

微乳电动毛细管色谱分离山酮类化合物的影响因素

薄 涛¹, 贡素萱¹, 杨学东², 李 薇¹, 李克安¹, 刘虎威¹

(1. 北京大学化学与分子工程学院 教育部生物有机和分子工程重点实验室, 北京 100871;
2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100094)

摘要 在优化微乳系统(如 pH、缓冲液浓度、表面活性剂、助乳剂、油相及添加剂)的基础上,对影响微乳电动毛细管色谱(MEEKC)分离山酮类化合物的因素进行了系统研究。以正辛醇-水分配系数(疏水常数 $\log P$)、色谱峰对称因子和理论塔板数作为参数,研究了分离条件的改变对 MEEKC 分离性能的影响。结果表明,色谱条件的改变对疏水性山酮和亲水性山酮分离选择性的影响存在着显著差异,当微乳体系为 50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH 9.5) 10% (体积分数)正丁醇、80 mmol/L 正庚烷、120 mmol/L 十二烷基硫酸钠和 5 mmol/L 磺酸化 β -环糊精,分离电压为 20 kV 和柱温为 35 °C 时,10 个山酮中有 9 个可被基线分离。

关键词 微乳电动毛细管色谱;山酮类化合物;分离选择性;添加剂

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)05-0439-07

Impact Factors on the Xanthone Separation by Microemulsion Electrokinetic Capillary Chromatography

BO Tao¹, GONG Suxuan¹, YANG Xuedong², LI Wei¹, LI Kean¹, LIU Huwei¹

(1. Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: The selectivity of microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) was studied for the separation of nine xanthenes under various operation variables including pH and concentrations of buffer, surfactant and co-surfactant, oil type, addition of organic solvents and cyclodextrins (CDs), capillary temperature and applied voltage. The selectivity was evaluated using such parameters as logarithm of octanol-water partition coefficient ($\log P$), peak symmetry factor and theoretical plate number (N), showing that the changes in operating conditions had significantly different impacts on the separation selectivity for hydrophobic and hydrophilic analytes. The baseline separation of nine xanthenes was achieved with satisfactory repeatability and high separation efficiency using 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 10% (v/v) *n*-butanol, 80 mmol/L *n*-heptane, 120 mmol/L SDS and 5 mmol/L sulfated β -CD, under 20 kV applied voltage and at 35 °C.

Key words: microemulsion electrokinetic capillary chromatography; xanthenes; separation selectivity; additive

微乳电动毛细管色谱(MEEKC)是20世纪90年代在胶束电动毛细管色谱(MEKC)基础上发展起来的一种电泳新技术。在分离分析化学中,微乳液最初曾经被用于高效液相色谱^[1]。1991年,Watarai^[2]第一次将其应用在毛细管电泳(CE)中。近年来,MEEKC方面的文章逐渐增多,是CE研究的热点之一。MEEKC可以同时分离水溶性的、脂溶性的、带电的或不带电的物质,所分离物质的极性

范围比MEKC更宽^[3~7]。在MEEKC分离过程中,被分析物在微乳液滴和水相之间分配,化合物的疏水性不同,同微乳液滴的亲合作用也不同。脂溶性越强和微乳液滴的亲合作用越强,迁移时间越长。十二烷基硫酸钠(SDS)和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)是MEEKC中最常用的表面活性剂。目前MEEKC可用于多环芳烃、固醇类化合物、脂溶性维生素、糖类、蛋白类以及手性药物的分离等。此外,

收稿日期 2003-04-22

作者简介 薄涛,男,1972年生,理学博士,E-mail:btotao@chem.pku.edu.cn.

通讯联系人 刘虎威,教授,博士生导师,Tel (010)62754976,E-mail:hwliu@chem.pku.edu.cn.

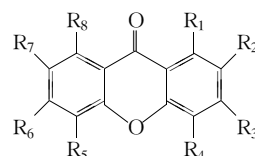
基金项目 国家自然科学基金面上项目(No. 20275001).

