

胶束电动毛细管色谱法测定草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的含量

赵艳芳¹, 徐坤², 徐鲁斌^{1*}, 吕海涛¹

(1. 青岛农业大学化学与药学院, 青岛 266109; 2. 青岛农业大学分析测试中心, 青岛 266109)

[摘要] 目的: 建立胶束电动毛细管色谱快速测定草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的方法。方法: 采用未涂层石英毛细管(31.2 cm × 75 μm, 有效长度 21 cm), 分离电压 15 kV, 检测波长 286 nm, 背景缓冲液组成为 20 mmol·L⁻¹ pH 7.0 硼砂-5 mmol·L⁻¹ SDS-10% 乙腈。结果: 在选定实验条件下, 山姜素和小豆蔻明在 4 min 内即可达到完全分离, 并与峰面积线性关系良好, 线性范围分别为 25.2 ~ 251.1 mg·L⁻¹ ($r = 0.996 2$), 27.9 ~ 167.4 mg·L⁻¹ ($r = 0.999 5$); 平均回收率分别为 102.4% (RSD 2.46%) 和 97.1% (RSD 2.72%)。结论: 该方法操作简便, 分析速度快, 用于草豆蔻样品测定, 结果满意。

[关键词] 胶束电动毛细管色谱; 草豆蔻; 山姜素; 小豆蔻明

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0142-03

[doi] 10.11653/syfq2013140142

Determination of Alpinetin and Cardamonin in *Alpinia katsumadai* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

ZHAO Yan-fang¹, XU Kun², XU Lu-bin^{1*}, LU Hai-tao¹

(1. College of Chemistry and Pharmaceutical Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Analysis and Testing Center, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid micellar electrokinetic capillary chromatography method for the routine analysis of alpinetin and cardamonin in *Alpinia katsumadai* Hayata was established. **Method:** The analysis was carried out using an unmodified fused-silica capillary (75 μm; total length 31.2 cm; effective length 21 cm), the background electrolyte (BGE) containing 20 mmol·L⁻¹ sodium borate (pH 7.0) -5 mmol·L⁻¹ sodium dodecyl sulfate (SDS) -10% acetonitrile. The applied voltage was 15 kV and detection wavelength was 286 nm.

Result: Under the selected conditions, two components were separated completely within 4 min. The linear range was 25.2-251.1 mg·L⁻¹ ($r = 0.996 2$) for alpinetin and 27.9-167.4 mg·L⁻¹ ($r = 0.999 5$) for cardamonin. The average recoveries were 102.4% (for RSD 2.46%) alpinetin and 97.1% (RSD 2.72%) for cardamonin.

Conclusion: This method has the advantages of rapidity, simplicity and has been successfully applied to the analysis of alpinetin and cardamonin in *Alpinia katsumadai* sample.

[Key words] micellar electrokinetic capillary chromatography; *Alpinia katsumadai*; alpinetin; cardamonin

[收稿日期] 20111118(005)

[基金项目] 青岛农业大学高层次人才启动基金项目(630736)

[第一作者] 赵艳芳, 博士, 副教授, 从事天然产物提取与分离分析研究, Tel: 15963247349, E-mail: zyftoday@163.com

[通讯作者] * 徐鲁斌, 博士, 副教授, 从事天然产物化学研究, Tel: 0532-86080442, E-mail: qnd_xlb@163.com

草豆蔻是姜科山姜属植物草豆蔻的成熟种子团, 其性温, 具有健胃止吐、祛寒止泻、收敛等作用, 在中医临床上用于寒湿内阻、脘腹冷痛、暖气呃逆、不思饮食等症^[1]。草豆蔻中主要有效成分山姜素和小豆蔻明, 其含量作为衡量药品质量的主要指标之一。目前, 测定山姜素和小豆蔻明含量的主要方法为高效液相色谱法 (HPLC)^[2-5], 而采用高效毛

细管电泳法(HPCE)测定这两种有效成分未见有国内文献报道。HPCE分离速度快,试剂和样品消耗少,成本低,对环境污染小,在中草药及其制剂的分析中有着HPLC无法比拟的优点^[6-7]。本文采用胶束毛细管电泳法同时测定了草豆蔻中山姜素和小豆蔻明含量,为草豆蔻的质量控制提供了一种新的方法。

1 仪器与试剂

HP^{3D}毛细管电泳仪(Agilent公司,美国),配有二极管阵列检测器及仪器操作和数据采集软件。未涂层石英毛细管(ID.75 μm,OD.375 μm,河北永年光导纤维厂),毛细管总长为31.2 cm,有效长度为21 cm。Mettler Toledo 320 pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

