

毛细管电泳法分析唐古特白刺种子中两种生物碱

王洪伦^{1,3}, 明永飞^{2,3}, 李玉林^{1,3}, 丁晨旭^{1,3}, 索有瑞^{*1}

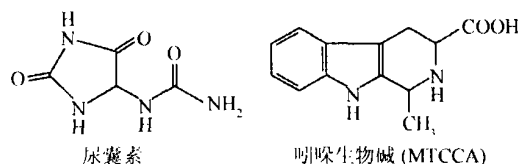
(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:利用毛细管电泳法分离测定唐古特白刺种子中的尿囊素和吲哚生物碱 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-*β*-carboline-3-carboxylic acid (MTCCA), 所用毛细管规格为 48.5 cm × 50 μm i. d., DAD 检测波长 220 nm, 最佳分离条件: 电压 19 kV, 分离温度 25 °C, 背景电解质为含有 32 mmol/L SDS, 体积分数 10.0 % 乙腈的 32 mmol/L 硼酸溶液, pH 10.0。MTCCA 与尿囊素分别在 350.0 ~ 11.0 μg/mL 和 112.5 ~ 3.5 μg/mL 质量浓度范围内与电泳峰面积呈现良好线性关系, 检出限分别为 5.0 μg/mL 和 2.5 μg/mL。对标准品进行 6 次测定, 迁移时间的 RSD 为 1.1 % 和 1.4 %, 峰面积的 RSD 为 2.3 % 和 0.82 %。

关键词:毛细管区带电泳; 唐古特白刺; 尿囊素; 吲哚生物碱

中图分类号: O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2006)03-009-03

白刺 (*Nitraria*) 是蒺藜科 (Zygophyllaceae) 的旱生或超旱生典型荒漠植物, 自然分布在干燥、盐碱、多风、植被稀少的严酷环境中, 是防风固沙的优良灌木^[1,2]。全世界有 12 个种, 我国有 8 个种, 主要分布在青海、新疆、甘肃、内蒙古等地, 其中唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum* Bobr.) 为我国的特有种。白刺是西部蒙、藏、维等少数民族的传统药材, 用于多种疾病的治疗, 同时具有广谱的营养作用^[3,4], 经常在中藏药复方上出现。白刺果实成熟时, 产地农牧民采集鲜果连核一起吞食, 可治疗胃病, 有助消化, 还可治伤风感冒、头痛头晕等; 其叶民间作为药用, 具抗痉挛、抑制神经痛、降压安神等功效。近年来的实验还显示白刺果有一定的抗脂质过氧化作用和提高 SOD 酶活力的作用^[5], 因而具有延缓衰老的保健功能。前人研究发现白刺种子内含有丰富的黄酮类化合物^[6], 本实验室对柴达木地区的唐古特白刺种子成分进行了分离鉴定, 研究发现白刺种子除含有黄酮化合物外还含有多种生物碱, 其中包括尿囊素 (Allantoin) 及一种吲哚生物碱 (MTCCA) (结构如下所示)。



对以上两种物质的测定方法主要是利用高效液相色谱法^[7], 液相色谱法存在着分离时间长, 效率低, 色谱柱易被污染, 污染后难于清洗等缺点。毛细管电泳具有高效、快速、进样体积小和抗污染能力强等特点, 在中药有效成分的分析中得到了广泛的应用^[8-10]。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

HP-3D 毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司); 毛细管总长 48.5 cm, 有效长度 40 cm, 内径 50 μm (河北永年光纤厂); Milli-Q 超纯水系统 (美国 MILLIPORE 公司); PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

尿囊素与吲哚生物碱 MTCCA 自唐古特白刺种子分离提纯制得; 乙腈 (色谱纯, 山东禹王集团化工

* 收稿日期: 2005-04-25; 修订日期: 2005-07-10

基金项目: 中组部和中科院人才培养计划“西部之光”项目资助

作者简介: 王洪伦 (1979 -), 男, 博士研究生

厂);其它试剂皆为分析纯。实验所用唐古特白刺种子于青海省都兰县采集,洗净、晾干并粉碎备用。

1.2 实验方法

试验前,对缓冲溶液进行超声脱气 10 min,每次进样前,分别用 0.1 mol/L 的 NaOH、Milli-Q 超纯水和缓冲溶液冲洗毛细管柱 2 min;更换毛细管时,需分别冲洗 20 min。