MEEKC 的另一重要应用是测定物质的疏水常数。Altria^[4,8]对 MEEKC 的应用进行了详尽的综述。国内也有人^[9]运用 MEEKC 分离了微生物发酵产物中的 6 种吉他霉素(A1、A5~A9)组分,并对 A5 进行了纯度测定,取得了较好的结果。

毛细管区带电泳(CZE)和 MEKC 是分离天然产物的最常用 CE 模式,然而有很多结构类型的天然化合物用这两种分离模式难以完全分离,因此开发电泳技术新模式用于天然产物的分离、分析非常重要。据文献调研,MEEKC 在天然产物分离中的应用只有一篇报道^[4],故很有必要进行更深入的研究。运用 MEEKC 作为分离天然产物的手段,尤其是应用它来解决其他电泳模式不能解决的分离问题,对于开发中药有效成分分离的新技术和拓展 CE 技术在中药分析中的研究对象具有重要意义。我们曾用 MEEKC,采用阴、阳离子表面活性剂对天然产物如异喹啉生物碱和皂苷类成分进行了分离研究^[10],取得了良好的结果,显示了 MEEKC 的较大潜力。

蝉翼藤(*Securidaca inappendiculata* Hassk.)为

远志科远志族蝉翼藤属攀援灌木,分布于印度、缅甸、越南、印度尼西亚和马来西亚及我国广东、海南、广西和云南等地。其根茎味辛、甘、苦,性微寒,有活血化瘀、消肿止痛、清热利尿的功效,可用于跌打损伤、风湿骨痛、腰肌劳损、急慢性肠胃炎、产后恶露不净等疾病的治疗;其茎叶常用于治疗过敏性皮炎^[11,12]。文献^[13]报道该植物的化学成分主要为黄酮、山酮(xanthone, XAN)和皂甙。近来,从蝉翼藤中分离到 10 个山酮类成分(化学结构见图 1),药理实验表明其具有显著的抗氧化和保护神经细胞作用^[14]。我们曾经运用 MEEKC 初步分离了 10 个山酮成分,并与 MEKC 的分离进行了比较研究^[15]。本文在系统优化分离的基础上,运用 MEEKC 分离这 10 个 XAN 化合物,对影响分离的因素进行了系统研究。



Xanthone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	log P (25°C)
1	HO	MeO	MeO	H	H	H	HO	H	2.30
2	MeO	H	H	MeO	H	H	HO	H	2.69
3	MeO	HO	H	H	H	H	MeO	H	2.69
4	H	H	MeO	HO	H	H	MeO	H	2.69
5	MeO	HO	H	H	H	H	HO	H	2.17
6	HO	H	H	MeO	H	H	HO	H	2.17
7	HO	H	HO	MeO	H	H	HO	H	1.78
8	HO	MeO	HO	H	H	H	HO	H	1.78
9	HO	H	HO	H	H	H	HO	H	1.65
10	HO	MeO	MeO	H	H	IO	HO	H	1.91

图 1 10 个山酮类化合物的分子结构式及疏水常数(log P)

Fig. 1 The chemical structures and logarithms of octanol-water partition coefficients (log P) of ten xanthenes

1 实验部分

1.1 仪器与实验条件

HP^{3D}高效毛细管电泳仪(Agilent Technologies, USA),配有二极管阵列检测器、半导体控温和强制气冷,仪器控制和数据处理采用安捷伦化学工作站软件(版本 A.08.03)。十万分之一分析天平(日本岛津)。

熔融石英毛细管 50 μm i.d. × 40 cm(河北永年锐泽色谱器件有限公司),5 000 Pa 气压进样 10 s,紫外检测波长 265 nm。

毛细管清洗程序:为了提高分析的重现性,每次进样前,毛细管分别用 1 mmol/L NaOH 溶液冲洗 1 min,双蒸水冲洗 2 min,运行缓冲液冲洗 3 min。

1.2 材料与试剂

本实验所用 XAN 标准品由中国医学科学院药用植物研究所提供。硼酸、NaOH、SDS 和 CTAB 均为分析纯;甲醇、乙腈、异丙醇、正丁醇和四氢呋喃均为色谱纯,以上试剂均由北京化工厂生产。α-环糊精(CD)、β-CD、γ-CD 和羟丙基 β-CD(HP β-CD)购自日本东京化学工业公司;磺酸化 β-CD 由美国生物分析系统公司(West Lafayette, IN, USA)提供。实验中配制缓冲液和样品溶液所用的水均为二次去离子水。

