



胶束电动毛细管电泳分离测定北沙参中 5 种香豆素类成分

刘曼, 孔德志, 杨维, 王巧*, 张兰桐

(河北医科大学药学院药物分析教研室, 河北石家庄 050017)

[摘要] 目的: 建立同时测定北沙参中补骨脂素、花椒毒素、异茴芹内酯、佛手柑内酯和东莨菪内酯 5 种香豆素类成分的胶束电动毛细管电泳法。方法: 采用未涂层融硅石英毛细管柱(50.2 cm × 75 μm × 40 cm), 20 mmol · L⁻¹ 硼砂溶液-16 mmol · L⁻¹ 十二烷基硫酸钠(SDS)-15% 乙腈(pH 9.6) 为运行缓冲液, 分离电压 22 kV, 紫外检测波长 214 nm。对缓冲液种类、浓度、pH、SDS、乙腈浓度、电压、温度等因素对分离的影响做了系统的考察。结果: 补骨脂素、花椒毒素、异茴芹内酯、佛手柑内酯和东莨菪内酯在 7 min 内全部分离, 线性范围分别为 9.91 ~ 82.6, 37.2 ~ 162, 2.23 ~ 18.6, 2.73 ~ 22.3, 2.89 ~ 20.1 mg · L⁻¹, 平均回收率分别为 98.9%, 98.4%, 101.3%, 99.1%, 98.0%。结论: 该方法为北沙参药材的质量评价提供了新的途径, 简便、快速、灵敏、准确。

[关键词] 胶束电动毛细管电泳法; 北沙参; 香豆素

北沙参为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的干燥根。具有养阴清肺, 益胃生津的功效, 可用于肺热燥咳, 劳嗽痰血, 热病津伤口渴等症, 为临床常用中药^[1]。现代药理研究证明北沙参具有解热、镇痛、镇咳、祛痰、强心、抗突变、调解免疫系统等多种药理作用^[2]。文献^[3-6]报道其主要含有补骨脂素(psoralen, 1)、花椒毒素(xanthotoxin, 2)、异茴芹内酯(isoimipinellin, 3)、佛手柑内酯(bergapten, 4)和东莨菪内酯(scopoletin, 5)等香豆素类成分。目前测定北沙参中该类成分方法主要有高效液相法(HPCE)、薄层色谱法(TLC)^[7-8]等, 但未见有高效毛细管电泳法 HPCE 分析测定的相关报道。本研究首次采用胶束电动毛细管电泳模式同时测定了北沙参中 5 种香豆素类成分, 分离效率高、快速、成本低, 为北沙参的质量控制提供了一种新方法。

1 仪器、试剂与试药

Beckman P/ACE™ MDQ 型毛细管电泳仪; pHs-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂); 超声波提取器(上海声浦超声波设备厂); Heidolph2 旋转蒸发仪; 试剂

均为分析纯; 水为超纯水(Heal Force-PWVF, 上海康雷分析仪器有限公司)。

对照品补骨脂素(1, 批号 110739-200512), 花椒毒素(2, 批号 071228), 异茴芹内酯(3, 批号 07120422) 和佛手柑内酯(4, 批号 07111221) 购于上海同田生物技术有限公司(纯度 > 95%), 东莨菪内酯(5, 批号 110768-200504) 购自中国药品生物制品检定所(纯度 > 98%)。北沙参药材收集于不同地区, 经河北医科大学药学院刘振通高级技师鉴定为伞形科植物珊瑚菜 *G. littoralis* 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 未涂层融硅石英毛细管(50.2 cm × 75 μm × 40 cm); 运行缓冲液为 20 mmol · L⁻¹ 硼砂缓冲溶液(pH 9.6, 含 16 mmol · L⁻¹ SDS, 15% 乙腈); 温度 22 °C; 压力进样 5 s (0.5 Psi); 分离电压 22 kV; 检测波长 214 nm。

实验前, 用 0.1 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液冲洗 10 min, 水冲洗 5 min, 运行缓冲液冲洗 5 min, 每次进样前用缓冲液冲洗 4 min。

运行缓冲液的制备 精密称取硼砂和 SDS 适量, 加水溶解, 分别制成 100 mmol · L⁻¹ 的硼砂储备液和 200 mmol · L⁻¹ 的 SDS 储备液。实验时, 按不同比例各取适量以制得不同浓度和不同 pH 的电泳运行缓冲液, 用前以 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取对照品补骨

[稿件编号] 20090914019

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(0927642313)

