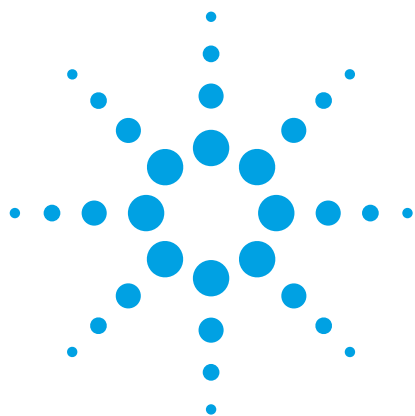




白毛茛中生物碱类成分的 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取剂净化及其 HPLC-DAD 定量分析

应用报告

膳食补充剂

作者

Kedimetse Mothibedi, Janes
Mokgadi 与 Nelson Torto
Department of Chemistry
Rhodes University
P. O. Box 94
Grahamstown 6140
南非

摘要

采用 Bond Elut Plexa 固相萃取剂对白毛茛中的生物碱类成分（白毛茛碱和小檗碱）成功进行了净化。采用 Agilent RRHD ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱（4.6 x 75 mm, 3.5 μ m），0.1% 磷酸溶液/甲醇作为流动相，梯度洗脱，35°C 条件下于 6 min 内实现了其 HPLC 分离。两种生物碱校准曲线的线性关系良好，相关系数均为 0.9994。白毛茛碱的回收率范围是 76–102%，小檗碱的是 99–104%，其相对标准偏差 (RSD%) 均小于 5。



Agilent Technologies

引言

白毛茛是美国和加拿大东部阔叶林中自然生长的一种小型多年生植物 [1]。它已被当地人用于治疗伤口、溃疡、消化不良、皮肤病和眼疾 [2]。由于确信它具有抗菌、抗寄生虫和抗病毒活性，它的提取物已被用作膳食补充剂 [3]。人们相信这些活性来源于植物中含有的生物碱类成分。小檗碱和白毛茛碱是白毛茛中发现的主要生物碱（结构见图 1）[4]。草药类膳食补充剂和替代药品的广泛使用催生了新的指令和立法，其目的在于对草药和功能性食品产业进行监管 [5]。因此，建立检测这些化合物的简单、重现性好、准确和易用的分析方法就非常必要。

在许多分析中，样品前处理是一个非常重要的步骤，尤其是对于检测复杂基质样品中的低浓度组分更是如此 [6]。固相萃取 (SPE) 是当前采用高效液相色谱 (HPLC) 进行环境、食品、药品和生物等样品分析前最受欢迎的样品净化技术 [7]。它的吸附剂类型众多，如无机氧化物、聚合物键合相、硅和碳，以及对特定分析物或官能团具有选择性的吸附材料（离子交换、混合模式、通过限制、免疫亲和与分子印迹聚合物等）。人们不断希望 SPE 材料有更高的分析物回收率、吸附容量、选择性、机械强度和化学稳定性 [8]。

本应用报告描述了一种采用 Agilent Bond Elut Plexa 聚合物吸附剂的 SPE 方法，用于白毛茛中生物碱类成分的净化和预富集。该方法操作简便，能提供更高的分析性能和易用性 [9]。要实现上述性能，所采用 SPE 材料的吸附机制应该是其疏水内核强保留目标分析物，而其亲水外表面使样品基质保留在填料孔结构之外。在淋洗过程中，样品基质可以很容易地被洗掉，而分析物仍强保留在填料疏水内核中。这样，我们就可以得到更纯净的提取物，萃取回收率高，重现性好。均匀和窄粒径分布的填料有助于避免 SPE 小柱的堵塞，从而可以提高流速，也提高了柱间萃取效果的重现性 [10]。

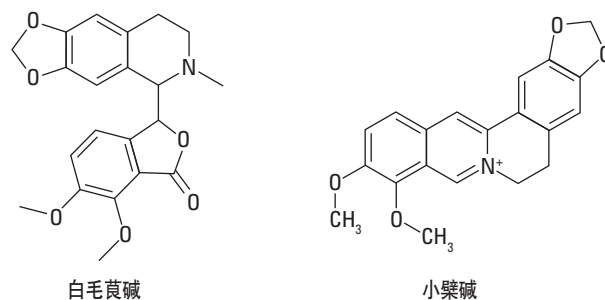


图 1. 白毛茛碱和小檗碱的化学结构

实验部分

材料与化学品

盐酸小檗碱和盐酸白毛茛碱购自 Sigma-Aldrich 公司（圣路易斯，美国）。磷酸和盐酸购自 Merck Chemicals 公司（豪登，南非），HPLC 级甲醇购自 Merck KGaA 公司（达姆施塔特，德国）。氨水 (25%) 购自 Saarchem Analytic 公司（克鲁格斯多普，南非）。白毛茛根购自南非格雷厄姆斯敦当地的一家草药店。SPE 小柱填料为 Agilent Bond Elut Plexa，规格 1 mL/30 mg，部件号 12109301。分析采用配备了二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1200 系列 HPLC 仪。分析柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 3.5 μm，部件号 959933-902)。

