

[研究简报]

并行捕集柱 SFE-HPLC 在线联用系统的构建及应用

张 洁¹, 梁 振¹, 张丽华¹, 张维冰¹, 霍玉书², 张玉奎¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116023;

2. 德克萨斯大学健康科学中心, 圣安东尼奥 78229-3900)

关键词 超临界流体萃取; 高效液相色谱; 灵芝

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)12-2291-03

超临界流体萃取(SFE)技术已经被广泛用于天然产物中有效成分的提取^[1~3]. 它易于实现与高效液相色谱、气相色谱和超临界流体色谱等分析仪器的在线联用^[4~10]. 其中 SFE-HPLC 在线联用系统可以将萃取物完全转移到分析柱, 使得检测灵敏度大大提高, 所需样品量减小, 分析时间缩短, 而且能够避免样品污染、变质, 尤其适合对光或空气敏感型的化合物、珍贵样品和痕量样品的萃取分离分析^[11]. 本文在前期研究^[12]的基础上, 发展了采用自动十通阀/并行捕集柱接口构建了 SFE 和 HPLC 在线联用的新装置, 并利用该系统对灵芝子实体的超临界萃取过程进行实时监测.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 JascoTM超临界流体萃取系统(日本)包括 PU-1580 型 CO₂ 泵、CO-2060 型恒温箱、BP-1580-81 型背压控制器和自制萃取容器(10 和 0.1 mL). P230 型高效液相色谱仪(大连依利特公司); Jasco UV-2075plus 型紫外检测器(日本). 超临界萃取条件: 压力 15 MPa, 温度 35 °C, 流量 1 mL/min, 背压控制器温度 45 °C. 自动十通阀购自美国 Rhedye 公司. 捕集柱: 两根 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 5 μm i. d., 自制); 分析柱: Hypersil C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm i. d.) 色谱柱. 流动相 A 为去离子水; B 为乙腈. 线性梯度洗脱程序: 0 ~ 20 min, 流动相 B 由 30% 线性增至 52%, 流速为 1 mL/min; 20 min 后流动相 B 保持 100%, 流速变为 2 mL/min; 25 min 后流动相 B 变为 30%, 平衡色谱柱 3 min. 检测波长 254 nm. 尿嘧啶、硝基苯、萘和菲均购自沈阳联邦试剂公司. 乙腈(Scharlau Chemie S. A., 西班牙)为 Supragradient 色谱纯, 甲酸(哈尔滨化工化学试剂厂)为分析纯.

1.2 实验过程 (1) 样品制备: 将灵芝子实体(沈阳万象生物养殖公司提供)干燥, 粉碎, 过筛, 待处理. (2) 离线超临界二氧化碳萃取: 精密称取 3 g 灵芝子实体粉末 6 份, 分别置于 10 mL 萃取池中, 超临界条件下分别萃取 30, 60, 90, 120, 150 和 180 min, 称重并计算其产率. 将经 180 min 萃取后得到的样品用甲醇定容至 500 μL, 并经 0.45 μm 滤膜过滤作为对照样品, 注入液相色谱进行对照分析.

2 结果与讨论

2.1 并行捕集柱 SFE-HPLC 在线联用系统的构建 采用自动十通阀/并行捕集柱接口构建的 SFE 和 HPLC 在线联用系统见图 1, 其中两根捕集柱交替实现捕集样品和转移样品的功能. 某萃取周期内, 捕集柱 1 捕集样品, 捕集柱 2 进行分离分析[图 1(A)]. 萃取周期结束后, 切换十通阀, 捕集柱 2 开始捕集样品, 同时启动液相色谱, 将替换溶剂(纯水)引入捕集柱 1, 将残留气泡通过三通阀赶出[图 1(B)]. 以 1 mL/min 的流速冲洗所选择的捕集柱 1.2 min. 将气泡全部赶出后, 切换三通阀连通捕

收稿日期: 2006-01-24.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20375040)及中国科学院知识创新工程重要方向性项目(批准号: KGCX2-SW-213)资助.

联系人简介: 张玉奎(1942 年出生), 男, 研究员, 博士生导师, 中国科学院院士, 主要从事色谱基础理论及新技术开发应用研究.

E-mail: ykzhang@dicp.ac.cn

集柱 1 和分析柱, 同时启动已设定的梯度洗脱程序, 流动相将萃取物从捕集柱 1 中洗脱下来, 并转移到分析柱进行分离. 再次切换十通阀, 捕集柱 1 开始捕集样品, 液相色谱导入流动相对捕集柱 2 依次进行溶剂替换和色谱分离. 如此循环实现整个超临界流体萃取过程不同时间段萃取产物的分离分析.

