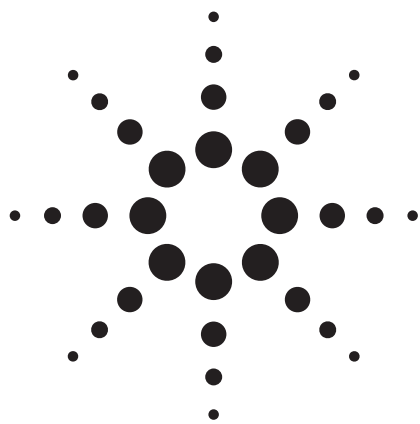




人参皂苷的 UHPLC 新方法的开发

应用

液相色谱；超高效液相色谱；自动方法开发系统及方法筛选；人参皂苷

作者

安蓉 邢占磊 李浪 肖尧*
安捷伦科技（中国）有限公司
液相色谱应用部，北京 100102

摘要

目的：使用带有自动方法开发/色谱柱筛选功能的超高效液相色谱 (UHPLC) 系统对于人参皂苷类成分的适宜分离条件进行快速筛选及探索，并在此基础上优化得到快速高效重现性良好的定性定量分析方法。**方法：**使用自动方法开发系统对分离条件进行筛选和优化后，得到两种基于不同选择性条件的最终方法，方法 1，色谱柱：Agilent Zorbax Bonus RP (3.0 x 50 mm, 1.8 μ m)，柱温 25 °C，流动相为超纯水 (A)-乙腈 (B)，梯度分析，流速 1.0 mL/min，检测波长 203 nm；方法 2，色谱柱：Agilent Zorbax SB-C18 (3.0 x 150 mm, 1.8 μ m)，柱温 50 °C，流动相为超纯水 (A)-乙腈 (B)，梯度分析，流速 0.6 mL/min，检测波长 203 nm。**结果：**使用上述两个方法对标准品和样品进行了分析，所需分析时间均小于 10 分钟，重现性良好，保留时间 RSD < 0.2%，峰面积 RSD < 1.0%，样品中的干扰成分与被测成分均可以得到良好分离。**结论：**两种方法分析快速切分离度良好，能够充分发挥 UHPLC 的分离能力，适合于含有人参皂苷类成分的药材及制剂的分析。Agilent 的方法筛选软件可以快速、无人照管地选择最佳的色谱柱、色谱条件；使方法开发的步骤更趋系统化，更为合理。



Agilent Technologies

前言

人参皂苷 (Ginsenoside) 是一种固醇类化合物，三萜皂苷。主要存在于人参属药材中。人参皂苷被视为是此类药材中的活性成分，具有增加白细胞数量、提高人体免疫力、促进物质代谢、抗疲劳、抗衰老等作用^[1]，使用液相色谱方法分析此类成分是控制人参、三七等药材或含此类活性成分药品的重要手段，但是相关样品中的人参皂苷一般需要很长的分析时间，例如：中国药典的方法需要大概 90 至 120 分钟时间^[2]。UHPLC 技术的出现可以使液相色谱分析时间大为缩短，在不损失分离度的情况下大幅提高分析速度，目前已经广泛应用于中药分析领域。

在分析方法的开发过程中，通过改变色谱柱的种类，柱温等条件可以改变分离选择性，从而对较难分离的化合物进行更好的分析，在人参皂苷的分析中，Re 及 Rg1 是一对比较难分离的成分，通常需要比较长时间(大概 20 分钟^[3])的等度或缓梯度先把这两个化合物分开，但是这会严重影响分析速度，延长分析时间。

在这篇文章中,我们使用了基于 Agilent 公司的 1260 或 1290 超高效液相色谱系统的自动方法开发系统及软件^[3]对色谱柱和其他分析条件进行了自动筛选，并从中选出最适合人参皂苷分析的色谱柱及相应分析条件，并在此基础上进行改进和优化，最终得到了两个基于不同选择性特性的高效快速的分析方法，可分别用于不同的分析目的。通过这个研究，我们找到了人参皂苷在不同色谱柱上的色谱行为差异；同时也为类似的方法开发工作推荐一个有用的工具。

仪器试剂及色谱条件

仪器和试剂

Agilent 1290 Infinity 自动方法开发系统，包括：1290 色谱泵、自动进样器、两个柱温箱（均配置 8 位 9 通阀）组成的柱温箱簇、二极管阵列检测器；ChemStation 色谱工作站及 Agilent ChemStation Method Scouting Wizard 软件。方法开发系统及方法筛选软件是仪器根据不同需求增加不同切换阀、柱温箱构成。

