

黑面神枝叶中表儿茶素的含量测定及水提工艺优化

王英晶, 彭伟文*, 梅全喜, 曾聪彦, 戴卫波, 吴飞
(广州中医药大学附属中山市中医院, 广东 中山 528400)

[摘要] 目的:测定黑面神枝叶中表儿茶素含量并优化水提取工艺条件。方法:采用 HPLC 法测定黑面神枝叶中表儿茶素含量,并运用正交试验考察浸泡时间、加水量、提取时间和提取次数对表儿茶素含量的影响。结果:表儿茶素在 0.006 6 ~ 0.264 0 g·L⁻¹线性关系良好,回归方程 $Y = 59\,283X + 53.986$, $r = 0.999\,9$, 平均回收率达 98.2%, RSD 1.03%。水提最佳工艺条件:药材加 20 倍量水浸泡 45 min, 80 ℃温浸提取 2 次,每次 1 h。结论:HPLC 法测定黑面神枝叶中表儿茶素含量操作简便,专属性强,经正交试验优化后含量有所提高,为黑面神的进一步开发奠定基础。

[关键词] 黑面神; 表儿茶素; 正交试验

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090093

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000062.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:43

Quantitative Determination and Orthogonal Test of Water Extraction
Conditions for Epicatechin in Leaves of *Breynia fruticosa*

WANG Ying-jing, PENG Wei-wen*, MEI Quan-xi, ZENG Cong-yan, DAI Wei-bo, WU fei
(Zhongshan Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method and optimize the water extraction conditions for Epicatechin in leaves of *Breynia fruticosa*. **Method:** The content of Epicatechin in leaves of *Breynia fruticosa* was determined by using HPLC. Permeating time, ratio of solid to liquid, extraction time and extraction times for the affection of water extraction rate of Epicatechin in leaves of *Breynia fruticosa* were detected by the orthogonal test. **Result:** The linear range of Epicatechin was 0.006 6-0.264 0 g·L⁻¹, the standard curve of Epicatechin was as follows $Y = 59\,283X + 53.986$, $r = 0.999\,9$, the average recovery of Epicatechin was 98.2% with RSD 1.03%. The optimal water extraction technics were as follows: ratio of solid to liquid at 1:20 (w/v) and permeating for 45 minutes, 80 ℃ extraction 2 times and 1 hour for each time. **Conclusion:** HPLC method for determination of Epicatechin in leaves of *Breynia fruticosa* is simple and selective. The content of Epicatechin was higher after orthogonal test, which can be used for the development of *Breynia fruticosa*.

[Key words] *Breynia fruticosa*; epicatechin; orthogonal test

黑面神为大戟科黑面神属植物 *Breynia fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶, 又名狗脚利, 鬼画符。主要分布于广东、广西等地, 具清湿热、化痰滞之功效。黑面神用于皮炎、湿疹、皮肤瘙痒等多种皮肤病的治疗; 在广东和广西地区以黑面神合剂入药用于治疗慢性支气管炎, 疗效显著; 此外, 黑面神还作为

[收稿日期] 20130810(003)

[基金项目] 广东省中医局项目(2010073); 广东省中山市科技局项目(20102A033)

[第一作者] 王英晶, 在读研究生, 从事中药制剂开发与研究, Tel:13422806862, E-mail:wangyingjingsxpy@163.com

[通讯作者] * 彭伟文, 主任中药师, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂开发与研究, Tel:0760-88815106, E-mail:pw200688@21cn.com

湛江蛇药的一种重要成分治疗毒蛇咬伤^[1]。文献报道黑面神主要含有三萜类、黄酮类、酚类和鞣质等成分^[2]。浮光苗等人从黑面神嫩枝叶中分离鉴定了表儿茶素^[3],但未见其含量测定及提取优化方面的报道。为有效开发利用这一植物资源,本实验首次采用 HPLC 法对黑面神枝叶中表儿茶素含量进行测定^[4-7],并运用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化其水提取条件,现报道如下。

