

胶束电动毛细管色谱在中药化学成分分析中的应用

张申亮 (平遥县人民医院,山西 晋中 031100)

摘要 目的:胶束电动毛细管色谱 (MECC)是一种应用广泛且发展较快的电泳模式。本文选择了近年来 MECC在中药化学成分分析研究中的相关文献进行综述,希望能够为中药化学成分的分 离分析提供帮助。方法:按照中药中化学成分的种类,对 MECC的应用进行分类汇总。结果:MECC在黄酮类、蒽醌类、酚酸类、皂苷类、内酯类和生物碱类等多种化学成分的分 离分析中被广泛应用。结论:MECC结合了胶束的色谱特性与电泳的先进技术,具有电泳迁移、静电作用和两相分配等多种分离机理,在中药分析研究中具有非常广阔的应用前景。

关键词 胶束电动毛细管色谱;中药分析;化学成分;应用进展

中图分类号: R284 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006 - 0111 (2009) 01 - 0021 - 04

胶束电动毛细管色谱 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC)是众多毛细管电泳技术中发展较快且应用广泛的模式之一。MECC是唯一能同时分离中性分子和带电离子的电泳技术,其原理是在运行缓冲液中加入十二烷基硫酸钠 (SDS)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)等表面活性剂,形成带电荷的胶束,中性分子通过与胶束的相互作用而分离,从而将色谱技术和电泳技术相结合,弥补毛细管区带电泳 (CZE)无法分离中性粒子的缺陷。在 MECC系统中,存在着类似于色谱的两相,分别是流动的水相和起到相对固定作用的胶束相,溶质可以在这两相之间不断分配,因为各组分在胶束中拥有的保留能力不同而产生差异,从而将分析对象有效分离。中性组分依据本身疏水性的不同而达到分离的,在含阴离子表面活性剂的缓冲系统中,组分的疏水性越强,与胶束之间的作用力就越强,留在胶束相中的时间就越长,则迁移时间越长,反之越短。如果使用阳离子表面活性剂,则情况恰恰相反。

MECC在缓冲液中添加的表面活性剂具有吸附、增溶、形成胶束等功能,带电离子则同时受到电泳迁移、静电作用和两相分配等多种分离机理的综合作用,因此增加了该模式分离化合物的范围。中药及其制剂的成分种类复杂且数量众多,用高效液相色谱法 (HPLC)进行分离分析时,往往会出现色谱柱污染严重,有机溶剂消耗大,样品测定成本高等问题。中药的化学成分多以中性化合物为主,MECC的特性的使得其在对中药及其制剂的分离分

析方面具有非常广泛的适用性,且具有毛细管柱易于全面清洗,分离柱效高,可以与 HPLC法互补等优点。目前,MECC已经被广泛应用到个黄酮类、蒽醌类、酚酸类、皂苷类、内酯类和生物碱类等多种天然化学成分的研究中,得到越来越多的重视。

1 黄酮类

黄酮类化合物具有多种不同的结构类型,在中药中广泛存在,具有各种各样的生物活性。由于黄酮类化合物一般为中性分子,采用 MECC方法分析此类物质可以取得满意的结果。Jinhua Zhu等^[1]采用 20 mmol/L 磷酸 -100 mmol/L SDS-20%乙腈缓冲液 (pH 2.0)测定枳实中红桔素、川皮苷、橙皮素、柚皮素、橙皮苷和柑桔苷的含量,并比较了两种不同预富集技术的效果。Lihong Liu^[2]等采用 4 mmol/L 硼砂 -8 mmol/L 磷酸二氢钠 -8 mmol/L SDS-19%乙醇 (pH 8.1)为缓冲液,可以在 5 min内快速测定草豆蔻中良姜素和小豆蔻明的含量。邓永智等^[3]选择 25 mmol/L 硼砂 -25 mmol/L 磷酸二氢钾 25 mmol/L SDS-1%甲醇 (pH 8.6)的电解液,在 15 min之内槲皮素、山奈酚、异鼠李素均可得到很好分离。同时把 MECC定量分析的结果与 HPLC进行了对比,表明所建立的 MECC法用于银杏浸膏中的黄酮测定是可靠的。戴忠等^[4]通过对表面活性剂、pH和有机改进剂的优选确定了最佳缓冲液比例为胆酸钠系统 (10 mmol/L 硼酸钠, 15 mmol/L 磷酸二氢钠, 40 mmol/L 胆酸钠) 乙腈 (3:2) (pH 7.0),将穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮和银杏双黄酮等 3种双黄酮化合物很好分离并定量。朱加虹^[5]以 pH为 8.5的 50 mmol/L 硼酸盐为缓冲液,加入 35 mmol/L SDS,将银杏叶中的芦丁和槲皮素完全分离。马玲云等^[6]

