

多孔石墨化碳柱分析强极性化合物三七素

付春梅, 刘三康, 李章万

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要 :建立了强极性的非蛋白氨基酸三七素在石墨化碳色谱柱上的反相高效液相色谱分析方法。以 Thermo Hypercarb 石墨化碳柱(100 mm × 4.6 mm 5 μm)为分离柱,以 0.05 mol/L NaH₂PO₄(H₃PO₄ 调 pH 2.2)为流动相,流速为 1 mL/min,于柱温 80 ℃、检测波长 220 nm 条件下分离检测。对三七素在石墨化碳柱上的保留及其影响因素的研究结果表明:三七素在石墨化碳柱上的保留机理仍主要是疏水相互作用。将建立的色谱条件用于三七药材中三七素的测定,进样量在 0.22 ~ 4.4 μg 范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均加标回收率为 99.5%($n=9$),相对标准偏差不高于 2.2%,分析速度快(三七素的保留时间不到 3 min)。

关键词 :多孔石墨化碳柱;三七素;保留机理;三七

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2007)06-0834-04 栏目类别:研究论文

Determination of Dencichine in Sanchi Using Liquid Chromatography on Porous Graphitic Carbon Column

FU Chunmei, LIU Sankang, LI Zhangwan

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract : A simple reversed-phase high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of dencichine in sanchi on a porous graphitic carbon (PGC) column. The effects of different buffers, buffer concentrations, pH values of mobile phase and mobile phase compositions as well as column temperatures on the retention of dencichine were studied. The retention mechanism of dencichine on a porous graphitic carbon column seems to be mainly hydrophobic interaction according to the study. The chromatographic method developed was used to determine dencichine in sanchi. The calibration curve was linear in the range of about 0.22 ~ 4.4 μg ($r=0.9999$) and the recovery for the extract was 99.5% with the relative standard deviation of 2.2% ($n=9$).

Key words : porous graphitic carbon column; dencichine; retention mechanism; sanchi

小粒径的多孔石墨化碳(porous graphitic carbon, PGC)填料是由 Knox 和其合作者发明制备的^[1],其由六方形排列、共价结合的碳原子层构成,层与层之间由范德华力联系,表面结构均匀,色谱活性点位较少,稳定性好,可耐受的 pH 范围为 1 ~ 14。与传统的反相色谱填料相比,石墨化碳表面具有奇特的极性增强效应以及在某些条件下较强的疏水性^[2],因此被用于极性很强的物质如胍基化合物^[3]和糖^[4]的分析。

三七素(dencichine, Den)是一种特殊的非蛋白氨基酸,其结构为 β-草酰基-L-α,β-二氨基丙酸,是五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen(Sanchi)的止血活性成分^[5]。从人参和西洋参中也能分离得到三七素^[6,7]。由于三七素的极

性很强,在传统的 ODS 柱上几乎不保留,因此其测定方法主要为衍生化高效液相色谱法(HPLC)或气相色谱法^[8-14],其操作繁琐耗时;也有用氨基酸自动分析仪^[15]或毛细管电泳^[16,17]分析,但因仪器普及率不高,应用不广泛。还有采用离子对反相液相色谱法的,但系统平衡时间长,对色谱柱损伤大^[18]。

本文用 PGC 柱分析三七药材中的强极性化合物三七素,并对三七素在 PGC 填料上的保留机理做了初步探讨,希望为强极性化合物的分析及 PGC 柱的应用提供一个参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪,SPD-

10AVP 紫外检测器 ,CTO-10A 柱温箱 ;SEPU3000 色谱工作站(杭州普惠科学仪器有限公司)。三七素原料和三七素对照品(含量大于 99.5%)由本院药物化学教研室提供 ;三七药材(产地为云南文山)经本院生药教研室鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根 ;实验用水为超纯水 ,甲醇为色谱纯 ,其他试剂均为分析纯。

