

· 制剂与质量 ·

半边旗中二萜类化合物的超临界 CO₂ 萃取及 HPLC-MS 分析

邓亦峰, 梁念慈*

(广东医学院 广东省天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要: 目的 建立一种高效准确的提取和分析半边旗中二萜类化合物的方法。方法 以超临界 CO₂ 与改性剂乙醇组成的复合流体萃取半边旗中二萜类化合物, 采用正交设计法优化萃取条件; 建立了 HPLC-大气压化学电离源 (APCI)-MS 联用的分析方法, 以选择离子监测 (SIM) 方式进行含量测定, 以选择离子峰面积与总离子流峰面积的比值优选改性剂。主要的二萜类化合物 5F 的准分子离子为 $[M-H]^{-1}$ 。采用 $[M-H]^{-1}$ 为选择监测离子, 以色谱保留时间和选择监测离子流峰面积定量。结果 超临界流体萃取最佳条件: 25 MPa、60 °C、15% 甲醇、流量 3.0 mL/min; 分析条件: Diamonsil ODS 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 CH₃CN-2 mmol/L NH₄AC (35:65), 流速 1.0 mL/min, 进样 5 μL, 线性范围为 0.05 ~ 2.5 μg, 检出限达 0.4 ng。5F 的加样回收率为 97.8% (n=3)。结论 本法提取效率高、检测灵敏度高、选择性好, 可应用于半边旗中二萜类抗癌化合物的深入研究和质量标准的制定。

关键词: 半边旗; 二萜类化合物; 超临界 CO₂ 萃取; 液相色谱-质谱联用; 改性剂

中图分类号: R 284.1; R 286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)02-0145-04

Extraction of diterpenoids from *Pteris semipinnata* by supercritical CO₂ fluid and their analysis with HPLC-MS

DENG Yi-feng, LIANG Nian-ci

(Guangdong Medical College, Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Object** To establish a high-efficient and reliable method for extraction and analysis of the diterpenoids in *Pteris semipinnata* L. **Methods** Supercritical CO₂ fluid modified with alcohol was used to extract the diterpenoids in *P. semipinnata*, the extracting conditions were optimized by orthogonal design method, and the modifying solvent was investigated through total ions chromatography normalization. A quadrupole mass spectrometer coupled with atmospheric pressure chemical ionization interface was employed as a detector for HPLC, the $[M-H]^{-1}$ ion was used as selective ion for the detecting of ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-olic acid (5F) in selective ion monitoring (SIM) mode. The peak area of SIM and total ion chromatogram (TIC) were used for quantitative determination. As an example of its application, this method was used to determinate the content of 5F as antitumor diterpenoids in *P. semipinnata*.

Results The optimized conditions for supercritical CO₂ fluid extraction are 25 MPa, 60 °C, 15% methanol, flow rate 3.0 mL/min; analytical column was Diamonsil ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); the mobile phase of HPLC was CH₃CN-2 mmol/L NH₄AC (35:65), flow rate 1.0 mL/min, injection volume 5 μL; the standard curve showed good linearity over the range of 0.05—2.5 μg; the limit of detection is 0.4 ng; the recovery is 97.8% (n=3). **Conclusion** This method is highly efficient, sensitive, and selective, which can be applied to study the antitumor drug of diterpenoids in *P. semipinnata* and to establish the drug standard.

Key words: *Pteris semipinnata* L.; diterpenoids; supercritical CO₂ extraction; HPLC-MS; modifying solvent

半边旗 *Pteris semipinnata* L. 为凤尾蕨科植物, 载于《中药大辞典》, 民间认为有解毒、消肿及治疗蛇伤的功。国外文献报道其含二萜和倍半萜等化合

物^[1]。梁念慈等发现半边旗中具有 α 、 β -亚甲基环戊酮基团结构的贝壳杉烷型二萜类化合物具有强烈的抗癌作用, 并对它们作了分离鉴定。半边旗中二萜类化合物

* 收稿日期: 2003-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3987099)

作者简介: 邓亦峰 (1960—), 男, 高级工程师。Tel: (0759) 2388405 E-mail: dengyf@gdmc.edu.cn

主要以 5F(*ent*-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-*en*-19-*olic acid*) 和 4F(*ent*-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-*en*-19-*olic acid*) 形式存在, 5F 为有效成分^[2]。

现有的半边旗中二萜类化合物的提取方法主要是乙醇回流提取方法, 效率低、共存组份多、难以分离, 且受热时间长、活性成分容易被破坏。超临界 CO₂ 流体萃取天然产物的方法具有公认的优点, 采用该法萃取半边旗中二萜类化合物的研究国内尚未见报道。本实验以 5F 为目标成分, 建立了超临界 CO₂ 流体萃取半边旗中二萜类化合物的方法, 并以 HPLC-APCI-MS 联用分析方法优化了萃取条件, 测定了萃取产物中 5F 的含量。