1.3 微乳溶液的制备

将微乳组成成分(包括缓冲液、表面活性剂、助乳剂和油相)混合,超声 30 min,即得透明稳定的微乳溶液。

2 结果与讨论

2.1 pH 的影响

采用 50 mmol/L 硼酸盐、80 mmol/L 正庚烷、120 mmol/L SDS、8% (体积分数) 正丁醇组成微乳体系,在 pH 8.0~10.5 考察 pH 对 MEEKC 分离选择性的影响。研究表明(见图 2),pH 的变化对 XAN 保留时间的影响不显著,但是随着 pH 的增加 XAN 的分离度和柱效发生了显著改变,而且这种变化对疏水性不同的 XAN 成分存在着差异。对于亲水性较强的 XAN 7~10,在所研究的 pH 范围内峰形均良好,在 pH 8.5 时可基线分离;然而疏水性较强的 XAN 1~6 在 pH 低于 9.0 时峰形很差。在 pH 9.5~10.5 时,随着 pH 的提高,峰形明显改善。原因是疏水性较强的 XAN 1~6,在 pH 低于 9.0 时,与微乳亲和作用很强,因此峰形较差;随着 pH 的提高,XAN 分子中羟基的电离程度加大,所带负电荷增多,与油滴所带负电荷间的排斥作用增强,XAN 与微乳亲和作用降低,因此峰形得到改善。而

亲水性较强的 XAN 7~10,在所研究的 pH 范围内与微乳的亲和作用均适中,所以峰形始终保持良好。研究还表明,pH 的变化对 XAN 1~6 的出峰顺序无影响。而 XAN 7~10 的洗脱次序则随 pH 的变化发生改变,尤其在 pH 10.5 时,XAN 7~10 洗脱次序的变化最为显著。pH 对 MEEKC 分离的影响是个复杂的过程,包括电渗流(EOF)的变化、被分析物的电离和被分析物与油滴间电荷相互作用的改变等,因此上述 XAN 分离选择性的改变是综合作用的结果。综合考虑分离度和峰形,选择 pH 9.5 为最优值。

2.2 SDS 浓度对分离的影响

SDS 浓度是影响 MEEKC 分离的重要因素。研究表明,在 60~160 mmol/L,随着 SDS 浓度的增大,由于 EOF 减小以及油滴表面负电荷的增多,XAN 的保留时间随之延长(见图 3)。在较低的 SDS 浓度(60 mmol/L)时,10 个 XAN 的分离度很差,随着 SDS 浓度的增大,分离度显著改善。然而,较高 SDS 浓度使得 XAN 的分离时间过长。综合考虑分析时间和分离度的影响,选择 120 mmol/L 为 SDS 的最佳浓度。

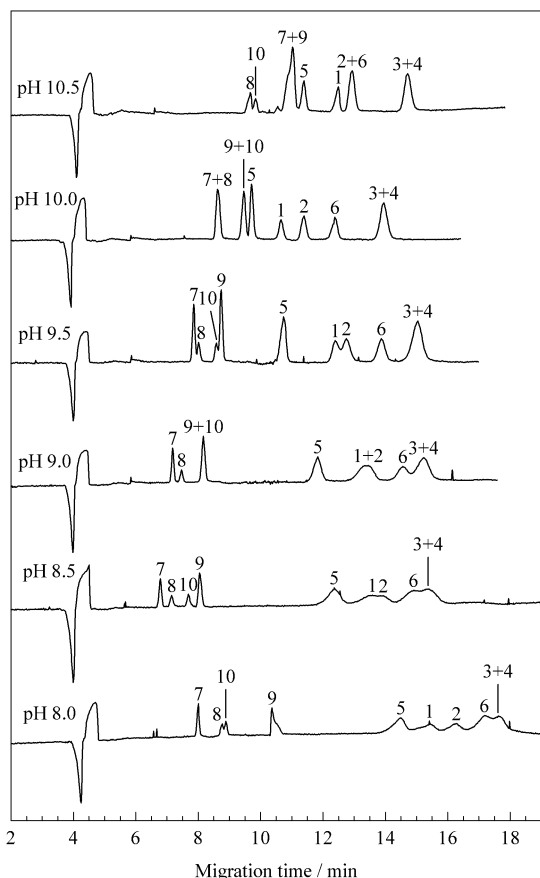


图 2 pH 对山酮分离的影响

Fig. 2 Effect of pH on the separation of xanones

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer containing 80 mmol/L *n*-heptane, 120 mmol/L SDS and 8% (v/v) *n*-butanol; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For peak identification, see Fig. 1.

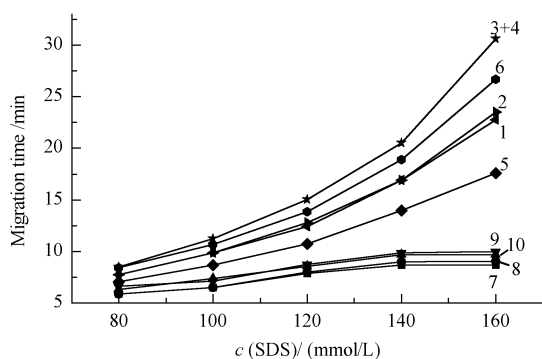


图 3 SDS 浓度对山酮分离的影响

Fig. 3 Effect of SDS concentration on the separation of xanones

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 80 mmol/L *n*-heptane and 8% (v/v) *n*-butanol; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For compound numbers, see Fig. 1.

