

周 桂, 谢贻冬, 罗珍连, 等. 毛细管电泳-电化学发光法分离检测麦芽中大麦芽碱[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 192-195.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.049

毛细管电泳-电化学发光法分离检测麦芽中大麦芽碱

周 桂¹, 谢贻冬¹, 罗珍连², 李美兰¹, 贲蓓蓓¹, 邓光辉²

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院/广西高校微生物与植物资源利用重点实验室, 广西南宁 530006;

2. 广西民族大学化学化工学院, 广西南宁 530006)

摘要:根据大麦芽碱具有增强 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 电化学发光信号的作用,建立了毛细管电泳-电化学发光快速分离检测麦芽中大麦芽碱的方法。考察了检测电位、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 浓度、PBS 缓冲液的 pH 值、毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 运行缓冲液的浓度和 pH 值、进样时间和电压及 CE 分离电压等试验条件对大麦芽碱检测的影响。得到最佳分离检测条件:分离电压 13 kV, 分离缓冲液浓度 10 mmol/L, pH 值 6.5, 进样时间 10 s, 检测电位 1.16 V, 检测池缓冲液浓度 60 mmol/L, pH 值 8.0, $\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 浓度 5 mmol/L。在此条件下,大麦芽碱含量的线性范围为 5 000.00 ~ 100 000.00 $\mu\text{g/L}$, 检出限[性噪比($S/N=3$)]为 60.00 $\mu\text{g/L}$ 。对样品进行检测,麦芽中大麦芽碱的含量为 $(0.239 \pm 0.021) \text{ mg/g}$, 电化学发光强度和迁移时间的 RSD 分别为 1.48% 和 2.69%, 样品的加标回收率为 93.71% ~ 104.31%。

关键词:毛细管电泳; 电化学发光; 麦芽; 大麦芽碱; 分离

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0192-04

麦芽是 1 年生禾本科 (Gramineae) 植物大麦 (*Hordeum vulgare*) 的成熟果实经过干燥的炮制加工成品。将麦芽用于医药最早记载于南朝梁陶弘景的《别医名录》:“以作羹,温,消食和中”,至今已有 1 000 多年的历史^[1]。唐朝苏敬的《新修本草》和明朝李时珍的《本草纲目》等古医书籍以及现代的《中国药典》中也记载了麦芽的相关药用功效,认为麦芽具有治疗脾虚、消胀、退乳等作用^[2-5]。麦芽中所含的大麦芽碱 (hordenine) 化学名为 4-(2-二甲胺基乙基)苯酚,具有收缩血管、兴奋中枢神经、松弛支气管平滑肌等作用^[6-7]。随着对大麦芽碱研究的深入,其分析检测的方法主要有高效液相色谱法、薄层层析法、双电极液相色谱库检测、高效液相色谱-电喷雾质谱联用等^[8-11]。目前还未见到有关毛细管电泳-电化学发光 (CE-ECL) 法分离检测大麦芽碱的报道。

毛细管电泳-电化学发光是 20 世纪 80 年代开始发展起来的分离技术^[12-16],具有选择性高、效率高、分析速度快和易操作等优点^[17-20],因此在生物碱等化学物质的检测方面越来越受到重视^[21-25]。本研究基于大麦芽碱能够增强

$\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 电化学发光性号的特性,建立一种测定大麦芽碱的毛细管电泳-电化学发光新方法,并应用于麦芽中大麦芽碱的分离检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

麦芽由广西南宁市中药材市场提供,大麦芽碱标准品 (含量 $\geq 98\%$) 由北京索莱宝生物科技有限公司提供,并于笔者所在实验室-20℃冰箱保存。

磷酸二氢钠、氯化钠、磷酸氢二钠均为分析纯,由北京索莱宝生物科技有限公司提供。三联吡啶钌 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \geq 98\%]$,由梯希爱(上海)化成工业发展有限公司提供。

