

# 红花提取物的全二维液相色谱分析

LC-146

**摘要：** 本文使用岛津的 Nexera-e 全二维液相色谱系统对红花粉末的甲醇提取物进行了分析。结果表明，相比传统的一维液相色谱的结果，采用全二维系统分离出了更多的组分，且原先在传统一维系统上分不开的组分，在全二维系统上得到了较好的分离。使用 LC×LC Assistant 梯度程序自动生成软件避免了在二维上色谱峰应溶剂效应而产生的展宽，从而保证了充足的峰容量。采用 ChromSquare 全二维数据处理软件共识别出了 81 个组分。

**关键词：** 红花 全二维液相色谱

红花是菊科 1-2 年生草本植物，至今已有 2100 年的栽培历史。红花有多种广泛使用的功效成分，是一种重要的经济作物和传统中药。近年来，国内外学者针对红花的成分分析鉴定、药理药效、分离纯化等进行了广泛研究，红花已经成为了中草药研究的一个热点。鉴于红花对身体健康和疾病预防的重要性，迫切需要掌握红花本身的确切成分。一方面掌握红花药效成分可为进一步的药理活性研究提供物质基础，另一方面有助于药品的质量监控。但红花的化学成分复杂多样，已知含有红花黄色素、红花甙、红花油、木聚糖类等上百种化学成分，

想要通过传统的液相色谱方法分析如此复杂的组分几乎是不可能的，因为仅使用一种色谱模式往往不能提供足够的分离度和峰容量。而二维液相色谱系统因仪器结构简单、操作方便、可以实现不同分离模式的偶联等特点在生物样品分析方面具有非常广阔的应用前景。本文以酸性条件为第一维色谱分析的流动相，以中性条件为第二维色谱分析的流动相，在两维中均采用反相分离模式构建的二维液相色谱分离系统，对红花的甲醇提取物进行了分离，取得了较好的结果。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津 Nexera-e 全二维液相色谱系统。具体配置为 LC-30AD×4( 输液泵 )，DGU-20A<sub>5R</sub>、DGU-20A<sub>3R</sub>( 在线脱气机 )，SIL-30AC( 自动进样器 )，CTO-20AC( 柱温箱 )，FCV-32AH×2( 高压流路切换阀 )，SPD-M30A( 二极管阵列检测器 )，CBM-20A( 系统控制器 )，LabSolutions Ver.5.71( 色谱工作站 )，LC×LC Assistant( 时间程序生成软件 ) 和 ChromSquare Ver.2.0( 全二维数据处理软件 )。

### 1.2 分析条件

<1<sup>st</sup>D LC >

色谱柱：Shim-pack GIST C18 250 mm L.× 1 mm ID.,

3 μm

流动相：A-10 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.9);

B- 乙腈

流速：0.05 mL/min

柱温：40°C

进样量：2 μL

时间程序：参见图 1

<2<sup>nd</sup>D LC >

色谱柱：Shim-pack XR-ODS 50 mm L.× 4.6 mm

ID., 2.2 μm

流动相：C-0.1% 磷酸水溶液;

D- 乙腈

流速：2.5 mL/min

柱温：40°C

进样量：50 μL(Loop 环体积)