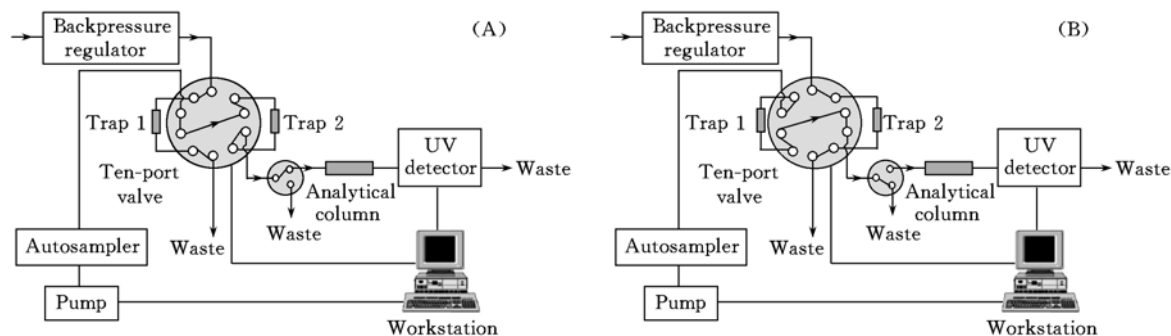


Fig. 1 Systematic diagram of parallel-trap SFE-HPLC system

(A) Extraction procedure; (B) solvent displacement procedure.

两根捕集柱能够交替实现样品的捕集和转移, 同时充当色谱分离中的预柱. 非极性的油脂类化合物被超临界二氧化碳萃取出来, 吸附在色谱柱上, 将降低色谱柱的性能, 所以捕集柱可以起到保护分离色谱柱的作用, 对样品也有一定的分离效果, 从而影响色谱峰的保留时间和峰面积. 图 2 为两根捕集柱对于 4 种标准化化合物的分离谱图. 由于这两根捕集柱同一批填充, 两张色谱图几乎完全重合, 重现性良好. 在线联用系统中, 萃取周期是重要的参数, 它包括溶剂替换、色谱分离和色谱柱平衡时间,

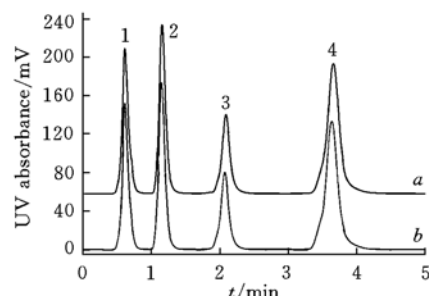


Fig. 2 Chromatograms of four standards with two traps

a. Trap 1; *b*. trap 2. Peaks: 1. Uracil; 2. nitrobenzene; 3. benzene; 4. phenanthrene.

其中色谱分离时间是最大的决定因素. 当色谱柱平衡结束时, 萃取周期正好完成. 中药萃取物的组成非常复杂, 利用 HPLC 谱进行全分析时通常需要 1 h 以上. 由于萃取物的主要色谱峰能够代表整体信息, 因此只需对影响主要色谱峰分离分析的操作条件进行优化, 就可大大缩短萃取周期.

2.2 在线联用系统应用于灵芝子实体分析 灵芝是中医药宝库中的珍品^[13]. 现代研究表明, 灵芝子实体(伞状菌体)富含的三萜类化合物是主要有效成分, 利用超临界二氧化碳提取可以得到很好的结果^[13,14]. 与传统的溶剂提取的方法相比, 萃取时间可大大缩短, 所得产品无溶剂残留. 根据文献^[14,15]方法, 利用超临界二氧化碳完全萃取灵芝子实体中三萜类化合物的萃取时间为 2~3 h, 产物组成非常复杂, 分布在 20%~100% 乙腈的洗脱区域, 但主要色谱峰可被 30%~52% 乙腈洗脱. 本文将萃取周期设定为 30 min, 通过优化液相色谱梯度洗脱条件, 对主要色谱峰进行分离检测. 图 3 谱线 *a*

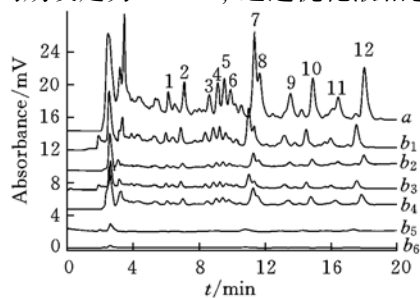


Fig. 3 Chromatograms of the off-line sample and the extracts in six extraction cycles

Sample amount: 15 mg; conditions of SFE and HPLC were shown in section 1.1. *a*. The off-line sample; *b*₁—*b*₆. the extracts in six extraction cycles.

