

毛细管胶束电动色谱-质谱联用法同时测定心脑血管康胶囊中3种成分含量*

Determination of 3 Compositions in Xinnaokang Capsules by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry

黄丽涵¹, 曾永芳², 徐远金^{1,2}

HUANG Li-han¹, ZENG Yong-fang², XU Yuan-jin^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁 530004)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:采用胶束电动色谱-质谱联用法同时测定心脑血管康胶囊中的芍药苷、葛根素、大黄素含量。该方法以未涂层石英毛细管(80cm×50μm)为分离通道,以30 mmol/L月桂酸-90 mmol/L氨水(pH值9.0)为缓冲溶液,50%异丙醇(含1 mmol/L乙酸)为鞘液,工作电压为25kV。测定结果:各组分在18 min内达到完全分离,芍药苷、葛根素、大黄素的线性范围分别为0.20~200mg/L、0.50~500mg/L、0.020~300 mg/L,检出限分别为0.020mg/L、0.050mg/L、0.0060 mg/L。样品的加标回收率在96.5%~102%之间,相对标准偏差均小于3.1%。该方法简便、快速、准确可靠,已成功应用于心脑血管康胶囊中芍药苷、葛根素、大黄素的含量测定。

关键词:毛细管胶束电动色谱 心脑血管康胶囊 芍药苷 葛根素 大黄素

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2010)03-0264-04

Abstract: A MEKC-MS method for the simultaneous determination of paeoniflorin, puerarin and emodin in Xinnaokang Capsules was established. The samples were separated by an uncoated capillary(80cm×50μm) on the operating voltage of 25 kV using 30 mmol/L lauric acid - 90 mmol/L ammonia mixture (containing 25% acetonitrile, pH value 9.0) as the running buffer and 50% 2-Propanol 50% water mixture (containing 1 mmol/L acetic acid) as the sheath liquid. Under the optimum conditions, the baseline separation of three compounds was achieved within 18 minutes. The detection limits were 0.020 mg/L, 0.050 mg/L, 0.0060 mg/L for paeoniflorin, puerarin and emodin, respectively. The average recoveries of the three components were from 96.5% to 102% with all RSD less than 3.1%. The method is simple, rapid, accurate and suitable for the quality control of Xinnaokang Capsules.

Key words: MEKC-ESI MS, xinnaokang capsules, paeoniflorin, puerarin, emodin

心脑血管康胶囊是由丹参、赤芍、制何首乌、葛根、川

芎等16味中药材制成的复方制剂,具有扩张血管、活血化瘀、通窍止痛等功效,是《卫生部药品标准》中药成方制剂第十三册收录的品种^[1]。标准中至今尚未建立其含量的测定方法。心脑血管康中丹参酮I_A^[2]、芍药苷^[3]、葛根素^[4]含量的单独测定方法已有文献报道,但同时测定心脑血管康胶囊中的芍药苷、葛根素、

收稿日期:2010-05-01

作者简介:黄丽涵(1967-),女,实验师,主要从事色谱分析测试。

* 国家自然科学基金项目(20865001),广西自然科学基金项目(桂科自0832034)资助。

大黄素的分析方法尚未见有报道。据中医药理论,复方中药药效的发挥是多种药效组分共同作用的结果,因此在评价、控制复方中药质量时,多种指标成分同时测定比单一指标成分测定更科学更合理,能更好地表征药品的质量^[5]。为更好地控制该制剂的质量,本实验选择赤芍中的芍药苷、制何首乌中的大黄素以及葛根中的葛根素为定量控制指标,采用毛细管胶束电动色谱-质谱联用法同时测定其含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent HP^{3D}CE 毛细管电泳仪-MS Trap SL 质谱联用仪通过 CE-MS 喷雾组件连接,鞘流使用 Agilent 1100 等梯度泵和 1:100 分流器提供(德国);未涂层弹性石英毛细管(80 cm × 50 μm)(河北永年锐光导纤维厂出品);Orion 720A 型酸度计/离子计(美国);Sartorius ME 215S 电子天平(德国);Labconco Water Pro Plus 超纯水仪(美国)。

月桂酸(分析纯,北京市旭东化工厂出品);甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司出品);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(优级纯,国药集团化学试剂有限公司出品);其它试剂为分析纯试剂,所用水为超纯水。芍药苷、葛根素、大黄素对照品均购自中国药品生物制品检定所;样品(通化金马药业集团股份有限公司生产,产品批号:20081001;通化正和药业有限公司生产,产品批号:080602)。

