

利用沃特世Prep 150 LC系统分离银杏叶中的黄酮类化合物

Andrew Aubin
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 配有直观易用式软件的制备级HPLC高性能系统
- 通过ChromScope™软件对所有系统组件进行全面控制

简介

银杏叶入药治疗多种疾病的历史可追溯千年之久¹。银杏叶提取物中含有多种活性化合物，尤其富含黄酮类化合物，主要为槲皮素、山柰酚和异鼠李素(图1)。

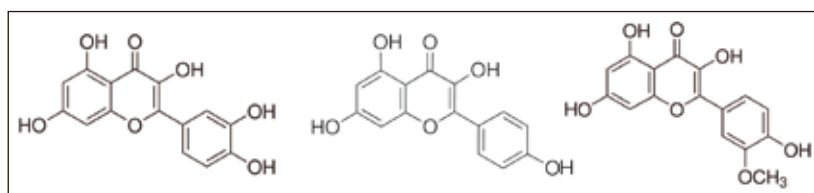


图1. 槲皮素、山柰酚和异鼠李素的化学结构。

通常来说，天然产物的纯化目的是将可能具有生物活性的单一化合物成分分离出来。分离出的这些化合物累积到足够量后即可应用于多种用途，例如标准品的制备，或供其它研究使用(如，临床试验，生物检测等)。所有分离出的化合物都需要达到尽可能高的纯度，并且制备过程需要尽可能的快速有效。过去的文献中介绍过诸多有关天然产物提取、分离和纯化的技术²，制备级反相高效液相色谱仪(RP-HPLC)在此类操作中的应用广泛，被视为是一种适用于多类化合物的快速、可靠与稳定的技术。本应用纪要将介绍利用沃特世(Waters®) Prep 150 LC系统(图2)分离银杏叶粉末中的黄酮类化合物。

沃特世解决方案

Prep 150 LC系统

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ChromScope软件1.4版

XBridge®色谱柱

关键词

制备级HPLC, 银杏, ChromScope,
Prep 150 LC, XBridge



图2. 沃特世Prep 150 LC系统。

实验

分离

使用包含下列沃特世组件的Prep 150 LC系统 (图2) 执行制备级色谱分离:

泵:	2545二元梯度模块
检测器:	2489紫外可见光检测器 (带半制备级 TaperSlit™流通池)
进样器:	配有5 mL定量环的制备级进样器
收集器:	馏分收集器III
软件:	ChromScope 1.4版

实验所涉及的分析级色谱分离 (方法开发和最终纯度检查) 均采用配有ACQUITY PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统完成, 控制软件为Empower® 3。两套初始分析级分离操作的开发条件 (一套用于纯度检查的梯度条件和一套用于纯化的等度条件) 详情如下所示。

分析级梯度条件 (用于纯度检查)

系统:	ACQUITY UPLC H-Class
柱温:	50°C
流速:	0.50 mL/min
流动相A:	0.2%甲酸水溶液
流动相B:	乙腈
梯度:	在13 min内由85:15梯度变化至30:70, 然后在13 - 15 min范围内变化至5:95
检测条件:	UV (371 nm)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm

分析等度条件 (用于制备操作放大)

系统:	ACQUITY UPLC H-Class
柱温:	室温
流速:	1.4 mL/min
流动相A:	0.2%甲酸水溶液
流动相B:	乙腈
组成:	73% A与27% B
检测条件:	UV (371 nm)
色谱柱:	XBridge BEH C ₁₈ 色谱柱, 130Å, 5 µm, 4.6 mm x 100 mm

下文将详细介绍把制备级分离从分析级方法几何放大为采用19 x 100 mm XBridge 色谱柱进行操作。

制备级等度条件

系统:	Prep 150 LC
柱温:	室温
流速:	24.8 mL/min
流动相A:	0.2%甲酸水溶液
流动相B:	乙腈
组成:	73% A与27% B
进样体积:	0.25 mL
检测条件:	UV (371 nm)
色谱:	XBridge BEH C ₁₈ OBD™制备色谱柱, 130Å, 5 µm, 19 mm x 100 mm

