

益母草药材中水苏碱成分的高频电导毛细管电泳法分析

王峻梅¹, 翟海云², 陈缙光¹

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510089;
2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 建立了益母草药材中水苏碱含量测定的高效毛细管电泳高频电导法, 以融硅毛细管 (150 $\mu\text{m} \times 60\text{ cm}$) 为分离柱, $\text{H}_3\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液为电泳介质 (2.0 mmol/L NaH_2PO_4 , H_3PO_4 调 pH 5.0), 在 12.0 kV, 柱端高频电导检测了益母草药材中水苏碱的含量, 重点探讨了缓冲液的种类、浓度、pH 值、分离电压、进样时间、进样高度及毛细管有效长度对检测的影响; 该法的线性范围为 20.0 ~ 1 300 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 2.50 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明该法快速、简便、结果准确, 适用于益母草药材中有效成分的含量测定。

关键词: 高效毛细管电泳; 高频电导检测; 非接触式电导检测; 水苏碱; 益母草

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 01-0132-03

益母草是唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分, 为常用中药, 有活血调经、利尿消肿的作用, 用于治疗月经不调、痛经闭经、恶露不尽、水肿尿少、急性肾炎水肿等^[1]。益母草的有效成分主要为生物碱类, 从益母草中提取并鉴定出结构的生物碱有水苏碱 (stachydrine)、益母草碱、益母草定等, 其中水苏碱含量较高。现版药典一部益母草项下收载了分光光度法测定盐酸水苏碱的定量方法 (以水苏碱为对照)^[1]。目前测定水苏碱的含量, 多用薄层扫描法^{2,3}和高效液相色谱法⁴⁻⁶, 毛细管电泳法则少见报道, 且为紫外检测^[7]。

毛细管电泳中, 电化学检测具有灵敏、价廉等优点, 其中电导检测器作为一种通用型的检测器, 检测范围广, 有较大的应用范围。由于普通电导检测存在电极易中毒污染和易受分离电压影响等不足, 本课题组研制了非接触式毛细管电泳高频电导^[8]检测装置, 避免了电极与溶液直接接触, 不仅寿命长, 而且灵敏度较高、使用方便。本文首次采用高效毛细管电泳—高频电导检测法对益母草药材中的水苏碱含量进行直接测定, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

(1) 仪器: 高压电源 (自制见文 [9]); 高频电导检测器 (自制见文 [8]); 石英毛细管 (150 $\mu\text{m} \times 60\text{ cm}$, 河北永年锐沣色谱器件有限公司); 数

据工作站 (中山大学化学与化学工程学院赖^图研制); 数据记录与处理在普通 P4 微机 and PCL-711B 型 A/D 卡 (台湾 EVOC 出品) 上完成; 中药粉碎机 (LK 400A, 温岭市创力药材器械厂); 超声波提取器 (DA-3A, 顺德乐从灵通电子厂)。

(2) 试剂: 水苏碱对照品购自中国药品生物制品检定所; 益母草药材购自广州宝芝林药店, 经中山大学药学院天然药物化学研究室鉴定为唇形科植物益母草的地上部分; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, GR 香港分装), 甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、异丙醇、柠檬酸、 HAc 、 HCl 、 H_3BO_3 、 H_3PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaOH 、 NaAc , 均为国产分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 对照品和供试品溶液的制备 精密称取水苏碱对照品 0.013 0 g, 加水溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 得浓度为 2.60 mg/mL 的对照品溶液。

将益母草药材用中药粉碎机粉碎, 过 200 目筛, 精密称取药材粉末 0.500 g, 置于具塞锥形瓶中, 加水 20 mL, 超声提取 30 min, 振摇后静置 10 min, 过滤; 残渣重复提取一次, 合并滤液, 定容至 50 mL, 得供试品溶液。

1.3 实验方法 毛细管柱在使用前, 分别用 0.1 mol/L NaOH 、 H_2O 、缓冲液洗 20, 10, 10 min。每次测定后, 依次用上述溶液洗 2 min。采用虹吸重力进样方式, 进样高度差为 20.0 cm, 进样时间为 14.0 s, 分离电压为 12.0 kV。检测器的输出信号经

* 收稿日期: 2004-07-19

基金项目: 广东省自然科学基金重点资助项目 (021808); 广东省教育厅科学基金资助项目 (Z03055)

作者简介: 王峻梅 (1978 年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈缙光; E-mail: chenzy@gzsums.edu.cn

A/D 卡转换, 由数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。实验在恒温 (25 °C)、恒湿 (50%) 条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液的选择 缓冲溶液的选择直接影响离子的迁移和最后的分离。在毛细管电泳电导检测过程中, 选择的缓冲液通常要遵循: ①在所选择的 pH 范围内有很好的缓冲容量; ②自身的淌度低, 即分子大而电荷小, 以减少电流的产生; ③缓冲溶液的背景电导低; ④为了减少电极极化的产生, 最好在碱性条件下检测, 但由于本文采用非接触式电导检测, 故缓冲液 pH 选择范围较宽。