1 材料

1100 型高效液相色谱仪 (Agilent), 包括四元泵、在线脱气机、手动进样器、DAD 检测器; BS224S 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ3200E 型医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HH-S₄ 型数显恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂)。

黑面神枝叶购自广州至信药业有限公司,经广州中医药大学药鉴定教研室黄海波教授鉴定为大戟科黑面神属植物 *Breynia fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶;表儿茶素对照品 (中国药品生物制品检定所,批号 110878-200102)。水为屈臣氏蒸馏水;甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯。

2 方法与结果

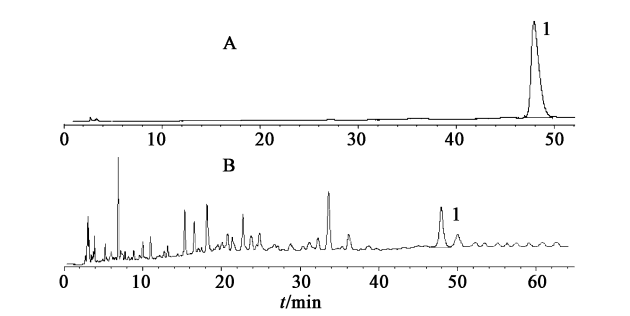
2.1 黑面神枝叶中表儿茶素含量测定

2.1.1 色谱条件 Boston Green ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液,梯度洗脱 (程序见表 1), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。在此条件下黑面神枝叶供试品溶液中表儿茶素峰与相邻峰能达到基线分离,其保留时间为 47.932 min。理论塔板数按表儿茶素计算不低于 3 600。对照品与供试品溶液的色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序		
t/min	甲醇/%	0.1% 磷酸溶液/%
0	5	95
15	15	85
35	18	82
60	23	77
65	5	95

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取表儿茶素对照品 6.6 mg,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.66 mg 的溶液,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取药材粗粉约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 烧瓶中,精密加入水 25 mL,称定质量,80 ℃ 温浸提取 1 h,放冷,再称定质量,用水



A. 对照品;B. 样品;1. 表儿茶素

图 1 黑面神枝叶 HPLC

补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取 2.1.3 中对照品溶液 0.1,0.2,0.5,1,2,4 mL 置 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,在 2.1.1 条件下进样分析。以进样浓度 (g · L⁻¹) 为横坐标 (X),以峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 59\,283X + 53.986$ ($r = 0.999\,9$)。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一浓度的对照品溶液,在 2.1.1 条件下连续进样 6 次,测得表儿茶素含量,结果显示 RSD 0.67%。

2.1.6 稳定性试验 取黑面神枝叶粗粉约 1.0 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法进行处理,分别于 0,2,4,8,16,24 h 在 2.1.1 条件下进样分析,测得表儿茶素含量,结果显示 RSD 1.03%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取黑面神枝叶粗粉约 1.0 g,6 份,精密称定,按供试品溶液的制备方法进行处理,在 2.1.1 条件下进样分析,测得表儿茶素含量,结果显示 RSD 1.27%。

2.1.8 加样回收率试验 称取已测知含量的黑面神枝叶粗粉约 0.5 g,6 份,精密称定,分 2 组,分别精密加入表儿茶素对照品 0.350 mg 和 0.715 mg,按供试品溶液的制备方法进行处理,在 2.1.1 条件下进样分析,结果显示平均回收率达 98.2%,RSD 1.03%,见表 2。表明表儿茶素加样回收率试验良好,符合定量分析要求。

2.2 正交试验

2.2.1 水提工艺条件 为提高黑面神枝叶中表儿茶素的水提得率,运用 $L_9(3^4)$ 正交试验,对浸泡时间、加水量、提取时间和提取次数进行考察,因素水平见表 3。取黑面神枝叶粗粉约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,按表 3 进行提取,按供试品溶液的制备方法进行处理,在 2.1.1 条件下进样分析,测定表儿茶素含量,结果见表 4,5。