以 0.2 mol/L 硼砂-0.06 mol/L SDS(含 15%乙腈, pH 9.0)的缓冲液为电泳介质,在 270 nm 波长下 30 min 内可以分离娑罗子中 3 种黄酮苷类化合物。吕元琦等^[7]建立了一种羟丙基-环糊精毛细管胶束电动色谱测定密蒙花中的芹菜素和木犀草素的方法。经过条件优化,2 种物质在 15 min 内得到良好分离。王月伶等^[8]建立了 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(1E-3M-ITFB)修饰的 MECC 分离测定异槲皮甙、绿原酸和槲皮素的方法,欧亚旋覆花中的 3 种分析物在 11 min 内可以得到良好的分离。蒋受军等^[9]采用 50 mmol/L 硼酸溶液-50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液-20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液(pH 8.5)为运行缓冲液,建立了测定小野芝麻中毛蕊花糖苷含量的方法。吕元琦等^[10]通过优化缓冲溶液 pH 值和浓度、SDS 浓度等条件,建立了 MECC 测定葛根素和大豆甙元的方法。两种成分在 5 min 内得到良好分离,该方法用于葛根和葛根芩连片样品的分析,结果令人满意。

2 蒽醌类

蒽醌类化合物的结构中多含有羧基和羟基,采用 MECC 方法对大黄素等蒽醌类化合物的分离,可以取得良好的峰型,有利于定量检测。Selda Baskan 等^[11]采用 10 mmol/L 硼砂-50 mmol/L SDS-25%乙腈(pH 10.6)为运行缓冲液,在 6 min 内测定了皱叶酸模中 1,5-二羟基-3-甲基蒽醌、1,3,5-三羟基-6-羟甲基蒽醌和 1,5-二羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌的含量。张继友等^[12]通过对缓冲液的酸度和浓度、表面活性剂及有机添加剂的浓度进行优化,得到大黄及其复方制剂中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚最佳分离条件为:15 mmol/L 硼砂-30 mmol/L SDS-10%乙醇(pH 9.6),检测波长为 235 nm。沈守杰等^[13]建立了胶束电动毛细管色谱分离和测定大黄及其制剂三黄片中蒽醌类成分的方法。在缓冲液 pH 为 9.5,SDS 浓度为 25 mmol/L,乙腈浓度为 20%时的优化条件下,大黄及三黄片中蒽醌类活性组分得到基线分离且方法具有较好的重现性。尚小玉等^[14]采用 50 mmol/L 硼酸-氢氧化钠含 20 mmol/L 脱氧胆酸钠(pH 10)为缓冲溶液,可以在 5 min 内全部分离大黄酚、大黄素、土大黄苷和大黄酸等 4 种成分,方法简单快速。尚小玉等^[15]采用-环糊精修饰的 MECC 分离测定了大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚和大黄素等 5 种有效成分。缓冲溶液为磷酸盐(pH 10~10.38)含 20 mmol/L SDS 和 10 mmol/L 环糊精,10%~15%甲醇或异丙醇,结果令人满意。

3 有机酸类

有机酸类化合物解离后带负电荷,在 MECC 模式中可以与 CZE 取得一致的分离效果,但出峰时间较短,分离迅速。Shenhua Shi 等^[16]采用场增强样品进样模式在 120 mmol/L 硼砂-100 mmol/L SDS(pH 8.8)缓冲液条件下,测定冠心舒和滴丸和胶囊、龙胆泻肝丸、中华跌打丸、蒲公英冲剂、牛黄清胃丸、导滞丸等 8 种中成药中马兜铃酸 I 和 II 的含量。曹艳等^[17]采用 30 mmol/L SDS-30 mmol/L 硼酸-15%甲醇(pH 9.5)为缓冲液,对半夏及其同科属其它品种共 14 个样品中的苯甲酸含量进行了测定。赵新峰等^[18]选取芦丁为内标,分别以 30 mmol/L SDS-30 mmol/L 硼砂,20 mmol/L SDS-50 mmol/L 硼砂(pH 9.4)为背景电解质,分离测定了中药材牡丹皮及中成药六味地黄丸中丹皮酚的含量。郭涛等^[19]以 50 mmol/L 硼砂和 10 mmol/L 去氧胆酸钠并含 2% 甲醇的溶液(pH 9.6)为运行缓冲液,对当归中的有效成分阿魏酸和腺苷同时进行含量测定。段建平等^[20]在 20 mmol/L 磷酸二氢钠-硼砂-60 mmol/L SDS-15 mmol/L 胆酸钠(pH 8.63)的最佳分离条件下,成功测定了丹参及其它 3 个中成药中水溶性和脂溶性成分原儿茶醛、原儿茶酸和丹参酮 A 的含量。王媛等^[21]在 25 mmol/L 磷酸盐(pH 7.0),40 mmol/L SDS 和 3 mol/L 尿素的实验条件下,在 28 min 内实现了牡蛎中 8 种游离丹酰化氨基酸的分离和测定。王勇等^[22]以 14 mmol/L 硼砂-25 mmol/L SDS-15 mmol/L 环糊精-乙腈为缓冲液,测定了熊胆及鸡、鸭、狗胆及其掺伪品中不同胆汁酸类成分的含量。

