

胶束电动毛细管色谱法测定柚皮苷对照品的研究

李 芸^{1,2}, 杨媛媛^{2,3}, 丁晓静^{1,2*}, 刘 军⁴, 王 志³

1. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院, 北京 100069

2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013

3. 河北农业大学食品科学与技术学院, 河北 保定 071001

4. 中国计量科学院 化学计量与分析科学研究所, 北京 100013

摘要: 目的 建立胶束电动毛细管色谱(MECC)分离测定柚皮苷对照品的方法。方法 以47 cm×50 μm(有效长度40 cm)的熔融石英毛细管柱为分离柱, 以(10 mmol/L Tris+100 mmol/L SDS+90 mmol/L H₃BO₃+60 mmol/L HP-β-CD)-[甲醇-异丙醇(1:1)](2:1)为分离缓冲液, 于220 nm处检测。结果 MECC法测定10 mg/mL柚皮苷的迁移时间和校正峰面积的RSD分别为0.58%、1.3%(n=7), 检出限为5 mg/L(S/N=3), 定量限为15 mg/L(S/N=10)。结论 测定柚皮苷对照品的质量分数, 并与HPLC法进行比较, 两种方法的结果存在显著差异(P<0.01)。

关键词: 柚皮苷; 胶束电动毛细管色谱; HPLC; 迁移时间; 校正峰面积

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2251-04

Determination of naringin reference substance by micellar electrokinetic capillary chromatography

LI Yun^{1,2}, YANG Yuan-yuan^{2,3}, DING Xiao-jing^{1,2}, LIU Jun⁴, WANG Zhi³

1. School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

3. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

4. Division Chemical Metrology & Analytical Science, National Institute of Metrology, Beijing 100013, China

Key words: naringin; micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC); HPLC; migration time; corrected peak area

柚皮苷是一种黄酮类化合物, 微溶于水, 易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂, 相对分子质量为580.53, 主要存在于橘、橙的果皮和果肉中, 具有抗炎、抗癌、抗突变等多种功效。目前, 柚皮苷的检测方法大多为HPLC法^[1-3], 而采用胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC)的报道较少^[4-5]。由于MECC法能够同时分析带电与不带电组分, 也非常适于分析不溶于水的组分, 而且对照品质量分数的分析一般需要原理完全不同的方法如HPLC法及高效毛细管电泳(HPCE)法来进行确证^[6], 因此, 本实验建立了MECC法分离、测定柚皮苷对照品的方法, 并对已经纯化的柚皮苷对照品进行测定, 将结果与HPLC法的结果进行了比较。

1 仪器与材料

Beckman P/ACE 5000型毛细管电泳仪(配有紫外检测器, 美国Beckman公司), Agilent 1100型高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司), Millipore Milli-Elix/RiOs型超纯水器(美国Millipore公司), 旋涡混合器(法国Gilson公司), Mettler Toledo电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

三羟甲基氨基甲烷(Tris, 色谱纯, 上海生工生物工程有限公司); 十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma-Aldrich); 硼酸(H₃BO₃, 优级纯, 铁岭市开原化工厂); 羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD, Across Organics); 甲醇、异丙醇(色谱纯, Fisher试剂); 纯化的柚皮苷对照品(批号20080805)由中国计量科学院化学计量与分析科学研究所提供, 采用HPLC分离、峰

收稿日期: 2011-02-01

作者简介: 李 芸(1985—), 女, 湖北省荆门市人, 硕士研究生, 主要从事毛细管电泳在食品、药物分析中的应用研究。

Tel: 15889614011 E-mail: bhly311@yahoo.com.cn

*通讯作者 丁晓静 Tel: (010)64407087 13522808336 E-mail: dingxiaojing@gmail.com

面积归一化测得其质量分数大于 99%。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

准确称取 100 mg 柚皮苷对照品于 1.5 mL 塑料离心管中, 加入 1 mL 甲醇, 涡旋使其充分溶解, 配制成质量浓度为 100 mg/mL 的储备液。使用前, 吸取 20 μ L 储备液于 200 μ L PCR 管中, 再加入 180 μ L 样品缓冲溶液, 涡旋混匀后即可进样。

