

快速毛细管电泳安培法测定京尼平甘和藏红花素的含量*

黄宝美¹, 姚程炜², 莫金垣³, 边清泉¹, 王志国¹

- (1. 绵阳师范学院化学系, 四川 绵阳 621000;
2. 中国空气动力研究与发展中心设备设计及测试技术研究所, 四川 绵阳 622653;
3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 采用毛细管电泳安培法测定了梔子 *Fructus gardeniae* 中京尼平甘和藏红花素的含量。在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH = 8.50), 25 kV 高压, 0.86 V 工作电极电位的条件下, 在 4 min 内实现了两种被测组分的有效分离。测得四川梔子中京尼平甘和藏红花素的含量为 32.46 mg/g 和 8.527 mg/g, 浙江梔子中京尼平甘和藏红花素的含量为 26.51 mg/g 和 7.028 mg/g。浙江梔子中京尼平甘和藏红花素的平均回收率分别为 99.64% 和 100.2%, 四川梔子中京尼平甘和藏红花素的平均回收率分别为 99.73% 和 99.92%。该法快速准确, 为梔子中京尼平甘和藏红花素的质量控制提供了新方法。

关键词: 毛细管电泳; 梔子 *Fructus gardeniae*; 京尼平甘; 藏红花素

中图分类号: O657.8 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2011)05-0083-04

Determination of the Contents of Geniposide and Crocin in *Fructus gardeniae* by Capillary Electrophoresis

HUANG Baomei¹, YAO Chengwei², MO Jinyuan³, BIAN Qingquan¹, WANG Zhiguo¹

- (1. Chemical Department of Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China;
2. Facility Design and Instrumentation Institute of CARD, Mianyang 622653, China;
3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The capillary electrophoresis was used for the determination of the content of Geniposide and Crocin in *Fructus gardeniae*. The effective separated components were achieved by using separation voltage 25 kV, injection time 8 seconds and detection potential at 0.86 V in 20 mmol/L Tris-HCl buffer condition (pH = 8.50). The contents of Geniposide and Crocin in Sichuan *Fructus gardeniae* were determined to be 32.46 mg/g and 8.527 mg/g. The contents of Geniposide and Crocin in Zhejiang *Fructus gardeniae* were determined to be 26.51 mg/g and 7.028 mg/g. The average recovery ratios of Geniposide and Crocin in Sichuan *Fructus gardeniae* were 99.73% and 99.92%. The average recovery ratios of Geniposide and Crocin in Zhejiang *Fructus gardeniae* were 99.64% and 100.2%. A novel method of the quality control of Geniposide and Crocin in *Fructus gardeniae* was built up.

Key words: capillary electrophoresis; *Fructus gardeniae*; Geniposide; Crocin

梔子 *Fructus gardeniae* 又名黄梔子、梔子花、山梔、水黄梔等, 味苦性寒, 具有抗氧化、降血脂、降血栓、抗动脉粥样硬化、抗焦虑等作用^[1]。

其主要活性成分有京尼平苷 (Geniposide) 和藏红花素 (Crocin)。京尼平苷别名梔子苷具有缓泻、镇痛、利胆、抗炎、治疗软组织损伤以及抑制胃液

* 收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 绵阳师范学院科研基金资助项目 (MA2010003)