2.3 正丁醇对分离的影响

正丁醇在 MEEKC 中为助乳剂,它对 MEEKC 的分离选择性有着重要影响。如图 4 所示,随着微乳体系中正丁醇的体积分数从 8% 增至 14%,由于 EOF 减少,亲水性较强的 XAN 7~10 的保留时间延长,然而,疏水性较强的 XAN 1~6 的保留时间在正丁醇超过 10% (体积分数) 以后不再增加,反而下降。原因可能是当正丁醇加入后,虽然 EOF 减小,但是疏水性 XAN 在水相的分配增大,导致其与油滴的亲和作用下降,从而使保留时间缩短。从图 4 可以看出,正丁醇含量为 10% 时,分离度最佳。

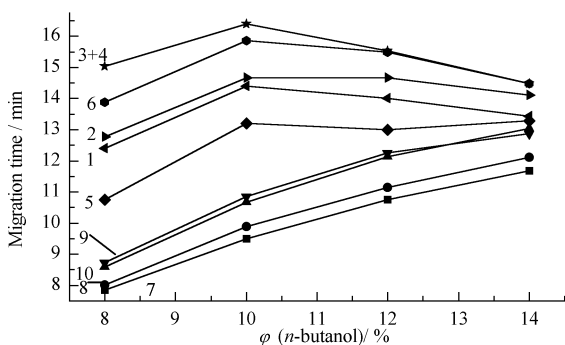


图 4 助乳剂对山酮分离的影响

Fig. 4 Effect of co-surfactant content on the separation of xanones

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 80 mmol/L *n*-heptane and 120 mmol/L SDS; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For compound numbers, see Fig. 1.

2.4 硼酸浓度对分离的影响

随着硼酸浓度从 40 mmol/L 增加到 70 mmol/L, EOF 逐渐减少, 亲水性 XAN 7~10 的保留时间延长, 但 XAN 1~6 的保留时间变化却不明显。数据表明, 50 mmol/L 为最佳硼酸浓度。

2.5 油滴种类和浓度对分离的影响

分别用正己烷、正庚烷和正辛烷作为油相考察了油滴种类对分离的影响。结果表明, 正己烷和正辛烷作为油相不能分离 XAN 9 和 10, 正庚烷作为油相可以基线分离 XAN 9 和 10, 因此正庚烷为最佳油相。研究还表明, 正庚烷的浓度对分离选择性的影响不大。

2.6 添加剂对分离选择性的影响

$\log P$ (25 °C 时化合物在正辛醇和水中的分配系数) 是 MEEKC 分离的重要参数, 我们计算了 10 个山酮的 $\log P^{15}$ (见图 1), 并研究了微乳体系的改变对疏水性和亲水性山酮分离选择性的影响。

2.6.1 CD-MEEKC 体系

在 CD-MEEKC 体系中, 被分离物在水介质、胶束和 CD 中进行三相分配, 与水介质和微乳二相分配相比分离选择性显著不同, 而且不同空腔尺寸和不同衍生化基团的 CD 对分离的影响也存在差异。5 mmol/L 的 β -CD、磺酸化 β -CD、HP β -CD、 α -CD 和 γ -CD 分别加入到微乳体系以考察其对 XAN 分离选择性的影响。

(1) β -CD-MEEKC 体系: β -CD 的加入使亲水性较强的 XAN 7~10 的保留时间缩短, 流出顺序发生了显著变化, 但分离度未能得到改善, 疏水性较强的 XAN 1~6 的保留时间变化不大, 洗脱次序也无改变, 但是 XAN 6 和 3, 4 间的分离度获得了明显改善 (见图 5-b)。与 MEKC 的分离情况相似, XAN 10

与 β -CD 的结合常数远大于其他 XAN, 当 β -CD 加入后, XAN 10 最先被洗脱, 表明 XAN 10 与 β -CD 的包合作用强于与微乳的亲和作用。

