

# HPLC 同时测定花生衣中 4 种成分含量的方法研究

胡碧辉

宁波市奉化区中医院, 浙江 宁波 315500

**[摘要]** 目的: 建立花生衣中儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的含量测定方法。方法: 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.3%磷酸梯度洗脱; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL; 检测波长 278 nm。结果: 儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯分别在 0.155~1.162 μg、0.156~1.168 μg、0.161~1.204 μg 和 0.151~1.128 μg 范围内线性关系良好, 回归方程分别为  $Y=5.367 \times 10^5 X + 1.231 \times 10^4$ ,  $r=0.999 7$ ;  $Y=5.639 \times 10^5 X + 1.475 \times 10^4$ ,  $r=0.999 5$ ;  $Y=6.151 \times 10^5 X + 4.007 \times 10^3$ ,  $r=0.999 6$ ;  $Y=4.874 \times 10^5 X + 3.277 \times 10^4$ ,  $r=0.999 6$ 。平均加样回收率分别为 98.3% (RSD=1.2%)、97.6% (RSD=1.7%)、98.0% (RSD=1.0%) 和 98.2% (RSD=1.3%)。结论: 本研究建立的方法简便、高效、快速、准确性高、重复性好, 可用于花生衣的质量控制。

**[关键词]** 花生衣; HPLC; 含量测定; 儿茶素; 原花青素 B2; 表儿茶素; 表儿茶素没食子酸酯

**[中图分类号]** R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 05-0015-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.05.004

## Study of Simultaneous Determination Methods of the Content of Four Components in Peanut Skin by HPLC

HU Bihui

**Abstract:** Objective: To establish determination methods of the content of catechin, procyanidin B2, epicatechin and epicatechin gallate in peanut skin. **Methods:** Adopted the Kromasil C<sub>18</sub> chromatographic column (250 × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric acid with gradient elution. The flow velocity was 0.7 mL/min. The column temperature was 30℃. The injection volume was 10 μL. The detection wavelength was 278 nm. **Results:** The catechin, procyanidin B2, epicatechin and epicatechin gallate respectively had good linearity in the ranges of 0.155~1.162 μg, 0.156~1.168 μg, 0.161~1.204 μg and 0.151~1.128 μg. The regression equation respectively was  $Y=5.367 \times 10^5 X + 1.231 \times 10^4$ ,  $r=0.999 7$ ;  $Y=5.639 \times 10^5 X + 1.475 \times 10^4$ ,  $r=0.999 5$ ;  $Y=6.151 \times 10^5 X + 4.007 \times 10^3$ ,  $r=0.999 6$ ;  $Y=4.874 \times 10^5 X + 3.277 \times 10^4$ ,  $r=0.999 6$ . The average recovery respectively was 98.3% (RSD=1.2%), 97.6% (RSD=1.7%), 98.0% (RSD=1.0%), and 98.2% (RSD=1.3%). **Conclusion:** The method established in the study is simple, efficient and rapid with high accuracy and good reproducibility, which can be used for the quality control of peanut skin.

**Keywords:** Peanut skin; HPLC; Content determination; Catechin; Procyanidin B2; Epicatechin; Epicatechin gallate

花生衣又称为花生皮, 是花生种子外表面的红色(或黑色)种皮, 具有止血、散瘀、消肿等功效, 在临床上被广泛应用。现代研究发现, 花生衣的抗氧化性是花生仁的 50 多倍<sup>[1]</sup>, 对超氧阴离子、羟自由基有不同程度的清除作用, 对脂质过氧化有明显的抑制作用<sup>[2]</sup>, 而花生衣发挥抗氧化的物质是其中所含的多酚类物质(原花青素)、低聚原花青素(以原花青素 B2 为

代表)、以及单体酚(以儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯为代表), 约占花生衣重量的 15%<sup>[3]</sup>。低聚体及单体酚的抗氧化活性高于多聚体, 因此低聚体及单体酚的含量可以作为衡量花生衣质量的重要指标。花生衣已经成为多酚类抗氧化物质的主要供应原料之一<sup>[4]</sup>, 对于作为抗氧化剂提取原料的花生衣, 其酚类物质的含量至关重要, 尤其是低聚体及单体, 多酚类

**[收稿日期]** 2017-11-29

**[作者简介]** 胡碧辉 (1975-), 男, 副主任中医师, 研究方向: 中药饮片的鉴定、成分分析。

含量测定一般采用紫外可见分光光度计法测定,如Folin-C法、Bate-Smith法、Porter法、香兰素法等<sup>[9]</sup>;低聚体和单体的含量一般采用HPLC法。本实验拟对花生衣低聚体及单体的HPLC测定方法进行研究。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** LC-2030型高效液相色谱仪,包括PDA检测器、Lab-solution工作站(日本岛津公司);AF240型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);CQX25-06型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。

