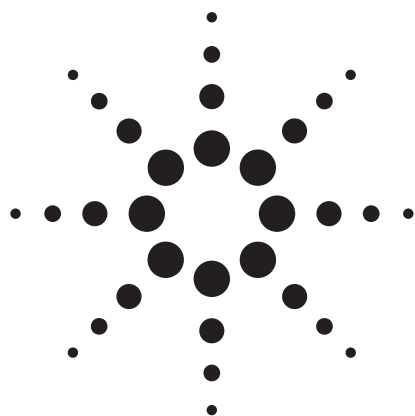
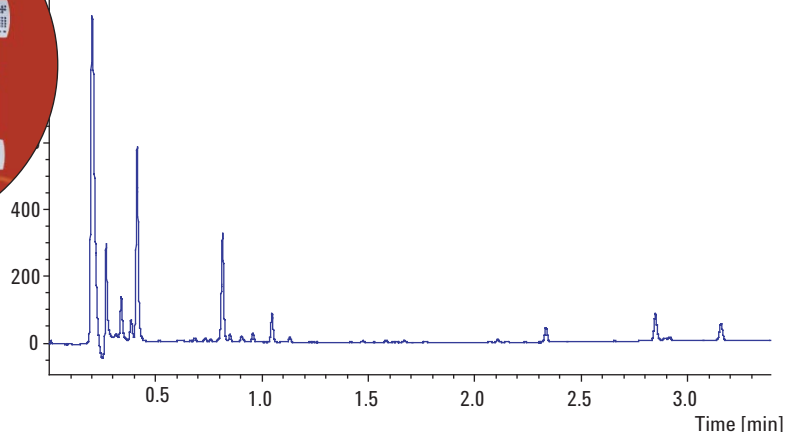
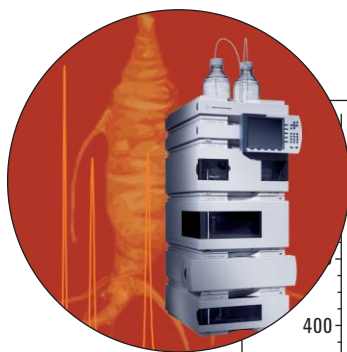




用高分离度快速液相色谱对三七进行快速、 高效分析

应用报告

徐智秀



摘要

本应用报告报道了：

- 高分离度快速液相色谱（RRLC）分析三七方法的方法建立
- 从常规HPLC到RRLC方法转换的结果
- 用RRLC方法在保持复杂组分良好分离度的同时，缩短了分析时间，同时提高了样品通量、降低了成本
- 用优化方法得到的色谱图显示，从三七不同部位得到的样品色谱峰轮廓不同，某些皂甙的浓度也不同

安捷伦仪器：

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
ZORBAX XDB C18 RRHT 柱

应用领域：

中药



Agilent Technologies

前言

中药 (TCMs) 具有悠久的用药历史, 其疗效在中国及韩国、日本等亚洲国家都得到公认。在西方国家, 也越来越普遍地将中药作为食品添加剂或营养补剂。被使用过的中药已经有 11,000 多种。对中药的研究和质量控制很大程度上依靠仪器分离和分析的性能。

本研究建立了一种分析三七的高分离度快速液相色谱 (RRLC) 方法。用安捷伦方法转移器轻松地常将常规 HPLC 分析方法转为 RRLC 方法。用不同提取方法从三七植物的不同部位制备不同样品。用优化的方法分离这些样品, 得到的色谱图显示了不同的色谱峰轮廓。本应用报告还报道了定量结果。质控部门使用本研究中建立的更快、更好的方法, 将缩短分析时间, 提高样品通量。使用这些方法还能节省溶剂消耗, 改善整个分析过程。

三七, 中文名三七或田七, 在中国是一种重要而昂贵的药材。它已经有 400 多年的栽培历史, 85% 以上

的三七都产自中国云南省。三七的功效在于促进血液循环、去除血液瘀积包括凝血, 治疗肿胀、缓解疼痛。最近的药理学研究显示, 三七具有抗癌和保肝作用, 如, 对心血管和脑血管系统有保护作用¹。三七的皂甙种类与著名的人参和西洋参 (花旗参) 相似, 因为它们都属于同一种属。三七主要用于中国南方的不同验方。著名的中成药云南白药和片仔癀中也含有三七。

