

超高效液相色谱在复杂体系 中药分离分析中的应用*

□金高娃 章飞芳** 薛兴亚 肖远胜 徐青 梁鑫森**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘要:超高效液相色谱比高效液相色谱分析速度更快更灵敏,它使用 1.7 μm 颗粒度的色谱柱填料,能够获得更高的柱效,并且在更宽的线速度范围内柱效保持恒定,因而有利于提高流动相流速、节省分析时间和增加峰容量,这种固定相还减少了表面残余硅羟基,适合于分析中药中生物碱类等特殊样品。本论文对超高效液相色谱在复杂体系中药中的分离分析进行了简要介绍,尽管使用小粒径的色谱柱填料,超高效液相色谱本质上应符合液相色谱的保留值规律、峰形规律,我们对此进行了初步验证。研究表明了超高效液相色谱将在复杂体系中药的分离分析中发挥重要的作用。

关键词:超高效液相色谱 复杂体系 中药

Waters 公司在 2004 年推出了一种新的液相色谱技术-超高效液相色谱(UPLC),它采用 1.7 μm 颗粒度的色谱柱填料,能获得更高的柱效,并且在更宽的线速度范围内柱效保持恒定,因而有利于提高流动相流速,缩短分析时间,提高分析通量^[1]。通过性能优越的色谱柱,精确梯度控制的超高压液相色谱泵,低扩散、低交叉污染的自动进样系统及高速检测器使超高效液相色谱的峰容量、分析效率、灵敏度较常规高效液相色谱(HPLC)有了很大的提高,为复杂体系的分离分析提供了良好的平台,为代谢组学、蛋白组学的研究提供了方便的条件。目前,UPLC 已用于代谢产物的高通量筛选^[2],痕量杀虫剂的分析^[3-4],生物

样品的分析^[5-6]等等。中药是一个复杂的未知体系,不仅化合物种类繁多、数目不明确,而且含量差异大、已知化合物少,中药现代化又是目前研究的热点和难点,中药要走向世界,首先必须具备国际认可的标准和规范,因而高效、高灵敏地分离分析中药这个复杂的黑箱体系,是解决这些难点和热点问题的必由之路。为了更好地解决这些难题,我们实验室购买了世界上第一台超高效液相色谱仪,其高效率、高灵敏度的特点,在复杂黑箱体系中药的分离分析中发挥了重要的作用。

一、UPLC 在中药分析中的基本特点

1. 缩短分析时间

中药成分十分复杂,需要高效分离分析其复杂

组稿日期:2006-04-20

修回日期:2006-06-05

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213):基于现代理论和技术复方中药系统研究,负责人:梁鑫森;国家自然科学基金重点项目(20235020):中药药效组分的指纹图谱分析的方法研究,负责人:梁逸曾。

** 联系人:章飞芳,博士,主要从事组分中药的研究,Tel:0411-84379523,Email:zhangff@dicp.ac.cn;梁鑫森,本刊编委,博士,研究员,主要从事组分中药的研究,Tel:0411-84379519,Email:liangxm@dicp.ac.cn。

的组分,在我们的标准组分分析过程中,常规的HPLC一般需要运行1h以上样品组分才能得到较好的分离,如图1(b),使用HPLC在40min完成分析,共35个峰,而采用UPLC分析时,只需一半甚至更短的时间就能得到更好的分析结果,如图1(a),该样品在20min内就完成分析,共39个峰。如仅考虑与HPLC相同的分离效果,可提高流速,进一步缩短UPLC的分析时间。

2. 增加峰容量,提高灵敏度

梯度条件下UPLC的峰容量变化已有报道,该报道以小分子药物为研究对象,认为梯度变化时间,流动相流速,色谱柱长度对峰容量影响最大,短柱、快速梯度变化可获得很高的峰容量,而增加分析时间,使用长柱会获得更高的峰容量^[7]。UPLC使用1.7 μm 颗粒度的色谱柱填料,这就使色谱柱的柱效极大提高,色谱峰变窄,峰容量增加。图2(a)UPLC谱图中8min到10min共23个色谱峰,而图2(b)HPLC谱图中8min到10min只有9个色谱峰。此外,图2(a)中,UPLC进样量为3 μL 时,最高峰的吸收值为3.5AU,而在(b)中,HPLC进样量为10 μL 时,与UPLC中对应峰的吸收值为1.7AU,经过换算,UPLC的灵敏度是HPLC的7倍左右。HPLC检测不到或吸收很小的峰来说,UPLC高灵敏度的优势更加明显,因此,UPLC对于微量甚至痕量组分的研究具有重要意义。

