

支链聚乙烯亚胺辅助硼酸功能化磁性纳米粒子的制备 及其用于人参皂苷的特异性富集

李 雪¹, 晏志凤², 李龙珠¹, 马 涛^{1*}, 陈 阳^{1,2*}

(1. 蚌埠医学院药学院, 安徽 蚌埠 233030; 2. 蚌埠医学院公共基础学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 为了实现更高效的人参皂苷富集, 以硼亲和色谱为核心, 结合支链聚乙烯亚胺放大硼酸配基数量, 合成了支链聚乙烯亚胺辅助硼酸功能化磁性纳米粒 (PEI-BA-MNPs), 用于实际样品中人参皂苷的选择性富集, 结合高效液相色谱, 建立了一种分析实际样品中的人参皂苷的方法。以人参皂苷 Re 为代表, 在优化的磁性固相萃取的条件下, 该方法在 50~800 $\mu\text{g/L}$ 的范围内呈现良好的线性, 线性相关系数 (R^2) 为 0.9681。添加水平在 0.1~10 mg/L 时, 回收率为 91.5%~117.3%, 相对标准偏差为 7.2%~13.4%。由于所得材料对于人参皂苷的高亲和力, 经所建立的方法富集过后, 人参皂苷 Re 的灵敏度提高了约 50 倍。同时, 所得材料重复使用 5 次以后还可以保持至少 72% 的原始吸附量。最后, 将该方法用于启脾口服液中人参皂苷 Re 的含量分析, 并与 2015 版《中国药典》的标准方法做对比。结果显示, 所建立的方法检测出的人参皂苷 Re 含量为 0.27%, 虽然与标准方法测得的含量 (0.31%) 有些微差距, 但该方法极大地节约了实际操作中样品前处理的步骤和时间。结果表明, 所制得的 PEI-BA-MNPs 可以用作磁性固相萃取吸附剂实现实际样品中人参皂苷的选择性富集。该方法亲和力强, 选择性好, 灵敏度高, 操作快速简便且准确度高, 具有很大的应用价值和发展前景。

关键词: 聚乙烯亚胺; 硼亲和; 磁性纳米粒子; 高效液相色谱; 人参皂苷

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2021)06-0599-08

Preparation of branched polyethyleneimine-assisted boric acid-functionalized magnetic nanoparticles and its application to selective enrichment of ginsenoside Re

LI Xue¹, YAN Zhifeng², LI Longzhu¹, MA Tao^{1*}, CHEN Yang^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

2. School of Public Basic Courses, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract: Panax ginseng has a 5000-year-long history as a traditional herbal medicine in Eastern Asia and North America. It is also known as crown jewel in traditional Chinese herbs because of its wide pharmacological properties. Ginsenosides, a class of saponins containing triterpene aglycones and various sugar moieties, are the main active components of ginseng. Considering the low abundance of ginsenosides and other abundant interferences, separation of ginsenosides is essential prior to further analysis. Recently, our group demonstrated the potential of a boronate affinity material for the selective enrichment of ginsenosides. However, conventional boronate affinity materials suffer from an apparent drawback. The binding strength of boronic acids toward *cis*-diol-containing compounds is low, with dissociation constants (K_d) ranging from 10^{-1} to 10^{-3} mol/L. Thus, it is necessary to develop boronate affinity materials with high binding strength. In this study, we developed polyethyleneimine (PEI)-functionalized

收稿日期: 2020-11-04

* 通讯联系人. E-mail: matao1992@foxmail.com (马涛); E-mail: yangchen@bbmc.edu.cn (陈阳).

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1908085QH349); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2018A1009).

Foundation item: Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1908085QH349); Key Project of Natural Science Research of University in Anhui Province (No. KJ2018A1009).

boronate affinity magnetic nanoparticles (BA-MNPs) for the selective enrichment of ginsenosides. Branched PEI was applied as a scaffold to amplify the number of boronic acid moieties, while 3-formylphenylboronic acid, which shows high affinity toward *cis*-diol-containing molecules, was used as the affinity ligand. In addition, the presence of the multi-glycan structure of ginsenoside leads to higher binding affinity between the PEI-BA-MNPs due to the synergistic multivalent binding effect. Combining with high performance liquid chromatography, a method for the selective analysis of ginsenosides was established. With ginsenoside Re as the representative and under the optimized conditions for magnetic solid-phase extraction, the developed method showed good linearity in the range of 50–800 $\mu\text{g/L}$, with a linear correlation coefficient (R^2) of 0.9681. At different spiked levels (0.1–10 mg/L), the recoveries were in the range of 91.5%–117.3%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 7.2% to 13.4%. Since the PEI-BA-MNPs exhibited significantly improved binding strength toward ginsenosides, they could extract trace glycoproteins. After enrichment, a 50-fold improvement in the sensitivity was achieved. In addition, the PEI-BA-MNPs maintained at least 72% of their original binding capacity after five consecutive uses. Finally, the developed method was applied to the determination of ginsenoside Re in commercial medicine (Qipi oral liquid). As opposed to the tedious and time-consuming sample preparation in the standard method (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015; ChP2015), the present protocol allowed for direct enrichment of the diluted commercial medicine with PEI-BA-MNPs. The magnetic separation made the overall experiment much simpler than the standard ChP2015 method. After washing and elution, the enriched ginsenoside Re was eluted and subjected to HPLC-UV analysis. The results obtained with the developed method (0.27%) were similar to those of ChP2015 (0.31%). We have experimentally demonstrated that PEI-BA-MNPs are ideal affinity sorbents for the selective enrichment of ginsenosides owing to their significant advantages, including high affinity, excellent selectivity, easy manipulation, high binding capacity, and fast binding equilibrium. As many saponins contain sugar side chains, we foresee a promising prospect for the proposed method in real-world applications.

