

毛细管电泳-电化学检测法测定黄芪及其制剂中的活性成分

靳淑萍, 李萍, 董树清, 王清江, 方禹之*

(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-ED)对中药黄芪的主要活性成分芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸进行了分离和测定。分别考察了工作电极电位、运行缓冲液的pH值和浓度、分离电压和进样时间等实验参数对实验结果的影响。在优化的实验条件下,以直径300 μm 的碳圆盘电极为工作电极,检测电位为+0.95 V(相对于饱和甘汞电极),在10 mmol/L硼酸盐(pH 8.2)的运行缓冲溶液中,上述6种活性成分能在17 min内实现很好的基线分离,被测物浓度与峰电流在3个数量级范围呈良好的线性关系,检出限($S/N=3$)范围为78~110 $\mu\text{g/L}$ 。在不同的加标水平下,6种活性成分的平均回收率为96.0%~103.0%,相对标准偏差为1.9%~3.6%($n=3$)。该方法样品处理简单,无需预富集,已应用于实际样品的分析,并获得了令人满意的结果。

关键词 :毛细管电泳;电化学检测;活性成分;黄芪;中药

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)02-0229-04 栏目类别:研究论文

Determination of active components in *Radix Astragali* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis with electrochemical detection

JIN Shuping, LI Ping, DONG Shuqing, WANG Qingjiang, FANG Yuzhi*

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

Abstract : A simple, fast, and reliable method based on capillary electrophoresis with electrochemical detection (CE-ED) was developed for the separation and determination of rutin, ferulic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, quercetin and caffeic acid in *Radix Astragali* and its medicinal preparations. The effects of several important factors, such as detection potential, pH, running buffer concentration, separation voltage and injection time, were investigated to acquire the optimum conditions. Under the optimum conditions, the analytes could be separated within 17 min in a 75 cm length capillary at a separation voltage of 18 kV in a 10 mmol/L borate buffer (pH 8.2). A 300 μm diameter carbon disk electrode generated a good response at +0.95 V (vs. saturated calomel electrode (SCE)) for all analytes. The relationship between peak currents and analyte concentrations was linear over about three orders of magnitude with detection limits ($S/N=3$) ranging from 78 $\mu\text{g/L}$ to 110 $\mu\text{g/L}$ for all analytes. The average recoveries were 96.0%–103.0% with the relative standard deviations of 1.9%–3.6% ($n=3$). This method has been successful used for the determination of these analytes in real samples, and the assay results were satisfactory.

Key words : capillary electrophoresis (CE); electrochemical detection; active components; *Radix Astragali*; traditional Chinese medicine (TCM)

在中国,传统中药被广泛地用于预防和治疗各种疾病已逾数千年。低毒性和良好的治疗效果使得中药在许多医药领域受到广泛的关注^[1,2]。其中黄芪是名贵中药,属补气药,具有补气升阳、益胃固表、利水消肿、脱毒生肌等功效。黄芪传统入药,多选用

豆科植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)或蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)的干燥根。黄芪对于气虚乏力、久泻脱肛、自汗、水肿、糖尿病、疮口久不愈合等有很好的疗

* 通讯联系人:方禹之,教授。Tel:(021)62233508, E-mail: yzfang@chem.ecnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20575022).

收稿日期:2008-07-31

效^[3]。黄芪的主要活性成分包括芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸^[4]。一些相关的研究表明槲皮素和其他一些黄酮类化合物具有抗过敏、抗氧化和消炎作用^[5]，现代研究也证实一些酚酸类物质具抗癌性^[6]。因此，建立灵敏、简单、快速和准确的检测方法对黄芪的品质监督具有重要的意义。

