

超高效液相色谱辅助优化大孔树脂洗脱条件的可行性分析

李慕春^{1*}, 阿力甫·阿不都¹, 贺飞², 阿依古丽·塔西¹

(1. 新疆维吾尔自治区分析测试研究院, 乌鲁木齐 830011;
2. 阿勒泰戈宝麻有限责任公司, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**探索以 UPLC 技术为辅助快速优选黄酮类成分大孔树脂纯化条件的可行性。**方法:**选择罗布麻叶提取液为研究对象,以总黄酮、浸膏、主要活性成分的含量变化为指标,在黄酮类成分一般洗脱条件基础上,通过 UPLC 优化洗脱条件并进行验证试验。采用 UV 测定芦丁含量,检测波长 410 nm;采用 UPLC 测定金丝桃苷、异槲皮素及紫云英苷含量,流动相乙腈-0.2% 乙酸(14:86),流速 0.2 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm。**结果:**最佳纯化工艺为上样液 pH 5,径高比 1:8,上样速度 1.5 BV·h⁻¹,静置 2 h,加水 3 BV 以 1.5 BV·h⁻¹洗脱,加 10% 乙醇 1 BV 和 70% 乙醇 3 BV 以 2 BV·h⁻¹洗脱,收集 70% 乙醇洗脱液;总黄酮收率、质量分数分别为 92.3%、38.4%。**结论:**UPLC 技术辅助优选总黄酮的大孔树脂洗脱条件简便易行、精确性高。

[关键词] 罗布麻叶提取液; 超高效液相色谱; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮素; 紫云英苷; 总黄酮; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0020-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140020

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1142.005.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:42

Feasibility Analysis of UPLC-assisted for Optimization of Elution Conditions on Macroporous Resin

LI Mu-chun^{1*}, Alifu·Abudu¹, HE Fei², Ayigl·Taxi¹

(1. Xinjiang Uyger Autonomous Region Academy of Instrumental Analysis, Urumqi 830011, China;
2. Alter Gebaoma Co. Ltd, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate feasibility of UPLC-assisted for optimizing purification conditions of total flavonoids by macroporous resin. **Method:** Take aqueous extracts of Apocyni Veneti Folium as an example, taking content changes of total flavonoids, extract and main active components as indexes, on the basis on general elution conditions of flavonoids, UPLC was adopted to optimize elution conditions and experimental verification was employed. UV was used to determine the content of rutin with detection wavelength of 410 nm; contents of hyperin, isoquercetin and astragaloside were determined by UPLC, mobile phase of acetonitrile-0.2% acetic acid (14:86), flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, detection wavelength of 360 nm. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: sample solution pH 5, diameter-high ratio 1:8, adsorption rate of 1.5 BV·h⁻¹, standing for 2 h, washed impurity with 3 BV of water with elution rate of 1.5 BV·h⁻¹, then eluted by 1 BV of 10% ethanol and 3 BV of 70% ethanol with elution rate of 2 BV·h⁻¹, collected eluent of 70% ethanol; yield and purity of total flavonoids were 92.3% and 38.4%, respectively. **Conclusion:** Optimization of elution conditions by macroporous resin based on UPLC was simple and feasible with high accuracy.

[Key words] Apocyni Veneti Folium; UPLC; rutin; hyperin; isoquercetin; astragaloside; total flavonoids; macroporous resin

[收稿日期] 20131026(005)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(201232123)

[通讯作者] *李慕春, 硕士, 副研究员, 从事天然产物研究与开发, Tel:0991-3857108, E-mail:lmcy@vip.sina.com

大孔树脂被广泛应用于分离纯化药材中黄酮类成分^[1],效果良好,但操作过程非常繁琐,不同试验批次间数据的重复性较差,对大生产的指导意义有限。研究认为大孔树脂对药材中总黄酮的纯化工艺存在一定的共性^[2-3],基本纯化条件可归纳为 pH 5, 径高比 1:8, 上样速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加 3 BV 水洗除杂, 每个乙醇梯度 2 BV 洗脱, 洗脱速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。洗脱液中总黄酮含量变化常采用 UV 测定, 虽检测方便, 但试验获得的信息量较少, 不能有效指导纯化工艺优化。UPLC 具有超高速度、超高分离度、超高灵敏度^[4], 可在较短分析时间内对多组分进行定量分析, 获得丰富的试验数据, 较 UV 更具有指导意义。本实验选择罗布麻叶提取液为研究对象, 利用 UPLC 精确分析洗脱液中主要黄酮类物质的含量变化, 结合浸膏量和总黄酮的含量变化, 优化洗脱条件, 为 UPLC 在大孔吸附树脂技术中的应用提供实验依据。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), UV-1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), Alpha 2-4D Plus 型真空冷冻干燥器(美国 Christ 公司)。罗布麻叶由新疆阿勒泰戈宝麻有限公司提供, 经新疆分析测试研究院阿依古丽副研究员鉴定为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 的干燥叶; XDA-6 型大孔树脂(西安蓝晓科技有限公司), 金丝桃苷、异槲皮素、紫云英苷、芦丁对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号分别为 MUST-11122003, MUST11121801, MUST11092001, MUST13031701), 乙腈为色谱纯, 水为去离子水或超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 罗布麻叶提取液的制备 取罗布麻叶, 粉碎过 40 目筛, 精密称取 300 g, 加入 10 倍量水, 在不锈钢锅中煮沸提取 1 h, 过滤; 滤渣加 8 倍量水煮沸提取 1 h, 过滤; 合并 2 次滤液, 加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 5.0, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 滤液浓缩, 加水溶解并定容至 500 mL 量瓶中, 经测定总黄酮质量浓度 $12.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 总黄酮的含量测定 根据文献[5-6]优化的方法进行测定。