提取

将银杏叶粉末 (20 g) 加入 100 mL 甲醇中, 超声 60 min。加入 40 mL 3N 的盐酸后, 将此混合物加热至沸腾并回流 90 min。此回流操作可将黄酮苷水解成单个的黄酮化合物。冷却至室温后, 使用 Whatman #1 滤纸对提取物进行过滤即可, 无需进一步处理。

结果与讨论

对制备所得的提取物进行梯度 UPLC[®] 分析, 结果显示其中槲皮素和山柰酚的浓度分别为 0.088 和 0.104 mg/mL (未获得异鼠李素的定量标准品), 根据 UV (371 nm) 条件下测得的峰面积百分比计算所得三种化合物的总体纯度约为 11%, 14% 和 5% (图 3)。借助于先前开发出的分析级等度 HPLC 方法 (图 4), 使用内置于 ChromScope 软件中的 Analytical to Prep Gradient Calculator (分析级至制备级梯度计算器, 图 5) 可计算出几何放大至内径为 19 mm 的色谱柱时所需的制备级分离流速。分析级至制备级梯度计算器是一款简便且易用的工具, 可进行分析级至制备级操作的几何缩放计算, 提供流速与梯度时间计算信息。分析级方法到制备级方法的准确放大可实现在分析级规模下进行方法开发, 从而能够节省样品并减少方法开发所需的溶剂使用量。放大的制备级色谱会与分析级色谱十分相似, 使用户能够准确地通过放大的制备级方法收集目标峰。之前发布的应用纪要³中对此类放大计算提供有更详细的描述。