高效液相色谱法(HPLC)^[7-9]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[10]等已用于分析黄芪中的黄酮类、异黄酮类和皂角苷，但上述方法普遍存在检测周期长、分析成本高等缺点；某些方法的灵敏度比较低，有些还需复杂的样品前处理或衍生化。毛细管电泳(CE)作为一种较新的分离技术，具有分离速度快、分离效率高、重现性好、样品进样量少等特点，已逐渐成为一种重要的分离分析技术^[11-13]。毛细管电泳技术与电化学检测(ED)联用，对电化学活性物质具有更高的灵敏度和选择性^[14]。然而到目前为止，这种技术对于黄芪及其制剂的分析应用尚未确立，对其主要活性成分芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸等的同时分离与测定未见报道。本文通过CE-ED建立了一种简单、快捷的同时测定中草药黄芪中的主要活性成分芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸的方法。

1 实验部分

1.1 仪器

自组装毛细管电泳-电化学检测装置系统^[15]：高压电源(0 ~ ±30 kV)(中国科学院上海原子核研究所)；75 cm 长的熔融石英毛细管(25 μm i. d., 360 μm o. d., Polymicro Technologies, Phoenix AZ, USA)。三电极系统，即直径为 300 μm 的碳圆盘工作电极、饱和甘汞参比电极(SCE)、Pt 丝对电极。CHI 830B 电化学系统(CH Instruments, Austin, Texas, USA)为安培检测器，与一台安装了 Windows XP 系统的电脑相连。使用前，碳圆盘电极表面用金相砂纸抛光，再用蒸馏水超声清洗 5 min。使用时，将其安装在三维定位仪上，借助放大镜，仔细调节好电极的位置，使毛细管与工作电极在一条直线上，且与端口尽可能靠近(5 ~ 10 μm)，毛细管口应对准工作电极圆心。毛细管在使用前要依次用 0.1 mol/L 的 NaOH、水、缓冲溶液各清洗 15 min。

1.2 试剂

芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸(均为分析纯)购于中国药品检验所。中草药黄芪和中成药黄芪颗粒购于上海一家药店。

芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸

标准储备溶液的制备：1.00 g/L，用无水乙醇(分析纯)配制，保存于 4 °C 的冰箱中。实验时将该溶液用运行缓冲液(10 mmol/L 硼酸盐缓冲液，pH 8.2)稀释到所需浓度。使用前，所有的溶液均通过 0.22 μm 的聚丙烯滤膜过滤。

1.3 样品处理

将中草药黄芪和中成药黄芪颗粒烘干，分别磨成粉末，并精确称取各 1.000 0 g。向中草药黄芪粉末中加入 10 mL 甲醇，在 80 °C 水浴中回流 3 h，先用滤纸过滤一次，之后取清液再用聚丙烯滤膜过滤两次，最后用甲醇定容到 50 mL。向黄芪颗粒粉末中加入 10 mL 80%(体积分数)甲醇水溶液，超声提取 30 min，以后的处理过程同中草药黄芪。

上述样品溶液经聚丙烯滤膜过滤后可直接进样。使用前，所有溶液均保存于 4 °C 冰箱内。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 工作电位的选择

工作电位的选择直接影响到实验方法的灵敏度、检出限和稳定性，因此有必要研究电极电位对被测物峰电流的影响以确定最佳的检测电位。

工作电极的工作电位对被测物峰电流的影响如图 1 所示。随着工作电位的增加，峰电流增大。当工作电位超过 +0.95 V(vs. SCE)时，虽然所有被测物都产生更大的峰电流，但由于基线电流同时也急剧增加，信噪比反而有所降低。综合考虑灵敏度和检出限，选择检测电位为 +0.95 V(vs. SCE)，此时信噪比较高，电极的稳定性较好，重现性较高。

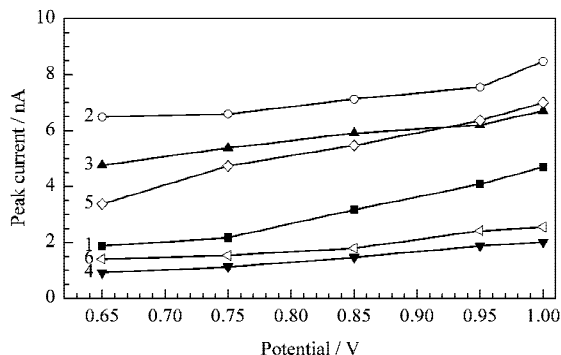


图 1 6 种分析物的流体伏安图

Fig. 1 Hydrodynamic voltammograms (HDVs) for six analytes in CE

Experimental conditions: fused-silica capillary, 25 μm × 75 cm; working electrode, a 300 μm diameter carbon disk electrode; running buffer, 10 mmol/L borate buffer (pH 8.2); separation voltage, 18 kV; electrokinetic injection, 8 s (18 kV); mass concentration, 15 mg/L for each analyte.

