

中药复杂样品高效液相色谱和超高效液相色谱分析条件转换方法

金 郁 薛兴亚 肖远胜 章飞芳 (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)
石 慧 (华东理工大学药学院 上海 200237)

梁鑫淼* (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)
(华东理工大学药学院 上海 200237)

摘 要: 目的: 建立中药复杂样品高效液相色谱 (HPLC) 和超高效液相色谱 (UPLC) 分析条件相互转化的方法。方法: 采用丹参水提组分为模型样本, 利用五次线性梯度分别求算该样品中 12 个色谱峰在 HPLC 和 UPLC 中的保留参数 (a, c 值), 然后对 a, c 值进行分别关联, 获取线性方程, 利用该线性方程可以实现 a, c 值的相互转换, 由计算的 a, c 值进行色谱条件的预测与优化。结果: HPLC 和 UPLC 的 a, c 值存在良好的线性关系。 a, c 值线性关联的 R^2 值分别为 0.9914 和 0.9936。根据 a, c 值转换的线性方程, 将川芎水提组分中各色谱峰在 HPLC 上的 a, c 值转换为 UPLC 上的 a, c 值, 利用计算的 a, c 值进行 UPLC 的分离预测, 以实验验证, 模拟图与实验谱图一致。结论: 本方法实现了两种分析条件的相互转化, 实现了数据在这两个分析方法的通用性。方法简单、准确, 有利于复杂样品的分析预测与优化。

关键词: 高效液相色谱法 超高效液相色谱法 保留参数 方法转换 中药

一、前 言

高效液相色谱法 (HPLC) 是复杂样品分析的重要方法, 在中药复杂样品的分离中发挥着重要作用。现已用于中药有效成分定量、中药指纹图谱研究、中药药代动力学研究等重要领域^[1-3]。现代色谱方法正向高柱效、快速, 高灵敏发展, 这就给分离材料的发展提出了更高的要求。其中, 小颗粒的填料是其固定相发展的一个重要方向。超高效液相色谱 (UPLC) 就是以 1.7μ 填料作为固定相, 在这种小颗

粒填料上获得了更高的柱效, 有利于复杂样品的分离, 因其具有较高的柱效, 所以可以采用短柱进行快速分析。另外根据范氏方程, 1.7μ 填料的柱效随流速增加几乎不降低^[4], 可以在不降低柱效的情况下采用高流速进行快速分析, 这样可为中药复杂样品的分析节约大量时间和溶剂^[5]。

液相色谱中的保留值方程 ($\ln k = a + cC_B$)^[6-8] 描述液相色谱全浓度范围内的保留值变化规律, 式中 C_B 为二元流动相中强溶剂的体积百分比, a 和 c 都是与分子结构有关的具有明确物理意义的常数。采用五次线性梯度对样品进行液相色谱分析, 五个梯度下的液相色谱图在 CSASS 软件 (Conpeex sample analysts

收稿日期: 2007- 10- 10

修回日期: 2007- 10- 23

* 联系人: 梁鑫淼, 本刊编委, 研究员, 主要研究方向: 组分中药研究, Tel: 0411- 84379519, E- mail: liangxm@dicp.ac.cn。

Sofiware system) (中国科学院大连化学物理研究所) 中进行峰拟合,对重叠峰进行分辨^[9], 并且将五个梯度下的色谱峰进行匹配, 因此可以快速获取 a 和 c 值。结合色谱峰形规律, 在软件中可以进行色谱图仿真, 仿真的色谱图可以预测任意条件下的色谱分离情况, 这个过程将复杂未知样品转化成色谱行为已知的样品^[10-11]。

本实验室对于 36 味药材建立了标准化的液相分析方法, 采用五次线性梯度获取了中药复杂样品的 a, c 值。本实验就是以 a, c 值为基础, 对 HPLC 和 UPLC 的 a, c 值进行关联, 通过 a, c 值的转化, 使 HPLC 分析条件转化为 UPLC 分析条件。实现通过现有的 HPLC 的数据来预测 UPLC 上的分离情况, 在进行超高效液相色谱分析时, 样品在超高效液相上的分离行为是已知的。

二、材料与方法

1. 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器)

