

毛细管电泳—电化学检测法测定 淮山中三种植物甾醇含量

胡月芳

(贺州学院 化学与生物工程学院, 广西 贺州 542899)

摘 要:以淮山为试材,采用毛细管电泳—电化学检测(CE-ED)方法测定淮山中3种植物甾醇(麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇)的含量,考察了检测电位、运行缓冲液浓度和 pH、分离电压及进样时间等对检测效果的影响。结果表明:在优化的条件下,对 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇混合标准溶液连续 6 次进行测定在 10 min 内实现了分离,线性范围分别为 $0.1 \sim 1\,500$ 、 $0.1 \sim 1\,000$ 、 $0.1 \sim 1\,200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检出限分别为 0.03 、 0.04 、 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,峰电流的相对标准偏差(RSD)分别为 1.5% 、 1.7% 、 1.6% ,迁移时间 RSD 分别为 0.6% 、 0.7% 、 0.6% 。该方法已用于淮山样品中胆甾醇、麦角甾醇和 β -谷甾醇的测定,加标回收率在 $97.6\% \sim 100.3\%$,相对标准偏差(RSD) $\leq 2.3\%$ 。

关键词:毛细管电泳—电化学检测;淮山;麦角甾醇;胆甾醇; β -谷甾醇

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0162-04

淮山(*Dioscorea opposita* Thunb)别名山药、怀山药等,是一种常用药材和较佳的保健食品^[1]。淮山除了含活性多糖、薯蓣皂苷、腺苷、尿囊素、黄酮、氨基酸等成分之外,还含有植物甾醇类成分(麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇)、胆碱、尿嘧啶等多种化学成分^[2-3]。其中,植物甾醇具有抗癌、降血浆胆固醇及降血糖血脂等多种生理功能,已被作为原料合成甾体类药物^[4]。

常见用来分析药物中植物甾醇类成分的方法有高效液相色谱法(HPLC)^[5-7]、气相色谱法(GC)^[8]。HPLC 和 GC 具有分析速度快、分离效率高、试剂与样品消耗量少等优点,但色谱柱价格昂贵,容易被污染,分析成本高。毛细管电泳(CE)广泛应用于复杂物质分离检测中^[9-10],CE 和电致化学发光联用技术虽已成功应用于一些活性物质的检测^[11],灵敏度和选择性高,但重现性不佳。毛细管电泳—电化学检测法(CE-ED)是一种高灵敏、高选择性、重现性好及分析速度快的分离分析方法,较适用于药用植物活性成分及复杂体系分离检测的研究^[12-15]。迄今为止尚鲜见采用 CE-ED 方法同时测定麦

角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇含量的报道。该研究采用 CE-ED 对淮山中麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇含量进行测定,对于进一步综合开发功能性保健食品淮山提供了理论依据,促进淮山资源的开发与利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试淮山样品购于阳光市场;麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇(美国 Sigma 公司);其它试剂均为分析纯。麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇标准储备液的质量浓度均为 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,用乙醇及二次蒸馏水配制,使用时用运行缓冲液稀释至所需浓度。

毛细管电泳—电化学检测系统(CE-ED)为自组装^[15],包括可调高压电源($\pm 30 \text{ kV}$),CHI660D 电化学工作站(北京华科普天科技有限公司);长 55 cm 石英毛细管,25 μm 内径(河北永年光导纤维厂);三维定位调节器;三电极体系包括:工作电极(直径 125 μm 铜圆盘电极),对电极(铂丝电极),参比电极(Ag/AgCl 电极);0.22 μm 乙酸纤维素滤膜(上海新亚净化器件厂)。

1.2 试验方法

淮山样品提取液的制备:挑选完好的新鲜淮山,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 4 h,用研钵研成细粉,准确称 5.0 g 粉末,加入 70%乙醇 100 mL,室温浸泡 24 h。离心过滤,滤渣用 70%乙醇 10 mL 洗涤 2 次,最后用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的

作者简介:胡月芳(1977-),女,硕士,副教授,研究方向为电化学分析。E-mail:huyuefang@126.com.

