

Vanquish分析纯化液相色谱系统对益母草中己糖二酸类成分实现高效分离纯化

吴燕娇¹ 沈国滨¹ 冉良骥¹ 金燕¹ 李勇强¹ 王红芳¹ 李钰洁² 胡坪²

¹ 赛默飞世尔科技（中国）有限公司

² 华东理工大学

关键词

馏分收集，益母草，己糖二酸，集成馏分收集器，纯化，液相色谱

1. 前言

益母草作为一种传统的中药材，内含丰富的化学成分，具有多种药理作用。长期以来，各版《中国药典》中益母草的含量测定指标成分为益母草碱和水苏碱，因此，大部分的研究关注其中的生物碱类化合物，而对于益母草中的己糖二酸类化合物的研究甚少。己糖二酸是一种无毒的葡萄糖衍生物，有助于降低胆固醇和调控人体内的激素水平，究其原因，可能是因为益母草中的己糖二酸类成分极性较强且结构与性质相近，加之含量较低且稳定性较差，分离纯化的难度很大。由此可见，益母草中的己糖二酸类成分的制备具有较大的挑战和研究价值^[1]。

本文利用Vanquish分析纯化液相色谱系统（Vanquish Analytical Purification Liquid Chromatography System）对益母草提取液中的3个主要组分进行纯化以及馏分收集（按峰收集），考察了样品残留、重复性、回收率。积累足够馏分后采用紫外光谱、核磁共振波谱和质谱对单体化合物的结构进行鉴定。

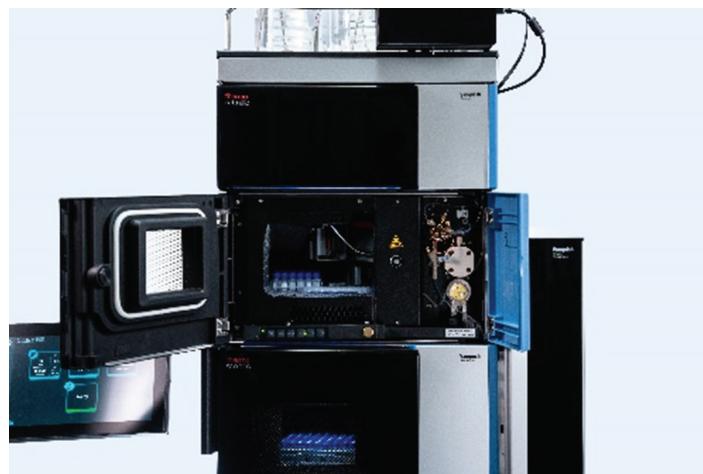


图1 Vanquish Analytical Purification Liquid Chromatography System

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱仪

泵：Binary Pump C (VC-P10-A-01)

自动进样器：Split Sampler CT (VC-A12-A, 250μL 定量环)

柱温箱：Column Compartment C (VC-C10-A)

检测器：Diode Array Detector CG (VC-D11-A-01) 含13 μL流通池

馏分收集器：Vanquish Integrated Fraction Collector (VF-F20-A-01)

色谱软件：变色龙色谱管理软件 Chromleon CDS 7.3.1

2.1.2 试剂：甲醇（色谱级，Fisher公司）

去离子水（18.2MΩ，Millipore纯水机）

甲酸（色谱级，Fisher公司）

2.1.3 样品：益母草提取液 华东理工大学 胡坪课题组提供

2.2 样品溶液配制

取样品5ml，加5ml甲醇稀释并混匀，0.45μm针式滤头过滤，取续滤液。

2.3 色谱条件

表1 益母草分离条件:

Parameter	Value																					
Column	Hypersil Prep HS C18, 250 * 10 mm, 5 µm																					
Eluent	A – 0.1%FA-H ₂ O B – MeOH																					
Flow rate	4 mL/min																					
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>92</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	%A	%B	0	92	8	5	75	25	13	70	30	25	70	30	28	0	100	32	0	100
Time (min)	%A	%B																				
0	92	8																				
5	75	25																				
13	70	30																				
25	70	30																				
28	0	100																				
32	0	100																				
Autosampler temp.	5°C																					
Column temp.	25°C																					
Injection volume	100 µL																					
Injection wash solvent	10% MeOH																					
Detection	296 nm, 5 Hz, 1 s response time, 4 nm bandwidth																					

