



使用 Poroshell 120 表面多孔填料液相色谱柱分析丹参(*Salvia Miltiorrhiza*)和复方丹参滴丸

应用

医药

作者

傅荣杰

安捷伦科技(上海)有限公司

中国上海浦东英伦路 412 号,

邮编 200131

肖遥

安捷伦科技中国有限公司

中国北京望京北路 3 号,

邮编 100102

摘要

采用 Agilent Poroshell 120 液相色谱柱, HPLC 法分析了一种常用中药丹参(*Salvia Miltiorrhiza*)及其复方丹参滴丸制剂。该色谱柱是由表面多孔填料颗粒填充而成, 这种填料具有实心内核(1.7 μm)和表面多孔层, 多孔外层的扩散路径为 0.5 μm 。该新型色谱柱的优点是具有与亚 2 μm 颗粒填充的色谱柱相似的高柱效, 而产生的反压却比后者低 40-50%, 同时还具有峰容量高的优点。本文使用 Poroshell 120 色谱柱与用于超高效液相色谱的 Waters HSS T3 色谱柱进行分析方法开发的比较。结果表明使用 Poroshell 120 色谱柱进行分析, 可以得到极佳峰形, 且操作压力低于 287 bar。此方法可在任何高效液相色谱仪上运行。

前言

丹参(*Salvia miltiorrhizae*)为一味常用中药, 常与其它中草药配伍使用。传统上, 含丹参的方剂常被用来治疗多种疾病, 尤其是心血管疾病, 例如动脉粥样硬化(由胆固醇斑块引起的动脉“硬化”)或凝血异常。复方丹参滴丸是一种由丹参、三七、冰片及其它化合物组成的复方制剂。常用于治疗冠心病及心绞痛[1]。



Agilent Technologies

由于中药成分复杂，所以对中药和其它天然产物的质量控制非常困难。虽然我们常用 HPLC 法对中药中的一种或几种化合物进行定量分析，但是这种分析很难代表中药的实际质量。因而应用独一无二的指纹图谱分析用于不同原料的鉴别成为当前的发展趋势。色谱峰越多，提供的样品信息就越多。因此对于中药指纹图谱分析来说，峰容量及分离度对于控制中药质量非常重要。

已有相关标准使用 Waters UPLC 建立 TCM 指纹图谱的分析方法 [2]。本应用采用 Agilent Poroshell 120 色谱柱，建立了一种适用于任何液相色谱仪的分析方法。

实验部分

样品制备

滴丸样品制备：取 10 粒滴丸，加 10 mL 水溶解。用装有 0.45 μm 再生纤维素薄膜的过滤器（部件号：5064-8221）过滤，后进行 HPLC 过滤。

丹参样品制备：称取丹参粉末 2.0 g，80 $^{\circ}\text{C}$ 水提 1 h，过滤，取滤液加水定容至 50 mL。进样进行 HPLC 分析之前，用装有 0.45 μm 再生纤维素薄膜的过滤器（部件号：5064-8221）过滤。

HPLC 色谱条件

采用 Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC (RRLC) 系统进行 HPLC 分析。此分析系统包括 G1312B SL 型二元泵、G1376C SL 型自动进样器(ALS)、G1316B SL 型柱恒温箱(TCC)和 G1316C SL 型二极管阵列检测器(DAD)。

表 1. 分析丹参滴丸样品的色谱条件

流动相：	A, 0.02% H_3PO_4 溶液；B, H_3PO_4 浓度为 0.02% 的乙腈/水溶液(V/V=80/20)					
梯度程序：						
时间 (min)	0	1.6	1.8	8.0	8.4	10
%B	9	22	26	39	9	9
色谱柱	Waters HSS T3, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 $\times$ 100 mm, 2.7 μm Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 μm					
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$					
流速	2.1 mm 内径色谱柱的流速为 0.4 mL/min, 3.0 mm 内径色谱柱的流速为 0.8 mL/min, 4.6 mm 内径色谱柱的流速为 2 mL/min					
波长	280 nm					
进样量	2.1 和 3.0 mm 内径色谱柱的进样量为 2 μL , 4.6 mm 内径色谱柱的进样量为 4.0 μL					