3. 方法转换

UPLC与HPLC可以进行简单方便的方法转换,在保证相同分离度的条件下,HPLC上

50min完成的分析在UPLC上不到8min即可完成。在相同分离机制条件下,主要转换流速、进样量及流动相梯度条件,本实验中,根据转换软件,如图1(a),HPLC上10 μL 的进样量在UPLC上进样量为0.9 μL ;HPLC上1ml/min的流速转换到UPLC上为0.21ml/min,从而使在HPLC上50min完成的分析在UPLC上21.78min即可完成,如图3(b),在仪器压力允许范围内及保证分离度的情况下,UPLC可适当增大流速,最大可达0.60ml/min,在此条件下,7.62min即可完成分析,如图3(c)。

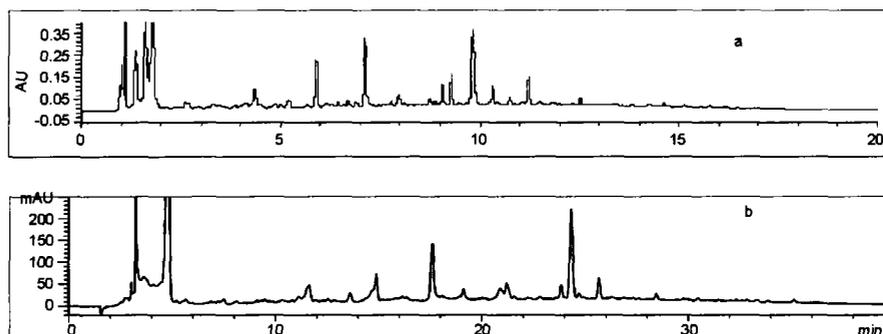


图1 赤芍提取组分UPLC谱图(a)与HPLC谱图(b)比较

UPLC: Waters Acquity™; 色谱柱: ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈(2.1×100mm, 1.7 μm); 流速: 0.25ml/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 280nm; 流动相: 水-0.5%甲酸(A), 乙腈-0.5%甲酸(B); 梯度条件: 20%B经20min达40%, 再经20min达95%。

HPLC: Agilent 1100; 色谱柱: Hypersil ODS2(4.6mm×250mm, 5 μm); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 280nm; 流动相: 水-0.5%甲酸(A), 乙腈-0.5%甲酸(B); 梯度条件: 20%B经40min达40%, 再经40min达95%。