基金项目:广西高校科学技术研究资助项目(2013YB238);贺州市科学研究与技术开发计划资助项目(贺科转 1408035)。

收稿日期:2016-01-11

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 缓冲溶液定容至 250 mL。备用。

毛细管用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH、二次蒸馏水、缓冲液分别冲洗 5、10、15 min 后使用;铜圆盘电极用细砂纸打磨,用粒径 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ 氧化铝粉末抛光平整,并于 $0\sim 0.95\text{ V}$ (vs. Ag/AgCl)在 NaOH 溶液中扫描,进行电化学处理。采用自组装的 CE-ED 检测系统,调节工作电极与毛细管出口在同一直线上,最大程度靠近毛细管的末端,以优化后的条件电动进样,检测池为阴极电泳槽。所有溶液使用前均用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 乙酸纤维素滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 检测电位的优化

考察了不同检测电位对 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇电流的影响。从图 1 可以看出,在 $0.6\sim 1.0\text{ V}$ 随氧化电位的增加,麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇的峰电流不断增高,且在 0.85 V 前增高较快,之后缓慢增高。随着检测电位的增大,本底电流和噪音均增加,当检测电位高于 0.85 V 时基线很不稳定,基底电流明显提高,噪音也较大。综合考虑灵敏度及稳定性等因素,选择 0.85 V 为最佳检测电位。

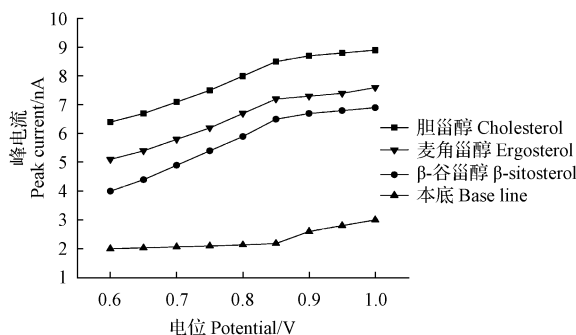


图1 检测电位对麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇峰电流的影响

Fig. 1 Effect of detection potential on the peak current of ergosterol, cholesterol, β -sitosterol standards

2.2 运行缓冲溶液浓度与 pH 的选择

选择 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 作为运行缓冲溶液,考察不同浓度的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 溶液对分离效果的影响。如图 2 所示,浓度较低时,麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇因迁移时间较短未能得到好的基线分离;浓度太高时,分离时间随迁移时间变长而变长,且电泳电流增大导致基线噪音增大,峰电流降低。综合考虑,选择 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 溶液为最优浓度。

固定 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 缓冲液浓度 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,考察了 pH 在 $7.5\sim 10.0$ 对分离检测效果的影响。结果表明,当 pH 小于 8.5 时,麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇不能基线分离,随着 pH 增加,迁移时间增长,分离效果提高,但电流峰型变宽。因此,考虑到要使麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇全部分离,选择缓冲液较小 pH 较合适。综合考虑,选择 pH 8.5 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 溶液作为运行缓冲液。

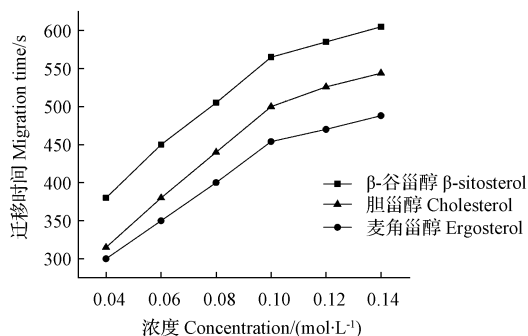


图2 缓冲溶液浓度对麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇迁移时间的影响

Fig. 2 Effect of buffer concentration on migration time of ergosterol, cholesterol, β -sitosterol standards