Waters 超高效液相色谱仪(包括二元高压梯度泵, 自动进样器, 柱温箱和 PDA 检测器)。

乙腈(色谱纯, Merck 公司); 甲酸(色谱纯, Acros 公司); Milli-Q 水(Millipore 公司)。

2. HPLC 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS2 C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特); ACQUITY UPLC™ BEH SHIELD RP18 column (100 × 2.1 mm i.d.; 1.7 μm, Waters); 流动相: 水(A) - 乙腈(B), 两相加 0.1%(v/v) 甲酸; HPLC 的流速为 1.0 mL/min; UPLC 的流速为 0.25mL/min; 柱温: 30 ; 检测波长: 280 nm; HPLC 的进样量为 5 μL; UPLC 的进样量为 3 μL。五次线性梯度如表 1 所示。用于验证超高效液相色谱预测结果的色谱条件为色谱条件 3。

3. 供试液的制备

用于分析的丹参和川芎水提组分为中科院重要方向性项目中所建立的标准组分。组分的提取方法如下; 100kg 药材加 1000L 水提取两次, 提取时间分别为 2h 和 1.5h, 合并两次提取液, 然后经喷雾干燥制成干粉, 此标准组分供分析和制备用。在本次实验中, 称取 0.5g 丹参和川芎干粉, 加入 20mL 75%的乙醇, 超声 10min, 过滤, 滤液定容到 25mL, 备用。进样前用 0.45 μm 有机滤膜过滤。

三、结果与讨论

1. 丹参水提组分在 HPLC 和 UPLC 上保留参数的求算和验证

利用五次线性梯度分别求算丹参水提组分在 HPLC 和 UPLC 上的 a, c 值。线性梯度的设计有多种方式, 但是相互之间不能有交叉, 否则在求解线性方程组的迭代过程中, 可能造成该线性方程组奇异。丹参水提组分 HPLC 和 UPLC 的色谱图在 CSASS 软件中进行拟合(图 1)。从拟合谱图可以看出, 在 HPLC 和 UPLC 上所得到的色谱图基本一致, 但是在 UPLC 上的分析时间大大缩短。通过软件的拟合可以对重叠峰进行很好的分辨。在本实验中, 标识了保留较好, 在两种分离中能准确匹配的 12 个色谱峰, 计算这 12 个色谱峰的 a, c 值。利用 a, c 值可以得到模拟谱图, 该谱图可以显示在任意条件下的分离情况。为了验证 a, c 值的正确性, 我们预测了在色谱条件 3 下的 HPLC 和 UPLC 的分离情况, 预测值和预测误差列于表 2。在 HPLC 和 UPLC 上都得到了很好的预测精度。通过预测的结果可以看出, 两种分离所计算的 a, c 值是正确的, 同时也说明了利用 a, c 值可以进行色

表 1 用于 a, c 值计算的 5 次线性梯度

梯度 条件	HPLC B%)					UPLC B%)				
	1	5%	40min	20%	50min	95%	5%	20min	20%	27.27min
2	5%	40min	25%	50min	86.67%	5%	20min	25%	25.45min	95%
3	5%	40min	30%	50min	83.30%	5%	20min	30%	23.64min	95%
4	5%	40min	35%	50min	80%	5%	20min	35%	21.82min	95%
5	5%	40min	40%	50min	76.67%	5%	20min	40%	20.00min	95%

