

独活配方颗粒 UHPLC 特征图谱测试

高绪来

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽 合肥 230088)

摘要: 供试品经前处理后用 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 以甲醇、水为流动相, 梯度洗脱, 使用 C18 色谱柱进行分离, 超高效液相色谱 DAD 检测器检测。

关键词: 独活配方颗粒; UHPLC

1 试剂和材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

1.1 试剂材料

1.1.1 甲醇 (CH₃OH): 色谱纯。

1.1.2 有机系过滤头: 孔径为 0.22 μ m。

1.2 试剂配制

1.2.1 甲醇溶液 (70%): 量取 70mL 甲醇, 加水定容至 100mL, 混匀。

1.3 参照物及供试品

1.3.1 蛇床子素对照品: 购于诗丹德。

1.3.2 二氢欧山芹醇当归酸酯对照品: 购于诗丹德。

1.3.3 独活配方颗粒: 购自北京康仁堂药业有限公司, 批号 20032491。

1.4 参照物及供试品制备

1.4.1 参照物溶液的制备: 分别称取蛇床子素 8.4mg, 二氢欧山芹醇当归酸酯 10.6mg 于两个 25mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀。分别取上述溶液 0.60mL、0.05mL 于 10mL 容量瓶中, 70%甲醇溶液稀释并定容至刻度, 摇匀, 0.22 μ m 滤头滤过, 取续滤液, 即得。

1.4.2 供试品溶液的制备: 取本品 0.2078g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 20mL, 称定质量 (116.4617g), 超声处理 20min, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 0.22 μ m 滤头滤过, 取续滤液, 即得。

2 仪器设备

2.1 皖仪超液相色谱仪: 配 DAD3600 检测器。

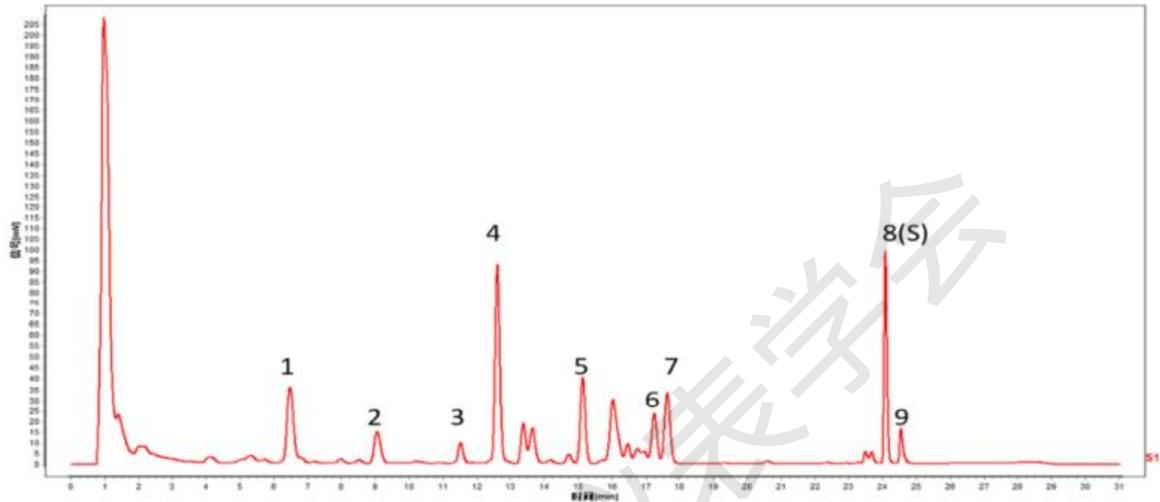
2.2 电子天平：感量为 0.1 mg。

2.3 超声波清洗器。

2.4 涡旋振荡器

2.5 溶剂过滤器：滤膜孔径约为 0.22 μ m

3 药典标准谱图



峰 8 (S)：蛇床子素；峰 9：二氢欧山芹醇当归酸酯。

4 实验过程记录及结果分析

4.1 仪器条件

色谱柱：Agilent Extend C18(2.1*100, 1.8 μ m)。

流动相：甲醇为流动相 A，水为流动相 B，进行梯度洗脱。

时间	A (%)	B (%)
0~2	30→35	70→65
2~10	35→45	65→55
10~18	45→51	55→49
18~23	51→90	49→10
23~25	90	10

