

有机添加剂对毛细管电泳分离中药中麻黄碱的影响

江冬青

(南开大学中心实验室 天津 300071)

摘要 毛细管电泳中的胶束电动色谱方式是分离中性物质的一种很有效的方法,β-CD 广泛地使用在手性对应体的分离中,在 CTAB 阳离子表面活性剂的作用下,实现了中药里麻黄碱和伪麻黄碱的分离,加标回收率 93%~105%。

关键词 毛细管电泳 β-CD 麻黄碱

引言

麻黄碱是从中草药中提取的有药效作用的生物碱,具有兴奋神经、增加血压、扩张气管、松弛平滑肌等作用。一般用于止咳、鼻炎、关节痛症的治疗。由于麻黄碱的刺激作用,使得在药物中的加入量受到各国的严格限制。因此对药物中麻黄碱含量的测定是非常必要的。天然麻黄碱有多种异构体,其中麻黄碱(1R,2S)(-)-ephedrine(简称(-)-E)和伪麻黄碱(1S,2S)(+)-pseudoephedrine(简称(+)-wE)占主要部分^{1,2},它们的分子结构(见图1)。在分子中各含有两个不相同手征性碳原子R和S,有两对对应异构体,并且它们的理化性质极其相似,临床上所应用的这类药物通常都是以混合物形式存在。对(-)-E和(+)-wE的分析通常采用液相色谱、气相色谱。但液相色谱用手性柱分离成本高,气相色谱又很难对这两个物质进行分离。因此高效毛细管电泳成为一种新兴的分离手性物质的重要工具,它具有分离效率高、溶剂消耗少、成本低、光谱检测灵敏、选择性分离等优点,越来越被药物工作者所重视^{3,4}。

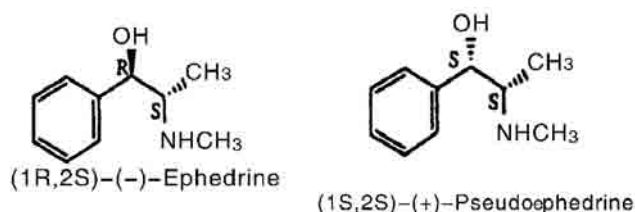


图1 麻黄碱及伪麻黄碱的分子结构

毛细管电泳(capillary electrophoresis)有多种分离模式,其中胶束电动色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography)是对中性化合物分离最有效的方法。其原理为当缓冲溶液中加入的表面活性剂的浓度大于临界胶束浓度(critical micelle concentration 简称CMC)时,表面活性剂在溶液中形成胶束相,不同的中性物质能根据其在胶束相和水相的分配系数不

同,在电泳作用下进行分离⁵。

β-环糊精(简称β-CD)具有环状分子结构,该结构中所含环状空腔具有手性识别能力,β-CD(简称主体)能与各种对映体分子(简称客体)形成包合物,其包合过程主要受化合物疏水性和其形状的影响,也受化合物分子大小对CD空穴的适应性的影响,造成在色谱过程中滞留的差异,达到分离目的。β-CD作为手性添加剂被广泛应用于对映体异构体毛细管电泳的分离⁶。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

毛细管电泳仪P/ACE MDQ由美国Beckman Coulter公司生产;液体冷却系统温度25℃;检测器为UV,检测波长 $\lambda = 214\text{nm}$;未涂渍石英毛细管(50cm×75 μm I.D.)作为分离之用;pH酸度计;超声波振荡器。

试剂:十四烷基三甲基溴化铵(CTAB)、三羟三甲基氯化铵(Tris)、β-环糊精(β-CD)、磷酸二氢钠、磷酸、甲醇、乙腈试剂均为分析纯,标准品麻黄碱((-)-E)和伪麻黄碱((+)-wE)纯度大于99.0%,水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

