

方法开发系统在建立 6 种人参皂苷 UHPLC 分析方法上的应用

摘要: 本文建立了一种使用岛津 HPLC 方法开发系统对 6 种人参皂苷类药物高效液相色谱快速分析条件探索的方法。在人参皂苷 Rb1 等 6 种药物的高效液相快速分析方法开发中, 实现在 4 种色谱柱、2 种流动相体系、16 种梯度条件间的方法探索, 根据所得色谱图结果对各峰进行综合评价, 最终确定峰检出数和分离度综合评价最优者为该样品分析方法。

关键词: 超高效液相色谱 方法开发系统 药物分析 人参皂苷

人参皂苷 (Ginsenoside) 是一种固醇类化合物, 主要存在于人参属药材中, 具有增加白细胞数量、提高人体免疫力、促代谢、抗疲劳、抗衰老和抗肿瘤等作用。在对人参皂苷分析研究中, 由于化合物结构相似的缘故, 传统的 HPLC 方法耗时长, 分离效果不佳, 随着现代液相色谱技术的高速发展, 开发超快速液相分析方法进行人参皂苷检测显得尤为重要。

岛津 HPLC 方法开发系统是基于其最新一代超高效液相色谱仪 LC-30A 建立的一套用于液相分析条件探索的自动化装置。它利用工作站控制自动进行色谱柱切换和流动相配比而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。该系统配备的 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化, 图形界面易于操作和理解。

文中使用该套系统, 自动筛选合适的色谱柱和流动相比例建立了快速检测 Re, Rg1,

Rb1, Rb2, Rc, Rd 共计 6 种人参皂苷的 UHPLC 分析方法。

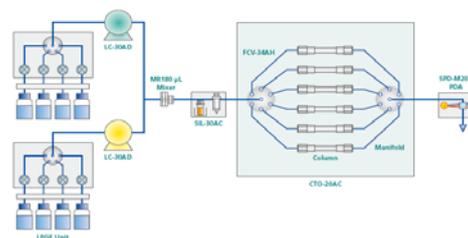


图 1 方法开发系统流路特点

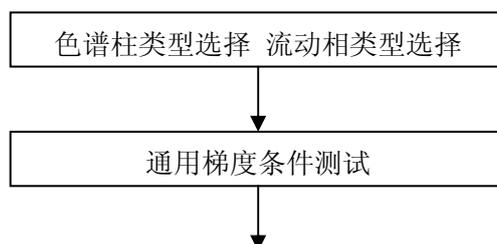
1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵, 配四元低压梯度比例阀), DGU-20A_{5R}×2 (在线脱气机), SIL-30ACMP (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱, 含 FCV-34AH (高压流路切换阀)), SPD-M30A (二极管阵列检测器), CBM-20A (系统控制器), Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站,) LabSolutions Ver. 5.54SP1 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

1.2.1 方法建立的流程



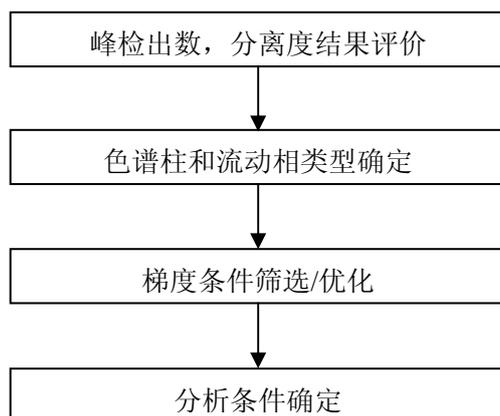


图 2 应用方法开发系统进行色谱方法建立的流程

1.2.2 液相色谱条件

色 谱 柱： InertSustain ODS 3.0 mmI.D.×100 mmL., 3 μm
 Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

流 动 相： A 相—水
 B 相—乙腈

流 速： 0.4 mL/min

进样体积： 3 μL

柱 温： 40°C,55°C

洗脱方式： 梯度洗脱

检测波长： 203 nm

1.3 样品制备

分别称取一定量的人参皂苷 Re, Rg1, Rb1, Rb2, Rc, Rd, 以甲醇溶解分别得到 1 mg/mL 的储备液, 吸取各单标储备液以甲醇-水 (1: 1, V/V) 稀释得到 100 μg/mL 的标准溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2. 结果与讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以表 1 所示的通用梯度时间程序对四种色谱柱在水-乙腈流动相体系下进行测试。

