

在线扫集 - 毛细管胶束电动色谱法对石榴与石榴叶中没食子酸含量的测定

魏立静, 吴远远, 孙汉文

(河北大学 化学与环境科学学院 河北省分析科学技术重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要: 建立了一种在线扫集 - 胶束电动色谱法测定没食子酸的新方法。考察了背景溶液 pH 值、十二烷基硫酸钠 (SDS) 浓度、样品基体组成和进样时间对富集效果的影响。使用未涂层的毛细管柱 (48.5 cm × 75 μm i.d., 有效柱长 40 cm), pH 9.0 的 20 mmol/L 硼酸盐 + 50 mmol/L SDS 为背景溶液, 在紫外检测波长 272 nm、运行电压 18 kV 的条件下, 200 s 内的富集倍数可达 20 倍。线性范围为 0.62~10.30 mg/L ($r=0.999$), 检出限 ($S/N=3$) 为 0.08 mg/L, 平均回收率为 104%。没食子酸迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.2% 和 1.6%。方法快速、准确可靠、灵敏度高、重复性好, 可检测石榴不同部位和石榴叶以及饮料中没食子酸的含量。

关键词: 毛细管胶束电动色谱; 在线扫集; 石榴; 没食子酸

中图分类号: O657.7; O611.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)03-0298-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.03.018

Determination of Gallic Acid in Pomegranate and Its Leaves by On-line Sweeping Micellar Electrokinetic Chromatography

WEI Lijing, WU Yuan-yuan, SUN Han-wen

(Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract An on-line sweeping micellar electrokinetic chromatographic method was developed for the determination of gallic acid. Effect of pH in background solution, concentration of SDS, matrix composition of the sample and injection time was investigated. The concentration factor for gallic acid could reach 20 times within 200 s by a non-coating fused-silica capillary column (48.5 cm × 75 μm, effective length 40 cm), using 20 mmol/L borate (pH 9.0) + 50 mmol/L SDS as the running buffer and 272 nm as detection wavelength under 18 kV separation voltage. The calibration curve of gallic acid was linear in the range of 0.62–10.30 mg/L with correlation coefficient of 0.999. The limit of detection ($S/N=3$) was 0.08 mg/L and the average recovery was 104%. The relative standard deviations (RSDs) for migration time and peak area of gallic acid were 1.2% and 1.6%, respectively. The proposed method was rapid, accurate and had high sensitivity and good reproducibility. It could be applied for the determination of gallic acid in pomegranate and its leaves as well as beverages.

Key words micellar electrokinetic chromatography; on-line sweeping; pomegranate; gallic acid

石榴 (Pomegranate) 含有丰富的多酚类物质, 其主要物质没食子酸具有驱虫、收敛、止血、涩肠、止痢等功效, 以及抗病毒、抗菌、抗癌、抗氧化等药理活性^[1]。没食子酸的含量因石榴部位和产地的不同而有差异。已有报道采用分光光度法^[2]、Folin-Ciocalteu 比色法^[3]测定石榴中的没食子酸; 高效液相色谱法测定石榴皮^[4-6]、食品^[7]和茶叶^[8]中的没食子酸; 毛细管电泳法测定消炎抗菌片^[9-10]、中草药^[11-12]、酒^[13]和茶叶^[14]中的没食子酸。但上述方法灵敏度较低且存在一定干扰。胶束在线扫集技术是一种有效的富集模式, 可显著提高检测灵敏度^[15-17]。本文提出了一种在线扫集 - 胶束电动色谱测

收稿日期: 2009-11-01; 修回日期: 2010-01-28

基金项目: 教育部博士点基金资助项目 (20050075003); 河北省自然科学基金资助项目 (B2008000583)

第一作者: 魏立静 (1985-), 女, 河北南和人, 硕士研究生

通讯作者: 孙汉文, Tel: 0312-5079739, E-mail: hanwen@hbu.edu.cn

定没食子酸的新方法, 并考察了没食子酸在石榴各部位及石榴叶中的分布。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 3D 毛细管电泳仪、二极管阵列检测器 (DAD) (德国安捷伦公司); 未涂层石英毛细管柱 (48.5 cm × 75 μm i.d., 有效柱长 40 cm, 河北省永年锐泽色谱器件有限公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司), PHS-3C 精密 pH 计 (上海); 数据采集和处理使用安捷伦化学工作站 A. 10. 02 版本。

没食子酸 (天津市科密欧化学试剂开发中心), 硼酸盐、甲醇、氢氧化钠和十二烷基硫酸钠 (SDS) 为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 样品处理