1.2 仪器与设备

MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪 (陕西西安瑞迈分析仪器有限公司);三电极体系由自制的碳纤维簇微盘电极 (工作电极)、饱和甘汞电极 (参比电极)、铂丝电极 (辅助电极) 组成;未涂层石英毛细管 ($50 \mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$, 河北永年光导纤维厂);JY92-II 超声波细胞粉碎机 (浙江宁波新芝生物科技股份有限公司);BSA124S-CW 电子天平 (Sartorius 科学仪器北京有限公司);1810-B 型自动双重水蒸馏器 (江苏省金坛市医疗仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准品和样品的制备 精确称量大麦芽碱 0.10 g, 用无水乙醇溶解并定容 100 mL, 在 4℃ 条件下避光存放于棕色试剂瓶中, 用时适当稀释。

将麦芽研磨成粉, 并过 60 目筛后准确称取 2.00 g 于 50 mL 的具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 无水乙醇, 100 W 超声破碎处理 30 min 后浸提 24 h, 12 000 r/min 离心 25 min, 取上清液。

1.3.2 毛细管电泳-电化学发光检测条件 在每次使用前,

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 广西自然科学基金 (编号: 2014GXNSFAA118047、2014GXNSFAA118076); 广西高校科学技术研究重点项目 (编号: 2D2014041); 广西科学研究与技术开发项目 (编号: 桂科合 14125008-1-2); 广西研究生教育创新计划资助研究生科研创新项目 (编号: YCSZ2015129); 广西大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201510608085); 广西大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201610608098); 广西高等教育本科教学改革工程项目 (编号: 2016JGZ120)。

作者简介: 周 桂 (1969—), 女, 湖北宜昌人, 博士, 教授, 主要从事植物生物化学研究。E-mail: 130777396082@163.com。

通信作者: 邓光辉, 博士, 教授, 主要从事现代分离分析技术研究。E-mail: dgh321@163.com。

毛细管先分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液和二次蒸馏水冲洗 10 min,再用运行缓冲液冲洗 20 min。铂电极用 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末抛光平整并超声清洗干净,在显微镜下与毛细管对接。在 ECL 池中加入 5 mmol/L $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和 60 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 值 8.0) 350 μL ,电泳分离缓冲液为 10 mmol/L PBS (pH 值 6.15)。毛细管分离电压为 13 kV,进样电压 10 kV,光电倍增管高压 800 V,进样时间 10 s,以电化学发光信号的峰高定量。为了获得良好的重现性,减小由于溶剂蒸发等因素的影响,每 3 h 更换 1 次 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。所有进样溶液在进入毛细管前须用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 检测条件的优化

2.1.1 检测电位的影响 工作电极上的检测电位是影响电化学发光强度的一个重要因素。控制其他条件不变,大麦芽碱的电化学发光强度随着电极电位从 1.00 ~ 1.20 V 的变化而变化 (图 1)。在 1.00 ~ 1.16 V 范围内,电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 强度随着电极电位的增加而不断增加,当电极电位达到 1.16 V 时,发光强度达到最大。当电极电位超过 1.16 V 时,ECL 强度随着电极电位的增加而下降,所以选择 1.16 V 为大麦芽碱的电化学发光最佳检测电位。