Curves: 1. rutin; 2. ferulic acid; 3. vanillic acid; 4. chlorogenic acid; 5. quercetin; 6. caffeic acid.

2.1.2 运行缓冲液 pH 值和浓度的选择

在碱性溶液中,因硼酸盐能与许多物质螯合生成配位阴离子来增加该溶液的溶解度^[16],减少了因吸附造成的峰拖尾等影响,故选用硼酸盐作为缓冲体系。运行缓冲液的酸度直接影响毛细管表面的 zeta(ζ)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荷电情况,从而影响组分的迁移时间和分离度。因此,对运行缓冲液的酸度进行优化是获得较好分离条件的关键。我们研究了在 pH 为 7.8 ~ 8.8 范围内迁移时间与 pH 值的关系,结果发现当 pH 为 8.2 ~ 8.6 时 6 种分析物能完全分离;当 pH 低于 8.2 时,芦丁和阿魏酸、槲皮素和绿原酸不能达到基线分离;但当 pH 高于 8.6 时,香草酸和绿原酸又不能被完全分离(见图 2-a)。实验中又发现迁移时间随着 pH 值的增大而延长。考虑到迁移时间等因素,本文选择 pH 8.2 的硼酸盐缓冲液作为运行缓冲液。

除了 pH 值,缓冲液的浓度也是一个重要的影响因素。缓冲液的浓度可以影响峰电流、迁移时间及其分离情况。在 pH 8.2 的条件下,随着缓冲液浓度的增加,被测组分的分离度得到了提高,但同时被测组分的迁移时间变长;如果缓冲液的浓度太低,6 种组分不能得到很好的基线分离。考虑到分离度和迁移时间的影响,实验中选择 10 mmol/L 硼酸盐作运行缓冲液。

2.1.3 分离电压和进样时间的选择

分离电压决定电场强度,从而影响被测组分的迁移速度和电渗流的速度,进而影响各组分的迁移时间(见图 2-b)。分离电压越高,迁移时间越短。但过高的分离电压会降低分离度;而过低的分离电压会导致迁移时间过长,使被测组分峰展宽。综合考虑各组分的分离度、灵敏度、焦耳热及迁移时间等

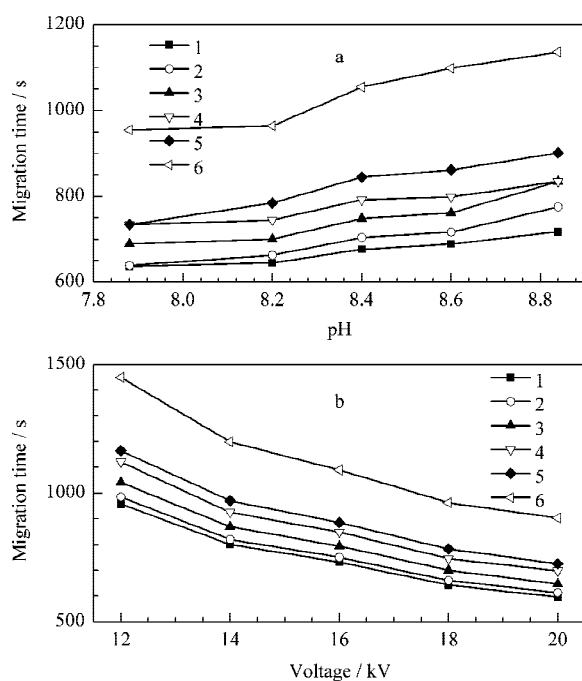


图 2 (a)运行缓冲液的 pH 值和(b)分离电压对 6 种分析物迁移时间的影响

Fig. 2 Effects of (a) the running buffer pH and (b) separation voltage on the migration times of the analytes

Detection potential: +0.95 V (vs. SCE). Other experimental conditions and labels are the same as in Fig. 1.