贮备液和工作标准液的制备

用甲醇制备浓度均为 1000 μg/mL 的白毛茛碱和小檗碱贮备液，并于 4°C 储存。所有其它的标准液按浓度要求取贮备液适量稀释制备。

样品制备

将 200 mg 白毛茛根粉碎并混匀，加入 200 mL 去离子水，回流提取 1 h，并不断搅拌，然后冷却至室温。提取物采用 Whatman 滤纸（直径 125 mm）过滤，并用三倍体积的 2% 氨溶液稀释。用 0.01 M 盐酸溶液调节 pH 值至约 7，然后进行 HPLC-DAD 分析。

参数的优化

分离和净化

进样 5 μ L 浓度为 80 μ g/mL 稀释的贮备液进行 HPLC 分离条件优化。优化时小檗碱和白毛茛碱均于 242 nm 进行监测，但由于它们分别在 294 和 350 nm 有更强的紫外吸收，我们在这两个波长处分别测定它们的含量。HPLC 条件见表 1，这些条件参考以前的一篇应用报告并稍做了修改 [11]。

表 1. HPLC 条件

参数	条件			
色谱柱	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 × 75 mm, 3.5 μm (部件号 959933-902)			
流速	1.00 mL/min			
进样量	5 μL			
柱温	35 °C			
流动相	A: 0.1% 磷酸溶液 B: 甲醇			
运行时间	6 min			
梯度程序	时间	0	0.5	3
	%B	25	25	50

SPE 条件优化

采用标准液进行了 SPE 活化、上样、淋洗和洗脱等一系列条件的优化。最佳条件见图 2。

结果与讨论

峰分离与 SPE 净化

采用表 1 所列条件进行 HPLC 分析，标准混合物中的白毛茛碱和小檗碱实现了良好分离（见图 3）。采用相同的条件，对 SPE 处理前后的白毛茛根提取物进行 HPLC 分析。如图所示，SPE 处理后的提取物色谱图更干净，小干扰峰数目减少，并且目标峰峰高增加（见图 4），表明本 SPE 操作可以有效去除样品中潜在的干扰物。