利用方法筛选软件对多根色谱柱（最多 8 根）及多个色谱条件进行排列组合，在无人照管的情况下自动完成分析任务。方法筛选软件能根据谱图中色谱峰数量、分离度及保留时间等方法开发所关注的参数生成报告。

Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统，配备脱气机，四元泵，自动进样器，柱温箱，二极管阵列检测器。

Agilent 1220 Infinity 整体式液相色谱，配备脱气机，二元泵，自动进样器，柱温箱，二极管阵列检测器。

色谱柱: Agilent Zorbax Bonus RP (3.0 x 50 mm, 1.8 μm), Agilent Zorbax SB-C18 (3.0 x 150 mm, 1.8 μm)。

以上设备，耗材及软件均由 Agilent Technologies, Inc.（美国）生产制造。

实验所用的对照品均购买自中国食品药品检定研究院；乙腈为 HPLC 级试剂 (Sigma-Aldrich)，实验用水由 Milli-Q 纯水机 (Merck-Millipore, 德国) 制备；所有样品购自本地药店。

实验条件

方法 1: 色谱柱 Agilent Zorbax Bonus RP (3.0 x 50 mm, 1.8 μm)，柱温 25 °C，流动相：超纯水 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱条件见表 1，流速：1.0 mL/min，进样量：3 μL，检测波长 203 nm。

表 1. 方法 1 梯度洗脱时间表

时间	0	1.5	4	4.1	4.5	4.6	6
B%	22	23	41	100	100	22	22

方法 2: 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C18 (3.0 x 150 mm, 1.8 μm)，柱温：50 °C，流动相：超纯水 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱条件见表 2，流速：0.5 mL/min，进样量：3 μL，检测波长 203 nm，检测波长 203 nm。

表 2. 方法 1 梯度洗脱时间表

时间	0	7	7.1	8	8.1	12
B%	28	50	100	100	28	28

结果及讨论

方法 1 的分析结果

根据上述条件(方法 1)对含有三七成分的中药成分进行了分离,五种主要人参皂苷类成分分离良好,并且不受其他干扰组分的影响,具体分析结果见图 1:

重现性:对上述样品进行了重现性考察,重现性良好,保留时间 RSD 均小于 0.2%,峰面积 RSD 均小于 1.0%,结果见图 2。

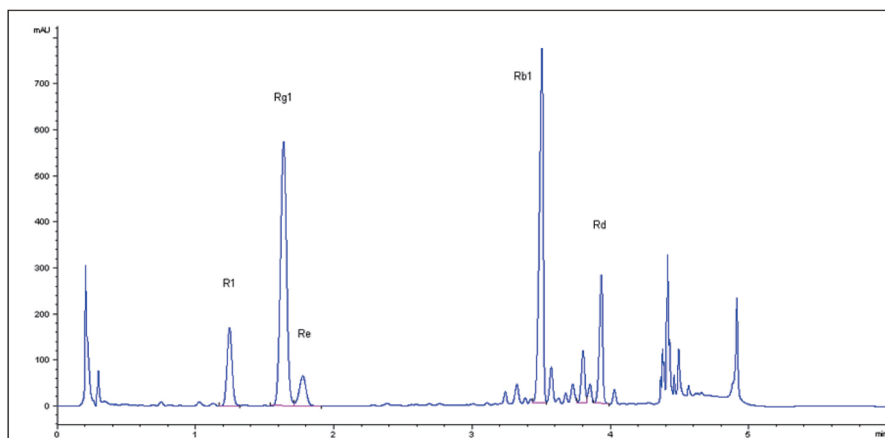


图 1. 用方法 1 对含有三七的成方制剂中人参皂苷的分析

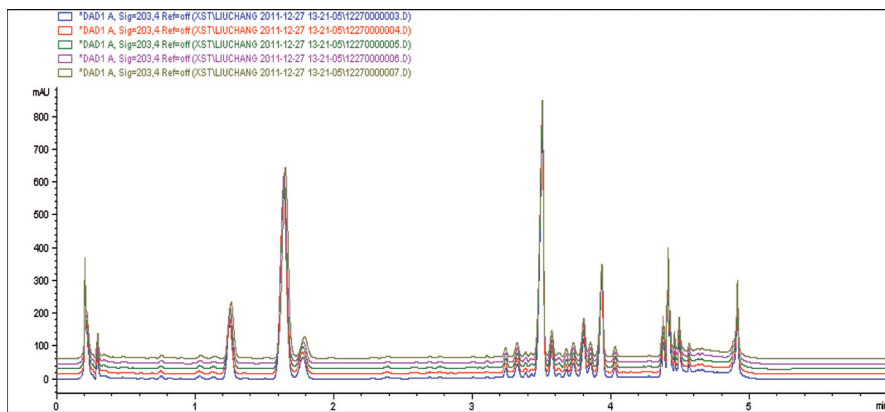


图 2. 重现性; 含有三七的成方制剂中人参皂苷的分析

专属性：进行专属性考察，对空白、标样及样品分别进行了分析，从结果可以看出（图 5），溶剂中的杂质对实际样品的分析没有干扰。

样品分析和方法的调整：在分析样品时，发现不同样品中所含有的干扰成分会有所差别，从而对被测成分分析产生影响，因此需要根据实际情况对梯度进行细微的调整以保证分离效果，图 4 至 6 为分析不同样品的结果。

