

# 西部特色高寒植物反顾马先蒿中苯丙素苷的毛细管电泳含量测定

岳美娥, 师彦平\*

(中国科学院兰州化学物理研究所甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 73000)

**摘要:** 建立了分离和测定反顾马先蒿中七种苯丙素苷类化合物的毛细管区带电泳法。缓冲溶液为含 20% (v/v) 甲醇和 5 mg/ml  $\beta$ -CD 的 30 mL 的硼砂-NaOH 溶液, pH 为 10.50。标准曲线表明各化合物的峰面积与其浓度具有很好的线性关系, 相关系数为 0.9966-0.9992。七种苯丙素苷的迁移时间及峰面积的日内相对标准偏差 ( $n=6$ ) < 1.91%, 4.73%, 日间相对标准偏差 ( $n=5$ ) < 2.03%, 4.95%。回收率在 96.5% 与 107.6% 之间, 回收率的相对标准偏差 ( $n=5$ ) 小于 3.56%。实验中研究了 pH、甲醇浓度、 $\beta$ -CD 浓度及缓冲溶液浓度对七种分析物的迁移行为的影响。在优化的条件下, 反顾马先蒿中七种苯丙素苷的含量在 10 分钟内被成功的检测。

**关键词:** 毛细管电泳; 马先蒿; 苯丙素苷

马先蒿属 (*Pedicularis* L.) 是玄参科 (*Scrophulariaceae*) 中最大的属, 约有 600 种, 主产北半球, 多数分布于寒冷及高原地带<sup>[1]</sup>。该属植物具有“清热解毒、祛湿利水、滋补”等功能, 主治肝病、胆病、关节炎等<sup>[2]</sup>。研究表明, 马先蒿属植物的药理作用主要来自于他们所含的苯丙素苷类化合物。研究表明, 提取于马先蒿属植物的苯丙素苷具有抗病毒、抗炎<sup>[3,4]</sup>, 清除氧自由基<sup>[5,6]</sup>、抑制肿瘤细胞的生长<sup>[7]</sup>等多种生理活性。也就是说, 苯丙素苷类化合物有可能成为抗癌、抗衰老和抗辐射药物, 这在国内外引起极大的关注。因此建立马先蒿属药用植物中苯丙素苷类化合物分离和含量测定方法具有非常重要的意义。

尽管 Cui 等<sup>[8]</sup>报道了紫花野芝麻中苯丙素苷类化合物的毛细管电泳测定方法; 我们对几种马先蒿属植物中的四种苯丙素苷类化合物进行了毛细管电泳分离测定<sup>[9]</sup>。但是到目前为止, 反顾马先蒿中的苯丙素苷类化合物含量的测定方法尚未见报道。我们首次利用毛细管电泳对反顾马先蒿中的 7 个苯丙素苷类化合物 [(7s, 8s) dehydronicoferyl alcohol-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (DE), dihydrodehydrodi-coniferyl alcohol-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (DI), 1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-2-{2-methoxy-4-[1-(E)-propen-3-ol]-phenoxy}-propane-1,3-diol (HM), alaschanioside A (AL), Vervascoside (VE), 2''', 3'''-O-acetylmartynoside (AC), leucosceptoside A (LE)] 进行了定量分析。

\*通讯联系人 e-mail: [shiyp@lzu.edu.cn](mailto:shiyp@lzu.edu.cn) and [shiyp@lzb.ac.cn](mailto:shiyp@lzb.ac.cn)

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

BioFeus 3000 型电泳仪(Bio-Rad 公司, 美国); 未涂覆石英毛细管柱 35cm×50μm I.D., 有效长度 30cm (河北永年光导纤维厂)。反顾马先蒿采自陕西省太白山; DE、DI、HM、AL、VE、AC 和 LE (结构式见图 1) 自反顾马先蒿中分离得到。所有标准品的结构通过 <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 和 MS 等手段, 并结合已有的文献报道来确定。