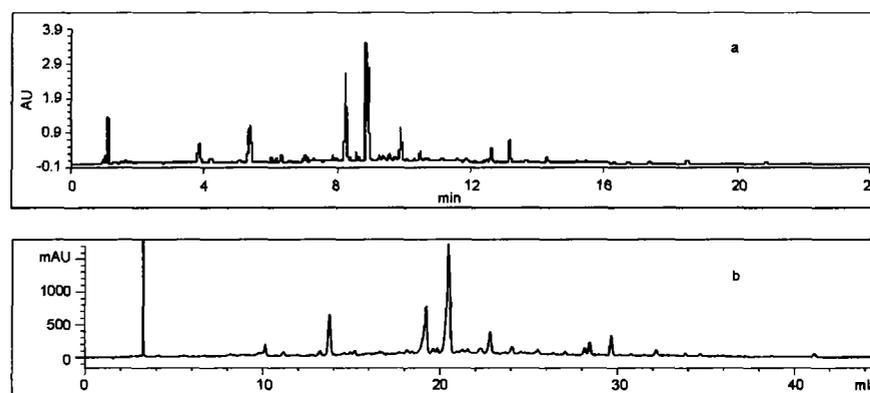


图2 连翘提取组分UPLC谱图(a)与HPLC谱图(b)比较

色谱条件同图1

二、UPLC 在中药生物碱类组分分析中的应用

中药中存在大量的生物碱,这类成分通常是中药的活性成分,研究这类成分具有重要意义。但常规高效液相色谱方法分析生物碱时,由于固定相表面残余硅羟基的影响,此类化合物色谱峰的保留行为会发生变化,造成色谱峰严重展宽和拖尾^[6],因而在分析时往往需要在流动相中加入添加剂,如离子对试剂、有机胺类等来屏蔽固定相表面残余硅羟基的作用,但这些添加剂的加入往往会给 LC-MS 联用带来不便。Waters 公司发展了双(三乙氧基硅)乙烷在硅胶中形成桥式乙基基团的技术,合成了 1.7 μm 颗粒度的“ACQUITY UPLC™”填料^[1],减少了固定相表面残余硅羟基,因而在分析生物碱类样品时,流动相中只加入酸抑制剂不需加有机胺就可以使其获得良好的分离,如图 4(b)HPLC 谱图中,色谱峰严重展宽且拖尾,无法深入研究,而在(a)UPLC 谱图中,色谱峰展宽和拖尾现象得到明显改善。

基于该色谱柱的特性,我们相信采用 UPLC-MS 定性生物碱样品时,由于在流动相中避免了有机胺及盐的加入,可以在一定程度上降低质谱噪音、减少对质谱的污染,且使用的流速适合与质谱直接联用,无需分流,可以进一步提高检测灵敏度,与 HPLC-MS 相比,可以为中药中生物碱类组分的定性提供良好的平台。

三、UPLC 色谱保留值规律与峰形规律

色谱保留时间、色谱保留参数经常被用于未知成分的辅助

定性。液相色谱遵循 $\ln k = a + c \cdot C_B$ 的色谱保留规律,其中 k 为容量因子, a 、 c 系数为液相色谱保留参数, C_B 为溶质浓度^[9],UPLC 本质上是液相色谱,其保留值规律、峰形规律应该符合液相色谱理论。我们对 36 味中药组分,10 个复方组分在 UPLC 的保留规律进行了研究,现以丹参为例加以说明。

1. UPLC 的保留参数(a , c 值)

在二元反相超高效液相色谱线性梯度条件下,快速准确获取液相色谱保留参数 a , c 值和任意梯度下的保留时间,可将中药复杂未知体系转化为色谱已知体系。采用基于 Levenberg-Marquardt 法的软件

