

非水毛细管电泳法同时测定麦冬中薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的含量

黄宝美^{1*}, 姚程炜², 边清泉¹, 王志国¹, 莫金垣³

(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: 采用非水介质毛细管电泳法同时测定了麦冬中薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的含量。以 70%甲醇为非水介质, 20 mmol·L⁻¹ 硼砂-HCl 为缓冲溶液 (pH 7.61), 运行 25 kV 高压, +0.70 V 工作电极电位的条件下, 实现了被测组分的有效分离。测得麦冬中薯蓣皂苷元的含量为 0.018 mg·g⁻¹, 鲁斯可皂苷元的含量为 0.008 mg·g⁻¹, 薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的平均回收率分别为 102%和 99.2%。本法为麦冬中薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的质量控制提供了新方法。

关键词: 毛细管电泳; 薯蓣皂苷元; 鲁斯可皂苷元; 麦冬

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0443-04

Determination of diosgenin and ruscogenin in Radix Ophiopogonis by nonaqueous capillary electrophoresis

HUANG Bao-mei^{1*}, YAO Cheng-wei², BIAN Qing-quan¹, WANG Zhi-guo¹, MO Jin-yuan³

(1. Chemical Department of Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China; 2. Facility Design and Instrumentation Institute of China Aerodynamics Research & Development Center, Mianyang 622653, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Nonaqueous capillary electrophoresis is used for the determination of the contents of diosgenin and ruscogenin in Radix Ophiopogonis. The operating buffer was composed of 20 mmol·L⁻¹ Na₂B₄O₇-HCl (pH 7.61) in 70% methanol. The applied voltage was 25 kV and detection potential was at +0.70 V. With these conditions, the components were successfully separated. The content of diosgenin in Radix Ophiopogonis was 0.018 mg·g⁻¹ and ruscogenin was 0.008 mg·g⁻¹. The average recoveries of diosgenin and ruscogenin were 102% and 99.2%, respectively. A new method of the quality control of diosgenin and ruscogenin in Radix Ophiopogonis is provided.

Key words: nonaqueous capillary electrophoresis; diosgenin; ruscogenin; Radix Ophiopogonis

麦冬 (Radix Ophiopogonis) 为百合科属植物麦冬的干燥块根, 是传统中药之一。近年来药理研究显示麦冬具有强心、利尿、抗菌耐缺氧、免疫调节、降血糖、改善心肌缺血等作用^[1, 2]。这些作用主要归功于它的活性成分薯蓣皂苷元 (diosgenin) 和鲁斯可皂苷元 (ruscogenin)。

目前对麦冬的报道大多是关于对其临床应用和药理药效的研究, 对其活性成分含量进行分析检测的报道有高效液相色谱法^[3, 4]、薄层扫描法^[5]、紫外可见分光光度法^[6]、比色法^[7]。作者曾用毛细管电泳安培法^[8]对薯蓣皂苷元的成分进行分离测定, 本文继续研究, 采用非水介质 CE 法对两种活性成分进行快速分离和检测, 与上次研究相比, 采用非水介质是因为可以使用更高的电压从而分离迅速, 在 3 min 内实现了两种物质的有效分离。

收稿日期: 2010-11-03.

基金项目: 绵阳师范学院校级项目 (MY2010003).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-816-2200064, E-mail: hbm790117@yahoo.com.cn

毛细管电泳分离通常在水溶液中进行, 要求药物具有一定的亲水性, 而非水介质毛细管电泳 (NACE) 分离比水介质有更多的优点^[9, 10], 如具有更宽的酸碱范围, 可增加疏水物质的溶解度并减少疏水物质对毛细管的吸附以及可以使用更高的电压和减少焦耳热等。上述两种皂苷元均难溶于水, 因此, 采用 NACE 进行分离和安培检测, 可以得到较满意的结果。

材料与方 法

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。薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元对照品 (中国药品生物制品检定所), 麦冬为市售。

