

高效毛细管电泳同时测定大枣中 环磷酸腺苷、芹菜素及槲皮素

高瑞斌¹, 杨 艳³, 董树清², 倪京满³, 郭 玫^{1,*}, 赵 亮^{2,*}

(1. 甘肃中医学院, 药理学系, 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃兰州 730000;
2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室,
甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃兰州 730000; 3. 兰州大学, 药学院, 甘肃兰州 730000)

摘要:建立高效毛细管电泳(CE)同时测定大枣中环磷酸腺苷、芹菜素及槲皮素的方法。研究了运行缓冲液的浓度、pH、添加剂 β -环糊精浓度、检测波长及分离电压对分离结果的影响。在最佳分离测定条件下,三个化学成分得到快速分离检测。环磷酸腺苷、芹菜素及槲皮素分别在16.5~529.4、5.5~176.4、8.8~282.4mg/L范围内线性关系良好, r 值分别为0.9998、0.9998和0.9997,加样回收率分别为97.31%、95.62%和94.88%,保留时间RSD值分别为6.7%、5.1%和5.3%,峰面积的RSD值分别为4.5%、5.8%和4.2%。结果表明本方法简便、快速、重现性好,适用于含有环磷酸腺苷、芹菜素及槲皮素类药物成分的检测。

关键词:大枣,高效毛细管电泳,环磷酸腺苷,芹菜素,槲皮素

Simultaneous determination of cyclic adenosine monophosphate and apigenin and quercetin in *Fructus jujuba* by HPCE

GAO Rui-bin¹, YANG Yan³, DONG Shu-qing², NI Jing-man³, GUO Mei^{1,*}, ZHAO Liang^{2,*}

(1. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the College of Gansu Province, Department of Pharmacy, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Key laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
3. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: High performance capillary electrophoresis (CE) was developed for the determination of cyclic adenosine phosphate, apigenin and quercetin in jujube. The effects of several factors such as concentration of running buffer and the pH, concentration of the additive β -cyclodextrin, the detection wavelength and the separation voltage for separating result were investigated. In optimum condition, three groups chemical component had been achieved separation detection. A good linearity between peak area ratio of the common peak to the concentration was found in the range of 16.5~529.4mg/L for cyclic adenosine phosphate, 5.5~176.4mg/L for apigenin and 8.8~282.4mg/L for quercetin, and correlation coefficients (r) were 0.9998, 0.9998, 0.9997, respectively. The average recoveries were 97.31%, 95.62% and 94.88% for cyclic adenosine phosphate, apigenin and quercetin, respectively. The retention time of relative standard deviation was 6.7%, 5.1% and 5.3% and the peak area of relative standard deviation was 4.5%, 5.8% and 4.2%. The results showed that the method was simple, rapid and with satisfactory recoveries and good reproducibilities. It can be used to detection of elements of cyclic adenosine phosphate, apigenin and quercetin.

Key words: *fructus jujuba*; HPCE; cyclic adenosine monophosphate; apigenin; quercetin

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)09-0282-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.09.053

大枣(*fructus jujubae*),为鼠李科植物枣(*ziziphus jujube mill*)的成熟果实,既是常用的中药,又是一种营养极其丰富的食品,即药食同源,在我国已有4000年栽培史^[1],《伤寒论》、《金匱要略》、《本草纲目》中多有阐述。大枣味甘、性平,主要用于中气不足、脾胃虚弱、体倦乏力、食少便溏、血虚萎黄、妇女脏躁等

收稿日期: 2013-09-18 * 通讯联系人

作者简介: 高瑞斌(1986-),男,硕士研究生,研究方向: 中药有效成分与质量标准研究。

基金项目: 中科院科技支新项目(XBJ-2011-021);兰州市科技专项计划(2010-1-156)。

症的治疗^[2],具有补血、健脑、抗癌等功效^[3]。近年来研究发现,大枣中含有多种生物活性物质,如环磷酸腺苷、黄酮类、皂苷类、三萜类、生物碱类等成分^[4]。其中,环磷酸腺苷(cAMP)在大枣果肉中的含量为10~300nmol/g,是所有已测动植物材料中最高的品种^[5],比一般动植物材料中cAMP含量高数千至数万倍,它是核苷酸的衍生物,为蛋白激酶致活剂,是有机体中广泛存在的一种重要的生理活性物质,颇具开发价值。同时,大枣中还含有包括芹菜素^[6]和槲皮素等多种黄酮类化合物,其研究价值日益受到重视。据报道,槲皮素具有广泛的生物学作用,有抗氧化及清除氧自由基作用、抗肿瘤、抗病毒、镇痛止泻等作用^[7-8];芹菜素也具有广泛的药理活性,具有抗肿瘤、心脑血管保护、抗病毒、抗菌等多种作用^[9-10]。