时间程序：参见图 1

检测波长：MaxPlot: 240-450 nm

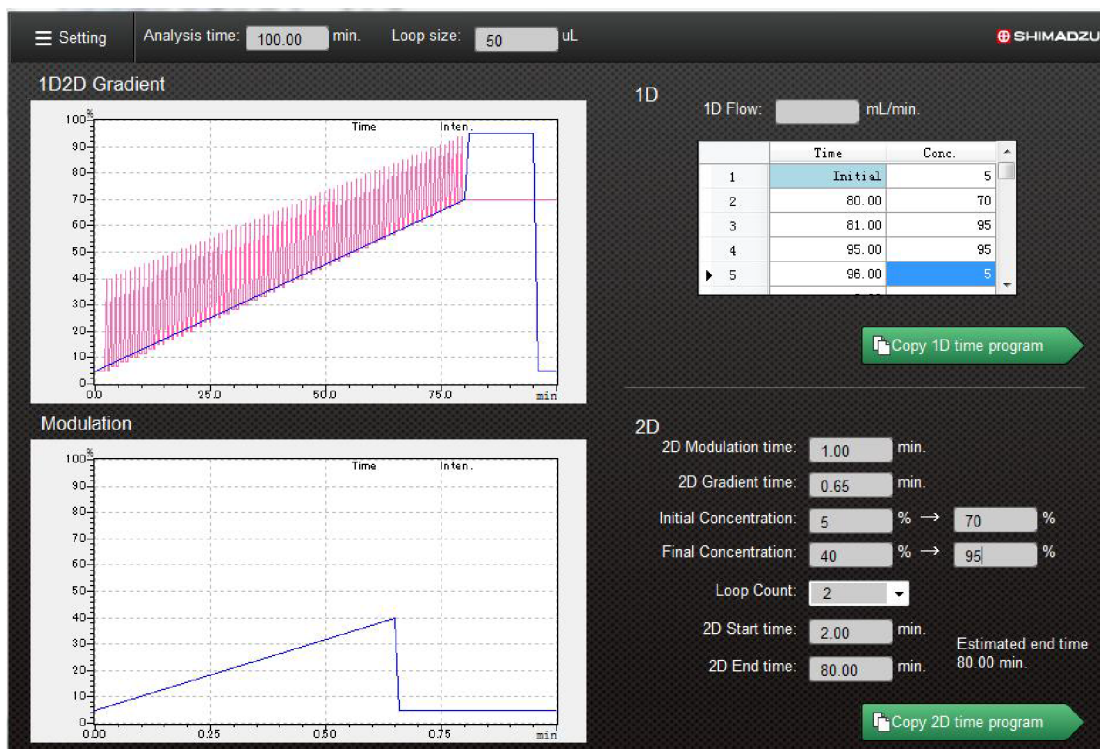


图1 一维及二维LC梯度程序

### 1.3 样品制备

取 1 g 红花粉末用 5 mL 甲醇 30 min 超声提取，经过 0.22 μm 滤膜过滤后使用 Nexera-e 全二维液相色谱进行分析。

## 结果讨论

### 2.1 样品一维分析结果

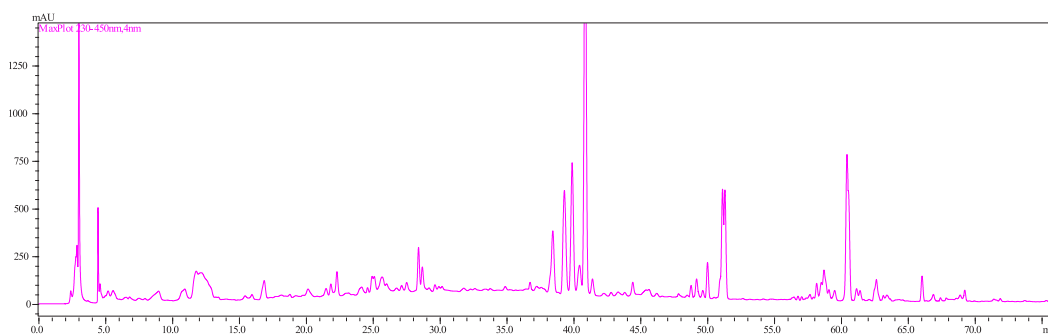


图2 样品一维液相色谱图

仅使用一维色谱柱按照一维实验条件测得的样品色谱图如图 2 所示，从图中可见有很多色谱峰没能彻底分开。

### 2.2 样品二维分析结果

按照二维液相实验条件测得的色谱图如图 3- 图 17 所示。其中图 3 是整体时间段的色谱图，图 4- 图 17 是采集间隔 5 min 的局部放大图。可见在二维液相中基线平稳，色谱峰形尖锐对称，大部分色谱峰均有良好的分离度。

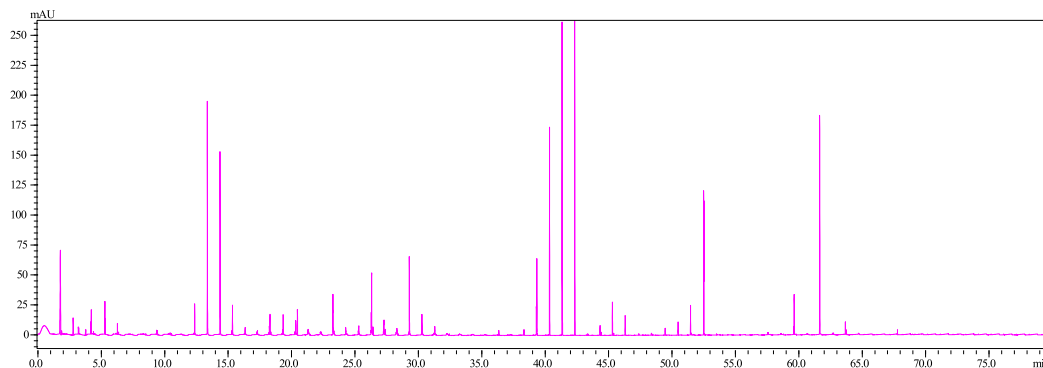


图3 样品二维液相色谱图(整体图)