对照品溶液的制备 准确称取薯蓣皂苷元对照品 0.014 4 g 和鲁斯可皂苷元对照品 0.017 0 g, 用甲醇溶解后定容至 25 mL, 得到对照品溶液浓度分别为 $576 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $680 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 再取 1 mL 稀释 100 倍待用。

样品溶液的制备 参照参考文献[10]方法。

缓冲溶液的制备 分别制备 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼砂、磷酸二氢钠、氢氧化钠和盐酸的储备液, 各取适

量配成不同浓度比的体系。

实验方法 进样前, 毛细管依次用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸、二次蒸馏水和缓冲溶液各冲洗约 10 min, 每两次进样之间用缓冲液冲洗 3 min, 以保证其重现性。本实验用碳纤维电极体系。采用重力进样方式, 进样高度 20 cm, 时间 10 s, 分离毛细管长度 45 cm, 内径 $50 \mu\text{m}$, 分离电压 25 kV, 工作电极电位 +0.70 V。

结果

1 工作电位的选择

在电化学工作站上做薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的循环伏安图 (图 1), 从图中可看出, 薯蓣皂苷元在 +0.5 V 左右出现一个不可逆的氧化峰, 鲁斯可皂苷元在 0.45 V 左右出现一个不可逆的氧化峰, 两种物质的氧化电位很接近, 有利于电位的优化。又在毛细管电泳仪上考察了薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的动态伏安曲线 (图 1C), 发现薯蓣皂苷元 0~0.60 V 峰电流不断增加, 0.60 V 时达到最大, 鲁斯可皂苷元在 0.75 V 时峰电流达到最大, 电位正移, 峰电流又有所减小, 综合考虑电位对两种物质灵敏度的影响, 所以本文选择 0.70 V 为最佳检测电位。

2 非水介质的选择

非水介质毛细管电泳中有机溶剂的选择, 需要

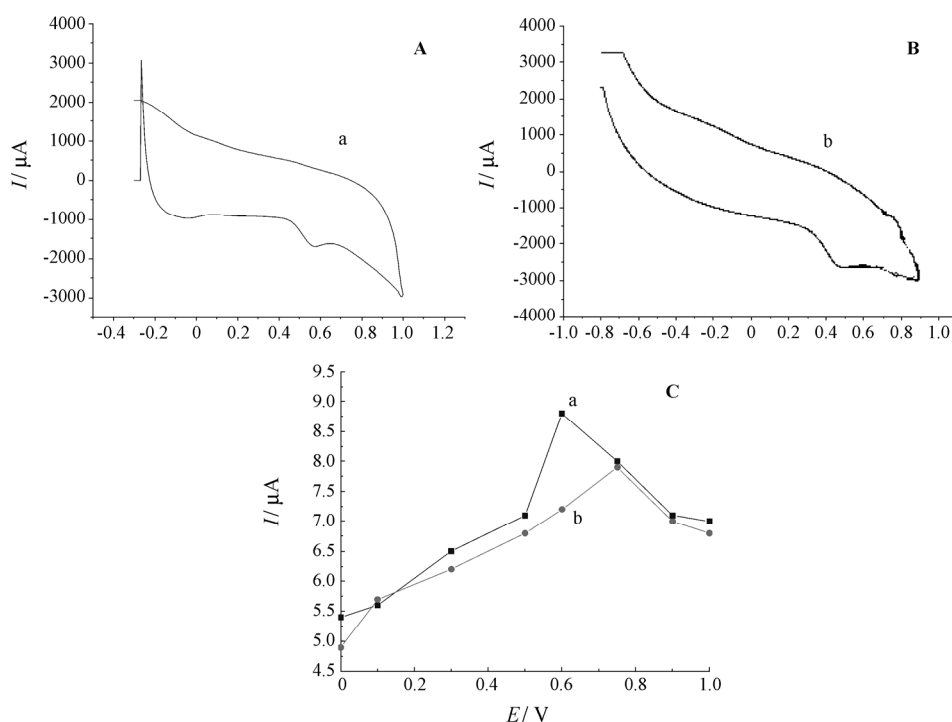


Figure 1 Cyclic voltammograms (A, B) and hydrodynamic voltammograms (C) of diosgenin (a) and ruscogenin (b). Separation voltage: 25 kV; capillary: $50 \mu\text{m} \times 45 \text{ cm}$; injection height: 20 cm; injection time: 10 s

