

胶束电动毛细管电泳法快速分离测定 南、北五味子中木脂素类成分

李坦¹, 孙绩岩², 苑广信², 孙新^{1*}

(1. 北华大学生命科学中心, 吉林 132013; 2. 北华大学药学院, 吉林 130021)

〔摘要〕 目的:建立胶束电动毛细管电泳法测定五味子中 6 种木脂素类成分的方法。方法:探讨了缓冲溶液、添加剂、分离电压、温度和进样条件等因素对分离检测的影响。在 10 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲溶液(35% 乙腈,37.5 mmol·L⁻¹ SDS,pH 8.0)、分离电压为 28.0 kV 的优化条件下,9 min 内可实现五味子样品溶液的分析。结果:线性范围分别为 25.5~1 020,25.75~1 030,12.0~480,25.5~1 020,24.25~970,19.75~790 mg·L⁻¹;检出限为 0.5,0.8,1.0,1.0,1.0,1.5 mg·L⁻¹。结论:该方法与高效液相色谱法比较,在分离效果、柱效和分析速度方面具有明显优势。

〔关键词〕 胶束电动毛细管电泳法;五味子;木脂素
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0067-05
〔doi〕 10.11653/syfy2014050067
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1416.015.html>
〔网络出版时间〕 2013-12-18 14:16

Rapid Determination of Six Lignans in *Schisandra Chinensis* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

LI Tan¹, SUN Ji-yan², YUAN Guang-xin², SUN Xin^{1*}

(1. Research Center for Life Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Beihua University, Jilin 130021, China)

〔Abstract〕 **Objective:** A micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was developed for the rapid determination of six lignans in *Schisandra chinensis*. **Method:** The key factors for separation and determination were studied and the best analysis conditions were obtained, in the background electrolyte of 10 mmol·L⁻¹ phosphate (35% acetonitrile, 37.5 mmol·L⁻¹ SDS, pH 8.0) at the separation voltage of 28.0 kV, the *Schisandra* extract could be detected within 6 min. **Result:** The lignans showed good linear response in the range of 25.5-1 020, 25.75-1 030, 12.0-480, 25.5-1 020, 24.25-970 and 19.75-790 mg·L⁻¹, the limit of detection was 0.5, 0.8, 1.0, 1.0, 1.0 and 1.5 mg·L⁻¹. **Conclusion:** Compared with high-performance liquid chromatography (HPLC), the MEKC analyses offers high separation efficiencies and rapid analyses.

〔Key words〕 Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC); *Schisandra chinensis*; lignans

五味子为传统中药,主要植物基源包括五味子和华中五味子的干燥成熟果实^[1],两者外形和功效相近。一般认为其含有的木脂素类成分为主要生理活性成分,五味子木脂素成分复杂^[2-4],其中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素 6 种木脂素是五味子中广泛存在

〔收稿日期〕 20130702(012)
〔基金项目〕 吉林省科技发展计划项目(20111809)
〔第一作者〕 李坦,学士,讲师,从事营养学相关工作,Tel:0432-64608351,E-mail:litan7248@163.com
〔通讯作者〕 *孙新,博士,教授,硕士生导师,从事老化相关疾病研究,Tel:0432-64608351,E-mail:sunxinbh@126.com

的主要活性成分^[5-8]。

毛细管电泳(CE)具有分析速度快、柱效高、不易污染等优点,在复杂基质的中药成分分析方面具有独特优势^[9-11]。目前尚无使用 CE 法同时分离检测五味子中 6 种主要木脂素的相关报道,těrbová 等采用胶束电动毛细管电泳法(MEKC)测定了北五味子中 4 种木脂素的含量^[12],但其在样品处理、缓冲盐和添加剂选择等方面缺乏系统的研究,分析时间较长,测定的木脂素种类也较少。本文系统研究了 MEKC 法中各因素对五味子木脂素分离测定的影响,建立了可快速分离检测五味子中 6 种主要木脂素的胶束电动毛细管电泳法,为五味子药材的评价和质量控制提供一种新方法。

