

广地龙中琥珀酸的毛细管电泳电导法测定

黄庆华,龙晓英,毋福海,谢国祥,何林 (广东药学院,广州 510006)

摘要:目的 建立毛细管电泳电导法测定广地龙中琥珀酸含量的方法。方法 以 1.0 mmol/L Tris-10 mmol/L H_3BO_3 -0.5% 四乙烯五胺-0.025 mmol/L 十六烷基三甲基溴化铵为分离介质,使用未涂层融硅毛细管柱 (50 cm $\times$ 75 μ m),分离电压 -10 kV,电导检测器检测。结果 琥珀酸的线性范围 5.00 ~ 80.0 μ g/mL ($r=0.9998$),平均加样回收率 98.4%, RSD = 2.2%。结论 该法操作简便,快速。

关键词:琥珀酸;广地龙;毛细管电泳;电导检测

基金项目:广东省教育厅科学基金资助项目 (Z03055)

Determination of succinic acid in *Pheretima aspergillum* by capillary electrophoresis with a conductivity detector

HUANG Q ing-hua LONG X iao-ying WU Fu-hai X IE Guo-xiang HE Lin (Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006 China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A capillary electrophoresis with conductivity detection method to determine succinic acid in *Pheretima aspergillum* was described. **METHODS** A fused-silica capillary tube (50 cm $\times$ 75 μ m) was used at the separation potential of -10 kV. Succinic acid was detected directly in running medium of 1.0 mmol/L Tris-10 mmol/L H_3BO_3 -0.5% tetraethyleneglycol-0.025 mmol/L CTAB (pH = 11.45). **RESULTS** The linear range of succinic acid was 5.00 μ g/mL ~ 80.0 μ g/mL ($r = 0.9998$), the average recovery of added sample was 98.4% with the RSD = 2.2%. **CONCLUSION** This method is simple and quick.

KEY WORDS succinic acid; *Pheretima aspergillum*; capillary electrophoresis; conductivity detection

广地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥全体, 功能清热定惊, 平肝息风, 通经活络, 平喘利尿。琥珀酸^[1]是地龙的平喘有效成分之一, 因其无紫外吸收, 文献报道^[2-3]的是利用 TLC 分离经显色后进行测定。该法操作繁琐, 步骤较多, 精密度较难控制。笔者选择了反向毛细管电泳分离—电导法检测的方法, 测定广地龙中琥珀酸的含量, 结果令人满意。

1 仪器与试剂

CES2000-HV-IB 毛细管电泳仪 (负高压电源, 电导检测器, 毛细管电泳数据工作站, 中山大学化学与化工学院研制) 广地龙由广东省药材公司提供; 琥珀酸对照品购自中国药品生物制品检定所 (含量测定用); 三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris) (Farca chemical supplies 香港分装, 优级纯); 其余试剂均为国产分析纯, 所用水为去离子二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 电泳工作模式的选择

在碱性条件下, 琥珀酸阴离子的电泳方向 $(-) \rightarrow (+)$ 和电渗流方向 $(+) \rightarrow (-)$ 相反, 被测组分达到检测端的时间较长, 实验加入了电渗流抑制剂和改向剂四乙烯五胺和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 使电渗流方向反向由负极向正极, 应用负极进样, 正极检测的反向分离模式。

2.2 实验方法

以未涂层融硅毛细管 (50 cm $\times$ 75 μ m) 为分离柱, 1 mmol/L Tris-10 mmol/L H_3BO_3 -0.5% 四乙烯五胺-0.025 mmol/L CTAB (pH = 11.45) 体系为电泳介质, 采用重力进样, 进样时间 15 s 进样高度 20 cm, 分离电压 -10 kV。

2.3 线性范围

精密称取琥珀酸对照品适量, 加蒸馏水配制成 1.00 mg/mL 的储备溶液。精密量取适量的储备液, 分别配成 5.00、10.00、20.00、40.00、60.00 和 80.00 μ g/mL 的琥珀酸对照品溶液, 按上述实验条件进样, 以峰面积对浓度进行线性回归, 琥珀酸在 5.00 ~ 80.00 μ g/mL 范围内线性关系良好 (线性方程 $Y = 5.589 \times 10^4 x + 46.38$ 相关系数 $r = 0.9998$)。