表 2 黑面神枝叶中表儿茶素加样回收率试验						
称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.502 5	0.350 5	0.350	0.697 5	99.1	98.2	1.03
0.503 1	0.356 2	0.350	0.700 4	98.3		
0.501 5	0.348 2	0.350	0.693 0	98.5		
0.502 4	0.350 1	0.715	1.062 2	99.6		
0.501 6	0.342 5	0.715	1.036 5	97.1		
0.502 3	0.353 2	0.715	1.043 1	96.5		

表 3 黑面神枝叶水提工艺优选因素和水平				
水平	A 浸泡时间 /min	B 加水量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取次数 /次
1	15	20	0.5	1
2	30	25	1.0	2
3	45	30	1.5	3

表 4 黑面神枝叶水提工艺优选正交试验安排及直观分析					
试验号	A	B	C	D	表儿茶素 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.655 2
2	1	2	2	2	0.622 5
3	1	3	3	3	0.382 8
4	2	1	2	3	0.676 7
5	2	2	3	1	0.452 6
6	2	3	1	2	0.688 1
7	3	1	3	2	0.702 9
8	3	2	1	3	0.572 6
9	3	3	2	1	0.682 2
K ₁	0.554	0.678	0.639	0.597	
K ₂	0.606	0.549	0.660	0.671	
K ₃	0.653	0.584	0.513	0.544	
R	0.099	0.129	0.147	0.127	

表 5 表儿茶素方差分析				
因素	SS	f	F	P
A	0.015	2	1	>0.05
B	0.027	2	1.8	>0.05
C	0.038	2	2.533	>0.05
D	0.024	2	1.6	>0.05
误差	0.01	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, P < 0.05$ 。

2.2.2 试验结果分析 从直观分析结果看出各考察因素对表儿茶素含量的影响次序为 $C > B > D > A$,以极差最小的 A 因素浸泡时间作为误差项,加水量、提取时间和提取次数对表儿茶素含量的影响均

无显著性差异。由 K 值优选的提取工艺路线为 $A_3B_1C_2D_2$,即药材加 20 倍量水浸泡 45 min,80 ℃ 温浸提取 2 次,每次 1 h。

2.3 样品含量测定 取 3 批黑面神枝叶粗粉约 1.0 g,精密称定,按优选工艺进行提取,在 2.1.1 条件下进样分析,测定表儿茶素含量。不同批次的黑面神枝叶中表儿茶素含量分别为 0.703,0.703,0.704 mg·g⁻¹。

3 讨论

3.1 样品提取方法的选择^[8] 实验过程中比较了温浸提取法和超声法(功率 250 W,频率 20 kHz)对黑面神枝叶中表儿茶素含量的影响。结果显示,温浸提取法得率较超声法高。此外,分别于 40,60,80,100 ℃ 下进行提取,结果显示,80 ℃ 提取时表儿茶素含量最高。故选择 80 ℃ 温浸提取法作为样品的提取方法。

3.2 检测波长的选择^[8] 取 0.066 g·L⁻¹表儿茶素对照品溶液于 200~800 nm 扫描,显示在 230 nm 处有最大吸收。《中国药典》2010 年版,对儿茶中儿茶素和表儿茶素含量测定的检测波长为 280 nm。本实验过程中比较了 230 nm 和 280 nm 下供试品溶液的 HPLC 图,发现在波长为 230 nm 处表儿茶素峰面积大,且峰型较好,故选用 230 nm 为检测波长。

3.3 流动相的选择^[9-10] 曾选用甲醇-乙腈-0.1% 磷酸溶液(18:7:75)为流动相,黑面神枝叶供试品中表儿茶素出峰时间为 9.5 min,但因药材成分多为中高极性,出峰时间太快导致基线漂移严重,且与相邻峰的分离度不好,故不采用此流动相。后调整乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相,药材中表儿茶素峰分离度亦不佳。最终调整流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱后分离度明显改善,且峰型较好,故选用甲醇-0.1% 磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱。

目前,黑面神仅在《中国药典》2010 年版附录 25 中收载:鬼画符为大戟科植物黑面神 *Breynia fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥全株。本文首次研究了黑面神枝叶中表儿茶素的含量测定及水提取工艺条件,为其质量标准的建立及更好地控制药材质量提供依据。

[参考文献]

[1] 《广东中药志》编辑委员会. 广东中药志. 第一卷 [M]. 广州:广东科技出版社,1990:362.
[2] Hiroyuki M, Ryoji K, Hideaki O, et al. Terpenic and phenolic glycosides from leaves of *Breynia officinalis* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52:1086.