1 材料

Agilent CE 型毛细管电泳仪,配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);未涂层石英毛细管(50 $\mu\text{m} \times 56 \text{ cm}$,有效长度 47.5 cm,河北永年锐沣色谱器件有限公司)。

南五味子药材购于河北安国药材市场,辽宁丹东、辽宁本溪、吉林汪清、黑龙江尚志、黑龙江虎林产北五味子分别购于当地药材市场;五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素对照品(中国药品生物制品检定所 110704-200921, 120904-200914, 110703-201027, 110833-200904, 120807-200924, 110706-201025),二烷基硫酸钠(SDS)(Geneview 进口分装,北京鼎国生物公司),甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯(国药制药有限公司,上海),其他试剂均为分析纯,实验用水为 Millipore 制备的超纯水。

2 方法

2.1 对照品和供试品溶液的制备 称取五味子醇甲对照品 10.0 mg、五味子醇乙对照品 10.0 mg、五味子酯甲对照品 8.0 mg、五味子甲素对照品 10.0 mg、五味子乙素对照品 10.0 mg、五味子丙素对照品 8.0 mg,分别加适量甲醇超声溶解后定容于 10 mL 量瓶中,得 1.00,1.00,0.80,1.00,1.00,0.80 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。分别吸取上述对照品储备液各 200 μL ,置 2 mL 离心管中,漩涡震荡混匀后氮气吹干,残渣加 500 μL 运行缓冲液溶解,超声 20 min,得混合对照品溶液。

干燥五味子药材粉碎后过 100 目筛,称取药材粉末 10.0 g,加甲醇 300 mL,超声提取 10 min,振摇后静置 10 min,过滤,滤渣加 150 mL 甲醇,超声提取 10 min $\times$ 2 次,合并 3 次滤液,减压蒸干,残渣用甲醇

溶解并定容至 100 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。取该溶液 2 mL,减压蒸干,残渣用运行缓冲液溶解并定容至 2 mL,过 0.22 μm 滤膜后既得供试品溶液。

2.2 电泳条件 运行缓冲液为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(37.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS,35% 乙腈,pH 8.0),50 mbar 压力进样 3 s,工作电压 28 kV,检测波长 214 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

毛细管在使用前,分别用 1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液、 H_2O 和运行缓冲液各冲洗 10 min,每次进样前用运行缓冲液冲洗 4 min,以确保较好的重复性。

3 结果与讨论

3.1 缓冲溶液的选择 研究了 HAC-NaAC、柠檬酸-柠檬酸钠、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 和硼酸-硼砂缓冲体系对五味子 6 种木脂素分离效果的影响。结果发现,在 HAC-NaAC、柠檬酸-柠檬酸钠等酸性缓冲体系中,五味子木脂素不出峰;在 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 、硼酸-硼砂等碱性缓冲体系中,五味子木脂素可出峰,但峰形和分离度较差。经初步优化,在 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS,10% 甲醇)条件下可得到较好的分离效果,但分析时间较长(36 min)。为得到最佳分离效果,继续对分离条件进行优化。

3.2 缓冲液浓度的选择 考察不同浓度(5 ~ 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 对分离的影响,结果显示,各组分迁移时间随缓冲液浓度增加而增加,综合考虑迁移时间、峰形和灵敏度等因素,选择 10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 为运行缓冲液。

3.3 有机改性剂的影响 缓冲体系中加入有机改性剂可影响迁移时间、灵敏度、分离效果和柱效,考察了甲醇、乙醇和乙腈不同加入量对分离的影响。结果发现,缓冲液中加入甲醇和乙醇使迁移时间增加,加入一定量的乙腈使迁移时间缩短。比较了 20% ~ 40% 乙腈对分离的影响,结果见图 1,迁移时间和分离度随乙腈比例的增加明显减小,当乙腈比例超过 35% 后,样品中杂质峰与五味子醇乙和五味子乙素不能完全分离,影响测定。综合考虑迁移时间和分离度,选择 35% 的乙腈做为有机改性剂。