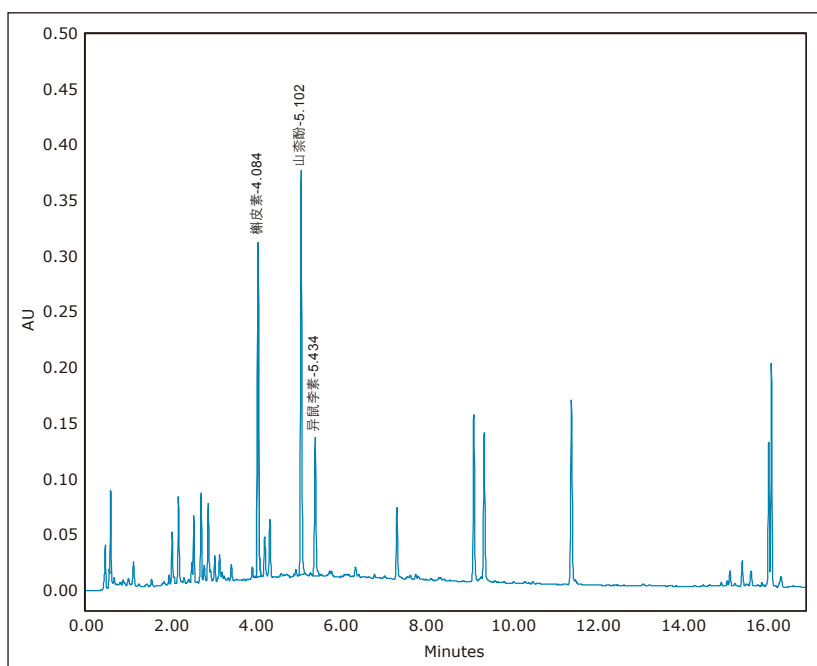


图3. 银杏叶粉末提取物的UPLC色谱图。

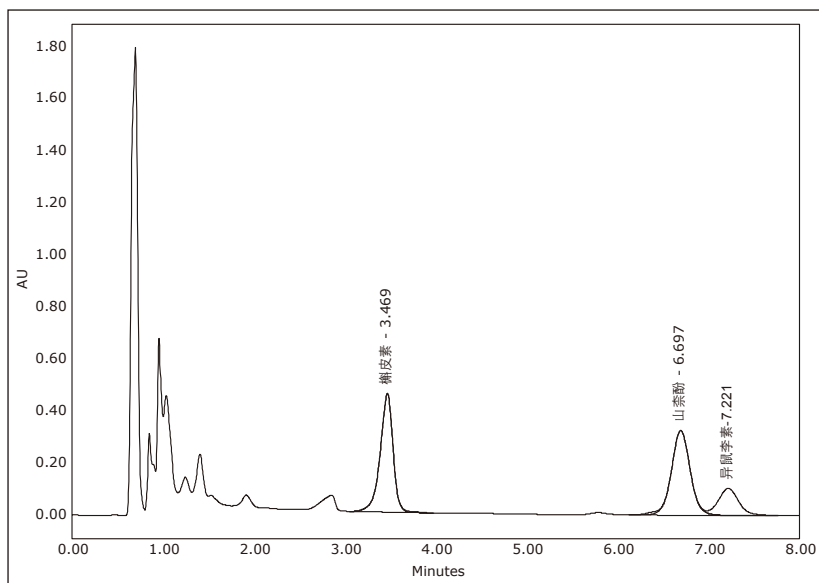


图4. 银杏叶粉末提取物的分析级等度HPLC色谱图。

Analytical to Prep Gradient Calculator

Analytical or Scouting Column
Diameter: 4.6, Length: 50, Particle Size: 5, L/dp ratio: 10

Preparative Column
Diameter: 19, Length: 100, Particle Size: 5, L/dp ratio: 20

System Dwell volume (mL)
Analytical: 0.88
Prep: 1

[How to calculate Dwell volume](#)

Enter Analytical Gradient Conditions

Time	Flow	%A	%B
0.00	1.40	98	2
Hold step	0	1.40	98
	10.00	1.40	50
	11.00	1.40	98

A B

Solvent used per gradient (mL) 12.0 5 mL

Total solvent per gradient (mL) 17 mL

Prep Flow Rate Override

If the scaled Prep flow rate is higher than you would like, enter the flow rate you would prefer and it will calculate a new gradient table

Constant Linear Velocity Gradients

Scaled Preparative Gradient (without dwell volumes)

Time	Flow	%A	%B
0.00	23.88	98	2
Hold step	0.00	23.88	98
	20.00	23.88	50
	22.00	23.88	98

A B

Solvent used per gradient 389 mL 137 mL

Total solvent per gradient 526 mL

Scaled Preparative Gradient (with Dwell volumes)

Time	Flow	%A	%B
0.00	23.88	98	2
Hold step	1.22	23.88	98
	21.22	23.88	50
	23.22	23.88	98

A B

Solvent used per gradient 418 mL 136 mL

Total solvent per gradient 556 mL

Reset
Print

图5. 沃特世ChromScope分析级至制备级梯度计算器。

实验通过等度纯化分离方法和基于阈值的馏分收集方法，使用0.25 mL的进样量实现了结果可接受的制备级分离(图6)。通过ChromScope软件可设置在收集时间段中通过阈值收集轻松实现各馏分的收集(图7)。本示例中定义了一对收集时间段(3.0至4.0 min和6.0至7.5 min)，定义时间段以外洗脱出的所有峰都不会收集到最终的组分中。每个定义时间段中的洗脱峰必须满足峰阈值条件(本示例中第一个时间段的阈值为25 mAU，第二个时间段阈值为15 mAU)才能实现正确的收集操作。根据UPLC分析(数据未示出)，所收集馏分的纯度分析显示三种化合物的紫外吸收峰面积%纯度分别为87%、96%和85%。

