

[质 量]

一测多评法测定心脑血管胶囊(片)中6种儿茶素

谢静¹, 韦杰¹, 周璐炜¹, 何金莲¹, 杜蕾蕾^{2*}

(1. 成都医学院, 四川 成都 610083; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 建立一测多评法测定心脑血管胶囊(片)(茶叶提取物)中6种儿茶素的含量。方法 该药物50%甲醇提取液的分析采用Shimadzu Wonda Cract ODS-2色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相0.5%乙酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 检测波长280 nm; 柱温35 ℃。以表没食子儿茶素没食子酸酯为内标, 计算表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯的相对校正因子, 测定其含量。结果 6种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9998$), 加样回收率96.00%~98.47%, RSD 2.09%~2.91%, 一测多评法所得结果接近于外标法。结论 该方法简便可靠, 可用于心脑血管胶囊(片)的质量控制。

关键词: 心脑血管胶囊(片); 表没食子儿茶素; 儿茶素; 表儿茶素; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 没食子儿茶素没食子酸酯; 表儿茶素没食子酸酯; 一测多评

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0523-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.016

Determination of six catechins in Xinnaojian Capsules (Tablets) by QAMS

XIE Jing¹, WEI Jie¹, ZHOU Lu-wei¹, HE Jin-lian¹, DU Lei-lei^{2*}

(1. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) method for the content determination of six catechins in Xinnaojian Capsules (Tablets) (tea extract). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Shimadzu Wonda Cract ODS-2 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 0.5% acetic acid (A) -acetonitrile (B) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. With epigallocatechin gallate as an internal standard, the relative correction factors of epigallocatechin, catechin, epicatechin, gallic acid gallate and epicatechin gallate were calculated, from which the content determination was made. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9998$), whose average recoveries were 96.00% - 98.47% with the RSDs of 2.09% - 2.91%. The results obtained by QAMS method approximated those obtained by external standard method. **CONCLUSION** This simple and reliable method can be used for the quality control of Xinnaojian Capsules (Tablets).

KEY WORDS: Xinnaojian Capsules (Tablets); epigallocatechin; catechin; epicatechin; epigallocatechin gallate; gallic acid gallate; epicatechin gallate; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS)

心脑血管胶囊(片)可用于治疗高血脂症、高血压病、冠心病、脑动脉硬化及其他伴有高凝状态

的疾病, 对心血管病伴高纤维蛋白原症及动脉粥样硬化, 以及肿瘤放、化疗所致的白细胞减少症也有

收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 国家自然科学基金(81503361); 四川省2015年大学生创新训练项目(201513705078); 四川省教育厅科研计划项目(16ZA0299)

作者简介: 谢静(1979—), 女, 博士, 讲师, 从事天然产物活性成分研究。Tel: (028) 62308658, E-mail: aggie-xj@163.com

*通信作者: 杜蕾蕾(1978—), 女, 博士, 助理研究员, 从事药物制剂质量标准研究。Tel: (028) 85224504, E-mail: 934534055@qq.com

防治作用。其现行质量标准均以紫外-可见分光光度法测定茶多酚的总含有量,作为质控指标^[1]。由于儿茶素是茶多酚的主要成分,具有广泛的生物活性^[2-3],是心脑血管胶囊(片)的重要药效物质,故最近有文献对其中一些成分的含有量进行了定量测定^[4-6],但由于茶多酚中主要含有表没食子儿茶素、表儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯6种成分,故现有的相关研究还不够全面。另外,在众多分析方法中^[7],主流的HPLC外标法需要所有待测对象的单体作为外标对照品,但由于儿茶素是以成对的光学异构体存在,分离纯化难度大,不易获得,而且价格较贵,导致该方法较少用于生产和检验的实际工作中。

近年来,开始受到关注的一测多评法可避免HPLC外标法的不足^[8]。它是利用中药有效成分之间的内在函数和比例关系,通过测定一种成分(对照品易得、价廉者)而实现多种成分(对照品难得、昂贵者)的同步测定,是适合中药特点的多指标质量评价模式^[9-11]。本实验将采用该方法,以含有量相对较高、便宜易得的表没食子儿茶素没食子酸酯为内标,同时测定心脑血管胶囊(片)中表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯含有量,以期更全面有效地控制该制剂的质量。

1 材料与试剂

1.1 仪器 KH5200B超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);GA110分析天平(美国Ohaus公司);KA0004731、KE0040836移液器(100~1000、10~100 μL);高效液相色谱系统,配置LC-20AD二元高压泵、DGU-20A3R自动脱气机、SIL-20A自动进样器、MSD-M20A二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

