

高效毛细管电泳法测定不同产地多叶棘豆中 3 种黄酮类化合物含量

海平^{1*}, 苏雅乐其其格²

(1. 内蒙古民族大学化学化工学院, 内蒙古 通辽 028043;

2. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028043)

[摘要] 目的: 建立高效毛细管电泳法同时测定不同产地多叶棘豆中 3 种黄酮类化合物含量的方法。方法: 采用高效毛细管电泳法, 弹性石英毛细管柱 75 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$, 电动进样 15 s, 分离电压 18 kV, 毛细管温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 283 nm, 运行缓冲液为 0.25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂 30% 乙腈溶液。结果: 不同产地多叶棘豆中 3 种黄酮类化合物的含量有较大差异, 所用实验条件下, 3 种对照品溶液分别在 1.00 ~ 40.00 ($r = 0.999\ 8$), 2.00 ~ 80.00 ($r = 0.999\ 9$), 0.50 ~ 80.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999\ 6$) 具有良好的线性关系, 平均回收率均 > 96.00%, $\text{RSD} < 2.0\%$ 。结论: 建立的高效毛细管电泳法可作为多叶棘豆质量控制的一种方法。

[关键词] 多叶棘豆; 高效毛细管电泳法; 黄酮类

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0092-04

Determination of Three Flavonoids in *Oxytropismyriophylla* from Different Habitats by HPCE

HAI Ping^{1*}, Suyaleqiqige²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University

[收稿日期] 20111207(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960525)

[通讯作者] * 海平, 硕士, 副教授, 从事有机合成及天然产物化学研究, Tel: 15847562916, E-mail: tisl2006@163.com

表 2 10 批当归药材阿魏酸含量测定

批号	阿魏酸 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD $/\%$	批号	阿魏酸 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD $/\%$
1	0.203 4	1.10	101112	0.158 8	1.68
2	0.331 9	1.08	100929	0.288 2	1.05
3	0.235 8	1.50	100711	0.192 1	1.02
4	0.186 9	1.12	100223	0.208 4	1.06
5	0.099 1	1.75	100233	0.180 4	1.35

3 讨论

大叶当归药材中阿魏酸的 HPLC 法测定含量和 2010 年版《中国药典》同法测定偏低, 建议在民间使用时适当加大使用量。在正品当归药材资源来源和产量不足的情况下, 发现和扩大其生药来源有着积极意义。

[参考文献]

[1] 黄伟晖, 宋纯青. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 147.
[2] 韦玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其药理

作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130.

[3] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酚类和萜类成分作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41(6): 938.
[4] 严辉, 段金殿, 钱大玮, 等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1988.
[5] 刘东辉, 黄水清, 黄月纯, 等. 当归补血汤皂苷类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2006, 29(8): 844.
[6] 王庆敏, 李晓宁, 王兵, 等. 当归补血汤有效部位指纹图谱归属分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2658.
[7] 孙备, 杨士友, 裴月梅, 等. 清上瀉痛颗粒的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 3.
[8] 王婕, 建邦, 宋平顺. 中阿魏酸、藜本内酯含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 70.
[9] 唐力英, 王祝举, 赫炎, 等. 高效液相色谱法测定当归中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 14.
[10] 张慕群, 孟召全, 崔淑莲. 调经止痛颗粒质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 62.

[责任编辑 顾雪竹]

for Nationalities, Tongliao 028043, China;

2. College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPCE method for determination of the content of three flavonoids in *Oxytropismyriophylla* from different areas. **Method:** High-performance capillary electrophoresis with an elastic silica capillary (75 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$) was used. The electro-injection time was 15 s, voltage 18 kV, capillary temperature at 25 $^{\circ}\text{C}$, and the detection wavelength at 283 nm. The electrolyte buffer was composed of 0.25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax with 30% acetonitrile. **Result:** Content of three flavonoids in *Oxytropismyriophylla* from different habitats varied greatly. All calibration curves showed good linear regression ($r \geq 0.9996$) within the tested range. All average recoveries were more than 96.00% and RSD less than 2.0%. **Conclusion:** This experiment has established an HPCE method which can become a quality control access of *Oxytropismyriophylla*.

