

毛细管电泳法测定矮地茶中岩白菜素的含量

孔文婷¹ 潘丽玉² 赵白云¹ (1. 杭州师范大学附属医院药学部 杭州 310000; 2. 解放军 117 医院药剂科)

摘要 目的: 建立矮地茶药材中岩白菜素的含量测定方法。方法: 矮地茶药材粉碎后过筛, 取粉末用甲醇超声提取, 未涂渍熔融石英毛细管(75 $\mu\text{m} \times 48.5 \text{ cm}$, 有效长度 40 cm), 以 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂水溶液为缓冲液, 运行电压 15 kV, 温度 25℃, 内标为肉桂酸, 检测波长为 240 nm, 运行时间 10 min。结果: 在此条件下岩白菜素与内标及其他成分能达到基线分离, 岩白菜素在 3.356 ~ 167.800 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系 $Y = 0.0349X + 0.0606$, $r = 0.9979$, 最低检测限为 0.839 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($S/N = 3$), 最低定量限为 3.356 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($S/N = 10$), 平均加样回收率为 99.6% ($RSD = 3.0\%$, $n = 6$), 低, 中, 高浓度日内、日间精密度 RSD 均小于 5% ($n = 3$)。结论: 此方法可用于矮地茶药材中岩白菜素的含量测定, 具有简便快速、准确可靠、试剂消耗量少的优点。

关键词 矮地茶; 岩白菜素; 毛细管电泳; 含量测定

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2014)12-2151-03

Determination of Bergeni in *Herba Ardisiae Japonicae* by Capillary Zone Electrophoresis

Kong Wenting¹, Pan Liyu², Zhao Baiyun¹ (1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310000, China; 2. Department of Pharmacy, the 117th Hospital of PLA)

ABSTRACT Objective: To establish a method for the determination of bergeni in *Herba Ardisiae Japonicae*. **Methods:** *Herba Ardisiae Japonicae* was ultrasonic extracted by methanol after crushed and sieved. An untreated fused-silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 48.5 \text{ cm}$, 40 cm effective length) was used, the running buffer was 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax in water, the voltage was 15 kV, the temperature was 25℃, the internal standard was cinnamic acid, the ultraviolet wavelength was set at 240nm, and the running time was 10 minute. **Results:** Bergeni, the internal standard and the impurities were separated by baseline under the above conditions. Bergeni was linear within the range of 3.356-167.800 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ with the linear equation of $Y = 0.0349X + 0.0606$ ($r = 0.9979$), the limit of determination was 0.839 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($S/N = 3$), the limit of quantitation was 3.356 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($S/N = 10$), the average recovery was 99.6% ($RSD = 3.1\%$, $n = 6$), and $RSDs$ of intra and inter-day were lower than 5% ($n = 3$). **Conclusion:** The method has the advantages of convenience, fastness, accuracy, and low sample and reagent consumption, which can be used to determine bergeni in *Herba Ardisiae Japonicae*.

KEY WORDS *Herba Ardisiae Japonicae*; Bergeni; Capillary zone electrophoresis; Determination

矮地茶为紫金牛科植物紫金牛 [*Ardisia japonica* (Thunb.) Blume] 的干燥全草, 又名平地木、老勿大、不出林、叶底珠等。全草化痰止咳、活血化瘀, 用于肺结核、咯血、慢性气管炎、经闭、跌打损伤等^[1,2]。矮地茶中有香豆素、黄酮、多酚、萜类及挥发油等多种化学成分^[3], 其中岩白菜素为矮地茶所含最为重要的异香豆素类化合物, 具有显著的止咳作用, 是治疗慢性支气管炎、肺气肿、肺心病、支气管哮喘

等呼吸系统疾病的特效药物^[4]。矮地茶药材的质量控制以岩白菜素的含量为主要指标, 主要方法为高效液相色谱法^[5~7]。本文将建立毛细管电泳法对矮地茶中的岩白菜素含量测定的方法, 探讨该法用于矮地茶药材质量控制的可行性。

