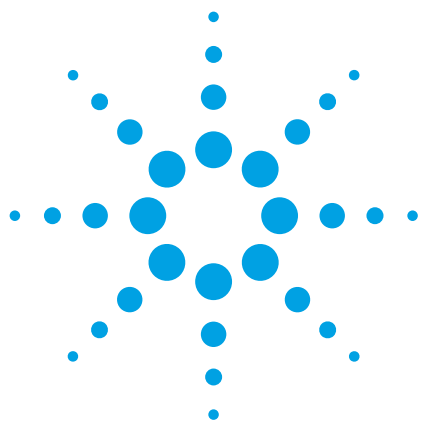




利用超高效二维液相色谱系统同时完成颠茄（流）浸膏特征图谱及硫酸阿托品含量的测定

应用简报

制药

作者

杨新磊，陈波

安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文利用超高效二维液相色谱系统在完成颠茄（流）浸膏特征图谱分析的同时，将硫酸阿托品峰分多次切割收集在 40 μL 的样品环阵列中，然后再将每个环中的收集馏分连续转移进入第二维完成再次分离，并对硫酸阿托品进行定量分析。本文所述方法检测限为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 5.1 $\mu\text{g/mL}$ ；在 0.025-0.5 mg/mL 的浓度范围内，硫酸阿托品的线性相关性良好；分别进样 6 次 0.25 mg/mL 硫酸阿托品对照品溶液和样品溶液，其峰面积相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.5% 和 0.7%；硫酸阿托品的样品加标回收率为 98.05%。相比于 2015 年版《中国药典》测定颠茄（流）浸膏中硫酸阿托品的复杂样品前处理过程，本方法实现了高效、简便、低有机溶剂消耗和自动化等特点。

前言

中药质量标准化是我国中医药行业亟需解决的问题。为保证中药的安全性和有效性，历版《中国药典》不断引入新的分析技术和方法来改善和提高中药分析质量标准。2015 年版《中国药典》中颠茄（流）浸膏的质量标准包含了鉴别、乙醇量检查、特征图谱和含量测定，其中硫酸阿托品含量测定时样品前处理较为繁琐、费时且结果误差较大^[1]。

二维液相色谱具有高分离效果和超高峰容量等特点，近年来广泛应用于复杂中药材和中药复方中微量成分的发现、鉴定以及活性成分的筛查等^[2-5]。本文利用超高效二维液相色谱系统的高效二次分离性能，同时进行特征图谱分析和样品前处理过程，把特征图谱和含量测定集成一个高频采样超高效二维液相色谱方法，极大简化了样品前处理过程的同时，保证了分析结果的重现性和准确性。



Agilent Technologies

实验部分

试剂和样品

乙腈、甲醇和磷酸为色谱纯级，购自 Sigma-Aldrich；水为 Mill-Q 纯水机新制超纯水；东莨菪内酯、硫酸阿托品对照品购自诗丹德生物制品有限公司；颠茄（流）浸膏为企业友情提供。

仪器和设备

本文采用 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统，其含有：

- 1290 Infinity II 高速泵（部件号 G7120A，内置双通道脱气机）
- 1290 Infinity II 自动进样器（部件号 G7167B）
- 1290 Infinity II 柱温箱（部件号 G7116B）
- 1290 Infinity II 二极管阵列检测器（部件号 G7117B）
- 1290 Infinity II 二元泵（部件号 G7120A，内置双通道脱气机），用于第二维分析
- 1290 Infinity II 二极管阵列检测器（部件号 G7117B），配 60 mm 高灵敏度流通池（部件号 G4212-60007），用于第二维分析
- 外置阀驱动（部件号 G1170A），3 个
- 多中心切割二维液相色谱升级包（部件号 G4242A）
- OpenLab CDS ChemStation 软件（修订版 C01.07[27]），用于系统控制及数据处理
- 二维液相色谱采集软件（部件号 G2198AA），用于高频采样、二维方法编辑及数据分析

系统配置及工作原理

系统配置及连接如图 1 所示。样品先经第一维色谱柱分离后，目标化合物通过检测器后的双 2 位 4 通阀连续不间断切换进入 6 位 14 通阀所连接的不同样品环，收集完成后进入第二维色谱再次分析。当样品环中收集的组分完成第二维分析后，该样品环即处于空闲状态，可被切入第一维收集其他目标化合物。

