

在线扫集-胶束电动毛细管色谱法对活血通脉片中阿魏酸与原儿茶醛的分离测定

李利军, 胡大春, 郝学超, 吴启涛, 李彦青

(广西工学院 生物与化学工程系, 广西 柳州 545006)

摘要: 建立了在线扫集-胶束电动毛细管色谱法同时分离测定活血通脉片中阿魏酸和原儿茶醛含量的方法。讨论了 pH 值、十二烷基磺酸钠 (SDS) 浓度、电压、有机溶剂、进样时间和背景电解质组成对分离效果的影响。结果表明: 采用未涂层熔融石英毛细管, 以 20 mmol/L 磷酸二氢钠、140 mmol/L SDS 为电泳缓冲液 (含 16% 甲醇, pH 2.2), 在优化条件下, 阿魏酸和原儿茶醛在 19 min 内出峰, 峰面积 RSD 均小于 5%, 其线性范围分别为 0.67~21.4、0.72~23 mg/L, 回收率分别为 94%~108%、91%~106%, 检出限 ($S/N=3$) 分别达 55.5、34.8 $\mu\text{g/L}$ 。与胶束电动毛细管色谱相比, 在线扫集-胶束电动毛细管色谱分离效果稳定, 重现性好。该方法用于活血通脉片中阿魏酸、原儿茶醛含量的测定, 结果满意。

关键词: 高效毛细管电泳; 扫集法; 胶束电动毛细管色谱; 阿魏酸; 原儿茶醛

中图分类号: O657.7; R917 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)01-0064-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.01.015

Separation and Determination of Ferulic Acid and Protocatechuic Aldehyde by Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatographic Method

LILi-jun, HU Da-chun, HAO Xue-chao, WU Qi-tao, LI Yan-qing

(Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract A sweeping-micellar electrokinetic chromatographic (sweeping-MEKC) method was used for the simultaneous separation and determination of ferulic acid and protocatechuic aldehyde. Effect of pH, concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS) and methanol injection time, injection voltage composition and concentration of background electrolyte on separation efficiency were optimized. The result indicated that a best separation of ferulic acid and protocatechuic aldehyde was obtained on an uncoated fused silica capillary column (60 cm $\times$ 50 μm , effective length 47 cm) by using the background electrolyte containing 140 mmol/L SDS, 20 mmol/L NaH_2PO_4 and 16% (by volume) methanol at pH 2.2 with a constant temperature of 25 $^\circ\text{C}$ and applied voltage of -20 kV. The detection wavelength was set at 316 nm, sample injection time and injection height were selected to be 100 s and 16 cm, respectively. Under the optimum conditions, the separation of ferulic acid and protocatechuic aldehyde was performed with in 19 minutes with relative standard deviation (RSDs) of peak area less than 5%. The calibration curves showed good linearity in the range of 0.67-21.4 mg/L for ferulic acid and 0.72-23 mg/L for protocatechuic aldehyde with detection limits ($S/N=3$) of 55.5 $\mu\text{g/L}$ and 34.8 $\mu\text{g/L}$, respectively. The spiked recoveries were 94%-108% and 91%-106%. Compared with MEKC method, the sweeping-MEKC method showed high separation efficiency, good sensitivity and was applied in the simultaneous separation and determination of ferulic acid and protocatechuic aldehyde with satisfactory results.

Keywords high performance capillary electrophoresis; sweeping-MEKC; ferulic acid; protocatechuic aldehyde

毛细管电泳具有分离速度快、分离效率高、样品及试剂用量少和毛细管柱寿命长、易清洗等优点,

收稿日期: 2009-10-26; 修回日期: 2009-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20665001); 桂科自资助项目 (0832062)

第一作者: 李利军 (1966-), 男, 湖北黄梅人, 教授, 博士, Tel: 0772-2685028, E-mail: lilijun0562@sina.com

近年来在中药有效成分分析中逐渐得到推广应用^[1]。由于一般毛细管的内径小于 100 μm , 进样体积小、检测光程短, 从而使得毛细管电泳的检测灵敏度较低^[2]。在线富集技术操作简便, 是解决该问题的较好方法。

