

毛细管电泳-电致化学发光检测法分离测定中药 马尿泡中的托烷类生物碱成分^{*}

任小娜， 马永钧， 周 敏， 霍淑慧， 姚俊丽， 陈 慧

(西北师范大学化学化工学院 甘肃省高分子材料重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要 以铕离子掺杂类普鲁士蓝(Eu-PB)化学修饰铂电极为工作电极,采用毛细管电泳-电致化学发光检测法对4种托烷类生物碱成分(如山莨菪碱、东莨菪碱、阿托品和樟柳碱)进行了分离检测。考察了氧化电位值、运行缓冲液酸度、盐浓度和甲醇含量等实验条件对电泳分离效果及检测灵敏度的影响。在优化的实验条件下,以20 mmol/L的磷酸盐(pH 8.0)-7% (体积分数)甲醇为运行液,各组分在6 min内可达到基线分离,其峰面积的相对标准偏差小于5.0%,迁移时间的相对标准偏差小于1.1% (n=12)。并将该法成功地应用于测定中药马尿泡根茎中的山莨菪碱和东莨菪碱的含量,其含量平均值分别为27.8 g/kg和4.43 g/kg。样品的加标回收率为97.8%~102%。

关键词 毛细管电泳; 电致化学发光检测; 修饰电极; 托烷类生物碱; 马尿泡

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)02-0223-05 栏目类别: 研究论文

Determination of tropane alkaloid components in *Przewalskia tangutica* Maxim. by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection

REN Xiaona, MA Yongjun, ZHOU Min, HUO Shuhui, YAO Junli, CHEN Hui

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University,

Key Laboratory of Polymer Materials of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract : Based on an Eu-PB modified platinum electrode as the working electrode, a method for the simultaneous determination of the four tropane alkaloids, anisodamine, scopolamine, atropine and anisodine, by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection (CE-ECL) has been established. The effects of several factors, such as the detection potential, the acidity and concentration of the running buffer, and the content of the methanol additive were investigated for the improvement of separation ability and detection sensitivity. Under the optimized conditions, these four components could be fully separated from each other in a 20 mmol/L phosphate (pH 8.0) containing 7% (v/v) methanol buffer within 6 min. The relative standard deviations of the peak area and migration time were less than 5.0% and 1.1% (n=12) respectively for all the four compounds. Thus, the method has been successfully applied to the determination of anisodamine, scopolamine in *Przewalskia tangutica* Maxim. The average amounts of 27.8 g/kg anisodamine and 4.43 g/kg scopolamine were found in the herbal root-stalk sample. The recoveries of the tropane alkaloids were 97.8%~102%.

Key words : capillary electrophoresis (CE); electrochemiluminescence (ECL) detection; chemically modified electrode; tropane alkaloids; *Przewalskia tangutica* Maxim.

马尿泡(*Przewalskia tangutica* Maxim.) ,又名唐古特马尿泡、矮莨菪等,系茄科马尿泡属植物,为我国特有属植物;分布于青海、西藏、四川等地。

它是藏医常用药,其根和种子及全草均可做药用,具有镇痛、解痉、杀虫、消炎等药效,用于治疗胃肠痉挛疼痛、白喉、炭疽等病症。对其化学成分进行的大量

收稿日期 2007-11-01

第一作者:任小娜,硕士研究生。

通讯联系人:马永钧,教授。Tel:(0931)3359666, E-mail:LF0522@0931mail.com.

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(No. 3ZS051-A25-097)。

*本文的英文电子版由 Elsevier 出版社在 ScienceDirect 上出版(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722059>).