目前,针对大枣活性成分的研究,多采用传统的薄层扫描法和高效液相法测定其含量。高效毛细管电泳是近些年发展起来的一项新的分离分析技术,具有灵敏度高、准确度高、简便、快速等特点^[11]。本文采用高效毛细管电泳技术,在加入 β -环糊精(β -CD)改性剂的基础上,成功的分离分析了大枣中cAMP、芹菜素、槲皮素(结构式见图1)。通过对电泳条件的优化,以及方法学筛选和考察,获得了理想的实验结果,以期为大枣的质量控制和评价提供参考。

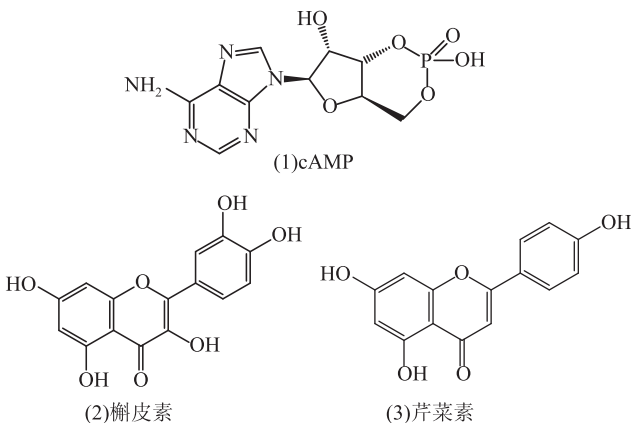


图1 cAMP、芹菜素和槲皮素的结构式

Fig.1 Chemical structures of cAMP, apigenin, quercetin

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大枣 市售(充分成熟),产地为甘肃省定西市,取果肉烘干后粉碎待用;cAMP标准品(纯度99%,批号140709-200401) 中国药品生物制品检定所;槲皮素标准品(纯度99%,批号100081-200406) 中国药品生物制品检定所;芹菜素标准品(批号2082923) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;AB-8型大孔吸附树脂 西安蓝深特种树脂有限公司; β -CD 成都艾科达化学试剂有限公司;乙醇、甲醇均为色谱纯 山东禹王实业有限公司化工分公司;实验所需的水均为二次蒸馏水,氢氧化钠、硼砂(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

贝克曼P/ACE™ MDQ毛细管电泳系统,配有二极管阵列检测器(PDA) 美国贝克曼库尔特有限公司;32Karat™ 色谱工作站;弹性石英毛细管 永年锐

洋色谱器件有限公司;R-200型旋转蒸发器 德国海尔道夫仪器厂;KQ-500E型超声清洗器 昆山市超声仪器设备厂;SHB-III循环式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;DHG-9070A电热鼓风干燥箱 上海-恒科学仪器有限公司;FA1604N电子分析天平 上海精密仪器厂。

1.2 标准溶液的制备

分别精密称取环磷酸腺苷标准品5.005mg,槲皮素标准品4.005mg,芹菜素标准品1.003mg,加1mL无水甲醇溶液分别配制成浓度为5.005mg/mL的cAMP标准品溶液,4.005mg/mL槲皮素标准品溶液和1.003mg/mL芹菜素标准品溶液,超声脱气5min,储备液放置于4℃冰箱中备用。

1.3 实际样品的制备

将50℃烘干的大枣果肉粉碎后精确称取20.0g,加入200mL蒸馏水浸泡2h后加热回流,重复回流三次,每次2h,合并三次提取液抽滤减压浓缩至浸膏状,加水稀释至1g/mL,上样于已活化好的AB-8型大孔吸附树脂柱,先采用400mL蒸馏水冲洗树脂柱,直至洗脱液无色,后用30%乙醇溶液400mL洗脱,控制流速为1.5mL/min左右,收集上述30%乙醇洗脱液,后浓缩干燥,干燥品用1.5mL甲醇溶解稀释,配制成1.0mg/mL的溶液,经0.45 μ m滤膜过滤,即得大枣的样品溶液。

