

國立交通大學

應用化學系碩士班

碩士論文

以離心分配層析法結合三相溶劑系統
製備分離洋蔥中兩種類黃酮成分

Preparative Separations of Two Flavonoids in
Onion by Centrifugal Partition Chromatography
Using a Three-phase Solvent System



研究生：黃詩軒

指導教授：余艇 博士

中華民國一百年六月

以離心分配層析法結合三相溶劑系統
製備分離洋蔥中兩種類黃酮成分

Preparative Separations of Two Flavonoids in
Onion by Centrifugal Partition Chromatography
Using a Three-phase Solvent System

研究生：黃詩軒

Student : Shih-Hsuan Huang

指導教授：余 艇 博士

Advisor : Dr. Tiing Yu



Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of
Master of Science
In
Applied Chemistry
June 2011
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國一百年六月

以離心分配層析法結合三相溶劑系統 製備分離洋蔥中兩種類黃酮成分

學生：黃詩軒

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學系碩士班

摘要



本研究是利用離心分配層析結合三相溶劑系統，來製備分離洋蔥中 quercetin-3,4-di-*O*-glucoside(Q3,4G) 及 quercetin-4-*O*-glucoside (Q4G)兩種主要類黃酮成分。

洋蔥樣品先以 60%(v/v)的乙醇萃取，分離實驗中使用的溶劑系統為 Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water (2 : 2 : 3 : 3)的三相溶劑系統，管柱總體積為 240 mL，在 1000 rpm 的轉速下，固定相之滯留率為 82% (其中中層相占 21%、下層相 79%)。首先將下層相(固定相)注入充滿管柱，再以上升法(ascending mode)注入中層相，待第一次平衡後；接著以上層相注入，達第二次平衡後可注入樣品。分離樣品過程中，首先將上層相以上升法沖堤 30 分鐘後，轉換以中層相沖堤 50 分鐘，最後再切換到下層相以下降法(descending mode)

沖提 120 分鐘，分管收集之樣品沖提液，以電灑質譜儀分析之。洋蔥粗萃取物 0.26 克，經過離心分配層析分離之後，Q3,4G 和 Q4G 純度和回收量以液相層析估計為 90% (0.33 mg) and 92% (0.12 mg)。

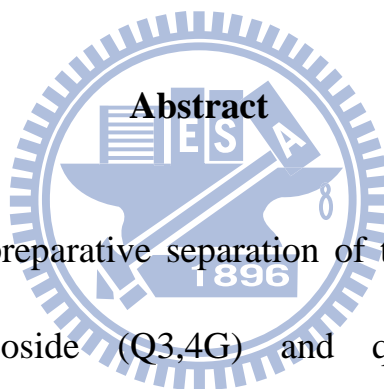


Preparative Separations of Two Flavonoids in Onion by Centrifugal Partition Chromatography Using a Three-phase Solvent System

Student : Huang Shih Hsuan

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University



Abstract

We developed a preparative separation of two active compounds, quercetin-3,4-di-*O*-glucoside (Q3,4G) and quercetin-4-*O*-glucoside (Q4G), from onion using centrifugal partition chromatography (CPC) with a three-phase solvent system.

The crude extract was obtained using a 60% (v/v) ethanol aqueous solution. The three-solvent system was composed of hexane / methyl tert-butyl ether / acetonitrile / water = 2:2:3:3 (v/v). The stationary-phase retention ratio was 82% (including 21% middle phase and 79% lower phase) in a 240-ml column under 1000 rpm rotation speed. The

separation column was first filled with the lower phase and the middle phase was pumped into the column. After the equilibrium was reached, the upper phase was delivered until the second equilibrium was attained. We then injected the sample solution and eluted the column with the upper phase under the ascending mode for 30 min. The elution was then switched using the middle phase for 50 min. Finally, the elution was completed using the lower phase for 120 min under the descending mode. The collected fractions were analyzed using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-Mass). The purities and recoveries, estimated using a HPLC, were 90% (0.33 mg) and 92% (0.12 mg) for quercetin-3,4-di-*O*-glucoside and quercetin-4-*O*-glucoside, starting from a 0.26 g onion crude extract.

謝誌

兩年的碩士學涯宣告完成了，即將邁向人生的另一個起點，兩年裡的點點滴滴、充實的生活深深的烙印在腦海裡，很開心的兩年，也終於畢業了。

最想先感謝的莫過於是恩師余艇老師的教導。兩年過程中，因為家裡的狀況，老師的體諒，讓我能夠學業與家庭兩方兼顧，老師除了實驗上的細心指導，也給了我們學生許多關於生活上該有的態度，每一件事情應該盡應有的態度去完成；感謝陳月枝老師與許馨云老師，在百忙之中抽空前來指導口試與提醒我論文撰寫該注意的細節。

感謝伶宜學姐、育國、典佑學長，在我們實驗起步時，給予了莫大的幫助與指導；感謝士峯、宜儒，不管學業或是實驗中也都不吝嗇給我想法與幫助，我們三個終於畢業了；感謝弘哲、伯森學弟和沛穎、俐揚學妹們幫忙張羅口試，也希望你們明年順順利利畢業。

最後並感謝我的家人支持，雖然爸爸一直深受病魔侵蝕，但心裡惦記的卻是希望我順利畢業，直等到我畢業您才安心放下人生最後一個心願，去另一個世界享樂了。還有媽媽和哥哥以及姐姐的鼎力支持，我終於踏過這艱辛的一步，爸爸，我畢業了!!!

總目錄

| | |
|------------------------|-----|
| 摘要..... | i |
| Abstract..... | iii |
| 謝誌..... | v |
| 總目錄..... | vi |
| 圖目錄..... | x |
| 表目錄..... | xii |
| 第一章 緒論..... | 1 |
| 1.1 前言..... | 1 |
| 1.2 研究動機..... | 2 |
| 第二章 研究背景與文獻回顧..... | 4 |
| 2.1 洋蔥..... | 4 |
| 2.1.1 洋蔥成分簡介..... | 4 |
| 2.1.2 洋蔥成分效用..... | 4 |
| 2.1.3 類黃酮成分與抗氧化關係..... | 5 |
| 2.2 逆流層析技術..... | 6 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1 簡介 | 6 |
| 2.2.2 逆流層析的分離理論 | 7 |
| 2.2.3 逆流層析的儀器系統 | 9 |
| 2.2.4 逆流層析的特點 | 12 |
| 2.2.5 逆流層析的移動和固定相溶劑系統 | 13 |
| 2.2.6 三相溶劑系統在逆流層析上的應用 | 13 |
| 2.3 離心分配層析 (centrifugal partition chromatography, CPC)..... | 14 |
| 2.3.1 原理 | 14 |
| 2.3.2 移動相與固定相的流動模式 | 17 |
| 2.3.3 溶劑系統的選擇 | 18 |
| 2.3.4 影響固定相滯留量的因素 | 18 |
| 2.3.5 離心分配層析儀的應用 | 19 |
| 第三章 實驗..... | 20 |
| 3.1 實驗樣品和溶劑 | 20 |
| 3.2 實驗儀器 | 21 |
| 3.3 實驗流程 | 23 |
| 3.3.1 洋蔥的前處理流程 | 23 |
| 3.3.2 偵測洋蔥成分在不同溶劑系統中的分佈情況 | 23 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 3.3.3 純度的估計 | 24 |
| 3.3.4 回收量的估計 | 24 |
| 3.3.5 CPC 製備實驗步驟..... | 25 |
| 3.3.6 HPLC 分析收集液實驗步驟..... | 27 |
| | |
| 第四章 結果與討論..... | 29 |
| | |
| 4.1 乙醇萃取洋蔥的濃度選擇 | 29 |
| | |
| 4.2 以 HPLC 分析洋蔥萃取出黏稠物..... | 29 |
| 4.2.1 HPLC 移動相的選擇..... | 29 |
| 4.2.2 HPLC 分析結果..... | 31 |
| | |
| 4.3 以質譜鑑定洋蔥成分的結構..... | 31 |
| 4.3.1 以質譜鑑定 peak a 結構..... | 31 |
| 4.3.2 以質譜鑑定 peak b 結構 | 32 |
| | |
| 4.4 離心分配層析儀製備分離的實驗結果 | 33 |
| 4.4.1 配製不同的溶劑系統..... | 33 |
| 4.4.2 最佳化溶劑系統的選擇..... | 35 |
| 4.4.3 三相系統結合離心分配層析儀沖提時間的選擇..... | 36 |
| 4.4.4 三相溶劑系統的選擇 | 38 |
| 4.4.5 固定相滯留量的探討 | 39 |

| | |
|--|----|
| 4.4.6 三相系統結合離心分配層析法的分離結果..... | 40 |
| 4.4.7 以質譜鑑定 CPC 層析圖中波峰 I、II、III、IV 結構..... | 42 |
| 4.4.8 樣品在 CPC 中分離過程的探討 | 45 |
| 4.4.9 回收量及純度的探討 | 48 |
| 4.5 結論 | 48 |
| 參考文獻..... | 49 |



圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖 1-1、洋蔥中四種類黃酮成分的結構圖 | 3 |
| 圖 2-1、類黃酮基本結構 | 5 |
| 圖 2-2、液相-液相層析方法 | 8 |
| 圖 2-3、流體靜態平衡系統(HSES)示意圖[10] | 10 |
| 圖 2-4、流體動態平衡系統(HDES)示意圖[11] | 12 |
| 圖 2-5、CPC 儀器示意圖[19] | 16 |
| 圖 2-6、CPC 的兩種流動模式[20] | 17 |
| 圖 3-1、CPC 實驗儀器裝置 | 27 |
| 圖 3-2、三相溶劑系統示意圖 | 27 |
| 圖 3-3、HPLC 實驗儀器裝置 | 28 |
| 圖 4-2、peak a 測 ESI-MS 正電荷質譜圖 | 32 |
| 圖 4-4、以 CPC 來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl tert-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 3 (v/v)，沖堤時間 30-40-50 min (上- 中-下層) | 37 |

| | |
|---|----|
| 圖 4-5、以 CPC 來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl tert-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 3 (v/v)，沖提時間 30-50-120 min (上-中-下層)..... | 37 |
| 圖 4-6、以 CPC 來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl tert-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 2 (v/v)，沖提時間 30-50-120 min (上-中-下層)..... | 38 |
| 圖 4-7、上圖:經由 CPC 分離後的波峰 I 收集後 HPLC 的分析圖譜 . | 41 |
| 下圖:經由 CPC 分離後的波峰 IV 收集後 HPLC 的分析圖譜 | 41 |
| 圖 4-8、上圖:經由 CPC 分離後的波峰 II 收集後 HPLC 的分析圖譜 | 42 |
| 下圖:經由 CPC 分離後的波峰 III 收集後 HPLC 的分析圖譜 | 42 |
| 圖 4-9、以 ESI-MS 正電荷分析波峰 I 的層析圖 | 43 |
| 圖 4-10、以 ESI-MS 正電荷分析波峰 II 的層析圖 | 44 |
| 圖 4-11、以 ESI-MS 正電荷分析波峰 III 的層析圖 | 44 |
| 圖 4-12、以 ESI-MS 正電荷分析波峰 IV 的層析圖 | 45 |
| 圖 4-13、樣品在 CPC 中分離過程示意圖 | 47 |



表目錄

| | |
|-------------------------------------|----|
| 表 4-1、HPLC 移動相 | 30 |
| 表 4-2、五組兩相溶劑成分系統 | 34 |
| 表 4-3、不同溶劑成分比平衡後上、中、下層中佔有比例 | 34 |
| 表 4-4、兩目標分析物在五組兩相溶劑系統中的分配係數 | 35 |
| 表 4-5、平衡後在管柱中各層相所佔的體積 | 39 |
| 表 4-6、CPC 分離的實驗參數 | 41 |
| 表 4-7、波峰 I 和 IV 偵測 ESI-MS 正電荷 | 43 |
| 表 4-8、回收量及純度 | 48 |



第一章 緒論

1.1 前言

洋蔥被使用在人們飲食上已有相當長的一段歷史。從古埃及時代開始，一直是健康飲食和天然藥物方面不可或缺的一部分。洋蔥中的抗菌、防腐、抗真菌的功效，更使得它在第二次世界大戰期間，在戰場上被用來做為俄羅斯和英國士兵傷口治療之用。到至今，洋蔥更是多次被證實了具有相當高的營養和醫療價值。近年來，更是被廣泛研究，致力於治療各種疾病的潛在特性。洋蔥本身的化學物質非常多且複雜，除了將近有百分之九十的水分以外，並含有維生素、礦物質、含硫磺類化合物、類黃酮等多種成分。

槲皮素(Quercetin)是一種廣泛存在於多種日常食用蔬果中的天然抗氧化物，例如：洋蔥、蘋果、櫻桃、草莓等。槲皮素已被文獻[1；2；3；4]證實指出，具有預防心血管疾病、抗發炎、抗過敏等功能，而在抗癌方面亦具有初步的正面實驗成果。

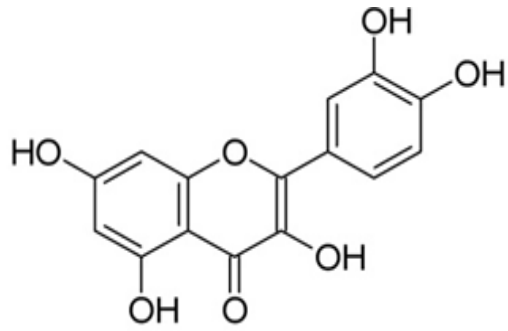
離心分配層析(Centrifugal partition chromatography, CPC)，是一種液相-液相層析技術，因為CPC是使用中空的管柱，在沖提過程中，管柱內部的固定相占總管柱的體積比例往往可達到60%以上，並且比起典型的固定相填充管柱，擁有更大的容量。因此CPC目前被定位在製備型的層析儀器，可應用在天然物的分離，能製備大量的樣品，