作者简介: 黄宝美 (1978年生), 女, 副教授; E-mail: hbm790117@yahoo.com.cn

分泌和降低胰淀粉酶等作用。藏红花素可以增加胆汁分泌量,能显著的抗致癌物,并已有以此开发新药的尝试。梔子资源丰富,作为提取京尼平苷和藏红花素的原料是很有价值的。

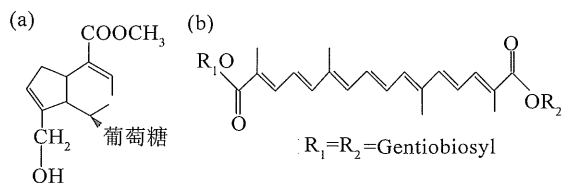


图 1 京尼平苷和藏红花素的化学结构式

Fig. 1 Structures of Geniposide and Crocin

a. 京尼平苷 b. 藏红花素

目前对于梔子成分的测定方法主要有高效液相色谱法^[2-6]。毛细管电泳法有柱效高,分离速度快,试剂和样品消耗少,成本低,精密度高等优点在中草药及其制剂的分析中有着高效液相色谱无法企及的优点。王洪平,李利君等^[7-8]用毛细管电泳光检测法对梔子中的主要成分进行了测定,目前尚未见电化学检测其活性成分的报道,电化学检测法与光化学检测相比,电化学检测器可以自己组装,经济实用,光化学检测器比较昂贵;电化学检测也可以避免毛细管光程短,灵敏度低的缺点;电化学检测器中的安培检测选择性高,受干扰小,特别适合中草药等实际样品的分离分析^[10]。本文采用电化学检测法对梔子中的藏红花素和京尼平苷进行了分离检测,相对于液相色谱法,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CL1010 型高效毛细管电泳仪, CL101A 型高压电源, (北京彩陆科学仪器有限公司), 碳纤维电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极。

磷酸二氢钠, 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris), 硼砂, 氢氧化钠, 盐酸, 甲醇, 以上试剂均为分析纯; 所用水为蒸馏水。

1.2 对照品溶液, 样品溶液和缓冲溶液的制备

1.2.1 对照品溶液的制备 各准确称取一定量的京尼平苷和藏红花素对照品, 用 $\varphi = 50\%$ 甲醇溶解后定容至 25.00 mL, 得到对照品溶液 500 mg/L 和 400 mg/L。再取 2 mL 溶液稀释 20 倍待用。分别取稀释后的溶液配制成 1+1, 1+4, 1+10, 1+20, 1+50, 1+100, 1+200 等一系列不同浓度的标准溶液待测定标准曲线备用。

1.2.2 样品溶液的制备 称取梔子粉末 (过 3 号筛) 约 0.20 g, 精密称量, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 $\varphi = 50\%$ 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 20 min, 放凉, 补重, 过滤后精密量取 1 mL 至 25 mL 容量瓶中, 以 $\varphi = 50\%$ 甲醇定容, 摇匀, 得样品溶液^[9]。

1.2.3 缓冲溶液的制备 分别制备 100 mmol/L 的硼砂, 磷酸二氢钠, 柠檬酸钠, Tris, NaOH, HCl 的储备液, 各取适量配成不同浓度比的体系 (具体配置见分析化学手册)。

1.3 实验方法

进样前, 毛细管依次用 0.1 mol/L 的盐酸、二次蒸馏水和缓冲溶液各冲洗约 10 min, 每 2 次进样之间用缓冲液冲洗 3 min, 以保证其重现性。采用重力进样方式, 进样高度 20 cm, 时间 8 s, 分离毛细管长度 45 cm, 内径 50 μm , 分离电压 25 kV, 工作电极电位 0.86 V。

2 结果与讨论

2.1 工作电位的选择

工作电位的选择直接影响到实验方法的灵敏度、检出限和稳定性, 在电化学工作站上考察了京尼平苷和藏红花素的循环伏安图 (如图 2 (A) 所示), 发现京尼平苷和藏红花素在碳糊电极, 微 Pt 电极上都没有响应, 在碳纤维电极上有响应, 从图 2 可以看上京尼平苷在 1.0 V 左右出现一个不可逆的氧化峰, 藏红花素在 0.85 V 左右出现一个不可逆的氧化峰。

在毛细管电泳仪上考察了京尼平苷和藏红花素的动态伏安 (图 2 (B) 所示), 考察了工作电位 0.20 ~ 1.05 V 对峰电流的影响, 结果发现随着工作电位的增加, 峰电流增大, 当工作电位大于 0.86 V 时, 峰电流又有所降低, 考虑灵敏度和检出限, 选择检测电位为 +0.86 V。

2.2 缓冲溶液浓度的选择

分别考察了 NaOH- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tris-HCl, 硼砂-盐酸, 柠檬酸钠-HCl, 磷酸盐 5 种不同缓冲体系对分离的影响。发现其中磷酸盐缓冲溶液基线噪音和基线偏移都较大; 柠檬酸钠-HCl 和 NaOH- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 中不出峰; 硼砂-盐酸体系有杂峰; Tris-HCl 缓冲溶液中比较稳定, 峰形较好。所以本实验选择 Tris-HCl 缓冲溶液体系。配制了几种不同浓度的缓冲溶液, 实验发现浓度较大时, 背景电流较大, 噪音增大, 基线漂移, 浓度较小时, 峰较宽, 综合考虑, 本实验选用 20 mmol/L

