

# 胶束电动毛细管色谱间接紫外光检测法分离胆汁酸

陈 冰<sup>\*</sup>, 杨春梅, 彭新勇, 张 健, 黄宇杰

(湛江师范学院化学科学与技术学院, 湛江 524048)

**摘 要:**利用间接紫外光检测法在 254 nm 进行胆汁酸胶束电动毛细管色谱分离的研究。在对氨基苯磺酸为背景电解质和十二烷基硫酸钠作胶束的体系中, 加入高浓度的尿素, 有效地改善了两类胆汁酸 5 组份的分离度, 在优化分离缓冲体系 10 mmol/L 对氨基苯磺酸 - 5 mmol/L 硼砂 - 30 mmol/L SDS - 7 mol/L 尿素 - 10 %乙醇(pH 7.5)中, 13 min 内获得基线分离, 分离效率为  $8.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ 。所建立的方法无需衍生化处理, 为胆汁酸的分离提供了新的通用的方法。

**关键词:**胶束电动毛细管色谱; 间接紫外光检测; 胆汁酸

中图分类号: O657.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2007)07-048-04

胆汁酸(BA)是中药动物胆汁中所含的主要活性成份, 属于一类疏水性较强而无光活性(254 nm)的甾体化合物, 为体内重要的表面活性剂<sup>[1]</sup>。其分析方法主要有薄层扫描法(TLC)<sup>[2]</sup>、气相色谱法(GC)<sup>[3]</sup>和高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4,5]</sup>等, 这些方法通常只用于单一胆汁酸的分离, 试剂消耗较大, 需较严格预处理。毛细管电泳(CE)是生物活性物质的有效分离工具<sup>[6~10]</sup>, 而间接紫外光检测则广泛地应用于非光活性物质的检测, 且无需衍生化处理, 使检测方法简便而快速, 并减少了样品受污染的可能<sup>[8,11]</sup>。基于胆汁酸的非光活性(254 nm)及其强疏水性的特点<sup>[1,4]</sup>, 本文利用对氨基苯磺酸(PABS)为背景电解质, 进行两类 5 组份胆汁酸胶束电动毛细管色谱(MECC)分离及其间接紫外光检测的研究, 包括 3 种游离胆汁酸和 2 种结合胆汁酸, 即: 胆酸(CA)、熊脱氧胆酸(UDOC)、猪脱氧胆酸(HDOC)和牛磺胆酸(TC)、牛磺熊脱氧胆酸(TUDOC)。在十二烷基硫酸钠(SDS)作胶束的体系中加入高浓度的尿素, 有效地改善其分离度, 在优化分离缓冲体系中, 13 min 内获得基线分离。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

1229 型高效毛细管电泳仪及 UV-254 紫外光

检测器(北京宾达英创科技有限公司), X-Y 记录仪(四川仪表厂), 未涂层熔硅毛细管(河北永年光纤厂, 分离内径 75  $\mu\text{m}$ , 总长 49.6 cm, 有效长度 37.5 cm); 分离电压: 15 kV;  $\Phi 25$  mm/孔径 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维素酯微孔滤膜和  $\Phi 25$  mm 过滤器(上海医药工业研究院亚东分离器材厂)。

### 1.2 试剂

标准对照品: CA(进口)、UDOC(中国药品生物制品检定所), HDOC(进口)、TC(Sigma)和 TUDOC(中国药品生物制品检定所)。

无水对氨基苯磺酸(PABS, 中国湖南湘中地质实验研究所)、硼砂、SDS、尿素均为分析纯。水为石英亚沸蒸馏水。

### 1.3 实验操作

采用弹簧助推正压冲洗方式, 每次进样前依次用 1 mol/L NaOH 溶液、水及分离缓冲体系各冲洗 1~2 min。分离 5~6 次后, 更换电极槽中分离缓冲体系。阳极端手动高差进样, 进样高度 10 cm, 进样时间 10 s。溶液进入毛细管之前, 均用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤<sup>[8,9]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SDS 浓度的影响

