

# 高效毛细管电泳安培法 测定麦冬中薯蓣皂甙元的含量\*

黄宝美<sup>1</sup>, 姚程炜<sup>2</sup>, 莫金垣<sup>3</sup>, 杜世章<sup>1</sup>, 边清泉<sup>1</sup>, 王志国<sup>1</sup>

(1. 绵阳师范学院化学与化学工程学院, 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:**建立了麦冬中薯蓣皂甙元含量的高效毛细管电泳安培检测方法。着重探讨了缓冲溶液种类、浓度、酸碱度, 工作电位, 有机改性剂及其操作电压、进样时间等对检测的影响。 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  浓度为  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为缓冲液, 工作电位为  $0.4 \text{ V}$ ,  $\varphi$  为 7% 甲醇为有机添加剂, 进样时间为  $5 \text{ s}$ , 在  $15 \text{ kV}$  分离高压,  $\text{pH}=9.5$  的碱性条件下柱端安培法检测了薯蓣皂甙元的含量。该法的线性范围为:  $100 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性方程为  $Y=17224 + 8722c$ , 相关系数  $r=0.9995$ , 检出限为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 毛细管电泳; 薯蓣皂甙元; 安培检测

中图分类号: O657.8 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2010)02-0065-04

## Determination of Diosgenin in Radix Ophiopogonis with Amperometric Detection by Capillary Electrophoresis

HUANG Baomei<sup>1</sup>, YAO Chengwei<sup>2</sup>, MO Jinyuan<sup>3</sup>

DU Shizhang<sup>1</sup>, BIAN Qingquan<sup>1</sup>, WANG Zhiguo<sup>1</sup>

(1. Chemistry and Chemical Engineering, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China;

2. Facility Design and Instrumentation Institute of CARDC, Mianyang 622653, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Diosgenin in radix ophiopogonis was determined by capillary electrophoresis with amperometric detection (CE-AD). The affected conditions, such as the running buffer pH value (pH), the types of running buffer, the concentration of running buffer, the detection potential, the applied voltage and the sampling time were investigated. The optimized condition was in a running buffer composed of  $30 \text{ mmol/L}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  buffer at a pH 9.5, separation voltage at  $15 \text{ kV}$ , injection time for  $5 \text{ s}$ , organic additive for 7% methanol and detection potential at  $0.4 \text{ V}$ . A linear relation between peak area ( $Y$ ) and mass concentration of diosgenin ( $c$ ) was obtained in the range of  $1 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r=0.9995$ ) and the determination limit is  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** capillary electrophoresis; diosgenin; amperometric detection

麦冬为百合科植物麦冬 *Radix ophiopogonis* 的干燥块根, 是传统中药之一, 有养阴生津、润肺清心的功效。薯蓣皂甙元 (diosgenin) 是麦冬的主要活性成分。目前对麦冬的报道几乎是有关该药物临

床应用和药理药效的, 对其进行分析检测的文章有高效液相色谱法<sup>[1-4]</sup>、薄层扫描法<sup>[5]</sup>、紫外分光光度法<sup>[6]</sup>和比色法<sup>[7]</sup>。由于皂苷为一类极性较大, 结构复杂的化合物, 无紫外吸收, 无专一显色剂,

\* 收稿日期: 2009-07-28

基金项目: 四川省教育厅科研资助项目 (07zb041)

作者简介: 黄宝美 (1979年生), 女, 讲师; E-mail: hbm790117@yahoo.com.cn

再加上麦冬总皂苷测定经常受糖的干扰,若采用紫外检测末端吸收法,则灵敏度低,且有干扰峰,无法使用;而毛细管电泳—电化学检测法(CE-ED)比紫外检测法灵敏度高、分离效率高、受干扰小,设备可以自己组装,便宜,它对于样品的前处理要求没有那么严格,特别适合成分复杂的实际样品的检测分析<sup>[8-9]</sup>。目前尚未见高效毛细管电泳法对麦冬中主要化学成分的测定的报道,本文采用高效毛细管电泳对其进行了测定,结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

高压电源(北京彩陆科技有限公司), CES98-AD-IB 型安培检测器(北京彩陆科技有限公司)。三电极体系: Pt 片辅助电极、碳纤维电极和饱和甘汞电极。毛细管电泳数据站(北京彩陆科技有限公司), pH S-3C 精密酸度计(上海电光器件厂), 石英毛细管柱(45 cm × 50 μm)。薯蓣皂甙元对照品(中国药品生物制品检定所)。

