

工作简报

基质固相分散-高效液相色谱法测定五味子中尼哥纳乐酸

冯伟博^{1,2}, 杨光宇^{1,2}, 雷 春², 胡秋芬¹, 戴 云^{1*}

(1. 云南民族大学 化学与生物技术学院, 昆明 650031; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要: 提出了基质固相分散-高效液相色谱法测定五味子中的尼哥纳乐酸的方法。将样品与硅胶以质量比 1 比 4 混合研磨后装入固相萃取柱, 用纯的二氯甲烷以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流量淋洗, 以除去共存干扰物。用二氯甲烷-丙酮(9+1)混合液将尼哥纳乐酸从固相萃取柱上洗脱, 吹氮浓缩后, 以 ZORBAX Stable Bound C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) 快速分离柱为固定相, 甲醇-水(82+18)为流动相, 用蒸发光散射检测器检测。峰面积与尼哥纳乐酸的质量浓度在 2.0~400.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系, 检出限(3S/N)为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用此法分析五味子样品, 所得结果的相对标准偏差($n=7$)小于 2.0%, 标准加入回收率在 96.8%~101.5% 之间。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 五味子; 尼哥纳乐酸

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2009)04-0451-03

HPLC Determination of Nigranoic Acid in *Fructus Schisandra* with Matrix Solid Phase Dispersion

FENG Wei bo^{1,2}, YANG Guang yu^{1,2}, LEI Chun², HU Qiufen¹, DAI Yun¹

(1. College of Chemistry and Bio techniques, Yunnan University of Nationalities, Kunming 650031, China;

2. Kunming Research Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: A method of determination of nigranoic acid in *fructus schisandra* by HPLC with matrix solid phase dispersion was proposed. The sample was homogenized with silica gel in the ratio of 1 to 4 by mass, and packed into SPE column. It was then eluted with pure dichloromethane at a flow rate of $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ to remove co-existing interfering substances. Nigranoic acid was eluted from the column with mixed solution of dichloromethane and acetone (9+1), and then dried by blowing with N_2 gas. The eluate was separated on ZORBAX Stable Bound C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) rapid column, using mixed solution of methanol and water (82+18) as mobile phase, and determined by evaporation light scattering detector. Linear relationship between the peak area and the mass concentration of nigranoic acid was obtained in the range of 2.0~400.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, with detection limit (3S/N) of 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The proposed method was used in the analysis of *fructus schisandras*, giving RSD's ($n=7$) less than 2.0%. The values of recovery found by standard addition method were in the range of 96.8% - 101.5%.

Keywords: HPLC; Evaporative light scattering detection; *Fructus schisandra*; Nigranoic acid

五味子科植物分为五味子属和南五味子属两个属。其中五味子为著名中药, 临床应用已有 200 多

年的历史。20 世纪 70 年代初, 我国临床研究发现五味子能明显降低肝炎患者血清谷丙转氨酶(SGPT)水平, 引起对五味子科药用植物研究的热潮, 并由此开发出治疗肝炎药物联苯双酯^[1,2]。1996 年孙汉董等^[3]从五味子属球蕊五味子中得到了有显著抑制 HIV-1 逆转录酶活性的三萜(尼哥纳乐酸), 对于五味子三萜的研究开始引起人们的关注。随着

收稿日期: 2008-02-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2003AA219142); 国家自然科学基金(No. 20402016)资助课题。

作者简介: 冯伟博(1981-), 男, 重庆市人, 硕士研究生, 从事植物化学和分析化学研究工作。

* 联系人



近年来发现五味子三萜酸及内酯具有抗爱滋病毒、抗癌和抑制胆固醇生物合成等作用, 进一步拓展了本科植物活性成分研究的领域^[4-5]。

尼哥纳乐酸作为五味子中存在最广泛的三萜类物质, 其定量分析在国内外均还未见报道过。基质固相分散是一种新样品处理技术, 其基本操作是将样品(固态或液态)直接与固相萃取材料一起混合研磨, 使样品均匀分散于固定相颗粒的表面, 形成一个独特的色谱固定相装柱, 然后依靠所选定的溶剂洗脱样品, 它浓缩了传统样品均化, 组织细胞裂解, 提取, 过滤, 净化等过程, 使样品的预处理变得简便, 同时也避免了目标物的损失^[6-8]。本工作建立了基质固相分散 高效液相色谱测定五味子中的尼哥纳乐酸的方法, 方法用于几种五味子实际样品中尼哥纳乐酸的测定, 结果表明: 方法稳定性好, 灵敏度高, 适宜于五味子中三萜类化合物的测定。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 Alliance 高效液相色谱系统, 包括四元梯度泵, Empower 色谱工作站, ELSD 2000 蒸发光散射检测器。

