

毛细管区带电泳法分析不同来源血竭中龙血素 A 和龙血素 B

杨雪滢¹, 胡旭芳¹, 李 菲¹, 王兴红², 曹秋娥^{1*}

(1. 云南大学化学科学与工程学院 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091; 2. 云南大学微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要: 在系统优化了电解质溶液的 pH、组成、浓度及仪器条件的基础上, 建立了一种测定不同来源血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的毛细管区带电泳 (CZE) 方法。采用 20 kV 的分离电压, 25 °C 的毛细管柱温, 211 nm 的检测波长以及 5 s 的压力 (3 447 Pa) 进样时间, 在 20 mmol/L 的 Na₂B₄O₇ 缓冲溶液 (用 NaOH 调节 pH 到 9.98, 含有 10% (v/v), 下同) 乙腈、5.0% 乙二醇和 1.0% 正丁醇) 中, 龙血素 A 和龙血素 B 在 15 min 内得到了有效分离与检测。方法的线性范围对于龙血素 A 和龙血素 B 分别为 1.0 ~ 100.0 mg/L 和 0.5 ~ 100.0 mg/L。将该方法用于天然血竭及人工诱导血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的测定, 相对标准偏差在 0.6% ~ 3.8% 之间, 加标回收率在 95.1% ~ 105.8% 之间。方法具有简单、快速、重现性较好和准确度较高的优点, 可以用于血竭样品中龙血素 A 和龙血素 B 的测定。

关键词: 毛细管区带电泳; 龙血素 A; 龙血素 B; 血竭

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)05-0501-06

Determination of loureirin A and loureirin B in dragon's blood by capillary zone electrophoresis

YANG Xueying¹, HU Xufang¹, LI Fei¹, WANG Xinghong², CAO Qiue^{1*}

(1. School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, Kunming 650091, China;
2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: A capillary zone electrophoresis method (CZE) for the simultaneous determination of loureirin A and loureirin B was developed based on the optimized conditions of the pH, composition and concentration of the running buffer solution. Loureirin A and loureirin B were separated and determined effectively within 15 min in a running buffer solution of 20 mmol/L Na₂B₄O₇ (pH 9.98 adjusted with NaOH solution) containing 10.0% (v/v) acetonitrile, 5.0% (v/v) ethylene glycol and 1.0% (v/v) butanol, with the applied voltage of 20 kV, capillary temperature of 25 °C, detection wavelength of 211 nm, and injection of 5 s at 3 447 Pa. The linear ranges for the determination of loureirin A and loureirin B were 1.00 – 100 mg/L and 0.50 – 100 mg/L, respectively. The determination of loureirin A and loureirin B in dragon's blood from natural and artificial inoculation was performed by the proposed method. The relative standard deviations for the determination of the two constituents in samples were from 0.6% to 3.8%, and the recoveries ranged between 95.1% and 105.8%. The method is simple, rapid and possesses higher reproducibility and efficiency. It can be used for the determination of loureirin A and loureirin B in dragon's blood.

Key words: capillary zone electrophoresis (CZE); loureirin A; loureirin B; dragon's blood

血竭是一种名贵的中药材, 是一些植物如百合科剑叶龙血树等受到损伤后感染真菌等微生物后产

生的一种代谢产物, 具有广泛的物理活性, 能活血散瘀、定痛止血和敛疮生肌等, 可以用于跌打损伤、瘀

* 通讯联系人: 曹秋娥, 博士, 教授, 主要研究方向为色谱及分离材料。Tel: (0871) 5033723, E-mail: qecao@ynu.edu.cn.
基金项目: 云南省自然科学基金项目 (2008CD066) 和云南省科技厅普洱市党政一把手工程项目 (2010AE005)。
收稿日期: 2011-12-20

血作痛、臃疮久不收口等症^[1,2]。血竭主要含黄酮类、芳香类、皂苷类等化学成分,其中4'-羟基-2,4-二甲氧基二氢查耳酮(龙血素 A, loureirin A)和4'-羟基-2,4,6-三甲氧基二氢查耳酮(龙血素 B, loureirin B)为其主要有效成分^[1,2]。测定血竭中的龙血素 A 和龙血素 B 对了解中药材的质量具有重要的意义。

