

# RP-HPLC测定中药赤小豆中儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷的含量

穆合塔尔·卡德尔哈孜<sup>1</sup>, 王海涛<sup>2</sup>, 屠鹏飞<sup>1</sup>, 姜勇<sup>1\*</sup> (1. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 2. 中国人民解放军第306医院药学部, 北京 100101)

**摘要:** 目的 建立测定中药赤小豆中儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷含量的高效液相色谱法, 为中药赤小豆质量标准的制定提供依据。方法 采用体积分数 50% 甲醇超声提取, 以 Grace Prevail<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> Column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为固定相, 乙腈-水 (6:94) 为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 230 nm。结果 色谱峰分离度良好, 线性范围为 0.04 ~ 1.00 mg·mL<sup>-1</sup>, 平均加样回收率为 101.2%。结论 本方法操作简单、准确度高、重现性好, 可用于赤小豆药材的质量控制。

**关键词:** 赤小豆; 儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)10-0778-03

## RP-HPLC Determination of Catechin-7-*O*-β-*D*-Glucopyranoside in *Vigna Semen*

KADEERHAZIM uetaer<sup>1</sup>, WANG Hai-ao<sup>2</sup>, TU Peng-fei<sup>1</sup>, JIANG Yong<sup>1\*</sup> (1. State Key Laboratory of Natural and Bio-mimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Department of Pharmacy, The 306<sup>th</sup> Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

**ABSTRACT:** **OBJECTIVE** To establish a HPLC method for the determination of catechin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside in *Vigna Semen*. **METHODS** The analysis was carried out on a Grace Prevail<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 °C, using acetonitrile and water (isocratic elution, 6:94) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 230 nm. **RESULTS** The standard curve was linear in the range of 0.04 ~ 1.00 mg·mL<sup>-1</sup>, and the correlation coefficient was 0.9997. The average recovery was 101.2% (*n* = 6). **CONCLUSION** This established method is accurate, reliable, reproducible, and can be used to control the quality of *Vigna Semen*.

**KEY WORDS** *Vigna Semen*; catechin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside; HPLC; content determination

赤小豆为豆科豇豆属植物赤小豆 (*Vigna umbellata* Ohwi et Ohashi) 或赤豆 (*Vigna angularis* Ohwi et Ohashi) 的干燥成熟种子, 味甘酸, 性平, 无毒。具有利水消肿, 解毒排脓的功效, 临床上常用于水肿胀满, 脚气肢肿, 黄疸尿赤, 风湿热痹, 痈疮疖毒, 肠痈腹痛等症状<sup>[1]</sup>。除药用外, 赤小豆作为食品也被广泛应用, 亦被称作“饭豆”, 用于制作豆饭、八宝粥、红豆沙、豆粉等食品<sup>[2]</sup>。但是关于赤小豆的质量分析, 国内尚未见文献报道, 2010年版《中国药典》也只是进行了性状和纤维鉴别, 难以有效保证药材的质量<sup>[1]</sup>。国外学者通过对该属植物的化学分析发现, 黄酮和皂苷类化合物是该属植物的主要化学成分类型<sup>[3-5]</sup>。本课题组前期对赤小豆的化学成分研究结果也证实了这点, 并且发现儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷为其主要成分之一。因此, 为有效控制赤小豆的质量, 本实验利用高效液相色谱, 建立了赤

小豆中儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷的测定方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent1100高效液相色谱仪; 二极管阵列检测器, 四元低压梯度泵, 真空脱气机, 柱温箱, 自动进样器; 数据处理机: Agilent1100色谱工作站 (Agilent公司); 万分之一电子分析天平 (BS 110S 美国 Sartorius); 十万分之一电子分析天平 (BP 211D 美国 Sartorius); 超声波清洗器。

儿茶素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷对照品为本实验室自制, 纯度经 HPLC 分析大于 98%。甲醇为分析纯; 乙腈为色谱纯; 自制重蒸水。

收集了不同产地共计 26 批赤小豆药材。经本室屠鹏飞教授鉴定为豆科植物赤小豆 (*Vigna umbellata* Ohwi et Ohashi) 或赤豆 (*Vigna angularis* Ohwi et Ohashi) 的干燥成熟种子。样品信息见表 1。

基金项目: “重大新药创制专项”——中药新药发现与评价技术平台 (2009ZX09311-004); 教育部新世纪优秀人才计划 (985-2-102-113)

作者简介: 穆合塔尔·卡德尔哈孜, 男, 硕士研究生 研究方向: 中药质量评价 \* 通讯作者: 姜勇, 女, 副教授 研究方向: 天然活性成分及新药研究 Tel: (010) 82802719 E-mail: yongjiang@bjnu.edu.cn

表 1 样品信息及儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量测定结果. n = 2

Tab 1 Sample information and the content determination results of catechin-7-O-β-D-glucopyranoside n = 2

| No | Purchasing area      | Habitat          | Source              | Content/% |
|----|----------------------|------------------|---------------------|-----------|
| 1  | Beijing              | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.143     |
| 2  | Beijing              | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.159     |
| 3  | Beijing              | Hebei            | <i>V. umbellata</i> | 0.124     |
| 4  | Beijing              | Hebei            | <i>V. umbellata</i> | 0.147     |
| 5  | Beijing              | Guangdong        | <i>V. angularis</i> | 0.200     |
| 6  | Beijing              | Anhui            | <i>V. angularis</i> | 0.087     |
| 7  | Hebei                | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.141     |
| 8  | Beijing              | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.137     |
| 9  | Liaoning shenyang    | Liaoning heishan | <i>V. angularis</i> | 0.104     |
| 10 | Shandong bingzhou    | Shandong         | <i>V. angularis</i> | 0.109     |
| 11 | Hebei xingtang       | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.124     |
| 12 | Shandong shizhao     | Shandong         | <i>V. angularis</i> | 0.143     |
| 13 | Hubei shiyan         | Hubei            | <i>V. angularis</i> | 0.153     |
| 14 | Heilongjiang haerbin | Heilongjiang     | <i>V. angularis</i> | 0.106     |
| 15 | Zhejiang jinhua      | zhejiang         | <i>V. umbellata</i> | 0.126     |
| 16 | Shanghai             | Heilongjiang     | <i>V. angularis</i> | 0.115     |
| 17 | Shenzhen             | Guangdong        | <i>V. angularis</i> | 0.107     |
| 18 | Anhui                | Anhui            | <i>V. umbellata</i> | 0.172     |
| 19 | Heilongjiang         | Heilongjiang     | <i>V. umbellata</i> | 0.107     |
| 20 | Jilin                | Jilin            | <i>V. umbellata</i> | 0.112     |
| 21 | Beijing              | Beijing          | <i>V. angularis</i> | 0.104     |
| 22 | Anhui                | Anhui bozhou     | <i>V. angularis</i> | 0.139     |
| 23 | Anhui                | Anhui bozhou     | <i>V. umbellata</i> | 0.124     |
| 24 | Guangdong shenzhen   | Guangdong        | <i>V. umbellata</i> | 0.135     |
| 25 | Hebei anguo          | Hebei            | <i>V. umbellata</i> | 0.126     |
| 26 | Hebei anguo          | Hebei            | <i>V. angularis</i> | 0.119     |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Grace Prevail<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> Column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相为乙腈-水(6:94), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30℃, 检测波长 230 nm, 进样量 10 μL。在上述条件下, 赤小豆中儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷保留时间为 19.1 min, 分离度良好(图 1)。

2.2 溶液配制

对照品溶液: 精密称取儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品适量, 加体积分数 50% 甲醇制成每 1 mL 含儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 150 μg 的溶液, 即得。

供试品溶液: 取 1.0 g 样品粉末(过 40 目筛), 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密量取 10 mL 体积分数 50% 甲醇, 称定重量, 超声提取 1 h, 放冷, 用体积分数 50% 甲醇补足重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

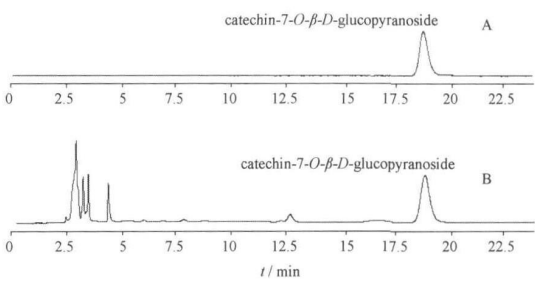


图 1 儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品(A)及赤小豆样品(B)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC Chromatograms of the reference substance of catechin-7-O-β-D-glucopyranoside(A) and the crude drug sample of Vigna Sesame(B)

2.3 线性关系考察

取儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品储备液 1.00 mg·mL<sup>-1</sup>, 分别稀释 2.5、10、12.5、25 倍, 依次进样, 以对照品浓度 ρ 对色谱峰峰面积 Y 做标准曲线, 得回归方程为 Y = 12.944ρ - 85.759, r = 0.9997 (n = 6)。线性范围为 0.04 ~ 1.00 mg·mL<sup>-1</sup>。

2.4 精密度实验

取供试品溶液, 连续进样 6 次, 以儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的峰面积为指标, RSD 为 1.47%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性实验

取同一批赤小豆药材粉末 6 份, 按“2.2”制备方法进行制备, 平行测定, 以儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量为指标, RSD 为 2.07%, 表明方法重复性良好。

2.6 稳定性实验

取供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 结果儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷峰面积的 RSD 为 1.52%, 说明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.7 回收率实验

取已知含量的赤小豆药材粉末 6 份各 0.5 g 精密称定, 加入儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品溶液适量, 按“2.2”制备方法制备, 并按含量测定方法进行测定, 结果表明, 儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷回收率为 101.21%, RSD 为 3.03%, 说明方法准确度较高。

2.8 不同产地样品含量的测定

分别称取不同产地的药材粉末, 按“2.2”的制备方法操作, 分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得(表 1)。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱柱的选择

