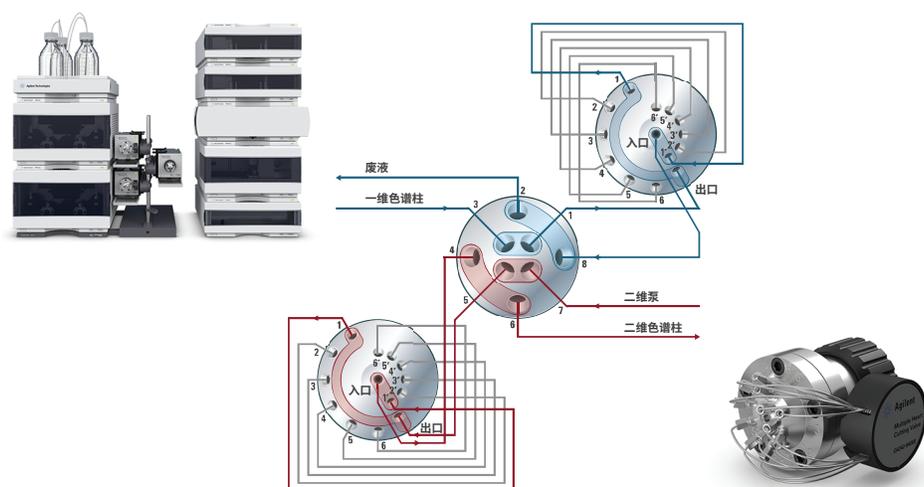


采用安捷伦超高效液相色谱及多中心切割二维液相色谱对金钱草中药配方颗粒的特征峰进行高分离度确证研究



作者

余彦海, 陈晓光
安捷伦科技(中国)有限公司

摘要

本文以 Agilent Infinity II 超高效液相色谱平台为基础, 结合安捷伦独有的多中心切割二维液相色谱解决方案, 对金银花中药配方颗粒的特征图谱中的所有特征峰进行高效分离和准确鉴定。

前言

中药配方颗粒是一种新型饮片, 既保留传统提取工艺, 使其临床应用尽量符合中医中药理论, 同时又改善了传统中药饮片煎煮复杂、不适应现代社会快节奏的弊端。但是在标准控制上, 此前没有明确的法定标准分析方法。所采用的质量控制方法基本上是参照现行《中国药典》中有关饮片的控制方法, 但此类方法存在明显不足。原因在于《中国药典》的质量控制规定是限定药材或者饮片, 未经提取, 其组成与配方颗粒可能存在本质差异。采用《中国药典》规定的方法, 有可能导致中药配方颗粒的质量控制出现偏差。

因此, 在国家食品药品监督管理局的部署下, 六家中药配方颗粒试点企业以及行业研究机构分别对 301 个中药配方颗粒品种进行了统一标准的研究, 最终于 2019 年 11 月发布了 160 个品种的试点统一标准的拟公示标准。此后, 中药配方颗粒质量控制进入一个崭新的时期, 摆脱了质量控制千差万别的状况。

上述公示的标准中，对于所有中药配方颗粒均采用特征图谱来控制批间质量的一致性，主要以多个特征峰与参照物峰的相对保留时间 (RRT) 来确证组成的一致性。但由于中药配方颗粒多以水为提取溶媒，在高温高压下提取的成分类型、成分极性、成分疏水性等极其复杂，因此在特征图谱分析中，必须使每一个色谱峰都要进行良好的分离和鉴定，才能保证特征图谱的特征峰不受共流出物的干扰，从而保证特征图谱稳定、可控、重现，使其成为真正应用于控制中药配方颗粒质量的标准方法。

本文采用安捷伦独特的多中心切割二维液相色谱系统，对已公布的金钱草中药配方颗粒标准进行了二维分离研究，为其质量控制的研究提供了新思路和方法。

实验部分

试剂和样品

乙腈为色谱纯，购自 J.T. Baker；磷酸为分析纯，购自广州化学试剂厂；水为超纯水，取自 Milli-Q。样品由用户提供。

仪器和设备

Agilent Infinity II 液相色谱系统，配备：四元泵 (G7104C)、二元泵 (G7120A)、自动进样器 (G7129B)、多功能柱温箱 (G7116B)、阀驱动 (G1170A×3)、主动溶剂调谐二维阀头 (G4243A, #008, #007)、二极管阵列检测器 (G7117A × 2)、高灵敏度流通池 (G4212-60007) 和 G2198AA 二维专用软件。

