

中药菟丝子中生物活性成分的毛细管电泳-电化学检测

傅 亮, 楚清脆, 管月清, 叶建农

(华东师范大学化学系, 上海 200062)

摘要 :采用毛细管电泳-电化学检测法(CE-ECD)同时测定了菟丝子中芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素等5种主要生物活性成分的含量,考察了运行缓冲液酸度和浓度、分离电压、氧化电位和进样时间等实验参数对分离检测的影响。在最佳实验条件下,以直径300 μm 的碳圆盘电极为工作电极,检测电位为+950 mV(vs. 参比电极),以50 mmol/L的硼砂缓冲溶液(pH 9.0)为运行缓冲液,上述各组分在19 min内能完全分离。芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素在两个数量级的范围内呈良好线性关系,检测下限(按 $S/N=3$ 计)分别为 1.93×10^{-5} 、 3.55×10^{-4} 、 3.65×10^{-5} 、 1.73×10^{-5} 和 1.46×10^{-4} g/L。该法已成功地应用于菟丝子中活性成分的分离检测,结果令人满意。

关键词 :毛细管电泳;电化学检测;芦丁;金丝桃甙;山柰酚;对香豆酸;槲皮素;菟丝子;中药

中图分类号 :O658 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-8713(2005)05-0524-04

Determination of Bioactive Components in *Semencustae* by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection

FU Liang, CHU Qingcui, GUAN Yueqing, YE Jiannong

(Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract : A method of high performance capillary electrophoresis with electrochemical detection (CE-ECD) has been developed for the determination of five bioactive components in *Semencustae*, namely rutin, hyperoside, kaempferol, *p*-coumaric acid and quercetin. The effects of several factors such as the acidity and concentration of the running buffer, the separation voltage, the applied potential and the injection time on CE-ECD were investigated. Under the optimized conditions, these five components can be separated in a 50.0 mmol/L borax running buffer (pH 9.0) within 19 minutes. A 300 μm diameter carbon disk electrode was used as the working electrode positioned carefully opposite to the outlet of the capillary in a wall-jet configuration at potential of +950 mV (vs. saturated calomel electrode as reference electrode, SCE). Good linear relationships were established between the peak current and concentration of analytes over two orders of magnitude. The detection limits ($S/N=3$) were 1.93×10^{-5} , 3.55×10^{-4} , 3.65×10^{-5} , 1.73×10^{-5} and 1.46×10^{-4} g/L for rutin, hyperoside, kaempferol, *p*-coumaric acid and quercetin, respectively. The method has been successfully applied to the determination of these analytes in *Semencustae* samples after a relatively simple extraction procedure, and the assay results were satisfactory.

Key words : capillary electrophoresis; electrochemical detection; rutin; hyperoside; kaempferol; *p*-coumaric acid; quercetin; *Semencustae*; traditional Chinese medicine

菟丝子(*Semencustae*)为旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)的干燥成熟种子,具有滋补肝肾、固精缩尿、安胎明目等功效。临床应用十分广泛,主治因肝肾不足引起的阳痿、早泄、遗精、腰膝冷痛、白浊及目暗不明等,亦可用于因脾肾不足引

起的大便溏泄,妇科用于治疗流产、月经不调、更年期综合征^[1]等。现代药理研究表明:菟丝子的浸提物具有壮阳、调节内分泌、抗衰老等活性,其主要生物活性成分为黄酮类化合物^[2]。

目前,高效液相色谱法(HPLC)^[3]已用于菟丝

子中黄酮类成分的含量测定。但是 HPLC 用于传统中药分析仍存在一些不足,例如分析时间长,分离度低,因多种相互干扰的化合物共存致使色谱柱使用寿命缩短,其中一些物质还可能被吸附在管壁上,导致色谱柱的快速老化,甚至造成不可逆的损坏。毛细管电泳(CE)具有分离效率高、分析速度快、重现性好、样品和试剂用量少等优点,是一种高效的分离分析技术。与电化学检测方法(ECD)联用,CE-ECD 对电活性物质具有很高的检测灵敏度和选择性^[4]。本实验成功地建立了一种采用毛细管电泳-电化学检测法同时测定菟丝子中芦丁、金丝桃甙、山柰酚、槲皮素和对香豆酸等 5 种活性成分(结构见图 1)的简便、可靠、灵敏的分析方法。