研究发现,山莨菪等托烷类生物碱是其主要的生化有效成分。因此准确测定马尿泡中的生物碱类化合物对于其药用制剂的质量控制和临床疗效均具有重要的意义。

目前,山莨菪等托烷类生物碱的检测主要有分光光度法^[1]、间接原子吸收和原子发射光谱法^[2,3]及高效液相色谱法(HPLC)^[4]等。分光光度法和间接原子吸收、间接原子发射光谱法的选择性较差;HPLC 存在着仪器价格高、分离时间相对较长、色谱柱易被污染及污染后难于清洗等缺点。毛细管电泳法(CE)具有分析速度快、分离效率高、重现性好、样品和溶剂消耗量小、毛细管柱寿命长和容易清洗等优点,已经被广泛应用于中草药成分分析领域^[5],将电致化学发光(ECL)检测技术与 HPLC 及 CE 结合起来可形成一种兼顾高效分离与高灵敏检测的全新分析方法^[6,7]。尽管毛细管电泳法应用于山莨菪

碱(anisodamine)、东莨菪碱(scopolamine)、阿托品(atropine)和樟柳碱(anisidine)这 4 种托烷类生物碱的分离已有一些报道^[8],但采用四氢呋喃作为渗流添加剂后,运行液对仪器部件和工作环境均有不良作用。本文建立了一种基于联吡啶钌(Ru(bpy)₃²⁺)电致化学发光体系的电泳分离方法(CE-ECL),此法用于同时分离这 4 种托烷类生物碱并测定了马尿泡根茎中山莨菪碱和东莨菪碱的含量。文献已报道掺杂的类普鲁士蓝膜对三(2,2'-联吡啶)钌(II)有良好的催化氧化作用^[9,10],所以本法中采用稀土铕掺杂的类普鲁士蓝膜修饰的铂电极作为工作电极,从而有效避免了样品中干扰杂质对电极的吸附毒化现象,大大提高了该法测定实际样品的可靠性和灵敏度。阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱的分子结构式见图 1。

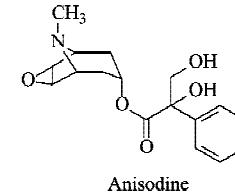
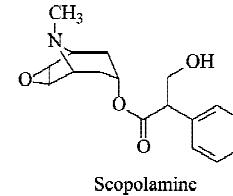
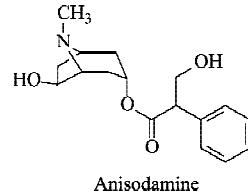
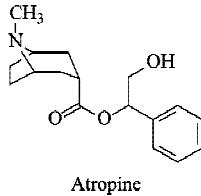


图 1 阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of atropine, anisodamine, scopolamine and anisidine

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MPI-A 型多参数化学发光毛细管电泳分析测试系统(西安瑞迈电子科技有限公司);SK2200HP 型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司);未涂层石英毛细管(40 cm × 25 μm)(河北永年光导纤维厂)。化学发光检测采用三电极系统:工作电极为铕离子掺杂类普鲁士蓝修饰铂电极($\Phi=0.5\text{ mm}$),辅助电极为铂丝,内充饱和 KCl 溶液的 Ag/AgCl 电极为参比电极。

二氯三联吡啶钌 Ru(bpy)₃Cl₂ · 6H₂O(98%,美国 Aldrich 公司);山莨菪碱标准品(中国国家药品生物制品检定所,批号 100249-199501);东莨菪碱、樟柳碱和阿托品标准品(Sigma 公司);马尿泡根茎购自青海晶珠藏药有限公司;其他试剂均为分析纯。实验用水为亚沸蒸馏水。

1.2 电极处理

参照文献[9],将裸铂电极在金相砂纸(1200 目)上打磨,用氧化铝(粒径 0.05 μm)乳液抛光成镜面,用水冲洗。再依次放入稀硝酸(1:1)、50% (体积分数)丙酮水溶液和水中超声清洗各 1 min。将电极置于新配制的组成为 0.2 mmol/L

K₃Fe(CN)₆、0.2 mmol/L FeCl₃、0.2 mmol/L 甘氨酸、0.2 mmol/L Eu³⁺ 的 25 mL 混合溶液(pH 3.0)中,以 20 mV/s 的扫描速度于 0 ~ +1.3 V 区间内循环扫描 10 圈后取出,用蒸馏水清洗后备用。