磷酸二氢钾, 磷酸氢二钠, 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris), 硼酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 硼砂, 甲醇, 邻苯二甲酸氢钾(KHP), NaOH, 以上试剂均为分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。

### 1.2 对照品溶液的制备

精密称取薯蓣皂甙元对照品各 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得对照品溶液。

### 1.3 样品溶液的制备

取麦冬细粉约 0.2 g, 精密称量, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加乙醇 20 mL, 水浴回流 20 min, 同法提取 3 次, 以少量乙醇洗涤滤渣, 合并乙醇液, 挥干。残渣加 1 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸 20 mL, 沸水回流 5 h, 取出, 冷却, 移置分液漏斗中, 用少量水超声洗涤容器, 并入分液漏斗中, 加氯仿萃取 3 次, 每次 10 mL, 合并氯仿液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 挥干氯仿, 残渣加甲醇使溶解, 移置 10 mL 量瓶中加甲醇稀释至刻度, 摇匀、离心, 取上清液即得。

### 1.4 缓冲溶液的制备

分别制备 100 mmol · L<sup>-1</sup> 的硼砂、硼酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、Tris 的储备液, 各取适量配成不同浓度比的体系。

### 1.5 实验方法

进样前, 毛细管依次用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的

NaOH、二次蒸馏水和缓冲溶液各冲洗约 5 min, 每两次进样之间用缓冲液冲洗 2 min, 以保证其重现性。本实验用柱端安培检测, 三电极体系: 碳纤维电极, 饱和甘汞电极, Pt 对电极。采用重力进样方式, 进样高度 20 cm, 进样时间 5 s, 分离毛细管长度 45 cm, 内径 50 μm, 分离电压 15 kV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 工作电位的选择

在电化学工作站上对薯蓣皂甙元进行扫描, 其循环伏安图如图 1(a) 所示; 在毛细管电泳仪上考察了薯蓣皂甙元的动态伏安(如图 1b 所示), 由图可见从 0.0 ~ +0.4 V, 图峰电流不断增加, 0.4 V 达到最大, 电位再往正移, 峰电流又有所减小, 所以本文选择 0.4 V 为检测电位。

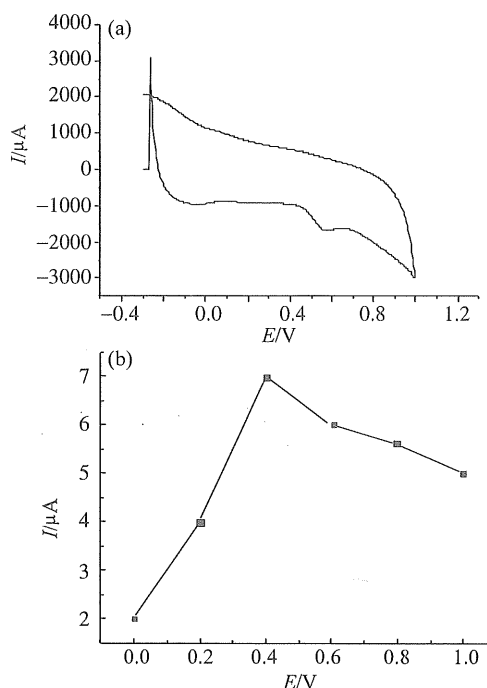


图 1 薯蓣皂甙元的循环伏安 (a) 和动态伏安图 (b)

Fig. 1 Cyclic voltammogram (a) and hydrodynamic voltammogram (b) of diosgenin

缓冲溶液为 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH, pH=9.5; 分离电压为 15 kV; 进样高度为 20 cm; 进样时间为 5 s

### 2.2 缓冲溶液的选择

实验分别考察了 KHP、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>、Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、磷酸盐 4 种不同体系对分离的影响。实验发现其中磷酸盐的缓冲溶液基线噪音和基线偏移都较大; KHP 体系和 Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 中峰电流较小, 峰拖尾严重, 灵敏度较低; 而 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 缓冲溶液中峰形较理想, 灵敏度较高。因此本文选择 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 为最佳缓