1.2 样品制备

取三七素对照品约 5 mg ,精密称定 ,用流动相溶解制成 0.1 g/L 溶液作为对照品溶液。取粉碎的三七根粉 1 g ,精密称定 ,置于 50 mL 烧瓶中 ,用硼砂缓冲液(pH 9.18)于水浴中回流提取 2 次 ,第一次提取 1 h ,第二次提取 0.5 h ,残渣用硼砂缓冲液洗涤。合并提取液与洗涤液 ,用硼砂缓冲液定容至 50.00 mL ,混匀 ,过滤 ,取续滤液作为供试品溶液。

1.3 色谱条件

Thermo Hypcarb 色谱柱(100 mm × 4.6 mm 5 μm) ,流动相 0.05 mol/L NaH₂PO₄(H₃PO₄ 调 pH 2.2) ,流速 1 mL/min ,柱温 80 ℃ ,检测波长 220 nm ,进样 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 三七素在 PGC 柱上的保留行为

采用单因素法对三七素在 PGC 柱上的保留行为进行了考察。保留因子 $k=(t_r-t_0)/t_0$, t_r 是溶质的保留时间 ,死时间 t_0 为纯水的洗脱时间。所有数据均为三次测定的平均值。

2.1.1 缓冲盐种类及其浓度对三七素保留的影响

当以纯水作流动相时 ,三七素不被洗脱。NaH₂PO₄ 或 NH₄Ac 作流动相对三七素的保留不同。以 NH₄Ac 溶液作流动相 ,三七素的保留很弱 ,柱效较低 ;而以 NaH₂PO₄ 溶液作流动相 ,保留因子、柱效均较 NH₄Ac 溶液高。三七素在 KH₂PO₄ 溶液中的保留行为与在 NaH₂PO₄ 中一致。考察不同浓度的 NaH₂PO₄ 对三七素保留的影响 ,结果表明盐浓度降低 ,保留增加 ,柱效也稍微增加(见表 1) ,其机理有待进一步研究。

表 1 NaH ₂ PO ₄ 浓度对三七素保留因子(k)和柱效的影响		
Table 1 Effect of concentration of NaH ₂ PO ₄ on the retention factor(k) and performance of dencichine		
α (NaH ₂ PO ₄)(mol/L)	k	N/m^{-1}
0.025	3.28	39840
0.05	1.63	43312
0.10	1.60	47291
0.20	1.27	46358

2.1.2 流动相的 pH 值对三七素保留的影响

用不同 pH 值(用磷酸或 2 mol/L NaOH 调节)的 0.05 mol/L NaH₂PO₄ 溶液作为流动相 ,考察了流动相 pH 值对三七素在石墨化碳柱上保留的影响 ,结果见图 1。

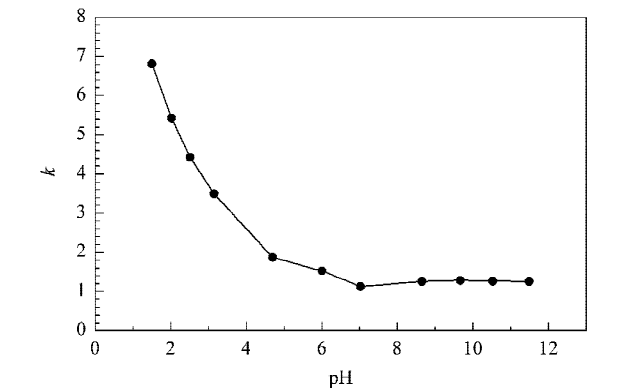


图 1 流动相 pH 值对三七素保留的影响
Fig. 1 Effect of mobile phase pH on the retention of dencichine

在 pH 1.5 ~ 7 范围 ,ln k 与 pH 的线性关系较好($\ln k = -0.3239 \text{ pH} + 2.3198$, $r = 0.9917$)。由于三七素有两个羧基 ,其 $pK_{a1} = 2.7$, $pK_{a2} = 8.4$,因此随着 pH 值的降低 ,以分子形式存在的三七素增加 ,在 PGC 柱上的保留增强 ,说明在 1.5 ~ 7.0 的 pH 值范围 ,三七素在石墨化碳柱上的保留机制仍是疏水作用。当 $\text{pH} > pK_{a2}$ 时 ,三七素的两个羧基均以离子形式存在 ,因此保留值几乎不变。