中药的复杂基质常常给质量控制和研究带来挑战。2005 版中国药典收录了药材三七及其复方制剂, 如三七伤药片, 其中含有三七皂甙 R1, 是这些制剂中必须分析的成分。三七皂甙的分析时间一般是 60 多分钟。随着对中药的研究越来越深入, 科学家们认为只控制 1 到 2 个成分还不足以确定中药的质量, 必须开发分离更多组分的质量控制方法。像中药这种复杂样品的分离比合成药物的分离需要更长的分析时间。当需要考虑样品通量问题时, 理想的解决方案就是在较短的分析时间内达到相似或更高的性能。使用 RRLC 有可能开发出分析时间更短、

性能更好, 又节省溶剂的方法。对于生产质量控制来说, 使用 RRLC 意味着产品批次的检定出厂可以比使用常规 HPLC 方法更快。

实验

仪器

用于开发 RRLC 方法的 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统包含以下组件:

Agilent 1200 系列 RRLC 系统包括:

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵, 带真空脱气机
- Agilent 1200 系列 SL 型高性能自动进样器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 配置微量流通池 (2 μ L 体积, 3 mm 光程)
- Agilent 化学工作站 B.02.01 SR1, 用于数据采集和分析
- Agilent ZORBAX XDB C18 RRHT 色谱柱, 4.6 x 50 mm, 1.8 μ m 粒径

常规HPLC为标准配置Agilent 1100系列液相色谱，包含以下组件：

- Agilent 1100 系列二元泵，带脱气机
- Agilent 1100 系列自动进样器
- Agilent 1100 系列柱温箱
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器
- Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱，4.6 x 50 mm, 5 μ m 粒径

样品和样品制备

- 三七皂甙 R1、人参皂甙 Rg1 和人参皂甙 Rb1 标准品购自中国国家药品与生物制品检定所 (NICBPB)，人参皂甙 Re 和人参皂甙 Rc 标准品购自美国 Sigma-Aldrich 公司。
- 三七茎叶提取物(NCLE)由用户实验室提供。茎和叶用60%乙醇提取，溶剂蒸干后残渣用正丁醇溶解，再将溶剂挥发掉，残留黄色粉末用甲醇溶解，待进样。

- 三七根提取物 (NRE) 由用户实验室提供。粗品用水提取，用大孔滤膜过滤，滤液挥发至干。残留白色粉末状物质用甲醇溶解，待进样。
- 三七购自当地一家药材商店（品牌为同仁堂）。粗品用水/甲醇 (30/70, v/v) 超声萃取 30 分钟，用 0.22 微米滤膜过滤，用澄清的滤液进样。
- 水、乙腈和甲醇均购自美国 Fisher 公司。

方法转换

需要将使用填充 5 μ m 填料色谱柱的常规 HPLC 方法转换成使用填充 1.8 μ m 填料色谱柱的 RRLC 方法。使用安捷伦方法转换计算器(可用光盘，Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，发行号 5989-5130EN)，可使这一过程简便、快速(图 1)。方法转换计算器上列出了各种不同参数，可以根据具体需求对转换后的方法进一步改进。如需了解如何将一个常规 HPLC 方法手动转换成 RRLC 方法，请参阅安捷伦相关应用报告 2,3,4。