实验比较了 Tris H_3BO_3 、Tris 柠檬酸、柠檬酸-柠檬酸钠、HAc NaAc、 H_3PO_4 NaH_2PO_4 几种缓冲体系对分析的影响。在 Tris H_3BO_3 、Tris 柠檬酸缓冲体系中, 离子质量较大, 电导较低, 理论上可以通过提高缓冲溶液的浓度和分离电压来改善分离度和缩短分析时间, 但实验发现, 在这 2 种缓冲体系中, 样品溶液出峰顺序较为混乱, 灵敏度低, 且峰形较差。在柠檬酸-柠檬酸钠、HAc NaAc、 H_3PO_4 - NaH_2PO_4 体系中, 虽然离子强度较大, 电导高, 不能采用高浓度的缓冲液, 限制了缓冲容量, 但灵敏度高, 峰形较好, 出峰时间较快。实验证明, H_3PO_4 - NaH_2PO_4 是较理想的缓冲体系。

2.2 缓冲溶液浓度的影响 在毛细管电泳中, 缓冲溶液的浓度是一个很重要的指标。保持溶液 pH 不变, 增加浓度, 离子强度增大, 明显改变溶液的缓冲容量, 减少溶质和管壁之间、被分离的粒子和粒子之间的相互作用, 从而改善分离。随着浓度的不断增加, 导电的离子数增加, 在相同的电场强度下电流值增大, 产生大量焦耳热, 致使峰形变差。因此需选择合适的缓冲溶液浓度以获得较高的灵敏度和分离度。保持 pH 5.0 不变, 分别考察了 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mmol/L NaH_2PO_4 的浓度 (H_3PO_4 调 pH), 发现 1.0 mmol/L 时, 分离度较差, 可能是由于缓冲容量太低, 而浓度高于 2.0 mmol/L 时, 由于焦耳热增大的缘故, 基线噪音增大, 峰形变差。

2.3 添加剂的影响 添加剂是毛细管电泳中一个十分重要的因素, 在缓冲溶液中加入有机溶剂可以降低电渗流的速度, 减少电导率, 从而减少焦耳热的产生, 改善峰形。本次实验考察了甲醇、乙醇、乙腈、丙酮和异丙醇作为添加剂对分析的影响。实验发现, 随着有机溶剂在缓冲溶液中比例的增加,

基线噪音降低, 但灵敏度也随之下降低, 且出峰时间逐渐延长。综合分离效果, 本次实验选择 H_3PO_4 - NaH_2PO_4 (2 mmol/L NaH_2PO_4 , H_3PO_4 调 pH 5.0) 为电泳介质。

2.4 进样时间和分离电压的影响 采用虹吸进样, 在一定的进样高度下, 进样时间决定了进样量的大小。进样量太小, 达不到检测器的灵敏度, 进样量太大, 样品塞长度超过扩散引起的区带增宽, 分离效率和分离度都变差。考察进样时间 6~24 s, 选择 14 s 为最佳分离时间。在柱长确定时, 随着操作电压的增加, 电渗流和电泳流速度的绝对值都增加, 迁移时间缩短。但在升高电压的同时, 将使柱内的焦耳热增加, 缓冲液的黏度减小, 在不能有效驱散所产生的焦耳热的情况下, 柱效和分离度反而下降。比较了分离电压在 8~20 kV 时的分离效果, 发现提高电压可以明显缩短分析时间, 但在电压升高的同时, 分离度变差, 且高电压下, 焦耳热增加, 体系的基线噪音增大, 故选择 12.0 kV 为分离电压。

2.5 提取方法的选择 不同溶剂, 不同提取方法对益母草中总生物碱提出率的影响已有文献报道^[10,11], 根据文献, 以 $\varphi=95\%$ 乙醇为溶剂超声提取 40 min, 益母草总碱提出率最高, 可能是由于超声波的强烈振动所具有的特殊作用, 有利于溶剂渗入药材粉末中, 加速药物中的生物碱成分溶出和扩散, 从而提高了提取率, 缩短了提取时间。故本次实验采用超声法来提取水苏碱, 分别考察了以不同体积的乙醇 ($\varphi=30\%$, 50% , 95%) 和水为溶剂水苏碱的提出率。结果发现, 以水为溶剂时, 水苏碱的提出率最高, 不同提取条件下所得毛细管电泳谱图如图 1 所示。

2.6 线性关系、精密度和检出限 分别精密量取对照品溶液, 按不同比例稀释成浓度分别为 2.50×10^{-3} 、 5.00×10^{-3} 、 10.0×10^{-3} 、 20.0×10^{-3} 、 40.0×10^{-3} 、 80.0×10^{-3} 、 160×10^{-3} 、 320×10^{-3} 、 640×10^{-3} 、1.00、1.30、2.00 和 2.60 mg/mL, 在优化条件下测定, 得水苏碱的线性回归方程为

$$Y = 0.982X + 162$$

r 为 0.993, 线性范围为 $20.0 \times 10^{-3} \sim 1.30$, 最低检出限为 2.50×10^{-3} mg/mL, RSD 为 2.10 mg/mL。

