加水回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液并浓缩至小体积, 用乙酸乙酯萃取 4 次, 合并乙酸乙酯萃取液, 浓缩后的残渣用甲醇 - 水 (体积比为 1:1) 溶解并定容, 即得。经系统的方法学考察, 所建立的方法在原儿茶酸浓度为 8.56 ~ 214 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好 ( $R^2 = 0.9997$ ), 平均加样回收率为 99.2%, RSD 为 2.8%, 市售 7 个批次鸡血藤药材中原儿茶酸的含量为 65.81 ~ 122.35 μg · g<sup>-1</sup>。该方法准确, 重复性好, 可用于鸡血藤药材的质量控制。

**关键词:** 鸡血藤; 密花豆属密花豆; 原儿茶酸; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2014) 01 - 0089 - 04

## Determination of Protocatechuic Acid in *Spatholobi Caulis*

LIN Huizhen<sup>1</sup>, LIU Haowen<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>, LI Wenting<sup>1</sup>, ZHAO Zhimin<sup>1</sup>, CHEN Jianping<sup>2</sup>, WANG Dongmei<sup>1</sup>  
(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;  
2. School of Chinese Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the quantitative analysis of protocatechuic acid (PA) in *Spatholobi Caulis* (the stem of *Suberect spatholobus* Dunn.). The preparation method of sample solution was established by optimizing the extraction solvents, methods, times and the sizes of the crude drug. The sample solutions were analyzed using a C<sub>18</sub> column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with CH<sub>3</sub>CN - φ = 0.5% HAc (volumic ratio, 10:90) as mobile phase and detected at 260 nm with a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The crude drug was extracted by boiling water for three times and 1.5 h for each time. The obtained aqueous solution was concentrated and followed by extracted with ethyl acetate for four times. The ethyl acetate layer was concentrated to dryness, and was resolved in methanol-water (volumic ratio, 1:1) to give the sample solution previous to HPLC analysis. After systematic method evaluation, the results showed that the linear range was 8.56 ~ 214 μg · mL<sup>-1</sup> with correlation coefficient  $R^2$  of 0.9997; and the average recovery rate was 99.2% with RSD of 2.8%. The contents of PA in market-sold seven batches of *Spatholobi Caulis* were determined to be in the range of 65.81 ~ 122.35 μg · g<sup>-1</sup>. The established method was accurate and repeatable, which could be used for the quality control of *Spatholobi Caulis*.

**Key words:** *Spatholobi Caulis*; *Spatholobus suberectus*; protocatechuic acid; HPLC

\* 收稿日期: 2013 - 06 - 11

基金项目: 广东省科技计划国际合作资助项目 (2012B050300014); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题资助项目 (20121150); 香港创新科技基金 (ITF) 资助项目 (ITS/073/11FP)

作者简介: 林惠贞 (1989 年生), 女; 研究方向: 中草药质量标准化与分析研究; 通讯作者: 王冬梅; E-mail: lss-wdm@mail.sysu.edu.cn

鸡血藤 (*Spatholobi Caulis*) 为我国传统的活血化瘀中药, 中国药典 2010 年版一部收载鸡血藤为豆科 (*Leguminosae*) 密花豆属植物密花豆 (*Spatholobus suberectus* Dunn.) 的干燥藤茎。其性温, 味苦、甘, 归肝、肾经, 具有补血、活血、通络之传统功效, 一般主要用于治疗麻木瘫痪、血虚萎黄、月经不调、风湿痹痛等症<sup>[1-3]</sup>。

中国药典 2010 年版一部中鸡血藤药材的质量研究只有显微鉴别, TLC 鉴别和醇浸出物的检测项目, 并无含量测定方法。原儿茶酸是鸡血藤药材中的特征成分之一, 其具有抗血小板凝集、降低心肌耗氧量、抑菌、镇痛等多方面药理活性<sup>[4-6]</sup>, 是一种重要的天然活性物质。对于鸡血藤药材中原儿茶酸的测定方法已有文献报道<sup>[7-9]</sup>, 但其样品前处理方法步骤较多, 而且样品中原儿茶酸的提取率偏低。本研究并改进了鸡血藤药材中原儿茶酸含量测定的样品前处理方法, 所建立的方法能更准确反映出鸡血藤药材中原儿茶酸的含量。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