胶束电动毛细管色谱 (MEKC) 是在缓冲溶液中加入浓度高于临界胶束浓度 (CMC) 的表面活性剂, 从而形成胶束, 胶束相在分离中起准固定相的作用, 由于电中性的有机化合物在水相和准固定相间的分配系数有差异, 导致被分离组分的流出时间不同。因此, MEKC 不仅能够分离荷电离子, 而且能够分离中性化合物^[3]。扫集技术 (Sweeping)^[4-7] 由 Quirino 和 Terabe 提出, 以胶束电动毛细管色谱为基础而形成在线富集技术。在线扫集-胶束电动毛细管色谱 (Sweeping-MEKC) 将样品富集后按 MEKC 进行分离^[8]。当样品溶液与背景缓冲液电导不同时, 还可引起样品的电堆积富集^[9]。该方法简单、富集效率高、可在商用毛细管电泳仪上操作, 广泛用于黄酮类、蒽醌类、酚酸类、皂苷类、内酯类和生物碱等多种天然化学成分的分析与分离^[10]。

活血通脉片^[11] 主要成分为三七、丹参、川芎、冰片、石菖蒲、人参、桃仁、红花、赤芍、郁金、将香、木香等 17 味中药, 用于活血通脉、强心镇痛, 冠状动脉硬化引起的心绞痛、胸闷气短、心气不足、瘀血作痛等症。原儿茶醛为丹参中主要的有效成分, 是抗心绞痛的主要有效成分之一。阿魏酸为川芎中主要的有效成分, 具有抗血小板凝集和血栓的作用^[12]。目前分离测定阿魏酸和原儿茶醛的方法主要有高效液相色谱法^[13]、反相高效液相色谱法^[14] 和反相高效液相色谱-电化学法检测 (RP/HPLC-ECD)^[15]。本文研究了在线扫集-胶束电动毛细管色谱法分离测定原儿茶醛、阿魏酸的可行性, 优化了实验条件, 方法简便快捷、灵敏度高, 用于活血通脉片中原儿茶醛、阿魏酸含量的测定, 结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ACS 2000 型高效毛细管电泳仪 (北京彩陆科学仪器有限公司), 负电源: 电压 0~30 kV 可调、未涂层毛细管 (Φ 50 μm , 总长 60 cm, 有效长度 47 cm), UV-2102PC 型紫外-可见分光光度计 (UNICO instruments 公司); DL-60D 超声波清洗器 (上海之信仪器有限公司); 分析天平 (奥豪斯 (上海) 有限公司), EF20 pH 计 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司)。

阿魏酸对照品 (批号: 0773-9910)、原儿茶醛对照品 (批号: 110810-200506), 中国药品生物制品检定所; 活血通脉片 (通化玉圣药业股份有限公司); 磷酸二氢钠 (汕头市西陇化工厂); 氢氧化钠 (天津市福晨化学试剂厂); 甲醇 (天津市四友生物医学技术有限公司); 磷酸 (广州市新港化工有限公司); 十二烷基磺酸钠 (SDS, 汕头市光华化学厂); 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 标准溶液及样品溶液制备

准确称取阿魏酸对照品 0.0107 g, 原儿茶醛对照品 0.0115 g, 用水溶解后分别定容至 25 mL, 配成 428、460 mg/L 的对照品储备液, 稀释待用。取研细后的活血通脉片 1.3849 g 溶于 5 mL 甲醇中, 超声萃取 60 min, 再离心 15 min, 取上清液过滤, 定容至 10 mL。以上溶液均置冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 操作条件

分离电压为 -20 kV; 重力进样; 进样高度 16 cm; 进样时间 100 s; 检测波长 316 nm; 环境温度 25 $^{\circ}\text{C}$; 电泳缓冲液为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 - 140 mmol/L SDS (pH 2.2) - 10% 甲醇。

样品基质: MEKC 法, 样品用 20 mmol/L 磷酸二氢钠 - 140 mmol/L SDS (pH 2.2) - 10% 甲醇稀释, 即溶解在缓冲溶液中; Sweeping-MEKC 法, 样品用 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.2) - 10% 甲醇稀释。

实验前毛细管柱依次用 1 mol/L NaOH 溶液、二次蒸馏水分别冲洗 15 min, 进样前用缓冲液冲洗 10 min, 实验 5 h 后更换缓冲液。实验结束后用二次蒸馏水冲洗。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