1.4 电泳条件

毛细管使用前分别用甲醇、0.1mol/L NaOH溶液、稀盐酸、重蒸水和电泳缓冲液分别依次冲洗5min。两次进样间,在15kV电压下用缓冲液冲洗5min。以0.2mol/L硼砂缓冲体系(pH9.48)及10mmol/L添加剂 β -CD为电泳缓冲溶液,未涂层熔融毛细管(68.5cm \times 75 μ m(I.D.),有效长度为60cm)为分离通道,压力进样(20Psi),运行电压15kV,温度25℃,进样时间为5s,在检测波长250nm下进行检测。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

对cAMP、芹菜素及槲皮素分别进行紫外扫描,判定出三种化学成分在260、255和246nm处有最大吸收波长,综合考虑后检测波长定为250nm。

2.2 缓冲溶液pH的影响

电泳分离过程中,缓冲溶液直接影响到电渗流(EOF)的大小,对分离的灵敏度与迁移时间都会造成影响^[12-13]。若缓冲溶液电解质浓度过低,分离度达不到要求;缓冲溶液电解质过高,则供试液中酸性成分负电荷密度可能增加,会使迁移时间过长。本实验分别从三种化合物的标准溶液中取一定体积,经缓冲溶液稀释配后制成0.8mL的混合标准溶液,其中cAMP、芹菜素、槲皮素三种化合物的浓度分别为0.529、0.176和0.282mg/mL,此为三种成分在混合标准溶液中最终的浓度。在此浓度下,选用0.2mol/L硼砂缓冲液,pH从7.6~9.94范围内对分离测定的结果进行考察。从图2可以看出,当pH在7.6~9.94范围内,芹菜素和槲皮素不能得到很好的分离。但仔

表1 回归方程和检测限($n=8$)Table 1 Results of regression analysis on calibration and the detection limits($n=8$)

化合物	回归方程 ^a $y = ax + b$	相关系数 r	线性范围 (mg/L)	检测限 (mg/L)
cAMP	$y = 907.37x + 1702.54$	0.9998	16.5~529.4	0.3556
芹菜素	$y = 1342.07x - 1027.83$	0.9998	5.5~176.4	0.1963
槲皮素	$y = 2486.48x + 2337.13$	0.9997	8.8~282.4	0.1382

注: * y 值代表检测的峰面积 (AU.min); x 值代表检测的浓度 (mg/L)。

细观察可以发现,在 pH 为 9.48 时,两组分的迁移时间很接近却出现分离迹象,因此选定缓冲溶液的 pH 为 9.48。

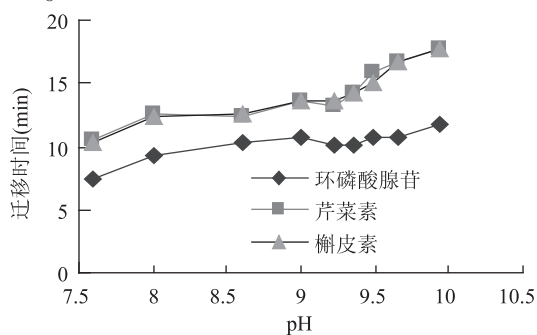
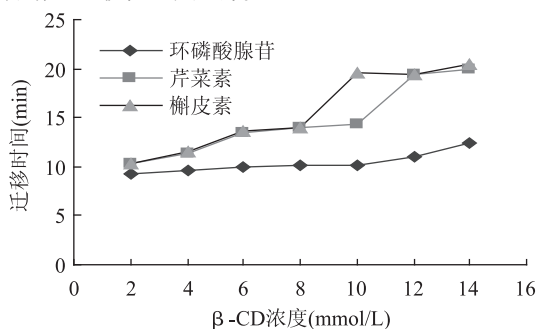


图2 缓冲溶液 pH 对迁移时间的影响

Fig.2 Effect of pH on migration time

2.3 添加剂浓度对分离检测的影响

在确定的缓冲溶液电解质浓度和 pH9.48 条件下,加入 β -CD 添加剂^[14]。结果发现,三个化合物的迁移时间会随着 β -CD 浓度的改变而发生变化。从图 3 中可以清楚的看到,当 β -CD 等于 10mmol/L 时,三种成分可以得到基线分离。同时,当 β -CD 的浓度在 10mmol/L 附近时,会对芹菜素和槲皮素的迁移时间产生较大的影响。