缓冲溶液:水:甲醇:乙腈=50:25:25(V:V:V),含有3 mmol·L⁻¹ β-CD、3.0 mmol·L⁻¹ CTAB、18.5 mmol·L⁻¹ Tris、10 mmol·L⁻¹ NaH₂P₄O₄,用1% H₃P₄O₄调节pH=6.70,缓冲溶液经0.45 μm 膜过滤,超声5 min。

样品提取:称中药样品0.5000g,加入甲醇25 mL浸泡4h,超声30 min过滤,用甲醇冲洗残渣,甲醇提取液定容至50 mL备用。

电泳条件:电压+15kV;电流12.6 μA ;检测器UV;检测波长 $\lambda = 214\text{nm}$;压力进样0.5 psi 3s,样品测试前用0.2 M NaOH冲洗1 min,二次蒸馏水冲洗2 min,甲醇冲洗1 min,缓冲液冲洗10 min。

1.3 分离度计算

分离度用来衡量电泳峰分离效果的好坏, 一般用 R_s 表示:

$$R_s = 2((t_m)_2 - (t_m)_1) / (W_2 + W_1)$$

式中, t_m 表示迁移时间, W 为峰底宽, 下标 1、2 表示相邻的两个峰。

2 结果与讨论

2.1 β -CD 对分离的影响

在 β -CD 浓度为 $0 \sim 9.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 测定标准样品(-)-E 和 (+)-wE 的分离度, 图 2 表示 R_s 与 β -CD 浓度的关系。结果表明(-)-E 与 (+)-wE 的分离度 R_s 随着 β -CD 浓度的减少而增大。从图 2 可以看出当 β -CD 浓度在 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分离度最小。同时, 实验表明迁移时间也随 β -CD 浓度的减少而加长。当不加 β -CD 时, (-)-E 和 (+)-wE 的迁移时间分别为 41.52 min 和 45.20 min 。而 β -CD 的浓度为 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, (-)-E 和 (+)-wE 的迁移时间分别为 6.74 min 和 6.83 min 。因此加入 β -CD 可以缩短分离时间。

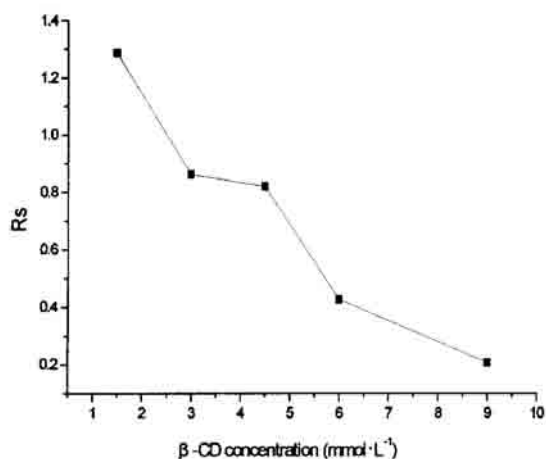


图 2 β -CD 不同浓度时(-)-E 和 (+)-wE 的分离度

2.2 CTAB 对分离的影响

阳离子表面活性剂的加入一方面起到胶束电泳固定相的作用, 同时还能使电渗流 EOF 反相, 当加正相电压即进样端为“+”极, 检测端为“-”极时, 电迁移方向与电渗流 EOF 方向相反, 从而延长出峰时间, 达分离目的。分别配置 CTAB 浓度为 $2.25 \sim 6.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓冲溶液, 测定标准样品(-)-E 和 (+)-wE。结果表明: 随着 CTAB 的浓度的增加, 分离度 R_s 也逐渐增大(见图 3), 但出峰时间越长。当 CTAB 加至 $6.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 出峰时间大于 40 min 。因此, 分离最佳条件应选择为 $3.5 \sim 5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 背景电解质的影响

缓冲溶液以两种方法配制:(I) Tris- H_3PO_4 , 加入不同浓度的 Tris 用 H_3PO_4 (1%), 调 $\text{pH} = 5.15 \sim 7.1$, β -CD