4 三萜类

皂苷类化合物一般均采用 MECC 模式来分离,可以取得良好的分离效果。杨伟峰^[23]等以 20 mmol/L 硼酸-20 mmol/L 硼砂-60 mmol/L 胆酸钠-20%乙腈(pH 9.0)为缓冲液,测定了西洋参中人参皂苷 Re 和 Rb₁ 的含量。梁生旺等^[24]分离测定三七中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 和三七皂苷 R₁ 的含量,优化后的缓冲液为 20 mmol/L SDS-40 mmol/L 胆酸钠-60 mmol/L 硼砂。王瑞等^[25]以环糊精修饰的 MECC 分离分析了山茱萸中的齐墩果酸和熊果酸,最佳操作条件为 60 mmol/L SDS,2.5 mmol/L 磷酸二氢钠,2.5 mmol/L 硼砂,8 mmol/L 二甲基-环糊精,8 mmol/L 环糊精和 30% 异丙醇。肖美添等^[26]以 30 mmol/L SDS,20 mmol/L 羟丙基-环糊精,5%乙腈,40 mmol/L 硼砂(pH 9.4)为运行缓冲

液,测定了枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的含量。马少妹等^[27]采用 MECC对泽泻的乙醇提取物进行分离研究。运行缓冲溶液 (pH 9.18~9.20),硼砂浓度 30 mmol/L, SDS浓度 45 mmol/L,甲醇体积分数 30%时分离效果最好,并对 23-乙酰泽泻醇 B和 24-乙酰泽泻醇 A进行定性。

5 生物碱类

由于生物碱类成分在缓冲溶液体系中带有部分正电荷,可以采用 CZE模式,在一定的 pH值下实行分离。MECC对于生物碱类成分的分离同样可以取得令人满意的效果,而且在背景电解质溶液中加入有机溶剂作为改性剂可以改善电渗流和选择性,对生物碱类成分进行有效分离。Lei Zhou等^[28]采用激光诱导荧光检测器和柱内衍生化的方法,在 25 mmol/L 硼砂和 20 mmol/L SDS (pH 9.7)条件下,测定麻黄草、克咳胶囊和黑白片中麻黄碱和伪麻黄碱的含量。吴江明等^[29]以 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (含 50 mmol/L SDS, pH 6.9) 乙腈 (8:5) 为运行缓冲液,建立了 MECC同时测定黄连、吴茱萸药对中小檗碱、巴马汀、药根碱、吴茱萸碱和吴茱萸次碱等 5种主要生物碱的含量测定方法。纳鹏君等^[30]以盐酸麻黄碱作内标物,20 mmol/L 硼砂缓冲溶液 (含 30 mmol/L SDS, 40% 甲醇) 作电解质 (pH 9.35),于 208 nm 检测了山豆根提取液中的苦参碱和氧化苦参碱,有效成分都能够获得基线分离。翁前锋等^[31]建立了 MECC结合电化学安培检测同时分析中药马齿苋中多巴胺和去甲肾上腺素的方法。考察了缓冲液的浓度、pH值、SDS浓度以及工作电极电势对分离检测的影响。在优化的条件下,可用于马齿苋样品的分析。罗东玲等^[32]在 50 mmol/L 硼砂-50 mmol/L SDS甲醇的条件下,对戊己丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量进行了测定。

