

# 高效毛细管电泳法测定 苯甲酸类化合物含量

沈齐英, 吕晨曦, 修米迪

(北京石油化工学院, 北京 102617)

**摘要:**建立了高效毛细管电泳同时测定苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸的方法。在 15 mmol/L 的硼砂和十二烷基硫酸钠为缓冲溶液, 运行电压为 16 kV, 温度为 25℃, 检测波长为 250 nm 的条件下, 4 种组分在 10 min 内得到良好分离。线性质量浓度范围分别为 2.5 ~ 180、1.5 ~ 200、1.8 ~ 210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.2 ~ 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 检测限分别为 0.45、0.5、0.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 并有较好的精密度、稳定性和回收率。实验证明, 该法操作简便, 分析快速, 结果准确, 重现性好, 适用于苯甲酸类化合物的同时检测。

**关键词:** 高效毛细管电泳; 苯甲酸类化合物; 双黄连口服液

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)04-0178-03

## Determination of benzoic acid compounds by HPCE

SHEN Qi-ying, LV Chen-xi, XIU Mi-di

(Beijing Institute of Petro-chemical Technology, Beijing 102617, China)

**Abstract:** A method for simultaneous determination of flavonoid, benzoic acid, salicylic acid, acetosalicylic acid and pyrogallol acid by HPCE is proposed. The buffer solution is composed of 15 mmol/L of borax and lauryl sodium sulfate. The electric tension is 16 kV. The temperature is 25℃. The detection wavelength is at 250 nm. The result shows that four components could be well separated in 10 minutes. Their linearity is found in range of 2.5 - 180, 1.5 - 200, 1.8 - 210 and 1.2 - 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. And their corresponding detection limit is 0.45, 0.5, 0.47 and 0.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. This method is simple, rapid and reproducible, which is suitable for the determination of benzoic acid compounds.

**Key words:** HPCE; benzoic acid compounds; shuanghuanglian mixture

苯甲酸类化合物是一类重要的化工中间体, 是合成药物、染料的基础原料, 广泛应用于食品、医药、材料等行业。因此对苯甲酸类化合物进行有效的分析具有极其重要的意义。目前苯甲酸等化合物的分析大都采用紫外分光光度法、离子对色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法和高效毛细管电泳法等进行检测, 多数是对单一物质进行定性、定量分析<sup>[1-3]</sup>。为了有效、方便检测到微量的苯甲酸类化合物, 在相关研究文献的基础上, 笔者采用高效毛细管电泳, 通过实验条件的优化, 建立了同时检测 4 种苯甲酸类化合物的分析方法, 取得了比较满意的效果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

CL3010 高效液相色谱毛细管电泳一体机, 北京彩陆科学仪器有限公司生产, UV 检测器; SP-2102 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司生产。实验中使用的对照品苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸均为分析纯, 北京试剂公司生产;

氢氧化钠、硼砂, 分析纯, 北京化工厂生产; 十二烷基硫酸钠, 化学纯, 天津福晨化学试剂厂生产; 纯净水(哇哈哈); 样品为市售双黄连口服液和阿司匹林肠溶片。

### 1.2 对照品和样品溶液的制备

精密称取适量对照品苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸, 分别配制 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度的水溶液为储备液(棕色瓶避光, 4℃冰箱保存), 使用时稀释为不同浓度, 并由 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸滤膜滤过。

取样品双黄连口服液 1 mL 稀释至 10 mL, 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸滤膜滤过备用。

取 5 片阿司匹林肠溶片, 精密称其质量, 用研钵研磨, 加入 30 mL 纯净水, 在振荡器中震荡 10 min 后定容至 100 mL, 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸滤膜滤过备用。

### 1.3 电泳条件

以 15 mmol/L 的硼砂和十二烷基硫酸钠(pH 为 8.5) 为电泳分析的缓冲溶液, 运行电压为 16 kV, 温度为 25℃, 采用重力差进样法, 在高差为 10 cm 下

进样 10 s,检测波长为 250 nm,所有溶液使用前超声处理 30 min,以除去细小气泡,并 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸滤膜滤过,以涂层开窗的石英毛细管柱(内径为 50  $\mu\text{m}$ ,有效长度为 60 cm)为分离通道,毛细管柱依次用 0.1 mol/L NaOH 溶液、水和缓冲溶液分别冲洗 10 min,然后进行电泳分离测定。每次电泳后用缓冲溶液清洗 5 min,以保持迁移时间和峰面积良好的重现性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 缓冲溶液

