

Nexera LC-30A 方法开发系统在金莲花 6 种中药成分 UHPLC 分析方法建立上的应用

LC-140

摘要： 本文建立了一种使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统对金莲花 6 种中药成分的高效液相色谱快速分析条件进行了优化。该方法开发系统实现了液相色谱分析方法开发过程中色谱柱和流动相的自动切换和搭配，节省了液相色谱分析方法开发的时间。并对所得色谱图结果进行了综合评价，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。对该方法微调后建立了样品定量检测方法。

关键词： 超高效液相色谱方法开发系统金莲花

金莲花是多年生草本植物毛茛科金莲花属的干燥花及花蕾，在我国北方和西南地区多有分布。金莲花入药历史悠久，清代赵学敏所著的《本草纲目拾遗》，谓其“味苦、性寒、无毒”，可治口疮、喉肿、浮热牙宣、耳疼、目痛，并具有明目、解岚障之功效。近年来，国内外学者在生药学及药物化学研究基础上，对金莲花药效学等方面进行了大量研究，发现金莲花具有抑菌、抗病毒、抗氧化及治疗呼吸道和泌尿道感染等药理活性。其主要有效成分是黄酮类化合物，含有苈草苷、牡荆苷、槲皮素等成分。

岛津 Nexera UHPLC LC-30A 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比选择从而实现原本需要人力干预才能完成的分析方法开发优化的过程。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，利用 Class-agent report 软件对结果进行自动评价。本文使用该系统，自动筛选合适的色谱柱和流动相比例并建立了快速检测苈草苷、牡荆苷、异苈草苷、异槲皮素、金丝桃苷和金合欢素 6 种金莲花成分的 UHPLC 分析方法。

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-20A5R×2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含高压流路切换阀 FCV-34AH)，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)。

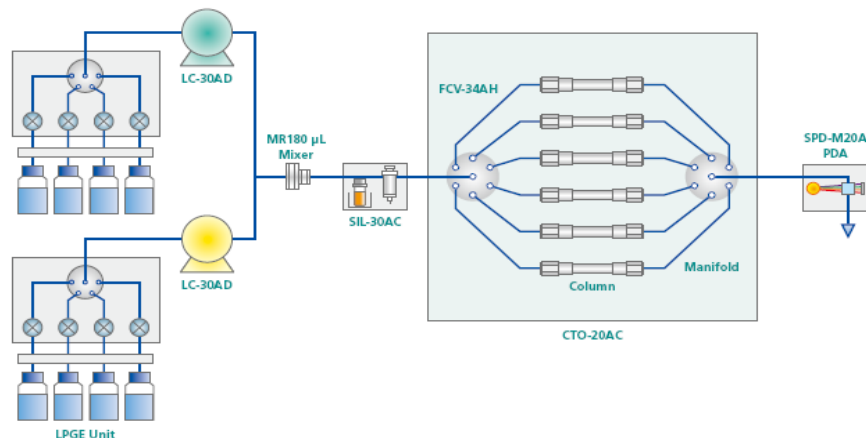


图 1 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统硬件构成平面图

1.2 分析条件

1.2.1 方法建立的流程

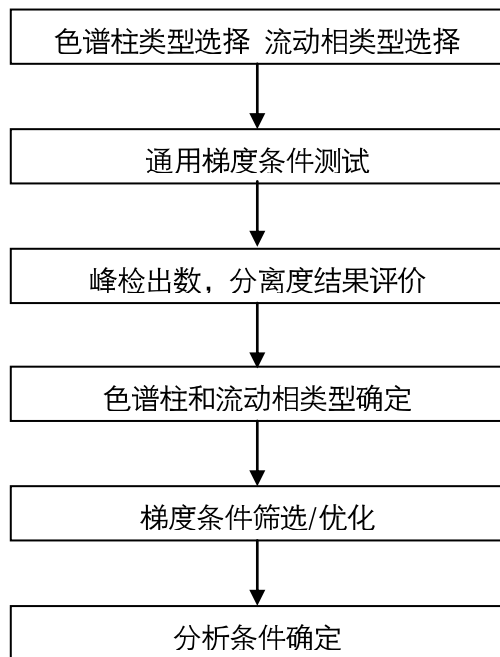


图2 应用方法开发系统进行色谱方法建立的流程

1.2.2 液相色谱条件

色谱柱：Inertsil ODS-P2.1mmI.D.×150 mmL., 3 μm
Shim-pack HR-ODS 3.0 mmI.D.×150 mmL., 3 μm
Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

结果讨论

2.1 通用梯度优化结果

初步优化时的通用梯度洗脱时间程序如下表，Class-agent report 软件根据峰检出数和分离度自动综合评判得到的分析评价结果如图。

表1 通用梯度洗脱时间程序(柱温 40 °C)

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	10
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
16.00	Pumps	Pump B Conc.	65
20.00	Pumps	Pump B Conc.	65
20.01	Pumps	Pump B Conc.	10
26.00	Controller	Stop	

流动相：A1：水

A2：水（0.1% 甲酸）

A3：水（5mM 乙酸铵）

B1：甲醇

B2：乙腈

B3：甲醇 / 乙腈 =1:1

流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：35°C

洗脱方式：梯度洗脱

检测波长：348 nm

1.3 标准品及样品制备

分别称取适量荭草苷、牡荆苷、异荭草苷、异槲皮素、金丝桃苷、金合欢素，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 0.1、0.5、1、5、10、100 μg/mL 的标准溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

金莲花粉末适量置入 50 mL 容量瓶加甲醇至 2/3 处超声 30min 后加甲醇至刻度，取 1 mL 上清液加 1 mL 超纯水稀释后振荡均匀过 0.22 μm 膜备用。

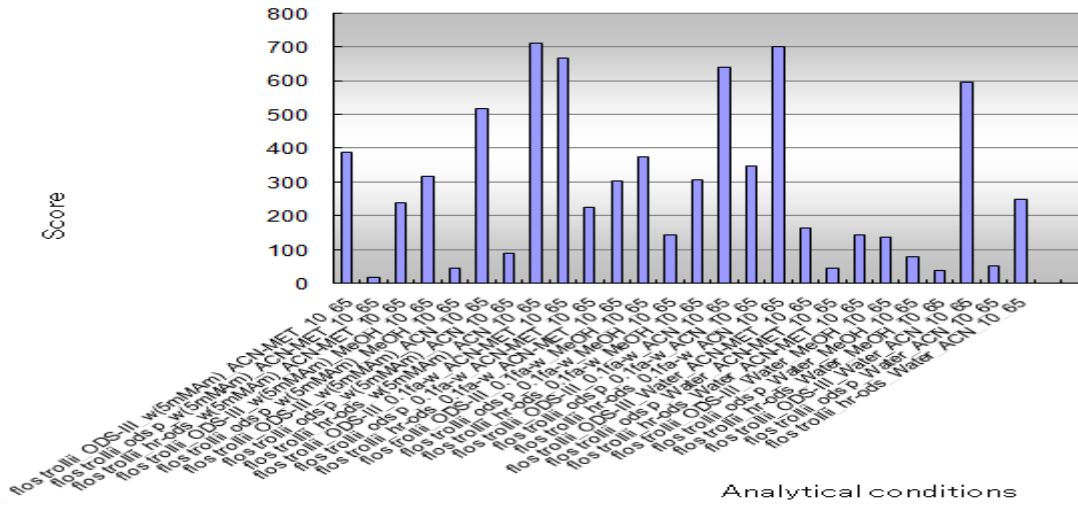


图 3 通用梯度分析结果评价

其中部分色谱图如下所示:

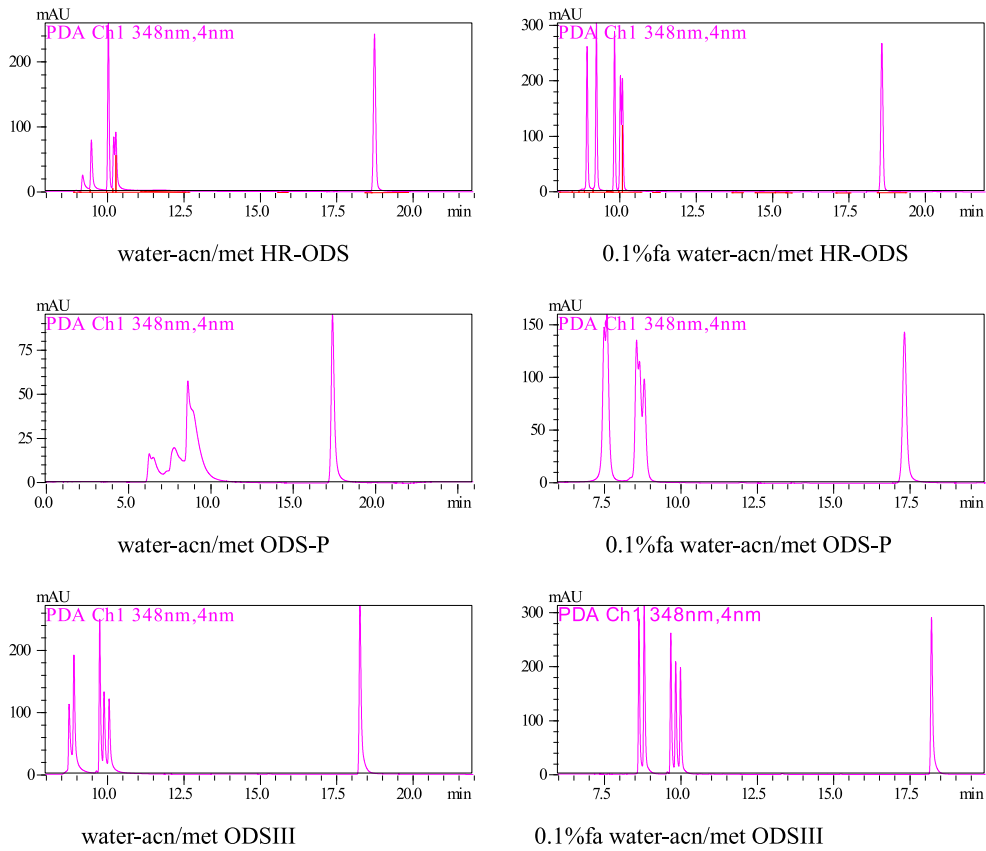


图 4 6 种化合物在通用梯度条件下的部分色谱图

根据以上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：

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

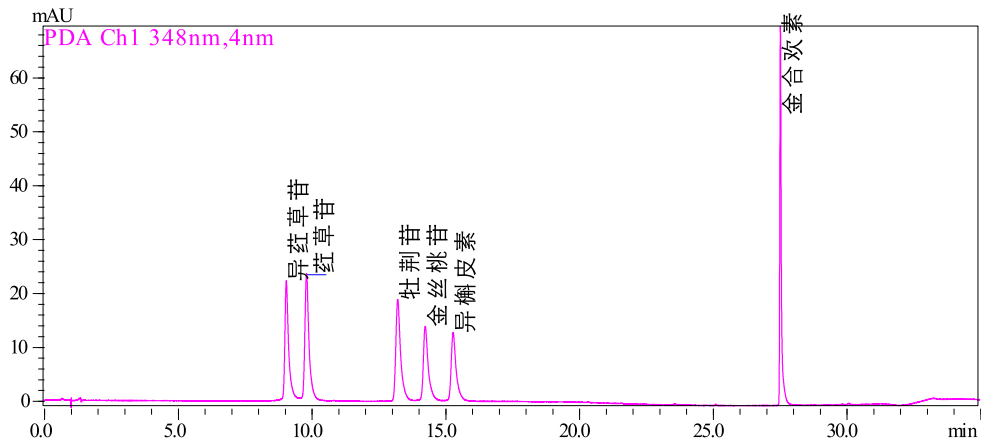


图 6 66 种金莲花成分对照品溶液 UHPLC 色谱图

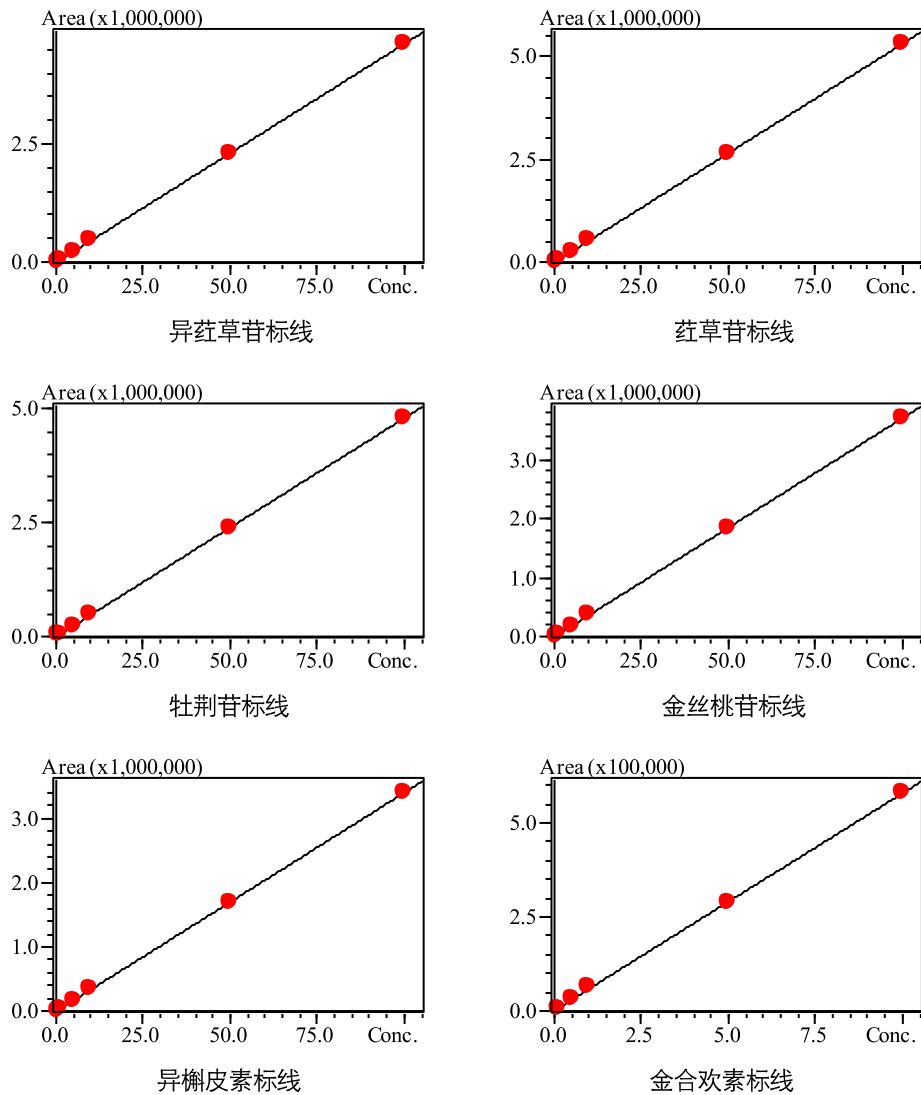


图 7 六种化合物标准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r
1	异荭草苷	$Y = (46318.9)X + (-9269.00)$	0.5~100	0.9999
2	荭草苷	$Y = (53209.3)X + (-6950.37)$	0.5~100	0.9999
3	牡荆苷	$Y = (47982.1)X + (-1947.03)$	0.5~100	0.9998
4	金丝桃苷	$Y = (37056.8)X + (-5254.03)$	0.5~100	0.9999
5	异槲皮素	$Y = (34080.8)X + (-5806.34)$	0.5~100	0.9999
6	金合欢素	$Y = (57152.0)X + (2637.66)$	0.1~10	0.9998

2.6 精密度实验

按照与标液相同配制方法配制浓度为 0.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 的样品，分别平行进样 7 次，化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01~0.12 % 和 0.08~2.52 % 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

样品名称	RSD% (0.5 $\mu\text{g/mL}$)		RSD% (5 $\mu\text{g/mL}$)	
	R.T	Area	R.T	Area
异荭草苷	0.10	1.90	0.03	0.34
荭草苷	0.12	0.90	0.07	0.37
牡荆苷	0.08	1.01	0.02	0.08
金丝桃苷	0.08	2.52	0.02	0.33
异槲皮素	0.08	1.58	0.03	0.42
金合欢素	0.01	0.63	0.01	0.21

2.7 实际样品检测结果

称取某产地金莲花样品适量，研磨成粉末按照 1.3 所述进行提取。提取液的分析谱图和结果分别如下所示：

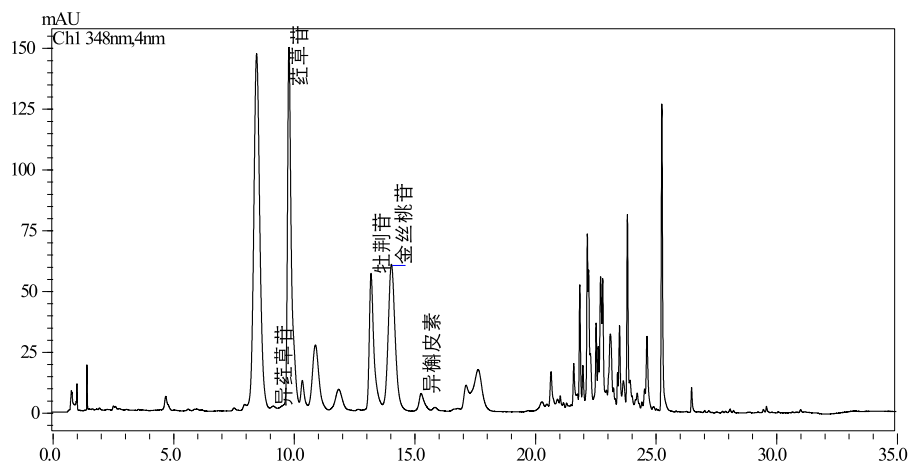


图 8 金莲花样品提取液色谱图

表 5 金莲花检测结果

检测成分	英文名	CAS号	测量值 (mg/L)
异荭草苷	Isoorientin	4261-42-1	0.37
荭草苷	Orientin	28608-75-5	34.33
牡荆苷	Apigenin8-C-glucoside	3681-93-4	16.48
金丝桃苷	Hyperoside	482-36-0	33.02
异槲皮素	Isoquercitrin	482-35-9	3.56
金合欢素	Acacetin	480-44-4	-

■ 结论

使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统建立了荭草苷、牡荆苷、异荭草苷、异槲皮素、金丝桃苷、金合欢素 6 种金莲花成分的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。为该中药的液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。