



采用安捷伦 ZORBAX Solvent Saver 溶剂节省高通量色谱柱(1.8 μm)分析酸枣仁中的皂甙

应用报告

食品和中药

作者

傅荣杰
安捷伦科技公司
上海市浦东区英伦路 412 号 200131
中国

摘要

对酸枣仁的两个活性成份—酸枣仁皂苷 A 和 B 进行了提取，并采用安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 液相色谱分析柱，进行了高效液相色谱（HPLC）分析。该方法是在传统的 C18 色谱柱（4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm ）测定的基础上开发的，主要采用了 ZORBAX Eclipse Plus 溶剂节省高通量 C18 色谱柱（3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm ）。使用溶剂节省高通量色谱柱的优势在于溶剂的消耗更低并能实现更快速地分析。由于这两种化合物缺乏发色团，因此本方法采用蒸发光散射检测器（ELSD）。与 UV 检测器相比，ELSD 检测器检测可使液相色谱分析具有更高的灵敏度和更干净的基线。



Agilent Technologies

前言

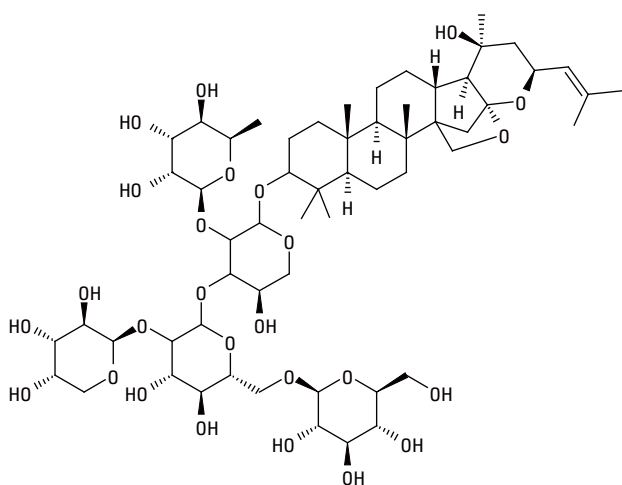
酸枣具有补气健肝功能，在中国它作为食品和中药已有 2500 多年的历史。酸枣口感好且营养价值高。其果实含有维生素 A，维生素 B2，维生素 C，皂甙，类黄酮，糖，胶，钙，磷，铁。17 世纪以来，欧洲人将它当作一种滋补品，认为它对身体各部位都是有益的，尤其是对肺和肾脏[1]，西方人一直对酸枣不屑一顾认为它没有任何药用价值。

枣树种子，英文名酸枣仁主要用做药物。皂甙化合物存在于许多植物中如人参和三七，一直以来都是研究的目标。皂甙化合物具有三萜类化合物的结构，许多三萜类化合物已被证明具有治疗作用。动物实验研究表明酸枣仁皂甙具有抗焦虑和催眠作用，能够

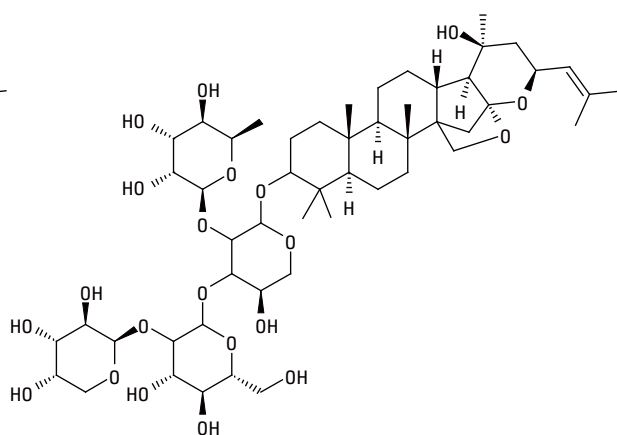
降低人脑对外界条件反射的速度，达到安神和降压的目的[1]。因此，酸枣仁皂甙可用于治疗焦躁、失眠、焦虑、水肿、充血性心力衰竭、哮喘、咽炎等疾病。

酸枣仁中皂甙主要有酸枣仁皂甙 A 和酸枣仁皂甙 B 两种形式，其结构见图 1。这两种化合物缺乏生色团，不会产生足够强的紫外信号，不能用紫外（UV）检测器检测。而蒸发光散射器（ELSD）是一个较为普遍的检测器，本方法采用 ELSD 进行检测。