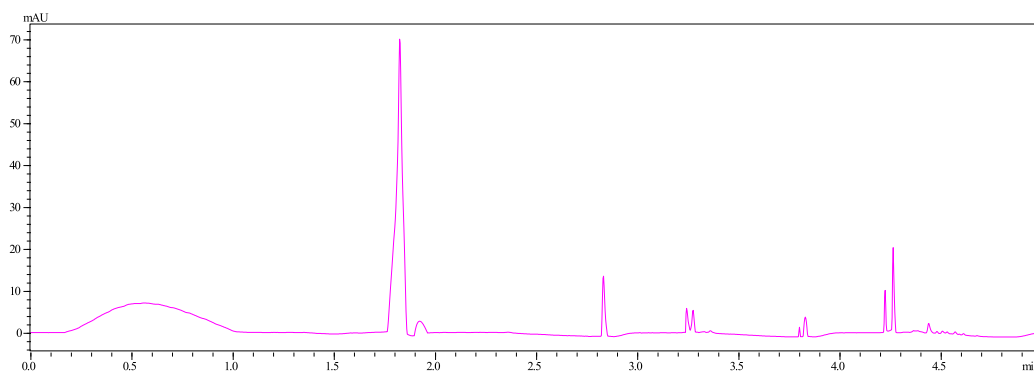


图4 样品0-5 min二维液相色谱图

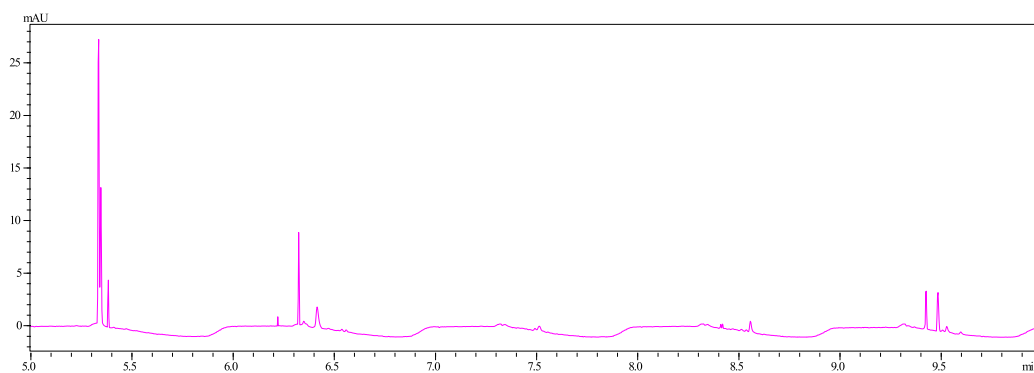


图5 样品5-10 min二维液相色谱图

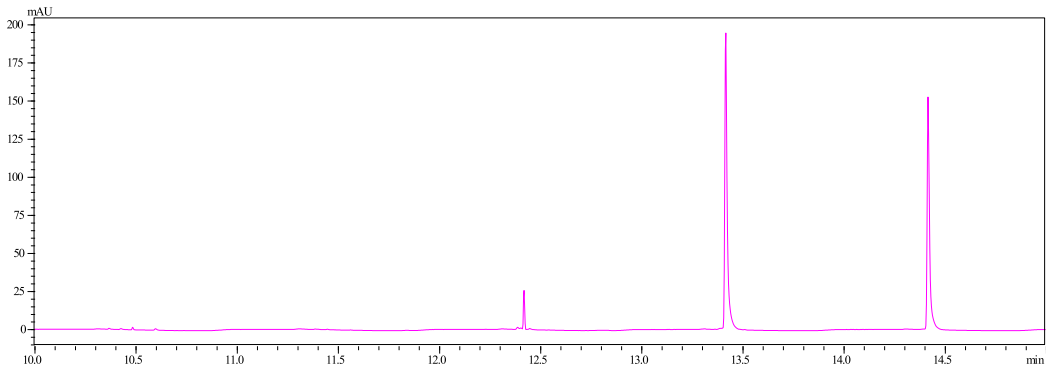


图6 样品10-15 min二维液相色谱图

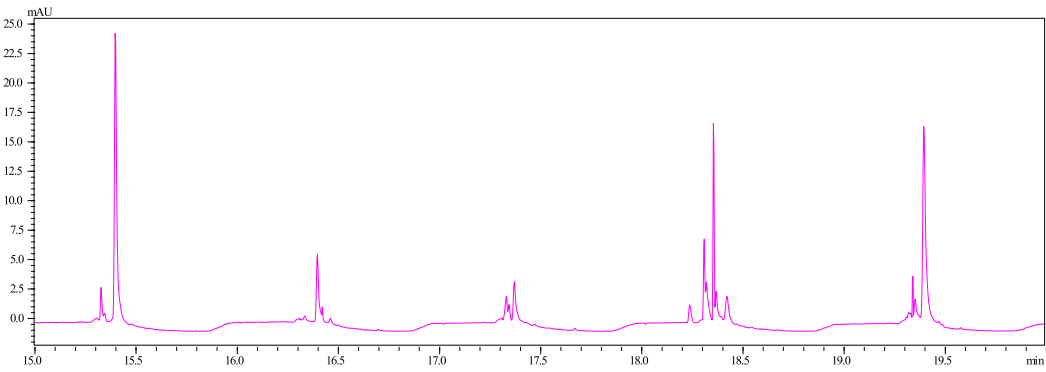


图7 样品15-20 min二维液相色谱图

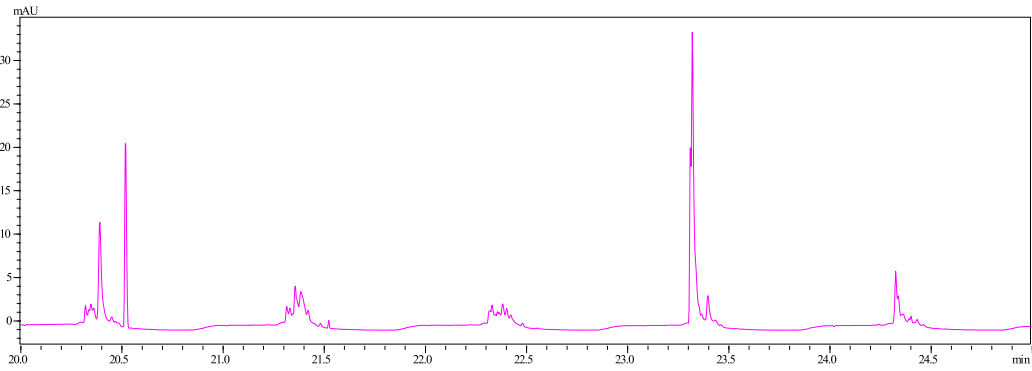


图8 样品20-25 min二维液相色谱图

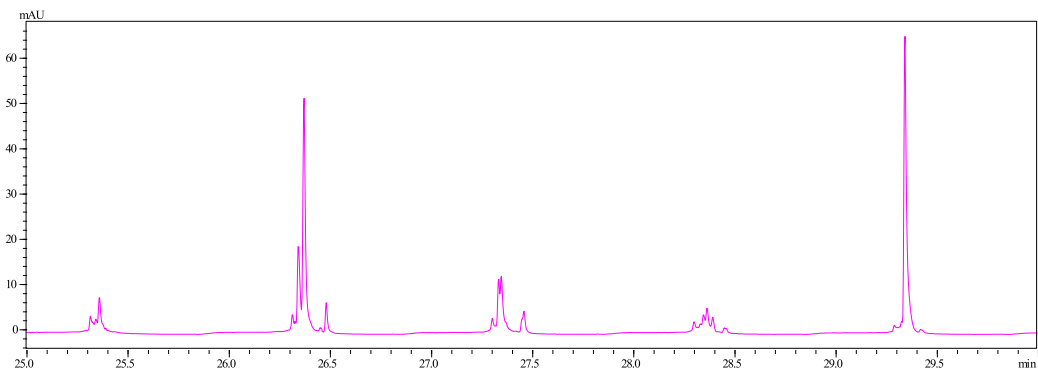