[Key words] *Oxytropismyriophylla*; HPCE; flavonoids

多叶棘豆为豆科植物狐尾藻棘豆的干燥全草^[1],蒙名为娜布哈格-敖日道查、查干-达克沙、达林-敖日道查。《中华本草·蒙药卷》记载具有杀黏、清热、燥黄水、愈伤、生肌、合脉止血、消肿、软便之功效,主要用于瘟疫、炎症、丹毒、腮腺炎、麻疹、颈强病、抽筋、创伤出血、月经过多、吐血咳痰等症,是蒙医常用药^[2],主要分布于我国东北、华北、蒙古等地。多叶棘豆主要含有黄酮类、甾体皂苷、酚类、氨基酸等化学成分。到目前为止,文献报道多叶棘豆中有8种黄酮类成分^[3-4],另外Lu等也从多叶棘豆中分离出丁香苷 myriophylloside 等分离出酚酸类成分^[5];李翠玲从多叶棘豆中鉴定了5个化合物^[6]。但对多叶棘豆而言,其化学成分和药理活性的研究在国内有极少报道。现代药理研究^[7-9]表明,本实验中被检测的3种黄酮类化合物具有扩张血管、抗氧化、抗炎和调血脂作用。其药理作用与多叶棘豆蒙医临床用药比较吻合,系多叶棘豆的主要活性成分之一。另外,HPCE法具有简便、准确、快速、重复性好等特点,因此,本实验建立了HPCE法同时测定不同产地多叶棘豆中5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮及槲皮素的含量,为多叶棘豆的质量控制和进一步研究提供参考依据。

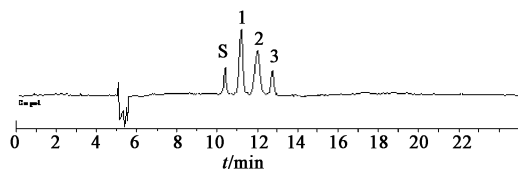
1 材料

CAPEL-105型高效毛细管电泳仪,弹性石英毛细管(郑州英诺高科有限公司),UV-3000型双波长/双光束紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),PB-20型数字式酸度计(北京赛多利斯有限公司),AUW220D型自动电子天平(日本岛津公司)。5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮、槲皮素均为作者从多叶棘豆中分离得到

并用高效毛细管电泳仪测定其含量均为 $>99.5\%$ 。内标物:三硝基苯酚(北京鑫鼎鹏飞科技有限公司,CAS:88-89-1)。实验中所用的多叶棘豆采集于10个不同地区,经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药教研室布和巴特尔教授鉴定均为豆科植物狐尾藻棘豆 *Oxytropismyriophylla* (Pal1.) DC. 的干燥全草。大孔树脂 D101(天津市北联精细化学品开发有限公司),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 弹性石英毛细管柱(75 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$),进样方式为电动进样15 s,分离电压18 kV,毛细管温度25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长283 nm。运行缓冲液:0.25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂30%乙腈溶液。每天开机使用前均用0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液在25 $^{\circ}\text{C}$ 下冲洗10 min,再用0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液在25 $^{\circ}\text{C}$ 下冲洗10 min,然后分别用0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液,0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液,超纯水和缓冲液冲洗5 min。平行测定之间用0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠,超纯水和缓冲液在25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下各冲洗5 min。进入毛细管柱的溶液需预先经0.45 μm 微孔滤膜过滤,以防止毛细管柱被堵塞。在操作条件下,所测3种黄酮类化合物的分离度良好,结果见图2~3。



1. 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮;2. 5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮;3. 槲皮素;S. 内标物(三硝基苯酚)

图2 混合对照品和内标物电泳分离

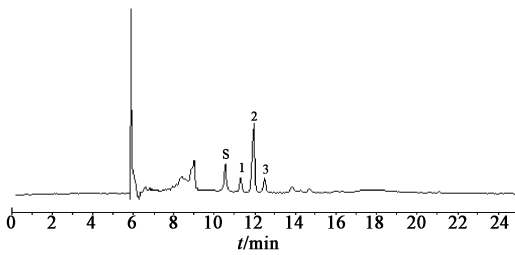


图 3 样品电泳分离

2.2 供试液的制备

2.2.1 样品供试液的制备 分别精密称取样品 1.0 g 和内标物 100 μg , 加甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过。分别吸取滤液 10 mL, 放入已装好 40 g 大孔树脂(D101)的色谱柱, 先用 20% 乙醇溶液 50 mL 洗脱, 然后用无水乙醇 100 mL 洗脱。无水乙醇减压回收至干, 加色谱乙腈溶解并定容至 5 mL, 既得样品供试液 1 ~ 10。