缓冲溶液的选择对于减小溶质与管壁的相互作用,克服峰形畸变,改善分离度都具有十分重要的作用。缓冲溶液浓度影响溶液的黏度系数、分析物的扩散系数,从而影响分析物的分辨率和迁移时间。实验中考察 pH、硼酸盐的浓度及磷酸盐与十二烷基硫酸钠组成的缓冲盐溶液对电泳分离的影响,结果表明:硼砂缓冲液对 4 种化合物的分离效果好于磷酸盐缓冲溶液。当缓冲溶液的 pH 高于 8 时,4 种化合物分离效果良好;当缓冲溶液的 pH 高于 9 时,分析时间明显延长。缓冲溶液中十二烷基硫酸钠和硼砂的浓度在 15 ~ 20 mmol/L 之间时,4 种化合物的分离效果较好,浓度过低,谱图不出峰,浓度过高,pH 增大,谱图也不出峰。综合考虑,缓冲溶液使用 pH 为 8.5 的 15 mmol/L 的硼砂和十二烷基硫酸钠<sup>[4-6]</sup>。

### 2.2 分离电压和检测波长

分离电压影响谱图的出峰时间,实验考察了 10 ~ 25 kV 范围内的电压对 4 种化合物分离的影响。结果表明,分离电压过高或过低均不利于 4 种化合物的分离。电压较低,分离分析时间较长;电压升高,分析时间缩短,但基线噪音显著增大。综合考虑分离度、分辨率和灵敏度等因素,选择 16 kV 为工作电压。

经紫外分光光度计扫描,4 种化合物均在 250 nm 波长处有较大吸收峰,检测波长选择 250 nm。

在检测波长为 250 nm,工作电压为 16 kV,硼砂和十二烷基硫酸钠均为 15 mmol/L (pH 为 8.5) 的缓冲液,压力进样 10 s,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$  条件下,检测苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸对照品中加入双黄连口服液,双黄连口服液的谱图分别如图 1、图 2 所示。苯甲酸的保留时间为 4.198 min,水杨酸的保留时间为 5.149 min,乙酰水杨酸的保留时间为 4.878 min,焦性没食子酸的保留时间为

5.753 min。

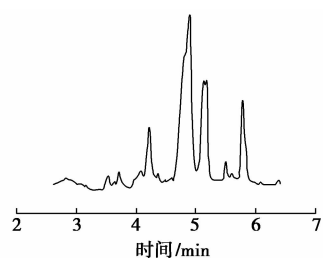


图 1 加样回收率的毛细管电泳谱图

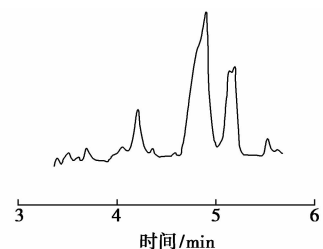


图 2 双黄连口服液的毛细管电泳谱图

### 2.3 线性关系和检测限

在选定条件下,配制不同浓度的化合物进行电泳分析,考察 4 种化合物的线性关系。以对照品浓度为横坐标,对照品峰面积为纵坐标作回归曲线,得回归方程。利用三倍噪音法得检出限如表 1 所示。

表 1 线性回归方程和检测限

化合物	回归方程	相关系数	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
苯甲酸	$Y = 3928.1 + 5017.1X$	0.9898	2.5 ~ 180	0.45
水杨酸	$Y = 4188.3 + 31111.3X$	0.9966	1.5 ~ 200	0.50
乙酰水杨酸	$Y = 2049.7 + 3657.1X$	0.9901	1.8 ~ 210	0.47
焦性没食子酸	$Y = 6040.7 + 3443.1X$	0.9745	1.2 ~ 150	0.35

### 2.4 方法学验证

#### 2.4.1 稳定性实验

表 2 稳定性实验结果

时间/h	峰面积均值/( $\mu\text{AU}\cdot\text{s}$ )			
	苯甲酸	水杨酸	乙酰水杨酸	焦性没食子酸
0	32083	47330	42128	37479
1	32114	47415	42211	37512
3	32029	47388	42098	37456
5	31960	47256	42231	37401
8	32112	47378	42345	37521
12	32002	47271	42031	37445
24	31689	47289	42098	37400
RD/%	0.17	0.11	0.20	0.10

在同一电泳条件下,取质量浓度均为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 4 种化合物对照品溶液,分别在 0、1、3、5、8、12、24 h 依次平行测定 5 次并记录峰面积,计算 24 h 内峰面积间的平均相对偏差( $RD$ ),结果如表 2 所示。

由表 2 可知,4 种化合物在 24 h 内测定值峰面积间的平均  $RD$  分别为 0.17%、0.11%、0.20% 和 0.10%,表明测试溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.4.2 精密度实验