### 1.2 缓冲溶液和样品溶液配制

缓冲液: 配制 0.1mol 的硼砂储备液, 取适量硼砂储备液, 加入一定体积的甲醇, 再加入一定量的β-CD, 然后用 0.1 mol 的 NaOH 或 0.1 mol HCl 调节, 以配制 pH 分别为 9.00、9.50、10.00、10.50 及 11.00 的缓冲液。

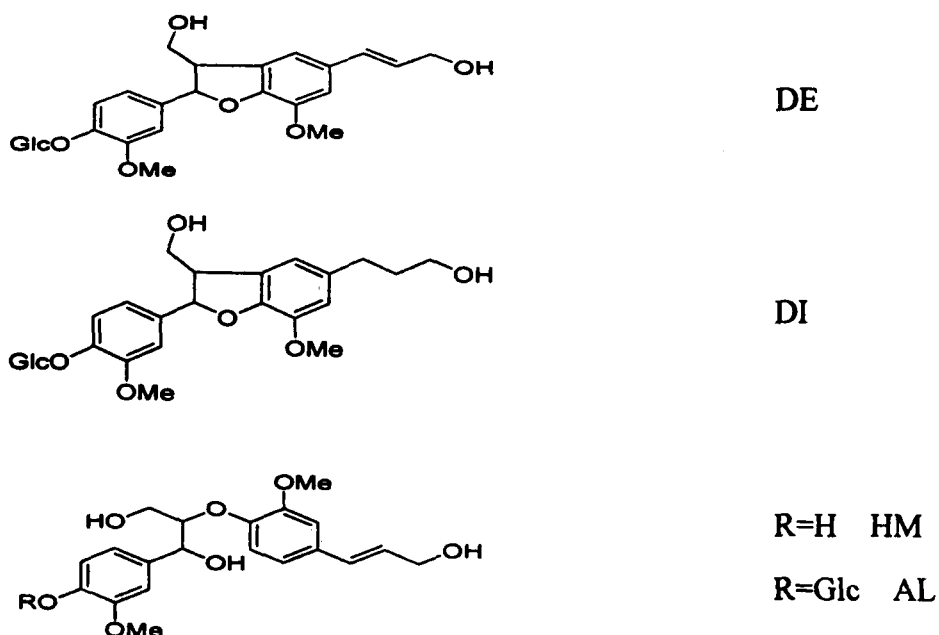
标准样品溶液: 分别称取 DE、DI、HM、AL、VE、AC 和 LE 2.0 mg; 溶于 1 mL 甲醇中, 再分别各取少许稀释成不同浓度的标准溶液, 4℃避光保存待用。

### 1.3 实际样品的制备

称取干燥反顾马先蒿全草 2 g 粉碎, 室温下用 95%乙醇浸泡四次, 每次七天, 减压浓缩合并。将所得提取物加水溶解, 用正丁醇萃取三次。合并正丁醇萃取液, 减压浓缩后溶于甲醇中并定容到 10 mL 容量瓶中。此溶液经滤纸和 0.45 μm 滤膜过滤后, 通过适当的稀释后直接进样分析。

### 1.4 实验方法

分离柱在每天运行前用 0.1 M NaOH 冲洗 10 min, 用水冲洗 4 min 然后用运行缓冲溶液冲洗 4 min。每两次运行之间用运行缓冲溶液洗柱 2 min。工作电压: 15kV; 紫外检测 214 nm; 进样方式: 压力进样 8 psi\*s(1psi = 6897.76Pa); 操作温度: 25℃。甲醇为电渗流标记物。