Key words: polyethyleneimine; boronate affinity; magnetic nanoparticles; high performance liquid chromatography (HPLC); ginsenosides

人参为五加科植物人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 的干燥根和根茎, 是我国传统的名贵中药材, 最早出现在《神农本草经》中, 具有大补元气、固脱、生津、安神和益智等功效^[1]。人参的化学成分较为复杂, 研究已表明, 人参皂苷为人参中的主要活性成分^[2], 具有抗肿瘤^[3–6]、调节心脑血管系统^[7]、调节中枢神经系统^[8,9]、调节免疫系统^[10]、抗疲劳^[11]、抗氧化^[12]、抗辐射^[13]、抗衰老^[14]和抗糖尿病^[15]等多

种药理作用, 但其在人参中含量较低, 测定时易受到其他组分的干扰。因此, 采用合适的人参皂苷富集方法对人参皂苷分析具有十分重要的意义。

硼亲和材料是一种选择性分离富集顺式二羟基生物分子的功能性材料^[16], 硼酸配体可以可逆地与含顺式二羟基的化合物结合, 如糖蛋白^[17]、聚糖、糖类、核苷和核苷酸。这些含顺式二羟基的生物分子在蛋白质组学、代谢组学、糖组学、糖生物学等当前

引用本文: 李雪, 晏志凤, 李龙珠, 马涛, 陈阳. 支链聚乙烯亚胺辅助硼酸功能化磁性纳米粒子的制备及其用于人参皂苷的特异性富集. 色谱, 2021, 39(6): 599–606.

LI Xue, YAN Zhifeng, LI Longzhu, MA Tao, CHEN Yang. Preparation of branched polyethyleneimine-assisted boric acid-functionalized magnetic nanoparticles for selective enrichment of ginsenoside Re. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(6): 599–606.

科学前沿中是重要的目标分子^[18]。但单一硼酸对含有顺式二羟基化合物的结合强度相对较弱,因此,用传统的硼酸盐亲和材料无法胜任低浓度的顺式二羟基分子的选择性富集任务^[19]。支链聚乙烯亚胺(PEI)可以作为一种较好的载体来扩增材料表面可供修饰的官能团,使硼酸位点大量增加^[20]。人参皂苷分子多数都具有多糖链结构,这也为多位点协同结合提供了基础(具体结合原理见图1)。Li等^[21]制备了PEI修饰硼亲和毛细管整体柱,结果表明其对于糖蛋白的结合力较单一硼酸提高了1~2个数量级。

同时,纳米颗粒在分离、催化、传感器和药物传递等领域引起了广泛的关注。其中磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒由于其良好的生物相容性、超顺磁性、低毒性和易于操作等特性在样品制备中得到广泛关注^[22-25]。最近,本课题组制备了硼酸修饰的介孔硅纳米颗粒,并成功用于人参皂苷的选择性富集^[26]。但由于单一硼酸与人参皂苷分子较低的结合力,此方法尚不能满足中成药中人参皂苷的分析需求,因此需要选用与人参皂苷分子具有更高亲和力的功能化材料。