图9 样品25-30 min二维液相色谱图

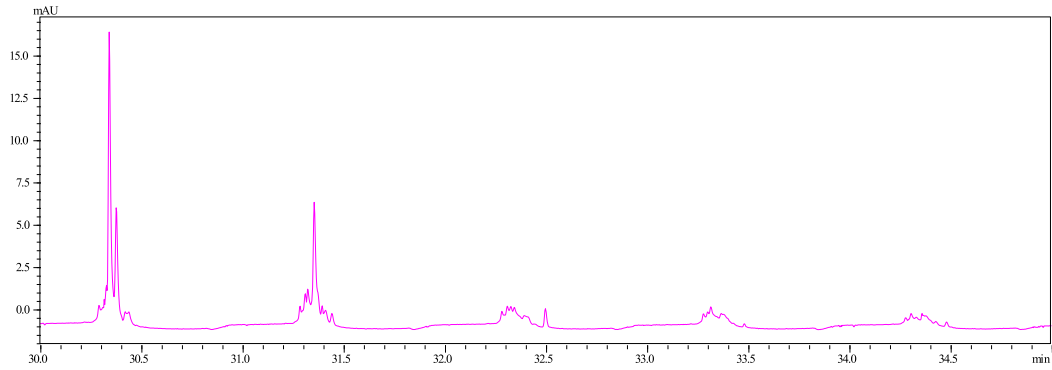


图10 样品30-35 min二维液相色谱图

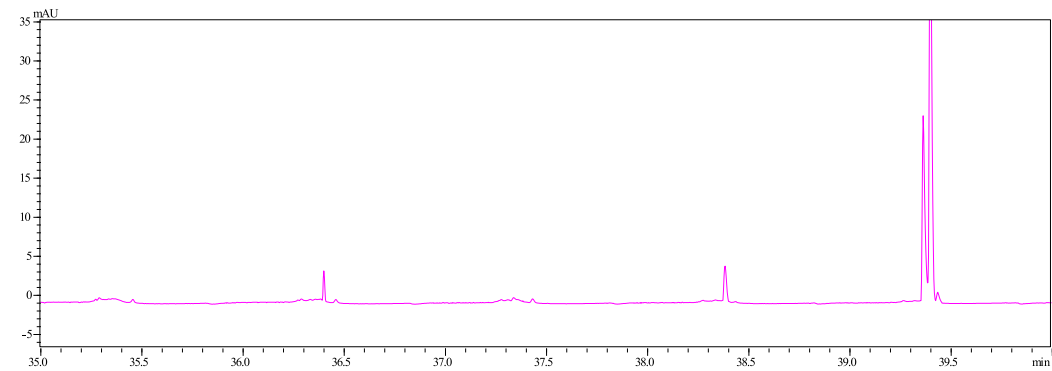


图11 样品35-40 min二维液相色谱图

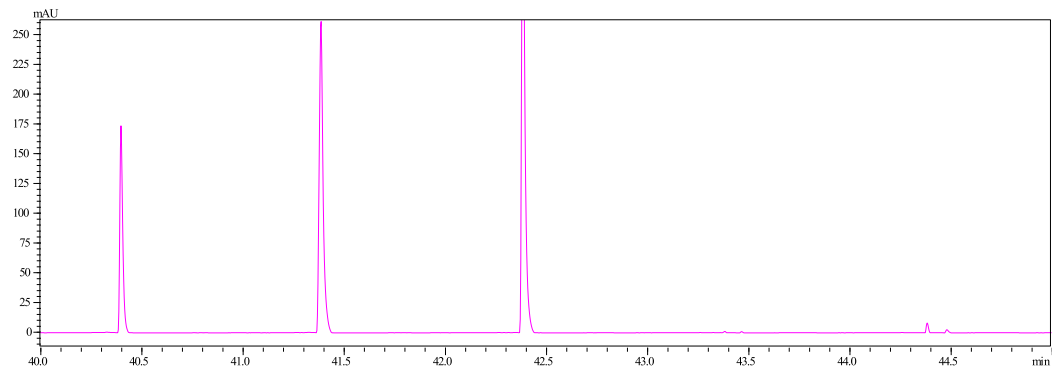


图12 样品40-45 min二维液相色谱图

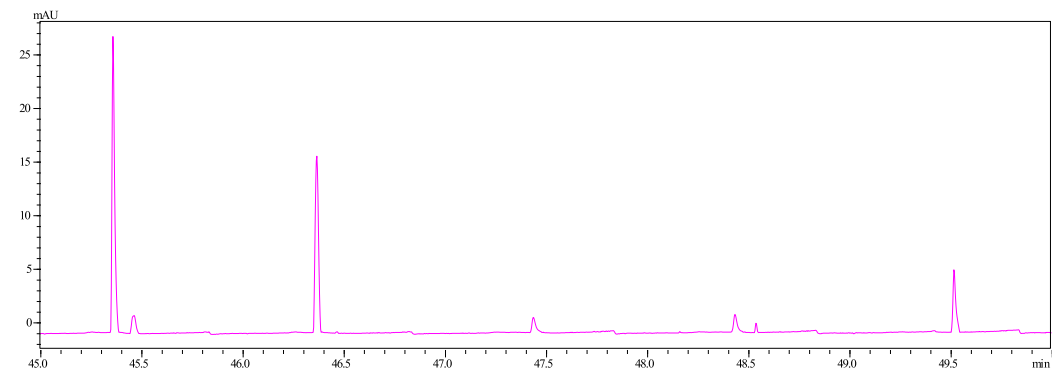


图13 样品45-50 min二维液相色谱图

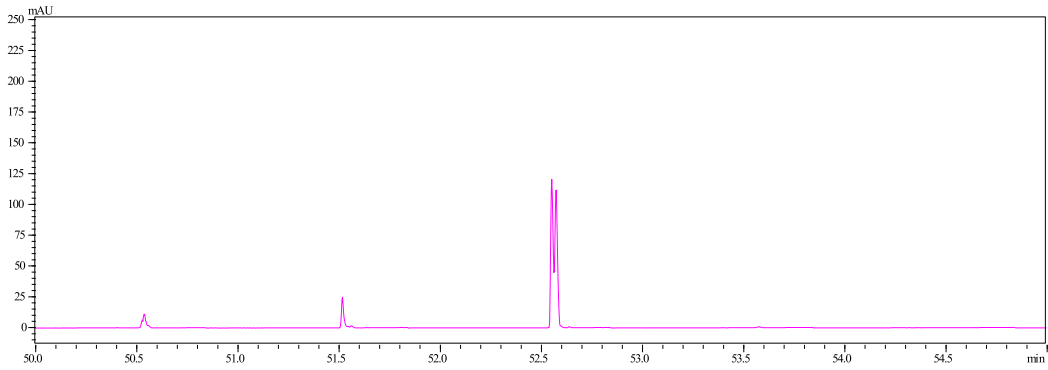


