

Accucore Vanquish 色谱柱在天冬配方颗粒的UHPLC特征图谱研究中的应用

彭倩, 金琦芸

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

中药配方颗粒, 天冬, Accucore Vanquish 色谱柱, 超高效液相色谱 (UHPLC), Vanquish Duo

摘要

本文基于赛默飞 Vanquish Duo超高效液相色谱系统, 采用 Accucore Vanquish超高效液相色谱柱, 能有效分离天冬配方颗粒的皂苷成分, 完美实现天冬配方颗粒特征图谱分析, 极大的提高实验室分析效率。同时对赛默飞不同系列UHPLC色谱柱如何选择合适的保护柱进行了研究, 给出了相应配置方案。该方案大大节省了人力、物力和成本, 为中药配方颗粒分析实验室实现快速高效分析带来便利。

1. 前言

中药配方颗粒是近几年发展较快的中药制剂, 由单味中药饮片经提取浓缩而成, 供中医临床配方用, 具有见效快, 吸收好, 疗效显著, 携带方便等特点。中药配方颗粒目前已有700余种, 占中药饮片品种50%。目前市场上对于配方颗粒主要存在疑虑为质量以及疗效。

国务院印发的《中医药发展战略规划纲要(2016-2030年)》明确将中药配方颗粒纳入国家中医药发展战略规划内容之中。2019年11月8日, 国家药典委公示了巴戟天配方颗粒、白芍配方颗粒等第一批160个中药配方颗粒品种试点统一标准。全国规范统一的质量标准将提高配方颗粒的市场接受度, 有利于配方颗粒行业的长远发展。

160个品种的中药配方颗粒公示稿中有91个品种采用了超快速液相方法来进行分析, 占比约57%, 表明超快速液相在中药配方颗粒分析中已有广泛的应用。天冬, 为百合科植物天门冬的根。天冬配方颗粒是以天冬饮片为原料, 经水煎煮、干燥等工艺加工生产制成。具有养阴润燥, 清肺生津等功效。用于肺燥干咳, 腰膝酸痛, 内热消渴, 肠燥便秘等症状。

目前尚未颁布天冬配方颗粒公示稿, 如采用常规的液相色谱法进行特征图谱分析, 耗时长, 降低实验室效率。同时中药基质容易对色谱柱和色谱系统造成污染, 需配备合适的保护柱进行分析, 减少系统维护, 提升色谱柱使用寿命。本文采用Vanquish Duo超高效液相色谱, Accucore Vanquish超高效液相色谱柱, 有效实现了天冬配方颗粒特征图谱的快速方法开发, 同时对赛默飞超高效液相色谱柱如何配备保护柱给出了选择方案。为中药配方颗粒分析人员提供了快速方法开发思路及解决方案。

2. 实验方法

2.1 仪器, 色谱柱与试剂

2.1.1 仪器: Vanquish Duo UHPLC

2.1.2 色谱柱: Accucore Vanquish C18+, 150x2.1mm, 1.5 μ m (P/N 27101-152130)

2.1.3 保护柱芯: Accucore C18, 10x2.1mm, 2.6 μ m (P/N 17126-012105)

2.1.4 保护柱套: UNIVERSAL UNIGUARD HOLDER FOR 2.1/3.0mm (P/N 852-00)

2.1.5 乙腈、磷酸(色谱纯, Fisher)、超纯水

2.2 样品信息

4g天冬配方颗粒溶于4mL甲醇, 过膜后上机测试

2.3 液相色谱方法

色谱柱: Accucore Vanquish C18+, 150x2.1mm, 1.5 μ m

保护柱: Accucore C18, 10x2.1mm, 2.6 μ m

流动相: A: 0.1% H₃PO₄/H₂O

B: 乙腈

梯度条件:

表1. 梯度洗脱程序

Time (min)	A%	B%
0	72	28
5	72	28
15	70	30
20	65	35
25	50	50
30	5	95
35	5	95
36	72	28
45	72	28