1.2 溶液配制

对照品溶液的配制:取芍药苷、葛根素、大黄素适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释成 1.00 mg/ml 的对照品储备液,密封于 4 °C 下保存。

供试样品溶液的配制:取心脑血管胶囊 10 粒,除去胶囊,将内容物研细后,混匀,从中取样品约 1.00 g,精密称定后置于 50 ml 锥形瓶中,加 40 ml 甲醇超声提取 60 min,取出,放冷。静止后转移至 50 ml 量瓶中,再用少量甲醇洗涤锥形瓶 3 次,洗涤液全部转至量瓶,并用甲醇定容至刻度。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后稀释至适当浓度作为样品溶液。

1.3 电泳分离条件

毛细管柱:未涂层弹性石英毛细管(80 cm × 50 μm);缓冲液 30 mmol/L 月桂酸-90 mmol/L 氨水(pH 值 9.0)为电泳介质。进样压力 5 kPa,进样时间 6 s,分离电压 25 kV,分离温度 25 °C,所有溶液使用前均经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,并超声脱气 5 min。每天电泳运行前将毛细管用 0.1 mol/L 氢氧化

钠活化 30 min,然后用水和缓冲溶液各冲洗 10 min。两次分析间用运行缓冲液冲洗 3 min。

1.4 质谱条件

电离源为电喷雾电离源,采用选择性离子监测(0~10 min, ESI⁺ m/z 498; 10~14 min, ESI⁺ m/z 417; 14~18 min, ESI⁻ m/z 269);毛细管电压为 4.3 kV,喷雾气压力为 34.3 kPa,干燥气 10 L/min,温度为 325 °C;鞘液组成 50%异丙醇(含 1 mmol/L 乙酸);鞘液流速 8 μl/min。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳分离条件的优化

2.1.1 缓冲溶液碱组成的影响

考察月桂酸-Tris,月桂酸-NH₃·H₂O 这两体系对物质电离的影响。结果发现使用 Tris 有机碱时,采用选择性离子模式(SIM)都未见有 3 种物质的峰,而使用月桂酸-NH₃·H₂O 体系时 3 种组分的电离强度大,出峰灵敏。进一步考察氨水浓度对分离的影响时发现,氨水浓度对各组分的分离影响不大,只影响各组分的迁移时间,当氨水浓度达 90 mmol/L 时,各组分的迁移时间最短。因此,选定氨水浓度为 90 mmol/L。

2.1.2 有机改性剂对分离的影响

考察各种有机溶剂对分离的影响,结果发现各组分的迁移时间变化为:乙腈<丙酮<乙醇。并且在丙酮和乙醇体系中基线噪音较大,且大黄素的电离不灵敏。综合考虑组分的迁移时间及灵敏度,选择体积分数为 25%的乙腈作为有机改性剂。

2.1.3 月桂酸浓度对分离的影响

当月桂酸浓度为 20~40 mmol/L 时,被测组分能得到很好分离,随着月桂酸浓度的增加,各组分的保留时间增加(见图 1),但是对组分的分离度影响不大,而浓度过高时,溶液中的电解质浓度增大,检测噪音增加。因此选择最佳的月桂酸浓度为 30 mmol/L。

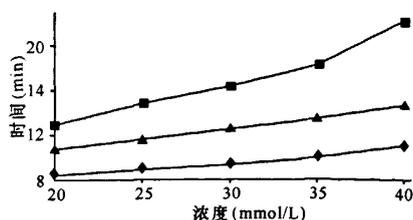


图 1 月桂酸浓度对分离的影响
◆: 芍药苷; ▲: 葛根素; ■: 大黄素

2.1.4 缓冲溶液 pH 值对分离的影响

考察 pH 值在 8.5~11 范围变化的情况,3 种组分随 pH 值变化不大,在 pH 值 9.0 时 3 种组分的迁移时间最短,故选择实验最佳 pH=9.0。

2.1.5 电压和进样时间对分离的影响

在前述的电泳条件中,在 15~30 kV 范围内考察电压对分离的影响,结果发现随着电压的增加,样品的分析速度加快,峰形尖锐。但电压过高会产生大量焦耳热,导致分离效率下降,所以选择分离电压为 25 kV。