醇、 β -谷甾醇全部分离,选择缓冲液较小 pH 较合适。综合考虑,选择 pH 8.5 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 溶液作为运行缓冲液。

2.3 分离电压和进样时间的选择

考察了分离电压在 $12\sim 24\text{ kV}$ 范围内对分离检测的影响。图 3 表明,当分离电压升高,迁移时间逐渐缩短,太高的分离电压使分离效果降低,但分离电压太低也会使迁移时间变长,电泳峰型变宽。综合考虑各物质的分离度、灵敏度、迁移时间及焦耳热等对分离检测的影响,选择 18 kV 为最优分离电压。

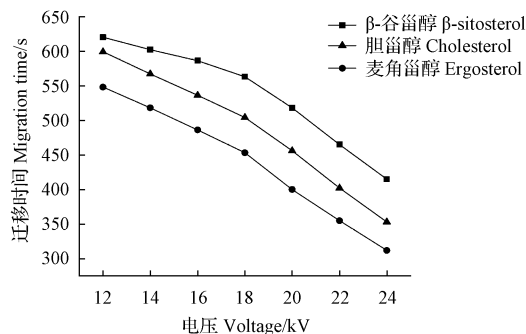


图3 分离电压对麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇迁移时间的影响

Fig. 3 Effect of separation voltage on migration time of ergosterol, cholesterol, β -sitosterol standards

在选定最优运行缓冲溶液浓度、pH 和分离电压条件下,考察了不同进样时间对麦角甾醇、胆甾醇、 β -谷甾醇电流的影响。如图 4 所示,开始时,峰电流随进样时间的增长而增高,但进样时间超过 8.0 s 后峰电流增加不明显,基线电流增高,电泳峰展宽,峰拖尾等现象,各分析物的分离效果降低,重现性差。综合考虑,选择 8.0 s 为最佳进样时间。

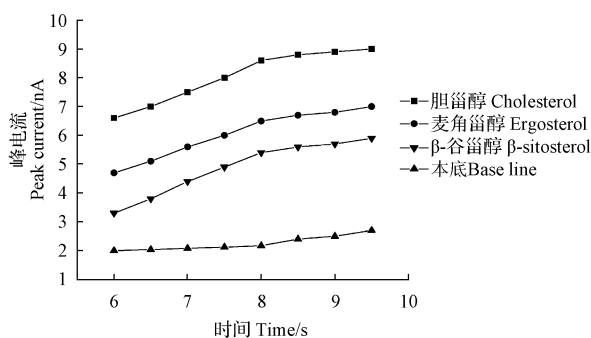


图4 进样时间对麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇峰电流的影响

Fig. 4 Effect of inject time on peak current of ergosterol, cholesterol, β-sitosterol standards

2.4 重复性、线性范围与检出限

配制一系列不同浓度的麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的混合标准溶液,以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦角甾醇、胆甾醇、

β-谷甾醇混合标准溶液在最优条件下连续进样 6 次,在 10 min 内实现基线分离,电泳结果如图 5(a),麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的浓度分别在一定范围内与峰电流呈线性关系,线性范围、回归方程、相关系数及检出限如表 1 所示。麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇峰电流的相对标准偏差(RSD)为 1.5%、1.7%、1.6%,迁移时间的 RSD 为 0.6%、0.7%、0.6%,重复性良好。

2.5 样品测定与回收率试验

取 $100 \mu\text{L}$ 淮山样品提取液,加运行缓冲液稀释到 1.00 mL,混匀后立即进样,检测淮山中麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的含量,在 10 min 内实现基线分离,电泳结果如图 5(b)所示。与标准溶液的电泳图相比,1、2、3 峰分别是麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的电流峰,分离效果良好。除此之外,还发现了一些未知峰,但对麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的分离测定不产生干扰,并不影响测定结果。

