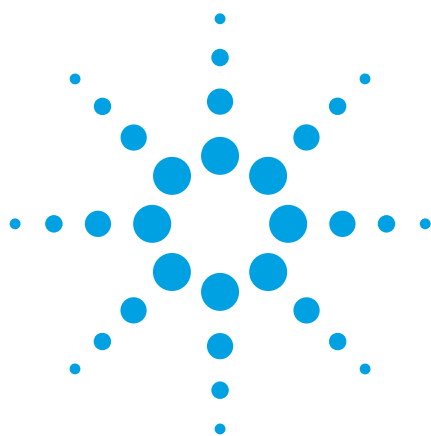




# 用安捷伦 Poroshell 120 EC-18 色谱柱快速分析两面针

## 应用报告

传统中药

### 作者

Yun Zou  
安捷伦科技（上海）有限公司  
上海市浦东新区外高桥保税区英伦路 412 号  
上海 200131，中国

### 摘要

本文中使用安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 色谱柱成功再现了中国药典中两面针的分析方法。将该方法轻松转移到 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上，得到了良好的分离结果，氯化两面针碱峰形卓越，确保了定量的准确性。使用 75 mm Poroshell 120 色谱柱时梯度时间从 35 分钟缩短到 17.5 分钟，使用 50 mm Poroshell 120 柱时则缩短到 12 分钟。通过增大流速，分析时间获得了进一步缩短，但背压仍没有超过 400 bar，所以，本分析方法可以在传统 HPCL 仪器上进行。Poroshell 120 色谱柱缩短了分析时间，同时保证了对复杂的传统中药（TCM）成分的高分离度，从而提高了样品通量、降低了成本。



**Agilent Technologies**

前言

两面针也称 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, 是一种芸香科植物。广泛分布在中国东南部, 在印度、北昆士兰州和澳大利亚等地也有生长 [1]。两面针是一种常用的中草药, 具有活血、散瘀、消肿和止痛等功效。两面针中含有许多生物碱, 其中具有药效和生物活性的主要活性成分为氯化两面针碱 [2]。氯化两面针碱最为著名的是其抗癌活性 [3]。中国药典 [4] 规定用 HPLC 测定两面针中的氯化两面针碱时, 其含量不得低于 0.13%, 以此对该药材进行质量控制。

安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱填充表面多孔填料, 可实现快速分离, 并与亚 2 μm 全多孔色谱柱性能相当。但由于其使用的筛板与 5 μm 粒度填料的色谱柱相同, 都是 2 μm 筛板, 因而不需要进行额外的样品处理。可以将用 5 μm 粒度色谱柱建立的方法无差别转移到 Poroshell 120 色谱柱上。这使得 Poroshell 120 色谱柱非常适用于中草药的分析, 因为这类样品通常非常复杂。用 5 μm 色谱柱分离这类样品时常常需要相当长的时间, 而用 Poroshell 120 色谱柱可以缩短分析时间, 并且得到这类样品所需的高分离度。

本研究中, 我们成功地将传统 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱上的梯度洗脱方法转移到两根不同的 2.7 μm Poroshell 120 EC-18 柱上, 提高了分析速度, 得到了良好的分离度和高柱效, 超越了中国药典的要求。

表 1. 各色谱柱的方法参数

|       | Agilent Zorbax Eclipse Plus C18<br>4.6 × 150 mm, 5 μm                  | Agilent Poroshell 120 EC-C18<br>4.6 × 75 mm, 2.7 μm | Agilent Poroshell 120 EC-C18<br>4.6 × 50 mm, 2.7 μm |               |
|-------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|
| 流动相   | A: 0.1% 甲酸-三乙胺 (pH = 4.5) , (0.1% (v/v) 甲酸水溶液用三乙胺调节 pH 至 4.5)<br>B: 乙腈 |                                                     |                                                     |               |
| 梯度    | 0 min 20% B                                                            | 0 min 20% B                                         | 0 min 20% B                                         | 0 min 20% B   |
|       | 30 min 50% B                                                           | 15 min 50% B                                        | 10 min 50% B                                        | 2.7 min 27% B |
|       | 35 min 100% B                                                          | 17.5 min 100% B                                     | 12 min 100% B                                       | 3 min 100% B  |
| 流速    | 1.5 mL/min                                                             | 1.5 mL/min                                          | 1.5 mL/min                                          | 3 mL/min      |
| 进样量   | 10 μL                                                                  | 5 μL                                                | 4 μL                                                | 4 μL          |
| 柱温箱温度 | 30 °C                                                                  | 30 °C                                               | 30 °C                                               | 30 °C         |
| 检测器   | UV 273 nm                                                              | UV 273 nm                                           | UV 273 nm                                           | UV 273 nm     |

