

制备高效液相色谱分离纯化系统的研制与开发*

Research and Development of Preparation High Performance Liquid Chromatography System for Isolation and Purification

刘布鸣¹, 马彦², 冯可荣³, 黄艳¹, 王廷伟², 林霄¹, 莫建光⁴

LIU Bu-ming¹, MA Yan², FENG Ke-rong³, HUANG Yan¹, WANG Ting-wei², LIN Xiao¹, MO Jian-guang⁴

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西南宁市威玛龙色谱科技有限公司, 广西南宁 530022; 3. 广西计量检测研究院, 广西南宁 530022; 4. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Nanning Weimar Technology Co., Ltd. Dragon chromatography, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi Institute of Metrology and Test, Nanning, Guangxi, 530022, China; 4. Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:介绍一种基于柱层析技术、高效液相色谱技术于一体的计算机智能控制全自动、高性能的化学物质纯化系统。该系统属于高压制备高效液相色谱,采用模块化设计模式,各模块经由计算机工作站软件统一协调,实现进样、分离、馏分收集自动化。该系统应用于中药复杂成分分离、提取和纯化的效率高、馏分损失少、样品回收率高。

关键词:制备色谱系统 分离 纯化 工作站

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2010)03-0354-03

Abstract: A purification system based on column chromatography and high performance liquid chromatography with automated computer intelligent control was introduced. The system used high pressure for preparation high performance liquid chromatography and modular designed modes. All modes are coordinated by computer workstation software to implement sample injection, separation and fraction collection automatically. The instrument can be used to separate, extract and purify complex components in traditional Chinese medicine with high efficiency of separation and purification, low loss fraction and high recovery rate.

Key words: preparation high performance liquid chromatography system, isolation, purification, workstation

制备色谱技术在中药天然药领域的样品制备、物质纯化、化学成分研究等作用越来越受到业界的关注。目前国内应用的制备色谱系统以进口为主,国内尚无成套的自动化程度较高的制备系统面市,多数仅停留于大流量制备泵及制备型检测器(或分析

型检测器的流通池分流方式)的简单拼凑,系统的概念较为淡薄,国产的此类设备在技术上尚不成熟,与国际同类产品的差距较大,而进口该产品因高昂的价格严重制约着国内特别是基础的需求。

制备高纯度的化学标准品以及质量标准规范化研究是中药现代化发展的必由之路。而中药的成分多而结构复杂,要从中分离纯化化学标准品非常困难,采用传统的分离技术如超离心、沉淀、萃取、超滤等往往达不到所需的纯度要求,而色谱分离技术无

收稿日期: 2010-06-05

作者简介: 刘布鸣(1956-),男,研究员,硕士研究生导师,主要从事药物分析与质量标准研究。

* 广西创新能力建设项目(09-090-10C)资助。

疑是这类物质精细分离的有效手段。目前化学标准品的纯化多采用反复多次人工柱层析、重结晶,或采用进口的高压制备液相色谱,前者费时费工,后者设备投资较高,因此国产化全自动的系统必要性日趋突出。我们研制开发出一套集柱层析技术、高压液相制备色谱技术于一体并用计算机智能控制的全自动、高性能的化学标准品纯化系统(UC-3250 高压制备系统),并通过该系统建立制备高纯度的化学标准品的技术与平台,为中药化学标准品的制备和纯化提供设备、方法和示范。本系统的研制与开发对中药现代化的作用是显而易见的,具有重大的实际意义和学术价值。

1 制备色谱系统的结构与功能

UC-3250 高压制备色谱系统集柱层析技术、液相色谱技术于一体并用计算机智能控制的全自动、高性能的化学标准品纯化系统,包括:分离系统、检测系统、样品处理系统和控制系统。UC-3250 高压制备色谱系统是专门为纯化应用而设计,可以满足从纯化研究到小规模工业生产的需求。系统提供了灵活的配置,可配置从低成本的简单系统到全自动的系统(图1)。系统的 UC-3286 制备型高压输液泵可以配置100ml、250ml、500、1000ml 泵头;流速0.1~1000ml/min;最大耐压可以为100ml/min,40MPa;250ml/min,20MPa;500ml/min,10MPa;1000ml/min,5MPa。UC-3292 紫外检测器(可变波长)。UC-3266 制备型自动进样器(X, Y 坐标型)。UC-3267 全自馏份收集器(12位)。全自动包括:自动进样自动馏份收集,可现无人值守自动纯化。UC-3269 全反控制制备版色谱工作站及软件的功能强大,可以实现可靠、复杂、精确切割收集控制。网络化可通过网络实时监控系统的运行。

