Получение профиля фрагментации экстрактов шалфея краснокорневищного (*Salvia miltiorrhiza*) с помощью колонок для ВЭЖХ с поверхностно-пористыми сорбентами с размером частиц до 2 мкм

Рекомендации по применению

Лекарственные препараты

Автор

Ронгцзе Фу (Rongjie Fu)

Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.

Аннотация

Экстракты гидрофобных и гидрофильных компонентов в шалфее краснокорневищном (*Salvia miltiorrhiza*) анализировали посредством ВЭЖХ с помощью колонки с поверхностно-пористыми сорбентами с размером частиц до 2 мкм. Методика, использующая колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120, была перенесена из методик получения профиля фрагментации комплекса фенольных кислот таншинонов шалфея, на которые распространяются нормативные требования Китайской фармакопеи (CHP). Применение колонки InfinityLab Poroshell 120 с частицами размером 1,9 мкм, подходящей для анализа проб сложного состава, позволило получить чрезвычайно большое количество пиков при уменьшенном времени анализа.

Введение

Шалфей краснокорневищный, представляющий собой высушенный корень растения *Salvia miltiorrhiza*; он является средством традиционной китайской медицины, используемым для ускорения кровотока и лечения сосудистых заболеваний [1]. Из-за большого количества компонентов в матрице фитопрепарата эффективная оценка качества и подлинности средства китайской медицины на основе одного действующего вещества вызывает существенные затруднения. Для комплексной оценки качества фитопрепарата в настоящее время выполняется поиск уникальной хроматограммы, используемой в качестве «отпечатка пальца» соответствующего материала. Получение профиля фрагментации в ВЭЖХ и УВЭЖХ является наиболее распространенной технологией, используемой для контроля и обеспечения качества фитопрепаратов традиционной китайской медицины. Использование этой методики позволяет обнаружить большее количество пиков и дает больше информации о пробе. Поэтому количество пиков и разрешение представляют собой важные факторы применения профиля фрагментации фитопрепаратов в контроле и обеспечении качества.

Agilent Technologies

Шалфей краснокорневищный относится к пробам, анализ которых с помощью получения профиля фрагментации ВЭЖХ с целью контроля и обеспечения качества регулируется требованиями Китайской фармакопеи 2015 года. Многие активные фармацевтические компоненты, наибольшее значение среди которых имеют сальвианоловые кислоты и таншиноны, были выделены из шалфея краснокорневищного. Экстракты комплекса фенольных кислот и таншинонов регулируются требованиями к получению профиля фрагментации ВЭЖХ [2].

В настоящих рекомендациях по применению мы перенесли методики китайской традиционной медицины для фенольных кислот и таншинонов на новые колонки для ВЭЖХ Agilent InfinityLab Poroshell 120 с частицами размером 1,9 мкм.

Вещества и методики

Все использованные реагенты и растворители были аналитической чистоты или предназначены для жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Ацетонитрил и фосфорная кислота были приобретены у компании J&K Scientific Ltd, Пекин. Экстракты комплекса фенольных кислот и таншинонов и стандартные пробы были предоставлены китайской фармацевтической компанией. Экстракт комплекса фенольных кислот шалфея растворяли в воде до достижения концентрации 1 мг/мл, а экстракт таншинонов растворяли в метаноле до достижения концентрации 1 мг/мл.

Анализ УВЭЖХ выполняли посредством системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, включающей:

- Бинарный насос Agilent 1290 Infinity (G4220A)
- Автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A)
- Термостат отсека для колонок Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- Диодно-матричный детектор Agilent 1290 Infinity (G4212A)

Колонки

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 мм × 100 мм, 1,9 мкм (кат. № 695675-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 мм × 150 мм, 1,9 мкм (кат. № 693675-902)

Условия УВЭЖХ для таншинонов

Параметр	Значение		
Подвижная фаза	(A) Вода (0,026% фосфорной кислоты) (B) Ацетонитрил		
Градиент для колонки размером 2,1 × 100 мм	Время (мин)	%A	%B
	0	80	20
	4	40	60
	10	20	80
Время элюирования	13 мин		
Продолжительность периода после завершения анализа	2 мин		
Градиент для колонки размером 2,1 × 150 мм	Время (мин)	%A	%B
	0	80	20
	6	40	60
	15	20	80
Время элюирования	20 мин		
Продолжительность периода после завершения анализа	3 мин		
Температура	25 °C		
Скорость потока	0,33 мл/мин		
Объем вводимой пробы	1 мкл для колонки длиной 100 мм 1,5 мкл для колонки длиной 150 мм		
Детектирование	УФ, 270 нм		