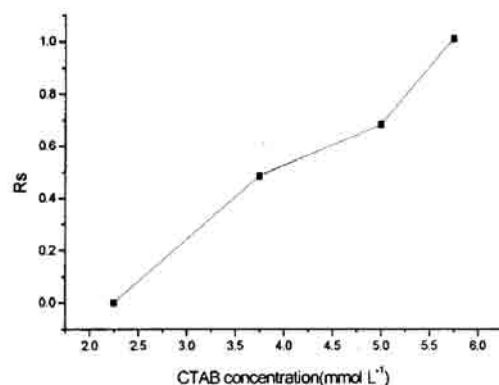


图 3 CTAB 不同浓度时(-)-E 和 (+)-wE 的分离度 ($6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), CTAB ($3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 甲醇:乙腈 = 1:1 (50%); (II) Tris- NaH_2PO_4 , 加入不同浓度的 Tris 和 NaH_2PO_4 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 用 H_3PO_4 (1%) 调 $\text{pH} = 4.3 \sim 7.3$, 其他有机添加剂不变。测定(-)-E 和 (+)-wE (见表 1)。表明 II 组由于加入 NaH_2PO_4 , 使缓冲溶液中电解质浓度增加, 导致电流增大, 出峰时间前移, 另外从表 1 可以看出随着 pH 的逐渐增大, 由于毛细管表面的硅羟基的解离度也随之增大, 导致电渗流也逐渐增强。由于在 CTAB 环境中, 电渗流反向, 造成迁移时间延长, 分离度加大。但是当 $\text{pH} > 7$ 时迁移时间 $> 30 \text{ min}$, 不可取。

表 1 不同电解质分离(-)-E 和 (+)-wE 的结果

	Tris	NaH_2PO_4	H_3PO_4 1%	(+)-wE	(-)-E	R_s
	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	调 pH	T_R (min)	T_R (min)	
(I)组	15.0		5.15	11.74	11.83	0.21
	16.0		5.57	19.52	20.30	0.46
	17.0		6.04	25.43	26.35	0.84
	18.0		6.26	34.82	35.91	1.0
	19.0		6.82	41.5	45.22	1.29
	20.0		7.1	>40	>45	
(II)组	15.0	10	4.77	3.81	3.81	0
	16.0	10	6.42	5.34	5.40	0.38
	17.0	10	6.75	6.73	6.82	0.78
	18.0	10	6.86	15.82	16.55	1.15
	19.0	10	6.99	18.59	19.67	1.23
	20.0	10	7.13	>30	>30	

2.4 添加有机溶剂的影响

有机溶剂的添加, 可以减少毛细管电泳的电渗流, 降低焦耳热的产生, 由此可以加大分离电压, 提高分离度。通常选择有高的介电常数和偶极矩, 对被测物有好的溶解性, 甲醇、乙腈是良好的有机选择剂, 在缓冲溶液中分别加入 60%、50%、40%、30%、20% 的有机溶剂 (甲醇:乙腈 = 1:1 V/V), 考察对分离(-)-E 和 (+)-wE 的影响(见图 4)。实验表明, 随着有机溶剂比例的减少, 迁移时间延长。当有机溶剂比例为 30% 以下时, 迁移时间大于 40 min 。当有机溶剂比例大于 60% 时, β -CD 溶解度下降。

