

红景天中红景天甙和酪醇的毛细管电泳法分析

王洪伦¹, 明永飞², 李玉林¹, 陈世龙¹, 索有瑞^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165)

摘要:利用毛细管电泳法分离测定两种红景天中红景天甙和酪醇的含量, 所用毛细管规格为 48.5 cm × 50 μm, 二极管阵列紫外检测器 (DAD) 检测波长 221 nm, 最佳分离条件: 电压 21 kV, 分离温度 25 °C, 背景电解质为含有 30 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS), 2.5 + 97.5 (V/V) 乙腈的 14 mmol/L 硼酸溶液, pH 10.7。红景天甙与酪醇分别在 60.0 ~ 7.5 μg/mL 和 27.5 ~ 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, 检测下限分别为 3.0 和 1.5 μg/mL。对标准品进行 6 次测定, 迁移时间的 RSD 为 0.25 % 和 0.39 %, 峰面积的 RSD 为 5.26 % 和 3.52 %。

关键词:毛细管区带电泳; 红景天; 红景天甙; 酪醇

中图分类号: O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2005)01-0040-03

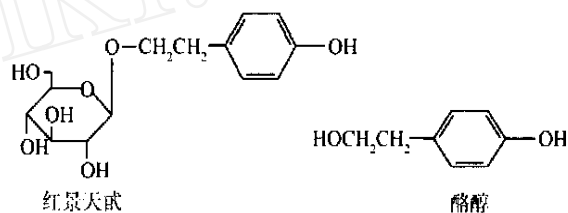
红景天 (*Rhodiola*) 为景天科红景天属 (*Rhodiola* L.) 多年生草本或亚灌木植物。世界上有 90 余种, 多分布在北半球的高寒地带, 大多数生长在海拔 3500 ~ 5000 m 的高山流石或灌木丛林, 我国有 70 余种^[1]。其中包括大花红景天和狭叶红景天等多种。红景天中主要的成分有红景天甙、酪醇、没食子酸、没食子酸乙酯等。红景天具有抗衰老、抗缺氧、抗疲劳、抗病毒和抗肿瘤作用。其中红景天甙具有多方面的药理活性, 酪醇对病毒感染的细胞具有显著的保护作用^[2~5]。

对红景天中红景天甙和酪醇 (结构如下所示) 的测定方法主要是高效液相色谱法^[6], 但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。毛细管电泳是近年来快速发展的一种分离分析技术, 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^[7~9]。

1 试验部分

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)。

红景天甙与酪醇自大花红景天分离提纯制得; 乙腈 (色谱纯, 山东禹王集团化工厂); 其它试剂为分析纯。

实验所用大花红景天采自西藏自治区德格县; 狭叶红景天采自西藏昌都县, 两者经中科院西北高原生物研究所陈世龙研究员鉴定。

1.2 样品制备

称取研碎的红景天样品 1.00 g 样品, 置于 10.0 mL 体积分数 80 % 乙醇溶液中浸泡过夜, 然后室温下超声提取 1 h, 4000 r/min 离心 15 min, 取上层清液用于分析。

* 收稿日期: 2004-02-16; 修订日期: 2004-03-28

基金项目: 中组部和中国科学院人才培养计划“西部之光”项目资助

作者简介: 王洪伦 (1979 -), 男, 博士研究生

1.3 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 溶液、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 10 min。

运行电压为 21 kV, DAD 检测波长为 221 nm, 实验温度为 25 , 进样压力 50 mbar ×4S。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液 pH 对分离效果的影响

缓冲溶液的 pH 对分离效果有很大的影响。pH 值小,电渗流(EOF)降低,pH 值大,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,红景天甙和酪醇的迁移时间略有增加。当 pH < 10.5 时,两者的迁移时间差别不大,不能得到较好的分离。当 pH > 10.5 时,两者能够得到较好的分离,实验选定 pH 10.7。

2.2 缓冲溶液浓度对分离效果的影响

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,实验表明:硼酸浓度对分离效果影响不大,随着硼酸浓度的增加,两者的保留时间略有增加。在浓度为 14 和 16 mmol/L 时,红景天甙和酪醇的分离度和峰形优于其它浓度,实验选取硼酸浓度为 14 mmol/L。

2.3 SDS 和乙腈浓度的影响

为了获得较好的分离效果,实验过程中考察了表面活性剂 SDS 及乙腈对红景天甙和酪醇迁移时间的影响。实验中调节 SDS 浓度为 26 ~ 38 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 30 mmol/L 时,分离效果较好。因此确定 SDS 的浓度为 30 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 2.5 % 时,分离度最大,峰形最好,因此选取乙腈的体积分数为 2.5 %。

2.4 分离温度和电压对分离效果的影响

考察了分离温度(20 ~ 35)和电压(19 ~ 25 kV)对红景天甙和酪醇分离的影响。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 19 ~ 21 kV 时,两者的迁移时间随电压增加略微减小,当电压大于 21 kV 时,两者的迁移时间减小比较明显。在 21 kV 时,两者即能得到较好的分离且峰形较好,因此选取电压为 21 kV。

综合以上实验最终确定的分离测定条件为:分离电压 21 kV, 温度 25 , 背景电解质为含有 30 mmol/L SDS, 体积分数 2.5 % 乙腈的 14 mmol/L 的硼酸溶液,溶液 pH 10.7。在最佳条件下红景天甙和酪醇的电泳分离图谱如图 1 所示。

