

胶束电动毛细管色谱法测定红丝线 提取物中紫蓝素的含量

李娟, 谢运昌*, 蒋小华

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 建立了胶束电动毛细管电泳色谱法(MECC)测定红丝线提取物中紫蓝素的含量的方法。毛细管柱内径 75 μm , 长 50.2 cm; 运行电压 25 kV, 检测波长 585 nm, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$; 缓冲液为 25 mmol/L β -CD 10 mmol/L, 硼酸盐-20%乙腈(pH 值 8.0); 进样方式: 压力进样, 进样时间 5 s。结果表明紫蓝素在 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内具有良好的线性关系($r=0.9995$), 回收率为 95.3%~103.2%。该方法快速、简便、并且较为准确, 适用于测定红丝线提取物中紫蓝素的含量。

关键词: 胶束电动毛细管电泳色谱法; 紫蓝素; 红丝线提取物

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)05-0707-03

Determination of zilanine contents in extracts of *Peristrophe baphica* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC)

LI Juan, XIE Yun-Chang*, JIANG Xiao-Hua

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The method of MECC was established to determine zilanine contents in extracts of *P. baphica*. The capillary column was 50.2 cm long and 75 μm in internal diameter; the operation voltage was 25 kV, test wavelength 585 nm, column temperature 25 $^{\circ}\text{C}$; the mobile buffer was 25 mmol/L boric acid-20% acetonitrile (pH 8.0) with 10 mmol/L β -CD; the sampling was conducted by pressure for 5 s. The results showed that the linear range of determination for zilanine was 10~100 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0.9995$). The average recovery rate was 95.3%—103.2%. The method was fast, simple, convenient, comparatively accurate, and could be used to determine zilanine contents in extract of *P. baphica*.

Key words: MECC; Zilanine; extract of *Peristrophe baphica*

红丝线(*Peristrophe baphica*), 又名红兰草、紫蓝, 山蓝, 观音草等, 为爵床科观音草属植物(中国科学院中国植物志编辑委员会, 2002)。据文献记载, 红丝线药用具有化痰、活血、止血、解毒、化痰、消肿等功效, 用于治疗咳血、肺热咳嗽、尿路感染、跌打肿痛等症(国家中医药管理局中华草本编委会, 1999)。

紫蓝素为原创自主知识产权化合物, 是新的氨基酸化合物, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 分子量 457, 含氨基酸、酚、酰胺、醌类基团, 具有很强的抗氧化、抑制蛋白酪氨酸酯酶、抗糖尿病、抗乙型肝炎病毒等作用(谢运昌等, 2003, 2005)。高效毛细管电泳以高压直流电场为驱动力, 以毛细管作分离通道, 依据样

收稿日期: 2009-08-27 修回日期: 2010-01-05

基金项目: 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目(2005BA901A10); 广西科技计划项目(0511200123A3); 广西植物研究所基本业务费(桂植业09023)[Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China(2005BA901A10); the Project of Science and Technology of Guangxi(0511200123A3); the Project of Guangxi Institute of Botany(09023)]

作者简介: 李娟(1982-), 女, 湖南湘乡人, 助理研究员, 从事天然药物研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yue018 @163.com)

品之间电离度和分配行为上的差异而实现分离,具有高效、快速、样品用量少等优点,与传统的高效液相色谱分析法相比,它进样体积小(陈义,2000)、用时短,而且不会污染柱,在中药有效成分分析中已得到了广泛应用。本文探索应用 MECC 法测定红丝线提取物中紫蓝素的含量,该方法简便、快速、准确、重复性好,为制定红丝线提取物的质量标准提供了可靠的依据。

1 仪器与材料

高效毛细管电泳仪 Beckman Coulter P/ACETM MDQ Capillary Electrophoresis System, 配有二极管阵列检测器。熔融石英毛细管(内径 75 μm , 总长度 50.2 cm, 有效长度 40 cm, 河北永年光学纤维厂生产); 数据处理软件系统: 32karat 5.0。试剂: 乙腈为色谱纯(美国), 水为超纯水(自制), 其它试剂均为分析纯。红丝线(*P. baphica*)栽培于广西植物研究所, 经韦发南研究员鉴定。红丝线提取物用新鲜的红丝线样品, 采用热水提取、反复上大孔树脂柱、加酸沉淀、溶剂洗涤、干燥的方法制备(谢运昌等, 2005)。紫蓝素对照品为本实验室从红丝线中分离得到并经光谱数据分析和理化性质测定鉴定结构(纯度>99%)。