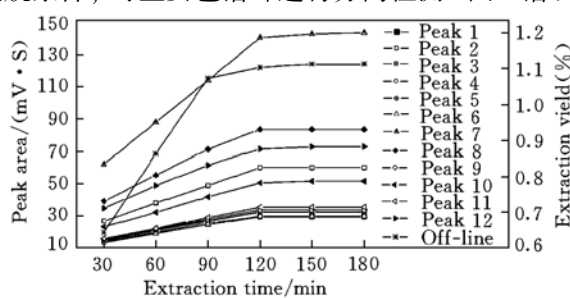


Fig. 4 Comparison of the total peak areas of 12 major peaks after various extraction cycles and the yields under the off-line extraction

是对照样品经过离线液相色谱分析的谱图, 谱线 $b_1 \sim b_6$ 是 180 min 内 6 个萃取周期的在线色谱图. 由图 3 可看出, 在优化的色谱条件下, 大多数色谱峰可以得到较好的分离, 选择其中的 12 个色谱峰作为标志峰. 图 3 谱线 a 和 $b_1 \sim b_4$ 的峰形相似, 说明产物中的化合物随着时间的延长可逐渐被萃取出来. 图 3 谱线 b_5 和 b_6 中没有明显的色谱峰, 说明灵芝子实体经过 120 min 超临界萃取已基本完成.

图 4 给出了不同萃取周期后标志峰的总峰面积和离线萃取率的比较结果. 随着萃取时间的增加, 每个色谱峰的总峰面积也随之增大, 120 min 后萃取完全, 与离线萃取率的结果相符, 说明主要色谱峰的峰面积能够代表萃取产物的整体信息, 在线的结果能够很好地反映真实的萃取过程.

参 考 文 献

- [1] Smith R. M. . J. Chromatogr. A[J], 1999, **856**: 83—115
- [2] Lang Q. Y. , Wai C. M. . Talanta[J], 2001, **53**: 771—782
- [3] LI Yu-Qun(李毓群), SHI Shun-Qing(施顺清). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药)[J], 2002, **33**(6): 572—574
- [4] Wang Z. Y. , Ashraf-Khorassani M. , Nazem N. *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 2004, **1033**: 221—227
- [5] Wang Z. Y. , Ashraf-Khorassani M. , Taylor L. T. . Anal. Chem. [J], 2003, **75**: 3979—3985
- [6] Stolker A. A. M. , Tricht E. F. V. , Zoontjes P. W. *et al.* . Anal. Chim. Acta[J], 2003, **483**:1—9
- [7] Shimmo M. , Anttila P. , Hartonen K. *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 2004, **1022**:151—159
- [8] Shimmo M. , Adler H. , Hyötyläinen T. *et al.* . Atmos. Environ. [J], 2002, **36**(18): 2985—2995
- [9] Suto K. , Kakinuma S. , Ito Y. . J. Chromatogr. A[J], 1997, **786**(2): 371—376
- [10] Petersson U. , Markides K. E. . J. Chromatogr. A[J], 1996, **734**(2): 311—318
- [11] Luque de Castro M. D. , Tena M. T. , Valcarcel M. . Analytical Supercritical Fluid Extraction[M], Berlin: Springer-Verlag, 1994: 66—75
- [12] ZHANG Jie(张 洁), DUAN Ji-Cheng(段继诚), ZHANG Yu-Kui(张玉奎) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(10): 1832—1834
- [13] LIN Zhi-Bin(林志彬). Modern Research on Ganoderma Lucidum, 2nd Edition(灵芝的现代研究, 第2版)[M], Beijing: Beijing Medical University Press, 2001: 1—6
- [14] Hsu R. C. , Lin B. H. , Chen C. W. . Ind. Eng. Chem. Res. [J], 2001, **40**: 4478—4481
- [15] ZHANG Jie(张 洁), DUAN Ji-Cheng(段继诚), ZHANG Yu-Kui(张玉奎) *et al.* . Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2006, **34**(4): 447—451

Establishment and Application of On-line Parallel-trap SFE-HPLC System

ZHANG Jie¹, LIANG Zhen¹, ZHANG Li-Hua¹, ZHANG Wei-Bing¹, HUO Yu-Shu², ZHANG Yu-Kui^{1*}

(1. National Chromatographic R&A Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Health Science Center at San Antonio, The University of Texas, San Antonio 78229-3900, USA)

Abstract A novel on-line parallel-trap supercritical fluid extraction(SFE)-high performance liquid chromatography(HPLC) system was established. The interfere consisted of automated ten-port valve and parallel traps were used to carry out continuous and alternate trapping and transferring of the sample extracted with supercritical carbon dioxide, and HPLC was used to analyze the transferred sample. The novel on-line system was used to monitor the extraction process of fruiting bodies of Ganoderma lucidum. The extracts of six consecutive cycles were analyzed and the optimum extraction time was determined, which accorded with the result obtained with off-line extraction. Using this system, the whole process can be monitored and the optimum extraction time can be determined with single run. In addition, it has many other advantages, such as low sample loading, high sensitivity and accuracy, short analysis time, avoiding sample pollution and easily operation *etc.* The system shows a great potential in the extraction and analysis of the complicated samples including traditional Chinese medicine and environmental samples *etc.*

Keywords Supercritical fluid extraction; High performance liquid chromatography; *Ganoderma lucidum*

(Ed. : A, G)