因素,选择分离电压为 18 kV。在此条件下,所有被测组分在 17 min 内实现了较好的分离。

在分离电压为 18 kV 的条件下,选择进样时间为 2, 4, 6, 8 和 10 s,测定 6 种目标组分的峰高与进样时间的关系。实验中发现进样时间大于 8 s 时峰高增加幅度不大,却引起电泳峰展宽、峰拖尾等负面影响,故选择进样时间为 8 s。

在优化条件下测得的芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸混合标准溶液的电泳图谱见图 3-a。

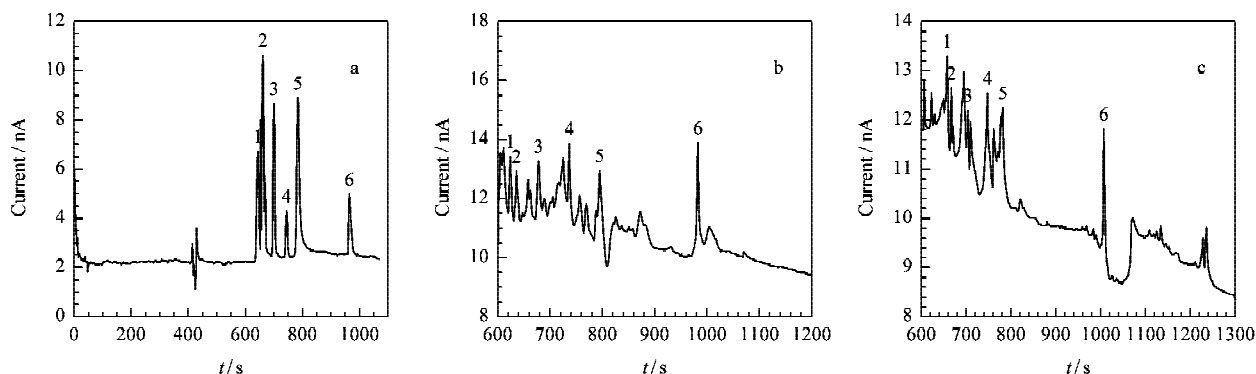


图 3 (a) 6 种活性组分的混合标准溶液 (15 mg/L)、实际样品 (b) 中草药黄芪和 (c) 中成药黄芪颗粒的电泳图谱

Fig. 3 Electropherograms of (a) the standard mixture solution (15 mg/L), samples of (b) Radix Astragali, and (c) Huangqi granule

Experimental conditions are the same as in Fig. 1.

Peaks: 1. rutin; 2. ferulic acid; 3. vanillic acid; 4. chlorogenic acid; 5. quercetin; 6. caffeic acid.

2.2 线性关系和检出限

配制一系列不同质量浓度(0.2 ~ 100 mg/L)的上述 6 种活性组分的混合标准溶液,在选定的条件下,考察了各组分的线性范围,得出各组分的线性回归方程;并以 3 倍的信噪比对应的质量浓度为检出限。6 种活性组分的线性回归方程、相关系数和检出限结果见表 1。

2.3 方法的回收率及精密度

方法的回收率以标准加入法测定,回收率测定结果及相对标准偏差(RSD)如表 2 所示。

表 1 6 种活性成分的线性回归方程、相关系数和检出限
Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r) and limits of detection (LOD) of 6 components

Component	Regression equation*	r	LOD/ ($\mu\text{g/L}$)
Rutin	$I = 3.4 \times 10^5 C + 0.08$	0.9997	86
Ferulic acid	$I = 6.1 \times 10^5 C - 0.01$	0.9992	78
Vanillic acid	$I = 8.3 \times 10^5 C - 0.03$	0.9997	79
Chlorogenic acid	$I = 2.0 \times 10^5 C - 0.02$	0.9999	90
Quercetin	$I = 8.7 \times 10^5 C - 0.07$	0.9997	90
Caffeic acid	$I = 1.6 \times 10^5 C + 0.05$	0.9992	110

* I: peak current, nA; C: mass concentration, kg/L . Linear range: 0.2 - 100 mg/L.