1.3 电泳条件及溶液配制

ECL 池结构与文献[10]中的设计相同。ECL 池中溶液为含 5 mmol/L Ru(bpy)₃²⁺ 的 80 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0);电泳运行缓冲液为含 7% (体积分数)甲醇的 20 mmol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液(pH 8.0);电动进样 10 kV × 10 s;分离电压为 12 kV,光电倍增管的负高压为 800 V。每次实验前依次用 0.01 mol/L NaOH 水溶液、水和运行缓冲液分别冲洗 3 min、3 min 和 5 min,实验 3 h 后更换新鲜 Ru(bpy)₃²⁺ 溶液,以保持实验数据的重现性。每两次进样之间设定缓冲液冲洗毛细管 2 min。所有溶液在进入毛细管前均用 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤。

准确称取山莨菪碱 6.91 mg、东莨菪碱 10.13 mg、阿托品 7.22 mg、樟柳碱 14.83 mg,用水溶解,分别定容至 10, 25, 50 mL 的容量瓶中,配制成浓度为 1.00 mmol/L 的对照品贮备液。配制好的对照品贮备液置于冰箱 4 ℃保存备用。

1.4 样品溶液的制备

取马尿泡根茎 50 g 干燥至恒重,研磨成粉,过 120 目筛后准确称取 3 份质量各为 1.000 g 的试样,每份试样均按以下步骤进行处理:加入 5.0 mL 甲醇溶液,超声提取 30 min 后冷浸 12 h 过滤;再用 5.0 mL 甲醇重复提取一次,合并两次滤液,用甲醇定容至 10.0 mL 容量瓶中备用。

2 结果与讨论

2.1 检测电位的影响

施加在铕掺杂的类普鲁士蓝膜修饰的铂工作电极上的电位是影响 ECL 强度的一个重要因素。实验发现,当按恒电位方式控制工作电极电位在 1.05 ~ 1.20 V (vs Ag/AgCl) 范围内变化时,4 种生物碱的 ECL 强度开始随着工作电极电位的增加而增加,且当工作电极电位达到 1.15 V 时,ECL 强度达到最大值;而当超过 1.15 V 后,ECL 强度又随电极电位的增加而下降(见图 2)。

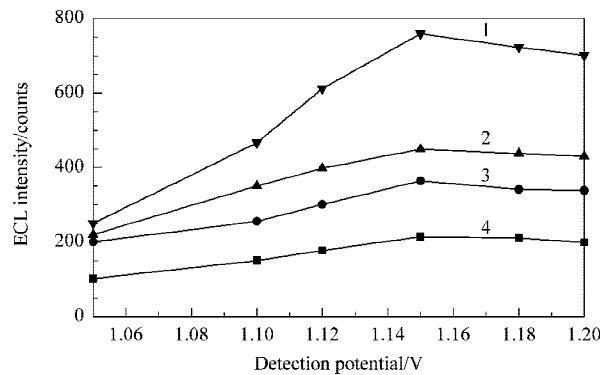


图 2 检测电位对 4 种托烷类生物碱 ECL 强度的影响

Fig. 2 Effect of detection potential on ECL intensity of four tropane alkaloids

Concentrations of four analytes: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ each; separation capillary, 40 cm \times 25 μm ; sample injection, 10 s at 10 kV; separation voltage, 12 kV; running buffer, 20 mmol/L pH 8.0 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄+7% methanol; 5 mmol/L Ru(bpy)₃³⁺ and 80 mmol/L pH 8.0 phosphate buffer in ECL cell.

1. atropine; 2. anisodamine; 3. scopolamine; 4. anisodine.