3.4 溶液 pH 的影响 考察缓冲液不同 pH(7.0 ~ 9.0)对分离的影响,见图 2,随溶液 pH 的增加,迁移时间逐渐减小;而分离度先增加(7.0 ~ 8.0)后降低(8.0 ~ 9.0),综合考虑分离度和迁移时间,选择 pH 8.0 的缓冲液作为电泳运行缓冲液。

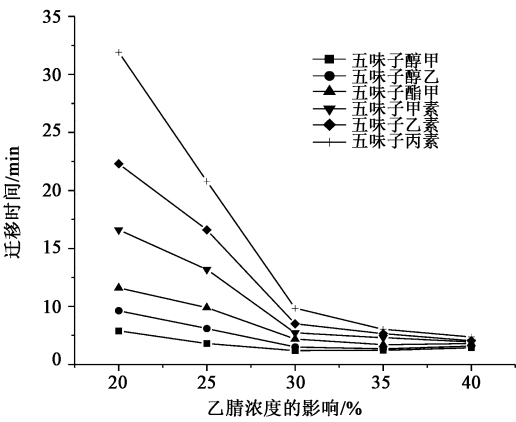


图 1 乙腈浓度的影响

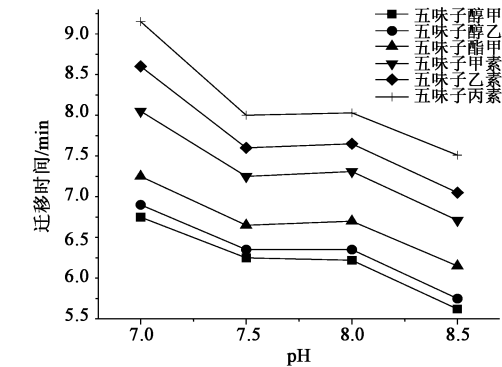


图 2 溶液 pH 的影响

3.5 表面活性剂的影响 SDS 是最常用的阴离子表面活性剂,考察了 27.5 ~ 42.5 mmol·L⁻¹ SDS 对分离的影响,见图 3,随 SDS 浓度的增大,迁移时间和分离度逐渐增大,而柱效降低。综合考虑迁移时间、分离度和柱效,最佳 SDS 浓度为 37.5 mmol·L⁻¹。

3.6 分离电压、温度和进样时间的选择 在 20.0 ~ 30.0 kV 分离电压下进样分析。结果表明,提高电压可以提高柱效和加快分析速度。但电压太高时,随分析时间的缩短和焦耳热效应,分离度变差。优化条件为 28.0 kV。

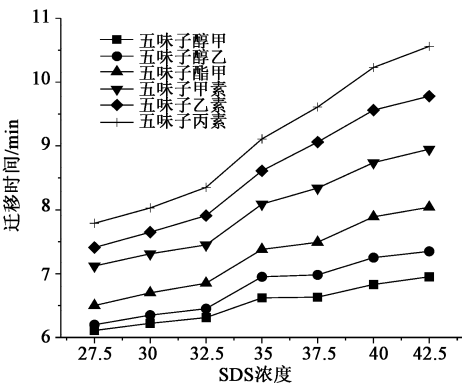


图 3 SDS 浓度的影响

考察温度在 15 ~ 30 ℃ 对分离的影响。结果表明,随温度的升高,分析速度加快,这是因为温度升高溶液的黏度降低,从而缩短迁移时间。但温度过高,分析时间太短,同时样品扩散也加快,导致分离度变差。优化条件为 25 ℃。

采用压力进样,进样量受进样压力和进样时间的影响。进样量太小时难以检出;进样量过大则会导致区带展宽,分离度变差。优化条件为 50 mbar 进样 3 s。

3.7 方法学验证 在优化条件下,取混合对照品溶液重复进样 6 次,测定峰面积并计算 RSD,见表 1。以 6 种木脂素浓度 ($X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和峰面积 (Y) 作图,回归方程、线性范围和检出限见表 1。