KQ 3200 超声波清洗仪

Milli-Q 超纯水机

样品前处理

取样品适量，研细后称取约 0.2 g，置具塞锥形瓶中；加入 10 mL 80% 甲醇，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）20 分钟；冷却后摇匀，过滤后取续滤液以备进样分析。

第一维液相色谱条件

色谱柱：以十八烷基键合硅胶为填充剂，100 mm × 2.1 mm，1.6 μm

流动相 A：乙腈

流动相 B：0.4% H₃PO₄

梯度洗脱：	时间 (min)	B (%)
	0	88
	15	85
	30	65
	30.1	88
	35	88

流速：0.2 mL/min

柱温：30 °C

检测波长：364 nm

第二维液相色谱条件

色谱柱：以十八烷基键合硅胶为填充剂，50 mm × 3.0 mm，1.8 μm（例如 Agilent Zorbax SB-Aq 液相色谱柱）

流动相：0.4% H₃PO₄ (A)，乙腈 (B)，梯度洗脱：从动梯度

流速：0.8 mL/min

柱温：30 °C

检测波长：364 nm

结果与讨论

中药配方颗粒方法开发过程中多中心切割二维液相应用的必要性

为获得稳定的色谱条件以生成特征图谱，从而保证配方颗粒批次间的一致性，必须筛选和测试许多色谱参数，如色谱柱类型、流动相种类、梯度程序、柱温和添加剂浓度等。并且，为确证优选的色谱条件的可靠性，需要评价此条件下产生的特征图谱中各个特征峰的唯一性。即，对各个特征峰进行确证研究，确定各色谱为单一色谱峰后才能将此峰作为特征峰，并用作该品种中药配方颗粒的质量控制指标。

在液相色谱中，确证色谱峰的方法主要有以下几种：

- 二极管阵列检测器的峰纯度分析，利用光谱相似性进行纯度比较确定是否共流出
- 采用具有不同选择性的色谱条件对同一分析物进行分析，确认各个色谱峰是否存在共流出等
- 结合质谱进行分子量检测确证

由于中药配方颗粒的成分来源于药材，而药材中的有效成分由很多大类相似成分组成，因此如果采用方法 1 的二极管阵列检测器检测峰纯度，通常会由于相似成分的共流出而导致纯度鉴别失败，采用方法 3 同样可能由于同分异构体或者光学异构体共流出而导致鉴别失败。最终，在中药配方颗粒的特征图谱研究中采用了方法 2，即在不同选择性的色谱条件下对同一分析物进行分析，尽可能分离所有特征峰以确定色谱峰是否受到干扰。

安捷伦独特的多中心切割二维液相色谱，能够在一次运行中对特征图谱中的所有特征峰进行两次具有不同选择性的分离，从而确定特征峰是否受到共流出干扰，提高特征图谱质量控制的稳定性和可靠性。

金钱草配方颗粒的公示方法重现

在金钱草中药配方颗粒公示稿中，确定 6 个色谱峰作为特征峰。本研究首先在 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统（额定压力 800 bar）的系统上重复该标准方法，完全重现了图 1 中所示的 2-6 号色谱峰。

为确认这 6 个色谱峰是单一色谱峰还是包含共流出物的色谱峰，可使用二极管阵列检测器的峰纯度功能提取各个色谱峰的峰纯度结果，结果如图 2 所示。从图中可以看出，根据光谱相似性判断，6 个色谱峰中仅有两个色谱峰可能对应的是纯化合物，而其它色谱峰中均包含共流出干扰成分。但由于中药配方颗粒中的许多成分均相似，因此即使色谱峰纯度符合要求，也不能保证那两个色谱峰未受到干扰。