HPLC 色谱仪 (日本岛津公司): LC-20 AB 泵、SIL-20 A 自动进样器; SPD-M20A 二极管阵列检测器, CTO-20A 柱温箱。

TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

### 1.2 试剂

乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 水为超纯水 (Millipore 超纯水系统); 其他试剂均为国产市售分析纯。

原儿茶酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110809-200604)。

鸡血藤药材, 产地广西, 购自广州市清平药材市场和广东环球制药公司, (批号分别为 20110601, 20110701, 20110702, 20110801, 20110802, 20110302, 20120201); 经中山大学药学院生药学与天然药化实验室杨得坡教授鉴定为豆科密花豆属植物密花豆 (*Spatholobus suberectus* Dunn.) 的藤茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取原儿茶酸对照品适量约 2.0 mg, 精密称定 (2.14 mg), 加甲醇-水 (体积比为 1:1) 溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,

制成每 1 mL 含原儿茶酸 0.214 mg 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取鸡血藤药材粉末 (过 60 目筛) 约 2 g, 精密称定, 加水回流提取 3 次 (50、40、40 mL), 每次 1.5 h。过滤后将滤液浓缩至小体积 (约 10 mL), 用乙酸乙酯萃取 4 次 (25、20、20、20 mL), 合并乙酸乙酯液, 减压回收溶剂, 残渣用甲醇-水 (体积比为 1:1) 超声使溶解, 并定容至 5 mL, 摇匀后, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为鸡血藤药材供试品溶液。

### 2.2 HPLC 分析条件的建立

2.2.1 检测波长选择 对原儿茶酸对照品溶液在 200 ~ 500 nm 波长范围进行紫外可见吸收光谱测定, 如图 1 所示, 原儿茶酸在 260 nm 波长处有最大吸收, 因此选用 260 nm 为检测波长。

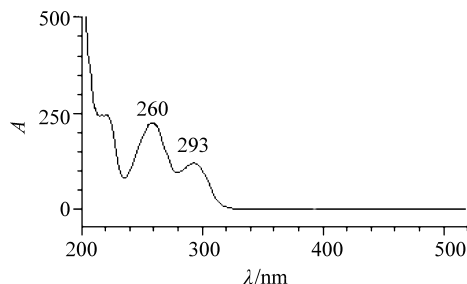


图 1 原儿茶酸对照品溶液紫外可见吸收光谱图  
Fig. 1 UV-Vis absorption spectrum of protocatechuic acid

2.2.2 流动相选择 常用的流动相系统为甲醇-水和乙腈-水系统。由于原儿茶酸是酸性化合物, 流动相加入  $\varphi = 0.5\%$  醋酸能改善色谱峰型。实验比较两者色谱系统对药材供试品溶液的分析情况可知, 选用乙腈- $\varphi = 0.5\%$  醋酸水系统的色谱峰型较好, 理论塔板数较甲醇- $\varphi = 0.5\%$  醋酸水系统高。通过调整流动相比例, 最终确定采用乙腈- $\varphi = 0.5\%$  醋酸水 (体积比为 1:9) 为流动相。在该流动相下, 药材供试品溶液中原儿茶酸峰与其他杂质峰能够达到完全分离, 色谱图基线平稳, 分离度、拖尾因子等色谱参数都能达到要求。

综上所述, 经过考察最终确定色谱条件为: 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈- $\varphi = 0.5\%$  醋酸水 (体积比为 1:9); 检测波长 260 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

### 2.3 供试品溶液制备方法的优化

2.3.1 提取溶剂的确定 同一批次样品, 分别采用水、乙酸乙酯、甲醇、乙醇、丙酮为提取溶剂,

按照 2.1.2 项下进行原儿茶酸含量的测定分析, 原儿茶酸质量分数 ( $w$ ) 分别为 41.64、2.99、34.87、29.71、19.36  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 结果表明以水为提取溶剂所得的原儿茶酸含量最高, 因此, 确定以水作为提取溶剂。

2.3.2 提取方法的确定 同一批次样品, 分别进行回流提取 (1.5 h, 3 次) 和超声提取 (30 min, 3 次), 按照 2.1.2 项下进行原儿茶酸的测定分析, 原儿茶酸质量分数 ( $w$ ) 分别为 53.24 和 107.94  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 结果表明以回流提取得到的原儿茶酸的含量较高, 故选择回流提取法作为鸡血藤药材中原儿茶酸含量测定的供试品溶液制备的提取方法。