表 2. 分析丹参水提物的色谱条件

流动相	A, 0.02% H_3PO_4 溶液；B, 乙腈					
梯度程序	流速=1 ml/min					
时间(min)	0	6	14	18	22	28
%B	10	20	25	30	90	90
梯度程序	流速 = 2 ml/min					
时间(min)	0	3	7	9	11	14
B%	10	20	25	30	90	90
梯度程序	流速 = 3 ml/min					
时间(min)	0	2	4.67	6	7.33	9.33
B%	10	20	25	30	90	90
色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 $\times$ 100mm, 2.7 μm ; Agilent ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 1.8 μm					
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$					
波长	280 nm					
进样量	4 μL					

结果与讨论

如图 1 所示,我们使用 Poroshell 120 EC-C18 和 Poroshell 120 SB-C18 两个色谱柱对复方丹参滴丸进行分析。复方丹参滴丸中所有 8 种目标化合物均在上述两个色谱柱中得到有效分离。与 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱相比, Poroshell 120 EC-C18 色谱柱保留时间略长,从而可以推测两个色谱柱的选择性不同。而选择性的差异表现在 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对此样品有更好的选择性,因为在 Poroshell 120 EC-C18 的色谱图中从峰 6 中分离出一个小杂质峰,而 Poroshell 120 SB-C18 的色谱图中没有分离出此峰。

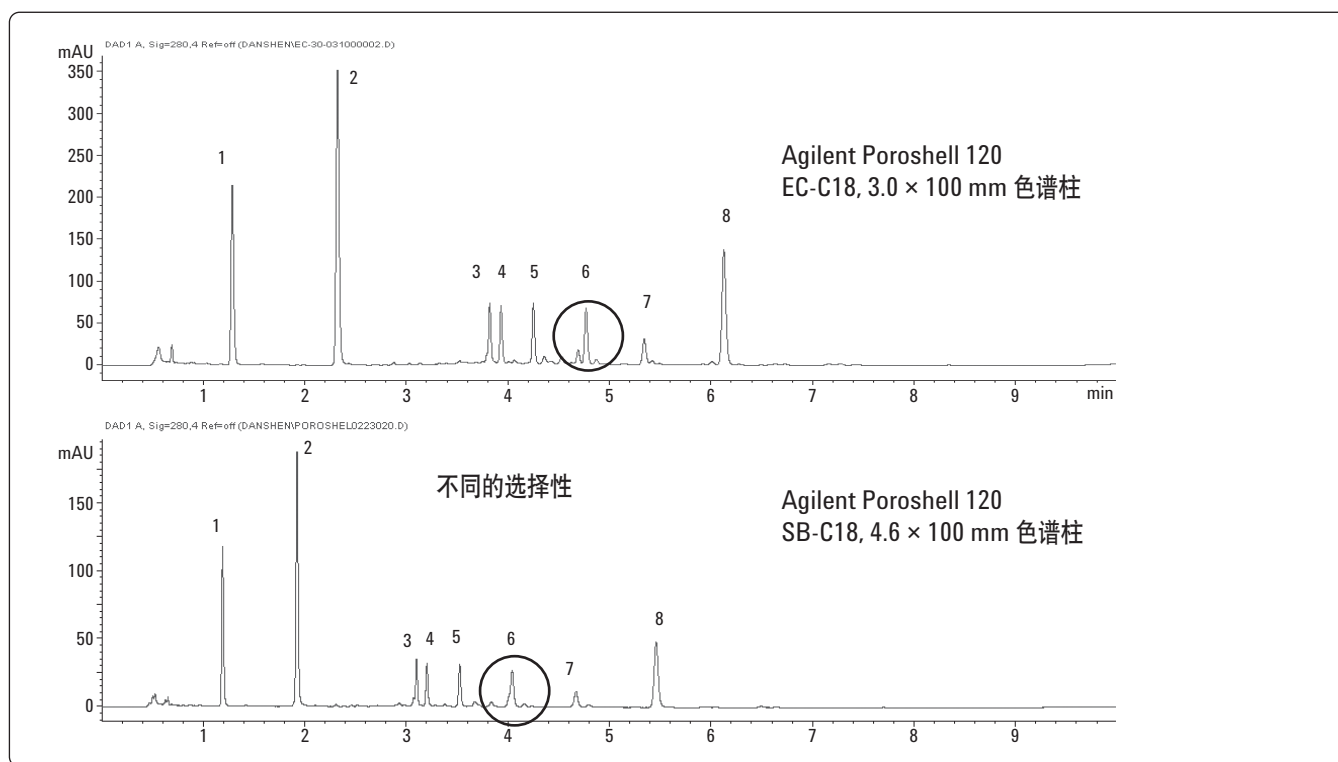


图 1. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 和 SB-C18 色谱柱分析丹参滴丸样品。两色谱柱的填料粒径均为 2.7 μm