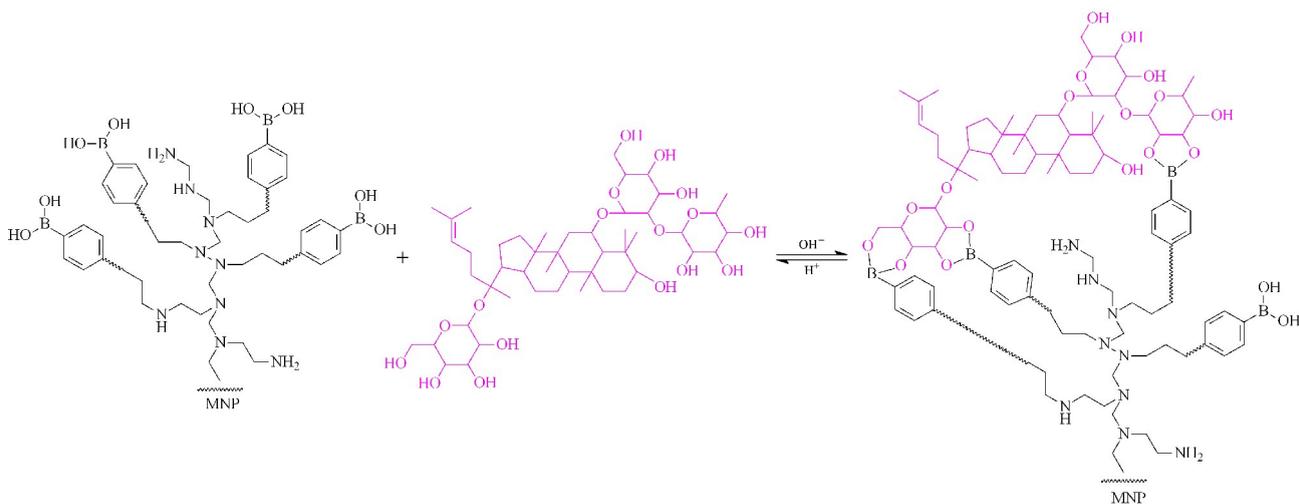


图1 支链聚乙烯亚胺修饰的硼亲和磁性纳米粒子(PEI-BA-MNPs)与人参皂苷Re结合示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the combination of polyethyleneimine-functionalized boronate affinity magnetic nanoparticles (PEI-BA-MNPs) and ginsenoside Re

本研究中,以 Fe_3O_4 纳米颗粒为磁核,采用支链聚乙烯亚胺作为支架放大后修饰的硼酸(3-甲酰基苯硼酸)官能团数目,合成了一种支链聚乙烯亚胺修饰的硼亲和磁性纳米粒子(PEI-BA-MNPs),采用磁性固相萃取的方法实现了人参皂苷的高效富集。以人参皂苷Re为例,对于材料性能进行验证,同时结合高效液相色谱定量分析,测定实际样品启脾口服液中的人参皂苷含量。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

透射电子显微镜(TEM)JEM1010系统(日本东京JEOL);超微量紫外可见分光光度计(美国Thermo Fisher公司);HPLC系统为Waters公司,该系统由1525二元溶剂泵、2998 PDA检测器和2707自动进样器组成。

PEI(相对分子质量10 000)购自阿法埃莎(中

国)化学有限公司,六水合三氯化铁、乙二醇、无水乙酸钠、1,6-己二胺、5% (v/v)戊二醛甲醇溶液、无水甲醇、乙腈、磷酸、正丁醇、三氯甲烷、氰基硼氢化钠、3-甲酰基苯硼酸、乙酸、磷酸钠(十二水)、氨试液、腺苷、脱氧腺苷、葡萄糖、果糖均为分析纯,购自天津市大茂化学试剂厂。实验用水均为Milli-Q纯水系统制备的超纯水。人参皂苷Re、人参皂苷Rb1、原人参三醇、原人参二醇购自上海源叶生物科技有限公司,均为分析标准品,纯度 $\geq 98\%$ 。

启脾口服液(吉林益民堂制药有限公司)购自当地药店(蚌埠)。

1.2 磁性纳米粒子的制备

1.2.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备

首先将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.0 g)溶解在60 mL的乙二醇中,形成澄清的橙黄色溶液。然后,向上述溶液中添加4.0 g无水乙酸钠和13.0 g 1,6-己二胺。将混合物剧烈搅拌30 min,并密封在100 mL反应

釜中,在 198 °C 下反应 6 h,得到氨基修饰的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子 (AMNPs)。

1.2.2 支链聚乙烯亚胺修饰的磁性纳米粒子 (PEI-MNPs) 的制备

将 200 mg AMNPs 加入 40 mL 5% (v/v) 戊二醛甲醇溶液中,在室温下机械搅拌 12 h。所得戊二醛活化的 MNPs 用无水甲醇洗涤 4 次后,先加入 20 mL 无水甲醇,然后用超声波分散在含有 0.5 g PEI 的 20 mL 无水甲醇中。在室温下将混合物机械搅拌 12 h。随后每 6 h 加入 10 mL 氰基硼氢化钠甲醇溶液 (20 g/L),持续反应 12 h。用磁铁收集反应得到的 PEI-MNPs,洗涤后进行真空干燥。将获得的 PEI-MNPs 储存以备进一步使用。