對於醫學或藥物開發的相關研究有著莫大的幫助。

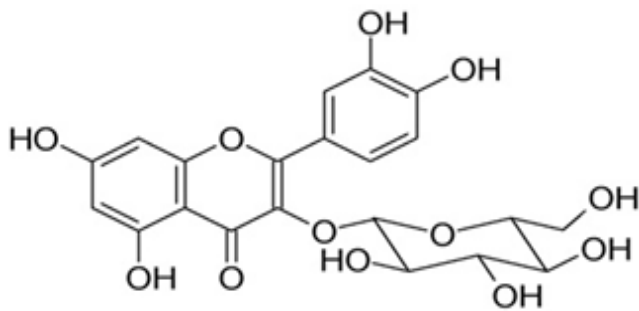
1.2 研究動機

本研究中，我們希望利用離心分配層析的技術來分離洋蔥中的有效成分，並找出最合適用來分離洋蔥萃取物的 CPC 溶劑系統，使得洋蔥樣品可以期望達到製備、分離、純化洋蔥中的四種主要類黃酮成分 Quercetin、Quercetin-3-*O*-glucosid、Quercetin-4-*O*-glucoside、Quercetin-3,4-di-*O*-glucoside (圖 1-1)，藉由 CPC 分離製備此兩種類黃酮成分，期望在以後的研究能有所貢獻。

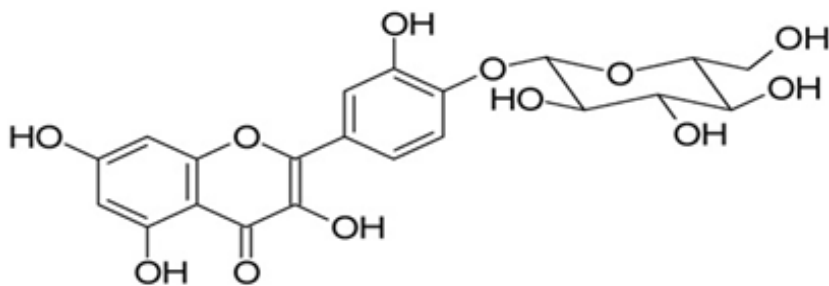
另外，三相溶劑系統在 CCC 方面的應用，目前為止的研究都還在標準品分離的萌發階段；而在 CPC 尚未有與三相溶劑系統結合的相關研究。在本研究中，首次將 CPC 與三相溶劑系統結合在天然物運用的可行性。



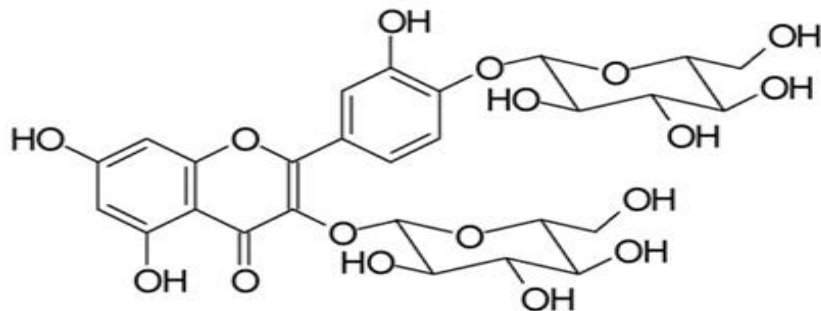
Quercetin



Quercetin-3-*O*-glucoside



Quercetin-4-*O*-glucoside (Q4G)



Quercetin-3,4-di-*O*-glucoside (Q3,4G)

圖1-1、洋蔥中四種類黃酮成分的結構圖

第二章 研究背景與文獻回顧

2.1 洋蔥

2.1.1 洋蔥成分簡介

洋蔥學名為：*Allium cepa* L.，兩年生草本植物，一般認為它是一種營養豐富的食材，甚至對於疾病的預防與治療，亦有相當的成效。洋蔥除了包含將近 90% 的水分以外，並含有獨特且多種的有機硫化物 [5]，而在果糖、葡萄糖、維他命 C、鐵質、鈣質、類黃酮 [6；7；8] 也都具有豐富的含量。近年許多研究中，更是發現洋蔥中所豐富的槲皮素(Quercetin)具有多種潛在的醫療功效。



2.1.2 洋蔥成分效用

在洋蔥中含有豐富的類黃酮(Flavonoid)成分，許多研究報告證實其具有(1)抗氧化、清除自由基作用，(2)具保護心血管，降低血膽固醇、減少動脈硬化疾病 [1]，1995 年 Pace-Asciak 等人研究報告 [2] 指出，類黃酮成分具有抑制脂質過氧化物所導致的血小板凝集，可避免粥狀動脈硬化的發生。(3)抗發炎、過敏，(4)抗癌等功效 [3]。1998 年，Kanazawa 等人的研究 [4] 發現，槲皮素能夠抑制 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)，Trp-P-2 是一種對

肝臟具有專一性致癌因子，也是一種高度的細胞突變因子，常存於飲食中，形成途徑是高蛋白食品經烹煮過程中色氨酸高溫裂解所形成，尤其是燒焦部位，例如烤焦的牛肉或魚肉。槲皮素能在Trp-P-2破壞細胞DNA之前先中和Trp-P-2。

2.1.3 類黃酮成分與抗氧化關係

類黃酮如圖2-1所示包含兩個苯環及一個含氧環酮基，其中槲皮素在位置3,5,7,3',4'處含有OH取代基，在A環之C-5及C-7位置，B環之C-3'及C-4'位置及C環之C-3的羥基使得類黃酮具有抗氧化性，抗氧化機制主要為清除氧自由基作用；而在不同位置不同取代基也都造成抗氧化性的強弱差別[9]。

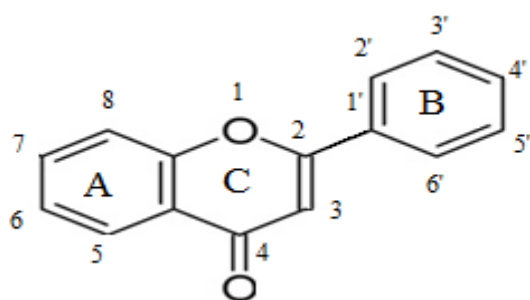


圖2-1、類黃酮基本結構

2.2 逆流層析技術

2.2.1 簡介

逆流層析[10]是一種固定相、移動相皆為液體的液相-液相萃取技術，所以過程中能夠完全排除樣品對於固體固定相的不可逆吸附，造成對樣品的污染問題或管柱阻塞的問題。在沖提過程中利用樣品中不同分析物對於兩相溶劑之間分配係數(partition coefficient)的相異而分離。

逆流層析技術的發展，起源於二十世紀 50 年代的逆流分佈法 (countercurrent distribution, CCD) [11]，它是一種不連續式的萃取方式，其以數百個玻璃的分離管進行萃取，但是因為儀器本身過於複雜且龐大，而過程中也需要比較長時間來分離。直到 70 年代時，依據流體靜力學 (Hydrostatic equilibrium system, HSES) 原理出現了一套液滴逆流層析(Droplet Counter Current Chromatography, DCCC)技術。而 Yoichiro Ito 等人對於之前的基礎理論開始深入研究，進而發展出逆流層析(countercurrent chromatography, CCC)；在 1982 年 Sanki Engineering Ltd. (Kyoto, Japan)也研發出了離心場不同於 CCC 的另一種離心分配層析(centrifugal partition chromatography, CPC)儀器設備。

2.2.2 逆流層析的分離理論

逆流層析分離的基礎[12；13]是建立於逆流分佈法，CCD 是一種非連續式的萃取方式，其過程可以用圖 2-2(A)說明：假設有多個連續萃取槽，分析物最初在 L_0 中，而 $U_0、U_1\dots U_n$ 和 $L_0、L_1\dots L_n$ 分別為不含分析物的兩相(U 代表上層液相；L 代表下層液相)。當 U_0 和 L_0 混合後，分析物在上層相與下層相中分配，達到平衡時， U_0 會萃取走部分分析物，再接著與 L_1 混合，完成平衡後，再依序與 $L_2、L_3\dots L_n$ 混合；新的上層相 $U_1、U_2\dots U_n$ 依序與 U_0 做相同的萃取動作。由二相式定理可知，大部分的分析物最後會集中於某幾個萃取槽中。若一開始含有兩種對於上下層相有著不同分配係數的分析物，藉由增加萃取槽的數目，就可以提高分離的解析度，然而隨著萃取的次數增加，分析物的分佈也會變的比較寬(broad)。

圖 2-2(B)，為液相-液相分配層析法，亦是 CCD 基礎概念的延伸。分析物在無限多個萃取槽間連續進行分配萃取，不同的物質會因為對於相與相之間的分配係數不同而產生分離的情形，此為液相層析的基礎觀點。圖 2-2(C)，為一般所熟知的液相層析，藉由管柱中填充的固體支持物(固定相)，使液體以物理性吸附或化學鍵結方式留在固體支持物的表面。相較之下，前者的缺點為，因為物理性吸附若造成固

定相容易在沖提過程中溶解在移動相中而減少，而後者之固定相雖不會被移動相帶走，但卻會因為與分析物的吸附，造成層析峰的拖尾現象。

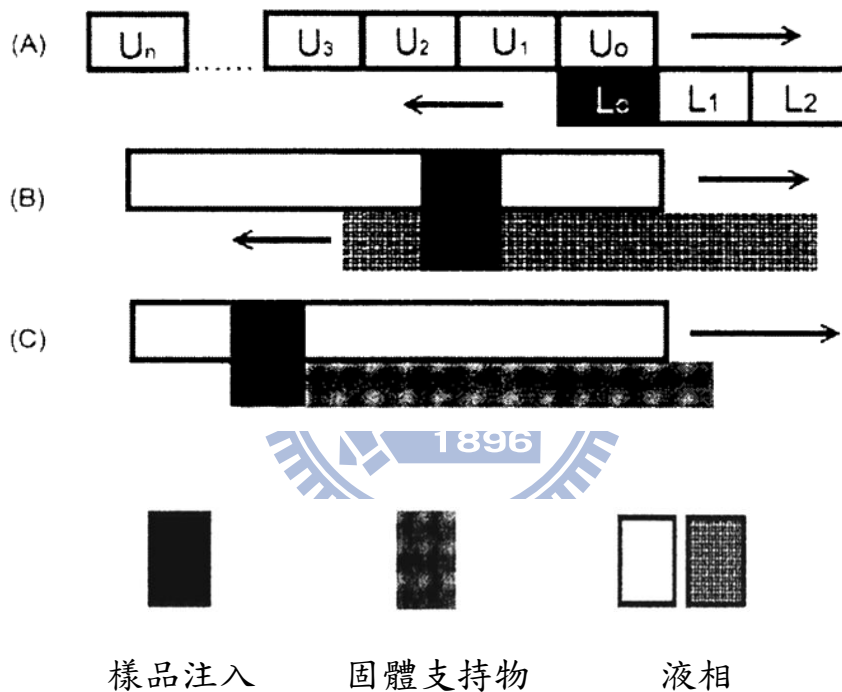


圖2-2、液相-液相層析方法

- (A) 傳統步驟式液相萃取。
- (B) 逆流萃取(CCE)，兩相都是移動相，分別往反方向移動。
- (C) 液相-液相層析(LLC)，固定相是以固體支持物滯留在管柱中。

2.2.3 逆流層析的儀器系統

為了能發展逆流層析成為實用的層析儀器，陸續開發出具有穿流 (Flow-through) 性質、不同管柱結構和不同力場的儀器。因此，逆流層析的儀器系統依分離的管柱本身的轉動方式可區分為兩種：流體靜態平衡系統和流體動態平衡系統[12；13]。

(1) 流體靜態平衡系統(Hydrostatic Equilibrium System，HSES)

在 HSES 系統中，管柱每一個部份所受力大小固定。固定相因重力場滯留在管柱中，樣品隨著移動相穿越固定相，並藉著樣品在移動相與固定相中的分配係數不同而達到分離。圖 2-3 為 HSES 示意圖。圖 2-3(A)，所使用的移動、固定相事先平衡過，選擇固定相為下層相，先使其充滿管柱後將移動相(上層相)由一端緩緩的注入，固定相會被移動相推出直到兩相的界面到達螺管底部，此時由於重力場的作用，移動相開始往上穿越固定相直到螺管頂端，如此一直重複直到分離管柱的末端，其每一圈的螺管都會保留住一半的固定相。圖 2-3(B)和 2-3(A)相反，使用平衡過的上層相當作固定相，而下層相為移動相，因此移動相與固定相在螺管中會產生不同的平衡狀態。

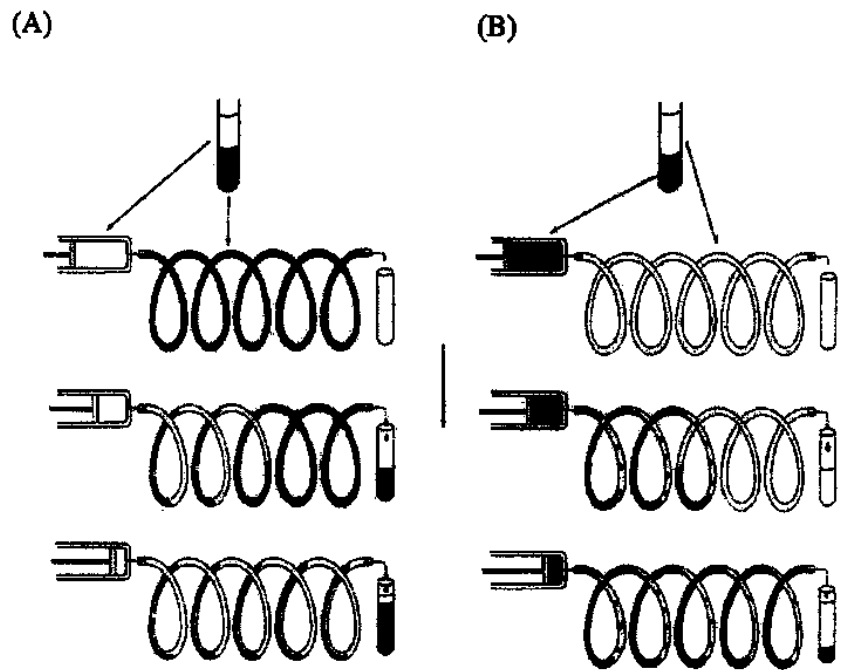


圖2-3、流體靜態平衡系統(HSES)示意圖[10]

(A) 固定相為下層相，移動相為上層相。

(B) 固定相為上層相，移動相為下層相。

(2) 流體動態平衡系統(Hydrodynamic Equilibrium System, HDES)