1.2 材料 心脑血管胶囊购自浙江花园药业有限公司(胶囊1)、杏辉天力(杭州)药业有限公司(胶囊2)、宁波立华制药有限公司(胶囊3)、浙江南洋药业有限公司(胶囊4)、上海世康特制药有限公司(胶囊5);心脑血管片购自浙江花园药业有限公司(片1)。表没食子儿茶素、表儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司。乙腈为色谱纯(美国Fisher公司);其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shimadzu Wonda Cract ODS-2色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相0.5%乙酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~40 min, 10%~30% B);体积流量1.0 mL/min;检测波长280 nm;柱温35℃。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,50%甲醇配成不同质量浓度的对照品贮备液(表没食子儿茶素6.2 mg/mL、儿茶素5.1 mg/mL、表儿茶素9.5 mg/mL、表没食子儿茶素没食子酸酯5.8 mg/mL、没食子儿茶素没食子酸酯4.9 mg/mL、表儿茶素没食子酸酯4.7 mg/mL),4℃冰箱中保存备用。将其以20:2:4:50:3:16比例混合,50%甲醇稀释10倍,得到混标工作溶液I,再用50%甲醇其分别稀释至75%、50%、25%、5%,得到混标工作溶液II~V。

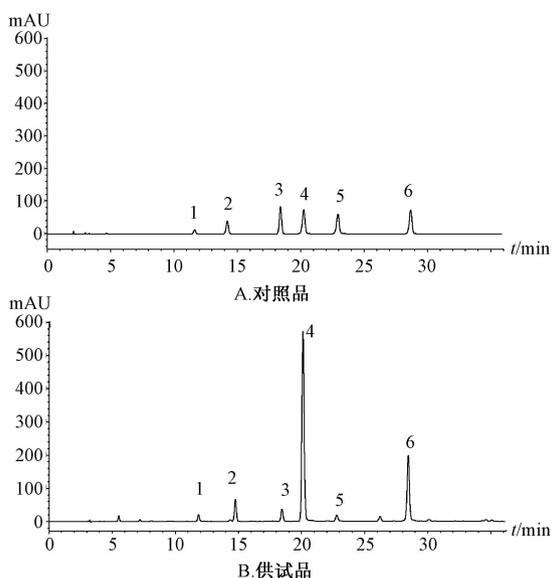
2.2.2 供试品溶液 将胶囊去掉胶囊壳后取出内容物,再将片剂粉碎。分别精密称取200 mg,置于25 mL量瓶中,50%甲醇超声提取15 min,静置至室温后50%甲醇定容,即得。

2.3 系统适用性考察 在“2.1”项色谱条件下,精密吸取“2.2”项下对照品、供试品溶液各10 μL,注入色谱仪中分析,结果见图1。由图可知,各成分色谱峰对称性良好,均达到基线分离,理论塔板数均大于10 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 在“2.1”项色谱条件下,吸取混标工作溶液I~V各10 μL,注入色谱仪,记录峰面积。以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到标准曲线分别为没食子儿茶素 $Y=1\,433\,515X-822$, $r=0.999\,8$ (0.006 5~0.130 5 mg/mL);儿茶素 $Y=4\,036\,738X+1\,369$, $r=0.999\,8$ (0.000 5~0.010 7 mg/mL);表儿茶素 $Y=12\,365\,713X-21\,708$, $r=0.999\,9$ (0.002 0~0.040 0 mg/mL);表没食子儿茶素没食子酸酯 $Y=7\,399\,901X+1\,751$, $r=0.999\,9$ (0.015 3~0.305 3 mg/mL);没食子儿茶素没食子酸酯 $Y=12\,255\,005X-1\,032$, $r=0.999\,8$ (0.000 8~0.015 5 mg/mL);表儿茶素没食子酸酯 $Y=15\,629\,836X-781$, $r=0.999\,9$ (0.004 0~0.079 2 mg/mL),在各自范围内均呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混标工作溶液II适量,在“2.1”项色谱条件下连续



1. 表没食子儿茶素 2. 儿茶素 3. 表儿茶素 4. 表没食子儿茶素没食子酸酯 5. 没食子儿茶素没食子酸酯 6. 表儿茶素没食子酸酯

1. epigallocatechin 2. catechin 3. epicatechin 4. epigallocatechin gallate 5. gallic acid catechin gallate 6. epicatechin gallate