1.2.3 PEI-BA-MNPs 和硼亲和磁性纳米粒子 (BA-MNPs) 的制备

首先将 200 mg PEI-MNPs 用超声分散在 30 mL 无水甲醇中,随后加入 10 mL 3-甲酰基苯硼酸无水甲醇溶液 (50 g/L) 中,再加入 10 mL 氰基硼氢化钠甲醇溶液 (30 g/L),搅拌 24 h。用磁铁收集反应得到的 PEI-BA-MNPs,洗涤 3 次后进行真空干燥。将获得的 PEI-BA-MNPs 储存以备进一步使用。对于 BA-MNPs 的合成,使用 AMNPs 代替 PEI-MNPs,其余步骤保持不变。

1.3 磁性固相萃取过程

称取 3 mg 的 PEI-BA-MNPs,先加入 0.5 mL 空白溶剂 (含 30% 甲醇和 70% pH 8.5 的磷酸盐缓冲液),超声使 PEI-BA-MNPs 均匀分散,再加入等量的人参皂苷标准溶液,混合均匀后,振荡 60 min,弃去上清液,用空白溶剂清洗,加入 200 μL 的 0.1 mol/L 乙酸,振荡 60 min,吸取上清液,在 203 nm 处测定紫外吸收度。

1.4 亲和力测定

PEI-BA-MNPs 对于人参皂苷的亲和力采用 Scatchard 拟合进行分析。根据以下 Scatchard 方程计算解离常数 (K_d) 和表观最大结合容量 (Q_{\max}):

$$Q_e/C_s = (Q_{\max} - Q_e)/K_d$$

其中 Q_{\max} 和 K_d 分别是饱和结合容量和解离常数, Q_e 是人参皂苷在平衡时与 PEI-BA-MNPs 和 BA-MNPs 的结合量, C_s 是吸附平衡时的自由浓度。 K_d 和 Q_{\max} 的值可以根据 Q_e/C_s 与 Q_e 曲线的斜率和截距来计算。

1.5 启脾口服液样品预处理

本工作方法:将启脾口服液用含 30% 甲醇和

70% pH 8.5 的磷酸盐缓冲液稀释 100 倍后,按照 1.3 节中所述过程进行萃取。

2015 版《中国药典》(ChP2015) 标准方法:精密量取启脾口服液 50 mL,加入三氯甲烷振摇提取 3 次,每次 30 mL,弃去三氯甲烷提取液,水液中加入水饱和的正丁醇振摇提取 5 次 (50、30、30、20、20 mL),合并正丁醇提取液,加氨试液洗涤 4 次,每次 50 mL,弃去氨试液,再加正丁醇饱和的水轻轻振摇洗涤 2 次,每次 50 mL,弃去水洗液,正丁醇液回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.6 高效液相色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-3 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 检测波长: 203 nm, 流速: 1.3 mL/min。流动相为 1% (v/v) H_3PO_4 (A) 和 ACN (B), 梯度如下: 0 ~ 30 min, 19% B; 30 ~ 35 min, 19% B ~ 24% B; 35 ~ 60 min, 24% B ~ 40% B; 60 ~ 70 min, 40% B, 进样量为 20 μL 。所有流动相在使用前通过 0.45 μm 的滤膜过滤,并在超声中脱气。

2 结果与讨论

2.1 磁性纳米粒子的表征

用 TEM 对制备的 PEI-BA-MNPs 进行了形貌表征。如图 2a 所示,TEM 图像显示 PEI-BA-MNPs 具有良好的分散性和相对均匀的尺寸分布,平均直径约为 100 nm。如图 2b 所示,PEI-BA-MNPs 在水中均匀分散,并被外部磁铁迅速吸引到容器壁上。当去除磁体时,聚集的纳米粒子可以通过超声重新分散。首先采用腺苷和脱氧腺苷这一对化合物对 PEI-BA-MNPs 的硼亲和作用进行表征,按照 1.3 节中的方法对腺苷和脱氧腺苷标准溶液进行萃取和解吸,所得溶液在 260 nm 处测定紫外吸收度,结果 (见图 2c) 显示腺苷的紫外吸收度远大于脱氧腺苷,说明所合成的 PEI-BA-MNPs 对含有顺二羟基分子具有选择性。

2.2 磁性固相萃取条件的优化

2.2.1 吸附时间

吸附时间是固相萃取技术中的一个重要参数,一般情况下,在吸附剂与目标物未达到结合平衡时,吸附剂的结合能力会随着吸附时间的增加而增加,在保证富集效果的前提下,应尽量缩短吸附时间。

按照 1.3 节中的过程进行萃取,如图 3a 所示,分别考察了吸附时间为 5、10、20、30、60、360 min 时



图 2 PEI-BA-MNPs 的 (a) 透射电子显微镜照片、(b) 磁分离照片和 (c) PEI-BA-MNPs 结合腺苷、脱氧腺苷的能力考察 ($n=3$)
 Fig. 2 (a) TEM image and (b) photographs of magnetic separation of PEI-BA-MNPs and (c) investigation on the binding affinity of PEI-BA-MNPs to adenosine and deoxyadenosine ($n=3$)