在本应用报告中，比较了 ZORBAX 溶剂节省 RRHT 柱（3.0 mm × 50 mm，1.8 μm）和传统的 ZORBAX 色谱柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）分离酸枣仁皂甙的方法。



酸枣仁皂苷 A 分子量为 1207.36



酸枣仁皂苷 B 分子量为 1045.22

图 1. 酸枣仁皂苷的结构

实验部分

样品制备

酸枣仁种子购自药店(Qun-Li TCM Pharmacy), 样品按照下列流程提取目标化合物[2]:

- 称 5.0 克干燥酸枣仁粉末
- 酸枣仁粉末中加 50 mL 乙醚, 利用索氏提取器脱脂 4 小时
- 冷却后过滤, 弃去滤液, 然后对滤渣进行干燥
- 将滤渣转移到 250 毫升圆底烧瓶中, 再加入 50 毫升甲醇萃取 2 小时
- 重复萃取并合并提取液
- 真空状态下除甲醇, 后加 20 毫升水对溶解残留物
- 用 15 毫升水饱和正丁醇萃取 3 次, 然后合并萃取液后进行真空干燥
- 残渣用 5.0 mL 甲醇溶解, 在进行高效液相色谱法分析之前, 使用 0.45 μm 可再生纤维素滤器过滤

色谱条件

使用安捷伦 1200 系列快速高分离度液相色谱 (RRLC) 系统进行 HPLC 分析。该系统包括 G1312 二元泵、G1376C 自动进样器 (ALS), G1316B 柱温箱 (TCC), G1316C 二极管阵列检测器 (DAD) 和 G4218A 蒸发光散射检测仪 (ELSD)。

流动相:	35%水, 65%甲醇
流量:	4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱 1mL/min ; 3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm 色谱柱 0.4 mL/min
注射量:	4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱为 5 μL ; 3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm 色谱柱为 2 μL
色谱柱:	ZORBAX Eclipse Plus C18 柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm , p/n: 959993-902) 和 3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm 柱(p/n: 959941-302)
UV:	210 nm
TCC 温度:	30 $^{\circ}\text{C}$
ELSD 温度:	40 $^{\circ}\text{C}$
ELSD 压力:	3.5 bar
ELSD 增益:	7
蒸发光散射滤光器:	对于 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱为 5s; 对于 3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm 色谱柱为 2 s

结果与讨论

采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm) 对两种化合物进行了很好的分离, 使用 ELSD 检测器得到了出色的峰形, 如图 2 所示。但是对于这种复杂的样品, 许多潜在化合物在 210 nm 以下都有吸收, 这使得得到平滑基线变得很难。采用 UV 210 nm 进行检测, 两个目标化合物不能从基质中得到很好的分离, 在定量测定中存在潜在误差。与 UV 相比, ELSD 具有较高的灵敏度并且基线更平滑。采用 ELSD 能够这两个感兴趣的化合物能得到基线分离。

