

高效毛细管电泳法同时测定二陈汤中 3 种成分含量

张超云^{1*}, 黄显章¹, 高言明²

(1. 南阳理工学院, 南阳 河南 473004; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 建立二陈汤中橙皮苷、甘草酸和甘草次酸的高效毛细管电泳(HPCE)含量测定方法。方法: 采用高效毛细管电泳法, 电泳条件为未涂层石英毛细管柱 $50\ \mu\text{m} \times 95\ \text{cm}$ (有效长度 $86.5\ \text{cm}$), 运行缓冲液 $50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液(含 10% 乙腈, pH 9.28); 压力进样 $50\ \text{kPa} \times 20\ \text{s}$, 电压为 $24\ \text{kV}$, 柱温 $20\ ^\circ\text{C}$, 检测波长 $254\ \text{nm}$ 。结果: 橙皮苷、甘草酸与甘草次酸分别在 $0.10 \sim 2.40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.04 \sim 0.72\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.01 \sim 0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系, r 分别为 $0.999\ 4$, $0.999\ 4$, $0.999\ 6$, 平均回收率分别为 98.17% , 98.72% , 98.48% , RSD 分别为 1.49% , 2.95% , 2.25% 。结论: 该方法简便、快速、准确, 在一定程度上弥补了高效液相法的不足, 为二陈汤电泳指纹图谱的建立提供了依据, 并为该方药效物质基础的研究奠定了基础。

[关键词] 二陈汤; 高效毛细管电泳; 橙皮苷; 甘草酸; 甘草次酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0048-03

Simultaneous Determination of Three Active Constituents in Erchen Tang by High Performance Capillary Electrophoresis

ZHANG Chao-yun^{1*}, HUANG Xian-zhang¹, GAO Yan-ming²

(1. NanYang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;

2. GuiYang College of Traditionl Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance capillary electrophoresis(HPCE) method for the determination of hesperidin, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in Erchen Tang. **Method:** Fused silica capillary coated ($50\ \mu\text{m} \times 95\ \text{cm}$) with detection window at $86.5\ \text{cm}$ from anode was employed and $50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax solution (10% acetonitrile, pH 9.28) served as the running buffer. Other conditions were as follows: electrokinetic injection 20 s. analytical voltage $24\ \text{kV}$, detection wavelength $254\ \text{nm}$ and temperature $20\ ^\circ\text{C}$. **Result:** The linearity of hesperidin was in the range of $0.10\text{-}2.40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999\ 4$), the average recovery was 98.17% and RSD 1.49% . The linearity of glycyrrhizic acid was in the range of $0.04\text{-}0.72\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999\ 4$), the average recovery was 98.72% and RSD 2.95% . The linearity of glycyrrhetic acid was in the range of $0.01\text{-}0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999\ 6$), the average recovery was 98.48% and RSD 2.25% . **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate and it provides the basis of the fingerprints of CE and composite herbal medicines.

[Key words] Erchen Tang; high performance capillary electrophoresis; hesperidin; glycyrrhizic acid; glycyrrhetic acid

[收稿日期] 20100521(003)

[基金项目] 南阳理工学院 2009 年度科研基金项目
(NG2009KYJJ17)

[通讯作者] *张超云, 中药学硕士, 讲师, 主要从事中药复方研究及新药开发, Tel: 0377-62071302, E-mail: chaoyun801123@yahoo.com.cn

二陈汤, 源于宋代《太平惠民和剂局方》, 燥湿化痰, 理气和中, 为祛痰的基础方剂。组合严谨, 君臣协调, 衍生者多, 疗效可靠。目前有关二陈汤的有效成分含量测定, 主要是对某单个有效成分的测定。本研究建立了利用 HPCE 法同时测定橙皮苷、甘草酸、甘草次酸的含量的方法。

1 材料

1.1 仪器 HP-3D-CE(美国惠普);未涂层石英毛细管 $50\ \mu\text{m} \times 95\ \text{cm}$ (有效长度 $86.5\ \text{cm}$)(河北永年光道纤维厂);METTLER TOLEDO 320 pH 计(梅特勒-托利多上海仪器有限公司);METTLER AE 240 分析天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司)。

1.2 试剂 硼砂(中国上海同济大学);碳酸钠(中国上海虹光化学厂);乙腈为色谱纯(天津科密欧化学试剂开发中心);甲醇为色谱纯(天津科密欧化学试剂开发中心)。

1.3 药材 方中药材均由同济堂药房提供,并由贵阳中医学院生药教研室刘芄教授鉴定,半夏、橙皮、茯苓、甘草 4 味药材均为 2005 年版《中国药典》收载品^[1]。

