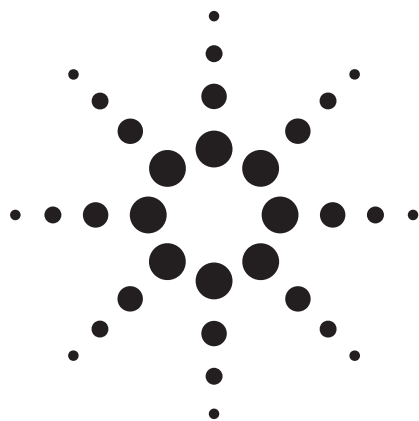




使用 HT 1.8 μm 快速分离色谱柱对甘草根提取物进行高分离度反相 HPLC 分离应用

食品添加剂，天然产物和药物

作者

Bernard Permar and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

对甘草、甘草水解产物和市售甘草样品进行的高分离度反相 HPLC 分析研究表明，ZORBAX 1.8 μm 柱的分离度和通量都远远超过常规 5.0 μm 柱。

引言

甘草是洋甘草的根部，这种植物是 4 至 5 英尺高的木质灌木，生长于欧洲、中东和西亚。已知这种植物的根含有约 4% 的甘草素，即甘草酸的钾盐或钙盐。甘草酸是带有两分子葡萄糖醛酸的五环三萜羧酸（18- β -甘草次酸）的糖苷（图 1）。

甘草素比蔗糖（甘蔗糖）甜 50 倍左右，但高剂量的甘草素具有毒性。水解后，这种糖苷会失去甜味，转化成糖苷配基甘草次酸和两分子葡萄糖醛酸。

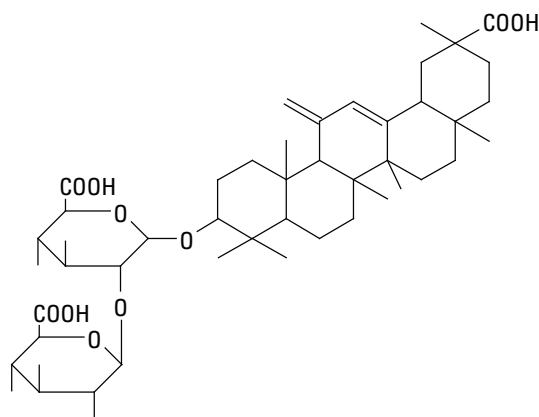


图 1. 甘草次酸的结构

从这类植物的很多品种得到的提取物成分都很复杂，包含 100 多种化合物。其中，有几种化合物可用作添加剂增加糖果的甜度，或用作止咳糖浆的增味剂，或用于中和药物的苦味；此外，它们还具有治疗疾病的功效，这主要体现在中药里 (TCM)。在中国以及印度、埃及、希腊和罗马，几百年前人们就知道甘草具有药用价值。用途包括止咳、通便和治疗胃溃疡、早期 Addison 病和肝病。最新的研究表明，甘草素对 DNA 和 RNA 病毒（流行性感冒 A 和 B、HIV、VZV、乙肝和丙肝病毒）具有抗病毒活性 [1]。甘草还可用于局部化妆。



Agilent Technologies

具体化合物的丰度可能会有很大差异，取决于植物的品种、收获的时间和提取方法。因此，需要能够监测活性成分的分析方法。已经发现，梯度洗脱反相 HPLC 是分离甘草中一些重要化合物的有效方法 [2]。本文对传统的 HPLC 方法与较新的快速分离高通量 (RRHT) 柱进行对比。我们将使用这些 HPLC 技术研究两种市售甘草根提取物之间的差异。

实验

本研究使用两个反相 (RP) 柱：

- 常规的 ZORBAX StableBond (SB)-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm
- ZORBAX SB-C18 RRHT, 4.6 mm × 150 mm, 1.8 μm

RRHT 的粒径较小，因此可以使用更短的色谱柱获得与较长的常规色谱柱相同的分离度，同时加快分离速度。

HPLC 条件

仪器： Agilent 1200 系列快速分离系统
检测器： 多波长检测器 (MWD), 254 nm/100 BW, 450 nm 参比波长
流动相： A = 1% 乙酸水溶液
B = 1% 乙酸的乙腈溶液

ZORBAX SB-C18 色谱柱的梯度条件：

常规： 4.6 mm × 250 mm, 5 μm
50 分钟内，B 由 5% 递增至 100%

RRHT： 4.6 mm × 150 mm, 1.8 μm
30 分钟内，B 由 5% 递增至 100%

流速： 1.0 mL/min

温度： 室温

标准品： 购自 Sigma Aldrich

- (G) 0.1-mg 甘草次酸铵盐，~75%，溶于 0.5-mL 流动相 B 中，然后加入 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL
- (GA) 0.1-mg 18-β-甘草次酸，97%，溶于 0.5-mL 流动相 B 中，然后加入 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL

样品：

- 甘草根提取物 A (HERB FARM牌)
- 甘草根提取物 B (Newark 天然食品)

进样前，对两种提取物进行旋涡振荡，然后过滤 (0.2 微米)。

进样量： 5 μL 提取物

结果

普通甘草提取物中发现的最重要的化合物是 G，其次是其水解产物，GA。这些物质都能在市场上买到。虽然在甘草中鉴定出了一些其他组分，而且这些组分也能在市场上买到，但是它们非常昂贵。因为我们的主要目的是要证明使用更短的高分离度 HPLC 柱的优势，所以我们只使用两种标准品 (G 和 GA) 来建立初始方法。图 2a 显示使用梯度洗脱在常规色谱柱 (ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 上梯度分离 G 和 GA。因为待检验的甘草提取物非常复杂，等强度条件不能分离所有的组分。G 因为比 GA 多了葡萄糖基团而极性更强，因此 G 先洗脱，而 GA 的洗脱要晚得多。使用这一梯度，42 分钟以内就可以洗脱 GA。换成更短的 ZORBAX SB-C 18 RRHT 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 1.8 μm)，分离效果几乎相同，如图 2b 所示。然而，分离时间只有 25 分钟多一点，节省了约 40% 的时间。

为了研究这些色谱柱对真正的甘草根提取物的分离效果，图 3 和 4 描绘了加入过滤的提取物后观察到的复杂的色谱图，实验部分对这些提取物进行了说明。图 3a 显示使用 5 μm 250-mm 柱获得的复杂的色谱图。断面表示提取物中存在少量 GA。因为 GA 是 G 的水解产物，所以它在甘草提取物中的浓度应该低得多，除非对提取物进行了处理以增加水解产物的浓度。根据面积计数，提取物 A 中 GA 浓度低于 G 浓度的 0.5%。

