

## 反相毛细管电色谱分离山酮类化合物

廖杰<sup>1</sup>, 薄涛<sup>2</sup>, 刘虎威<sup>2</sup>

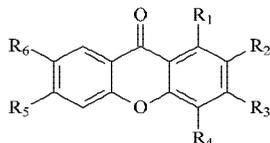
(1. 中国人民解放军总医院医学实验测试中心, 北京 100853;

2. 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)

关键词: 反相毛细管电色谱(RP-CEC); 山酮(xanthone); 蝉翼藤(*Securidaca inappendiculata* Hassk.)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2006)04-0421-02 栏目类别: 技术与应用

目前, 毛细管电色谱(CEC)在中草药分析中显示出一些独特的优势, 如: CEC流动相相对简单、用量少、峰容量大、更易与质谱(MS)联用。特别是植物提取物中活性成分复杂, 需要对色谱峰进行精确的指认并控制峰纯度; 采用CEC-MS方法可在线提供中药中各种化合物的质谱图。此外, 有许多天然产物在中药中的含量极低, MS的高灵敏度可弥补紫外检测器灵敏度较低的缺陷。因此, 研究CEC分离中药成分的选择性问题具有重要的实际意义。蝉翼藤(*Securidaca inappendiculata* Hassk.)为远志科远志族蝉翼藤属攀援灌木, 其根茎叶有多种药效, 其化学成分主要为黄酮、山酮(XAN)和皂甙<sup>[1]</sup>。从蝉翼藤中已分离出的10个XAN类成分(结构见图1)<sup>[2,3]</sup>具有显著的抗氧化和保护神经细胞作用<sup>[3]</sup>。我们曾用毛细管区带电泳(CZE)<sup>[2,4]</sup>、高效液相色谱(HPLC)<sup>[5]</sup>、毛细管胶束电动色谱(MEKC)<sup>[6]</sup>和毛细管微乳电动色谱(MEEKC)<sup>[7-8]</sup>对这10个XAN进行分离, 并就电泳条件的变化对分离选择性的影响进行系统研究。本文采用CEC法对这10个XAN成分进行分离, 并对其色谱分离条件进行优化研究, 以期今后CEC与MS联用分析中药成分打下基础。



No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
XAN-1	OH	OMe	OMe	H	H	OH
XAN-2	OMe	H	H	OMe	H	OH
XAN-3	OMe	OH	H	H	H	OMe
XAN-4	H	H	OMe	OH	H	OMe
XAN-5	OMe	OH	H	H	H	OH
XAN-6	OH	H	H	OMe	H	OH
XAN-7	OH	H	OH	OMe	H	OH
XAN-8	OH	OMe	OH	H	H	OH
XAN-9	OH	H	OH	H	H	OH
XAN-10	OH	OMe	OMe	H	OH	OH

图1 10个XAN化合物的结构

## 1 实验部分

## 1.1 仪器和试剂

HP<sup>3D</sup> CE 高效毛细管电泳仪(德国安捷伦公司), 配有二极管阵列检测器(DAD)。pHs-3C型pH计与E-201-C型电极相连(上海Rex仪器厂)。

XAN标准品由中国医学科学院药用植物研究所提供。冰醋酸、氢氧化钠、甲醇、乙腈为色谱纯, 均由北京化工厂生产。配制缓冲液和样品溶液所用水均为二次去离子水。

## 1.2 实验条件

CEC条件: CEC Hypersil-C18柱, 100 μm i. d. × 375 μm o. d., 总长度48.5 cm, 有效长度(填充部分)40 cm, 粒径3 μm(德国安捷伦公司); 流动相为乙腈-25 mmol/L 醋酸缓冲液(体积比为50:50, pH 4.5); 柱温25 °C。进样条件为20 kV × 10 s; 分离电压25 kV(分析电流稳定在5.5 μA); 分析时进样口和出口同时施加气压0.5 MPa, 以避免气泡的产生; 检测波长265 nm。

新毛细管柱的平衡是实验成功的关键。将新毛细管柱用含80%乙腈的5 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)(用30% HCl调pH 8.0)缓冲液冲洗约70 min。在冲洗过程中, 先在进样口施加气压1.2 MPa, 柱两端施加电压5 kV, 并以0.5 kV/min的速率逐步升至25 kV; 再于进样口和出口同时施加气压1.2 MPa, 柱两端施加电压25 kV冲洗30 min, 直到电流和基线稳定。更新缓冲液时, 毛细管柱在进样前要用流动相冲洗30 min, 两次分析之间要用流动相冲洗10 min。