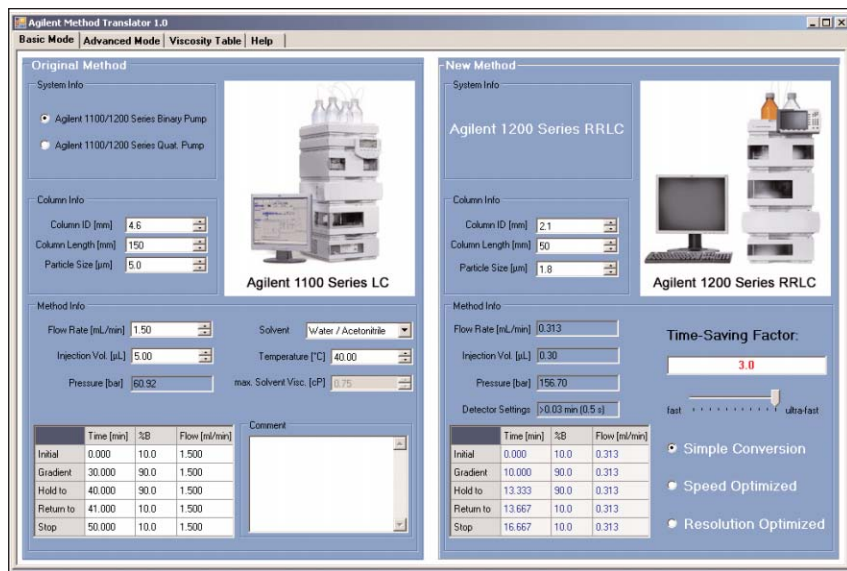


图1
安捷伦方法转换计算器用于将标准HPLC方法转换为RRLC方法

结果与讨论

色谱图

药理学研究结果显示，三七植物的不同部位因所含的成分不同具有不同的药效。使用特殊的提取方法以达到获得更多有效成分的目的。用常规HPLC方法和RRLC方法分析三七样品得到不同的峰轮廓。图2显示了用常规HPLC方法分析三七茎和叶提取物(NCLE)得到的色谱图。这种分析通常需要60多分钟⁵。如实验部分所述，用于分析三七样品的RRLC方法是在常规HPLC方法的基础上开发的。用常规HPLC方法和RRLC方法分析了相同的NCLE样品。色谱图见图2和图3。图3中的色谱峰比图2中的更窄。这意味着分离复杂样品的峰容量增加了。RRLC分析的分离度或分离性能优于常规HPLC。同时，分析时间从60分钟明显缩短到20分钟。另一个要考虑的因素是常规HPLC和RRLC柱的选择性应保持一致。如果新的RRLC柱与常规HPLC柱相比具有完全不同的选择性，方法转换将失去意义。在本研究中，峰