冲溶液。缓冲溶液浓度不仅影响分离时间也会影响安培响应, 实验发现, 随着  $B_4O_7^{2-}$  浓度增大迁移时间延长, 当浓度高于  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 焦耳热明显增大, 区带展宽严重, 基线噪音也增大, 综合考虑, 选择  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硼酸盐为缓冲溶液。

对于石英毛细管, 溶液 pH 增高时, 表面电离多, 电荷密度增加, 管壁 zeta 电势增大, 电渗流增大; 考察了 5 种不同 pH 值 (8.0、8.5、9.0、9.5、10.0) 对迁移时间的影响, 实验发现随着 pH 值的增大, 迁移时间减小, 综合考虑峰形, 迁移时间, 柱效的影响, 本文选择最佳 pH 值 9.5。

### 2.3 有机改性对分离的影响

有机改性剂对于改善峰形和提高分离度都是很重要的, 实验发现在缓冲液中加入甲醇可以使峰形变得尖锐, 有助提高分离度, 但是甲醇的含量太高, 易挥发, 引起缓冲溶液组成变化, 从而引起基线漂移, 本文选择  $\varphi$  为 7% 的甲醇作为有机改性剂。

表 1 有机添加剂的体积浓度对分离的影响

Table 1 Effect of the concentration of organic solvent on separation

$\varphi$ (有机添加剂) / %	3	7	10	15
$I/\mu\text{A}$	8.1	7.2	7.0	6.7
$R_s$	2.2	3.2	2.6	2.8

### 2.4 分离高压及进样时间对分离的影响

分离高压是毛细管电泳的驱动力。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, 电流增大, 并且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) 高压对柱效的影响, 选择电压为 15 kV。

采用虹吸进样, 在一定的进样高度下, 进样时间决定进样量的多少, 选择进样高度为 20 cm, 考察了进样时间对分离检测的影响, 实验发现进样时间太短, 达不到检测器的灵敏度, 若进样时间超过 5 s, 峰拖尾现象较严重, 这是因为进样时间过长, 进样量增大, 引起样品扩散, 导致峰形扩宽, 故选择最佳进样时间为 5 s。

### 2.5 方法的精密度和线性范围

在最佳的实验条件下, 将薯蓣皂甙元标准品进

样 6 次, 迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.1% 和 2.5%。芦荟苷在  $1 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内峰面积 ( $Y$ ) 与质量浓度 ( $c$ ) 之间呈现良好的线性关系, 回归方程为:  $Y = 17224 + 8722c$ ,  $r = 0.9995$ , 检出限为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.6 样品测定及加标回收实验

按照 1.3 节制备样品, 用外标法定量进行回收测定, 平均回收率为 100.3%, 结果令人满意。在最佳条件下样品的毛细管电泳图如图 2 所示。

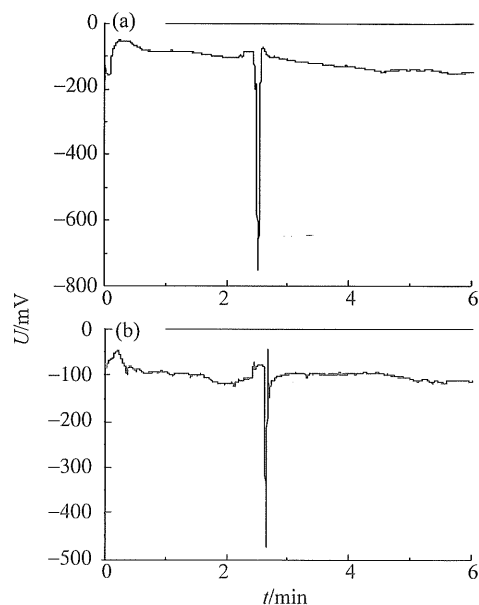


图 2 标准品 (a) 和麦冬样品 (b) 的毛细管电泳图  
Fig. 2 Electropherogram of diosgenin standard (a) and sample (b) in buffer solution of  $\text{NaOH-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{NaOH-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $30 \text{ mmol/L}$ , pH 9.5, 分离电压为: 15 kV, 进样高度为: 20 cm, 进样时间为: 5 s)

表 2 样品的回收率

Table 1 Recovery ratio of the samples

加入量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	实测量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/ %
1.00	1.01	101.0
2.00	1.99	99.5
5.00	5.02	100.4