在分离缓冲体系中加入 SDS 能有效地改善上

\* 收稿日期: 2006-02-24; 修订日期: 2006-05-21

基金项目: 2003 年湛江师范学院重点自然科学研究([2004]41 号)和 2006 年湛江市科技攻关([2006] 76 号)项目资助

作者简介: 陈 冰(1964-), 女, 副教授

述 5 种胆汁酸的分离度。这是由于所分离的 5 种胆汁酸是甾体化合物, 其结构相似, 分离选择性较差; 且其均含有甾核, 具有较强的疏水性<sup>[1]</sup>, 能不同程度地分配于 SDS 胶束(假固定相)中, 并不同程度地减少了在水中的分配, 各组份的迁移时间发生改变, 从而改善了其分离选择性。同时, 分离缓冲体系中的硼砂是含硼(B)缺电子化合物, 而胆汁酸是含氧(O)供电子化合物, 二者易于形成配合物, 在 SDS 胶束中的分配增加程度不同, 从而也改善了分离选择性<sup>[9,11]</sup>。随着胶束浓度的增加, 其容量因子增加, 各种胆汁酸的迁移时间逐渐增长, 各分离峰的分离选择性进一步提高; 当 SDS 浓度为 30 mmol/L 时, 上述 5 种胆汁酸能获得基线分离, 并且各峰的分布较佳。但继续增加 SDS 浓度为 50 mmol/L 时, 第 2、3 和 4 峰重合, 各峰的分布欠佳。SDS 对胆汁酸分离度的影响结果如图 1 所示, 可见, SDS 能改善胆汁酸的分离选择性, 但其浓度要适当。

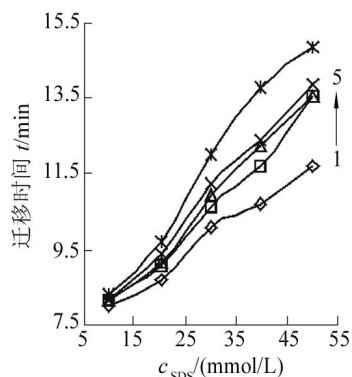


图 1 SDS 浓度的影响

Fig. 1 Effect of concentration of SDS

1 - UDOC; 2 - CA; 3 - TUDOC; 4 - HDOC; 5 - TC

## 2.2 尿素浓度的影响

如图 2 所示, 在 SDS 体系中加入一定量的尿素  $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$  能有效地改善疏水性甾体化合物胆汁酸的分离度。这可能是由于尿素分子中含有氨基 ( $-\text{NH}_2$ ) 和羰基 ( $>\text{C}=\text{O}$ ), 而胆汁酸分子中含有羟基 ( $-\text{OH}$ )、羧基 ( $-\text{COOH}$ ) 或酰胺基 ( $-\text{CONH}$ )、磺酸基 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ), 二者之间易于形成氢键, 从而改变胆汁酸在 SDS 胶束中的分配, 改善其分离选择性。同时, 尿素与熔硅毛细管壁硅羟基 ( $\text{SiOH}$ ) 也产生氢键作用, 改变毛细管壁表面净电荷或双电层局部粘度, 使毛细管壁表面的 Zeta 电势减小, 电渗

流也随着减小, 各组份的迁移时间延长, 其分离度也得到改善。当在分离缓冲体系中加入 5 mol/L 尿素时, 5 种胆汁酸仅呈四重峰, 其中, 第 3 峰和第 4 峰重合在一起; 增加尿素的浓度, 第 3 峰和第 4 峰的分离度提高; 当尿素浓度为 6.5 mol/L 时, 5 种胆汁酸能获得基线分离。这是因为, 随着尿素浓度的增加, 分离缓冲体系的离子强度降低, 扩散层厚度增大, 但溶液粘度也降低, 且尿素与熔硅毛细管壁硅羟基所产生的氢键作用增强, 这些效应共同作用的结果, 使电渗流减小, 各组份迁移时间随着延长, 其分离度得到进一步的提高。但尿素的浓度太大(大于 7 mol/L), 可增加各组份在水中的溶解度, 减小各组份在胶束相中的分配, 反而使各组份容量因子减小, 迁移时间随着减小, 其分离度降低, 且各组份的峰高降低, 检测灵敏度下降, 对胆汁酸的间接检测不利<sup>[12]</sup>。

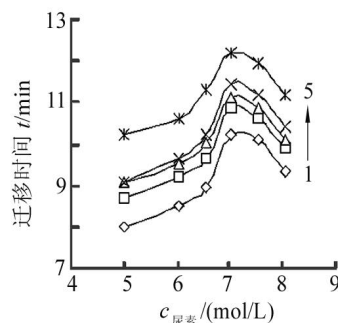


图 2 尿素浓度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of urea

1 - UDOC; 2 - CA; 3 - TUDOC; 4 - HDOC; 5 - TC

## 2.3 pH 的影响

如图 3 所示, 分离缓冲体系 pH 降低, 各组份迁移时间均延长, 分离度提高; 但第 2 峰的迁移时间延长较少, 故 pH 为 6.5 时, 其与第 3 峰趋于重合, 不能获得基线分离。相反, pH 增大, 各组份迁移时间均减小, 分离度下降, 对分离不利。这是由于分离缓冲体系 pH 降低, 毛细管壁表面的硅羟基电离受到抑制, 负电荷密度减小, Zeta 电势降低, 电渗流下降, 迁移时间延长; 相反, 分离缓冲体系 pH 升高, 毛细管表面硅羟基电离增大, 负电荷密度增大, Zeta 电势升高, 电渗流提高, 迁移时间缩短<sup>[6]</sup>。可见, 分离缓冲体系 pH 对各组份的迁移时间有一定的影响。