图3 添加剂 β -CD 浓度对迁移时间的影响Fig.3 Effect of β -CD concentrations on migration time

2.4 分离电压的选择

在选定了缓冲液浓度、pH 及添加剂浓度的情况下,进一步考察在不同电压下对被测组分迁移时间的影响。结果发现当分离电压小于 14kV 或大于 16kV 时,虽检测信号变强,但噪音严重基线不稳,故最终选择的分离电压为 15kV,三种化合物可以在 20min 内完成分离检测。在上述优化的色谱条件下,检测得到混合标准溶液的电泳图(图 4)。

2.5 线性范围、检出限及重现性考察

在最终确定的标准混合溶液浓度下,即 cAMP

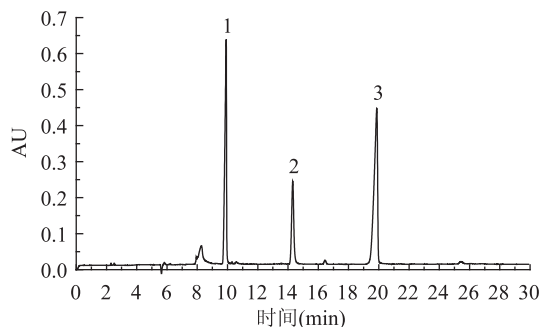


图4 cAMP、芹菜素及槲皮素的标准混合溶液的毛细管电泳图

Fig.4 Typical electropherogram of the standard solution

注:1.环磷酸腺苷,2.芹菜素,3.槲皮素。

0.529mg/mL、芹菜素 0.176mg/mL、槲皮素 0.282mg/mL,成倍递减稀释成八组溶液。八组溶液中 cAMP 浓度分别为 0.529、0.265、0.132、0.066、0.033、0.165、0.088、0.044mg/mL;芹菜素浓度分别为 0.176、0.088、0.044、0.022、0.011、0.0056、0.0028、0.0014mg/mL;槲皮素浓度分别为 0.282、0.142、0.071、0.035、0.018、0.009、0.0044、0.0022mg/mL。在上述选定的电泳条件下,实验了 cAMP、芹菜素和槲皮素三个化合物的线性范围,得出三个成分的线性回归方程,并按 3 倍信噪比计算检出限。结果如表 1 所示。

另外,在最终的优化条件下,将混合标准溶液连续进样 6 次,每测定一次后,用超纯水和缓冲溶液清洗毛细管 3min,分别测定三个成分的峰面积和保留时间,计算其相对标准偏差,得出 cAMP、芹菜素及槲皮素的峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 4.5%、5.8% 和 4.2%,迁移时间的 RSD 为 6.7%、5.1% 和 5.3%。实验结果表明,在优化的条件下,毛细管电泳测定大枣中 cAMP、芹菜素及槲皮素,误差小,重现性好。

2.6 精确度及稳定性

取 cAMP、芹菜素和槲皮素的混合标准溶液样品,每天重复测定 5 次,连续测定 5d,得到峰面积的日内与日间变异系数,见表 2。实验表明,用毛细管电泳法测定 cAMP、芹菜素和槲皮素,误差小,重现性好。

2.7 大枣样品的测定

按照实际样品的制备方法,得到的大枣提取物干燥品用甲醇溶解稀释,配制成 1.5mL 的实际样品溶液,在优化电泳条件下进样,测得实际样品溶液的电泳图(图 5),从图上可以看出,因实际样品溶液中含有除 cAMP、芹菜素和槲皮素以外的其它成分,会与 β -CD 产生屏蔽效应,致使能与芹菜素和槲皮素

表3 cAMP、芹菜素及槲皮素加样回收率实验结果

Table 3 Recovery of cAMP, apigenin and quercetin

化合物	样品含量 (mg/L)	标准品加入量 (mg/L)	混合后测得量 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
cAMP	7.0301	7.03	13.7241	95.22	97.31	5.49
		7.10	13.6565	93.33		
		7.07	14.3398	103.39		
芹菜素	9.8510	9.72	19.0403	94.54	95.62	1.05
		9.91	19.4161	96.52		
		9.23	18.6924	95.79		
槲皮素	14.9150	14.23	28.1788	93.21	94.88	2.22
		15.19	29.6858	97.24		
		14.23	28.3182	94.19		

