

HPLC 内标法测定猫耳朵菜的硫苷含量

王丽红¹, 吴莉莉¹, 武冬梅¹, 栾芳¹, 王凤芝², 孙伟佳¹

(1. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

摘要:采用 HPLC 内标法, 以烯丙基硫苷为内标物, 对不同采收期猫耳朵菜 (*Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl.) 中硫苷含量进行测定。结果表明: 猫耳朵菜幼苗期和花期全草硫苷含量分别为 275.6960 和 85.1246 $\mu\text{mol/g}$ 。

关键词:猫耳朵菜; 硫代葡萄糖苷; HPLC 内标法

中图分类号:S 647 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)12-0128-03

猫耳朵菜属十字花科葶苈属植物, 学名光果葶苈 (*Draba nemorosa* L. var. *Leiocarpa* Lindl.), 全国各地均有分布, 主要生长于路边、田野、农田。有些地区有食用其幼苗的习惯, 也有将该植物种子作葶苈子入药的^[1]。由于其幼苗食用口感好, 深受一些地区居民的喜爱。课题组在立项时检索国内外资料表明, 对该植物的研究还未见报道。故课题组前期对其资源学及营养成分进行了研究。研究表明猫耳朵菜资源广布, 营养成分丰富^[2-3]。十字花科植物的主要成分是硫代葡萄糖苷^[3] (Glucosinolates, 简称硫苷), 其水解产生的异硫氰酸酯具有显著的抗癌作用。为了明确该植物中硫苷含量及其开发成一种抗癌蔬菜, 现采用 HPLC 内标法测定不同时期光果葶苈全草中硫苷的含量, 为今后引种栽培、植物采收、加工及开发利用等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

光果葶苈幼苗期、花期全草分别于 2011 年 4 月初和 4 月中旬采于黑龙江省佳木斯市区。

化学试剂及对照品: 烯丙基硫苷、硫酸酯酶购自 Sigma 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水。其它试剂均为分析纯。

试验仪器: 安捷伦高效液相色谱仪系统 (美国安捷伦公司); Agilent 1100 四元泵; Agilent 柱温箱; Agilent 色谱数据工作站; Agilent 二极管阵列紫外检测器。其它仪器均由黑龙江省生物药制剂重点实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 内标溶液的配制 ①标准储备液的配制: 使用电

第一作者简介:王丽红(1968-), 女, 在读博士, 副教授, 现主要从事植物资源开发及利用等研究工作。

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D200875); 佳木斯大学科研专项资助项目(S2008-044)。

收稿日期:2012-04-09

子天平准确称取 8.31 mg 烯丙基硫苷, 用去离子水定容至 1 mL 容量瓶。②用醋酸溶液与硼砂溶液调 pH 5.8 溶液。③取①中的溶液 0.6 mL, 用②中的溶液定容至 2 mL, 备用^[4]。

1.2.2 硫苷提取 分别取 500 mg 光果葶苈全草幼苗期粉末于 2 支试管中(A 和 B), 再分别取 500 mg 光果葶苈全草花期粉末于另 2 支试管中(C 和 D), 均准确称量至 0.1 mg, 将 4 支试管同时放于 70℃ 水浴中加热 1 min 后, 向 4 支试管中分别加入 10 mL 煮沸的 75% 甲醇溶液, 然后向 A 管和 C 管中分别加入 1.2.1 中制备的内标溶液 (烯丙基硫苷溶液) 各 200 μL , 继续水浴 75℃ 加热 10 min。然后离心 3 min, 将上清液取出至另外 4 支试管 (A_1 和 B_1 、 C_1 和 D_1), 沉淀物再分别加入各 10 mL 煮沸的 75% 甲醇, 水浴 75℃ 加热 10 min, 离心 3 min, 将上清液转移至相对应的 4 只试管中, 备用。准备 4 支离子交换柱, 分别向 4 支离子交换柱中各加入 1 mL 萃取液, 然后再向 4 支离子交换柱中分别加入各 1 mL 醋酸钠缓冲溶液各 2 次。后向 4 支离子交换柱中分别加入稀释后的硫酸酯酶液各 75 μL , 分别加入 1 mL 去离子水, 然后收集液体, 再向 4 支离子交换柱中加入 1 mL 去离子水收集液体于样品瓶 A_2 和 B_2 、 C_2 和 D_2 中, 密封备用。

1.2.3 HPLC 内标法测定硫苷含量 该试验采用内标法对光果葶苈中的硫苷进行测定, 采用丙烯基硫苷作为色谱内标物, 对色谱条件进行考察, 确定最佳测定方法。硫苷含量根据保留时间进行定性、定量, 以每克样品中所含硫苷微摩尔表示 $\mu\text{mol/g}$ 。

硫苷含量计算公式如下:

$$G(\mu\text{mol/g}) = \frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times F \times \frac{100}{100 - W}$$

式中: G 硫苷分量; A_g 脱硫硫苷峰面积的数值; A_s 标准脱硫硫苷峰面积的数值; F 脱硫硫苷相对校正系数; m 试样质量的数值, 单位为 g; n 加入标准物质的量, 单位为 μmol ; $100/(100 - W)$ 试验条件无干扰, 忽略不计,