## 1.3 缓冲溶液及样品溶液的制备

分别以醋酸(pH 3.0~5.0)和Tris(pH 7.0~8.0)为缓冲溶液, 用0.1 mol/L NaOH或30% HCl调节其pH到所需值, 再加入一定量的乙腈作为有机添加剂。缓冲液使用前用0.45 μm的滤膜过滤, 并用超声波脱气约10 min。

## 2 结果与讨论

## 2.1 缓冲体系的pH值对分离的影响

由于酚羟基的存在, 10个XAN类化合物均为弱酸性化合物, 它们的电离程度与其本身的pK<sub>a</sub>和流动相的pH值有关, 而且pH值的变化还影响着电渗流(EOF)速率的高低以及被分析物与反相固定相间的作用强弱。为此, 试验了不同pH值(pH 3.5~8.0)的流动相: 80%乙腈-5 mmol/L 醋酸缓冲液(pH 3.5, 4.0和5.0)和80%乙腈-5 mmol/L Tris缓冲液(pH 7.0, 8.0)。结果表明, pH的变化对XAN的保留时间有明显的影响(见图2)。在pH为5.0时, XAN的保留时间最长。这是因为pH值的提高虽然可促进电色谱柱柱壁和柱内填料上硅羟基的解离, 从而提高EOF及流动相的流速, 然而在较高的pH值下, XAN的酚羟基电离而带负电, 其电泳迁移方向与EOF相反, 而且随着pH值的提高, XAN的酚羟

基电离程度增大, XAN 与反相固定相间的保留作用减弱; 反之亦然。因此, pH 对 XAN 保留时间的影响是上述 3 个因素综合作用的结果。当 pH 由 7.0 降至 5.0 时, EOF 速率减小, 而且由于 XAN 酚羟基电离程度的下降导致其与反相固定相间的保留作用增强, 这时虽然与之反向的溶质的电迁移速率也会随之减小, 但前二者的作用占支配作用, 因此, XAN 的保留时间延长。在 pH 为 5.0 ~ 3.5 时, 随着 pH 的减小, 由于与高 pH (如 pH 7.0 和 8.0) 相比, EOF 速率较小且减小程度不是很明显, 因此尽管 XAN 与反相固定相间的保留作用随着 pH 的降低而增强, 但与之反向的溶质的电迁移速率减小的程度更大, 导致总迁移速率变大, XAN 的保留时间反而缩短。实验显示, 当 pH 为 4.0 时, XAN 的分离选择性最好。

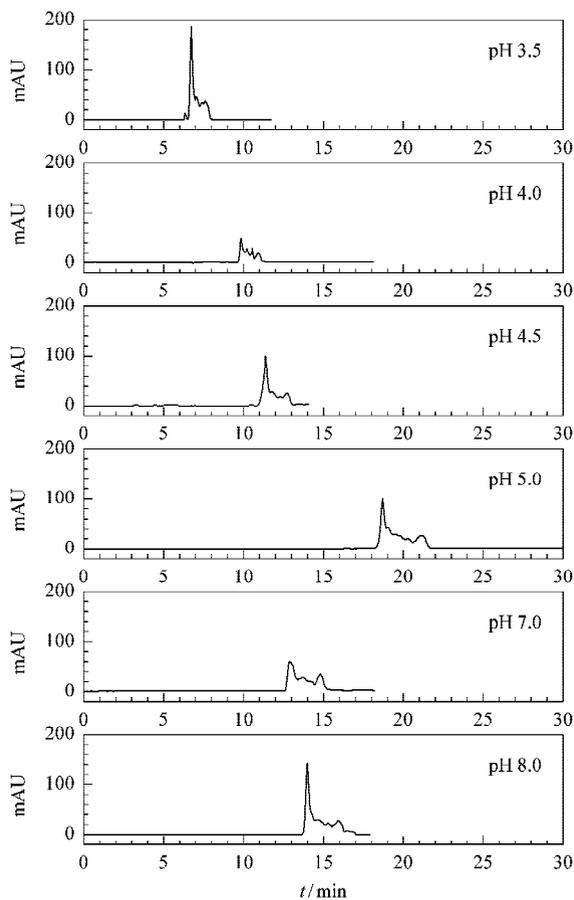


图 2 缓冲体系的 pH 值对 XAN 分离的影响

实验条件 5 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.5, 4.0 和 5.0) 或 5 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.0 和 8.0), 均含 80% 乙腈; 柱温 25 °C; 分离电压 25 kV。