(2) 磺酸化 β -CD-MEEKC 体系: 磺酸化 β -CD 是 β -CD 的磺酸化衍生物, 带负电荷, 因此当磺酸化 β -CD 加入到微乳体系时, XAN 成分与其发生包合作用, 保留时间显著延长 (见图 5-c)。随着磺酸化 β -CD 的加入, XAN 的洗脱次序不变, 但分离度明显提高, 有 9 个 XAN 可以被基线分离。磺酸化 β -CD 带磺酸基, 在与 XAN 发生包合作用时, 不仅改变疏水作用, 而且磺酸基与 XAN 分子上的羟基会发生较强的氢键和电荷相互作用, 与中性 CDs 相比, 磺酸化 β -CD 影响分离选择性的因素更多。

(3) HP β -CD、 α -CD 和 γ -CD 的影响: HP β -CD 的加入不影响 XAN 的保留时间, 亲水性 XAN 7~10 迁移顺序发生显著变化, 但分离度未能得到改善。而 XAN 6 和 3, 4 间的分离度明显改善 (见图 5-

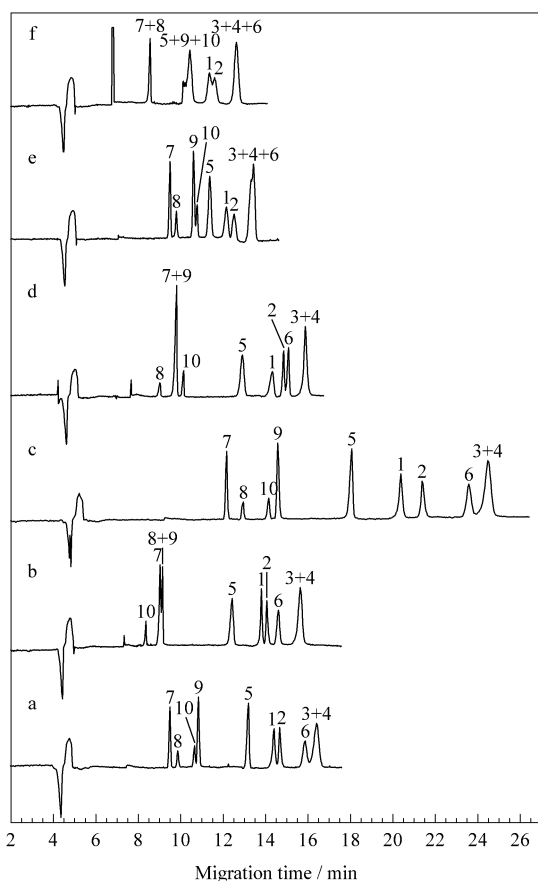


图 5 环糊精作为添加剂对山酮分离的影响

Fig. 5 Effect of the addition of CDs on the separation of xanones
a. without CD; b. β -CD; c. sulfated β -CD; d. HP β -CD; e. α -CD; f. γ -CD.

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 10% (v/v) *n*-butanol, 80 mmol/L *n*-heptane and 120 mmol/L SDS and 5 mmol/L CD; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For peak identification, see Fig. 1.

d) α -CD 由于其空腔尺寸小于 XAN 的分子体积, 故包合作用很小。然而, α -CD 的加入可以增加疏水性 XAN 在水相中的分配, 从而减小其与油滴的亲合作用。因此, 对于亲水性 XAN, α -CD 的加入对其保留时间和分离选择性的影响不大; 对于疏水性 XAN, 其保留时间减小而分离度下降(见图 5-e)。 γ -CD 的空穴远大于 XAN 的分子体积, 对 XAN 的包合作用缺乏选择性, 因此 γ -CD 的加入使 10 个 XAN 的保留时间均减小, 分离度变差(见图 5-f)。

此外, CD 的加入对 XAN 的理论塔板数有着明显影响。对于唯一含邻二酚羟基的 XAN 10, 各种 CD 的加入均使理论塔板数增加。对于其他 XAN, CD 对柱效的影响是不同的。对于疏水性 XAN 1~4, β -CD、HP β -CD 的加入显著提高了理论塔板数;

磺酸化 β -CD 使其理论塔板数略有增加。对于亲水性 XAN 5~9, 中性 CD 使理论塔板数提高很少, 甚至有所下降, 而磺酸化 β -CD 使 XAN 5~10 的理论塔板数略有增加。

2.6.2 有机溶剂对 MEEKC 分离的影响

将 5%(体积分数) 甲醇、乙腈、异丙醇、四氢呋喃加入微乳体系中考察了有机溶剂对 MEEKC 分离的影响。有机溶剂可以提高疏水性成分在水相中的溶解度, 改变微乳的理化性质从而改变分离选择性。研究表明, 随着有机溶剂的加入, EOF 减小, XAN 的保留时间延长。甲醇的加入对分离选择性影响不大, 而乙腈、异丙醇和四氢呋喃明显改变了分离选择性, 使分离恶化。此外, 有机溶剂的加入使 XAN 的理论塔板数发生显著的改变(见表 1)。