2.7 样品分析和回收率 在优化条件下, 取样品溶液经稀释 5 倍后进样测定, 电泳谱图见图 1c。计算出样品中水苏碱含量为 33.3 mg/g。将样品溶液稀释 5 倍, 并将对照品溶液与供试品溶液按不同比例混合, 测得回收率如表 1。

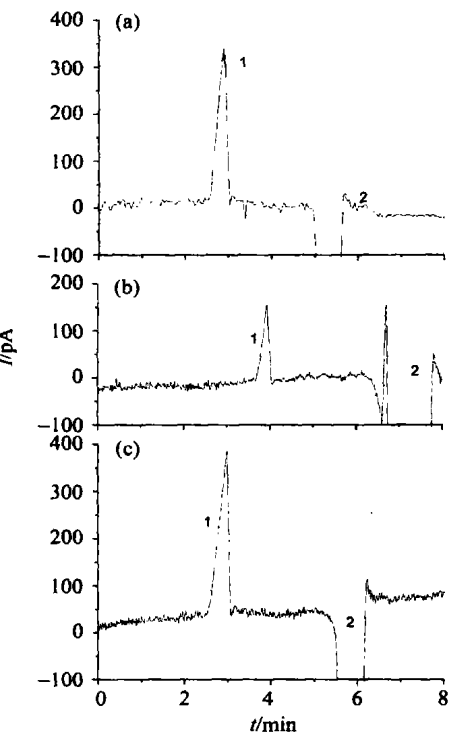


图 1 毛细管电泳谱图

Fig 1 Electrophoregram

(a) 对照品; (b) 样品 1: 乙醇提取; (c) 样品 2: 水提取

1. 水苏碱; 2. 水

缓冲液: $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (2.0 mmol/L NaH_2PO_4 , H_3PO_4 调 $\text{pH}=5.0$); 分离电压 12.0 kV

表 1 益母草药材中水苏碱的回收率测定

Tah 1 The recovery of stachydrine in *Herba leonuri*

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		回收率/ %		RSD/ % ($n=6$)	
底物	加入量	测得量		日内	日间
66.6	16.7	82.4	98.9	2.71	2.72
66.6	33.3	97.6	97.7	2.12	
66.6	50.0	115.2	98.8	3.64	

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

[2] 刘静红, 李静, 王淑芳. 益母草中水苏碱的含量测定[J]. 中草药, 1997, 28(2): 89—90.

[3] 虞和永, 何翱, 陈仙. 鲜益母草胶囊中水苏碱的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 113—114.

[4] 宋晶萍, 董树彪. 益母草颗粒中盐酸水苏碱的 HPLC 分析[J]. 广西医学, 2002, 24(8): 1289—1290.

[5] 姜舜尧. 益母草药材中水苏碱成分的高效液相色谱法分析[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(4): 243—247.

[6] 秦永平, 毛兴荣, 梁茂植, 等. RP-HPLC 测定产妇安口服液中水苏碱的含量[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(4): 288—290.

[7] 姜舜尧, 田颂九, 陈碧莲, 等. 几种中药生物碱的毛细管区带电泳分析//现代药物分析论坛[M]. 香港: 世界医药出版社, 1999: 128.

[8] 陈缙光, 莫金垣. 毛细管电泳高频电导检测器的研制[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 801—804.

[9] CHEN Z G, MO J Y, YANG X Y, et al. A new conductivity detector for capillary electrophoresis[J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231.

[10] 谢国莲. 超声提取法提高益母草总碱提出率的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 33(1): 5—6.

[11] 王文彤, 马雪梅, 朱永智. 不同溶剂提取对益母草中生物碱含量的影响[J]. 天津药学, 2003, 15(3): 5—19.

Determination of Stachydrine in *Herba leonuri* by Capillary Electrophoresis with High Frequency Conductivity Detection

WANG Jun mei¹, ZHAI Hai yun², CHEN Zuan guang¹

(1. Department of Chemistry, Zhongshan Medical College, Sun Yat sen University, Guangzhou 510089, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A method for the determination of stachydrine in *Herba leonuri* by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection has been developed. The buffer medium and electrophoretic parameters were researched. The stachydrine in *Herba leonuri* could be separated and detected in phosphate buffer (2.0 mmol/L of NaH_2PO_4 , adjusted to $\text{pH}=5.0$ by H_3PO_4) at 12.0 kV of constant voltage (current of 12 μA). The linear concentration of stachydrine ranged from 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1.30 mg/mL ($r=0.993$). The relative standard deviation (RSD) was 2.10%, the limit of detection (LOD) reached 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the recovery was 97.7%~98.9%.

Key words: capillary electrophoresis; high frequency conductivity detection; contactless conductivity detection; stachydrine; *Leonurus japonicus*