谱条件的预测与优化。

2. 高效液相色谱法与超高效液相色谱法 *a*, *c* 值

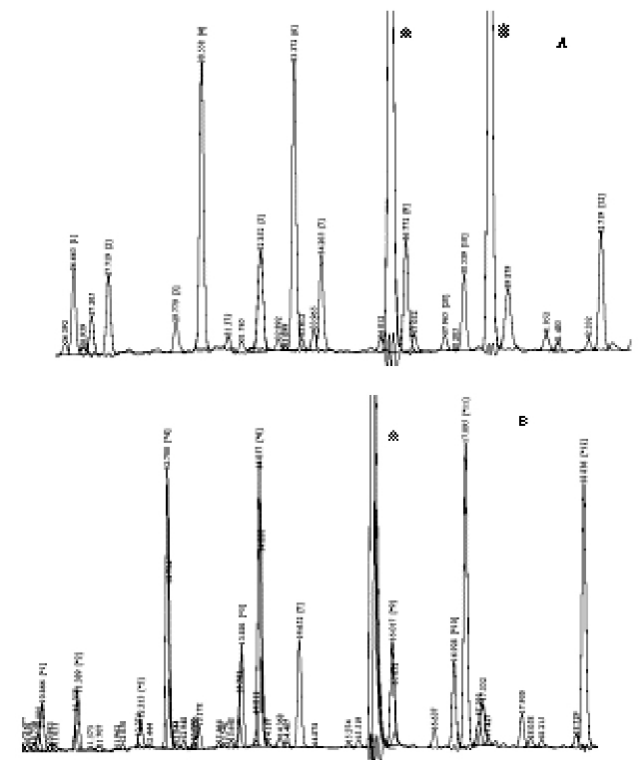


图 1 丹参水提组分在 HPLC A) 和 UPLC B) 的液相色谱图

表 2 丹参水提组分在 HPLC 和 UPLC 分析的实测值与预测值误差

峰号	HPLC (实测值) (min)	HPLC (预测值) (min)	预测 误差 (min)	UPLC (实测值) (min)	UPLC (预测值) (min)	预测 误差 (min)
1	26.665	26.503	- 0.162	10.866	10.870	0.004
2	27.719	27.567	- 0.152	11.389	11.390	0.001
3	29.779	29.640	- 0.139	12.313	12.313	0.001
4	30.559	30.440	- 0.119	12.700	12.700	0.000
5	32.352	32.273	- 0.079	13.801	13.800	- 0.001
6	33.372	33.300	- 0.072	14.057	14.060	0.003
7	34.205	34.153	- 0.052	14.652	14.653	0.002
8	36.299	36.290	- 0.009	15.713	15.713	0.000
9	36.772	36.773	0.001	16.017	16.007	- 0.010
10	38.539	38.553	0.014	16.928	16.933	0.005
11	39.325	39.337	0.012	17.095	17.097	0.002
12	42.719	42.727	0.008	18.836	18.823	- 0.012

的关联

利用 *a*, *c* 值进行复杂样品液相色谱分析条件预测与优化避免了建立液相分析条件时反复的实验摸索, 有效地节约了时间, 样品和溶剂, 同时使我们可以更深入地了解样品的保留规律, 有效地进行目标优化。本实验室在高效液相色谱以标准化的分析条件进行了大量中药样品的分析, 获取了 *a*, *c* 值。所以建立 HPLC 和 UPLC 的 *a*, *c* 值关系, 可以使在 HPLC 上建立的 *a*, *c* 值直接转化为 UPLC 上的 *a*, *c* 值, 利用计算所得的 *a*, *c* 值直接进行 UPLC 上的预测与优化。