将高中低 3 个浓度的对照品溶液加入丹东产北五味子样品溶液中,测得回收率见表 2。

3.8 样品分析 取不同产地的五味子样品(1 号为湖南产南五味子,2 ~ 6 号分别为辽宁丹东、辽宁本溪、吉林汪清、黑龙江尚志、黑龙江虎林产北五味子),分别用本文建立的 MEKC 法和 HPLC 法^[13]测定 6 种主要木脂素含量,结果见表 3,两种方法所得结果接近。辽宁省丹东市产北五味子电泳图和湖南产南五味子的电泳图见图 4。

表 1 线性、检出限和重复性

被测物质	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 /mg·L ⁻¹	检出限 (S/N = 3) /mg·L ⁻¹	重复性 RSD /% (n = 6)
五味子醇甲	$Y = 0.8188X - 3.8212$	0.9995	25.5 ~ 102.0	0.5	1.08
五味子醇乙	$Y = 0.421X + 6.5037$	0.9994	25.75 ~ 103.0	0.8	1.19
五味子酯甲	$Y = 0.3816X - 3.3545$	0.9993	12.0 ~ 480	1.0	1.79
五味子甲素	$Y = 0.3946X + 2.4609$	0.9991	25.5 ~ 102.0	1.0	1.83
五味子乙素	$Y = 0.2706X - 0.7141$	0.9993	24.25 ~ 970	1.0	1.80
五味子丙素	$Y = 0.1474X + 4.9927$	0.9983	19.75 ~ 790	1.5	1.98

表 2 五味子样品中 6 种成分加标回收率

成分	本底值	加入量	测得值	回收率	RSD
	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/%	/%(n=3)
五味子醇甲	358.8	400	743.62	98.0	2.0
		200	543.71	97.3	2.3
		100	451.92	98.5	2.5
五味子醇乙	213.95	400	622.55	101.4	2.3
		200	417.26	100.8	2.7
		100	321.8	102.5	3.1
五味子酯甲	102.5	200	294.94	97.5	3.3
		100	191.16	94.4	2.4
		50	144.88	95.0	2.7
五味子甲素	63.1	200	259.15	98.5	2.0
		100	159.19	97.6	2.8
		50	114.57	101.3	2.6
五味子乙素	146.95	200	348.34	100.4	1.8
		100	252.14	102.1	2.2
		50	202.66	102.9	2.4
五味子丙素	30.9	100	122.39	93.5	2.6
		50	77.91	96.3	2.9
		25	51.54	92.2	3.9

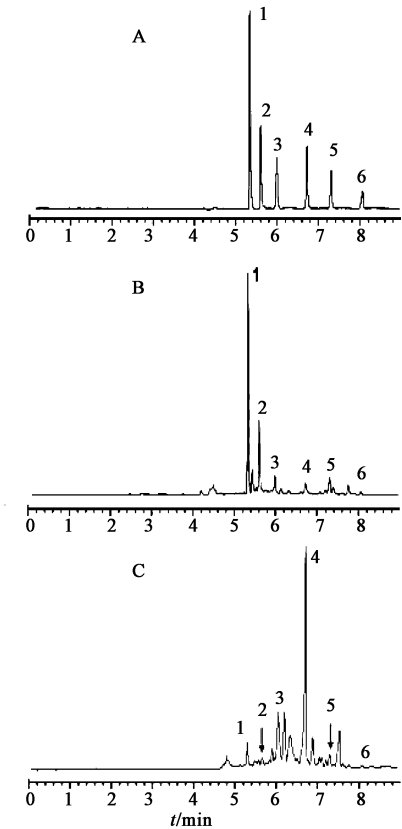


图 4 混合对照品 (A)、北五味子 (B) 和南五味子 (C) 电泳

表 3 MEKC 法和 HPLC 法样品测定结果对比

No.	五味子醇甲		五味子醇乙		五味子醇甲		五味子甲素		五味子乙素		五味子丙素	
	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC	MEKC	HPLC
1	1.058	1.143	0.623	0.652	4.521	4.997	5.821	5.523	0.496	0.434	0.761	0.800
2	7.176	6.937	4.279	4.031	2.050	2.163	1.262	1.374	2.939	3.188	0.618	0.694
3	4.730	4.532	3.550	3.375	0.993	1.094	0.811	0.856	3.398	3.611	0.536	0.562
4	6.142	5.999	3.436	3.272	1.892	1.993	1.206	1.327	3.744	3.952	1.275	1.390
5	6.255	6.041	4.289	4.127	2.254	2.482	1.045	1.138	3.602	3.828	0.593	0.621
6	4.851	4.665	4.838	4.620	1.409	1.556	0.887	0.953	3.553	3.787	0.838	0.918