表2 馏分收集条件:

Parameter	Value
Wash solvent	10% MeOH
Flush solvent	10% MeOH
Fraction collector compartment Temperature	5°C
Collection Time Frame	14.5-15.2min 16.5-18min 21-21.8min
Flush	Active
Max. tube volume	10ml
Minimum time for tube change	5s
Delay volume	900µl with delay capillary 1.0 x 1150 mm
Collection Path Mode	Horizontal
Collection Valve mode	Continue
Needle Positioning Mode	AboveVial
Use Safe Needle Height	Active
Wash Mode	Both
Wash Speed	100.0 µL/s
Wash Time	3.0 s
Rinse Mode	Both
Puncture Offset	0.0 mm
Show advanced settings	
Peak Detection Options	Peak Start Threshold 570mAu
	Peak Start Slope 50 mAU/s
	Peak Start True Time 1.0s
	Peak End Threshold 570 mAU
	Peak End Slope -50mAU/s
	Peak End True Time 1.0 s

表3 收集液分析条件

Parameter	Value		
Column	Hypersil Prep HS C18, 250 * 4.6 mm, 5 μm		
Eluent	A – 0.1%FA-H ₂ O B – MeOH		
Flow rate	1 mL/min		
Gradient	Time (min)	%A	%B
	0	92	8
	5	75	25
	13	70	30
	25	70	30
	28	0	100
	32	0	100
Autosampler temp.	5°C		
Column temp.	25°C		
Injection volume	100 μL		
Injection wash solvent	10% MeOH		
Detection	328nm、287nm、280nm		

3. 实验结果与讨论

馏分收集的最终目的是分离目标化合物，同时保证馏分的纯度，以便开展下一步的分析工作。

馏分收集的一个最重要的方面是，色谱柱所达到的分离效果必须由检测器和馏分收集器共同来保持。这种色谱柱分离-检测响应-馏分收集对馏分收集结果的影响只是一个理想的情况，在实践中很少实现。例如，扩散、涡流和机械障碍都会影响收集效果^[2]。

Vanquish集成的馏分收集器（ Vanquish Integrated Fraction Collector, VFC ）模块化的设计更加灵活，可以与液相系统整合到一起，使流路的连接尽可能的短，结合不同流量优化不同延迟体积管路，这种设计的优点是可以最大程度减小延迟体积、降低峰扩散以及降低馏分重叠的风险。系统的流路图如图2所示。

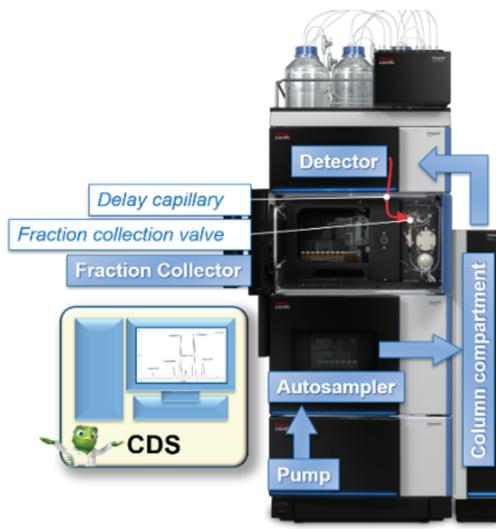


图2. Vanquish分析纯化液相色谱系统流路图，CDS连接与LC系统通信，触发VFC进行馏分收集

按时间收集：

基于保留时间窗口的馏分收集通常仅用于对复杂样品进行预分馏，例如收集某一段峰。这种收集方式不常用于复杂基质样品，因为复杂基质样品通常分离度较差，通常使用按色谱峰收集这种收集方式。