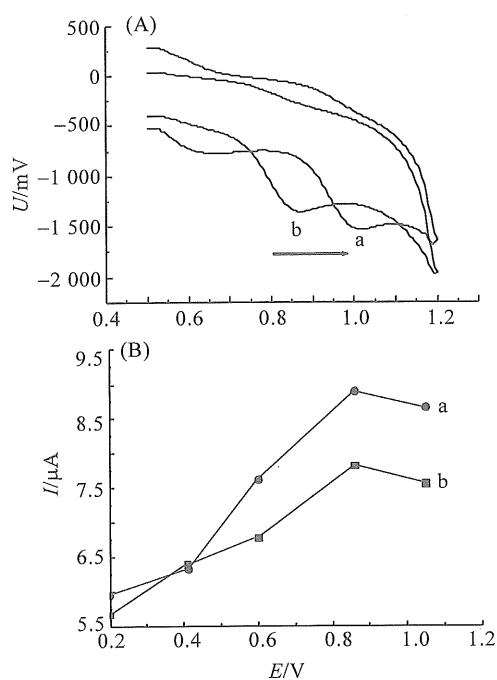


图2 京尼平甘(a)和藏红花素(b)的循环伏安图(A)和动态伏安图(B)

分离高压: 25 kV; 毛细管: 50 μm × 45 cm;
缓冲溶液: tris-HCl, pH=8.50; 虹吸进样: 20 cm;
Fig. 2 Cyclic voltammograms (A) and hydrodynamic
voltammograms (B) of Geniposide (a) and Crocin (b)

的 Tris 为缓冲溶液的浓度。

2.3 缓冲溶液 pH 的选择

考察了缓冲溶液 pH 分别为 4.96、7.61、8.50、8.89、11.04 时, 对电泳迁移时间和峰形的影响, 发现随着 pH 值增大, 迁移时间减小, 但柱效变低, 综合考虑峰形、迁移时间、柱效的影响, 本文选择溶液的 pH=8.50。

2.4 分离高压及进样时间对分离的影响

分离高压是毛细管电泳的驱动力。电压越高, 组分迁移越快, 分析时间越短, 但是电压升高, 使柱内焦耳热增加, 易发生气泡割断现象, 对工作电极也有一定影响。在一定范围内, 柱效随着电压增大而增大, 过了极点, 随着电压升高, 焦耳热的影响更大, 柱效反而降低。实验采用瞬间加压的恒电压工作方式, 考察了 (15~30 kV) 高压对迁移时间和柱效的影响, 结果选择电压为 25 kV。

采用虹吸进样, 在一定进样高度下, 进样时间决定进样量的多少, 选择进样高度为 20 cm, 考察了进样时间对分离检测的影响。发现进样时间太短, 达不到检测器的灵敏度, 若进样时间超过 8 s, 进样量增大, 引起样品扩散, 导致峰形扩宽拖尾, 故选择进样时间为 8 s。

2.5 方法的精密度和线性范围

在上述实验条件下, 将京尼平甘和藏红花素标准品进样 6 次, 迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 3.2% 和 1.5%。京尼平甘在 0.25~50 mg/L 范围内峰面积 (Y) 与质量浓度 (c) 之间呈现良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 22994.4 + 18718.5c$, $r = 0.9994$, 检出限为 0.1 mg/L。藏红花素 0.8~40 mg/L 范围内峰面积 (Y) 与质量浓度 (c) 之间呈现良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 10681.2 + 16738.4c$, $r = 0.9996$, 检出限为 0.2 mg/L。

2.6 样品测定及加标回收实验

在最佳条件下, 标准品和样品的毛细管电泳图如图 3 所示。图中主峰为京尼平甘和藏红花素的峰, 标准品和样品中京尼平甘和藏红花素的峰型和出峰时间基本一致, 定性的说明了片剂中的主峰为京尼平甘和藏红花素的峰。按照本文“1.2”节方法制备样品, 用外标法定量, 平行测定 5 次, 经计算浙江栀子中京尼平甘和藏红花素的质量分数分别为 26.51 mg/g 和 7.028 mg/g, 四川栀子中京尼平甘和藏红花素的质量分数为 32.46 mg/g 和 8.527 mg/g。并按照以上实验方法在 1.2 节制备样品溶液时分别加入不同水平量的标准溶液, 进行加标回收试验, 每个水平量平行测定 3 次, 测得浙江栀子中京尼平甘和藏红花素的平均回收率分别为 99.64% 和 100.2%, 四川栀子中京尼平甘和藏红花素的平均回收率分别为 99.73% 和 99.90%。

