

SFE-SFC-UV 与超高效液相色谱法比对分析红花羊蹄甲中的成分

SFE-SFC-001

摘要：本建立一种 SFE-SFC-UV 在线测定分析红花羊蹄甲中的成分，并且对 SFE 分流出的组分进行高效液相色谱分析，比对两种分析方法在天然产物成分提取分离上的优缺点。SFE-SFC 是集在线萃取在线分离检测于一体的分析技术，极大程度的简化了其前处理的繁冗步骤以及不可预计的人为操作误差以及错误。此外对于易挥发，易降解，极性溶剂萃取难度大，处理后无法进行反相液相色谱分析的问题，使用 SFE-SFC 技术可以较为方便的解决。

关键词：超临界流体萃取 超临界流体色谱 红花羊蹄甲

红花羊蹄甲 (*Bauhinia blakeana* Dunn) 又名洋紫荆、紫荆花，属于、豆科 (Leguminosae) 羊蹄甲属 (*Bauhinia*) 中等乔木，该品种终年常绿繁茂，花色艳丽，常作为观赏花木。其树皮含单宁，可用作鞣料和染料；树根、树皮和花朵可入药。红花羊蹄甲花含有丰富的天然红色素，而天然色素具有色调自然、安全性高、含有人体所需要的营养成分，有的还具有抗氧化、抗肿瘤、抗突变、预防心脑血管疾病的生理功能。本文使用超临界流体萃取 - 超临界色谱联用技术在线对红花羊蹄甲粉末进行萃取分离，与此同时对部分萃取馏分进行收集浓缩，进行

液相色谱分析。比对两种分析技术在天然产物提取分离方面的特点。

超临界流体具有许多独特的性质，如粘度小、密度、扩散系数、溶剂化能力等性质随温度和压力变化十分敏感：粘度和扩散系数接近气体，而密度和溶剂化能力接近液体。超临界流体密度很大，具有溶解性能，减压后又能立刻结晶析出。通过添加共溶剂 (Modifier) 进行萃取剂以及洗脱剂的极性修饰可以一定程度上扩大 SFE-SFC 联用技术的分析范围。

实验部分

1.1 药物

红花羊蹄甲粉末由北京大学医学部生药系提供。

1.2 仪器

本实验使用岛津 SFE-SFC 联用系统以及超高效液相色谱仪 Nexera XR 统。SFE-SFC 具体配置为 LC-30AD_{SF} 超临界 CO₂ 输液泵，LC-20AD_{XR} 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SFE-30A 超临界萃取仪，CTO-20A 柱温箱，SPD-20A 紫外检测器，SFC-30A×2 超临界色谱背压调节单元，CBM-20A 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站；超高效液相色谱具体配置：LC-20AD_{XR}×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-20AC_{XR} 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，SPD-M20A 二极管阵列检测器 CBM-20A 系统控制器，LCMSolutions Ver. 3.80 工作站。Shimadzu 电子天平。

1.3 试剂

甲醇购自美国 Fisher 公司 (Fairlawn, NJ, USA)；甲酸 (纯度 99%，LCMS 级，Wako, Japan)。

方法和结果

2.1 前处理方法

精密称取 1 mg 红花羊蹄甲粉末置于 5 mL 萃取罐内，加盖滤纸，封存上机分析。分流吸收液为甲醇 / 异丙醇 (9:1, v/v)，吸收剂吸收结束后，吸收剂于 40°C N₂ 吹近干浓缩，加入甲醇 1mL 进行 LC 上样分析。