石榴样品产自保定。石榴皮、石榴叶、石榴籽均低温烘干、研磨, 准确称取 0.5 g 置具塞锥形瓶中, 加入 10 mL 体积分数为 50% 的甲醇, 超声提取 2 次, 每次 30 min, 冷却至室温。合并提取液, 离心, 将上清液收集于 100 mL 容量瓶中, 用 10 mmol/L 硼酸盐溶液稀释至刻度, 摇匀。石榴皮、石榴叶和石榴籽提取液分别用 10 mmol/L 硼酸盐溶液稀释 20 倍、20 倍、10 倍, 最后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上机进样分析。石榴汁用 10 mmol/L 硼酸盐溶液稀释 50 倍, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上机进样分析。

购自当地超市的饮料 (纯果乐) 用 10 mmol/L 硼酸盐溶液稀释 2 倍, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上机进样分析。

1.3 电泳操作

使用前用 0.1 mol/L NaOH 溶液、H₂O、硼酸盐缓冲溶液各冲洗 10 min, 每两次分析之间用 0.1 mol/L NaOH 溶液冲洗 3 min, H₂O 冲洗 2 min, 硼酸盐缓冲液冲洗 5 min, 每天实验结束后, 用 0.1 mol/L NaOH、水各冲洗 10 min, 使毛细管中充满水。选用 20 mmol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 9.0), 检测波长 272 nm, 温度 25 °C, 分离电压 18 kV。

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳条件的优化

2.1.1 背景缓冲溶液种类及浓度的影响 分别考察了磷酸盐和硼酸盐缓冲体系对响应值的影响, 发现硼酸盐缓冲体系优于磷酸盐缓冲体系。固定硼酸盐溶液 pH 值 (9.2)、电压 (18 kV), 考察其浓度的影响。发现迁移时间随着缓冲液浓度的增大而变长, 这是因为浓度增大导致双电层厚度减小, 电渗流减小。当浓度大于 20 mmol/L 时, 电流变大基线不稳。故选择 20 mmol/L 硼酸盐溶液为缓冲体系。

2.1.2 背景缓冲溶液 pH 值的影响 缓冲溶液的 pH 值强烈影响弹性石英毛细管内表面的特性, 通过影响电渗流的大小而影响迁移时间和分离度。实验考察了不同 pH 值的 20 mmol/L 硼酸盐溶液对样品峰高的影响。结果表明, 随背景缓冲溶液 pH 值的升高, 样品峰高增加, 迁移时间缩短。当背景缓冲溶液的 pH 值为 9.0 时, 样品峰高达到最大值。

2.2 富集条件的优化

2.2.1 样品基体组成对富集效果的影响 在优化电泳条件下, 考察了样品中电解质的种类和浓度对富集效果的影响。考察了 4 mg/L 的没食子酸在水、甲醇 - 水、磷酸盐、硼酸盐等电解质溶液中的富集效果。结果发现, 样品在硼酸盐溶液中的富集效果明显, 而在其他电解质中富集效果均不明显。其原因可能是硼酸盐与没食子酸生成了络合物, 增强了胶束和样品之间的相互作用, 从而增强了富集效果。实验选择 10 mmol/L 硼酸盐作为样品基体。

2.2.2 SDS 浓度对富集效果的影响 考察了不同 SDS 浓度 (10 30 50 70 90 mmol/L) 对峰高的影响。结果表明: 随着 SDS 浓度的增加, 样品峰高随之逐渐增高。当 SDS 浓度为 50 mmol/L 时, 峰高达到最大值。继续增大 SDS 浓度则会导致电流过高, 不利于分离测定, 故选择 SDS 最佳浓度为 50 mmol/L。

2.2.3 进样时间对富集效果的影响 固定其他实验条件不变, 当进样压力为 1.5 kPa 时, 考察了不同进样时间对富集效果的影响。实验表明, 随着进样时间的增加样品峰高增加, 当进样时间为 200 s 时,

样品峰形好, 杂质干扰最小, 具有足够高的灵敏度。随着进样时间的继续增加, 基线噪声增大, 且待测组分与其他杂质的分离度减小, 谱峰明显展宽, 不利于分离测定。因此选择实际样品的进样时间为 200 s。