[通信作者] * 王巧, 博士, Tel: (0311) 86265625, E-mail: qiaowang88@hotmail.com

[作者简介] 刘曼, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究工作



脂素 4.59 mg、异茴芹内酯 1.55 mg、佛手柑内酯 5.58 mg 和东莨菪内酯 2.01 mg,分别置 10 mL 量瓶中,花椒毒素 5.05 mg 置 5 mL 量瓶中,分别加甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取北沙参药材粉末(过 3 号筛)约 2.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,浸泡 30 min,冰浴超声处理 40 min,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,抽滤,用甲醇洗涤残渣,合并洗液与滤液,减压蒸干,残渣用 4% 醋酸铅溶液稀释至 50 mL,放置过夜,抽滤,除去沉淀,减压浓缩至

10 mL,分别用 10,5,5 mL 的氯仿萃取 3 次,合并氯仿液,减压蒸干,残渣用 8.00 mL 缓冲溶液溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得^[9]。

2.4 标准曲线、线性范围、定量限与检测限 取适量上述对照品储备液,分别加缓冲溶液稀释成含 1 9.91,19.8,39.6,66.1,82.6 mg · L⁻¹,含 2 37.2,62.0,77.5,129,162 mg · L⁻¹,含 3 2.23,4.46,5.58,9.30,18.6 mg · L⁻¹,含 4 2.73,5.47,10.9,15.6,22.3 mg · L⁻¹,含 5 2.89,5.79,9.65,16.1,20.1 mg · L⁻¹ 的系列对照品溶液,依照 2.1 项下条件测定,见表 1。

表 1 5 种被测成分的线性相关关系

化合物	线性方程	R ²	线性范围/mg · L ⁻¹	检测限/mg · L ⁻¹	定量限/mg · L ⁻¹
1	$A = 2.64 \times 10^3 C - 6.15 \times 10^3$	0.998 4	9.91 ~ 82.6	0.7	1.7
2	$A = 2.40 \times 10^3 C - 1.71 \times 10^4$	0.999 1	37.2 ~ 162	0.9	3.0
3	$A = 1.83 \times 10^3 C - 98.1$	0.999 6	2.23 ~ 18.6	0.8	2.0
4	$A = 2.26 \times 10^3 C + 5.06 \times 10^2$	0.999 5	2.73 ~ 22.3	0.6	1.5
5	$A = 4.88 \times 10^3 C + 1.48 \times 10^2$	0.998 5	2.89 ~ 20.1	0.3	0.7

2.5 仪器重复性试验 取 1 ~ 5 质量浓度分别为 39.6,77.5,5.35,10.9,9.65 mg · L⁻¹ 的对照品溶液,连续进样 5 次,计算各对照品峰面积的 RSD 分别为 1.1%,1.3%,0.8%,0.7%,1.2%,表明仪器重复性良好。

2.6 精密度试验 取北沙参药材,按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依照 2.1 项下测定。化合物 1 ~ 5 测定结果的 RSD 分别为 2.0%,2.4%,2.8%,2.0%,2.9%,表明方法精密度良好。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的北沙参药材约 1.0 g,精密称定,精密加入 1 ~ 5 对照品储备液 0.30,0.25,0.10,0.08,0.15 mL,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,平行 6 份,依照 2.1 项下方法测定,计算各组分的平均回收率及 RSD 值,见表 2。

2.8 稳定性试验 将供试品溶液于室温放置 0,2,4,6,8,10,12 h 时分别进样分析,测得 1 ~ 5 号峰面积的 RSD 分别为 1.1%,0.9%,1.2%,1.2%,1.6%,表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定性良好。

2.9 样品测定 分别取各北沙参药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,依照 2.1 项下方法检测,记录峰面积,代入标准曲线,计算各样品中 1 ~ 5 的质量分数,结果见表 3。对照品溶液和供试品溶液毛细

管电泳图见图 1。

3 讨论

3.1 缓冲体系、浓度和 pH 的选择 缓冲体系直接影响离子的迁移和分离,缓冲液的浓度影响双电层的厚度,增加缓冲液的浓度可改善峰形,但迁移时间和焦耳热也随之增加。实验中考察了 Tris-磷酸,Tris-硼酸、磷酸和硼砂等缓冲体系(浓度均为 20 mmol · L⁻¹,SDS 16 mmol · L⁻¹,15% 乙腈,pH 9.6),结果表明,Tris 缓冲体系电流波动较大,且响应值偏低;而硼砂缓冲体系分离效果较好。进一步考察了硼砂缓冲液在 5 ~ 40 mmol · L⁻¹ 对分离的影响,当硼砂浓度为 20 mmol · L⁻¹ 时基线稳定,峰形对称,灵敏度较高,故选择其作为运行缓冲溶液。

