

· 化学与分析 ·

毛细管区带电泳内标法测定半夏中鸟苷含量

魏英勤^{1,2,3}, 卢恒^{1,2}, 刘鑫欣^{1,2}, 刘金鑫^{1,2}, 孟繁蕴^{1,2*}, 王永炎^{1,2}

(1. 北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875; 2. 北京师范大学教育部资源药物工程研究中心, 北京 100875; 3. 山东轻工业学院化学工程学院, 济南 250353)

[摘要] 目的: 建立毛细管区带电泳内标法测定半夏鸟苷含量的方法。方法: 采用毛细管区带电泳内标法定量, 以熔融石英毛细管(57 cm × 75 μm, 有效长度 50 cm)为分离通道, 运行缓冲液经 NaOH 溶液调 pH 至 9.0 的 0.8 mol·L⁻¹ 硼酸溶液-0.1 mol·L⁻¹ 硼砂溶液-乙腈(50:50:13), 分离电压 25 kV, 检测波长 254 nm, 毛细管温度 25 °C, 自动压力进样 5 s。结果: 半夏中鸟苷在 0.25 ~ 1.5 mg 线性关系良好($r=0.999\ 1$), 鸟苷加样回收率为 102.0%, RSD 为 2.4%。结论: 用毛细管区带电泳内标法测定半夏鸟苷含量的方法准确可行。

[关键词] 毛细管区带电泳法; 内标法; 鸟苷; 半夏

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0049-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110721.1733.005 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1733.005.html>

Determination of Guanosine in Pinelliae Rhizoma by Capillary Zone Electrophoresis with Internal Standard Method

WEI Ying-qin^{1,2,3}, LU Heng^{1,2}, LIU Xin-xin^{1,2}, LIU Jin-xin^{1,2}, MENG Fan-yun^{1,2*}, WANG Yong-yan^{1,2}

(1. Beijing Key Laboratory of Protection and Application of Chinese Medicinal Resources, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2. Research Center of Resource Drug Engineering of Educational Ministry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. School of Chemical Engineering, Shandong Polytechnic University, Jinan 250353, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the capillary zone electrophoresis (CZE) method for quantitative analysis of guanosine in Pinelliae Rhizoma using aciclovir as internal standard. **Method:** A fused silica capillary (57 cm × 75 μm ID, an effective length of 50 cm) was used. The running buffer was composed of 0.8 mol·L⁻¹ boric acid, 0.1 mol·L⁻¹ borate and acetonitrile (50:50:13) with pH adjusted to 9.0. The applied voltage was 25 kV and the capillary temperature was 25 °C. The detection wavelength was at 254 nm. **Result:** Good linearity was found in the range of 0.25-1.5 mg for guanosine with $r=0.999\ 1$. The average recovery was 102.0% for guanosine with the relative standard deviation 2.4% ($n=5$). **Conclusion:** The method is simple and accurate to determine guanosine in Pinelliae Rhizoma.

[Key words] capillary zone electrophoresis; internal standard method; guanosine; Pinelliae Rhizoma

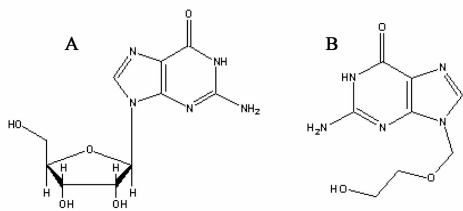
半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit 的块茎, 首载于《神农本草经》, 性温, 味辛, 有小毒, 归脾、胃、肺经。具有燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结的功效^[1]。半夏含有生物碱、β-谷甾

[收稿日期] 20110323(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072999); 国家科技重大专项项目(2009ZX09502-026)

[通讯作者] * 孟繁蕴, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源学, Tel:010-62208739, E-mail: mfy@bnu.edu.cn

醇、多糖、氨基酸、挥发油、半夏蛋白及无机元素等多种成分。半夏水溶性化学成分鸟苷通常作为半夏质量的评价指标,通常采用反相高效液相色谱进行分析检测^[2-5],尚未见采用毛细管区带电泳法检测半夏中鸟苷的报道。毛细管电泳仪器精密度易受电压、进样、毛细管内壁吸附等诸多因素的影响,采用内标法定量,可有效克服上述因素的影响。阿昔洛韦与鸟苷分子结构中均含有生色基团鸟嘌呤结构,紫外吸收光谱近似,是一个较为理想的内标物。本文首次采用毛细管区带电泳内标法检测半夏药材中鸟苷的含量,可以作为半夏药材的质量控制方法之一。鸟苷、阿昔洛韦的分子结构式如图 1 所示。