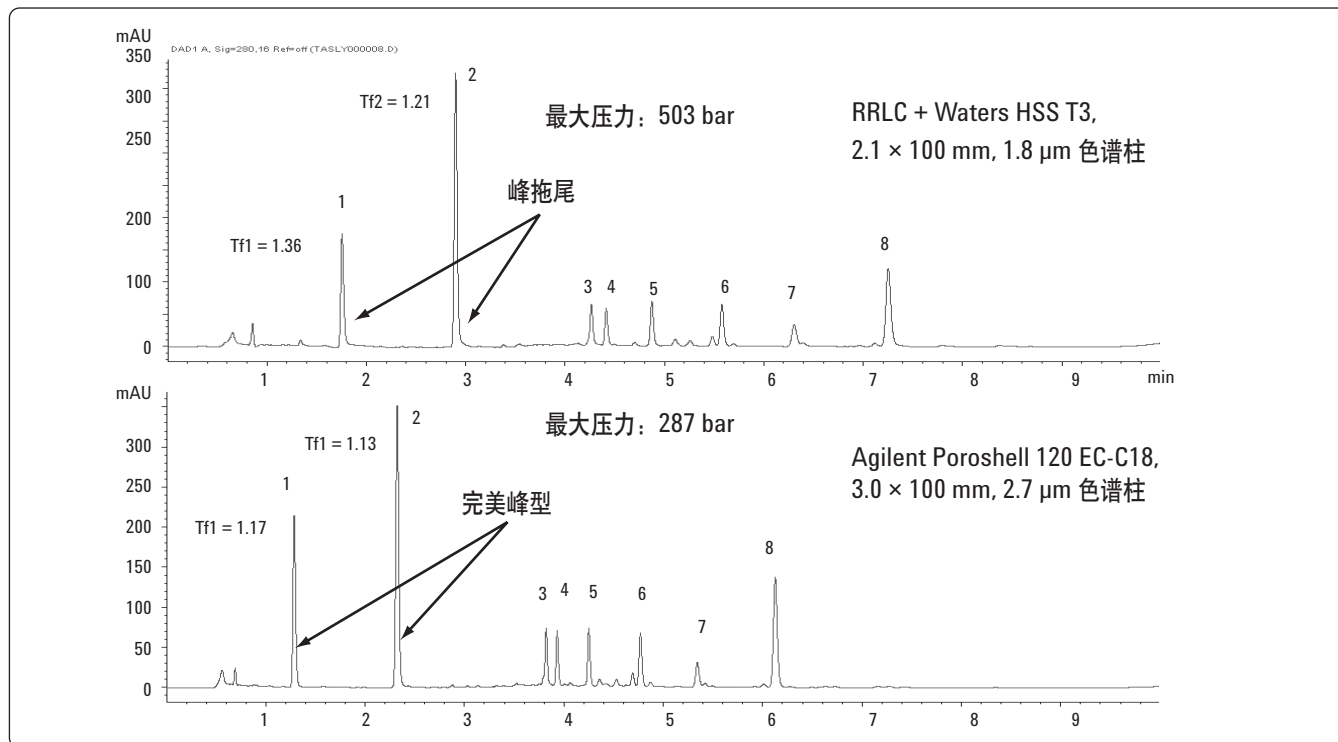


图 2. Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和对照色谱柱的谱图比较，显示了 Poroshell 120 色谱柱可以在更短的分析时间里得到更好的峰形

此分析方法最早采用 Waters HSS T3, 1.8 μm 色谱柱，并在安捷伦液相色谱仪上重复出实验结果，如图 2 所示。Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Waters HSS T3 色谱柱的实验结果对比图显示，Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对此分离有若干优势。与 Waters HSS T3 色谱柱相比，Poroshell 120 EC-C18 色谱柱缩短了分析时间，色谱图的峰型良好，而且在此对比图中八个目标化合物的分离度非常相似。本实验对不具备 UHPLC 进行色谱分析人员的最大优势表现在 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的最大使用压力仅为 Waters HSS TS, 1.8 μm 色谱柱的 57%。Poroshell 120 EC-C18 色谱柱适用于任何液相色谱仪，而 Waters HSS T3 色谱柱使用相同的方法则需要高压液相色谱仪上运行。