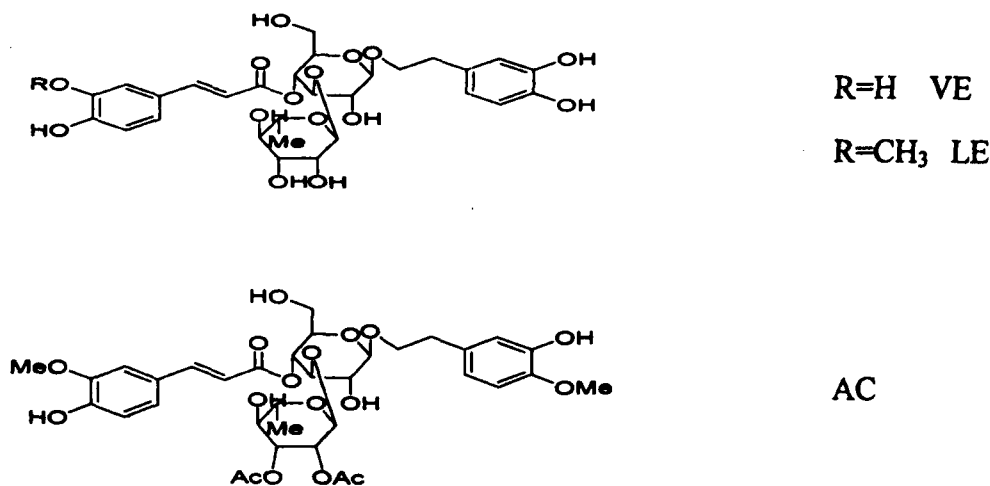


图1 分析物结构式

## 2 结果与讨论

为了获得最佳的分离效果，我们系统考察了几个电泳参数对分离的影响。

### 2.1 缓冲液pH对分离的影响

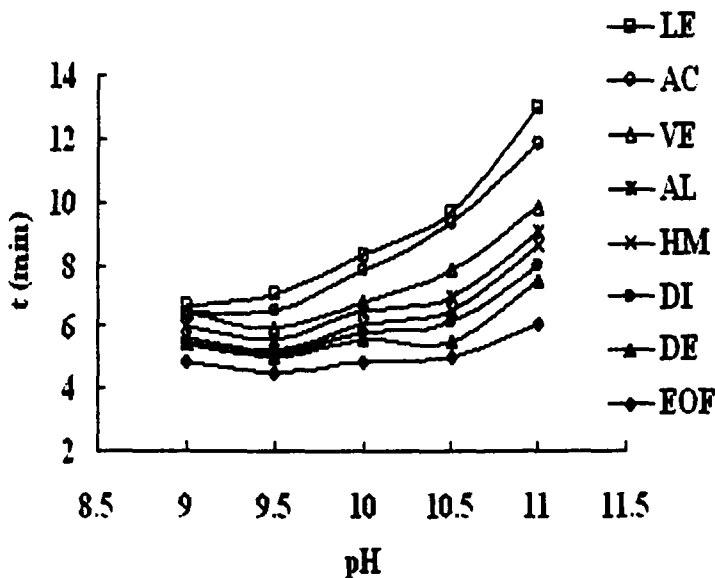


图2 缓冲液 pH 对分离的影响.

分析条件: 硼砂 30mmol; 甲醇: 20% (v/v);  $\beta$ -CD: 5mg/mL;  
分离电压: 15 kV; 温度: 25 °C; 紫外检测波长: 214 nm.

考察了缓冲液组成为含20% (v/v)甲醇和5 mg/mL  $\beta$ -CD的30mmol硼砂溶液时, pH变化(从9.00到11.00)对分析物迁移行为的影响。实验结果如图2所示, 实验表明缓冲液的酸碱度对分析物分离度的影响较大。所有分析物的迁移时间随着pH的增大而增加。当pH为10.50时, 所有的分析物都可以在10 min内达到基线分离, 因此选择pH 10.50作为缓冲液的最佳酸碱度。

## 2.2 有机溶剂和 $\beta$ -CD对分离的影响

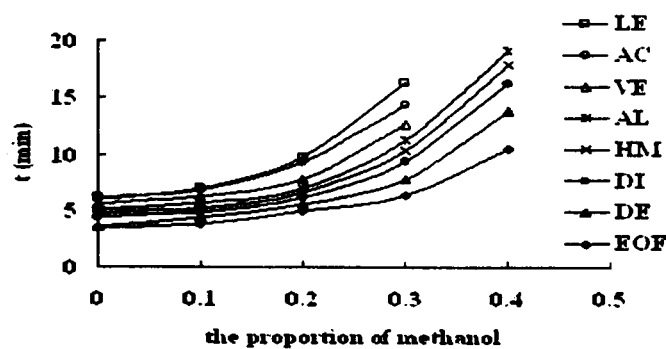


图3 甲醇浓度对分离的影响.

