

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.025

毛细管区带电泳测定大黄提取物中有效成分的含量*

曾雪^{1,2,3}, 杨元娟^{1Δ}, 陈竹^{4,5}, 刘应杰¹, 夏培元²

(1. 重庆医药高等专科学校 401331; 2. 第三军医大学西南医院药剂科, 重庆 400050; 3. 重庆市药物制剂工程技术研究中心 401331; 4. 重庆市食品药品检验检测研究院 401121; 5. 重庆市化学药品质量控制与评价协同创新中心 401121)

[摘要] **目的** 采用毛细管区带电泳测定大黄提取物中大黄素、大黄酚和大黄酸的含量。**方法** 以熔融石英毛细管柱(67.4 cm×75.0 μm, 有效长度 51.0 cm)为分离柱, 60 mmol/L Na₂B₄O₇, 40 mmol/L Na₂CO₃, 40 mmol/L β-环糊精(pH 8.9)为缓冲溶液, 检测波长 254 nm。**结果** 大黄提取物含量测定中大黄素、大黄酚和大黄酸精密度的相对标准偏差(RSD)分别为 1.79%、4.46%和 2.30%; 3 组分共同线性范围为 1.1~19.0 mg/mL; 大黄素、大黄酚和大黄酸的平均回收率分别为 100.14%、99.65%和 98.44%, RSD 分别为 2.43%、2.54%和 2.02%(n=3)。**结论** 该方法可用于大黄提取物的含量检测。

[关键词] 电泳, 毛细管; 大黄; 含量测定

[中图法分类号] R914.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)02-0220-03

Measurement of effective constituents contents in rhubarb by capillary electrophoresis*

ZENG Xue^{1,2,3}, YANG Yuanjuan^{1Δ}, CHEN Zhu^{4,5}, LIU Yingjie¹, XIA Peiyuan²

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2. Department of Pharmacy, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400050, China; 3. Chongqing Engineering Technology Research Center of Pharmaceutical Preparation, Chongqing 401331, China; 4. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 5. Collaborative Innovation Center for Chemical Medicine Quality Control and Evaluation, Chongqing 401121, China)

[Abstract] **Objective** To adopt the capillary electrophoresis(HPCE) for detecting the contents of emodin, chrysophanol and rhein in the extract of rheum officinale. **Methods** The detection was executed with a fused-silica capillary column(67.4 cm×75.0 μm, effective length 51.0cm) as the separation column. The buffer solution consisted of 60 mmol/L Na₂B₄O₇, 40 mmol/L Na₂CO₃ and 40 mmol β-cyclodextrin(pH 8.9). The detection wavelength was 254 nm. **Results** RSD of precision in emodin, chrysophanol and rhein was 1.79%, 4.46% and 2.30%, respectively. The linear range of 3 components was 1.1—19.0 mg/mL; the average recovery rates of emodin, chrysophanol and rhein were 100.14%, 99.65% and 98.44% respectively, RSD was 2.43%, 2.54% and 2.02% respectively(n=3). **Conclusion** The method can be used in the content determination of rheum officinale extract.

[Key words] electrophoresis, capillary; rheum officinale; content determination

药用大黄是我国常用中药,具有多种药理作用^[1-3]。有效成分的检测方法主要有纸色谱法、柱色谱法(HPLC)^[4]、薄层色谱法^[5]和高效液相色谱法^[6-8],但液相色谱操作过程复杂,流动相处理要求高,试剂消耗量大。高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)是一种具有灵敏度和分辨率高、成本较低的分析技术^[9-10]。本研究以大黄为对象,回流提取有效成分,并采用高效毛细管电泳作为分离和检测手段,通过加入 β-环糊精和调节缓冲溶液 pH 实现更好分离效率,该方法国内尚无相关研究,是液相色谱法的一个有力补充^[11-13]。

1 材料与方 法

1.1 材料 CL1020 高效毛细管电泳仪(紫外检测器,北京彩陆仪器有限公司,中科院研究生院应化所,中国),GWA-UN1 型超纯水器(北京普析通用仪器有限公司,中国),SK-1 涡旋混合器(常州市国旺仪器制造有限公司,中国),AUX220 电子天平(岛津,日本)。Na₂B₄O₇·10 H₂O(分析纯,重庆北碚精细化工工厂);无水碳酸钠(分析纯,重庆北碚精细化工工厂);羟丙