6 其它

内酯类、环烯醚萜苷类、木脂素等中性分子均可采用 MECC进行分析,能够取得较好的结果。Xiao-Kui Wang等^[33]采用吐温 20形成单胶束并以甲醇为改性剂,在 20 mmol/L 硼砂-64 mmol/L 吐温 20-9% 甲醇 (pH 9.3) 为运行缓冲液的条件,测定秦皮药材中东茛菪内酯、芦丁、七叶亭、绿原酸和咖啡酸的含量。李琦等^[34]以 20 mmol/L 磷酸缓冲溶液-10 mmol/L SDS (含 5% 甲醇, pH 6.8) 为电泳介质,采用 MECC分离测定了中药穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯。赵新峰等^[35]探讨了运行缓冲液中硼酸浓度、SDS浓度、乙腈比例和 pH对山茱萸中

莫罗昔和番木鳖苷迁移时间的影响,并采用内标法进行了含量测定。刘海兴等^[36]建立了 MECC测定生脉注射液中五味子酯甲含量的新方法,确定的最佳缓冲溶液是 25 mmol/L 硼砂, 30 mmol/L SDS, 15% 乙醇 (pH 9.82)。

目前,MECC已经成为众多毛细管电泳技术中的一种常用应用方法,其对中性分子的分离能力较 CZE和 HPLC具有明显的优势,可以在相对较短的时间内同时分离中药的化学成分,具有分析时间短,分离效率高,溶剂用量少,运行成本低等优势,因而 MECC被广泛应用于中药及天然产物等复杂体系的分离分析中,在中药分析中表现出非常良好的应用前景。然而,与 HPLC相比,在定量分析的精确性和定性分析的灵敏度方面,其仍有待于进一步的改进和完善。

参考文献:

- [1] Zhu J, Yu K, Chen X, *et al* Comparison of two sample pre-concentration strategies for the sensitivity enhancement of flavonoids found in Chinese herbal medicine in micellar electrokinetic chromatography with UV detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1166(1-2): 191.
- [2] Liu L, Chen X, Hu Z Separation and determination of alpinetin and cardamonin in *Alpinia katsumadai* Hayata by flow injection-micellar electrokinetic chromatography [J]. *Talanta*, 2007, 71(1): 155.
- [3] 邓永智,袁东星,金晓英,等. 胶束电动毛细管色谱法用于中成药原料银杏浸膏中黄酮的质量控制 [J]. *分析化学*, 2003, 31(5): 580.
- [4] 戴忠,王钢力,马双成,等. HPLC法测定卷柏属植物中 3种双黄酮类化合物的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2006(26), 1408.
- [5] 朱加虹. 应用胶束电动毛细管色谱法分离测定银杏叶提取物中的芦丁和槲皮素 [J]. *浙江农业学报*, 2001, 13(4): 223.
- [6] 马玲云,魏锋,马双成,等. 毛细管电泳法测定娑罗子药材中的黄酮苷类成分 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(5): 537.
- [7] 吕元琦,郭春华,袁倬斌. 羟丙基-环糊精毛细管胶束电动色谱法测定密蒙花中的芹菜素和木犀草素 [J]. *分析化学*, 2005, 33(6): 805.
- [8] 王月伶,胡中波,袁倬斌. 离子液体修饰毛细管胶束电动色谱法分离测定槲皮素、绿原酸和异槲皮甙 [J]. *分析化学*, 2006, 34(12): 1741.
- [9] 蒋受军,鲁静,林瑞超,等. 胶束毛细管电泳测定小野芝麻中毛蕊花糖苷的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(2): 137.
- [10] 吕元琦,李新民,袁倬斌. 毛细管胶束电动色谱法快速测定葛根素和大豆甙元 [J]. *化学工程师*, 2005, (1): 28.
- [11] Baskan S, Daut-demir A, Gaydin K, *et al* Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography [J]. *Talanta*, 2007, 71(2): 747. (下转第 65 页)

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备采用石油醚萃取可有效除去委陵菜全草中含有的酯类成分,减少了干扰峰的出现和有效组分分离度的下降。

3.2 黄酮类化合物中的酚羟基易电离,易产生拖尾,加入适量的 H_3PO_4 能使峰形良好,为了延长柱子的寿命,本实验在确保峰形良好的前提下尽量降低了 H_3PO_4 的加入量。

3.3 实验过程中考察了不同比例的甲醇-水系统和乙腈-水系统流动相以及不同类型色谱柱的分离效果,最终流动相确定为甲醇-0.3%磷酸水溶液(51:

49),达到了成本低、分离效果好、保留时间适宜的效果。

参考文献:

(上接第 23 页)