2.2 毛细管的预处理

新的毛细管在使用前分别用 1 mol/L NaOH 洗 20 min、水洗 5 min、分离缓冲液洗 5 min。每次进样前, 分别用 1 mol/L NaOH、水及分离缓冲液各洗 1 min, 以保证迁移时间和校正峰面积具有重现性。

2.3 色谱条件

2.3.1 MECC 色谱条件 毛细管柱为 47 cm $\times$ 50 μ m 的石英毛细管柱 (有效长度 40 cm, 河北永年锐沱色谱器件有限公司); 分离电压 30 kV; 工作电流 23 μ A; 检测波长 220 nm; 高纯氮气压力 3 447.5 Pa; 进样时间 5 s; 操作温度 25 $^{\circ}$ C; 分离缓冲溶液: (10 mmol/L Tris+100 mmol/L SDS+90 mmol/L H₃BO₃+60 mmol/L HP- β -CD)-[甲醇-异丙醇 (1:1)] (2:1); 样品缓冲液: 同分离缓冲液。

2.3.2 HPLC 色谱条件 色谱柱为 Inertsil ODS-SP C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液 (18:82), 体积流量 0.95 mL/min, 进样量 1 μ L, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 220 nm。

2.4 电泳条件的选择

2.4.1 检测波长的选择 通过二极管阵列检测器对柚皮苷对照品溶液进行光谱扫描, 其最大吸收波长为 283 nm, 考虑到杂质在柚皮苷的特征吸收波长处可能无吸收, 而对照品质量分数定量分析的目的就是让更多的杂质峰能够被检测到, 为了便于与 HPLC 法的测定结果进行比较, 最终选择检测波长为 220 nm。

2.4.2 硼酸浓度对分离的影响 由于柚皮苷不带电荷, 但含有邻位的羟基, 这样的结构使之易于与硼酸根形成带负电的络合物, 再加之硼酸根在低紫外波长处无吸收, 因此本研究选用 Tris-H₃BO₃ 缓冲体系来进行分离。在缓冲液其他组分保持不变的条件下, 研究了硼酸浓度对分离的影响, 结果见图 1。当硼酸浓度为 25 mmol/L 时, 柚皮苷的峰较宽; 当浓度增至 50 mmol/L 时, 峰形变锐; 浓度再增至 90 mmol/L, 峰形最佳且与杂质峰得到很好分离; 继续

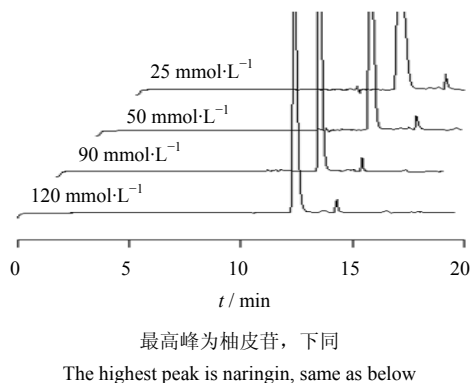


图 1 硼酸浓度对柚皮苷分离的影响

Fig. 1 Influence of H₃BO₃ concentrations on separation of naringin

增加硼酸浓度至 120 mmol/L 时, 峰展宽。因此, 确定硼酸的最佳浓度为 90 mmol/L。

2.4.3 SDS 浓度的影响 在 MECC 中 SDS 的主要作用是形成胶束, 胶束起到伪固定相的作用, 以分离毛细管区带电泳无法分离的中性物质, 从而改善分离, 此外还有一定的增溶作用。在保持其余条件不变的情况下, 本实验又研究了 50、100、120 mmol/L SDS 对分离的影响, 结果见图 2。随着 SDS 浓度的增加, 柚皮苷与杂质峰之间的分离度逐渐变大, 但是柚皮苷的峰形越来越宽, 而且迁移时间越来越长, 因此, 确定 SDS 的最佳浓度为 100 mmol/L。

