

# 毛细管电泳法分离丹参水溶性有效成分—— 丹参素、原儿茶醛和原儿茶酸

中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心 (116011) 芮建中\* 邹汉法  
南京军区南京总医院临床药理科 袁倚盛 凌树森

**摘要** 毛细管电泳法分离丹参水溶性有效成分丹参素(DSS)、原儿茶醛(PAH)和原儿茶酸(PA)。分别考察电渗流改向剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)的浓度、电泳缓冲液pH值及电解质浓度、有机添加剂种类及浓度、运行电压、样品溶剂组成,以及检测波长等因素对有机阴离子类分析对象的峰迁移时间、分辨率、柱效的影响,优化选择的分离条件为:以pH为7.0,含0.5 mmol/L CTAB,浓度为200 mmol/L的磷酸盐溶液与乙腈按20:5混合配制电泳缓冲液,在75  $\mu$ m(id)  $\times$  34.5 (eff. 30) cm的毛细管柱(柱温控制于20 $^{\circ}$ C)上,10 kV(6 s)电迁移进样,运行电压为8 kV。在8 min内能将以20%乙腈水为溶剂的样品,即内标(对羟基苯甲酸, *p*-HBA), DSS、PAH和PA完全基线分离,柱效达40万/米理论塔板数。

**关键词** 高效毛细管电泳 丹参素 原儿茶醛 原儿茶酸

## Separation of Water-Soluble Active Principles of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) Danshensu, Protocatechuic Aldehyde and Protocatechuic Acid by HPCE

National Chromatographic Research & Analysis Centre, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (Dalian 116011) Rui Jianzhong and Zou Hanfa

Department of Clinical Pharmacology, Jinling Hospital Yuan Yisheng and Lin Shusen

**Abstract** Water-soluble active principles of *Salvia miltiorrhiza* Bge. — Danshensu (DSS), protocatechuic aldehyde (PAH) and protocatechuic acid (PA) were separated by HPCE. Many factors that can affect the resolution, sensitivity and column efficiency of organic anion, including the concentration of cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), pH value, concentration of phosphate buffer, percentage of organic modifier in the buffer, running voltage, composition of solvent used for the sample, and detector wavelength were investigated to optimize the experimental conditions. Good separation of internal standard (*p*-hydroxy benzoic acid), DSS, PAH and PA can be achieved in less than 8 min under the following conditions: capillary column, 75  $\mu$ m (id)  $\times$  34.5 (eff. 30) cm, uncoated; column temperature controlled at 20 $^{\circ}$ C; detector, UV 200 nm; injection, 10 kV /6 s; running voltage, 8 kV; running buffer, 200 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0, containing 0.5 mmol/L CTAB) and acetonitrile 5 mL in 20 mL (20:5, v/v). Sample solvent was acetonitrile-water (2:8 v/v). The column efficiency reached 400 000 per metre in theoretical plate number.

**Key words** HPCE Danshensu (DSS) protocatechuic aldehyde (PAH) protocatechuic acid (PA)

中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,性味苦微寒,为临床常用的活血药<sup>[1]</sup>。丹参水溶性主要有效成分为丹参素(danshensu, DSS),原儿茶醛(protocatechuic aldehyde, PAH)和原儿茶酸(protocatechuic acid, PA)。DSS能抗心肌缺血并对冠状动脉有作用,PAH能显著增加冠状动脉血流量,对抗ADP所致血小板聚集,并有广谱抗菌作用<sup>[2,3]</sup>。丹参药材及各种制剂中DSS、PAH和PA的

分离和测定方法有薄层层析-分光光度法,纸层析-紫外分光光度法,荧光光谱法,薄层扫描法和高效液相色谱法<sup>[4,5]</sup>。

高效毛细管电泳(HPCE)是80年代以来迅速发展新兴的分析方法,具有高效、灵敏、快速、样品用量少,以及容易自动化、操作简便、溶剂消耗少、环境污染小等优点,在氨基酸、蛋白质、多肽和核酸等生物分子的分析中得到广泛应用,并迅速扩展到食品

\* Address: Rui Jianzhong, National Chromatographic Research & Analysis Centre, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian

芮建中 男,主管药师。1994年7月在第二军医大学获硕士学位;1997年7月在中国药科大学获博士学位。1997年10月进入中科院大连化物所博士后流动站,研究方向为高效毛细管电泳在中药成分分析中的应用。固定地址:南京军区南京总医院临床药理科,南京 210002