实验部分

试剂和化学品

氯化两面针碱标准品来自中国药品与生物制品检定所 (NICBPB, 中国, 北京)。乙腈 (ACN) 和甲醇购自国药集团化学试剂公司 (中国, 上海)。高纯水用 Milli-Q 纯水系统制备。

称取适量氯化两面针碱标准品, 用 70% 甲醇溶解, 配制成 50 μg/mL 标准溶液。

样品制备

两面针中药材购自当地中药店。取粉末样品 (1 g), 用 20 mL 70% 甲醇水溶液在超声水浴中提取 30 分钟, 重复提取两次。合并提取液, 用 70% 甲醇水溶液稀释并定容至 50 mL。然后该萃取液用 0.45 μm 再生纤维素滤膜 (部件号 5064-8221) 过滤后直接进样到 HPLC 系统。

仪器

本研究使用安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统, 组件包含有二元泵 (G4220A)、柱温箱 (TCC, G1316C)、自动进样器 (G4226A) 和二极管阵列检测器 (DAD, G4212A)。表 1 列出了各种规格色谱柱的方法参数。

所用色谱柱为:

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm  
(部件号 959993-902)

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 75 mm, 2.7 μm  
(部件号 697975-902)

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm  
(部件号 699975-902)

## 结果和讨论

我们在 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱上重复了 2010 版中国药典上发布的一面针分离检测方法。图 1 显示了氯化两面针碱标准溶液和两面针提取液的色谱图。由于该样品基质非常复杂，这类分离一般需要 35 分钟以上。氯化两面针碱可以得到基线分离，并具有良好的峰形。色谱柱性能见图 2A。

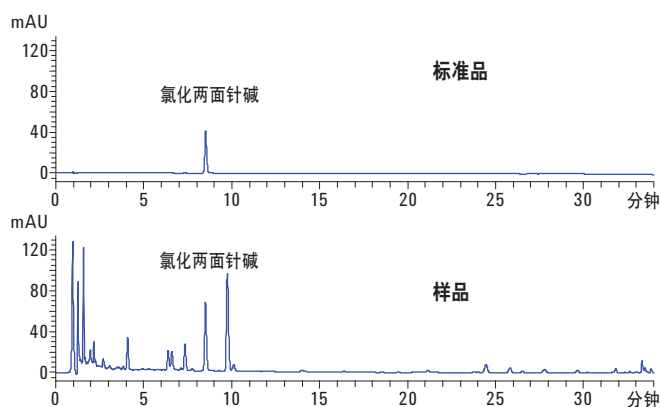


图 1. 在 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱上使用原方法分析两面针

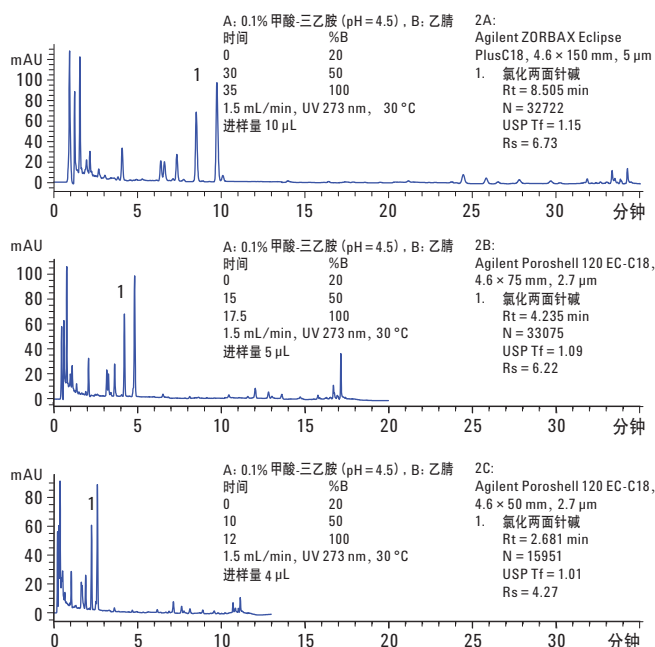


图 2. 使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱, Agilent Poroshell 20 EC-C18, 4.6 × 75 mm, 2.7 μm 柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 柱分析两面针样品的叠加色谱图

我们将原方法从 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱上转移到 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 75 mm, 2.7 μm 柱上, 根据方程 1 为了保持相同线速度, 流速应不变。