表 2 6 种活性成分的加标回收率及精密度(RSD) (n=3)
Table 2 Recoveries and precisions (RSD) of 6 components (n=3)

Sample	Component	Original/ (mg/L)	Spiked/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Radix Astragali	rutin	0.86	1.0	1.82	96.0	3.3
	ferulic acid	0.48	1.0	1.51	103.0	2.9
	vanillic acid	0.51	1.0	1.49	98.0	2.0
	chlorogenic acid	4.81	5.0	9.80	99.8	3.7
	quercetin	1.80	5.0	6.84	100.8	2.8
	caffeic acid	14.90	15.0	29.80	99.3	3.6
Huangqi granule	rutin	0.81	1.0	1.83	102.0	2.5
	ferulic acid	0.26	1.0	1.27	101.0	3.6
	vanillic acid	0.24	1.0	1.22	98.0	2.4
	chlorogenic acid	2.78	5.0	7.77	99.8	2.5
	quercetin	0.25	1.0	1.24	99.0	1.9
	caffeic acid	13.70	15.0	28.67	99.8	3.1

2.4 实际样品的测定

在优化条件下测定了中药黄芪及中成药黄芪颗粒中的芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸,电泳图谱见图 3-b 和 3-c。实际样品的定性分析结果通过标准加入法得到。

3 结语

采用毛细管电泳-电化学检测技术测定了中草药黄芪及中成药黄芪颗粒中的 6 种主要活性成分芦丁、阿魏酸、香草酸、绿原酸、槲皮素和咖啡酸。在优化条件下,6 种活性成分在 17 min 内实现基线分离,被测物浓度与峰电流在 3 个数量级范围呈良好的线性关系,检出限范围为 78 ~ 110 $\mu\text{g/L}$ 。实验结果表明,本方法准确、灵敏度高、重现性好,可成为中草药中活性成分分析的有效方法。

参考文献:

[1] Xue T H, Roy R. Science, 2003, 300 : 740
 [2] Normile D. Science, 2003, 299 : 188
 [3] Gui S Y, Wei W, Wang H, et al. J Ethnopharmacol, 2006, 103 : 154

[4] Sinclair S. Altern Med Rev, 1998, 3 : 338
 [5] Hollman P C H, Hertog M G L, Katan M B. Food Chem, 1996, 57(1) : 43
 [6] Chen Y J, Shiao M S, Hsu M L, et al. J Agric Food Chem, 2001, 49 : 5 615
 [7] Wang X H, Liu T, Li Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (王晓辉, 刘涛, 李清, 等. 色谱), 2006, 24(5) : 486
 [8] Wu T, Bligh S W A, Gu L H, et al. Fitoterapia, 2005, 76 : 157
 [9] Song J Z, Mo S F, Yip Y K, et al. J Sep Sci, 2007, 30 : 819
 [10] Xiao H B, Krucker M, Putzbach K, et al. J Chromatogr A, 2005, 1 067 : 135
 [11] Chen G, Zhang L Y, Wu X L, et al. Anal Chim Acta, 2005, 530 : 15
 [12] Cui Y J, Li Y Q, Shi W F, et al. Chinese Journal of Chromatography (崔英杰, 李玉琴, 史卫峰, 等. 色谱), 2007, 25(5) : 686
 [13] Cheng Y, Bai M, Wang X M, et al. Chinese Journal of Chromatography (程燕, 白敏, 王新梅, 等. 色谱), 2006, 24(2) : 188
 [14] Cao Y H, Lou C G, Fang Y Z, et al. J Chromatogr A, 2001, 943 : 153
 [15] Wang Q J, Ding F, Zhu N N, et al. J Chromatogr A, 2003, 1 016 : 123
 [16] Hoffstetter-Kuhn S, Paulus A, Gassmann E, et al. Anal Chem, 1991, 63 : 1 541