表 1 麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇混合溶液的回归方程、线性范围和检出限

Table 1 Regression equations, linear range, detection limit for ergosterol, cholesterol, β-sitosterol mixture solution

成分 Component	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient	线性范围 Linearity range/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	检出限 Detection limit/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
麦角甾醇 Ergosterol	$y=3.421x+5.967$	0.999 8	0.1~1 500	0.03
胆甾醇 Cholesterol	$y=3.128x+3.967$	0.999 5	0.1~1 000	0.04
β-谷甾醇 β-sitosterol	$y=3.772x+6.023$	0.999 7	0.1~1 200	0.03

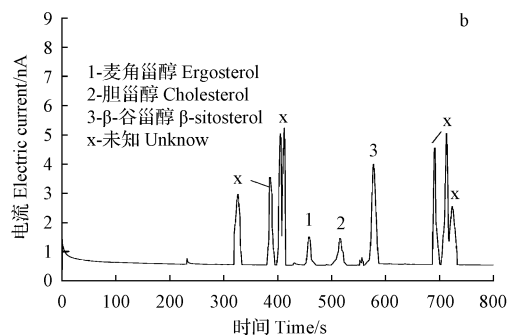
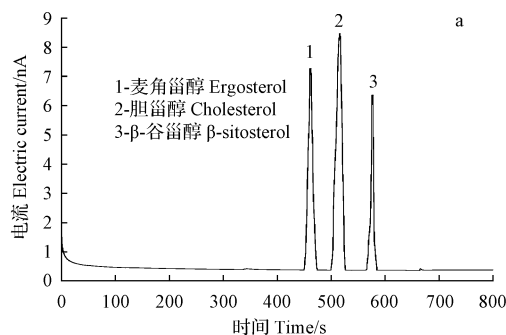


图5 麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇混合标准溶液(a)和淮山样品(b)的电泳图谱

Fig. 5 Electropherograms of ergosterol, cholesterol, β-sitosterol mixture solution(a) and sample of yam(b)

为了再次验证 CE-ED 方法的可靠性,在淮山提取液中添加适量麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇标准溶液进行加标回收率试验,重复 6 次对样品进行检测。表 2 表明,麦角甾醇、胆甾醇、β-谷甾醇的加标回收率范围 97.6%~

100.3%,均在误差范围之内;相对标准偏差(RSD)均不大于 2.3%,效果较好,可见用 CE-ED 方法检测淮山中植物甾醇含量准确、重现性好,可成为淮山中植物甾醇分析的可行方法。

表 2 淮山中胆甾醇、麦角甾醇、β-谷甾醇的含量及加标回收率

Table 2 The content and spiked recoveries of cholesterol, ergosterol, β-sitosterol in yam

成分 Component	样品含量 Sample contents/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	加入量 Added/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	测得量 Found/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率 Recovery/%	RSD/%
麦角甾醇 Ergosterol	0.100	0.50	0.598	98.0	2.2
胆甾醇 Cholesterol	0.082	0.50	0.580	97.6	2.3
β-谷甾醇 β-sitosterol	0.316	0.50	0.817	100.3	2.1

3 结论

该研究采用 CE-ED 法检测淮山中 3 种植物甾醇的含量。试验表明,在优化条件下,3 种植物甾醇在 10 min 内实现基线分离,被测物浓度与峰电流呈良好的线性关系。该方法简单可靠、准确、灵敏度高,重现性好,为淮山中植物甾醇类成分的测定提供了一种有效的方法。淮山中 3 种植物甾醇含量的测定显示,淮山具有较高的营养价值,有良好的开发前景。