图14 样品50-55 min 二维液相色谱图

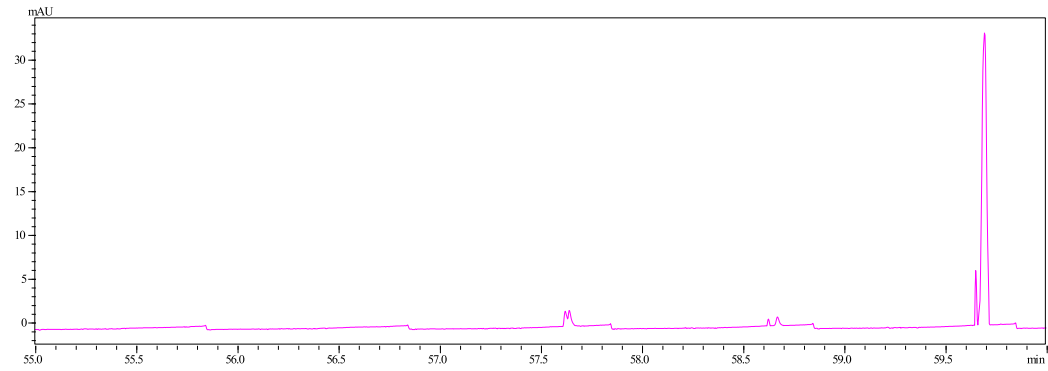


图15 样品55-60 min 二维液相色谱图

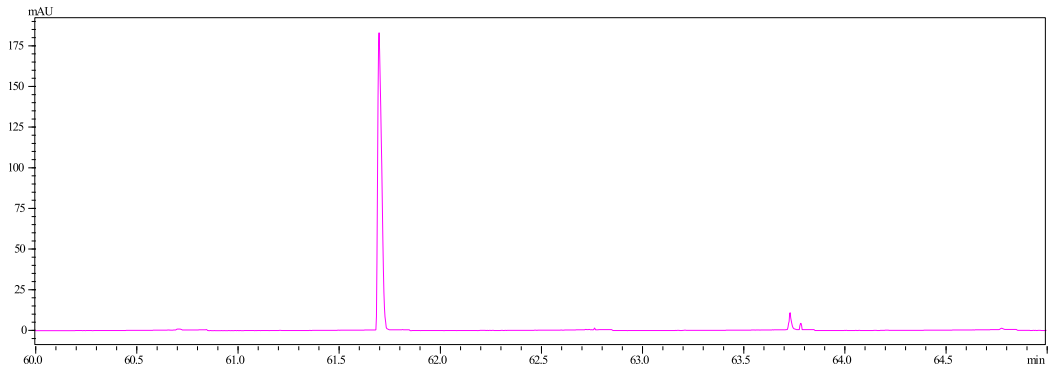


图16 样品60-65 min 二维液相色谱图

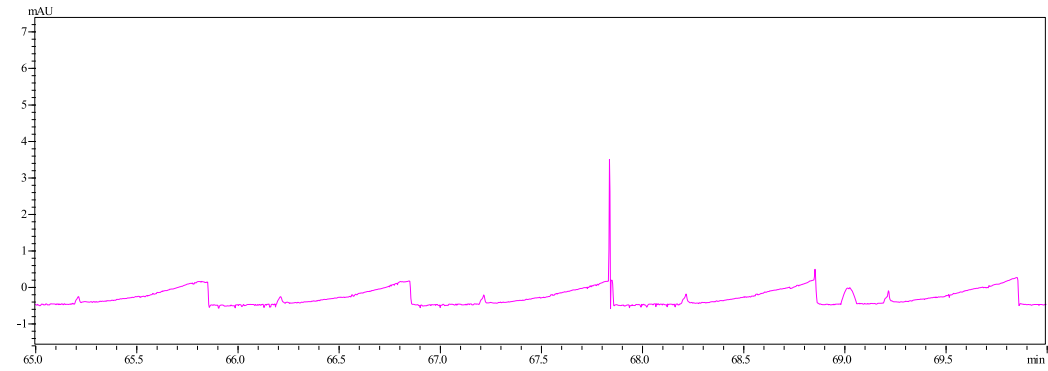


图17 样品65-70 min 二维液相色谱图

### 2.3 样品色谱图全二维软件处理结果

整体时间段内样品 2D 与 3D 视图分别如图 18 至图 19 所示。可见大部分组分出峰呈点状分布，各点间有良好的分离度。经 ChromSquar 全二维处理软件积分识别出 81 个色谱峰，峰表如表 1 所示。