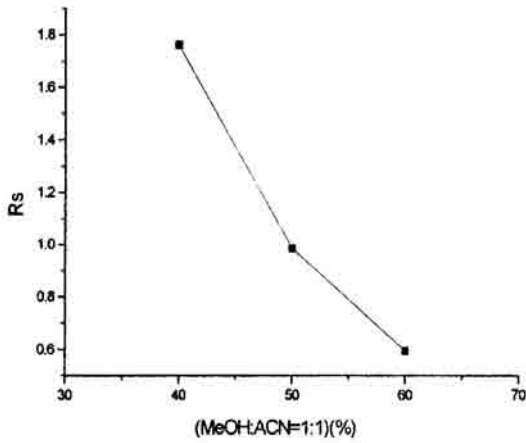


图4 不同浓度的有机溶剂(乙腈:甲醇=1:1 V/V)对(-)-E和(+)-wE的分离度影响

2.5 最佳优化条件选择

在2.1~2.4各项分析的基础上,优化选定样品分离的电泳条件为:缓冲溶液 β -CD($4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), CTAB($3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), Tris($18.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), NaH_2PO_4 ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), H_3PO_4 (1%)调 $\text{pH}=6.80$,水:甲醇:乙腈=50:25:25(V:V:V)。标准样品及中药样品电泳分离图(见图5)。可以看出,(-)-E和(+)-wE的分离在10 min以内完成, Rs均大于1。(-)-E标样浓度线性范围为 $5\sim 25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (+)-wE标样浓度线性范围为 $4\sim 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。标准样品线性回归计算(-)-E为 $y=291.38x+39$; $R=0.9991$ 。(+)wE为 $y=217.45x+8$; $R=0.9994$ 。(-)-E的检出限为 $0.72\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (+)-wE的检出限为 $0.83\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6 回收率试验

取样品提取液适量,分别加入不同浓度混合标准样品,回收测试结果(见表3)。从表3看出(+)-wE的回收率好于(-)-E的回收率。原因是(+)-wE的峰形有些拖尾,给积分带来一定误差。(+)wE的回收率范围在97.9%~103.8%,(-)-E的在93.1%~105.8%。

表3 中成药中麻黄碱和伪麻黄碱的测定及回收率(n=3)

样品	(+)-wE [*]			回收率(%)	(-)-E [*]			回收率(%)
	测试值($\mu\text{g mL}^{-1}$)	加入量	测试值		测试值($\mu\text{g mL}^{-1}$)	加入量	测试值	
通宣理肺(98)	4.4	9.0	13.5	100.9	8.8	10.0	18.4	95.5
	—	13.0	18.2	102.1	—	15.0	23.5	97.9
通宣理肺(2000)	4.8	3.0	7.1	103.8	8.5	2.5	10.9	98.1
	—	6.0	11.3	97.9	—	7.5	15.6	94.4
鼻炎康片	2.7	3.0	5.0	101.9	5.8	2.5	8.5	105.8
	—	6.0	9.4	98.8	—	7.5	12.6	93.1
川贝止咳片	—	—	—	—	21.0	25.0	45.7	98.2
	—	—	—	—	38.9	50.0	89.1	100.3

(*样品的检出浓度)

(下转第23页)

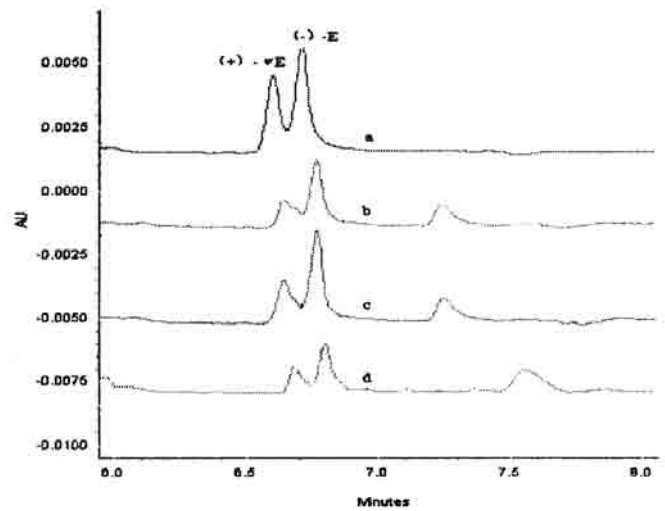


图5 标准(-)-E和(+)-wE样品及中药样品电泳分离
a.标样;b.通宣理肺片(98);c.通宣理肺片(2000);d.鼻炎康片

3 结论

高效毛细管电泳法对中药中的麻黄碱及伪麻黄碱含量分析,具有分析速度快,方法简便,成本低,样品提取容易等特点。另外毛细管电泳法采用紫外光谱鉴定,麻黄碱具有较强光谱吸收,因此灵敏度优于气相色谱法的火焰离子检测器,同时分离度远远好于气相色谱法。

