

# 高效毛细管电泳法测定乌骨藤药材及其制剂中绿原酸的含量

赵陆华,相秉仁\*,谭喜莹(药物质量与安全预警教育部重点实验室,中国药科大学分析测试中心,南京 210009)

**摘要:**目的 建立毛细管电泳法测定乌骨藤药材及其制剂中绿原酸的含量。方法 未涂层毛细管柱(50  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm,有效长度 42 cm);缓冲液:200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸与 10%甲醇(NaOH溶液调节至  $\text{pH}=8.0$ );分离电压:30 kV;检测波长:328 nm;温度:25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样条件:50 mbar,5.0 s。结果 绿原酸浓度在 21.0 ~ 105.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, $r=0.9997$ ,平均回收率为 99.16%,RSD为 0.8%。结论 本法简便、准确、重复性好,可为乌骨藤药材及其制剂的质量研究提供一种新的分析方法。

**关键词:**乌骨藤;绿原酸;毛细管电泳;消癌平片;消癌平注射液

中图分类号:R931.6 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)02-0152-03

## Determination of Chlorogenic Acid in *Marsdenia tenocissima* and Its Preparations by High Performance Capillary Electrophoresis

ZHAO Lu-hua, XIANG Bing-ren\*, TAN Xi-ying(Drug Quality Control and Pharmacovigilance Laboratory, Ministry of Education, Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a determination method for chlorogenic acid of *Marsdenia tenocissima* and two relative preparations, Xiaoaiping tablets and Xiaoaiping injections, by capillary electrophoresis. **METHODS** The separation was carried out in an uncoated fused silica capillary (50  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm). The running voltage was 30 kV. The buffer was 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  boric acid ( $\text{pH}$  8.0) containing 10% methanol, and the wavelength was 328 nm. **RESULTS** The linear range of the calibration curve was 21.0 ~ 105.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9997$ ), and the average recovery was 99.16%, RSD was 0.8%. **CONCLUSION** This method is proved to be simple, rapid and accurate, and can be used as a new method for the quality control of *Marsdenia tenocissima* and its preparations. **KEY WORDS:** *Marsdenia tenocissima*; chlorogenic acid; capillary electrophoresis; Xiaoaiping table; Xiaoaiping injection

乌骨藤,又名通光藤,为萝藦科植物乌骨藤 *Marsdenia tenocissima* (Roxb) Wight et Arn 的藤茎,主产于贵州、云南等地,具有消炎、平喘、抗肿瘤之功效<sup>[1]</sup>。其单味药制剂消癌平片、消癌平注射液收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第二十册,临床上用于食道癌、胃癌、肺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤的治疗,并可用于治疗慢性气管炎和支气管哮喘<sup>[2]</sup>。绿原酸是乌骨藤药材及其制剂中的主要活性成分之一,具有抗诱变、抗菌、抗病毒等作用。目前,乌骨藤及其制剂中绿原酸的含量测定方法主要有高效液相色谱法和分光光度法<sup>[3-4]</sup>,毛细管电泳法(HPCE)测定乌骨藤中绿原酸的含量尚未见报道。笔者首次建立了 HPCE法测定乌骨藤药材及其制剂中绿原酸的含量,方法简单快捷,结果令人满意,为该药材及其制剂的质量研究提供了一种新方法。

### 1 仪器与试剂

HPG1600A毛细管电泳仪(美国安捷伦公司),DAD检测

器,HP化学工作站。融熔石英毛细管(河北永年光纤厂)。

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200212);乌骨藤药材(产地云南,南京圣和制药厂提供),经中国药科大学宋学华教授鉴定为乌骨藤 *Marsdenia tenocissima*;消癌平片剂及消癌平注射液(南京圣和制药厂提供)。

硼酸、氢氧化钠均为分析纯;甲醇为色谱纯;水为乐百氏纯净水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 电泳条件

毛细管柱:未涂层毛细管柱(50  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm,有效长度 42 cm);缓冲液:200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸和 10%甲醇(NaOH溶液调节至  $\text{pH}=8.0$ );分离电压:30 kV;检测波长:328 nm;温度:25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样条件:50 mbar,5.0 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,纯净水冲洗 15 min,运行缓冲液冲洗 10 min。进样前分别用 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2005100)