流速: 0.2 mL/min

柱温: 25 $^{\circ}$ C

进样量: 1 μ L

检测波长: UV 203nm

最高压力: 800bar

3. 实验结果和讨论

3.1 最佳色谱柱筛选

色谱柱是分离的心脏, 选择合适的色谱柱是色谱方法开发的前提条件, 筛选最合适的色谱柱, 首选赛默飞Vanquish色谱柱, 包括3个旗舰色谱柱系列: Accucore, Acclaim以及Hypersil Gold, 适用于Vanquish 系列仪器, 分离能力与柱效高于传统亚2微米填料, 可实现快速、高效的分析, 能够耐受1500 bar 的压力。中药涵盖的化学成分极性跨度大, 为保证一针内分离更多化合物, 色谱柱规格选择150*2.1mm。

本方案选择如下色谱柱比较分离结果, 每款色谱柱均优化至最佳色谱条件, 从上至下依次为:

Accucore Vanquish C18+, 1.5 μ m 150x2.1mm (P/N: 27101-152130)

Acclaim VANQUISH C18, 2.2 μ m 150x2.1mm (P/N: 071399-V)

Hypersil GOLD Vanquish C18, 1.9 μ m 150x2.1mm (P/N: 25002-152130-V)

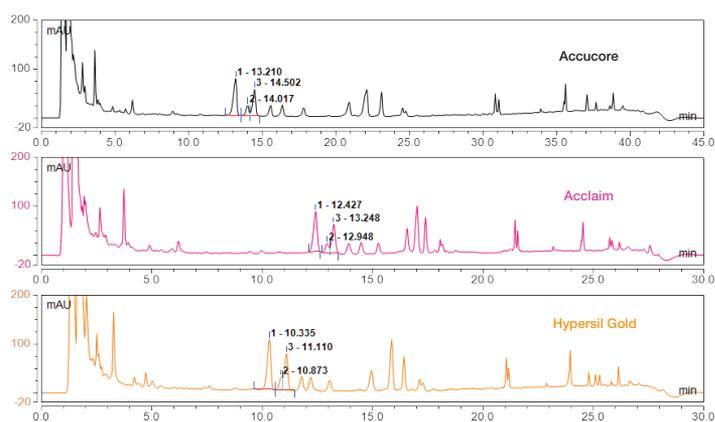


图1. 天冬样品1000mg/mL三款Vanquish 色谱柱分离谱图

如图1所示, 1、2、3号峰是天冬的皂苷成分中最难分离的3个峰, 也是研究者希望有较好分离效果的部分, 从谱图上可以看到, 相比 Acclaim和Hypersil Gold, Accucore 分离效果最佳, 分离度分别为2.15和1.38。最终选择色谱柱为Accucore Vanquish C18+。

3.2 实验方法优化

用中药指纹图谱监控中药质量, 并不要求指纹图谱中的每一个组分都清楚, 也不要求对每一个组分都精确测定。但是中药涵盖的化学成分极性跨度大, 需要尽可能保证有效时间内一针内分离更多化合物。从方法优化的思路来看, 流动相组分不变的情况下, 为了最佳的分离效果, 优先优化流动相梯度。图2展示了使用Accucore色谱柱通过调整流动相水相和有机相的比例以及梯度时间, 3号谱图获得了最佳的分析时间及分离效果, 一针分离出了从极性到非极性更多成分。

图2中1号谱图化合物出峰主要分布在30-40min, 皂苷成分未完全分离, 10-27.5min无化合物出峰, 整体分析时间过长; 2号谱图通过将B相乙腈初始比例从19%提高到25%, 加快洗脱速度, 并在集中出峰阶段将乙腈比例从35%提高到50%, 加快梯度洗脱提升峰数量, 同时整体梯度时间缩短。但结果仍不理想, 化合物出峰主要分布在20min以后, 分离效果不佳; 3号谱图提高B相乙腈初始比例至28%, 同时将集中出峰阶段的梯度变缓, 使整体出峰分布更均匀, 极性到非极性成分都有较好的分离效果。