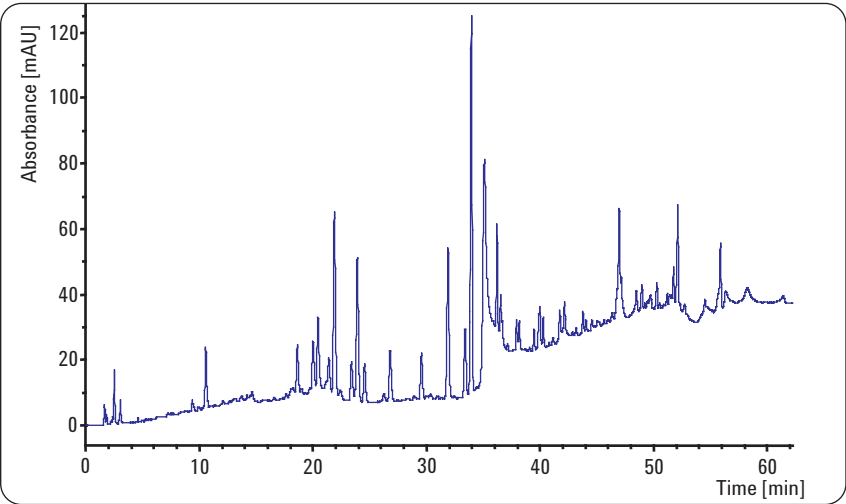


图2 用常规HPLC方法在Agilent 1100系列LC系统上分析NCLE的色谱图，色谱条件见表1

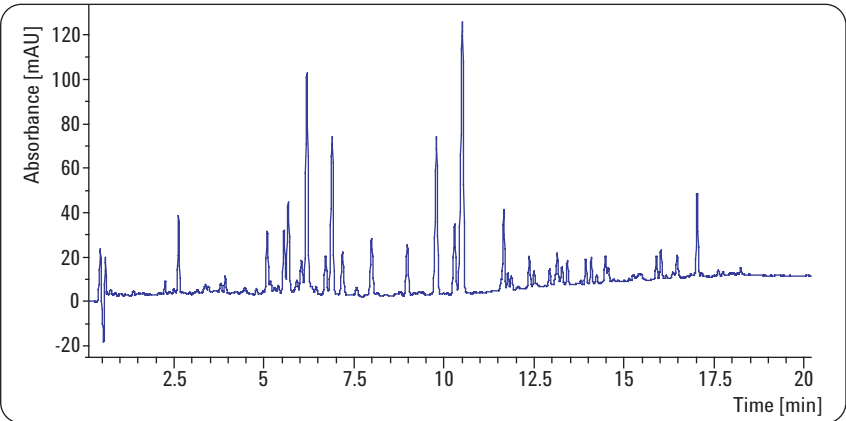


图3 用RRLC方法1在Agilent 1200系列LC系统上分析NCLE的色谱图，色谱条件见表1

在Agilent 1100系列LC上进行常规方法分析的色谱条件:		RRLC方法1色谱条件:		RRLC方法2色谱条件:		RRLC方法3色谱条件:	
色谱柱:	Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm 粒径	色谱柱:	Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径	色谱柱:	Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径	色谱柱:	Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径
流动相:	A: 水, B: 乙腈	流动相:	A: 水, B: 乙腈	流动相:	A: 水, B: 乙腈	流动相:	A: 水, B: 乙腈
梯度:	0 分钟, 20 %B; 10 分钟, 30 %B; 20 分钟, 35 %B; 30 分钟, 40 %B; 40 分钟, 60 %B; 50 分钟, 100 %B	梯度:	0 分钟, 20 %B; 3 分钟, 30 %B; 7 分钟, 35 %B; 10 分钟, 40 %B; 13 分钟, 60 %B; 17 分钟, 100 %B	梯度:	0 分钟, 20 %B; 1.5 分钟, 30 %B; 5 分钟, 35 %B; 7 分钟, 40 %B; 10 分钟, 60 %B; 12 分钟, 100 %B	梯度:	0 分钟, 20 %B; 1.5 分钟, 60 %B; 5 分钟, 100 %B
流速:	1.0 mL/min	流速:	1.0 mL/min	流速:	1.5 mL/min	流速:	2.5 mL/min
进样量:	5 μL	进样量:	5 μL	进样量:	5 μL	进样量:	5 μL
二极管阵列检测:	203 nm ±8 nm, 参比 360 nm ±100 nm	二极管阵列检测:	203 nm ±8 nm, 参比 360 nm ±100 nm	二极管阵列检测:	203 nm ±8 nm, 参比 360 nm ±100 nm	二极管阵列检测:	203 nm ±8 nm, 参比 360 nm ±100 nm

表1. 色谱条件

轮廓和洗脱顺序都相同，所以不需要再对新色谱图中的峰进行鉴定。而且，二极管阵列检测器得到的UV光谱图将有助于进一步对色谱峰进行确证。

图4显示了用RRLC方法2分析NCLE样品的色谱图。流速提高到1.5 mL/min，又缩短了分析时间。同时，保持了与图3结果相同或相当的性能。对于更复杂的样品，缩短分析时间意味着将损失峰容量。所以，用户必须在峰容量和分析时间之间进行权衡。

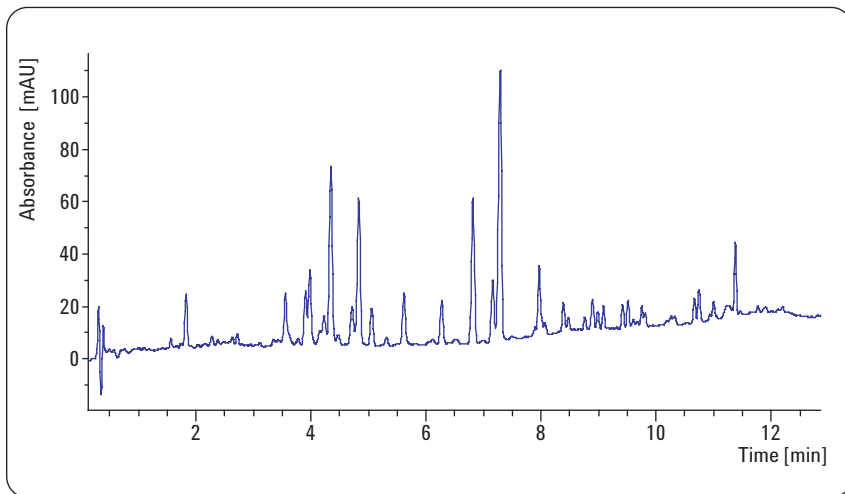


图4
NCLE 色谱图，用 RRLC 方法2在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上分析。色谱条件见表1