数值为 1。总硫苷含量计算为样品中每种硫苷分量相加,单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2.4 HPLC 测定硫苷的色谱条件 通过紫外分光光度法在 200~500 nm 区间扫描测得标准储备液的最大吸光波长为 229 nm。检测硫苷的 HPLC 条件为:流动相 A:100%水;流动相 B:20%乙腈;流速:1.5 mL/min;进样量:20 μL ;色谱柱为 Spherisorb C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm)^[5-8]。经过对洗脱条件的筛选确定出最佳梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度组成

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0 | 99 | 1 |
| 1 | 99 | 1 |
| 21 | 1 | 99 |
| 26 | 60 | 40 |

2 结果与分析

2.1 样品中硫苷含量的测定

按照 1.2.4 中色谱条件分别进样,测定 1.2.2 中所提取的硫苷,即全草幼苗期(加内标) A_2 、全草幼苗期 B_2 、全草花期(加内标) C_2 、全草花期 D_2 。根据 HPLC 测定结果及硫苷含量计算公式,计算硫苷含量。

2.1.1 全草幼苗期 测得样品 A_2 和 B_2 的 HPLC 图(图 1、2)。根据上述方法除去内标物测得全草幼苗期硫苷总含量为 275.6960 $\mu\text{mol/g}$ 。

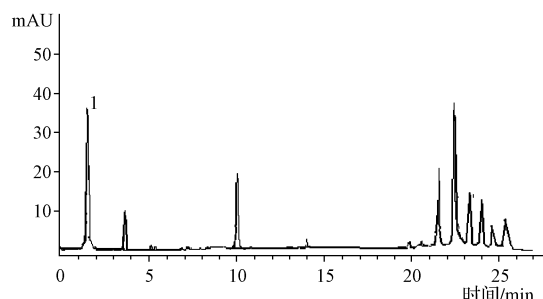


图 1 样品 A_2 的 HPLC 色谱图

注:1 为烯丙基硫苷,以下同。

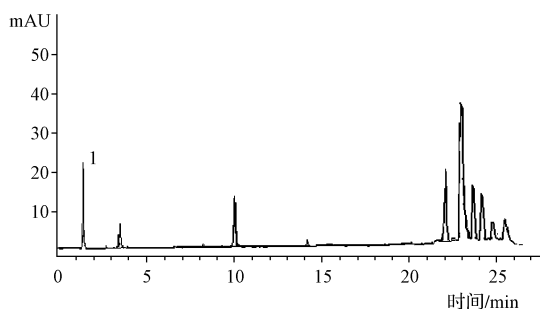


图 2 样品 B_2 的 HPLC 色谱图

2.1.2 全草花期 测得样品 C_2 和 D_2 中的 HPLC 图(图 3、4)。根据上述方法除去内标物,测得全草花期硫苷总含量为 85.1246 $\mu\text{mol/g}$ 。根据上述方法除去内标物测

得全草幼苗期及花期硫苷总含量分别为 275.6960 和 85.1246 $\mu\text{mol/g}$ 。

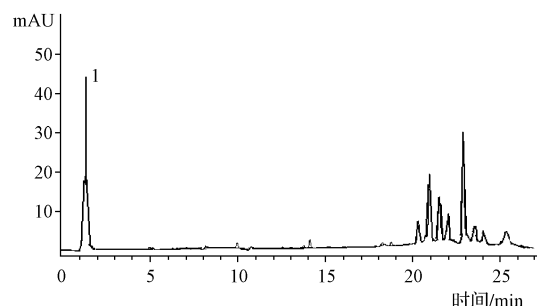


图 3 样品 C_2 的 HPLC 色谱图

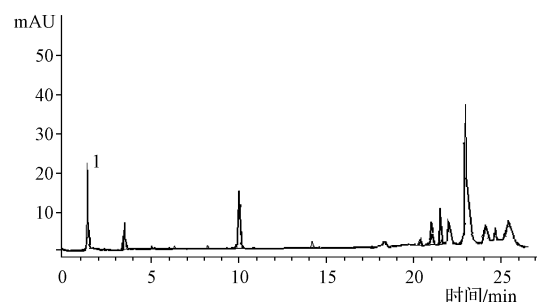


图 4 样品 D_2 的 HPLC 色谱图

2.2 精密度试验

取 1.2.1 中制备的烯丙基硫苷溶液,重复进样 5 次,每次 20 μL ,测得峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.12%,该误差在仪器分析误差范围之内。

2.3 重复性试验

采用 1.2.4 中的色谱条件,对幼苗期和花期硫苷提取液分别进行 5 次重复性测定。根据重复性测试结果可看出样品硫苷的峰高、峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)均在 0.005%~0.3%,说明该方法的重复性好。

