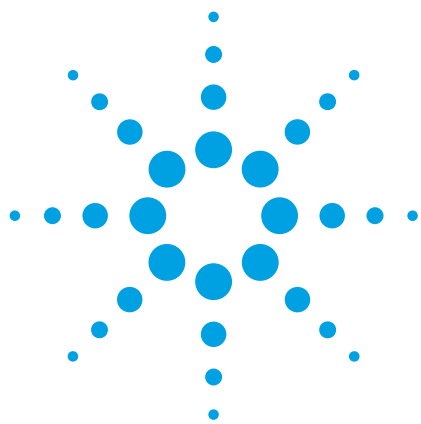




采用多中心切割超高效二维液相色谱法准确测定连翘中的连翘酯苷 A 和连翘苷

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

本文参照 2015 年版《中国药典》，采用多中心切割超高效二维液相色谱法分析连翘提取物中的连翘苷和连翘酯苷 A。在二次分离过程中，目标化合物和干扰物质进一步有效分离，使得测定结果更加准确。由实验结果得到，连翘酯苷 A 在 0.05-0.4 mg/mL 浓度范围内线性相关系数 $R^2 = 0.9958$ ，连翘苷在 0.01-0.2 mg/mL 浓度范围内线性相关系数 $R^2 = 0.9999$ ；0.1 mg/mL 混合对照品溶液连续进样 6 次考察峰面积重现性，连翘酯苷 A 的 RSD 为 4.2%，连翘苷 RSD 为 0.3%。

前言

中药材、中药提取物和中成药的质量优劣多根据现行《中国药典》中相关品种的分析方法来判断。高效液相色谱法是中药中有效物质或有毒有害成分最常用的检测方法。随着《中国药典》的不断更新，其中的高效液相色谱方法的数量也在不断增加。然而，由于中药成分的复杂性，很多药典方法存在峰型差、分离度不好等问题，不利于准确的定量分析。

连翘，又名旱莲子、大翘子，为木犀科植物连翘的干燥果实。2015 年版《中国药典》^[1] 分别收载了连翘药材和提取物两个品种，药材采用两个等度方法分别测定连翘苷和连翘酯苷 A，提取物采用特征图谱方法同时测定连翘苷和连翘酯苷 A。本文参照 2015 年版《中国药典》，采用多中心切割超高效二维液相色谱^[2-7]方法对连翘提取物中连翘苷和连翘酯苷 A 进行分析，此方法最大程度降低目标化合物受其它成分的干扰，使其定量结果更加准确。



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；连翘酯苷 A 和连翘苷对照品、连翘提取物为企业友情提供。

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 二元泵（部件号 G7120A，内置四通道脱气机）
- 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，内置四通道脱气机），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），用于第二维检测
- 外置阀驱动（部件号 G1170A），3 个
- 多中心切割二维液相升级包（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）：用于多中心切割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 通阀的切换进入 6 位 14 通阀所连接的样品环，可以根据第一维峰宽对目标峰进行连续多次收集。第一个样品环收集完成后，即刻自动触发第二维的分析。同时，样品环还可继续收集第一维其它组分。

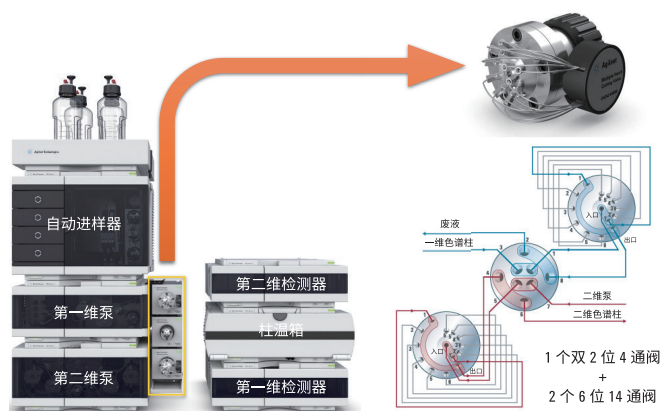


图 1. 多中心切割超高效二维液相色谱系统的配置及连接示意图

对照品溶液和供试品溶液的配制

对照品溶液：精密称取连翘苷和连翘酯苷 A 对照品各 40.0 mg 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得 0.4 mg/mL 混合对照品溶液。将该溶液用甲醇逐级稀释成 0.2、0.1、0.05、0.01 mg/mL 溶液，用于建立校准曲线。

供试品溶液：精密称取连翘提取物 50 mg 置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，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 滤膜过滤，待测。

多中心切割超高效二维液相色谱条件

多中心切割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 的二维液相色谱采集软件编辑完成。整个分析时间为 30 min。

第一维 UHPLC 方法

色谱柱：Agilent Zorbax RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm, 部件号 858700-902