表 1 有机溶剂添加剂对理论塔板数和峰对称因子(括号中的数字)的影响($n=3$)

Table 1 The theoretical plate numbers and peak symmetry factors (data in the parentheses) of xanthenes with the addition of organic solvents ($n=3$)

Xanthone	Without additive	With methanol	With acetonitrile	With 2-propanol	With tetrahydrofuran
1	185 145(1.26)	117 543(1.51)	44 365(1.28)	148 018(1.18)	86 320(1.75)
2	288 648(0.71)	505 202(0.90)	122 110(0.94)	148 018(1.18)	87 050(1.23)
5	185 130(1.60)	87 203(1.19)	43 625(0.53)	251 605(1.01)	86 320(1.75)
6	77 863(1.07)	117 003(0.83)	324 865(1.20)	130 713(1.04)	69 948(1.14)
7	212 903(1.09)	264 420(1.08)	199 458(1.11)	278 803(1.36)	241 853(1.31)
8	194 858(1.10)	217 723(0.86)	194 055(1.17)	251 088(1.09)	227 828(0.99)
9	205 073(0.94)	243 378(1.21)	200 168(0.82)	145 643(1.21)	86 320(1.75)
10	184 253(1.39)	245 708(0.90)	200 168(0.82)	145 643(1.21)	217 955(1.51)

2.6.3 混合表面活性剂对 MEEKC 分离的影响

阴离子、阳离子和中性表面活性剂与 SDS 组成混合表面活性剂(10 mmol/L 胆酸钠(SC), 10 mmol/L CTAB, 5%(体积分数) Tween-80 和 5%(体积分数) Triton X-100 分别加入到微乳体系)以考察对 MEEKC 分离的影响。结果表明, 混合表面活性剂对 MEEKC 的分离选择性和柱效有着重要影响。SC 的加入使 XAN 的分离度明显下降, 不利于分离。CTAB 为阳离子表面活性剂, 它的加入使油滴表面的负电荷密度下降, 因此 XAN 的保留时间减小, 但 XAN 的理论塔板数均得到了较大提高。此外, CTAB 的加入对出峰顺序和分离度的影响不

大。中性表面活性剂 Tween-80 和 Triton X-100 的加入, 使 XAN 在水相中的溶解度增大, 从而使其与油滴的亲合作用减小, 因此 XAN 的保留时间减小。Tween-80 的加入虽然不能显著改善 XAN 的分离度, 却明显提高了亲水性 XAN 7~10 的理论塔板数, 但未能提高、甚至降低了疏水性 XAN 1~6 的柱效(见表 2)。研究还表明, Triton X-100 的加入破坏了疏水性 XAN 1~6 的分离, 但明显提高了亲水性 XAN 7~10 的柱效。

2.7 温度和电压对 MEEKC 分离的影响

在上述优化的微乳体系中, 考察了电压(15~30 kV)和温度(30~45 $^{\circ}$ C)对分离的影响。如图 6 所

表 2 混合表面活性剂对理论塔板数和峰对称因子(括号中的数字)的影响($n=3$)

Table 2 The theoretical plate numbers and peak symmetry factors (data in the parentheses) of xanthenes with the addition of surfactant ($n=3$)

Xanthone	Without additive	With SC	With CTAB	With Tween-80	With Triton X-100
1	185 145(1.26)	-	334 348(1.09)	186 838(0.89)	-
2	288 648(0.71)	-	410 683(0.76)	159 003(0.58)	-
5	185 130(1.60)	-	244 923(1.23)	164 318(1.15)	-
6	77 863(1.07)	-	225 678(0.98)	50 338(1.15)	-
7	212 903(1.09)	-	277 593(1.32)	414 672(1.04)	504 638(1.10)
8	194 858(1.10)	-	283 125(1.16)	369 813(1.02)	530 275(1.09)
9	205 073(0.94)	-	304 010(1.52)	420 508(0.76)	318 793(0.65)
10	184 253(1.39)	-	285 110(1.52)	490 955(1.14)	487 373(1.55)

SC: sodium cholate; CTAB: cetyltrimethylammonium bromide.