精密吸取质量浓度均为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 4 种化合物对照品溶液,在同一电泳条件下连续进样 8 次,同时由其他 1 人使用不同的电泳仪进行相同实验,考察仪器的重复性和重现性,得到 4 种化合物的保留时间、峰面积及其相对标准偏差( $RSD$ ),如表 3 所示。

表 3 精密度实验结果

化合物	重复性保		重复性峰		重现性保		重现性峰	
	留时间/		面积/		留时间/		面积/	
	min		$(\mu\text{AU}\cdot\text{s}^{-1})$		min		$(\mu\text{AU}\cdot\text{s}^{-1})$	
	$RSD/$		$RSD/$		$RSD/$		$RSD/$	
	平均值		平均值		平均值		平均值	
	%		%		%		%	
苯甲酸	4.158	0.98	32083	2.51	4.213	1.23	28511	2.18
水杨酸	5.239	1.86	47330	1.98	5.102	1.98	45341	2.01
乙酰水杨酸	4.978	1.12	42128	2.16	4.724	0.98	46016	1.03
焦性没食子酸	5.513	1.83	37479	2.93	5.403	1.21	33534	2.38

由表 3 可知,4 种化合物平均保留时间的  $RSD$  均小于 2%,重复性峰面积的  $RSD$  分别为 2.51%、1.98%、2.16% 和 2.93%,重现性峰面积的  $RSD$  分别为 2.18%、2.01%、1.03% 和 2.38%,表明测定结果的精密度较高。

#### 2.4.3 加样回收率实验

回收率是指在实验条件下,于含有被分析组分的样品中加入已知量的被分析组分,在同一条件下得到的分析结果增量占加入的已知量的百分比。进行平行 5 次加样回收率实验,每次向 10 mL 双黄连口服液中加入苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸各 5 mg,在同一电泳条件下进行测定,计算 4 种化合物的回收率分别为 95.06%、102.8%、97.81% 和 96.20%,平行 5 次组间相对标准偏差均小于 2%,表明该法准确性较高<sup>[7-9]</sup>。

在选定的电泳条件下,同时检测苯甲酸、水杨

酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸有较大的线性范围,较好的稳定性、精密度和回收率。

#### 2.5 样品测定

在同一电泳条件下,对双黄连口服液、阿司匹林肠溶片进行 5 次平行测定,其均值含量如表 4 所示。

表 4 样品中苯甲酸类化合物的含量

样品	双黄连口服液/ ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	阿司匹林肠溶片/ ( $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
苯甲酸	1.12	—
水杨酸	6.93	0.001
乙酰水杨酸	32	27
焦性没食子酸	0.08	—

### 3 结论

在检测波长为 250 nm,硼砂和十二烷基硫酸钠的缓冲液浓度均为 15 mmol/L (pH 为 8.5),工作电压为 16 kV,毛细管内径为 50  $\mu\text{m}$  条件下,建立了高效毛细管电泳同时测定苯甲酸、水杨酸、乙酰水杨酸和焦性没食子酸 4 种化合物的分析方法。该方法操作简单方便,试剂用量少,有较好的线性关系、稳定性、精密度和回收率,有一定的实际应用价值。

#### 参考文献

- [1] 于瑞莲. 苯甲酸类化合物对发光菌的毒性及定量构效[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(10): 22-23, 36.
- [2] 彭进进, 罗泽娇, 李龙媛. 高效毛细管电泳-二极管阵列检测法测定土壤中的苯酚[J]. 分析科学学报, 2012, 28(1): 98-100.
- [3] 刘成伦, 丁世环, 谢太平, 等. HPCE 法同时测定蒲公英中的四种组分[J]. 分析试验室, 2011, 30(1): 63-65.
- [4] 袁东星, 王小如, 童秋云, 等. 表面活性剂作为电解液添加剂在毛细管电泳中的应用[J]. 分析测试学报, 1994, 13(2): 87-97.
- [5] 陈思蔚, 付春梅, 李章万, 等. 高效毛细管电泳法测定钩藤中的钩藤碱[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(3): 355-356.
- [6] 徐溢. 药物分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 12-16.
- [7] 李士敏, 季红, 黄碧云, 等. 二甲基 2 $\beta$ 2 环糊精作为手性选择剂对尼索地平对映体的毛细管电泳拆分研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(4): 376-378.
- [8] 宋丽军, 谭晓梅, 罗佳波, 等. 多成分可定性的葛根芩连汤的 HPLC 图谱解析[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1791-1794.
- [9] 何欢, 马双成, 张启明, 等. HPLC 替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中的 6 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 33(11): 1892-1899. ■