运行电压为 19 kV, DAD 检测波长为 220 nm, 实验温度为 25 ℃, 压力进样 50 mbar $\times 4$ S。

1.3 样品制备

称取研碎的白刺种子样品 5.00 g, 置于 50.0 mL 体积分数 75%乙醇溶液中于 80 ℃ 水浴中回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 提取液浓缩定容于 50 mL 容量瓶中, 溶液 4000 r/min 离心 15 min, 取上层清液用于分析。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液 pH 的影响

缓冲溶液的 pH 对分离效果有很大的影响。pH 减小, 电渗流(EOF)降低, pH 增大, EOF 增加, 可以通过改变缓冲溶液的 pH 影响 EOF 大小从而改善两者的分离效果。实验发现, 随着缓冲溶液 pH 的增大, MITCCA 和尿囊素迁移时间逐渐增加。当 pH 大于 9.5 时, 两者能得到较好的分离且时间间隔较大, 实验选定 pH 10.0。

2.2 缓冲溶液浓度的影响

缓冲溶液的选择对于减小溶质与管壁的相互作用, 克服峰形畸变, 改善分离度都具有十分重要的作用。实验发现利用硼酸作为缓冲溶液比磷酸的分离效果好。因此以硼酸作为缓冲溶液, 实验中考察了硼酸浓度(20 ~ 40 mmol/L)对分离的影响, 结果表明: 当硼酸浓度大于 24 mmol/L 时两者能够得到分离, 随着硼酸浓度的增加两者迁移时间逐渐增加。为了使两者得到分离并且减少分析时间, 实验选取硼酸浓度为 32 mmol/L。

2.3 SDS 和乙腈浓度的影响

实验过程中考察了表面活性剂 SDS 及乙腈对 MITCCA 和尿囊素迁移时间的影响。实验中调节 SDS 浓度为 24 ~ 36 mmol/L, 结果表明, 随着 SDS 浓度的增加, 两者的迁移时间也随之增大。当达到 32 mmol/L 时, 分离效果较好。因此确定 SDS 的浓度为 32 mmol/L。

乙腈的加入, 能够改善峰形, 提高分离度。实

验表明乙腈体积分数为 10% 时, 分离度最大, 峰形最好, 因此选取乙腈的体积分数为 10%。

2.4 分离温度和电压的影响

在上述确定的条件下, 考察了分离温度(15 ~ 35 ℃)和电压(17 ~ 23 kV)对尿囊素和吡哆生物碱 MITCCA 分离的影响。结果发现: 随着分离温度的增加两者的迁移时间均明显减小, 并且两者的迁移时间差减小。为了使两者得到明显的分离并且更加实用, 宜选取接近室温的温度: 25 ℃。当电压在 17 ~ 23 kV 时, 两者的迁移时间随电压增加略微减小, 当电压大于 19 kV 时, 两者的迁移时间减小比较明显。因此选取电压为 19 kV, 两者即能得到较好的分离且峰形较好。

综合以上实验最终确定的分离测定条件为: 分离电压 19 kV, 温度 25 ℃, 背景电解质为含有 32 mmol/L SDS, 体积分数 10.0%乙腈的 32 mmol/L 的硼酸溶液, 溶液 pH 10.0。在最佳条件下 MITCCA 和尿囊素的电泳分离图谱如图 1 所示。

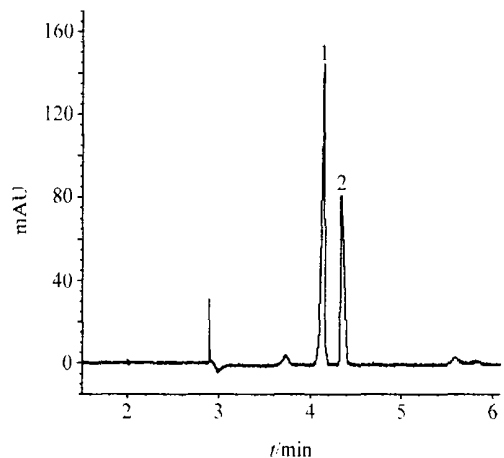


图 1 最佳条件下两种标准品的电泳分析图

Fig. 1 Capillary electrophorograms of a standard mixture

1 - MITCCA, 2 - 尿囊素

2.5 线性关系与精密度

对一系列 MITCCA 与尿囊素的标准品混合液进行分析测定, 测定其峰面积与浓度, 得到 MITCCA 峰面积与质量浓度的线性方程为: $y = 0.4167x - 2.4632$, $r = 0.9979$, 线性范围为 350.0 ~ 11.0 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (按 3 倍噪声计算)。尿囊素峰面积与浓度的线性方程为: $y = 0.4035x - 0.4463$, $r = 0.9980$, 线性范围为 112.5 ~ 3.5 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。取一定浓度的标准品混合