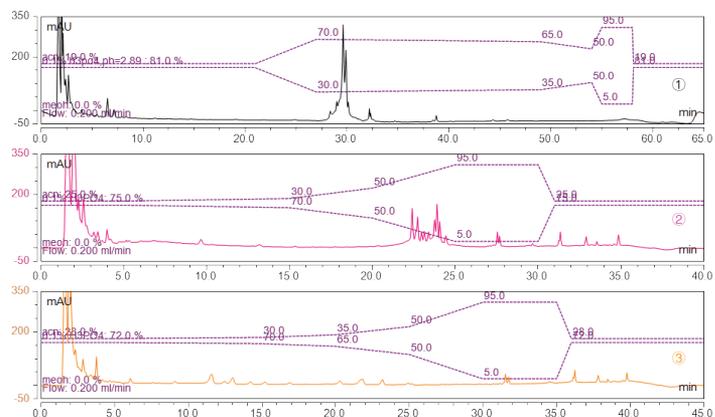


图2. 通过调整流动相水相有机相比例以及梯度时间获得更佳的分离效果

调整柱温也是方法优化的一种途径，同样使用Accucore色谱柱分别在室温（25℃），20℃以及30℃下对比分离效果，如图3所示，上下各调整5度后，温度变化对谱图的影响较小，分离效果没有明显改善，最终条件仍旧选择室温。

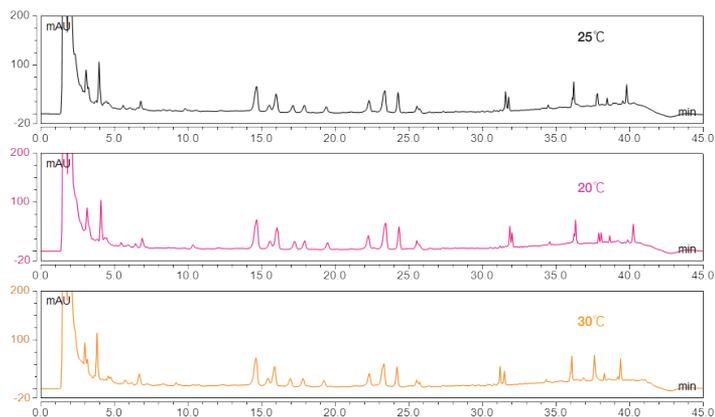


图3. Accucore 色谱柱在不同温度下的分离效果

综上对于天冬配方颗粒特征图谱的实验方法优化，较为有效的是调整流动相梯度和水相有机相比比例来达到最佳的分离效果，柱温对实验结果影响不大。

3.3 方法重现性

为了考察实验方法的稳定性，天冬样品连续进样6针，重复性谱图如图4所示，保留时间和峰面积相对标准偏差（RSD）均小于2%，表现了优异的稳定性。

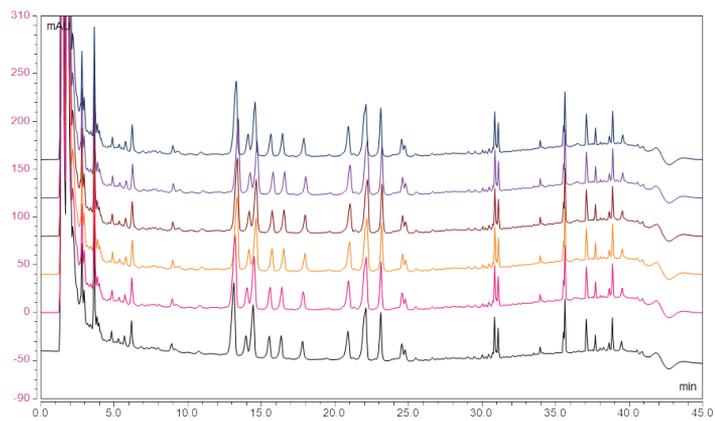


图4. Accucore 色谱柱连续进样天冬样品重复性谱图（n=6）

4. UHPLC 色谱柱保护柱配置

目前对于UHPLC色谱柱的标准配置为在线过滤器，小体积滤芯设计，最大限度减少扩散带来的柱效损失，保持色谱柱峰形，同时能够有效过滤流动相和样品中的颗粒。但是由于中药基质较为复杂，即使使用在线过滤器，提升色谱柱的抗污染能力有限。在不影响色谱柱柱效和分离效果的情况下，为了延长色谱柱使用寿命，对于UHPLC色谱柱保护柱配置进行了研究。

对比使用的保护柱如下：

ACCUCORE C18 10x2.1MM, 2.6 μ M (P/N: 17126-012105)