基-β-环糊精(HP-β-CD, 相对分子量 1 459.8, ACROS ORGANICS, New Jersey, USA); 大黄素(C₁₅H₁₀O₅, 批号 must-14110704)、大黄酚(C₁₅H₁₀O₄, 批号 must-14072415)和大黄酸(C₁₅H₈O₆, 批号 must-14072401, HPLC 纯度大于或等于 98.0%)对照品(美仑生物科技有限公司,中国),药用大黄饮片(四川省阿坝州松潘县药用大黄栽培基地),其他试剂均采用分析纯。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品、大黄酸对照品和大黄酚对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含大黄素、大黄素、大黄酚各 8.0 mg 的对照品贮备液;分别精密量取上述对照品贮备液各 2 mL,定容至 10 mL,混合摇匀,即得(每 1 mL 中大黄素、大黄酸、大黄酚各 1.6 mg)。

1.2.2 供试品溶液的制备 取药用大黄饮片粉碎,取粉末(过四号筛)约 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL,置烧瓶中,挥去溶剂,加 8% 盐酸溶液 10 mL,超声处理 5 min,再加三氯

* 基金项目:重庆市科技委员会基础与前沿项目(cstc2014jcyjA10125);重庆市卫生和计划生育委员会中医项目(zy20150242);重庆市卫生和计划生育委员会医学项目(2012-1-093);重庆市教育委员会科技项目(KJ132501);重庆医药高等专科学校校级重点项目(ygz2015101)。作者简介:曾雪(1981—),讲师,硕士,主要从事中药提取及药物分析相关研究。 Δ 通信作者, E-mail: yang_1889@sina.com。

甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得^[14-15]。

1.2.3 电泳条件

1.2.3.1 毛细管预处理 采用 67.4 cm×75.0 μm 石英毛细管柱(有效长度 51.0 cm, 河北永年瑞丰色谱配件有限公司)为分离柱, 毛细管分别用 0.1 mol/L NaOH 冲洗活化 10 min, 水洗 5 min, 再用缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前都分别用 0.1 mol/L NaOH 冲洗 3 min, 水洗 1 min, 再用缓冲溶液冲洗 2 min, 以保证迁移时间和峰面积的重现性。

1.2.3.2 电泳条件设定 分离电压范围: 15~30 kV, 进样方式采用压差进样, 进样时间 5 s, 操作温度 25 ℃, 缓冲溶液: 60 mmol/L Na₂B₄O₇ + 40 mmol/L Na₂CO₃ + 40 mmol/L HP-β-CD(pH 8.9); 供试品缓冲溶液与此相同。

2 结果

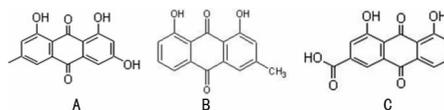
2.1 电泳条件优化

2.1.1 检测波长的选择 大黄素和大黄酸的吸收波长均在 250~270 nm 处, 其中 254 nm 为最大吸收波长。大黄酚在 254, 530 nm 处有最大吸收, 依据中国药典 2015 版, 均采用 254 nm 为检测波长, 因此本实验采用 254 nm 波长为检测波长。

2.1.2 进样方式的选择 毛细管电泳的进样方式对分离效率和重现性有重要影响, 压力进样和电动进样为最常见的两种进样方式, 电动进样对粘度较大的生化样品比较适合, 但测量重现性较差, 且可能因各组分扩散系数的差别而导致迁移速率的改变, 本试验的标本为大黄提取物, 相对生化样品粘度较低, 且注重重现性, 因此选择压力进样作为进样方式。采用进样压力 0.5 psi, 进样实践 0.5 s。

2.1.3 缓冲溶液及浓度的优化 由于大黄素、大黄酚和大黄酸的结构近似, 电荷差异小, 且大黄提取物中成分较多, 采用区带电泳分离模式(CZE)较难实现 3 种目标组分的完全分离, 因此本试验通过在缓冲体系中加入低浓度 HP-β-CD, 在传统的 CZE 电泳模式下引入胶束电色谱模式, 利用 3 组分在分配系