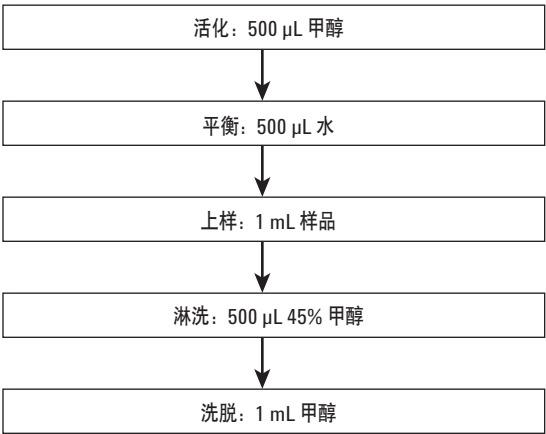


图 2. 采用 Bond Elut Plexa 吸附剂净化生物碱类成分的 SPE 过程

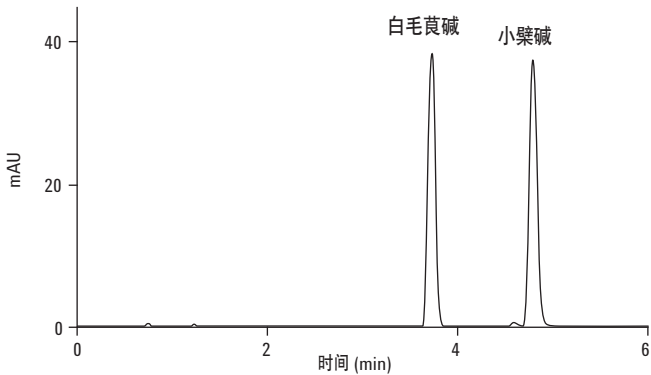


图 3. 白毛茛碱和小檗碱标准品的色谱图

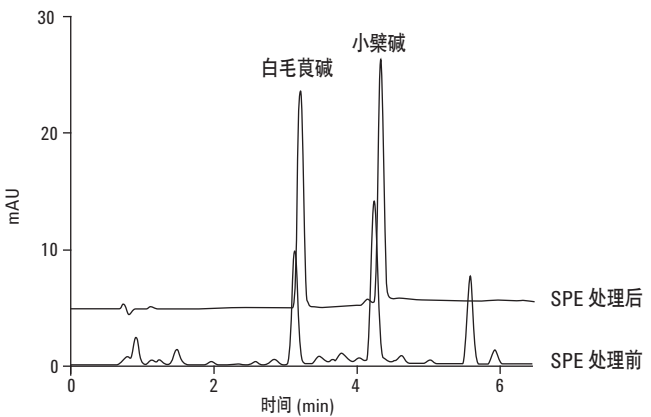


图 4. SPE 处理前后，白毛茛根提取物中白毛茛碱和小檗碱的 HPLC-DAD 色谱图

回收率和重现性

方法的回收率和重现性考察通过平行测定六份加标的商品白毛茛根进行，白毛茛碱加标三个不同浓度，小檗碱两个浓度。加标样品提取物的净化采用如上优化的 SPE 条件进行。回收率通过计算 SPE 处理后加标和未加标样品的浓度差异获得。结果见表 2。RSD% 均小于 5。

表 2. 白毛茛碱和小檗碱的回收率和重现性数据 (n = 6)

生物碱	浓度 (μg/mL)	回收率 %	% R.S.D.
白毛茛碱	10	76	3.94
	50	83	4.98
	100	102	2.40
小檗碱	5	99	4.68
	75	104	3.12