1 仪器与试药

安捷伦公司 Agilent3DCE 高效毛细管电泳仪(美国); 二

极管阵列检测器;Agilent ChemStation 工作站;ORION MODEL 828 型 pH 计(美国奥立龙公司);KUDOS SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司)。

矮地茶三批药材均购自上海青浦中药饮片厂(批号:100826,产地:江苏;批号:120503,产地:安徽;批号:110612,产地:湖南);岩白菜素对照品购自四川成都曼斯特生物科技有限公司(批号:MUST-13010902,纯度 ≥ 98.0%),硼砂、甲醇等试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 电泳条件

毛细管:未涂渍熔融石英毛细管(河北永年光学纤维厂,75 μm × 48.5 cm,有效长度40 cm);缓冲液:25 mmol · L⁻¹ 硼砂水溶液,电压:15 kV;温度:25℃;压力进样:50 mbar × 5 s;内标:肉桂酸;检测波长:240 nm;运行前用0.05 mol · L⁻¹ NaOH 溶液及缓冲液各冲洗 4 min,运行时间为 10 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取岩白菜素对照品16.78 mg,置于 10 ml 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得1.678 mg · ml⁻¹ 岩白菜素对照品母液,置冰箱 4℃ 保存备用。

2.2.2 内标溶液 精密称取肉桂酸对照品12.05 mg,置于 10 ml 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得1.205 mg · ml⁻¹ 肉桂酸溶液,作为内标,置冰箱 4℃ 保存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 参照《中国药典》前处理方法^[8],取矮地茶药材饮片,粉碎后过 60 目筛,取粉末约 0.2 g,精密称定,置 50 ml 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 ml,称重,超声(250 W,33 kHz)40 min,取出放冷至室温,称重,用甲醇补足减失重量,取上清液过0.45 μm 微孔滤膜,精密量取续滤液 5 ml 置 10 ml 量瓶中,加入内标肉桂酸溶液0.5 ml,用甲醇溶液稀释至刻度,摇匀作为供试品溶液。

2.3 专属性考察

取岩白菜素对照品溶液及矮地茶供试品液,按“2.1”项下电泳条件进样,记录色谱图,在此条件下岩白菜素、内标肉桂酸及其他成分均能达到基线分离,待测物无干扰,柱效大于 50 000,结果见图 1。

2.4 线性关系考察

精密量取岩白菜素对照品母液适量置 10 ml 量瓶中,加入 0.5 ml 肉桂酸内标溶液,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制浓度分别为3.356,8.390,33.56,83.90,167.8 μg · ml⁻¹ 的对照品溶液。取前述岩白菜素标准溶液按“2.1”项下的电泳条件进样,以对照品峰面积同内标峰面积之比为纵坐标(Y),对照品溶液的浓度为横坐标(X,μg · ml⁻¹),得回归方程:Y = 0.034 9X + 0.060 6, r = 0.997 9;线性范围:3.356 ~ 167.8 μg · ml⁻¹。

