Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

将USP GC方法转换为合相色谱方法：分析颠茄

Paula Hong 和 Pat McConville
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德市）

应用优势

- UPC²™，作为气相色谱法的正交分离技术，适用于分析热不稳定的化合物
- 高通量，可在5 min内完成稳定分析
- 线性动态范围为10-400 µg/mL
- UPC²方法与用于鉴定未知组分的质谱法兼容

沃特世解决方案

配备PDA和SQD检测器的ACQUITY UPC²系统

ACQUITY UPC² BEH 1.7 µm色谱柱

Empower® 3 软件

关键词

UPC²，合相色谱法，生物碱，气相色谱法，USP方法转换

简介

颠茄是一种原产于欧洲南部和中部、非洲北部以及东亚地区的多年生植物。几个世纪以来，颠茄提取物一直用于治疗多种疾病，包括溃疡和其它胃肠功能紊乱，以及疼痛。它也是一种抗毒蕈碱药剂。该提取物主要由莨菪烷类生物碱、东莨菪碱和莨菪碱（阿托品）组成，这些成分不仅具有药效，也具有较高的毒性。这种利弊两面性使得提取物中这些生物碱的定量在安全性方面显得尤为关键。

目前，美国药典委员会(USP)方法针对颠茄提取物指定了一种气相色谱(GC)方法，该方法采用1.2 4.0 mm的玻璃柱，其中由涂覆3% G3的S1AB填充，以氦气作为载气。样品制备中需使用高挥发性的二氯甲烷作为稀释液。虽然此类分析物一般采用直接进样的方式，但是GC分析时所需的高温可能会导致东莨菪碱和阿托品脱水和转化为它们的载脂蛋白形式。[1]通常情况下，这些问题可通过衍生化反应解决。[2]本应用纪要证明USP方法可成功转换为合相色谱法。本实验采用超临界二氧化碳(CO_2)作为流动相，结合改性剂和添加剂，建立了一种可靠的定量方法用以替代GC，此外还提高了样品稳定性并简化了样品制备过程。

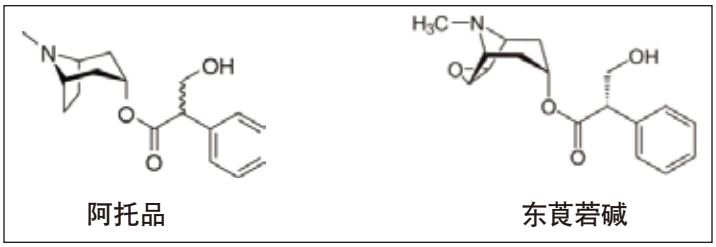

图1. 阿托品和东莨菪碱的结构。[3]

实验

样品描述

氢溴酸东莨菪碱(CAS号114-49-8)、阿托品游离碱(CAS号51-55-8)和氢溴酸后马托品(CAS号51-56-9)标准溶液均以异丙醇为溶剂。所有储备液浓度均配制为1 mg/mL。对储备液进行超声处理，确保溶解。采用东莨菪碱和阿托品储备液依次制备浓度为5、10、50、100、200和400 µg/mL的校准标准溶液，内标物(后马托品)浓度为50 µg/mL。

购买市售颠茄提取物，实验对颠茄提取物和空白基质进行了分析。提取物按照1:3的比例(4倍)，用异丙醇进行稀释。内标物(后马托品)浓度为50 µg/mL。在分析之前，用1 µm的玻璃过滤器过滤复合溶液。空白基质中加入100 µg/mL的阿托品、东莨菪碱，以及内标物(50 µg/mL)。

