

HPCE 法测定归脾丸中远志皂苷元和远志酸的含量*

王洁, 张一鸣, 郝增艳, 胡明勋, 陈安家**

(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要 目的: 建立测定归脾丸中远志皂苷元和远志酸含量的高效毛细管电泳法。方法: 采用未涂层毛细管柱(75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, 有效长度 50 cm), 运行缓冲液为 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液与 20% 甲醇($\text{pH}=8.0$), 分离电压 25 kV, 检测波长 210 nm。结果: 远志皂苷元、远志酸的线性范围分别为 13.25 ~ 212 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9971$) 和 12.5 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9977$), 平均回收率($n=5$) 分别为 101.5% 和 100.4%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可用于归脾丸的质量控制。

关键词: 远志皂苷元; 远志酸; 毛细管电泳; 归脾丸

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1891-03

HPCE determination of senegenin and polygalacic acid in Guipi pills*

WANG Jie, ZHANG Yi-ming, HAO Zeng-yan, HU Ming-xun, CHEN An-jia**

(Pharmacy College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To develop a capillary electrophoresis method for determination of senegenin and polygalacic acid in Guipi pills. **Methods:** The separation was carried out on an uncoated fused silica capillary(75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, effective length 50 cm). The separation voltage was 25 kV. The running buffer was 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ containing 20% methanol($\text{pH}=8$) and the detection wavelength was 210 nm. **Results:** The linear ranges were 13.25 ~ 212 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9971$) for senegenin and 12.5 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9977$) for polygalacic acid. The average recoveries of senegenin and polygalacic acid in Guipi pills were 101.5% and 100.4%. **Conclusion:** This method is proved to be simple, rapid and accurate and can be used as a new method for the quality control of Guipi pills.

Key words: senegenin; polygalacic acid; capillary electrophoresis; Guipi pills

归脾丸由党参、白术、远志、黄芪、茯苓、酸枣仁、龙眼肉、当归、木香、大枣、甘草共 11 味药组成, 具有益气健脾、养血安神之功, 用于心脾两虚、气短心悸、失眠多梦、头昏头痛、肢倦乏力、食欲不振、崩漏便血^[1]。其中远志具有安神益智的功效, 为归脾丸中主要药味; 其主要活性成分远志皂苷具有镇静、祛痰、利尿、降压等功效, 有关远志及其制剂的含量测定方法主要为高效液相色谱法^[3~6]。紫外检测器是常用的检测器, 但远志皂苷的紫外吸收波长在 200 nm 左右, 属末端吸收而难以测定。但远志皂苷经酸水解可得远志皂苷元和远志酸, 故测定远志皂苷元和远志酸的含量对控制归脾丸中远志的用量至关重要。目前中国药典^[2]尚未收载归脾丸的含量测定方法, 亦未见归脾丸中有关远志成分的相关报道。高效毛细管电泳(HPCE)由于其具有高效、快速、操作成本低, 试剂用

量少等突出优点, 在药物分析中得到日益广泛的应用。本文建立了 HPCE 法测定归脾丸中远志皂苷元和远志酸含量, 该法简单快捷, 结果令人满意, 为该制剂的质量控制提供了一种新方法。

1 仪器与试剂

BECKMAN P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳仪, DAD 检测器, 熔融石英毛细管(Beckman 公司), KQ-400KDB 型超声波清洗器。

对照品远志皂苷元(批号 111572-200502)、远志酸(批号 111572-200502)购自中国药品生物制品检定所; 归脾丸(河南省宛西制药股份有限公司; 批号 100201, 100401, 100206); 硼酸、氢氧化钠均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

* 山西省自然科学基金资助项目(2008011077-1)

** 通讯作者 Tel: 15835108120; E-mail: chenanjia888@163.com

2.1.1 对照品混合溶液 精密称取远志皂苷元对照品 10.6 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得远志皂苷元对照品储备液(质量浓度为 $1.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 精密称取远志酸对照品 10.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得远志酸对照品储备液(质量浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。分别取对照品储备液各 250 μL , 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制得远志皂苷元浓度为 $53 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和远志酸浓度为 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取归脾丸, 研细, 过 3 号筛, 取 2.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 浸泡过夜, 超声(400 W, 40 kHz)处理 0.5 h, 过滤, 滤渣再加入 25 mL 甲醇, 超声处理 0.5 h, 滤过, 合并滤液, 滤液蒸干, 残渣加 10% 盐酸溶液 20 mL, 微热使溶解, 置沸水浴中水解 2 h, 取出, 滤过, 沉淀用水洗至中性, 用甲醇少量多次洗滤纸, 使沉淀溶解于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例制备不含远志的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法操作, 即得。

2.2 电泳条件 毛细管柱: 未涂层毛细管柱(75 $\mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$, 有效长度 50 cm); 运行缓冲液: 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液与 20% 甲醇(用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液调 pH=8.0); 分离电压: 25 kV; 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样条件: $3.45 \times 10^3 \text{ Pa}$ 5 s。每天分析之前, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗毛细管 10 min, Milli-Q 超纯水冲洗 15 min, 运行缓冲液冲洗 10 min。进样前分别用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、Milli-Q 超纯水和运行缓冲液各冲洗 3 min。每 5 次进样后更换运行缓冲液。在上述条件下, 对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液 CE 图见图 1。

