使用亚 2 µm 表面多孔液相色谱柱对丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 提取物进行指纹图谱分析

应用简报

制药

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

使用亚 2 µm 表面多孔液相色谱柱对丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 中的疏水和亲水组分提取物进行 UHPLC 分析。此方法使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱进行分析，这是从《中国药典》(CHP) 中对于丹参总酚酸和丹参酮指纹图谱分析的方法转换而来。InfinityLab Poroshell 120, 1.9 µm 色谱柱在更短的分析时间内提供了极高的峰容量，且适合复杂样品的分析。

前言

丹参（植物*丹参*的干燥根茎）是一种用于促进血液循环和治疗血管疾病的中药 [1]。由于中药基质中存在多种化合物，仅凭任何一种单一活性成分很难有效地评估中药的质量和真实性。为了全面评价中药的质量，当前的研究趋势是找到独特的色谱图作为相应材料的指纹图谱。HPLC 或 UHPLC 指纹图谱是中药质量控制的最常用技术；使用这种方法，发现的峰越多，获得的样品信息也就越多。因此，峰容量和分离度是使用指纹图谱控制中药质量的重要因素。

Agilent Technologies

在 2015 版《中国药典》里，丹参是其中一种使用 HPLC 指纹图谱进行质量控制的药品。从丹参中可分离出许多具有活性药物作用的组分，其中最重要的是丹参总酚酸和丹参酮。总酚酸和丹参酮的提取物都可通过 HPLC 指纹图谱分析鉴定 [2]。

在此应用简报中，我们将《中国药典》里用于提取总酚酸和丹参酮的方法转移到新开发的 1.9 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 液相色谱柱中。

材料与方法

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈和磷酸购自北京百灵威科技有限公司。丹参总酚酸与丹参酮的提取物和参比标样由一家中国本土的制药公司提供。将丹参总酚酸提取物溶于水得到浓度为 1 mg/mL 的水溶液，并将丹参酮提取物溶于甲醇得到浓度为 1 mg/mL 的甲醇溶液。

采用 Agilent Infinity 1290 液相色谱系统进行 UHPLC 分析，包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)

色谱柱

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，
  2.1 mm × 100 mm，1.9 µm（部件号：695675-902）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，
  2.1 mm × 150 mm, 1.9 µm（部件号：693675-902）

丹参酮的 UHPLC 条件

参数	值		
流动相	A) 水（0.026% 磷酸） B) 乙腈		
2.1 × 100 mm 色谱柱梯度	时间 (min) 0 4 10	%A 80 40 20	%B 20 60 80
停止时间	13 分钟		
后运行	2 分钟		
2.1 × 150 mm 色谱柱梯度	时间 (min) 0 6 15	%A 80 40 20	%B 20 60 80
停止时间	20 分钟		
后运行	3 分钟		
温度	25 °C		
流速	0.33 mL/min		
进样量	1 µL（100 mm 色谱柱） 1.5 µL（150 mm 色谱柱）		
检测条件	UV 270 nm		

丹参总酚酸的 UHPLC 条件

参数	值		
流动相	A) 水（0.05% 磷酸） B) 乙腈		
2.1 × 100 mm 色谱柱梯度	时间 (min) 0 3 7 9 11 14	%A 90 80 75 70 10 10	%B 10 20 25 30 90 90
停止时间	14 分钟		
后运行	2 分钟		
2.1 × 150 mm 色谱柱梯度	时间 (min) 0 4.5 10.5 13.5 16.5 21	%A 90 80 75 70 10 10	%B 10 20 25 30 90 90
停止时间	21 分钟		
后运行	3 分钟		
温度	30 °C		
流速	0.42 mL/min		
进样量	1 µL（100 mm 色谱柱） 1.5 µL（150 mm 色谱柱）		
检测条件	UV 286 nm		