UPC² 条件

系统：	ACQUITY UPC²，配备PDA和SQD检测器
检测条件：	PDA(220 nm)，补偿410 nm至480 nm
样品瓶：	洁净的最大回收样品瓶，螺口(部件号186000327C)
样品过滤器：	Acrodisc，注射器过滤器，玻璃过滤器(部件号WAT 200819)
色谱柱：	ACQUITY UPC² BEH 3.0 × 100 mm，1.7 µm
柱温：	50 ℃
样品温度：	15 ℃
ABPR：	2000 psi(138 bar)
进样体积：	1 µL
流速：	2 mL/min
流动相A：	CO_2
流动相B：	含0.2%氢氧化铵(28%- 30%)的98:2(v/v)甲醇/水溶液
梯度：	流动相B在4.5 min内从10%增加至30%，在0.5 min内从30%增加至40%，在0.5 min内从40%降低至5%
弱洗针液：	2-丙醇
强洗针液、密封清洗液：	甲醇
平衡参数：	1 mL/min，100%流动相B

MS 条件

质谱仪：	ACQUITY® SQD，配有PCM II和515泵用于提供补充流量
分流器：	UPC² MS分流器
电离模式：	ESI+
采集范围：	70至500m/z
毛细管电压：	3
锥孔电压：	30
脱溶剂气：	500
补液流量：	0.4 mL/min甲醇
数据管理：	Empower 3软件

结果与讨论

已有大量文献报道过颠茄提取物的GC分析。UPC²方法学要求使用GC法对东莨菪碱和阿托品进行定量测定。 分析的适用性要求如下：

- 6-10次进样所得阿托品(A)与后马托品(H)的峰面积比值的相对标准差(RSD)应小于2%
- 后马托品与阿托品的USP分离度应大于3.0
- 阿托品的USP拖尾因子应小于2.0

为证明UPC²方法的等效性，本研究针对上述标准和方法的耐用性进行了评估。

UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²) 是一种使用超临界CO_2作为主要流动相的分离技术。在分析强碱性化合物时，需使用含碱性添加剂的改性剂，最大程度减少次级相互作用，改善峰形。[4]在分析阿托品(碱性)和东莨菪碱(中性)时，本实验采用甲醇作为共溶剂或改性剂在大量不同的固定相上进行了初步筛选。不出所料，阿托品的峰形较差。碱性添加剂的加入改善了峰形，满足了USP方法中对拖尾因子的要求。由于氢氧化铵与质谱分析的兼容性，因此将其选作添加剂，用于改善峰形。水作为第二添加剂可进一步改善峰形和重现性。最终的方法(采用亚乙基桥杂化(BEH)固定相)满足了所有的USP适用性要求，结果见表1，并且该高通量方法运行时间少于5 min。在进行适用性测试之前，使用改性剂-添加剂溶液平衡色谱柱2.5 h，或使用200倍柱体积的此溶液进行平衡。

参数	USP 标准	UPC² 分析
6-10次进样所得R_A/ R_H比值的相对标准差	<2.0	<1.6
αH和α_A之间的分离度，R	>3.0	>3.9
a_A的拖尾因子在5%峰高处测定	<2.0	<1.5
东莨菪碱和阿托品的线性动态范围(数量级)	3x	40x

表1. USP适用性标准和颠茄提取物的UPC²分析结果对比。

为满足USP适用性要求并评估重现性，本实验中各校准标准品执行了8次重复进样。 各标准品的保留时间重现性结果为RSD小于0.05%。东莨菪碱和阿托品相对于内标物(H)的峰面积小于1.6%，符合USP适用性要求。在大约2.8 min时，标准物谱图中会出现一个溴化物峰。

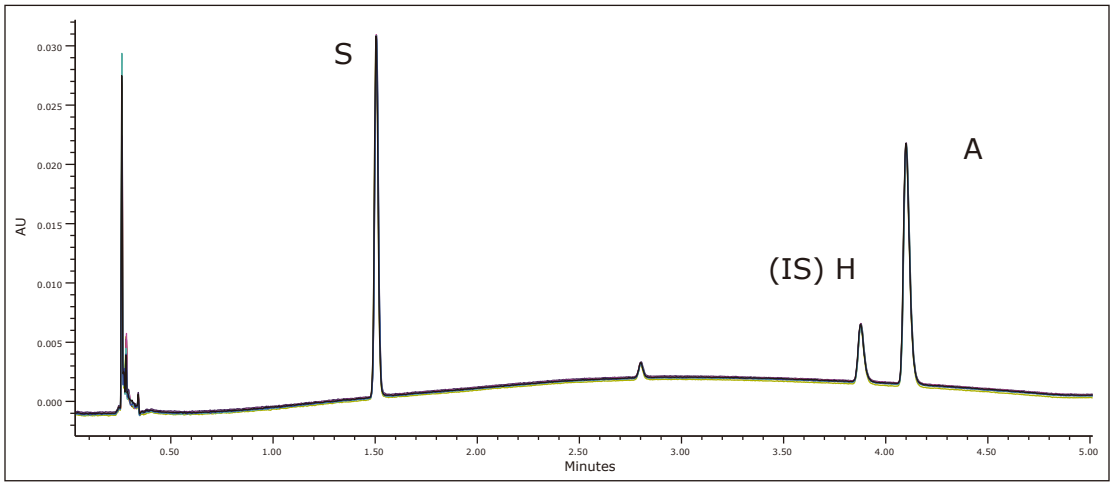

图2. 颠茄提取物标准品、东莨菪碱(S)和阿托品(A)(200 µg/mL)的8次重复UPC²分离所得的色谱叠加图。后马托品(H)为内标物(50 µg/mL)。UV 220 nm补偿波长。

根据USP方法中所述的标准，东莨菪碱和阿托品的线性动态范围要求分别为32-120 µg/mL和320-1200 µg/mL。转换为UPC²方法时要求将阿托品浓度降低至较低水平，因为在浓度400 µg/mL以上时会造成质谱检测器过载；但是，两个成分的总体线性动态范围将超出要求(各成分的40x与3x标准)。如图3和表2所示，东莨菪碱和阿托品在10-400 µg/mL(0.01%-0.4%)的范围内均达到线性要求。图3中对完整系列的校准标准品叠加色谱图进行了评估。在整个测试浓度范围内并无可对阿托品或东莨菪碱的定量产生影响的明显失真。 检测限位于检测器的线性范围内。这些特征表明在此浓度范围内可保持分析的定性性能。