作者简介:赵陆华,女,副研究员

Tel: (025) 83271185

E-mail: zhaoluhua@hotmail.com

\* 通讯作者:相秉仁,教授,博士生导师

氢氧化钠、纯净水和缓冲液各冲洗 3 min。每 5 次进样后更换缓冲液。

## 2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得储备液。取储备液 5 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加缓冲液至刻度, 得  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液作为对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备

取乌骨藤药材粉末 3 g, 精密称定, 加 50% 甲醇 50 mL, 浸泡 30 min, 超声 60 min, 放冷, 滤过, 浓缩, 转移至 10 mL 量瓶中, 用运行缓冲液分次洗涤容器, 洗液置同一量瓶中, 加运行缓冲液至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 ( $0.22 \mu\text{m}$ ) 滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.4 线性关系考察

精密吸取对照品储备液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 ( $0.22 \mu\text{m}$ ) 滤过, 分别进样, 记录色谱图。以对照品浓度 ( $X$ ) 为横坐标, 峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标进行回归, 线性方程为:  $Y = 0.5464X + 4.9522$ ,  $r = 0.9997$ 。结果表明, 绿原酸在  $21.0 \sim 105.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

## 2.5 精密度试验

取对照品溶液 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 连续进样 6 次, 记录绿原酸峰面积, 结果表明峰面积的 RSD 为 1.2%。

## 2.6 稳定性试验

取“2.3”项下溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 测得绿原酸的峰面积 RSD 为 1.8%, 表明样品溶液在 8 h 内稳定, 均可测定。

## 2.7 重复性试验

取同一批乌骨藤药材 6 份, 按“2.3”项下制备成供试品溶液, 分别进样, 测定绿原酸含量的 RSD 为 2.1%, 表明方法可行, 重复性好。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取已测含量的样品 ( $212.42 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 1.5 g, 精密加入对照品适量, 配成中间浓度溶液, 按“2.3”项下方法操作, 平行操作 6 份, 计算加样回收率。平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.3%, 结果见表 1。

表 1 乌骨藤药材中绿原酸的加样回收率试验结果

Table 1 Result for recovery tests of chlorogenic acid in *Marsdenia tenocissima*

编号	取样量/g	样品含量/ $\mu\text{g}$	对照品加入量/ $\mu\text{g}$	测得总量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值	RSD
1	1.502	319.1	318.2	639.2	320.1	100.6		
2	1.495	317.6	318.2	638.2	320.6	100.8		
3	1.536	326.3	318.2	640.2	313.9	98.7	100.4	1.3
4	1.524	323.7	318.2	641.1	317.4	99.7		
5	1.498	318.2	318.2	639.2	321.0	100.9		
6	1.496	317.8	318.2	641.2	323.4	101.6		

## 2.9 样品含量测定

分别取三批乌骨藤药材各 3 g, 精密称定, 按“2.3”项下

制备成供试品溶液, 在选定的色谱条件下测定绿原酸含量, 0501111, 0510121 和 0605032 三批的测定结果分别为 96.42, 86.50 和  $12.42 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。对照品和供试品色谱图见图 1 (A, B)。

取消癌平注射液 5 mL, 精密量取, 至 10 mL 量瓶中, 加运行缓冲液至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 ( $0.22 \mu\text{m}$ ) 滤过, 取续滤液, 即得。在选定的色谱条件下测定绿原酸含量, 三批消癌平注射液中绿原酸含量分别为 2.021, 2.234, 1.982 mg/皮, 供试品色谱图见图 1 (C)。

取消癌平片, 除去包衣, 研细, 取 3g, 精密称定, 按“2.3 项”下制备成供试品溶液, 在选定的色谱条件下测定绿原酸含量, 三批消癌平片中绿原酸含量分别为 0.172 mg/片, 0.168 mg/片, 0.189 mg/片, 供试品色谱图见图 1 (D)。