以上这种现象与 Ru(bpy)₃³⁺ 的电解生成效率 (electrogenic efficiency) 和生物碱特定化学基团的氧化活性有关。Noffsinger 等^[11] 曾报道过, ECL 强度与胺本身的结构有关。对脂肪族胺而言,由于它们氨基的第一级电离化所需能量为伯胺 > 仲胺 > 叔胺,因此其 ECL 强度为伯胺 < 仲胺 < 叔胺。他们在研究不同取代基的影响时发现,氨基 α -C 或 β -C 上存在吸电子的取代基时,其发光强度减少;相反,当取代基为推电子的取代基时,发光强度增加。这是由于氨基氮原子被氧化后形成的氮阳离子自由基 ($-\text{N}^+ \cdot -$) 的稳定性与其 α -C 或 β -C 上的取代基

性质有很大的关系。推电子基团的取代将减少 $-\text{N}^+ \cdot -$ 正电荷的量,导致其稳定性增加,寿命增长,从而增加发光强度。相反,如果取代基为吸电子基团时,则会减少 $-\text{N}^+ \cdot -$ 的寿命,从而减少发光强度^[7,11,12]。除取代基的性质影响生物碱的发光强度外,氨基氮周围基团的空间结构也会明显影响其发光强度。如图 1 所示,与阿托品相比,山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱的 β -C 分别与具有一定吸电子能力的羟基和环氧基相连接,由于山莨菪碱的 N-CH₃ 主要取平展构型,樟柳碱和东莨菪碱的 N-CH₃ 主要取直立构型,空间位阻将阻碍樟柳碱和东莨菪碱中氮正离子自由基平面结构的形成,增加氮的电离势,影响氮正离子自由基的稳定性^[13,14],从而导致这 4 种生物碱的化学发光强度发生变化。由于上述因素的影响,对于相同浓度的这 4 种生物碱,发光强度按照阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱顺序依次降低,而东莨菪碱与樟柳碱的发光强度相近。

另一方面,Ru(bpy)₃³⁺ 的电解生成效率也是影响生物碱发光强度的一个重要因素,而 Ru(bpy)₃³⁺ 的电解生成效率与施加在工作电极上的氧化电位值有关。如图 2 所示,当电极电位值未达到最佳电位时,由于 Ru(bpy)₃³⁺ 的电解生成效率低,电解产生的 Ru(bpy)₃³⁺ 量不足而致使 ECL 较低;而当电极电位值超过最佳电位时,发光池中存在的氯离子和基底物质的氧化也会导致 Ru(bpy)₃³⁺ 的电解生成效率变低,生物碱的 ECL 强度会随之降低。所以,实验可选择 1.15 V 为最佳氧化电位。

2.2 分离条件的优化

2.2.1 缓冲溶液种类、酸度和浓度的选择

实验研究了 H₃PO₄-NaH₂PO₄、NaH₂PO₄-Na₂HPO₄、柠檬酸-柠檬酸钠、HAc-NaAc、Tris-H₃BO₃、Tris-HCl 等几种缓冲体系在不同浓度、不同配比条件下对马尿泡根茎中生物碱分离检测的影响。结果表明,在 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲体系中基线平稳、噪声低、分离时间较短、峰形较好,是较理想的缓冲体系。缓冲液的浓度变化对分离度也有一定影响,实验考察了磷酸盐浓度为 5 ~ 50 mmol/L 时对分离度的影响,结果表明,磷酸盐浓度小于 20 mmol/L 时,樟柳碱和东莨菪碱的分离度略有降低;磷酸盐浓度大于 20 mmol/L 时,噪声随之缓慢增大、基线开始漂移、灵敏度下降。综合考虑后选择磷酸盐浓度为 20 mmol/L。固定缓冲液浓度后,对 pH 从 3.5 至 10 每隔 0.5 个单位进行考察,发现上述 4 种物质在 pH = 8.0 时,其迁移时间差别较大,故选择 pH 为 8.0。