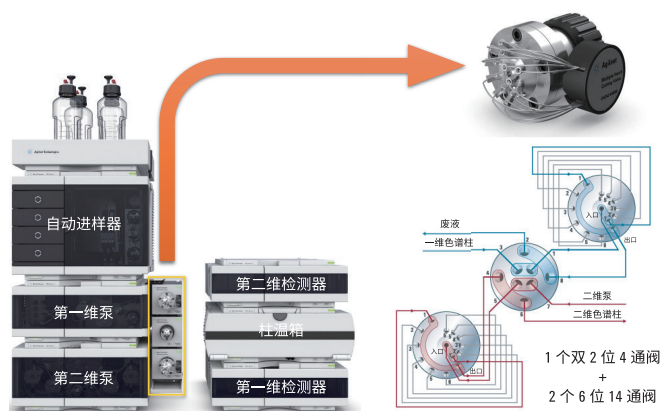


图 1. 超高效二维液相色谱系统的配置及连接示意图

对照品溶液和样品溶液的配制

东莨菪内酯对照品溶液：精密称取东莨菪内酯对照品 1.0 mg 于 100 mL 容量瓶中，用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度，摇匀，即得 10 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

硫酸阿托品对照品储备液：精密称取 120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的硫酸阿托品对照品 100.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度，摇匀，即得 10 mg/mL 硫酸阿托品对照品储备液。

标准工作溶液系列：取上述 10 mg/mL 硫酸阿托品对照品储备液，用 50% 甲醇水溶液逐级稀释至 1.0、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025 mg/mL，待用。

样品溶液：精密称取 1 mL 待测样品置于 25 mL 容量瓶中，用 50% 甲醇水溶液溶解并定容，摇匀后，取 2 mL 溶液于高速离心机，以 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm PTFE 滤膜后，待测。

加标样品溶液：精密称取 1 mL 样品置于 25 mL 容量瓶中，加入 0.25 mL 10 mg/mL 硫酸阿托品对照品储备液，用 50% 甲醇水溶液溶解并定容，摇匀后，取 2 mL 溶液于高速离心机，以 10000 rpm 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm PTFE 滤膜后，待测。

超高效二维液相色谱方法

超高效二维液相色谱方法包括三部分，第一部分为第一维 UHPLC 方法，第二部分为阀切换次数和时间，第三部分为第二维 UHPLC 方法。其中，第一部分由 OpenLab CDS

ChemStation 设定，包括泵、自动进样器、柱温箱和检测器参数；第二和第三部分由内置于 OpenLab CDS ChemStation 的二维液相色谱方法编辑软件完成。整个分析时间为 27 min。

第一维 UHPLC 方法

色谱柱：Agilent Zorbax RRHD Plus C18，2.1 × 50 mm，1.8 μm，部件号 959757-902

流动相：A) 0.05% 磷酸水溶液
B) 甲醇

梯度洗脱：时间 (min) B (%)

0	3
1	15
12	60
12.1	90
14	90
14.1	3
16	3

进样量：1 μL

柱温：30 °C

流速：0.4 mL/min

检测波长：344 nm（特征图谱）和 210 nm（硫酸阿托品）

阀切换方法

阀切换时间为硫酸阿托品起始出峰时间至结束（共 7 个片段）。

第二维 UHPLC 方法

色谱柱：Agilent PLRP-S，100Å，4.6 × 50 mm, 3 μm，部件号 PL1512-1300

流动相：A) 0.05% 磷酸水溶液
B) 乙腈

流速：2.5 mL/min

分析时间：第二维每一个片段的分析时间为 3 min，包括 2 min 梯度时间和 1 min 平衡时间

梯度洗脱：时间 (min) B (%)

0	10
2	20

柱温：60 °C

检测器波长：210 nm

结果与讨论

HPLC 转换为 UHPLC

2015 年版《中国药典》中颠茄（流）浸膏特征图谱方法为 HPLC 方法，参考该方法一次运行时间约为 70 min。按照相同填料和两倍线流速原则，可将 70 min 方法转换为 14 min 的 UHPLC 方法，大幅提高样品分析通量，如图 2 所示。综观 HPLC 和 UHPLC 色谱图，两种方法的分离图谱相似。转换后的 UHPLC 方法可完全满足药典关于特征图谱系统的适用性规定，详见表 1。

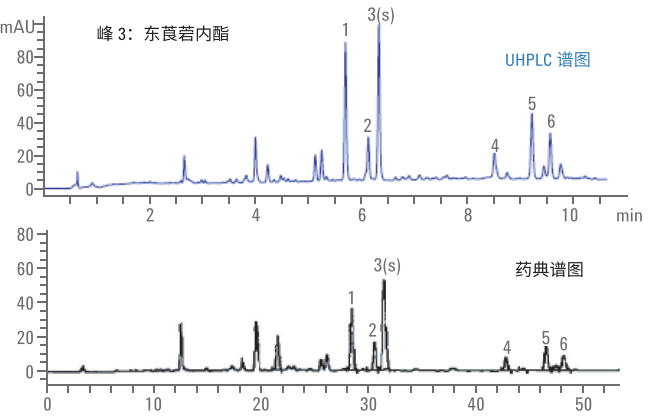


图 2. 颠茄（流）浸膏的 HPLC 和 UHPLC 色谱图比较

表 1. UHPLC 方法系统适用性数据

	药典规定相对保留时间 (允许误差)	UHPLC 方法相对保留时间	药典规定相对峰面积	UHPLC 相对峰面积	是否满足要求
峰 1	0.897 (±5%)	0.900	≥ 0.3	0.85	√√
峰 2	0.965 (±5%)	0.969	-		√
峰 3 (s)	1	1	参考峰		
峰 4	1.354 (±5%)	1.345	-		√
峰 5	1.473 (±5%)	1.457	≥ 0.1	0.49	√√
峰 6	1.528 (±5%)	1.511	-		√

样品前处理的简化

2015 年版《中国药典》中所述颠茄（流）浸膏中硫酸阿托品含量测定时的样品前处理较为繁琐，需要用乙酸乙酯萃取 5 次，再将提取液合并、挥干、浓缩后待测。颠茄（流）浸膏特征图谱分析时的样品前处理则相对简单，只需用 50% 甲醇水溶液溶解稀释即可。从颠茄（流）浸膏 210 nm 下的 UHPLC 特征谱图（图 3 下图）可以看出，硫酸阿托品峰受基质干扰严重，所以药典方法采用液液萃取来净化样品。

为了进一步简化样品前处理过程，本文利用二维液相色谱二次分离的特性，将颠茄（流）浸膏特征图谱作为第一维 UHPLC 分离，同时进行样品净化，之后再 将硫酸阿托品引入第二维色谱进行分析。从图 3 可以看出，经过二次分离后净化效果非常明显，而且由于选择性上的差异，第一维色谱中与硫酸阿托品共流出的杂质在第二维色谱中也得到有效分离。

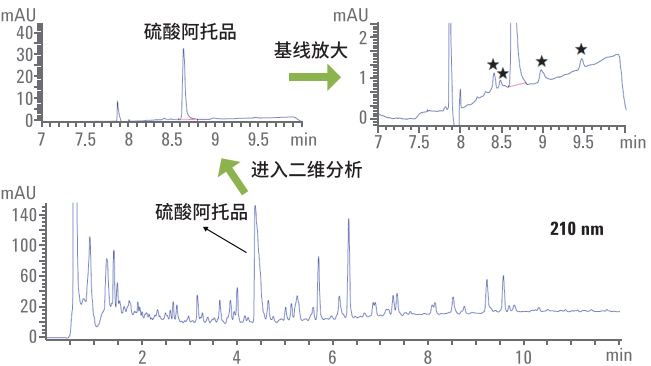


图 3. 颠茄（流）浸膏 210 nm 下的 UHPLC 图谱及二维分离谱图（★：杂质）

高频采样方式的选择

二维液相色谱（中心切割、多中心切割和全二维色谱）的出色分离和高峰容量特性已经被多次用于复杂样品的特定和全组分分离与鉴定。然而，二维色谱定量一直面临着重复性差、灵敏度下降严重等问题。以图 4 中硫酸阿托品峰为例，准确定量必须将硫酸阿托品全部转移至第二维检测，然而传统的大体积定量环收集会造成第二维色谱柱严重过载，导致峰变形、展宽，从而影响灵敏度，甚至无法分离杂质。如果采用捕集柱进行捕集，则需要通过重新实验考察捕集柱对硫酸阿托品的捕获能力，能力太低易造成回收率的损失，太高则不利洗脱。

安捷伦二维液相色谱软件的高频采样功能利用多组小体积样品环不间断收集第一维目标峰，再依次自动切换至第二维分离，最后通过软件将不同样品环中的目标峰面积结合起来进行计算，从而完成样品中目标化合物的定量，如图 4 所示。该采样方式有效地避免了大体积样品环和捕获柱带来的问题，很好地解决了二维色谱定量问题。

