

文章编号: 1000-5471(2007)03-0048-04

# HPLC-CL 测定吊石苣苔中石吊兰素的含量<sup>①</sup>

吴永平<sup>1</sup>, 高智席<sup>1</sup>, 周光明<sup>2</sup>

1. 遵义师范学院 化学系, 贵州 遵义 563002; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

**摘要:** 在碱性介质中, 铜氨络离子的催化作用下, 石吊兰素对乙腈-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 化学发光体系有强烈的增敏作用. 在 Hypersil ODS 色谱柱上, 以乙腈-N, N-二甲基甲酰胺-0.01 mol/L 草酸(体积比 27:6:67)为流动相的条件下, 实现了对石吊兰素的分离测定, 建立了测定石吊兰素的方法. 发光强度与石吊兰素的浓度在 0.02~50 mg/mL 范围内呈线性关系. 检出限(3 $\sigma$ )为 0.01  $\mu$ g/mL. 5 次平行测定的相对标准偏差分别为 1.24%~1.56%. 应用于吊石苣苔中石吊兰素的测定, 结果满意.

**关键词:** 高效液相色谱; 化学发光; 吊石苣苔; 石吊兰素

**中图分类号:** 0652.63

**文献标识码:** A

吊石苣苔(别名有石豇豆、岩泽兰、石吊兰、岩豇豆、条枝草等)为苦苣苔科植物吊石苣苔 *Lysionotus Pauciflorus* Maxim. 的干燥全草, 常绿小灌木<sup>[1,2]</sup>, 附生在岩石壁或树干上. 本品在贵州系苗族习用药材<sup>[3,4]</sup>, 具有祛风除湿, 化痰止咳, 祛瘀通经的功能. 主要用于治疗结核病、支气管炎, 疗效显著, 且无毒无副作用. 石吊兰素(Nevadensin, 别名为岩豆素)为吊石苣苔的主要成分之一<sup>[2,5,6]</sup>, 现代药理研究认为, 石吊兰素具有良好的止咳、抗炎等功效<sup>[7]</sup>, 石吊兰素对多种动物产生降压作用<sup>[8]</sup>. 近年来, 国内外对野生药用植物吊石苣苔的化学成分的研究的报道很少<sup>[2,5,6]</sup>, 还没有石吊兰素的化学发光的报道. 本实验用 HPLC-CL 测定野生药用植物吊石苣苔中石吊兰素的含量, 对用于分析的样品制备方法进行了探讨. 结果表明: 该方法简单、快速、灵敏, 并成功应用于贵州野生药用植物吊石苣苔中石吊兰素的含量测定, 为贵州野生药用植物吊石苣苔的开发利用提供科学依据.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

HPLC-CL 化学发光分析系统流路如图 1 所示; LC-6A 液相色谱仪(Shimadzu, 日本), kBPCL 超微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所). KQ-50 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂).

石吊兰素(Nevadensin, 别名为岩豆素)标准溶液: 准确称取一定量的石吊兰素标准品(99%, DELTA 天然有机化合物信息中心)溶于水并用流动相定容到 50 mL 棕色容量瓶中, 摇匀, 作为标准溶液, 在 4 °C 冰箱中保存, 使用时用流动相稀释至所需浓度. 铜氨络离子溶液: 0.1 mol/L CuSO<sub>4</sub>-0.1 mol/L CTMAB-0.5 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 体积比为 4:5:20; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(0.03 mol/L); 其它试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水.

① 收稿日期: 2006-09-19

作者简介: 吴永平(1947-), 男, 贵州遵义人, 副教授, 主要从事天然产物药用成分分析的研究.

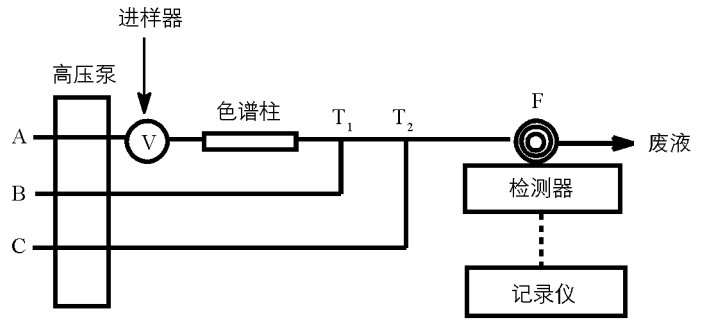
通讯作者: 周光明, 教授.

## 1.2 色谱条件

色谱柱: 填料 Hypersil ODS2  $5\ \mu\text{m}$ , 尺寸  $4.6\ \text{mm} \times 300\ \text{mm}$  (大连依利特科学仪器有限公司). 流动相为乙腈-N,N-二甲基甲酰胺-0.01 mol/L 草酸(体积比 27:6:67), 流速为  $1\ \text{mL}/\text{min}$ . 柱温为室温, 进样量为  $20\ \mu\text{L}$ . 在此色谱条件下, 石吊兰素的保留时间为  $411.5\ \text{s}$ ; 石吊兰素的标样色谱图和样品色谱图如图 2 所示.