表 1 通用梯度洗脱时间程序 (柱温 40°C)

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
0.50	Pumps	Pump B Conc.	5
3.50	Pumps	Pump B Conc.	95

5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
5.01	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Controller	Stop	

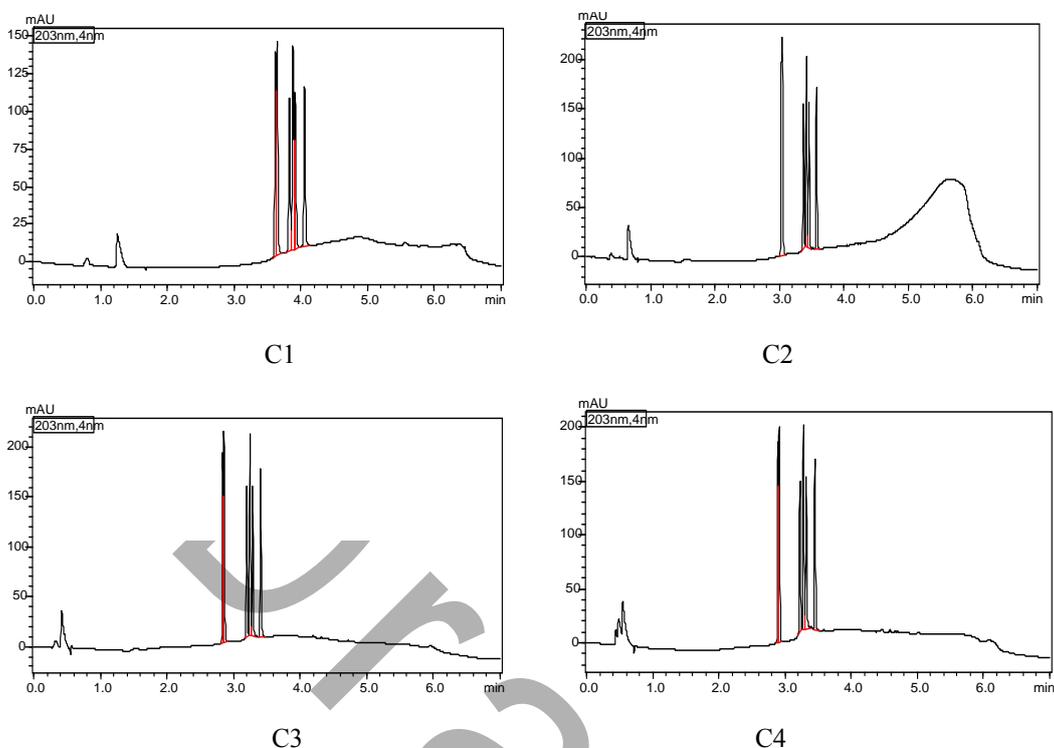


图3 6种人参皂苷在通用梯度条件下的色谱图

C1: InertSustain ODS 3.0 mmI.D.×100 mmL., 3 μm C2: Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 C3: Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm C4: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

2.2 通用梯度分析结果评价

对 2.1 中通用梯度分析结果评价，依据为峰检出个数同分离度等参数的综合得分

表2 通用梯度条件下4种色谱柱上的分离结果评价

peak#	Corrected Resolution*			
	C1	C2	C3	C4
1	-	-	-	-
2	0.3	3.0	0.3	0.4
3	3.0	1.4	3.0	3.0
4	1.0	1.2	1.5	1.5
5	0.5	3.0	1.2	1.2
6	2.5	-	3.0	3.0
S*	44.2	43.0	54.3	54.8

Corrected Resolution*: 各峰分离度中大于3的以3记，不足3的以实际计算结果记。

S*: 综合得分，以峰检出数×各峰分离度之和。

根据通用梯度各分析条件下分析结果的评价，最终确定的样品分析色谱柱为 C4，即为：
 色谱柱：Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

2.3 梯度条件筛选

由通用梯度时间程序分析结果确定了用于分析 6 种人参皂苷的色谱柱和流动相,为增加分离度和改善分离效果,进行梯度条件筛选。因此在通用时间程序的基础上,按表 3 优化梯度程序中的初始浓度和终止浓度,总共考察 4×4=16 种梯度条件。