2.1.3 流动相中甲醇的比例对三七素保留的影响

用不同比例的甲醇-0.05 mol/L NaH₂PO₄(磷酸调节 pH 2.2)作为流动相 ,考察了甲醇比例对三七素保留的影响 ,实验结果表明 ln k 与甲醇比例的线性关系较好。流动相中甲醇比例增加 ,三七素的保留值降低(见图 2)。

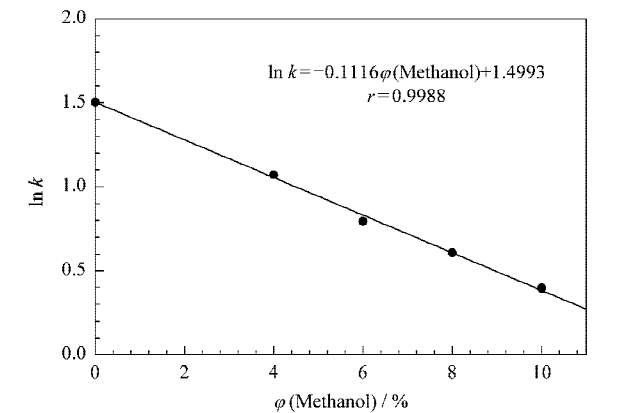


图 2 流动相中甲醇比例对三七素保留的影响
Fig. 2 Effect of methanol content in mobile phase on the retention of dencichine

2.1.4 温度对三七素保留的影响

以 0.05 mol/L NaH_2PO_4 作流动相,考察了柱温对三七素保留的影响,结果见图 3。随着柱温升高,三七素的保留降低, $\ln k$ 与绝对温度的倒数 $1/T$ 呈良好的线性关系($\ln k = 2\,041.5 \times 1/T - 6.332\,9$, $r = 0.997\,6$)。线性的 van 't Hoff 曲线说明:柱温从 (308 K 升至 353 K) (35 °C 升至 80 °C),保留过程的热力学未发生变化,即焓变和熵变未变化,负的焓变和熵变提示三七素在流动相和固定相中的传质是焓变引起的。PGC 的柱效随着柱温升高而增加是由于温度升高引起传质速度加快的结果。

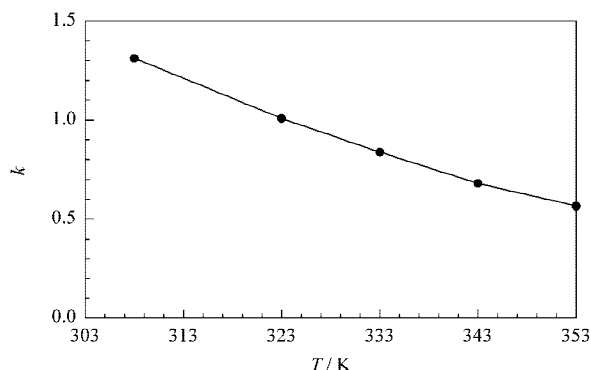


图 3 柱温对三七素保留的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the retention of dencichene

