

硅胶柱超临界流体制备色谱分离极性化合物

赵锁奇, 石铁磐, 王仁安, 杨光华

(石油大学 重质油加工国家重点实验室, 北京 昌平 102200)

摘要:建立了一套克级的制备型超临界流体色谱, 采用全多孔空白硅胶为固定相, 二氧化碳加极性携带剂及酸碱改性剂为三元流动相, 在该设备上对黄酮类物质和生物碱混合物进行了分离, 讨论了分离条件对分离组分产率和纯度的影响。

关键词:超临界流体色谱; 制备; 分离; 硅胶; 极性化合物

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274X(2001)03-0229-03

超临界流体色谱(SFC)是超临界流体技术的重要分支之一, 目前在许多方面得到了应用, 已普遍受到重视^[1], 主要利用其超临界流体分离效率高、流动相回收容易的优点。国内关于 SFC 的研究报道较少, 制备色谱方面似乎没有。对制备色谱来说, 其发展制约因素主要是资金问题, 因为色谱填料是最大的易耗品之一。键合相填料是现代高效液相色谱中应用最为广泛的柱填料, 但价格昂贵, 将制备色谱放大至千克级的工业装置花费就更大。目前的超临界流体色谱制备多运用键合相填料, 缺乏硅胶填料上的分离方法, 而强极性物质在硅胶上的分离被认为

是很困难的。因此, 探索极性物质在相对价廉的全多孔硅胶填料上的分离方法是非常必要的。

1 实验部分

1.1 实验设备

我们 1992 年即开始超临界流体色谱的研究工作^[2], 建立了一套分析型超临界流体色谱, 在这套色谱上进行了黄酮类化合物的分离及其保留值规律的研究^[3,4]。在此基础上, 建立了一套克级规模的制备型超临界流体色谱, 如图 1 所示。

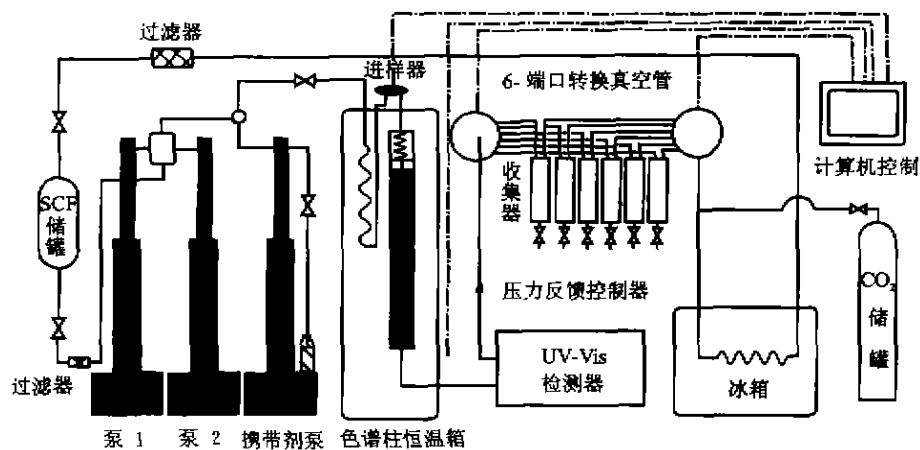


图 1 克级制备型超临界流体色谱示意图

Fig. 1 Flowsheet of gram scale preparative SFC

收稿日期: 2000-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29575211)

作者简介: 赵锁奇(1962-), 陕西西安人, 石油大学(北京)副教授, 从事超临界流体技术研究。

其中泵送系统采用两台 ISCO 260D 注射泵,由单向阀组成的套件提供连续泵送流动相,泵头上装循环低温套件及保温夹套,另外一套 ISCO 100DM 注射泵进行携带剂输送。ISCO 260D 和 100DM 可提供的压力分别为 50MPa 和 65MPa,其流量由一台专用控制器进行精确控制,有多种操作模式选择。色谱柱为轴向动态压缩式,柱尺寸为 $\Phi 25 \text{ mm} \times 500 \text{ mm}$ (长度可调),设计压力为 50MPa。色谱柱箱温度范围为室温 $\sim 150 \text{ C} \pm 1 \text{ C}$ 。检测器为 TSP-100(原 Spectro-Physics)UV-Vis 检测器,配备 50 mL/min 的大容量流通池,进行不分流检测。冷冻机采用重庆四达实验仪器厂产品。进样阀、采集阀和气驱电磁阀均采用 Rheodyne 公司产品。溶剂储罐设计压力为 10MPa,带可视视窗。