A. 鸟苷; B. 阿昔洛韦
图 1 分子结构式

1 材料

1.1 仪器 Beckman P/ACE™ MDQ 高效毛细管电泳仪, 2996 型二极管阵列检测器。熔融石英毛细管 57 cm × 75 μm, 有效长度 50 cm, 32Karat Software 工作站。Eppendorf 5418 小型高速离心机(德国), KQ 超声波清洗器(江苏昆山, 功率 500 W, 频率 40 KHz), Mettler Toledo AX205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药 鸟苷(批号 0193, 纯度 > 99%), Amresco 公司; 阿昔洛韦对照品(含量测定用, 140630-200001), 购自中国药品生物制品检定所。野生半夏采自北京房山, 栽培半夏采自北京师范大学房山综合试验基地, 秋季采挖, 洗净, 除去外皮和须根, 晒干, 经鉴定为天南星科植物半夏 *P. ternate* (Thunb.) Breit 的干燥块茎。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 内标储备溶液: 取阿昔洛韦对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.4% NaOH 溶液超声溶解, 定容至刻度, 摇匀, 配成 0.5 g · L⁻¹ 的溶液, 备用。

鸟苷储备溶液: 取鸟苷对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.4% NaOH 溶液超声溶解,

定容至刻度, 摇匀, 配成 0.5 g · L⁻¹ 的溶液, 备用。

混合对照品溶液: 精密吸取鸟苷对照品储备溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加内标储备溶液 1.0 mL, 0.4% NaOH 溶液稀释至刻度, 即得混合对照品溶液。

供试品溶液的制备: 取过 40 目筛的半夏药材样品细粉 1.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加 30% 甲醇 20 mL, 超声提取 2 次, 第 1 次 30 min, 第 2 次 15 min, 滤过, 合并滤液, 回收溶剂至干, 残渣加 0.4% NaOH 溶液使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 精密加入 0.5 g · L⁻¹ 的阿昔洛韦对照品溶液 1.0 mL, 用 0.4% NaOH 溶液稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 毛细管电泳测定条件 经 NaOH 溶液调 pH 至 9.0 的 0.8 mol · L⁻¹ 硼酸溶液-0.1 mol · L⁻¹ 硼砂溶液-乙腈(50:50:13) 作为缓冲溶液, 电压 25 Kv, 压差进样 5 s, 检测波长 254 nm, 32 Karat Software 工作站。

2.3 校正因子的测定 取混合对照品溶液在上述条件下平行测定 5 次, 计算校正因子为 0.831 8, RSD 为 0.5%。计算公式为校正因子 $f = (A_s/C_s)/(A_r/C_r)$, 式中 A_s 和 A_r 分别为内标物阿昔洛韦和鸟苷对照品的峰面积, C_s 和 C_r 分别为内标物阿昔洛韦和鸟苷对照品的浓度。

2.4 线性范围 精密量取阿昔洛韦内标储备溶液 1.0 mL 分别置 5 个 10 mL 量瓶中, 分别精密加入鸟苷储备溶液 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mL, 制得含阿昔洛韦和鸟苷的混合标准溶液, 其中阿昔洛韦浓度 0.05 g · L⁻¹, 鸟苷浓度分别为 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15 g · L⁻¹。在 2.2 项毛细管电泳测定条件下进样测定, 以相对峰面积(鸟苷/阿昔洛韦)作为纵坐标(A), 以鸟苷含量(mg)为横坐标(C), 进行线性回归。结果鸟苷在 0.25 ~ 1.5 mg 线性关系良好 ($r = 0.999 1$), 回归方程为 $A = 2.566 78 C + 0.042 65$ 。

2.5 精密度试验 取含阿昔洛韦、鸟苷各 0.05 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液, 按上述的电泳条件连续进样 5 次测定, 鸟苷与阿昔洛韦峰面积比的 RSD 1.2%, 表明精密度良好。

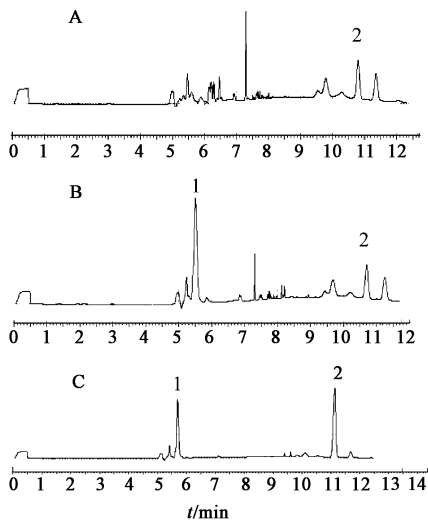
2.6 重复性试验 取野生半夏药材样品细粉 5 份, 按照供试品溶液制备方法制备, 在 2.2 项下毛细管电泳条件下测定, 测得鸟苷平均含量为 0.40 mg · g⁻¹, RSD 2.1% ($n = 5$), 说明本法重复性较好。