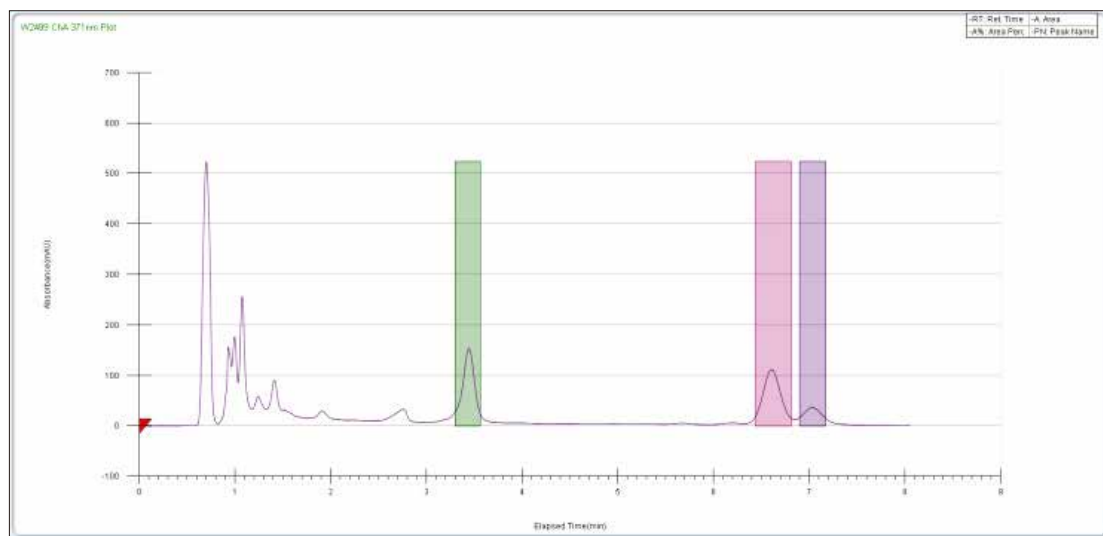


图6. ChromScope制备级HPLC色谱图，显示有三个收集峰。

Fraction Collection Parameters									
Current selected window: 2									
Window #	Single Fraction	Collection Type	Select Detector Signal	Threshold Start (mAU)	Threshold Stop (mAU)	Time Window Start (min.)	Time Window Stop (min.)	Collect waste within time window	Fraction is Inverted
1	<input type="checkbox"/>	Signal Threshold	[W2489] 2DChannel_1	25.0000	25.0000	3.000	4.000	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>	Signal Threshold	[W2489] 2DChannel_1	15.0000	15.0000	6.000	7.500	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>							<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

图7. ChromScope馏分收集方法。

结论

- 本实验采用沃特世Prep 150 LC制备级HPLC系统对银杏叶粉末提取物中的物质进行了分离与纯化。
- 沃特世ChromScope软件(1.4版)的全面化系统控制提供了出色的系统灵活性, 用户可对所有的方法参数进行轻轻修改。
- 实验先开发出了分析级分离方法, 然后利用分析级至制备级梯度计算器将此方法几何放大至Prep 150 LC系统上的19 100 mm制备级色谱柱。
- 简单易设置的馏分收集实现了目标化合物的精确收集。
- 初始提取物中包含15%的槲皮素和18%的山柰酚, 通过这套易于使用的Prep 150 LC系统可将每种组分的纯度提高到87%以上。

参考文献

1. *PDR for Herbal Medicines*, 4th Ed., 2007, Thompson Healthcare Inc, Montvale NJ, U.S.A.
2. *Natural Products Isolation* 2nd edition, edited by S.D. Sarker, Z. Latif, A.I., 2006 Humana Press Inc, Totowa, NJ, U.S.A.
3. "Analytical HPLC to Preparative HPLC: Scale Up Techniques using a Natural Product Extract." Andrew Aubin and Ronan Cleary. Waters Application Note 720003120en, 2009

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPLC, UPLC, Empower和XBridge是沃特世公司的注册商标。ChromScope和OBD是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司 印制于中国
2013年11月 720004839ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010-5209 3866
上海: 021-6156 2666
广州: 020-2829 5999
成都: 028-6578 4990
香港: 852-2964 1800

免费服务热线: 800(400)820 2676
www.waters.com