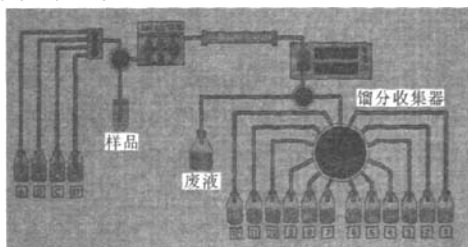


图1 UC-3250 高压制备色谱系统结构

2 制备色谱系统的设计思路与技术特点

全套系统采用全新的设计开发思路,包括大流

量制备泵设计,电气系统设计,数字通讯系统设计。

进样泵设计是采用自行开发的高压输液泵的泵部件,对泵头进行改造,最大流速提升为50ml/min,以满足快速、大量进样的要求。由工作站来驱动制备六通阀的动作,同时进样信息传送到工作站,进而开始采集信号,控制馏分收集器的切换。

紫外可见检测器采用最简捷的设计,使光学元件减至极少。波长控制采用单片机正弦算法实现,取消了正弦杆,使机械可靠性得以提高,信号处理采用24位 A/D 转换后全数字化处理,对数转换由单片机完成,避免了温度的影响。

进样系统包括电控制六通阀、进样泵。制备六通阀选购美国 Rheodyne 公司产品。对压力波动的抑制,采用通过电子学的相关技术加以解决。经过对高压输液泵系统的研究,并参考对国内外的高压输液泵,采用去掉机械缓冲器,由实验的方法来确定周期控制信号,从而使流速平稳,减小脉动。

3 制备色谱系统的控制流程

系统具有完善的主控和反控能力,具有控制功能的色谱数据工作站软件,界面友好,操作简单方便。泵单片机控制核心软件,检测器单片机控制数据采集处理核心软件,高稳定氙灯电源控制技术软件等实现整机自动控制(图2)。

全自动的控制过程是作为自动化控制核心的计算机工作站,通过编程控制进样泵启动、停止以及运行时间来控制上样量,由工作站给出信号触发进样阀的切换。流动相的输送工作可以由工作站设定,也可以由泵面板设定。工作站采集样品峰信息并进行处理,根据峰信息对待收集组分进行数据处理,给出收集的开始、结束以及收集时间等信息,由工作站发送命令来控制馏分收集器的采集。

分离系统运行过程是进样时机控制程序和分离过程的实时监测以紫外检测器的相应信号为依据,经工作站数据处理部分进行处理,给出色谱分离的基本参数,根据色谱分离参数及谱图对待收集的组分进行收集,由工作站驱动馏分收集器的相应阀,实现馏分收集。

样品的制备流程是待纯化样品通过进样泵注入进样阀的定量器皿中,进样阀将样品切换入制备系统,在大流量制备泵的推动下,进入制备柱进行分离,分离后的物质依次进入检测器检测,根据检测结果由馏分收集器将既定的物质收集于容器中。