化学、环境化学、临床医学和药学中,CE分离有机分子、药物分子,特别是在手性分子和中药成分分析方面的能力,已显示出较大优越性<sup>[6-9]</sup>。本文介绍用毛细管区带电泳(CZE)分离有机阴离子类中药成分丹参素、原儿茶醛和原儿茶酸

## 1 材料和方法

1.1 仪器:自动毛细管电泳仪 Biofocus<sup>®</sup> Capillary Electrophoresis System 2000 型(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA),紫外检测器;毛细管柱:75  $\mu$ m $\times$  34.5 cm,河北永年光纤厂,有效长度为柱长减去 4.5 cm,设柱温 20 $^{\circ}$ C;自动控制软件 Biofocus operating software (Version 5.0);pH 计(杭州立丰仪表设备厂)

1.2 试剂和药品:氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙醇为分析纯,江苏太仓化工厂生产;甲醇、乙腈为色谱纯,江苏淮阴精细化工研究所生产;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)购自华美生物工程公司。对羟基苯甲酸(*p*-HBA)作为内标,购自 SIGMA 公司;丹参素、原儿茶醛和原儿茶酸购自中国药品生物制品检定所。

1.3 溶液配制:分别配制浓度为 1.0, 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液;浓度为 100 mmol/L 的磷酸二氢钠(pH 4.93)和磷酸氢二钠(pH 9.15);配制浓度为 100, 150, 200, 250 mmol/L 的磷酸盐背景缓冲液(由等浓度的磷酸二氢钠与磷酸氢二钠按体积比为 1:1 混合而成);过滤重蒸水为去离子水。在考察和优化分离条件时,如 CTAB 浓度、有机添加剂种类和浓度、样品溶剂组成等,则在磷酸盐背景缓冲液中添加各种试剂配制而成。电泳冲洗液和电泳缓冲液在使用前经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,并超声脱气。

1.4 新柱预处理:新的空柱分别用 1.0 mol/L 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液和过滤重蒸水各冲洗 60 min,活化柱表面,用氮气吹干后备用。

### 1.5 电泳条件选择和优化

1.5.1 CTAB 浓度:被分析物为有机阴离子,带负电荷,其电泳方向和电渗流方向(正极 $\rightarrow$ 负极)相反,一方面电迁移方式难以进行,另一方面样品达到检测端的时间很长或无法到达检测窗。因此,采用电渗流改向剂 CTAB,使电渗流方向由负极向正极,并使电泳仪的检测端电极为正极( $\rightarrow$  +),从而达到快速、高效的分离。在磷酸盐背景缓冲液中添加 CTAB,配制成浓度分别为 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 mmol/L 的磷酸盐 CTAB 电泳缓冲液,考察电渗流改向剂浓度对分析时间的影响。

1.5.2 缓冲液 pH 和浓度:分别配制含 0.5 mmol/L CTAB 的 100 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 4.93)和磷酸氢二钠(pH 9.15)。另外,配制 pH 为 7.0,含 0.5 mmol/L CTAB,磷酸盐缓冲液浓度分别为 100, 150, 200 和 250 mmol/L 的电泳缓冲液。考察磷酸盐缓冲液的 pH 和浓度对分离效果的影响。

1.5.3 有机添加剂:考察在磷酸盐背景缓冲液中添加有机试剂乙腈、乙醇和甲醇对分离效果的影响,以及添加的乙腈浓度高低对峰形和分辨率的影响。

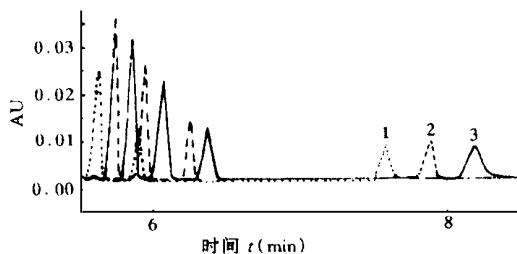
1.5.4 样品溶剂组成:在电泳缓冲液条件基本确定后,考察分别以水-乙腈(2:8)为溶剂配制的样品在含 0.5 mmol/L CTAB 的 200 mmol/L 磷酸盐电泳缓冲液中对羟基苯甲酸、原儿茶醛和丹参素的分离结果。

