

毛细管电泳高频电导法快速测定桂枝中的桂皮酸

翟海云¹, 徐健君¹, 陈缵光^{2*}, 王峻梅², 蔡沛祥¹, 莫金垣^{1*}

(1. 中山大学化学与化工学院, 广东 广州 510275; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510089)

摘要:目的 建立了毛细管电泳高频电导法快速简便测定桂皮中桂皮酸的新方法。方法 考察了实验参数对分离和检测的影响。电泳条件为: 缓冲液 5 mmol/L Tris+ 1 mmol/L H₃BO₃+ 10% CH₃OH (pH=9.0), 分离电压 20.0 kV。结果 桂皮酸的峰形良好, 出峰时间快, 线性范围为 0.35~17.0 μg/mL, 检出限为 0.15 μg/mL。桂枝药材用缓冲溶液超声提取后测定, 方法回收率达 93.5%~97.0%。结论 为桂皮酸的含量测定提供了一种快速和简便的方法。

关键词: 桂枝; 桂皮酸; 毛细管电泳; 高频电导检测; 非接触式电导检测

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0109-03

Rapid and simple determination of cinnamic acid in *Ramulus Cinnamomi* by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection

ZHA I Hai-yun¹, XU Jian-jun¹, CHEN Zuan-guang², WANG Jun-mei², CA I Pei-xiang¹, MO Jin-yuan¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **Objective** A rapid and simple method used to determine cinnamic acid in *Ramulus Cinnamomi* by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection was described. **Methods** In the buffer of 5 mmol/L Tris+ 1 mmol/L H₃BO₃+ 10% CH₃OH (pH=9.0) at voltage of 20.0 kV, the cinnamic acid in *Ramulus Cinnamomi* could be separated and detected well. **Results** Under the chosen condition, the linear concentration of cinnamic acid ranged from 0.35 to 17.0 μg/mL, the limit of detection was 0.15 μg/mL. The method was used for analysis of cinnamic acid in *Ramulus Cinnamomi* satisfactorily with recovery of 93.5%—97.0%. **Conclusion** This method is rapid and simple for the determination of cinnamic acid.

Key words: *Ramulus Cinnamomi*; cinnamic acid; capillary electrophoresis; high frequency conductivity detection; contactless conductivity detection

桂枝是常用的中药品种, 为历版《中华人民共和国药典》所收载^[1], 是樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩茎。用于解表散寒、温经通脉、化气行水等, 据《本草经疏》称, 桂枝有和营、通阳、利水、下气、行瘀、补中等6大功效。桂皮酸(cinnamic acid, CA)是桂枝的有效成分之一, 具有抗菌、升高白细胞、利胆等功效^[2], 快速、简便并准确地测定桂枝中的桂皮酸对桂枝的质量检测具有重要的意义。文献报道测定桂皮酸含量方法有高效液相色谱^[3]、电化学方法^[4,5]等, 这些方法分析时间长、试剂成本高、所需样品量较多。曾用胶束毛细管电泳法^[6]测定桂皮酸, 但分离需时间较长, 紫外检测灵敏度不高。新的高频电导检测器^[7](非接触式电导检测器)避免了电极与溶液直接接触, 不但寿命长、成本

低, 而且灵敏度较高、使用极为方便。本实验利用该检测装置, 在弱碱条件下, 采用区带毛细管电泳模式, 在很短时间(6.5 min)内对桂枝中的桂皮酸进行了分离和检测, 方法快速、简便。

1 仪器、试剂与材料

高压电源(自制^[8]), 高频电导检测器(自制^[7])。石英毛细管(150 μm id), 河北永年锐沅色谱器件有限公司。数据工作站, 中山大学化学与化工学院提供, 信号采集使用台湾 EVOC 出品的 PCL—711B 型 A/D 卡; 数据记录与处理在普通 P4 微机上完成。中草药粉碎机。超声波清洗器。

桂皮酸对照品(中国药品生物制品检定所), 三羟甲基-氨基甲烷(Tris, GR 香港分装); 乙二胺、三乙胺、β-环糊精(β-CD)等均为国产分析纯; 所用水为

* 收稿日期: 2004-03-22

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(021808)

作者简介: 翟海云(1975—), 女, 博士研究生, 主要从事毛细管电泳、电分析化学和药物分析的研究。E-mail: haiyun_zhai@263.net

* 通讯作者 Tel: (020) 88364586 Fax: (020) 87330558 E-mail: chenzg@gzsums.edu.cn

二次蒸馏水。桂枝药材购自广州采芝林药店。

2 方法与结果

2.1 实验方法: 毛细管柱使用前, 先用 0.1 mol/L NaOH、H₂O、缓冲液 [5.0 mmol/L Tris + 1.0 mmol/L H₃BO₃ + 10% CH₃OH (pH = 9.0)] 分别洗 30、15、15 min。电泳条件: 缓冲液分离电压 20.0 kV, 20.0 cm 位差虹吸进样 10.0 s, 毛细管总长 65.0 cm, 有效长度 57.0 cm, 运行方向 (+) → (-)。高频电导检测器的输出信号经数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。实验在恒温 (25℃)、恒湿 (相对湿度 60%) 条件下进行。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取桂皮酸 0.015 0 g, 加缓冲液定容于 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 1.50 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 样品溶液制备: 精密称取桂枝药材粉末 0.200 0 g, 置于具塞锥形瓶中, 用缓冲液超声提取 2 次, 每次 30 min, 滤过, 定容于 10 mL 量瓶中, 即得待测样品溶液。