2.2.2 添加剂对电泳分离的影响

在缓冲液体系中加入一定量的添加剂可显著地影响样品的迁移时间和分离效果,从而提高分离选择性;同时,添加剂的加入也对化学发光信号的强度产生一定的作用。为了在不过多损失灵敏度的前提下获得较好的相互分离效果,考察了表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)、环糊精及有机溶剂对山莨菪碱、东莨菪碱、阿托品和樟柳碱迁移时间的影响。结果发现,SDS、环糊精对4种物质的分离效果影响不大,只有甲醇的加入可以明显地改善分离效果,且少量甲醇的加入使组分峰形得到了改善,各组分的发光强度略有增加(见图3)。同时,实验数据显示若甲醇的浓度太低,4种物质不能达到很好的相互分离;但若浓度太高,则使得分析时间大大延长,且发光信号不稳定。经过实验优化,当甲醇的体积分数为7%时,分离效果最好,4种物质间的分离度可达到1.5以上(见图4),故实验过程中选择7%甲醇作为运行缓冲液的添加剂。此外,由图4可以看出,甲醇加入量的变化对所有组分的出峰位置都略有影响。

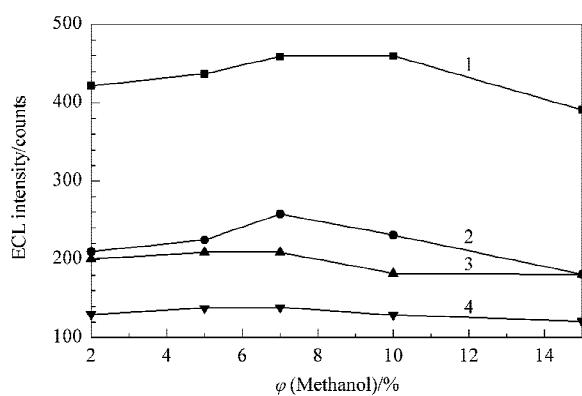


图3 运行缓冲液中甲醇含量对电致化学发光强度的影响

Fig. 3 Effect of content of methanol in running buffer on ECL intensity

Other conditions are the same as in Fig. 2.

1. atropine ; 2. anisodamine ; 3. scopolamine ; 4. anisidine.

2.2.3 分离电压的影响

运行电压对迁移速度、分离度均产生影响,增加操作电压可提高分离效果,缩短迁移时间。在保持加入甲醇量一定的实验条件下,依次考察运行电压为8,10,12和14 kV时对分离的影响。结果表明,电压增高,组分的淌度增大,焦耳热增大,基线噪声

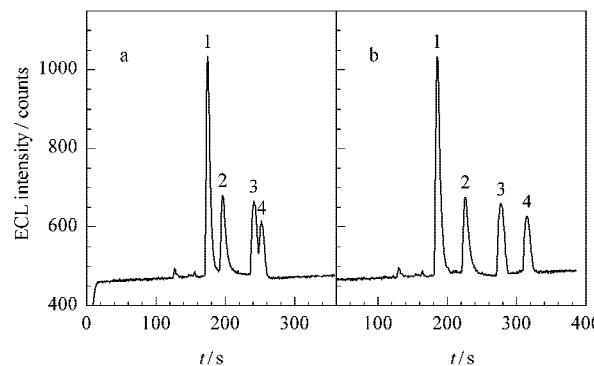


图4 阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱的典型电泳分离图

Fig. 4 Electropherograms of atropine, anisodamine, scopolamine and anisidine

Running buffer, 20 mmol/L pH 8.0 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ with:
a. 0% methanol ; b. 7% methanol . Other conditions are the same as in Fig. 2.

1. atropine ; 2. anisodamine ; 3. scopolamine ; 4. anisidine.