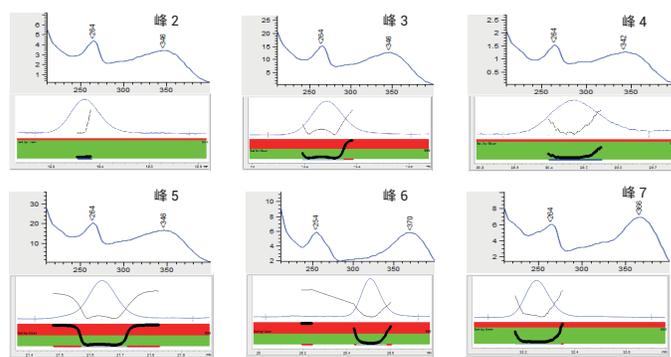


图 2. 金钱草配方颗粒特征峰光谱及峰纯度

金钱草配方颗粒的多中心切割二维分析

利用多中心切割二维液相色谱，在一次运行中，对特征图谱中的 2-6 号色谱峰分别进行一维色谱柱分离后，再依次引入二维色谱进行二次分离。获得了所有特征峰的二次分离结果，如图 3 所示。从第二维分离的结果来看，借助具有不同选择性的二维色谱柱的分离，仅 2 号峰中不含共流出干扰物，其它色谱峰均受到共流出物的干扰。