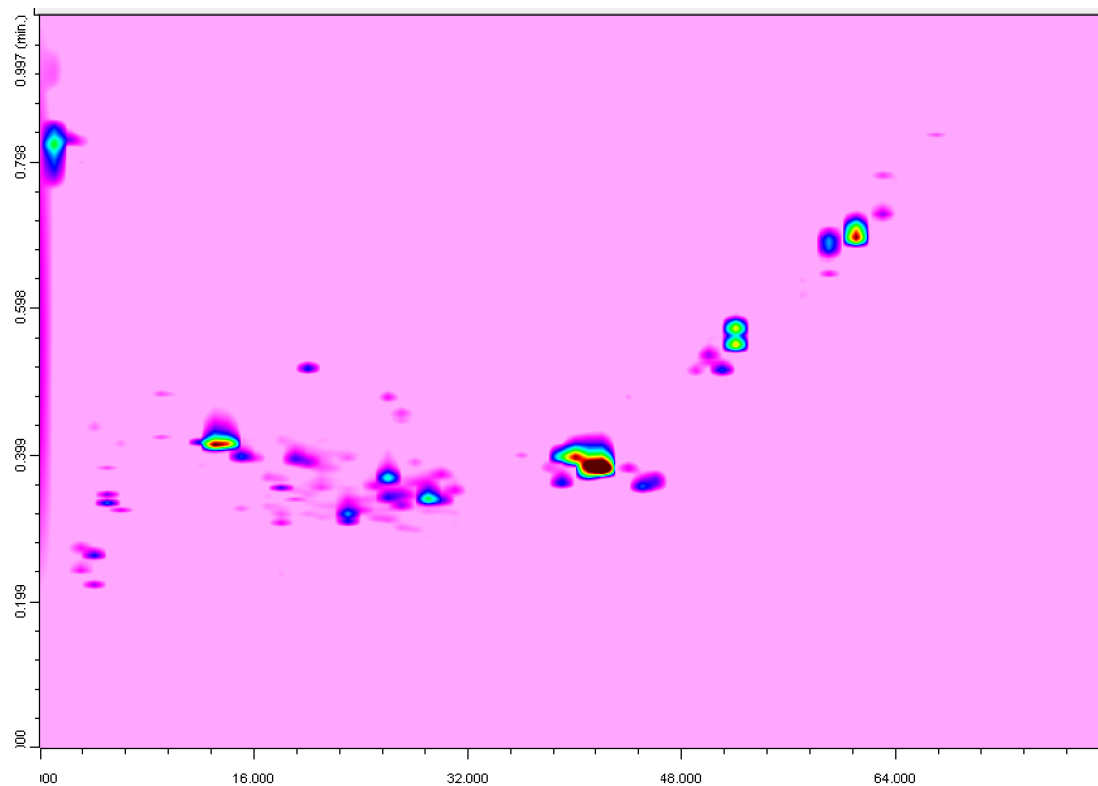


图18 样品全二维软件处理色谱图2D视图

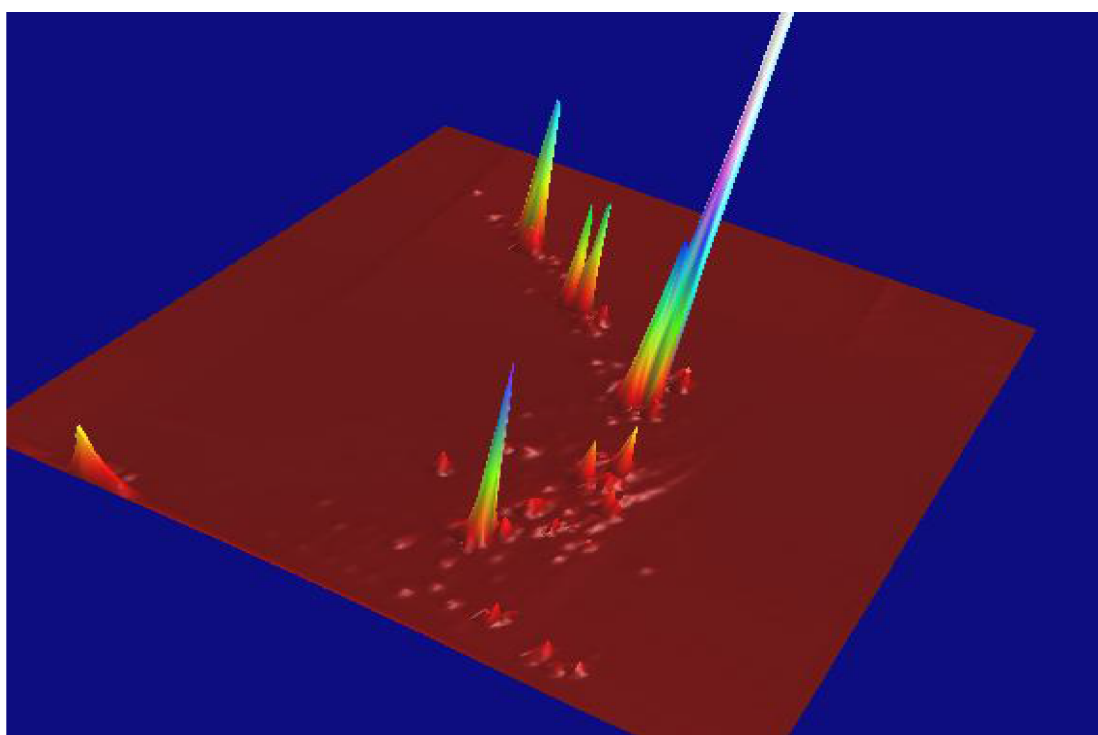


图19 样品全二维软件处理色谱图3D视图

两个出峰密集的时间段一维时间 9-32 min 及 43-68 min 的局部放大的 2D 及 3D 视图分别如图 20 与 21 及图 22 与 23 所示。在此时间段内各组分依然有较好的分离度。