以缓冲溶液为参比液, 将阿魏酸、原儿茶醛的对照品溶液在 200~400 nm 间进行扫描, 2 种物质在 316 nm 处均有较强吸收, 因此选取检测波长为 316 nm。

2.2 缓冲溶液 pH 的选择

考察了磷酸盐缓冲体系 pH 值分别为 2.0、2.2、2.4、2.6 时阿魏酸、原儿茶醛的分离情况。实验发现, pH 值为 2.2 时, 峰形最好。但 pH 值越小, 电流越大, 不利于分离。实验选择 pH 值为 2.2, 此时缓冲液具有较好的缓冲能力, 且电流大小适当。

2.3 有机溶剂的选择及浓度优化

有机溶剂对分离时间有较大的影响。缓冲溶液中不加有机溶剂时, 样品迁移时间较短, 但样品溶液中杂质峰对峰形产生干扰。而过多的有机溶剂会抑制缓冲溶液中胶束相的形成^[16], 同时使被测物质迁移时间大大推迟。本实验以甲醇为有机溶剂, 考察了其体积分数为 14%~18% 时对分离的影响。当甲醇体积分数为 16% 时, 峰形、出峰时间和分离度均较理想, 实验选定甲醇的体积分数为 16%。

2.4 SDS 浓度的优化

实验考察了缓冲溶液为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.2) 时, 不同浓度的 SDS (60、80、100、120、140 mmol/L) 对分离和富集效果的影响。结果表明, 随着 SDS 浓度增加, 样品的迁移时间逐渐缩短, 峰面积逐渐减小, 这是由于 SDS 浓度的增加导致电流变大, 产生的焦耳热增多。峰面积在 SDS 浓度为 100~140 mmol/L 时趋于稳定, 此时峰宽较小, 峰较高。再增加 SDS 的浓度, 电流过大, 基线不稳, 不利于分离测定。综合考虑, 选择 140 mmol/L 为 SDS 的最佳浓度。

2.5 分离电压的选择

考察了负电压为 16~24 kV 时对分离效果的影响。实验表明, 随着电压的增加, 出峰时间缩短, 峰形尖锐, 20 kV 时分离最佳, 峰形较好。当电压大于 20 kV 时, 基线不稳, 分离度下降。因此选择最佳运行电压为 -20 kV。

2.6 进样时间对分离的影响

考察了进样时间为 60、80、100、120 s 时对阿魏酸和原儿茶醛峰面积的影响。实验表明, 在 60~120 s 间, 2 种化合物的进样时间与峰面积呈线性关系。当进样时间为 100 s 时, 基线稳定, 峰形较好, 且干扰较小。因此选定样品的进样时间为 100 s。

2.7 方法性能对比

进样时间在 30 s 以内时, Sweeping- MEKC 与 MEKC 法性能相差不大。但随着进样量的增加, 进样时间超过 60 s 时, 采用 Sweeping- MEKC 法可使 2 种对照品的检测峰峰形明显改善。2 种对照品在优化条件下的检测峰见图 1。随着进样时间的延长, MEKC 法分离效果差, 而 Sweeping- MEKC 法分离效果较稳定, 且重现性好。在本实验的优化条件及所测的对照品浓度下, 2 种方法的灵敏度、富集倍数没有差异。