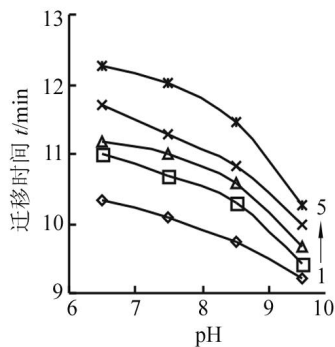


图 3 pH 的影响

Fig. 3 Effect of pH

1 - UDOC; 2 - CA; 3 - TUDOC; 4 - HDOC; 5 - TC

2.4 乙醇对胆汁酸分离的影响

在分离缓冲体系中加入体积分数 10 %乙醇可改善胆汁酸的分离选择性和迁移时间的重复性。

这是因为，加入适当的有机溶剂能减小流动相极性，改变毛细管壁表面负电荷密度，Zeta 电势降低，电渗流下降，各组份迁移时间延长，从而提高其分离度；其次，加入适当的有机溶剂，分配平衡向水相移动，疏水性较弱的组份相对于疏水性较强的组份的平衡移动要大些，在胶束相中的分配也减小得多些，故各组份容量因子发生相对改变，从而达到分离的目的；此外，疏水性的胆汁酸与胶束相互作用较强，利用简单胶束电动毛细管色谱无法进行分离，但若加入适当的有机溶剂，可减弱或阻止各组份之间较强的相互作用而实现分离<sup>[6,13]</sup>。

另外，SDS 是一种良好的表面活性剂，但应用于分离缓冲体系时，常常会产生泡沫，从而使组份在电泳过程中产生大量的焦耳热，降低迁移时间的重复性，使各组份区带增宽。乙醇是常用的

醇类消泡剂，其表面张力较低，易于吸附于泡沫表面(双分子层的上层)，使泡沫液面局部表面张力降低，发生铺展并逐步扩展，取代双分子膜上层的发泡剂分子，形成强度较低的膜；同时，在铺展过程中，会带走泡沫邻近表面的部分液体，使泡沫液膜变薄，破坏泡沫液膜的平衡，降低了泡沫的稳定性，从而使泡沫破坏。因此，加入适当的有机溶剂，能使 SDS 所起的泡沫消泡，减少各组份在电泳过程中产生的焦耳热，提高迁移时间的重复性，减少各组份区带展宽，提高其分离度<sup>[13]</sup>。

2.5 胆汁酸定量分析特征

在优化分离缓冲体系 10 mmol/L 对氨基苯磺酸 - 5 mmol/L 硼砂 - 30 mmol/L SDS - 7 mol/L 尿素 - 10 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (pH7.5) 中，进行上述两类胆汁酸 5 组份标准对照品混合液的 MECC 分离，13 min 内获得基线分离，UDOC、CA、TUDOC、HDOC 和 TC 的分离效率分别为 8.4 ×10<sup>4</sup>、1.1 ×10<sup>5</sup>、1.7 ×10<sup>5</sup>、1.1 ×10<sup>5</sup> 和 1.1 ×10<sup>5</sup>，所得分离谱图见图 4，定量分析数据处理所得定量分析特征参数列于表 1。