Условия УВЭЖХ для комплекса фенольных кислот шалфея

Параметр	Значение		
Подвижная фаза	(A) Вода (0,05% фосфорной кислоты) (B) Ацетонитрил		
Градиент для колонки размером 2,1 × 100 мм	Время (мин)	%A	%B
	0	90	10
	3	80	20
	7	75	25
	9	70	30
	11	10	90
	14	10	90
Время элюирования	14 мин		
Продолжительность периода после завершения анализа	2 мин		
Градиент для колонки размером 2,1 × 150 мм	Время (мин)	%A	%B
	0	90	10
	4,5	80	20
	10,5	75	25
	13,5	70	30
	16,5	10	90
	21	10	90
Время элюирования	21 мин		
Продолжительность периода после завершения анализа	3 мин		
Температура	30 °C		
Скорость потока	0,42 мл/мин		
Объем вводимой пробы	1 мкл для колонки длиной 100 мм 1,5 мкл для колонки длиной 150 мм		
Детектирование	УФ, 286 нм		

Результаты и обсуждение

Обе методики определения общего содержания фенольных кислот и таншинонов, представленные в Китайской фармакопеи, требуют использования традиционной колонки 4,6 × 250 мм, 5 мкм. Для получения дополнительной информации о пробе фитопрепарата при получении профиля фрагментации рекомендуется использование колонок, позволяющих зафиксировать большее количество пиков, например колонки с поверхностно-пористыми сорбентами с размерами частиц до 2 мкм. Количество пиков является мерой производительности, описывающей число пиков, разделяемых в ходе анализа с градиентным элюированием при заданном разрешении. Большое количество пиков приобретает значимость в связи с растущим спросом на высокопроизводительные градиентные системы для разделения сложных проб с неизвестным количественным и качественным составом аналитов.

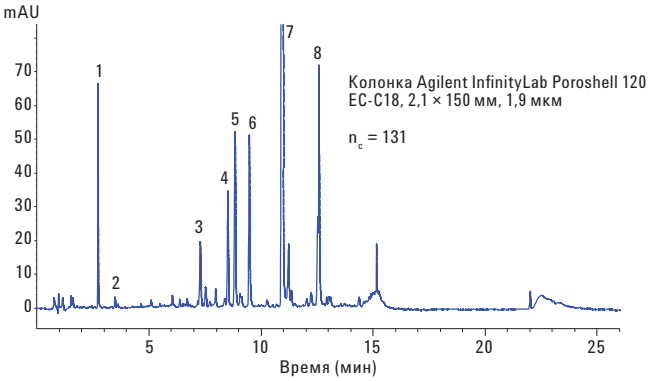

Рис. 1. Получение профиля фрагментации комплекса фенольных кислот шалфея на колонке Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 мм, 1,9 мкм. Пики 5 (розмариновая кислота) и 7 (литоспермовая кислота B) определяли с помощью стандартных проб

В настоящих рекомендациях по применению оригинальные методики Китайской фармакопеи переносили на колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 с размером частиц 1,9 мкм длиной 150 и 100 мм. Линейная скорость потока удваивалась для достижения максимальной эффективности применения частиц размером до 2 мкм, а время градиента регулировалось в соответствии с длиной колонки и скоростью потока. Хроматограммы представлены на рис. 1, 2, 3 и 4. Соединения на рис. 1 и 3, помеченные в соответствии с хроматограммой стандарта в Китайской фармакопее [2], соответствовали пикам, которые должны обнаруживаться при идентификации всех проб.

Колонки с поверхностно-пористыми частицами размером до 2 мкм обеспечивали превосходную производительность и быстроту анализа при давлениях УВЭЖХ. По сравнению с колонками размером 2,1 × 100 мм и 2,1 × 150 мм более длинные колонки обеспечивали значительно большее количество пиков и более высокое разрешение, что дало возможность получить больше сведений о пробах.

Для расчета условного количества пиков использовали следующее уравнение:

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

где n — количество пиков, использовавшееся в расчетах, t_R — время градиента, а w — средняя ширина пика, измеренная на высоте пика 4σ:

$$w = (W½/2{,}35) \times 4,$$

где W½ — ширина пика на половине высоты.