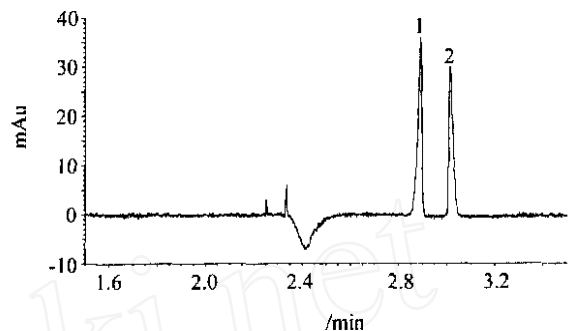


图 1 最佳条件下红景天甙和酪醇的电泳分析图

Fig. 1 Capillary electropherograms of a standard mixture of salidroside and tyrosol

1 - 红景天甙; 2 - 酪醇

2.5 线性关系与精密度

对一系列红景天甙和酪醇的标准品混合液进行分析,测定其峰面积与质量浓度,得到红景天甙峰面积与浓度的线性方程为: $y = 1.4544 + 0.2456 (\mu\text{g}/\text{mL})$, $r = 0.9954$, 线性范围为 60.0 ~ 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (按 3 倍噪声计算)。酪醇峰面积与浓度的线性方程为: $y = 0.5348 + 0.5140 (\mu\text{g}/\text{mL})$, $r = 0.9988$, 线性范围为 27.5 ~ 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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。结果测得红景天甙与酪醇的迁移时间 RSD 分别为 0.25 % 和 0.39 %, 两者峰面积 RSD 分别为 5.26 % 和 3.52 %。

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红景天甙与酪醇峰的位置。样品 CE 分离图见图 2。大花红景天和狭叶红景天中红景天甙和酪醇的测定结果见表 1。

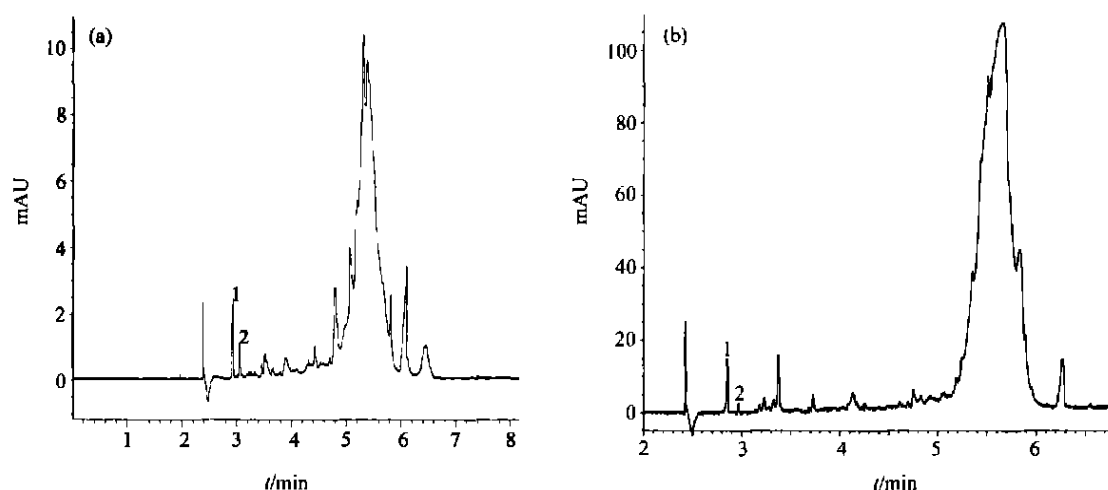


图 2 红景天实样 CE 分离图

Fig. 2 Capillary electrophorograms of samples

a - 大花红景天; b - 狭叶红景天

表 1 样品测定结果

Tab. 1 Determination results of samples

样品	红景天甙 w/ %	酪醇 w/ %
大花红景天	1	0.421
	2	0.417
	3	0.420
	平均值	0.419
狭叶红景天	1	0.301
	2	0.301
	3	0.302
	平均值	0.301

Determination of salidroside and tyrosol in rho-

diola by capillary electrophoresis WANG Hong-lun, LI Yu-lin, CHEN Shi-long, SUO Yourui (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001) and MING Yongfei (Department of chemistry, Qufu Normal University, Qufu 273165), Fenxi Shiyanshi, 2005, 24(1): 40~42

Abstract: A simple rapid and versatile capillary electrophoresis method was developed for the separation and determination of Salidroside and Tyrosol in Rhodiola. The buffer solution was consisting of 14 mmol/L borax and 30 mmol/L SDS and containing 2.5 + 97.5 (V/V) methyl-cyanide with the apparent pH value adjusted to 10.7. The voltage applied was 21kV and the temperature was maintained at 25 . Quantitative determination was possible because regression equations revealed a liner relationship between the peak area of each constituent and its concentration, with correlation coefficient of 0.9954 and 0.9988, and the range of liner relationship were 60.0 ~ 7.5 μg/mL and 27.5 ~ 3.5 μg/mL respectively. The relative standard deviations were 0.25%, 0.39% for migration times and 3.52%, 5.26% for peak areas.

Keywords: Capillary electrophorsis; Rhodiola; Salidroside; Tyrosol

参考文献

[1] 刘尚武主编,青海植物志(第二卷). 西宁:青海人民出版社,1999
 [2] 尹桂山,邹静琴,王桂香等. 营养学报,1992,14(1):98
 [3] 周成明,胥云,徐文豪. 时珍国药研究,1991,2(2):85
 [4] 叶子聪,陈钦铭,金凯平等. 中国药理学报,1993,14(5):424
 [5] 王秀清,孙非,李静波等. 中国药理学通报,1993,9(6):443
 [6] 彭江南,陈浩,马成禹. 药物分析杂志,1995,15(4):21
 [7] Issaq HJ. Electrophoresis 1999,20:3190
 [8] Issaq HJ. Electrophoresis 1997,18:2438
 [9] Larger P J, Jones A D, Dacombe, J. Chromatogr. A 1998, 799: 309