2.2.2 对照品和内标溶液的制备 分别精密称取 3 种黄酮对照品 30 mg 和内标物 30 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加色谱乙腈溶解并配成浓度为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液和内标溶液。

2.3 线性关系考察 精密吸取 3 种黄酮对照品储备液适量, 分别加入相同量内标液, 然后用色谱乙腈配成不同浓度的系列对照品溶液, 在选定操作条件下分析测定, 以对照品的浓度为横坐标, 对照品和内标物的峰面积比为纵坐标绘制标准曲线, 计算其回归方程式。

2.4 最低检测限(LOQ) 取 3 种黄酮对照品液, 分别加入相同量内标液对照品溶液, 以不同比例稀释后测定, 以信噪比 2 ~ 3 为最低检出, 结果见表 2。

2.5 精密度试验 在选定操作条件下, 精密吸取 3 种黄酮储备液 10 μL , 再加入内标液 10 μL , 然后用色谱乙腈定容至 3 mL, 电动进样 15 s, 记录其毛细管电泳谱图, 并根据回归方程计算出其浓度, 连续测 6 次, 结果 RSD 分别为 1.17, 0.74, 1.14%。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试液 0.5 mL, 再加入内标液 10 μL , 然后用色谱乙腈定容至 3 mL, 在上述测定条件下 48 h 内每隔 4, 8, 16, 24, 36, 48 h 测定 1 次, 进行稳定性考察。在 48 h 内测定 6 次, 数据稳定。3 种黄酮对照品的 RSD 分别为 1.08, 0.70, 1.12%。

2.7 重复性试验 取样品 1.0 g, 精密称定, 共 6 份, 分别加内标物 100 μg , 按照供试液制备方法操作, 依次测定, 记录其毛细管电泳谱图, 根据回归方程计算 3 种黄酮类成分的质量分数, 结果 3 种黄酮类成分质量分数的 RSD 分别为 1.65, 1.32, 1.49%。

2.8 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的样品(1), 每份为 0.5 g, 精密称定, 分别加入对照品适量, 依照上述方法提取并测定, 计算回收率。测定结果见表 3。

2.9 样品含量测定 分别吸取不同样品供试液 0.5 mL, 然后用色谱乙腈定容至 3 mL, 在选定的实验条件下进行测定, 计算含量。结果见表 4。

表 2 黄酮对照品溶液的线性关系

对照品	回归方程式	r	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LOQ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮	$Y = 0.1143X + 0.0327$	0.9998	1.00 ~ 40.00	0.03
5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮	$Y = 0.1000X + 0.0595$	0.9999	2.00 ~ 80.00	0.06
槲皮素	$Y = 0.0555X + 0.0268$	0.9996	0.50 ~ 80.00	0.01

注: Y 轴为对照品与内标物的峰面积比值, X 轴为对照品溶液的浓度

3 讨论

选择提取溶剂时, 考察了氯仿、氯仿-甲醇(1:1)和甲醇等溶剂对 3 种黄酮类化合物的提取率。实验结果表明, 甲醇的提取率不仅比其他两种要高, 而且预处理后的电泳图清晰, 分离度较好。预处理中先用 20% 乙醇 50 mL 洗脱, 3 种黄酮类化合物均没有洗脱下来, 然后用无水乙醇 100 mL 洗脱, 3 种黄酮类化合物均完全洗脱下来并且与其他杂质分离。

加大毛细管柱两端电泳电压能缩短分析时间, 但当电压增加到一定程度时黄酮类化合物的分离度下降, 电泳电压加大后, 还会使仪器噪音明显增大。

毛细管柱温度较低时, 溶液黏度增大, 淌度降低, 峰形展宽, 迁移时间延长; 温度较高时, 溶液黏度减小, 淌度增加, 迁移时间缩短, 分离度下降。综合考虑, 采用 18 kV 电泳电压和毛细管电泳的温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 既保持了仪器的低噪音, 又能使黄酮类化合物有良好的分离度。另外也考虑了缓冲体系及其 pH 和有机添加剂, 结果表明硼砂缓冲体系、缓冲溶液 pH 9.7 和缓冲体系加一定量的乙腈对 3 种黄酮类化合物分离度最好。