与 UV 检测相比，ELSD 具有更高的灵敏度和更平滑的基线

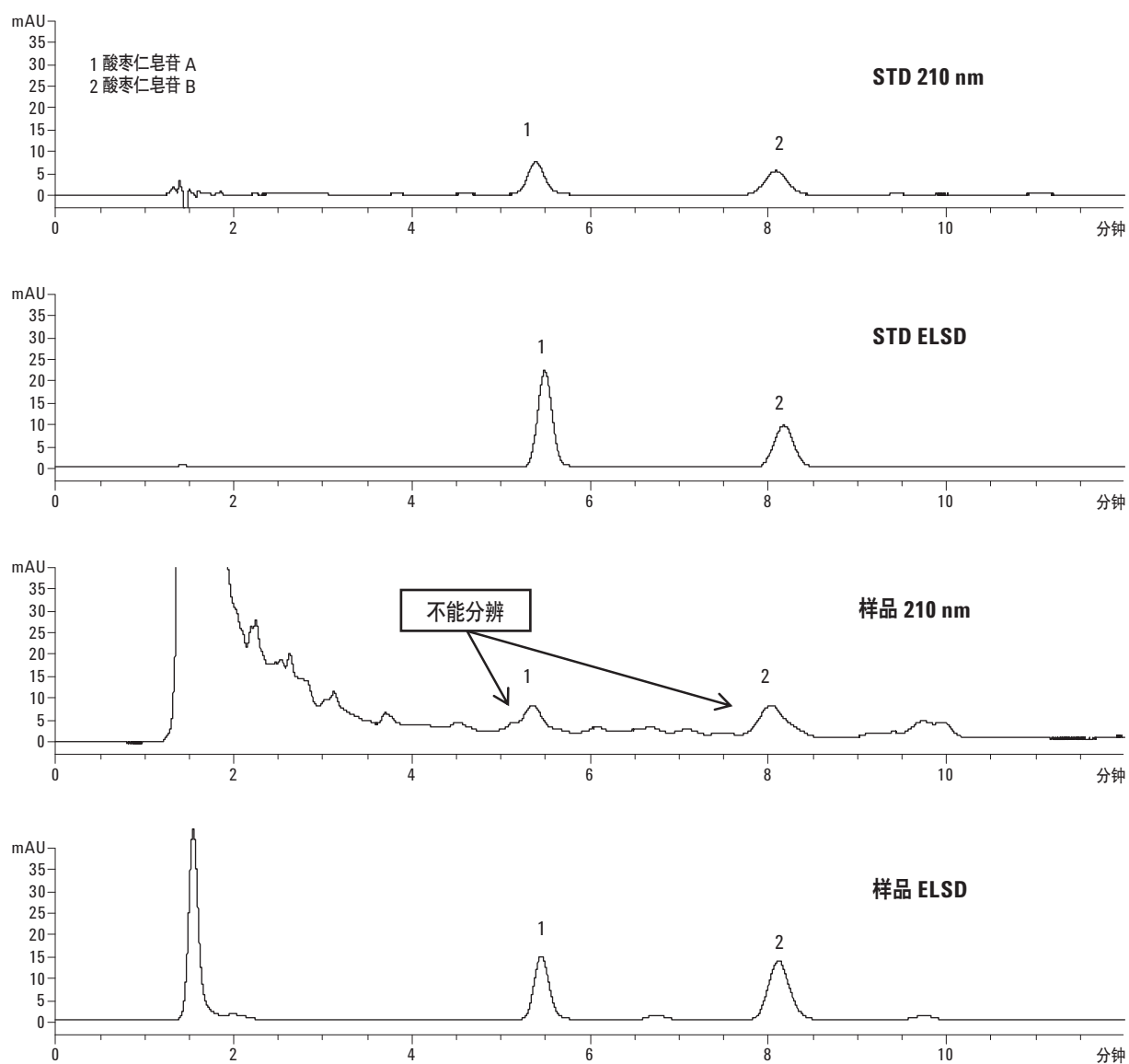


图2. 采用 UV/210nm/ELSD 和安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 液相色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 测定标样和样品的色谱图