发生作用的 β -CD 浓度增大,导致两者迁移时间发生了微小的偏移,这与上文图 3 中的变化趋势相吻合。同时,在实际样品中添加少量芹菜素和槲皮素标准溶液后,也证实了 2 号峰和 3 号峰确实为芹菜素和槲皮素的色谱峰。通过三个成分的峰面积及其回归方程,计算得出本实验所用的大枣含 cAMP 0.1406mg/g、芹菜素 0.1970mg/g、槲皮素 0.2983mg/g。

表 2 精确度实验

Table 2 Precision experiment

化合物	日内(n=5)		日间(n=5)	
	峰面积 (AU·min)	变异系数 (%)	峰面积 (AU·min)	变异系数 (%)
cAMP	481512	2.48	481683	3.41
	481629		481423	
	481734		481432	
	481824		481422	
	481733		481221	
芹菜素	234951	2.15	234489	3.58
	234920		234611	
	234821		234577	
	234933		234722	
	234899		234622	
槲皮素	703741	3.31	703710	2.17
	703323		703529	
	703325		703923	
	703520		703592	
	703829		703619	

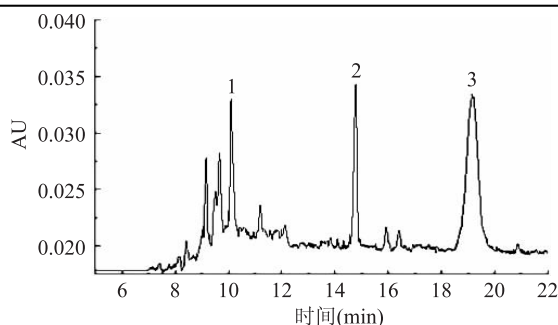


图 5 大枣提取液毛细管电泳图

Fig.5 Electropherogram of an extract of the sample of *Fructus jujuba*

2.8 加样回收率测定

精密称取已知含量(cAMP 0.1406mg/g、芹菜素 0.1970mg/g、及槲皮素 0.2983mg/g)大枣的样品粉末 3 份,每份 50mg,用甲醇溶解稀释成 1mL 的样品溶液,则样品中三种成分的浓度通过计算分别为 cAMP 7.0301mg/L、芹菜素 9.8510mg/L、槲皮素 14.9150mg/L。在三组样品溶液中分别精密加入不同浓度的 cAMP、芹菜素和槲皮素标准品,按照标准加入法测定。按照公式加样回收率(%)=(混合后测得量-样品含量)/标准品加入量 \times 100,计算得出 cAMP 平均回收率为 97.31%,RSD 为 5.49%;芹菜素平均回收率为 95.62%,RSD 为 1.05%;槲皮素平均回收率为 94.88%,RSD 为 2.22%,见表 3。从表中可看到,本实验获得了理想的实验数据,具有较好的准确度。

3 结论

cAMP、芹菜素和槲皮素作为大枣中重要的化学成分,在常规色谱方法下,分离难度较大,而本研究利用高效毛细管电泳(HPCE)技术快速简便分离测定了大枣中这三种成分。实验过程中考察了背景电解质浓度、pH、 β -CD 浓度等对分离的影响,最后确定了选用检测波长 250nm,以 0.2mol/L 硼砂缓冲体系(pH 9.48)、10mmol/L 添加剂 β -CD 等条件为毛细管电泳测定大枣中这三种成分的最佳分离条件。

在优化的电泳条件下,三种成分出峰时间适中分离度好,且简便、快速、重复性高,结果准确、可靠,可用于大枣中 cAMP 和黄酮类成分的含量测定和质量检测,为大枣在医疗及食品方面的进一步应用奠定了科学的基础。

参考文献

- [1] Guo S, Duan J A, Tang Y P, et al. Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of *Ziziphus* Species by HPLC-ELSD-MS[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 6285-6289.
- [2] 关俊玲,李明润,高向耘,等.不同产地大枣化学成分的含量分析[J]. *天津药学*, 2002, 14(3): 82-83.
- [3] Pierluigi P, Daniela B, Donatella V, et al. Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells[J]. *J Ethnopharmacology*, 2012, 140: 325-332.