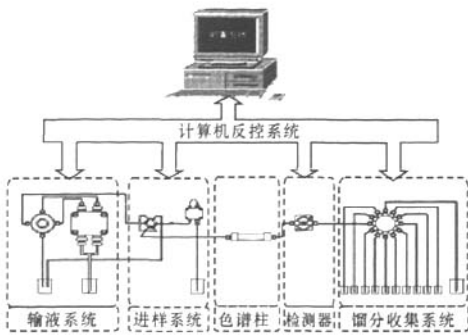


图2 高压制备色谱系统流程

4 制备色谱系统的色谱工作站与软件特点

高压制备色谱系统的色谱工作站与软件是在多年的色谱分析仪器使用经验的基础上开发而成,有操作方便、功能强大、运行稳定等诸多特点,其主要性能特点为:(1)具有国际标准的 Windows 界面风格,占用系统资源少,多线程、多任务并行处理技术,性能稳定,采样同时可播 dvd、听音乐。(2)数据查找图形预览文件带有样品信息说明,加上图谱图形预览,快速准确定位图谱数据文件。(3)快捷的操作界面图形化,直观方便。在同一窗口中定性、定量、校正曲线制作一次完成,可以对多个相同浓度和不同浓度的标准试样进行校准。(4)功能完善强大。面积、峰高与归一、校正归一、外标、内标、指数等多种定性、定量方法可供选择。自动零点扣除。根据色谱柱类型自动进行参数动态调整,完美积分,不漏峰,不错判峰。(5)多张谱图可以同时打印在一张报告中,可以分开坐标打印也可以合成在一个坐标中叠加打印。每张谱图的分析结果表可以打印在同一报告中同时给出统计结果。

5 应用实例

应用高压制备色谱系统对剑叶龙血素 C 进行

制备。取百合科植物剑叶龙血树 [*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen.] 含脂木材提取的树脂状药材龙血竭,粉碎,用氯仿提取多次,滤过,合并滤液,回收氯仿,得氯仿提取物,经硅胶柱层析,用石油醚(60~90℃)-醋酸乙酯混合溶剂洗脱,收集含剑叶龙血素 C 的流分,合并,再进行硅胶柱层析,用石油醚(60~90℃)-醋酸乙酯混合溶剂洗脱,得粗结晶。将粗结晶用甲醇溶解,配成 50mg/ml 的溶液,采用制备色谱柱 Kromasil(15 mm × 250mm, 5μm),色谱条件以甲醇-水(85:15)为流动相,流速为 10 ml/min,检测波长为 295nm,收集 15~20min 的流分,合并流分,再经 50℃ 旋转蒸发器真空浓缩至干,得到无色针状结晶。该结晶经分析型 HPLC 检查,纯度达 98% 以上,收率为 90% 以上,最后用紫外、红外、质谱和核磁共振波谱确证结构为剑叶龙血素 C。

6 结束语

制备色谱设备造价高,我们研制开发的高压制备色谱系统造价低廉,在性能上可与进口仪器相比,性价比高,能分离提纯得到纯度大于 98% 以上的化学标准品,可以满足国内大多数科研及企业对中药化学标准品的要求。国外目前制备色谱已广泛用于药物及生物产品的纯化,而且发展迅速,但是因经济利益,国外各色谱公司对其技术严加保密,极少公开发表,与分析型色谱相比制备型色谱仍处于研究发展阶段。在我国 PHPLC 的研究与应用近年来虽有所发展,但是与国际水平相比差距甚远。作为一种高效的分离与纯化技术,PHPLC 在我国中药现代化进程中无疑具有广阔的发展与应用前景,纯化系统以及化学对照品的市场非常巨大,加速研究与积极推广使用无疑是对广大科技工作者的一大挑战和艰巨任务。

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 348 页)

- [8] 李江文,赵发琼,肖萍,等. 氯丙嗪在离子液体 BMIMPF₆ 修饰玻碳电极上的伏安行为[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 5-9.
- [9] 李小青. 氧化还原蛋白质在离子液体/纳米材料复合体系中的直接电化学[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2009.
- [10] Dettlaff-Weglikowska U, Benoit J M, Chiu P W, et al. Chemical functionalization of single walled carbon nanotubes[J]. Current Applied Physics, 2002, 2(6): 497-501.

- [11] Yan Q, Zhao F, Li G, et al. Voltammetric determination of uric acid with a glassy carbon electrode coated by paste of multiwalled carbon nanotubes and ionic liquid[J]. Electroanalysis, 2006, 18(11): 1075-1080.
- [12] Gao R, Zheng J. Direct electrochemistry of myoglobin based on DNA accumulation on carbon ionic liquid electrode[J]. Electrochemistry Communications, 2009, 11(7): 1527-1529.

(责任编辑:韦廷宗)