缓冲体系 pH 是影响分离度的重要因素。通过调节缓冲溶液的 pH,改变溶质所带电荷,达到改变淌度,从而改变溶质的迁移行为和分离选择性^[10]。实验中,以 20 mmol · L⁻¹ 硼砂缓冲液,20 mmol · L⁻¹ SDS,15% 乙腈,分离电压 15 kV,温度 22 °C 为电泳条件,考察了不同 pH(7.5,8.5,9.0,9.6,10.0) 对分离的影响。表明,在 pH 7.5,8.5,9.0 时,化合物 3,4 和 5 无法得到分离;在 pH 9.6,10.0 时,分离得到改善,但化合物 3 和 4 仍未分离,综合考虑分离度和迁移时间,本实验选择 pH 9.6。



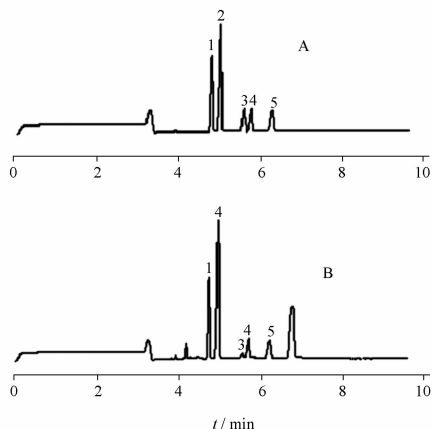
表2 北沙参药材加样回收率($n=6$)

化合物	取样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
补骨脂素	1.004	136.6	137.7	270.4	97.1	98.9	2.4
	0.994	135.2	137.7	272.8	99.9		
	1.007	137.0	137.7	269.6	96.3		
	0.995	135.4	137.7	276.4	102.4		
	1.008	137.1	137.7	269.4	96.1		
花椒毒素	1.006	136.9	137.7	276.8	101.6	98.4	2.5
	1.004	279.3	252.5	519.9	95.3		
	0.994	276.4	252.5	519.8	96.4		
	1.007	280.2	252.5	525.4	97.1		
	0.995	276.9	252.5	533.4	101.6		
异茴芹内酯	1.008	280.5	252.5	526.9	97.6	101.3	2.7
	1.006	279.9	252.5	538.7	102.5		
	1.004	15.9	15.5	31.9	103.4		
	0.994 1	15.7	15.5	30.9	98.0		
	1.007 3	16.0	15.5	31.0	96.5		
佛手柑内酯	0.995 6	15.8	15.5	31.8	103.1	99.1	3.0
	1.008 1	16.0	15.5	31.9	102.8		
	1.006 6	16.0	15.5	32.1	104.0		
	1.004 4	46.4	44.6	89.3	96.3		
	0.994 1	45.9	44.6	91.0	101.1		
东莨菪内酯	1.007 3	46.6	44.6	92.7	103.3	98.0	2.5
	0.995 6	46.0	44.6	91.5	102.0		
	1.008 1	46.6	44.6	89.8	96.8		
	1.006 6	46.5	44.6	89.0	95.3		
	1.004 4	30.1	30.2	60.7	101.3		
	0.994 1	29.8	30.2	60.6	102.1		
	1.007 3	30.2	30.2	59.3	96.3		
	0.995 6	29.9	30.2	58.9	96.2		
	1.008 1	30.2	30.2	59.2	96.0		
	1.006 6	30.2	30.2	59.3	96.3		

