

HPCE法测定通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量^{*}

李伟东, 蔡宝昌^{**}

(南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029)

摘要 目的: 研究 HPCE法同时测定通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量。方法: 以葛根素为内标, $40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢硼钠 ($\text{pH} 9.18$) - 甲醇 ($90:10$) 为运行缓冲液。采用未涂层弹性石英毛细管柱 ($75\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ cm}$, 有效长度 42.5 cm), 分离电压 20 kV ; 进样压力 5 kPa 进样 1.5 s 毛细管温度: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 二极管阵列检测, 测定波长 $\lambda_s = 320\text{ nm}$, $\lambda_R = 380\text{ nm}$ 。结果: 在上述条件下, 通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸在 25 min 内得到很好的分离, 加样回收率分别为 99.3% , 98.7% , 100.2% ; RSD 分别为 3.2% , 2.6% 和 1.7% 。结论: 本方法具有良好的精密度和回收率, 可作为通塞脉微丸质量控制的方法。

关键词: 高效毛细管电泳法; 通塞脉微丸; 甘草苷; 甘草素; 阿魏酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0599-03

HPCE determination of liquiritin, liquiritigenin and ferulic acid in Tongsaimai pellets^{*}

LI Wei-dong CAI Bao-chang^{**}

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing Nanjing 210029 China)

Abstract Objective To develop an HPCE method for the determination of liquiritin, liquiritigenin and ferulic acid in Tongsaimai pellets. **Methods** Puerarin was used as an internal standard. The buffer was composed of $40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax ($\text{pH} 9.18$) - methanol ($90:10$). CE was performed on a $75\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ cm}$ (effective length was 42.5 cm) fused silica capillary. Separation voltage was 20 kV , sampling pressure was 5 kPa , sampling time was 1.5 s and the temperature was maintained at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Results** Liquiritin, liquiritigenin and ferulic acid were successfully separated within 25 min , the recoveries of them were 99.3% , 98.7% and 100.2% and RSDs were 3.2% , 2.6% and 1.7% , respectively. **Conclusion** This method is convenient, rapid and accurate. It can be used for the determination of liquiritin, liquiritigenin and ferulic acid in Tongsaimai pellets.

Key words HPCE; Tongsaimai pellets; liquiritin; liquiritigenin; ferulic acid

通塞脉微丸是以黄芪、当归、金银花、石斛、玄参、甘草 6 味药材精制而成的复方制剂, 具有清热养阴、活血化瘀的功效, 用于血栓闭塞性脉管炎、静脉曲张形成、动脉硬化性闭塞症、脑血栓形成及其后遗症等。微丸中主要含黄酮类、皂苷类、酚酸类成分^[1], 池玉梅等^[2]用 HPLC 双波长梯度洗脱法同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量。本文采用 HPCE 法同时测定通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量, 结果重复性和稳定性均较好。又由于 HPCE 具有极高的分离效率和极低的分析成本, 进样量少和污染小等优点, 可作为该产品质量

控制的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 毛细管电泳仪 二极管阵列检测器 (DAD) 自动进样装置。HPChemStation 色谱工作站。未涂层石英毛细管 $75\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ cm}$, 有效长度 42.5 cm (河北永年锐沣色谱器件有限公司)。

1.2 试剂 通塞脉微丸 ($5\text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$, 南星药业股份有限公司), 批号: 031006 031016 031025。甲醇: 江苏汉邦科技有限公司, 色谱纯; 四氢硼钠: 南京化学试剂一厂, AR 级。纯净水: 杭州娃哈哈集团有限公司。对照品甘草苷、甘草素、阿魏酸为自制, 经 UV、

^{*} 国家 863 重大研究计划项目 (2003AA2Z3247); 江苏省科技厅科技攻关重大项目“通塞脉片复方活性部位群及其药效学研究” (BK2001209)

^{**} 通讯作者 Tel: (025) 86798281 E-mail: bcca@126.com

R、MS、NMR 等结构鉴定, HPLC 检测纯度均在 99% 以上。内标: 葛根素 (批号: 110752-200209, 中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标溶液 精密称取葛根素对照品 50.63 mg 加 50% 甲醇定容至 250 mL, 摇匀, 即得浓度为 $0.2025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