该方法是传统分析方法，分析时间为 12 分钟，一次分析需消耗溶剂 12 毫升。该方法可以很容易地转移至溶剂节省 HT 柱，明显节省时间和溶剂使用量（图 3）。

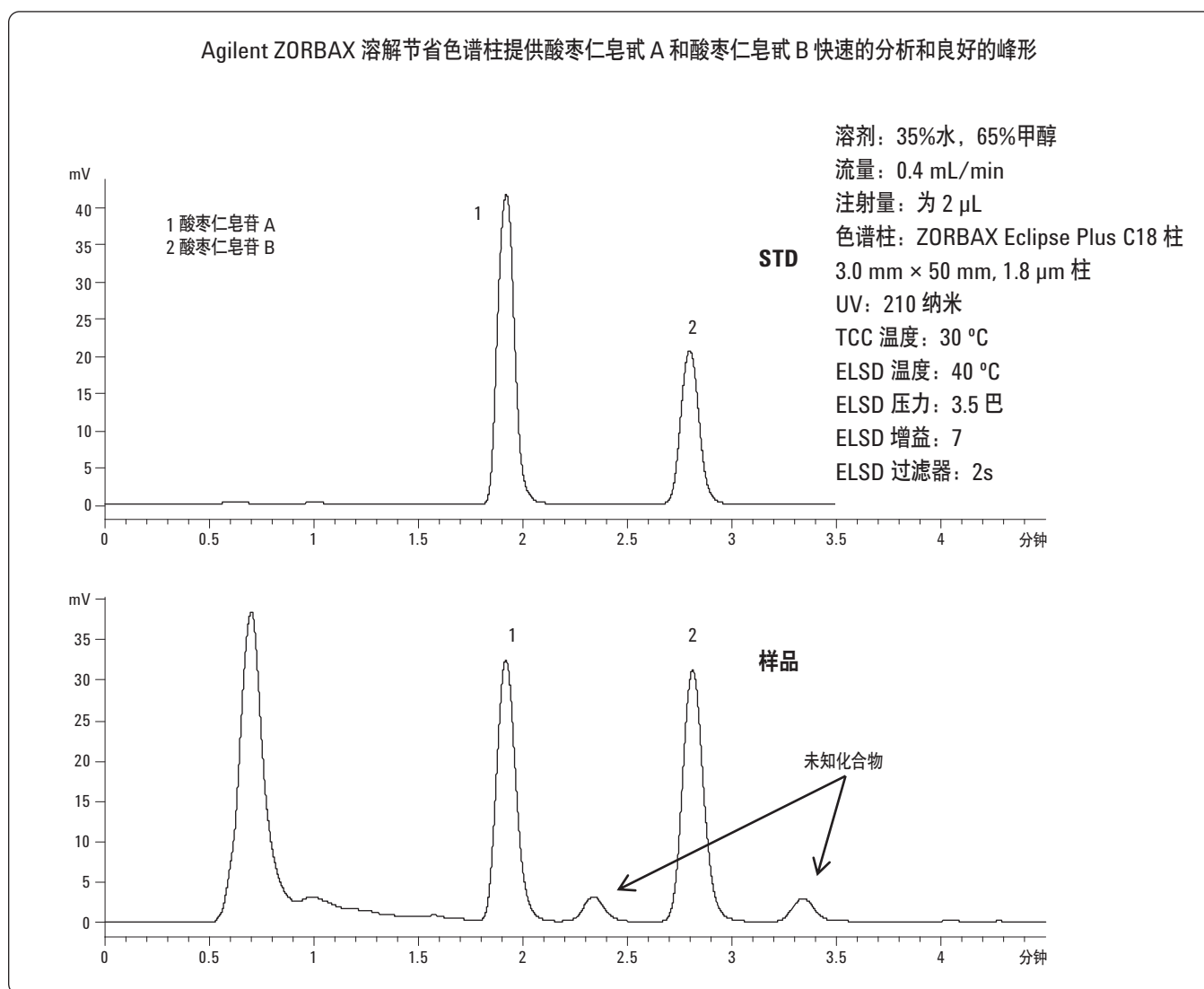


图 3. 采用 ELSD 和安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 液相色谱柱 (3.0 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m) 测定标样和样品的色谱图

图 4 给出了采用 4.6 mm × 150 mm 色谱柱和 3.0 mm × 50 mm 色谱柱测定样品的分析时间和溶剂消耗量的比较结果。从 5 μm 粒径的 4.6 mm × 150 mm 色谱柱测试改变到使用粒径为 1.8 μm 的 3.0 mm × 50 mm 色谱柱可以节约 87% 的溶剂量、67% 的时间。对于未知样品化合物，峰 1 和 2 分辨率相同。

使用 3.0 mm × 50 mm 色谱柱的方法也能在标准 LC 系统上运行 [3]，但可能需要优化，以尽量减少柱外效应。此外，也必须优化蒸发光散射检测器参数。在本方法中，当色谱柱切换到 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm 柱时，所有蒸发光散射参数保持不变。但是，使用

3.0 mm × 50 mm 色谱柱得到的两个样品的峰高与使用 4.6 mm × 150 mm 5 μm 色谱柱时的峰高不同。这造成了峰 1 和峰 2 的理论塔板数较低，分别为 2000 多和 4000 多。对 ELSD 检测器的两个参数进行了优化。当 ELSD 检测采样频率从 2.5 Hz 到 30 Hz 变化时，信号略有提高。然而，当过滤值在 off, 2, 5 和 8 之间改变时，随着过滤值的降低，理论塔板数迅速增加。同时，基线噪声也增加。为了确定理想的信噪比，过滤值设置为 2，这样峰 1 的理论板数超过了 5000，峰 2 的理论板数超过了 8000。此时，在这两种色谱柱上这两个峰的峰高是一致的，如图 4 所示。

