

反相高效液相色谱法测定心脑血管康胶囊中表没食子儿茶素没食子酸酯含量

简洁¹, 梁钢^{2*} (1. 桂林医学院药理教研室, 广西 桂林 541004; 2. 广西医科大学药理教研室, 南宁 530021)

摘要:目的 建立测定心脑血管康胶囊的反相高效液相色谱法。方法 采用芬兰产 C_{18} 柱 ($\varnothing 5\mu\text{m}$, $4.6 \times 150\text{mm}$), $0.04\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸-N, N-二甲基甲酰胺-四氢呋喃 (55:8:2) 为流动相, 流速: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 280nm , 柱温: 35°C , 峰面积外标法定量。结果 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 在 $0.24 \sim 1.44\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好 ($r=0.9998$, $n=6$), 平均回收率为 ($100.63 \pm 1.88\%$, $n=5$), RSD 日内 0.48% , RSD 日间 1.87% 。结论 本法简便、灵敏、重现性好, 适合心脑血管康胶囊的含量测定和质量控制。

关键词:反相高效液相色谱法; 心脑血管康; 含量测定

基金项目: 广西科技厅科研基金资助课题, 项目编号: 桂科攻 0235024-3

作者简介: 简洁, 女, 34岁, 博士在读。研究方向: 心血管药理。E-mail: jianjielucky@yahoo.com.cn

* 通讯作者

Determination of the content of EGCG in Xinnao Shenkang by RP-HPLC

JIAN Jie¹, LIANG Gang^{2*} (1. Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 2. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simple method for the determination of the content of epigallocatechin gallate (EGCG) in Xinnao Shenkang (XNSK) by RP-HPLC. **METHODS** Used C_{18} chromatographic column ($\varnothing 5\mu\text{m}$, $4.6 \times 150\text{mm}$), $0.04\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ citric acid-*N,N*-dimethylformamide-THF (55:8:2) as mobile phase, and the detector wavelength was at 302nm. The EGCG content was determined with peak area by external reference method. **RESULTS** The line arrange was from 0.24 to $1.44\mu\text{g}$ ($r=0.9998$). The average recovery was $(100.63 \pm 1.88)\%$, The RSD of within-day was 0.48%, and that of between-day was 1.87%. The detection limit was $0.012\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, and feasible for the determination of EGCG content and quality control of XNSK.

KEY WORDS: RP-HPLC; Xinnao Shenkang (XNSK); assay

心脑血管康胶囊(Xinnao Shenkang, XNSK)由茶多酚(TP)、银杏提取物(EGb761)、三七总皂苷(PNS)、丹参素(DS)配伍而成(TP:EGb761:PNS:DS=4:1:1:2.5),动物实验证实其具改善脑肾功能、清除自由基、抗氧化、改善能量代谢、抑制血栓形成等作用^[1]。其中,TP含量为40%,作为XNSK中的主药和质量控制标准。TP主要包括儿茶素类、黄酮及黄酮醇类、花色素类、酚酸及缩酚酸类等四大类物质,以儿茶素类含量最多,占其总量的60%~80%,也是其众多药效的物质基础。茶多酚中含有的儿茶素类成分主要有^[2]:表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、(+)-儿茶素[(+)-catechin, DC]、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素(epicatechin, EC)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)和表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)等。EGCG在儿茶素中所占比例最多,且其还原电位最高,抗氧化能力最强。笔者以EGCG为指标进行含量测定,更能反映主药有效成分的实际含量。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Waters 1525 HPLC仪(美国沃特斯公司);芬兰产 C_{18} 柱($\varnothing 5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 150\text{mm}$)。

1.2 试剂与试药

EGCG对照品:美国Sigma公司,含量:95%。

XNSK胶囊:本课题组研制。组方中各活性提取物均购自成都华高天然药物有限公司,包括TP(纯度98%,其中EGCG占60%;批号:20031108)、EGb761(总黄酮:总内酯 $\geq 24:6$,批号20030710)、PNS(纯度90%,批号:20030911)、DS(3%针用提取物,批号:20030815)。各成分以4:1:1:2.5比例按常规方法制成胶囊。