山姜素和小豆蔻明对照品购于中国药品生物制品检定所(批号分别为110762-200303,110763-200302),其他试剂均为分析纯。草豆蔻药材样品购于当地药店及药材市场,经青岛农业大学化学与药学院吕海涛教授鉴定为姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* 的干燥种子团。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 背景电解质溶液组成为20 mmol·L⁻¹ pH 7.0 硼砂-5 mmol·L⁻¹ SDS-10%乙腈。毛细管柱在使用前首先用1 mol·L⁻¹ NaOH,0.1 mol·L⁻¹ HCl,0.1 mol·L⁻¹ NaOH,H₂O、缓冲溶液分别冲洗5 min,两次运行之间用背景电解质冲洗2 min。平衡后,以压力方式(0.2 psi)阳极进样3 s,紫外检测(286 nm),运行电压为15 kV,温度为25℃。

2.2 对照品溶液的制备 分别精确称一定量的山姜素和小豆蔻明对照品,用60%甲醇配成分别为0.503 6,0.558 0 g·L⁻¹标准储备液。实验时,工作溶液由储备液稀释至所需浓度。

2.3 供试品溶液的制备 将草豆蔻样品粉碎过筛,精密称取约1.00 g,置于250 mL圆底烧瓶中,加100%乙醇水浴加热回流提取3次,每次20 mL。然后用100%乙醇分次洗涤烧瓶及滤器,合并提取液和洗涤液,用旋转蒸发仪蒸干,残留物用60%的甲醇溶解,移入50 mL量瓶中,定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品储备液各0.5,1.0,1.5,2.0,3.0 mL分别置于10 mL量瓶中,用60%甲醇稀释至刻度。在优化电泳条件下进行测定,以峰面积对样品质量浓度做标准曲线,得到山姜素和小豆蔻明的线性方程分别为 $Y = 389.7X +$

$0.5479 (r = 0.9962)$; $Y = 308.4X - 1.267 (r = 0.9995)$ 。线性范围分别为25.2~251.1,27.9~167.4 mg·L⁻¹。在3倍信噪比下,两种成分的检测限分别为1.2,3.5 mg·L⁻¹。

2.5 精密度试验 对同一样品溶液连续进样5次,峰面积的RSD 1.17%,1.55%,结果表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批草豆蔻样品6份,按2.3项制备供试品溶液,按2.1项中的电泳条件分别进样,测得山姜素和小豆蔻明平均含量的RSD分别为1.78%,2.05%,表明此方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取新制样品溶液,分别于0,2,8,16,24 h进样,测定其峰面积RSD分别为1.58%,1.86%,结果表明山姜素和小豆蔻明在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收试验 精密称取草豆蔻粉末约1.00 g共5份,分别加入一定量的山姜素和小豆蔻明对照品,依法制备供试品溶液,进行加样加收实验,计算回收率。结果山姜素平均回收率为102.4%,RSD 2.46% (n=5);小豆蔻明平均回收率为97.1%,RSD 2.72% (n=5),见表1。

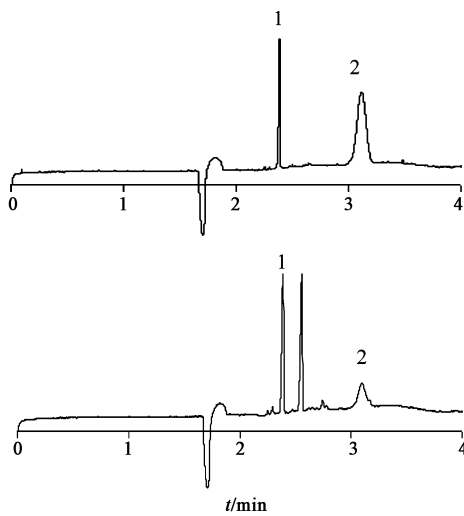
表1 样品中山姜素和小豆蔻明加样回收率试验(n=5)

测定成分	称样量	样品中量	加入量	测得量	回收率	RSD
	/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%
山姜素	1.000 6	5.263 2	5.000 5	10.176 3	98.25	2.46
	1.000 3	5.261 6	5.000 8	10.354 2	101.83	
	1.000 5	5.262 6	2.500 6	7.865 8	104.10	
	1.000 7	5.263 7	2.500 2	7.874 3	104.41	
	1.000 5	5.262 6	1.500 6	6.813 2	103.33	
小豆蔻明	1.000 6	2.671 6	2.500 8	5.049 3	95.07	2.72
	1.000 3	2.670 8	2.500 3	5.080 8	96.39	
	1.000 5	2.671 3	1.500 4	4.197 0	101.69	
	1.000 7	2.671 9	1.500 6	4.127 4	96.99	
	1.000 5	2.671 3	1.000 3	3.627 3	95.57	

2.9 样品测定 在优化电泳条件下,取制备好的草豆蔻提取液样品进行测定,见图1。对6批次不同来源的草豆蔻样品分别制备供试品溶液,测得山姜素和小豆蔻明含量结果见表2。