2.3.3 提取次数的确定 对不同回流提取次数 (1, 2, 3, 4 次) 所得原儿茶酸的含量 ( $w$  分别为 51.22、79.21、106.89、107.78  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 进行比较, 回流提取 3 次与回流提取 4 次所得到的原儿茶酸的含量之间没有显著性差异, 但比提取 2 次的含量高。因此, 选择回流提取 3 次作为鸡血藤药材中原儿茶酸含量测定的供试品溶液制备的提取方法。

2.3.4 药材粒度的确定 对不同药材粒度 (10, 40, 60, 80 目) 所得原儿茶酸的含量 ( $w$  分别为 83.83、101.13、106.89、105.78  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 进行比较, 当药材粉碎至过 60 目筛的细粉所提得的原儿茶酸的含量最大, 药材粒径进一步缩小, 对原儿茶酸的提取率没有显著影响, 故选择将鸡血藤药材粉碎至过 60 目筛的细粉。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验 在 2.2 项下优化后的色谱条件下分析, 原儿茶酸色谱峰与相邻峰的分度大于 1.5, 理论塔板数按原儿茶酸峰计算应不低于 6 000, 色谱图见图 2。

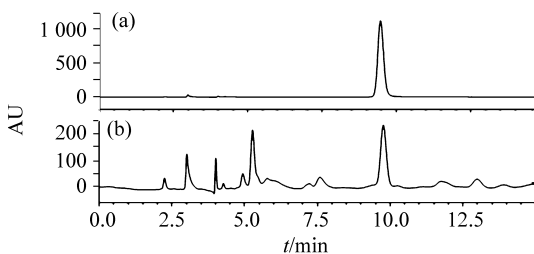


图 2 原儿茶酸对照品溶液 (a) 和鸡血藤药材供试品溶液 (b) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of protocatechuic acid of standard solution (a) and sample solution (b)

2.4.2 线性关系考察 精密量取 2.1.1 项下的原儿茶酸对照品储备液 0.2、0.5、1、3、5 mL 分别

置于 5 mL 容量瓶中, 分别加入甲醇-水 (体积比为 1:1) 稀释定容至刻度, 摇匀, 备用。分别将上述各浓度对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪分析, 并记录色谱图。以原儿茶酸对照品溶液浓度 ( $X$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与相应峰面积 ( $Y$ ) 作图, 进行线性回归, 得回归方程为  $Y = 74\,241 X - 46\,857$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。结果表明进样浓度在 8.56 ~ 214  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

2.4.3 检测限与定量限 取 2.1.1 项下对照品溶液, 用稀释法测定检测限及定量限。按  $S/N = 3$  计算, 原儿茶酸的检测限为 0.00132  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 按  $S/N = 10$  计算, 其定量限为 0.0066  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.4 精密度试验 将原儿茶酸对照品溶液重复进样 6 次, 结果测得原儿茶酸峰面积的 RSD 为 0.1%, 表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 将供试品溶液在室温下贮存, 分别于配制后第 0、1、2、4、8、12、24、36 h 进样分析 8 次, 测定原儿茶酸的峰面积。结果表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好, RSD 为 1.2%。

2.4.6 重复性试验 精密称取 6 份鸡血藤药材粉末 (过 60 目筛), 每份约 2 g, 按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液, 测定原儿茶酸的峰面积。结果测得原儿茶酸的平均含量为 106.92  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 为 1.0%, 显示方法具有良好的重复性。

2.4.7 加样回收试验 取约 1 g 已知原儿茶酸含量的鸡血藤药材粉末 9 份 (过 60 目筛), 精密称定后, 分别加入不同含量的原儿茶酸对照品, 制备 3 个不同浓度的样品, 每个浓度平行 3 份, 按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 1, 原儿茶酸的加样回收率为 99.2%, RSD 为 2.8%, 表明所建立的方法具有较高的准确性。

2.4.8 耐用性试验 精密称取鸡血藤药材粉末 2.0 g (过 60 目筛), 按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定。采用 3 根不同品牌的色谱柱分别进行分析, 平行测定 2 次。同一供试品溶液, 在 3 根不同品牌的色谱柱上进行分析所得结果的 RSD < 3%, 说明所建立的方法具有较好的耐用性。