磁性纳米粒子的结合能力,结果表明,在 5~60 min 内,随着吸附时间的增加,磁性纳米粒子的吸附能力逐渐增大;当吸附时间为 60 min 时,结合能力达到最大;之后随着吸附时间增加,磁性纳米粒子的结合能力变化不大。因此,本工作选择 60 min 作为最佳吸附时间。

2.2.2 解吸时间

如图 3b 所示,分别考察了解吸时间为 5、10、20、30、60、360 min 时磁性纳米粒子的结合容量,结果表明,在 5~30 min 内,随着解吸时间的增加,磁

性纳米粒子的结合容量逐渐增大;当解吸时间为 30 min 时,结合能力达到最大;之后随着解吸时间增加,磁性纳米粒子的结合能力几乎不再变化。因此,基于以上实验结果,本工作选择 30 min 为最佳解吸时间。

2.3 亲和力

以人参皂苷 Re 为例,对制得的 PEI-BA-MNPs 和 BA-MNPs 进行 Scatchard 分析,如图 4a 所示,人参皂苷 Re 在平衡时与 PEI-BA-MNPs 的结合量 Q_e 。

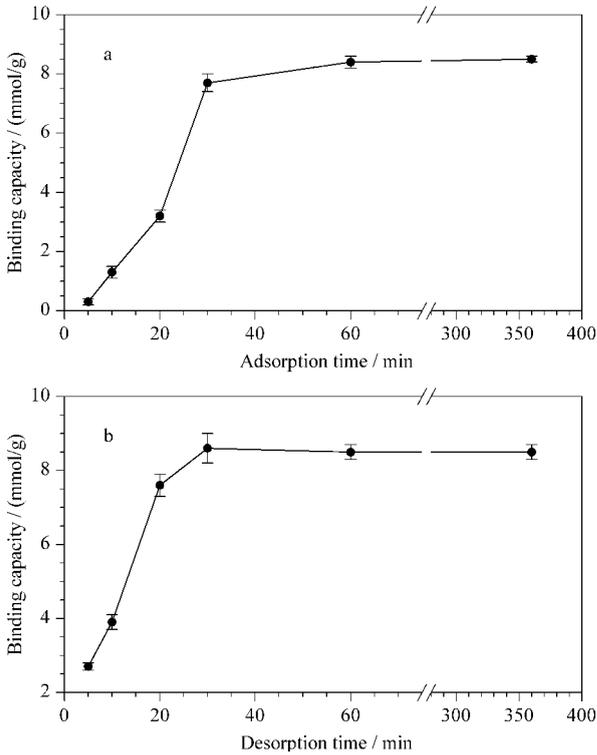


图 3 (a) 吸附时间和 (b) 解吸时间对 PEI-BA-MNPs 结合人参皂苷 Re (1 g/L) 容量的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of (a) adsorption time and (b) desorption time on the binding capacity of PEI-BA-MNPs towards ginsenoside Re (1 g/L) ($n=3$)

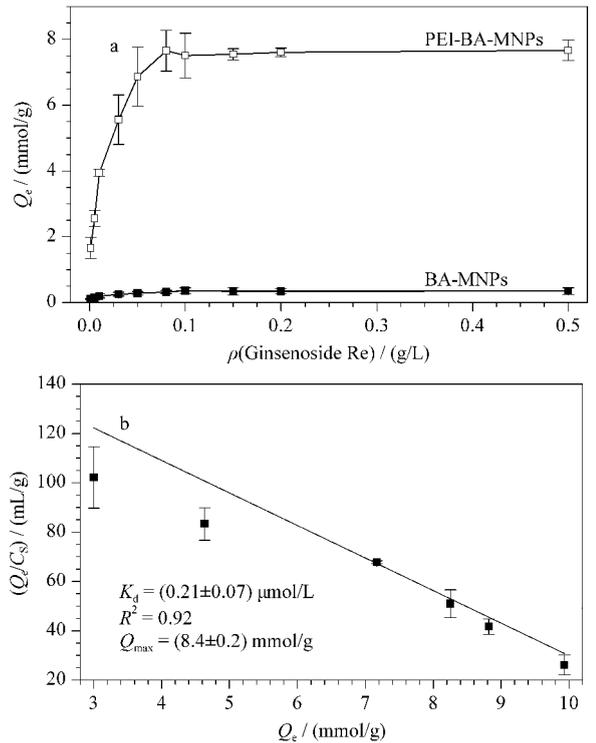


图 4 (a) BA-MNPs 与 PEI-BA-MNPs 对人参皂苷 Re 的等温吸附线及 (b) PEI-BA-MNPs 对人参皂苷 Re 吸附的 Scatchard 分析 ($n=3$)

Fig. 4 (a) Adsorption isotherms of BA-MNPs and PEI-BA-MNPs towards ginsenoside Re and (b) Scatchard analysis of PEI-BA-MNPs towards ginsenoside Re ($n=3$)