表1 样品的测定结果及回收率
Table 1 Analysis results and recovery ratios mg · g⁻¹

| 样品名称 | 本底值 | 增加量 | 测定值 | 回收率/% | |
|------|------|-------|--------|-------|-------|
| 京尼平甘 | 浙江栀子 | 5.302 | 5.000 | 10.31 | 100.2 |
| | | | 1.529 | 6.825 | 99.61 |
| | | | 0.6738 | 5.970 | 99.12 |
| | 四川栀子 | 6.492 | 6.000 | 12.50 | 100.1 |
| | | | 2.390 | 8.887 | 100.2 |
| | | | 1.002 | 7.483 | 98.90 |
| 藏红花素 | 浙江栀子 | 1.406 | 1.206 | 2.618 | 100.5 |
| | | | 0.572 | 1.983 | 100.9 |
| | | | 0.141 | 1.546 | 99.3 |
| | 四川栀子 | 1.705 | 1.152 | 2.861 | 100.3 |
| | | | 0.504 | 2.203 | 98.8 |
| | | | 0.171 | 1.877 | 100.6 |

3 结论

本文采用快速毛细管电泳安培检测法对浙江栀

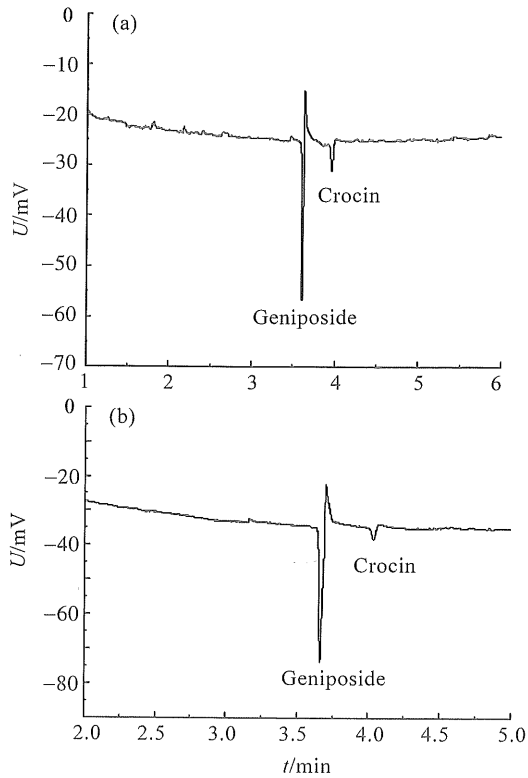


图3 标准品(a)和样品(b)的毛细管电泳图
Fig.3 Electropherograms of standard (a) and sample (b)

子和四川栀子中的藏红花素和京尼平苷进行了分离检测。实验优化了工作电位,缓冲溶液,分离高压等条件,在优化条件下,得到了较满意的结果,可为藏红花素和京尼平苷的含量测定提供新方法。

参考文献:

- [1] 刘国敏,郭素华,程维明. 栀子的药理作用及其机制研究新进展[J]. 海峡药学,2008,20(11):8-10.
- [2] 段启,陈华师. HPLC法测定不同产地栀子中藏红花素的含量[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):299-301.
- [3] 胡震,王义明,罗国安,等. 栀子药材中三种有效成分HPLC定量分析结果不确定度的评定[J]. 中药材,2005,28(11):991-994.
- [4] 徐燕,曹进,王义明,等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分[J]. 药学学报,2003,38(7):543-546.
- [5] 王春芳,鲁静. 高效液相色谱法测定栀子中藏红花素的含量[J]. 药物分析杂志,1997,17(5):321-323.
- [6] 李向阳,冯伟力,袁明,等. 大鼠血浆中藏红花素的HPLC法测定及其药代动力学研究[J]. 青海医学院学报,2007,28(2):73-77.
- [7] 王洪平,周洪雷,李和光,等. 高效毛细管电泳法测定栀子中栀子苷的含量[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(2):318-319.
- [8] 李利军,冯军,黄文艺,等. 高效毛细管电泳同时分离测定栀子苷、芍药苷及丹皮酚的研究[J]. 分析实验室,2007,26(5):38-41.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:173.
- [10] 黄宝美,杜世章,姚程炜,等. 高效毛细管电泳安培法测定麦冬中薯蓣皂甙元的含量[J]. 中山大学学报:自然科学版,2010,49(2):65-67.