2.2 超临界萃取条件

同一份样品依次使用不同比例的共溶剂进行超临界萃取

萃取比例：1%、5%、10% 以及 20%

萃取流速：5.0 mL/min

萃取温度：40.0°C

静态萃取时间：1 min

动态萃取时间：1 min

2.3 超临界色谱条件

色谱柱：Shim-pack UC-X Diol 4.6×150 mm 3 μm

Modifier：0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：3.0 mL/min

柱温：60.0°C

出口压力 (outlet pressure)：20 MPa

分流压力：25 MPa

2.3.1 1% 共溶剂萃取洗脱条件

0.00 min PumpB 1%

15.00 min Pump B 5%

30.00 min Pump B 20%

40.00 min Pump B 40%

2.3.2 25% 共溶剂萃取洗脱条件见 2.3.1

2.5 萃取成分色谱图比对

2.3.3 10% 共溶剂萃取洗脱条件

0.00 min PumpB 10%

19.00 min Pump B 20%

40.00 min Pump B 30%

50.00 min Pump B 40%

2.3.4 20% 共溶剂萃取洗脱条件

0.00 min PumpB 10%

10.00 min Pump B 20%

40.00 min Pump B 30%

45.00 min Pump B 40%

50.00 min Pump B 40%

2.4 超高效液相色谱条件

色谱柱：Inertsil® ODS-4 2.1×250 mm, 5 μm

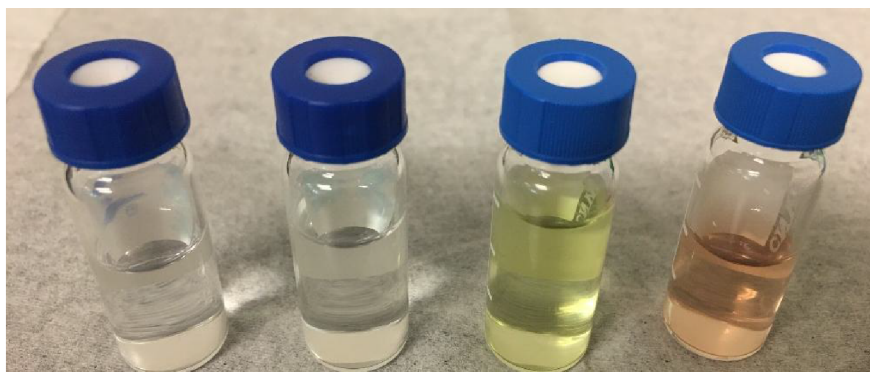
流动相：0.1% 甲酸水溶液；乙腈

柱温：40°C

流速：0.4 mL/min

洗脱条件：0.00 min 90:10；70.00 min 5:95；80.00 min 5:95

进样体积：10 μL

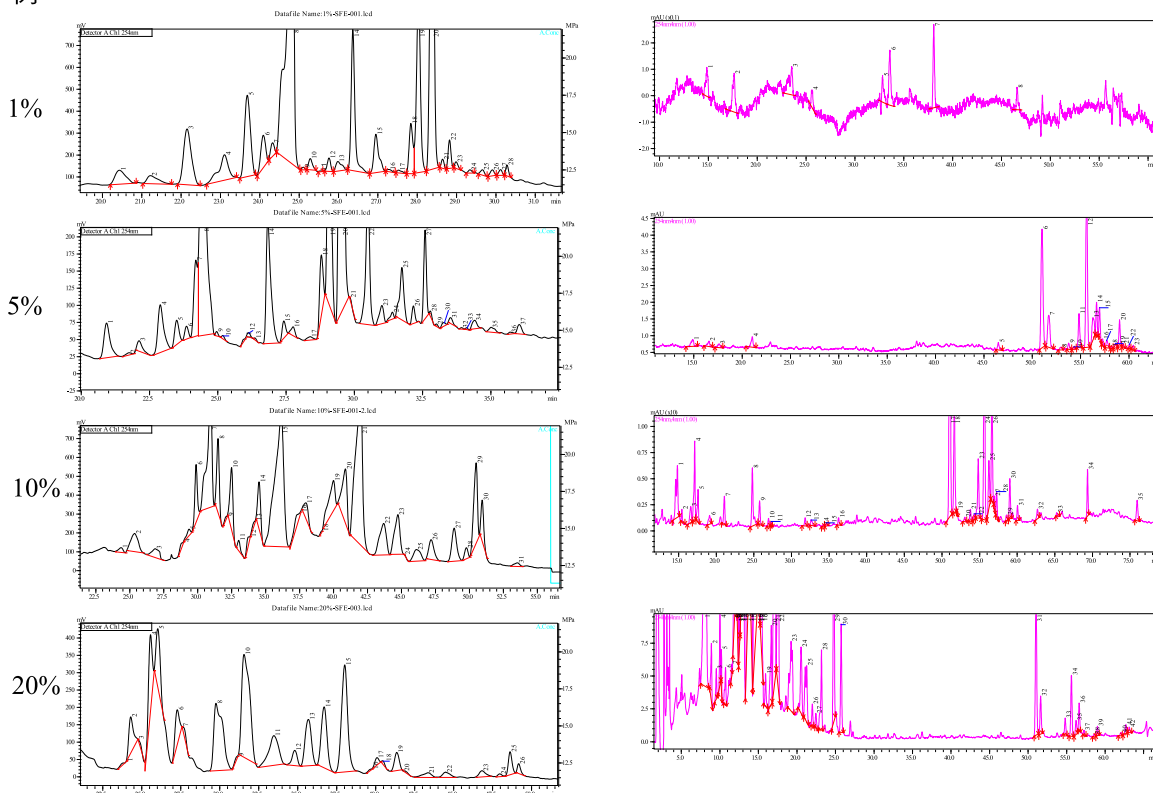


上图自左至右分别是共溶剂 1%、5%、10%、20% 萃取回收成分。

萃取
 比例

SFE-SFC-UV

HPLC-UV



参考方法开发系统对色谱分离评价系统，对两种分析技术分析同一样品进行评分，评分如下：

分离技术 评价指标	SFE-SFC-UV			HPLGUV		
	峰个数	分离度和	评分	峰个数	分离度和	评分
1%	28	42.933	1202.124	8	20.311	162.488
5%	37	57.938	2143.706	23	48.66	1119.18
10%	31	47.774	1480.994	35	80.838	2829.33
20%	26	41.327	1074.502	42	87.482	3674.244

由上表可知，对于极性较低的化合物，如在 1% 和 5% 共溶剂萃取比例分离得到的化合物，SFE-SFC-UV 能够分离分析更多的化合物，而对于高共溶剂萃取比例得到的化合物，在 HPLC 上能得到更好的分离效果。

结论

本文建立使用岛津 SFE-SFC-UV 和超高效液相色谱仪 LC-20A 分别对同一样品进行了分离，并对分离结果进行了评价。结果显示，极性较低的化合物更适用于在 SFE-SFC 上进行分离，而极性较高的化合物更适用于 HPLC 上进行分离。此外，由于 SFE-SFC 采用在线联用系统，极大地节省了前处理步骤以及前处理时间，降低人为错误与误差，而且由于体系处于非氧条件，对于极易被氧化的抗氧化物质，如天然色素、花青素等的分析较为有利。