1.4 对照品 橙皮苷、甘草酸、甘草次酸对照品均购自江西本草天工科技有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 运行缓冲液 $50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液(含 10% 乙腈, pH 9.28);压力进样 $50\ \text{kPa} \times 20\ \text{s}$, 电压为 $24\ \text{kV}$, 柱温 $20\ ^\circ\text{C}$, 检测波长 $254\ \text{nm}$;开机后先用 $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠冲洗毛细管 $15\ \text{min}$, 两次进样间用 $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠和缓冲液分别冲 $15\ \text{min}$ 。

2.2 供试品溶液与对照品溶液制备

2.2.1 供试品溶液制备 分别精密称取半夏 $5\ \text{g}$ 、橙皮 $5\ \text{g}$ 、茯苓 $3\ \text{g}$ 、甘草 $2\ \text{g}$, 加 10 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 $60\ \text{min}$, 合并水煎液, 过滤, 减压浓缩成浸膏, 精密称取浸膏约 $1.0\ \text{g}$, 精密加入甲醇 $100\ \text{mL}$, 称重, 超声提取 $30\ \text{min}$, 冷却后补重, 过滤, 于 $100\ \text{mL}$ 量瓶中定量, 用微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称取橙皮苷、甘草酸及甘草次酸对照品适量, 用甲醇溶解, 分别制备成 $2.40, 0.72, 0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液, 备用。

2.3 定性实验 按照 2.2.1 项制备供试品溶液, 按照 2.2.2 项制备对照品溶液, 并制备样品加对照品溶液, 分别按 2.1 项电泳条件进样, 所得 HPCE 图谱见图 1。

2.4 线性关系的考察

2.4.1 橙皮苷线性关系的考察 取橙皮苷对照品溶液, 用甲醇分别稀释成 $0.10, 0.20, 0.40, 1.20, 1.60, 2.40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照溶液。按 2.1 中电泳条件进样, 以对照品的峰面积与浓度作线性回归, 回归方程

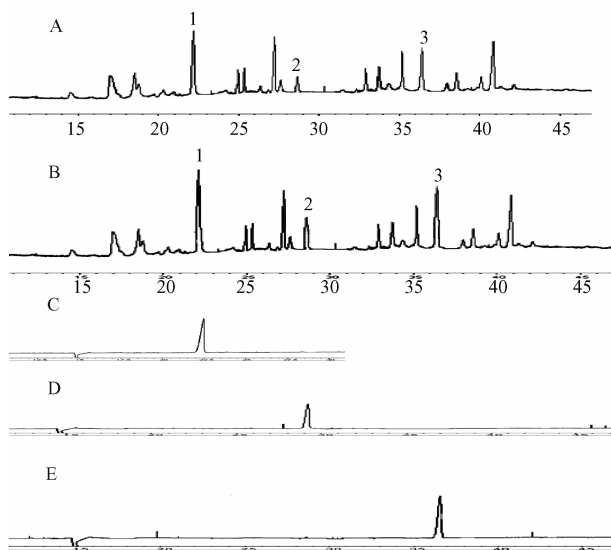


图 1 二陈汤样品与对照品 HPCE 图谱

1. 橙皮苷;2. 甘草次酸;3. 甘草酸;A. 二陈汤;B. 二陈汤加对照品;C. 橙皮苷;D. 甘草次酸;E. 甘草酸。

为 $A = 3.44 \times 10^2 C - 0.4787$, $r = 0.9994$ 。表明在 $0.10 \sim 2.40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.2 甘草酸线性关系的考察 取甘草酸对照品溶液, 用甲醇分别稀释成 $0.04, 0.08, 0.12, 0.18, 0.36, 0.72\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照溶液, 按上述条件进行电泳, 以对照品的峰面积与浓度作线性回归, 回归方程为 $A = 8.81 \times 10^2 C + 12.634$, $r = 0.9994$ 。表明在 $0.04 \sim 0.72\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.3 甘草次酸线性关系的考察 取甘草次酸对照品溶液, 用甲醇分别稀释成 $0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.09, 0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照溶液, 按 2.1 中电泳条件进样, 以对照品的峰面积与浓度作线性回归, 回归方程为 $A = 1.86 \times 10^2 C + 5.8639$, $r = 0.9996$ 。表明在 $0.01 \sim 0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取 2.2.2 中对照品溶液, 分别稀释为 $0.80\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 橙皮苷、 $0.18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草酸和 $0.02\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸, 分别按 2.1 电泳条件连续进样 6 次, 测得橙皮苷、甘草酸和甘草次酸的峰面积, 计算其 RSD 分别为 1.95% , 1.83% , 2.25% 。