也增大,分离度下降。但是在较低的电压下,虽然分离度有所增加,但色谱峰有较严重的拖尾,并且出峰时间大大延长。综合考虑分离度、峰形和分析时间3因素,选择12 kV为最佳运行电压。

2.3 线性关系的考察

配制山莨菪碱、东莨菪碱、阿托品和樟柳碱的系列标准溶液,在最佳条件下,对4种生物碱的峰面积与质量浓度(mg/L)计算线性回归方程及相关系数,结果见表1。实验结果表明,在一定的浓度范围内标准曲线呈良好的线性关系,r值均大于0.9994。信噪比为3(S/N=3)确定检出限,各物质的检出限均小于0.46 mg/L。

2.4 仪器的精密度

将质量浓度分别为3.10,43.8,4.90,40.0 mg/L的山莨菪碱、东莨菪碱、阿托品和樟柳碱对照品混合溶液平行测定12次,测得阿托品峰面积的相对标准偏差(RSD)为3.1%,迁移时间的RSD为1.0%;山莨菪碱峰面积的RSD为2.2%,迁移时间的RSD为0.9%;东莨菪碱峰面积的RSD为4.1%,迁移时间的RSD为1.1%;樟柳碱峰面积的RSD为3.1%,迁移时间的RSD为1.1%。

2.5 样品的测定及加样回收实验

用本方法对实际样品进行测定时,将马尿泡根茎提取液稀释适当倍数后在上述实验条件下以标准

表1 4种生物碱的线性回归方程、相关系数及检出限

Table 1 Results of regression analysis on working curves and the detection limits

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Linearity range/(mg/L)	Detection limit/(mg/L)
Anisodamine	$Y = -15.34 + 8.76 \times 10^7 X$	0.9995	0.300~305	0.22
Scopolamine	$Y = 97.64 + 4.78 \times 10^7 X$	0.9996	1.30~87.7	0.46
Atropine	$Y = -1.51 + 1.18 \times 10^7 X$	0.9994	0.0690~48.6	0.030
Anisidine	$Y = 22.57 + 3.30 \times 10^7 X$	0.9996	0.400~400	0.32

Y: peak area (μV·s); X: concentration of standard tropane alkaloid, mg/L.

加入法平行测定3次计算出平均含量,然后以测得固定干重马尿泡提取液中山莨菪碱、东莨菪碱的含量值推算出马尿泡根茎中两种生物碱的平均含量值分别为27.8 g/kg和4.43 g/kg,阿托品和樟柳碱未检出。图5为马尿泡提取液稀释100倍后的电泳图及东莨菪碱的加标电泳图。由于山莨菪碱的信号响应比较大,所以进行山莨菪碱的加标实验时必须将马尿泡提取液稀释1000倍后进行测定(图略)。加标测得值与回收率实验结果见表2。

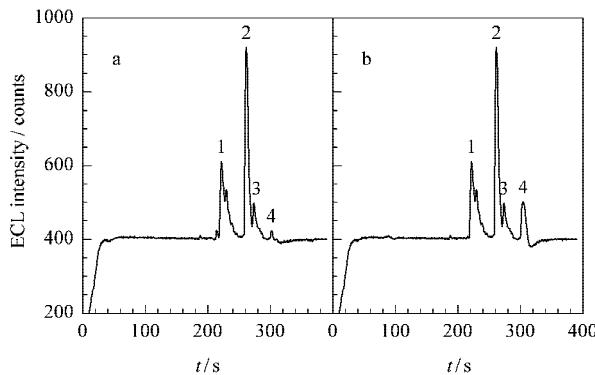


图5 (a) 马尿泡提取液稀释100倍和(b)其 2.0×10^{-5} mol/L东莨菪碱加标的电泳图

Fig. 5 Electropherograms of (a) the diluted extract of *Przewalskia tangutica* Maxim. and (b) the diluted extract spiked with 2.0×10^{-5} mol/L scopolamine

1, 3. unknown components; 2. anisodamine; 4. scopolamine.