4 结论

本文采用胶束电动毛细管电泳法实现了五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素 6 种主要木脂素的同 时分离测定。通过系统研究各因素对分离测定的影响,确定了最佳电泳条件,使分析速度较现有方法大幅提高(本法 8.2 min,文献报道 MEKC 法 18 min 以上,HPLC 30 min 以上)。利用本方法测定 10 个不同产地的五味子样品,所得结果与 HPLC 法相近,本研究可为五味子药材的评价和质量控制提供一种更快速、全面、科学的新方法。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:44.

[2] 张延妮,岳宜峰,王喆之. 反相高效液相色谱同时测定五味子中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素的含量[J]. 分析科学学报,2007,23(1):41.

[3] 谭晓虹,王志宝,赵倩. HPLC 测定南、北五味子中五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 中成药,2010,32(1):155.

[4] 张村,肖永庆,李丽,等. 五味子鲜果不同部位的化学成分比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):37.

脱脂炒莱菔子提取物 HPLC 指纹图谱

刘梅,李书云,吕文海^{*}
(山东中医药大学,济南 250355)

〔摘要〕 目的:建立脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱。方法:依利特 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~28 min,5%~30% A;28~30 min,30%~70% A;30~51 min,70%~88% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 225 nm,柱温 30℃。结果:建立了脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱,共标示出 10 个共有峰;不同产地脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱相似度>0.96。结论:该方法准确稳定,重复性好,可为脱脂炒莱菔子提取物的定性鉴别提供依据。

〔关键词〕 脱脂炒莱菔子提取物;高效液相色谱;指纹图谱
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0071-04
〔doi〕 10.11653/syfy2014050071
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1418.017.html>
〔网络出版时间〕 2013-12-18 14:18

HPLC Fingerprint of the Extract of Physical Defatted Roasted Raphani Semen

LIU Mei, LI Shu-yun, LV Wen-hai^{*}
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

〔收稿日期〕 20130306(020)
〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(81173554)
〔第一作者〕 刘梅,硕士研究生,从事中药炮制研究,Tel:13793153591,E-mail:xiongmiao0108@126.com
〔通讯作者〕 ^{*} 吕文海,教授,从事饮片炮制理论与制备规范化研究,Tel:0531-89628081,E-mail:luwenhaitcm@163.com

[5] 黄鑫,宋凤瑞,刘志强,等. 五味子中木脂素类成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 化学学报,2008,66(9):1059.

[6] 黄文倩,李丽,肖永庆,等. HPLC 同时测定五味子中 6 种木脂素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):63.

[7] 赵玥,王冰. 辽宁凤城地区不同生长环境五味子 5 种木脂素成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):64.

[8] 楼招欢,吕圭源,陈素红. 南、北五味子及其炮制品中木脂素类成分比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):43.

[9] 高玲. 毛细管电泳在中药分析中的应用进展[J]. 赤峰学院学报:自然科学版,2009,25(9):102.

[10] 张丽媛. 毛细管电泳药物分析研究进展[J]. 固原师专学报:自然科学,2006,27(6):31.

[11] 吴娟芳,陈令新,罗国安,等. 毛细管电泳技术在药物分析中的应用研究进展[J]. 药学学报,2006,41(5):385.

[12] Sterbová H, Sevcíková P, Kvasnicková L, et al. Determination of lignans in *Schisandra chinensis* using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis,2002, 23 (2):253.

[13] Lenka Březinová, Helena Vlášínová, Ladislav Havel. Validated method for bioactive lignans in *Schisandra chinensis in vitro* cultures using a solid phase extraction and a monolithic column application [J]. Biomed Chromatogr, 2010(24):954.

〔责任编辑 顾雪竹〕