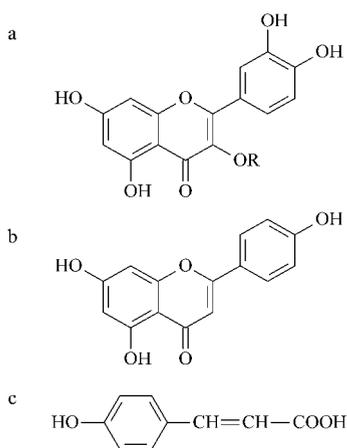


图 1 5 种组分的分子结构式

Fig.1 The molecular structures of five components

a. hyperoside (R = galactoside); quercetin (R = H); rutin (R = rutinoside); b. kaempferol; c. *p*-coumaric acid.

1 实验部分

1.1 仪器

毛细管电泳-电化学检测系统(CE-ECD)为自组装^[5],包括 ± 30 kV 高压电源(中国科学院上海应用物理研究所),BAS LC-4C 安培检测器(美国生物分析系统公司),EB100 型台式单笔记录仪(上海大华仪表厂),Model 14901 三维微定位器(斯特拉特福,康涅狄格州,美国),75 cm 长熔融石英毛细管(内径 25 μm ,外径 360 μm ,河北永年锐沓色谱器件有限公司);毛细管、检测池和三电极体系均组装在一个带有微动开关的树脂玻璃框架中,以保证仪器和操作人员的安全,当框架打开时,微动开关会自动切断电源^[6,7]。

工作电极为 300 μm 的碳圆盘电极^[8],使用前先用金相砂纸抛光,并置于二次蒸馏水中超声清洗 5 min,然后借助三维微定位器,使工作电极与毛细管出口在一条直线上,并尽可能靠近毛细管的末端。三电极体系包括碳圆盘工作电极、铂丝辅助电极和

饱和甘汞电极(SCE,参比电极)。用 BAS LC-4C 安培检测器检测氧化电流,电泳图谱由 EB100 型单笔记录仪记录。采用电迁移进样,采用 16 kV 电压从毛细管阳极端进样 6 s,检测池为阴极电泳池。

1.2 试剂

标准品芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸购自 Sigma 公司,槲皮素购自上海试剂二厂。各样品均按产品说明使用。

用无水乙醇(分析纯)配制 5 种标准储备液,使其质量浓度均为 1.00 g/L,避光于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。其他不同浓度的工作液,用 50.0 mmol/L 的硼砂溶液(pH 8.70 ~ 9.48)运行缓冲液稀释得到。所有分析样品经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后进样。菟丝子购自上海市药店。

1.3 试液的配制

将菟丝子磨成粉状,准确称取 2.000 g,用 10 mL 80% 的乙醇溶液(无水乙醇-去离子水(体积比 4:1))超声萃取 1 h 后,先用滤纸过滤,再用 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤,将得到的滤液放于阴暗处保存。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 工作电极电位的影响

由于 5 种组分均带有酚羟基,容易在碳电极上被氧化,因此本实验采用电化学检测。在安培检测中,工作电极的电位直接影响实验的灵敏度、检测限和稳定性,因而为了选择最佳工作电位,对 5 种组分的流体伏安曲线进行了测定。如图 2 所示,当电极电位超过 +400 mV(*vs.* SCE)时,5 种组分均产生