在 HDES 系統中，螺旋管柱會藉由轉動所產生的扭力及離心力，將固定相滯留在管柱中，這扭力是由希臘數學家阿基米德發現，藉由轉動螺旋形的管子，可將河水取至水壩，此即所謂阿基米德扭力

(Archimedes screw force)。此原理亦被應用在 HDES 系統中。若螺旋管柱內存在有輕重兩相，受阿基米德扭力及重力之作用下，輕重兩相因為受力不均，而在管柱中有不同的分佈，圖 2-4 說明在重力場作用下，阿基米德扭力對旋轉中螺管的影響、圖 2-4(a) 先將螺旋管中注滿水，再導入氣泡或玻璃珠，封住螺管兩端，接著將螺管緩慢旋轉，由於阿基米德扭力的作用，將使氣泡與玻璃珠帶往螺管的左端，此表示不管比水輕或比水重的物質皆會向螺管的某一端移動，此端稱為螺管的頭端(head)，而另一端則稱為尾端(tail)。圖 2-4(b) 中，利用平衡過的溶劑系統進行相同的實驗，圖 2-4(b) 上圖是先將螺管注滿較輕的一相，也就是溶劑系統的上層相，而較重的一相則由尾端打入，此時較重的一項行為就像是水中的玻璃珠會往頭端移動，圖 2-4(b) 下圖則先將較重的一相注滿螺管，由尾端打入較輕的一相，其行為就像是水中的氣泡。圖 2-4(c)，先將螺管內填入等體積的輕重兩相，兩相會在螺管的每一圈形成分離，當螺管開始轉動，任一相多餘的量則會被推至螺管尾端。因此，當螺管達到動力學平衡，則兩相在螺管中的分佈將保持不變，使固定相維持程度的滯留。

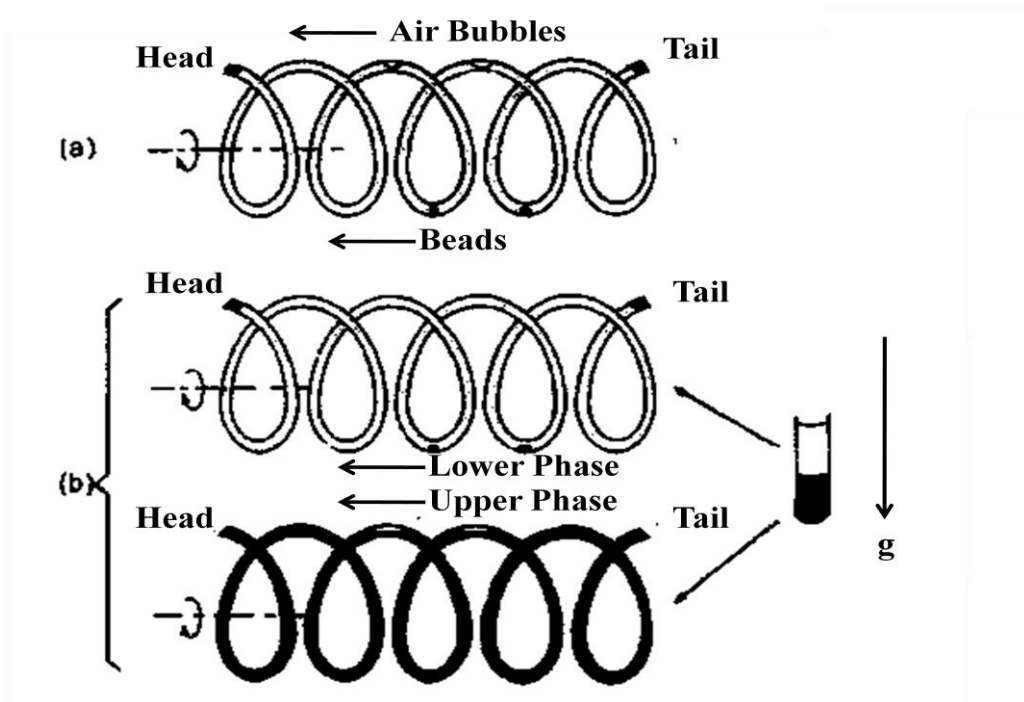


圖2-4、流體動態平衡系統(HDES)示意圖[11]

- (a)將螺旋管中注滿水，再導入氣泡或玻璃珠，封住螺管兩端。
- (b)先將較重的一相注滿螺管，由尾端打入較輕的一相。
- (c)將螺管內填入等體積的輕重兩相，兩相會在螺管的每一圈形成分離。

2.2.4 逆流層析的特點

現代逆流層析技術為化合物的分離純化提供了一種新的方法，有

別於一般的高效液能層析管柱，它無需固體作固定相，所以不存在固體對樣品的吸附、變性、失活、拖尾等現象，且能達到很高的回收率，節省昂貴的材料和溶劑的消耗。逆流層析在不需更換不同極性的層析管柱情況下，藉由提高極性溶劑或非極性溶劑比例的方法，可以實現流動相從弱極性到強極性或相反的轉化。由於層析管柱容積大，無填料，管柱內的空間全部都是有效空間，因此樣品的負載能力強，製備分離量大，再現性好。

2.2.5 逆流層析的移動和固定相溶劑系統

大部分 CCC 使用的溶劑系統中均含有水，再配合其他極性不同的有機溶劑，將水及有機溶劑系統以適合的體積比例混合後，會形成上下分層的兩相，分別取其做為移動相與固定相。少部分研究僅利用兩種溶劑混合，例如正丁醇-水[14]；而大多數的研究是採用三種或四種的溶劑混合而成，使得上下層相的極性有比較多的彈性調整空間，例如正己烷-乙酸乙脂-水[15]。


2.2.6 三相溶劑系統在逆流層析上的應用

以往應用在 CCC 上的溶劑系統，是以兩相溶劑系統為主流；而

相對於三相溶劑系統的研究[16；17]，至今，僅有在標準品混合的分離萌發階段，在天然物的分離上還有許多技術可以改進，相信進行更進一步的研究，在日後會有很大的前景。與兩相系統相較之下，最大的不同點，在於三相溶劑系統一次可分離的樣品極性較為寬廣。文獻[14]中，應用了三相溶劑系統，將樣品從低極性(β -Carotene)到高極性(Tryptophan) 成功分離。

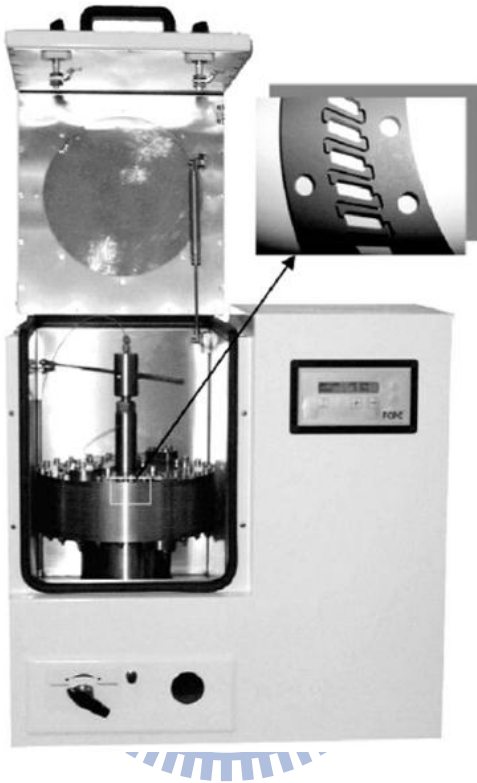
2.3 離心分配層析 (centrifugal partition chromatography, CPC)

2.3.1 原理

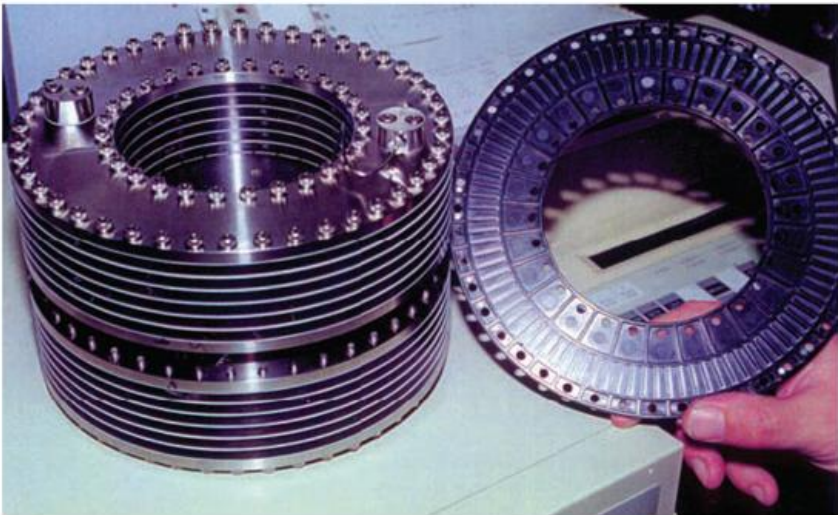


離心分配層析屬於流體靜力平衡系統[18]，其儀器設計原理如圖 2-5 所示，層析管柱由一系列刻在圓盤或圓筒內的導管相聯的柱體組成，依管徑大小的不同管柱又可分為兩種，管徑小的稱 duct，主要是移動相流動的通道，管徑大的稱 channel，滯留固定相的管柱部分，透過單軸旋轉產生恆定的重力場，固定相被滯留在管柱中。管柱中兩個旋轉密封的接口分別連接移動相的進口和出口，移動相是以液滴的形式在固定相中傳遞，樣品成分會在液滴的表面進行分佈，因為不同的物質有不同的分配係數，因此經由自動化且連續式的萃取，就可以把樣品成份分離。

(A)



(B)



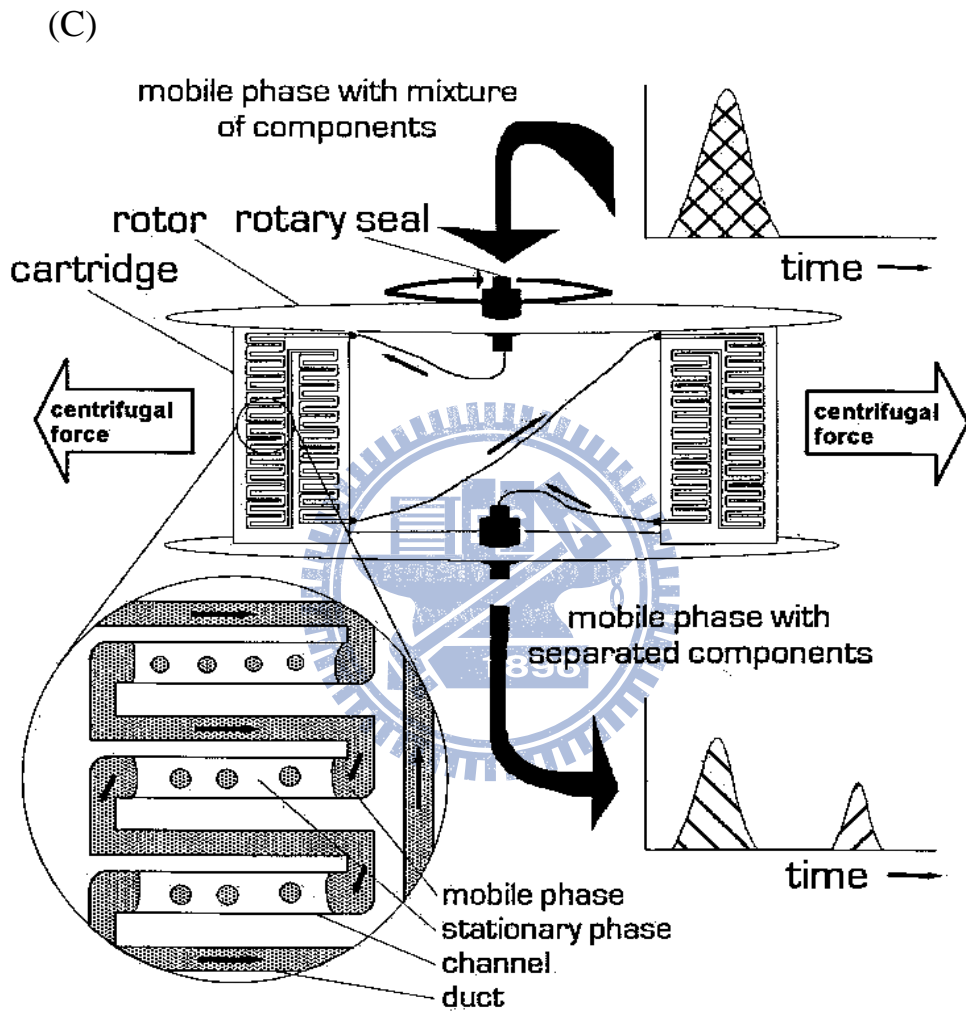


圖2-5、CPC儀器示意圖[19]

- (A) CPC 外部構造與蝕刻在圓盤上的層析管柱。
- (B) CPC 內部結構，由一系列圓盤組成。
- (C) CPC 管柱中運作原理，移動相是以液滴的形式在固定相中穿越流析。

2.3.2 移動相與固定相的流動模式

由於 CPC 是屬於液相-液相層析技術，根據實驗條件的不同，可以選擇其中一相當作固定相，另一相則當作移動相，固定相與移動相可以互相交換。因此存在兩種模式，一種是上升法(ascending mode)，移動相的行進方向與重力場反方向；另一種是下降法(descending mode)，移動相的行進方向與重力場同方向，如圖 2-6 所示，上升法是以下層相當作固定相，上層相當作移動相；下降法則是以上層相當作固定相，下層相當作移動相。