表3 北沙参药材来源及其5种香豆素质量分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	产地(采集日期)	补骨脂素	花椒毒素	异茴芹内酯	佛手柑内酯	东莨菪内酯
1	山东-1(2008-10)	7.4 \pm 0.2	23.8 \pm 0.5	-	18.6 \pm 0.2	21.6 \pm 0.2
2	山东-2(2008-10)	6.1 \pm 0.1	21.2 \pm 0.5	-	16.7 \pm 0.2	24.5 \pm 0.4
3	内蒙-1(2008-10)	5.9 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1	-	12.3 \pm 0.1	20.7 \pm 0.2
4	内蒙-2(2008-10)	4.2 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	-	11.1 \pm 0.2	18.9 \pm 0.2
5	内蒙-3(2008-10)	3.9 \pm 0.1	10.1 \pm 0.2	-	12.0 \pm 0.1	22.7 \pm 0.2
6	内蒙-4(2008-10)	1.2 \pm 0.0	34.6 \pm 0.8	-	7.51 \pm 0.1	27.4 \pm 0.4
7	内蒙-5(2008-09)	68.0 \pm 1.2	168.3 \pm 2.0	58.6 \pm 1.2	87.6 \pm 1.0	28.9 \pm 0.4
8	河北-1(2008-10)	12.5 \pm 0.2	15.4 \pm 0.2	13.8 \pm 0.2	23.8 \pm 0.3	17.5 \pm 0.3
9	河北-2(2007-10)	135.6 \pm 1.4	277.3 \pm 3.7	15.9 \pm 0.3	46.1 \pm 0.8	29.9 \pm 0.2
10	河北-3(2007-10)	85.4 \pm 0.9	134.3 \pm 1.6	14.5 \pm 0.1	45.3 \pm 0.6	45.6 \pm 0.7
11	河北-4(2007-10)	69.7 \pm 0.7	144.0 \pm 2.7	26.9 \pm 0.3	53.9 \pm 0.8	36.8 \pm 0.5
12	河北-5(2007-10)	145.2 \pm 1.6	268.2 \pm 3.0	54.3 \pm 1.1	66.4 \pm 0.8	28.7 \pm 0.5
13	河北-6(2007-10)	66.1 \pm 1.3	127.5 \pm 1.2	14.0 \pm 0.2	47.9 \pm 0.9	31.6 \pm 0.6
14	河北-7(2007-10)	87.6 \pm 2.0	165.4 \pm 1.7	18.5 \pm 0.3	45.2 \pm 0.9	55.2 \pm 0.7
15	河北-8(2007-10)	82.9 \pm 1.8	174.3 \pm 2.2	25.2 \pm 0.3	48.0 \pm 0.6	57.3 \pm 0.7
16	河北-9(2007-10)	75.8 \pm 1.1	179.2 \pm 1.6	48.0 \pm 1.0	57.1 \pm 1.0	51.1 \pm 1.0



1. 补骨脂素; 2. 花椒毒素; 3. 异茴芹内酯;
4. 佛手柑内酯; 5. 东莨菪内酯。
图1 对照品溶液(A)和北沙参供试品溶液(B)
的毛细管电泳图

3.2 SDS 的浓度和有机改性剂的选择 SDS 在水溶液中形成胶束后,使香豆素类组分的溶解度增大,增溶后胶束的形状、大小以及胶束内环境的性质也发生变化。以分离电压 15 kV,温度 22 °C,15% 乙腈,不同浓度 SDS,pH 9.6 的 20 mmol · L⁻¹ 硼砂缓冲液为分离缓冲液,考察 SDS 浓度变化对分离的影响。发现在 SDS 16 mmol · L⁻¹ 时,化合物 3 被分离出来,且化合物 4 和 5 分离度为 4.2,而 SDS 18 mmol · L⁻¹ 时,化合物 4 和 5 分离度仅为 0.9,在 SDS 20,22 mmol · L⁻¹ 时化合物 3 未分离出,故实验选择 SDS 浓度为 16 mmol · L⁻¹。

有机改性剂能增加疏水性物质在水中的溶解度,并且改善分离效果。试验中考察了乙腈、甲醇、异丙醇及尿素的影响,乙腈的分离效果较好,峰形对称,且迁移时间短,尿素产生了新的杂质峰。在分离电压 15 kV,温度 22 °C,16 mmol · L⁻¹ SDS,20 mmol · L⁻¹ 硼砂缓冲液,pH 9.6 条件下,考察乙腈浓度对分离的影响。乙腈浓度的改变对分离有明显影响,乙腈 15% 时,各成分达到基线分离,见图 2。

3.3 电压与温度的选择 分离电压对迁移时间和分离度也有一定的影响。实验考察了电压在 10 ~ 30 kV 内对分离的影响,结果发现,改变电压对分离度影响不大,但对分析时间影响较大,香豆素类组分的迁移时间缩短了一半多。因此,在不损失分离度的前提下,为了缩短分析时间,选择分离电压为 22 kV。

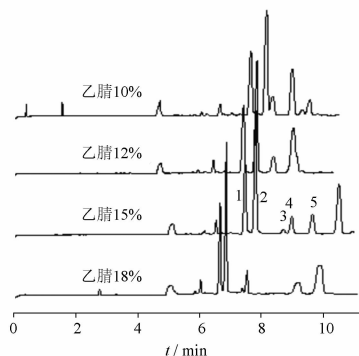


图2 乙腈浓度对香豆素类组分迁移的影响

考察了温度在 15 ~ 25 °C 对分离的影响,结果,随着温度升高,香豆素类组分的迁移时间相应减小,这是因为随着温度的升高溶液的黏度降低,从而缩短迁移时间,当温度为 22 °C 时,迁移时间适中,分离度最好,响应值最大,见图 3。