数上的差异, 当 HP-β-CD 浓度达到 40 mmol/L 时, 实现完全分离, 见图 1、2。



A: 大黄素; B: 大黄酚; C: 大黄酸

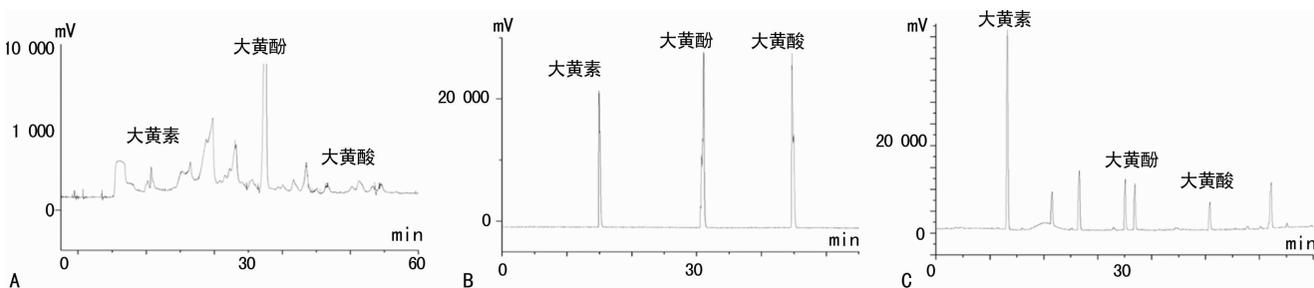
图 1 大黄主要活性成分结构式

2.2 方法学验证

2.2.1 精密性试验 精密量取“1.2.1”项下对照品溶液, 按“1.2.3.1”项下电泳条件连续进样测定 3 次, 记录峰面积。大黄素、大黄酚和大黄酸相对标准偏差(RSD)分别是 1.79%、4.46% 和 2.30%, 表明仪器精密性良好, 见表 1。

2.2.2 线性范围 分别精密吸取“1.2.1”项下大黄素、大黄酚和大黄酸对照品溶液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中定容, 配置成浓度为 1.6 mg/mL 对照品溶液, 再分别吸取对照溶液 0.3、0.8、1.3、1.8、2.3、2.8 mL, 置于 6 个 10 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 得等浓度梯度对照品溶液, 并分别以“1.2.3”项下电泳条件进行电泳分析检测, 分别以 3 组分对照品浓度为横坐标(X), 以对照品峰面积为纵坐标(Y)进行回归计算, 得到大黄素回归方程为: $Y = 0.079 4X - 0.034 6$, $r = 0.995 7$; 大黄酚回归方程为: $Y = 0.085 3X - 0.042 8$, $r = 0.995 9$; 大黄酸回归方程为: $Y = 0.078 4X - 0.073 2$, $r = 0.995 4$, 鉴于压力进样存在一定误差, 3 组分共同线性范围在 1.1~19.0 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.3 回收率试验 精密称取大黄样品粉末约 1.5 g, 共 3 份, 分别置于 5 个锥形瓶中, 按“1.2.2”项下“大黄提取物供试品”方法制备供试品溶液, 先按“1.2.3”项下电泳条件检测并记录每份样品的电泳谱图, 再在每份供试品中加入等量的大黄素、大黄酚和大黄酸对照品各 3 mg, 再次测定其含量, 分别计算大黄素、大黄酚和大黄酸的平均回收率, 结果显示该方法单组分回收率较好, 多组分 RSD 偏高, 分析可能是由于大黄提取物成分较多, 且本方法是同时考察 3 组分在电泳中含量, 目标组分间存在化学性质差异, 导致检测效率不一致所致, 见表 2。



A: CZE 模式下 CE 分离检测; B: HP-β-CD 修饰后 CZE 模式下大黄混合标品 CE 分离检测; C: HP-β-CD 修饰后 CZE 模式下大黄提取物 CE 分离检测

图 2 HP-β-CD 修饰前后大黄毛细管电泳对比图

表 1 精密性试验结果

项目	大黄素			大黄酚			大黄酸		
	第 1 份	第 2 份	第 3 份	第 1 份	第 2 份	第 3 份	第 1 份	第 2 份	第 3 份
峰面积	247 158.50	249 566.94	240 994.23	198 875.60	206 842.45	189 185.32	227 634.32	229 843.51	219 945.82
平均值	246 843.99			198 301.13			225 807.88		
RSD(%)	1.79			4.45			2.30		

表 2 回收率试验结果($n=3$)

项目	大黄素			大黄酚			大黄酸		
	第 1 份	第 2 份	第 3 份	第 1 份	第 2 份	第 3 份	第 1 份	第 2 份	第 3 份
取样量(g)	1.475 1	1.512 6	1.521 0	1.475 1	1.512 6	1.521 0	1.475 1	1.512 6	1.521 0
样品含量(mg)	3.343 2	3.312 1	3.430 2	1.913 4	1.937 4	1.913 2	2.225 1	2.201 6	2.234 2
加入量(mg)	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0	3.000 0
测定量(mg)	6.337 2	6.481 2	6.290 2	4.892 2	4.917 1	4.903 2	5.198 9	5.001 2	5.217 1
加样回收率(%)	99.91	102.68	97.82	99.57	99.59	99.80	99.49	96.15	99.67
平均加样回收率(%)	100.14			99.65			98.44		
RSD(%)	2.43			2.54			2.02		