(下转第 293 页)

烃类和酯类化合物,酸类和酯类化合物和含氮的杂环类化合物,它们代表了85%以上的变量信息,可以说明五种芽菜之间的差异。根据不同品牌芽菜样品主成分的得分和香气感官评定对其香味品质进行了评价,结果表明,主成分得分结果和香气感官评定结果完全一致,主成分分析可以为香气品质的评价提供一个新的思路;综合各样品测得的香气成分的种类,可以发现三者之间的趋势完全一致,但是由于芽菜中香气成分极其复杂,交互作用显著,因此香气种类的多少和品质评价之间没有必然的正相关关系,对香气品质评价要看香气成分对芽菜香气的贡献大小^[12]。此外,在宜宾芽菜香气的构成中,除了特征性的呈香物质以外,还包括了起协调、修饰和定香作用的化合物,其中有些物质虽然含量微小但作用巨大,但是如何利用主成分分析表达这些作用,还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 刘云秀. 宜宾芽菜的研制[J]. 中国调味品, 2007(8): 72-73.
- [2] 左勇, 鞠帅, 谢晖, 等. 宜宾芽菜生产技术展望[J]. 中国调味品, 2011, 36(5): 12-14.
- [3] 邵学广, 许禄. 化学计量学方法[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] 唐会周, 明建. 5种市售脐橙果实香气成分的主成分分析[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 175-180.
- [5] 戴素贤, 谢赤军, 陈栋, 等. 七种高香型乌龙茶香气成分的主成分分析[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 113-117.
- [6] 余宁华, 陆震鸣, 许伟, 等. 基于主成分分析的中国发酵食醋有机酸含量差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 144-148.
- [7] 李朝峰, 杨中宝. SPSS主成分分析中的特征向量计算问题[J]. 统计教育, 2007(3): 10-11.
- [8] 邓静, 张伟娜, 吴华昌, 等. SPME-GC-MS法分析芽菜中的挥发性风味成分[J]. 中国调味品, 2011, 36(10): 86-90.
- [9] 何新益, 汪姣, 任小青, 等. 花色馒头的制备及质构特性主成分分析[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(7): 108-111.
- [10] LU Zhao-liang, LIU Li-wang, LI Xiao-yan, et al. Analysis and Evaluation of Nutritional Quality in Chinese Radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(7): 823-830.
- [11] 岳田利, 彭帮柱, 袁亚宏, 等. 基于主成分分析法的苹果酒香气质量评价模型的构建[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 223-227.
- [12] 苏扬, 陈云川. 泡菜的风味化学及呈味机理的探讨[J]. 中国调味品, 2001(4): 28-31.
- (上接第285页)
- [4] Chang S C, Hsu B Y, Chen B H. Structural characterization of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* and evaluation of antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47: 445-453.
- [5] Guo S, Duan J A, Tang Y P, et al. Characterization of Nucleosides and Nucleobases in Fruits of *Zizyphus jujuba* by UPLC-DAD-MS [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 10774-10780.
- [6] Li H J, Li P. HPLC method for determination of *Zizyphus jujuba* benevolence in different processed products of two kinds of flavonoid glycosides carbon content [J]. Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 20(4): 260-262.
- [7] Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca J F, et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 2179-2205.
- [8] Maria R, Carmela S, Idolo T, et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies [J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 83: 6-15.
- [9] Rossella A, Paola Z, Giulia P, et al. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla* [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 59: 1387-1394.
- [10] Huang J Q, Wang S W, Zhu M Z, et al. Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 1943-1947.
- [11] Bayram B, Ozcelik B, Schultheiss G, et al. A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column [J]. Food Chem, 2013, 138: 1663-1669.
- [12] Liu J, Lou Y J. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis; rat pharmacokinetic studies after administration of icariin [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 36: 365-370.
- [13] Ding N, Yang Q, Huang S S, et al. Separation and determination of four ganoderic acids from dried fermentation mycelia powder of *Ganoderma lucidum* by capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Anal, 2010, 53: 1224-1230.
- [14] Salvatore F. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors [J]. J Chromatography A, 2000, 857: 89-122.