2.4 线性范围和检出限: 在优化的实验条件下, 桂皮酸对照品的毛细管电泳图见图 1, 桂皮酸的峰面积与含量呈线性关系。线性方程为 $Y = 77.9 + 112X$, $r = 0.995$, 线性范围为 0.35~16.0 μg/mL, 检出限为 0.15 μg/mL ($S/N = 3$)。

2.5 精密度试验: 取桂枝药材供试品溶液, 重复 6 次进样, 测定其桂皮酸含量, 计算 RSD 为 2.6% ($n = 6$)。

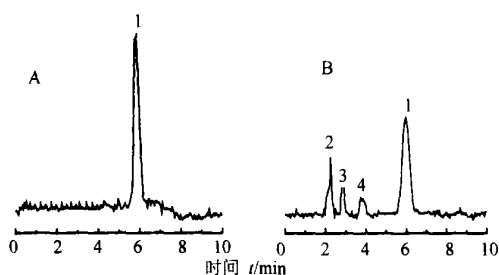
2.6 重现性试验: 取同一份桂枝药材粉末 6 份, 按样品供试液的制备方法平行操作, 测定峰面积, 计算 RSD 为 3.0% ($n = 6$)。

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液 (在 4℃ 下保存) 在 0、2、4、6、8 h 测定峰面积, RSD 为 1.5%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 回收率的测定: 取 0.200 0 g 桂枝药材粉末, 加入适量高、中、低浓度的桂皮酸标准储备液, 按样品溶液制备方法操作。将所得溶液适当稀释后进样测定, 计算加样回收率, 平均回收率为 94.8%, RSD 为 2.6% ($n = 6$)。

2.9 桂枝样品中桂皮酸的含量测定: 在选定的实验条件下, 取样品溶液稀释 5 倍后进样测定, 见图 1, 根据线性回归方程计算出稀释 5 倍的桂枝样品溶液中桂皮酸的含量为 3.95 μg/mL, 即测得的桂枝中桂皮酸含量为 0.988 mg/g。

3 讨论



1-桂皮酸 2~4-未知物

1-cinnamic acid 2~4-unknown impurities

图1 对照品(A)和桂枝提取溶液(B)的毛细管电泳图

Fig. 1 Capillary electropherograms of standard substance (A) and sample (B)

3.1 缓冲溶液的选择: 实验考察了 NaAc-HAc、三乙胺-H₃BO₃、二乙胺-H₃BO₃、Tris-H₃BO₃、Tris-柠檬酸、NaH₂PO₄-H₃PO₄、NaOH-NaHPO₄、Tris-Na₂HPO₄ 等几种缓冲体系不同的浓度、比例和 pH 值对分离的影响。结果发现: 在 Tris-柠檬酸、NaH₂PO₄-H₃PO₄、NaOH-Na₂HPO₄、三乙胺-H₃BO₃、二乙胺-H₃BO₃ 缓冲液体系中, 桂皮酸不出峰; 在 NaAc-HAc 缓冲体系中, 出峰较慢 (9 min); 在 Tris-Na₂HPO₄ 缓冲体系的电流较大, 峰形较差; 实验证明 Tris-H₃BO₃ 是比较理想的缓冲体系, 在较高的分离电压下电泳电流很小, 出峰较快, 有利于实验条件的优化。在该基础上进一步比较了不同比例和浓度的 Tris-H₃BO₃ 缓冲体系对分离的影响。结果发现, 随着 H₃BO₃ 浓度的增加, 分离度加大, 但分析时间延长; 随着 Tris 浓度的增加, 分离度加大, 灵敏度下降, 分析时间延长。比例不变时, 随着缓冲液浓度的加大, 分离度加大, 但灵敏度降低, 出峰延迟。故选择优化的缓冲液浓度为 5.0 mmol/L Tris + 1.0 mmol/L H₃BO₃。

3.2 体系 pH 值的影响: 缓冲溶液的 pH 值是影响分离检测的一个重要因素, 弱碱性条件下, 桂皮酸带负电便于分离和电导检测。考察了缓冲溶液 pH 值对分离检测效果的影响, 实验发现在 pH 为 7.0~9.0, 随着 pH 增加, 桂皮酸的峰高逐渐变大, pH 超过 9.0 后峰高又缓慢降低, 见图 2。但迁移时间随着 pH 的增加逐渐延长, 综合考虑分析时间和检测灵敏度 2 种因素, 实验选择 pH 值为 9.0。