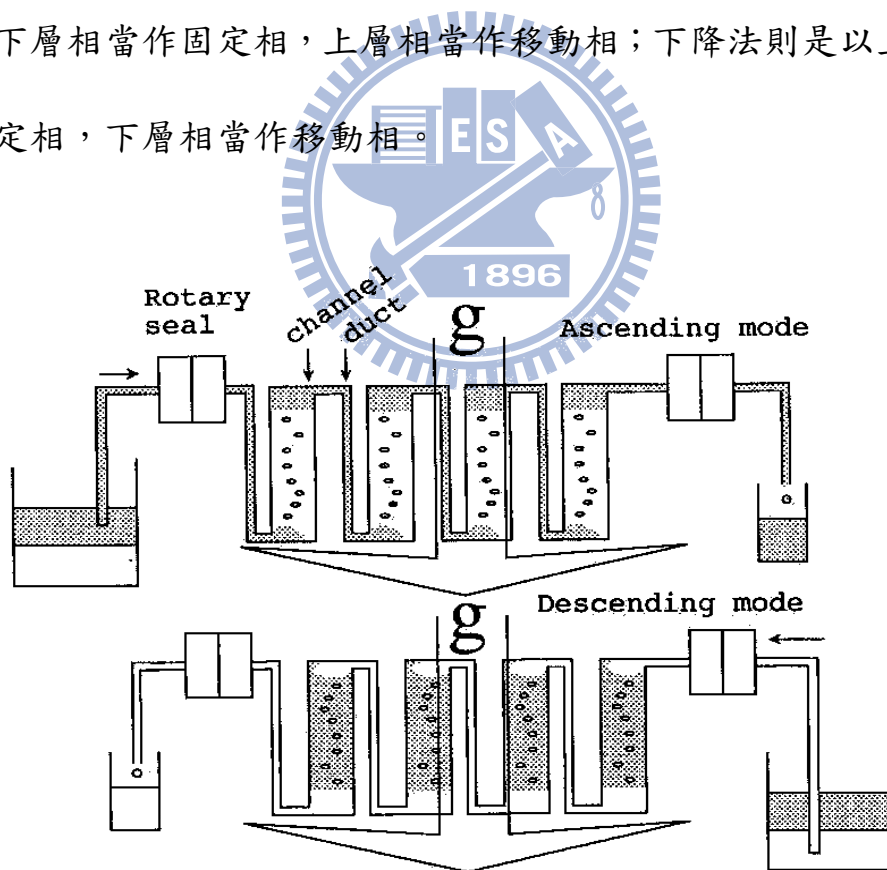


圖2-6、CPC的兩種流動模式[20]

上圖：上升模式，下層相當作固定相，上層相當作移動相。

下圖：下降模式，上層相當作固定相，下層相當作移動相。

2.3.3 溶劑系統的選擇

一般大部分的研究溶劑系統皆選擇兩相溶劑系統，其通常包含水，加上其他有機溶劑，相互達到飽和而成為不互溶的兩相溶劑，分別為移動相和固定相。其溶劑的成分組合視其實驗的分離條件而決定。在離心分配層析當中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意：(1) 樣品有充分的溶解度 (2) 樣品不會被分解和去活性 (3) 適當的分配係數 (4) 良好的固定相滯留量[21；22]。

2.3.4 影響固定相滯留量的因素

在離心分配層析中，液體固定相在管柱中滯留的多寡影響了分離的效率，在較高的固定相滯留量下可提高對樣品的承載量和分離的解析度。影響固定相滯留量及分離的效率的因素分為下列幾點[23]:

(a) 溶劑系統：在選擇適當的溶劑系統時必須考慮溶劑極性、對溶質的選擇性以及溶質在不同溶劑中的溶解度。一般而言，分析物在兩相溶劑間最佳的分配係數 K_D 需在 0.2 ~ 5 之間，才能獲得較佳的分離效果。但在二元的溶劑系統中， K_D 值要落在此範圍不容易，因此，常藉由加入第三種甚至第四種可溶於原先兩者的溶劑，用來調和原先溶劑在極性或是界面張力的差異。然後依 K_D 來判斷分

離結果，並決定移動和固定相。

(b) 儀器轉速：在較高的轉速下，固定相越容易滯留在管柱中，且因為轉動速度大，離心力也較大，因此還可以加速移動相與固定相的分層，這兩個結果均可提供較高的固定相滯留量，在有關於離心分配層析分離效果的研究中，若可以得到固定相滯留量越大，解析度也較佳，所以在 CPC 機械結構可以承受的轉速之下，轉動速度越快，分離效果越好。

(c) 移動相流速：當移動相流速越快時，越容易將固定相推出管柱，因此固定相的滯留量會比較低。反之移動相流速若較慢，會達到較佳的固定相滯留量，且可提高分離解析度，但相對地分離時間會變長。



2.3.5 離心分配層析儀的應用

因為 CPC 的固定相與一般填充管柱相比，能有較大的固定相體積，且具有放大特性，所以在 CPC 的研究以天然物製備分離為主流 [24]，而在對於化學品的純化分離方面研究亦不在少數。近年來也有學者將 CPC 與鏡像選擇物結合，應用在分離鏡像異構物的分子 [25]，或是蛋白質的純化 [26]，最後也都成功將其分離。

第三章 實驗

3.1 實驗樣品和溶劑

(1) 洋蔥

購自 愛買 量販店的美國紅洋蔥。

(2) 溶劑

Deionized water, purified from Milli-Q plus, (Bedford, MA, USA)

Ethanol, 99.5%, (景明化工股份有限公司)

Formic acid, 98% up, (ACROS, Geel, Belgium, USA)

Tetrahydrofuran, HPLC/Spectro grade, 99.8% (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

n-Hexane, HPLC grade, 95%,(景明化工股份有限公司)

Methyl t-Butyl Ether (MTBE), HPLC grade, 99.8%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

Acetonitrile (ACN), HPLC grade, 99.9%, (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

3.2 實驗儀器

(1) 離心分配層析儀

CPC 是由 Sanki (Tokyo, Japan)所生產，型號是 CPC 240，內部主體由 12 個 disks 所構成，包含 2136 個 channels，最高可耐壓為 6.2×10^6 N/m² (900 psi)，管柱總容積大約 240 毫升，此儀器的轉速可以控制在 0 - 2000 rpm。藉由轉動外部控制閥，就可輕易選擇上升模式或下降模式的模式。

(2) 往覆式幫浦

此幫浦為 Series II Digital HPLC pump，流速可由 0.01 mL/min - 9.99 mL/min，購買自 Pharma-Tech Research Company (Baltimore, MD, USA)。

(3) 高效能液相層析管柱

由 Polymer Laboratories 製造的 PLRP-S column (250 mm × 4.6 mm, 15 μm)，屬於 reverse phase column。

(4) 紫外光-可見光偵測器(UV-Visible Detector)

型號為 Bio-Rad Model 1801 UV-Visible detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，偵測器外部與個人電腦連接，利用色層分析儀數據處理系統(訊華公司，台北市)擇取實驗訊號。

(5) 紫外光-可見光譜儀(UV-Visible Spectrophotometer)

Hewlett Packard 8453, (Waldronn, Germany)。

(6) 離心機

型號為 EBA20 (Hettich, Germany)，最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g。

(7) 迴旋減壓蒸餾器

廠牌為 Buchi (Switzerland)，型號是 R-114。

(8) 分管收集器

廠牌為 Advantec (Tokyo, Japan)，型號是 CHF1215A。

(9) ESI-MS

廠牌為 Micromass (Manchester, England)，型號是 Quattro Micro，主要使用分子量小於 2000 電灑游離法質譜。

(10) 果汁機

廠牌為 Gibson，型號是 GSN-6060G。



3.3 實驗流程

3.3.1 洋蔥的前處理流程

(1) 首先秤 130.0 g 的洋蔥置入果汁機中，並倒入 300 mL 的乙醇水

溶液(60%)，待洋蔥絞碎之後，

(2) 再經過超音波震盪 30 分鐘，置入低溫(8°C)保存。

(3) 使用抽氣過濾來去除洋蔥的殘渣部分，並保留濾液的部分，

(4) 再使用減壓迴旋蒸餾器將溶劑抽乾，最後可得約 6.25 g 的洋蔥萃取物。



3.3.2 偵測洋蔥成分在不同溶劑系統中的分佈情況

實驗初始首先嘗試兩相溶劑系統，將所配製的 20 mL 兩相溶液，加入約 0.05 g 的洋蔥萃取物，經由超音震盪 5 分鐘靜置至平衡後，上、下層相各取 20 μ L 注入 HPLC 以紫外光-可見光偵測器，偵測波長 370 nm，可得上、下層的層析圖譜，同一成分在上下層的濃度比值，也就是層析波峰面積比值，可得各成分在兩相中的分佈值(K_D)

$$K_D = \frac{C_u}{C_l}$$

C_u : 分析物在上層相的濃度(層析面積)

C_l : 分析物在下層相的濃度(層析面積)

3.3.3 純度的估計

CPC 和 CCC 儀器應用在製備分離中草藥方面[25；27]，其純度計算方法，主要是藉由不同物質在 HPLC 層析圖中，單一物質的波峰面積佔總面積的百分比。

純度的計算：

$$\text{純度(\%)} = \frac{\text{單一波峰面積}}{\text{HPLC所有層析峰的總面積}} \times 100\%$$



3.3.4 回收量的估計

回收量估計值的計算方法[23]，首先要確認樣品進樣於 CPC 的重量，然後與 HPLC 層析圖中，單一物質的波峰面積佔總面積的百分比相乘，就可估算出單一成分的回收量。

回收量估計值的計算：

$$\text{回收量估計值} = \text{樣品進樣量}(\text{mg}) \times \frac{\text{單一波峰面積}}{\text{HPLC所有層析峰的總面積}}$$

3.3.5 CPC 製備實驗步驟

CPC 實驗儀器裝置如圖 3-1 所示[20]

(1) 利用量筒量取特定體積溶劑，並置於分液漏斗內，配製成所需的溶劑系統，然後靜置至溶劑分層為三相(圖 3-2)，分別取出上層相、中層相與下層相。

(2) CPC 調至上升模式方向，用氮氣把管柱內的去離子水保存液吹出，之後使用往復式幫浦以流速 8 mL/min 將下層相(固定相)填滿整個管柱。

(3) 啟動 CPC，使其轉速達到 1000 rpm。

(4) 待其轉速穩定後，以流速 1.2 mL/min 將中層相注入 CPC，此時會有固定相從 CPC 中被推出，中層相(移動相)與下層相(固定相)會在內部達到第一次平衡，直到固定相不再持續被推出時，紀錄被推出的固定相體積量，並可以計算出此兩相在管柱中的體積比。

(5) 待第一次平衡後，以相同流速與轉速，將上層相注入 CPC 中，此時，部分中層相與上層相(固定相)會從 CPC 中被推出，上層相(移動相)與中、下層相(固定相)在管柱中會達第二次平衡，記錄被推出的固定相體積量，即可得知最後 CPC 中的固定相滯留率。

- (6) 第二次平衡後，開啟 UV-Vis 偵測器(370 nm)，並等待訊號穩定。
- (7) 注入洋蔥樣品溶液 5 mL，首先以上層相當移動相來沖提， 上升模式，時間為 30 分鐘，並在樣品注入的同時紀錄層析訊號。
- (8) 上層相沖提 30 分鐘後，切換以中層相沖提當移動相，上升模式，時間 50 分鐘，持續記錄層析訊號。
- (9) 最後，切換到下層相沖提當移動相，並轉換為下降模式，時間 120 分鐘，記錄層析訊號。
- (10) 每 1 分鐘收集一管，即每管中含有 1.2 mL 的樣品液。
- (11) 實驗完成後，CPC 停止轉動，用氮氣將管柱內的液體吹出並收集，紀錄有機相和水相的體積，上層有機相(移動相)的體積與總體積相除就是固定相滯留率。
- (12) 在 CPC 停止轉動的情況下，先以 300 mL 甲醇沖洗管柱，再以 300 mL 去離子水清洗，未流出之去離子水保存在 CPC 中。

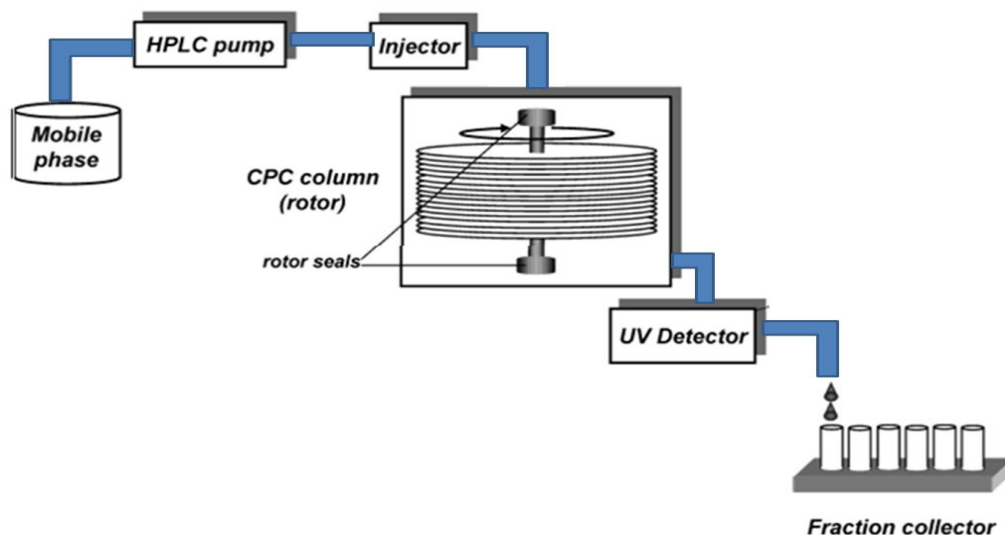


圖3-1、CPC實驗儀器裝置

包含了梯度幫浦、CPC 儀器、紫外光偵測器、以及分管收集器。

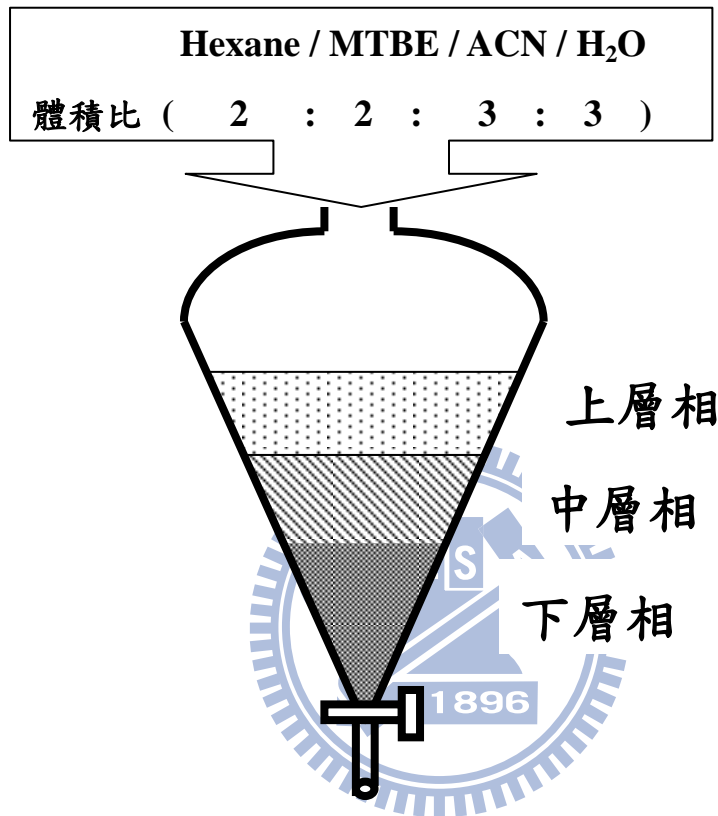


圖3-2、三相溶劑系統示意圖

3.3.6 HPLC 分析收集液實驗步驟

HPLC 實驗儀器裝置如圖 3-3 所示

(1) 每支收集管先用迴旋減壓蒸餾裝置把溶劑抽乾，再加入 1 mL 的 HPLC 沖提的移動相溶解樣品，選擇用此移動相來溶解樣品，可避免掉因為溶劑不同而產生的背景干擾訊號。