方程 1

$$F_1/(r_1)^2 = F_2/(r_2)^2$$

其中

$F_1$  为原色谱柱流速

$F_2$  为新色谱柱流速

$r_1$  为原色谱柱内径

$r_2$  为新色谱柱内径

要保持原分离效果, 梯度时间应与柱长成比例。由于原色谱柱为 4.6 × 150 mm, 在同样线速度下使用 4.6 × 75 mm 柱, 梯度时间应缩短 75/150 或 2 倍, 因此, 为避免样品超载, 进样量减少一半。分析时间也相应缩短了 2 倍, 从 35 分钟减为 17.5 分钟, 如图 2A 和 2B 所示。但与原方法相比, 使用 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 75 mm, 2.7 μm 柱分析时色谱图呈现出了相当或略好的峰形、理论塔板数和分离度。该 Poroshell 柱分析时的背压不到 250 bar, 使得该方法可以在任意 HPLC 或 UHPLC 上使用。

同理, 若使用更短的色谱柱, 分析时间还可以进一步缩短。如图 2C 所示, 当使用 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 柱时, 新方法与原方法相比, 分析时间节省了三分之二, 而且背压仅为 176 bar, 耐压 400 bar HPLC 仪器完全可以承受。氯化两面针碱的理论塔板数值大大超过了 2010 版中国药典的要求 ( $N > 2500$ )。

基于 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 柱的性能, 还可以对本方法进行进一步优化。首先, 流速增加两倍, 循环时间还可以进一步缩短, 因为表面多孔的 Poroshell 2.7 μm 填料的 Van Deemter 曲线与 1.8 μm 填料柱相似。因此, Poroshell 120 柱的柱效在较高流速下不会明显降低。氯化两面针碱是本方法中决定两面针中药材质量的目标化合物。在氯化两面针碱流出检测器后, 可以加大流动相中的乙腈比例, 将两面针中的杂质快速洗出色谱柱。

如图 3 所示, 对流速和梯度斜率进行优化后, 在分离度和分析时间之间达到了最佳平衡, 分析时间缩短到了原方法的十分之一, 虽然分离度和理论塔板数略有损失, 但仍超越了药典中规定的要求。背压不到 370 bar, 这一压力很适合该色谱柱, 该柱可以在高达 600 bar 的压力下使用。虽然本方法可以在传统的耐压 400 bar 的 HPLC 仪上使用, 但最好在最高压力限为 600 bar 的 HPLC 或 UHPLC 仪器上使用。

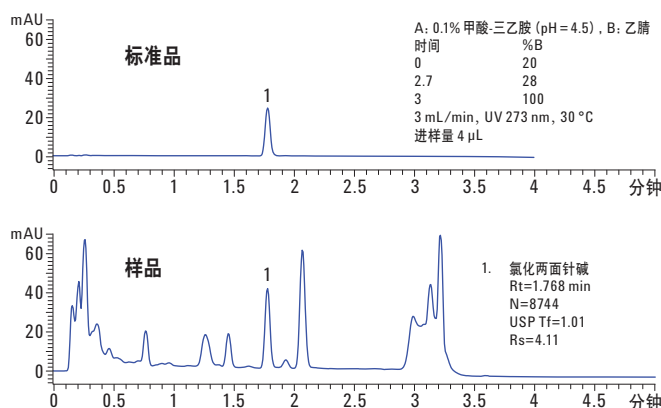


图 3. 在 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 柱上优化的两面针分析方法

## 结论

我们将两面针中氯化两面针碱的分析方法成功地从传统 4.6 × 150 mm, 5 μm 柱转移到 Agilent Poroshell 120 色谱柱上。Poroshell 120 2.7 μm 粒度色谱柱提供了高柱效和高分离度, 并可适合更快速的分析方法。达到了与亚 2 μm 柱相似的性能, 但 Poroshell 120 柱可在更低的压力下操作, 从而可以在耐压 400 bar 的仪器上用 Poroshell 120 柱运行常规分析。使用更高流速将分析时间缩短到了 4 分钟以下。转移后的方法快速、高效, 并且实现了良好分离和峰形, 从而节省了时间和经费。

## 参考文献

1. D.Y. Kong, I.G. Alexander, G.H. Tom and G.W. Peter. *Biochem. Syst. Ecol.*, 24 (1996), pp. 87–89
2. Liu Limin, Liu Huagang. Nitidine chloride of recent research. *Materia Medica*, 2007, 18 (1): 60.
3. RC Yao, J Hu. Review of the study on the constituents and pharmacology of *Zanthoxylum nitidum*. *Journal of Pharmaceutical Practice*. 2004, 22 (5): 264-267.
4. National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia. Chemical Industry Press, Beijing, PR China, 2010:157.

## 更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息, 请访问  
[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn).

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误, 以及由于使用本资料引起的相关损失不承担责任。

本文中的信息、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, 2011

2011 年 10 月 19 日, 中国印刷

5990-9249CHCN



**Agilent Technologies**