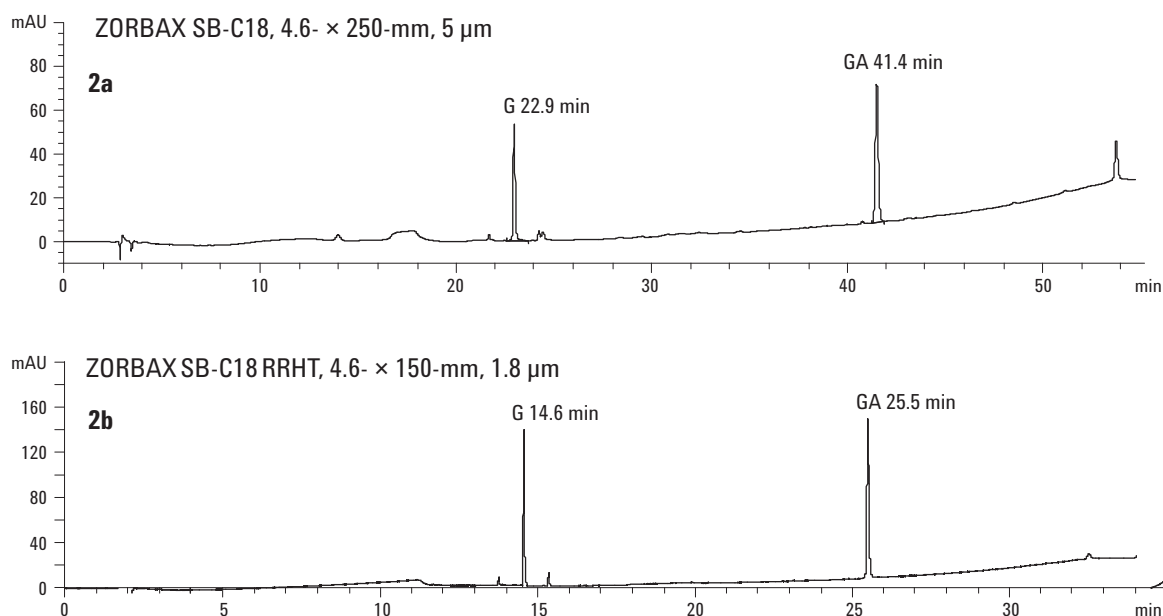


图 2. 在 5.0 μm 和 1.8 μm 测试柱上进行的 G 和 GA 梯度反相分离

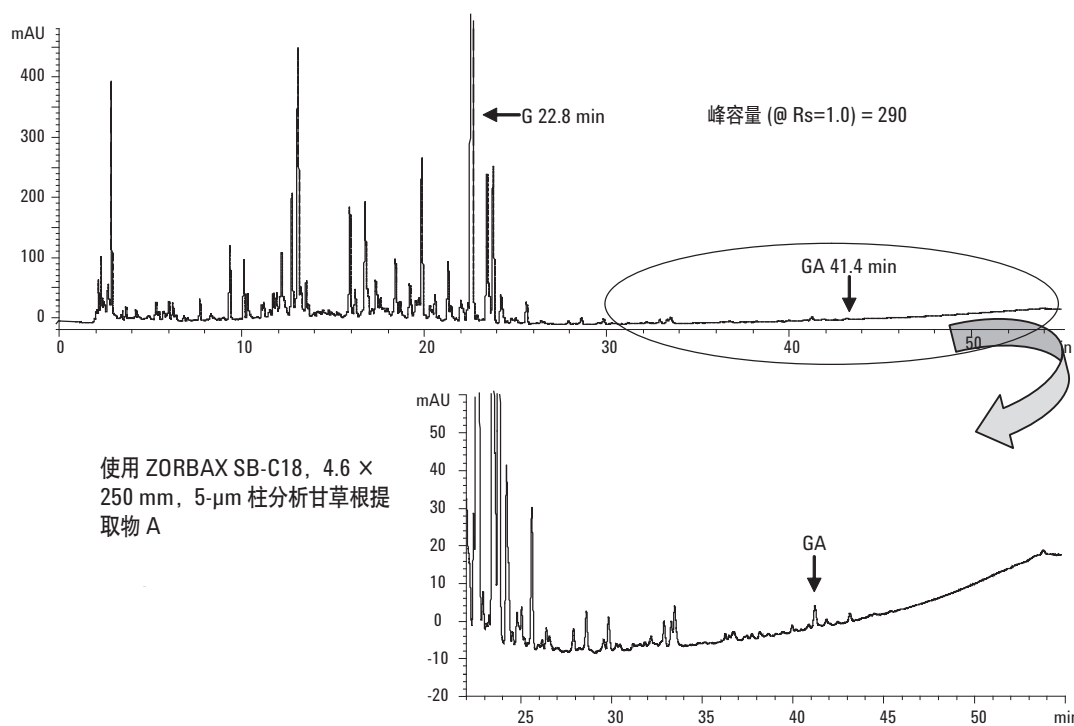
虽然未对实际的峰进行计数，但 5- μm 柱的峰容量计算值 (3) 为 290 (分离度: 1.0). 在 1.8- μm 150-mm 柱上对相同的提取物 A 进行分离，可以看到结构更精细 (即分离度更高) 的色谱图 (图 3b)。这种效率更高的色谱柱具有 442 的峰容量计算值，比较长的 5- μm 柱高 50% 以上。因此，使用这种较短的快速分离色谱柱能更轻松地确定含量较少的组分。1.8- μm 柱的单位时间峰数 (分离度 = 1.0) 计算值为 17.7 个峰/分钟，5- μm 柱为 7.1。

图 4a 和 4b 显示使用提取物 B 进行类似的分离。通过比较图 3b 和图 4b 的高分离度色谱图，可以发现该提取物比提取物 A 还要复杂。同样，1.8- μm 柱的每分钟峰数计算值远远超过 5- μm 柱 (分别为 17 和 7.5)。根据 GA 的峰面积计数，提取物 B 中 GA 的浓度大约为 G 的 1%。

结论

并未尝试对甘草提取物的组分进行定量分析。根据我们的研究，很明显，1.8- μm 柱的分辨率和通量都远远超过 5.0- μm 常规柱。因为要处理更复杂的天然产物，研究者需要更精确的组分分析，因此高分离度小颗粒柱将得到更广泛的应用。在对甘草根、其他天然产物和 TCM 进行的研究中，梯度分离功能和灵敏的检测是必不可少的。

(A)



(B)