分析条件: pH 10.50; 其他条件同图2.

为了提高分离度, 我们选择甲醇作为改性剂, 并考察了其浓度变化对分离的影响. 从图3中可以看出, 甲醇浓度增加, 分析物分离度提高, 但是分析时间也随之延长. 当甲醇浓度为20% (v/v)时, 七个分析物在较短时间内可以达到完全分离, 因此选择甲醇浓度为20% (v/v).

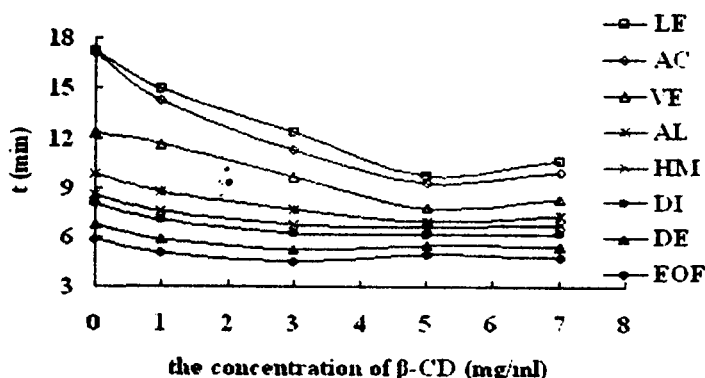


图4  $\beta$ -CD浓度对分离的影响.

分析条件: pH 10.50; 其他条件同图2.

实验过程中发现, 即使在缓冲溶液中加入甲醇, LE与AC也不能完全分离. 因此我们选择三种 $\beta$ -CDs ( $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD及HP- $\beta$ -CD) 作为“主-客”体包合作用中的主体加入到背景电解质中. 结果显示,  $\beta$ -CD对化合物LE与AC的分离度提高最大, 因此选择 $\beta$ -CD作为添加剂并进一步考察了其浓度对化合物分离的影响. 结果如图4所示,  $\beta$ -CD可以提高LE与AC的分离度且能缩短分析物的迁移时间. 因为 $\beta$ -CD在水中的溶解度不高, 其浓度过高使系统的稳定性变差. 因此选择5mg/mL作为 $\beta$ -CD的最佳浓度.

## 2.3 缓冲液浓度对分离的影响

以含20%(v/v)甲醇和5mg/mL  $\beta$ -CD的硼砂溶液为缓冲液, 考察了硼砂浓度在10~40 mmol 范围内变化时对七种苯丙素苷类化合物迁移行为的影响. 由图5可见, 七个分析物的迁移时间和分离度都随着硼砂浓度的增加而增大. 综合考虑分析时间和分离度, 选择硼砂的最佳浓度为30 mmol.

依据上述实验结果, 该体系的最佳条件为: 30 mM硼砂; 5mg/mL  $\beta$ -CD; 20%(v/v)甲醇; pH 10.50.