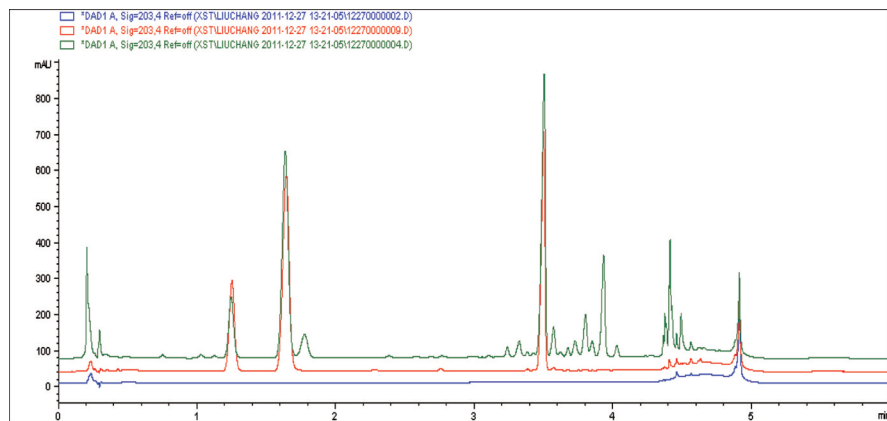


图 3. 样品、对照品及空白谱图的重叠

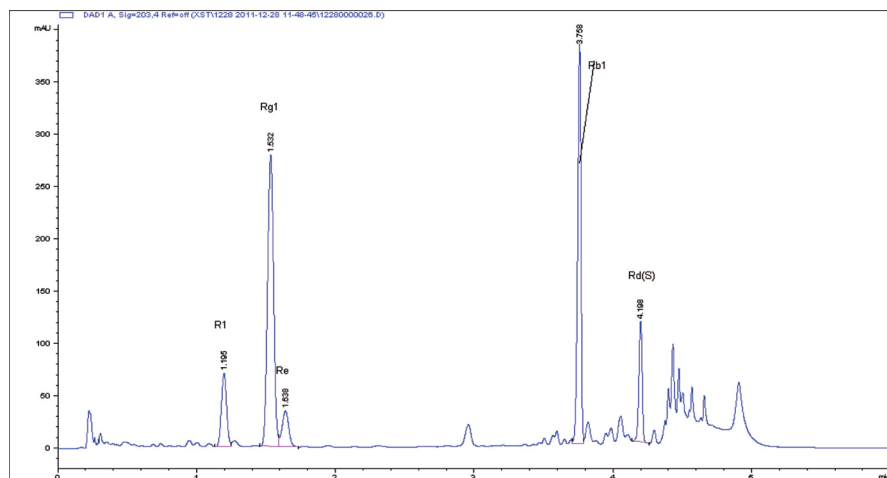


图 4. 样品：三七总皂苷

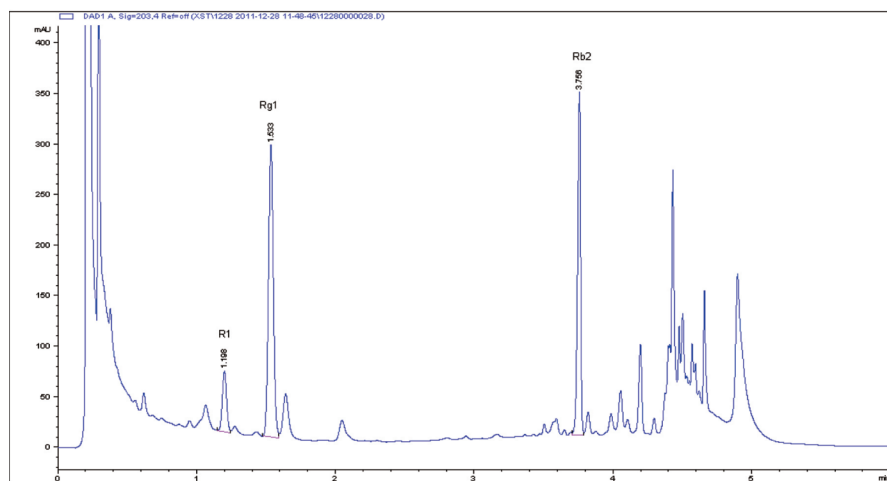


图 5. 含有三七的成方制剂 A

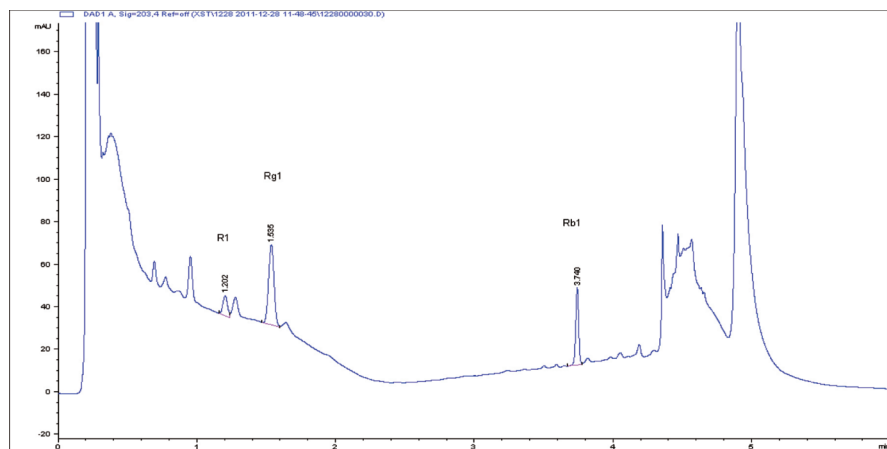


图 6. 含有三七的成方制剂 B

方法 2 的分析结果

图 7 是使用方法 2 对含有三七的中药制剂进行分析得到的结果，各个被测组分均可以与干扰物质得到良好分离，与方法 1 相比较，分析时间变为 12 分钟，且 Rg1 与 Re 的出峰顺序发生颠倒，但是由于使用线性梯度，使得 Rg1 与 Re 峰型更加尖锐，并且使各个被测组分峰位置分布比较平均，为应对不同样品中的干扰成分时进行的梯度微调留下了更多余地。

方法筛选和优化的思路

根据本实验室原来从药典方法转换的 UHPLC 方法的色谱条件，稍加修改后，选择三种不同的梯度程序，四根不同品牌（分别是：Bonus RP, Zorbax SB-C18, Eclipse Plus C18 及 Extend C18）同样规格的色谱柱，25 °C 及 30 °C 两个不同色谱柱温度排列组合。