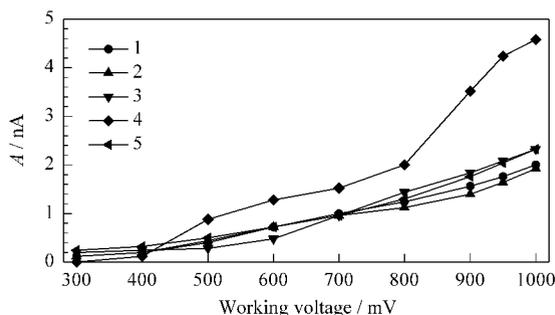


图 2 5 种组分的流体伏安图

Fig.2 Hydrodynamic voltammogram (HDV) of five analytes

Working conditions: fused-silica capillary, 25 μm i. d. \times 75 cm; working electrode: 300 μm diameter carbon disk electrode; running buffer, 50.0 mmol/L borate buffer (pH 9.0); separation voltage, 16 kV; injection, 16 kV \times 8 s; analyte concentration, 1.0×10^{-2} g/L each.

Analytes: 1. rutin; 2. hyperoside; 3. kaempferol; 4. *p*-coumaric acid; 5. quercetin.

氧化电流。随着电极电位的增大,对香豆酸的氧化电流增加迅速,而其他 4 种组分受氧化电位的影响较小。当电极电位大于 +950 mV(vs. SCE) 时,虽然对香豆酸的氧化电流仍稍有增加,但基线噪声和背景电流都急剧增大,导致基线不稳,对检测的灵敏度和稳定性不利。因此将工作电位选为 +950 mV(vs. SCE),此时的背景电流不太大且信噪比较高。

2.1.2 pH 值和缓冲溶液浓度的影响

运行缓冲溶液的酸度直接影响毛细管表面的 Zeta (ξ) 电势,从而影响电渗流(EOF)的方向和速率,同时溶液的酸度也决定样品中各组分分子的表观电荷数,从而影响组分的迁移时间和分离度,故对运行缓冲溶液的酸度进行优化是获得较好分离条件的关键。如图 3-a 所示,当 pH 为 8.4 时,山柰酚与对

香豆酸分不开,pH 为 8.7 时,金丝桃甙与山柰酚分不开。随着 pH 值的增大,各组分的分离度增加而迁移时间延长,pH 为 9.0 时,各组分可以达到基线分离,再增大 pH 值,分离度没有明显的改变而迁移时间延长。因此,选择运行缓冲液的 pH 为 9.0。

此外,缓冲溶液浓度是影响被测物迁移时间和分离度的另一个重要因素。这是因为缓冲液的浓度决定了溶液的粘度系数、溶质的扩散系数以及毛细管内壁的 ξ 电位。图 3-b 表明迁移时间和分离度随着缓冲溶液浓度的升高而增大。然而缓冲液浓度较高(>50 mmol/L)会增加它的导电性,从而产生较高的焦耳热,使组分峰变宽,导致峰电流降低及分离度和重现性变差。综合考虑上述各种因素,选择缓冲溶液的浓度为 50 mmol/L。

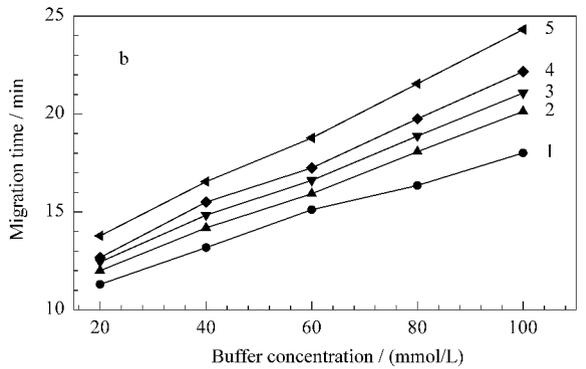
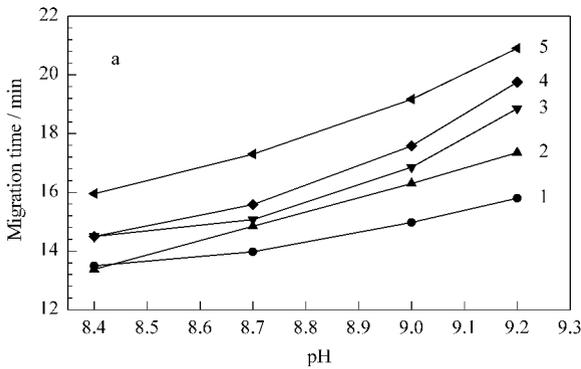