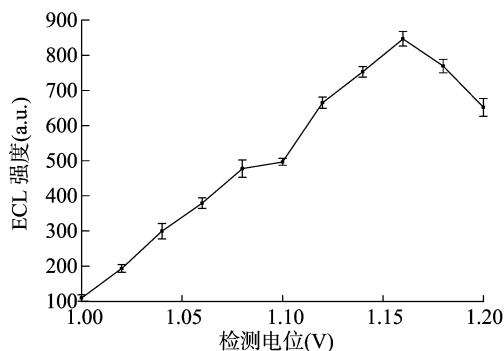


图1 检测电位对 ECL 强度的影响

2.1.2 检测池中 PBS 浓度和 pH 值的影响 检测池 PBS 的浓度和 pH 值也是影响电化学发光强度的重要因素。控制 PBS 的 pH 值固定不变,检测其浓度 30 ~ 70 mmol/L 时,大麦芽碱电化学发光强度的变化。结果 (图 2) 表明,PBS 浓度在 30 ~ 60 mmol/L 时,电化学发光强度随着 PBS 浓度的增大而增大,当 PBS 浓度超过 60 mmol/L 时,电化学发光强度随着 PBS 浓度的增大反而减小,所以选 60 mmol/L 为 PBS 的最佳浓度。控制 PBS 的浓度为 60 mmol/L 不变,检测 pH 值在 6.5 ~ 9.0 范围内变化时,大麦芽碱电化学发光强度的变化。结果 (图 3) 表明,在 pH 值 6.5 ~ 8.0 范围内,电化学发光强度随着 pH 值的增大而增大,当 pH 值超过 8.0 时,电化学发光强度随着 pH 值的增大而减小,所以选择 8.0 为最佳 pH 值。

2.1.3 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液浓度的影响 作为电化学发光试剂, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度影响着电化学发光的底值和大麦芽碱共发光的强度。试验结果 (图 4) 表明,在 2 ~ 5 mmol/L 范围内,大麦芽碱的电化学发光强度随着 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度的升高而升高,且基线稳定,峰型良好。当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度超过 5 mmol/L 时,虽然大麦芽碱的电化学发光强度有所增加,但

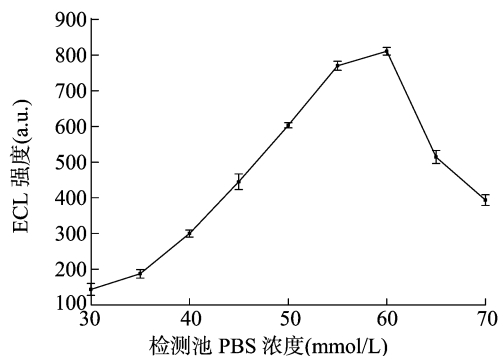


图2 检测池中 PBS 浓度对 ECL 强度的影响

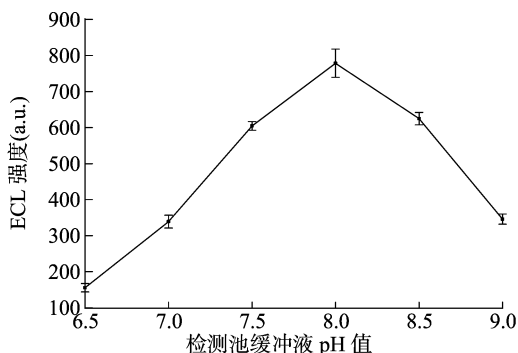


图3 检测池缓冲液 pH 值对 ECL 强度的影响

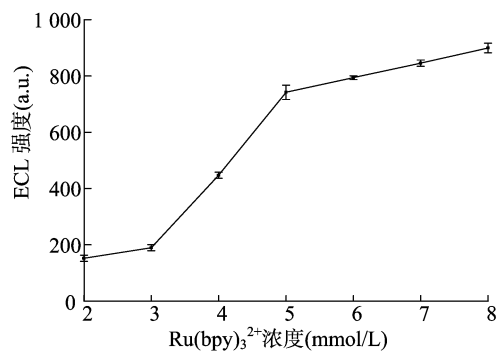


图4 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液浓度对 ECL 强度的影响

是背景信号和基线噪音也随之增加。所以,综合考虑各因素,选择 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度为 5 mmol/L 为最佳。

2.2 分离条件的优化

2.2.1 分离缓冲液的 pH 值和浓度的影响 分离缓冲液中的 pH 值会通过影响点渗流和样品的分离效率,从而影响样品的电化学发光强度。控制分离缓冲液的浓度不变,检测 pH 值从 5.5 变化到 8.5 过程中电化学发光强度的变化。结果 (图 5) 表明,pH 值在 5.5 ~ 6.5 之间时,电化学发光强度随着 pH 值的升高而升高,并在 pH 值为 6.5 时达到最大值,当 pH 值超过 6.5 时,电化学发光强度逐渐减弱,因此选择 pH 值 6.5 的缓冲液进行后续试验。同时,分离缓冲液的浓度也是影响电化学发光的一个因素。控制缓冲液的 pH 值为 6.5 不变,检测缓冲液浓度为 5 ~ 30 mmol/L 时的样品电化学发光强度。结果 (图 6) 表明,当浓度为 5 ~ 10 mmol/L 时,ECL 发光强度随缓冲液浓度的增加而增加,当缓冲液浓度超过 10 mmol/L 时,ECL 发光强度开始下降,所以选择运行缓冲液浓度为 10 mmol/L 最佳。