2.3 专属性试验 在上述电泳条件下, 归脾丸供试品溶液电泳图(图 1-B)中, 在与远志酸和远志皂苷元对照品迁移时间(图 1-A)相对应处呈分离良好的色谱峰, 同时用二极管阵列检测器对两峰进行波长扫描。结果表明其紫外光谱图与对照品紫外光谱图完全一致。表明两峰即为待测的远志酸和远志皂苷元峰。从图 1 可见在此色谱条件下归脾丸提取液中两峰与样品中其他成分峰达到很好的分离。且样品中其他成分对远志酸和远志皂苷元的测定没有干扰(图 1-C)。

2.4 线性关系考察 取远志皂苷元、远志酸的对照品储备液适量, 分别加甲醇倍比稀释成含远志皂苷元及远志酸分别为 212, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 106, 100 $\mu\text{g} \cdot$

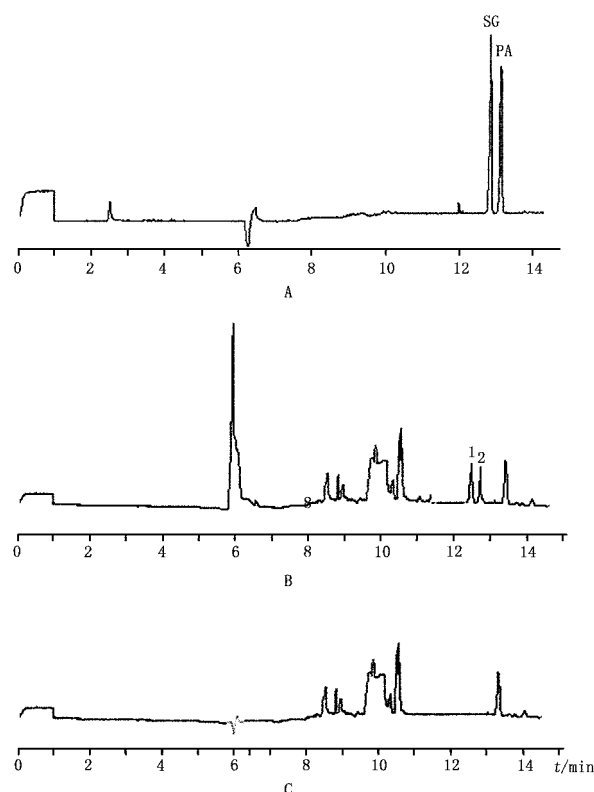


图 1 混合对照品(A)、样品(B)、阴性样品(C)的毛细管电泳图谱
Fig 1 Capillary electropherograms of the standard mixture(A), sample(B) and negative sample without Radix Polygalae(C)

1. 远志皂苷元(senegenin) 2. 远志酸(polygalic acid)

$\cdot \text{mL}^{-1}$; 53, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 26.5, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 13.25, 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5 份混合溶液, 摇匀, 用微孔滤膜(0.22 μm) 滤过, 分别进样, 测定峰面积。分别以远志皂苷元浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、远志酸浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标, 绘制远志皂苷元、远志酸标准曲线, 得回归方程分别为:

$$Y = 312.4X + 6.271 \times 10^3 \quad r = 0.9971$$

$$Y = 282.6X + 5.286 \times 10^3 \quad r = 0.9977$$

结果表明: 远志皂苷元浓度在 $13.25 \sim 212 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 远志酸浓度在 $12.5 \sim 200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与峰面积之间呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品混合溶液连续测定 5 次, 结果远志皂苷元、远志酸峰面积的 RSD 分别为 1.0% 和 0.9%。

2.6 重复性试验 取归脾丸(批号 100201), 按“2.1.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 进样测定含量。结果归脾丸中远志皂苷元、远志酸的平均含量分别为 $0.617 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.446 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.5% 和 1.9%。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液(样品批

号 100201) , 分别在制备后 0 2 4 6 8 h 进样测定。结果远志皂苷元、远志酸峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 1.0% , 表面供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 回收率试验 取已知含量的归脾丸(批号 100201) 粉末适量(约相当于远志酸约 0.6 mg , 远志皂苷元约 0.4 mg) 共 5 份 , 精密称定 , 分别准确加入远志皂苷元 0.6148 mg 和远志酸对照品 0.4500 mg , 按“2.1.2”项下方法制备供试溶液 , 进样测定。结果归脾丸中远志皂苷元、远志酸的回收率分别为 101.5% 和 100.4% , RSD 分别为 0.5% 和 1.0% 。

2.9 样品测定 取不同批号的归脾丸各 3 份 , 按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液 , 在选定的电泳条件下进样 , 记录电泳图 , 用外标回归曲线法测定样品中远志皂苷元和远志酸的含量。结果见表 1。

表 1 归脾丸中远志皂苷元和远志酸的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ $n=3$)