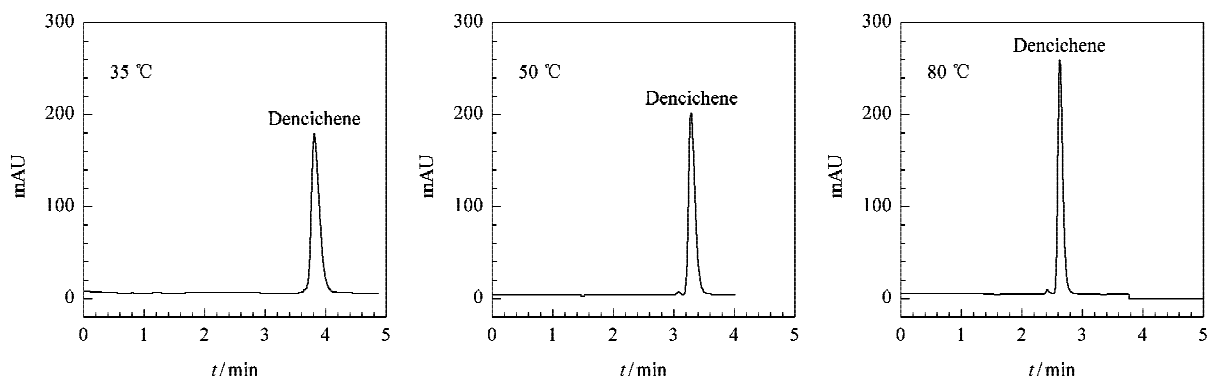


图 4 三七素原料在不同柱温下的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of Dencichen raw material at different temperatures

Mobile phase : 50 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2) , 1 mL/min.

2.2.4 对照品溶液的稳定性

试验表明对照品溶液在冰箱中贮存一周,浓度基本不变。

2.3 样品测定

对三七素原料和不同规格的三七(产地为云南)进行测定,散装三七素原料中三七素含量为 99.0% ,20 头三七中三七素含量为 0.64% ,30 头三七中三七素含量为 0.59% ,40 头三七中三七素含量为 0.56% ,60 头三七中三七素含量为 0.57% ,80 头三七中三七素含量为 0.56%。色谱图见图 5。

图 4 是三七素原料在不同温度下的色谱图。从图 4 可知,35 °C 时三七素原料只有一个单峰;当柱温升至 50 °C,三七素原料中分离出一个杂质峰,分离度 R_s 为 1.2;当柱温升至 80 °C,三七素与杂质峰获得了基线分离, R_s 为 1.7。此结果说明升高温度是改善液相色谱分离和选择性的有效工具。

2.2 含量测定方法学的验证

2.2.1 线性与范围

对不同质量浓度(0.011 ~ 0.22 g/L)的对照品溶液进行测定。以三七素峰面积 y 对进样量 x (μg) 进行直线回归,回归方程为 $y = 805\,379\,x - 11\,888$, $r = 0.999\,9$,即进样量在 0.22 ~ 4.4 μg 范围内线性关系良好。

2.2.2 方法的精密度及日间精密度

同一批三七样品平行测定 5 份,其含量的相对标准偏差(RSD)为 0.96%。在连续 5 天内测定同一批供试品含量,其 RSD 为 1.3%。

2.2.3 加样回收率

精密称取三七药材粉末(含三七素 6.35 mg/g)适量(2.42、2.60、5.20 g),加入三七素对照品适量(12.5、7.45、5.14 mg),制成高、中、低 3 种浓度的溶液各 3 份。测定结果表明平均加样回收率为 99.5% ,RSD 为 2.2%。

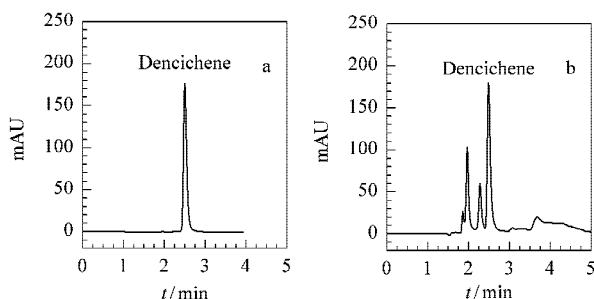


图 5 (a)三七素对照品和(b)三七药材样品的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of (a) dencichene control and (b) *P. notoginseng* sample

3 结 论

多孔石墨化碳填料由于其独特的保留行为 ,对强极性物质三七素的分析是合适的选择。本文建立的三七中三七素的分析方法与 ODS 柱上离子对反相液相色谱法相比 ,系统平衡时间大大缩短 ,简便快速。通过对流动相有机溶剂比例和 pH 等对保留的影响的研究说明多孔石墨化碳填料对三七素的保留机理仍主要是疏水作用。

参考文献：

[1] Gilbert M T , Knox J H , Kaur B. Chromatographia , 1982 , 16 : 138
[2] Toshiniko H. J Chromatogr A , 2003 , 989 : 183
[3] Inamoto Y , Inamoto S , Hanai T. J Chromatogr B , 1998 , 707 : 111
[4] Lu B , Stefansson M , Westerlund D. J Chromatogr A , 1995 , 697 : 317
[5] Kosuge T , Yokota M , Ochiai A. Yakugku Zasshi , 1981 , 101 (7) : 629
[6] Li X G , Zheng Y N , Weil C Y. Journal of Jilin Agricultural University (李向高 , 郑毅男 , 魏春雁. 吉林农业大学学报) , 1989 , 11(2) : 32
[7] Zheng Y N , Li X G , Shuai F. Journal of Jilin Agricultural

University (郑毅男 , 李向高 , 帅菲. 吉林农业大学学报) , 1989 , 11(1) : 24
[8] Khan J K , Kuo Y H , Kebede N , Lambein F J. J Chromatogr A , 1994 , 687 : 113
[9] Khan J K , Kebede N , Kuo Y H , Lambein F , Bruyn A De. A- nal Biochem , 1993 , 208 : 237
[10] Geda A , Briggs C J , Venkataram S. J Chromatogr A , 1993 , 635 : 338
[11] Wang F , Chen X , Chen Q , Qin X C , Li Z X. J Chromatogr A , 2000 , 883 : 113
[12] X. Chen , F. Wang , Q. Chen , X. C. Qin , Z. X. Li , J Agric Food Chem , 2000 , 48 : 3 383
[13] Xie G X , Qiu Y P , Qiu M F , Gao X F , Liu Y M , Jia W. J Pharm Biomed Anal , 2007 , 43(3) : 920
[14] Zhang Y , Chen XY , Li X Y , Zhong D F , Anal Chim Acta , 2006 , 566 : 200
[15] Jin D Z , Zhang C , Wang Z H. Chinese Traditional Patent Medicine (金德庄 , 张聪 , 王智华. 中成药) , 1998 , 20(11) : 48
[16] Zhao L , Chen X , Hu Z , Li Q , Chen Q , Li Z , J Chromatogr A , 1999 , 857 : 295
[17] Arentoft A M K , Greirson B N. J Agric Food Chem , 1995 , 43 : 942
[18] Fu C M , Zhu J , Liu S K , Li Z W. Chinese Traditional and Herbal Drugs (付春梅 , 朱静 , 刘三康 , 李章万. 中草药) , 2006 , 37(1) : 68

书 讯

《气相色谱仪器系统》

由中国色谱学会副理事长武杰高级工程师等编著的《气相色谱仪器系统》已于 2007 年 1 月由化学工业出版社出版。

本书是“ 分析仪器使用与维护丛书 ”之一。全书分 10 章介绍了气相色谱仪的基础原理和基本组成 ,从实用角度对仪器用气体与气源、进样系统、检测器、电路系统、色谱柱、色谱工作站、仪器日常维护和保养、整机故障现象分析与排除等内容进行了详尽的介绍 ,仅有关气相色谱仪日常维护与保养和常见故障分析与排除方法等有关信息就有几百条之多。

本书除提供给一线气相色谱仪操作者一本实用参考书外 ,也可供从事气相色谱分析、研究与开发及仪器维修人员参考 ,同时可作为高等院校与分析化学相关专业师生的参考书。

“ 分析仪器使用与维护丛书 ”由中国仪器仪表学会分析仪器学会组织编写 ,丛书已出版的其他分册还有《分析仪器与仪器分析概论》、《傅里叶变换红外光谱仪》、《高效液相色谱仪器系统》、《样品前处理仪器与装置》、《原子吸收光谱仪》、《紫外可见光光度计》、《物性分析仪器》等。

《气相色谱仪器系统》采用 B5 开本 ,376 页 ,49 万字 ,书号 978-7-5025-9689-7 ,定价 48.00 元。

详情可登录化学工业出版社网站查询(www. cip. com. cn)。