3 结果与讨论

3.1 SDS浓度对分离的影响 山姜素和小豆蔻明均属黄酮类化合物,对黄酮类化合物的分离主要采用CZE和MEKC两种模式。当在CZE模式下,两种化合物不能得到充分分离,故采用MEKC模式。实验考察了SDS浓度在0~10 mmol·L⁻¹变化时对分离的影响,发现当SDS浓度为2 mmol·L⁻¹时两种组分即可得到完全分离,随SDS浓度增大,分离度



1. 山姜素; 2. 小豆蔻明

图 1 对照品溶液(A)和草豆蔻样品(B)的电泳图

和迁移时间均增加。综合考虑分离度和分析时间,选择 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS。

表 2 不同草豆蔻样品中山姜素与小豆蔻明的含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	山姜素	小豆蔻明
1	4.62	2.24
2	5.25	2.12
3	5.26	2.67
4	6.71	3.26
5	5.14	1.98
6	4.38	1.84

3.2 缓冲溶液 pH 对分离的影响 对于多羟基化合物,经常选择硼砂缓冲体系,因为硼酸根离子和样品中的羟基发生络合,开成络阴离子,提高分离效果。考察硼砂缓冲溶液 pH 在 7.0 ~ 9.5 对分离的影响,结果发现,随着 pH 的升高,两种有效成分的迁移时间随之缩短,二者之间的分离度也随之下落。由于 pH 升高,EOF 增大,使胶束相迁移速度加快,从而降低了溶质与胶束相间的相互作用,导致分离度下降,故选用 pH 7.0。

3.3 缓冲溶液浓度对分离的影响 在 10 ~ 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 考察缓冲溶液浓度对分离的影响,结果表明随着硼砂浓度的升高,两种有效成分的迁移时间均随之增加,分离度也略有增加,但随浓度的升高,峰形变得不对称,基线噪音增大,检测灵敏度下降,故选择 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂为最佳缓冲溶液浓度。

3.4 有机添加剂对分离的影响 在电泳分离过程中,往往加入有机添加剂来改善分离效果,实验中考察了甲醇、乙醇、乙腈对分离的影响,结果发现添加甲醇、乙醇使分析时间延长,峰变宽,分离恶化。而加入乙腈,使分离时间缩短,峰形尖锐。进一步考察

乙腈含量(5% ~ 20%)对分离的影响,结果发现 10% 乙腈分离效果最好。

3.5 电压对分离的影响 在电压 10 ~ 20 kV 进行电泳分离,两种组分出峰时间随电压增大而缩短,但对分离度影响不大。电压过高时,产生的电流、焦耳热较大,使柱效下降。综合考虑,选用 15 kV 作为分离电压。

3.6 提取条件的选择 分别采用 100%, 75%, 50%, 25% 乙醇对草豆蔻样品进行回流提取实验,结果表明乙醇浓度对提取含量有显著影响,而溶剂用量、提取次数、提取温度和提取时间对提取效果无显著影响。选用 100% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,提取效果最佳。

本实验建立了胶束毛细管电色谱法快速测定草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的方法。该方法分析速度快,分离效率高,实验成本低,环境污染小,可为草豆蔻及其制剂中山姜素和小豆蔻明的含量分析提供一个良好的测定方法。

[参考文献]

[1] 乔春峰,徐璐珊. 山姜素和豆蔻明的研究概况 [J]. 中国野生植物资源, 2007, 20(6):11.

[2] 邹毓兰,吕海涛. 草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的 HPLC 测定及提取工艺优化 [J]. 中成药, 2011, 33(1):145.

[3] 李元圆,俞桂新,杨莉,等. 草豆蔻药材质量控制方法 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2091.

[4] 梁嘉敏,何敬愉,彭维,等. HPLC 法测定草豆蔻中山姜素、小豆蔻明的含量 [J]. 中药材, 2007, 30(3):299.

[5] 饶伟文,林泳德. HPLC 测定草豆蔻中山姜素、小豆蔻明的含量 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12):743.

[6] 雷利利,张熙洁,侯林中,等. 现代色谱技术在中药制剂多指标成分质量控制中的应用 [J]. 中国药房, 2011, 22(39):3733.

[7] 吴娟芳,陈令新,罗国安,等. 毛细管电泳技术在药物分析中的应用研究进展 [J]. 药学学报, 2006, 41(5):385.

[8] 张超云,黄显章,高言明. 高效毛细管电泳同时测定二陈汤中 3 种成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):48.

[9] 肖辣. 高效毛细管电泳测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):87.

[10] 邹薇,张鹤,孟宪生,等. 毛细管电泳法测定延胡索中 2 种生物碱含量电泳条件优化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):59.

[责任编辑 顾雪竹]