## 2.5 不同批次鸡血藤药材中原儿茶酸的含量测定

精密称取 7 批鸡血藤药材粉末 (过 60 目筛) 各 2 g, 按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分析, 每份样品平行测定 2 次, 代入标准曲线计算原儿茶酸含量, 结果见表 2, 7 批药材的原儿茶酸质量分数为 65.81 ~ 122.35  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 1 加样回收率试验 ( $n=9$ )  
Table 1 Reproducibility test ( $n=9$ )

浓度等级	样品号	取样量 $m/g$	样品中原 有量 $m_{原}/\mu g$	加入标准品 质量 $m_{加}/\mu g$	测得标准品 质量 $m_{测}/\mu g$	加样 回收率/%	回收率 均值/%	RSD/ %
高(150%)	1	1.011 6	107.62	147.70	251.04	97.1	99.2	2.8
	2	1.013 6	107.84	147.70	251.81	97.5		
	3	1.012 1	107.68	147.70	252.05	97.7		
中(100%)	1	1.009 8	107.43	105.50	215.38	102.3		
	2	1.007 9	107.23	105.50	213.01	100.3		
	3	1.010 5	107.51	105.50	217.55	104.3		
低(50%)	1	1.014 1	107.89	52.75	160.76	100.2		
	2	1.018 4	108.35	52.75	159.13	96.3		
	3	1.006 8	107.11	52.75	158.55	97.5		

表 2 不同批次的鸡血藤药材中原儿茶酸的含量测定

Table 2 Contents of protocatechuic acid  
in Suberect Spatholobus Stem

药材批次	$w$ (原儿茶酸) / ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )
20110601	71.25 ± 0.97
20110701	65.81 ± 1.24
20110702	84.15 ± 1.62
20110801	122.35 ± 1.93
20110802	95.80 ± 1.41
20110302	106.31 ± 1.75
20120201	82.42 ± 1.06

### 3 讨论

1) 由表 2 可知, 所分析的 7 批鸡血藤药材虽然均产自广西, 但不同批次的药材, 由于具体生长环境、采收时间、干燥过程、贮藏条件等系列因素的不同, 其中的原儿茶酸的含量有较大的差异。

2) 为了提高鸡血藤药材的质量控制标准, 本研究经过对定量分析的样品前处理方法中的提取溶剂、提取方法、提取次数以及药材粒度等因素的考察, 并优化选定合适的色谱条件, 建立了高效液相色谱法测定鸡血藤药材中原儿茶酸含量的方法。在方法学考察过程中, 标准曲线、精密度试验、重复性试验、稳定性试验、加样回收率和耐用性试验等指标均符合中国药典对含量测定方法建立的规定要求, 表明所建立的方法具有较好的准确性和重现

性, 能有效地提取鸡血藤药材中的原儿茶酸, 用于实际样品的检测, 具有操作简便、线性范围宽、准确可靠等特点, 可为完善鸡血藤药材的质量控制方法提供重要参考。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 180.
- [2] 王筠默. 中药研究与临床应用[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2006: 390.
- [3] 李萍. 生药学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 271.
- [4] 张秀丽, 李亚晨, 牛新华, 等. 原儿茶酸对帕金森模型鼠脑组织抗氧化能力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(17): 3248-3251.
- [5] 刘厚佳, 胡晋红, 孙莲娜, 等. 原儿茶酸等化合物对 HBVDNA 转染人肝癌细胞株的作用[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(7): 661-663.
- [6] 饶曼人, 刘广余, 高长忠, 等. 原儿茶酸对缺血区心肌代谢及心肌梗塞范围的影响[J]. 中国药理学报, 1988, 9(1): 27-30.
- [7] 黄灿辉. HPLC 法测定不同产地鸡血藤中原儿茶酸的含量[J]. 中医药导报, 2009, 15(3): 83-84, 88.
- [8] 翟明, 刘军民, 安冉, 等. HPLC 法测定鸡血藤类药材中原儿茶酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 462-465.
- [9] 仰铁锤, 林振坤, 丁平, 等. 鸡血藤药材质量评价研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(23): 1765-1768.