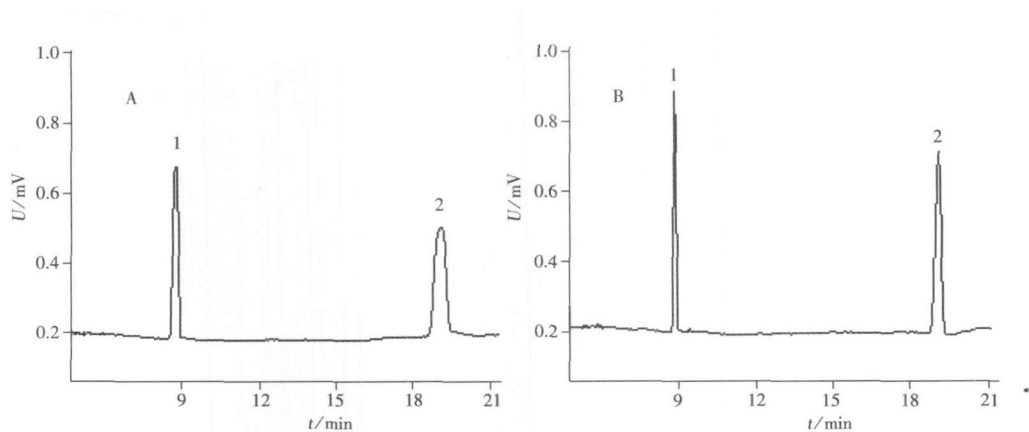


图 1 MEKC (A) 及 Sweeping- MEKC (B) 法测定的阿魏酸和原儿茶醛的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of ferulic acid and protocatechuic aldehyde by MEKC (A) and sweeping- MEKC method (B)
(ρ (ferulic acid): 21.4 mg/L; ρ (protocatechuic aldehyde): 23 mg/L; peak 1 ferulic acid; 2 protocatechuic aldehyde)

2.8 方法的线性关系及检出限

配制阿魏酸和原儿茶醛的系列标准溶液，在优化条件下，以平均峰面积对质量浓度 (mg/L)绘制标准曲线，2种化合物的线性方程、相关系数及检出限 ($S/N = 3$)见表 1。由表可知，在一定的质量浓度范围内，平均峰面积 (y)与质量浓度 (x , mg/L)呈良好的线性关系。

表 1 阿魏酸和原儿茶醛的线性回归方程、相关系数及检出限

Compound	Regression equation	Correlation coefficient	Linear range $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Detection limit $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
Fenolic acid	$y = 239.6x - 34.82$	0.999 3	0.67~ 21.4	55.5
Protocatechuic aldehyde	$y = 335.2x + 113.25$	0.999 6	0.72~ 23	34.8

2.9 样品测定及回收率实验

用本方法对活血通脉片提取液 (138.49 g/L)平行测定 3次。样品电泳图见图 2 回收率实验结果见表 2。经计算，活血通脉片中阿魏酸与原儿茶醛的质量分数分别为 0.0040%、0.0027%，回收率分别为 94%~ 108%、91%~ 106%，RSD 均小于 3%。

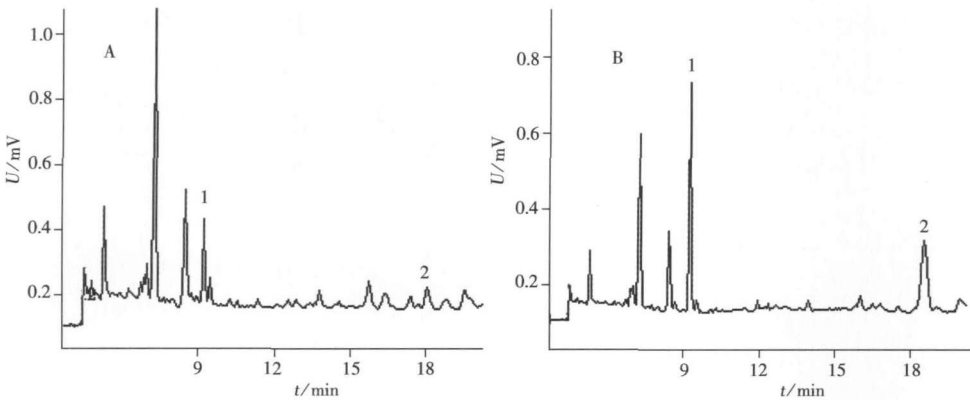


图 2 样品 (A) 与加标样品 (B) 的胶束毛细管电泳在线扫集电泳谱图
Fig. 2 Sweeping-MEKC electropherograms of real sample(A) and real sample spiked standard(B)
peak 1 fenolic acid 2 protocatechuic aldehyde

表 2 回收率实验结果
Table 2 Results of recovery test

Compound	Added $\rho_A/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $\rho_F/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R/\%$	$\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
Fenolic acid	3.45	3.73	108	99	3.3
	6.90	6.48	94		
	11.50	10.97	95		
Protocatechuic aldehyde	3.21	3.07	96	98	3.3
	6.42	5.83	91		
	10.70	11.37	106		

参考文献:

[1] 陈义. 毛细管电泳技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006 6
[2] 杜艳艳, 刘海清, 贾丽, 等. 毛细管电泳中的样品在线富集技术及其应用 [J]. 分析测试学报, 2008 27(1): 103- 112
[3] 曹成喜. 分析生物化学技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008 93
[4] QUIRINO JP, KM JB, TERABE S. Sweeping concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2002, 965(1/2): 357- 373
[5] QUIRINO JP, TERABE S. Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography [J]. Science, 1998, 282(5388): 465- 468
[6] QUIRINO JP, TERABE S. Sweeping of analyte zone in electrophoretic chromatography [J]. Anal Chem, 1999 71(8): 1638- 1644

(下转第 72 页)

体废物经蒸压处理, 其红外光谱强吸收区的 Si—O 伸缩振动频率降低。

参考文献:

- [1] MELLER N, KYRITSIS K, HALL C. The mineralogy of the $\text{CaO} - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ (CASH) hydroceramic system from 200 to 350 °C [J]. *Cem Concr Res*, 2009, 39(1): 45–53.
- [2] COLEMAN N J, BRASSINGTON D S. Synthesis of Al substituted 1.1 nm tobermorite from new sprint recycling residue: a feasibility study [J]. *Mater Res Bull*, 2003, 38(3): 485–497.
- [3] CHINDAPRASART P, PMRAKSA K. A study of fly ash lime granule unfired brick [J]. *Powder Technol*, 2008, 182(1): 33–41.
- [4] CICEK T, TANIRVERDIM. Lime based steam autoclaved fly ash bricks [J]. *Construction and Building Materials*, 2007, 21(6): 1295–1300.
- [5] 波任诺夫. 蒸压材料工艺学 [M]. 吕昌高, 译. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985: 77–83.
- [6] 建筑材料科学研究院. 水泥化学分析 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1982: 517.
- [7] HAUSER A, EGGENBERGER U, MUMENTHALER T. Fly ash from cellulose industry as secondary raw material in autoclaved aerated concrete [J]. *Cem Concr Res*, 1999, 29(3): 297–302.
- [8] 杨南如, 岳文海. 无机非金属材料图谱手册 [M]. 武汉: 武汉工业大学出版社, 2000: 277–278.
- [9] 李北星, 胡晓曼, 陈娟, 等. 高掺量混合材复合水泥的水化性能 [J]. *硅酸盐学报*, 2004, 32(10): 1304–1309.
- [10] KLIMESCH D S, RAY A. Effects of quartz content on the nature of Al substituted 11 angstrom tobermorite in hydrothermally treated $\text{CaO} - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ systems [J]. *Adv Cem Res*, 1999, 11(4): 179–187.
- [11] KLIMESCH D S, RAY A. DTA–TGA evaluations of the $\text{CaO} - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ system treated hydrothermally [J]. *Thermochim Acta*, 1999, 334(1/2): 115–122.
- [12] 柯昌君. 高铝粉煤灰蒸压制品强度的研究 [J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2007, 4(3): 111–116.

(上接第 67 页)

- [7] QURINO J P, TERABE S. Approaching a million fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: Cation selective exhaustive injection and sweeping [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(5): 1023–1030.
- [8] 李琨沫, 郭慧娟, 蒋晔, 等. 毛细管电泳在线富集技术及其在生物样品中药物分析的研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(10): 1771–1778.
- [9] QURINO J P, TERABE S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 902(1): 119–135.
- [10] 张申亮. 胶束电动毛细管色谱在中药化学成分分析中的应用 [J]. *药学实践杂志*, 2009, 27(1): 21–23.
- [11] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂 (第四册) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 141.
- [12] 翟学佳, 邵青, 程翼宇, 等. RP-HPLC 同时测定通脉口服液 4 种活性成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(7): 1087–1090.
- [13] 陈斌, 余岳林, 张少敏, 等. 用 HPLC 法测定止痛化癥胶囊中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸和丹酚酸 B 的含量 [J]. *药学服务与研究*, 2007, 7(1): 71–73.
- [14] 申欣. 反相高效液相色谱法同时测定活络消痛片中阿魏酸和原儿茶醛的含量 [J]. *中南药学*, 2008, 6(6): 680–682.
- [15] 肖雪红, 刘小莉, 索志荣, 等. RP-HPLC–ECD 测定通脉颗粒中 3 种化合物 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(12): 1924–1927.
- [16] 宋根萍, 郭荣. 乙醇对 SDS 胶束的临界胶束浓度和胶束聚集数的影响 [J]. *扬州师院学报: 自然科学版*, 1995, 15(4): 31–36.