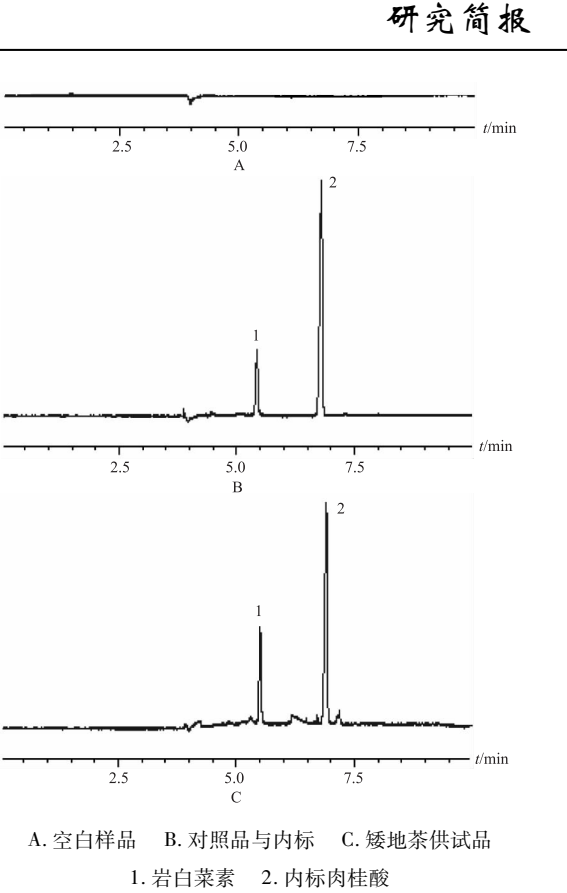


图 1 矮地茶提取物毛细管电泳分离色谱图

2.5 精密度试验

取浓度为3.356,33.56,167.8 μg · ml⁻¹ 的低、中、高三种浓度对照品溶液按“2.1”项下的电泳条件连续进样 3 次,以及连续 3 天分别进样一次,进行日内、日间精密度考察。结果低,中,高浓度日内精密度分别为2.9%、1.4%、1.2%(n = 5),日间精密度分别为3.73%、1.49%、1.58%(n = 3),表明该方法日内、日间精密度良好。

2.6 检测限及定量限

取岩白菜素对照品溶液,以不同比例稀释后按“2.1”项下的电泳条件进样,以信噪比为 3 时的浓度作为最低检测限,以信噪比为 10 时的浓度作为最低定量限,结果岩白菜素最低检测限为0.839 μg · ml⁻¹,最低定量限为3.356 μg · ml⁻¹。

2.7 稳定性试验

按“2.1”项下的电泳条件,取供试品溶液分别于 0,1,2,4,6,8 h 进样分析,记录峰面积的比值,代入标准曲线计算浓度,考察样品室温放置稳定性,结果发现样品在 8 h 内放置稳定, RSD 2.2%(n = 6)。

2.8 提取回收率考察

取矮地茶药材粉末约 0.1 g,精密称定,加入浓度为 1.678 mg · ml⁻¹ 岩白菜素对照品储备液溶液0.5 ml,再加入甲醇19.5 ml,按照“2.2.3”项下供试品溶液制备过程操作,按“2.1”项下的电泳条件进样分析,平行操作 6 份,考察提取回收率,结果平均回收率为99.6%, RSD 3.0%(n = 6)。

2.9 样品含量测定

取江苏产地矮地茶药材粉末约0.2 g,按照“2.2.3”项下供试品溶液制备过程操作提取样品,按“2.1”项下的电泳条件进样分析,每批药材平行操作 3 份,记录峰面积比值,代入标准曲线计算样品浓度,得每批药材中岩白菜素的含量。三批矮地茶中岩白菜素的含量均大于0.5%,结果见表 1。与文献报道^[7]的含量测定结果相符,符合《中国药典》2010 年版标准关于岩白菜素不得少于0.50% 的相关规定。

2.10 HPLC 测定

色谱条件:色谱柱为 SHISEIDO MG C₁₈(3.0 mm × 100 mm,3 μm);流动相为甲醇:水 = 20:80;进样量:1 μl;流速:0.4 ml·min⁻¹;柱温:25℃;检测波长:275 nm;运行时间 15 min。在此条件下,三个产地矮地茶药材中岩白菜素的含量分别为0.55%(江苏),0.52%(安徽)和0.85%(湖南),见表 1。表明两种方法测定结果一致。

表 1 样品测定结果 (n = 6)

产地	称重 (g)	含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)	平均含量 (%)
江苏	0.2021	0.57	0.56	2.2	0.55
	0.2087	0.56			
	0.2050	0.55			
	0.2068	0.52			
安徽	0.2069	0.54	0.53	1.6	0.52
	0.2071	0.53			
	0.2014	0.83			
湖南	0.2024	0.82	0.82	2.0	0.85
	0.2035	0.80			