分别考察了 Waters Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Grace Prevail™ C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent Extend-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3种型号的色谱柱。不同的色谱柱其差别主要在色谱峰的保留时间上,而在峰形、峰面积上均无明显区别,但由于本实验所采用流动相为含水量较大的流动相,常用反相色谱柱在长期使用的情况下对色谱柱的耗损较严重,故最后采用更能耐水,填料不易耗损的 Grace Prevail™ C<sub>18</sub>色谱柱。

#### 3.2 检测波长的选择

儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷最大吸收波长为 203 nm 附近,另外,在 230 nm 附近有个肩峰。笔者比较了赤小豆样品在上述 3 个波长处的检测情况,发现 203 和 230 nm 处的吸收强度明显高于 280 nm 处的吸收,但 203 nm 由于处于 UV 检测器的末端吸收波长处,受干扰的因素较多,易引起基线的波动,因此综合考虑选择了 230 nm 作为检测波长。

#### 3.3 流动相的选择

考察了甲醇-水、甲醇-磷酸水、乙腈-水、乙腈-磷酸水 4 种流动相系统,结果表明,乙腈-水、乙腈-磷酸水系统与甲醇-水、甲醇-磷酸水系统相比基线噪音更小,且色谱峰保留时间更短,最终确定流动相为乙腈-水。另外,由于赤小豆药材中含有多种不同极性的化合物,在本实验报道的色谱条件下,很多极性稍小的一些化合物不被洗脱,被吸附在色谱柱上,对下一次的分析工作带来较大的影响。因此,建议在每针进样的时候,除了样品的测定,再增加一个采用高浓度有机溶剂进行洗柱的过程。通过摸索,确定了洗脱梯度如下: 0~ 20 min 乙腈-水 (6: 94), 20~ 22 min 从乙腈-水 (6: 94) 变化到乙腈-水 (100: 0), 22~ 27 min 用纯乙腈洗柱, 27~ 30 min 从乙腈-水

(100: 0) 变化到乙腈-水 (6: 94), 30~ 35 min 保持乙腈-水 (6: 94)。

#### 3.4 药材的提取方法

考察了超声和回流两种提取方法,结果表明,二者之间提取效率相近,故选择更易操作的超声提取法。通过比较体积分数 30%、50%、70% 和 100% 甲醇溶液的提取效果,发现体积分数 50% 甲醇溶液提取效率最高,故确定以体积分数 50% 甲醇为提取溶剂。另外,分别考察了 10、15、20 mL 3 种不同的提取溶剂用量,结果表明,溶剂用量对测定结果影响不大,故以 10 mL 为提取溶剂用量。关于提取时间,分别考察了 0.5、1、1.5、2 h 4 种不同的提取时间,发现除提取 0.5 h 的样品提取效率较低外,其余 3 个时间的提取效率相当,因此,确定样品的提取时间为 1 h。

#### 3.5 不同基原赤小豆药材有效成分的含量比较

中药赤小豆有两种基原植物,分别是赤小豆 (*V. umbellata*) 和赤豆 (*V. angularis*)。根据现有的数据分析结果,发现赤豆和赤小豆样品中含有的儿茶素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的量相当,赤豆为 0.13% ( $n=17$ ),赤小豆为 0.13% ( $n=9$ )。这种指标性成分含量的一致性为它们临床的等同使用提供了一定依据。

### REFERENCES

- [1] Ch. P (2010) Vol 1 (中国药典 2010 年版,一部) [S]. 2010: 147.
- [2] LIU Y K. Edible crude drug and medicated diet [J]. *New J Tradit Chin Med* (新中医), 1996, 26(10): 10-12.
- [3] KHALIL A H, EL-ADAWY T A. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes [J]. *Food Chem*, 1994, 50(2): 197-201.
- [4] ONYIA LAGHA J C, ISLAM S, NTAMATUNGIRO S. Comparative phytochemistry of eleven species of Vigna (Fabaceae) [J]. *Birchm. Syst Ecol*, 2009, 37(1): 16-19.
- [5] PRATIS BARAVELLIV, FABBRID, et al. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(4): 491-501.

(收稿日期: 2010-11-23)

## 《中国药学杂志》2011 年专栏征稿通知

为提高《中国药学杂志》稿件的学术水平,为广大学药工作者提供一个展示的舞台,经《中国药学杂志》主编扩大会讨论通过,本刊 2011 年将组织如下专栏。

①儿科药物的研发与应用;②围孕期和妊娠期用药及安全性评价;③糖尿病治疗药物研发与应用的新进展;④调血脂创新药物的研发与应用;⑤抗肝炎病毒药物的研发与应用;⑥岛津杯药物分析优秀论文获奖论文选登。

具体征文内容及刊登时间敬请关注中国药学杂志网站 [www.zgyxzz.com.cn](http://www.zgyxzz.com.cn) 及《中国药学杂志》各期发表的征文通知。

[本刊讯]