1.2 实验材料

CO_2 :北京氮普北分气体工业有限公司, $\varphi \geq 99.95\%$;无水乙醇:北京化工厂,分析纯, $\varphi \geq 99.7\%$;磷酸:北京化工厂,分析纯, $\varphi \geq 85.0\%$;槲皮素:中国药品生物制品检定所;黄酮、漆树素:日本东京化成工业株式会社;空白硅胶填料:(10 ± 1) μm 、孔径为 8~10 nm,比表面 340~400 m^2/g ,天津市化工二厂色谱技术公司。

2 实验结果与讨论

2.1 全多孔硅胶填料用于分离极性溶质

研究了黄酮类化合物在硅胶柱上的分离,流动相为 CO_2 -乙醇-磷酸,其中 $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4)$ 在乙醇中为 0.5%。银杏叶萃取物水解后主要有 3 种甙元,即异鼠李素、山奈酚、槲皮素,图 2 是其中一种水解样品在硅胶柱上的分离结果。异鼠李素、山奈酚、槲皮素 3 种物质的保留值随携带剂浓度的变化较大,当携带剂浓度较小时,这些化合物的容量因子较大,且异鼠李素和山奈酚分不开;当携带剂达到 7%,3 种物质的容量因子明显降低,再增加携带剂浓度保留值降低不多,3 种物质能有效分离。这几种化合物在 ODS 柱上的分离和硅胶柱不同,携带剂浓度较大时,3 个峰严重重叠;当携带剂浓度较低时,3 种溶质的容量因子差别较大,但是峰拖尾严重,峰间重叠依然比较严重。

2.2 黄酮类化合物的超临界流体色谱制备分离

选择了黄酮、槲皮素、漆树素 3 种黄酮类化合物进行示范性的分离。其中槲皮素及漆树素极性较强,可以用加入酸性改性剂的方法分离。图 3 是在制备

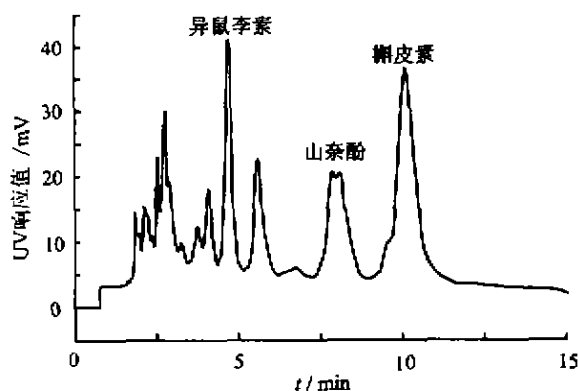


图 2 银杏叶萃取物水解产物的超临界流体色谱分离 YWG-SiO₂ 10 μm 柱, 25 MPa, 50 C, 流动相 3.0 mL/min,携带剂为乙醇(其中磷酸体积分数为 0.5%),流动相与携带剂体积比为 90:10

Fig. 2 SFC Chromatogram of hydrolyzate of egb extract conditions: YWG-SiO₂ 10 μm column, 25 MPa, 50 $^{\circ}\text{C}$ mobile phase: CO₂-ethanol (90:10 V/V) with $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0.5\%$ in ethanol flowrate: 3.0 mL/min

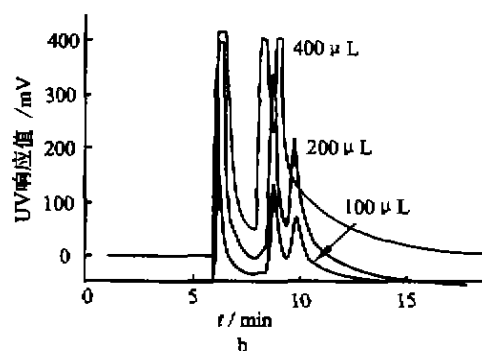
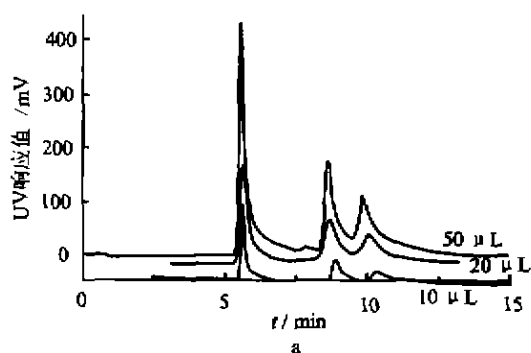


图 3 黄酮、槲皮素、漆树素的分离结果(出峰顺序为黄酮、槲皮素、漆树素)

Fig. 3 SFC Chromatograms of isorhamnetin, kaempferol and quercetin separation (in retention time sequence of kaempferol, isorhamnetin, Quercetin)