2 方法与结果

2.1 MECC 分析条件

分析条件: 毛细管柱为无涂层熔融石英毛细管, 75 μm (ID) $\times$ 50.2 cm。背景缓冲液: 25 mmol/L, β -CD 10 mmol/L, 硼酸盐-20%乙腈(pH 值 8.0)。进样方式: 压力进样, 进样时间 5 s。运行电压 25 kV, 检测波长 585 nm, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

毛细管冲洗方法: 新毛细管在使用前用 1 mmol/L NaOH 冲洗 15 min, 然后依次用实验用水和背景缓冲液冲洗 10 min。每日开始工作前用 0.1 mmol/L NaOH 冲洗毛细管柱 5 min, 然后分别用水和背景缓冲液冲洗 10 min。每次分析间隔, 用背景缓冲液冲洗 5 min。在该色谱条件下, 紫蓝素对照品和紫蓝素样品的色谱图见图 1。

2.2 供试品的制备

精密称取经真空干燥的红丝线提取物细粉 40.3 mg, 以 0.01 mol/L 碳酸氢铵水溶液超声溶

解, 过滤, 滤液置于 500 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度再精密量取 10.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 取样过微孔滤膜。

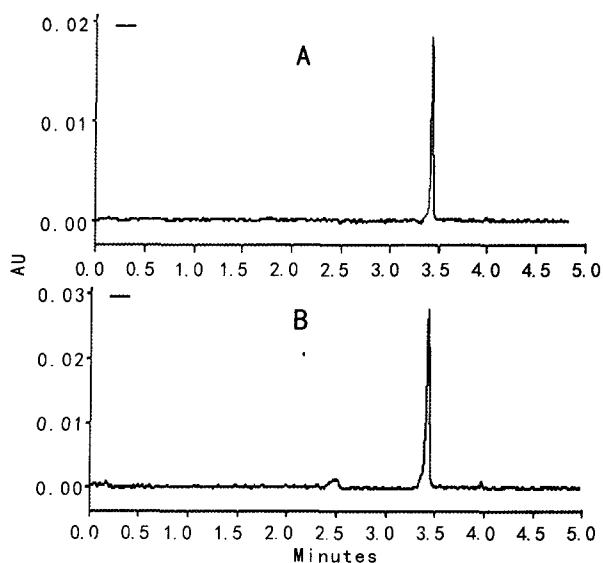


图 1 红丝线提取物中紫蓝素的 MECC 分析
Fig. 1 MECC analysis of zilanine in extract of *P. baphica*
A. 紫蓝素 Zilanine; B. 红丝线提取物 Extract of *P. baphica*

2.3 线性关系考察

精密称取经真空干燥的紫蓝素对照品 40.3 mg, 置于 500 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol/L 碳酸氢铵水溶液超声溶解并用水稀释至刻度。此溶液质量浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 溶液。以此溶液作为母液, 配制浓度为 100, 80, 60, 40, 20, 10 $\mu\text{mol/L}$ 对照品溶液。微孔滤膜过滤, 取滤液按上述色谱条件进行测定。以峰面积 Y 对进样质量浓度 X ($\mu\text{mol/L}$) 绘制标准曲线。计算得回归方程为: $Y = 808.4X + 289.05$, 相关系数: $r = 0.9995$, 结果表明: 紫蓝素在 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系。

2.4 精密度试验

取 40 $\mu\text{mol/L}$ 的对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积积分值, 代入回归方程, 计算紫蓝素含量, 考察仪器精密度。结果表明仪器精密度良好, 其 RSD 为: 2.9% ($n=6$)。

2.5 重现性试验

取紫蓝素样品, 按“2.2”项方法制备后, 在上述色谱条件下进行分析, 6 次平行实验, 峰面积分别为: 48796, 51136, 48613, 48310, 50207, 52042, 其 RSD 值为 3.0%, 表明样品处理过程和测定方法均有良好的重现性。

2.6 加样回收实验

在已知紫蓝素含量的红丝线提取物溶液中定量加入标准品溶液,按前述供试品处理方法制备样品溶液,测定 3 份,测定结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n=3)
Table 1 Recovery of the MECC determination