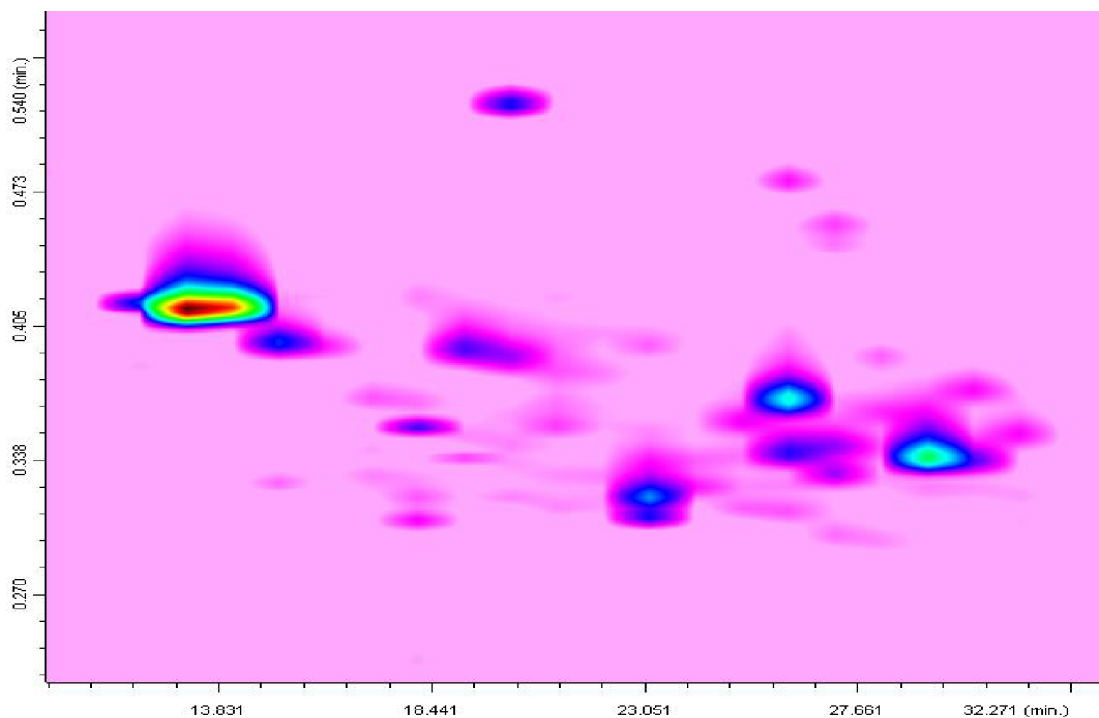


图20 9-32 min组分全二维软件处理色谱图2D视图

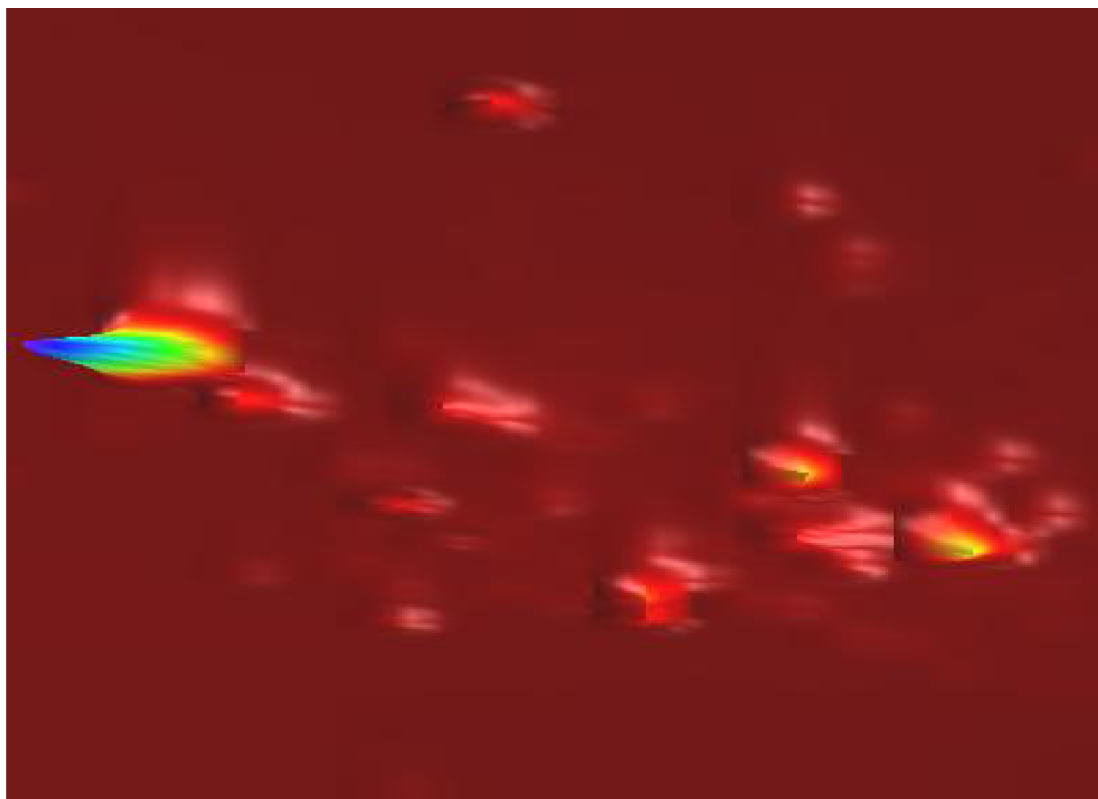


图21 9-32 min组分全二维软件处理色谱图3D视图

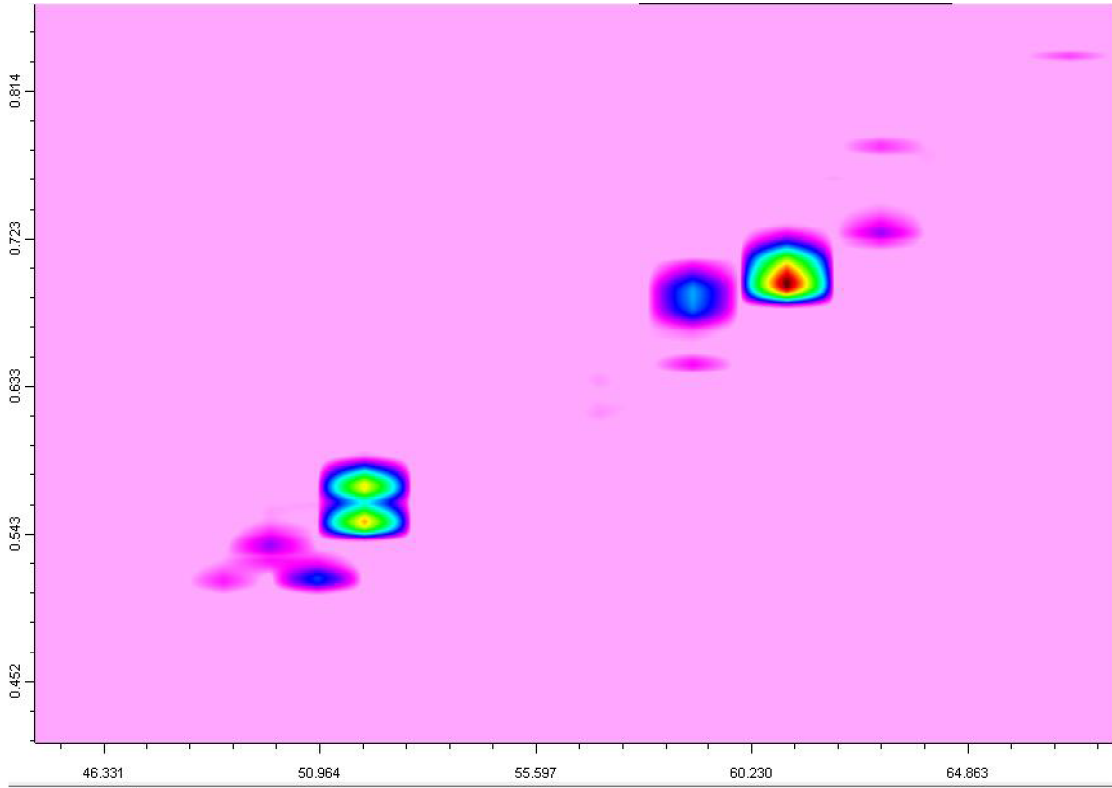


图22 43-68 min组分全二维软件处理色谱图2D视图

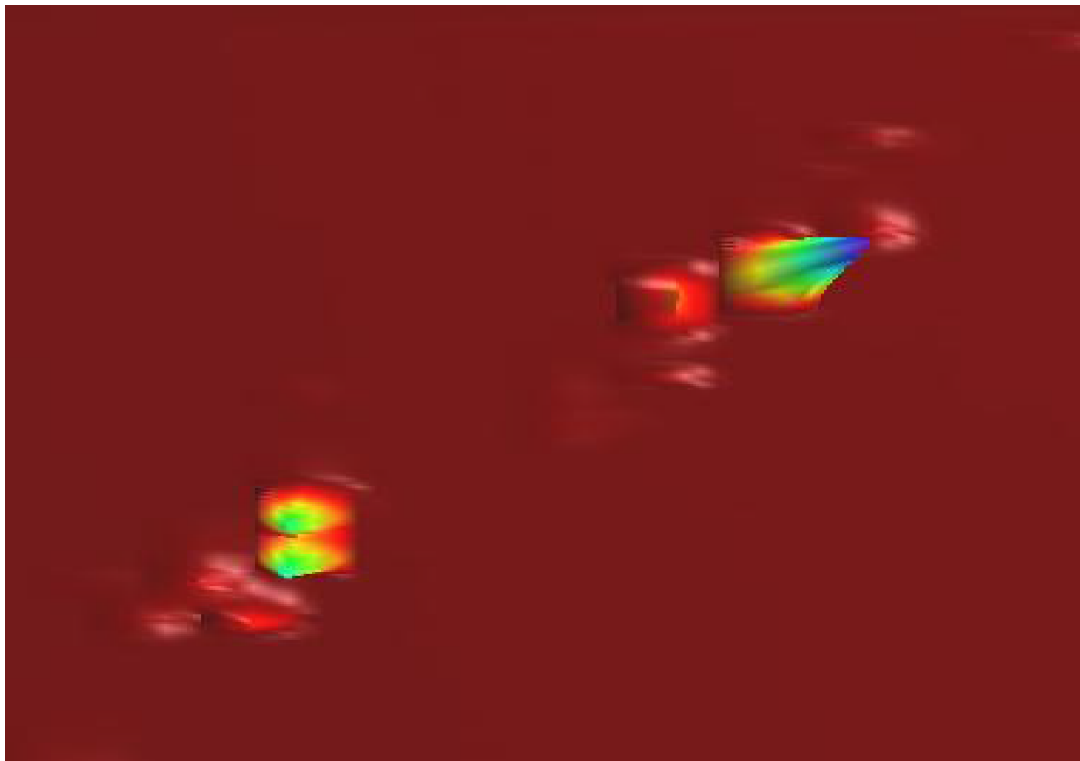


图23 43-68 min组分全二维软件处理色谱图3D视图

表1 样品组分峰表

ID	1D 时间(min)	2D 时间(min)	峰面积
1	3.245	0.243	26555
2	3.331	0.328	3046.2
3	4.227	0.224	27007.6
4	4.267	0.264	96538.9
5	4.368	0.365	2896.8
6	4.443	0.44	12016.5
7	5.339	0.336	92042.5
8	5.349	0.347	39892.8
9	5.387	0.384	12344.5
10	6.328	0.325	15891.9
11	9.488	0.485	7013.1
12	12.405	0.403	1540.5
13	13.419	0.416	1849535
14	15.331	0.328	5359.2
15	15.4	0.397	164191.7
16	17.333	0.331	6965.7
17	17.347	0.344	3023.6
18	17.373	0.371	17973.2
19	18.24	0.237	4437.6
20	18.312	0.309	14256.3
21	18.323	0.32	16176.9
22	18.357	0.355	48149.4
23	18.424	0.421	2064.4
24	19.344	0.341	6719.1
25	19.397	0.395	174429.8
26	20.323	0.32	4321.5
27	20.349	0.347	11764.6
28	20.52	0.517	84400.6
29	21.317	0.315	5696.3
30	21.36	0.357	31939.8
31	21.387	0.384	35127.9
32	22.333	0.331	15247.2
33	22.368	0.365	3561.6
34	23.315	0.312	57227.4
35	23.323	0.32	292369.6
36	23.4	0.397	19459.1
