

三种黄酮类化合物在高效毛细管电泳中电泳行为的研究*

□刘玉婕 李国玉 杨炳友 匡海学** (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘要:目的:研究芦丁、槲皮素、山萘酚等黄酮类成分在毛细管中的迁移行为与电压、缓冲溶液 pH 值及其离子浓度的关系。方法:在室温下,分别考察电压、缓冲液 pH 值及缓冲液离子浓度对分离度的影响。结果:3 种黄酮类物质在 pH 值 8.65、电压 20KV、缓冲液离子浓度 12mmol/L 条件下为最佳。结论:对于 3 种物质在毛细管电泳中的迁移行为,缓冲液的 pH 值对各峰的分离度起主要作用,电压和缓冲液的离子浓度主要影响各峰的出峰时间。

关键词:毛细管电泳 芦丁 槲皮素 山萘酚

高效毛细管电泳作为一种分析手段,20 世纪 80 年代后期在全世界范围内得到了迅速的发展^[1],在化学、生命科学、临床医学、药学等领域得到了广泛的应用^[2-9]。

本文主要研究了存在于诸多中药中的芦丁、槲皮素、山萘酚 3 种黄酮类化合物在高效毛细管电泳中的行为与电压、缓冲溶液酸碱度及其离子浓度之间的关系,为探索用毛细管电泳法对不同的黄酮类化合物进行分析测定提供实验基础。

一、实验部分

1. 仪器与试剂

P/ACE™MDQ 毛细管电泳仪(美国贝克曼公司),紫外 PDA 检测器。毛细管为 60cm (有效长度 50 cm × 75 μm (内径)石英毛细管(河北永年光纤厂)。赛多

利斯 PB-21 型酸度计(德国赛多利斯股份有限公司)。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠均为试剂纯。标准品芦丁(中国药品生物制品检定所)、槲皮素(北京药品生物制品检定所)、山萘酚(中国药品生物制品检定所)为含量测定用。实验所用的其它试剂均为分析纯。

2. 样品及缓冲溶液的制备

(1) 样品制备。

分别配置浓度约 1mg/mL 的标准品甲醇溶液。分别取等体积各标准溶液混匀,加少许缓冲溶液,过滤。

(2) 缓冲溶液的制备。

①分别配置浓度为 30mmol/L 的磷酸一氢钠和磷酸二氢钠缓冲溶液,50mmol/L 的氢氧化钠溶液。

②精密移取①中配置的磷酸一氢钠和磷酸二氢钠缓冲溶液各 5mL,加入 50mmol/L 的氢氧化钠溶液 5mL,定容至 25mL,混匀,测定 pH 为 7.93。以同法加

收稿日期:2005-05-22

修回日期:2006-08-14

* 黑龙江中医药大学基金项目(200519):高效毛细管电泳法评价洋金花、类叶牡丹质量的研究,负责人:刘玉婕。

** 联系人:匡海学,教授,主要从事中药及复方的药效物质基础研究,Tel:0451-82110803,E-mail:hxkuang@hotmail.com。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 57

入不同体积的氢氧化钠溶液分别配置 pH 为 8.44, 8.65, 9.04, 9.42, 9.86 的缓冲溶液, 过滤。

③分别配置浓度为 60mmol/L 的磷酸一氢钠和磷酸二氢钠缓冲溶液, 各取 5mL, 稀释至浓度为 20mmol/L, 加浓碱调 PH 为 8.6。同法配置离子浓度分别为 30mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L 的缓冲溶液, 过滤。

二、结果与讨论

1. 电压与迁移时间、峰形和分离度的关系

在离子对浓度 12mmol/L, pH 值 8.65 的条件下, 改变电压, 观察各峰的行为, 结果见图 1。以芦丁的出峰时间为 1, 山萘酚和槲皮素相对于芦丁的出峰时间做表, 结果见表 1。

从图 1 中可见各峰的迁移时间随电压的减小而延长。从表 1 可知, 在 pH 值和离子浓度一定的条件下, 改变电压, 山萘酚和槲皮素的相对出峰时间基本无变化, 因此改变电压, 不会改变各峰之间的分离度。所以电压不是影响各峰分离度的主要因素。