2.7 回收率试验 取已知鸟苷含量(测得含量 $0.39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)的半夏药材细粉5份各 0.5 g ,分别精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入 $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鸟苷对照品溶液 1.0 mL ,加30%甲醇 20 mL ,超声提取2次,第1次 30 min ,第2次 15 min ,滤过,合并滤液,回收溶剂至干,残渣加 0.4% NaOH溶液使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,精密加入 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿昔洛韦对照品溶液 1.0 mL ,用 0.4% NaOH溶液稀释至刻度,摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液依法测定,鸟苷的加样回收率如表1所示。

表1 鸟苷回收率试验($n=5$)

称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.502 1	0.195 8	0.405	104.82		
0.497 8	0.194 1	0.394	100.38		
0.491 2	0.191 6	0.398	103.67	102.01	2.4
0.505 6	0.197 2	0.395	98.88		
0.496 8	0.193 8	0.398	102.30		

2.8 样品测定 取野生和栽培半夏药材样品细粉(过40目筛)各3份,每份 1.0 g ,精密称定,置锥形瓶中,加30%甲醇 20 mL ,超声提取2次,第1次 30 min ,第2次 15 min ,滤过,合并滤液,回收溶剂至干,残渣加 0.4% NaOH溶液使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,精密加入 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿昔洛韦对照品溶液 1.0 mL ,用 0.4% NaOH溶液稀释至刻度,摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即为供试液,见图2。按上述毛细管电泳条件进行测定。不同批次半夏药材测定结果见表2,结果表明野生和栽培半夏鸟苷含量



A. 半夏药材; B. 半夏药材加阿昔洛韦; C. 鸟苷回收率;
1. 阿昔洛韦; 2. 鸟苷

图2 半夏药材HPCE图谱

差异显著,说明栽培过程中氮、磷、钾等肥料的施用等因素可能显著影响半夏中鸟苷含量。

表2 野生和栽培半夏鸟苷含量测定($n=3$)

样品	鸟苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
栽培半夏1批	0.133 7	1.7
栽培半夏2批	0.573 5	2.1
栽培半夏3批	0.628 3	1.2
野生半夏1批	0.390 2	0.3

3 讨论

3.1 毛细管电泳测定条件的选择 实验中发现缓冲溶液中硼酸和硼砂合用时半夏中组分分离效果较好,缓冲溶液体系中加入乙腈可以显著改善其分离度和选择性,可能与加入乙腈能够增加溶质溶解度、减小管壁的吸附效应等因素有关,但过高会导致电流中断而使分离失败。此外缓冲液pH也显著影响分离效率和迁移时间,可能是影响待测组分的解离和荷电所致。实验确定经NaOH溶液调pH至9.0的 $0.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸溶液- $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂溶液-乙腈(50:50:13)作为缓冲溶液分离效果最好。该实验条件下腺苷也能获得理想的分离,实验中曾对腺苷进行检测,但由于所采集样品腺苷含量太低而均未检出。

3.2 提取条件的选择 结合文献报道^[3-5],本文采用30%甲醇作为提取溶剂,并考察了超声提取和提取次数对鸟苷提取效率的影响,结果表明采用30%甲醇作为提取溶剂超声处理 30 min ,样品中鸟苷即已基本提取完全,为保证样品提取充分,本文超声提取两次,第1次 30 min ,第2次 15 min 。后续处理中考虑到鸟苷分子结构中的鸟嘌呤基团,用 0.4% NaOH溶液溶解残渣。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:110.
- [2] 吴皓,文红梅,郭戎,等.半夏姜制对鸟苷含量的影响[J].中国中药杂志,1998,23(11):661.
- [3] 张科卫,吴皓,崔小兵,等.不同产区半夏药材中鸟苷含量的测定[J].中成药,2000,22(11):769.
- [4] 赵杨,靳风云,伍庆,等.高效液相色谱法测定贵州不同产地半夏药材中鸟苷和腺苷的含量[J].时珍国医国药,2007,18(1):23.
- [5] 修彦凤,洪筱坤,王智华.数字化色谱指纹谱法控制姜半夏的质量[J].中国医院药学杂志,2006,26(9):1108.

[责任编辑 蔡仲德]