考虑介质的粘度、介电常数、挥发性、质子离解和偶极矩等多种因素的综合影响。通过实验比较,发现无水甲醇可以提高选择性和增大分离度,另外由于其较低的电渗流,可允许使用更高的分离电压,所以选用无水甲醇作为非水介质。实验配制了有机溶剂体积比为 60%、70% 和 80% 的缓冲溶液进行实验,观察到随着有机组分含量的增加,迁移时间增加,可能是因为影响电渗流的相对介电常数 ϵ 、介质黏度 η 、以及 zeta 电位 ξ 中 ξ/η 比值表现为先减小后增大,而 ξ 电位却随着有机组分含量的增加而降低,二者综合影响的结果使得电渗流的速度随着有机组分的增加呈现逐渐降低的趋势,所以迁移时间随着有机溶剂的增加而增加。当甲醇浓度为 60% 时,峰较宽,不易于定量,当浓度增大到 80% 时峰也有所加宽,考虑到灵敏度和检出限的问题,所以选择甲醇的浓度为 70%。

3 缓冲溶液的选择

分别考察了邻苯二甲酸氢钾 (KHP)-NaOH、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -NaOH 和硼砂-盐酸等不同种类的缓冲溶液体系。实验观察到 pH 5.6 的 KHP-NaOH 缓冲溶液时,基线不稳,出峰较乱;采用 pH 8.0 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -NaOH 缓冲溶液时,基线不同程度的往下漂移,峰形较差,不利于观察;采用 pH 9.94 的硼砂-盐酸缓冲溶液时,出峰较好,所以选择硼砂-盐酸体系缓冲溶液。

实验考察了缓冲溶液 pH 值分别为 7.61、8.31 和 9.94 的硼砂-盐酸缓冲溶液体系对分离的影响。pH 9.94 和 8.31 的硼砂-盐酸缓冲溶液时,出峰较小,但基线较平稳,pH 7.61 硼砂-盐酸缓冲溶液,出峰时间较快,峰形较好。故本实验选择 pH 7.61 的硼砂-盐酸缓冲溶液体系。

实验中固定溶液的 pH 值,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,迁移时间增加,故本实验选用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼砂为缓冲溶液的浓度。

4 分离高压及进样时间对分离的影响

毛细管电泳的驱动力是分离高压。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 (10~30 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,实验选择进样高度为 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 10 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 10 s。

5 方法的精密度和线性范围

将薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元对照品进样 6 次,迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.54%、0.37% 和 1.34%、0.87%。分别取稀释后的对照品溶液和流动相配制成 1+1、1+10、1+20、1+30、1+40 和 1+50 等一系列不同浓度的对照溶液用于电泳分析。薯蓣皂苷元在 $0.11 \sim 5.76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度内峰面积 (Y) 与质量浓度 (C) 之间呈现良好的线性关系,回归方程为: $Y = 324.76 + 4747.7 C$, $r = 0.9997$, 检出限为 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$); 鲁斯可皂苷元在 $0.14 \sim 6.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度内峰面积 (Y) 与质量浓度 (C) 之间呈现良好的线性关系,回归方程为: $Y = 221.24 + 6587.3 C$, $r = 0.9996$, 检出限为 $0.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