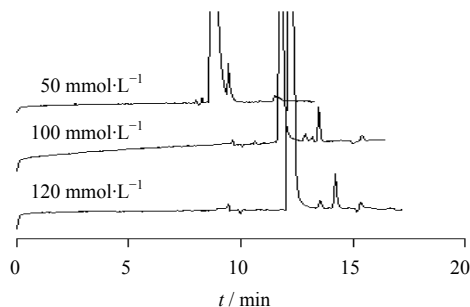


图 2 SDS 浓度对柚皮苷分离的影响

Fig. 2 Influence of SDS concentrations on separation of naringin

2.4.4 HP- β -CD 浓度的影响 研究发现 HP- β -CD 可对微溶于水的柚皮苷起到增溶作用, 从而改善柚皮苷的峰形。图 3 揭示了 30、60、80 mmol/L HP- β -CD 对柚皮苷峰形的影响。当 HP- β -CD 浓度由 30 mmol/L 增加到 60 mmol/L 时, 柚皮苷迁移时间增加的同时峰形变锐; 继续增至 80 mmol/L 时, 峰形变化不明显, HP- β -CD 最佳浓度为 60 mmol/L。

2.4.5 有机溶剂加入量的影响 由于柚皮苷微溶于

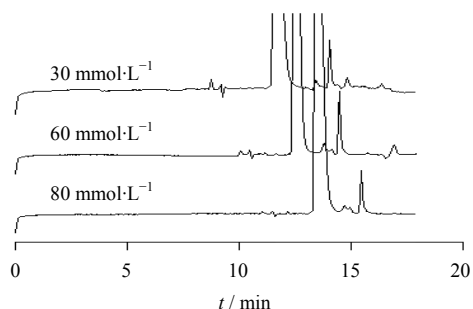


图3 HP-β-CD 浓度对柚皮苷峰形的影响
Fig. 3 Influence of HP-β-CD concentrations on peak shape of naringin

水, 分离缓冲液中必须加入有机溶剂使其形成均一的溶液。因柚皮苷易溶于甲醇, 而异丙醇也曾用于微溶于水的药物的分离^[7], 本研究发现分离缓冲液的有机相中甲醇和异丙醇的协同作用, 不仅可以增加柚皮苷与干扰峰之间的分离度, 且可改善峰形。随着有机溶剂加入量的增加, 柚皮苷的迁移时间增加, 与干扰峰间分离度增大。图4揭示了缓冲溶液中无机盐缓冲液与有机溶剂的比例分别为1:1、2:1、3:1时对分离的影响。当比例为1:1时, 柚皮苷与干扰峰的分度较大, 但是迁移时间较长, 并且峰展宽; 当比例为2:1时, 柚皮苷与干扰峰即能完全达基线分离, 而且峰形较好; 当比例为3:1时, 有机溶剂加入量较少, 虽然迁移时间较短, 但是柚皮苷与干扰峰之间的分离未达基线分离, 影响定量结果。因此, 确定无机盐缓冲液与有机溶剂的最终比例为2:1。

2.5 精密度试验

将10 mg/mL 柚皮苷对照品溶液连续进样7次, 所得迁移时间和校正峰面积的RSD分别为0.58%和1.3%。

2.6 检出限及定量限

在最终优化好的分离条件下, 将柚皮苷对照品

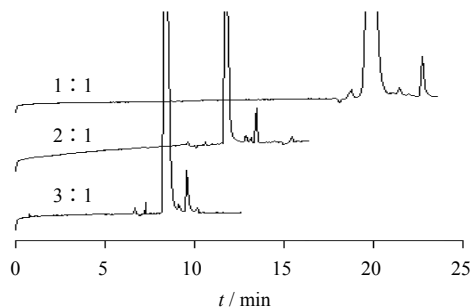


图4 有机溶剂加入量对柚皮苷分离的影响
Fig. 4 Influence of organic solution amount on separation of naringin