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用毛细管电泳自带的二极管整列检测器(DAD)对岩白菜素在 200 ~ 400 nm 范围内的紫外吸收进行了全扫描,发现岩白菜素在 240 nm 及 270 nm 均有较好的紫外吸收,而 240 nm 处有最大吸收,考虑到电泳检测灵敏度要求,选择最大吸收波长 240 nm 用于方法检测。

3.2 缓冲液对分离的影响

分别考察了硼砂及磷酸盐缓冲液对矮地茶提取物中岩白菜素与干扰峰分离的影响,发现以硼砂水溶液为缓冲液时,色谱基线平稳,其他干扰峰与岩白菜素色谱峰能达到基线分离。用磷酸调节缓冲液 pH,发现但随着 pH 降低,岩白菜素的迁移时间延长,不利于快速分离分析。考察了缓冲液浓度对分离度的影响,发现缓冲液浓度增加,电流增大,毛细管发热量增加导致岩白菜素色谱峰与干扰峰不能很好的分离,所以最终确定 25 mmol·L⁻¹ 硼砂水溶液 (pH = 9.03) 作为运行缓冲液。

3.3 温度及电压对分离的影响

考察了温度从 15 ~ 30℃ 之间每隔 5℃ 进样分析的结果,发现温度对出峰时间影响较大,温度越低出峰时间越晚,对电泳分离影响较小,最终选择室温。电压升高,电流也增大,不利于电泳分离,电压降低,整个迁移时间延长,最终选择 15 kV 作为分离电压。

3.4 毛细管内径对分离的影响

考察了 75 μm 及 50 μm 内径的毛细管柱,结果发现采用 50 μm 内径毛细管柱时,整个分析时间将延长至 20 min 以后,最终选用 75 μm 内径,40 cm 有效长度的毛细管柱进行电泳分离。

3.5 毛细管电泳法和高效液相法含量测定的比较

可以观察到,毛细管电泳法对矮地茶药材中岩白菜素在分离效率和柱效两方面较 HPLC 更佳,毛细管电泳法理论塔板数高于 50 000。从表 1 中可观察到,毛细管电泳法与传统液相测定结果基本一致。虽然 HPLC 法目前为含量测定及其药材质量控制的主导地位,但 CE 法具有快速、高效、试剂用量小的特点,选择性的分离在溶液中容易电离的成分,柱效高,分析时间短,尤其适合中药复杂成分的分离分析,能够大大减少有机溶剂的消耗量,减少对环境造成的污染,保护检验人员的健康,使毛细管电泳在中药领域具有一定前途。

3.6 小结

本研究建立了毛细管电泳法对矮地茶药材中岩白菜素的含量进行测定的方法,并进行了方法学验证,该法能在 10 min 之内完成整个分析,具有简便快速、试剂消耗量少的优点,结果准确可靠,可用于矮地茶药材中岩白菜素的含量测定及其药材质量控制。

参 考 文 献

1 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986. 2698

2 刘伟林,杨东爱,余胜民,等. 矮地茶药理作用研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(12):3002-3003

3 陈晓文,宋良科,谢娟. 矮地茶的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2009,37(11):79-82

4 董成梅,杨丽川,邹澄,等. 岩白菜素的研究进展[J]. 昆明医学院学报,2012,33(1):150-154

5 张志平,潘兆广,张金平. HPLC法测定矮地茶中岩白菜素的含量[J]. 食品工业,2012,33(7):131-133

6 卢仁宣. HPLC 法测定复方矮地茶片中岩白菜素含量[J]. 中国药事, 2010,24(10):1000-1001

7 艾一祥,冯毅凡,郭晓玲. 不同产地矮地茶中岩白菜素含量的差异[J]. 广东药学院学报,2006,22(5):510-512

8 中国药典[S]. 2010 年版. 一部. 338-339

(2014-05-26 收稿 2014-08-10 修回)