## 2.2 醋酸浓度对分离的影响

配制 pH 4.0 条件下含 80% 乙腈的不同浓度 (5 ~ 30 mmol/L) 的醋酸缓冲溶液进行电色谱分离, 结果表明, 随着醋酸浓度的提高, XAN 的分离度明显得到改善。

随着醋酸浓度的提高, 缓冲液的离子强度也随之增大, 导致 EOF 的速率降低; 然而, 醋酸浓度的提高还会增大 XAN 在水相中的分配, 减少其与反相固定相间的相互作用。这两种相反的作用决定了 XAN 的保留时间。在醋酸浓度为 15 ~ 25 mmol/L 的范围内, 由于 EOF 速率的下降为主要因素, 因此随着醋酸浓度的提高, XAN 的保留时间会延长。然而, 与

25 mmol/L 的醋酸浓度相比, 在醋酸浓度为 30 mmol/L 时, XAN 的保留时间反而下降, 这可能是由于在此浓度下 XAN 与反相固定相相互作用减弱的因素占主导, 导致 EOF 减小的因素被抵消所致。当醋酸浓度在 5 ~ 15 mmol/L 的范围内变化时, 随着醋酸浓度的减小, XAN 的保留时间延长, 这是因为在很低的醋酸浓度下, 减小醋酸浓度反而会增大 XAN 和反相固定相间的相互作用<sup>[9]</sup>, 虽然此时 EOF 同时也会提高。研究显示, 醋酸的最佳浓度为 25 mmol/L。

## 2.3 乙腈浓度对分离的影响

在 25 mmol/L 醋酸 (pH 4.0) 缓冲液中改变乙腈的浓度 (用体积分数表示, 下同) 浓度范围为 30% ~ 80%, 结果表明乙腈浓度为 50% 时, 分离效果最好 (见图 3)。

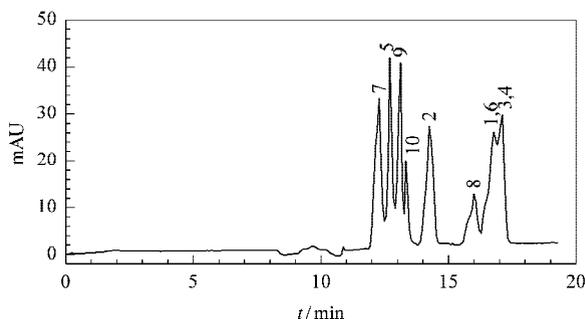


图 3 CEC 分离 XAN 化合物的结果

实验条件 25 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0), 含 50% 乙腈; 柱温 25 °C; 检测电压 25 kV。峰序对应于图 1 中的化合物编号。

从试验结果看, 乙腈浓度较高时会缩短分离时间 (EOF 的速率随着离子强度和黏度的降低而增加), 表明反相分离机制起主导作用, 故增加乙腈浓度还能起到提高溶剂强度的作用。与 XAN 的 HPLC<sup>[5]</sup> 和 CZE 分离结果<sup>[2,4]</sup> 相比, CEC 分离 XAN 成分时的出峰顺序与其存在着明显的差异, 表明 CEC 分离 XAN 时, 其色谱行为是 HPLC 和 CZE 分离的综合表现, 其中 RP-HPLC 分离机制占主导地位。

研究还表明, 乙腈的浓度对 XAN 的分离柱效有明显的影响。以 XAN-9 为目标化合物的试验结果表明, 随着乙腈浓度的下降, CEC Hypersil-C18 柱的理论塔板数 ( $N$ ) 明显提高。当乙腈浓度为 40% 时,  $N$  为 1 330 333。

## 参考文献:

- [1] 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 中草药, 2000, 31(5): 392
- [2] Bo T, Yang X D, Gao F, Liu H W, Li K A, Xu L Z. Chromatographia, 2002, 55(3/4): 217
- [3] 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, 2001
- [4] Bo T, Huang Y F, Yang X D, Li K A, Liu H W, Xu L Z. J Chromatogr Sci, 2003, 41(4): 182
- [5] Bo T, Liu F, Li K A, Liu H W. J Liq Chrom & Relat Technol, 2003, 26(6): 993
- [6] Bo T, Yang X D, Liu F, Li K A, Xu L Z, Liu H W. Anal Chim Acta, 2002, 474(1/2): 37
- [7] Bo T, Yang X D, Li K A, Xu L Z, Liu H W. J Sep Sci, 2003, 26(1/2): 133
- [8] 薄涛, 贡素董, 杨学东, 李薇, 李克安, 刘虎威. 色谱, 2003, 21(5): 439
- [9] Chankvetadze B, Blaschke G. J Chromatogr A, 2001, 906(1/2): 309