按色谱峰收集：

使用紫外检测器信号进行基于色谱峰的馏分收集比基于时间的馏分收集更有针对性、收集效率更高。每个样品通常会收集几个馏分，使用紫外信号进行按色谱峰收集的优势在于所得馏分的纯度较高（参数合适）。

3.1 馏分收集实验

按照上述实验条件，进行益母草提取液馏分收集实验。图3所示为益母草提取液3个组分的馏分收集示意图。

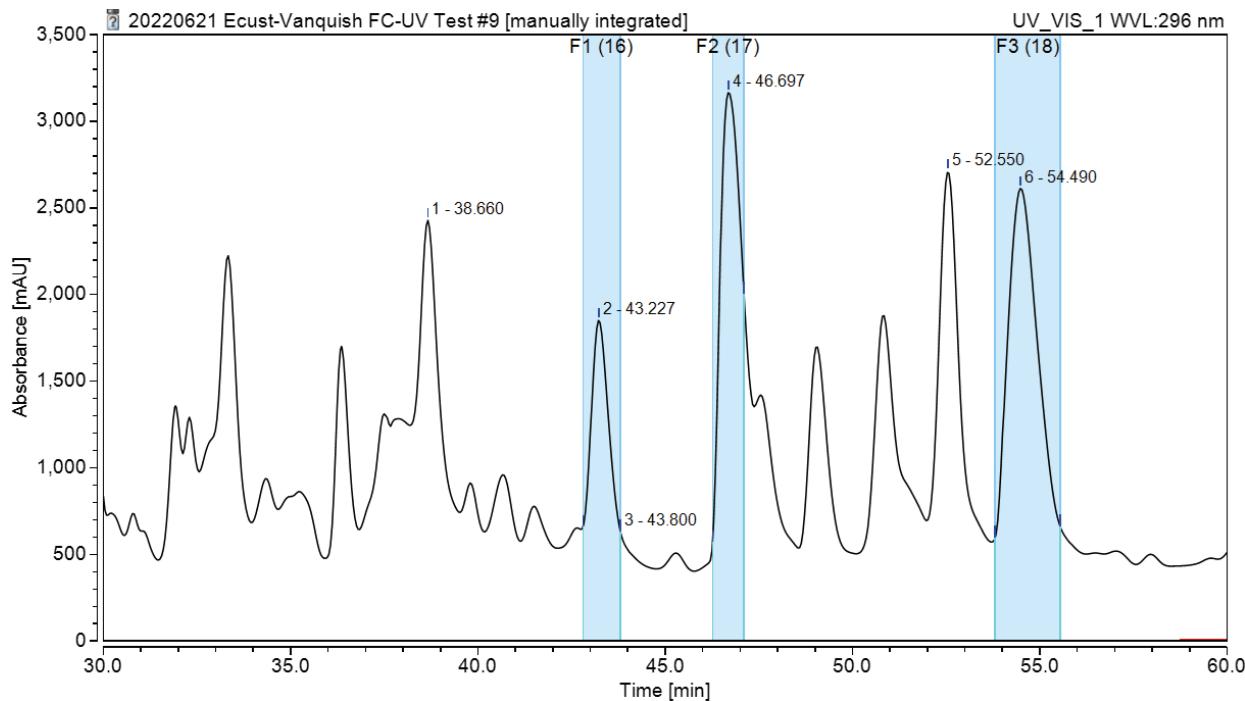


图3 益母草提取液馏分收集示意图

3.2 样品残留实验

由于分析型馏分收集是小体积应用，馏分纯度成了人们的主要关注点。传统馏分收集器的设计会使得一部分馏分在收集阀关闭时滞留在收集阀之后，收集针末端之前的管路中。在收集过程中，滞留的这部分馏分会与下一个馏分一起被收集，这就是我们通常所说的“交叉污染”。