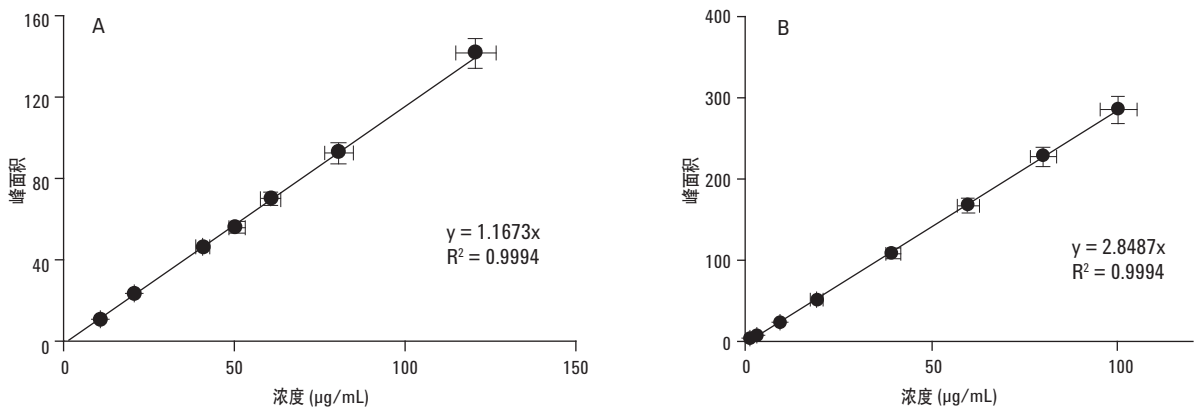


图 5. (A) 白毛茛碱和 (B) 小檗碱的校准曲线

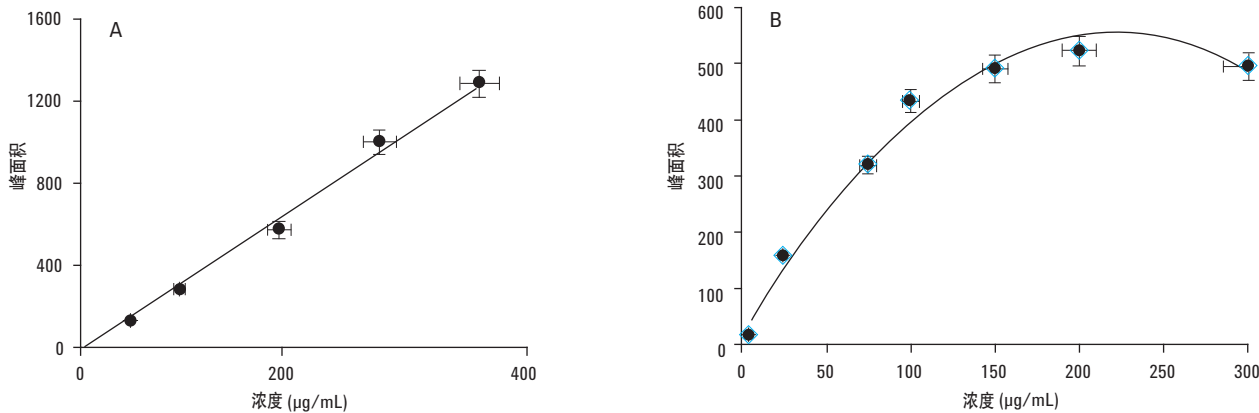


图 6. (A) 白毛茛碱和 (B) 小檗碱在 Bond Elute SPE 吸附剂上的载样容量

分析参数

校准曲线

制备浓度范围为 0–120 µg/mL 的 7 浓度白毛茛碱校准曲线，以及浓度范围为 0–100 µg/mL 的 8 浓度小檗碱校准曲线。稀释 1000 µg/mL 贮备液制备所需不同浓度的溶液。校准曲线线性关系良好，相关系数均为 0.9994（见图 5）。

SPE 方法的线性

Bond Elut Plexa SPE 吸附剂的载样容量通过向白毛茛根提取物中加入浓度递增的标准品混合物，再进行 SPE 净化后分析考察。白毛茛碱的线性范围可达 400 µg/mL 加标浓度，而小檗碱不超过 150 µg/mL。在 150 µg/mL 浓度水平以上，小檗碱甚至在上样阶段就有损失，表明吸附剂已经超载，不能承载更多样品（见图 6）。

检测限和定量限

通过截距 y_B 和回归曲线标准差 S_B 的三倍数据计算得到检测限 (LOD)。LOD 值采用公式 1 和 2 进行计算。

$$Y_{(LOD)} = y_B + 3S_B \quad \text{公式 1}$$

$$LOD = (y_{LOD} - y_B)/m, \quad m = \text{斜率} \quad \text{公式 2}$$

定量限 (LOQ) 的计算与采用公式 1 和 2 的方法相同，但改用 10 倍回归曲线的标准差数据（公式 3 和 4）。

$$Y_{LOQ} = y_B + 10S_B \quad \text{公式 3}$$

$$LOQ = (y_{LOQ} - y_B)/m \quad \text{公式 4}$$

白毛茛碱的 LOD 和 LOQ 分别是 0.50 和 1.65 µg/mL，而小檗碱的分别是 0.47 和 1.55 µg/mL。

实际样品测定

采用建立的方法分析白毛茛根提取物，分别含 22.24 和 68.13 µg/mL 的白毛茛碱和小檗碱。

结论

Bond Elut Plexa 固相萃取有效实现了白毛茛样品的净化，得到了更干净的色谱图。结果表明，本方法准确度高、重现性好，白毛茛碱的回收率范围为 76–102%，小檗碱为 99–104%，RSD% 均不超过 5%。白毛茛碱的 LOD 和 LOQ 分别为 0.50 和 1.65 µg/mL，而小檗碱的分别为 0.47 和 1.55 µg/mL。白毛茛提取物中分别含 22.24 和 68.13 µg/mL 的白毛茛碱和小檗碱。

参考文献

1. P. N. Brown and M. C. Roman, *JAQAC Int*, 91 (4) (2008), 694-701
2. M. Govindan and G. Govindan, *Fitoterapia*, 71 (2000), 232-235
3. L. Tong, Y. Liang, J. Song L. Xie, G. J. Wang, X. D. Lui, *J of Pharm Biomed Anal*, 40 (2006), 1218-1224.
4. M. S. Landis, *J. of Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007), 1029-1039.
5. L. F. C. Melo, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004), 51-58
6. K. Ridgeway, S.P.D Lalljie, R.M Smith, *J. Chromatogr. A*, 1153 (2007) 36-53
7. L.I Andersson *J. Chromatogr. B*, 739 (2000) 163
8. L.I Andersson *J. Chromatogr. B*, 745 (2000) 3
9. <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/columns-supplies/samplepreparation/spe/bondelutplexa/pages/default.aspx>
10. <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/si-1549.pdf>
11. J. Mokgadi, L.C. Mmualefe, N. Torto, 采用 Agilent Bond Elut OPT 固相萃取吸附剂对金印草生物碱净化并用高效液相色谱-二极管阵列检测器系统 (HPLC-DAD) 测定, 安捷伦科技公司, 应用简报, 出版号 5990-4188CHCN, 2009 年 10 月 5 日

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术规格等如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011
2011 年 12 月 19 日, 中国印刷
5990-9563CHCN



Agilent Technologies