2.3 样品含量测定 对 3 批样品进行含量测定,分别精密称取不同批次大黄药材样品粉末约 1.5 g,按“1.2.2”项下“大黄提取物供试品”方法制备供试品溶液,再按“1.2.3”项下电泳条件进行电泳分离检测,分别记录大黄素、大黄酚和大黄酸含量,见表 3。

表 3 3 批次样品中大黄提取物的含量测定结果($n=3, \%$)

项目	第 1 批	第 2 批	第 3 批
大黄素			
含量	0.214	0.224	0.212
RSD		2.970	
大黄酚			
含量	0.165	0.173	0.164
RSD		2.950	
大黄酸			
含量	0.141	0.137	0.143
RSD		2.180	

3 讨论

大黄素、大黄酚、大黄酸 3 组分化学结构相似,带电差异小,CZE 模式分离效果较差,本文加入 HP- β -CD 是因为环糊精分子略呈锥形的中空圆筒立体环状结构,具有一定的疏水性,增加了普通缓冲溶液的多相特性,待测组分在环糊精修饰的缓冲体系中,由于不同的疏水性而呈现出不同的分配系数,从而使不同组分在毛细管电泳中不仅受到电渗流的影响,同时也受到分配色谱的影响,有利于组分的完全分离。

电泳进样方式对本方法的重现性和稳定性有很大影响,电动进样操作简便且进样量稳定,但更适合于粘度较大的生化样品,而本文是中药提取物且带电性不明显,用电动进样不利于样品的导入,所以采用压力进样,保证了进样的重现性。

方法学考察中含量测定的 RSD 偏高,分析原因是因为本方法优先考虑大黄提取物多组分的分离度,在保证完全分离基础上,牺牲了部分检测准确度,导致结果 RSD 偏高,可在后期方法优化上进一步改进。

通过 β -环糊精修饰毛细管区带电泳测定大黄提取物的方法分析速度快,缓冲溶液简单,试剂消耗量少,可作为高效液相法的重要补充。

参考文献

[1] 刘哈,高云. 大黄素药理作用的分子机制研究进展[J]. 中

国药理学通报,2009,25(12):1552-1555.

- [2] SUNEELA D, DIPMALA P. Synthesis and pharmacokinetic profile of rhein- boswellic acid conjugate[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(24): 7582-7587.
- [3] 纪春梅,甄永占,骆广玲,等. 赖氨大黄酸通过升高 miRNA-451 抑制肺癌 A549 细胞迁移[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(3): 248-252.
- [4] 赵东梅,王威,刘坤,等. 柱色谱-高速逆流色谱法分离纯化虎杖中大黄素-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2118-2122.
- [5] 王晓剑,张悠,王晓红. 大黄散质量标准研究[J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(11): 988-991.
- [6] 马惠玲,谢鑫,麦曦,等. 高效液相色谱法测定黄连上清丸中芦荟大黄素和大黄酸的含量[J]. 南昌大学学报(医学版), 2016, 56(3): 16-19.
- [7] 潘丽丽,李亭亭,杨颂,等. HPLC 法同时测定牛黄解毒片中黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、大黄的含量[J]. 中医药学报, 2015, 43(1): 50-53.
- [8] 李莉,宋俊骊,王志梅,等. 高效液相色谱法同时测定九制大黄丸中 5 组分含量[J]. 中国药业, 2015, 24(5): 34-36.
- [9] 刘会前. HPLC 法测定保肾灵 I 号中大黄素和大黄酚的含量[J]. 重庆医学, 2005, 34(11): 1703-1704.
- [10] 郭芳芳,冯锋,白云峰,等. 高效毛细管电泳用于检测黄花菜中 4 种活性物质[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 73-76.
- [11] 陈琴华,李鹏,朱军. 毛细管电泳技术在黄酮类化合物分析中的应用进展[J]. 医药导报, 2012, 31(10): 1329-1333.
- [12] 于虹敏,林文津,徐榕青,等. 毛细管电泳技术在药学研究的应用概述[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(1): 34.
- [13] 王德先,赵敬湘,杨更亮,等. 毛细管区带电泳法测定中药金银花中绿原酸的含量[J]. 中草药, 2000, 31(6): 432-434.
- [14] 杨世颖,刘淑聪,杜冠华,等. 大黄中药材及其醇、水提取物中大黄素成分分析标准物质研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 456-462.
- [15] 林海丹,翟海云,周清. 毛细管电泳法同时测定牛黄解毒片中大黄酸和大黄素的含量[J]. 中药材, 2012, 35(6): 992-993.

(收稿日期:2017-07-24 修回日期:2017-09-26)