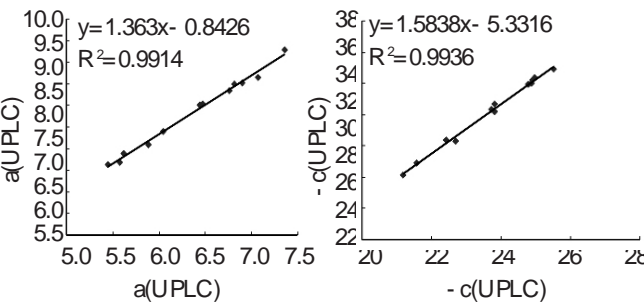


图 2 *a*, *c* 值在高效液相色谱和超高效液相色谱上的线性关系

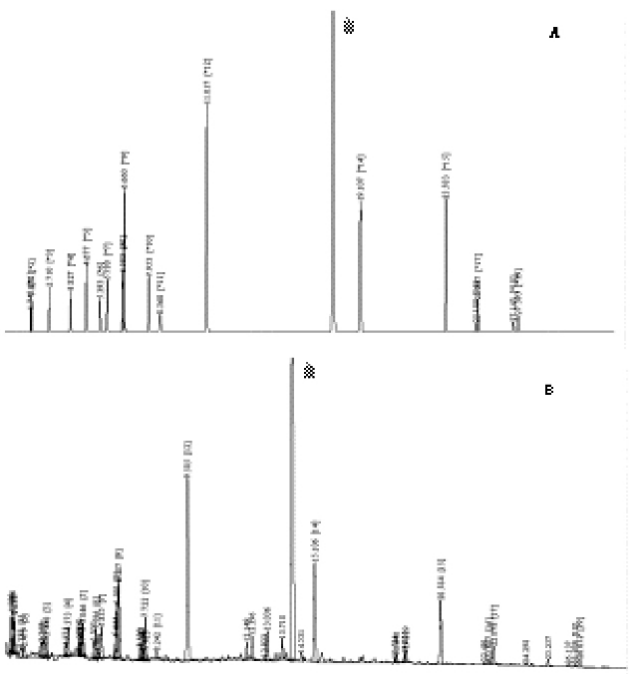


图 3 川芎水提组分利用计算的 *a*, *c* 值进行超高效液相色谱模拟谱图 A) 和 UPLC 分析谱图 B) 的比较

丹参水提组分中 12 个色谱峰在 HPLC 和 UPLC 上的 a, c 值进行了关联, 得到了很好的线性关系, 如图 2 所示。a, c 值关联的线性方程的 R^2 都大于 0.99。HPLC 和 UPLC 系统有着不同的死时间和系统延迟, 在 a, c 值计算时, 死时间和系统延迟都参与计算, 所以两者的关联校准了系统的差异, 利用此关联的线性方程可以进行 HPLC 和 UPLC 条件的相互转化。

3. 利用计算的 a, c 值进行川芎水提组分在超高效液相色谱上的分离预测

为了验证这种方法转化的准确性, 利用关联的线性方程将川芎水提组分中各色谱峰在 HPLC 上的 a, c 值转化为 UPLC 上的 a, c 值, 利用计算的 a, c 值进行了分析条件的预测, 结果见图 3。其中 A 图为利用计算的 a, c 值在 CSASS 软件上的模拟谱图, B 图为 UPLC 上的实际分析谱图。对比模拟谱图和实验谱图, 两者的分离情况基本一致。预测值与实测值的误差列于表 3。最大的预测误差为 1.3min, 多数的预测误差小于 1min。对比难分物质对的分离情况, 如 8 号峰和 9 号峰, 16 号峰和 17 号峰, 18 号峰和 19 号峰的分离, 可以看到分离选择性在模拟谱图和实验谱图中没有发生变化(图 4)。说明可以用转化的 a, c 值进行 UPLC 的分析条件的预测与优化。利用这种方法可以快速优化条件以获得与 HPLC 上相似的分

表 3 川芎水提组分在 UPLC 分析的实测值与利用计算的 a,c 值进行预测的预测值的误差比较

峰号	实测保留时间 (min)	预测保留时间 (min)	误差 (min)
1	2.3333	1.7400	- 0.5933
2	2.4792	1.7967	- 0.6825
3	3.4483	2.6533	- 0.7950
4	4.3733	3.7167	- 0.6567
5	5.0458	4.3767	- 0.6692
6	5.5958	4.9733	- 0.6225
7	5.8350	5.4067	- 0.4283
8	6.5000	6.1267	- 0.3733
9	6.5867	6.1933	- 0.3933
10	7.7217	7.0567	- 0.6650
11	8.2425	7.8900	- 0.3525
12	9.5850	9.7967	0.2117
13	14.1342	15.2667	1.1325
14	15.1058	16.4300	1.3242
15	20.5842	20.8333	0.2491
16	22.6867	23.1733	0.4866
17	22.8783	23.0300	0.1517
18	26.4392	25.4100	- 1.0292
19	26.6517	25.6867	- 0.9650

果, 将 HPLC 上的分析方法转化到 UPLC 上, 也可以根据分离需要进行有目标的优化。

四、结 论

HPLC 和 UPLC 是中药复杂体系分析的重要手段。本实验通过建立 a, c 值在两个分析方法中的线性关系, 实现了两种分析条件的相互转化, 实现了数据在这两个分析方法的通用性。该方法可用于中药复杂体系在 HPLC 和 UPLC 分析条件的相互转换。

参考文献

1 Yi - Zeng Liang, Peishan Xie, Kelvin Chan.Quality control of herbal medicines, Journal of Chromatography B, 812 (2004) 53~70.
2 王绪明, 白林. 高效液相色谱及其联用技术在药物分析中的应用新进展. 解放军药学报, 20 (2004) 457~459.
3 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略. 中药新药与临床药理, 12 (2001)141~151.