VFC采用的创新流路设计最大程度降低了残留风险。VFC 具有多种冲洗、清洗功能。启用冲洗功能后，馏分收集结束时的 CDS 会将馏分收集阀从收集位置（图 4 B）切换到冲洗位置（图 4 C）。因此，提高了主要馏分的回收率，并将一个馏分带入下一个馏分的情况降至最低，有效降低交叉污染^[2]（图 4 D）。

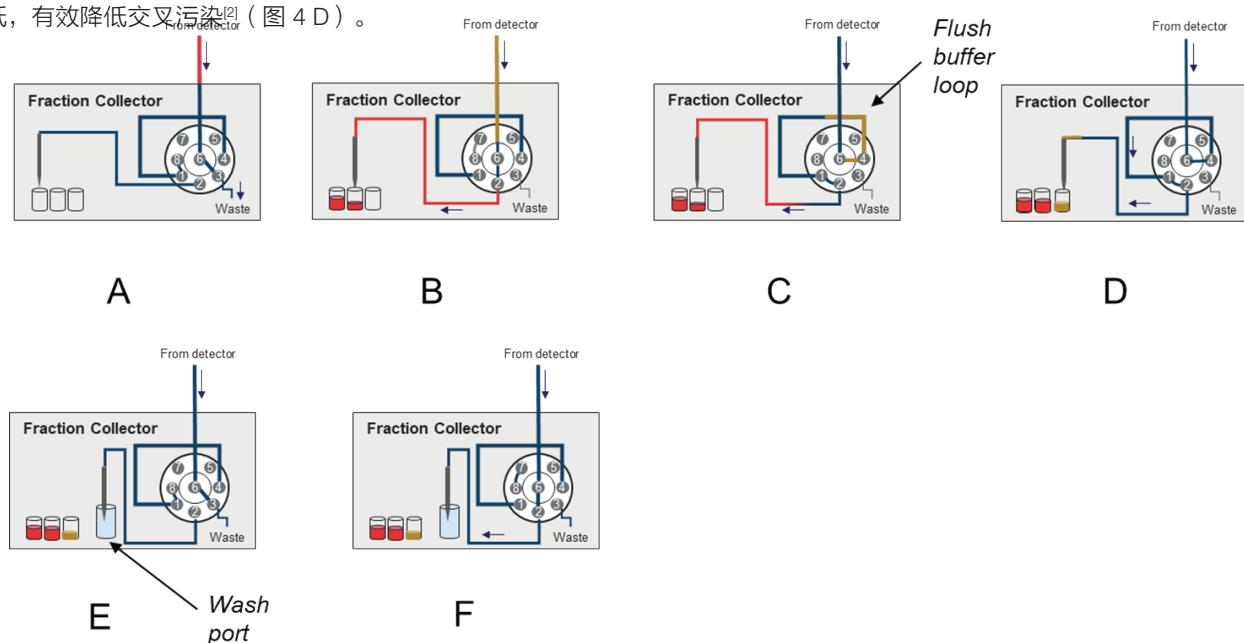


图 4 Vanquish 馏分收集器的馏分收集阀及其三个位置支持功能：在 WASTE 位置 (A)，VFC 处于空闲状态，不收集任何馏分。在收集位置 (B) 中收集馏分（红色）。FLUSH 位置 (C) 可实现高回收率分馏，以将主要馏分（红色）与杂质（黄色）（C 至 D）分离。对于外部针头清洗 (E)，阀门位于 WASTE 位置，针头位于清洗端口中。对于内部针头清洗或冲洗模式 (F)，阀门位于 COLLECT 位置，针头位于清洗端口中。