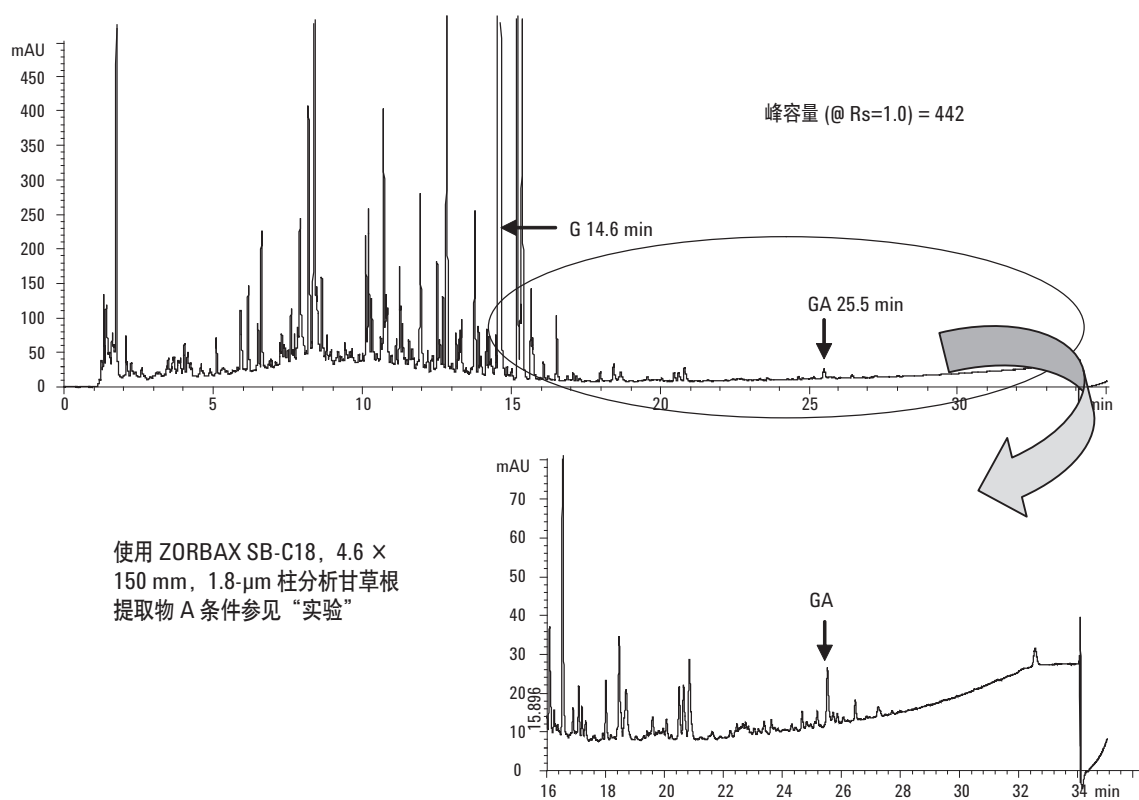
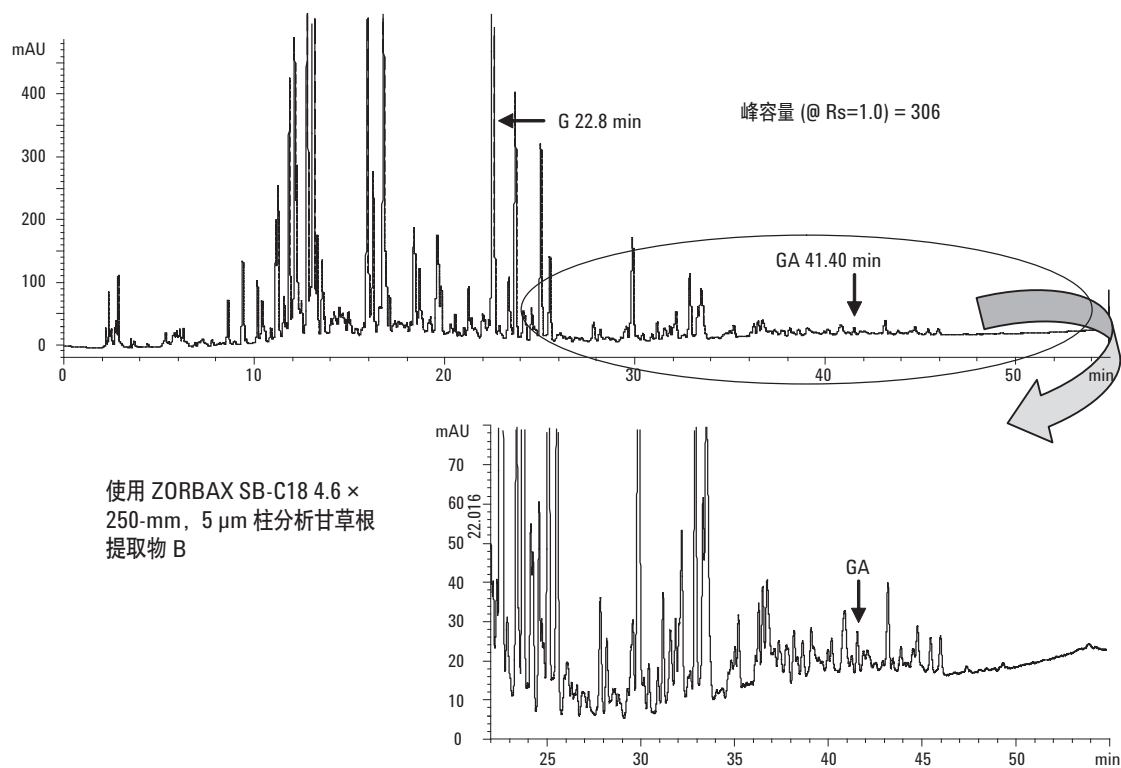