结果与讨论

《中国药典》中规定总酚酸和丹参酮的两种分析方法都需要使用传统的 4.6 × 250 mm，5 µm 色谱柱。想要从中药样品中获得更多信息，建议在中药指纹图谱分析中使用具有高峰容量的色谱柱，比如小颗粒亚 2 µm 表面多孔色谱柱。峰容量是一个性能衡量参数，用于描述在梯度运行之后得到的具有一定分离度的、可以分离的色谱峰数目。较高的峰容量值十分重要，因为对于分离具有未知数量和多种分析物的复杂样品，高通量梯度的需求不断增加。

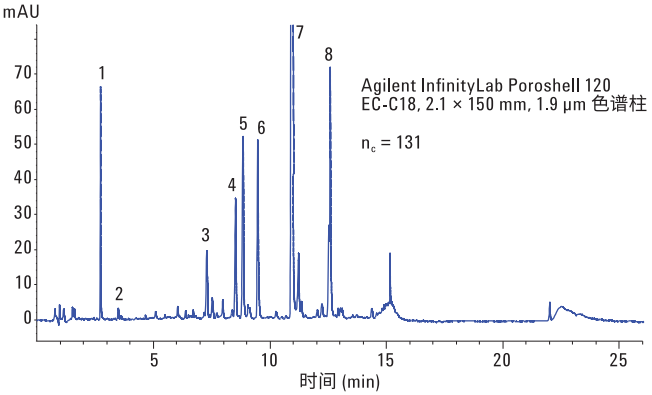

图 1. 丹参总酚酸在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150 mm，1.9 µm 色谱柱上的指纹图谱分析。使用参比标样鉴定色谱峰 5（迷迭香酸）和色谱峰 7（紫草酸 B）

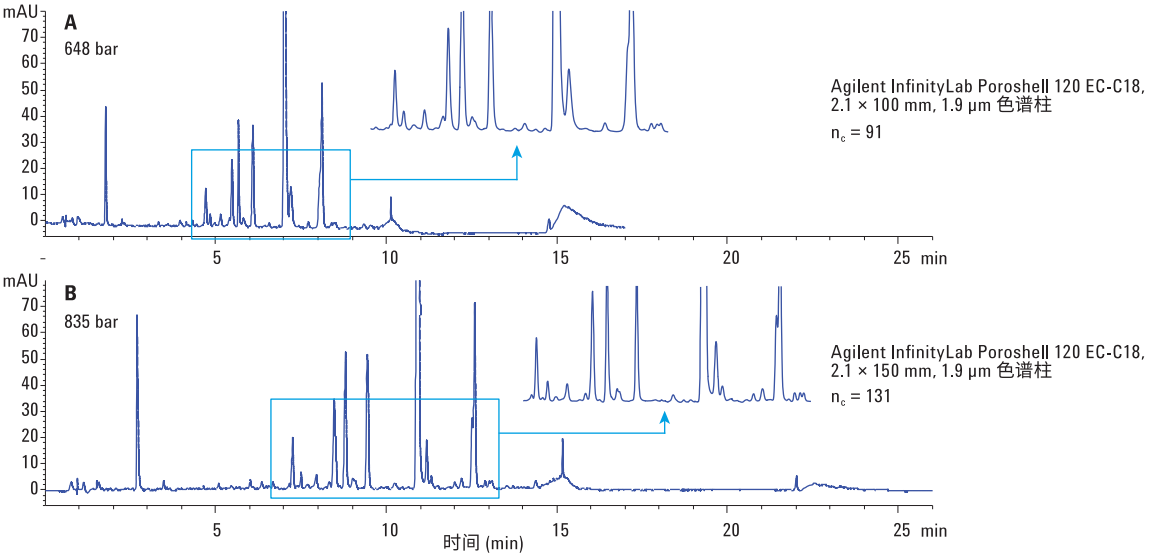

图 2. 比较丹参总酚酸在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，2.1 × 150 mm，1.9 µm 色谱柱和 2.1 × 100 mm 色谱柱上的指纹图谱

在此应用简报中，将原始的《中国药典》方法转换到 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 1.9 µm，150 mm 和 100 mm 的色谱柱中。线性流速加倍以达到亚 2 µm 的最大效率，并根据色谱柱长度和流速调节梯度时间。图 1、2、3 和 4 显示了得到的色谱图。图 1 和图 3 中根据《中国药典》中的标准色谱图所标记的化合物 [2] 是能够在所有合格样品中找到的色谱峰。