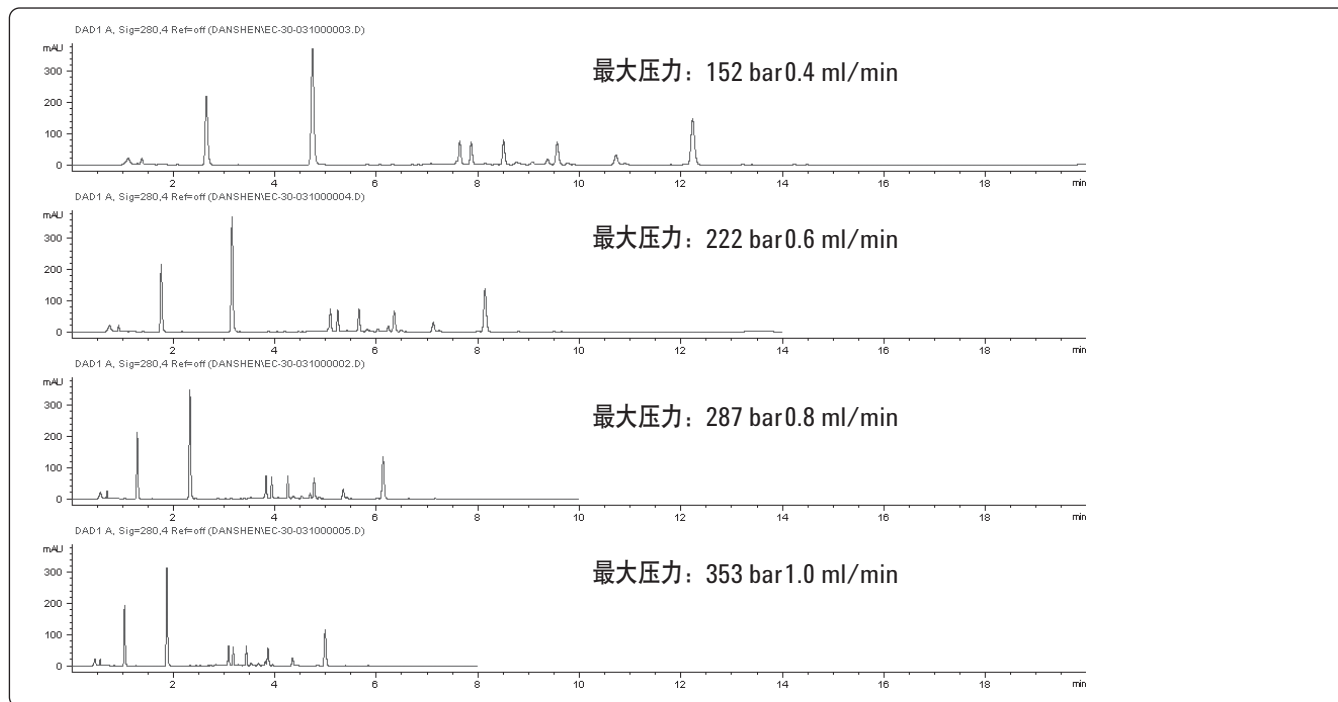


图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱在不同流速下分析的色谱图

图 3 为不同流速下的色谱图。高流速带来更快的分离却几乎不损失分辨率，同时压力保持在 400 bar 以下。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 ($2.7 \mu\text{m}$) 色谱柱及 Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18 ($1.8 \mu\text{m}$) 色谱柱分析丹参水提液的色谱图见图 4。与亚 $2 \mu\text{m}$ 全多孔颗粒色谱柱相比，填充表面多孔颗粒填料的 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱可提供更短的保留时间及更高的分离度。这种小的表面多孔颗粒填料

可提供高效的分析结果，与亚 $2 \mu\text{m}$ 色谱柱相似。不同的键合相会带来更高性能和分离度的分析结果。由于色谱柱的选择性不同，在 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的分析谱图中，主峰中分离出一个小峰。此外，由于表面多孔填料色谱柱的背压更低，在未造成分离度降低的情况下，流速越高，分离越快。由于多孔外壳颗粒填料的质量传递更快，粒径分布窄 20%，所以与全多孔颗粒填料相比，填充表面多孔颗粒的色谱柱有更高的效率和分离度。