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

测定5次,测得表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯峰面积RSD分别为0.61%、0.68%、0.52%、0.35%、0.56%、0.43%,表明仪器精密良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取“2.2.1”项下混标工作溶液Ⅱ适量,于0、3、6、9、12 h时在“2.1”项色谱条件下测定,测得表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯峰面积RSD分别为1.09%、0.77%、0.63%、1.38%、0.95%、1.26%,表明溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一样品粉末6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,测得没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯含有量RSD分别为2.01%、1.60%、1.75%、1.76%、2.03%、1.27%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取同一样品粉末6份,精密加入适量“2.2.1”项下对照品贮备

液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,计算回收率,结果见表1。

2.5 相对校正因子计算及耐用性验证 本实验选择 Shimadzu WondaCract ODS-2、Tianhe Kromasil C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈、Dalian Elite hypersil BDS C₁₈、Agilent Zorbax SB-aq C₁₈色谱柱进行试验,由于表没食子儿茶素没食子酸酯较易获得,价格低廉,而且在样品中的含有量也较高,故选择其作为内标峰,计算相对校正因子,结果见表2,可知该方法能满足定量分析要求。

2.6 一测多评法和内标法比较 取样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,计算6种成分的含有量,再采用外标法对其进行测定,并对两种方法所得结果加以比较,结果见表3。

为了对一测多评法结果的准确性进行评估,本实验借鉴指纹图谱相似度评价方法^[12],采用夹角余弦值评价外标法与一测多评法所得结果的相似度,以考察两者的差异程度。根据夹角余弦的统计学定义,两组数据的夹角余弦值越接近于1,其差异越小,相似度越高。本实验发现,两种方法所得结果的夹角余弦值在0.999 418~0.999 993之间,表明其相似度极高。

3 讨论

心脑血管胶囊(片)的处方是茶多酚提取物和制剂辅料,而前者是经过除杂步骤的高纯度原料,其主要成分是本实验所研究的6种儿茶素。经过色谱条件优化,参考文献[4],选择在280 nm波长处测定,此时所测成分的共轭体系较大,吸收较强;制剂辅料吸收很弱,干扰很小,从而使得样品HPLC色谱图较干净,没有大杂质峰干扰测定,有利于定量测定。

本实验采用一测多评法,以较易获得、价格低廉的表没食子儿茶素没食子酸酯为内标物,建立了其相对于表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯的相对校正因子,并对其适应性进行了考察,以实现多指标质量评价。同时,还比较该方法与内标法所得的结果,发现两者之间具有高度相似性。由此可知,一测多评法能有效控制心脑血管胶囊(片)的质量,适合企业、药监等单位的大量常规检测。

表1 加样回收率试验结果 (n=6)
Tab. 1 Results of recovery tests (n=6)

成分	称样量/mg	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
表没食子儿茶素	202.5	7.695	3.72	11.333	97.80	98.30 (2.09)
	201.3	7.649	3.72	11.328	98.90	
	199.4	7.577	7.44	15.159	101.90	
	196.8	7.478	7.44	14.628	96.10	
	198.7	7.551	10.54	17.743	96.70	
	199.1	7.566	10.54	17.979	98.80	
儿茶素	202.5	7.493	3.57	10.927	96.20	96.00 (2.89)
	201.3	7.448	3.57	11.015	99.90	
	199.4	7.378	7.14	14.675	102.20	
	196.8	7.282	7.14	14.193	96.80	
	198.7	7.352	10.71	17.537	95.10	
	199.1	7.367	10.71	17.627	95.80	
表儿茶素	202.5	2.228	0.95	3.161	98.23	98.47 (2.91)
	201.3	2.214	0.95	3.190	102.70	
	199.4	2.193	2.375	4.652	103.50	
	196.8	2.165	2.375	4.511	98.80	
	198.7	2.186	3.325	5.378	96.00	
	199.1	2.190	3.325	5.472	98.70	
表没食子儿茶素没食子酸酯	202.5	32.805	17.4	49.874	98.10	96.85 (2.76)
	201.3	32.611	17.4	50.150	100.80	
	199.4	32.303	34.8	67.868	102.20	
	196.8	31.882	34.8	65.708	97.20	
	198.7	32.189	52.2	82.249	95.90	
	199.1	32.254	52.2	82.158	95.60	
没食子儿茶素没食子酸酯	202.5	1.499	0.735	2.228	99.30	98.24 (2.46)
	201.3	1.490	0.735	2.244	102.60	
	199.4	1.476	1.47	2.981	102.40	
	196.8	1.456	1.47	2.954	101.90	
	198.7	1.470	2.205	3.627	97.80	
	199.1	1.473	2.205	3.616	97.19	
表儿茶素没食子酸酯	202.5	13.365	6.58	19.879	99.00	97.30 (2.50)
	201.3	13.286	6.58	19.938	101.10	
	199.4	13.160	13.16	26.478	101.20	
	196.8	12.989	13.16	26.083	99.50	
	198.7	13.114	19.74	32.065	96.00	
	199.1	13.141	19.74	32.012	95.60	

表2 相对校正因子
Tab. 2 Relative correlation factors

色谱柱	表没食子儿茶素	儿茶素	表儿茶素	表没食子儿茶素	没食子儿茶素	表儿茶素没
				没食子酸酯	没食子酸酯	食子酸酯
Shimadzu Wonda Cract ODS-2	0.54	0.35	0.41	1	0.89	0.60
Tianhe Kromasil C ₁₈	0.55	0.36	0.42	1	0.90	0.61
Phenomenex Luna C ₁₈	0.54	0.36	0.41	1	0.90	0.61
Dalian Elite hypersil BDS C ₁₈	0.52	0.36	0.40	1	0.88	0.59
Agilent Zorbax SB-aq C ₁₈	0.56	0.38	0.43	1	0.91	0.62
平均值	0.54	0.37	0.41	—	0.90	0.61
RSD/%	2.80	2.92	3.06	—	1.46	2.26

表3 一测多评法和外标法所得结果比较 (%)

Tab. 3 Comparison of results obtained by QAMS method and external standard method (%)

样品	表没食子儿茶素没食子酸酯		表没食子儿茶素		儿茶素		表儿茶素		没食子儿茶素没食子酸酯		表儿茶素没食子酸酯	
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
片1	16.24	3.60	3.77	3.65	3.80	1.15	1.13	0.77	0.74	6.55	6.67	
胶囊1	16.20	3.62	3.80	3.57	3.70	1.14	1.11	0.77	0.74	6.56	6.66	
胶囊2	15.87	3.10	3.28	3.82	3.95	1.09	1.05	1.30	1.26	6.81	6.94	
胶囊3	19.52	1.46	1.55	0.48	0.53	0.71	0.65	2.16	2.08	6.24	6.31	
胶囊4	17.63	0.87	0.97	1.24	1.25	0.29	0.23	0.61	0.57	5.10	5.19	
胶囊5	14.45	2.25	2.38	2.21	2.38	0.68	0.62	0.45	0.41	3.19	3.28	
夹角余弦值	—	0.999 959		0.999 904		0.999 418		0.999 937		0.999 993		

心脑血管胶囊规格为每粒含茶叶提取物 0.1 g (以茶多酚计), 本实验发现, 不同厂家之间生产的样品中儿茶素含有量有所差异, 这一方面可能是与厂家所选用的茶多酚原料有关; 另一方面, 由于儿茶素在一定条件下会发生构型转化、降解、氧化等现象^[13], 不同厂家生产工艺的差异也可能使其相对含有量差异较大。因此, 为了稳定心脑血管胶囊(片)的质量, 建议采用 HPLC 法测定其所含的茶多酚成分, 并规定 6 种儿茶素含有量的最低限度和总儿茶素含有量范围, 从而确保其疗效。

参考文献:

[1] 于泳, 司马哲超. 心脑血管片紫外分光光度计法的分析方法验证[J]. 机电信息, 2015, 431(5): 33-39.
 [2] 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: 自然科学版, 2012, 27(4): 60-64.
 [3] 武煜, 顾振纶. 茶多酚的药理学作用及其机制研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(6): 722-725.
 [4] 崔慧芳, 桑旭峰, 朱蓉, 等. 心脑血管胶囊的特征图谱研究及 6 个指标成分含量测定[J]. 中药材, 2015, 38(11): 2394-2398.
 [5] 戴其昌. 心脑血管胶囊的高效液相色谱法测定[J]. 中国现代

应用药学, 1998, 15(5): 45-47.
 [6] 路飏, 彭咏梅. HPLC 法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.
 [7] 袁和军, 邱明丰. 茶多酚检测方法综述[J]. 北方药学, 2013, 10(11): 11.
 [8] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
 [9] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.
 [10] 游正琴, 罗奕, 吴琳琳, 等. 一测多评法测定咽立爽口含滴丸中的 4 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1180-1183.
 [11] Kuang G J, Zhou J, Yao M C, et al. Systematic study on QAMS method for simultaneous determination of triterpenoid saponins in *Ilex pubescens* by HPLC and UPLC[J]. *Anal Methods*, 2015, 7(16): 6579-6587.
 [12] Qing L S, Xue Y, Deng W L, et al. Ligand fishing with functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for herbal medicine analysis: ligand fishing for herbal medicine analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(3): 1223-1231.
 [13] Fan F Y, Shi M, Nie M, et al. Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic oligomers[J]. *Food Chem*, 2016, 196: 347-354.