鬼箭羽总黄酮含量测定方法的建立

党晓芳,曹飒丽,祁娟娟,张慧,张晋,付京,陈杨,倪健*
(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:建立鬼箭羽总黄酮的含量测定方法并筛选其提取方法。方法:以芦丁为对照品,通过单因素试验优选显色方法和显色条件,建立总黄酮含量测定的方法学考察并优选其提取方法。结果:采用盐酸-镁粉反应比色法,芦丁在 0.020 ~ 0.104 mg 与吸光度呈良好线性关系($r=0.997$),平均加样回收率 99.424% (RSD 2.220%)。结论:盐酸-镁粉显色法具有精密度高、重复性好等优势,适用于鬼箭羽总黄酮的定量分析。鬼箭羽总黄酮的提取宜采用回流法。

[关键词] 鬼箭羽;总黄酮;显色条件;单因素试验;方法学考察;提取方式

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0096-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.20140900096

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000070.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:52

Optimization of Determination for Total Flavonoids in *Euonymus alatus*

DANG Xiao-fang, CAO Sa-li, QI Juan-juan, ZHANG Hui, ZHANG Jin, FU Jing, CHEN Yang, NI Jian*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of the content of total flavonoids in *Euonymus alatus*. **Method:** Selecting rutin as a reference substance, single factor tests were adopted to optimize colorimetry methods and conditions, determination of the content of total flavonoids was established and optimized its extraction method. **Result:** Hydrochloric acid-Mg reaction assay was adopted, rutin had a liner relationship with absorbance in the range of 0.021-0.104 mg ($r=0.997$), average recovery was 99.424% with RSD of 2.220%. **Conclusion:** HCl-Mg colorimetry method appeared to be an accurate, reliable and repeatable system for determination of total flavonoids in *E. alatus*. Total flavonoids in *E. alatus* should employ reflux extraction method.

[收稿日期] 20130829(012)

[基金项目] 北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CX70-13)

[第一作者] 党晓芳,在读硕士,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:18810481585,E-mail:yangmuju@163.com

[通讯作者] *倪健,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:010-84738607,E-mail:njtem@263.net

[3]

FU Guang-miao, YU Bo-yang, ZHU Dan-ni. Study on Chemical Constituents from *Breynia fruticosa* [J]. J China Pharmaceutical University, 2004, 35(2):114.

[4]

张臻.金荞麦中表儿茶素提取工艺的研究[J].中国医药咨讯,2011,3(21):34.

[5]

吴昭璇,唐勇琛.贵州野生和栽培钩藤药材中表儿茶素的含量测定[J].华夏医学,2011,24(1):16.

[6]

辛敏通,杨滨,李化,等.高效液相色谱-电化学检测法测定金荞麦饮片中表儿茶素的含量[J].中国中药杂志,2006,31(2):117.

[7]

何美珊,钱炳辉,王兆龙,等.HPLC 法测定金荞麦中

(-)-表儿茶素含量[J].中草药,2005,36(3):441.

[8]

杨君,宋纯清,陈明,等.大叶钩藤中表儿茶素含量的测定[J].中草药,2000,31(9):662.

[9]

边宝林,王宏洁,司南.鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(6):31.

[10]

刘利娥,李红萍,吴予明,等.反相高效液相色谱法测定青英中表儿茶素含量[J].郑州大学学报:医学版,2010,45(1):132.

[责任编辑 顾雪竹]