**1.2 试剂** 对照品儿茶素(批号:110877-201604)、表儿茶素(批号:110878-200102)、表儿茶素没食子酸酯(批号:111987-201501)均购自中国食品药品检定研究院(供含量测定用);对照品原花青素B2(上海哈灵生物科技有限公司,批号:HLZB0957,供含量测定用);乙腈、磷酸均为色谱纯(Dikma公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯;花生衣购自浙江省宁波市鄞州医药药材有限公司,经浙江省金华市职业技术学院医学院中药专业陈坚波副教授鉴定为豆科植物落花生 *Arachis hypogaea* L.的干燥种皮。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[6-8]</sup> Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.3%磷酸,梯度洗脱(见表1);流速0.7 mL/min;柱温30℃;检测波长278 nm;进样量10 μL。

表1 梯度条件

时间/min	0	50	65	66	85
乙腈	10%	20%	60%	10%	10%
0.3%磷酸	90%	80%	40%	90%	90%

### 2.2 溶液的配制

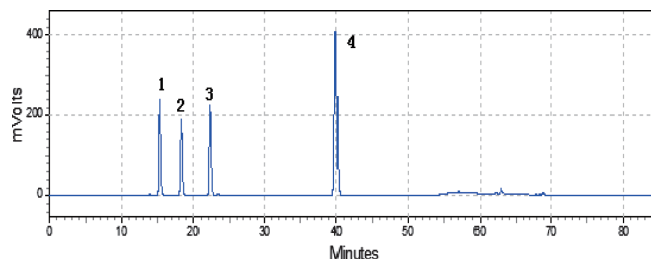
**2.2.1 混合对照品溶液的配制** 分别取儿茶素、原花青素B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯对照品适量,精密称定,加溶解液[乙腈-0.3%磷酸(9:1)]溶解并制成每1 mL含儿茶素387.4 μg、原花青素B2 389.5 μg、表儿茶素401.6 μg、表儿茶素没食子酸酯376.3 μg的混合溶液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

**2.2.2 供试品溶液的配制**<sup>[9]</sup> 取过80目筛的花生衣样品粉末约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入溶解液[乙腈-0.3%磷酸(9:1)]50 mL,密塞,称定重量。超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用溶解液[乙腈-0.3%磷酸(9:1)]

补足失重,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

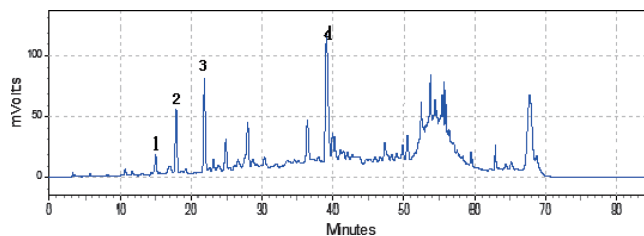
### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适应性试验** 见图1~2。精密吸取2.2.1项下的混合对照品溶液、2.2.2项下的供试品溶液各10 μL,注入高效液相色谱仪中,依照2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱图。供试品色谱图中,儿茶素、原花青素B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的保留时间与相应对照品色谱图一致。



1~4 分别为: 儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯

图1 混合对照品 HPLC 色谱图



注: 1.儿茶素; 2.原花青素 B2; 3.表儿茶素; 4.表儿茶素没食子酸酯

图2 供试品 HPLC 色谱图

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取2.2.1项下混合对照品溶液,分别进样4、6、10、15、20、30 μL,依照2.1项下色谱条件进行测定。以进样量(μg)为横坐标(X),以对应峰面积为纵坐标(Y),分别绘制儿茶素、原花青素B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的标准曲线,求得回归方程依次为: $Y=5.367 \times 10^5 X + 1.231 \times 10^4$ ,  $r=0.9997$ ;  $Y=5.639 \times 10^5 X + 1.475 \times 10^4$ ,  $r=0.9995$ ;  $Y=6.151 \times 10^5 X + 4.007 \times 10^3$ ,  $r=0.9996$ ;  $Y=4.874 \times 10^5 X + 3.277 \times 10^4$ ,  $r=0.9996$ 。上述结果表明儿茶素、原花青素B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯分别在0.155~1.162 μg、0.156~1.168 μg、0.161~1.204 μg和0.151~1.128 μg范围内具有良好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 取2.2.1项下混合对照品溶液,