亚 2 µm 表面多孔颗粒填料色谱柱在 UHPLC 压力下提供了卓越性能和快速分析。比较 2.1 × 100 mm 和 2.1 × 150 mm 色谱柱，较长的色谱柱可提供更高的峰容量和更高的分离度，从而提供更多样品信息。

使用以下方程计算条件峰容量：

$$n_c = (t_{R,n} - t_{R,1})/w$$

其中 n 是用于计算的色谱峰数目，t_R 是梯度时间，w 是 4σ 峰高处所测量的平均峰宽：

$$w = (W½/2.35) \times 4$$

其中 W½ = 半峰高处的峰宽

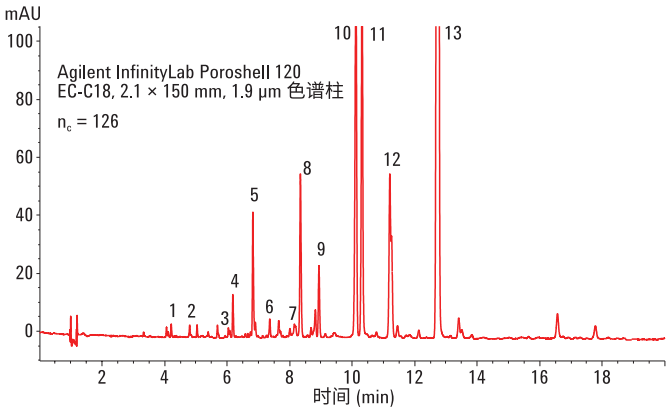

图 3. 丹参酮在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，2.1 × 150 mm，1.9 µm 色谱柱上的指纹图谱。使用参比标样鉴定色谱峰 10（隐丹参酮）和色谱峰 13（丹参酮 IIA）

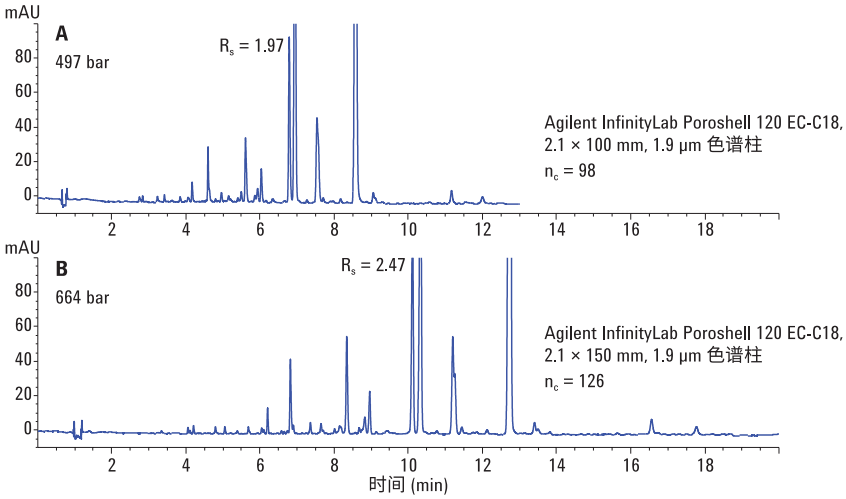

图 4. 比较丹参酮在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18，2.1 × 150 mm，1.9 µm 色谱柱和 2.1 × 100 mm 色谱柱上的指纹图谱

结论

亚 2 µm 表面多孔颗粒填料色谱柱在 UHPLC 压力下表现出卓越性能和快速分析。它们适用于中药的复杂样品分析中的指纹图谱分析。与短色谱柱相比，长的色谱柱可以提供更大的峰容量，从而提供更多样品信息。

参考文献

1. Tsai-Hui Lin, Ching-Liang Hsieh, Lin Hsieh. *Chinese Medicine* **5:22** (2010)

2 “丹参总酚酸和丹参酮”*《中国药典》* **397**，(2015)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

www.agilent.com

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016 年 10 月 31 日，中国出版
5991-7559CHCN

Agilent Technologies