目前,血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的同时测定以高效液相色谱法(HPLC)为主^[3-9]。与 HPLC 相比,高效毛细管电泳法(HPCE)具有更高的分离效率,更短的分析时间,更灵敏的检测,而且样品和试剂耗量少,因此被广泛应用于生物、临床、环境、中药及其制剂等复杂体系的分析中^[10-12],但采用高效毛细管电泳法分离测定龙血素 A 和龙血素 B 的研究很少见报道。田颂九等^[13]采用胶束毛细管电动色谱法(MEKC)对龙血素 A 和龙血素 B 进行了分离测定,但方法的分析时间较长(26.92 min)。与 MEKC 相比,毛细管区带电泳法(CZE)简单、快速、重现性好,但采用 CZE 同时分离测定血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的研究未见报道。本文采用高效毛细管区带电泳法(HPCZE)在 15 min 内实现了对龙血素 A 和龙血素 B 的同时分离测定。该方法不仅具有较好的重现性与较高的灵敏度,而且与现有文献报道的同时分离测定龙血素 A 和龙血素 B 的 HPLC 和 MEKC 方法^[4-9,12]相比,分析时间更短。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

P/ACE™ MDQ 型高效毛细管电泳仪,配二极管阵列紫外检测器(PDA,美国 Beckman Coulter 公司),数据处理采用 32Karat 软件;未涂层石英毛细管(57 cm(有效长度 50 cm) × 75 μm,河北省永年锐沓色谱器件有限公司)。

龙血素 A 和龙血素 B 对照品(纯度大于 98%)购自中国药品生物制品检定所,其结构见图 1。实验用其他试剂均为分析纯,水为高纯水。

样品 1 和样品 2 分别为同一棵剑叶龙血树(产地为云南思茅)的树干和树叶上天然形成的血竭,样品 3 至样品 6 是在该剑叶龙血树的树干上用不同真菌(编号分别为 2617[#]、6113[#]、7121[#]和 266[#])诱导后形成的血竭。

1.2 溶液的配制

标准溶液:龙血素 A 和龙血素 B 的标准品储备液(1.0 mg/mL)均用甲醇配制,于 4 °C 下保存;工作溶液由储备液用甲醇稀释得到。

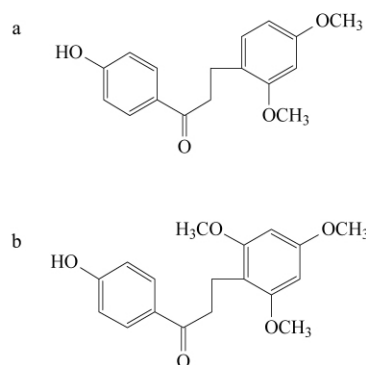


图 1 (a) 龙血素 A 和 (b) 龙血素 B 的结构式
Fig. 1 Chemical structures of (a) loureirin A and (b) loureirin B

电泳运行缓冲溶液:含 10% (v/v,下同) 乙腈、5% 乙二醇和 1% 正丁醇的 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液(用 NaOH 溶液调节 pH 9.98),使用前用 0.45 μm 滤膜过滤。

样品溶液:将同一棵剑叶龙血树的树干和树叶上天然形成的血竭以及在该树的树干上用不同真菌人工诱导形成的血竭干燥后粉碎,用甲醇水浴回流约 8 h,然后减压蒸馏除去溶剂,得到血竭浸膏。称取干燥后的浸膏约 0.2 g,用甲醇超声溶解,过滤,滤液用甲醇定容于 25 mL 容量瓶中,得样品溶液,于 4 °C 下保存备用。

1.3 HPCE 条件与方法

电泳介质为 1.2 节配制的电泳运行缓冲液,分离电压为 20 kV,柱温为 25 °C,检测波长为 211 nm;压力进样为 3 447 Pa × 5.0 s。为了确保重现性,毛细管柱每天在运行前和两次运行间依次用 0.1 mol/L NaOH 溶液、重蒸水和运行缓冲溶液分别冲洗 3、3 和 4 min。

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液 pH 值和浓度对分离的影响

图 1 表明龙血素 A 和龙血素 B 均含有酚羟基,在一定 pH 下可电离而带负电荷,因此实验在固定缓冲溶液中 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 浓度为 20 mmol/L,用 0.1 mol/L NaOH 溶液或 0.1 mol/L HCl 在 pH 为 8.38 ~ 10.73 范围内调节溶液的 pH 值条件下,考察了缓冲溶液 pH 值对龙血素 A 和龙血素 B 分离的影响。结果表明,当 pH 值 ≤ 8.81 时,基线噪声较大,峰形较差;当 pH 值 ≥ 10.13 时,峰展宽并且检测灵敏度下降。当 pH 值位于 8.81 ~ 10.13 范围内时,两组分的相对迁移时间(组分的迁移时间与溶剂甲醇峰的迁移时间之差)及分离度随 pH 值的变化关系见图 2。可见,在此 pH 范围内,随着 pH 值的增大,两

组分的相对迁移时间延长,分离度则在 pH 值等于 9.98 时达到最大。

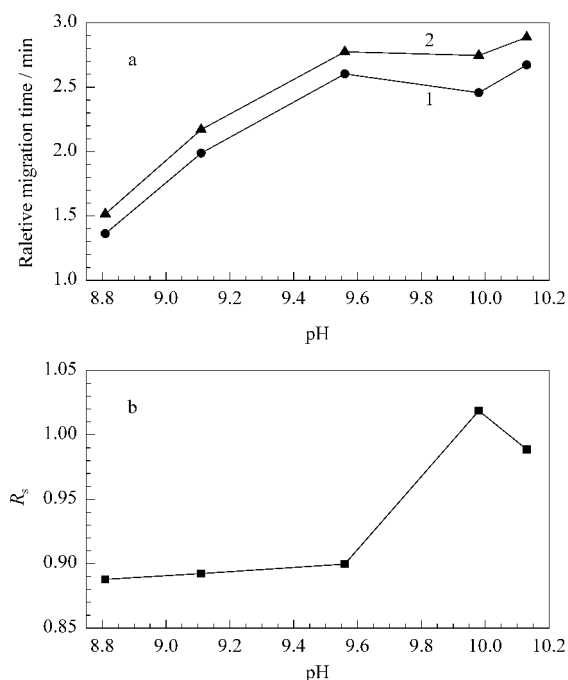


图2 pH对龙血素A和龙血素B(a)相对迁移时间和(b)分离度的影响

Fig. 2 Effects of pH on (a) relative migration times and (b) resolution for separation of loureirin A and loureirin B

Capillary electrophoresis (CE) conditions: running buffer, 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ with different pH values adjusted with NaOH solution or HCl solution; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 25 °C; detection wavelength, 211 nm; standard solution concentrations of loureirin A and loureirin B, 100 mg/L; injection, 5 s at 3447 Pa.

1. loureirin B; 2. loureirin A.

在固定 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液 pH 为 9.98 (用 NaOH 溶液调节) 的基础上,考察了缓冲溶液中硼砂浓度对分离的影响。结果表明,当分离电压为 20 kV、毛细管柱温为 25 °C 时在 15 ~ 30 mmol/L 范围内,随着 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 浓度的增加,龙血素 A 和龙血素 B 的迁移时间分别由 7.056 min 和 7.147 min 延长到了 8.917 min 和 9.151 min,而且基线噪声明显增加,分离度则在 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 浓度为 20 mmol/L 时达到了最大值(1.0187)。可见,仅仅通过优化 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 的浓度,无法使龙血素 A 和龙血素 B 达到基线分离。为了缩短分析时间,得到好的峰形和基线,实验将缓冲溶液中 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 的浓度选为 20 mmol/L。

2.2 添加剂对分离的影响

为了实现龙血素 A 和龙血素 B 的基线分离,考察了在电解质溶液中加入乙腈作为添加剂,并考察了其含量为 5% ~ 20% 时对分离的影响。结果表明,乙腈的加入虽然会使两组分的相对迁移时间大幅度

延长(见图 3a),但是能使两组分的峰形收敛,分离度有所增加。综合考虑分离度和分析时间,实验选择在电解质溶液中加入 10% 的乙腈。

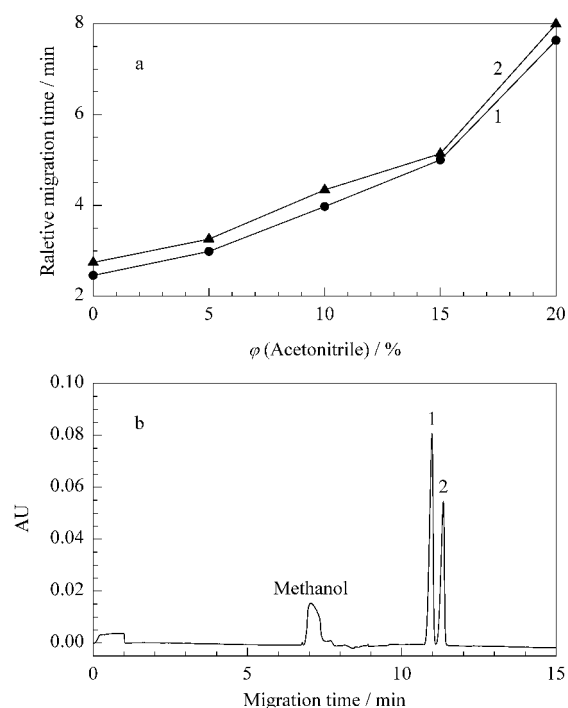


图3 (a) 电解质溶液中乙腈添加量对相对迁移时间的影响和 (b) 混合标准溶液在含有 10% (v/v) 乙腈的 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液 (pH 9.98) 中的电泳图

Fig. 3 (a) Effect of content of acetonitrile in running buffer on relative migration times and (b) electropherogram of the mixture of loureirin A and loureirin B standards in 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution (pH 9.98) containing 10% (v/v) acetonitrile as running buffer

Other CE conditions and the peak identifications were the same as those in Fig. 2.

在电解质溶液中添加了 10% 乙腈后,混合标准溶液中的两个组分基本得到了有效分离(见图 3b),但是将方法应用于实际样品分析时却未能得到满意的结果。因此,实验还考察了其他添加剂如乙二醇、乙醇、正丁醇、 β -环糊精、十二烷基磺酸钠(SDS)等对分离的影响。结果表明,除了乙二醇和正丁醇的加入对分离度有一定的改善外,其他添加剂对分离度的改善效果均不理想。

考察在含有 10% 乙腈的缓冲溶液中添加 1% ~ 7% 乙二醇对分离的影响时发现,随着乙二醇含量的增加,两组分的相对迁移时间均明显增加(见图 4a),分离度呈先增加后下降的趋势,当乙二醇含量为 5% 时,两组分的分离度达到最大,此时的混合标准溶液的电泳图见图 4b。

为了进一步提高龙血素 A 和龙血素 B 的分离度,考察了在上述选定的电解质溶液中加入正丁醇

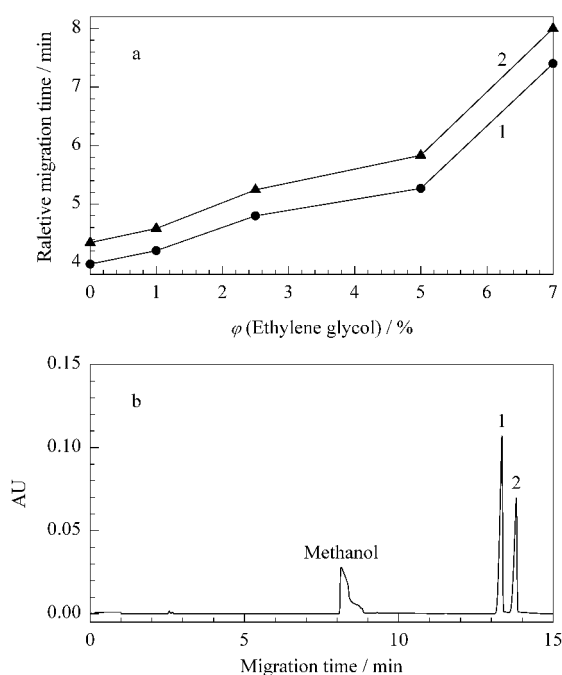


图 4 (a) 电解质溶液中乙二醇的添加量对相对迁移时间的影响和 (b) 混合标准溶液在含有 10% (v/v) 乙腈及 5% (v/v) 乙二醇的 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液 (pH 9.98) 中的电泳图

Fig. 4 (a) Effect of content of ethylene glycol in running buffer on relative migration times and (b) electropherogram of the mixture of loureirin A and loureirin B standards in 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution (pH 9.98) containing 10% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) ethylene glycol as running buffer

Other CE conditions and the peak identifications were the same as those in Fig. 2.

对分离的影响。结果表明,正丁醇的加入可以进一步增加龙血素 A 和龙血素 B 的分离度,并且在正丁醇的添加量为 1% 时效果最好,此时龙血素 A 和龙血素 B 的分离度达到了 2.212。

2.3 分离电压、柱温和进样时间对分离的影响

在上述选定的电解质溶液中,试验了分离电压、毛细管柱温和进样时间对分离的影响。结果表明,固定柱温为 25 °C,当分离电压由 15 kV 增加到 30 kV 时,龙血素 A 和龙血素 B 的迁移时间分别由 14.578 min 和 15.065 min 缩短到 10.614 min 和 11.079 min,同时基线噪声增加,分离度由 2.238 降至 1.851。在分离电压保持为 20 kV 的条件下,将毛细管柱温由 20 °C 升高到 30 °C,龙血素 A 和龙血素 B 的迁移时间由 14.228 min 和 14.709 min 缩短到 12.763 min 和 13.227 min,但基线噪声大幅度增大,峰形逐渐变差。固定进样压力为 3 447 Pa,增加进样时间,检测灵敏度增加,但峰形在进样时间大于 5 s 后逐渐变差。综合考虑两组分的峰形、分析时

间、分离度以及基线噪声等因素后,选用了分离电压为 20 kV、毛细管柱温为 25 °C、3 447 Pa 进样 5.0 s 的电泳条件。

在上述选定的实验条件下,混合标准溶液及代表性样品溶液的电泳图见图 5。可见,在此条件下,不仅龙血素 A 和龙血素 B 达到了完全分离,而且它们与样品中其他共存组分之间也达到了有效分离。

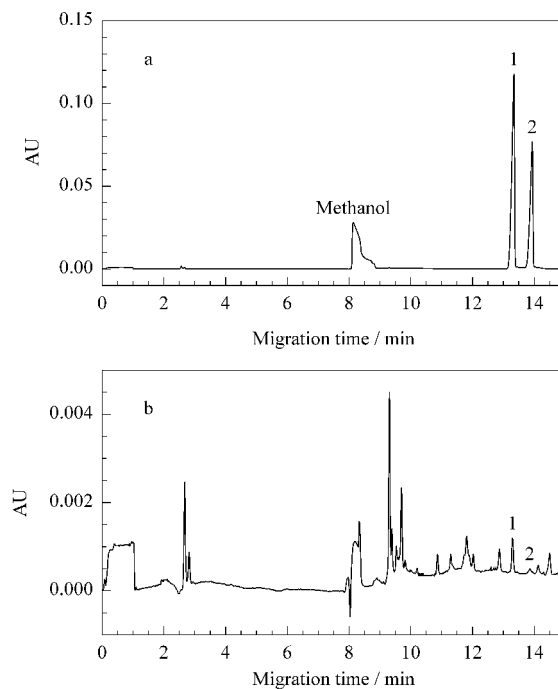


图 5 (a) 龙血素 A 和龙血素 B 混合标准溶液 (100 mg/L) 和 (b) 树干上天然形成的血竭样品溶液的电泳图

Fig. 5 Electropherograms of (a) a mixture of loureirin A and loureirin B standards (100 mg/L) and (b) a natural dragon's blood sample obtained from trunks

The peak identifications were the same as those in Fig. 2. The separation was carried out in 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution (pH 9.98) containing 10% (v/v) acetonitrile, 5% (v/v) ethylene glycol and 1.0% (v/v) butanol as running buffer under the conditions of applied voltage of 20 kV, capillary temperature of 25 °C, detection wavelength of 211 nm, and injection of 5 s at 3447 Pa.

2.4 工作曲线和方法的精密度

在选定的最佳电泳介质及仪器条件下,对一系列不同浓度的龙血素 A 和龙血素 B 混合标准溶液进行电泳分析,并以组分的峰面积 A 为纵坐标,其质量浓度 C (mg/L) 为横坐标进行回归分析,得到的两组分工作曲线的线性回归方程、相关系数及线性范围见表 1。同时,试验对质量浓度均为 50 mg/L 的龙血素 A 和龙血素 B 混合标准溶液进行 5 次平行测定,计算两组分的峰面积 A 与迁移时间 t 的相对标准偏差 (RSD),结果见表 1。可见,方法具有较宽的线性范围,较高的灵敏度,并且快速、简单、重现

性较好。

表 1 龙血素 A 和龙血素 B 的线性关系与方法的精密度

Table 1 Linear relationships and precisions (RSD) of the method for the determination of loureirin A and loureirin B

Component	Linear range / (mg/L)	Regression equation	Correlation coefficient	Migration time/min	RSD (n=5) /%	
					Migration time	Peak area
Loureirin A	1.0 - 100.0	A = 4302.22C - 1142.02	0.9993	13.94	0.32	2.43
Loureirin B	0.5 - 100.0	A = 7634.90C - 3018.74	0.9996	13.34	0.21	2.81

A: peak area; C: mass concentration, mg/L.

2.5 样品分析

按 1.2 节的实验方法将样品 1 和样品 2、样品 3 至样品 6 分别处理成样品溶液,然后用本文所建立的 CZE 方法进行分离测定,代表性样品的电泳图见图 5b。图 5b 中组分的定性识别采用标准加入法,样品中各组分的含量分析采用外标工作曲线法,测

定结果的准确性用加标回收试验进行验证。各组分在浸膏中的含量测定结果和加标回收率测定结果均列于表 2 中。可见,所有样品中龙血素 A 和龙血素 B 测定结果的相对标准偏差均在 5.0% 以内,加标回收率均在 95% ~ 106% 之间,表明测定结果准确可靠。

表 2 不同来源血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的含量及加标回收率 (n=3)

Table 2 Contents and recoveries of loureirin A and loureirin B in dragon's blood (n=3)

Sample ¹⁾	Loureirin A				Loureirin B			
	Content		Added / (mg/g)	Recovery / %	Content		Added / (mg/g)	Recovery / %
	Background ²⁾ / (mg/g)	RSD /%			Background ²⁾ / (mg/g)	RSD /%		
1	3.12	1.5	2.00	95.7 - 101.8	0.68	2.7	0.50	95.8 - 102.3
			3.00	96.1 - 103.9			1.00	97.4 - 102.8
			4.00	95.9 - 103.6			1.50	97.6 - 104.7
2	1.45	3.6	0.75	95.2 - 104.6	- ³⁾	-	0.50	96.5 - 105.8
			1.50	97.9 - 105.3	0.75	95.7 - 104.4		
			2.00	96.4 - 104.1	1.00	96.9 - 103.7		
3	0.81	2.8	0.50	96.6 - 105.2	0.59	3.8	0.25	98.2 - 103.9
			1.00	98.6 - 103.7			0.50	96.8 - 104.6
			1.50	95.9 - 102.2			1.00	101.2 - 104.3
4	-	-	0.25	95.1 - 104.6	0.46	3.1	0.25	95.0 - 104.7
			0.50	96.2 - 105.7			0.50	96.9 - 105.3
			1.00	100.8 - 104.9			1.00	95.9 - 104.1
5	1.05	1.4	0.50	97.8 - 103.2	1.27	0.6	0.50	98.0 - 103.7
			1.00	96.5 - 102.9			1.00	99.1 - 103.5
			2.00	97.2 - 101.4			1.50	96.1 - 104.8
6	0.33	1.6	0.15	96.1 - 103.4	0.98	3.5	0.50	96.4 - 105.7
			0.30	97.7 - 104.8			1.00	98.2 - 105.1
			0.50	98.1 - 102.6			1.50	95.8 - 104.9

1) Sample 1 and sample 2 were the natural dragon's blood obtained from trunks and leave, respectively; sample 3 to sample 6 were the dragon's blood inoculated by strain named as 2617[#], 6113[#], 7121[#] and 266[#], respectively. 2) contents of loureirin A and loureirin B in the sample. 3) -: not determined.

由表 2 的结果还可以发现,在剑叶龙血树的树干上天然形成的血竭中含有较高的龙血素 A 和龙血素 B,但树叶上天然形成的血竭中仅含有少量的龙血素 A,且不含龙血素 B,说明树叶难以直接作为血竭的开发原料。树干经不同真菌诱导后也能形成血竭,且除了编号为 6113[#] 的菌株诱导的血竭中没有检测到龙血素 A,其余菌株诱导的血竭中都既含有一定量的龙血素 A,也含有较高量的龙血素 B,说明用人工诱导的方式可以生产有应用价值的血竭,

这对血竭资源的开发具有参考价值。

3 结语

实验结果表明,本文所建立的同时分离测定龙血素 A 和龙血素 B 的毛细管区带电泳法不仅准确度高,重现性好,而且分析速度较快,可以应用于天然血竭及人工诱导血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的分离分析。

参考文献:

- [1] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. J Ethnopharm, 2008, 115 (3): 361
- [2] Xu H Y, Zhang X Y. Acta Chinese Medicine and Pharmacology (徐红英, 张晓燕. 中医学报), 2011, 39(4): 101
- [3] Li Y J, Li Y Z, Yang Z Z, et al. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50: 983
- [4] Li Z Q, Xiang D. West China Journal of Pharmaceutical Science (李忠琼, 向东. 华西药理学杂志), 2005, 20(4): 348
- [5] Hu Y Q, Zhang Q Y, Hu X G, et al. Traditional Chinese Medicine Patent Prescription (胡迎庆, 张庆云, 胡孝国, 等. 中成药), 2002, 24(12): 962
- [6] Xu J, Jin H Y, Sun L. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (许佳, 金红宇, 孙磊. 药物分析杂志), 2011, 31(11): 2058
- [7] Chen D F, Song Q S. Chinese Traditional and Herbal Drugs (陈定芳, 宋启示. 中草药), 2005, 36(10): 1545
- [8] Bai C T, Lü Z F, Wu W Y, et al. China Pharmacist (白才堂, 吕竹芬, 邬威尧, 等. 中国药师), 2010, 13(10): 1465
- [9] Yi T, Chen H B, Zhao Z Z, et al. J Ethnopharm, 2011, 133: 796
- [10] Carlucci F, Tabucchi A. J Chromatogr B, 2009, 877: 3347
- [11] Qian J X, Yang X J, Chen Z G. Chinese Journal of Chromatography (钱金雄, 杨秀娟, 陈缵光. 色谱), 2011, 29(4): 298
- [12] Lin Z Y, Huang L, Chen G N. Chinese Journal of Chromatography (林振宇, 黄露, 陈国南. 色谱), 2009, 27(1): 9
- [13] Tian S J, Hu C Q, Ma S C. Application of Chromatography in Drugs' Analysis. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (田颂九, 胡昌勤, 马双成. 色谱在药物分析中的应用. 2版. 北京: 化学工业出版社), 2004: 147