含量测定结果表明, 不同样品中 5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮的相对含量有一定差异, 在内

表3 多叶棘豆中3种黄酮类化合物加样回收率试验($n=6$)

对照品	样品中含量/mg	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	RSD/%
5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮	0.163 6	0.30	0.461 1	99.17	1.2
	0.165 4	0.30	0.4609	98.50	
	0.165 6	0.15	0.313 8	98.80	
	0.164 9	0.15	0.311 3	97.60	
	0.165 6	0.09	0.252 2	96.22	
5,3'-二羟基-6,7,4'-三甲氧基黄酮	0.164 7	0.09	0.252 0	97.00	0.74
	0.659 4	1.20	1.830 8	97.62	
	0.666 7	1.20	1.858 8	99.34	
	0.667 4	0.60	1.258 9	98.58	
	0.664 6	0.60	1.260 8	99.36	
	0.667 3	0.30	0.961 1	97.93	
	0.663 9	0.30	0.960 8	98.97	
槲皮素	0.344 1	0.60	0.938 9	99.13	1.1
	0.347 9	0.60	0.933 3	97.57	
	0.348 3	0.30	0.6477	99.80	
	0.346 8	0.30	0.644 6	99.53	
	0.348 2	0.15	0.497 9	99.80	
	0.344 5	0.15	0.490 5	97.33	

表4 多叶棘豆中3种黄酮类化合物的含量测定($n=3$)mg·g⁻¹

样品产地	5,7,3'-三羟基-4'-	5,3'-二羟基-6,7,4'	槲皮素
	甲氧基黄酮	-三甲氧基黄酮	
内蒙古赤峰巴林右旗	0.320 ± 0.004	1.390 ± 0.020	0.727 ± 0.010
内蒙古锡盟东乌旗	0.330 ± 0.006	1.330 ± 0.016	0.694 ± 0.009
内蒙古霍林郭勒市	0.303 ± 0.003	1.242 ± 0.012	0.684 ± 0.008
蒙古国	0.350 ± 0.007	0.340 ± 0.005	0.588 ± 0.007
内蒙古通辽市扎鲁特旗	0.310 ± 0.005	1.095 ± 0.018	0.502 ± 0.005
内蒙古兴安盟五岔沟	0.329 ± 0.003	0.357 ± 0.003	0.619 ± 0.012
内蒙古乌兰察布市	ND	0.395 ± 0.008	0.566 ± 0.006
内蒙古呼伦贝尔市	0.227 ± 0.002	0.361 ± 0.004	0.528 ± 0.004
内蒙古大青山	0.237 ± 0.004	1.083 ± 0.014	0.584 ± 0.010
内蒙古兴安盟索伦	ND	0.350 ± 0.006	0.578 ± 0.006

蒙古赤峰巴林右旗采集药材中相对含量最高,而内蒙古兴安盟索伦的最低;槲皮素在不同样品中相对含量变化不大;5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮在内蒙古乌兰察布市和内蒙古兴安盟索伦采集药材中没检测到,说明不同来源样品中3种黄酮类化合物的含量有一定差异。

[参考文献]

- [1] 白清云. 中国医学百科全书[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1986:322.
- [2] 伊希巴拉珠尔. 蒙医甘露四部[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2007:404.
- [3] Lu J H, Liu Y, Zhao Y Y, et al. New flavonoid from *Oxytropis myriophylla* [J]. Chem pharm Bull, 2004, 52 (2):276.

- [4] Okawa M, Yamaguchi R, Delger H, et, al. Five triterpeneglycoside from *Oxytropis myriophylla* [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(8):1097.
- [5] Lu J H, Liu Y, Tu G Z, et al. Phenolic glucosides from *Oxytropis myriophylla* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2002, 4 (1):43.
- [6] 李翠玲. 蒙药多叶棘豆化学成分及质量研究[D]. 郑州:河南大学,2009.
- [7] 李荣,李俊. 黄酮类化合物药理活性及其构效关系研究进展[J]. 安徽医药,2005,9(7):481.
- [8] 王青虎,奥乌力吉,包建华,等. 高效毛细管电泳法同时测定小白蒿5种黄酮类化合物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):63.
- [9] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241.

[责任编辑 顾雪竹]