- (2) 使用 reversed phase HPLC 系統，先以純的 Acetonitrile 清洗管柱，再用 solvent A [Tetrahydrofuran : 0.1%(v/v) formic acid = 20 : 80 (v/v)] 當移動相沖堤管柱。
- (3) 開啟 UV-Vis 偵測器，偵測波長設定在 370 nm，並等待訊號穩定。
- (4) 注入洋蔥樣品溶液於六向閥的 20 μ L sample loop 中，並將六向閥由 inject 調至 load 的同時紀錄層析訊號。

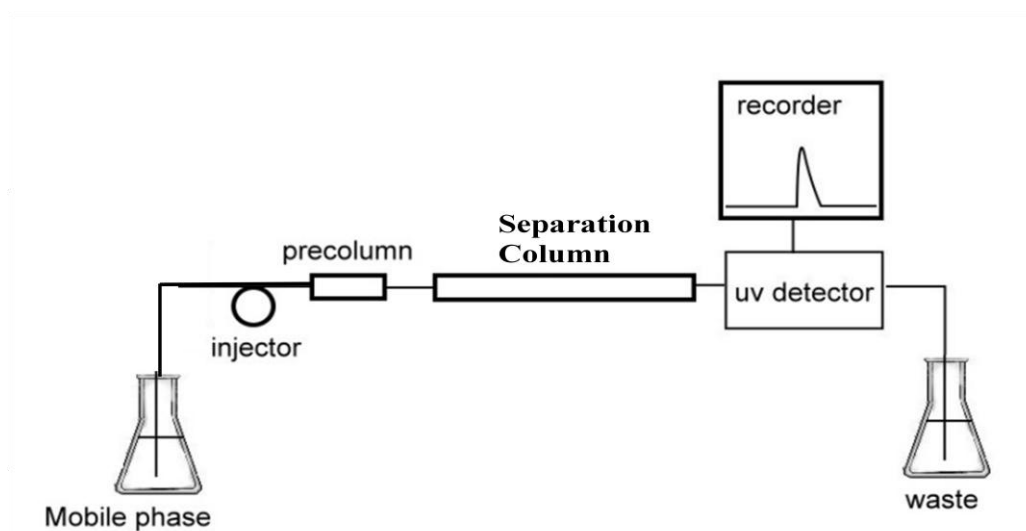


圖3-3、HPLC實驗儀器裝置

包含了梯度幫浦、HPLC 管柱、紫外光偵測器。

第四章 結果與討論

4.1 乙醇萃取洋蔥的濃度選擇

在進入 HPLC 與 CPC 分析之前，嘗試利用 300 mL 不同濃度的乙醇水溶液(40%、60%、80%，v/v)做萃取。研究中，想分離出洋蔥中的類黃酮成分，而在 60%的乙醇中所能萃取到的類黃酮成分較多，最後選用其為萃取條件。

4.2 以 HPLC 分析洋蔥萃取出黏稠物

4.2.1 HPLC 移動相的選擇

實驗中以依序分別為(A)、(B)三組不同的溶劑系統(表 4-1)分別當為 HPLC 移動相，圖 4-1、上圖中，滯留時間在 2~5 min 之間的吸收峰，以及下圖中，滯留時間在 4~8 min 之間的吸收峰，所屬的混合物是極性較小的物質，波峰的解析度不佳，所含的物質較為複雜，所以並沒收集鑑定之；而 peak a 與 peak b 兩波峰解析度較佳，並猜測可能為類黃酮物質，於收集之後做 ESI-MS 鑑定分析，最後分析結果並未發現另兩黃酮化合物。圖 4-1 層析圖譜結果顯示(B)組的溶劑系統有較佳的解析度，故本實驗最後選用移動相 [Tetrahydrofuran : 0.1%

(v/v) formic acid = 20 : 80 (v/v)] 為 HPLC 移動相條件。

表4-1、HPLC移動相

| | Tetrahydrofuran | 0.1%(v/v) formic acid |
|-----|-----------------|-----------------------|
| (A) | 25 | 75 |
| (B) | 20 | 80 |

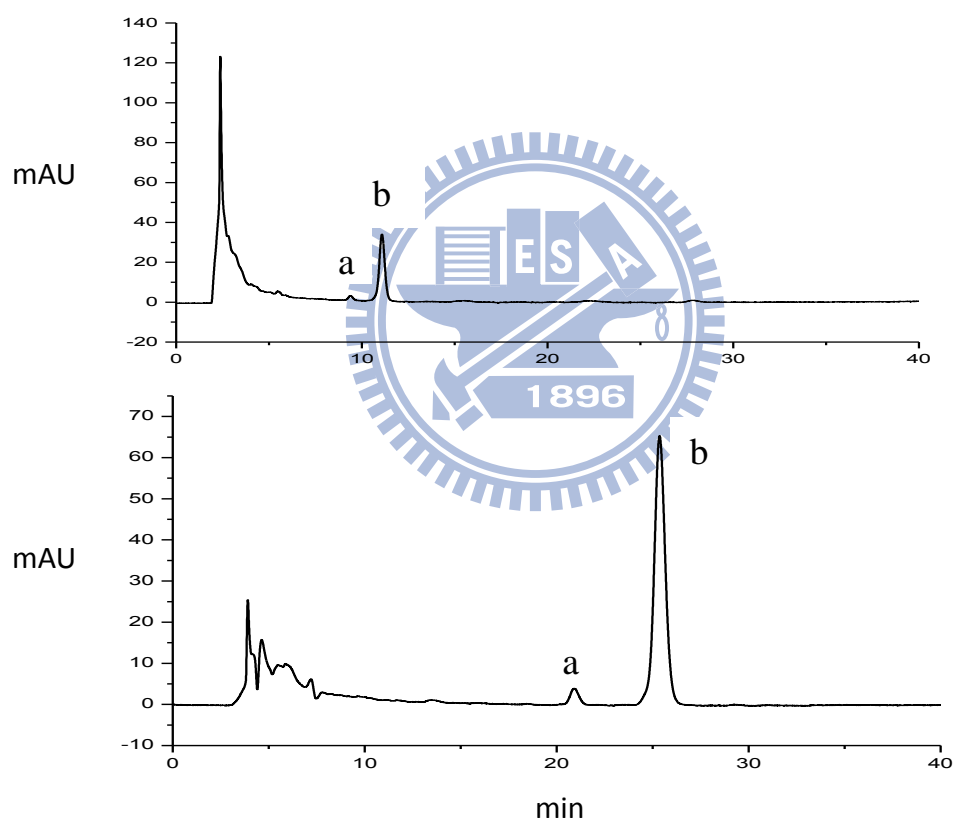


圖 4-1、HPLC 分析洋蔥萃取物的層析圖

上圖：移動相 Tetrahydrofuran : 0.1%(v/v) formic acid = 30 : 70 (v/v)

下圖：移動相 Tetrahydrofuran : 0.1%(v/v) formic acid = 20 : 80 (v/v)

4.2.2 HPLC 分析結果

我們將洋蔥的萃取物，利用 HPLC 分離，流速 0.5 mL/min，可以在 40 分鐘內，以波長 370 nm 的 UV-vis 偵測器偵測，得到層析圖(圖 4-1 下圖)，其將層析圖中兩波峰標記依序為 a 和 b，其依序的滯留時間為 20.9 min 和 25.4 min，經由收集後以 ESI-MS 偵測之。

4.3 以質譜鑑定洋蔥成分的結構

藉由 HPLC 分離並收集 a、b 兩個目標物，分別收集後，再用減壓迴旋蒸餾將溶劑抽乾，然後進一步由 ESI-MS 正電荷做結構鑑定，此儀器是選用低解析度的模式，準確值到整數位。

4.3.1 以質譜鑑定 peak a 結構

經由 ESI-MS 正電荷分析結果(圖 4-2)可由圖中發現， $[M+H]^+$ 為 627.1 m/z 的訊號，是加一個質子的離子訊號。465.1 m/z 是($[M+H]^+$ -glucoside)失去一個葡萄糖苷基的訊號；而在 303.1 m/z 則是($[M+H]^+$ -glucoside-glucoside)失去兩個葡萄糖苷基的訊號，因此可知 peak a 主成分是 Quercetin-3,4-di-O-glucoside (Q3,4G)。

4.3.2 以質譜鑑定 peak b 結構

由 ESI-MS 正電荷分析結果(圖 4-3)可由圖中發現， $[M+H]^+$ 為 465.1 m/z 的訊號，是加一個質子的離子訊號。而 303.1 m/z 是 $([M+H]^+ - \text{glucoside})$ 失去一個葡萄糖苷基的訊號，因此可知 peak b 主成分為 Quercetin-4-*O*-glucoside (Q4G)。

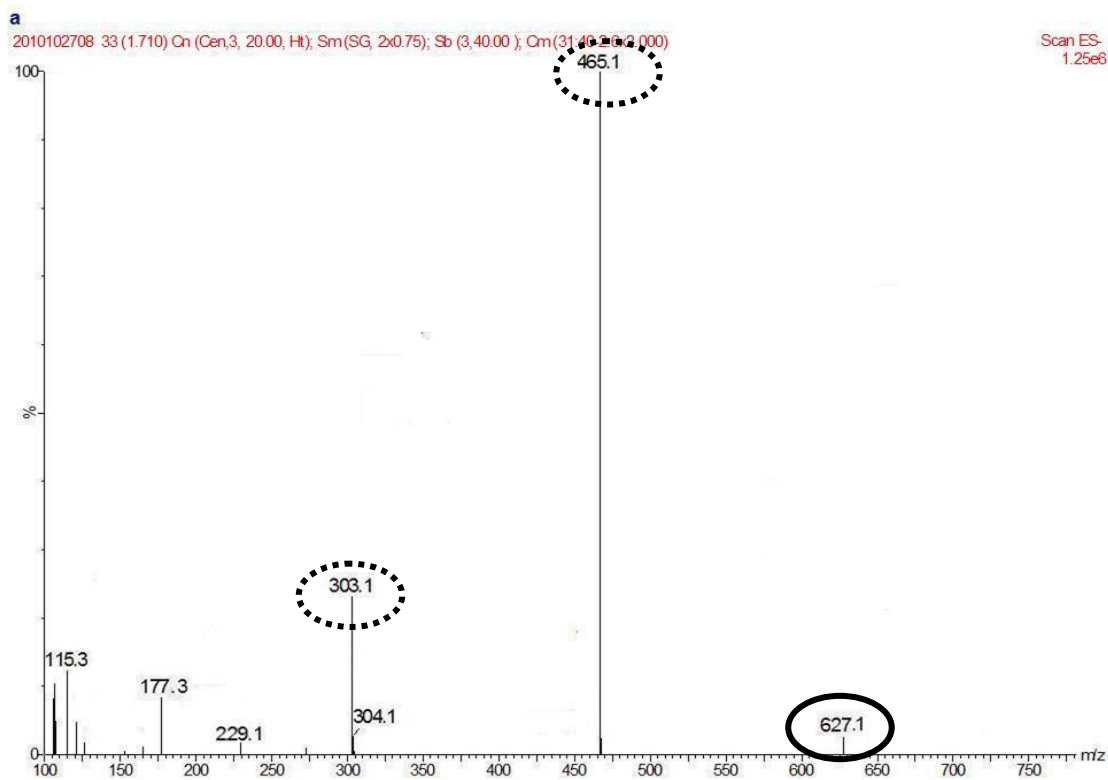


圖4-2、peak a 測ESI-MS正電荷質譜圖

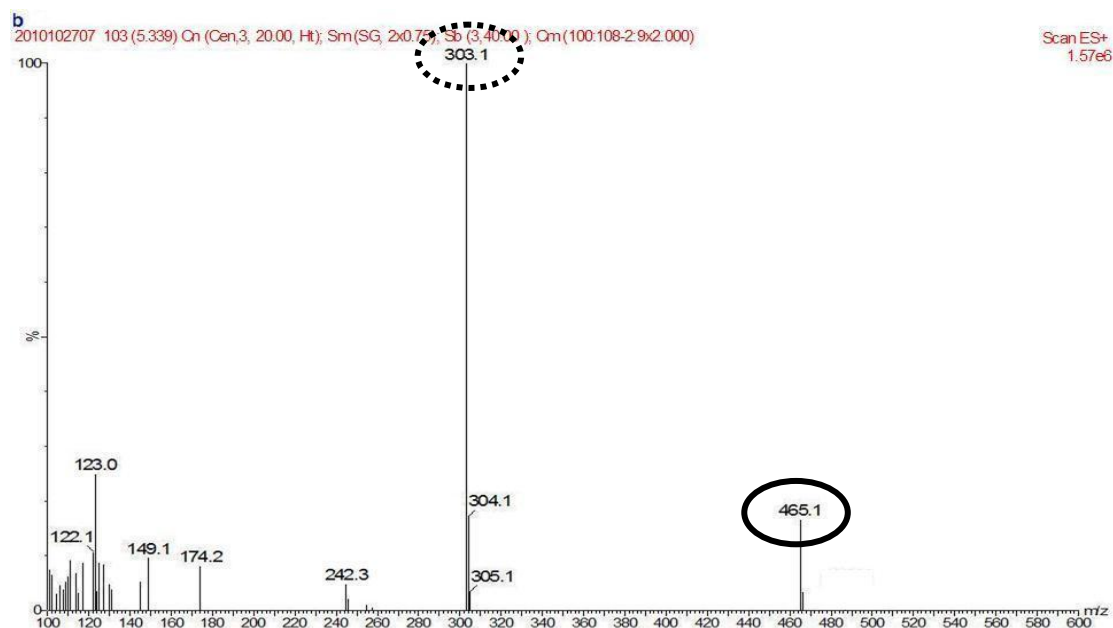


圖 4-3、peak b 測 ESI-MS 正電荷質譜圖

4.4 離心分配層析儀製備分離的實驗結果

4.4.1 配製不同的溶劑系統

一開始嘗試利用下列五組兩相溶劑系統(表 3-1)，針對洋蔥中兩種類黃酮分析物以 HPLC 的波峰面積計算其分配係數，結果顯示兩分析物皆傾向分佈在下層相，分佈情況不理想，所以此五組溶劑系統不適合應用在 CPC 分離本實驗的洋蔥萃取物。