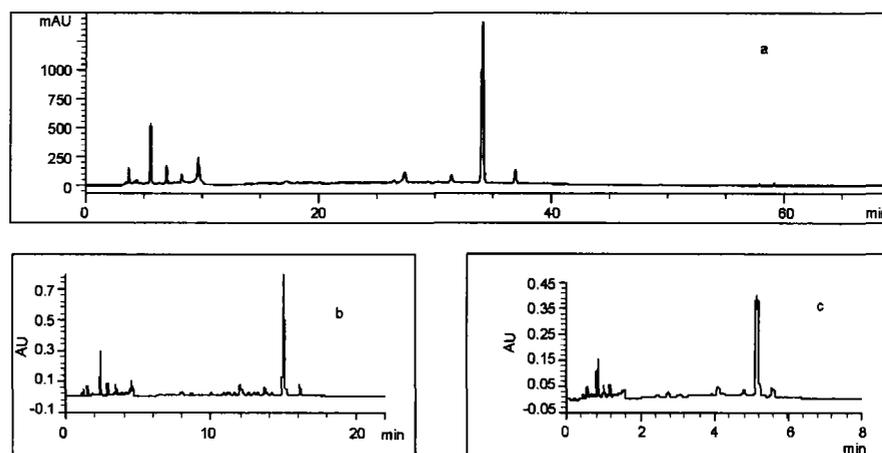


图 3 桂枝药材水提正丁醇组分 HPLC(a)与 UPLC (b:流速 0.21ml/min;c:流速 0.6ml/min)的方法转换

HPLC 梯度条件:5%B 经 20min 达 20%,再经 30min 达 50%。

UPLC(b)梯度条件:5%B 经 8.72min 达 20%,再经 13.06min 达 50%

UPLC(c)梯度条件:5%B 经 3.05min 达 20%,再经 4.57min 达 50%

其余条件同图 1

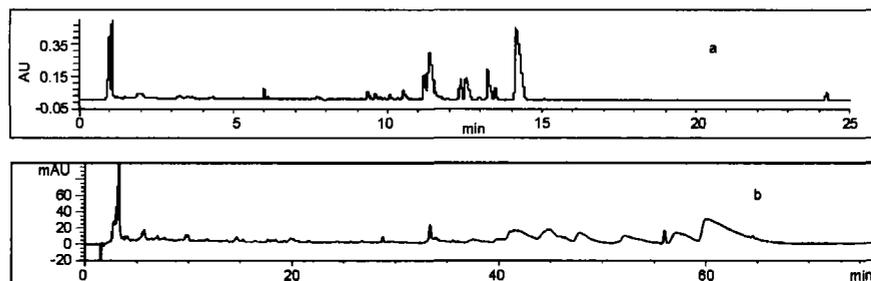


图 4 延胡索提取组分 UPLC 谱图(a)与 HPLC 谱图(b)比较
色谱条件同图 1

LC_AC (中国科学院大连化学物理研究所)计算得到了丹参提取组分 27 个拟合峰的准确保留时间,计算获得 27 个拟合峰的 a, c 参数,从而得到各成分的保留方程和虚拟保留时间 t_{R}^* , 并可以预测任意梯度条件下的保留时间。丹参 27 个拟合峰的 a, c 值见表 1, 由此得到 $\ln k$ 与 C_B 关系见图 5。由图可见, 每种化合物的 $\ln k$ 与 C_B 存在很好的线性关系, 不同流动相浓度下, 色谱峰保留时间不同, 流动相浓度增大, 相应色谱峰保留时间缩短; 由于各化合物分属不同的种类, 因此不可避免地存在峰交叉, 如此复杂的样品分析只有借助于计算机技术, 才能全面分析哪些化合物可以在什么条件下得到分离, 哪些化合物在该柱系统不能得到较好的分离。借助我们的软件, 可预测各化合物的色谱行为, 节省实验操作所需的人力、物力。

2. UPLC 的峰形规律

在中药的液相色谱分离中, 重叠峰是普遍存在的, 利用自动曲线拟合方法快速获取峰形参数, 可用于全谱图拟合和谱图仿真^[9]。上述丹参提取组分谱图在完成全谱图解析后, 同时获得了 27 个峰的 $W_{b/2}$ 值, 选取其中 9 个基线分离的单一化合物峰的 $W_{b/2}$, t_{R}^* , 线性回归求得柱系统参数, 获得峰形规律。其中 $s = 0.7128 \quad t_{R}^* - 1.3295 \quad (R^2 = 0.9241)$, $W_{b/2} = 1.0767 \quad t_{R}^* - 0.2822 \quad (R^2 = 0.9076)$, 利用这些规律, 可进行保留时间预测及谱图仿真。

3. 预测与仿真

通过保留值规律和峰形规律, 预测了 e 梯度条件下 27 个峰的保留时间, 并和该条件下的实验保留时间进行对比, 结果见表 1, 除 10 号峰外, 其他峰的预测时间误差均在 5s 以内, 可能原因是 10 号峰在谱图中是个非常小的峰且与 9 号峰重叠严重, 造成较大误差。预测谱图与实验谱图比较见图 6, 由图可见, 仿真结果与预测结果一致。

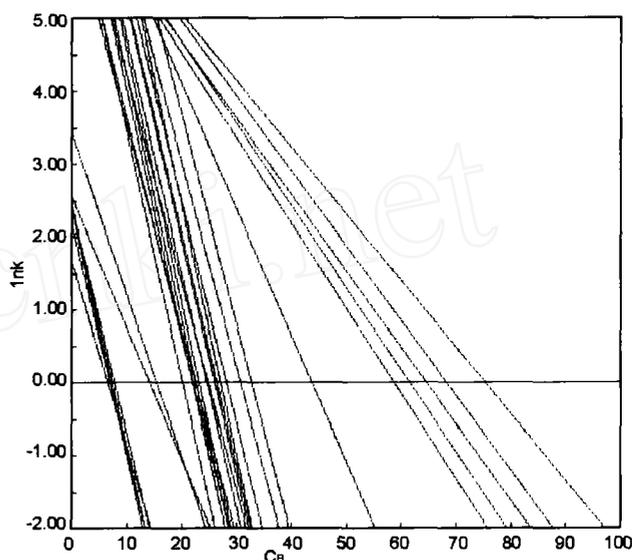


图 5 丹参提取组分 $\ln k$ 与 C_B 关系图

梯度条件: 条件 a: 5%B 起始, 20min 升到 25%, 25.45min 后再升到 95%; 条件 b: 5%B 起始, 20min 升到 30%, 23.64min 后再升到 95%; 条件 c: 5%B 起始, 20min 升到 35%, 21.82min 后再升到 95%; 条件 d: 5%B 起始, 20min 升到 40%, 20min 后再升到 95%; 采用条件 e 作为验证预测结果的实验条件, 即, 条件 e: 5%B 起始, 20min 升到 20%, 27.27min 后再升到 95%, 其余条件同图 1