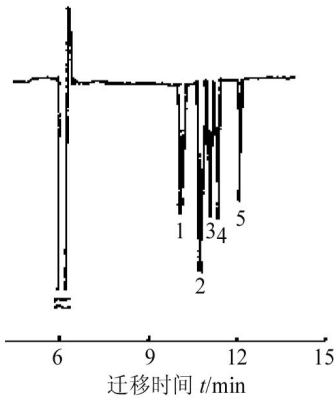


图 4 标准对照品混合液电泳图

Fig. 4 Electropherogram of a mixture of standards

1 - UDOC; 2 - CA; 3 - TUDOC; 4 - HDOC; 5 - TC

表 1 定量分析特征参数

Tab. 1 Characteristic parameter of calibration

| 对照品   | 回归方程                   | 相关系数   | 线性范围<br>$\rho/(\text{mg/L})$ | 检出限<br>$\rho/(\text{mg/L})$ ( $k=3$ ) | RSD/ % ( $n=5$ ) |     |
|-------|------------------------|--------|------------------------------|---------------------------------------|------------------|-----|
|       |                        |        |                              |                                       | $t_r$            | $h$ |
| UDOC  | $h=0.02138\rho+1.174$  | 0.9954 | 1000~25.00                   | 28.64                                 | 0.30             | 1.9 |
| CA    | $h=0.02749\rho+1.286$  | 0.9948 | 1000~25.00                   | 66.84                                 | 0.89             | 4.5 |
| TUDOC | $h=0.02511\rho-0.3139$ | 0.9994 | 666.7~50.00                  | 44.97                                 | 0.98             | 3.9 |
| HDOC  | $h=0.02503\rho+0.4014$ | 0.9996 | 666.7~25.00                  | 88.20                                 | 0.40             | 6.4 |
| TC    | $h=0.02023\rho+0.8902$ | 0.9958 | 666.7~25.00                  | 38.30                                 | 0.45             | 2.4 |

### 3 小结

本文应用 MECC 间接紫外光检测法进行了两类胆汁酸 5 组份的同时分离, 在优化分离缓冲体系中, 13 min 内获得基线分离。所建立的方法高效、简便而快速, 无需衍生化处理, 减少了样品受污染的可能, 为胆汁酸的分离分析提供了新的研究方法; 同时, 间接紫外光检测法的采用大大地扩大了紫外光检测范围, 使毛细管电泳技术更具通用性和应用前景。

### 参考文献

- [1] 成都中医学院. 中药鉴定学, 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 184
- [2] Maneerat S, Nitoda T, Kanzaki H *et al.* Appl Microbiol Biotechnology, 2005, 67(5): 679
- [3] Iida S, Ogawa S, Kakiyama G *et al.* J Chromatogr A, 2004, 1057: 171
- [4] You J M, Shi Y W, Ming Y F *et al.* Chromatographia, 2004, 60(9 - 10): 527
- [5] Ikegawa S, Okuyama H, Ohashi J *et al.* Anal Sci, 1999, 15(7): 625
- [6] 邓延倬, 何金兰. 高效毛细管电泳, 北京: 科学出版社, 1996. 2, 27, 100, 135
- [7] 朱丽芬, 洪筱坤. 药学学报, 2002, 37(3): 217
- [8] 陈冰, 李小戈, 何萍等. 色谱, 2004, 22(1): 74
- [9] 陈冰, 何金兰. 化学通报, 2001, (4): 247
- [10] Liu H T, Wang K T, Zhang H Y *et al.* Analyst, 2000, 125: 1083
- [11] Ackemans M T, Everaerts F M, Beckers J L. J Chromatogr, 1992, 606: 229
- [12] He J L, Li H P, Li X G. Ann Ist Super Sanit, 1996, 32(3): 375
- [13] 赵国玺. 表面活性剂物理化学, 北京: 北京大学出版社, 1984. 422

### Separation of bile acids by micellar electrokinetic capillary chromatography with indirect ultraviolet photometric detection

CHEN Bing<sup>\*</sup>, YANG Chun-mei, PENG Xin-yong, ZHANG Jian and HUANG Yu-jie (Chemistry Science and Technology School, Zhangjiang Normal College, Zhanjiang 524048), Fenxi Shiyanshi, 2007, 26(7): 48~51

**Abstract:** A method for the separation of five bile acid, which were three kinds of free bile acids and two kinds of conjugated bile acids, such as cholic acid (CA), ursodeoxycholic acid (UDOC), hyodeoxycholic acid (HDOC) and taurocholic acid (TC), tauroursodeoxycholic acid (TUDOC), by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) with indirect ultraviolet photometric detection at 254 nm without derivatization procedure has been studied in the paper. It was proved that the resolution could be effectively improved when urea was greatly added into the running buffer composed of sodium dodecyl sulphate as the micellar phase coupled with p-aminobenzene sulfonic acid as the background electrolyte. The separation of them could be completed in 13 min under the optimum running buffer as 10 mmol/L PABS-5 mmol/L borax-30 mmol/L SDS-7 mol/L urea-10 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (pH 7.5), and the separated efficiencies were  $8.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ . The developed method was high efficiency, simple, convenient and fast. It would provide a new and universal method for the separation of bile acids.

**Keywords:** Micellar electrokinetic capillary chromatography; Indirect ultraviolet photometric detection; Bile acids