分别在Flush功能Active以及Inactive条件下进行益母草提取液的馏分收集实验，并将收集液重新进样，考察VFC的抗交叉污染能力。

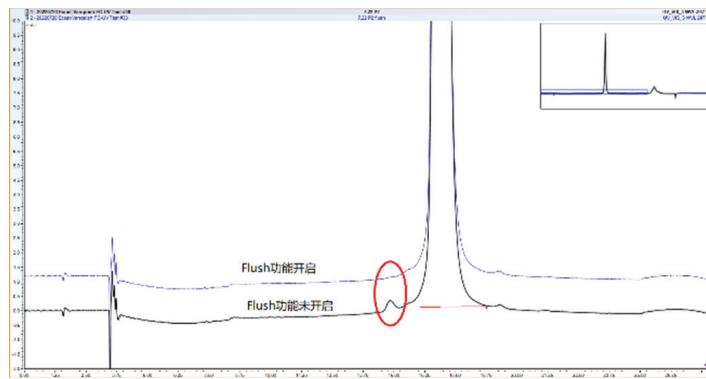


图5 组分2馏分收集液再进样色谱图

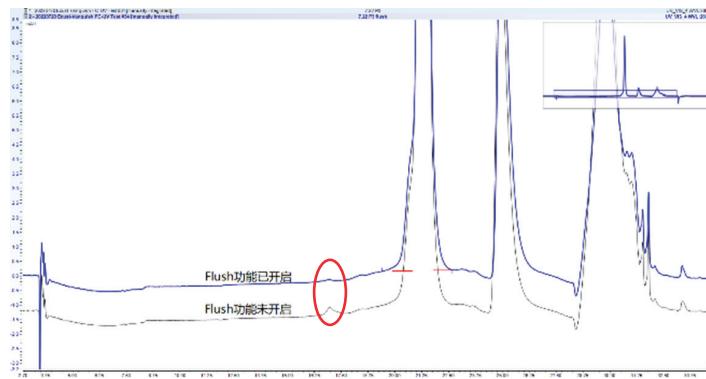


图6 组分3馏分收集液再进样色谱图

实验结果表明，Flush功能可以有效的避免组分之间的交叉污染，组分1的残留率从0.04%降至0，组分2的残留率从0.16%降至0，提高了组分2及组分3馏分收集液的纯度。

3.3 重复性实验

将益母草提取液进样后收集，重复5次，将三个组分每次收集液存放在不同的收集瓶中，对三个组分的收集液进行再进样，来考察收集液的纯度以及馏分收集器的重复性，结果见图7、表4。

表4 馏分收集重复性结果

组分1	T (min)	峰面积 (mAu*min)	纯度%
1-1	14.303	27.3524	93.42
1-2	14.327	26.2603	93.01
1-3	14.333	26.5992	93.57
1-4	14.340	26.3587	94.32
1-5	14.337	26.4739	93.99
Ave	14.333	26.6089	93.66
RSD%	0.12%	1.63%	0.54%

组分2	T (min)	峰面积 (mAu*min)	纯度%
2-1	16.16	59.7193	97.23
2-2	16.22	52.6538	97.15
2-3	16.22	60.0976	97.13
2-4	16.23	58.966	97.03
2-5	16.237	53.5799	97.21
Ave	16.218	57.0033	97.15
RSD%	0.19%	6.29%	0.08%

组分3	T (min)	峰面积 (mAu*min)	纯度%
3-1	19.667	35.4869	97.08
3-2	19.837	33.0255	96.81
3-3	19.857	33.2458	96.55
3-4	19.780	32.4681	97.28
3-5	19.693	31.5745	96.61
Ave	19.767	33.1602	96.87
RSD%	0.43%	4.38%	0.32%