如实验部分所述，有三种不同来源的样品。图3显示了用RRLC方法1对三七根提取物(NRE)样品的分析。样品为用不同的方法从三七根中提取。色谱峰轮廓显示，NRE 和 NCLE 含有不同类型的皂甙和其它成分。

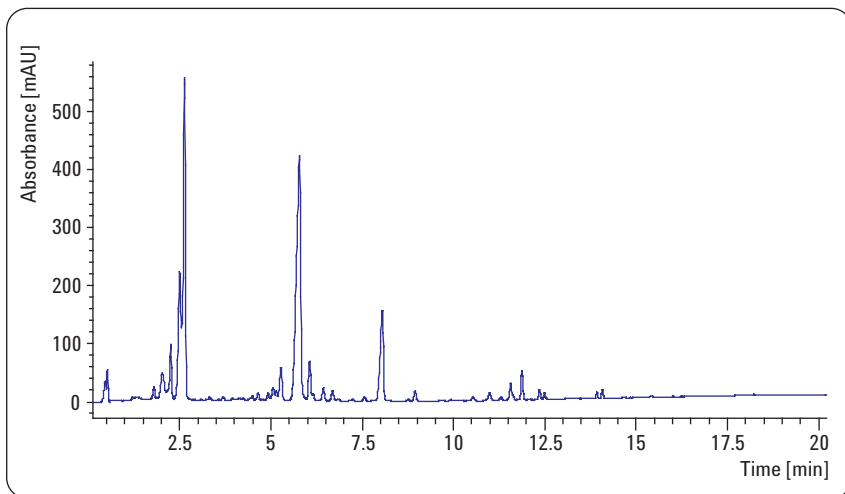


图5
NRE 色谱图，用 RRLC 方法1在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上分析。色谱条件见表1

为了检验所建立的RRLC方法是否能用于其它三七样品，我们从当地的一家中药店中购买了三七。品牌为同仁堂，中药店已将三七研成粉末。三七分析的色谱图见图6和图7。图6用RRLC方法1获得，图7用RRLC方法3获得。与需要60多分钟的常规HPLC方法相比，图7中色谱图的分析时间只有4分钟。

三七茎和叶的提取物比其它样品更复杂，为了节省时间并保持分离度，用方法1或2分析。对于不太复杂的样品，如同仁堂的三七提取物，可以在更短的时间里用更快的方法分析，如图7所示。

