

非水介质毛细管电泳电导检测虎杖中的白藜芦醇

郑妍鹏 李晓东 莫金垣* 谢天尧 李凤屏 李 娜

(中山大学化学与化学工程学院 广州 510275)

关键词 白藜芦醇, 虎杖, 分离检测, 非水介质毛细管电泳

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2002)06-0585-03

毛细管电泳 (CE) 是一种新型的高新分离分析方法, 但目前多在水溶液中完成, 要求被分析物具有一定的亲水性, 使其应用受到限制. 非水毛细管电泳 (NACE) 不但拓宽了毛细管电泳 (CE) 分析领域, 增加了可供优化的实验参数, 而且可使用更高的电压和离子强度, 因而有更高的分离度和灵敏度. 电化学检测以其结构简单, 方法比较灵活^[1], 对于非水毛细管电泳具有更大的检测优势和发展前景^[2]. 白藜芦醇属多羟芪类化合物 (polyhydroxystilbene, PHS), 是均二苯乙烯的酚羟基取代衍生物, 在虎杖中的含量很丰富, 具有抗菌、抗氧化、抗高脂血症、抗凝血及抗肿瘤等多种生物活性. 本文采用甲醇为分离介质, 三 (羟甲基) 氨基甲烷 硼酸 (THAM- H_3BO_3) 为支持电解质, 采用负高压, 使用电导检测对虎杖中白藜芦醇进行了分析.

仪器和试剂: CES98 毛细管电泳仪, 高压电源 (CZE30PN10/MCN22, 美国 Spellman High Voltage Electronics Corporation); 电导检测器 (中山大学电分析室研制, 其检测装置及连接方式见文献 [3]); 毛细管电泳数据站 (中山大学电分析室研制); pH5-3C 精密酸度计 (上海电光器件厂); 石英毛细管柱 $45\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ (i. d.); HP-6890 气相色谱带质谱检测器 (MSD-5973), 配 G1701B-02-05 工作站 (Hewlett-Packard, 美国), 所用色谱柱为 HP5-MS 熔融毛细管柱 ($30\text{ cm} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$), V (聚苯甲氧基硅氧烷): V (聚二甲基硅氧烷) = 5: 95.

甲醇, N,N -二甲基甲酰胺, 乙酸乙酯, 三 (羟甲基) 氨基甲烷, 硼酸, 乙酸铵, 乙酸钠均为市售产品, 所用试剂均为分析纯. 白藜芦醇 (反式结构) 对照品 (美国 Sigma 公司), 衍生化试剂 (双三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA, Sigma 公司).

标准溶液的制备: 取白藜芦醇 (3, 4', 5-Trihydroxy-trans-stilbene) 对照品 14 mg, 用乙酸乙酯溶解, 定容至 25 mL.

样品溶液的制备: 称取粉碎后虎杖 500 g, 用 1 500 mL 体积分数为 90% 的医用酒精回流 3 次, 合并提取液, 浓缩成浸膏. 用石油醚对浸膏回流 3 次, 每次 500 mL, 合并提取液. 用乙酸乙酯对浸膏中不溶部分回流提取 3 次, 每次 500 mL, 合并提取液并浓缩成浸膏. 对浸膏进行柱层析, 在 V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 7: 3 溶液中得到产物. 取目标物的提取浓缩液 (150 mL 的白藜芦醇乙酸乙酯溶液) 13 mL, 用乙酸乙酯定容至 50 mL.

缓冲溶液的制备: 分别制备 100 mmol/L 的硼酸, THAM, 乙酸钠, 乙酸铵的无水甲醇储备液. 各取适量配成不同浓度比的 THAM-硼酸体系及不同浓度的乙酸钠和乙酸铵体系.

电泳条件: 毛细管柱在使用前用 0.1 mol/L NaOH- H_2O 和运行电泳介质溶液分别洗约 5 min, 每次进样后用运行缓冲溶液洗柱 3 min. 进样采用重力进样方式, 进样高度为 15 cm, 进样时间为 10 s, 分离电压为 -18 kV. 实验在恒温 (25 $^{\circ}\text{C}$)、恒湿 (相对湿度 70%) 的实验条件下进行.

样品分析与加标回收实验: 在最佳条件下, 取样品溶液不经稀释直接进样测定, 由回归方程计算出样品溶液中白藜芦醇的含量为 71 mg/L. 取样品溶液稀释 2 倍后, 准确加入一定量的白藜芦醇标准溶

2001-10-08 收稿, 2002-03-12 修回

国家自然科学基金 (29675033) 和广东省自然科学基金 (001237) 资助项目

通讯联系人: 莫金垣, 男, 1934 年生, 教授, 博士生导师; E-mail: cesmjy@zsu.edu.cn; 主要从事电分析与化学计量学方面的研究

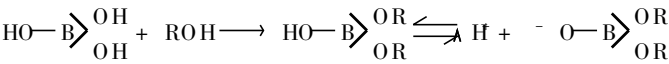
液,连续 6 次进样进行分析测定.

结果与讨论

非水介质体系和支持电解质的选择: 非水介质毛细管电泳中有机溶剂的选择,需要考虑介质的粘度、介电常数、挥发性、质子离解和偶极矩等多种因素的综合影响^[4]. 通过实验比较,发现无水甲醇可提高选择性和增大分离度,另外由于其较低的电渗流,可允许使用更高的分离电压,所以选用无水甲醇作为分离介质.

在有机溶剂中加入支持电解质使其具有一定的导电性是 NACE 的必要条件,在非水介质中通常是选用有机盐电解质. 经过对乙酸铵、乙酸钠和 THAM 硼酸体系进行的实验比较,发现 THAM 硼酸体系不但具有较高的稳定性而且对分离体系有很好的分离检测效果.

THAM 硼酸体系不同浓度配比的影响: 取适量的 THAM 和硼酸储备液,配成 THAM 浓度为 15 mmol/L,硼酸浓度分别为 2 3 4 5 6 7 和 8 mmol/L 的 THAM 硼酸缓冲体系. 按实验方法进行样品溶液,发现随着硼酸浓度的增大,主要干扰物峰的峰形变小,同时对称性增加;白藜芦醇峰的峰形随着硼酸浓度的增大而变大,这是因为羟基化合物与硼酸反应生成稳定的配合物,并使其显示强酸性,这样使得其在碱性介质中更加灵敏,其反应机理如下式所示:



但缓冲溶液浓度的增大,会产生大量的焦耳热,引起区带增宽,影响分离检测效果. 所以综合考虑,选用硼酸浓度为 5 mmol/L 的 THAM 硼酸体系作为分离检测的最佳浓度. 图 1A 为标准样品的毛细管电泳图,由于反式白藜芦醇在光照下会转化为顺式,所以有顺式白藜芦醇的峰. 图 1B~ 图 1D 为样品溶液的毛细管电泳图,峰 2 为反式白藜芦醇,峰 3 为未知物. 气相色谱-质谱联用法不能将干扰物和白藜芦醇完全分开,而在图 1B~ 图 1D 中二者不但能够完全分开,而且在时间上相差近 4 min,由此可以说明,非水介质毛细管电泳电导检测白藜芦醇是一种好的方法.

表观 pH 和进样时间对分离的影响: 用酸度计分别测 15: 2, 15: 3, 15: 4, 15: 5, 15: 6, 15: 7, 15: 8 (浓度单位为 mmol/L) THAM 硼酸体系的 pH 值,发现在甲醇介质里,其表观 pH 值的变化不大

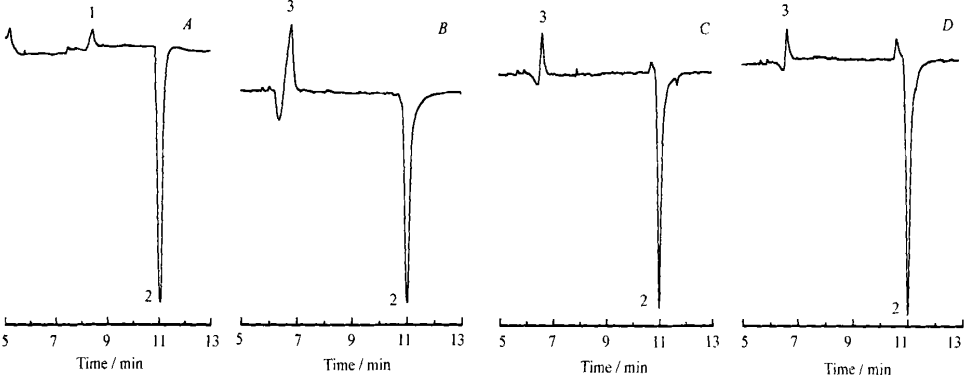


图 1 标准溶液白藜芦醇顺反异构体和样品溶液的毛细管电泳图

Fig. 1 Electropherogram of (A) resveratrol isomers (1. cis-; 2. trans-) and (B~ D) samples

Conditions A. background electrolyte tris(hydroxymethyl) aminomethane-boric acid (THAM 15 mmol/L+ boric acid 5 mmol/L); pH= 8. 2; Voltage - 18 kV; Injection time 10 s; Injection height 15 cm;

Peak identification 1. cis-resveratrol; 2. trans-resveratrol; B. background electrolyte

THAM 15 mmol/L+ boric acid 2 mmol/L; pH= 8. 2; Peak 3 the unidentified; others as in A; C. background electrolyte

THAM 15 mmol/L+ boric acid 5 mmol; pH= 8. 2, other as in B; D. background electrolyte

THAM 15 mmol/L+ boric acid 7 mmol/L; pH= 8. 2, other as in B

(pH值均在 8. 2左右). 所以 ,在选择最佳实验条件时 ,可以不考虑 pH的微小影响 .

分别在 3 5 8 11和 15 s时间下进样分析 ,发现进样时间在 15 s时 ,分离度和柱效均降低 ,这是因为进样时间过长 ,进样量增大 ,引起样品扩散 ,导致峰形扩宽 . 但进样时间少于 5 s时 ,进样量少 ,检测精度低 ,所以 ,鉴于这二者的考虑 ,选择进样时间为 10 s.

操作电压对分离的影响: 最佳实验条件下 ,分别在 - 12 - 14 - 16 - 18和 - 20 kV 的电压下进样分析 . 提高电压可以缩短分析时间 ,但产生的焦耳热也增多 ,导致缓冲溶液电导增加 ,电流增大 ,区带增宽 ,同时也不利于体系的恒温 . 在本体系中 ,产生的电泳电流很小 (小于 3 μ A) ,而且体系基线稳定 ,保留时间的重现性很好 ,所以综合两种因素考虑 ,选择 - 18 kV 作为分离电压 . 线性范围和精密度: 在最佳实验条件下进行分析 ,白藜芦醇的峰面积和含量呈线性关系 . 线性回归方程为: $Y= 0. 91+ 11. 8X$, $r= 0. 993 4$, (Y 为峰面积 , X 为质量浓度 (mg /L) , r 为线性相关系数);线性范围为: 27~ 540 mg /L. 在最佳实验条件下连续 6次进样 ,白藜芦醇峰面积的 RSD为 2. 46% . 表 1结果表明 ,该方法灵敏 ,准确 ,是分离检测白藜芦醇的一个好方法 .

表 1 样品溶液中反式-白藜芦醇回收率的测定

Table 1 Recovery of the determination for trans-resveratrol

	Backg round/(mg° L ^{- 1})	Added /(mg° L ^{- 1})	Found /(mg° L ^{- 1})	Average recovery %
trans-resveratrol	35. 5	20	56. 8	103. 4
	35. 5	20	66. 2	
	35. 5	20	76. 1	

参 考 文 献

1 ZHENG Yan-Peng (郑妍鹏) , XIE Tian-Yao (谢天尧) , MO Jin-Yuan (莫金垣) . *J Instrum Anal* (分析测试学报) [J], 2001, **20**(6): 12

2 Salimi-Moosavi H, Cassidy R M. *Anal Chem* [J], 1995, **67**(6): 1 067

3 XIE Tian-Yao (谢天尧) , ZHENG Yi-Ning (郑一宁) , MO Jin-Yuan (莫金垣) , et al. *J Instrum Anal* (分析测试学报) [J], 2000, **19**(3): 5

4 Sahota R S, Khaledi M G. *Anal Chem* [J], 1994, **66** 1 141

Determination of Resveratrol in *Rhizoma Polygoni Cuspidati* by Non-aqueous Capillary Electrophoresis

ZHENG Yan-Peng, LI Xiao-Dong, MO Jin-Yuan^{*} , XIE Tian-Yao, LI Feng-Ping, LI Na
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract Capillary zone electrophoresis (CZE) has been performed for determination of resveratrol in *Rhizoma Polygoni Cuspidati* in a non-aqueous solution of tris(hydroxymethyl) aminomethane(THAM) and boric acid with methanol as solvent. The effects of solvent, electrolyte, pH, concentration, running time and voltage were examined. The total separation and determination could be completed within 11 min. Under the optimum conditions, the linear range of trans-resveratrol was 27~ 540 mg /L. The RSD($n= 6$) of peak area for resveratrol was 2. 46% and the recovery was 103. 4% .

Keywords resveratrol, *Rhizoma Polygoni Cuspidati* , separation determination, non-aqueous capillary electrophoresis