尼哥纳乐酸对照品(本课题组从五味子属植物中分离到, 纯度 $\geq 99\%$)。

尼哥纳乐酸标准储备液: 用甲醇定容至质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用前用甲醇稀释成所需浓度的标准工作液。

试剂均为色谱纯, 试验用水为高纯水。

1.2 色谱条件

ZORBAX Stable Bound C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 10 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-水(82+18), 流量为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 25°C , 进样量 5 μL , 蒸发光散射管检测器的漂移管温度 120°C , 载气为氮气, 流量 $2.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 样品处理

五味子样品经粉碎, 过 150 μm 筛, 称取样品 0.1 g 置于 38 μm 孔径的硅胶 0.4 g 的玻璃研钵中, 用玻璃杵研磨 5 min, 使样品与填料均匀混合; 装入固相萃取小柱(8 mm $\times$ 20 mm)中, 装好后以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速用 10 mL 的二氯甲烷洗涤, 然后再用二氯甲烷-丙酮(9+1)混合液 10 mL 洗脱尼哥纳乐酸。洗脱液用氮气吹干, 然后用甲醇溶液 5.0 mL 溶解, 准确调整体积为 5.0 mL, 经 0.45 μm 针头过

滤器过滤, 进样 5.0 μL , 色谱分离测定。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理

在基质固相分散中, 固相分散剂同时起着支持剂、吸附剂和净化剂的作用, 它的选择非常重要。硅胶属于正相材料, 对极性大的物质有较强的吸附, 而极性较小的物质吸附较弱, 研磨时样品中的各种组分根据极性的不同吸附在硅胶上。根据相似相容原理, 在提取五味子中的尼哥纳乐酸时, 五味子中还含有其它成分, 如木脂素、色素、脂肪、多酚、蛋白质、有机酸等干扰成分。当五味子样品和硅胶研磨后, 木脂素、色素、脂肪、多酚、蛋白质、有机酸等干扰成分也被吸附于硅胶。用二氯甲烷洗涤时, 由于尼哥纳乐酸极性较大, 未被洗下, 而极性比尼哥纳乐酸小的干扰成分被洗下, 后改用二氯甲烷-丙酮(9+1)混合液洗脱时, 尼哥纳乐酸被洗下, 而极性比尼哥纳乐酸大的成分与硅胶结合更强, 大部分不能被洗下, 因此硅胶具有良好提取、净化效果。试验选择硅胶为分散剂, 二氯甲烷-丙酮(9+1)混合液为洗脱剂, 用量 10 mL, 以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流量进行洗脱。

2.2 色谱分离条件的选择

2.2.1 色谱流动相

试验选用水-甲醇流动相体系, 考察了不同比例的水和甲醇为流动相对尼哥纳乐酸进行分离。综合考虑分离效果、分析时间等因素, 选择甲醇与水(以体积比 82 比 18)的混合液作为流动相。

2.2.2 色谱柱规格

为了显著缩短分离时间, 研究了用 ZORBAX Stable Bound C_{18} 快速分离柱为固定相分离样品中尼哥纳乐酸, 该类型的色谱柱能在不降低柱效的前提下显著缩短分离时间。试验了 3 种规格的色谱柱, 样品中的尼哥纳乐酸与共存成分均能完全分离, 用(4.6 mm $\times$ 10 mm, 1.8 μm)的分离柱比其他 2 种规格的色谱柱分离时间短, 只需 1.0 min, 试验选用 ZORBAX Stable Bound C_{18} (4.6 mm $\times$ 10 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离。

2.3 检测器的选择及工作参数

蒸发光散射检测器是通过柱洗脱液进行喷雾, 流动相溶剂蒸发, 留下不挥发成分用光照射, 检测散射光的检测器。可用于分析任何挥发性低于流动相的化合物。试验中尼哥纳乐酸没有明显紫外吸收, 也没有明显的荧光, 试验选择用蒸发光散射检测器

检测。

漂移管温度和载气流量是蒸发光散射检测器的重要参数。漂移管温度影响检测器的响应, 温度升高, 流动相蒸发趋于完全, 信噪比上升, 但温度过高, 可能导致组分部分汽化, 信号响应值变小。雾化载气流量影响雾化器中液滴的形成, 从而影响检测器的响应。信噪比随流量的增加而升高。试验选择漂移管温度为 120 ℃, 载气为氮气, 流量 2.0 L · min⁻¹, 可达到最小的噪声信号, 色谱图基线平稳。