1.5.5 运行电压:考察在优化选择的电泳缓冲液中,6, 8, 10 kV 不同运行电压下分离效果,并选择分离速度快、分离效率高、运行稳定的电压。

1.5.6 检测波长:考察标准液样品在不同检测波长下峰形和峰高的变化情况,选择灵敏度最高的测定波长。

## 2 实验结果

2.1 电渗流改向剂浓度与迁移时间的关系:当 CTAB 浓度为 0.3 mmol/L,电渗流已改向,但样品出峰慢,迁移时间长,第一峰位(内标峰)出峰时间大于 15 min,达不到快速分离的目的;当 CTAB 浓度为 0.7 mmol/L,出峰较快,但高浓度样品中内标与原儿茶酸不能完全基线分离;用 0.5 mmol/L 浓度时,样品分离度高,峰迁移时间也较短。不同 CTAB 浓度下分离结果见图 1。

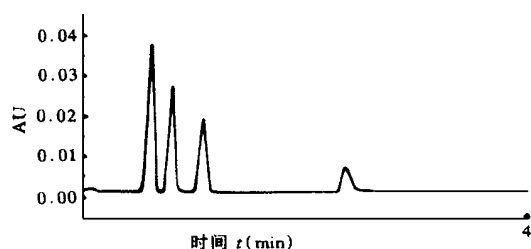


毛细管电泳条件:电泳缓冲液为 pH 7.0, 200 mmol/L 磷酸盐-乙腈(20:5), CTAB 1= 0.7 mmol/L, 2= 0.6 mmol/L, 3= 0.5 mmol/L;毛细管空柱为 75  $\mu$ m $\times$  34.5 (eff., 30) cm;电迁移在 10 kV /6 s;运行电压 6 kV;柱温为 20 $^{\circ}$ C;检测波长 UV 200 nm;样品中各组分浓度均为 0.50  $\mu$ g/mL。

图 1 CTAB 浓度对被分离组分峰迁移时间的影响

2.2 缓冲液 pH 和电解质浓度与分离度的关系:样

品在 100 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 4.93) 或 100 mmol/L 磷酸氢二钠 (pH 9.15) 背景缓冲液条件下分离差,而在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中出峰良好,并达到相对较满意的分离度 (见图 2)。缓冲液中电解质浓度是影响分辨率的重要因素,低浓度的缓冲液不能使样品 (特别是高浓度的样品) 达到基线完全分离。随着缓冲液电解质浓度增大,分离度增大。但是,缓冲液电解质浓度过高时,加较低电压就产生较大的运行电流,因而限制了运行电压的提高,并易产生较大的焦耳热,稳定性下降。故选择磷酸盐浓度为 200 mmol/L 的缓冲液。



毛细管电泳条件: 电泳缓冲液为 pH 7.0, 0.5 mmol/L CTAB, 100 mmol/L 磷酸盐-乙腈 (20:5); 运行电压 10 kV; 其它条件同图 1

图 2 缓冲液 pH 对分离度的影响

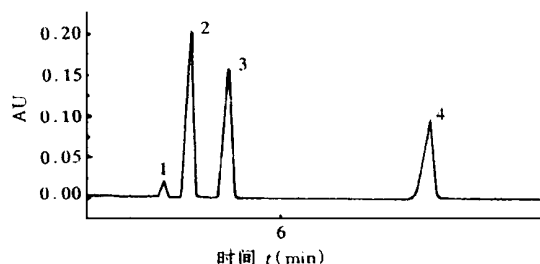
2.3 有机添加剂对分离和灵敏度的影响: 当电解质缓冲液中加入甲醇或乙醇时, *p*-HBA、PA 和 DSS 的分离很差, PAH 的峰形也较差。当加入乙腈,并随着其浓度逐渐增加,分离度及 PAH 的峰形得到明显的改善。磷酸盐缓冲液与乙腈的比例 ( $V/V$ ) 分别为 20:2, 20:3, 20:4 和 20:5 时,以 20:5 为最佳。当乙腈浓度进一步增加 (20:8) 分析时间明显延长,且分离效果下降。

2.4 样品溶剂组成与峰形: 以水或乙腈-水 (2:8) 为溶剂配制的标准溶液,在优化选择的电泳分离条件下,高浓度样品的分离度及峰形无显著差异,而在低浓度 (如 DSS、PAH 和 PA 均为  $0.05 \mu\text{g/mL}$ ) 时,用乙腈-水为溶剂,被分析成分的峰形和峰高较水样要好。