37	24.341	0.339	20514.2
38	26.315	0.312	29035.8
39	26.328	0.325	6167.3
40	26.344	0.341	96411
41	26.373	0.371	323854.6
42	27.304	0.301	8891.1
43	27.336	0.333	47342.9
44	27.349	0.347	122048.8
45	27.451	0.448	2853

46	27.461	0.459	20997.4
47	28.317	0.315	1514.7
48	28.365	0.363	24105.8
49	28.395	0.392	8462.8
50	29.328	0.325	6303.5
51	29.344	0.341	434907.7
52	30.328	0.325	4259.9
53	30.376	0.373	26368.9
54	31.323	0.32	5418.5
55	31.355	0.352	35436.6
56	38.387	0.384	25685.9
57	39.365	0.363	122113
58	42.387	0.384	6845751
59	43.467	0.464	5025.2
60	44.387	0.384	37782.1
61	44.483	0.48	15733.8
62	45.36	0.357	266507.8
63	48.435	0.432	28093.5
64	48.539	0.536	3840.3
65	49.517	0.515	31976.5
66	50.531	0.528	16939.4
67	50.541	0.539	53054.8
68	51.52	0.517	114872.2
69	52.555	0.552	595720.3
70	52.576	0.573	758152.2
71	52.64	0.637	3977.4
72	58.627	0.624	3392
73	58.669	0.667	6762.8
74	59.651	0.648	18922.2
75	59.693	0.691	332299.4
76	61.701	0.699	1549885
77	63.733	0.731	55153.7
78	63.784	0.781	16839.1
79	67.84	0.837	4236.9
80	69.84	0.837	2502.8
81	70.827	0.824	1768.1

## 结论

本文通过 Nexera-e 全二维液相色谱对红花粉末的甲醇提取物进行分离分析，分析结果显示相比普通液相分析，使用全二维液相色谱对此复杂组分的样品有明显的分离效果提升。