甲醇(色谱纯);枸橼酸-*N,N*-二甲基甲酰胺-四氢呋喃(均为分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

流动相: $0.04\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸-*N,N*-二甲基甲酰胺-四氢呋喃(55:8:2)^[3],流速: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:280nm;柱温:35℃;进样量:5 μL 。在此色谱条件下,EGCG保留时间 $t_R=10.63\text{min}$,XNSK中其余三种成分对主药TP测定无干扰。

2.2 标准曲线制作

精密称取干燥至恒重的EGCG对照品适量,用50% MeOH配成 $0.12\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。

精密吸取标准溶液2,4,6,8,10,12 μL ,依次进样,按“1.1”色谱条件测定,以EGCG进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归处理,得线性方程: $Y=971706X-24710$, $r=0.9998$ ($n=6$)。

2.3 样品溶液制备

精密称取XNSK约0.1g,置棕色量瓶中,加入50mL 50% MeOH,超声处理20min,摇匀,放冷,用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后置棕色瓶中。

2.4 精密度试验

精密称取XNSK一份,按“2.3”法操作,滤液进样5 μL ,考察方法精密度(RSD_{日内})。

2.5 重复性试验

精密称取XNSK五份,按“2.3”法操作,滤液进样5 μL ,考察方法重复性(RSD_{日间})。

2.6 加样回收率试验

精密称取五份已知含量的XNSK适量(含TP约10mg),依“2.3”法操作。取滤液50 μL ,加入50 μL EGCG标准溶液,混匀,进样20 μL 测定,按公式:回收率=(测定量-样品中的量)添加标准品量 $\times 100\%$ 计算EGCG的平均回收率及RSD值。

精密度、重现性、加样回收率试验结果见表1。

2.7 样品测定

取XNSK胶囊10粒,精密称取内容物约0.1g,按2.3法操作,进样5 μL ,以外标法定量,并计算相当于标示量,结果见表2。

表 1 精密度、重复性、加样回收率试验结果 ($n=5$)

Tab 1 Precision, reproduction, recovery of the method ($n=5$)

Exponent	Precision	Reproduction	Recovery	
	Content/ μg	Content/ μg	Content/ μg	Recover rate/%
1	0.4128	0.4128	2.3569	99.74
2	0.4177	0.4206	2.3861	102.18
3	0.4143	0.4062	2.3388	98.23
4	0.4145	0.4115	2.3943	102.86
5	0.4129	0.4257	2.3614	100.12
RSD%	0.48	1.87	1.87	

表 2 表没食子儿茶素没食子酸酯样品含量测定 ($n=5$)

Tab 2 The analytical results of EGCG in samples ($n=5$)

Sample	EGCG/%
1	92.3
2	94.2
3	91.8
4	89.8
5	93.7

3 讨论

3.1 茶多酚中儿茶素类成分的含量较高,进行加样回收率实验时若直接在 XNSK 样品中加入相应量的对照品,消耗较

大,故本实验是在一定量的样品溶液中加入。由于样品液的制备仅仅是一种加溶剂溶解的过程,所以此操作也能反映测定方法的可靠性。

3.2 作者曾选用甲醇-水,乙腈-水及配比相应的醋酸和磷酸水溶液作流动相,均未得到满意效果。本实验选取的流动相可使 EGCG 得到较好分离,且重现性好、精密度高,可用于心脑血管康胶囊的含量测定和质量控制。

参考文献

- [1] JIAN J, LIANG G. Investigated headway of inartificial antioxidants on prevention and cure the heart and cerebral diseases [J]. Acta Med Sin(华夏医学), 2004, 17(1): 109-112.
- [2] He Bing, Chen Xiaoxia and Chen Yiyue. Protective effects of tea polyphenol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its scavenging oxy-radical and anticerebral lipid peroxidation effects [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学·英文版), 2002, 11(4): 157-161.
- [3] ZHANG S J, LIU L, YU J Y. Determination of catechin in Herbe Cynomorii by RP-HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2003, 38(8): 578-580.

收稿日期: 2006-03-30