1 仪器与材料

惠普 7680T 超临界流体萃取仪, 安捷伦 1100 改性剂添加泵; 岛津 LCMS—8000 α 型高效液相色谱-质谱联用仪(含在线脱气机, 两台 LC—10Avp 高压输液泵, SPD—10Avp 紫外检测仪, 柱温箱, APCI 源接口, 四极杆质谱检测计)。

CH₃CN (HPLC 级), 三重蒸馏水, 试剂级二氧化碳(南海清越气体公司), 其他试剂均为分析纯。5F 对照品(本课题组分离纯化、含量 98%, 由日本东京理科大学药学区和广东医学院医用生化研究所鉴定); 半边旗生药材采集于广州郊区, 由湛江海洋大学杨燕君副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 5F 的 HPLC-MS 测定方法

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为 2 mmol/L NH₄AC 水溶液, 流动相 B 为 CH₃CN, A-B (65/35); 流速: 1 mL/min; 进样量: 5 μ L。

2.1.2 质谱条件: APCI 离子源, 电极温度 400 $^{\circ}$ C, 电晕(corona)电压—4.0 kV, 离子传输电压+ 55 V、温度 250 $^{\circ}$ C, 偏转电压 40 V, 检测器电压 1.6 kV, 喷雾氮气流速 2.5 L/min, 采用选择离子监测(SIM)方式, 扫描间隔 1 s。以色谱保留时间 4.3 min、*m/z* 331 为 5F 的选择监测离子。采用选择监测离子流(MIC)图峰面积进行定量。

2.1.3 超临界 CO₂ 萃取样品方法: 称取干燥的半边旗地上部分粉末(40 目) 0.500 g, 装入萃取仪的萃取柱(7 mL)中, 在 25 MPa、60 $^{\circ}$ C、超临界 CO₂ 与甲醇体积比为 85/15 条件下萃取: 静态萃取 2 min, 动态萃取 5 倍柱体积、流量为 2.0 mL/min; 萃取流体经装有 C₁₈ 柱填料的收集阱减压, 然后流入收集容器; 萃取完成后, 以 1.0 mL/min 的甲醇洗涤收

集阱, 洗脱液并入收集容器, 定容至 10.0 mL, 备测。萃取过程约 18 min, 洗脱过程约 9 min, 整个流程按所选择的参数程序自动完成。

2.1.4 标准曲线: 在本实验条件下, 0.050 ~ 0.500 μ g, 5F 的监测离子色谱峰面积与浓度呈线性关系, 回归方程为 $Y = 1.176 \times 10^8 C + 9.78 \times 10^5$, $r = 0.9998$ 。5F 的最低检出限为 0.4 ng(二倍信噪比对应的量)。

2.1.5 加样回收率试验: 平行称取 6 份干燥的半边旗地上部分粉末(40 目) 5.00 g, 其中 3 份作对照, 另外 3 份分别加入含 4.00 mg 5F 对照品的甲醇溶液(加入量与样品含量相近), 待样品挥干溶剂后, 按 2.1.3 项下方法操作, 进行测定, 计算回收率。结果平均加样回收率为 97.8%, RSD 为 2.9% ($n = 3$)。

2.1.6 测定结果: 按 2.1.3 项下方法平行制备 4 份样品溶液, 进样 5 μ L, 测定 5F 的峰面积, 以外标法代入回归方程计算含量。样品中 5F 含量为 1.18 mg/g。选择监测离子色谱图见图 1。

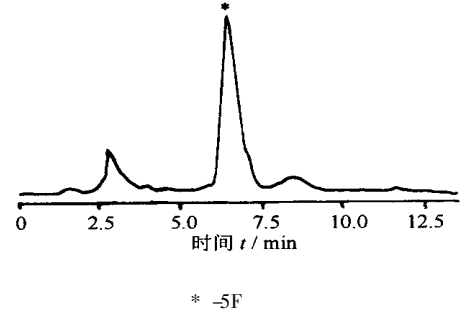


图 1 半边旗萃取物的选择监测离子色谱图

Fig. 1 SIM chromatogram of extracts from *P. semipinnata*

2.2 正交设计优化超临界流体萃取条件: 按 2.1.3 流程, 选取萃取温度(A)、萃取压力(B)、改性剂甲醇在超临界流体中的体积分数(C)作为因素, 进行正交试验, 采用 HPLC-MS 法测定 5F 的提取量作为指标。因素水平见表 1, 正交试验结果分析见表 2。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test			
水平	因 素		
	A /	B/ MPa	C/ %
1	40	25	5
2	50	30	10
3	60	35	15