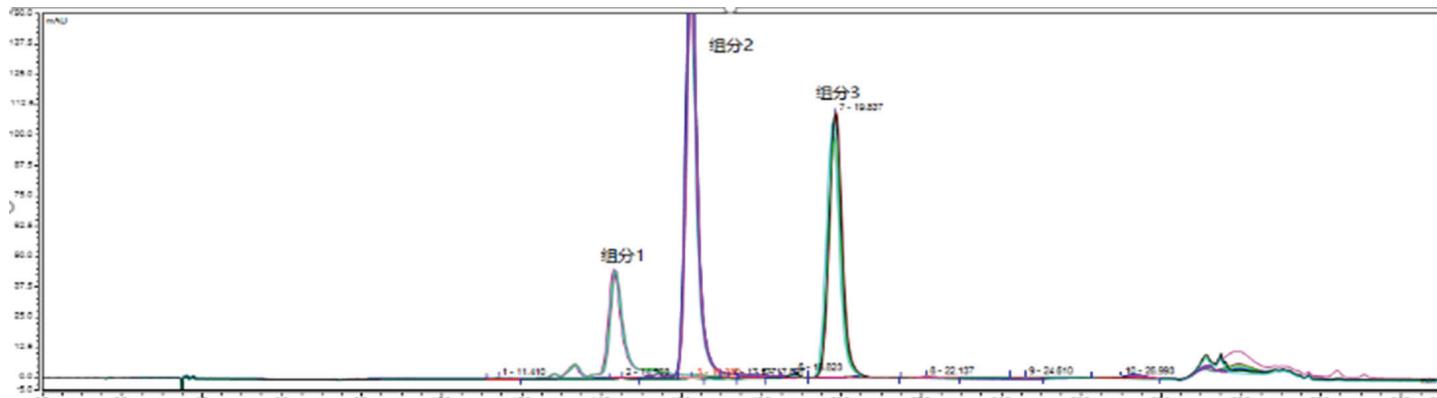


图7 重复性结果色谱叠加图

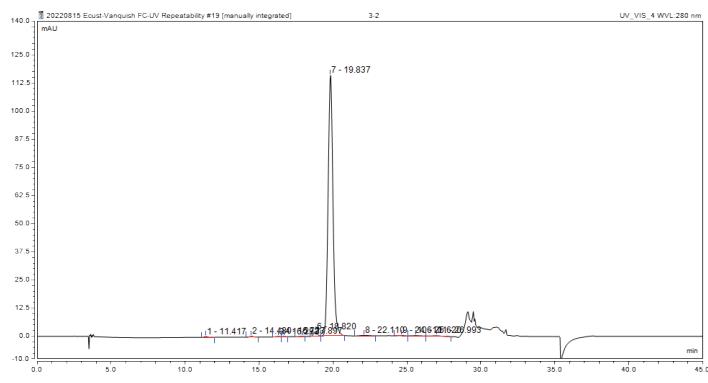


图8 组分3收集液色谱图

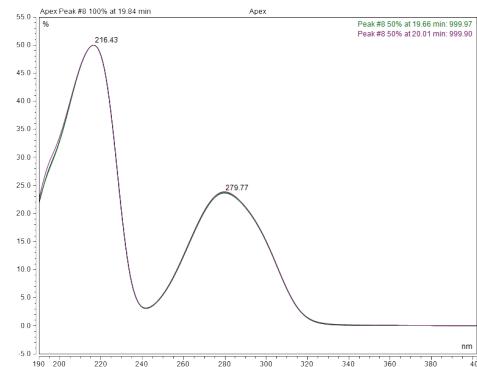


图9 组分3收集液光谱图

实验结果表明，三个组分再进样分析保留时间、峰面积、峰纯度（图8、图9）、重复性良好，说明本方法进行馏分收集重复性良好。

3.4 回收率实验

回收率取决于收集的产品量。许多因素会影响收集馏分回收率，例如检测器设置、延迟体积、馏分收集阀体积和切换时间，以及峰水平阈值和斜率，是一个综合的考察因素。回收率计算公式：

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\frac{V_0 + V_f}{V_2} \times A_2}{A_1}$$

变量	说明
V_f	流速(mL/min.)
Δ_t	收集截止时间(min.) – 收集开始时间(min.)
V_0	收集体积(μL)
V_1	原液馏分收集进样体积(μL)
V_2	收集液再分析进样体积(μL)
V_f	冲洗体积 (μL)
A_1	原液馏分收集峰面积(mAU*min.)
A_2	收集液再分析峰面积 (mAU*min.)