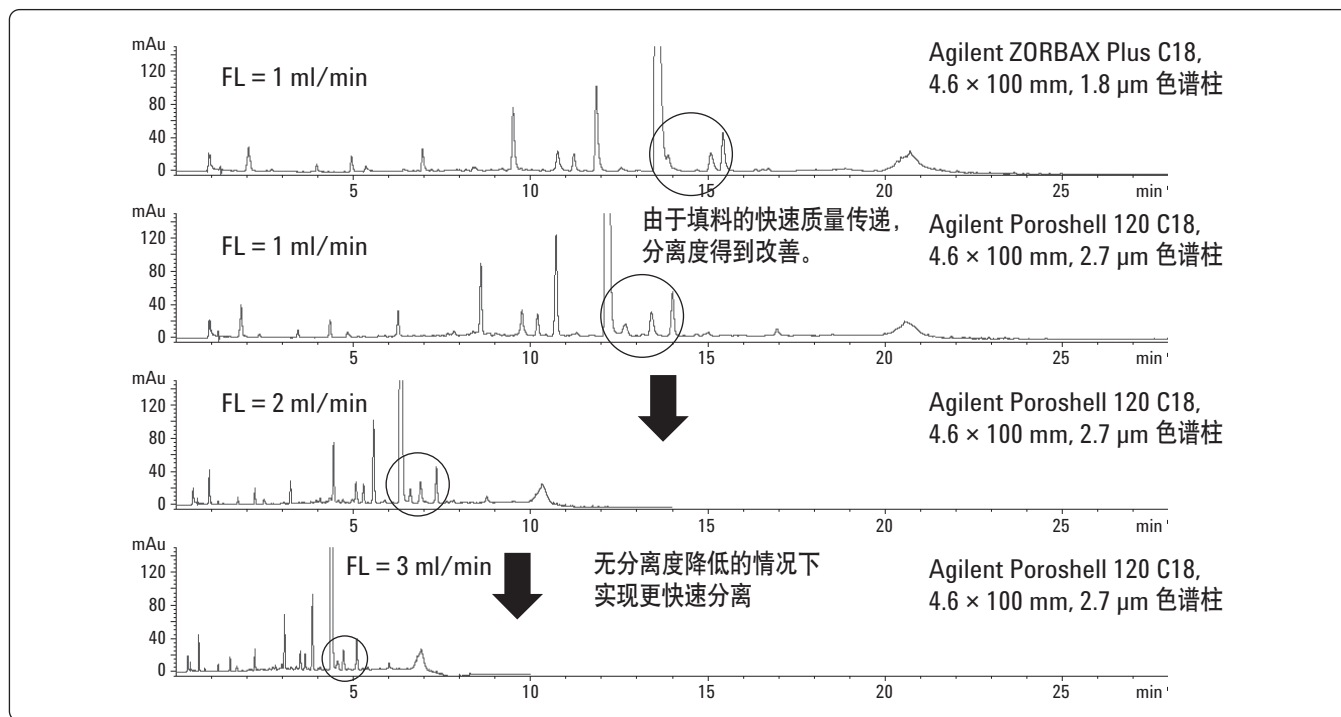


图 4. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18(2.7 μ m) 色谱柱和 Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18(1.8 μ m) 色谱柱分析丹参水提液

结论

在高效液相色谱压力条件下, 填充表面多孔颗粒的 Agilent Poroshell 120 色谱柱可提供高效和快速的色谱分析。因为此类色谱柱可实现高的分离度, 所以它们适用于分析传统中药等复杂样品, 例如丹参提取物。Agilent Poroshell 120 色谱柱的压力比全多孔亚 2 μ m 颗粒色谱柱低 40-50%。这使得 Agilent Poroshell 120 色谱柱适用于任何液相色谱仪, 尤其适用于最大压力为 400 bar 的通用型液相色谱仪。使用 Poroshell 120 色谱柱, 通用型液相色谱仪的使用者即可实现快速分析。

参考文献

1. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/patient-danshen.html>
2. Compound Danshen Dropping Pills, China Pharmacopoeia 2010: 906

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误, 或由于提供、展示或使用本材料造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物所含信息、说明和性能指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2010

中国印刷

2010 年 4 月 27 日

5990-5739CHCN



Agilent Technologies