2.6 稳定性试验 取 2.2.1 中供试品溶液, 按 2.1 电泳条件每隔 $2\ \text{h}$ 进一次样, 共进 6 次, 分别测得橙皮苷、甘草酸、甘草次酸的峰面积, 计算其 RSD 分别为 1.69% , 1.26% , 2.33% , 表明样品在 $24\ \text{h}$ (相隔时间和电泳时间的累计)内稳定。

2.7 重复性试验 按 2.2.1 中供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 电泳条件分别进样,

分别测得橙皮苷、甘草酸、甘草次酸的峰面积, 计算其 RSD 分别为 2.31%、2.73%、2.99%。

2.8 加样回收率试验

2.8.1 橙皮苷回收率试验 精密称取 6 份已经测定含量的供试品溶液, 分别精密加入 $0.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 橙皮苷对照品溶液适量, 定容至 10 mL 量瓶中, 按照 2.1 电泳条件进样, 测定橙皮苷含量, 计算回收率。结果平均加样回收率为 98.17%, RSD 1.49%, 结果见表 1。

表 1 橙皮苷回收率试验 ($n=6$)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
4.105	4.000	7.804	96.29		
3.984	4.000	7.808	97.80		
3.924	4.000	7.813	98.61	98.17	1.49
4.118	4.000	7.883	97.12		
3.892	4.000	7.936	100.50		
4.028	4.000	7.922	98.8		

2.8.2 甘草酸回收率试验 精密称取 6 份已经测定含量的供试品溶液, 分别精密加入 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草酸对照品溶液适量, 定容至 10 mL 量瓶上, 按照 2.1 电泳条件进样, 测定甘草酸含量, 计算回收率。结果平均加样回收率为 98.72%, RSD 2.95%。见表 2。

表 2 甘草酸回收率试验结果 ($n=6$)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1.092	1.000	2.017	96.42		
1.055	1.000	1.956	95.19		
1.082	1.000	2.063	99.18	98.72	2.95
1.067	1.000	2.024	97.88		
1.036	1.000	2.044	100.40		
1.015	1.000	2.082	103.31		

2.8.3 甘草次酸回收率试验 精密称取 6 份已经测定含量的供试品溶液, 分别精密加入 $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草次酸对照品溶液适量, 定容至 10 mL, 按照 2.1 电泳条件进样, 测定甘草次酸含量, 计算回收率。结果结果平均加样回收率为 98.48%, RSD 2.25%, 结果见表 3。

2.9 二陈汤供试品溶液含量测定 按照 2.2.1 中供试品制备方法平行制备 3 份样品, 按照 2.1 电泳条件进样, 分别测定橙皮苷、甘草酸和甘草次酸的含

量(浸膏中含量), 计算其 RSD 值, 结果见表 4。

表 3 甘草次酸回收率试验 ($n=6$)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.157	0.150	0.299	97.32		
0.155	0.150	0.301	98.60		
0.145	0.150	0.291	98.60	98.48	2.25
0.152	0.150	0.290	96.24		
0.149	0.150	0.300	100.25		
0.148	0.150	0.304	101.87		

表 4 二陈汤供试品溶液含量

No.	橙皮苷	甘草酸	甘草次酸
1	40.124	10.302	1.478
2	38.986	10.885	1.516
3	41.025	10.623	1.542

3 讨论

本试验在确定电泳条件的前期试验中做了大量的工作。首先是缓冲溶液的选择, 我们分别使用了 10, 20, 30, 40, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液, 以及不同比例的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液, 确定了 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液, 同时为了使最终效果更佳, 我们尝试加入改良剂, 分别加入 5% ~ 30% 的甲醇和乙腈, 确定了加入 10% 的乙腈效果最好, 故我们最终确定缓冲溶液为 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂溶液 (10% 乙腈)。其次是柱长和电压的选择, 分别使用 10 ~ 30 kV 的电压, 确定了 24 kV 为最佳电压; 又分别使用 50 ~ 100 cm 的色谱柱, 确定了 95 cm (有效长度 87.5 cm) 的最佳柱长^[2-5]。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:78, 136, 166, 59.
- [2] 关福玉. 毛细管电泳技术在药物分析中的应用[J]. 国外医学·药学分册, 1993, 20 (5):295.
- [3] 相秉仁, 张正行. 高效毛细管电泳法 (HPCE) 在药物分析及分离上的应用进展[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25 (6):380.
- [4] 沈阳, 庄峙夏, 王小如. 高效毛细管电泳法分离测定不同种类甘草药材中甘草酸的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18 (增刊):29.
- [5] 孙国祥, 孙毓庆, 王宇. 复方甘草片的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2003, 1 (3):131.

[责任编辑 顾雪竹]