2.2.2 分离电压和进样时间的影响 分离电压主要影响样

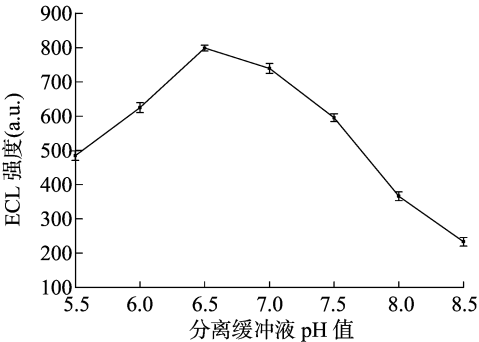


图5 分离缓冲液 pH 值对 ECL 强度的影响

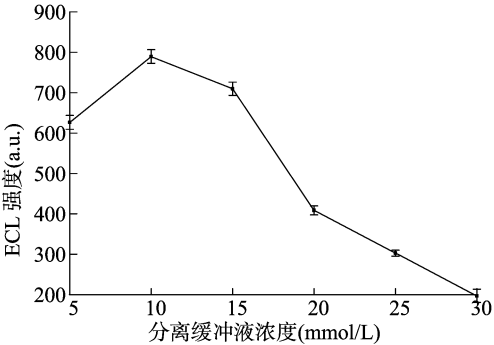


图6 分离缓冲液浓度对 ECL 强度的影响

品的迁移时间,分离电压越高,迁移时间越短。当分离电压在 8 ~ 18 kV 范围内变化时,综合考虑灵敏度、峰宽、噪音、分析时间及焦耳热等因素,选择 13 kV 作为分离电压较为合适。大麦芽碱采用电动进样,选择进样电压为 12 kV,检测不同的进样时间对 ECL 发光强度、迁移时间和峰宽等的影响。在 5 ~ 10 s 的进样时间范围内,ECL 发光强度随进样时间的增加而增加,但当进样时间超过 10 s 时,ECL 发光强度基本不变,且峰变宽,所以考虑到进样时间对峰型的影响,选择 10 s 为最佳进样时间(图 7)。

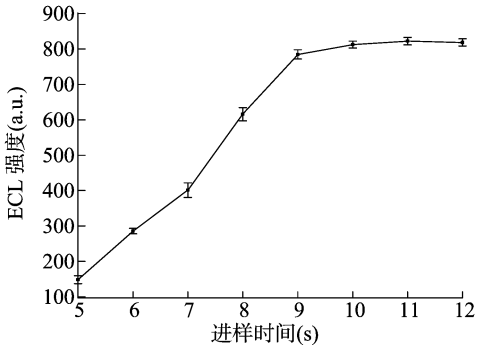


图7 进样时间对 ECL 强度的影响

2.3 检出限、精密度和线性范围

配制一系列浓度的大麦芽碱标准品溶液,在已优化的条件下进行试验,每个浓度重复检测 5 次,以 ECL 发光强度(I)对大麦芽碱标准品含量($c, \mu\text{g/L}$)绘制工作曲线,得到线性方程为 $I = 0.257 6c - 429.81$ ($r^2 = 0.998 9$),线性范围为 5 000.00 ~ 100 000.00 $\mu\text{g/L}$,检出限($S/N = 3$)为 60.00 $\mu\text{g/L}$ 。在此最优条件下对 10 000.00 $\mu\text{g/L}$ 麦芽碱进行 5 次分离检测,得到大麦芽碱的迁移时间和 ECL 发光强度相对标准差(RSD)分别为 1.48%、2.69%,说明该方法的精