示 随着电压的升高, EOF 提高, XAN 的保留时间缩短, 然而分离度下降。低电压产生较高的分离度, 但是分离时间过长。XAN 的理论塔板数随电压的变化较大, 对于大多数 XAN, 较高的电压(如 25 kV)产生较高的柱效, 然而, 过高的电压(如 30 kV)反而使柱效下降, 这可能与高电压时产生较大的焦耳热有关。

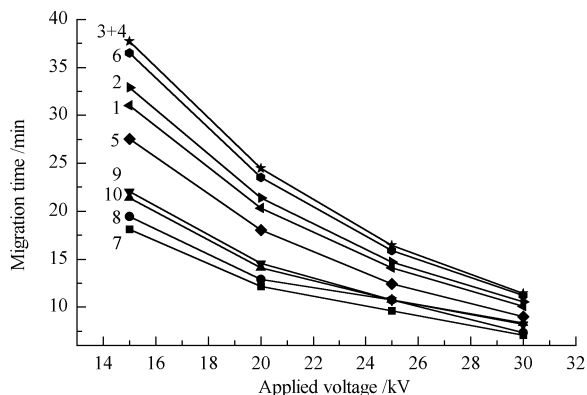


图 6 电压对山酮分离的影响

Fig. 6 Effect of applied voltage on the separation of xanthenes

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 10% (v/v) *n*-butanol, 80 mmol/L *n*-heptane and 120 mmol/L SDS; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For compound numbers, see Fig. 1.

与电压对分离的影响相似, 随温度的升高, EOF 提高, XAN 的保留时间缩短, 分离度下降。而且, 较高温度使 XAN 在水相中的溶解度提高从而与油滴的亲合作用减小, 这也是造成保留时间缩短的一个因素。对于大多数 XAN, 低温时柱效较高。

2.8 保留时间和峰面积的重复性

如表 3 所示, XAN 保留时间和峰面积的重复性良好。保留时间的相对标准偏差(RSD)小于 4%; 峰面积的 RSD 小于 5%。

表 3 MEEKC 分离山酮的保留时间及保留时间和峰面积的重复性 ($n=7$)

Table 3 Retention time and repeatability of the retention time and peak area of the xanthenes by MEEKC ($n=7$)

Xanthone	t_R /min	RSD t_R %	RSD A %
1	20.35	3.47	4.39
2	21.36	3.08	4.18
3+4	24.25	3.37	3.60
5	18.04	3.53	4.42
6	23.56	3.94	3.34
7	12.14	2.83	3.15
8	12.90	2.93	4.18
9	14.56	3.15	3.29
10	14.13	3.34	4.37

Operating conditions: 50 mmol/L borate buffer (pH 9.5) containing 10% (v/v) *n*-butanol, 80 mmol/L *n*-heptane, 5 mmol/L sulfated β -CD and 120 mmol/L SDS; applied voltage, 20 kV; capillary temperature, 35 °C; detection at 265 nm.

For xanthone No., see Fig. 1.

2.9 MEEKC 分离中影响柱效的因素

如前所述, 各种添加剂(如 CD、有机溶剂和表面活性剂)温度和电压对 XAN 的理论塔板数都有影响。在 MEKC 中, 毛细管中的峰扩散效应可由下式表达^[16]:

$$H_{\text{tot}} = H_1 + H_m + H_{\text{aq}} + H_T + H_{\text{ep}}$$

H_{tot} 为总理论塔板高度, H_1 , H_m , H_{aq} , H_T 和 H_{ep} 分别为纵向扩散、溶质在胶束中吸附-解吸附动力学过程、胶束在水相中的质量转移、毛细管径向温度梯度以及胶束淌度的差异对塔板高度的贡献。在等式右边的五个因素中, H_1 , H_m 和 H_{ep} 对峰扩散的影响最大^[16]。 H_1 随着 EOF 的提高而减小, 然而, H_m 和 H_{ep} 随着 EOF 的提高而线性增加。每一项对塔板高度的贡献依赖于保留因子(k)和 EOF 的大小: 当 k 和电渗淌度 v_{eo} 偏小时, H_1 对塔板高度的影响最为显著; 当 k 和 v_{eo} 较高时, H_{ep} 的影响逐渐明显; 当 k 适中而 v_{eo} 较高时, H_m 的影响变得重要。同样, 此公式亦适用于 MEEKC。