- [1] 中国药典 2005年版. 一部 [s], 2005: 149.
- [2] 王庆贺,李志勇,沈阳,等. 委陵菜三萜类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1434.
- [3] 沈阳,王庆贺,林厚文,等. 委陵菜化学成分的研究 [J]. 中药材, 2006, 29(3): 237.
- [4] 高雯,沈阳,张红军,等. 委陵菜的化学成分研究 [J]. 药学服务与研究, 2007, 7(4): 262.
- [5] 王瑞,王淑关,梁生旺,等. 胶束电动毛细管色谱法分离分析山茱萸中齐墩果酸和熊果酸 [J]. 中药材, 2007, 30(8): 946.
- [6] 肖美添,叶静,黄雅燕,等. 胶束毛细管电泳测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 724.
- [7] 马少妹,王巧娥,李琦,等. 泽泻乙醇提取物的 HPCE 分离研究 [J]. 分析试验室, 2005, 24(1): 8.
- [8] Zhou L, Zhou X, Luo Z, *et al*. In-capillary derivatization and analysis of ephedrine and pseudoephedrine by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1190(1-2): 383.
- [9] 吴江明,栾连军,程翼宇. 胶束毛细管电泳法同时测定黄连-吴茱萸药对中 5 种生物碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(3): 325.
- [10] 纳鹏君,毛学峰,陈平,等. 山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的胶束毛细管电泳法测定 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(2): 63.
- [11] 翁前锋,袁凯龙,张宏颖,等. 胶束电动毛细管色谱法检测中药马齿苋中多巴胺和去甲肾上腺素 [J]. 色谱, 2005, 23(1): 18.
- [12] 罗东玲,席先蓉,高言明,等. 胶束电动毛细管色谱法测定戊己丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1936.
- [13] Wang XK, He YZ, Qian LL. Determination of polyphenol components in herbal medicines by micellar electrokinetic capillary chromatography with Tween 20 [J]. Talanta, 2007, 74(1): 1.
- [14] 李琦,胡广林,徐晓琴,等. 胶束电动毛细管色谱法测定穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯 [J]. 分析化学, 2003, 31(4): 451.
- [15] 赵新峰,孙毓庆. 胶束电动毛细管色谱法测定山茱萸中莫罗苷和番木鳖苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8): 1154.
- [16] 刘海兴,米新艳,啜会民,等. 胶束电动毛细管色谱法测定生脉注射液中五味子酯甲的含量 [J]. 分析化学, 2004, 32(10): 1416.
- [12] 张继友,李前锋,潘仲巍,等. 毛细管胶束电动色谱测定大黄及复方制剂中蒽醌化合物 [J]. 兰州大学学报:自然科学版, 2003, 39(3): 101.
- [13] 沈守杰,岳美娥,师彦平. 市售大黄及三黄片中蒽醌类活性成分的胶束电动毛细管色谱含量测定 [J]. 分析测试技术与仪器, 2005, 11(2): 90.
- [14] 尚小玉,袁倬斌. 胶束电动毛细管色谱分离大黄中有效成分的研究 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 691.
- [15] 尚小玉,袁倬斌. 环糊精修饰胶束电动毛细管色谱法测定大黄中有效成分 [J]. 分析化学, 2002, 30(7): 853.
- [16] Shi S, Li W, Liao Y, *et al*. Online concentration of aristolochic acid I and II in Chinese medicine preparations by micellar electrokinetic chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1167(1): 120.
- [17] 曹艳,黄必胜,王平,等. 胶束电动毛细管色谱法测定半夏等药材中苯甲酸的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1896.
- [18] 赵新峰,孙毓庆. 胶束电动毛细管色谱法测定牡丹皮及六味地黄丸中丹皮酚的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1): 35.
- [19] 郭涛,孙沂,隋因,等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定当归中阿魏酸和腺苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 348.
- [20] 段建平,陈红青,潘雅玲. 毛细管胶束电动色谱法同时测定丹参及其中成药中的水溶性和脂溶性成分 [J]. 福州大学学报:自然科学版, 2002, 30(6): 873.
- [21] 王媛,袁倬斌. 胶束电动毛细管电泳分离和测定牡蛎中的氨基酸 [J]. 分析试验室, 2003, 22(5): 73.
- [22] 王勇,吴春敏,卢端萍. 胶束电动毛细管电泳法测定熊胆及鸡胆、鸭胆与狗胆中胆汁酸成分 [J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 61.
- [23] 杨伟峰,赵维良. 胶束电动毛细管色谱法测定西洋参中人参皂苷 R_{b1} 、 R_c 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1135.
- [24] 梁生旺,王瑞,王淑美,等. 胶束电动毛细管色谱法分离分析三七中的人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 和三七皂苷 R_1 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 183.

收稿日期: 2008-04-01

收稿日期: 2008-01-24