参考文献

- 1 Cheryl L. Fluor, Larrie A. Lin. Determination of ephedrine compounds in nutritional supplements by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis, *J Chromatography B*, 1995, 669:133~139
- 2 Guanbin Li, Ziping Zhang. Analysis of ephedrine in ephedra callus by acetonitrile modified capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 1999, 48:1023~1029
- 3 Maria-Helen E. Spyridaki, Christina J. Tsitsimikou. Determination of ephedrines in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatography B*, 2001, 758:311~314
- 4 Yukiko Makino, Yasuteru Urano. Impurity profiling of ephedrines in methamphetamine by high-performance liquid chromatography, *J of Chromatography A*, 2002, 947:151~154

- deletion polymorphisms (J). Clin Chem, 2001, 47(9):1728~1729
- 4 Bertsch T, Zimmer W, Casarin W et al. Real-time PCR assay with fluorescent hybridization probes for rapid interleukin-6 promoter genotyping (J). Clin Chem, 2001, 47(10):1873~1874
 - 5 Fu S, Stevenson H, Strovel JW, et al. Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the beta-globin gene (J). Gene, 2001, 278(1~2):131~139
 - 6 Chase MB, Fu S, Haga SB, et al. BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the β -globin gene (J). Mol Cell Biol, 2002, 22:2505~2514
 - 7 Fu S, Schwartz A, Stevenson H, et al. Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer (J). Breast Cancer Res, 2003, 5(4):R82~87
 - 8 Cantile M, Pettinato G, Procino A, et al. In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer (J). Eur J Cancer, 2003, 39(2):257~264
 - 9 Ferrari N, Paleari L, Palmisano GL, et al. Induction of apoptosis by fenretinide in tumor cell lines correlated with DLX-2, DLX-3, and DLX-4 gene expression (J). Oncol Rep, 2003, 10(4):973~977
 - 10 Shimamoto T, Ohyashiki K, Takeshita K. Overexpression of the homeobox gene DLX-7 inhibits apoptosis by induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (J). Exp Hematol, 2000, 28(4):433~441

The fluorescent real-time PCR technique and its application on detecting the homeobox gene in breast cancer

Yang Yi Yu Man Wei Xiyin Shi Yutong Niu Ruifang

(Oncology Central Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Hospital 300060)

Abstract The fluorescent real-time PCR is a nuclear-acid quantitative technique based on the measurement of various emitted fluorescence. By introducing the fluorescence-labeled probe in the PCR assay, this technique not only can accurately and specifically determine the template concentration and detect any minor difference in gene expression, but also greatly overcome the weakness of the common PCR, such as the lab contamination. In this article, we summary the theory and characteristic of the mostly used real-time PCR assays and give a brief introduction of our work on detecting the homeobox gene in breast cancer by applying this technique.

Key words Realtime PCR Fluorescence Breast cancer Homeobox gene

(上接第15页)

- 5 Simo P, Pomras, István E, Valkó, Pentti Jkske. Effect of electrolyte and solvent composition on capillary electrophoretic separation of some pharmaceuticals in non-aqueous media, J Biochem. Biophys Methods, 1999, 38:89~102
- 6 Benno A, Ingelse, Karel Lemr. Capillary electrophoretic enantioseparation of selegiline, methamphetamine and ephedrine using aneutral β -cyclodextrin epichlorhydrin polymer, J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1996, 14:1089~1094

Effect of organic additive on capillary electrophoretic separation of ephedrines in Chinese herbs

Jiang Dongqing

(Central Labtory, Research Center for Analytical Sciences, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) is best effective method for separation nature compounds, a neutral β -cyclodextrin epichlorhydrin polymer as chiral selectors was widely used to separate enantiomers of chiral compounds with the addition of cationic surfactants cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) for (-)-E and (+)- Ψ E of separation in Chinese herbs, and the recovery is 93%~105%.

Key words Capillary chromatography β -CD Ephedrine