根據文獻[16；17]的研究，並開始嘗試三相系統的可行性。由文獻得知，不同的溶劑比例，可使得分析物在各層中的分佈情況會有所不同。故本實驗首先針對此三相溶劑系統，改變成分溶劑比例，來得

知上、中、下層各占體積比的多寡(表 3-2)。

依據(表 3-2)，發現(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) 此七組溶劑的比例具有可分層三相的特性。

表4-2、五組兩相溶劑成分系統

| 各溶劑系統組成成分 | 各溶劑的成分比例 |
|--|---------------|
| ethyl acetate / butanol / water | 2 : 1 : 4 |
| ethyl acetate / butanol / water | 2 : 2 : 4 |
| MTBE / Acetone / H ₂ O | 6 : 4 : 10 |
| Hexane / EA / H ₂ O(1%acid) | 1 : 9 : 10 |
| Hexane / EA / MTBE / H ₂ O | 1 : 1 : 1 : 1 |

表4-3、不同溶劑成分比平衡後上、中、下層中佔有比例

| H / M / A / W | UP | MP | LP |
|-------------------|----|----|----|
| (a) 1 : 1 : 1 : 1 | 37 | 19 | 24 |
| (b) 2 : 1 : 1 : 1 | 30 | X | 20 |
| (c) 1 : 2 : 1 : 1 | 40 | X | 10 |
| (d) 1 : 1 : 1 : 2 | 18 | 10 | 22 |
| (e) 1 : 1 : 1 : 3 | 20 | 10 | 30 |
| (f) 1 : 1 : 3 : 1 | 15 | 38 | 7 |
| (g) 1 : 1 : 2 : 2 | 12 | 32 | 15 |
| (h) 2 : 2 : 3 : 2 | 28 | 40 | 22 |
| (i) 2 : 2 : 3 : 3 | 30 | 35 | 35 |

H : Hexane M : Methyl t-Butyl Ether A : Acetonitrile W : Deionized water

UP : Upper phase MP : Middle phase LP : Lower phase X : none

4.4.2 最佳化溶劑系統的選擇

先前提到，目前為止在 CPC 的分離應用方面，溶劑系統選擇皆為兩相溶劑系統。本實驗中，首先以表 4-2 中，五組兩相溶劑系統來找尋兩種目標物合適的溶劑系統，再以 HPLC 來分析，將其目標成分積分面積換算 K_D 值，測試結果發現，兩種目標物都傾向於分佈在水相，表示分析物的分配係數並不理想(表 4-2)。理想分配係數在 0.2~5 之間，數值小於 2，代表沖堤時間太短，分析物分離效果不佳，即被動相沖提出來，數值超過 5，代表所需的沖堤時間太長，倘若兩個分析物的數值太接近，也容易造成解析度不佳，所以此五組的兩相溶劑系統不適合應用在本實驗的分離。



表4-4、兩目標分析物在五組兩相溶劑系統中的分配係數

| 兩相溶劑系統 | $K_D(Q3,4G)$ | $K_D(Q3G)$ |
|---|--------------|------------|
| ethyl acetate / butanol / water (2/1/4)(v/v) | 0.15 | -- |
| ethyl acetate / butanol / water (2/2/4) (v/v) | 0.13 | -- |
| MTBE / Acetone / H ₂ O (6/4/10) (v/v) | 0.19 | 0.13 |
| Hexane / EA / H ₂ O(1% acid) (1/9/10) (v/v) | 0.05 | 0.02 |
| Hexane / EA / MTBE / H ₂ O (1/1/1/1) (v/v) | 0.07 | -- |

--：表示無法估算

根據文獻[11]應用在逆流層析儀中的研究，並開始針對三相系統結合離心分配層析儀的可行性。過程中首先，針對(Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water)的三相溶劑系統，改變各成分溶劑的比例，來得到平衡後的上、中、下層相的體積比，上層相為 Hexane-rich，中層相為 Acetonitrile-rich，下層相則是 Water-rich。

4.4.3 三相系統結合離心分配層析儀沖堤時間的選擇

實驗過程中，首先以上層相做沖堤，接著以中層相沖堤，最後再轉換為下層相做逆沖堤，所以各層相沖堤時間不同也是可能是影響分析物是否可以被分離出來的因素之一。圖 4-4 中，沖堤時間為上層相首先沖堤 30 分鐘，沖堤模式為上升法，接著中層相沖堤 40 分鐘，最後以下層相轉為下降模式沖堤 50 分鐘，可以觀察到在 80 分鐘左右，兩層析峰重疊區域太多，造成解析度太差，判斷為分析物在溶劑系統中，沒有足夠的時間來分離開；而將中層相時間延長為 50 分鐘(圖 4-5)，結果發現在 80 分鐘處的 peak，明顯比圖 4-4 中的 peak 解析度還要更佳，所以中層相(移動相)的適當的分離時間可直接影響 80 分鐘處吸收峰的解析度。在 70 分鐘一個直線型的落差(spike)所造成的因素是，當上升模式切換到下降模式時所造成的訊號。最後選擇上層

相沖提時間 30 分鐘，中層相沖提時間 50 分鐘，下層相沖提時間 120 分鐘做為本實驗三相系統的最佳化分析時間（圖 4-5）。

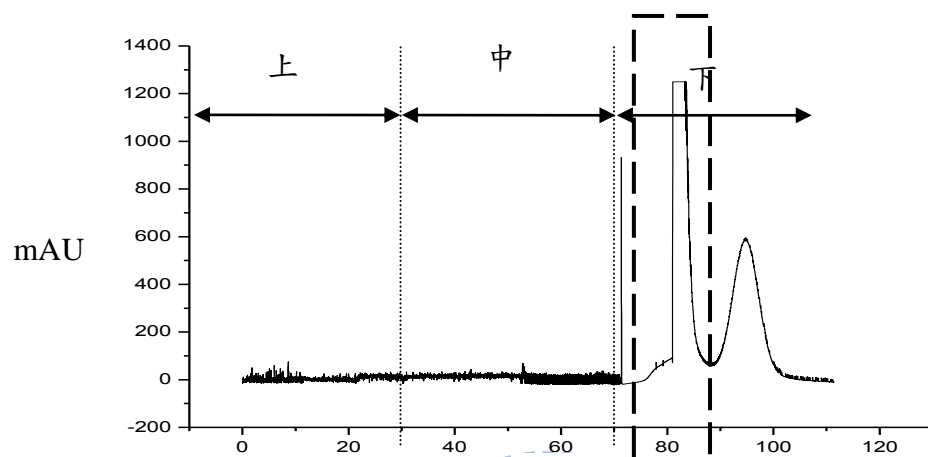


圖4-4、以CPC來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 3 (v/v)，沖提時間30-40-50 min (上-中-下層)

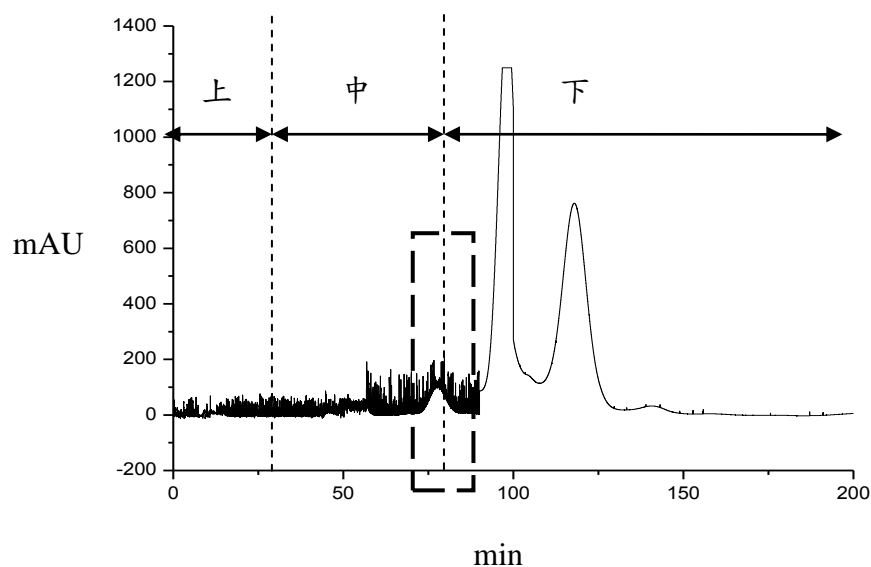


圖4-5、以CPC來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 3 (v/v)，沖提時間30-50-120 min (上-中-下層)

4.4.4 三相溶劑系統的選擇

三相溶劑系統配製完後，觀察其洋蔥成分在不同組三相溶劑系統的分佈情形。實驗過程中，首先以上層相沖提 30 分鐘，接著以中層相沖提 50 分鐘，最後再以下層相逆沖提模式，沖提到結束。以(h)組(圖 4-5)與(i)組(圖 4-6)做比較，可以發現(圖 4-5)在滯留時間 74~82 min. 處(i)組溶劑系統具有一吸收峰，且經由後續的 ESI-MS 分析，確認主要成分為 quercetin-3,4-di-O-glucoside，相對於(h)組溶劑系統在這滯留時間範圍內無訊號吸收，故最後選擇(i)組溶劑系統當作本實驗的最佳化條件。

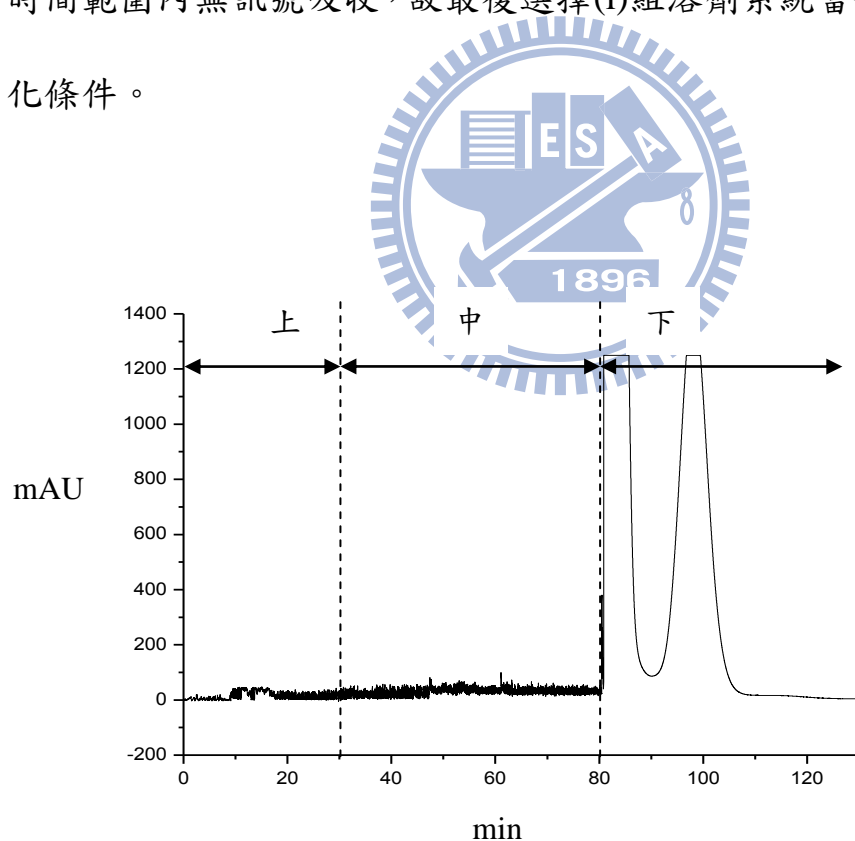


圖4-6、以CPC來分離洋蔥萃取物，Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 2 (v/v)，沖提時間30-50-120 min (上-中-下層)

4.4.5 固定相滯留量的探討

CPC 總管柱體積 240 mL，在實驗步驟中，管柱首先填滿下層相，再以中層相(移動相)沖堤，達到第一次平衡後，亦即下層相已不再被推出管柱外，可知下層相被推出管柱外的體積為 58 mL，故在 CPC 管柱中，中層相佔 58 mL，下層相 182 mL。進行第二次平衡時，以上層相(移動相)沖堤，平衡後，下層相被推出管柱外體積為 4 mL，中層相被推出 46 mL，最後管柱中含，上層相 58 mL，中層相 12 mL，下層相 178 mL (表 4-3)。因分離過程中先以上層相當移動相沖堤，所以最後得算知固定相滯留量為 79.2%，亦即中層相與下層相之體積佔總管柱體積 79.2%。



表4-5、平衡後在管柱中各層相所佔的體積

| | 上層相 mL | 中層相 mL | 下層相 mL |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 第一次平衡 | X | 58 | 182 |
| 第二次平衡 | 58 | 12 | 178 |