在 4~12 s 范围内考察进样时间对分离的影响。结果发现进样时间越长,灵敏度越高。但进样量过大时易造成溶质区带加宽,分离度下降。综合考虑以上因素,选择进样时间为 6 s。

2.2 质谱条件的优化

由于大黄萜醌类化合物大黄素在电喷雾电离条件下容易失去 H⁺ 而带负电荷,其负离子模式下的检测灵敏度明显优于正离子模式^[6],因此大黄素采用的是电喷雾电离源的负离子模式。其他两组分均在正离子模式下有较好的灵敏度,采用正、负离子自动切换模式进行检测。

对比甲醇、异丙醇、乙腈对样品电离的影响,体系中使用异丙醇作为鞘液时样品电离强度大且背景噪音低,当异丙醇体积浓度达 50% 时样品的电离强度达最大值。在 50% 的异丙醇鞘液体系中分别添加甲酸、乙酸、乙酸铵和氨水,结果发现乙酸效果最佳。从图 2 中可以看到大黄素随乙酸量的增加电离强度反而降低;乙酸量为 1 mmol/L 时,芍药苷的电离强度达最大值,而葛根素随乙酸量的增加电离强度缓慢增加,但变化不显著。

综合考虑 3 组分的电离,选择 1 mmol/L 乙酸作为鞘液添加剂。

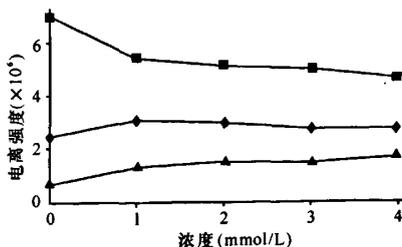


图2 鞘液中乙酸的浓度对电离的影响

◆: 芍药苷; ▲: 葛根素; ■: 大黄素。

2.3 样品的电泳图及定性分析

在优化的条件下,3 种组分在 18 min 内获得较好的分离。选择性离子流色谱如图 3 所示,各组分的

一级质谱见图 4。根据各组分的出峰时间和一级质谱的 m/z 值进行定性分析。从图 4 中可以看出芍药苷主要为 m/z 498 的 $[M+NH_4]^+$ 峰;葛根素主要为 m/z 417 的 $[M+H]^+$ 峰;大黄素主要为 m/z 269 的 $[M-H]^-$ 峰。

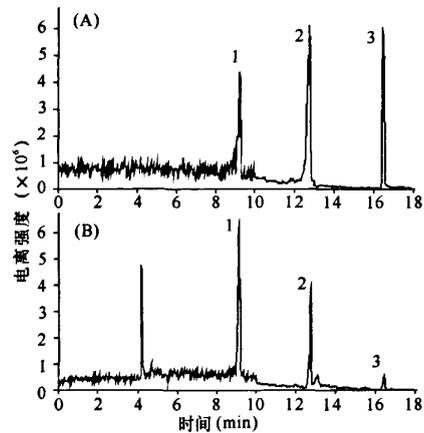


图3 标准品(A)及样品(B)的SIM色谱
1: 芍药苷; 2: 葛根素; 3: 大黄素。

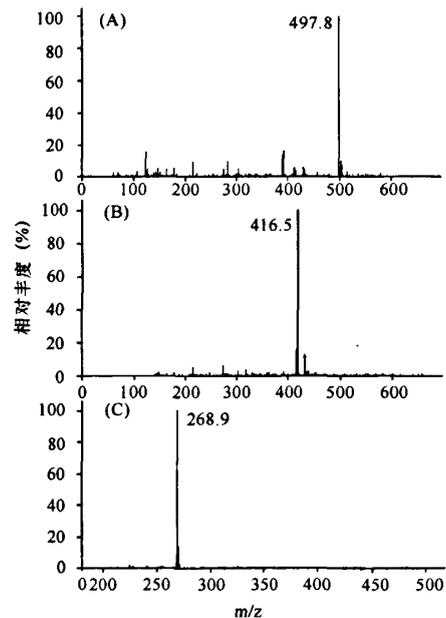


图4 芍药苷(A)、葛根素(B)及大黄素(C)的一级质谱

2.4 线性关系及检出限

配制一系列不同浓度的芍药苷、葛根素及大黄素对照品混合样,在优化的条件下,测定峰面积平均值(Y)与浓度(X, mg/L)的关系,得到各组分的线性范围,以信噪比等于 3 为标准,测得各组分的检出限,结果归纳于表 1。