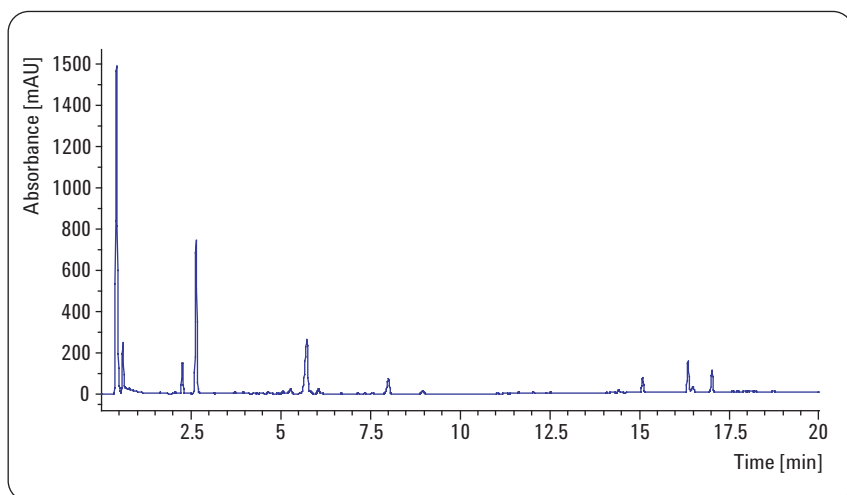


图6.
同仁堂三七色谱图，用RRLC方法1在Agilent 1200系列RRLC系统上分析。色谱条件见表1

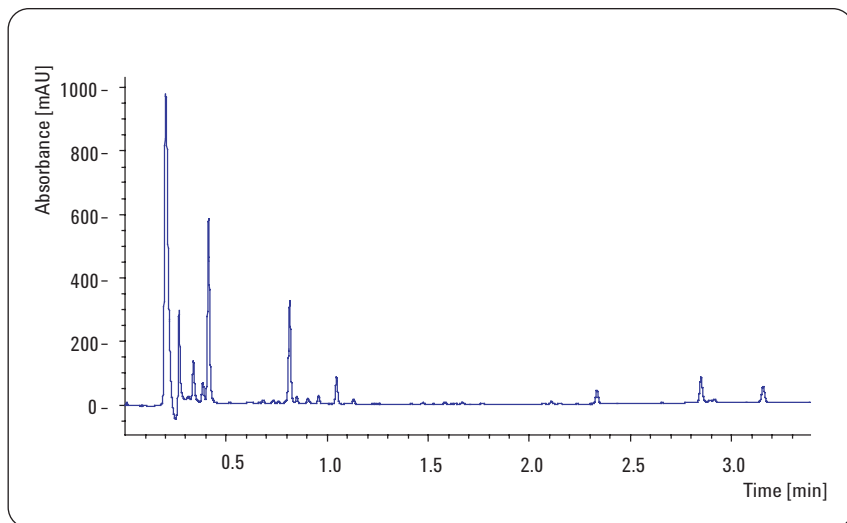


图7.
同仁堂三七色谱图，用RRLC方法3在Agilent 1200系列RRLC系统上分析。色谱条件见表1

定量结果

用RRLC方法2分析实验部分所列的标准品。使用不同浓度水平的标准品绘制校正曲线，并测定了三个样品的浓度。表2显示了定量结果。NCLE含有许多种皂甙，但不含Rc或Re。NRE含皂甙种类较少，但含有本研究所分析的5种标准品。同仁堂三七提取物中没有许多种类的皂甙，也不含Rc或Re，R1、Rb1和Rg1的浓度比NCLE和NRE高。所有样品中三七 R1的浓度范围为0.029到0.89 μg/μL。本研究建立的定量方法可以很容易地用于不同提取方法三七的质量控制。

标准品	公式 Y: 峰面积 x: 含量 (0.1 μg/μL)	相关系数	NCLE 中的浓度 (μg/μL)	NRE 中的浓度 (μg/μL)	同仁堂三七粉末 中的浓度 (μg/μL)
R1	Y = 54.03850x + 0.395722	0.99995	0.029	0.48	0.89
Rb1	Y = 71.64751x - 0.159297	1.0000	0.18	4.64	2.136
Re	Y = 93.85331x + 3.83488	0.99982	N/A	1.28	N/A
Rg1	Y = 151.66579x + 0.501417	1.0000	0.07	1.52	1.54
Rc	Y = 11.12002x + 0.128832	0.99980	N/A	0.025	N/A

表2.
皂甙标准品的定量结果

结论

中药是复杂的天然产物，用常规HPLC进行分析需要高性能的系统 and 很长的分析时间。本研究中建立的RRLC方法显示了在保持复杂组分良好分离度的同时，如何缩短了分析时间。色谱图显示了不同三七提取样品具有不同的峰轮廓。考虑到应用的需要，使用更快流速的RRLC可得到更快的分析方法。本研究中建立的定量方法可以很容易地开发为三七产品的质量控制方法。用RRLC方法在保持或获得更高性能的同时，显著缩短分析时间，从而提高样品通量，节省经费。

参考文献

1.
Wei J.X., Du Y.C., “Modern science research and application of panax 三七”, *Yunnan Science and Technology Press, Kunming, China*, **1996**.
2.
Angelika Gratzfeld-Huesgen, “Fast and Ultra-fast Analysis with the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System Compared to a Conventional Agilent 1100 Series LC System Using Sub 2- μ m Particle Columns”, *Agilent Application Note, Publication Number 5989-5672EN*, **2006**.
3.
Michael Woodman, “Improving the Effectiveness of Method Translation for Fast and High Resolution Separations”, *Agilent Application Note, Publication Number 5989-5177EN*, **2006**.
4.
Michael Frank, “Saving analysis time and gaining resolution by simple means”, *Agilent Application Note, Publication Number 5989-6819EN*, **2007**.
5.
Lau A.J., Woo S.O., Koh H.L., “Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection”, *J. Chromatogr. A*, **1011**, 77-87, **2003**.

徐智秀是安捷伦科技上海有限公司的应用化学工程师。

www.agilent.com/chem

© 2007 安捷伦科技公司

2008年1月中国印刷
出版号 5989-6757CHCN



Agilent Technologies