2.1.2 对照品储备液 精密称取甘草苷对照品 5.00 mg 用上述内标溶液定容至 5 mL, 得到对照品储备液 I; 精密称取甘草素对照品 4.90 mg 以内标溶液定容至 5 mL, 得到对照品储备液 II; 精密称取阿魏酸对照品 4.70 mg 以内标溶液定容至 5 mL, 得到对照品储备液 III。

2.1.3 供试品溶液 精密称取通塞脉微丸 50 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加入 20 mL 50% 甲醇超声 (功率 250 W, 频率 30 kHz) 30 min, 待冷却至室温后, 定容, 摇匀后过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜后备用。

2.2 毛细管电泳条件^[3~5] 毛细管: 未涂层石英毛细管柱 ($75 \mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$, 有效长度 42.5 cm); 检测波长: 320 nm, 灵敏度 0.020 AUFS 运行缓冲液: $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢硼钠 - 10% 甲醇, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH 至 9.18 压力进样: 5 kPa 1.5 s 运行电压: 20 kV; 毛细管温度: 25°C 。每天实验前用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗毛细管 10 min 用水冲洗 5 min 再用运行缓冲液冲洗 5 min 平衡 3 min 后, 预电泳 10 min。

2.3 定性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液, 用相同的电泳条件进样。记录电泳图, 见图 1。结果甘草苷、葛根素、甘草素和阿魏酸的迁移时间分别为: 13.13, 13.89, 16.83, 22.72 min。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品储备液 I、II、III 按 7:1:2 混合得混合对照品溶液 B_1 。精密吸取 B_1 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 得到对照品溶液 B_2 。依次等比例稀释得到混合对照品溶液 B_3 、 B_4 、 B_5 。用上述电泳条件对该标准系列进行测定。以浓度为横坐标, 各成分与内标的峰面积之比为纵坐标, 绘制标准曲线, 并回归分析, 结果甘草苷、甘草素及阿魏酸的回归方程分别为:

$$A = 11.83C - 0.0313 \quad r = 0.9999$$

$$A = 26.43C + 0.0033 \quad r = 0.9999$$

$$A = 19.43C - 0.0285 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为 $0.044 \sim 0.70$, $0.0061 \sim 0.098$, $0.011 \sim 0.19 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

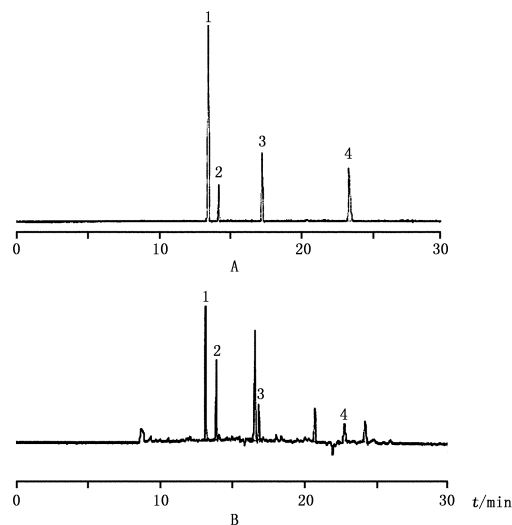


图 1 对照品 (A) 和通塞脉微丸样品 (B) 的 HPCE 图谱

Fig 1 Electropherograms of chemical reference substances (A) and sample of Tongsemai pellets

1. 甘草苷 (liquiritin) 2. 内标葛根素 (puerarin internal standard)
3. 甘草素 (liquiritigenin) 4. 阿魏酸 (ferulic acid)

2.5 精密度试验 取对照品溶液 B_1 , 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算甘草苷、甘草素及阿魏酸与内标峰面积比的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.66%, 1.3%, 1.0%。

2.6 稳定性试验 精密称取批号为 031016 的通塞脉微丸供试品溶液, 每隔 3 h 进样 1 次, 测定峰面积, 计算甘草苷、甘草素及阿魏酸与内标峰面积比的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.1%, 5.0%, 3.6%, 表明 15 h 内供试品溶液稳定。

2.7 重复性试验 精密称取批号为 031006 的通塞脉微丸 6 份, 每份约 50 mg 精密称定, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按所选电泳条件测定峰面积, 计算样品中甘草苷、甘草素及阿魏酸的平均含量 ($n = 6$) 分别为 1.50%, 0.19%, 0.22%; RSD ($n = 6$) 分别为 3.3%, 2.7%, 3.8%。