2.5 运行电压对分离结果的影响: 运行电压的高低主要影响分离度和分离效率,在低电压时分离度增大,但这是以延长分离时间为基础。由于本方法用较高的电解质浓度,在高电压时,电流增大较快,产生更多焦耳热,甚至产生气泡,导致峰形变差或运行失败。综合考虑分离度、分离效率、运行电流大小和峰形的优劣,最后采用 8 kV 运行电压,8 min 内样品达到基线完全分离。

2.6 检测波长与灵敏度: 考察在 200, 214, 230, 254, 267 和 281 nm 紫外检测波长下的峰形和峰高的变化。文献报道中检测波长均用 281 nm,本研究通过变换不同波长,分析并比较测定结果认为,样品在 200 nm 紫外检测其峰形和峰高较 281 nm 及其它波长要好。同时较大地提高了检测灵敏度,通过方法选择性考察,样品位置无干扰。

2.7 优化的分离条件: pH 为 7.0, 含 0.5 mmol/L CTAB, 浓度为 200 mmol/L 的磷酸盐缓冲液与乙腈按 20:5 混合配制电泳缓冲液。冲洗条件为: 0.1 mmol/L NaOH 90 s, 过滤重蒸水 180 s 和电泳缓冲液 120 s。在  $75 \mu\text{m}$  (id)  $\times$  34.5 (eff. 30) cm 的毛细管柱 (柱温控制于  $20^\circ\text{C}$ ) 上, 10 kV (6 s) 电迁移进样, 运行电压为 8 kV, 紫外检测波长为 200 nm。每一次运行后用过滤重蒸水冲洗 180 s, 再运行下一样品。优化分离条件下得到的电泳图谱见图 3。



毛细管电泳条件: 电泳缓冲液为 pH 7.0, 0.5 mmol/L CTAB, 200 mmol/L 磷酸盐-乙腈 (20:5); 运行电压 8 kV; 样品含 *p*-HBA 为  $0.25 \mu\text{g/mL}$ , PA, DSS 和 PAH 各为  $5.00 \mu\text{g/mL}$ ; 样品溶剂组成为乙腈-水 (2:8); 其它条件同图 1

图 3 优化分离条件下被分析组分 *p*-HBA (1), PA (2), DSS (3) 和 PAH (4) 的电泳图谱

### 3 讨论

毛细管电泳法在中药复杂成分分析中的应用不断增加。本研究尝试用 CZE 法快速分析中药丹参中有机阴离子类活性成分,用优化的分离条件,使 DSS、PAH、PA 和 *p*-HBA (内标) 4 种成分在较短时间 (8 min) 内得到基线完全分离,柱效达 40 万/米理论塔板数。由于采用电渗流改向剂及电极反向 ( $- \rightarrow +$ ) 运行,可以排除样品中带正电成分的干扰,与文献报道方法比较,具有高效、快速、灵敏和准确的特点,并显示出样品用量少 (每次进样仅几个 nL)、试剂消耗少、无柱污染和自动化运行的优势<sup>[10]</sup>。可以为丹参制剂的质量控制,丹参水溶性有效成分的血浆样品分析及体内药代动力学研究提供方法学基础。有关丹参制剂的人体药代动力学研究结果将进

## 一步报道

分离条件的选择和优化,一般从分辨率、柱效、分离效率和检测灵敏度等方面进行考察。在 HPCE 中分离的影响因素主要为 pH 缓冲液电解质种类和浓度、有机添加剂的种类和浓度、运行电压、进样方式和进样量、样品溶剂组成及柱温。在 pH 较高 (9.15) 或较低 (4.93) 时, DSS-PAH 和 *p*-HBA 的分离差, 主要由于三者的带电量及分子量相对接近, 而其分离效果是电迁移效应 (质荷比的大小决定) 和电渗流效应的总和。熔硅毛细管内壁表现的 Si-OH 的电离对 pH 非常敏感, pH 较高时, Si-OH 的电离基本饱和, EOF 很大, 相应减弱电迁移效应的分离作用; pH 较低时, 电渗流下降而使阴离子的解离也下降, 电迁移效应下降, 因此在 pH 适中 (7.0) 的条件下, 电渗流效应及电迁移效应的综合结果是 DSS-PAH、PAH 和 *p*-HBA 基本达到分离。但是以含 CTAB 0.5 mmol/L, 100 mmol/L 的磷酸盐背景缓冲液 (pH 7.0) 作分离介质, 内标与高浓度样品成分无法达到基线完全分离, 而且 PAH 的峰形相对较差。为了提高分辨率和灵敏度, 一方面增加磷酸盐浓度, 另一方面添加有机试剂。提高电解质浓度能达到更好的分离度和增大进样的柱上浓缩效应, 有利于改善峰形和进行定量分析; 添加有机试剂一般能提高解离度较弱的有机组分的进样量, 并改变其峰形<sup>[10]</sup>。本研究考察了乙腈、甲醇和乙醇三种常用有机添加剂的作用, 以乙腈的分离效果为最佳, 较明确的作用机制有待进一步的研究和探讨。