依照 2.1 项下色谱条件先后重复测定 6 次。结果儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯峰面积的 RSD 分别为 1.1%、0.93%、0.84%和 1.3%，结果表明仪器具有较好的精密度。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批花生衣样品 6 份，分别依照 2.2.2 项下方法制得供试品溶液，依照 2.1 项下色谱条件进行测定。结果花生衣中儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的平均含量分别为 1.96、3.83、5.08、8.29 mg/g，RSD 分别为 2.1%、1.8%、1.8%和 1.5%，结果表明本测定方法具有良好的重复性。

**2.3.5 稳定性试验** 取 2.3.4 项下的 1 份供试品溶液，分别于配制后的 2、4、6、8、10 h 测定儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的峰面积。结果儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的峰面积的 RSD 分别为 2.3%、2.3%、2.0%和 1.9%，结果表明供试品溶液在配制后的 10 h 内稳定性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 见表 2。取已知检测物质含量(儿茶素 1.96 mg/g、原花青素 B2 3.83 mg/g、表儿茶素 5.08 mg/g、表儿茶素没食子酸酯 8.29 mg/g)的花生衣粉末(过 80 目筛)约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入混合对照品溶液(儿茶素 99.4 μg/mL、原花青素 B2 194.2 μg/mL、表儿茶素 259.7 μg/mL、表儿茶素没食子酸酯 406.5 μg/mL)20 mL 和溶解液[乙腈 -0.3%磷酸(9:1)]30 mL，密塞，称定重量，其余依照 2.2.2 项下方法操作，平行制得供试品溶液 6 份，依照 2.1 项下色谱条件进行测定，计算加样回收率。

**2.4 样品含量测定** 见表 3。取不同批次花生衣样品各 3 份，依照 2.2.2 项下供试品溶液制备方法制得供试品溶液，依照 2.1 项下色谱条件进行测定，采用外标一点法计算含量。

### 3 讨论

花生衣虽然尚未载入《中国药典》，但目前已被收入《全国中草药汇编》，可以作为药食两用原料。当前花生衣的收集利用不够充分，花生在榨取花生油前需剥除花生衣，大众在食用花生仁时，也有撮掉花生衣的习惯，大量的花生衣被废弃，造成严重的资源浪费<sup>[9]</sup>。随着研究的深入，越来越多的人意识到花生衣的重要性，希望更多的花生衣被作为中药应用，或者作为多酚类抗氧化物质的来源用于提取多酚提取

表 2 加样回收率试验 (n=6)

成分	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)			
儿茶素	1.965 1	1.988	3.939 6	99.32	98.3	1.2			
	2.074 5	1.988	4.035 4	98.64					
	1.949 8	1.988	3.865 8	96.38					
	2.165 0	1.988	4.103 3	97.50					
	2.036 6	1.988	4.009 9	99.26					
	1.945 7	1.988	3.902 5	98.43					
	3.840 0	3.884	7.657 2	98.28					
	4.053 7	3.884	7.829 3	97.21					
原花青素 B2	3.810 1	3.884	7.587 7	97.26	97.6	1.7			
	4.230 6	3.884	7.982 2	96.59					
	3.979 8	3.884	7.839 7	99.38					
	3.802 0	3.884	7.574 6	97.13					
	5.093 2	5.194	10.235 3	99.00					
	5.376 7	5.194	10.492 8	98.50					
	5.053 6	5.194	10.053 3	96.26					
	5.611 4	5.194	10.696 3	97.90					
表儿茶素	5.278 6	5.194	10.410 3	98.80	98.0	1.0			
	5.042 9	5.194	10.112 3	97.60					
	8.311 6	8.130	16.350 3	98.88					
	8.774 1	8.130	16.762 2	98.25					
	表儿茶素没食 子酸酯	8.246 9	8.130	16.122 8			96.87	98.2	1.3
		9.157 1	8.130	17.196 4			98.88		
		8.614 1	8.130	16.716 6			99.66		
		8.229 5	8.130	16.074 4			96.49		

表 3 不同批次花生衣中 4 种成分的含量 (n=3)

批号	儿茶素	原花青素 B2	表儿茶素	表儿茶素没食子酸酯	总和
170901	1.95	3.80	5.11	8.27	19.13
170902	2.96	2.75	3.75	7.43	16.89
170903	1.87	4.88	3.65	5.04	15.44

物，用于食品、保健品或者作为添加剂用于饲料中。

儿茶素、原花青素 B2、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯在 203 nm 和 278 nm 处有最大吸收，鉴于 203 nm 为近紫外波长，多数杂质成分在此波长处均有吸收，会导致干扰峰增多，进而降低测试的专属性和准确度，因此本研究选择 278 nm 为检测波长。为缩短分析时间，提高分析效率，本研究采取梯度洗脱方式，在目标峰显示完全后，增大乙腈的比例，提高洗脱溶剂的洗脱能力。为提高目标峰和杂质峰的分度，本研究将洗脱速度降为 0.7 mL/min。