远高于与 BA-MNPs 的结合量。

根据图 4b 中的 Scatchard 分析, PEI-BA-MNPs 的 K_d 值为 $(0.21 \pm 0.07) \mu\text{mol/L}$; Q_{max} 为 $(8.4 \pm 0.2) \text{mmol/g}$ 。和硼酸与单糖的作用力相比^[26,27], 其对于人参皂苷的亲合力有了明显的增加, 这为 PEI-BA-MNPs 用于人参皂苷高效富集提供了理论依据。

2.4 选择性

本工作以人参皂苷 Re 和 Rb1 为代表, 研究 PEI-BA-MNPs 的选择性。在 PEI-BA-MNPs 结合了人参皂苷 (Re 或 Rb1, 0.5 g/L) 之后, 将 PEI-BA-MNPs 加入高浓度的竞争物质溶液 (空白溶剂、葡萄糖、果糖、原人参三醇、原人参二醇, 5 g/L) 后振荡 1 h, 随后测定 PEI-BA-MNPs 对于人参皂苷 (Re 或 Rb1) 的吸附量。如图 5 所示, PEI-BA-MNPs 与 Re 或 Rb1 的结合基本不受干扰, 将加入空白溶剂的吸附量设为 100%, 加入其他高浓度竞争物质的吸附量均保持了原始吸附量的 95% 以上。对于葡萄糖、果糖而言, 由于只具有一个顺式二羟基结构, 其与材料之间的亲和力显著弱于含多个顺式二羟基结构的人参皂苷。对于原人参三醇、原人参二醇而言, 其不具有顺式邻二羟基结构, 因而与材料之间无亲和力。此现象为使用 PEI-BA-MNPs 对实际样品中的人参皂苷进行选择性富集提供了可能。

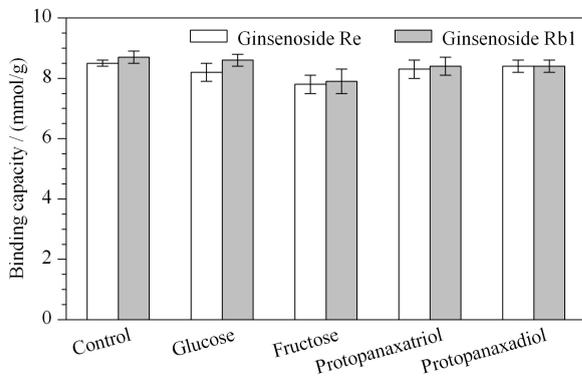


图 5 竞争物质对已结合人参皂苷 Re 和 Rb1 的 PEI-BA-MNPs 结合容量的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of competitive substances on the binding capacity of PEI-BA-MNPs towards ginsenosides Re and Rb1 ($n=3$)

2.5 重复使用性

如图 6 所示, 以人参皂苷 Re 为例, PEI-BA-MNPs 重复使用 10 次后, 吸附容量虽然有所下降, 但重复 5 次后仍保持在初始吸附容量的 72.8%。造成此现象的原因可能是: 在材料制备过程中, 硼酸的

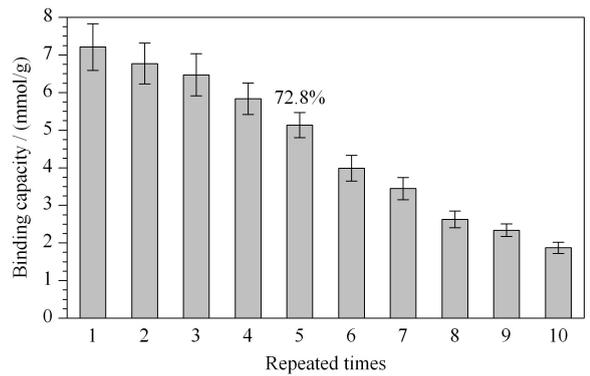


图 6 PEI-BA-MNPs 重复使用次数与其结合容量的关系 ($n=3$)

Fig. 6 Relationship between the repeated times and binding capacities of PEI-BA-MNPs ($n=3$)

修饰是依靠席夫碱反应进行的, 随后 $C=N$ 被还原为 $C-N$ 以增加稳定性。所得材料可能是存在未被还原的 $C=N$, 造成重复使用过程中硼酸被洗脱下来。此结果表明, PEI-BA-MNPs 能在一定的使用次数内维持良好的稳定性和重复使用性, 后续需要继续优化材料制备过程以进一步提高材料的稳定性。

2.6 方法验证

在上述优化条件下以人参皂苷 Re 和 Rb1 为代表, 对该方法进行了评价。在 $50 \sim 800 \mu\text{g/L}$ 范围内人参皂苷 Re 的峰面积 y 与质量浓度 x ($\mu\text{g/L}$) 的线性回归方程为 $y = 419x + 7444$, 相关系数 (R^2) 为 0.9681, 线性良好; 人参皂苷 Rb1 的峰面积 y 与质量浓度 x ($\mu\text{g/L}$) 的线性回归方程为 $y = 418x + 8011$, 相关系数 (R^2) 为 0.9799, 线性良好。以 S/N 为 3 和 10 分别确定检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 结果为 $20 \mu\text{g/L}$ 和 $50 \mu\text{g/L}$ 。

实验采用在阴性样品中添加 3 种不同浓度的人参皂苷 Re 标准溶液, 每个水平平行测定 6 次, 测得方法的回收率和相对标准偏差 (RSD), 用以评价方法的准确性。所得结果见表 1。结果显示, 3 种水平下的加标回收率为 91.5%~117.3%, RSD 为 7.2%~13.4%。

此外, 还以不同浓度的人参皂苷 Re ($10 \mu\text{g/L}$ 、 $50 \mu\text{g/L}$ 、 $500 \mu\text{g/L}$ 、 1mg/L 、 10mg/L 、 50mg/L) 为

表 1 样品中人参皂苷 Re 的加标回收率及精密度 ($n=6$)
Table 1 Recoveries and precisions of ginsenoside Re spiked in samples ($n=6$)

Spiked level/ (mg/L)	Ginsenoside Re	
	Recovery/%	RSD/%
0.1	117.3	13.4
1	91.5	7.2
10	93.7	10.9

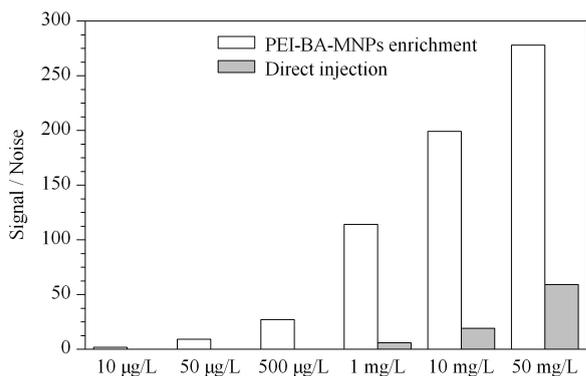


图7 不同浓度人参皂苷 Re 采用不同预处理方法在仪器中的信噪比比

Fig. 7 Comparison of the *S/N* of ginsenoside Re with different concentration using different pre-treatment methods in the instrument

代表,对 PEI-BA-MNPs 磁性固相萃取和直接进标准样两种方式的信噪比进行了考察,如图7所示,在直接进样中,在 1 mg/L 时信噪比为 7,接近检出限。而经过 PEI-BA-MNPs 磁性固相萃取后,使用同样的仪器可以检测到质量浓度为 20 µg/L 的样品。与直接进样的分析方法相比,本方法的灵敏度提高了约 50 倍,说明 PEI-BA-MNPs 对人参皂苷 Re 有良好的富集作用。

2.7 实际样品中的应用

启脾口服液中含有人参皂苷成分,本工作选用启脾口服液验证上述方法在实际样品中的应用。启脾口服液分别按照 1.3 节中所述方法和 ChP2015 中的标准方法进行处理。如图8所示,富集后样品的色谱图中干扰成分的色谱峰显著减少,可有效地提高样品检测的准确度。同时,本方法中的样品前处理方法相较于 ChP2015 中有着极大的简化^[28]。

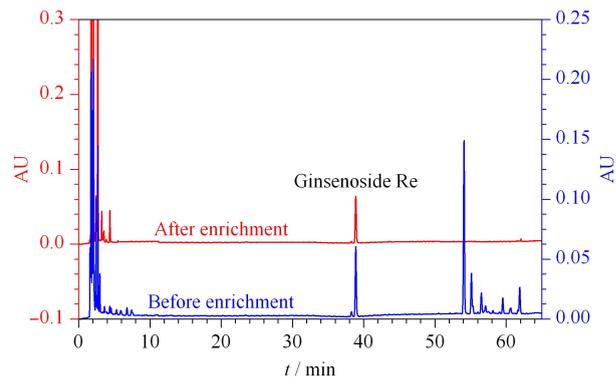


图8 启脾口服液经由 PEI-BA-MNPs 富集前后的高效液相色谱图

Fig. 8 Comparison of high performance liquid chromatogram of Qipi oral liquid before and after the selective enrichment of PEI-BA-MNPs

最后,使用 ChP2015 标准方法进行对比,采用本方法测定的启脾口服液中人参皂苷 Re 含量为 0.27%,而 ChP2015 标准方法检测出 Re 的含量为 0.31%。结果显示,采用本文中提出的样品前处理技术富集人参皂苷能得到令人满意的效果。