6 样品测定及加标回收实验

在最佳条件下,将薯蓣皂苷元浓度为 $0.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和鲁斯可皂苷元浓度为 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品和样品进样,毛细管电泳图见图 2。样品采用外标法定量,平行测定 5 次,计算麦冬中薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的含量分别为 $0.018 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。制备样品溶液时分别加入不同水平量的对照溶液,进行加标回收实验,测得薯蓣皂苷元和鲁斯可皂苷元的平均回收率分别为: 102% 和 99.2% (表 1)。

Table 1 Determination results and recovery detection. $n = 5$

	Background / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Added / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Founded / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	Recovery rate /%
Diosgenin	0.36	0.20	0.57	2.5	105
		0.50	0.85	2.2	98.0
		1.60	1.99	1.8	102
Ruscogenin	0.16	0.15	0.31	3.1	100
		0.5	0.65	2.6	98
		2.0	2.15	2.9	99.5

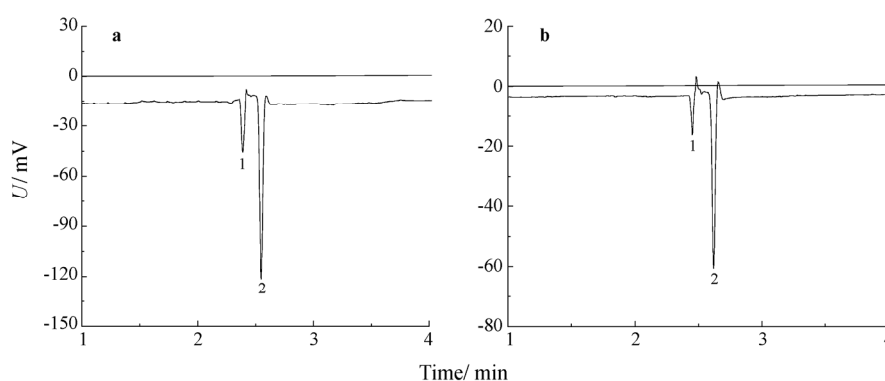


Figure 2 Electrophorogram of standard (a) and sample (b). Separation voltage: 25 kV; capillary: 50 $\mu\text{m} \times 45$ cm; injection height: 20 cm; injection time: 10 s; buffer: 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 7.61). 1: Ruscogenin; 2: Diosgenin

References

- [1] Jiang Y, Duan CL, Chai X, et al. Study on chemical ingredients of fibrous root from *Ophiopogon japonicus* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1111-1114
- [2] Jiang FR, Zhang X, Fan J, et al. Advances in studies on pharmacological effect of *Ophiopogon japonicus* [J]. China Arch Tradit Chin Med (中医学刊), 2006, 24: 236-237.
- [3] Xu XL, Xiang Y, Ke ZH, et al. Quantitative analysis of diosgenin in Jinhui Guanxin tablet by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 527-529.
- [4] Cheng SQ, Lü GH, Xu YM, et al. Determination of diosgenin in Jingangteng tablets by HPLC [J]. Drug Stand China (中国药品标准), 2007, 8: 36-38.
- [5] Xu JT, Tang GP, Wu M, et al. Determination of ophiopogonin constituents by TLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1997, 17: 164-166.
- [6] Wang GZ, Liu WW, Ge RB, et al. Determination of total saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by colorimetric analysis [J]. J Hubei Coll Tradit Chin Med (湖北中医学院学报), 2008, 10: 44-45.
- [7] Ai WS, Liu LQ, Xu CH, et al. Determination of diosgenin by colorimetry in the Weiley Granules [J]. Her Med (医药导报), 2005, 24: 626-726.
- [8] Huang BM, Yao CW, Mo JY, et al. Determination of diosgenin in Radix Ophiopogonis with amperometric detection by capillary electrophoresis [J]. J Sun Yat-sen Univ (中山大学学报), 2010, 49: 66-71.
- [9] Wei SL, Mo JY. Separation of salicylic acid drugs by aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis with conductance detector [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 207-210.
- [10] Hu Q, Tian SJ, Xu MD. Analysis of six antipsychotic drugs by nonaqueous capillary electrophoresis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 928-931.