图 8 即其中一个结果：在 25 °C 条件下其中一个梯度程序下的四种不同色谱柱的比较结果。

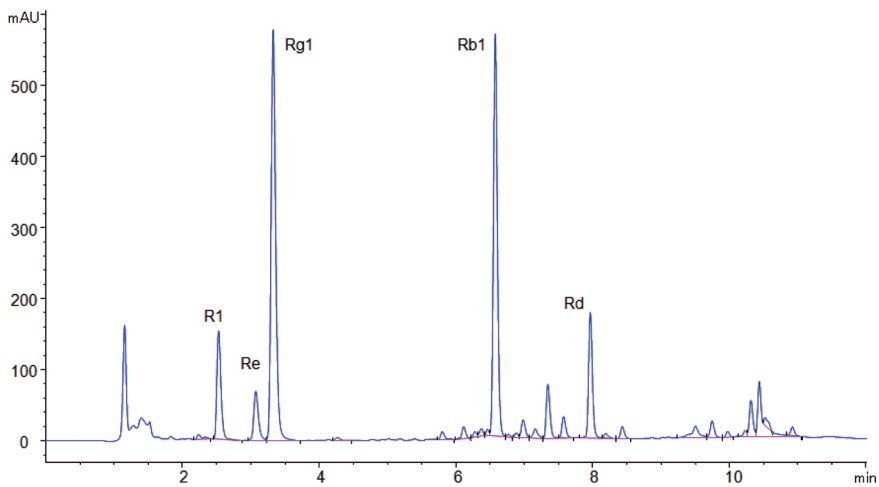


图 7. 用方法 2 对含有三七的成方制剂中人参皂苷的分析

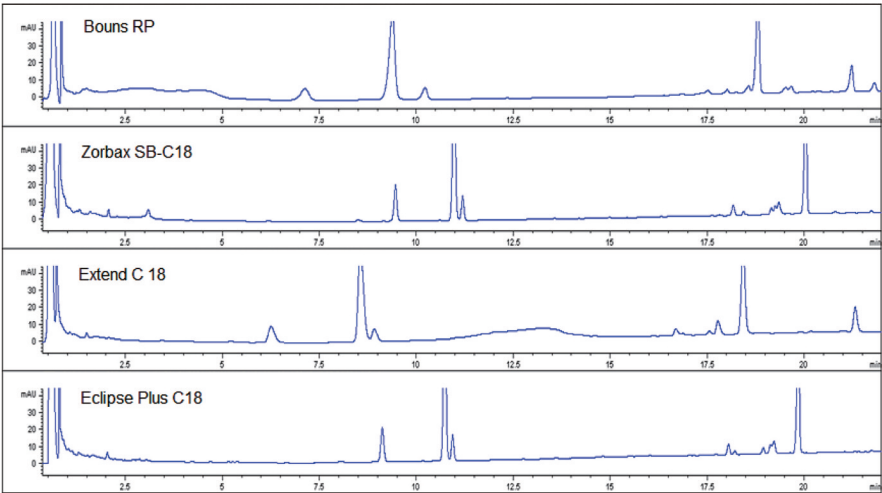


图 8. 不同色谱柱对人参皂苷 Re 及 Rg1 的选择性

从对以上四根色谱柱的筛选结果可以看出, Bonus RP 色谱柱对于极性较大的几个人参皂苷成分, 尤其是 Re 和 Rg1 两个较难分离的化合物有最好的分离选择性, 由于分离效果良好, 可以在此色谱柱的基础上进行进一步优化, 提高起始有机相比比例, 从而进一步提升分析速度。

同时, 在对这个分析法进行优化时发现, 温度对人参皂苷 Re 及 Rg1 分离的影响很大, 从方法筛选的结果中可以观察到, 温度提高会使这两个峰的分离度下降。所以在方法 1 中选择了 25 °C 作为最终条件。同时; 乙腈比例的提高也引起这两个峰的分离度下降, 所以在方法筛选中起始条件的乙腈含量不能超过 22%。因此, 如果想加快分析速度, 只能使用更陡的梯度曲线洗脱保留较强的其他人参皂苷, 导致方法后半段的峰容量降低, 增加保留人参皂苷成分之间以及与干扰组分分离的难度。

为了使梯度变化更加缓和, 提高方法后半段峰容量, 根据方法筛选的结果, 选择了一根对 Re 及 Rg1 保留最强的 Agilent Zorbax SB C18 色谱柱, 尝试将温度提高、同时提高条件起始时的乙腈比例, Re 及 Rg1 两个物质的出峰顺序颠倒, 并且可以达到良好的分离。

结论

使用方法开发系统及自动方法筛选软件, 可以系统地开发新方法。通过对方法筛选结果的分析, 找到了更适用于人参皂苷分析的色谱柱: Bonus RP。使用 1.8 μ m 颗粒、50 mm 长的 Bonus RP 超高效液相色谱柱开发了分析时间仅需 6 分钟的超高效液相色谱方法。该方法重现性良好, 通过对各种有代表性样品的分析, 证明这个方法对各种样品都具有很好的分离度, 杂质干扰也很小。

同样根据方法筛选的结果, 开发了另一种分析人参皂苷的方法。这第二种方法使用极其经典、耐用的 Agilent Zorbax SB-C18 柱, 在较高色谱柱温度、更高的起始有机溶剂比例的条件下, 用线性梯度在 10 分钟内也完成了人参皂苷的分析。因使用线性梯度、1.8 μ m 颗粒、150 mm 长的超高效色谱柱, 提供更高的分离能力。

参考文献

- 1 窦德强, 靳玲等, 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望, 沈阳药科大学学报, 1999, 02
- 2 中国药典 2010 版 (一部), 2010.8
- 3 马双成等, 常用中药标准物质分析谱图; 人民卫生出版社, 2010.5
- 4 Agilent 1200 Infinity Series Multi-method Solutions, 5990-6226EN, Sept. 2010.

更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务, 请访问我们的网站: www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014 年 3 月 3 日，中国印刷
5991-4164CHCN



Agilent Technologies