

HPLC 方法开发系统在建立 4 种水飞蓟素 UHPLC 分析方法上的应用

LC-111

水飞蓟素是从水飞蓟种子中提取的黄酮木酯素化合物的混合物，具有保肝、抗氧化和降血脂的作用，主要包括水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁等。其中水飞蓟宾、异水飞蓟宾均含有一对非对映异构体，因此，对 HPLC 分析水飞蓟素条件的建立带来一定的困难。该样品的传统 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此类样品的分析显得尤为重要。

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选择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。专用 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体系及梯度建立了快速检测四种水飞蓟素共计 6 个化合物的 UHPLC 分析方法。

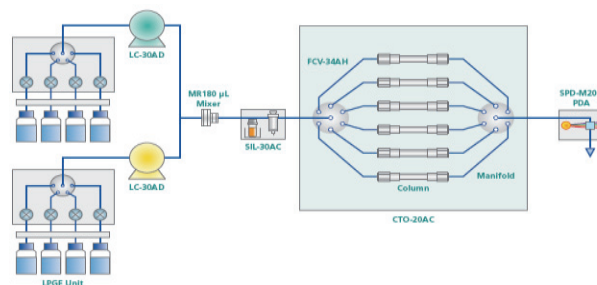


图 1 方法开发系统流路示意图

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 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. 5.54 SP1 (色谱工作站)。

表 1 4 种水飞蓟素信息

#	名称	英文名	CAS 号	分子式	备注
1	水飞蓟宾	Silybin	245-302-5	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	非对映异构体
2	异水飞蓟宾	Isosilybin	72581-71-6	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	非对映异构体
3	水飞蓟亭	Silychristin	33889-69-9	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	
4	水飞蓟宁	Silydianin	2288-70-6	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 µm

Inertsil ODS-4 2.1 mmI.D.×50 mmL., 3 µm

Inertsil ODS-SP 2.1 mmI.D.×100 mmL., 3 µm

Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×75 mmL., 1.6 µm

流动相：A1 相-水

A2 相-0.1% 甲酸水溶液

B1 相-乙腈

B2 相-甲醇

B3 相-乙腈-甲醇 (1:1, V/V)

流速：0.4 mL/min

进样体积：2 µL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱

检测波长：288 nm

1.3 样品制备

甲醇溶解并稀释水飞蓟宾，异水飞蓟宾，水飞蓟亭，水飞蓟宁四种对照品得浓度为 50 µg/mL 的混合标准溶液，经 0.22 µm 滤膜过滤后进样分析。

结果与讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以表 2 所示的通用梯度时间程序对色谱柱和流动相体系进行测试。

表 2 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.51	Pumps	Pump B Conc.	10
5.50	Controller	Stop	

共进行 $2 \times 3 \times 4 = 24$ 次快速液相分析，获得通用测试条件下各色谱柱和流动相体系的样品色谱保留行为。

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，为避免较高分离度值过分影响计算结果，计算中各峰分离度大于 3 的以 3 记，不足 3 的以实际计算结果记。

表 3 通用梯度分析条件下分离结果评价

	Shim-pack XR-C8	Inertsil ODS-4	Inertsil ODS-SP	Shim-pack XR-ODS III
M.P A1-B1	18.3	11.9	10.4	18.8
M.P A1-B2	22.3	20.5	18.2	15.0
M.P A1-B3	23.3	21.3	21.2	25.2
M.P A2-B1	12.3	12.1	10.7	20.8
M.P A2-B2	23.3	21.6	18.3	23.6
M.P A2-B3	23.0	21.7	21.5	26.3

M.P: 流动相

根据通用梯度各分析条件下分析结果的评价，确定如下色谱柱和流动相体系：

色谱柱 : Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D. \times 75 mmL., 1.6 μ m

流动相 : A: 0.1% 甲酸水溶液 B: 乙腈 - 甲醇 (1:1, V/V)

2.3 梯度条件筛选

在确定本实验使用的色谱柱和流动相体系后，以通用分析条件为基础，以改善分离度为目的，对流动相的梯度变化方式进行考察，按表 4 优化梯度程序中的初始浓度和终止浓度，总共考察 $4 \times 4 = 16$ 种梯度条件。

表 4 梯度条件设置

	初始浓度(%)	2.50 min- 终止浓度(%)
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60

2.4 梯度条件筛选结果分析和评判

对 16 种梯度条件下 4 种水飞蓟素分析结果通过 Class-agent report 软件进行峰检出数和分离度自动综合评判。

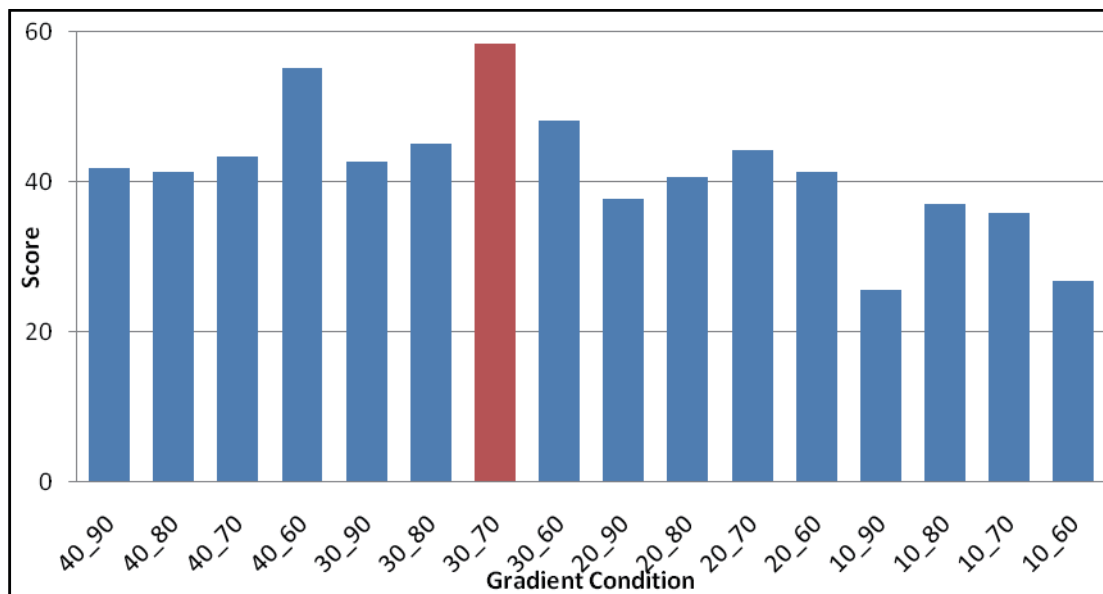


图 2 梯度条件筛选综合评价

根据分析结果评价系统统计结果，筛选出梯度条件为 30-70%B 进行下一步优化。

2.5 梯度条件优化

以 2.4 中确定的梯度条件 30-70%B 为基础，对梯度条件进行优化，优化方案如表 5 所示，共计进行 24 次分析，为增大各峰分离度，优化方法中适当延长梯度洗脱时间到 7 分钟。

表 5 梯度条件设置

初始浓度(%)	7 min-终止浓度(%)
	70
	65
	60
30	55
35	50
40	45
	40
	35

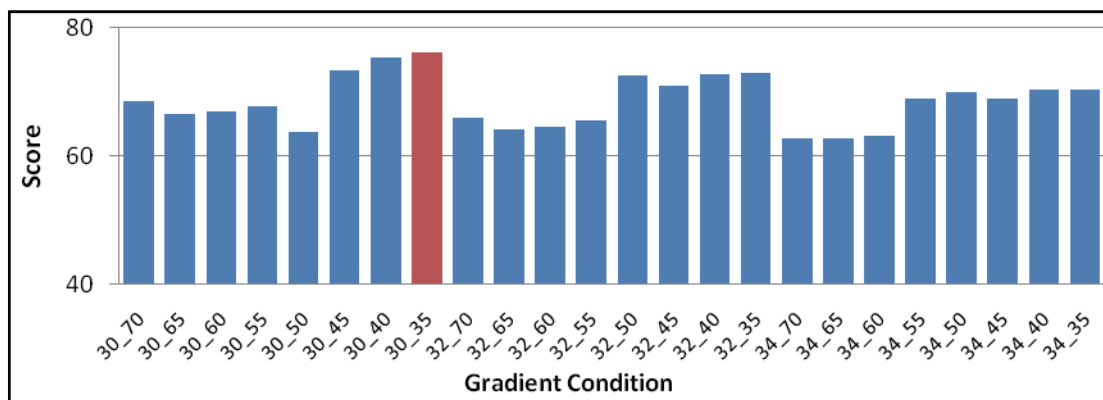


图 3 梯度条件优化综合评价

通过对梯度条件的优化, 根据评价系统统计结果, 选择为 30–35%B 方式为最优方法。

2.6 分析条件的确定和样品分析结果

通过 Nexera LC-30A 方法开发系统, 对 4 种水飞蓟素进行 UHPLC 分析方法探索, 经过评价系统综合评定, 最终确定的液相色谱分析条件为:

色谱柱 : Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. × 75 mm L., 1.6 μm

流动相 : A 相 - 0.1% 甲酸水溶液, B 相 - 乙腈 - 甲醇 (1:1, V/V)

流速 : 0.4 mL/min

检测波长 : 288 nm

柱温 : 40°C

进样量 : 2 μL

梯度洗脱时间程序 : 表 7

表 6 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	30
7	Pumps	Pump B Conc.	35
7.01	Pumps	Pump B Conc.	40
10.5	Pumps	Pump B Conc.	40
10.51	Pumps	Pump B Conc.	30
12	Controller	Stop	

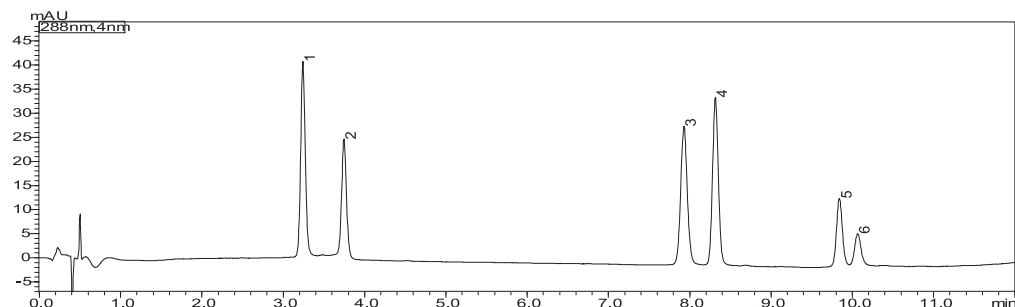
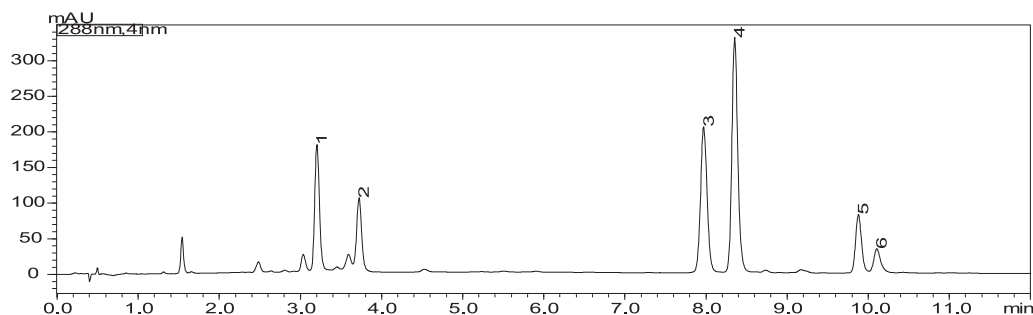


图 4 4 种水飞蓟素对照品溶液 UHPLC 色谱图

1.水飞蓟亭 2. 水飞蓟宁 3.4.水飞蓟宾 A+B 5.6. 异水飞蓟宾 A+B

2.7 水飞蓟相关样品的分析



a)

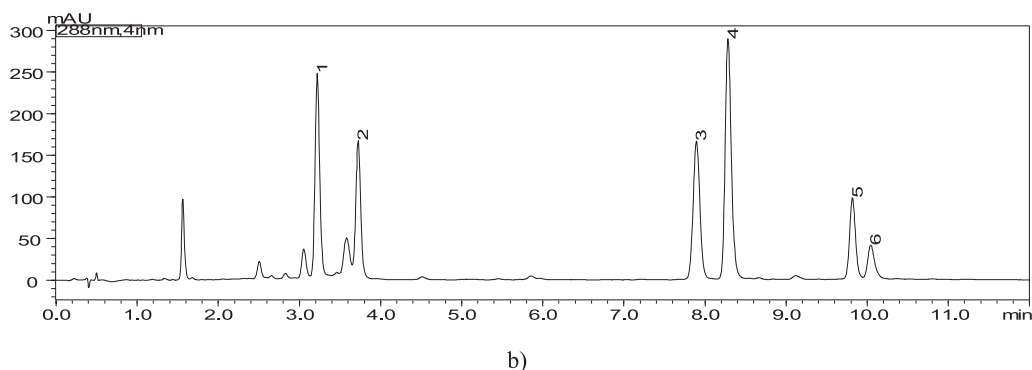


图 5 a)水飞蓟素片提取溶液 UHPLC 色谱图 b)乳蓟提取物甲醇水溶液 UHPLC 色谱图
 1. 水飞蓟亭 2. 水飞蓟宁 3.4. 水飞蓟宾 A+B 5.6. 异水飞蓟宾 A+B

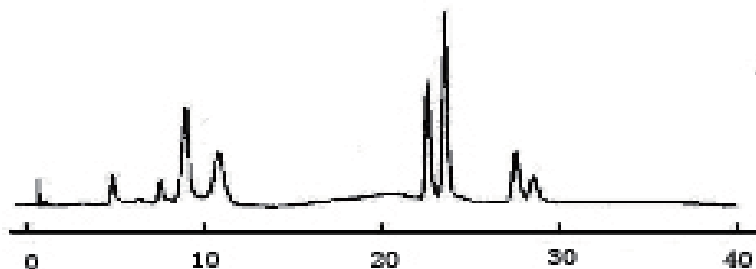


图 6 常规液相方法检测水飞蓟素色谱图

结论

使用岛津 Nexera LC-30A 方法开发系统建立了 4 种水飞蓟素的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，12 分钟内实现 4 种水飞蓟素共计 6 个同分异构体（其中包括两对非对映异构体）的基线分离，各峰分离度均能达到 1.5 以上，对于通过质谱检测获得的质量数色谱图而言，同分异构体尤其是非对映异构体可以满足定量分析的要求，从而为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。