X：管柱中無此相

4.4.6 三相系統結合離心分配層析法的分離結果

實驗參數如表 4-4 所示。

經由上述實驗參數進行 CPC 分離，所得到的結果(圖 4-5)，可看到存在 I、II、III、IV 四個波峰，使用分管收集器收集這四個波峰，波峰 I 收集 74-82 分鐘，波峰 II 收集 92-99 分鐘，波峰 III 收集 112-124 分鐘，波峰 IV 收集 133-145 分鐘。圖譜(圖 4-5)中，觀察到 80 分鐘以前的訊號較為不穩定，應屬於沖堤上層相與中層相所造成的固定相的流失，固定相流失速度大約為 1 mL/hr；當切換到下層相當移動相時，就無固定相流失現象，所以訊號趨為穩定。

之後將波峰 I、II、III、IV 收集進行 HPLC 分析，在圖 4-7 上圖中觀察到圖譜中在 a 位置波峰即為 quercetin-3,4-di-O-glucoside，且佔圖譜總面積的 90%，故將其純度以 90% 表示之。在圖 4-7 下圖中觀察到圖譜中在 b 位置波峰即為 quercetin-4-O-glucoside，且佔圖譜總面積的 92%，故將其純度以 92% 表示之；圖 4-8 上圖為波峰 II 收集後經由 HPLC 分析後的圖譜，下圖則為波峰 III 收集後之 HPLC 圖譜。

表4-6、CPC分離的實驗參數

| | |
|-------|---|
| 溶劑系統 | Hexane / Methyl <i>tert</i> -butyl ether / Acetonitrile / Water = 2 : 2 : 3 : 3 |
| 流動模式 | 30-50-120 * |
| 樣品進樣量 | 5 mL (0.31 g 溶於 6 mL 下層相) |
| 轉速 | 1000 rpm |
| 流速 | 1.2 mL/min |
| 偵測波長 | 370 nm |

* :流動模式(30-50-120): 上升模式，以上層相沖堤 30 分鐘，接著中層相沖堤 50 分鐘，最後再轉為下降模式，以下層相沖堤 120 分鐘。

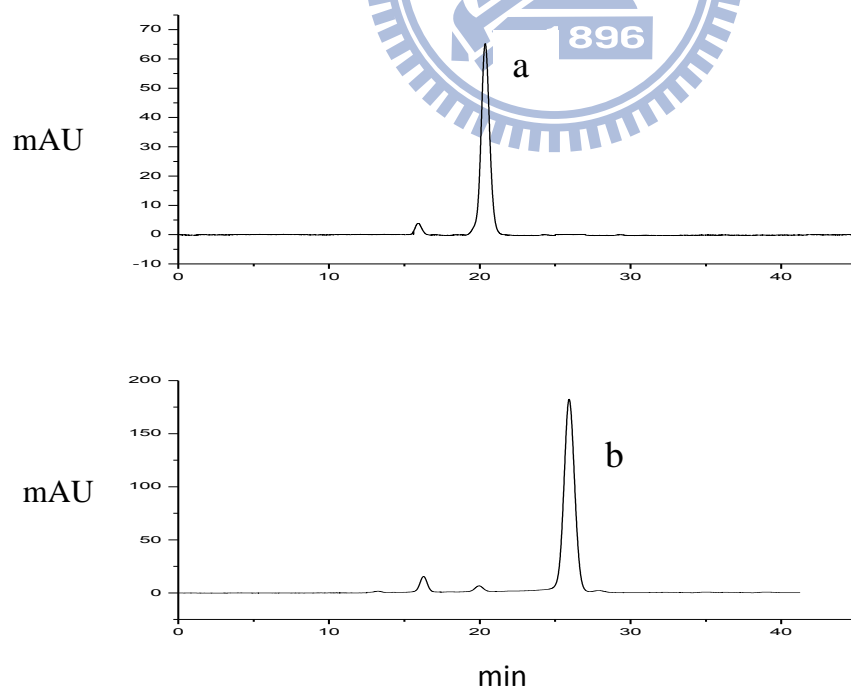


圖4-7、上圖:經由CPC分離後的波峰I收集後HPLC的分析圖譜
下圖:經由CPC分離後的波峰IV收集後HPLC的分析圖譜

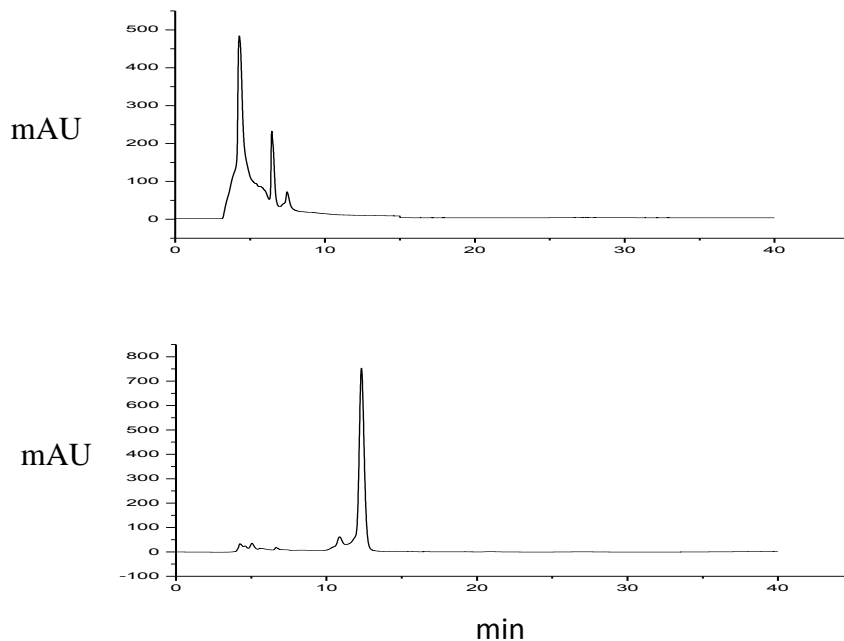


圖4-8、上圖:經由CPC分離後的波峰II收集後HPLC的分析圖譜

下圖:經由CPC分離後的波峰III收集後HPLC的分析圖譜

4.4.7 以質譜鑑定 CPC 層析圖中波峰 I、II、III、IV 結構

樣品經由 CPC 分離製備後，得到層析圖譜，可觀察到層析圖中具有 I、II、III、IV 四個波峰，使用分管收集器收集這四個波峰位置，並將其溶劑抽乾後，分別進行游離電噴灑質譜儀鑑定其成分結構(表 4-5)。經由質譜圖可觀察到波峰 I 所收集的成分物，主要成分為 quercetin-3,4-di-O-glucoside (圖 4-9)，波峰 IV 所收集到的成分物，主要成分為 quercetin-4-O-glucoside(圖 4-12) [28;29];而波峰 II (圖 4-10)、III(圖 4-11)所收集到的成分物極性較高成分種類也較為複雜，因本實驗想純化製備類黃酮成分，而在波峰 II、III 收集後做 ESI-MS 測定，圖譜中並沒有發現洋蔥中四種類黃酮成分的相關斷裂峰，故沒有針對

波峰 II、III 做進一步的探討。

表4-7、波峰I和IV偵測ESI-MS正電荷

| 波峰 | 滯留時間 (min) | 分析物 | [M+H] ⁺ (m/z) | 離子碎片 (m/z) |
|----|---------------|-------|-----------------------------|--|
| I | 74-82 | Q3,4G | 627 | 465 [M+H] ⁺ -Glc 303 [M+H] ⁺ -Glc-Glc |
| IV | 133-145 | Q4G | 465 | 303 [M+H] ⁺ -Glc |