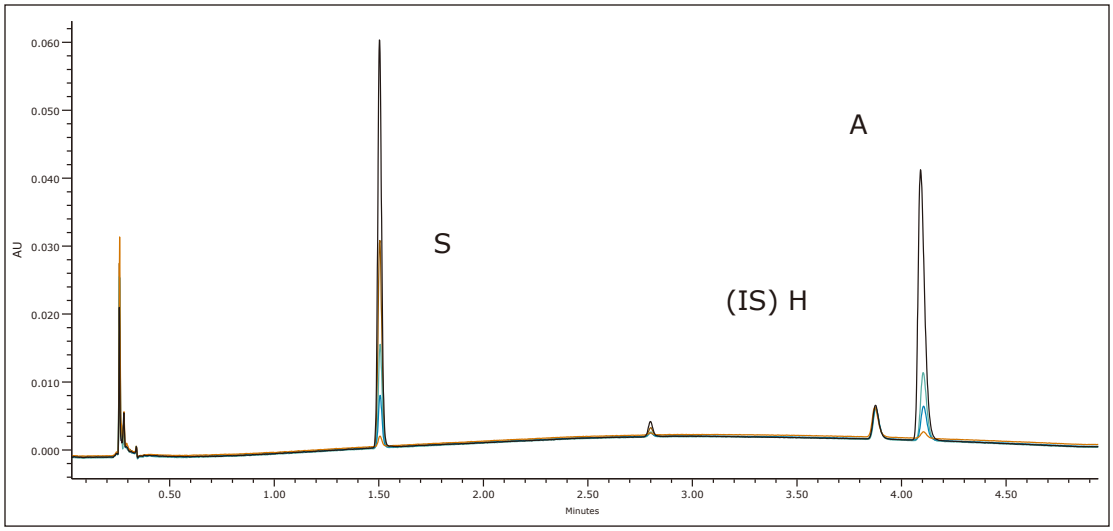

图3. 10-400 µg/mL浓度范围内线性校准标准品的叠加色谱图。各浓度水平溶液进样8次 (n=8)。

本实验建立的合相色谱方法满足USP方法规定的所有适用性要求。 峰面积重现性由相对于内标物(后马托品)的比率计算，其中：比率(A) =峰面积(A)/峰面积(H)。东莨菪碱和阿托品的峰面积比率的%RSD符合适用性规定(<2%)。线性动态范围满足所有要求：R^2 >0.999，定量限(LOQ)处各点的偏差<10%，校正曲线中各点的偏差<5%。在10 µg/mL (LOQ)浓度处，USP信噪比(S/N)>10。在USP S/N >3.0条件下确定的检测限(LOD)为5 µg/mL(阿托品)和<5 µg/mL(东莨菪碱)。上述结果见表2。

		东莨菪碱	阿托品
tR (at 0.001%)	平均值 (min)	1.50	4.11
	标准差 (min)	0.000991	0.00158
	RSD (%)	0.0658	0.0385
Area (A_X/A_H) at 0.001%	平均值	0.208	0.214
	标准差	0.00386	0.00335
	RSD (%)	1.86	1.56
R^2		0.9995	0.9998
方程		Y= 19.5x + 0.0236	Y= 21.8x -0.000394
S/N LOQ	0.001%	27.5	17.4
S/N LOD	0.0005%	9.95	6.98

表2. 采用UPC²方法所得的东莨菪碱和阿托品的线性数据。

虽然USP方法概述了从颠茄叶中提取分析物的步骤，但由于商购的供应量有限，本实验采用新开发的UPC²方法代替了USP方法中颠茄提取物的制备和分析。为使UPC²方法与USP GC方法等效，需将提取物稀释4倍。用异丙醇稀释提取物，最大程度降低峰畸变。在提取物中加入内标(后马托品)，并对稀释的样品过滤，去除因添加稀释液而产生的颗粒物。稀释的提取物溶液和商业制剂中阿托品的浓度分别为49.25 µg/mL、197 µg/mL。溶液中东莨菪碱的浓度低于UPC²和USP GC方法的LOQ。为确保提取物的准确定量，本实验在空白基质中加入了东莨菪碱和阿托品。所测得的回收率分别为105%和110%。

	东莨菪碱	阿托品
平均值(n=8)	N/D	0.493
标准差	N/D	0.000886
%RSD	N/D	1.79

表3. 将市售颠茄提取物稀释至µg/mL浓度所测得的定量数据。重复进样8次。

实验中运用质谱仪(MS)确证提取物中的目标分析物，并鉴别其中所有的未知组分。同时通过UV方法分析颠茄提取物表明其中可定量的东莨菪碱含量非常低，MS的单离子记录(SIR)显示提取物中含有的东莨菪碱含量低于UV方法的LOD，如图4A所示。此外，提取物色谱图中在2.8 min处出现一个峰，但在校准标准品中未检出。质谱图所示的峰(m/z154.4)与东莨菪醇的质量数一致，该物质可能由东莨菪碱水解产生。[5]

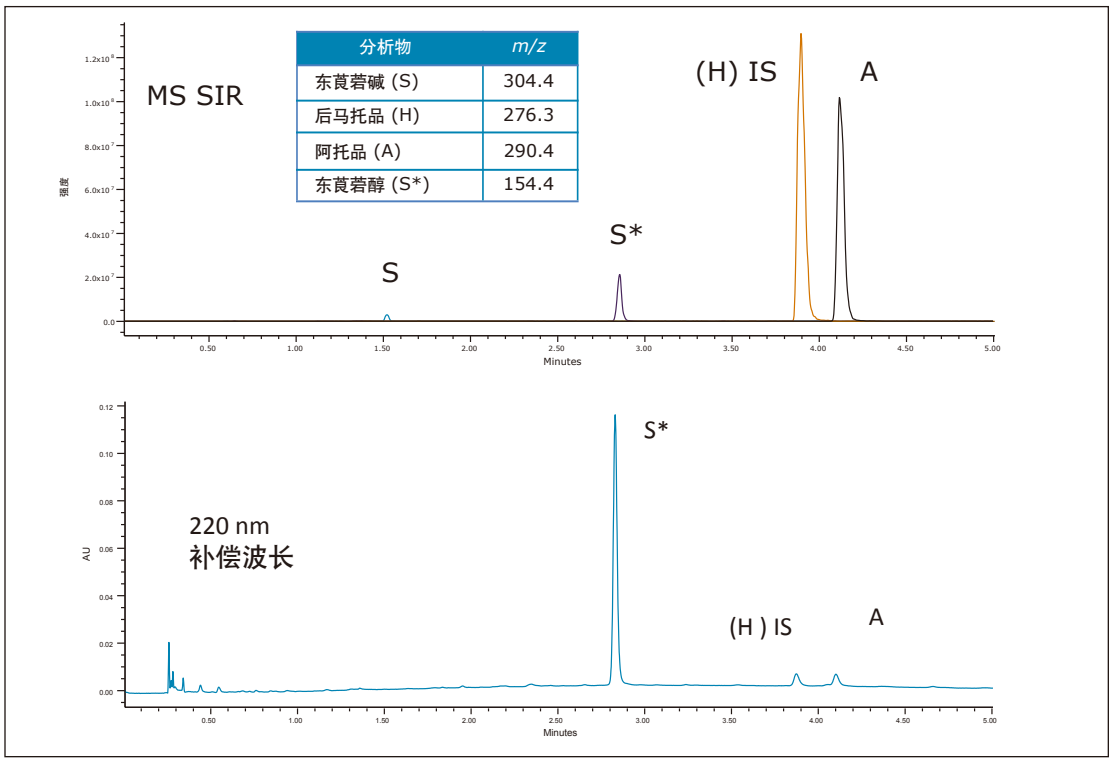

图4. 市售颠茄提取物的UV(220 nm)和MS (SIR)色谱图对比。

结论

通常强极性化合物的分析采用GC法，合相色谱为其提供了一种替代技术，此技术无需衍生化处理，从而简化了样品制备。[2]如上所述，超临界CO_2的使用在满足USP适用性规定的同时还为莨菪烷类生物碱提供了可重现的高通量分析。另外，方法的耐用性证明运用合相色谱可开发出可靠的定量方法。

参考文献

1. Solomon MJ, Crane FA, Chu BLW, Mika ES. Simultaneous quantitative gas chromatographic determination of atropine and scopolamine. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1969; 58 (2): 264-266.
2. Aehle E, Drager B. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of Chromatography* B. 2010; 878 (17-18): 1391-1406.
3. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B, Overington JP. ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research.* 2012; 40 (D1): D1100-D1107.
4. Grand-Guillaume Perrenoud A, Boccard J, Veuthey JL, Guillarme D. Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility. *Journal of Chromatography A.* 2012; 1262 (0): 205-213.
5. Meinwald J, Chapman OL. The Alkaline Hydrolysis of Scopolamine Methoxymethochloride: A New Route to Scopine. *Journal of the American Chemical Society.* 1957; 79 (3): 665-666.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY、和Empower是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC²、UPC²、Ultra Performance Convergence Chromatography和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 沃特世公司。印制于中国

2013 年 1 月 720004573ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com