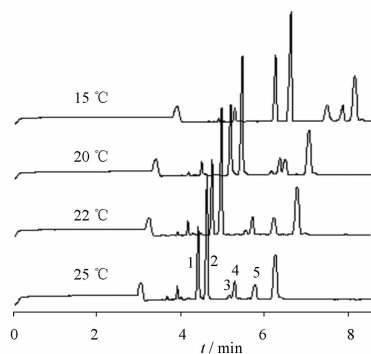


图3 温度对香豆素类组分迁移的影响

3.4 样品提取条件的优化 考察了 50% 甲醇、75% 甲醇、纯甲醇作为提取溶剂,表明,用纯甲醇时,提取效果好,响应值高。并且考察了醋酸铅的浓度和用量,最终确定为 4% 的醋酸铅 50 mL。

3.5 药材分析 由表 1 可知,不同产地的北沙参药材中 5 种香豆素成分含量差异很大,其中河北产地药材中 5 种有效成分的总含量明显高于其他产地,且异茴芹内酯均能检测到,因此有必要建立规范的栽培体系和质量检测系统。

本研究用胶束电动毛细管电泳法分离测定了北沙参中补骨脂素、花椒毒素、异茴芹内酯、佛手柑内酯和东莨菪内酯 5 种香豆素类有效成分,并对缓冲液种类、浓度、pH 值、SDS、乙腈浓度、电压、温度等



因素对分离的影响做了系统的考察。该模式扩展了毛细管电泳的应用范围,可以同时分离分析带电粒子、电中性及疏水性物质,特别适合于中药中各种复杂组分的分离。该法简便、快速、经济,为北沙参的质量控制提供了新方法。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:66.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1997.
- [3] Ng T B, Liu F, Wang H X, et al. The antioxidant effects of aqueous and organic extract of *Panax quinquefolium*, *Panax notogiseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(2):285.
- [4] Takahiro M, Mitsuo T, Masaki A. Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *glehnia littoralis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(1):13.
- [5] Sasaki H, Taguchi H, Endo T, et al. The constituents of *Glehnia littoralis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(6):1847.
- [6] 原忠,赵梦飞,陈发奎,等. 北沙参化学成分的研究[J]. *中草药*, 2002, 33(12):1063.
- [7] 李宝国,石俊英. HPLC法同时测定北沙参不同部位中3种香豆素的含量[J]. *山东中医药大学学报*, 2005, 29(5):383.
- [8] 张子忠,吕青涛. 北沙参的反相薄层色谱分离与色谱参数的测定[J]. *基层中药杂志*, 1992, 6(3):25.
- [9] Renata J, Danuta R, Piotr K, et al. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 709(1):197.
- [10] 邓延焯,何金兰. 高效毛细管电泳[M]. 北京:科学出版社, 1996.

Determination of five coumarins in Radix Glehniae by micellar electrokinetic capillary chromatography

LIU Man, KONG Dezhi, YANG Wei, WANG Qiao*, ZHANG Lantong

(Development of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] A micellar electrokinetic capillary chromatography method with ultraviolet detection was developed for the simultaneous determination of psoralen, xanthotoxin, isoimipinellin, bergapten and scopoletin in Radix Glehniae. The separation was performed on an uncoated fused silica capillary column (50.2 cm × 75 μm × 40 cm) with 20 mmol · L⁻¹ borax solution (pH 9.6) containing 16 mmol · L⁻¹ sodium dodecylsulfate (SDS) and 15% acetonitrile as running buffer at applied voltage of 22 kV. The detection wavelength was 214 nm. The effects of concentrations of borax solution, sodium dodecylsulfate (SDS), and organic modifier, voltage, temperature on the separation and sensitivity were investigated. The five active constituents were completely separated within 7 min. The linear ranges of psoralen, xanthotoxin, isoimipinellin, bergapten and scopoletin were 9.91-82.6, 37.2-162, 2.23-18.6, 2.73-22.3 and 2.89-20.1 mg · L⁻¹, respectively. And the average recoveries were 98.9%, 98.4%, 101.3%, 99.1% and 98.0%, respectively. This simple and rapid method provided a new basis for assessment on quality of Radix Glehniae.

[Key words] micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC); Radix Glehniae; coumarin

doi: 10.4268/cjcm20101416

[责任编辑 王亚君]