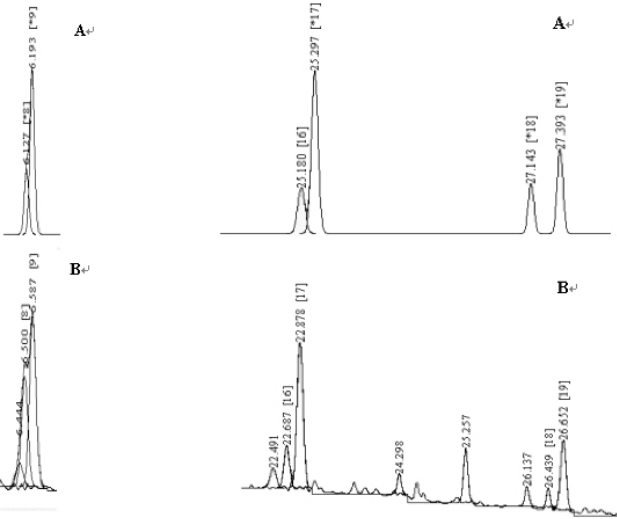


图 4 模拟谱图和实验谱图分离选择性的比较

- 4 Dao T.- T. Nguyen, Davy Guillaume, Serge Rudaz, Jean- Luc Veuthey, Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub -2 μ m stationary phases in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1128 (2006) 105~113.
- 5 Mei Liu, Yongguo Li, Guixin Chou, Xuemei Cheng, Mian Zhang, Zhengtao Wang, Extraction and ultra - performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*, *Journal of Chromatography A*, 1157 (2007) 51~55.
- 6 卢佩章, 戴朝政, 张祥民. 色谱理论基础. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 147~273.
- 7 Dai, C. Z., Lu P. Z., A modification on the retention equation of liquid - solid chromatography $\ln k' = A + B \ln C_B + C C_B$ *Chin. Sci. Bull.* 39 (1994) 1458~1462.
- 8 Zou H. F., Zhang, Y. K., Hong, M. F., Shy, Y. Y., Lu, P. Z., Relationship between retention values and solvatochromic parameters in reversed- phase liquid- chromatography, *Acta Chim. Sin.* 53 (1995) 269~274.
- 9 Xue X. Y., Zhang, Q., Liang, X. M., Oxyinos, K., Kettrup, A., Lu, P. C., Computer - assisted automatic peak recognition and result evaluation for analysis of chlorinated hydrocarbons in environmental samples *J. Chromatogr. A.*, 957 (2002) 37~44.
- 10 薛兴亚. 复杂未知样品气相色谱分离分析理论基础研究. 中国科学院大连化学物理研究所博士学位论文. 2004.
- 11 徐青. 中药高效液相色谱分析方法发展的理论基础研究. 中国科学院大连化学物理研究所博士学位论文. 2004.

HPLC and UPLC Switch for TCM Analysis

Jin Yu, Xue Xingya, Xiao Yuansheng, Zhang Feifang, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

Shi Hui, Liang Xinmiao

(School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Authors have developed a method to make a switch between HPLC and UPLC for analyzing a complex sample. In the study, water extracts of *Radix Salvia miltiorrhizae* was taken as a model sample. Retention parameters (a and c values) of 12 peaks were calculated on five linear gradients using both HPLC and UPLC. The relation ship for the a and c values on HPLC and UPLC was developed, respectively. with the linear equation, The a and c values on HPLC and UPLC Could be/ branferred each other, and predication and optimization was realized with calculated a and c values in the CSASS Software. We have obtained fine linear relationship for both a and c values under HPLC and UPLC. R^2 for a and c linear equation resulted in 0.9914 and 0.9936 respectively. The a and c values of water- extracts of *Ligusticum chuanxiong* was calculated using UPLC, while UPLC based analysis was predicted with calculated a and c values. The UPLC chromatogram was similar to the simulated one. We realized the switch between HPLC and UPLC using the method, allowing compatible data for both techniques. The method is simple and accurate. It facilitates the predication and optimization of a complex sample.

Keyword: high performanced liquid chromatography (HPLC); ultra performance liquid chromatography (UPLC); retention parameters; method migration; tradition Chinese medicine

(责任编辑: 张述庆, 责任译审: 邹春申)

(Continued from page 112)

This paper is a review of the latest techniques used in analyzing and removing pesticide residues in traditional Chinese medicines.

Keywrods: traditional Chinese medicine; pesticide residue; measuring; removing; techniques

(责任编辑: 张述庆, 责任译审: 邹春申)