2. pH 值与迁移时间、峰形和分离度的关系

在电压为 20 KV, 离子对浓度为 12mmol/L 的条件下, 改变缓冲溶液的 pH 值, 观察各峰的行为, 结果见图 2。以芦丁的出峰时间为 1, 山萘酚和槲皮素相对于芦丁的出峰时间做表, 结果见表 2

从表 2 中可以看出, 在电压和离子浓度一定的条件下, 改变 pH 值, 山萘酚和槲皮素的相对出峰时间延长, 而且山萘酚与槲皮素之间的相对出峰时间也延长了。因此改变缓冲溶液 pH 值, 会改变各峰之间的分离度, 从图 2 中可见各峰的相对迁移时间延长了, 各峰之间的分离度好。所以缓冲溶液 pH 值是影响各峰峰形、分离度的主要因素。

3. 离子对浓度与迁移时间、峰形和分离度的关系

在电压为 20kv, pH 为 8.65 的条件下, 改变缓冲溶液离子对浓度, 观察各峰的行为, 结果见图 3。以芦丁的出峰时间为 1, 山萘酚和槲皮素相对于芦丁的出峰时间做表, 结果见表 3。

从表 3 中可以看出, 在电压和 pH 值一定的条件

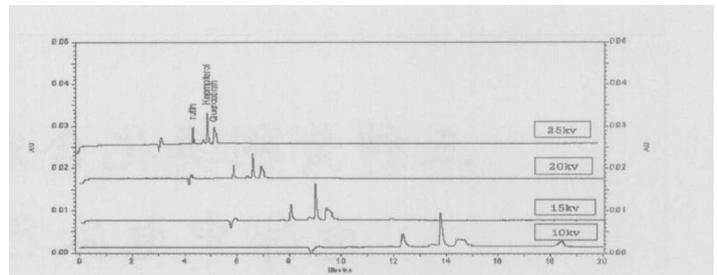


图 1 不同电压下的 HPCE 图

表 1 不同电压下各峰的相对迁移时间表

	25kv	20kv	15kv	10kv
芦丁	1	1	1	1
山萘酚	1.12	1.12	1.12	1.12
槲皮素	1.18	1.18	1.18	1.18

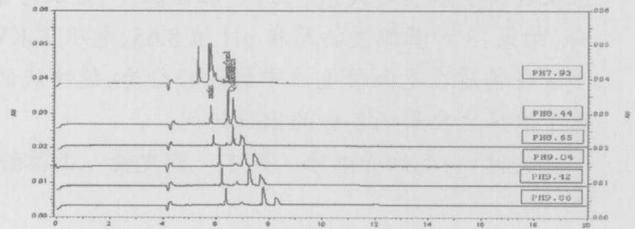


图 2 缓冲溶液不同 pH 值下的 HPCE 图

表 2 缓冲溶液不同 pH 值下各峰的相对迁移时间表

	7.93	8.44	8.65	9.04	9.42	9.86
芦丁	1	1	1	1	1	1
山萘酚	1.07	1.11	1.12	1.15	1.17	1.22
槲皮素	1.09	1.14	1.18	1.21	1.24	1.29

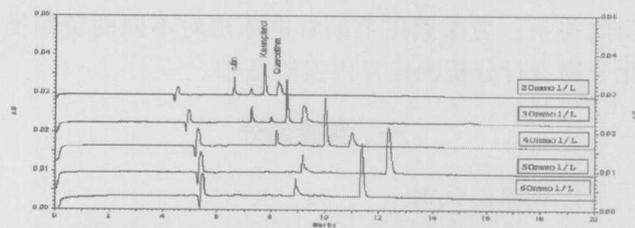


图 3 缓冲溶液不同离子浓度下的 HPCE 图

表 3 缓冲溶液不同离子浓度下各峰的相对迁移时间

	20	30	40	50	60mmol/L
芦丁	1	1	1	1	1
山萘酚	1.17	1.18	1.22		
槲皮素	1.24	1.26	1.34	1.35	1.28