表2 马尿泡根茎中托烷类生物碱成分的回收率($n=5$)

Table 2 Recoveries for tropane alkaloid components in *Przewalskia tangutica* Maxim. ($n=5$)

Component	Original amount/mg	Added/mg	Found/mg	Recovery/%	RSD/%
Anisodamine	29.7	30.5	58.9	97.8	1.1
	29.7	61.1	88.9	97.9	1.7
Scopolamine	4.40	5.00	9.62	102.0	2.0
	4.40	10.0	14.2	98.9	2.1
Atropine	0.00	69.5	68.7	97.9	1.3
	0.00	139.0	137.9	99.2	1.5
Anisodine	0.00	40.0	39.2	98.0	1.6
	0.00	80.0	78.8	98.4	1.5

对比图4和图5还可以发现,在实际样品测定时,山莨菪碱和东莨菪碱的迁移时间与其标准品的迁移时间相比均同步后移约25 s,一般这种现象大多是由样品中共存的基底物质引起的。在毛细管电泳中,物质由于荷电能力、粒子大小不一,在电场中迁移速度不同而获得分离。一般来说,离子所带电荷越多,解离度越大,体积越小,电泳的速度就越快。这4种生物碱的分子体积依次增大的次序为阿托品<山莨菪碱<东莨菪碱<樟柳碱,因而样品出峰的顺序依次为阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳

碱。在实际样品分析中,作者用加标定性方法确证了样品中存在的山莨菪碱和东莨菪碱出峰位置而在对应于阿托品和樟柳碱出峰位置上却无响应峰出现,同时也发现4种生物碱加标峰的出峰顺序和其峰间距均无改变。因此,这种实际样品测定中的峰位置移动现象很可能是由于样品中存在但又无发光响应的多糖及糖甙类等基底物质引起的,实验数据表明这些基底物质的存在并未影响定量分析的结果。

3 结论

本文将Eu-PB化学修饰电极应用于毛细管电泳-电致化学发光联用测定技术中,对阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱等4种生物碱进行了电泳分离条件的优化;分离和测定了中药马尿泡根茎中的山莨菪碱、东莨菪碱含量,并对方法的精密度、准确度和回收率进行了测定。本方法具有速度快、线性范围宽、准确度好、样品及缓冲液用量少、自动化程度高等优点,具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] Feng S L, Shi H M, Fan J. Chinese Journal of Analytical Chemistry(冯素玲,时惠敏,樊静.分析化学), 2006, 34(8):1157
- [2] Wang W, Sun W D. Spectroscopy and Spectral Analysis(王伟,孙为德.光谱学与光谱分析), 2003, 23(4):825
- [3] Wang W, Sun W D. Chinese Journal of Pharmaceuticals(王伟,孙为德.中国医药工业杂志), 2003, 34(4):183
- [4] Zhou H B, Zhang X, He X. Chinese Journal of Chromatography(周宏兵,张烜,何新.色谱), 1996, 14(1):60
- [5] Liu H W. Chinese Journal of Chromatography(刘虎威.色谱), 2003, 21(4):307
- [6] Yin X B, Wang E. Anal Chim Acta, 2005, 533:113
- [7] Chen X, Yi C Q, Li M J, et al. Anal Chim Acta, 2002, 466:79
- [8] Lin M, Zhang Z X, An D K, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(林梅,张正行,安登魁,等.分析化学), 1998, 26(4):457
- [9] Zhou X Y, Zhou M, Fu Z Z, et al. Journal of Northwest Normal University:Natural Science(周秀英,周敏,付周周,等.西北师范大学学报:自然科学版), 2007, 43(1):54
- [10] Zhou M, Ma Y J, Ren X N, et al. Anal Chim Acta, 2007, 587:104
- [11] Noffsinger J B, Danielson N D. Anal Chem, 1987, 59:865
- [12] Chen X, Li M J, Li Z, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(陈曦,李梅金,李真,等.分析化学), 2002, 30(5):513
- [13] Chen X, Yi C Q, Li M J, et al. Acta Chimica Sinica(陈曦,易长青,李梅金,等.化学学报), 2002, 60(9):1662
- [14] Wang G X, Li L Y, Shen L F, et al. Chinese Journal of Magnetic Resonance(王国兴,李丽云,沈联芳,等.波谱学杂志), 1987, 4(3):16