图 3 运行缓冲溶液 pH 值(a)和浓度(b)对分析物迁移时间的影响

Fig.3 The effects of the pH value (a) and concentration (b) of the running buffer on the migration time of the analytes Working electrode potential : +950 mV (vs. SCE). Analytes and other working conditions are the same as in Fig. 2.

2.1.3 分离电压和进样时间的选择

在毛细管长度一定的前提下,分离电压决定电场强度,而电场强度影响电渗流速度和带电物质的迁移率,继而决定了分析物的迁移时间。本实验在分离电压为 12 ~ 20 kV 的条件下,考察了分离电压对各分析物迁移时间的影响。实验结果表明:分离电压越高,组分的迁移时间越短,但当分离电压超过 18 kV 时,样品中待测物的峰与邻峰不能较好地分离,且基线噪声增大。故选择 16 kV 为分离电压。

进样时间决定了分析样品的进样量,而进样量的大小影响峰电流和峰形。本实验在 16 kV 下,研究了进样时间为 2 ~ 10 s 时对分离的影响。实验结果表明:峰电流随着进样时间的增加而增大;当进样时间大于 6 s 时,峰高趋于稳定,但峰扩展明显。故本实验选择在 16 kV 下进样 6 s 作为进样时间。

在上述优化条件下,芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素在 19 min 内即可达到基线或较好的分离,所得混合标准溶液的电泳图谱见图 4-a。

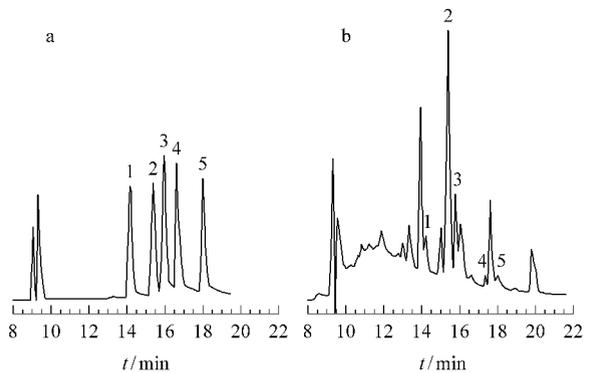


图 4 混合标准溶液(a)、菟丝子原草(b)的典型电泳图 Fig.4 Electropherograms of standard mixture solution (2.0×10^{-2} g/L of each analyte) (a) and sample solution of *Semencustae* (b)

Working electrode potential : +950 mV (vs. SCE). Analytes and other working conditions are the same as in Fig. 2.