流动相：A) 水
B) 甲醇

梯度洗脱程序：

时间 (min)	B (%)
0	10
2	25
8	40
12	60
12.1	95
15	95
15.1	10
18	10

进样量：2 μL

柱温：40 °C

检测器波长：235 nm

第二维 UHPLC 条件和阀切换方法

色谱柱：Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus phenyl-hexyl, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm, 部件号 959757-312

流动相：A) 0.1% 磷酸水溶液
B) 乙腈

流速：2 mL/min

柱温：50 °C

检测器波长：235 nm

阀切换时间：第一组阀切换时间为连翘酯苷 A 起始出峰时间至结束，共 4 个片段；第二组阀切换时间为连翘苷起始出峰时间至结束，共 3 个片段

梯度洗脱程序：每一个片段的分析时间为 2 min (cycle time)，包括 1.5 min 梯度时间和 0.5 min 平衡时间，具体如下：

连翘酯苷 A 每个片段的洗脱梯度：

时间 (min)	B (%)
0	10
1.5	30

连翘苷每个片段的洗脱梯度：

时间 (min)	B (%)
0	10
1.5	30

结果与讨论

HPLC 转换为 UHPLC

2015 年版《中国药典》中连翘提取物的分析方法为 HPLC 方法，参考该方法一次运行时间约为 80 min。按照相同填料和两倍线流速原则，可将 80 min 方法转换为 18 min 的 UHPLC 方法，如图 2 所示。综观 HPLC 和 UHPLC 色谱图，两种方法的分离谱图相似，且 UHPLC 时间的缩短并未损失 HPLC 获得的分离度，如 HPLC 色谱图中连翘苷出峰前的干扰峰在 UHPLC 上也得到明显分离。

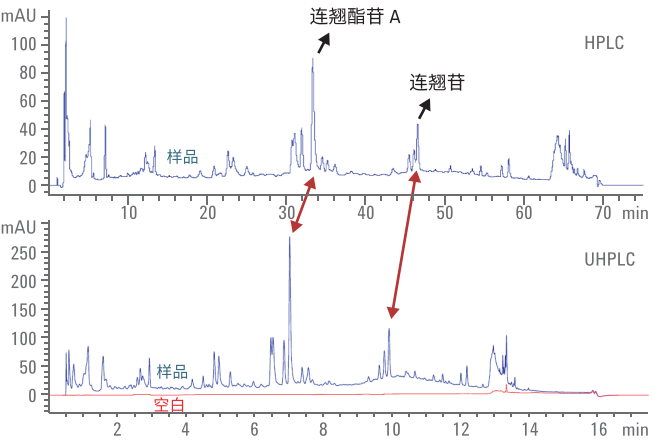


图 2. 连翘提取物的 HPLC 和 UHPLC 色谱图比较

目标峰中共流出物的分离

通过图 2 的 UHPLC 谱图可以看出，样品基线（蓝色）较空白基线（红色）有明显上升，表明连翘酯苷 A 和连翘苷出峰处很有可能存在共流出物。对于液相色谱而言，通常可以采用选择性不同的色谱柱和流动相组合进行分离验证。然而，对于成分极为复杂的中药来说，这种验证方法很难达到预期效果。由于分离的不确定性，在方法验证时，无法判断原始分析方法中得到分离的杂质是合并进入目标峰，还是合并进入已从目标峰中分离出的杂质峰。而中心切割二维液相方法可以很好地解决此问题。它可以在保证原始方法分离效果的前提下，将切割收集后的目标峰在线转移至第二维色谱重新进行分离、分析，在色谱柱和流动相选择合适的前提下即可轻松实现共流出物的分离。如图 3 所示，在本文所述第二维 UHPLC 条件下，第一维色谱中连翘酯苷 A 和连翘苷中的共流出物在第二维得到了很好的分离。

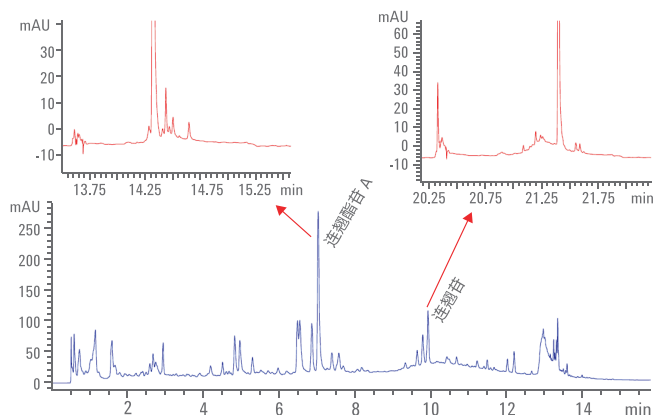


图 3. 采用中心切割二维液相色谱法分离连翘酯苷 A 和连翘苷中的共流出物

定量方式的选择

基于样品环收集的二维液相色谱法往往无法完成定量分析。即使第一维方法是 UHPLC，若峰宽为 0.2 min 时，色谱峰的洗脱体积为 80 μL （按第一维流速 0.4 mL/min 计算）。如果一次完全收集后转移至第二维，极易造成第二维色谱柱过载，从而影响第二维的分离效果，因此本文采用连续收集的多中心切割方案进行定量分析。在二维液相色谱方法编辑软件的帮助下，可以轻松完成该操作。在本文所建立的方法中，连翘酯苷 A 进行了 4 次连续收集，连翘苷进行了 3 次收集，每次收集体积为 32 μL 。

线性范围、重复性和灵敏度比较

由于第一维中连翘酯苷 A 和连翘苷经过多次切割进入第二维分析，因此定量时需要将每个片段分析中的连翘酯苷 A 和连翘苷的色谱峰面积加和起来进行计算。连翘酯苷 A 在 0.05-0.4 mg/mL 浓度范围内，线性回归方程为 $Y = 2953 \cdot X - 105.28$ （Y 代表峰面积，X 代表浓度），相关系数 $R^2 = 0.9958$ ；连翘苷在 0.01-0.2 mg/mL 浓度范围内，线性回归方程为 $Y = 9596.7 \cdot X + 5.3691$ （Y 代表峰面积，X 代表浓度），相关系数 $R^2 = 0.9999$ 。连翘酯苷 A 的线性相关系数较差，主要是因为对照品纯度不高，经过第二维分离后仍有杂质未与主峰实现基线分离，积分误差导致峰面积的偏差较大。

以 0.1 mg/mL 混合对照品溶液连续进样 6 次考察峰面积重现性，连翘酯苷 A 的 RSD 为 4.2%，连翘苷的 RSD 为 0.3%，数据如表 1 所示。

表 1. 0.1 mg/mL 混合对照品溶液连续进样 6 次所得峰面积重现性数据

连翘酯苷 A	片段 1	片段 2	片段 3	总峰面积
	19.2	80	81.6	180.8
	18.7	82.9	74.2	175.8
	17.4	89.7	85.5	192.6
	22.2	97.6	64	183.8
	19.3	93	61.3	173.6
	17.8	83.4	71.1	172.3
	SD			7.6
	平均峰面积			179.8
	RSD%			4.2
连翘苷	片段 1	片段 2	片段 3	总峰面积
	317.3	646.6	10.7	974.6
	329	632.4	9.6	971
	304.5	662.3	11.3	978.1
	320.8	644.5	10.8	976.1
	349.3	619	7.2	975.5
	324.2	644.9	9.5	978.6
	SD			2.7
	平均峰面积			975.6
	RSD%			0.3

利用多中心切割二维液相色谱法将第一维目标峰切割多次进入第二维分析，相当于目标峰在进入第二维分析时被流动相稀释。为防止灵敏度降低，第二维二极管阵列检测器配置 60 mm 的高灵敏度流通池来提高响应。以 0.01 mg/mL 对照品溶液为考察对象，连翘苷的第一维峰高为 27.2 mAU，第二维的三个片段中峰高最高为 63.5 mAU。然而，由于第二维流速较高且流动相添加了磷酸，导致基线噪音较第一维更高。因此，连翘苷第二维的信噪比 (S/N) 较第一维有所降低，约为第一维信噪比的 1/3。

样品测定结果

按照本文所述方法，将 3 批次连翘提取物按供试品溶液进行制备，每批次样品平行制备 2 份，每个供试品溶液进样 2 次，最后取平均值作为该批次样品的测定结果，结果如表 2 所示。

表 2. 连翘提取物供试品溶液中连翘酯苷 A 和连翘苷的含量

样品	连翘酯苷 A 含量		连翘苷含量	
	本文方法	药典方法	本文方法	药典方法
1	4.63%	4.28%	0.58%	0.61%
2	7.18%	7.02%	0.82%	0.81%
3	5.35%	5.14%	0.62%	0.64%

结论

本文以多中心切割超高效二维液相色谱系统为平台，建立了准确测定连翘提取物中连翘酯苷 A 和连翘苷含量的方法。相比于 2015 年版《中国药典》的特征图谱方法，本文方法在缩短分析时间的同时，利用二维色谱选择性的差异将一维方法中连翘酯苷 A 和连翘苷中的共流出物分离出来，并通过连续多次切割方式完成定量分析。方法重复性高，线性好，灵敏度与一维方法相当。对于复杂组成样品中待测物的定量，多中心切割二维色谱可以提供一种更简单有效的分析方法，而无需像传统一维色谱分析一样，花费过多的精力专注于样品分离。

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
6. Matthias Pursch, Stephan Buckenmaier. Loop-Based Multiple Heart-Cutting Two-Dimensional Liquid Chromatography for Target Analysis in Complex Matrices. *Anal. Chem.*, 2015, 87 (10): 5310–5317
7. Stephan Buckenmaier. Agilent 1290 Infinity 多中心切割二维液相色谱解决方案. 安捷伦科技, 2015, 5991-5615CHCN

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

5991-8341CHCN



Agilent Technologies