文献均采用 281 nm 作为丹参水溶性成分测定的检测波长, 本研究经多种波长测定比较采用 200

nm, 目的是进一步提高灵敏度。作者认为在实际测定及方法选择性考察中被分析成分出峰位若无干扰峰时, 可以选用吸光度更高的检测波长, 特别是进行体内样品测定和药代动力学研究时, 更有实际意义。DSS 在 200 nm 检测, 最低检测限可达  $0.025 \mu\text{g/mL}$ 。毛细管电泳采用在柱检测, 检测灵敏度非常高, 但由于进样量太少, 光程短 (柱内径为  $75 \mu\text{m}$ ), 实际检测灵敏度受到限制, 故优化选择新的检测波长。

为了提高检测灵敏度, HPCE 法中独特的柱上浓缩技术也是目前研究的热点<sup>[11]</sup>。本文主要通过增加电解质浓度和降低样品溶液的电场强度 (添加 20% 乙腈) 达到浓缩效应。目前应用较多方法有: (1) 场放大进样, 包括: 导入样品塞切换极性, 排除样品基体; 电迁移场放大进样; 场放大极性切换进样。(2) 色谱富集进样。(3) 单毛细管 ITP-CZE 经浓缩进样。在场放大进样中存在堆积极限, 进样量受到限制。本文通过不同进样电压及进样时间的结果比较, 选用理想的电迁移进样方式 (10 kV / 6 s)。

## 参考文献

- 1 李家泰主编. 临床药理学. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 1408
- 2 阴健, 等主编. 中药现代化研究与临床应用. 北京: 学苑出版社, 1993. 171
- 3 杨春欣. 中国药理学通报, 1997, 13(4): 298
- 4 崔艳萍. 中草药, 1996, 27(8): 503
- 5 倪坤仪, 等. 药学报, 1988, 23(4): 293
- 6 魏伟, 等. 药学报, 1997, 32(6): 476
- 7 尹茶, 等. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 209
- 8 芮建中, 等. 中国药学杂志, 1998, 33(9): 553
- 9 芮建中, 等. 药学报, 1998, 33(7): 517
- 10 邓延倬, 等编著. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社, 1996. 175
- 11 宋立国, 等. 分析化学, 1997, 25(6): 722

(1999-07-02 收稿)

## CWJ 超微粉碎机问世

### 攻克粉碎过程中的温升难题, 通过浙江省科委技术成果鉴定

这是一种特别适宜于纤维类中草药及矿物类、骨质类中药材常温下超微粉碎的新一代单元设备, 日前通过了省级新产品鉴定, 专家认为该机的试制成功是粉体工程的重大突破, 对促进中医、中药的发展具有现实意义。

该产品是依托产、学、研联合自主开发研制的新颖高效组合式超微粉碎设备, 设计先进, 其创新性、先进性在于将高精度涡轮式分级和高速冲击微粉碎机有机结合, 成功地解决了粉碎过程中的温升问题, 达到较大的节能效果, 且具有较好的使用可靠性; 并配有高压负压吸风系统, 使产品结构紧凑、效率高、运行可靠。粉碎粒度达 10 微米以下, 最细对中草药材可达 3~5 微米以下, 粒度无极可调, 粒度分布窄。

经用户使用, 反映良好, 认为该机是现阶段中药制备过程中“切碎”工序应用超微粉碎技术的较佳机型, 它比传统方式减少污染, 降低成本, 改善环境, 操作简便, 占地少, 投资小, 能耗低, 且粉碎细度能达到与气流粉碎机同样的要求, 便于工业化生产, 发展整个中药产业。

### 规模大、新品多、品种全成套超微粉碎设备生产基地

浙江丰利粉碎设备有限公司 电话/传真: 0575-3185888 3100888 3182888

总经理: 王春峰 联系人: 叶向红 地址: 浙江省嵊州市城关罗柱岙 邮编: 312400