2.4 加样回收率试验

精密称取已知含量的广地龙药材粉末 0.25 g 各 9 份, 分别加入琥珀酸 0.24、0.20 和 0.16 mg 各 3 份, 按“样品测定”项的步骤提取, 测定, 得平均回收率为 98.4%, RSD = 2.2% ($n = 9$)。

2.5 重复进样精密度试验

取同一供试品溶液, 连续重复进样 6 次, 琥珀酸峰面积的 RSD 为 1.4%。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 制备后每间隔一定时间进行测定, 结果表明供试品液在 48 h 内稳定, 琥珀酸峰面积的 RSD 为 1.9% ($n = 6$)。

2.7 重复性试验

按“样品测定”项的步骤, 提取制备 6 份广地龙药材供试品溶液, 各分别进样测定 2 次, RSD = 2.3% ($n = 12$)。

2.8 样品测定

取广地龙药材, 粉碎, 精密称取约 0.5 g 置 50 mL 带塞锥形瓶中, 加入 90% 乙醇液 20 mL, 超声提取 45 min, 过滤, 50 $^{\circ}$ C 水浴挥干。残渣用 20.00 mL 水溶解, 经 0.45 μ m 滤膜过滤, 取续滤液进样测定。三批药材的含量结果见表 1, 对照品溶液和供试品溶液的毛细管电泳图见图 1。

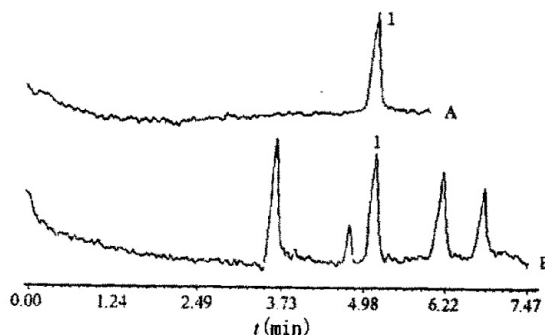


图 1 琥珀酸对照品 (A) 和广地龙药材 (B) 的毛细管电泳图

Fig 1 Electrophorogram of reference substance (A) and sample (B)

1. 琥珀酸; 1. succinic acid

表 1 样品测定结果

Tab 1 Results of determination

样品序号	琥珀酸含量 (mg/g)
1	0.801
2	0.618
3	0.973

3 讨论

3.1 实验考察了 Tris- H_3BO_3 、Tris-枸橼酸、二乙胺- H_3BO_3 和 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 等缓冲体系在不同浓度、不同比例时对供试品溶液分离的影响。结果表明:Tris- H_3BO_3 体系基线稳定,噪声较小,且可达到基线分离。

3.2 实验比较了电渗流抑制剂和改向剂四乙烯五胺和 CTAB所加浓度对分离的影响,阳离子表面活性剂可改变毛细管表面电荷,从而抑制电渗流使之反向,达到快速分离检测的目的。在 1 mmol/L Tris- 10 mmol/L H_3BO_3 的条件下,改变加入的四乙烯五胺浓度:0.1%,0.2%,0.5%,1.0%,1.2%,1.4%和 1.6%,结果表明:最佳浓度为 0.5%。实验还显示添加少量 CTAB(0.025 mmol/L)时,样品中各峰的峰宽减小,

峰形和分离度得到改善。

3.3 实验分别采用水、乙醇和不同浓度比的乙醇-水等作提取溶剂,结果显示,用 90%乙醇作超声提取的溶剂,提取效率较高,杂质峰较少,有利于分离测定。

参考文献

- [1] YUAN S T. Study of Chinese Medicine Decoction Pieces for medical use(医用中药饮片学)[M]. 1st ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 483.
- [2] WANG G Z H, ZHOU Y, CHEN J B *et al*. Determination of succinic acid in *Pheretima aspergillum* by TLCS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 1997, 17(4): 274-275.
- [2] FANG T H, YANG C P, SU W W. Study on TLC profile of *Pheretima aspergillum* and *Pheretima* (Dilong) Injection [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材), 2002, 25(11): 813-815.

收稿日期: 2005-06-21