Tab 1 Determination results of senegenin and polygalacic acid in Guipi pills

批号(Lot No.)	远志皂苷元(senegenin)	远志酸(polygalacic acid)
100201	0.618	0.446
100401	0.587	0.501
100206	0.638	0.459

3 讨论

3.1 测定波长的选择 取对照品溶液 , 以 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液与 20% 甲醇为运行缓冲液 , 在 200 ~ 400 nm 波长处进行二极管阵列扫描 , 结果远志皂苷元和远志酸均在 210 nm 处有最大吸收 , 检测灵敏度高 , 基线稳定。故选择 210 nm 为检测波长。

3.2 运行缓冲液的种类和浓度的选择 远志皂苷元与远志酸结构相似 , 故出峰时间相近。笔者考察了磷酸盐、醋酸盐、硼砂和硼酸缓冲液系统。试验发现采用硼砂为缓冲液时 , 两物质均出峰 , 峰形对称 , 且当浓度达到 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 , 两峰分离良好 , 分离效率高 , 运行电流适宜 , 保留时间适当 ; 浓度低于 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 , 远志皂苷元和远志酸两峰分离较差 ; 浓度高于 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 , 随着硼砂浓度的增高 , 电流增大 , 焦耳热增加 , 保留时间延长。

3.3 缓冲液 pH 的选择 远志皂苷元和远志酸为齐墩果酸类化合物 , 具有弱酸性 , 缓冲液的条件摸索主要在 pH 7 ~ 9 弱碱性范围内进行。随着 pH 的增加 , 远志皂苷元和远志酸的分离度增大 , 迁移时间也随之增长。结果表明 , 当 pH 为 8 时 , 远志皂苷元和远志酸分离良好且迁移时间适宜。

3.4 有机溶剂对分离的影响 在毛细管电泳中 , 有机溶剂作为改性剂 , 可以改善分离。本试验考察了

甲醇浓度为 5% ~ 30% 对分离的影响。结果表明 , 随着甲醇含量的增加 , 远志皂苷元和远志酸分离度增加 , 但是迁移时间增长 , 且焦耳热增加使得基线噪音变大。故最终确定缓冲液系统为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液与 20% 甲醇(pH = 8.0) 。

3.5 分离电压的选择 提高分离电压可以缩短分析时间 , 试验中考察了 10 ~ 30 kV 电压时远志皂苷元和远志酸的分离情况。电压为 25 kV 时分离时间短 , 分离效率高且峰形尖锐 , 因此选择 25 kV 为分离电压。

3.6 柱温的选择 柱温对电解质溶液的黏度、谱带扩展、离子淌度等有直接的影响。柱温试验发现 : 15 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 区间的不同柱温下分离时间变化不大 , 但对远志皂苷元和远志酸 2 个组分的分离度有较大影响。在柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时 , 两物质的分离较好。因此选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 作为实验柱温。

3.7 提取方法的考察 实验曾考察了不同提取方法(索氏提取法 5 h、超声提取法和回流提取法 2 h)、不同水解时间(1 , 1.5 , 2 h) 和不同盐酸浓度(5% , 10% , 20%) 的提取效率 , 确定的样品处理方法为超声提取 , 10% 盐酸水解 2 h。

3.8 结论 本试验建立的归脾丸中远志皂苷元和远志酸的毛细管电泳分离分析方法 , 具有高效、绿色、廉价、操作简便等优点 , 为归脾丸中有效成分的测定及其质量控制提供了良好的方法。

参考文献

- DONG Xiao - bing(董晓兵) , LI Jun(李军) , JIANG Yong(姜勇) , *et al.* Determination of tenuifolin in Tianwang Buxinwan and Guipiwan by HPLC(测定天王补心丸和归脾丸中细叶远志皂苷的含量) . *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2007 32(16) : 1647
- ChP(中国药典) . 2010. Vol 1 (一部) : 643
- YANG Guo - hong(杨国红) , SUN Xiao - fei(孙晓飞) . Studies on quantitative determination of senegenin in Radix Polygalae by RP - HPLC(反相高效液相色谱法测定远志中远志皂苷元的含量) . *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2001 21(4) : 261
- ZHAO Yun - sheng(赵云生) , LI Zhan - lin(李占林) , ZHANG Li - ping(张丽萍) , *et al.* The determination of senegenin content in Radix Polygalae from Shanxi(晋产远志种质资源皂苷元含量测定) . *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*(世界科学技术 - 中医药现代化) 2006 8(4) : 68
- XU Rong - chu(徐荣初) , LIU Pei - li(刘培丽) , ZHANG Xu - dong(张旭东) , *et al.* Determination of polygalacic acid in compound Haishe capsule by HPLC(高效液相色谱法测定复方海蛇胶囊中远志酸含量) . *China Pharm*(中国药业) 2008 17(13) : 23
- LIANG Ge - liang(梁戈亮) , LIN Shu - yu(林书玉) , LIU Dong(刘东) . Quantitative determination of total saponin in Polygalae by spectrophotometry(超声提取 - 分光光度法测定远志总皂苷的含量) . *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展) 2008 8(1) : 104

(本文于 2010 年 10 月 11 日收到)