2.3 芦丁的含量测定 精确称取芦丁对照品 20 mg, 加乙醇溶解并定容至 100 mL, 得 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮备液; 分别精密量取贮备液 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 加 1% 氯化铝溶液定容至 25 mL 比色管中, 置于 1 cm 光径比

色皿, 以相应试剂为空白, 于 410 nm 处测定吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度(C)为横坐标, 得回归方程 $A = 0.031C + 0.002$ ($R^2 = 0.999$), 线性范围 $8 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 UPLC 分析^[7]

2.4.1 色谱条件 Waters BEH C_{18} 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$), 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 流动相乙腈-0.2% 乙酸(14:86), 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 360 nm, 进样量 $3 \mu\text{L}$ 。

2.4.2 溶液的制备 精密称取金丝桃苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷对照品 10.0 mg, 分别加流动相溶解并定容至 100 mL, 作为对照品溶液。将提取液及洗脱液用 $0.22 \mu\text{m}$ 针筒式过滤器滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.5 洗脱条件考察 取 XDA-6 型大孔树脂适量, 加无水乙醇浸泡 24 h, 用无水乙醇重悬, 通过漏斗加入 $20 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ 玻璃层析柱中, 至柱床高度 16 cm, 加水冲洗至无醇味, 调节蠕动泵以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 上样, 上样完成后静置 30 min, 依次加水 3 BV ($1 \text{ BV} = 78 \text{ mL}$) 和 10%, 30%, 50%, 70%, 95% 的乙醇各 2 BV 洗脱, 分段收集洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 洗脱液分别冷冻干燥 48 h, 取冻干后样品, 测定浸膏质量, 加 50% 乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 各精密量取 1 mL, 测定总黄酮含量及金丝桃苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷峰面积, 结果见图 1~4。

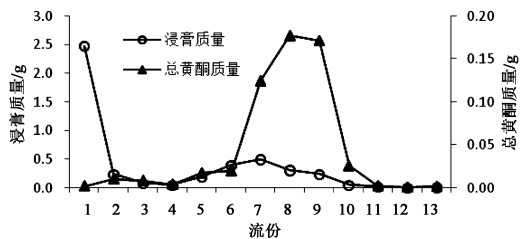


图1 罗布麻叶提取液不同洗脱液中浸膏质量及总黄酮质量

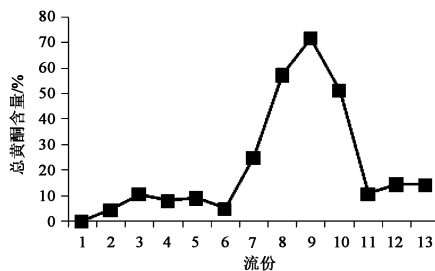


图2 罗布麻叶提取液不同洗脱液冻干粉中总黄酮含量变化

由图 1 可知, 3 BV 水洗时, 流份中浸膏质量依次降低, 浸膏质量占各流份总浸膏量的 61.2%, 表明水洗除杂的效果非常明显。随乙醇体积分数的增

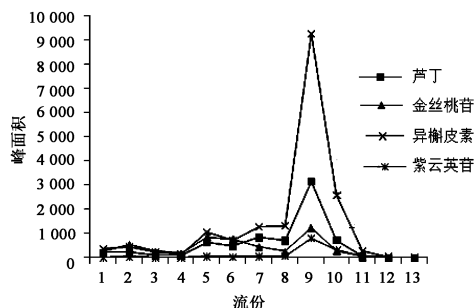
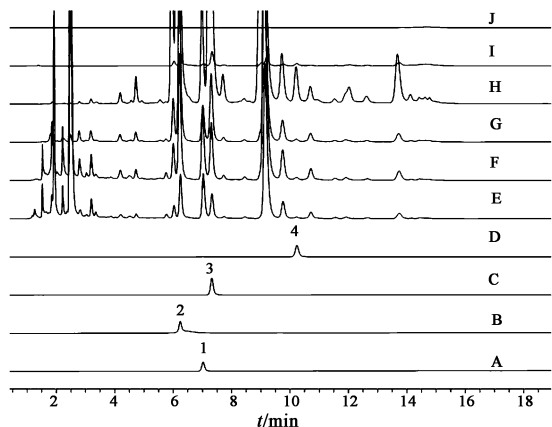