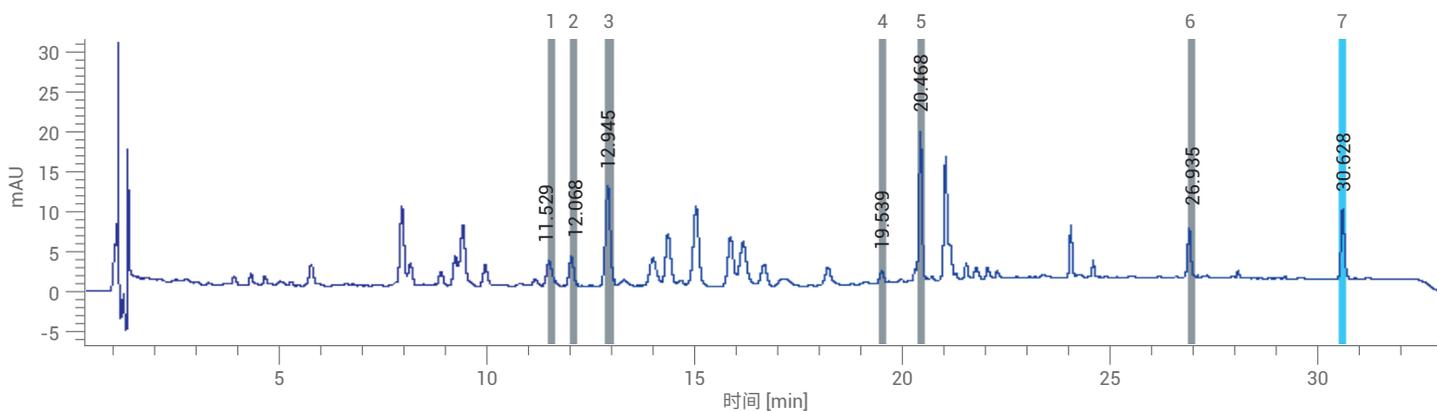


图 1. 金钱草配方颗粒 UHPLC 色谱图及特征峰

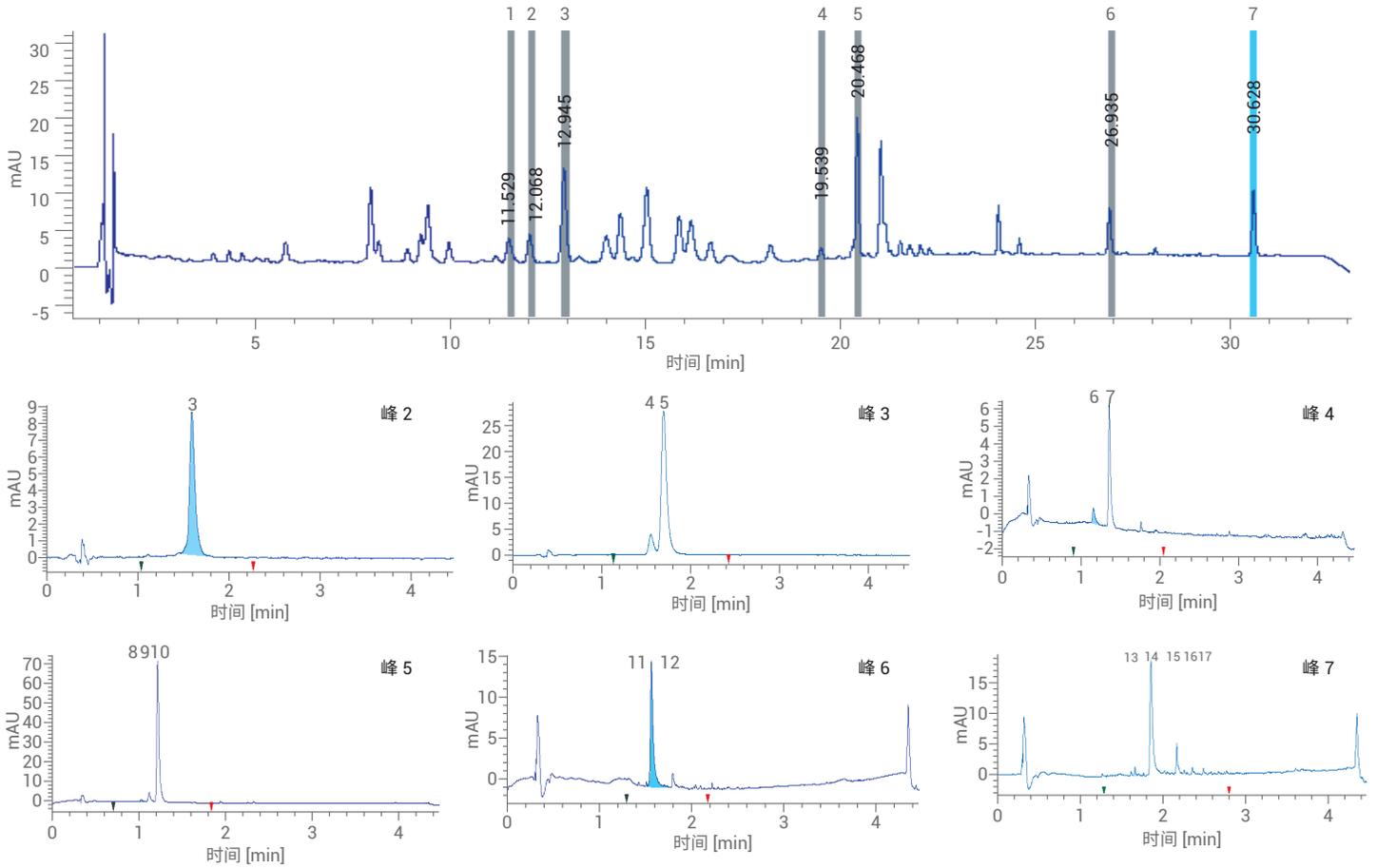


图3. 金钱草配方颗粒特征峰多中心切割二维分离结果

结论

本文利用安捷伦独特的多中心切割二维液相色谱，在完全重现金钱草中药配方颗粒标准中特征图谱的前提下，对特征图谱规定的2-6号色谱峰进行具有选择性差异的两维分离。结果表明，安捷伦独特的多中心切割二维液相色谱有助于鉴别特征图谱中的特征峰，保证特征图谱的稳定性和可靠性，从而显著提升中药配方颗粒质量控制水平。同时，该方案也可结合安捷伦三重四极杆质谱(QQQ)、高分辨质谱(Q-TOF)以及安捷伦专有的中药化合物库，高效、准确地分离并鉴定中药配方颗粒中的化合物。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

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，2020
2020年4月16日，中国出版