直观分析结果表明, 以 5F 的提取量为考察指标, 改性剂甲醇在超临界流体中的体积分数是影响萃取的主要因素, 其次是萃取温度和萃取压力。正交试验得到的最佳萃取条件为 25 MPa、60 $^{\circ}$ C、超临界

CO₂ 与乙醇体积比为 85 15。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果分析表

Table 2 Analytical results of L ₉ (3 ⁴) orthogonal test				
实验序号	A	B	C	5F 提取量/ mg
1	1	1	1	0.156
2	1	2	2	0.214
3	1	3	3	0.238
4	2	2	3	0.262
5	2	3	1	0.180
6	2	1	2	0.246
7	3	3	2	0.255
8	3	1	3	0.327
9	3	2	1	0.185
K ₁	0.608	0.729	0.521	
K ₂	0.688	0.661	0.715	
K ₃	0.767	0.673	0.827	
k ₁	0.203	0.243	0.174	
k ₂	0.229	0.220	0.238	
k ₃	0.256	0.224	0.276	
R	0.053	0.022	0.102	

2.3 改性剂的选择

2.3.1 归一化法选择改性剂: 以正交试验优选出的参数为萃取条件, 用甲醇、乙醇、丙酮、醋酸乙酯、氯仿为改性剂以及不加改性剂(对照) 分别进行萃取试验。采用 HPLC-MS 方法以扫描方式(*m/z* 范围为 50~700) 测定萃取产物的总离子色谱图(TIC) 峰面积和 5F 的选择监测离子色谱(MIC) 峰面积(*m/z* 331), 以选择监测离子峰面积及其在总离子流图峰面积百分比(归一化法) 对所选改性剂的萃取率和选择性进行比较。

2.3.2 实验条件: 超临界流体萃取按 2.1.3 流程进行; HPLC-MS 的色谱条件为: 梯度洗脱, 0%~100% 流动相 B(0~8 min)、100% 流动相 B(8~25 min); 流动相 A 为 2 mmol/L NH₄AC 水溶液、流动相 B 为 CH₃CN, 余同 2.1.1。质谱条件为: 负离子扫描方式, *m/z* 范围 50~700, 余同 2.1.2。结果见表 3, 以甲醇为改性剂的萃取产物总离子流见图 2。实验表明: 以甲醇为改性剂的萃取率和选择性最佳, 不加改性剂萃取效率最低。

表 3 归一化法的结果

Table 3 Results of normalization method		
改性剂	5F 峰面积/(× 10 ⁷)	归一化/ %
甲醇	3.93	4.88
乙醇	1.75	2.99
丙酮	1.32	2.51
醋酸乙酯	1.88	2.28
氯仿	2.04	2.48
对照	0.33	0.66

2.4 超临界 CO₂ 萃取法与索氏提取的提取效率对比: 称取半边旗样品 5.00 g, 平行 4 份, 以甲醇为溶

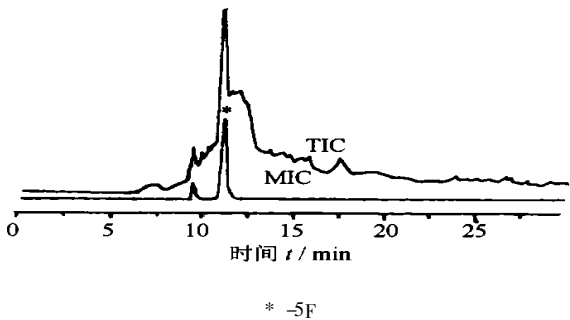


图 2 以甲醇为改性剂的萃取产物总离子色谱(TIC) 图和选择监测离子色谱(MIC) 图

Fig. 2 TIC and MIC of extract with methanol as modifier

剂, 在 80 ℃ 水浴中索氏提取 8 h。提取液以甲醇定容至 100 mL, 按 2.1 项下的 HPLC-MS 测定方法测定提取液中 5F 的含量, 结果提取率为 0.120%。称取半边旗样品 0.500 g, 平行 4 份, 采用优选出的超临界 CO₂ 流体萃取条件, 按 2.1.3 项下流程对相同的半边旗样品进行超临界萃取, 按 2.1 项下的 HPLC-MS 测定方法测定提取液中 5F 的含量, 结果提取率为 0.117%。实验表明, 超临界 CO₂ 萃取法 18 min 的提取率已达索氏提取法的 97.2%, 充分展示了超临界 CO₂ 萃取法的高效率。