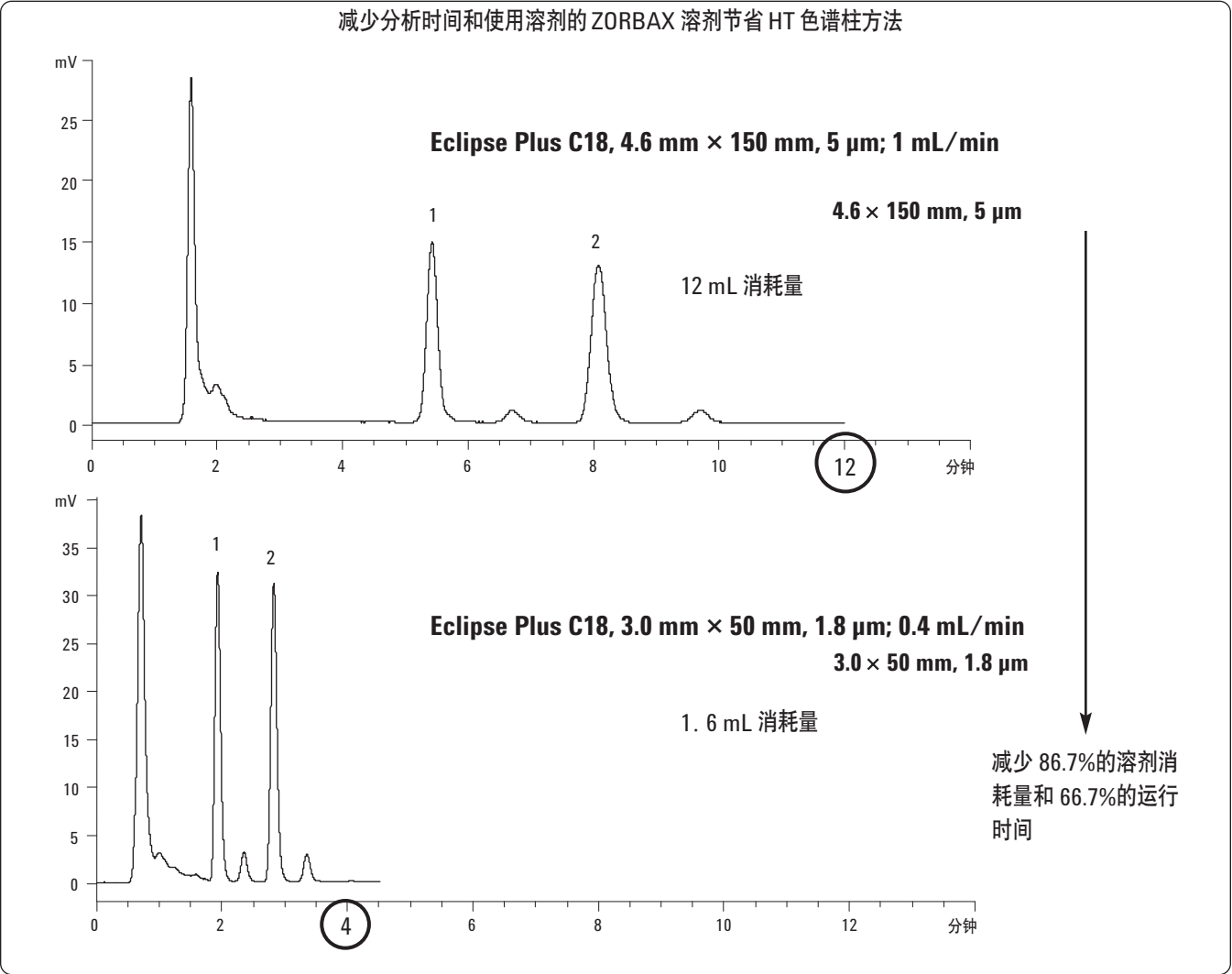


图 4. 采用 Eclipse Plus C18 4.6 mm × 150mm 色谱柱和 Eclipse Plus C18 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱测定的比较

结论

ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱能够很容易分离酸枣仁中的两个感兴趣组分酸枣仁皂甙 A 和酸枣仁皂甙 B，高效且峰对称。使用 3.0mm 内径的溶剂节省色谱柱可大大减少溶剂的使用量和分析时间，增加分析通量。分离这两种皂甙时，使用 ELSD 能够得到更为干净的基线和更高的灵敏度，这使得它可作为这类复杂基质中化合物如中药分离时更好的检测器。

参考文献

1. <http://www.mdidea.com/products/new/new029.html>, spine date seed
2. 李会军, 李平, “HPLC - ELSD 法测定酸枣仁中的酸枣仁皂苷 A 和 B” 中国药物分析, 2000,20(2): 82-84.
3. “降低溶剂使用量和废物的 LC 柱,” 安捷伦技术概览, 5990-3972EN

更多信息

欲了解更多有关我们产品和服务信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

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，2009
2009 年 6 月 16 日 中国印刷
5990-4176CHCN



Agilent Technologies