密度良好。大麦芽碱标准溶液的毛细管电泳图见图 8。

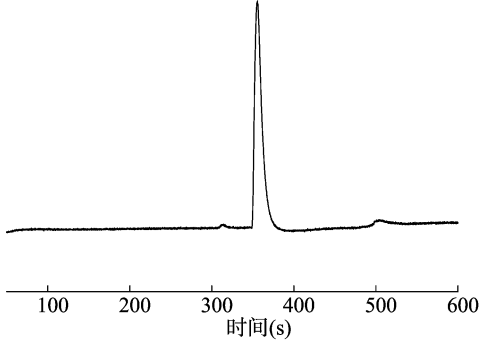


图8 大麦芽碱标准品毛细管电泳-电化学发光

2.4 样品检测及回收率

图 9 为麦芽样品的 CE-ECL 发光图,测得麦芽中大麦芽碱的含量为 $(0.239 \pm 0.021) \text{ mg/g}$ 。样品加标回收试验结果见表 1,电泳条件为:分离电压 13 kV,分离缓冲液浓度 10 mmol/L,pH 值 6.5,进样时间 10 s,检测电位 1.16 V,检测池 PBS 浓度 60 mmol/L,pH 值 8.0, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度 5 mmol/L,加标的回收率在 93.71% ~ 104.31% 之间,相对标准差 $\leq 3.29\%$ 。

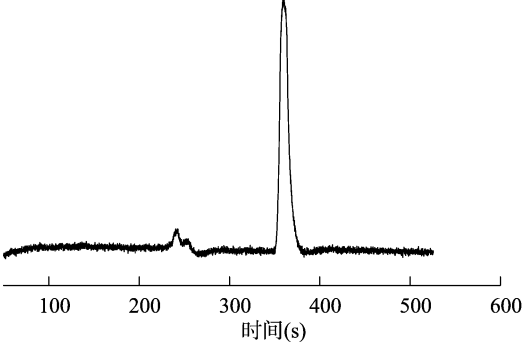


图9 麦芽样品中大麦芽毛细管电泳-电化学发光

表 1 麦芽中 18 230 $\mu\text{g/L}$ 麦芽碱加标回收率测定结果 ($n = 5$)

加入量 ($\mu\text{g/L}$)	检测值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)	相对标准差 (%)
5 000	24 231	104.31	1.62
10 000	26 786	94.88	2.81
20 000	35 829	93.71	1.54
30 000	49 057	101.71	2.93
40 000	57 958	99.53	3.29

3 结论

采用毛细管电泳-电化学发光检测法分离并检测了麦芽中的大麦芽碱,得到最佳分离检测条件:分离电压 13 kV,分离缓冲液浓度 10 mmol/L,pH 值 6.5,进样时间 10 s,检测电为 1.16 V,检测池 PBS 浓度 60 mmol/L,pH 值 8.0, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度 5 mmol/L。在此最优条件下检测到大麦芽碱的含量检测限($S/N = 3$)为 60.00 $\mu\text{g/L}$,麦芽中大麦芽碱的含量为 $(0.239 \pm 0.021) \text{ mg/g}$ 。加标回收率为 93.71% ~ 104.31%。相比较于高效液相色谱法和分光光度法,此方法具有操作简单、检测速度快、灵敏度高、重现性好、检出限低、少干扰、专属性强等优点,可为麦芽中大麦芽碱的检测鉴定提

供依据,有望应用于麦芽或其他植物中的大麦芽碱含量检测和分析鉴定。

参考文献:

- [1] 庞培孝,彭广芳,徐欣荣. 中药麦芽的本草学考证[J]. 时珍国医国药,2000,11(8):735,736.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:145.
- [3] 王桂香,刘惠娟,李 萍,等. 麦芽、稻芽与谷芽的生药鉴别研究[J]. 中药材,2009,32(4):500-503.
- [4] 王 雄,吴金虎. 大麦芽的研究概述[J]. 中药材,2010,33(9):1503-1508.
- [5] 李前进. 与《药典》收录的谷芽稻芽用药的商榷[J]. 中国医药指南,2010,8(21):173-175.
- [6] 王 凯,王 玄,葛燕丽,等. 大麦芽碱的合成[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(8):73.
- [7] Hapke H J. Pharmacological effects of hordenine [J]. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift,1995,102(6):228-232.
- [8] Kim S C, Lee J H, Kim M H, et al. Hordenine, a single compound produced during barley germination, inhibits melanogenesis in human melanocytes[J]. Food Chemistry,2013,141(1):174-181.
- [9] Singh A K, Granley K, Misra U, et al. Screening and confirmation of drugs in urine: interference of hordenine with the immunoassays and thin layer chromatography methods [J]. Forensic Science International,1992,54(1):9-22.
- [10] Steiner I, Brauers G, Temme O, et al. A sensitive method for the determination of hordenine in human serum by ESI + UPLC - MS/MS for forensic toxicological applications [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry,2016:1-8.
- [11] Johansson I M, Schubert B. Separation of hordenine and N - methyl derivatives from germinating barley by liquid chromatography with dual - electrode coulometric detection [J]. Journal of Chromatography A,1990,498(1):241-247.
- [12] Ding C, Ge Y, Zhang S. Electrochemical and electrochemiluminescence determination of cancer cells based on aptamers and magnetic beads [J]. Chemistry - A European Journal, 2010, 16 (35): 10707-10714.
- [13] Yuan Y, Li H, Shuang H, et al. Immobilization of tris (1, 10 - phenanthroline) ruthenium with graphene oxide for electrochemiluminescent analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2012,720(1):38-42.
- [14] Du Y, Wang E. Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis with electrochemical and electrochemiluminescence detection[J]. Journal of Separation Science,2007,30(6):875-890.
- [15] Yan Z, Li Y, Zheng J, et al. Electrogenerated chemiluminescence biosensing method for methyltransferase activity using tris (1, 10 - phenanthroline) ruthenium - assembled graphene oxide[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry,2014,731:133-138.
- [16] Sun H, Ma S, Li Y, et al. Electrogenerated chemiluminescence biosensing method for the discrimination of DNA hydroxymethylation and assay of the β - glucosyltransferase activity[J]. Biosensors & Bioelectronics,2016,79:92-97.
- [17] Deng B, Su C, Kang Y. Determination of norfloxacin in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2006, 385 (385): 1336-1341.
- [18] Liu Y M, Cao J T, Wei T, et al. Determination of levofloxacin and norfloxacin by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection and applications in human urine [J]. Electrophoresis, 2008,29(15):3207-3212.
- [19] Liu X, Shi L, Niu W, et al. Environmentally friendly and highly sensitive ruthenium (II) Tris (2, 2' - bipyridyl) electrochemiluminescent system using 2 - (dibutylamino) ethanol as co - reactant? [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2007,46(3):421-424.
- [20] Deng B, Ye L, Yin H, et al. Determination of pseudolycorine in the bulb of lycoris radiata by capillary electrophoresis combined with online electrochemiluminescence using ultrasonic - assisted extraction[J]. Journal of Chromatography B,2011,879(13-14):927-932.
- [21] Yin J, Xu Y, Jing L, et al. Analysis of quinolizidine alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by capillary electrophoresis with tris(2,2' - bipyridyl) ruthenium (II) - based electrochemiluminescence detection[J]. Talanta,2008,75(1):38-42.
- [22] Zhou M, Ma Y J, Ren X N, et al. Determination of sinomenine in *Sinomenium acutum* by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2007,587(1):104-109.
- [23] Deng B, Xie F, Li L, et al. Determination of galanthamine in *Bulbus Lycoridis Radiatae* by coupling capillary electrophoresis with end - column electrochemiluminescence detection [J]. Journal of Separation Science,2010,33(15):2356-2360.
- [24] 杨 洋,孙雪梅,李传龙. 毛细管电泳电化学发光检测香草扁桃酸和高香草酸[J]. 河北大学学报(自然科学版),2016(3):257-263.
- [25] 安 冬,李 玉,姜泽东,等. 毛细管电泳 - 电化学发光联用分离检测水产品中的组胺和亚精胺[J]. 中国食品学报,2014,14(12):136-142.