表 3 梯度条件设置

	0.01 min-初始浓度 (%)	3.00 min-终止浓度 (%)
1	5	95
2	15	85
3	25	75
4	35	65

2.4 梯度条件筛选结果分析和评判

对 16 种梯度条件下 6 种人参皂苷的分析结果,通过 Class-agent report 软件进行峰检出数和分离度自动综合评判。

表 4 梯度优化分析结果评价

#	Corrected Resolution*															
	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	11)	12)	13)	14)	15)	16)
%B	5-95	5-85	5-75	5-65	15-95	15-85	15-75	15-65	25-95	25-85	25-75	25-65	35-95	35-85	35-75	35-65
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.4	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5	0.7	0.6	0.6	3.0	3.0	3.0	3.0
3	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
4	1.6	1.7	1.9	1.9	1.7	1.7	1.9	2.1	1.9	2.0	2.3	2.5	3.0	3.0	3.0	3.0
5	1.3	1.4	1.5	1.6	1.4	1.4	1.6	1.8	1.6	1.7	1.9	2.1	-	-	-	-
6	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	-	-	-	-
S	55.9	57.2	58.9	60.1	56.7	57.0	59.4	61.7	59.7	62.9	64.9	67.5	36.0	36.0	36.0	36.0

Corrected Resolution*: 各峰分离度中大于 3 的以 3 记,不足 3 的以实际计算结果记。