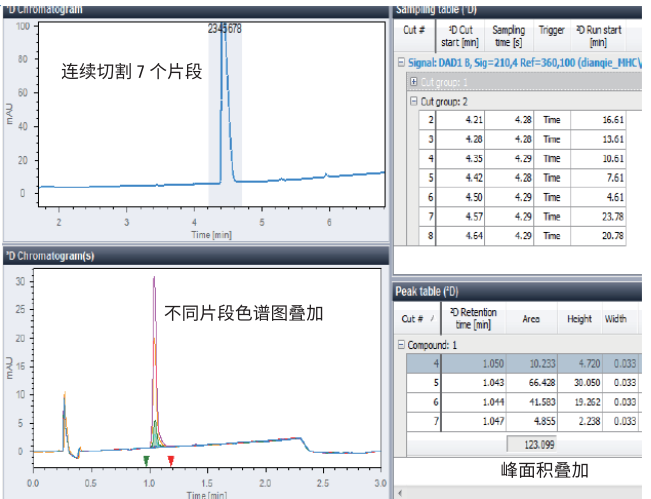


图 4. 二维液相色谱数据处理界面

线性范围、重复性、灵敏度和加标回收率

将硫酸阿托品对照品溶液按浓度由低到高进样，每个浓度平行进样 3 次，取每个浓度点峰面积平均值进行计算，在 0.025-0.5 mg/mL 的浓度范围内，硫酸阿托品的线性相关性良好，相关系数 r 为 0.9999，如图 5 所示。

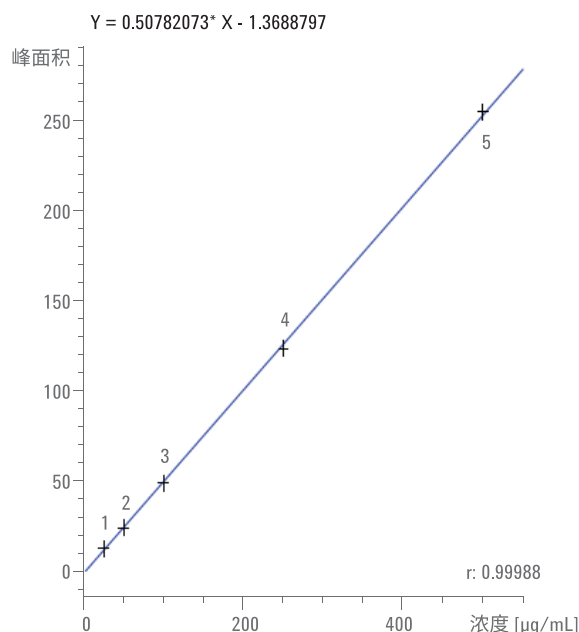


图 5. 硫酸阿托品的标准曲线

分别进样 6 次 0.25 mg/mL 硫酸阿托品对照品溶液和样品溶液考察其峰面积重复性，得出相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.5% 和 0.7%。按 $S/N = 3$ 计算出检测限 (LOD) 为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ ，按 $S/N = 10$ 计算出定量限 (LOQ) 为 5.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

平行配制 3 份样品溶液和 3 份加标样品溶液，进样分析后得到加标溶液浓度平均值和样品溶液浓度平均值，并计算出加标回收率为 98.05%。

结论

本文利用二维液相色谱的二次分离特点，在第一维颠茄（流）浸膏特征图谱分析的同时进行样品净化，建立了一种集特征图谱分析和含量测定于一体的超高效二维液相色谱方法。另外，利用安捷伦二维液相色谱方法编辑软件的高频采样功能，分多次将第一维硫酸阿托品峰切入第二维进行分析，很好地克服了传统二维液相色谱操作复杂、定量结果稳定性不高等弊病。方法学结果表明高频采样超高效二维液相色谱具有很好的应用前景，不仅可用于颠茄（流）浸膏等中药品种的特征图谱和含量的同时分析，还有望代替中药分析液液萃取、固相萃取等复杂繁琐的样品前处理步骤，实现快速在线多组分准确定量。

参考文献

1. 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典：2015 年版. 北京：中国医药科技出版社. 2015
2. Xue Qiao, Wei Song, Shuai Ji, et al. Separation and detection of minor constituents in herbal medicines using a combination of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1362 (2014): 157–167
3. Liang Qu, Yao Xiao, Zhixin Jia, et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry for chemical constituents analysis of tripterygium glycosides tablets. *Journal of Chromatography A*, 1400 (2015): 65–73
4. Xue Qiao, Qi Wang, Wei Song, et al. A chemical profiling solution for Chinese medicine formulas using comprehensive and loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1438 (2016): 198–204
5. Ru-Zhou Guo, Xin-Guang Liu, Wen Gao, et al. A strategy for screening antioxidants in Ginkgo biloba extract by comprehensive two-dimensional ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1422 (2015): 147–154

如需了解详细信息

了解更多：

www.agilent.com

安捷伦科技公司生命科学与化学分析部

用户服务中心免费专线：

800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

传真：800-820-1182

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅用于研究。本出版物的信息、技术指标和说明若有变更，恕不另行通知。

安捷伦科技对于本材料可能的错误或使用本材料所造成的事故或相关损害不负任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 8 月 14 日，中国出版

5991-8340CHCN



Agilent Technologies