## 3 结 论

本实验采用毛细管电泳电化学方法测定了麦冬中薯蓣皂甙元的含量, 在优化的条件下 3 min 内得到很好的分离, 样品加标回收率较高, 说明该法快速、准确, 可望成为药品的含量控制方法。

(下转第 71 页)

## 参考文献:

- [1] BLUNT J W, COPP B R, MUNRO M H G, et al. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23: 26.
- [2] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain 386) from the South China Sea [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 9607.
- [3] 邵长伦, 胡谷平, 张秀丽, 等. 南海红树林内生真菌 B60 中的一个新原儿茶酸衍生物 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(5), 133.
- [4] 邵长伦, 胡谷平, 杨瑞云, 等. 南海红树林内生真菌 B77 次级代谢产物研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(1), 56.
- [5] SHAO C L, WANG C Y, GU Y C, et al. Revised structure of penicillazine and preparation, bioactivities of penicillazine derivatives [J]. *Lett Org Chem*, 2009, 6(5): 387.
- [6] CHATTERJEA J N, SINHA N D, BHAKTA C. Use of diazoethane in the synthesis of isocoumarins. Part II [J]. *J Indian Chem Soc*, 1979, 56(5): 515.
- [7] HOLKER J S E, SIMPSON T J. Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 nuclear magnetic resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus melleus*: 3-(1',2'-epoxypropyl)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methylpyran-2-one and mellein [J]. *J Chem Soc, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, 1981 (5): 1397.
- [8] VENKATASUBBAIAH P, CHILTON W S. Phytotoxins of plant pathogens. Part IV. Phytotoxins of *Botryosphaeria obtusa* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1628.
- [9] HARWOOD L M. Trifluoroacetic acid-catalyzed Claisen rearrangement of 5-allyloxy-2-hydroxybenzoic acid and esters: an efficient synthesis of mellein [J]. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1982 (19): 1120.
- [10] KOKUBUN T, VEITCH N C, BRIDGE P D, et al. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(5): 779.
- [11] BALLIO A, BARCELLONA S, SANTURBANO B. 5-Methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966 (31): 3723.
- [12] SIDDIQUI S, MAHMOOD T, SIDDIQUI B S, et al. Non-terpenoidal constituents from *Azadirachta indica* [J]. *Planta Med*, 1988, 54(5): 457.
- [13] HUANG Z J, SHAO C L, CHEN Y G, et al. A new isocoumarin from mangrove endophytic fungus (No. dz17) on the South China Sea coast [J]. *Chem Nat Compd*, 2007, 43(6): 655.

(上接第 67 页)

## 参考文献:

- [1] 阎磊, 徐淑珍, 李秋怡, 等. 20 种菝葜近缘种的薯蓣皂苷元含量测定 [J]. *中药材*, 2006, 29(11): 63-73.
- [2] 余晓红. HPLC 测定刺蒺藜总皂苷中的薯蓣皂苷元 [J]. *华西药学杂志*, 2008, 23(4): 474-475.
- [3] 阳波, 李湘斌. HPLC 测定地奥心血康胶囊中薯蓣皂苷元的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(7): 506-506.
- [4] 林(吉吉), 王秦福, 张辉, 等. HPLC 法比较组培与野生穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的含量 [J]. *吉林中医药*, 2007, 27(5): 15-25.
- [5] 徐江滔, 汤谷平, 吴敏. 薄层扫描法测定麦冬皂苷类成分 [J]. *药物分析杂志*, 1997, 17(3): 164-166.
- [6] 王光忠, 刘伟伟, 葛如斌, 等. 分光光度法测定盾叶薯蓣总皂苷的含量 [J]. *湖北中医学院学报*, 2008, 10(2): 44-45.
- [7] 艾又生, 刘力强, 徐楚鸿, 等. 比色法测定胃乐益冲剂中薯蓣皂苷元的含量 [J]. *医药导报*, 2005, 24(7): 626-726.
- [8] 黄宝美, 姚程炜, 边清泉, 等. 丁公藤中东茛菪内酯含量的高效毛细管电泳检测 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(5): 71-73.
- [9] 林伟丰, 康信煌, 陈缙光, 等. 毛细管电泳法测定血清中的双氯芬酸钠 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(6): 58-60.