

值得引起重视。

REFERENCES

- [1] SARANJIT S, BHAGWAT P, AKASH A, *et al.* Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs [J]. *Trends Anal Chem*, 2009, 28(1): 13-28.
- [2] CONNIE M G, JOHN C R, JOHN F, *et al.* Detection of undeclared dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(3): 601-606.
- [3] BLOK-TIP L, ZOMER B, BAKKER F, *et al.* Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products [J]. *Food Addit Contam*, 2004, 21(8): 737-748.
- [4] GAO Q, ZHANG Z, GUO H Z, *et al.* Study on PDE₅ inhibitors and its unknown derivatives in traditional Chinese medicine and health food discovered [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43(2): 142-145.
- [5] GEA X W, LOW M Y, ZOU P, *et al.* Structural elucidation of a PDE-5 inhibitor detected as an adulterant in a health supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(4): 1070-1075.
- [6] JOHN C R, JEFFREY T W. Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(4): 887-893.
- [7] ZOU P, HOU P L, SHARON S Y, *et al.* Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(2): 279-284.
- [8] ZOU P, SHARON S Y, HOU P L, *et al.* Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr*, 2006, 1104(1-2): 113-122.
- [9] <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm206791.htm> (Accessed on: 18.10.2010).
- [10] National drug standards (国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法和检验项目批准件) [S]. 2009.
- [11] VENHUIS B J, ZOMER G, HAMZINK M, *et al.* The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: a Viagra with a pop [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(4): 735-741.
- [12] WANG W T, ZHAO Z Y, HE X Y, *et al.* Aildenafil on erectile function [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2005, 19(3): 220-225.

(收稿日期: 2011-04-20)

高效液相色谱法测定跌打活血散中儿茶素和表儿茶素的含量

刘刚, 谭生建*, 王海涛, 赵淼, 胡琴 (中国人民解放军第306医院药学部, 北京 100101)

摘要: 目的 建立跌打活血散中儿茶素和表儿茶素的含量测定方法。方法 高效液相色谱法, 采用 Prevail Select C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 35 °C; 以乙腈-水-磷酸 (100:900:1) 为流动相; 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长 278 nm。结果 儿茶素线性范围为 30.08 ~ 150.4 μg · mL⁻¹, *r* = 0.999 9; 表儿茶素线性范围为 12.24 ~ 61.20 μg · mL⁻¹, *r* = 0.999 9; 儿茶素和表儿茶素的回收率分别为 98.4% 和 96.5%, RSD 分别为 0.92% 和 1.3%。结论 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于跌打活血散中儿茶素和表儿茶素的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 跌打活血散; 儿茶素; 表儿茶素

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)18-1444-03

Determination of Catechin and Epicatechin in Dieda Huoxue San by High Performance Liquid Chromatography

LIU Gang, TAN Sheng-jian*, WANG Hai-tao, ZHAO Miao, HU Qin (Department of Pharmacy, Hospital 306 of PLA Beijing 100101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining catechin and epicatechin in Dieda Huoxue San. **METHODS** High performance liquid chromatography was used for determining the contents of catechin and epicatechin. The chromatography column was Prevail Select C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and the column temperature was 35 °C. The mobile phase was acetonitrile-water-phosphoric acid (100:900:1) with a flow rate of 1 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 278 nm. **RESULTS** The linear range of

作者简介: 刘刚, 男, 副主任药师 研究方向: 医院药学 * 通讯作者: 谭生建, 男, 主任药师 研究方向: 药物分析 Tel: (010) 66356172 E-mail: tansj163@163.com

catechin was $30.08 - 150.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9999$). The average recovery of catechin was 98.4% and RSD was 0.92%. The linear range of epicatechin was $12.24 - 61.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9999$). The average recovery of epicatechin was 96.5% and RSD was 1.3%. **CONCLUSION** This method is simple, time-saving and accurate. It can be used for routine analysis of catechin and epicatechin in Dried Huoxue San.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; Dried Huoxue San; catechin; epicatechin

跌打活血散收载于 2010 年版《中国药典》,由红花、当归、血竭、儿茶、大黄等 12 味中药加工制成,质量标准中没有含量测定项目。大黄中含有儿茶素^[1],儿茶中含有儿茶和表儿茶素,是跌打活血散中的活性成分。儿茶中儿茶和表儿茶素的含量测定方法 2010 年版《中国药典》有收载^[2],某些含儿茶制剂中的儿茶和表儿茶素的含量测定方法报道有高效液相色谱测定法^[3-4],跌打活血散中儿茶和表儿茶素的含量测定方法未见报道。本实验建立了高效液相色谱法测定跌打活血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 (Agilent 1200 系列) 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 (安捷伦公司)。儿茶素对照品 (批号 877-200001) 和表儿茶素对照品 (批号 110878-200102) (中国药品生物制品检定所)。跌打活血散 (批号: 20110323-1, 20110323-2, 20110323-3) 本院制剂室制备。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试液制备

2.1.1 混合对照品溶液 取儿茶素对照品、表儿茶素对照品, 精密称定, 分别加体积分数 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得儿茶素对照品溶液 ($225.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和表儿茶素对照品溶液 ($183.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。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 (含儿茶素 $150.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 含表儿茶素 $61.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.1.2 供试品溶液 取跌打活血散约 290 mg (约相当于儿茶素和大黄各 20 mg), 精密称定, 置 100 mL 具塞磨口锥形瓶中, 精密加入体积分数 50% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声 (500 W, 50 Hz) 处理 30 min, 擦干, 放冷, 再称定重量, 用体积分数 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性供试品溶液 按跌打活血散处方及工艺制备不含儿茶素和大黄的阴性样品, 取阴性样品约 250 mg (约相当于儿茶素和大黄各 20 mg), 置 100 mL 具塞磨口锥形瓶中, 精密加入体积分数 50% 甲醇 50 mL, 按照“2.1.2”项下方法操作, 即得。