溶液稀释至柚皮苷的峰高不低于3倍基线噪声($S/N \geq 3$), 连续测定3次, 测得的检出限为5 mg/L; 以柚皮苷的峰高不低于10倍基线噪声($S/N \geq 10$), 连续测定3次, 测得的定量限为15 mg/L。

2.7 柚皮苷对照品质量分数的测定

分别称取4份来自同一批产品(批号20080805)不同样品瓶的柚皮苷对照品各100 mg, 配制成100 mg/mL 储备液, 依照“2.1”项方法稀释10倍, 每个样品连续进样3次。用于HPLC法分析的柚皮苷溶于甲醇, 质量浓度为4 mg/mL。按照《中国药典》对采用峰面积归一法进行峰纯度检查的实验要求, 分析时间应该为主峰出峰时间的2倍以上, 以尽可能使杂质峰出峰完全。在本实验最优化电泳条件下, 发现主峰后面的谱图上无明显色谱峰出现, 故图中的分析时间只保留具有有效色谱峰的部分。HPLC法用峰面积归一法定量, 而MECC法用校正峰面积归一法定量。这是由于毛细管电泳分析中, 迁移时间较长的组分, 其峰面积将相应展宽而导致峰面积增加, 为消除这一影响, 一般将每个峰的峰面积除以各自的迁移时间即校正峰面积进行归一化处理^[8], 如果不用校正峰面积, 则在主成分之前的组分的量将被低估, 而之后组分的量将被高估^[9]。MECC电泳图及HPLC色谱图分别见图5、6。由图可见, 除柚皮苷的主成分峰之外, HPLC色谱图中仅有两个杂质峰(a、b), 而MECC电泳图中则出现4个杂质峰(1、2、3、4)。结果如表1所示。可以看出MECC法的结果低于HPLC法的结果, 用SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计算得 $t=8.157$, $P=0.004 < 0.01$, 表明两种方法的结果存在显著差异。

3 讨论

采用MECC法, 以内径50 μm、有效长度40 cm 未涂覆石英毛细管、(10 mmol/L Tris+100 mmol/L SDS+90 mmol/L H₃BO₃+60 mmol/L HP-β-CD)-[甲

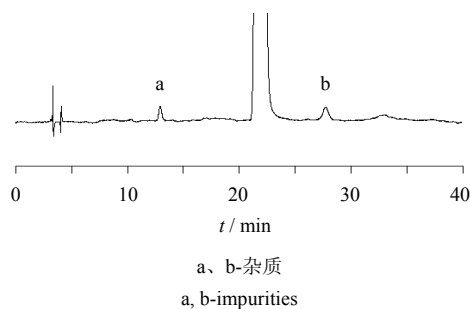


图5 柚皮苷的HPLC色谱图
Fig. 5 HPLC chromatogram of naringin

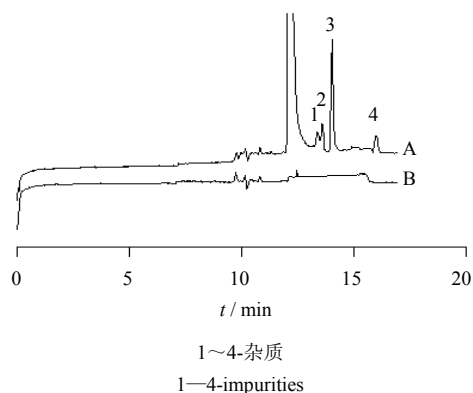


图 6 柚皮苷 MECC 电泳图 (A) 和空白对照 (B)

Fig. 6 MECC electrophoretogram of naringin (A) and blank control (B)

表 1 纯化后的柚皮苷质量分数测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of naringin in purified samples ($n=3$)

样 品	MECC		HPLC	
	平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
1	98.16	0.11	99.53	0.05
2	98.30	0.07	99.59	0.01
3	97.41	0.17	99.56	0.03
4	98.06	0.12	99.60	0.04
平均值	97.98	0.41	99.57	0.04