图 3a 和 3b. 在 5.0- μ m 柱 (A) 和 1.8- μ m 柱 (B) 上对甘草根提取物 A 进行梯度反相分离

(A)



(B)

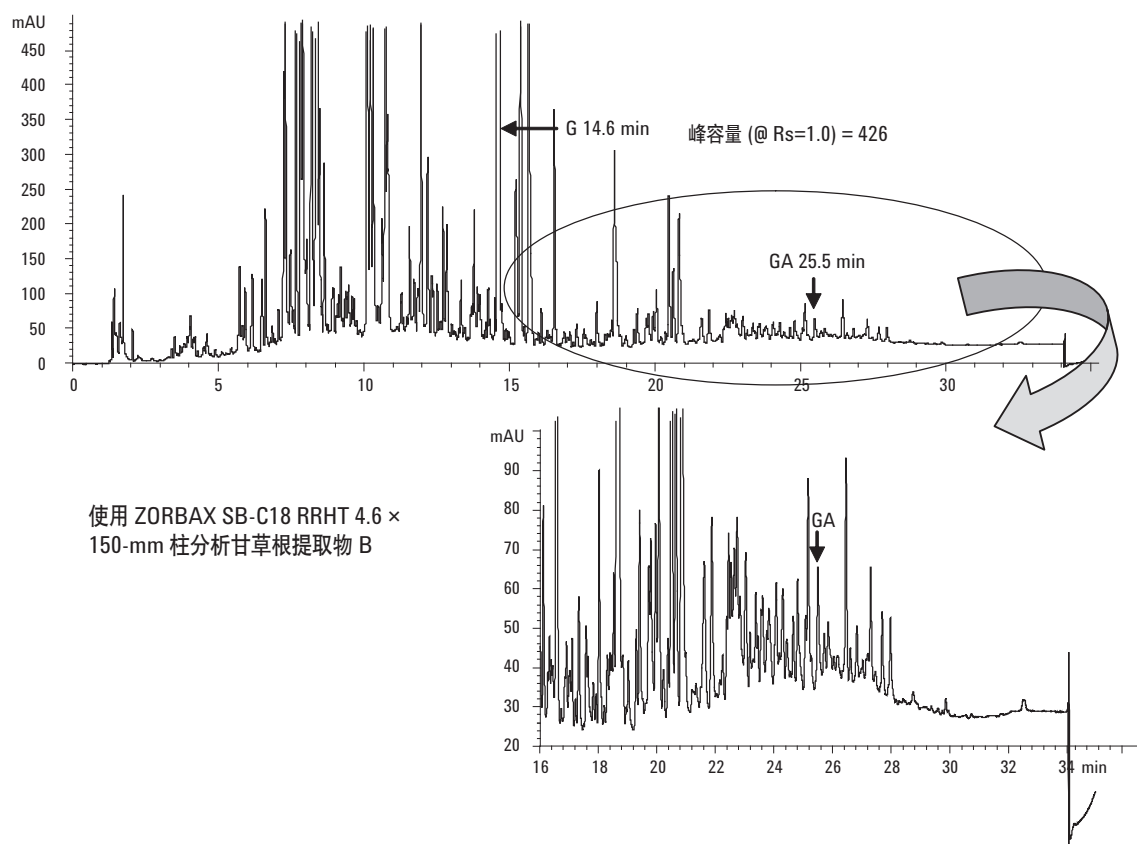


图 4a 和 4b. 在 5.0-μm 柱 (A) 和 1.8-μm 柱 (B) 上对甘草根提取物 B 进行梯度反相分离

参考文献

1. S. Fanali, Z. Aturki, G. D'Orazio, M. A. Raggi, M. G. Quaglia, C. Sabbioni, and A. Rocco, (2005) *J. Sep. Sci.*, **28**, 982–986.
2. I. Kitagawa, (2002) *Pure Appl. Chem.* **74** (7), 1189–1198.

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的 Web 站点 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2006

2006 年 3 月 14 日中国印刷
5989-4907CHCN



Agilent Technologies