2.8 加样回收率试验 取已测知含量 (含甘草苷 1.51%、甘草素 0.19%、阿魏酸 0.23%) 的通塞脉微丸样品 25 mg 共 6 份, 分别加入含 $0.228 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘草苷、 $0.0316 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘草素及 $0.0797 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸的混合对照品溶液 2 mL, 按“2.1.3”项下方法制备所需溶液, 进样测定, 求得甘草苷、甘草素及阿魏酸的平均回收率 ($n = 6$) 分别为 99.3%, 98.7%, 100.2%; RSD 分别为 3.2%, 2.6%, 1.7%。

2.9 样品测定 取通塞脉微丸 3 份, 每份约 50 mg 精密称定, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of sample determination

批号 (Lot No)	甘草苷 (liquiritin)		甘草苷 (liquiritigenin)		阿魏酸 (ferulic acid)	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
	(content) %	%	(content) %	%	(content) %	%
031006	1.53	2.9	0.189	2.2	0.225	2.6
031016	1.25	1.0	0.204	1.5	0.238	1.6
031025	1.30	3.3	0.191	1.8	0.236	1.7

3 讨论

3.1 提取方法的选择 采用回流法和超声波法进行了预试验比较, 结果表明: 以甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量计算, 2种方法的提取率基本一致, 由于超声波法简单省时, 故本实验采用超声波法; 同时考察了提取时间, 以超声 30 min 为宜。

3.2 缓冲介质的选择 本实验分别考察了硼砂溶液和磷酸盐溶液 2 个不同缓冲溶液体系, 发现硼砂体系的分离效率优于磷酸盐体系; 接着考察了 $10\sim 100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的硼砂缓冲液, 结果发现分离效率随浓度的增大而增高, 但超过 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 分离效率逐渐降低且迁移时间延长, 故实验选用 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲溶液为分离介质; 最后以甘草苷、甘草素和阿魏酸 3 组分与相邻峰的分离情况, 考察了缓冲液 pH 范围 ($4.5\sim 10.5$), 结果以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲溶液至 pH 9.18 效果为佳。

3.3 有机改性剂的选择及加入比例 考察了添加有机改性剂的影响, 发现加入有机改性剂后能有效改变分离效果, 使待测成分达到基线分离; 比较了加入改性剂的种类, 结果甲醇效果好于乙腈; 考察了甲醇的含量, 结果以缓冲液 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂 (pH 9.18) 加入 10% 甲醇 (体积比) 的分离效果最佳, 当

甲醇体积分数大于 10% 后, 目标成分的迁移时间延长且分离效率逐渐降低。

3.4 运行电压的选择 在选定的条件下, 于 15 20 25 30 kV 下进行电泳分离, 各组分的迁移速率随运行电压的降低而减小, 分离度提高, 但峰展变宽。运行电压过高时, 由于迁移加快而致分离度减小, 综合考虑对分离度和迁移时间的影响, 本文选择运行电压为 20 kV。

参考文献

- LI Wei-dong(李伟东), CAI Bao-chang(蔡宝昌), DING Xuan-sheng(丁选胜). Study on compounds in Tongsainai pellets by HPLC-MS(通塞脉微丸化学成分 HPLC-MS 研究). *Chin Arch Trad Chin Med* (中华中医药学刊), 2008, 26(11): 2355
- CHI Yu-mei(池玉梅), CUI Xiao-bing(崔小兵), CHEN Wei(陈维), et al. Determination of chlorogenic acid and ferulic acid and liquiritin in Tong Sai Mai tincture by dual wavelength high-performance liquid chromatography with gradient elution (HPLC 双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2007, 42(17): 1348
- SUN Yi(孙沂), GUO Tao(郭涛), SU Yi(隋因), et al. Determination of adenosine and quercetin in Carthamus tinctorius by HPLC (高效毛细管电泳法同时测定红花中腺苷、芦丁和槲皮素的含量). *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38(4): 283
- LUO Qi-qi(罗奇志), DAI Kai-jin(戴开金), MA An-de(马安德), et al. Analysis of puerarin and daidzein in Gegen Qinlian preparations by high performance capillary electrophoresis (葛根芩连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的 HPCE 分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24(1): 11
- GU Hui-yan(谷会岩), GONG Li-dong(宫立冬), YU Jing-hua(于景华). Measurement and comparison of glycyrrhizic acid contents in root of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) from different cultivating areas. *J Forest Res* [林业研究 (英文版)], 2002, 13(2): 141

(本文于 2008 年 3 月 20 日收到)