3 结论与讨论

随着色谱技术和其它相关技术的发展,硫苷的测定方法不断改进,新方法也相继出现,实现了对硫苷的定量分析。高效液相内标法是目前测定硫苷含量的一种比较准确的定量方法,通过测量内标物及被测组分的峰面积的相对值来进行计算,其优点是测定结果较为准确,在一定程度上消除了操作条件等的变化所引起的误差。采用 HPLC 内标法测定猫耳朵菜全草硫苷含量,幼苗期明显比初花期硫苷含量高。表明该植物一旦开花后硫苷含量将会大大降低,采摘时应该在其未开花时进行。另外在引种栽培时要考虑如何打破种子休眠,利用其生长期短的特点,在一年内多茬栽培。该试验所采用的 HPLC 内标法测定硫苷含量,得到的色谱条件分离效果好,结果准确,重复性好,稳定可靠,方便快捷,是今后检测该植物中硫苷含量较佳的测定方法。

云南松 ISSR-PCR 反应体系建立及优化

赵 雷¹, 张继兰²

(1. 昆明兴海绿化有限公司, 云南 昆明 650228; 2. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘 要: 为建立和优化云南松 ISSR-PCR 反应体系, 运用正交实验分析了模板 DNA、Tag DNA 聚合酶、引物、Mg²⁺ 和 dNTPs 5 个因子对云南松 ISSR-PCR 反应的影响。结果表明: 云南松 ISSR-PCR 25 μ L 反应体系中 5 个因子最佳水平为: DNA 模板为 3.6 ng、Tag DNA 聚合酶为 2.0 U、引物浓度为 0.8 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L、Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L。

关键词: 云南松; ISSR-PCR 反应; 体系优化

中图分类号: S 791.257 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2012)12-0130-04

云南松(*Pinus yunnanensis*) 为松科常绿针叶乔木, 广泛分布于北纬 23°~29°, 东经 98°~106°的西藏东南部、四川西南部、贵州西部、广西西部及云南的大部分地

区^[1]。云南松以云南高原为其起源和分布中心, 在形态水平上分化强烈, 生态地理变异突出, 形成了生态小种地盘松(*P. yunnanensis* var. *pygmaea* (Hsueh) Hsueh) 和地理小种细叶云南松(*P. yunnanensis* var. *tenuifolia* Chenget Law)。云南松具有生长较快、材质较好、耐干旱瘠薄、天然更新能力强等优良品性, 是西南地区荒山造林先锋树种和主要的用材树种^[2-3]。目前云南松在遗传多样性^[4-5]、种源选优^[6-8] 和非木质资源开发^[9-10] 等方面研究进展显著, 但在分子标记种源鉴定和辅助育种等生化研究方面报道甚少。

第一作者简介: 赵雷(1962-), 男, 云南昆明人, 本科, 工程师, 现主要从事园林苗木繁育和园林设计与施工。

基金项目: 云南省应用基础研究资助项目(2010ZC089); 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室开放基金资助项目(BC2010F04); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(09C0185); 西南林学院基金资助项目(200611); 云南省园林植物与观赏园艺重点学科建设资助项目。

收稿日期: 2012-03-27

参考文献

- [1] 周以良. 黑龙江省植物志[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1985: 300.
- [2] 王丽红, 刘娟, 贝雷, 等. 黑龙江省光果葶苈的资源调查及开发利用[J]. 北方园艺, 2009(9): 43-45.
- [3] 王丽红, 刘娟, 高歌. 光果葶苈的化学成分分析[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(4): 46.
- [4] 吴谋成, 况成生, 黄伟. 用液相制备色谱从菜籽中分离、纯化制备硫代葡萄糖苷[J]. 色谱, 1995, 13(1): 4-7.
- [5] 彭爱娟, 唐桂芬, 兰尊海. 油菜籽粕中提取硫苷的实验[J]. 郑州牧业

工程高等专科学校学报, 2000, 20(2): 92-93.

- [6] Ishida M, Takahata Y, Kaizuma N. Simple and rapid method for the selection of individual plants low in Glucosinolates[J]. Breeding Science, 2003, 53: 291-296.

- [7] Yuan L F, Guo W Q, Wang Z G, et al. Determination of glucosinolates by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Zhejiang University(Sciences Edition), 2004, 31(2): 180-183.

- [8] 褚庆华, 倪昕路. 油菜籽及其饼粕中硫代葡萄糖苷总量快速测定方法的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 79-83.

(该文作者还有缪月英, 工作单位同第一作者。)

Determination Glucosinolates Content in *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. by HPLC

WANG Li-hong¹, WU Li-li¹, WU Dong-mei¹, LUAN Fang¹, WANG Feng-zhi², SUN Wei-jia¹, MIAO Yue-ying¹

(1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002)

Abstract: Taking Allyl glucosinolate as internal standard substance, The content of glucosinolates on the herbs of *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. in different harvesting were determined by HPLC internal standard method. The results showed that the content of glucosinolates of its seedling stage and flowering were 275.696 μ mol/g and 85.1246 μ mol/g.

Key words: *Draba nemorosa* L. var. *Leiocarpa* Lindl.; glucosinolates; HPLC internal standard method