3.3 添加剂的选择: 有机溶剂的加入可以提高样品组份的分离度, 改善峰形, 提高灵敏度。实验考察了不同种类 (甲醇、乙醇和乙腈) 和添加不同比例的有机溶剂对分离测定的影响。结果表明, 选用甲醇作添加剂可有效提高桂皮酸的检测灵敏度。实验分别考

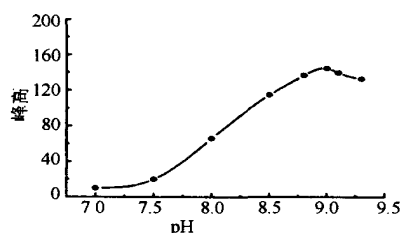


图2 pH值的影响

Fig. 2 Influence of pH value

察了添加0、5%、10%、15%、20%、25%和30%甲醇的缓冲液体系对分离的影响,结果显示,随着甲醇比例增加,电流变小,灵敏度提高,但出峰时间延迟,综合考虑,选择甲醇比例为10%作为添加剂。

3.4 对照品和样品溶液溶剂的选择:实验中发现,选择不同的溶剂来配制样品,在选定的缓冲液中出峰情况不同。实验中曾尝试采用甲醇、NaOH、缓冲溶液为溶剂来制备对照品和样品溶液。采用甲醇为溶剂制备的溶液,进样后峰形差,拖尾严重;而以NaOH做溶剂则会额外增加样品的电导,干扰出峰;实验采用缓冲液做溶剂,桂皮酸对照品溶液的拖峰现象得到明显改善。且与甲醇相比,缓冲液更适合于桂枝药材中桂皮酸的提取,稀释后的提取液的峰形良好,有利于测定,见图1。

3.5 分离电压、进样时间和进样高度的选择:实验在10.0~28.0 kV分离电压下进样分析。结果表明,提高电压可以缩短分析时间,但电压过高则分离度变差,且高电压下,产热增加,体系的基线噪音比较大。所以,综合上述因素考虑,优化条件为20.0 kV。在相同条件下比较了进样时间为2.0~16.0 s的分离效果,结果表明,当进样时间延长时,出峰时间减少,峰高与峰面积呈增大趋势。但当进样时间超过10.0 s后,峰高增加的幅度减少,分离效果变差。综合考虑,优化的进样时间为10.0 s。在相同条件下考察了虹吸进样高度为10.0~30.0 cm的分离检测效果,综合考虑,选择进样高度为20.0 cm。

3.6 毛细管内径和有效长度的选择:在相同条件下比较了100、150、200 μm 内径的毛细管的分离效果。内径增大,峰高,峰面积也增大,检测灵敏度提

高,但分离度下降,并且电流也增大,产生的焦耳热增多,导致基线噪音增大;内径减小,则出峰时间延长,灵敏度大幅度降低。实验选择150 μm 内径的毛细管。在相同条件下比较了毛细管有效长度为49.0、51.0、53.0、55.0、57.0、59.0和61.0 cm的分离效果。随着毛细管有效长度增加,分离度变大,基线噪音变小,但出峰时间延迟。随着毛细管有效长度变短,分离速度加快,但分离场强变大,从而产生的干扰也就越大。实验毛细管有效长度选用57.0 cm。

4 结论

在最佳条件下,桂枝中桂皮酸可在6.5 min内得到很好的分离检测。采用缓冲溶液做溶剂提取桂枝中的桂皮酸,可有效消除拖峰现象,更有利于样品测定;该高频电导检测器操作极为简便,只需将毛细管轻轻穿过检测器,检测电极不与溶液接触,不存在电极中毒的问题;用毛细管电泳-高频电导检测法测定桂枝中的桂皮酸,样品前处理简便易行,检测方法简便、快速、灵敏、廉价,符合药品检测的需要,是一种较好的、值得推广的检测中药有效成分新方法。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Zhang Q S, Wang B Q. Determination of cinnamic acid in *Cinnamomum cassia* Presl composite by HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1994, 19(6): 349-350.
- [3] Luo J P, Tian C, Li X M. Determination of cinnamaldehyde in *Guizhi* by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(9): 544-545.
- [4] Guo W, Song J F, Li H N, et al. Determination of cinnamic acid in *Cinnamomum cassia* Presl by linear-sweep polarography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(4): 3-6.
- [5] Li L M. Determination of cinnamic acid by linear scanning voltammetry [J]. *Phys Test Chem Anal Part B—Chem Anal* (理化检验·化学分册), 2002, 38(6): 295-298.
- [6] Li P, Che Z T, Guo J X. Micellar electrokinetic capillary chromatographic analysis of cinnamic acid in *Styrax* and *Rersina liquidambar* [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海医科大学学报), 1999, 26(5): 380-381.
- [7] Chen Z G, Mo J Y. High frequency conductivity detector for capillary electrophoresis [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2002, 23(5): 801.
- [8] Chen Z G, Mo J Y, Yang X Y, et al. A new capillary electrophoresis apparatus with piezoelectric ceramics high voltage and amperometric detector [J]. *Chin Chem Lett* (中国化学快报), 1999, 10(3): 231.