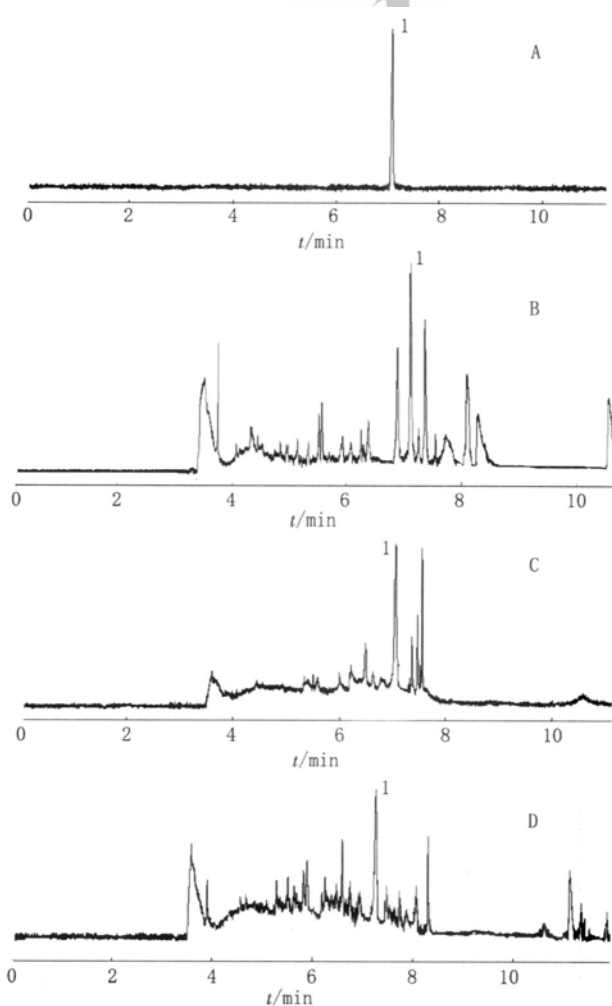


图 1 绿原酸对照品 (A) 与乌骨藤药材 (B)、消癌平注射液 (C)、消癌平片 (D) 的 HPLC 图谱

1 - 绿原酸

Fig 1 HPLC chromatograms of chlorogenic acid (A) and samples of *Marsdenia tenocissima* (B), Xiaoaiping injection (C), Xiaoaiping Tablet (D)

1 - chlorogenic acid

## 3 讨论

### 3.1 测定波长的选择

取绿原酸对照品溶液为分析对象,以  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸 (pH 8.0) 为运行缓冲液,在  $200 \sim 400 \text{ nm}$  进行二极管阵列扫描,结果在  $328 \text{ nm}$  处吸收大,检测灵敏度高,基线稳定。故选择  $328 \text{ nm}$  为检测波长。

### 3.2 缓冲液 pH 值的选择

绿原酸为酚酸类化合物,具有弱酸性,缓冲液的条件摸索主要在 pH 值  $7 \sim 9$  弱碱性范围内进行。随着 pH 值的增加,绿原酸与周围物质的分离度增大,迁移时间也随之增长。结果表明,当 pH 为 8 时,绿原酸与周围物质能够达到基线分离且迁移时间适宜。

### 3.3 缓冲液的种类和浓度的选择

考察了磷酸盐、硼砂和硼酸缓冲液系统。试验发现采用硼酸为缓冲液时,峰形对称,分离效率高,且当浓度达到  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,绿原酸与周围组分离度达到最佳。

### 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。本试验考察了甲醇含量为  $5\% \sim 25\%$  对分离的影响。结果表明,随着甲醇含量的增加,绿原酸与周围组分的分离度增加,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  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸含  $10\%$  甲醇 (pH = 8.0)。

### 3.5 运行电压的选择

提高分离电压可以缩短分析时间,试验中考察了  $10 \sim 30$

kV 电压时绿原酸的分离情况。电压为  $30 \text{ kV}$  时分离时间短,分离效率高且峰形尖锐,因此选择  $30 \text{ kV}$  为分离电压。

3.6 高效毛细管电泳作为一种新的分离分析方法,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。本试验建立的乌骨藤药材及其制剂中绿原酸的毛细管电泳分离分析方法,可使绿原酸与其他组分得到完全分离,为乌骨藤及其制剂中绿原酸的含量分析提供了一种新的色谱参考条件。

## REFERENCES

- [1] State Administration of Traditional Chinese Medicine. Selected Works of Chinese Bencao (No. 6). Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998: 372-374.
- [2] The Drug Standard of Ministry of Health. The Preparation of Chinese Traditional Medicine (No. 20) [S]. 1998: 277.
- [3] LIU Q F, CAO H, JIN X D, et al. Determination of total phenolic acid in Xiaoaiping injection by Colorimetry [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2003, 18(3): 220-222.
- [4] TAN C Y, LEI Y P. Determination of chlorogenic acid in *Marsdenia tenocissima* and its preparations Xiaoaiping tablet by HPLC [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中医药学刊), 2004, 22(7): 354.

收稿日期: 2007-01-11