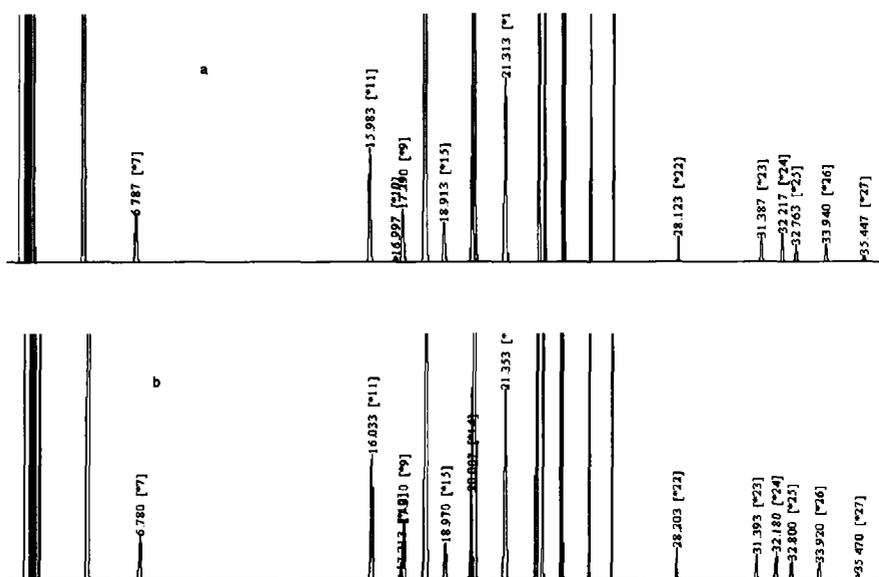


图 6 丹参提取组分仿真谱图(a)与实验谱图(b)比较

表1 丹参提取组分 27 峰 a,c 值及
预测保留时间与实验保留时间比较

id	a	c	tr(pre),min	tr(exp),min	Err,sec
1	1.646954	-25.376	2.16	2.15333	0.4002
2	2.163578	-31.4721	2.41	2.39833	0.7002
3	2.354735	-33.6417	2.51333	2.4975	0.9498
4	2.422435	-33.4495	2.62	2.60917	0.6498
5	2.406347	-31.0838	2.78667	2.77667	0.6
6	2.539936	-17.9666	4.72	4.71333	0.4002
7	3.42498	-22.2098	6.78667	6.78167	0.3
8	7.319929	-33.3912	18.1533	18.205	-3.102
9	6.611336	-29.8864	17.29	17.3358	-2.748
10	6.311136	-28.1688	16.9967	17.24	-14.598
11	6.807948	-33.7077	15.9833	16.035	-3.102
12	7.014508	-28.4062	20.0733	20.13	-3.402
13	7.906077	-32.1392	21.3133	21.375	-3.702
14	7.947578	-34.3614	20.02	20.0342	-0.852
15	7.476756	-33.1612	18.9133	18.9792	-3.954
16	8.331849	-32.0999	22.6333	22.6292	0.246
17	8.378637	-31.7454	22.8733	22.8708	0.15
18	9.260799	-34.1872	23.5467	23.5675	-1.248
19	8.503422	-30.3205	23.6367	23.6542	-1.05
20	8.659767	-28.179	24.67	24.7183	-2.898
21	9.40875	-28.7655	25.56	25.6183	-3.498
22	7.569702	-17.3274	28.1233	28.205	-4.902
23	6.832425	-11.6632	31.3867	31.4242	-2.25
24	6.923119	-11.2644	32.2167	32.2	1.002
25	6.764456	-10.4715	32.7633	32.8058	-2.55
26	6.981635	-10.2375	33.94	33.9233	1.002
27	6.866724	-9.12205	35.4467	35.4725	-1.548

其他 35 味中药组分及 10 个复方组分也进行了拟合解析,利用几个相近的线性梯度条件下组分的保留时间,计算了未知组分的色谱峰的保留参数,并预测任意梯度条件下的保留时间,将未知组分转化为色谱行为已知的组分。实验结果表明,各组分在 UPLC 上具有很好保留值规律、峰形规律。由上所述,无论在理论上还是实际应用中,UPLC 可以代替 HPLC,是进行中药化学表征的有效手段。

四、展望

面对大批量复杂的中药组分,UPLC 能够更快地完成以往 HPLC 的工作。UPLC 不但可以节省时间、提高效率、减少溶剂的消耗,而且 UPLC 能为质谱提供最佳的液相色谱入口,为中药的分析建立了良好的平台。目前,本实验室进行组分中药的系统研究,产生大量的样品,UPLC 可以完全胜任分离分析的任务,为信息库的建立奠定良好的基础。我们有理由相信,超高效液相色谱的超高分析速度,超高灵敏度将为复杂体系中中药的分离分析开创崭新的局面。

参考文献

- 1 Waters 公司北京实验室. Waters ACQUITY UPLC™ 介绍. 环境化学,2004,23(5):606-611.
- 2 Robert S. Plumb, Jennifer H. Granger, Chris L. Stumpf, Kelly A. Johnson, Brian W. Smith, Scott Gaulitz, Ian D. Wilsonand, Jose Castro-Perez. Analyst,2005,130:844-849.
- 3 Milagros Mezcua, Ana Agüera, Josep Lluis Lliberia, Miguel Angel Cortés, Bàrbara Bagó, Amadeo R. Fernández-Alba. Journal of Chromatography A,1109(2006):222-227.
- 4 Cristiana C. Leandro, Peter Hancock, Richard J. Fussell, Brendan J. Keely. Journal of Chromatography A,1103(2006):94-101.
- 5 Jim X. Shen, Haiping Wang, Samy Tadros, Roger N. Hayes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,40(2006):689-706.
- 6 Ruiping Li, Lili Dong, Junxiong Huang. Analytica Chimica Acta,546(2005):167-173.
- 7 Stephen A. C. Wren. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,38(2005):337-343.
- 8 卢佩章,张玉奎,梁鑫淼. 高效液相色谱法及其专家系统. 辽宁:辽宁科学技术出版社,1992:233,433.
- 9 徐青. 中国科学院研究生院博士学位论文. 2004:18.

Application of Ultra-performance Liquid Chromatography in the separation and analysis of complicated system—Traditional Chinese Medicine

*Jin Gaowa Zhang Feifang Xue Xingya Xiao Yuansheng Xu qing Liang Xinmiao
(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)*

Ultra-performance Liquid Chromatogram (UPLC) was faster and more sensitive than HPLC. Waters synthesized and developed 1.7 μ m particles as UPLC column solid phase. A realm of chromatography is entered where not only are higher efficiencies gains, but also these efficiencies no longer diminish with flow rate. It is now possible to take full advantage of chromatographic principles to run separations, using shorter columns and higher flow rates for increased speed, with superior resolution and sensitivity. Packings based on high-purity silicas that are well end-capped show a low silanol group activity. It shows significant benefit on the separation of alkaloids in Traditional Chinese Medicines (TCM). In this paper the applications of UPLC in separation and analysis of TCM were introduced. The retention value (a, c) and peak shape rule in UPLC was also studied. It showed that retention value (a, c) and peak shape rule in UPLC were similar to HPLC. The results indicate that UPLC will play an important role in the separation and analysis of TCM.

Keywords: UPLC, complicated system, TCM

(责任编辑:王 瑀 郭 屹, 责任编审:柳 莎, 张志华, 责任译审:熊艳艳)

(Continued from page 98)

structed by integration of multiple modern separation technologies. A series of standard operation protocols (SOPs) was carried out to control the extraction and separation procedures. 50 Chinese herbs and 8 prescriptions have been processed with this system, and more than 1100 standard multi-components have been produced. A library for standard multi-components of Traditional Chinese Medicines has been formed, which provides abundant multi-components for chemical constitution research and new medicine development.

Keywords: Traditional Chinese Medicine; Standard multi-component; Systematic separation and preparation; Standard multi-component library

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:张志华, 责任译审:熊艳艳)

更正:

本刊 2006 年第 8 卷第 2 期刊载的“病证结合的临床研究是中西医结合研究的重要模式”一文部分有误, 现更正如下并向作者致歉。

1. 陈可冀院士为中国科学院院士;
2. 作者为: 陈可冀(中国中医科学院西苑医院, 福建中医学院中西医结合研究院)
宋 军(中国中医科学院西苑医院);
3. 中西医结合应译为: Integrated Traditional Chinese and Western Medicine。