柱上负载逐渐加大的色谱图,配制的溶液中3种化合物含量均为2 g/L。其进样量从10 μ L到400 μ L,压力为25 MPa,温度为45 C,流动相流量为20 mL/min,携带剂加入量为10%,携带剂中 φ (H_3PO_4)为0.5%。在进样量为400 μ L时,紫外检测器的响应值已经超过最大范围。结果表明进样体积增大,相邻组分的分离选择性降低,但在样品浓度一定的情况下,大的进样体积意味着高的分离效率,所以希望有尽可能高的进样体积。在所给定的条件下,200 μ L的进样量仍保持较高的分离选择性。图4是进行的一次制备,有效的进样是9次。每次循环为15 min,每天可处理样品约为240 mg。样品收集为3个馏分,1号馏分为黄酮,经色谱检验纯度为96%,2号馏分为槲皮素(含部分漆树素),纯度为66%,3号馏分主要为漆树素(含有部分槲皮素),纯度为89%。并且,由于进样阀在切换回“LOAD”状态时,定量管内积存的 CO_2 会将进样容器中的样品冲出一些,不包括这部分损耗,总回收率约为80%。

用Pre-SFC分离制备了两种生物碱混合体系,防己科植物蝙蝠葛(*Menispermum dauricum* DC.)的根茎经萃取提纯后可以得到蝙蝠葛诺林碱(daurinoline)、蝙蝠葛新诺林碱(dauricinoline,或称去甲山豆根碱)两种生物碱异构体的混合物,用超临界流体制备色谱在全多孔硅胶上也成功地进行了分离;青川椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc)是产于我国辽宁等地的一种芸香科植物。其中含有香柑内酯(bergapten),青川椒碱(Schinifoline)等化合物。它的果实除做调味剂外,还有药用价值,青川

参考文献:

- [1] PERRUCI M. Advances in supercritical fluid chromatography[J]. J of Chrom A, 1994, (658):293-313.
- [2] ZHAO Suo-qi, WANG Ren-an, YANG Guang-hua. A method for measurement of solid solubility in supercritical carbon dioxide[J]. J Supercritical Fluid, 1995, 8(1):15-19.
- [3] 刘志敏,赵锁奇,王仁安,等.黄酮醇异构体的超临界流体色谱分离[J]. 色谱, 1997, 15(4): 288-291.
- [4] LIU Zhi-min, ZHAO Suo-qi, WANG Ren-an, et al. Preparation of polyhydroxyl flavonoids by packed-column supercritical fluid chromatography[J]. J Chromatographic Science, 1999, 37(5):155-158.

(编辑 杨丙雨)

Separation of polar compounds by preparative SFC

ZHAO Suo-qi, SHI Tie-pan, WANG Ren-an, YANG Guang-hua

(State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, University of Petroleum, Beijing, 102200, China)

Abstract: A gram-scale preparative supercritical fluid chromatogram was set up, with which polar compounds such as flavonoids were separated successfully on bare silica packing column by using CO_2 -modifier-additive mobile phase. Influence of the operating conditions on the yield and purity were discussed.

Key words: supercritical fluid chromatography; preparation; separation; silica; polar compounds

椒萃取物的样品是用一套多功能的超临界流体萃取分馏装置得到的。对青川椒的果皮萃取物应用超临界流体制备色谱也成功进行了青川椒碱的分离,得到了香柑内酯和青川椒碱。

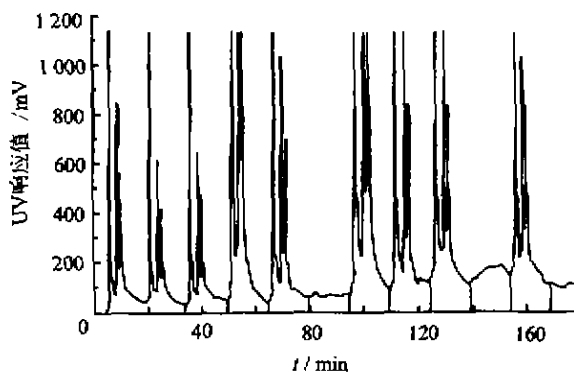


图4 黄酮类化合物的制备分离

Fig. 4 Flvanoids separation on prep-SFC by repeated sample injection

3 结论

建立了空白硅胶填料用于超临界流体色谱分离高极性物质和生物碱的方法,采用三元流动相(CO_2 -携带剂-酸碱改性剂)成功地分离了多羟基黄酮化合物的混合物和生物碱混合物,探索了操作温度、压力、携带剂浓度和流速对目的产物分离纯化的纯度和收率的影响。流动相中携带剂达到一定含量,强极性溶质的保留值明显减小,要求分离时间短,进样体积越大,分离选择性越低。