表1 3种组分的线性关系及检出限

化合物	线性回归方程	线性范围 (mg/L)	相关系数 <i>r</i>	检出限 (mg/L)
芍药苷	$Y = 1.31 \times 10^6 X + 1.62 \times 10^7$	0.20-200	0.9992	0.020
葛根素	$Y = 5.13 \times 10^5 X + 6.59 \times 10^6$	0.50-500	0.9995	0.050
大黄素	$Y = 5.04 \times 10^6 X + 1.19 \times 10^6$	0.020-300	0.9994	0.0060

2.5 精密度试验

精密称取同一批样品5份,按1.2节中样品溶液的方法处理后,在优化的实验条件下测定芍药苷、大黄酚及大黄素峰面积的相对标准偏差,结果分别为2.1%,1.5%,2.8%。这表明该分析方法有较好的重现性。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别存放0h,2h,4h,6h,8h后进行测定,记录峰面积。结果3种成分含量的RSD均小于4.3%,说明该方法至少在8h内可进行准确的定量分析。

2.7 回收率试验

取已知含量的样品3份,每份约1.0g,精密称定,分别加入适量的混合标准品,依1.2节中样品溶液的方法制成溶液,测定其回收率,结果见表2。

表2 样品加标回收率

化合物	<i>n</i>	原有值 (mg·g ⁻¹)	加入值 (mg·g ⁻¹)	测得值 (mg·g ⁻¹)	回收率 (%)	RSD (%)
芍药苷	3	0.528	0.500	1.012	96.8	2.6
葛根素	3	0.198	0.200	0.391	96.5	3.1
大黄素	3	0.00280	0.00250	0.00535	102	1.4

2.8 样品测定

分别精密称取不同批号样品,按1.2节中供试样品溶液的方法制备样品溶液,分析结果见表3。

表3 样品测定结果

样品批号	芍药苷 (mg·g ⁻¹)	葛根素 (mg·g ⁻¹)	大黄素 (mg·g ⁻¹)
080602	0.528	0.198	0.00280
20081001	0.626	0.296	0.00380

3 结束语

心脑血管胶囊中的主要药效成分丹参酮Ⅰ_A因其水溶性较差的缘故,出峰峰型较差,因此本实验未能将其作为指标性成分测定。而其他指标性成分:芍药苷、葛根素及大黄素在优化的实验条件下,在18min内得到良好的分离和测定。胶束电动色谱-质谱联用法具有简便、快捷、重现性好等优点,可以满足企业对心脑血管胶囊中的芍药苷、葛根素及大黄素的测定要求。

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂第十三册[S]. 1997:47.
- [2] 刘艳. 反相高效液相色谱法测定心脑血管胶囊中丹参酮Ⅰ_A含量[J]. 中国药业, 2008, 17(12):46-47.
- [3] 魏清, 康红英, 敖书华, 等. 高效液相色谱法测定心脑血管胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(5):693-694.
- [4] 杨跃龙. RP-HPLC测定心脑血管胶囊中阿魏酸和葛根素的含量[J]. 中国药师, 2008, 11(7):808-809.
- [5] 杨青, 郭炎荣. RP-HPLC同时测定心脑血管胶囊中葛根素和2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(6):730-731.
- [6] 马小红, 沈少林, 韩凤梅, 等. 大黄蒽醌类化合物电喷雾质谱研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2006, 28(4):404-406.

(责任编辑:尹 闯)

番茄红素分离纯化研究获新进展

番茄红素(Lycopene)作为天然食用色素、营养素及药品原料,广泛应用于保健食品、医药和化妆品工业,其主要来源是从番茄或番茄酱生产中的废渣中分离制备得到。目前,工业化制备番茄红素的方法主要有溶剂萃取法和超临界流体萃取。前者主要存在有机溶剂残留、提取率低和产品纯度低的缺陷;后者主要存在成本昂贵和产量低的缺陷。最近,中国科学院的科研人员利用大孔吸附树脂混合模拟移动床技术,通过静态吸附/解吸附、动态吸附/解吸附以及热力学和动力学行为的研究,分离纯化了番茄红素,筛选和优化了利用大孔吸附树脂分离制备番茄红素的工艺条件、工艺参数,使产品中番茄红素的纯度提高30.4倍,回收率达到66.9%。该方法为工业化分离制备番茄红素提供了重要的技术支持。(据科学网)