2.4 线性范围与检出限

在色谱条件下将 2.0, 4.0, 16, 80, 400 mg · L⁻¹ 尼哥纳乐酸系列标准溶液依次进样 5 μL。将测得的峰面积 A 与对应的尼哥纳乐酸的质量浓度 ρ (mg · L⁻¹) 作线性回归, 线性范围在 2.0 ~ 400.0 mg · L⁻¹ 之间, 线性回归方程 $A = 6.25 \times 10^5 \rho + 368$, 相关系数为 0.999 8。再取最小浓度的标准溶液逐级稀释后, 各进样 5 μL, 按 $3S/N$ 计算得其检出限为 20 μg · L⁻¹。

2.5 样品分析

按试验方法对五味子样品平行测定 7 次计算标准偏差, 同时做回收试验, 结果见表 1。尼哥纳乐酸标样及五味子样品的色谱图见图 1。

表 1 样品分析结果 ($n=7$)

Tab. 1 Analyt. results of samples

样品	尼哥纳乐酸 测得量 $w / \%$	加入量 m / mg	回收量 m / mg	回收率 $/ \%$	RSD $/ \%$
鹤庆五味子(叶)	0.248	0.1	0.097 2	97.2	1.8
鹤庆五味子(皮)	0.623	0.1	0.101 5	101.5	1.9
鹤庆五味子(果实)	0.358	0.1	0.098 6	98.6	1.6
滇藏五味子(茎)	0.264	0.1	0.096 8	96.8	2.0

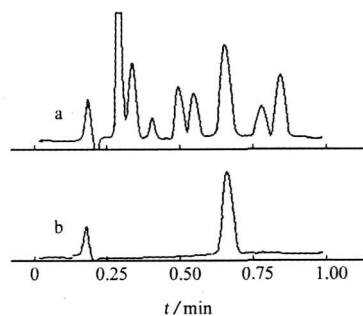


图 1 五味子样品(a)与标样(b)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard (a) and sample (b) of *fructus schisandra*

参考文献:

- [1] 陈业高, 李国宝, 张燕. 云南产五味子科药用植物化学成分研究进展[J]. 云南化工, 2003, 30(3): 53-57.
- [2] 李晓光, 高勤, 翁文, 等. 五味子有效部位及其药理作用研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(2): 156-159.
- [3] SUN H D, QIU S X, LIN L Z. Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase[J]. J Nat Prod, 1996, 59(2): 525-528.
- [4] 陈业高, 秦国伟, 谢毓元. 五味子科药用植物中的三萜酸和内酯及其波谱特征[J]. 化学研究与应用, 2001, 13(4): 363-367.
- [5] 周英, 杨峻山, 王立为, 等. 五味子科植物三萜成分[J]. 中国药理学杂志, 2003, 36(2): 81-83.
- [6] BARKER S A. Matrix solid phase dispersion[J]. J Chromatogr A, 2000, 885(1): 115-127.
- [7] 杨容, 傅承光. 基质固相分散 高效液相色谱法测定痕量异丙威和溴氰菊酯[J]. 分析测试学报, 1994, 13(5): 72-75.
- [8] 胡小钟, 储小刚, 余建新. 基质固相分散和气相色谱-质谱法测定浓缩苹果汁中 22 种有机氯农药和 15 种拟除虫菊酯农药的残留量[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 38-42.

《理化检验 化学分册》杂志欢迎广大作者网上远程投稿

为了适应当今期刊网络化、数字化的发展趋势, 本刊经过长期的筹划与准备, 初步建立了远程在线投稿、审稿系统。该系统的建立, 可以方便作者进行远程在线投稿、查询稿件的处理进度、与编辑部进行实时沟通; 审稿专家可以进行在线审稿。从而达到保证文章报道时效性、缩短稿件处理周期和节约成本的目的。

欢迎广大作者登录“材料与测试网站”(http://www.

mat-test.com) 查询该系统的使用方法, 进行网上投稿。您在使用过程中如发现该系统有不完善的地方, 希望您悉心指教, 并多提宝贵意见。本刊的电子信箱为 hx@mat-test.com。在此感谢大家多年来对本刊的大力支持, 我们定会以更好的服务回报广大作者。

《理化检验 化学分册》编辑部