流速：0.3mL/min。

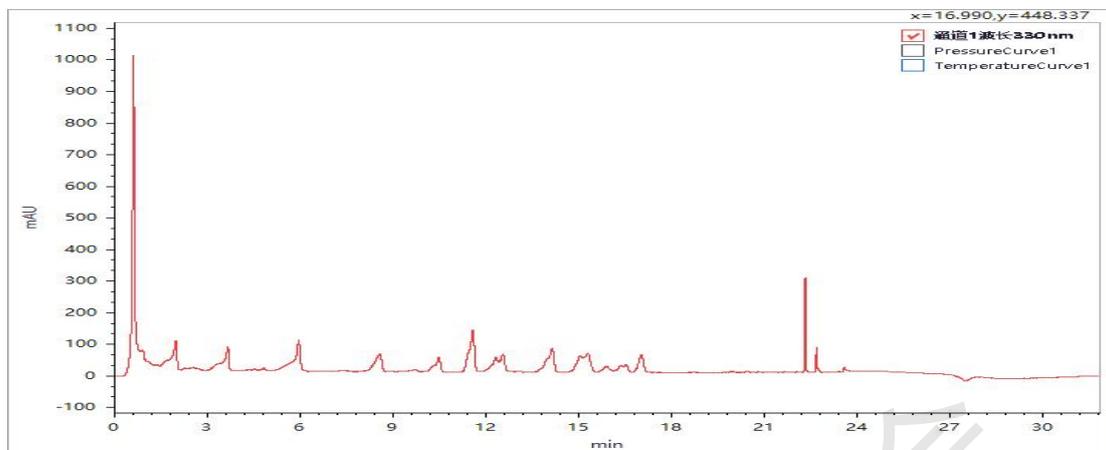
波长：330nm。

柱温：35 $^{\circ}$ C。

进样量：5 μ L。

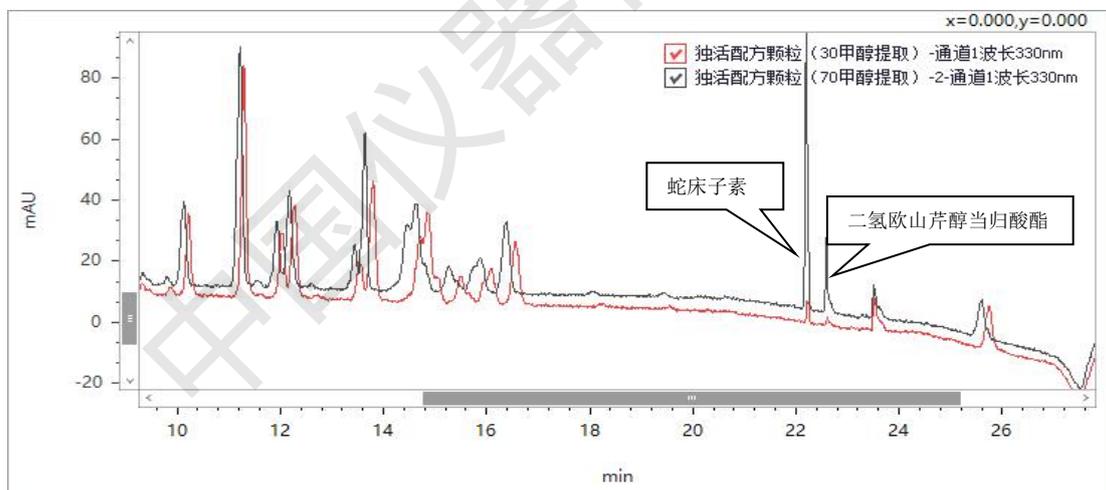
4.2 实验结果及分析

4.2.1 按照药典仪器方法进样，供试品谱图如下：



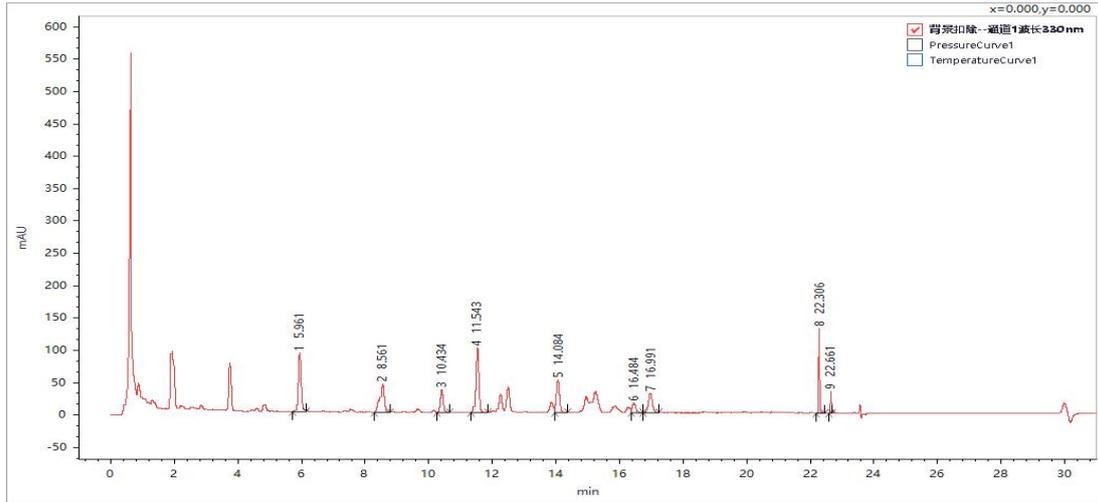
分析：在该色谱条件下，供试品前处理采用 70%甲醇溶解，流动相初始浓度为 30%甲醇，当进样量为 5 μ L 时，色谱峰前延。分析原因可能是：1、溶剂选择不合适；2、样品过载；3、色谱柱损坏。考虑到色谱柱为新购入，且已做验收，遂排除色谱柱因素。所以主要考虑更换供试品溶剂及降低进样量两个因素。

4.2.2 更换供试品溶剂：仪器条件同 6.1，供试品前处理溶剂 70%甲醇更换为 30%甲醇（与流动相初始浓度保持一致），谱图如下：



分析：从上图可以看出，采用 30%甲醇溶液对供试品进行前处理，峰形前延无明显改善，且用 30%甲醇提取样品不完全，蛇床子素与二氢欧山芹醇当归酸酯峰响应值相较 70%甲醇做溶剂时明显变低。

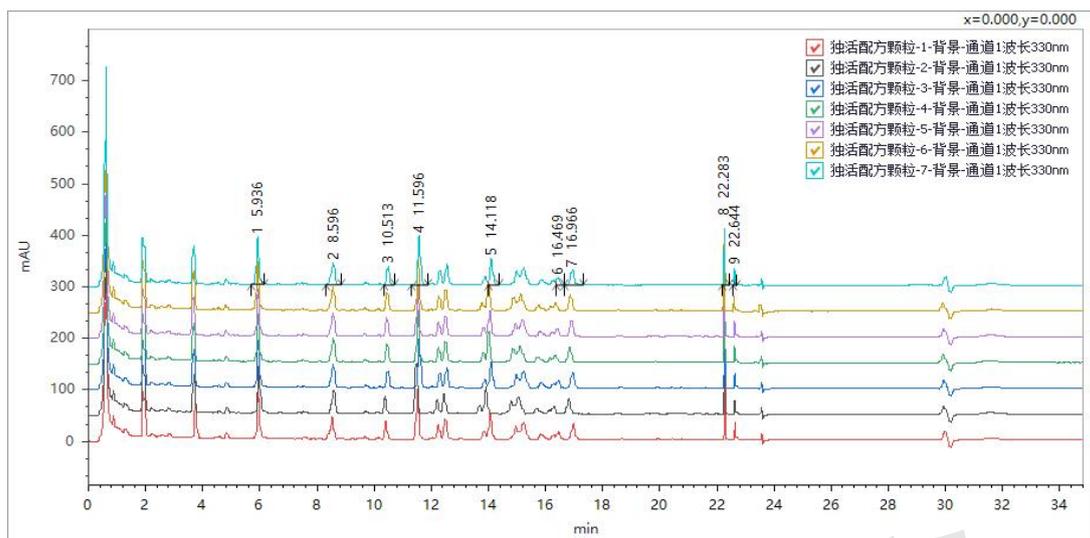
4.2.3 降低进样量：将进样量有 5 μ L 更换为 2 μ L，谱图如下：



分析：此条件下，前延峰得到很好解决。且各特征峰与 S 峰相对保留时间满足药典要求（以峰 8 蛇床子素为 S 峰，计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内）。

峰序号	保留时间	相对保留时间	标准规定值	偏差(%)
1	5.961	0.27	0.27	0.0
2	8.561	0.38	0.38	0.0
3	10.434	0.47	0.48	-2.1
4	11.543	0.52	0.53	-1.9
5	14.084	0.63	0.63	0.0
6	16.484	0.74	0.72	2.8
7	16.991	0.76	0.74	2.7
8 (S 峰)	22.306	1.00	1.00	0.0
9	22.661	1.02	1.02	0.0

4.2.4 重复性实验：取供试品溶液，连续检测 7 次，获得特征图谱，计算峰面积及保留时间 RSD 值。重叠谱图如下：



峰面积重复性:

峰序号	峰面积							平均值	SD	RSD (%)
	独活 1	独活 2	独活 3	独活 4	独活 5	独活 6	独活 7			
1	600.924	607.194	603.491	605.82	600.14	600.47	605.605	603.378	2.900	0.48
2	390.875	385.994	396.334	387.897	390.977	391.478	389.568	390.446	3.248	0.83
3	231.357	230.959	229.547	231.42	231.27	230.753	230.13	230.777	0.702	0.30
4	659.358	660.82	648.274	658.489	650.264	665.457	664.365	658.147	6.588	1.00
5	379.516	376.423	379.062	375.634	380.08	382.249	382.653	379.374	2.656	0.70
6	120.182	120.475	117.985	121.89	123.276	121.455	121.545	120.973	1.659	1.37
7	266.696	266.515	268.356	264.615	271.699	269.106	270.44	268.204	2.452	0.91
8	311.008	311.194	311.553	308.5	311.914	313.847	313.58	311.657	1.788	0.57
9	72.504	70.851	71.932	70.89	72.021	71.934	73.06	71.885	0.801	1.11

保留时间重复性:

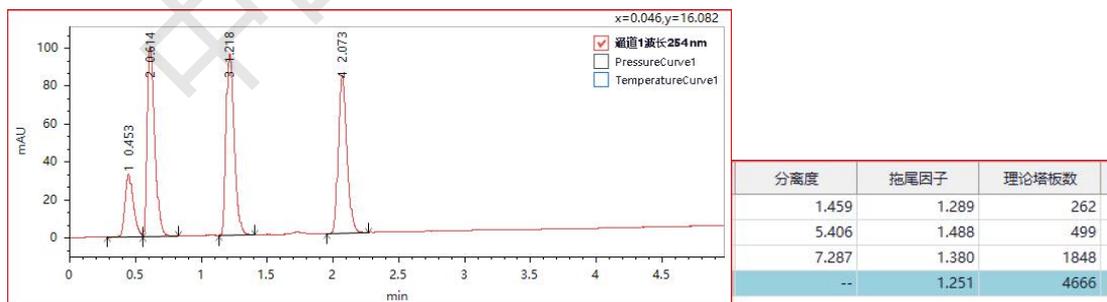
峰序号	保留时间							平均值	SD	RSD (%)
	独活 1	独活 2	独活 3	独活 4	独活 5	独活 6	独活 7			
1	5.961	5.984	5.959	5.954	5.953	5.938	5.936	5.955	0.016	0.27
2	8.561	8.616	8.596	8.601	8.591	8.588	8.596	8.593	0.017	0.20
3	10.434	10.406	10.509	10.478	10.469	10.481	10.513	10.470	0.039	0.37
4	11.543	11.496	11.601	11.556	11.553	11.568	11.596	11.559	0.035	0.30
5	14.084	13.929	14.111	14.026	14.069	14.016	14.118	14.050	0.066	0.47
6	16.484	16.318	16.476	16.358	16.429	16.378	16.469	16.416	0.065	0.40
7	16.991	16.834	16.973	16.868	16.926	16.891	16.966	16.921	0.059	0.35
8	22.306	22.291	22.296	22.284	22.286	22.254	22.283	22.286	0.016	0.07
9	22.661	22.649	22.653	22.643	22.646	22.616	22.644	22.645	0.014	0.06

5 实验讨论

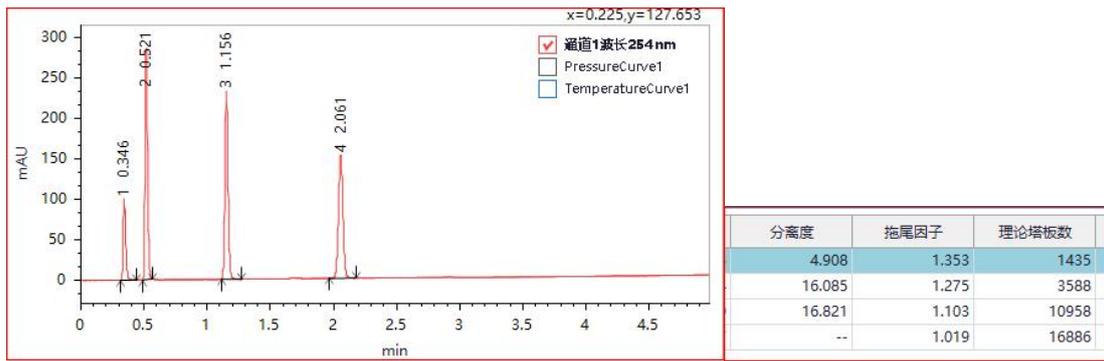
5.1 实验过程中发现, 当 Wash 管路溶液为甲醇时, 产生溶剂效应, 导致供试品色谱峰前延, 将甲醇更换为流动相初始浓度溶液时, 峰形正常。Wash 管路溶液与进样针内壁无接触, 理论上不会对峰形产生影响。此现象涉及仪器内部构造, 需与研发探讨解决方案。

5.2 色谱柱前后管路的连接对结果的影响。若没有采用合适孔径的管路、死体积没有得到有效控制, 会导致分离度达不到要求, 且色谱峰理论塔板数降低。

更换色谱柱前后连接管路前:



更换合适连接管路后:



5.3 药典方法梯度洗脱程序初始流动相比例与结束流动相比例不一致,可能会导致重复性不好。建议增加洗脱时间,回到初始流动相比例,平衡后再进行下一针分析。

参考文献:

[1] 药典公示稿《独活配方颗粒》。

中国仪器仪表学会