在上述最佳条件下，七种苯丙素苷类化合物的毛细管电泳分离谱图如图6A所示。

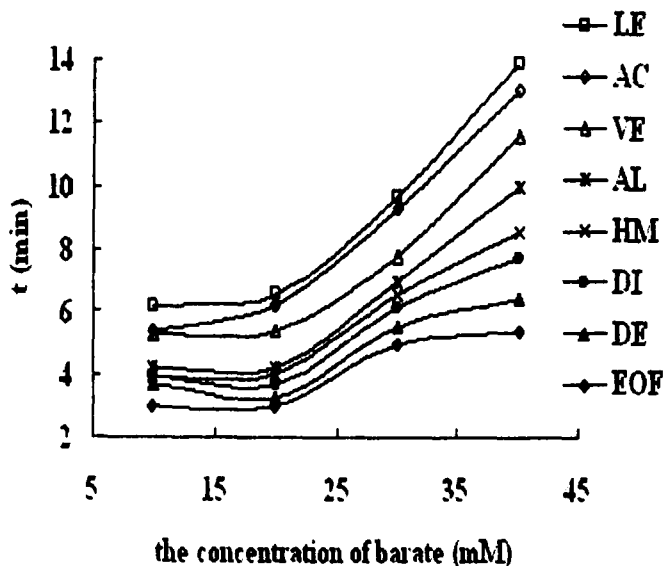


图5 缓冲液浓度对分离的影响。

分析条件: pH 10.50; 其他条件同图2。

### 2.4 线性、重复性和检测限

分别把已配好的七个标准样品储备液稀释成不同浓度的标准溶液，在最佳分析条件下进行CE测定，以各标准样品峰面积(y)为纵坐标，浓度(x)为横坐标，得到标准曲线和线性范围，如表1所示。

按信噪比(S/N)为3计算，得到各分析物的最低检测限(见表1)。

表1 回归方程、线性范围和检测限

分析物	回归方程 <sup>a</sup> $y=ax+b$	相关系数	线性范围( $\mu\text{g/mL}$ )	检测限( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>
DE	$y=9504x+34934$	0.9972	3~300	0.8
DI	$y=18543x+11907$	0.9985	2~150	0.5
HM	$y=5528x+23297$	0.9987	2~200	0.5
AL	$y=6407x-23974$	0.9966	4~200	2.0
VE	$y=1575x+11413$	0.9989	5~250	1.3
AC	$y=1243x+11372$	0.9978	3~250	1.0
LE	$y=4865x+73339$	0.9992	2~500	0.5

<sup>a</sup>: y 是分析物的峰面积, x 是分析物浓度。

<sup>b</sup>: 检测限为信噪比为3时的浓度。

### 2.5 系统稳定性测试

表2 迁移时间和峰面积的相对标准偏差

分析物	日内相对标准偏差%(n=6)		日间相对标准偏差%(n=5)	
	峰面积	迁移时间	峰面积	迁移时间
DE	2.31	0.32	2.54	0.65
DI	4.52	0.54	4.95	0.93
HM	4.03	0.55	4.51	0.86
AL	4.73	1.08	4.86	1.27
VE	1.83	1.26	2.36	1.43
AC	4.27	1.56	4.23	2.03
LE	3.28	1.91	3.33	1.99

通过考察各样品峰面积和迁移时间的重复性来表征方法的稳定性。各样品(DE、DI、HM、AL 浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ ; VE、AC、LE 浓度为150  $\mu\text{g/mL}$ )在同一天内连续进样6次,测定日内相对标准偏差,在连续的5天内每天进样一次,测定日间相对标准偏差。日内和日间相对标准偏差如表2所示。

从表中可以看出,各分析物的峰面积和迁移时间日内相对标准偏差小于4.73%和1.91%,日间相对标准偏差小于4.95%和2.03%,表明该方法具有良好的重复性和稳定性。