实验结果见表5：

表5 馏分收集回收率结果

回收率	组分1	组分2	组分3
1	91.43%	118.8%	106.1%
2	91.81%	111.6%	100.6%
3	96.90%	128.8%	101.6%
4	94.77%	117.4%	98.18%
5	92.76%	111.4%	96.94%
AVE	93.53%	117.6%	100.7%
RSD	2.44%	6.02%	3.52%

实验结果表明，组分1及组分3回收率良好，组分2因在益母草提取液中含量过高，峰接近平头，导致计算的回收率偏高。

3.5 组分结构鉴定

对组分1、组分2、组分3连续收集，收集液浓缩后进行结构鉴定。通过紫外光谱，一维、二维核磁共振波谱及质谱确认组分1是2-阿魏酰基己糖二酸，组分2是2-阿魏酰基-4-丁香酰基己糖二酸，组分3是2-丁香酰基苹果酸。

2-阿魏酰基己糖二酸的结构如图10所示。

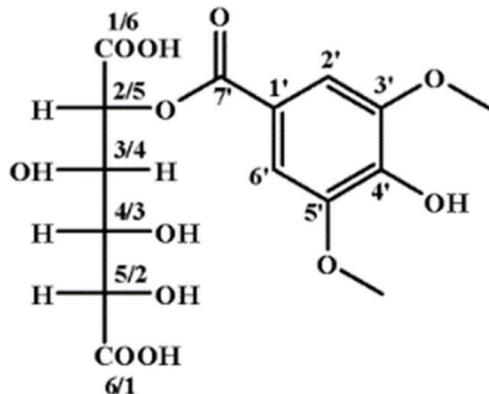


图10 2-阿魏酰基己糖二酸结构图

2-阿魏酰基-4-丁香酰基己糖二酸的结构如图11所示。

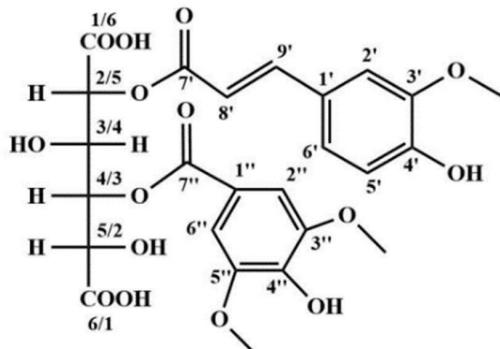


图11 2-阿魏酰基-4-丁香酰基己糖二酸

2-丁香酰基苹果酸的结构图如图12所示。2-丁香酰基苹果酸为淡黄色粉末，易溶于水，紫外最大吸收波长为220 nm和280 nm。

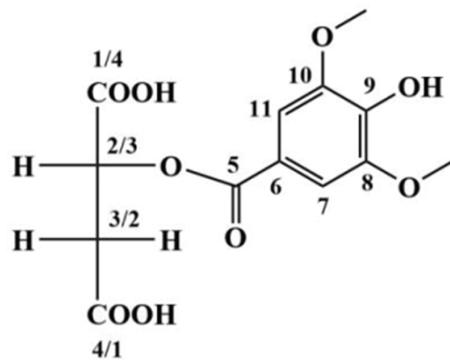


图12 2-丁香酰基苹果酸结构图

4. 结论

本应用展示了使用Vanquish Analytical Purification Liquid Chromatography System对益母草提取液3个组分进行纯化馏分收集（按峰收集），从重复性、馏分收集效率以及样品残留三个方面进行测试，实验结果表明，Vanquish Analytical Purification Liquid Chromatography System重复性好，收集效率高，收集残留率低。方便开展分析级别的馏分收集，提高收集效率并降低残留，非常适合分析级别的纯化与分离的应用。积累了一定量的收集液浓缩后对样品进行表征，确定样品结构。能够满足科研以及企业客户的需求。

参考文献

[¹] Yujie Li, Qiangqiang Jia1, Min Zhang. et al Isolation of three glucaric acids from Leonurus japonicus Houtt. by using high-speed counter-current chromatography combined with semi-preparative high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Separation Science. 2022;45:2140-2147;

[²] Dennis Koehler Principles of fraction collection using the Vanquish HPLC and UHPLC systems TN-72940



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC