

使用安捷伦 1290 Infinity 2D-LC 系统分析中药注射液

应用

二维液相，中药，峰容量，UHPLC

作者

肖尧
安捷伦科技（中国）有限公司
北京

摘要

本文使用安捷伦 1290 Infinity 二维液相系统 (2D-LC) 开发了一个用于分析复杂中药成分的全二维液相方法，在较短的分析时间内大幅提高了方法的峰容量，为复杂样品体系的分析提供了新的解决方案和思路。

此方法使用安捷伦 1290 Infinity 2D-LC 系统及相应软件功能进行开发和编辑，方法使用简便，结合安捷伦 Zorbax 及 Poroshell 系列色谱柱，分析快速，结果重现，能够大幅提高中药等复杂样品的分离效率，可以进行更加快速准确的定性鉴别分析。

前言

中药化学成分分析是中药药效物质阐明及质量控制的关键问题之一，液相色谱分析 (HPLC) 是进行此类定性定量工作的主要手段。由于中药化学成分的复杂性，中药成分分析一直存在着分离难度大、分析时间长等问题，近十年来发展起来的超高效液相色谱 (UHPLC) 以及相应的液质联用技术极大提升了对此类复杂样品的分离能力及速度。但是随着此类研究的不断深入，对于中药复方体系的综合研究，相关的代谢疗效研究等都对仪器分析方法的分离效率提出了更高的要求，即使是 UHPLC 方法也难以在较短时间内提供分离此类复杂样品的足够峰容量。



Agilent Technologies

目前, 在使用一根色谱柱的前提下增加峰容量的主要两个手段有两种: 增加色谱柱长度、降低色谱柱填料粒径, 这两种手段对峰容量的提升比较有限, 而且都会显著增加方法运行时产生的压力, 通过增加柱长的方法还会增加分析时间, 对整体分析的效率提升不大。随着仪器技术的发展, 全二维液相色谱 (Comprehensive 2D-LC) 技术成为了在短时间内获得极高峰容量的手段, 为这类复杂样品的分析提供了更高效的解决方案。

本文使用了安捷伦全新的 1290 Infinity 二维液相 (2D-LC) 系统成功的对一个中药样品进行了全二维液相色谱分析, 该中药是一个由三味药材组成的复方, 经水解提取后制成中药注射液, 成分组成复杂, 即使使用较长的 UHPLC 色谱柱进行长时间分析也难以将样品中的组分进行良好分离, 在本文开发的全二维方法中, 利用了不同固定相及流动相选择性的差异, 在短时间内极大提高了分析方法的峰容量, 获得了更多的样品信息, 此方法分析迅速, 重现性良好, 为复杂中药样品的分析提供了新的思路和解决方案。

实验

仪器及试剂:

仪器:

安捷伦 1290 2DLC 系统, 具体配置如下
安捷伦 1260 Infinity 二元泵 (第一维)
安捷伦 1290 Infinity 二元泵 (第二维)
安捷伦 1290 Infinity 自动进样器
安捷伦 1290 Infinity 柱温箱
安捷伦 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (两台)
安捷伦 1290 Infinity Flex Cube 多功能模块
安捷伦 1200 Infinity 双 2 位/4 通阀
安捷伦 6224 飞行时间质谱
安捷伦 ChemStation 软件 (配置 2DLC 功能插件)
安捷伦 MassHunter 软件
LC×LC 二维色谱数据处理软件 (HRMS 版, GCImage Inc.)

试剂:

实验用超纯水由 Milli-Q (Millipore Inc.) 纯水机制备; 甲醇, 乙腈均为 HPLC 级, 采购于迪马公司; 乙酸铵, 乙酸, 甲酸均为 HPLC 级, 采购于百灵威公司。

样品处理:

样品为中药注射液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后直接进样分析。

液相方法

第一维

色谱柱: Agilent Zorbax SB Aq (2.1 x 100 mm, 1.8 μm)
流动相: A: 含 10 mmol/L 乙酸铵和 10 mmol/L 乙酸的水溶液;
B: 50% 甲醇水溶液, 梯度洗脱 (表 1)
流速: 0.06 mL/min

表 1. 第一维梯度时间表

Time	0	5.5	10	53	60
B%	0%	0%	1%	100%	100%

柱温: Temperature 30 °C
进样量: 5 μL
检测波长: 254 nm; 参比波长 360/100 nm
采样速率: 40 Hz

第二维

色谱柱: Agilent Poroshell120 SB C18 (3.0 x 50 mm, 2.7 μm)
流动相: A: 0.1% 甲酸水溶液; B: 乙腈, 梯度洗脱 (表 2)
流速: 2.0 mL/min
梯度时间: 0.45 min, 二维片段时间 (Modulation Time):
0.5 min (见图 1)

表 2. 第二维梯度时间表

时间 (min)	0	0.1	0.45
0	0%	0%	10%
36	0%	0%	10%
55	5%	5%	25%

温度: 45 °C
样品环: 60 μL, 反冲方式
检测波长: 254 nm; 参比波长 360/100 nm
采样速率: 80 Hz

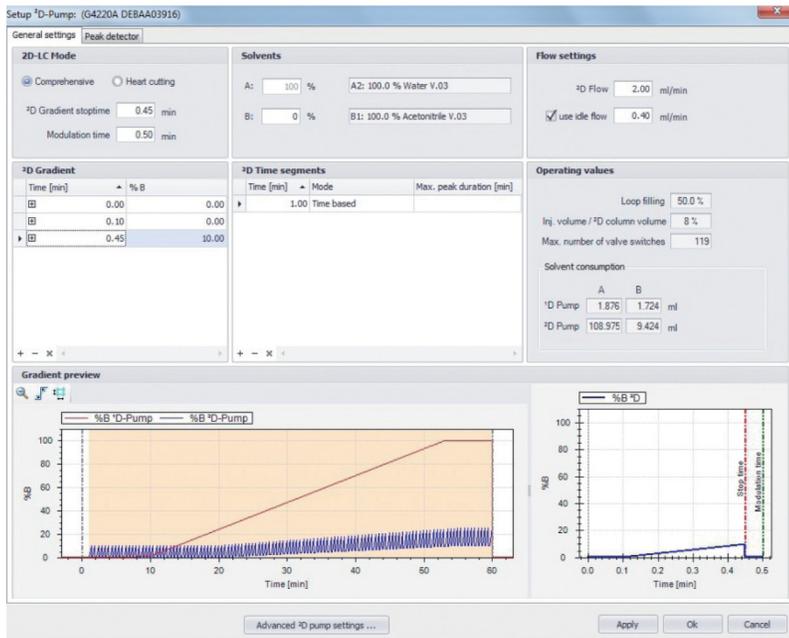


图 1. 第二维梯度方法编辑界面 (Agilent ChemStation 2DLC Software)

实验结果

图 2 是使用上述方法对样品进行 2D-LC 分析并使用 LC×LC (HRMS 版本 GCimage) 软件得到的等高散点数据图 (由 DAD 检测器 254 nm 数据处理得到), 图中每个数据点代表一个二维分析得到的色谱峰, 该点的横纵坐标分别代表其在第一维和第二维分析上的保留时间, 第一维为标准分析方法, 横坐标时间单位为分钟 (min), 第二维为超快速梯度分析, 纵坐标时间单位为秒 (s)。从图中可以看出数据点随机分散于图中较大的扇形区域内, 证明二维梯度条件均能让样品在各自维度上得到尽可能好的分离, 具有较好的正交性。

对相同样品进行了 5 次重复分析以考察方法的重现性, 以样品中强度较高的 9 个峰 (图 3) 为考察指标分别对第一维和第二维保留时间 (基于 DAD 数据结果) 进行了计算, 结果良好 (表 3), 证明此方法可以用于鉴别不同批次或工艺产品间组份组成的差异。

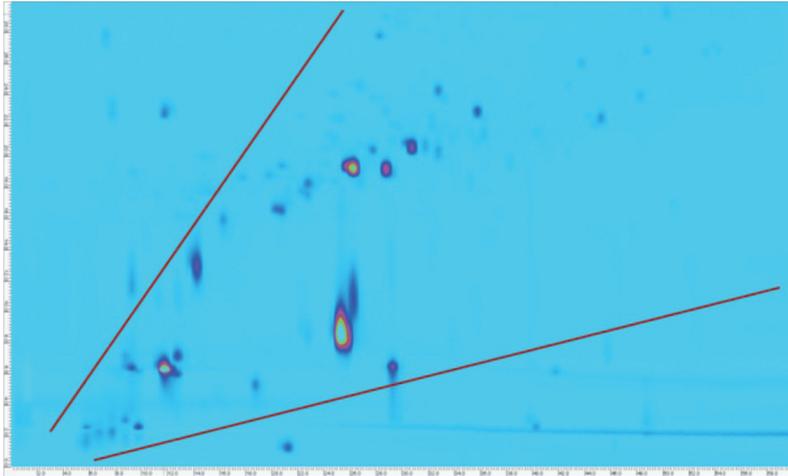


图 2. 样品 2DLC 分析等高散点图

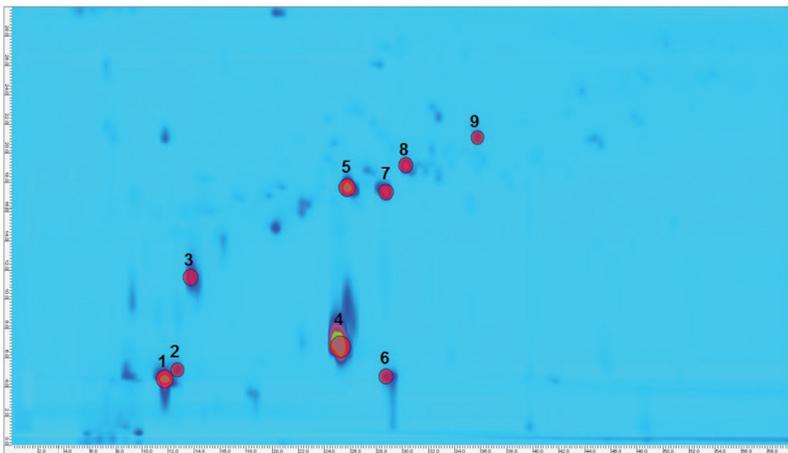


图 3. 9 个含量较高组分的散点标记图

表 3. 9 个含量较高组分保留时间重现性结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
第一维保留时间 RSD%	0.20	0.17	0.16	0.12	0.06	0.10	1.01	0.14	0.08
第二维保留时间 RSD%	2.18	2.62	1.50	1.66	0.34	0.40	0.92	0.14	0.64

讨论

在方法开发中，尝试使用了多种不同色谱柱作为第一维和第二维的组合，由于样品极性较强，所以最终选择使用 SB-Aq 色谱柱作为第一维色谱柱，这类色谱柱对强极性化合物有较好保留并且可以长时间耐受高水相比率的流动相冲洗，使用 50% 甲醇作为第一维流动相，可以使样品进一步获得更好的保留（图 4A）。从图 4A

中也可以看出，此样品成分复杂，仅仅使用一根色谱柱进行一维分离，很难对各个组份得到有效的分离，图中三组含量较大的峰很难达到基线分离，会严重影响定性定量分析的准确性，如果使用全二维分析方法，可以使第一维中难以达到基线分离甚至完全无法分离的组分在第二维色谱柱上得到完全分离，从图 4B 中可以看出，在第一维保留时间（横坐标）相同的色谱峰可以在第二维（纵坐标）上完全分离。

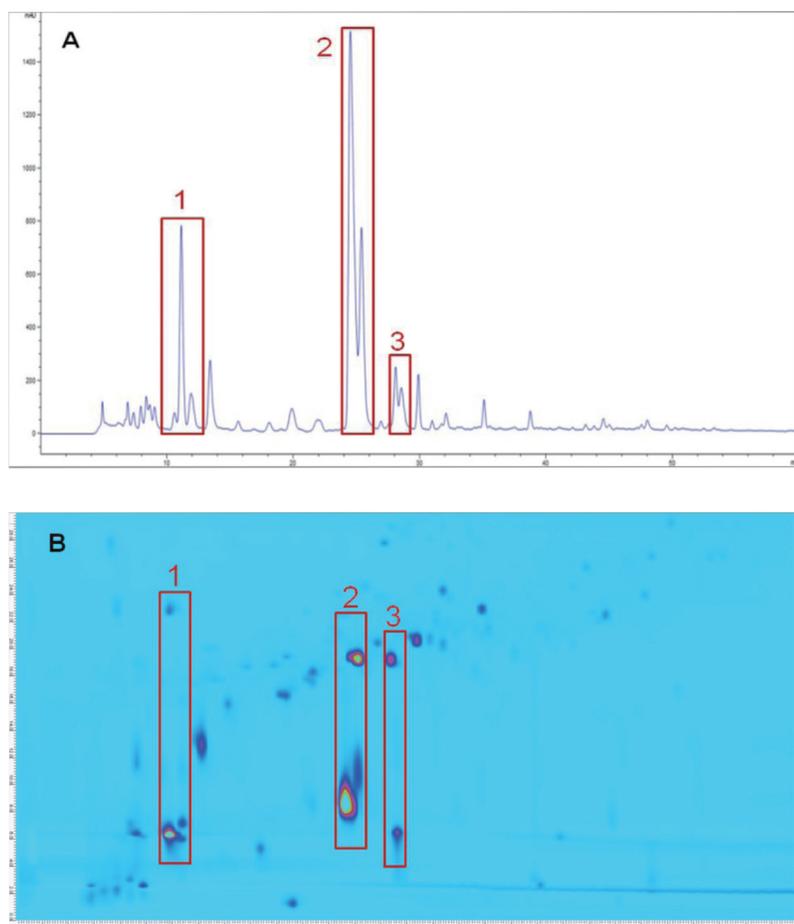


图 4. 样品第一维分析色谱图，DAD 检测器 254 nm
A: 一维分析色谱图；B: 二维分析散点图

在二维分析中，为了尽可能提高两维分析的正交性以提高方法的整体分离效果，使用了与第一维选择性差异较大的 PoroShell SB C18 色谱柱，并使用乙腈作为流动相。同时使用了 2D-LC 软件的功能对二维方法的梯度进行了优化，由图 5 可以看出，二维使用大比例跨度的固定梯度 (Full-in-fraction, FIF 模式) 会导致色谱峰在第二维保留很弱，降低整体分辨率 (图 5A)，如果对第二维梯度进行适当优化，按照化合物的保留状况，使用阶梯梯度

(Segment-in-fraction, SIF 模式)，可以改善第二维色谱峰的保留状况 (图 5B)，最后根据第二维色谱峰分布状况，进行进一步优化，使用从动梯度 (Shift Gradient 模式) 的设置，可以进一步改善第二维分析的峰型，减小峰在第二维分析中的展宽，使大部分峰在第二维分析上尽可能压缩为一个圆形的点，从而提高方法的分辨率 (图 5C)。

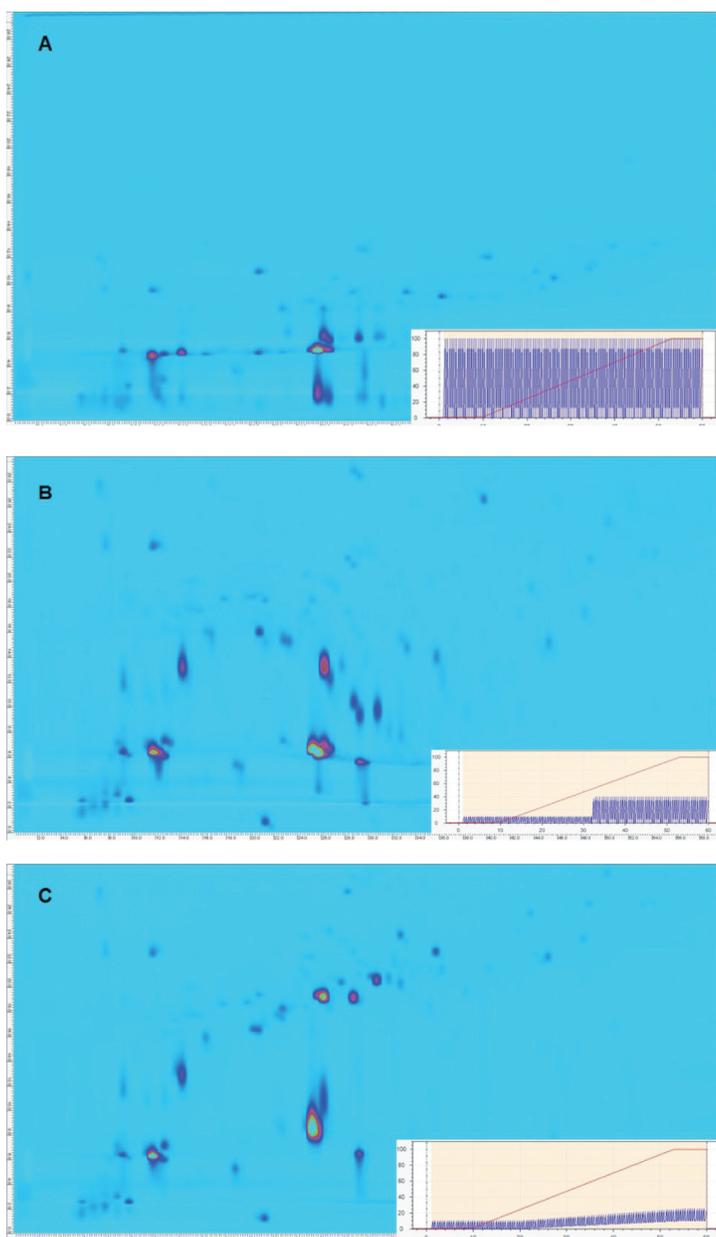


图 5. 第二维梯度优化结果

A: 使用固定梯度; B: 使用阶梯梯度; C: 使用从动梯度

更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务，请访问我们的网站: www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

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。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014年1月21日，中国印刷
5991-3913CHCN



Agilent Technologies