Glc : glucosyl unit

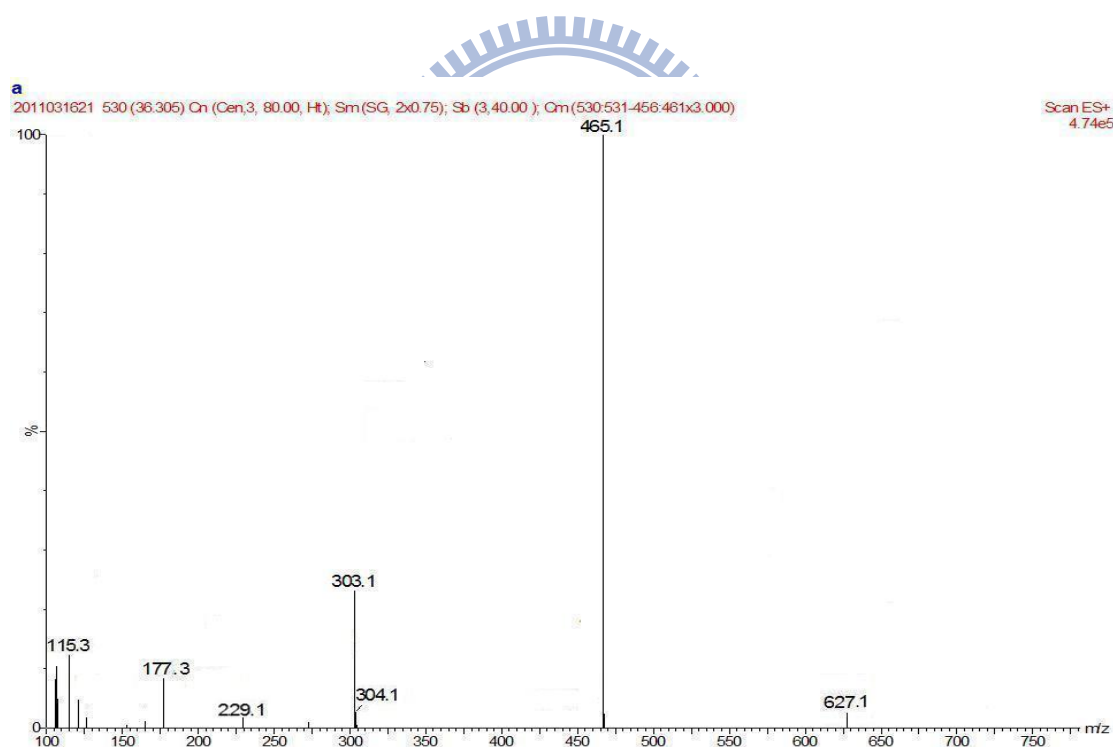


圖4-9、以ESI-MS正電荷分析波峰I的層析圖

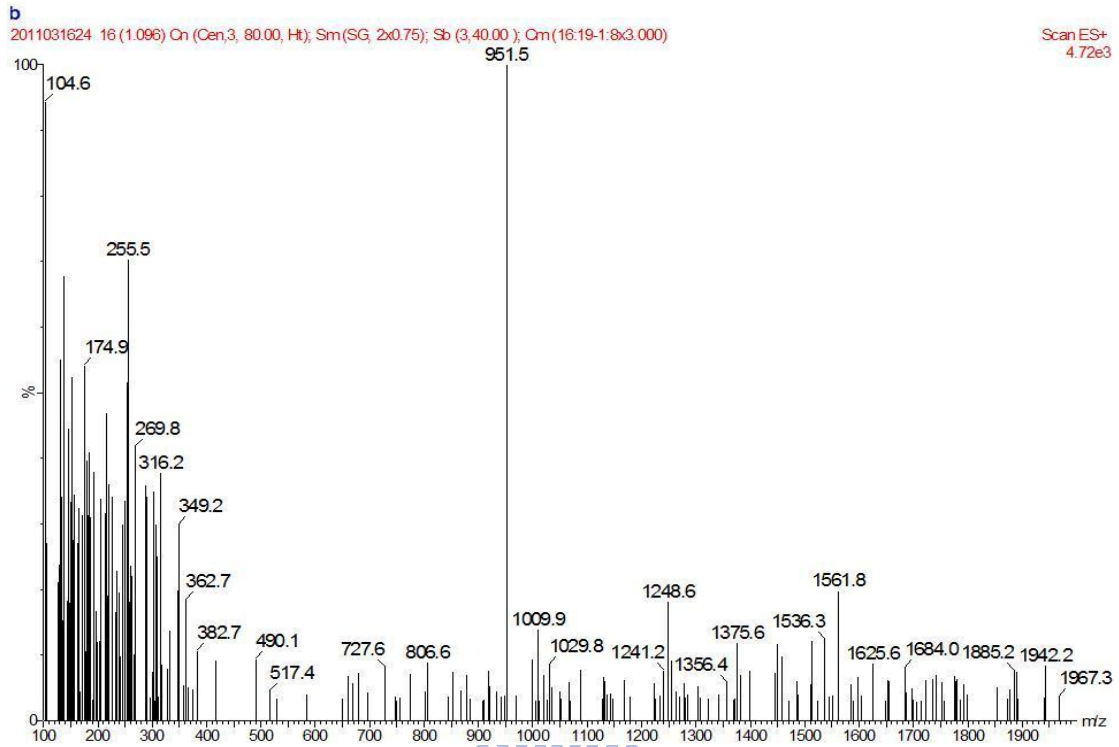


圖4-10、以ESI-MS正電荷分析波峰II的層析圖

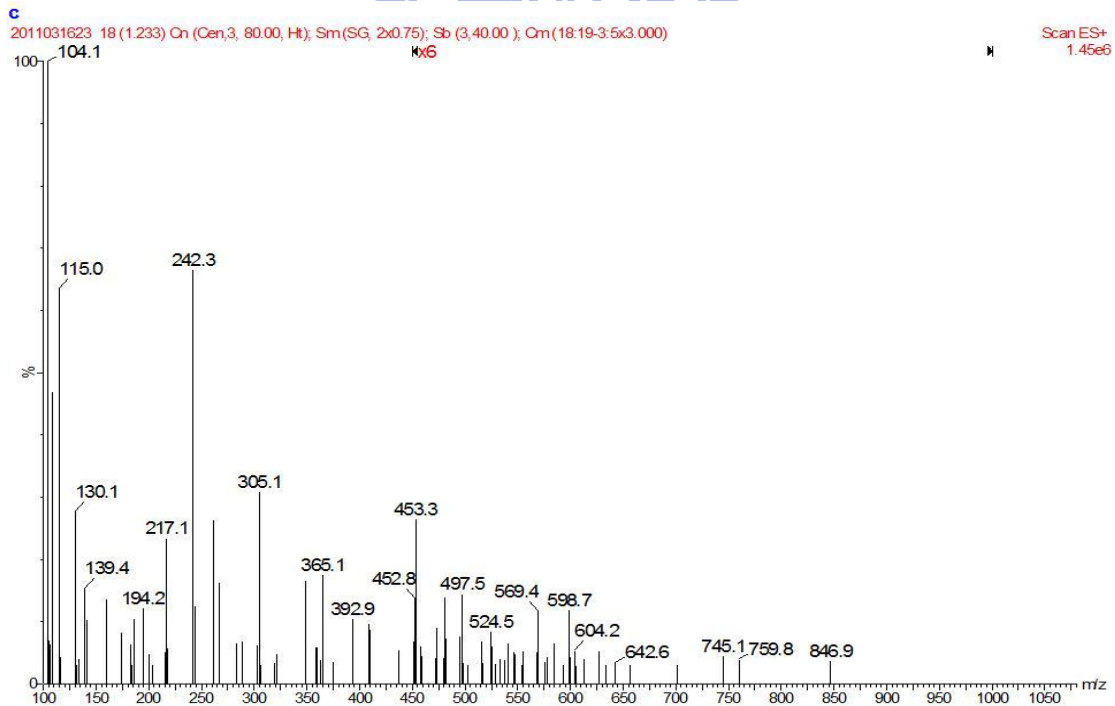


圖4-11、以ESI-MS正電荷分析波峰III的層析圖

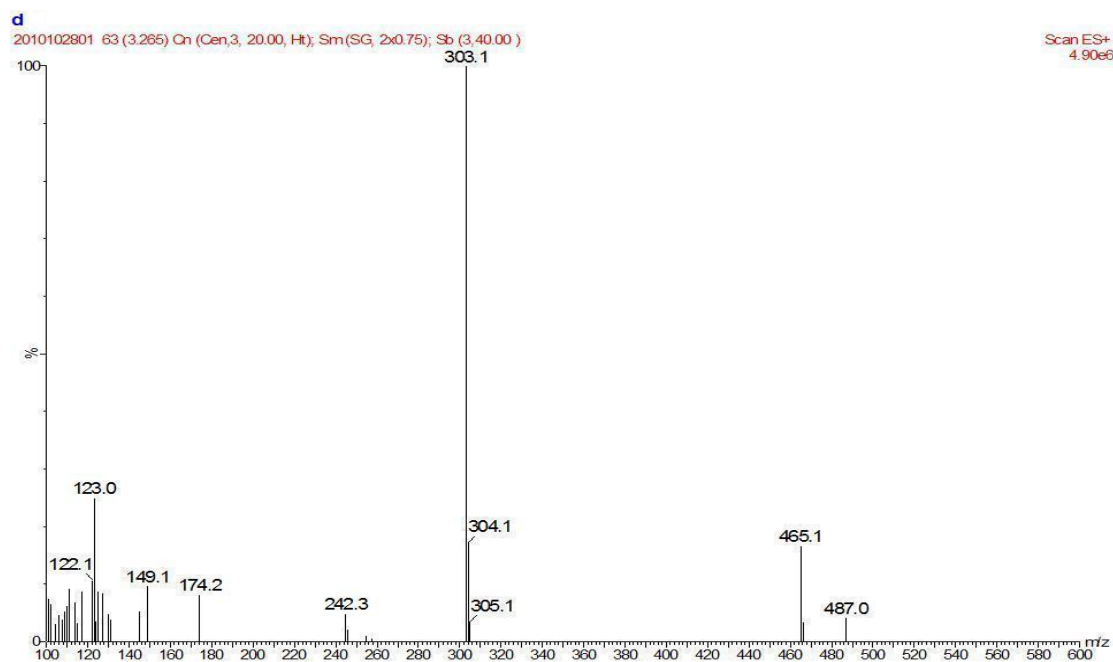


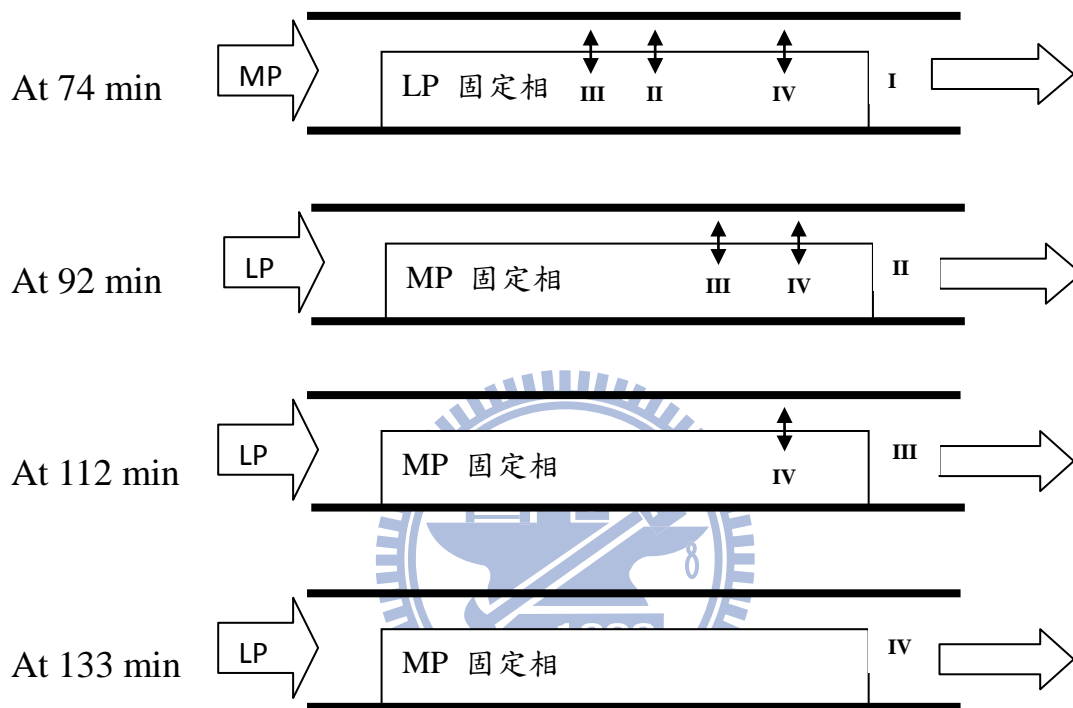
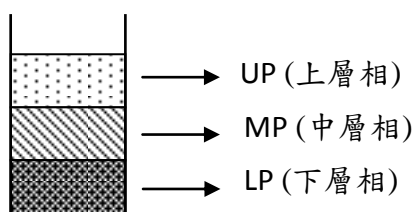
圖4-12、以ESI-MS正電荷分析波峰IV的層析圖

4.4.8 樣品在 CPC 中分離過程的探討

在整個分離過程中，首先上層相(Hexane-rich)沖提時先將一些洋蔥分析物中極性較低的物質沖提出來，當轉換為中層相或下層相沖提時因分析物極性較高，所以上層相的角色影響甚小，故以下的探討，將上層相影響不列入其中。如圖 4-13 所示，在波峰 I 中的成分屬於比較中偏高極性，易溶於在 Acetonitrile-rich 的中層相故在分析過程中，隨著中層相(移動相)的沖提在 74 分鐘左右被沖提出來。在波峰 II 中的成分的極性又比波峰 I 中的極性高，傾向分佈在 Water-rich 的下層相中比 Acetonitrile-rich 的中層相還要來的多，故隨著中層相沖提結束後，在 92 分鐘處被下層相(移動相)沖提出來。而在波峰 III 中的成分

極性又比波峰 I、II 還要來的更高，所以隨著波峰 II 的分析物沖提出來後，接著在 112 分鐘處被沖提出來。波峰 IV 中的主要成分極性只比波峰 I 大一些，相較之下極性又比波峰 II、III 的成分還要來的小，因為當移動相由中層相換成下層相，並且轉換到下降模式時，管柱中，原本的固定相由下層相變為中層相，波峰 II、III 的成分極性 $III > II$ ，且都傾向分佈在下層相，隨著下層相(移動相)依序沖提出來；而波峰 IV 成分，與 II 以及 III 相較，較為傾向於分佈在中層相(固定相)最後 133 分鐘才被沖提出來。





相對極性大小 : III > II > IV > I

圖4-13、樣品在CPC中分離過程示意圖

4.4.9 回收量及純度的探討

在 130.0 g 的洋蔥中，經由樣品前處理 60% 的乙醇萃取後，可得到 6.25 g 的洋蔥黏稠萃取物，其進樣量 0.26 g 於 CPC 做製備分離，最後計算其回收量，再由 HPLC，波長 370 nm 來偵測，得到分析物純度(表 4-6)(圖 4-6)。

表4-8、回收量及純度

| | 樣品進樣量 | 回收量 | 純度 |
|-----------|--------|---------|------|
| (I) Q3,4G | 0.26 g | 0.33 mg | 90 % |
| (IV) Q4G | 0.26 g | 0.12 mg | 92 % |

4.5 結論

本實驗的目的，是以離心分配層析來製備分離、純化洋蔥中兩種類黃酮成分，Quercetin-3,4-di-*O*-glucoside、Quercetin-4-*O*-glucoside，並利用 ESI-MS 來確定這些兩成分結構。在本研究中，首次將三相溶劑系統結合離心分配層析儀，實驗中，成功利用了 Hexane / Methyl *tert*-butyl ether / Acetonitrile / Water(2:2:3:3)(v/v)此組三相溶劑系統來分離純化洋蔥樣品。

参考文献

- [1] B. Enkhmaa, K. Shiwaku, T. Katsube, K. Kitajima, E. Anuurad, M. Yamasaki, Y. Yamane, "Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol Quercetin 3-(6-Malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL Receptor-Deficient Mice". Shimane Institute for Industrial Technology, Matsue City, Shimane 690-0816, Japan.
- [2] C. R. Pace-Asciak, S. Hahn, Eleftherios P. Diamandis, G. Soleas, David M. Goldberg, "The red wine phenolics *trans-resveratrol* and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease". *Clinica Chimica Acta*, 235 (1995) 207-219.
- [3] E. Middleton, JR., C. Kandaswami, T. C. Theoharides, "The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer". *Pharmacol Rev* 52, (2000) 673-751.
- [4] K. Kanazawa, H. Ashida, G. Danno, "Antimutagenic Mechanism of Flavonoids Against a Food-Derived Carcinogen, Trp-P-2, Elucidated with the Structure-Activity Relationships". F. F. for D. Pre. II, Chapter 8 (1988), pp 67-82.
- [5] V. Lanzotti, "The analysis of onion and garlic". *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 3-22.
- [6] T. Fossen, A. T. Pedersen , O. M. Andersen, "Flavonoids from red onion (*Allium Cepa*)". *Phytochemistry*, Vol. 47, No.2,(1998) 281-285.
- [7] L.Gennaro, C. Leonardi, F. Esposito, M. Salucci, G.Maiani, G. Quaglia, V. Fogliano, "Flavonoid and carbohydrate contents in tropea red onions : effects of homelike peeling and storage". *J. Agric. Food Chem.*, 50(2002) 1904-1910.

- [8] D. Caridi, V. C. Trenerry, S. Rochfort, S. Duong, D. Laughler, R. Jones, "Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography". *Food Chem.*, 105 (2007) 691-699.
- [9] 蔡旻都, 陳皓君, "蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性". *Chemistry* (2006) Vol. 64, No.3, 353-315
- [10] Y. Ito, "Development of Countercurrent Chromatography". *Anal. Chem.*, (1984), (56), 534-551.
- [11] Y. Ito, N. B. Mandava, "Countercurrent Chromatography : Theory and Practice ". Marcel Dekker, Inc., New York, (1998).
- [12] W. D. Conway, "Countercurrent Chromatography : Theory and Applications". VCH Publishers, Inc., (1990).
- [13] Y. Ito, W. D. Conway, "High-Speed Countercurrent Chromatography ". John Wiley & Sons, Inc., (1996).
- [14] H. T. Lu, Y. Jiang, F. Chen, "Application of high-speed counter-current chromatography to the preparative separation and purification of baicalin from the Chinese medicinal plant *Scutellaria baicalensis*". *J. Chromatogr. A*, 1017 (2003) 117–123.
- [15] Q. Du, W. Cai, M. Xia, Y. Ito, "Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns". *J. Chromatogr. A*, 973 (2002) 217–220.
- [16] Y. Shibusawa, Y. Yamakawa, R. Noji, A. Yanagida, H. Shindo, Y. Ito, "Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 119-125.

- [17] A. Yanagida, Y. Yamakawa, R. Noji, A. Odaa, H. Shindo, Y. Ito, Y. Shibusawa, "Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system". *J. Chromatogr. A*, 1151 (2007) 74-81.
- [18] E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, Z. H. Monique, E. Dardennes, G. L. Dour, J. Sapi, J. H. Renault, "Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications". *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 45-51.
- [19] E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, M. Hanrot, E. Dardennes, G. L. Dour, J. Sapi, J. H. Renault, "Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications". *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 45-51.
- [20] E. Gavioli, N. M. Maier, C. Minguillo'n, and W. Lindner, "Preparative Enantiomer Separation of Dichlorprop with a Cinchona-Derived Chiral Selector Employing Centrifugal Partition Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography: A Comparative Study". *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5837-5848.
- [21] J. B. Friesen, G. F. Pauli, "Rational development of solvent system families in counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1151 (2007) 51-59.
- [22] Y. Ito, "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1065 (2005) 145-168.
- [23] W. D. Conway, Y. Ito, "Resolution in Countercurrent Chromatography". *J. Liq. Chromatogr.* 8, (12), (1985) 2198-2207.

- [24]J. C. Delaunay, C. Castagnino, C. Che`ze, J. Vercauteren, "Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 123-128.
- [25]N. Rubio, C. Minguillon, "Preparative enantioseparation of (\pm)-N-(3,4-cis-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1183-1190.
- [26]I.A. Sutherland, G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, O. Intes, "Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1190 (2008) 57-62
- [27]W. Zhi, Q. Deng, "Purification of salvianolic acid B from the crude extract of *Salvia miltiorrhiza* with hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase system by counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 149-152.
- [28]P. Bonaccorsi, C. Caristi, C. Argiulli, U. Leuzzi, "Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS". *Food Chem.*, 107 (2008) 1668-1673.
- [29]K. R. Price, M. J. C. Rhodes, "Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition Resulting from Autolysis". *J Sci Food Agric.*, 74 (1997) 331-339.