

# 高速逆流色谱分离纯化腊梅花中的黄酮类化合物

## 一、实验目的

1. 学习和掌握高速逆流色谱的实验原理
2. 学习高速逆流色谱的操作技术

## 二、实验原理

高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography,HSCCC)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种连续高效地液-液分配色谱分离技术。与其它传统柱色谱不同的是,高速逆流色谱是利用溶质在两种互不相溶的溶剂系统中分配系数的不同,从而进行分离的方法,其优点在于不用任何固体载体或支撑体作为固定相,这样就避免了固定相对样品组分的不可逆吸附、污染、变形、失活等不良影响,使样品在短时间内实现高效地分离和纯化。高速逆流色谱作为一种理想的制备分离手段,目前已广泛应用于生物医药、天然产物、食品和化妆品等领域,尤其是在我国生物医药以及中药现代化等领域的应用愈来愈广。

## 三、实验试剂与器材

高速逆流色谱仪、旋转蒸发仪、超声波清洗仪、分析天平、高效液相色谱仪、分液漏斗、锥形瓶、小烧杯等。

正己烷、乙酸乙酯、甲醇、乙酸、腊梅花提取物、去离子水。

## 四、实验步骤

### 1.溶剂体系的配制

本实验所使用的溶剂系统为正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水:乙酸(5: 3: 3.5: 5: 0.25),将各溶剂按比例放入 2L 分液漏斗中,充分摇匀后在室温下静置 5min。将分配平衡的两相溶剂体系按上相和下相分开放入 1L 溶剂瓶中,超声脱气 30min,以备使用。

### 2. 分配系数的测定

本实验利用 HPLC 法测定样品在该溶剂体系中的分配系数,取约 10mg 腊梅花黄酮粗提物于 10mL 的玻璃试管中,加入预先达到平衡的两相溶剂系统的上相和下相各 3mL 于此试管中,超声振荡混匀,使粗提物充分溶解,待达到分配平衡后,分别取上相和下相各 0.5mL,水浴烘干后用等量的色谱纯甲醇溶解,经 HPLC 检测后,得到上相中该化合物的峰面积 A1 和下相中该化合物的峰面积 A2,即分配系数 K 为  $K=A1/A2$ 。

### 3.样品溶液的配制

称取 50mg 腊梅花黄酮粗提物,溶于 10mL 下相(流动相)中,超声充分溶解

后以备 HSCCC 进样使用。

#### 4.高速逆流色谱分离腊梅花中的黄酮化合物

首先将两相溶剂系统中已超声脱气后的上相(固定相),以 40mL/min 的速度泵入 HSCCC 螺旋管中,待螺旋管充满后,调节主机转速 850,正转,当达到转速后,以 10mL/min 的速度将下相(流动相)泵入其中,待两相平衡后,将 10mL 粗提物溶液由进样阀注入到螺旋管中,同时开始采集数据,通过紫外检测器(360nm)检测流出物,按照色谱峰收集目标成分。

#### 5. 高效液相色谱测定黄酮化合物的纯度

将目标成分的收集液减压浓缩至干,用 5mL 甲醇超声溶解。采用高效液相色谱仪测定纯度,色谱条件如下:Aligen Eclipse XDB-C18 色谱柱;流动相 0.2% 磷酸水溶液-甲醇(40:60);流速 1.0 mL/min;检测波长 360 nm;进样量 20  $\mu$ L。

### 五、思考题

- 1.高速逆流色谱仪的分离原理?
- 2.高速逆流色谱两相溶剂体系的选择原则?

#### 附高速逆流色谱仪操作方法:

- 1.打开恒温循环器,开机顺序:接通电源-设定温度-开启循环-达到设定温度后,开启冷凝。
- 2.打开检测器预热 15 分钟,并设置波长。确定设备上旋钮打在 inject 和 in 处。
- 3.将管路放入固定相,先用固定相清洗泵,流量调至 40mL/min 废液从泵的右面出口出来,大约 30mL 后清洗完毕,关闭流量。
- 4.将泵右面的管路接入 in 档,打开流量。将固定相充满整个管路(约 300mL,约 8min),当 out 口流出固定相 30mL 左右时,关泵。
- 5.将管路放入流动相,设定流量 10mL/min (5-20mL/min 都是允许的),调整转速至 850,按 FWD (正转),达到转速后,打开流量,用 250mL 量筒接 out 口出来的液体,先出固定相,后出流动相,当流动相出来 20-50mL 时,系统即达到平衡好的状态,关泵并计算保留率。

保留率=(柱体积 315mL+进样量 20mL+其余管路体积 10mL-流出的固定相体积)/柱体积

当保留率在 30%-80%时,即为可行的保留率。

- 6.将 out 档接入检测器(下进上出)并将流速调至 5mL/min。
- 7.清洗进样:inject 处的针筒里注入流动相,load 处的针筒再抽出来,重复 2-3 次。
- 8.配制样品:样品用流动相或固定相溶解至体积为 10-20mL。

9.进样：将溶解的样品倒入 inject 处的针筒，切到 load 档，将 load 处的针筒往里推，排出 inject 处的气泡，再往外抽，不用全抽完，打到 inject 档。点击工作站的绿色圆圈。待全部进样完毕，用水、乙醇分别冲洗进样器三次。

10.出峰时收集检测器流出的样品，走完样按红色圆圈，再停泵。

11.停工作站，关检测器，停设备。

12.清洗泵与检测器：若流动相、固定相中含有酸、碱、盐，将流速调至 10mL/min，先泵入水 1min，再泵入乙醇 1min，即清洗完毕。若流动相、固定相中不含有酸、碱、盐，只要以 10mL/min 流速泵入乙醇 1min，即清洗完毕。

13.清洗管路：将流速调至 40mL/min，若流动相、固定相中含有酸、碱、盐，须将流动相全部吹出，再泵入水，直至水流出 30mL,将水吹出，停掉吹气阀，再泵入 100mL 的工业乙醇；若流动相、固定相中无酸碱盐，直接将流动相吹出，待液体流完，停掉吹气阀，再泵 100mL 工业乙醇。将工业乙醇吹出至有雾状时，转速调小至 750，打到 REV，直至无雾状，将设备停掉，再吹气半小时，关掉设备。