3 结论

本研究基于硼亲和作用原理,合成了一种新型磁性纳米颗粒 PEI-BA-MNPs,其有均匀的尺寸大小、良好的磁性能且制备方法简单、分散性良好。将其作为磁性固相萃取吸附剂,结合高效液相色谱分析,建立了一种有效测定实际样品中人参皂苷的方法,可以有效简化药典中复杂的样品预处理步骤。本方法在针对皂苷类的药物分析方面具有较高的应用价值和广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Yuan B, Che J S, Jin Y, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(7): 1267
袁斌,车金水,金燕,等. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1267
- [2] Guo C, Gao Y G, Zang P, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(14): 2009
郭冲,郜玉钢,臧埔,等. 中草药, 2014, 45(14): 2009
- [3] Chen R B, Yuan S J, Liu D, et al. Chemistry of Life, 2017, 37(4): 561
陈若冰,袁慎俊,刘丹,等. 生命的化学, 2017, 37(4): 561
- [4] Zhang W Y, Liu F G, Zheng Y N. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(17): 3758
张伟云,刘发贵,郑毅男. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3758
- [5] Wang L, Ni M, Jiang B. Chinese Journal of Surgical Oncology, 2019, 11(5): 370
王领,倪敏,江滨. 中国肿瘤外科杂志, 2019, 11(5): 370
- [6] Yuan J L, Chen Q K. Journal of Nanchang University (Medical Sciences), 2019, 59(5): 96
袁佳蕾,陈钦开. 南昌大学学报(医学版), 2019, 59(5): 96
- [7] Huang Y T, Xu Y S, Fan G W. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2017, 33(22): 2311
黄钰婷,徐赟晟,樊官伟. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(22): 2311
- [8] Yang X, Chu S F. Acta Neuropharmacologica, 2018, 8(6): 56
杨雄,楚世峰. 神经药理学报, 2018, 8(6): 56
- [9] Wang G L, Li X J, Zhang L N, et al. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 51(3): 92
王国丽,李晓娇,张力娜,等. 上海中医药杂志, 2017, 51(3): 92
- [10] Huang R R, Qian Y, Xiang M. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(23): 2936
黄容容,钱颖,向明. 中国免疫学杂志, 2019, 35(23): 2936
- [11] Wang X F, Ren H X, Feng Y L. Medical & Pharmaceutical

- Journal of Chinese People's Liberation Army, 2019, 31(12): 114
王学芳, 任红贤, 封颖璐. 解放军医药杂志, 2019, 31(12): 114
- [12] Saw C L L, Yang A Y Q, Cheng D C, et al. Chem Res Toxicol, 2012, 25(8): 1574
- [13] Zhu S, Han Y Y, Jiang T, et al. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2020, 40(9): 1246
朱爽, 韩燕燕, 姜涛, 等. 吉林中医药, 2020, 40(9): 1246
- [14] Lu C W, Zhao Y Y, Liu Y J W, et al. Agriculture and Technology, 2014, 34(10): 4
卢丞文, 赵媛颖, 刘英加雯, 等. 农业与技术, 2014, 34(10): 4
- [15] Fang W. Journal of Practical Traditional Chinese Medicine, 2019, 35(5): 630
方伟. 实用中医药杂志, 2019, 35(5): 630
- [16] Bao J M, Yan Z Y, Li Y X. Chemistry, 2018, 81(5): 394
包建民, 闫志英, 李优鑫. 化学通报, 2018, 81(5): 394
- [17] Zhang L Y, Wang L H, Wang L L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(3): 279
张丽媛, 王立恒, 王丽莉, 等. 色谱, 2019, 37(3): 279
- [18] Feng J, She X J, He X Y, et al. Food Chem, 2018, 239: 612
- [19] Wang H Y, Bie Z J, Lü C C, et al. Chem Sci, 2013, 4(11): 4298
- [20] Li D J, Xia H J, Wang L. Talanta, 2018, 184: 235
- [21] Li D J, Li Y, Li X L, et al. J Chromatogr A, 2015, 1384: 88
- [22] Li D J, Chen Y, Liu Z. Chem Soc Rev, 2015, 44(22): 8097
- [23] Xiong F F, Jiang D D, Jia Q. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(1): 60
熊芳芳, 江丹丹, 贾琼. 色谱, 2020, 38(1): 60
- [24] Xiang X C, Jiao F L, Zhang Y J, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(11): 1135
相小超, 焦丰龙, 张养军, 等. 色谱, 2019, 37(11): 1135
- [25] Li F, Wu H C, Li Y J, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(1): 2
李菲, 吴昊宸, 李一峻, 等. 色谱, 2020, 38(1): 2
- [26] Chen Y, Zhao W M, Qing C, et al. Anal Methods, 2019, 11(44): 5673
- [27] Lü C C, Li H Y, Wang H Y, et al. Anal Chem, 2013, 85(4): 2361
- [28] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 7
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 7