样品含量 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	加入量 Added ($\mu\text{mol/L}$)	测得量 Found ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
30.00	33.1	64.05	102.9	—	—
31.47	33.1	65.58	103.1	—	—
29.90	27.8	57.06	97.7	97.4	3.0
29.72	27.8	56.22	95.3	—	—
30.89	33.1	65.06	103.2	—	—
32.40	33.1	64.05	95.6	—	—

2.7 稳定性试验

精密吸取紫蓝素对照品溶液,每隔 2 h 进样测定,结果表明对照品溶液在 12 h 内稳定。RSD 为 3.5%。

2.8 最低检测限

在选定色谱条件下,取上述对照品贮备液,逐步稀释,进样,直至信噪比 $S/N \geq 3$ 时,此时进样量即为最低检测限。紫蓝素最低检测限为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 。

3 结果

取 3 批红丝线提取物供试品按上述色谱条件进行分析,记录色谱图(图 1),计算紫蓝素的含量(表 2)。

表 2 红丝线提取物中紫蓝素的含量测定结果
Table 2 Content of zilanine in extract of
Peristrophe baphica (n=3)

批号 No.	紫蓝素含量 Content of zilanine (%)	RSD (%)
081101	87.2	0.51
081115	91.7	1.52
091201	94.3	1.79
091215	90.2	0.87
090101	88.5	1.00
090115	93.5	0.92

4 讨论

我们也曾采用 HPLC 法测定红丝线提取物中紫蓝素的含量(蒋小华等,2007),但高效毛细管电泳具有分离效率高,样品预处理简单,分析时间短及适用范围广等优点,受到广大分析工作者的青睐,在生

命科学、药物研究等领域中的应用日趋广泛(Elgstone 等,2001)。与 HPLC 相比,毛细管电泳具有成本低,只需少量(几毫升)流动相和价格低廉的石英毛细管;对环境污染小;样品少,只需 nL 级的进样量;另外,结合毛细管电泳在样品浓缩方面独特的优势,采用适当的样品浓缩方法,可以大大的提高检测的灵敏度,为紫蓝素在体内的药代动力学研究等提供了良好的分析方法。

实验中先后采用毛细管区带电泳法和胶束电动毛细管电泳色谱法测定紫蓝素含量,结果表明胶束电动毛细管电泳色谱法灵敏度更高,重现线更好。同时我们对表面活性剂 SDS,Brij, β -CD 等进行了平行对比实验,以 β -CD 的峰形更好,因此我们选择 β -CD 为添加剂的胶束电动毛细管电泳色谱法。

本试验用二极管阵列检测器对紫蓝素色谱峰在 200~600 nm 范围内进行光谱扫描,在波长 585 nm 处不但响应值高,而且检测专一性高,信噪比最高,故选择 585 nm 作为检测波长。同时,我们采用了硼砂缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液作为电解缓冲液,结果表明硼砂的检测效果更好。在确定使用硼砂盐缓冲液后,对其浓度、pH 值、运行电压、温度以及有机改性剂的含量等参数进行了考察,从而确定最终的电泳条件,待测组分出峰时间早,峰形最佳,灵敏度最高,未见其他杂峰。

参考文献:

中国科学院中国植物志编辑委员会. 2002. 中国植物志(第 70 卷)[M]. 北京:科学出版社:241
中国中医药管理局中华本草编委会. 1999. 中华本草(第 7 卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社:466—467
陈义. 2000. 毛细管电泳技术与应用(第 1 版)[M]. 北京:化学工业出版社:5—6
谢运昌,蒋小华,文永新,等. 2005. 紫蓝素化合物、其制备方法及其用途[P]. 中国专利 CN03117188.5,北京:知识产权出版社
Elgstone KB,Zhao JY,Anacleto JF,et al. 2001. Potentia of capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as diagnostic tools[J]. *J Chromatogr B*,**914**:265
Jiang XH(蒋小华),Xie YC(谢运昌),Huang YL(黄永林). 2007. Analysis of zilanine in extract of *Peristrophe baphica* by RP-HPLC(RP-HPLC(测定红丝线提取物中紫蓝素的含量)[J]. *Guihaia*(广西植物),**27**(6):958—960
Xie YC(谢运昌),Jiang XH(蒋小华),Wen YX(文永新),et al. 2003. The molecular constitution and chemical change of the precursor of the pigment from *Peristrophe baphica* by LC-NMR technique(山蓝色素前体的分子组成和化学变化)[J]. *Guihaia*(广西植物),**23**(4):367—369