从本研究收集的 3 批花生衣测试结果来看，4 种

成分中,儿茶素的含量相对较低,表儿茶素没食子酸的含量相对较高,4种成分之和占花生衣重量的1.5%~1.9%。

本研究建立的方法能同时对花生衣中4种成分进行含量测定,具有简便快速的优点,数据表明所建立的方法具准确性高、重复性好的优点。

#### [参考文献]

- [1] 亦森. 花生皮生理活性功能[J]. 粮食与油脂, 2001(4): 44-45.
- [2] 张红梅, 金征宇, 朱立贤, 等. 花生衣红抗氧化活性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 83-87.
- [3] Constanza KE, White BL, Davis JP, et al. Value-added processing of peanut skins: antioxidant capacity, total phenolics, and procyanidin content of spray-dried extracts[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(43): 10776-10783.
- [4] 欧阳燕林, 王锋, 谭兴和, 等. 原花色素的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(4): 1-4.
- [5] 任虹, 张乃元, 李梦媛, 等. 食品中原花青素含量分析方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 745-752.
- [6] 陈晓静, 何杰, 杨建云, 等. RP-HPLC法同时测定葡萄籽提取物中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 723-727.
- [7] 王航, 汤承, 岳华. 高效液相色谱法测定金荞麦超微粉原花青素 B2 含量[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(9): 222-224.
- [8] 谢静, 韦杰, 周璐炜, 等. 一测多评法测定心脑血管胶囊(片)中6种儿茶素[J]. 中成药, 2017, 39(3): 523-527.
- [9] 裴云逸, 陆星星, 武翠芳, 等. 花生衣中原花青素及多酚物质含量分析研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17): 143-147.
- [10] 严丹, 赵重博, 解达帅, 等. 花生衣开发利用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(20): 51-54.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

## 培土生金法对肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病模型大鼠血清 Ghrelin、Obestatin 及相关指标的影响

孙杰<sup>1,2</sup>, 桑凯<sup>1</sup>, 王东晓<sup>1</sup>, 张旭辉<sup>1,2</sup>, 马泉<sup>1</sup>, 柳志清<sup>1</sup>

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730020

**[摘要]** 目的: 观察培土生金法代表方参苓白术散干预作用下肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)模型大鼠血清生长激素释放肽(Ghrelin)、肥胖抑制素(Obestatin)、瘦素及炎症因子的含量变化, 探究培土生金法治疗 COPD 的作用机制, 为该治法临床防治 COPD 提供理论依据。方法: 60 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、药物干预组(根据药物干预时间的不同, 分为参苓白术散 28 天、35 天、42 天组), 每组 12 只。除空白组外, 模型组及药物干预组大鼠给予烟熏+气管内注射脂多糖+灌服冰冷的番泻叶浸液建立肺脾两虚型 COPD 大鼠模型。药物干预组给予参苓白术散灌胃治疗, 分别于药物干预第 28 天、35 天、42 天测定各组大鼠肺功能并取血处死, 用 ELISA 法检测各组大鼠血清 Ghrelin、Obestatin、瘦素及白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量变化。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠呼吸频率 F 值升高, 肺容量指标(TV)、流量指标 EF50、肺动态顺应性 Cdyn 均明显降低( $P < 0.05$ ); 血清 Ghrelin、Obestatin 含量明显降低( $P < 0.05$ ), IL-1、TNF- $\alpha$ 、瘦素含量明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 药物干预组各时间点大鼠 F 值下降, TV、EF50、Cdyn 值明显升高( $P < 0.05$ ), 血清 Ghrelin、Obestatin 含量不同程度升高( $P < 0.05$ ), 血清 IL-1、TNF- $\alpha$ 、瘦素含量明显下降( $P < 0.05$ )。与参苓白术散 28 天组比较, 参苓白术散 42 天组 F 值、TNF- $\alpha$  下降, Cdyn、Obestatin 含量升高( $P < 0.05$ )。结论: 培土生金法可改善肺脾两虚型 COPD 大鼠营养不良状况, 改善其肺功能, 延缓 COPD 发展进程, 其机制可能是上调其血清 Ghrelin、Obestatin 的表达和下调其

**[收稿日期]** 2017-10-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360539)

**[作者简介]** 孙杰(1972-), 男, 主任医师, 研究方向: 中西医结合呼吸病教学与临床。