3 讨论

3.1 影响萃取的主要因素: 超临界 CO₂ 萃取方法既是一种高效的样品提取方法, 也是一种分离富集的方法^[3]。实验表明, 改性剂是影响萃取的关键因素, 采用超临界 CO₂ 与改性剂组成的流体萃取半边旗中二萜类化合物性能较单纯的超临界 CO₂ 萃取剂的性能大为提高; 但在加入提高萃取效率的同时, 萃取的选择性也会发生改变, 增加共存组份, 对后续的色谱分离和检测带来负面影响。改性剂的选取必须同时考察其对萃取率和萃取选择性的影响。压力和温度对萃取也有较大的影响。压力增加可增加 CO₂ 的极性, 也增加 CO₂ 密度、降低其传质性能。实验中萃取产物中的 5F 含量随压力增高而有所下降, 说明传质性能在本实验中的影响更大。

3.2 HPLC-MS 分析方法的优点: 采用 HPLC-MS 联用方法分析天然产物组份, 既能发挥高效液相色谱和质谱的协同分离功能, 又具有质谱检测器的广泛响应性和高灵敏度, 能快速准确地检测目标成分^[4], 与 UV 检测器相比, 不需精细的色谱分离, 在保证选择性的同时, 可缩短分析时间, 灵敏度大为提高。

采用 HPLC-MS 方法以扫描方式获得的萃取产

物总离子流(TIC)峰面积包含萃取产物总量及其极性分布信息,在测量条件相同及产物共存组份数量和比例变化不大的情况下,选择离子峰面积在总离子流峰面积的百分比(归一化法)能在一定程度上反映目标产物在总萃取产物中的含量相对关系。本实验利用这一特性对所选改性剂的萃取和选择性进行了对比和选择,简捷而直观。

References:

- [1] Maurakami T, Tanaka N. Occurrence, structure and taxonomic implications of fern constituents [J]. *Prog Chem Org Nat Prod*, 1988, 54: 301-310.
- [2] Liang N C, Cui L. Extracts from *Pteris semipinnata* L. and their combined drugs [P]. CN: 1138998, 2002-04-03.
- [3] Zhang J C. *Extraction by Supercritical Fluid* (超临界流体萃取) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [4] Zhou S L, Hamburger M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis: Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 755: 189-204.

制备高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品

肖伟涛,朱小兰,陈波*,姚守拙*

(湖南师范大学化学研究所,湖南长沙 410081)

摘要:目的 研究制备型高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品的办法。办法 原料水提后的水相用被水饱和的氯仿萃取,水相蒸发浓缩后离心,上清液进行 HPLC 分离制备,收集液冷冻干燥,粗产品用甲醇清洗即得。结果 该法所得产品用外标法定量,纯度大于 98%,制备收率大于 60%。结论 本法生产周期短,产品质量高,办法简便,生产费用低,茶氨酸产品可用作分析方法的对照品。

关键词: 茶氨酸;对照品;制备高效液相色谱

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)02-0148-03

Preparation and purification of theanine reference substance by preparative HPLC

XIAO Wei-tao, ZHU Xiao-lan, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo

(Institute of Chemistry, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: **Object** To establish an isolation method of theanine reference substance by preparative HPLC. **Methods** After raw material extracted by water, the water phase was extracted by chloroform saturated with water, then concentrated on a thermostat. After centrifuged, supernatant was isolated and purified by preparative HPLC. Fraction was frozen and dried by Flexi-Drier. Crude product was rinsed by methanol. The purity of product was determined by analytical HPLC. **Results** The purity of product is higher than 98% and theanine yield from raw material by this method exceeds 60%. **Conclusion** The developed method is simple, rapid, and at low production cost. The product owns the quality of reference substance.

Key words: theanine; reference substance; preparative HPLC

茶氨酸(*N*-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是影响茶叶品质的重要组成部分^[1]。茶氨酸是茶叶氨基酸中一种非蛋白氨基酸,约占茶叶中游离氨基酸的 40% 以上,占茶叶干重的 1% ~ 2%^[2],并使茶汤鲜爽、有焦糖味^[3]。药理学研究表明茶氨酸能拮抗咖啡碱引起的神经系统的兴奋作用和降血压^[4,5]。随着茶氨酸的保健功效逐渐为人们所认识,对茶氨酸的需求量不断上升。目前关于茶氨酸对照品的合成、分离方法的研究报道甚少。茶氨酸可采用化学合成、微生物发酵

法合成^[6,7]。现仅日本有少量的茶氨酸对照品,且价格较贵,限制了对其进一步的研究与应用。本实验采用制备高效液相色谱技术,对 25% 茶叶提取物中茶氨酸进行制备、分离纯化。

1 制备与分离

1.1 仪器与试剂: Waters Prep LC4000 高效液相制备色谱仪, Waters 2487 Dual λ Absorbance 紫外检测器, 10 mL 定量环, Waters Millennium³² 色谱工作站, JCX-250W 超声波清洗器(山东济宁电子仪

* 收稿日期: 2003-05-16

基金项目: 国家“十五”攻关资助项目(2001BA746C, 2001BA804A21)

* 通讯作者 E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com Fax: (0731) 8865515