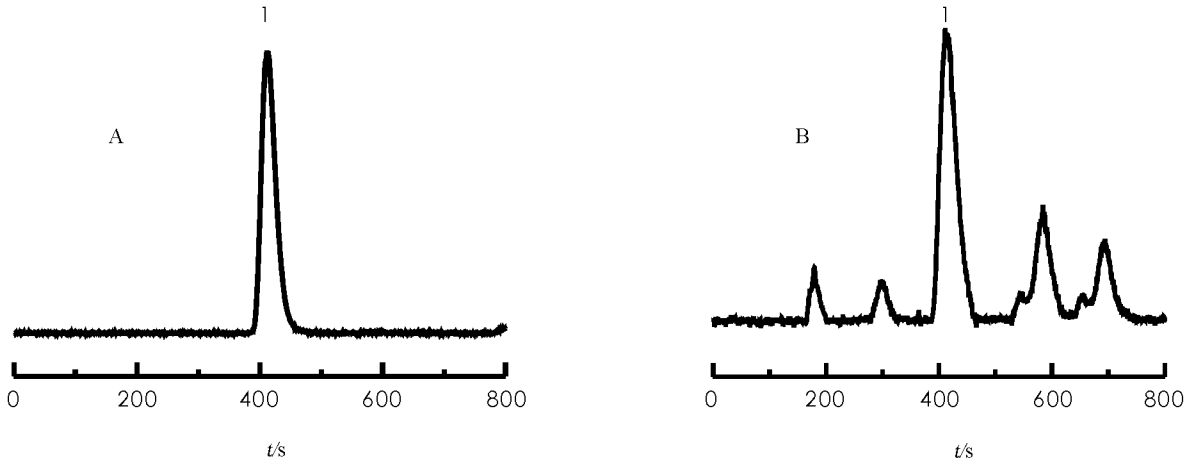
## 1.3 实验方法

用高效液相色谱高压泵代替蠕动泵或恒流泵, 按图 1 所示流路用高压泵 A 输送流动相, 分别用 B 泵和 C 泵输送  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液和铜氨络离子溶液, 将石吊兰素标准溶液或样品溶液由进样阀 V 注入到流路中去, 经色谱柱分离后与发光试剂混合产生强烈的化学发光, 记录发光信号以峰面积定量.



A. 流动相; B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液; C. 铜氨络离子溶液

图 1 HPLC-CL 流路图



A. 标样; B. 样品

图 2 石吊兰素色谱分离图

## 1.4 样品的制备方法

### 1.4.1 提取方法

以 50% 的乙醇为提取溶剂, 分别采用超声提取、常温浸泡提取、索氏提取 3 种方法对吊石苣苔的叶、茎进行分别提取, 对石吊兰素提取率进行比较, 结果表明: 三种方法提取率无显著性差异, 但经优化, 先浸泡再超声辅助提取, 石吊兰素提取率大大提高, 操作简单, 提取时间短, 因而采用先浸泡再超声辅助提取法作为样品的制备方法<sup>[9]</sup>.

### 1.4.2 分析样品的制备

取药材干燥粉碎, 称取  $1.000\ \text{g}$  磨碎的石吊兰叶(或茎)置于具塞三角烧瓶中, 加入  $15\ \text{mL}$  50% 乙醇, 室温放置  $10\ \text{h}$ , 超声提取  $20\ \text{min}$ , 过滤. 再分两次加入  $2\ \text{mL}$  50% 的乙醇超声提取  $5\ \text{min}$  并过滤. 合并滤液, 定容至  $20\ \text{mL}$ , 离心 ( $2\ 000\ \text{r}/\text{min}$ ), 取上清液, 用于 HPLC-CL 分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 流路参数的选择

在各流路试液浓度不变的情况下, 实验了流路参数对发光强度的影响, 结果表明当流动相流速为  $1\ \text{mL}/\text{min}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液和铜氨络离子溶液流速为  $2\ \text{mL}/\text{min}$ , 管道内径为  $0.8\ \text{mm}$ , 混合管长度为  $20\ \text{cm}$  时具有最大的信噪比.

## 2.2 实验条件的选择

在其它实验条件固定不变时,流动相及其流速进行了优化选择.乙腈是一种较好的分离石吊兰素的流动相组分,石吊兰素对乙腈-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>化学发光体系有增敏作用,但反应很慢.铜氨络离子可催化过氧化氢与石吊兰素的化学发光反应<sup>[10-12]</sup>,于是,我们试验了以乙腈-N,N-二甲基甲酰胺-0.01 mol/L草酸作流动相、铜氨络离子催化、过氧化氢氧化了的石吊兰素的化学发光测定方法,试验表明,当乙腈-N,N-二甲基甲酰胺-0.01 mol/L草酸的体积比为 27:6:67,铜氨络离子溶液组成为 0.1 mol/L CuSO<sub>4</sub>-0.1 mol/L CTMAB-0.5 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,体积比为 4:5:20, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液浓度为 0.03 mol/L时,具有最大的信噪比.

## 2.3 标准工作曲线和检出限

在所选的实验条件下,得到线性回归方程为:  $Y=5139X-84.199$ ,  $r=0.9994$  ( $n=6$ ),说明石吊兰素浓度在 0.02~50 μg/mL 范围内与化学发光强度呈良好的线性关系.当信噪比为 3 时,石吊兰素最低检测限为 0.01 μg/mL.

## 2.4 样品分析

取同一供试样品吊石苣苔叶、茎粉末各 3 份,按所确定的样品制备方法和色谱条件进行石吊兰素的含量分析,石吊兰素提取率为 0.9156%(叶)、0.3214%(茎),相对标准偏差为 1.25%(叶)、1.58%(茎),方法重现性好,所得实验结果可靠.

## 2.5 回收率测定

精密称取已测含量的吊石苣苔叶、茎粉末 1.000 g,各 3 份,加入一定量的对照品,按 1.4 方法处理后测定,结果见表 1.

表 1 吊石苣苔提取液中石吊兰素的测定结果 ( $n=3$ )

样 品	实际含量 /mg	标准加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%
叶	9.156	1.12	10.199	99.25	99.43	0.702
		3.28	12.292	98.84		
		5.20	14.385	100.20		
茎	3.214	1.02	4.238	100.10	100.26	0.847
		2.14	5.345	99.83		
		2.60	5.894	101.37		

由表 1 可见,石吊兰素回收率在 99.43%~100.26%之间,RSD 值为 0.702%~0.847%,表明实验所确定的 RP-HPLC 方法进行石吊兰素的含量分析,准确度较高.

## 3 结 论

研究表明,以乙腈-N,N-二甲基甲酰胺-0.01 mol/L草酸(体积比为 27:6:67)为流动相,在 Hypersil ODS 色谱柱上,实现了对石吊兰素的 HPLC-CL 分离测定,该法检出限低、重现性好、精密度高,并且操作简便、快速.可用于植物中石吊兰素的测定.

## 参考文献:

- [1] 王文采. 中国植物志[M]. 北京: 北京科技出版社, 1990, 69: 125-581.
- [2] LIU Y, WAGNER H, BAUER R. Nevadensin glycosides from lysionotus pauciflorus[J]. Phytochemistry, 1996, 42(4): 1203.
- [3] 马骏冉, 懋 雄. 贵州苗族医药研究与开发[M]. 贵州科技出版社, 1999.
- [4] 孙 超, 张勇民. 贵州特有药用植物资源与可持续利用评价[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1311-1315.
- [5] 杨付梅, 杨小生, 罗 波, 等. 苗药岩苣豆化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 508-509.

- [6] LIU Y, WAGNER H, BAUER R. Phenylpropanoids and flavonoid glycosides from *lysionotus pauciflorus*[J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(2): 339 - 341.
- [7] 张贵宁, 刘淑英, 林开中. 高效液相色谱测定风寒感冒胶囊中石吊兰素含量的研究[M]. *贵阳中医学院学报*, 2002, 24(3): 56 - 57.
- [8] 孙安盛, 石京山, 吴 芹, 等. 石吊兰素对麻醉猫血流动力学的影响[J]. *遵义医学院学报*. 1996, 19(1): 5 - 7.
- [9] 高智席, 周光明, 黄 成, 等. 离子抑制-反相高效液相快速测定池杉、落羽杉根系中有机酸[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(9): 1082 - 1085.
- [10] HUANG Cheng, ZHOU Guangming, PENG Hongjun, *et al.* Simultaneous Determination of N, N-Dimethylaniline and Phenol in Wastewater by High-Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection[J]. *Analytical Sciences*. 2005, 21(5): 565 - 567.
- [11] 高智席, 周光明, 黄 成, 等. 离子增强-反相高效液相色谱法快速测定落羽杉中莽草酸[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 30(6): 1082 - 1085.
- [12] 黄 成, 周光明, 彭红军, 等. 反相高效液相色谱法快速测定靛蓝中残留苯胺[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 29(6): 996 - 999.

## Determination of Nevadensin in *Lysionotus Pauciflorus Maxim* by HPLC-CL

WU Yong-ping<sup>1</sup>, GAO Zhi-xi<sup>1</sup>, ZHOU Guang-ming<sup>2</sup>

1. Department of Chemistry, Zunyi Normal College, Zunyi Guizhou 563002, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** An HPLC-CL linkage method was based on the strong sensitive chemiluminescence of the  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$  system in alkaline medium. The separation was carried out on a Hypersil ODS column with a mobile phase of  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{HCON}_2(\text{CH}_3)_2:0.01\text{mol/LH}_2\text{C}_2\text{O}_4(27:6:67, \text{V/V/V})$ . The linear ranges for Nevadensin determination was  $0.02\sim 50\ \mu\text{g/mL}$  with a detection limit ( $3\sigma$ ) of  $0.01\ \mu\text{g/mL}$ . The relative standard deviation for tetracycline were from  $1.24\%$  to  $1.56\%$  ( $n=5$ ). The method can be useful for the determination of Nevadensin in *Lysionotus Pauciflorus Maxim* samples.

**Key words:** HPLC; chemiluminescence; *Lysionotus Pauciflorus Maxim*; Nevadensin

责任编辑 潘春燕