S*: 综合得分,以峰检出数×各峰分离度之和

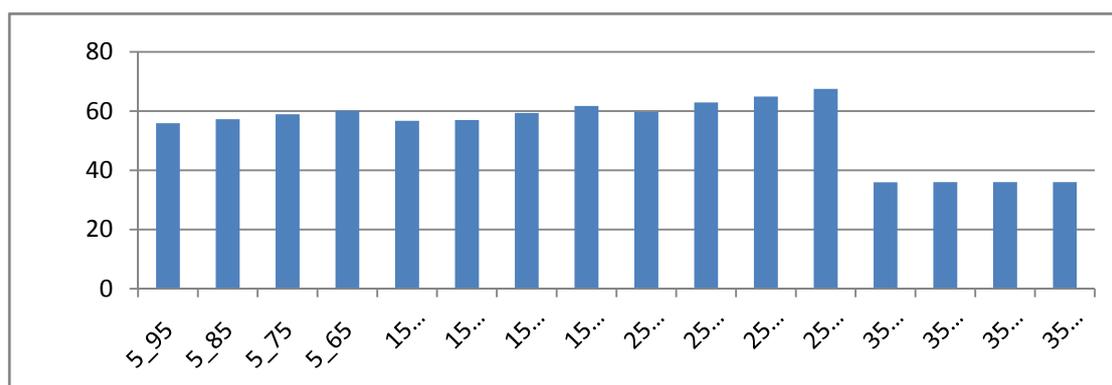


图 4 梯度条件筛选综合评价

根据分析结果评价系统统计结果,筛选出梯度条件为 25%-65%B 进行下一步优化。

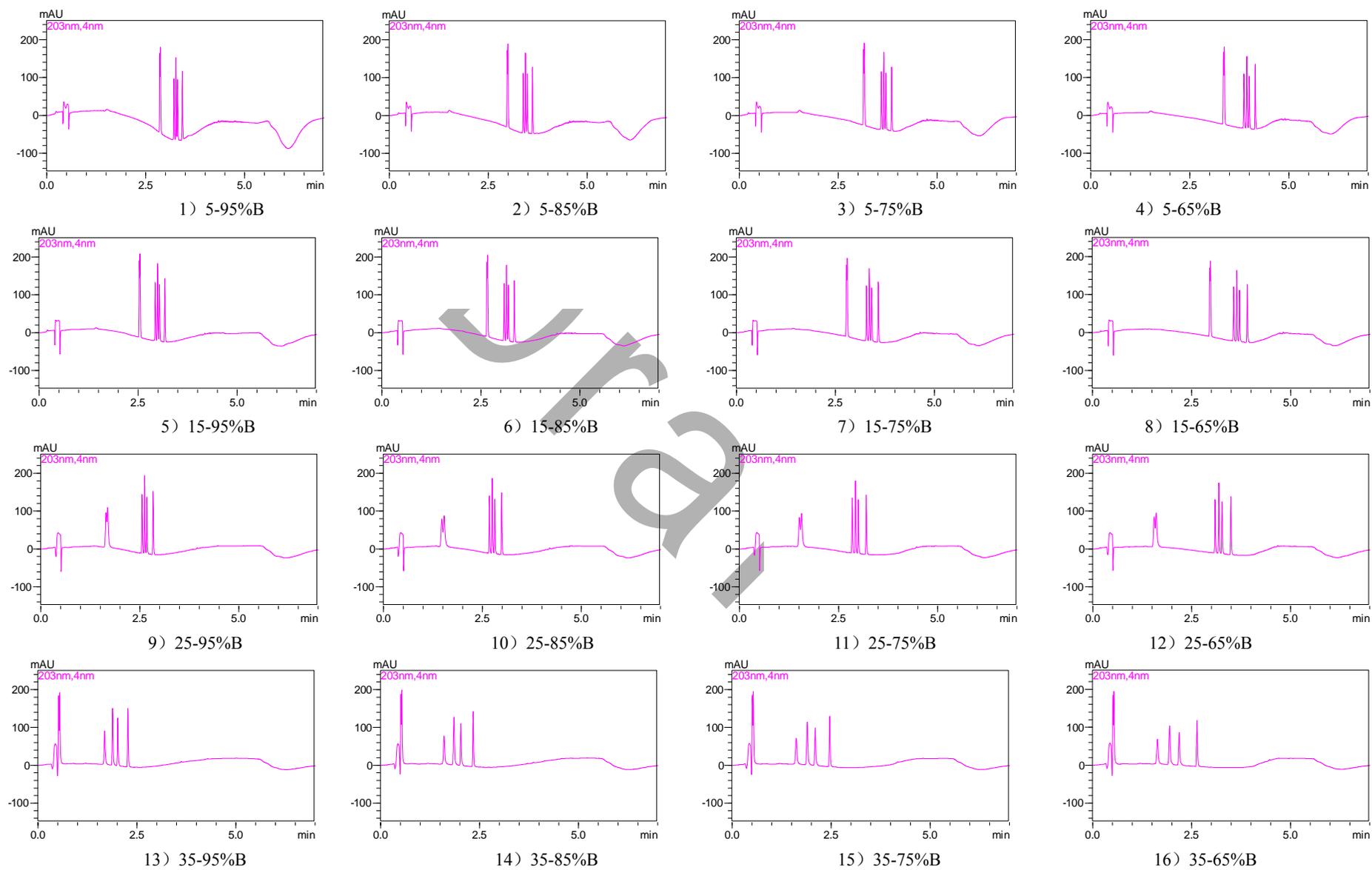


图5 6种人参皂苷在梯度条件筛选时的色谱图

2.5 梯度条件优化

对 2.4 中确定的梯度条件 25%-65%B 为基础, 对梯度条件进行优化, 目的以提高保留时间较小的两种人参皂苷的分离度, 采用保持 2 min 等度洗脱的方式, 如表 5 所示, 优化时间程序中 0-2min 时 B%。

表 5 梯度条件优化设置 (柱温 55℃)

	2 min-初始浓度 (%)	5 min-终止浓度 (%)	Peak2 保留时间	Peak2 分离度
1	24		4.23	0.7
2	26		3.11	1.4
3	28	65	1.83	1.8
4	30		1.52	1.7

综合考虑 peak2 分离度和保留时间, 0-2 min 选择 28%可在合理的保留时间内获得更高的分离度, 再对 5 min 终止浓度进行考察, 如表 6。

表 6 梯度条件优化设置 (柱温 55℃)

	2 min-初始浓度 (%)	5 min-终止浓度 (%)	评价系统结果 S
1		75	75.4
2		70	77.5
3	28	65	79.4
4		60	80.1

通过对梯度条件的优化, 根据评价系统统计结果, 选择为 28-60%B 方式为最优方法。

梯度优化过程对初始浓度和终止浓度分别先后进行考察, 用尽可能少的步骤完成优化过程。

2.6 分析条件的确定

通过 HPLC 方法开发系统对 6 种人参皂苷的 UHPLC 分析方法进行探索, 经过两种实际样品 (高丽红参, 生脉注射液) 验证, 将终止浓度调整到 55%可以提高实际样品中极性较小区域杂质的分离度, 因而最终确定的液相色谱分析条件为:

色谱柱: Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

流动相: A 相-水, B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

检测波长: 203 nm

柱温: 55℃

进样量: 3 μL

梯度洗脱时间程序: 表 5

表 6 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	28
2.00	Pumps	Pump B Conc.	28
4.50	Pumps	Pump B Conc.	55
7.00	Pumps	Pump B Conc.	55
7.01	Pumps	Pump B Conc.	28
9.00	Controller	Stop	

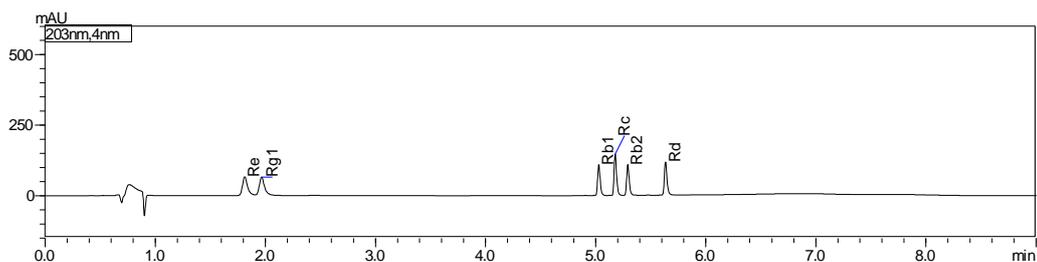


图 6 6 种人参皂苷对照品溶液 UHPLC 色谱图

2.7 含人参皂苷的中药及制剂样品分析结果

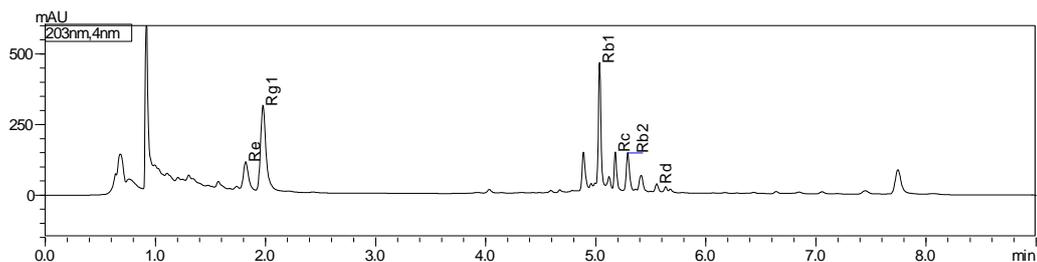


图 7 高丽红参甲醇提取液的 UHPLC 色谱图

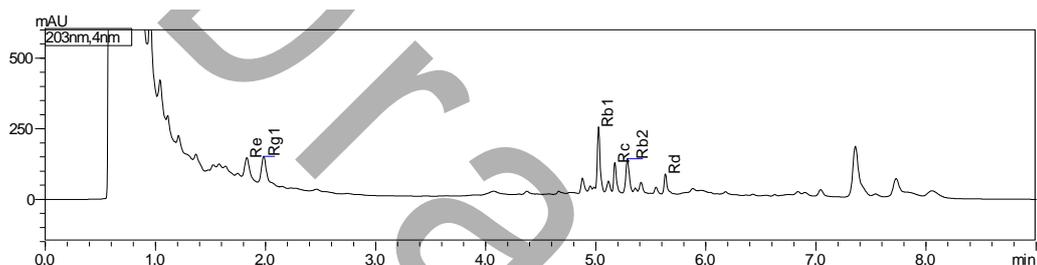


图 8 生脉注射液的 UHPLC 色谱图

3. 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统建立了 Re、Rg1 等 6 种人参皂苷超高效液相色谱分析方法，利用 Method Scouting Solution 工作站控制来自动实现色谱柱切换和流动相梯度比例调整，通过 Class-agent Report 报告生成软件自动进行分析结果中峰检出数和分离度综合评估从而筛选最优条件。分析结果显示，6 种人参皂苷在 10 分钟内实现基线分离，各峰分离度均能达到 1.5 以上，从而为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。