醇-异丙醇 (1:1)] (2:1) 为分离缓冲液, 20 min 内即可完成柚皮苷对照品质量分数的测定。然而, 其测定结果较 HPLC 法低。这与文献报道的 HPCE 法与 HPLC 法的分析结果不一致相类似^[10], 尽管已有大量文献报道两种方法的结果相吻合^[11-16]。可能的原因一方面由于极性强的杂质小分子组分在 HPLC 的色谱柱上不保留, 另外一些杂质组分可能被吸附在色谱填料上不能被洗脱, 或者杂质峰与主峰共洗脱^[8]导致 HPLC 的测定结果偏高; 另一方面由于 MECC 法较 HPLC 分离效率高, 使得一些杂质组分从主峰中分离出来, 另外 MECC 法能够同时分析带电与中性组分, 导致 MECC 法的定量结果较 HPLC 法低。由于 MECC 法的分析结果不支持 HPLC 法的分析结果, 该柚皮苷对照品需进一步纯化。

MECC 法因试剂消耗少、检测成本低、较 HPLC 分离效率高及与 HPLC 相媲美的精密度及准确度, 使之在中药分析中发挥越来越重要的作用。

参考文献

[1] 但俊峰, 盛雪飞, 陈建初. 5 种柚汁中主要抗氧化成分含量及其抗氧化能力的比较 [J]. 食品科学, 2008, 29(7): 90-93.

[2] 苏东林, 单 杨, 李高阳, 等. RP-HPLC 法同时测定柑桔皮中橙皮苷和柚皮苷的含量 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 288-290.

[3] 付陈梅, 吴桂苹, 苏学素, 等. 液相色谱法测定柑橘果实中类黄酮的方法研究 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 121-125.

[4] 杨 瑛, 王实强, 彭源贵. 胶束电动毛细管电泳法测定柑橘属药材中柚皮苷和橙皮苷的含量 [J]. 中草药, 1999, 30(3): 181-183.

[5] Gel-Moreto N, Streich R, Galensa R. Chiral separation of six diastereomeric flavanone-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and analysis of lemon juice [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 925(1/2): 279-289.

[6] Altria K D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 735(1/2): 43-56.

[7] 叶 姝, 王书芳, 瞿海斌, 等. 反向迁移毛细管胶束电动色谱分离测定复方丹参片中 5 种皂苷的含量 [J]. 分析化学, 2007, 35(1): 115-118.

[8] Altria K D, Kelly M A, Clark B J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis II [J]. *Trends Anal Chem*, 1998, 17(4): 214-226.

[9] Altria K D. High and low injection volumes in CE for improved quantitative determination of drug related impurities [J]. *Chromatographia*, 1993, 35(9/12): 493-496.

[10] Pessi A, Bianchi E, Chiappinelli L, et al. Application of capillary zone electrophoresis to the characterization of multiple antigen peptides [J]. *J Chromatogr A*, 1991, 557(1/2): 307-313.

[11] Hansen H K, Hansen S H, Kraunsøe M, et al. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid in pharmaceutical preparations [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9: 41-46.

[12] Velikinac I, Čudina O, Jankovic I, et al. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations [J]. *Il Farmaco*, 2004, 59: 419-424.

[13] Gibson G, Ramstad T, Mills K A, et al. A method for the determination of minoxidil in hair-regrowth formulations by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Il Farmaco*, 2005, 60: 847-853.

[14] Németh T, Jankovics P, Németh-Palotás J, et al. Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2008, 47: 746-749.

[15] Ding X J, Li Y, Song B H. et al. Determination of 5'-mononucleotides in infant formula by capillary electrophoresis with ultraviolet detection [J]. *Dairy Sci Technol*, 2011, 91(6): 759-770.

[16] 李 佳, 丁晓静, 李 芸, 等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re 及 Rb₁ [J]. 色谱, 2011, 29(3): 259-264.