CTAB 的加入使油滴表面的负电荷密度下降, 从而减小了与 XAN 分子所带负电荷间的排斥作用, 加速了 XAN 在水相和油滴间的传质过程, 从而使 H_m 减小, 此因素占主导地位, 因此 XAN 理论塔板数明显提高。然而, Tween-80 的加入对亲水性和疏水性 XAN 柱效的影响有显著差异。加入 Tween-80 使粘度增加, EOF 下降, 导致 H_1 提高。同时, Tween-80 的加入使疏水性 XAN 1~6 在水相中的溶解度增加、与油滴间的亲和作用减小, 从而使其在水相和油滴间的传质过程减慢(H_m 提高), 因此, Tween-80 的加入使疏水性 XAN 1~6 的理论塔板数减小。然而, 与疏水性 XAN 不同, 对于亲水性 XAN 7~10, Tween-80 作为添加剂加快了其在水相和油滴间的传质过程(H_m 减小), H_m 减小占主导因素, 从而抵消了 H_1 的增加对柱效减小的影响, 因此其理论塔板数提高。对于 Triton X-100 的加入, 与 Tween-80 作为添加剂相似, H_m 亦减小, 并占主导地位, 因此亲水性 XAN 7~10 的理论塔板数提高。

在 CZE 中, 提高温度和电压会提高溶质的理论塔板数。然而, 在 MEEKC 分离 XAN 时, 虽然随着温度或电压的升高, EOF 的提高使 H_1 下降, 但 EOF 的提高使 H_m 和 H_{ep} 增加从而抵消了 H_1 下降对柱效提高的影响, 因此较高的温度或电压对柱效的提高不太明显甚至降低柱效。

对于 CDs 和有机溶剂, 由于种类多样化, 其物化性质差别较大, 因此对柱效的影响较为复杂, 导致了 XAN 理论塔板数的不规律变化。总之, CD 和有

机溶剂仍是通过影响 H_1 , H_m 和 H_{ep} 对柱效产生作用的。

色谱峰的对称因子也是评价分离效果的一个重要参数,研究表明 MEEKC 色谱条件的改变会显著改变 XAN 色谱峰的对称因子。然而,由于影响对称因子的因素较为复杂,因此其改变缺乏规律性,这方面有待深入研究。

3 结论

研究表明, pH、微乳组成以及各种添加剂如 CD、SC 和有机溶剂和混合表面活性剂对 XAN 的 MEEKC 分离选择性有着显著影响。而且,电泳条件的变化对亲水性和疏水性 XAN 分离柱效的改变存在明显的差异。以磺酸化 β -CD 为添加剂时分离最佳,9 个 XAN 可在 25 min 内实现基线分离。

参考文献:

- [1] Hansen S H, Gabel-Jensen C, El-Sherbiny D T M, Pedersen-Bjergaard S. *TrAC, Trends Anal Chem*, 2001, 20(11): 614
- [2] Watarai H. *Chem Lett*, 1991(3): 391
- [3] Altria K D, Mahuzier P E, Clark B J. *Electrophoresis*, 2003, 24(3): 315
- [4] Altria K D. *J Chromatogr A*, 2000, 892: 171
- [5] Poole S K, Durham D, Kibbey C. *J Chromatogr B*, 2000, 745: 117
- [6] Gluck S J, Benkoe M H, Hallberg R K, Steele K P. *J Chromatogr A*, 1996, 744: 141
- [7] Ishihama Y, Oda Y, Asakawa N. *Anal Chem*, 1996, 68(23): 4281
- [8] Altria K D. *J Chromatogr A*, 1999, 844: 371
- [9] Hong Liya, Li Ling. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2000(4): 251
洪利娅, 郦玲. *药物分析杂志*, 2000(4): 251
- [10] Bo T, Zhong L, Li M, Luo Y Q, Li K A, Liu H W. *Chromatographia*, 2002, 56(11/12): 709
- [11] Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. *Records of Traditional Chinese Medicines (Vol. 2)*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982. 381
中国医学科学院药物研究所. *中药志(第二册)*. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 381
- [12] Yin Jian, Guo Lifang. *Modern Research and Clinic Application of Chinese Traditional Medicines*. Beijing: Xue Yuan Press, 1993. 336
阴健, 郭力方. *中药现代研究与临床应用*. 北京: 学苑出版社, 1993. 336
- [13] Yang Xuedong, Xu Lizhen, Yang Shilin. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(3): 365
杨学东, 徐丽珍, 杨世林. *植物学报*, 2003, 45(3): 365
- [14] Yang Xuedong. [PhD Dissertation]. Beijing: Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, 2002
杨学东. [博士学位论文]. 北京: 中国医学科学院药用植物研究所, 2002
- [15] Bo T, Yang X D, Liu F, Li K A, Xu L Z, Liu H W. *Anal Chim Acta*, 2002, 474: 37
- [16] Terabe S, Otsuka K, Ando T. *Anal Chem*, 1989, 61: 251