2.2 重现性、线性范围及检测限

2.2.1 重现性

在上述优化条件下,将混合标准溶液(每种标准品的质量浓度均为 2.0×10^{-2} g/L)连续进样 7

次峰高的相对标准偏差(RSD)为1.7%(芦丁)、3.6%(金丝桃甙)、1.6%(山柰酚)、1.0%(对香豆酸)和2.7%(槲皮素),表明方法的重现性良好。

2.2.2 回归方程、线性范围及检测限

在最佳分离检测条件下,对一系列不同质量浓度($5.0 \times 10^{-4} \sim 0.2$ g/L)的各组分的混合标准溶液分别进行测定,考察了各组分的线性范围,得出各组分的线性回归方程;以信噪比 $S/N=3$ 对应浓度确定检测限。实验发现,芦丁、对香豆酸和槲皮素的质量浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 0.1$ g/L时与电泳峰电流均呈现良好线性关系,金丝桃甙的质量浓度为 $2.5 \times 10^{-4} \sim 0.1$ g/L时与电泳峰电流呈现良好的线性关系,山柰酚的质量浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-2}$ g/L时与电泳峰电流呈现良好的线性关系。以 y 表示峰电流(nA), x 表示样品质量浓度(g/L),5种被测组分的线性回归方程分别为:芦丁, $y = 1.56 \times 10^2 x - 0.0003$ ($r = 0.9999$);金丝桃甙, $y = 2.71 \times 10^2 x + 0.0159$ ($r = 0.9998$);山柰酚, $y = 2.17 \times 10^2 x - 0.1212$ ($r = 0.9998$);对香豆酸, $y = 2.81 \times 10^2 x + 0.1165$ ($r = 0.9999$)和槲皮素, $y = 2.56 \times 10^2 x - 0.1238$ ($r = 0.9999$)。检测限分别为 1.93×10^{-5} g/L(芦丁)、 3.55×10^{-4} g/L(金丝桃甙)、 3.65×10^{-5} g/L(山柰酚)、 1.73×10^{-5} g/L(对香豆酸)和 1.46×10^{-4} g/L(槲皮素)。

2.3 样品测定及回收率实验

在选定的测定条件下,对菟丝子原草中的5种组分进行了测定,典型电泳图谱见图4-b。与标准品的电泳图相对照,菟丝子样品中含有芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素。测定结果见表1。

为了评估本文方法的精密度和准确性,以菟丝子样品为基质进行了加标回收试验。采用标准加入

法测得的回收率为91%~105%,平均回收率和RSD分别为:芦丁96.9%,0.9%;金丝桃甙93.5%,0.69%;山柰酚105%,5.70%;对香豆酸91%,0.73%和槲皮素92%,2.86%。

表1 菟丝子样品中5种活性组分的测定结果($n=3$)

Table 1 The assay results of a *Semencustae* sample ($n=3$)

Component	Content/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
Rutin	422.0	1.1
Hyperoside	1486.0	0.8
Kaempferol	601.9	7.0
<i>p</i> -Coumaric acid	297.8	0.9
Quercetin	295.1	3.5

Working electrode potential: +950 mV (vs. SCE). Other working conditions are the same as in Fig. 2.

本实验成功地建立了菟丝子中5种生物活性成分的毛细管电泳-电化学检测方法。该法所用样品无需富集,过滤后可直接进样,方法简单可靠,可作为菟丝子中5种生物活性成分的快速测定方法。

参考文献:

- [1] Guo Hongzhu, Li Jiashi. Journal of Chinese Medicinal Materials (郭洪祝,李家实. 中药材), 1996, 19(4): 205
- [2] Jin Xiao, Li Jiashi, Yan Wenmei. China Journal of Chinese Materia Medica (金晓,李家实,阎文玫. 中国中药杂志), 1992, 17(5): 292
- [3] Zhu Lihua, Jiang Guoqiang, Yang Shuixin. Journal of Zhejiang College of TCM (朱丽华,蒋国强,杨水新. 浙江中医学院学报), 2001, 25(4): 65
- [4] Liu Jifeng, Yang Xiurong, Wang Erkang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘继锋,杨秀荣,汪尔康. 分析化学), 2002, 30(6): 748
- [5] Chu Q C, Qu W Q, Peng Y Y, Cao Q H, Ye J N. Chromatographia, 2003, 58(1/2): 67
- [6] Ye J N, Baldwin R P. Anal Chem, 1993, 65(23): 3525
- [7] Ye J N, Baldwin R P. Anal Chem, 1994, 66(17): 2669
- [8] Fang X M, Ye J N, Fang Y Z. Anal Chim Acta, 1996, 329(1-2): 49