图 3 罗布麻叶提取液不同洗脱液中 4 种活性成分含量变化



A, B, C, D. 对照品; E. 流份 3; F. 流份 5; G. 流份 7;
H. 流份 9; I. 流份 11; J. 流份 13;
1. 金丝桃苷; 2. 芦丁; 3. 异槲皮素标; 4. 紫云英苷

图 4 罗布麻叶提取液不同洗脱液 HPLC 差异

加,原本吸附在树脂上的某些物质被洗脱下来,包含一定量黄酮类成分,可能是因为上样太快和流速过高导致^[8],适当增加静置时间有利于增加黄酮类成分的吸附^[9];30%,50%的乙醇洗脱液中总黄酮质量占全部洗脱液的 87%,70%乙醇只洗脱了 5%,95%乙醇洗脱液中几乎无黄酮类成分,表明 70%乙醇即可洗脱绝大多数黄酮。

由图 2 可知,自 30%乙醇洗脱开始,流份冻干粉中总黄酮含量快速上升,50%乙醇和 70%乙醇 1 BV洗脱时,总黄酮质量分数均 > 50%;乙醇洗脱时流份中总黄酮含量最高时,浸膏量并不是最大,提示 30%乙醇洗脱部分中含有较多的其他杂质。

由图 3 可知,除金丝桃苷外,其他 3 种成分被洗脱集中于第 8~11 流份,金丝桃苷含量随乙醇洗脱梯度的变化而不断波动,但在第 8~11 流份中含量亦呈现最大值,表明代表性物质的洗脱相对比较集中。

由图 4 可知,自流份 6 开始,极性相对较大的成分已经非常少;流份 9 中,中、低极性成分含量达到

了最高值,流份 9 的最大紫外响应值为流份 11 的 25 倍,流份 11 中黄酮类成分含量很低;极性相对较小的一些成分主要富集于流份 8,9。

2.6 验证试验 综合试验结果,拟定利用 XDA-6 型大孔树脂纯化罗布麻叶提取液的工艺参数为 pH 5,径高比 1:8,上样速度 1.5 BV·h⁻¹,静置 2 h,加水 3 BV 以 1.5 BV·h⁻¹洗脱,加 10%乙醇 1 BV 和 70%乙醇 3 BV 以 2 BV·h⁻¹洗脱。取罗布麻叶提取液 2 L,按优选的工艺进行纯化,收集 70%乙醇洗脱液 1.715 L,计算总黄酮质量分数 38.4%,表明在 UPLC 分析基础上进行优化,可快速确定总黄酮的大孔树脂纯化条件。

3 讨论

结合 UPLC 快速分析洗脱液可获得丰富的信息,根据这些信息可适时调整洗脱条件,快速获得最佳洗脱参数。还可确定某个具体化合物在洗脱液的流份序号,针对性的收集流份;可根据杂质在流份中分布特点确定收集时间;根据一些黄酮类成分在不同流份中含量,指导上样、洗脱的速度调节等。UPLC 辅助大孔树脂分离纯化使试验的目的性、精确性大幅提高,具有显著的大生产指导意义。

[参考文献]

- [1] 郭永学,李楠,杨美燕,等.大孔吸附树脂在中草药研究中的应用进展[J].药品评价,2004,1(5):376.
- [2] 沈晓玲,龚正礼.大孔树脂在茶叶功能成分分离中的应用进展[J].食品工业科技,2013,34(16):396.
- [3] 李伟,李茜,王媛.大孔树脂在中药黄酮及皂甙类成分分离纯化中的应用[J].新疆中医药,2010,28(5):87.
- [4] 石俊敏,管佳,张庆文,等.超高效液相色谱在药物分析中的应用[J].药物分析杂志,2008,28(9):1583.
- [5] 于村,俞莎,沈向红.保健食品中总黄酮测定方法的研究[J].中国卫生检验杂志,2002,12(4):401.
- [6] 马陶陶,张群林,李俊,等.三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J].时珍国医国药,2008,19(1):54.
- [7] 张群林,吴亮,言安定,等.HPLC 同时测定罗布麻叶药材及其提取物中 6 种黄酮的含量[J].中国中药杂志,2011,36(5):589.
- [8] 周英新.基于黄酮类分子构型的大孔树脂吸附动力学模型研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [9] 张强祖.中药材黄酮的大孔树脂吸附工艺研究及生产线设计[D].上海:华东理工大学,2013.

[责任编辑 刘德文]