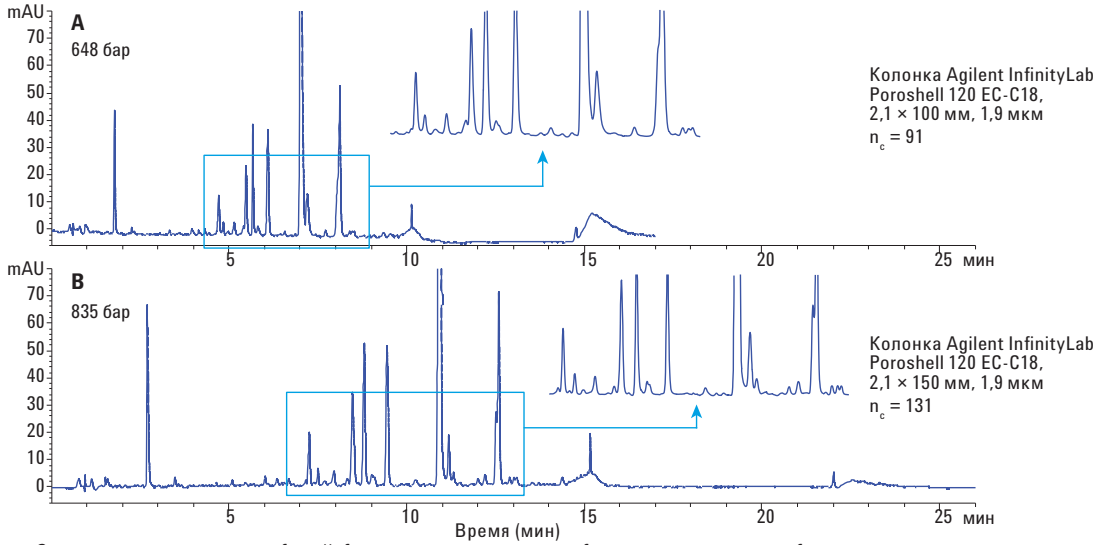

Рис. 2. Сравнение полученных профилей фрагментации комплекса фенольных кислот шалфея на колонках Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 мм, 1,9 мкм и 2,1 × 100 мм

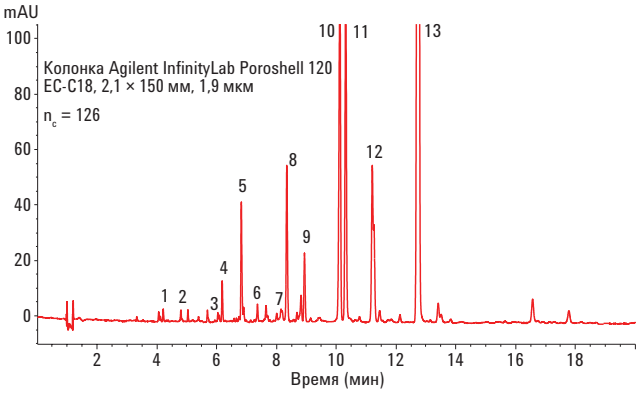

Рис. 3. Получение профиля фрагментации таншинонов на колонке Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 мм, 1,9 мкм. Пики 10 (криптотаншинон) и 13 (таншинон IIA) определяли с помощью стандартных проб

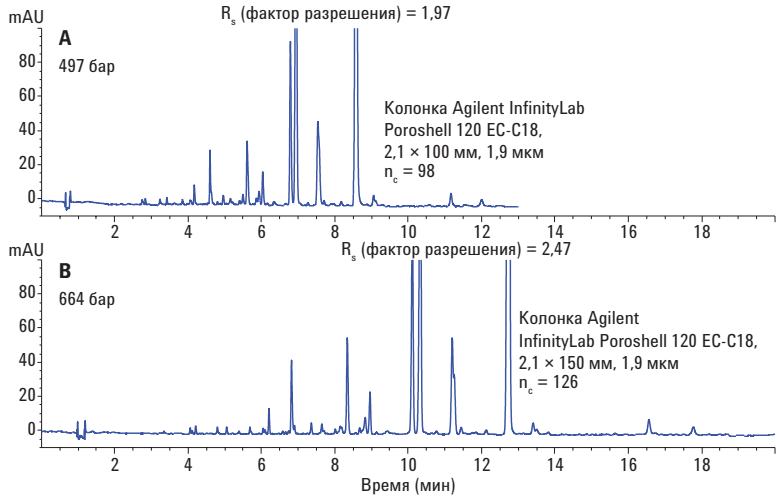

Рис. 4. Сравнение полученных профилей фрагментации таншинонов на колонках Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 мм, 1,9 мкм и 2,1 × 100 мм

Выводы

Колонки с поверхностно-пористыми частицами размером до 2 мкм обеспечивают превосходную производительность и быстроту анализа при давлениях УВЭЖХ. Они подходят для получения профиля фрагментации при анализах проб китайских фитопрепаратов сложного состава. Длинная колонка обеспечивает значительно большее количество пиков, чем короткая, что позволяет получить больше информации о пробах сложного состава.

Литература

1. Tsai-Hui Lin, Ching-Liang Hsieh, Lin Hsieh. *Chinese Medicine* **5:22** (2010).
2. "Salvia Total Phenolic Acids and Tanshinones" *China Pharmacopoeia* **397**, (2015).

Дополнительная информация

Представленные данные отражают характерные результаты. Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

Напечатано в США
31 октября 2016 г.
5991-7559RU

Agilent Technologies