液,重复进样 6 次,测定其迁移时间与峰面积的 RSD 值。结果测得 MTCCA 与尿囊素的迁移时间 RSD 分别为 1.1 % 和 1.4 %,两者峰面积 RSD 分别为 2.3 % 和 0.82 %。

2.6 样品测定

将制得的样品液在最佳条件下作毛细管电泳分离分析。利用图谱中各个峰的迁移时间和紫外吸收与标准品图谱相比较从而确定 MTCCA 与尿囊素的位置。实际样品 CE 分离图见图 2。MTCCA 与尿囊素的测定结果见表 1。

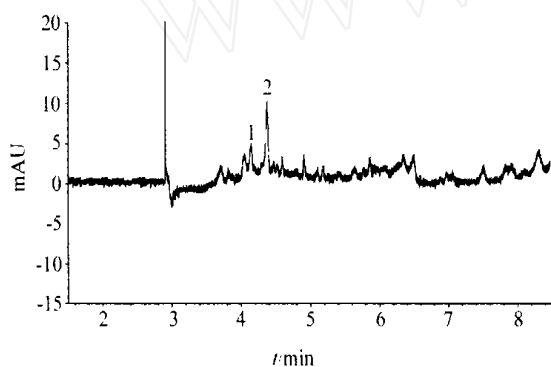


图 2 唐古特白刺种子实样 CE 分离图

Fig. 2 Capillary electrophorograms of *Nitraria tangutorum* seed samples

1 - MTCCA; 2 - 尿囊素

表 1 样品测定结果

样品	MTCCA $w/(mg/g)$	尿囊素 $w/(mg/g)$
1	0.586	1.094
2	0.601	1.125
3	0.597	1.136
平均值	0.595	1.118

参考文献

- [1] 赵克昌,曲金声,郭劲玲. 中国水土保持,1995,(1): 38
- [2] 李必华. 山东林业科技,1994,(3): 7
- [3] 高航,索有瑞. 氨基酸和生物资源,2002,24(4): 4
- [4] 高航,李天才,索有瑞. 广东微量元素科学,2002,9(8): 52
- [5] 姜明,戴有盛,吴承舜等. 营养学报,1994,16(3): 338
- [6] 贾忠建,朱广军,王继和. 兰州大学学报,1991,27(2): 102
- [7] 白雁,朱风云,王东等. 中草药,2003,34(2): 179
- [8] Issaq HJ. Electrophoresis, 1999, 20: 3190
- [9] Issaq HJ. Electrophoresis, 1997, 18: 2438
- [10] Larger P J, Jones A D, Dacombe, J. Chromatogr. A 1998, 799: 309

Determination of two alkaloids in *Nitraria tangutorum* Bobr. seed by capillary electrophoresis

WANG Hong-lun^{1,3}, MING Yong-fei^{2,3}, LI Yur-lin^{1,3}, DING Cher-xu^{1,3} and SUO You-rui^{*1} (1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039), Fenxi Shiyanshi, 2006, 25(3): 9~11

Abstract: A simple rapid and versatile capillary electrophoresis method was developed for the separation and determination of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCCA) and Allantoin in *Nitraria tangutorum* Bobr. seed. The optimum conditions were as follows: an applied voltage of 19 kV, 25 °C, and a buffer solution containing 32 mmol/L borax, 32 mmol/L SDS and 10.0 % (V/V) acetonitrile with the apparent pH of 10.0. Quantitative determination was shown to be possible because regression equations revealed a linear relationship between the peak area of each constituent and its concentration, with correlation coefficient of 0.9979 and 0.9980, and the range of linear relationship were 350.0 ~ 11.0 $\mu\text{g/mL}$ and 112.5 ~ 3.5 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The relative standard deviations were 1.08 %, 1.45 % for migration times and 2.28 %, 0.82 % for peak areas.

Key words: Capillary electrophoresis; *Nitraria tangutorum* Bobr.; Allantoin; Indole alkaloid