参考文献

- [1] 胡月芳. 毛细管电泳-电化学检测法测定淮山中 5 种活性成分[J]. 分析科学学报, 2014, 30(4): 533-536.
- [2] 杨丰滇. 传统山药和无硫山药 β -谷甾醇、腺苷、亚油酸含量研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.
- [3] 牛建平, 孙瑞霞, 孙剑辉. 气相色谱-质谱法分析怀山药中的有机成分[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2007, 5(2): 122-125.
- [4] 宋明杰, 包海鹰, 图力古尔, 等. 椭圆嗜蓝孢孔菌中四种甾类化合物的抗肿瘤活性及构效关系分析[J]. 菌物学报, 2015, 34(2): 293-300.
- [5] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 14 种石磺科贝类的胆甾醇含量测定[J]. 海洋科学, 2015, 39(1): 24-28.
- [6] 邱丰艳, 丁力, 曹红云. 高效液相色谱法测定油脂中 β -谷甾醇的含量[J]. 中国油脂, 2014, 39(7): 91-95.
- [7] 李思明, 冯怡, 曾星. HPLC-APCI-MS/MS 法同时测定猪苓颗粒中麦角甾酮与麦角甾醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 649-653.
- [8] 张峻松, 徐如彦, 薄云川, 等. 毛细管气相色谱法测定烟草中的甾醇类化合物[J]. 烟草科技, 2007(8): 27-31.
- [9] 邱玉亮. 高效毛细管电泳(HPCE)对优质小麦 HMWGS 的分离鉴定[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(5): 1-7.
- [10] 毛师师, 钦晓峰, 周杏琴. 毛细管电泳分析生物样本中儿茶酚氧甲基转移酶 COMT 活性[J]. 分析实验室, 2015, 34(8): 874-877.
- [11] 胡月芳, 李建平, 刘蓉, 等. 毛细管电泳-电致化学发光联用技术应用进展[J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47(5): 618-622.
- [12] DENG G H, CHEN S Y, WANG H, et al. Determination of active ingredients of *Phyllanthus urinaria* by capillary electrophoresis with amperometric detection[J]. J Liq Chromatogr Related Technol, 2012, 35(17): 2370.
- [13] 彭友元. 毛细管电泳电化学检测法测定蜂胶中的黄酮和酚酸[J]. 分析实验室, 2011, 30(3): 54-57.
- [14] 孔令瑶, 汪云, 曹玉华. 毛细管电泳-电化学法对发芽黑米胚芽中 C-氨基丁酸含量的检测[J]. 分析测试学报, 2008, 27(5): 527-530.
- [15] 邓光辉, 王士伟, 王辉, 等. 毛细管电泳安培法测定田基黄中的芦丁与槲皮素[J]. 分析实验室, 2014, 33(4): 424-427.

Determination of Three Phytosterols in Yam by Capillary Electrophoresis With Electrochemical Detection

HU Yuefang

(College of Chemistry and Bioengineering, Hezhou University, Hezhou, Guangxi 542899)

Abstract: Taking yam as test material, a method of capillary electrophoresis coupled with electrochemical detection (CE-ED) was adopted for the determination of three phytosterol content (ergosterol, cholesterol, β -sitosterol) in yam. The effects of detection potential, concentration and pH of running buffer, separation voltage and injection time on the detection were investigated. The results showed that under the optimum conditions, a good baseline separation and highly sensitive detection were achieved in 10 minutes good linear relationship between peak currents and ergosterol, cholesterol and β -sitosterol concentration ranging from $0.1-1\ 500\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1-1\ 000\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1-1\ 200\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, with the detection limits ($S/N=3$) of $0.03\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.04\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.03\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, the relative standard deviations (RSD) of peak currents were 1.5%, 1.7%, 1.6%, RSD of the migration time were 0.6%, 0.7%, 0.6%. The method was successfully applied to the assay of cholesterol, ergosterol and β -sitosterol in samples of yam. The spiked recoveries were in the range of 97.6%—100.3%, with relative standard deviations less than 2.3%.

Keywords: capillary electrophoresis-electrochemical detection; yam; ergosterol; cholesterol; β -sitosterol