2.3 分析特性

本文采取在线扫集-胶束电动模式, 样品带不含胶束相, 只有背景带含有胶束相。当施加电压后, 胶束定向移动通过样品带时, 胶束与样品相互作用从而带动样品运动使样品带压缩实现富集。在分离电压 18 kV、检测波长 272 nm、温度 25 °C 的条件下, 比较了 20 mmol/L 硼酸盐电泳缓冲液和 20 mmol/L 硼酸盐 + 50 mmol/L 十二烷基硫酸钠电泳缓冲液对灵敏度的影响(结果见图 1A)。结果表明, 使用含有表面活性剂 SDS 的胶束在线扫集法对没食子酸的富集倍数达 20 倍。

不同基质的样品经“1.3”步骤处理后上样分析, 电泳谱图如图 1B~F 所示。结果表明, 对于不同基质的样品, 没食子酸的迁移时间相同, 且与样品基体得到完全分离, 不存在干扰问题。

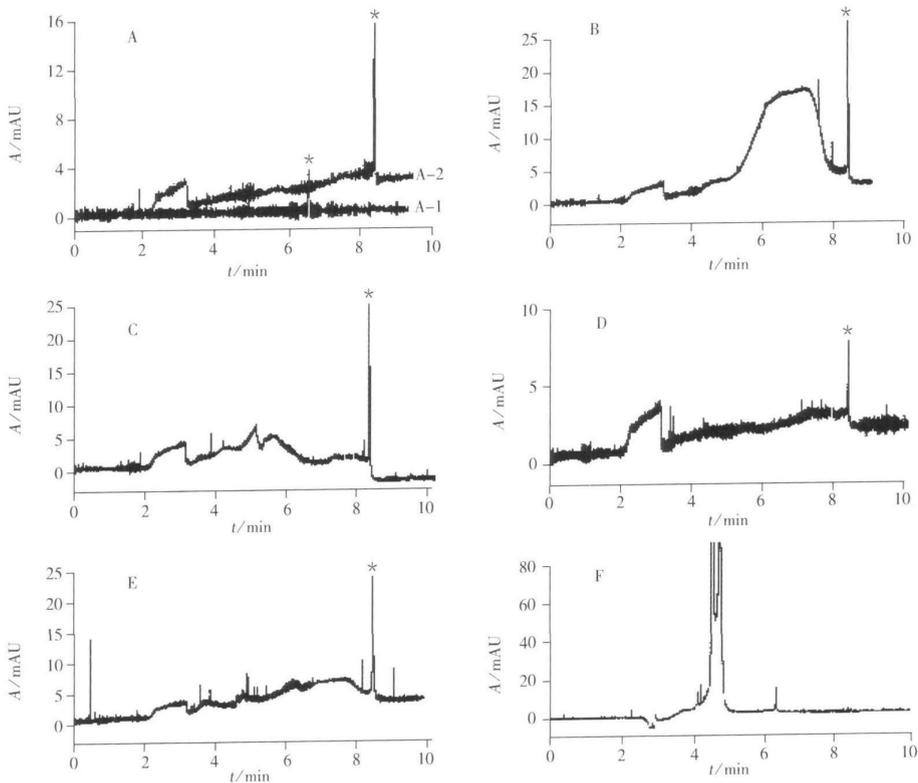


图 1 在线扫集毛细管电泳图谱

Fig 1 Electropherograms of gallic acid in the absence (A-1) and presence of SDS (A-2, B-F)

* gallic acid $\rho_{\text{gallic acid}}$: (A-1): 4.12 mg/L, (A-2): 1.24 mg/L; A: standard, B: pomegranate peel, C: pomegranate leaves, D: pomegranate seed, E: pomegranate juice, F: beverages, separation voltage: 18 kV; detection wavelength: 272 nm; temperature: 25 °C; 20 mmol/L borate buffer (pH 9.0)

优化实验条件下, 在 0.62~10.30 mg/L 范围内测定 5 个质量浓度的标准溶液, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (ρ , mg/L) 进行线性回归, 线性方程为 $Y = 14.93\rho - 6.87$, 相关系数 $r = 0.999$, 方法具有良好的线性。

本方法测定没食子酸的检出限 ($SN = 3$) 为 0.08 mg/L, 优于毛细管电泳法^[9-13]。平行测定 4 mg/L 的没食子酸标准溶液 5 次, 其迁移时间的 RSD 为 1.2%, 峰面积的 RSD 为 1.6%, 表明方法具有良好的重复性。

2.4 样品分析

按上述样品制备和测定方法, 采用标准曲线法分析了石榴叶、石榴皮、石榴籽、石榴汁和饮料样品, 同时进行加标回收实验。样品中没食子酸的含量和加标回收率见表 1, 其回收率为 94%~114%,

平均回收率为 104%, RSD 不大于 4.1%。测得石榴叶、石榴皮、石榴籽和石榴汁中没食子酸的含量分别为 10.26 mg/g、9.89 mg/g、1.77 mg/g 和 0.13 g/L, 饮料中未检出没食子酸。

表 1 没食子酸含量的测定与回收率 ($n=3$)
Table 1 Determination of gallic acid and recovery ($n=3$)

Sample	Original	Added			Found			Recovery $R/\%$			RSD $s_r/\%$		
Pomegranate leaves $w/(mg \cdot g^{-1})$	10.26	5.00	10.00	15.00	15.11	20.19	25.04	97	99	98	4.1	3.9	3.6
Pomegranate peel $w/(mg \cdot g^{-1})$	9.89	4.00	8.00	12.00	13.78	18.62	22.78	102	109	107	1.5	2.2	2.0
Pomegranate seed $w/(mg \cdot g^{-1})$	1.77	1.00	2.00	3.00	2.91	3.74	4.85	114	98	103	2.4	2.0	1.6
Pomegranate juice $\rho/(g \cdot L^{-1})$	0.13	0.07	0.13	0.20	0.21	0.26	0.34	114	103	105	0.6	1.4	2.5
Beverages $\rho/(mg \cdot L^{-1})$	-*	1.00	5.00	10.00	1.11	4.70	11.30	110	94	113	1.0	3.8	2.3

* no detected

3 结论

采用胶束电动毛细管电泳在线扫集技术测定没食子酸, 方法具有快速、灵敏度高和重复性好等特点。本方法的高灵敏度可允许样品高度稀释而有效地避免样品基体组分的干扰, 在很大程度上弥补了毛细管电泳在痕量组分测定方面的不足。

与文献报道值相比, 发现石榴中没食子酸的含量因其产地和品种的不同而存在一定差异。传统上以石榴皮入药, 而石榴叶中没食子酸的含量略高于石榴皮中的含量, 因此石榴叶也具有很好的开发前景。市售的某种饮料中未检出没食子酸, 与饮料标注明显不符, 值得对其质量问题加以关注。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典[S]. 1部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 63
- [2] 杨巧荷, 贾海鹰, 于海涛. 全石榴和石榴皮中没食子酸含量测定的比较[J]. 中国民族医药杂志, 2003, 9(1): 34-35
- [3] 田树革, 魏玉龙, 刘宏炳. Folin-Ciocalteu 比色法测定石榴不同部位总多酚的含量[J]. 光谱实验室, 2009, 26(2): 341-343
- [4] 陈威, 来谊, 沈利君. 高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 73-74
- [5] 帕丽达·阿不力孜, 张丽静, 热娜·卡斯木, 等. 高效液相色谱法测定新疆石榴皮中没食子酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2455-2456
- [6] 霍文, 刘占军, 张婷婷. 反相高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(5): 242-243
- [7] LEI Zhenian, JERVIS J, HELM R F. Use of methanolysis for the determination of total gallic and gallic acid contents of wood and food products[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3): 1165-1168
- [8] ZUO Yuegang, CHEN Haq, DENG Y wei. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector[J]. Talanta, 2002, 57(2): 307-316
- [9] 潘细贵, 汪洋, 雷湘. 高效毛细管电泳法测定消炎抗菌片中没食子酸含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(4): 424-426
- [10] 潘细贵, 阮晓琪, 汪洋. 高效毛细管电泳法同时测定消炎抗菌片中黄芩苷和没食子酸的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(11): 1069-1071
- [11] 翟海云, 杨冰仪, 黄庆华. 毛细管电泳法快速测定五倍子中的没食子酸[J]. 分析实验室, 2007, 26(11): 35-37
- [12] 茅向军, 鲁静, 林瑞超. 毛细管电泳法测定 2 种热淋清制剂中没食子酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(1): 62-65
- [13] PRASONGSIDDH B C, SKURRAY G R. Capillary electrophoresis analysis of *trans*- and *cis*-resveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine[J]. Food Chem, 1998, 62(3): 355-358
- [14] AUCAMP J P, HARA Y, APOSTOLIDES Z. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. J Chromatogr A, 2000, 876(1/2): 235-242
- [15] QU R NO J P, TERABE S. Sweeping of analyte zones in electrokinetic chromatography[J]. Anal Chem, 1999, 71(8): 1638-1644
- [16] 杜艳艳, 刘海清, 贾丽. 毛细管电泳中的样品在线富集技术及其在应用[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 103-112
- [17] SIMPSON S L, QU R NO J P, TERABE S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications[J]. J Chromatogr A, 2008, 1184(1/2): 504-541