下,改变缓冲溶液离子浓度,山萘酚和槲皮素的相对出峰时间略有延长,当离子浓度达到一定值时,山萘酚与槲皮素的吸收峰重叠,峰面积为两峰之和。因此缓冲溶液的离子浓度不宜过高。

4. 讨论

(1)本实验所用仪器的电压范围为 0~30 KV,兼顾样品的迁移时间和仪器性能,选择 20KV 为宜。调整电压可以改变电流强度,影响各峰的迁移时间,但对各峰之间的分离度无明显影响。

(2)在本实验中,缓冲溶液的离子浓度主要影响峰形,对各峰分离度无明显影响。样品在缓冲溶液的离子浓度低于 40mmol/L 的条件下,分离度高,峰形美观。但离子浓度越高,电泳过程中产生的热量越多,增加对制冷剂的消耗,因此根据测试结果,以离子浓度不高于 40mmol/L 为宜。

(3)黄酮类化合物多具有游离的酚羟基,因此本实验选择 pH 为 8~10 的缓冲溶液对其进行测试,结果发现在 pH8~9 之间,样品的分离度高,峰形美观。

(4)从考察的各因素看,缓冲溶液的 pH 值是影响各峰分离度的主要因素,调节 pH 值可以改善各峰的分离度及迁移时间。从化合物的结构看,含游离酚羟基越多,迁移时间越长。

三、结 语

通过本实验研究,发现 3 种黄酮类化合物在毛细

管电泳中的迁移行为与缓冲溶液的 pH 值、缓冲溶液的离子浓度和电压之间存在密切关系,特别是缓冲溶液的 pH 值是影响 3 种物质分离度的主要因素。因此,建议在采用电泳法分析研究此类物质时,调节缓冲溶液 pH 值,以使各物质分离,在此基础上,改变缓冲溶液的离子浓度和电压,调整各峰峰形,以实现对各物质的最佳分析。

参考文献

- 1 王前,许旭.美国药典中的毛细管电泳法.药学进展 2002,26(5):308~310.
- 2 徐飞龙,沈陶冶,胡云珍.高效毛细管电泳法在医药领域中的应用.中国药师 2006,9(1):59~61.
- 3 钟凌云,龚千锋,张的风.高效毛细管电泳在中药研究中的应用.医药导报 2006,25(3):233~235.
- 4 李立文,吕圭源.高效毛细管电泳技术与现代中药.时珍国医国药 2005,16(9):922~923.
- 5 李霞,卢宏波,刘爱芳,等.毛细管电泳法分离测定板蓝根中的活性有机酸.华西药学杂志 2004,19(2):114~117
- 6 田益玲,祝彦忠,陈冠华,等.丁香中丁香酚的高效毛细管电泳测定.药物分析杂志 2005,25(11):1322~1324.
- 7 牛其云,徐冰.高效毛细管电泳及其在体内药物分析中的应用.实用医技杂志 2005,12(6):1441~1443.
- 8 张蕊,郭宝林.高效毛细管电泳技术用于生物碱的分析.中草药 2005,36(12):1889~1892.
- 9 叶能胜,谷学新.高效毛细管电泳指纹图谱鉴别天然药物研究进展.中草药 2002,33(3):274~275.

Studies on Electrophoresis Behavior of Three Flavonoids in HPCE

Liu Yujie, Li Guoyu, Yang Bingyou, Kuang Haixue

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Objective: To study the migration of Rutin, Quercetin and Kaempferol in HPCE. Methods: The voltage of HPCE, pH and concentration of buffer were changed respectively to study the effect for separation. Results: The shape peaks and separation were proved to be good under the condition which pH was 8.65, and voltage was 20kv and concentration was 12mmol/L. Conclusion: The separation degree of the three compounds was mainly determined by pH of buffer, and migration time of them were mainly determined voltage and concentration of buffer.

Keywords: HPCE Rutin Quercetin Kaempferol

(责任编辑:林耕, 责任编辑:果德安, 责任译审:熊艳艳)