2.2 专属性

色谱柱: Prevail Select C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 以乙腈-水-磷酸 (100:900:1) 为流动相; 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 278 nm。在上述色谱条件下, 取混合对照品溶液、阴性供试品溶液和供试品溶液各 10 μL , 分别进样, 记录色谱图, 见图 1。图 1 显示, 跌打活血散中儿茶素和大黄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; 与相邻峰的分离度均大于 1.5; 儿茶素和表儿茶素理论板数分别约为 5 000 和 6 000。

2.3 线性关系

精密量取混合对照品溶液 (含儿茶素 $150.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表儿茶素 $61.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 μL 进样, 记录色谱峰面积; 精密量取该混合对照品溶液 2, 4, 6 和 8 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加体积分数 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为儿茶素 30.08、60.16、90.24 和 120.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表儿茶素 12.24、24.48、36.72、48.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。分别精密量取 10 μL 进样, 记录色谱峰面积, 以进样质量浓度 ($Y, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对峰面积 (X) 线性回归, 儿茶素回归方程 $Y = 0.1501X + 0.3368$,

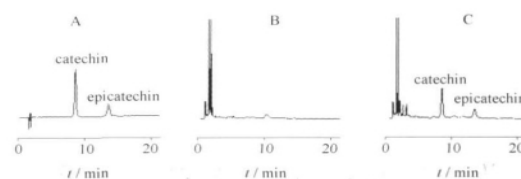


图 1 儿茶素和表儿茶素对照品和样品色谱图

A - 混合对照品; B - 阴性供试品; C - 供试品

Fig. 1 HPLC Chromatograms of catechin and epicatechin reference substances and samples

A - reference substance; B - sample negative Ercha and Dahuang; C - sample Dried Huoxue San

$r = 0.999\ 9$; 线性范围: $30.08 \sim 150.4\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 表儿茶素回归方程 $Y = 0.171\ 5X + 1.232$ $r = 0.999\ 9$; 线性范围: $12.24 \sim 61.20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 定量限

取混合对照品溶液用体积分数 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约为 0.005 和 0.007 μg 。

2.5 重复性

精密量取“2.1.1”项下的混合对照品溶液 10 μL 进样, 连续进样 5 次, 儿茶素和表儿茶素色谱峰面积的 RSD 分别为 0.11% 和 0.34%, 表明对照品溶液连续进样重复性符合要求。

2.6 精密度

取同一样品(批号 20110323-1), 按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 测定含量。儿茶素和表儿茶素含量平均值分别为 6.212 和 3.022 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 0.40% 和 1.4%, 表明样品重复测定精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性

配制供试品溶液, 分别在配制后 0、1、3、22、23、24 h 重复进样测定 6 次, 儿茶素和表儿茶素色谱峰面积的 RSD 分别为 0.24% 和 1.4%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率

取已知含量的跌打活血散(批号 20110323-3, 含儿茶素 5.949 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 含表儿茶素 2.899 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 6 份, 每份约 290 mg, 精密称定, 分别精密加入儿茶素对照品溶液(每 1 mL 含儿茶素 86.25 μg) 20 mL、表儿茶素对照品溶液 5 mL(每 1 mL 含表儿茶素 183.6 μg) 和体积分数 50% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声(500 W, 50 Hz) 处理 30 min, 擦干, 放冷, 再称定重量, 用体积分数 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 按照含量测定方法测定并计算回收率。儿茶素和表儿茶素的回收率分别为

98.4% 和 96.5%, RSD 分别为 0.92% 和 1.3%。

2.9 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跌打活血散供试品溶液。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 批跌打活血散的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 本实验参考有关文献^[2-4] 中儿茶素和表儿茶素含量测定方法, 采用体积分数 50% 甲醇为溶剂, 超声(500 W, 50 Hz) 处理 30 min 提取, 实验证明可行。

3.2 在线光谱显示儿茶素和表儿茶最大吸收波长均在 278 nm 左右, 故确定 278 nm 作为检测波长。

表 1 跌打活血散含量测定结果. $n = 2$

Tab. 1 Results of Dieda Huxue san sample determination. $n = 2$

Lot No	Catechin/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	Epicatechin/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
20110323-1	6.212	3.022
20110323-2	6.210	3.117
20110323-3	5.949	2.899

REFERENCES

[1] LI J L, WANG A Q, WU Z Z. Studies on Non2anthraquinones in Rheum of ficinale Baill [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2000, 25 (10): 612-614.
[2] *Ch. P*(2010) Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 9-10.
[3] TAN S J, LIU G, ZHANG F *et al.* Determination of catechin epicatechin and baicalin in Chahuang Ding by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28 (9): 64-66.
[4] RUAN G P, YUAN X J. Simultaneous determination of catechin and berberine hydrochloride in zhuhuang chuihou powder by HPLC [J]. *Tradit Chin Drug Res Clinical Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2010, 21(3): 296-298.

(收稿日期: 2011-04-02)

关于收取稿件处理费的通知

本刊来稿收取稿件处理费, 每篇 50 元, 请作者在寄发稿件的同时将处理费通过邮局寄汇本刊(请勿在稿件中夹带现金), 收款地址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室《中国药理学杂志》编辑部, 邮编: 100022。
汇款单位上请注明论文题目及第一作者姓名。 [本刊讯]