## 2.6 反顾马先蒿甲醇萃取液中苯丙素苷类化合物含量和回收率的测定

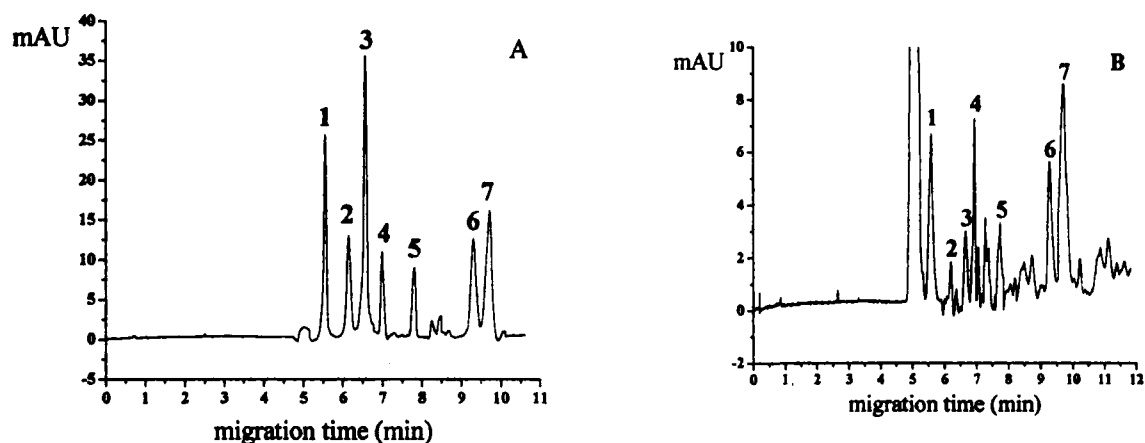


图6 七种苯丙素苷化合物混合物(A)和反顾马先蒿甲醇萃取液(B)的毛细管电泳谱图。

1: DE; 2: DI; 3: HM; 4: AL; 5: VE; 6: AC; 7: LE. 分析条件: pH 10.50; 其他条件同图2。

表3 实际样品中各组分的含量及回收率

分析物	含量		回收率	
	含量(mg/g)	RSD%(n=5)	回收率%	RSD%
DE	0.49	1.64	98.3	2.31
DI	0.074	2.69	103.4	2.65
HM	0.10	2.16	102.4	3.12
AL	0.98	2.35	96.5	3.56
VE	1.11	1.96	105.8	3.21
AC	2.69	1.83	107.6	2.85
LE	2.12	1.72	102.6	2.98

反顾马先蒿按2.3步骤进行样品前处理,经0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后进行毛细管电泳分析,电泳分离图见图6B。通过对比迁移时间和用标准样品标记两种方法确定各化合物出峰位置。样品中各分析物的含量及含量的RSD(n=5)见表3。含量测定结果的准确性通过检测回收率来评估。在反顾马先蒿甲醇萃取液中分别加入50  $\mu\text{g/mL}$  DE、DI、HM、AL及100  $\mu\text{g/mL}$  VE、AC、LE,在最佳分离条件下进行毛细管电泳分析,测定各分析物的加样回收率和回收率的RSD(n=5)。测定结果见表3。

## 3 结论

本文用毛细管区带电泳方法分离和测定了反顾马先蒿中七种苯丙素苷类化合物的含量,结果表明,该方法简单、快速、灵敏度高、重现性好,适用于对马先蒿属等植物的质量控制,具有较好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] 冯虎元, 安黎哲, 王勋陵. 甘肃马先蒿属药用植物调查[J]. 中草药, 2001, 32(5): 449-451.
- [2] 江苏新医学院编, 中药大辞典. 上海科学出版社, 1977, P. 267, 286, 487, 2674.
- [3] B. Kong, J.H. Dustmann, Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 1341-1344.
- [4] E. Cano. M. Verge, C. Jimenez, R. Riguera[J], *Planta Med.* 1990, 56: 24.
- [5] 郑荣梁, 刘自民, 贾忠建, 等. 用脉冲辐射法研究苯丙素甙与羟自由基的反应[J]. 中国科学.B 辑, 1995, 25(8): 848-851.
- [6] Li J, Ge RC, Zheng RL, et al. Antioxidative and chelating activities of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis striata*[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1997, 19(1): 77-80.
- [7] 李 忌, 刘自民, 贾忠建, 等. 苯丙素甙类化合物的抗肿瘤活性[J]. 中国药学杂志, 1995, 30(5): 269-271.
- [8] Cui Shuya, Chen Xingguo, Hu Zhide. Identification and determination of ecdysone and phenylpropanoid glucoside and flavonoids in *Lamium maculatum* by capillary zone electrophoresis[J]. *Biomedical Chromatography*, 2003, 17(7): 477-482.
- [9] Ting-Fu Jiang, Qing-Yu Ou, Yan-Ping Shi. Separation and determination of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 986: 163-167.