HYPERSIL GOLD 3 μ M 10X2.1MM DROP-IN GUARDS (P/N: 25003-012101)

UNIVERSAL UNIGUARD HOLDER FOR 2.1/3.0MM (P/N : 852-00)

在线过滤器为：

UHPLC FILTER HOLDER (P/N: 27006)

2.1mmID filter cart 0.2 μ m (P/N: 22180)

如图5和图6所示，分别为Accucore和Hypersil Gold UHPLC 色谱柱配置在线过滤器，Accucore 2.6 μ m保护柱以及Hypersil Gold 3 μ m保护柱对比效果，可以看到保护柱对比在线过滤器，色谱柱对于化合物的保留更强，但是对于峰形、分离效果和柱效没有明显影响。保护柱比在线过滤器大大提升了色谱柱的抗污染能力，对于分析中药基质复杂样品，能有效延长色谱柱寿命。综合考虑最佳方案，UHPLC色谱柱选择同系列保护柱。即Accucore UHPLC色谱柱搭配Accucore 2.6 μ m保护柱，Hypersil Gold UHPLC色谱柱搭配Hypersil Gold 3 μ m保护柱为最佳方案。

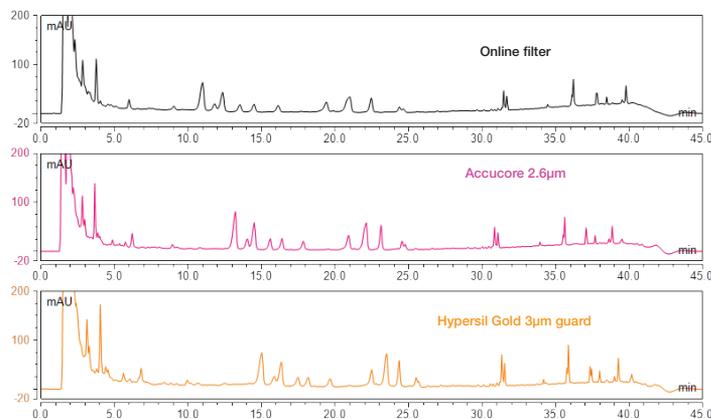


图5. Accucore 色谱柱在线过滤器与保护柱比较

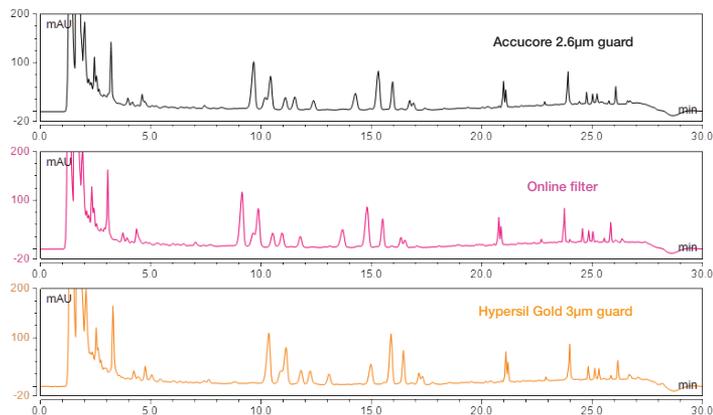


图6. Hypersil Gold 色谱柱在线过滤器与保护柱比较

5.结论

为解决中药配方颗粒研究难点，本文基于赛默飞 Vanquish Duo超高效液相色谱系统，通过筛选最佳色谱柱和方案优化，最终采用Accucore Vanquish超高效液相色谱柱，有效分离了天冬配方颗粒的皂苷成分，完美实现天冬配方颗粒特征谱图分析，极大的提高实验室分析效率。同时对赛默飞不同系列UHPLC色谱柱如何选择合适的保护柱进行了研究，给出了相应配置方案。该方案大大节省了人力、物力和成本，为中药配方颗粒分析实验室实现快速高效分析带来了极大便利。

6.参考文献

1. 关于中药配方颗粒品种试点统一标准的公示“160个中药配方颗粒品种试点统一标准”，国家药典委员会
2. Thermo Scientific 2020-2021 色谱耗材简明手册



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC