

中药物质基础的高效液相色谱分离分析方法研究

刘艳芳, 刘艳明, 董军, 李伟, 王超然, 张秀莉, 梁鑫淼*

中国科学院分离分析化学重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

* 通讯作者, E-mail: liangxm@dicp.ac.cn

收稿日期: 2009-06-08; 接受日期: 2009-06-19

摘要 高效液相色谱方法已成为中药物质基础研究的重要手段. 在中药质量控制、中药标准品制备、活性化合物发现等方面发挥着不可替代的作用. 然而我们的实验数据表明, 一个中药材可能包含上万个化合物. 中药物质基础的复杂性对高效液相色谱方法提出了巨大挑战. 本文针对液相色谱方法在中药物质基础分离分析中存在的问题与难点, 结合红花、黄连、姜黄三味药材样品, 从亲水色谱分离模式、新型色谱固定相、二维液相色谱分离系统和液相色谱质谱联用技术等方面讨论了液相色谱的分离分析方法和发展方向. 结果表明, 高效液相色谱新技术新方法在中药复杂体系的分离分析中具有很大的发展潜力和应用前景.

关键词

中药物质基础
高效液相色谱质谱联用
色谱固定相
亲水作用色谱
二维高效液相色谱

1 引言

中药作为中华民族的瑰宝, 其治病本质在于物质基础. 过去的几十年, 研究者们对中药物质基础研究做了大量工作, 使得人们的认识有了长足的进步. 然而, 中药物质基础研究仍存在很多问题, 如: 中药物质基础研究多么复杂? 还应从哪些方面着手深入认识中药物质基础? 等等. 我们的研究数据已表明: 中药是一个极其复杂的物质体系, 其复杂性远远超出人们原先的设想. 因此中药物质基础研究需在技术和方法上进行重大创新, 抓住其中的关键问题, 有针对性的开展研究工作, 发展新方法, 解决新问题.

高效液相色谱(HPLC)及其质谱联用(HPLC-MS)技术因强大的分离和高灵敏的检测能力而成为复杂体系分离分析最为常用的方法之一, 在中药质量控制^[1~4]、中药活性化合物的分离纯化^[5~8]及定性定量分析^[9~12]等方面得到了广泛的应用, 对中药物质基础研究做出了巨大的贡献. 然而当前高效液相色谱的分离能力仍不能满足中药复杂性对分离的要求. 因此,

探讨高效液相色谱在中药物质基础研究中的难点和发展方向, 将有助于其自身发展, 使其更好地为中药物质基础研究服务.

本文将针对中药物质组成的复杂性, 探讨液相色谱分离分析中存在的问题与难点, 结合中药实际样品讨论液相色谱的分离分析方法和发展方向, 从亲水色谱分离模式、新型色谱固定相和二维 HPLC 分离系统及 HPLC-MS 技术等方面进行具体分析. 结果表明高效液相色谱在中药复杂体系的分离分析中具有很大的发展潜力, 以上四个方面的发展将会显著提高高效液相色谱分离能力, 促进中药物质基础研究.

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱系统(包括四元梯度泵、自动进样器、柱恒温系统、2996 光电二极管阵列检测器). UPLC/Q-TOF 仪器购自 Waters 公司(美国),

带有 LockSpray 离子质量校正器和电喷雾离子源 (ESI). 工作站为 MassLynx 4.1 软件(Waters 公司, 美国). 用到的色谱柱有: ACQUITY UPLC BEH RP18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, Waters, 美国), XTerra™ MS C18 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm, Waters, 美国), Atlantis HILIC Silica 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, Waters, 美国), Click OEG-4 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm, 实验室自制), Click β-CD 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm, 实验室自制).

色谱纯乙腈购自 Fisher(新泽西州), 色谱纯甲酸购自 Acros(美国), 色谱纯三乙胺购自 Tedia(美国), 色谱用水经 Milli-Q 系统(Millipore, 美国)纯化.

2.2 样品制备

2.2.1 红花样品制备

中药材红花采自新疆塔城, 由中国中医科学院西苑医院中药研究室鉴定, 避光真空保存于 4℃冰箱中. 100 g 红花药材粉碎后置于 1 L 水中, 恒温 100℃提取 120 min. 过滤, 剩余药渣加 1 L 水, 继续恒温 100℃提取 90 min. 将两次水煎液合并, 真空干燥. 取粉末约 1.5 g, 溶于 15 mL 水/乙醇(30/70, V/V)中, 过滤, 将滤液蒸干, 用 10 mL 水(25℃)溶解, 并过 0.45 μm 滤膜, 置于 4℃冰箱中保存.

本实验重点研究红花中等极性化合物. 根据强极性化合物在 C18 色谱柱上保留很弱的特性, 采用 C18 制备色谱有效除去强极性化合物, 收集中等极性化合物. 样品制备所用制备柱为 XTerra™ prep MS C18 (19 mm×100 mm, 5 μm, Milford, MA, USA). 除特别标明, 本文的流动相均为水-0.1%(V/V)甲酸(A1), 乙腈-0.1%(V/V)甲酸(B1). 四通道进样量均为 350 μL, 流速为 16.37 mL/min, 流动相进入检测器前经 1/3000 分流. 所采用的梯度条件为 2% B₁ $\xrightarrow{50\text{ min}}$ 25% B₁ $\xrightarrow{20\text{ min}}$ 65% B₁. 馏分按时间收集, 合并 5~70 分钟的馏分, 旋转浓缩蒸干, 将其溶解于 1 mL 水/乙腈(70/30, V/V)(25℃)中, 为实验用红花样品.

2.2.2 黄连样品制备

中药材黄连采自四川石柱县, 由中国中医科学院西苑医院中药研究室鉴定, 避光真空保存于 4℃冰

箱中. 100 g 黄连药材粉碎后置于 1 L 水中, 恒温 100℃提取 120 min. 过滤, 剩余药渣加 1 L 水, 继续恒温 100℃提取 90 min. 将两次水煎液合并, 真空干燥. 取粉末约 1.5 g, 溶于 15 mL 水/乙醇(30/70, V/V)中, 将滤液中的乙醇蒸出后依次用乙酸乙酯和正丁醇分别萃取两次, 萃取液干燥后得乙酸乙酯和正丁醇组分, 正丁醇组分用水溶解后上 AB-8 大孔树脂, 流出液干燥后得实验所用黄连样品.

2.2.3 姜黄样品制备

中药材姜黄的乙醇提取物购自四川崇州, 上 XAD-1180 大孔吸附树脂, 依次用 20%、40%和 60%乙醇洗脱, 实验用样品为 60%乙醇洗脱组分.

2.3 分析方法

2.3.1 红花样品分析方法

在 UPLC/Q-TOF 分析中, 采用 ACQUITY UPLC BEH RP18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温 30℃. 流动相梯度条件为 5% B₁ $\xrightarrow{20\text{ min}}$ 24% B₁ $\xrightarrow{10\text{ min}}$ 40% B₁, 流速为 0.25 mL/min, 进样量为 5 μL.

2.3.2 黄连样品的分析方法

2.3.2.1 黄连样品反相模式分析方法

采用 XTerra™ MS C18(2.1 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30℃. 流动相梯度条件为 5% B₁ $\xrightarrow{10\text{ min}}$ 5% B₁ $\xrightarrow{10\text{ min}}$ 65% B₁ $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 95% B₁ $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 95% B₁, 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 1 μL.

2.3.2.2 黄连样品亲水模式分析方法

采用 Atlantis HILIC Silica(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30℃. 流动相为水-0.0005%(V/V)三乙胺(A2), 乙腈-0.0005%(V/V)三乙胺(B2). 流动相梯度条件为 95% B₂ $\xrightarrow{30\text{ min}}$ 85% B₂ $\xrightarrow{15\text{ min}}$ 50% B₂ $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 50% B₂, 流速为 1 mL/min, 进样量为 5 μL.

2.3.3 姜黄样品的分析方法

采用本实验室自制的 Click OEG-4(4.6 mm×150

mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$. 流动相为水-0.3% (V/V) 甲酸(A3), 乙腈-0.3%(V/V)甲酸(B3). 流动相梯度条件为 5% $B_3 \xrightarrow{10\text{ min}}$ 5% $B_3 \xrightarrow{45\text{ min}}$ 50% $B_3 \xrightarrow{5\text{ min}}$ 80% B_3 , 流速为 1 mL/min, 进样量为 5 μL .

2.3.4 红花样品二维分析方法

在 2D-HILIC/RPLC-UPLC 分析中, 第一维分析采用 Click β -CD 色谱柱, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$. 流动相梯度条件为 2% $A_1 \xrightarrow{25\text{ min}}$ 12% $A_1 \xrightarrow{20\text{ min}}$ 40% A_1 , 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL . 手动收集馏分, 从 1.8~44.8 min 每分钟一个馏分, 依次记为 Fraction 1、Fraction 2……Fraction 43. 馏分用氮气吹干后溶于 100 μL 乙腈/水(5/95, V/V)中, 并保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中.

第二维分析采用 ACQUITY UPLC BEH RP18 色谱柱, 柱温保持在 30 $^{\circ}\text{C}$. 流动相梯度条件为 5% $B_2 \xrightarrow{20\text{ min}}$ 24% $B_2 \xrightarrow{10\text{ min}}$ 40% B_2 , 流速为 0.25 mL/min, 每个馏分的进样量均为 5 μL .

2.3.5 红花样品质谱条件

Q-TOF Premier 质谱采用 ESI 正离子检测. 氮气流速为 800 L/h, 氮气温度为 300 $^{\circ}\text{C}$. 锥孔气流速为 50 L/h, 离子源温度是 120 $^{\circ}\text{C}$. 毛细管电压设为 3.0 kV.

锥孔电压设为 45 V. Q-TOF Premier 的采样速率是 1.0 s, 内部扫描延迟 0.02 s. 氦气作为碰撞诱导解离的气体, 碰撞电压分别是 5 eV. 扫描范围是 50~1000 m/z . 以棒图的形式记录谱图. 所有的分析在参比样品的对照下进行以保证分子量计算的准确和重复. 亮氨酸脑啡肽作为参比样品, 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 进样速度为 10 $\mu\text{L/min}$. 参比样品的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子是 556.2771 Da. 质谱交替采集样品和参比样品的数据. 参比样品的数据采集时间固定为 1 s. 原始数据用 MassLynx 软件分析(Waters, V.4.1).

2.4 数据分析

质谱分析所产生的数据采用 Markerlynx Application Manager Version (Waters, 英国)进行分析. 该软件中, 保留时间范围设为 1~30 min. 质量范围设为 50~1000 Da, 质量偏差设为 50 ppm, 最小强度设为 50, 保留时间偏差设为 0.2 s. 在统计过程中采用 ApexTrack 峰积分模式来检测色谱峰, 排除了同位素峰及噪音信号的影响. 该软件对 LC/MS 的分析结果以保留时间、 m/z 及其相应强度的形式输出.

3 讨论与结论

3.1 中药物质组成极其复杂

中药的复杂性已被人们所共识. 图 1 为 RP-

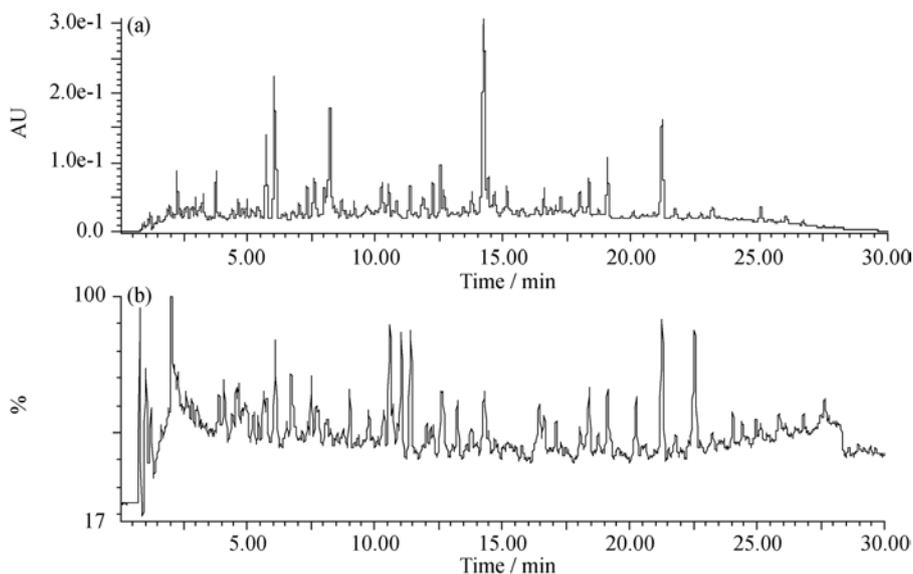


图 1 红花样品在 RP-UPLC 中的分析谱图

(a) 为 280 nm 波长下色谱图; (b) Q-TOF 质谱总离子流图

UPLC/Q-TOF 对常用中药红花样品分析的色谱图, 从图上我们可以清晰地看到, 整个分析时间内都是色谱峰, 且大部分峰没有完全基线分离. 将质谱数据经 Markerlyn 提取和比对, 30 min 共检测到 6027 个不同的离子(色谱保留时间不同或质核比不同). 由于色谱峰重叠现象的普遍存在, 在质谱检测过程中会不可避免地产生离子抑制效应, 红花样品中真实存在离子个数应该大于 6027. 这提示我们: 中药物质组成极其复杂, 而我们对其认识十分有限, 高效液相色谱的分离能力不足以满足中药复杂性的要求, 需要进行深入研究, 发展亲水色谱模式、新型色谱固定相和二维 HPLC 分离系统及 HPLC-MS 技术.

3.2 亲水色谱模式在中药复杂体系中的应用

反相高效液相色谱法(RP-HPLC), 以 C18 固定相为代表, 是目前发展最成熟、应用最为广泛的分离方法之一. 它对中等极性和弱极性化合物可以实现较好的分离, 但对强极性化合物的保留很弱甚至不保留. 因此, 中药强极性化合物缺乏有效的分离方法, 研究报道较少. 近年来, 亲水作用色谱(HILIC)因其对强极性化合物具有较好的分离而迅速发展起来, 它的选择性与 C18 完全不同, 可以对 C18 上不保留的

化合物实现较好的分离^[13~15]. 另外, 亲水作用色谱采用高有机相比率的流动相, 其质谱检测的灵敏度更高^[15]. 我们将亲水作用色谱模式应用于中药强极性化合物的分离中, 获得了很好的结果. 图 2(a)为黄连样品采用反相模式分离的色谱图, 死时间附近有紫外响应很高的大峰出现, 说明样品中含有大量的强极性化合物, 反相 C18 对这些化合物几乎没有保留. 采用 HILIC 模式对该样品进行分离, 从图 2(b)上可以看出, 49 个色谱峰被分离出来, 而我们采用通常的反相色谱模式是无法认识到这一点的. 这提示我们: 亲水作用色谱有望解决中药强极性化合物的分离问题, 在中药物质基础研究方面具有很大的应用潜力.

3.3 新型色谱填料在中药复杂体系中的应用

分离材料是分离技术的核心内容, 也是解决中药分离难题的关键因素之一. 当前, 广泛使用的商品化分离材料具有柱效高、重复性好等优点, 在中药分离分析中发挥着重要作用. 但是, 商品化分离材料并不能解决中药复杂体系分离的全部问题. 例如, 最常用的反相 C18 分离材料, 虽然型号众多, 但只是厂家不同, 其分离机理几乎没有区别, 难以实现二维互补分离; C18、氰基和苯基等反相色谱分离材料之间具

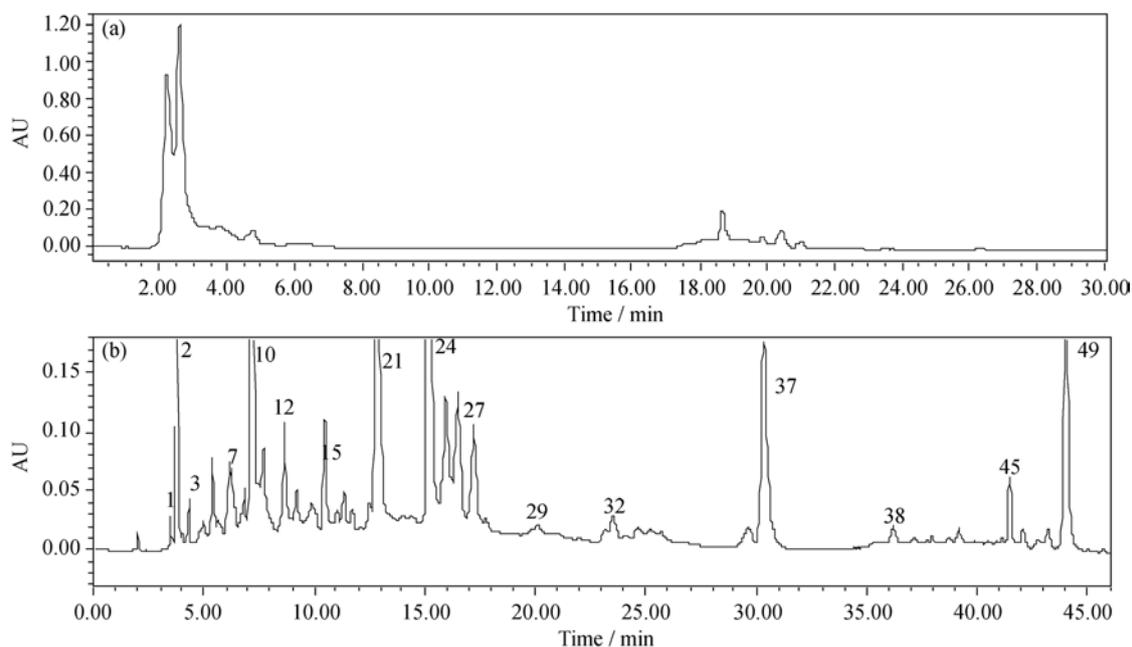


图 2 黄连样品在反相模式(a)和 HILIC 模式(b)下的分析色谱图

检测波长为 254 nm

有一定的互补性,但是正交性有限;分离强极性化合物的材料种类少且分离效率和选择性都存在的问题,不能满足中药水煎物质基础研究的需要.因此,发展新型功能材料,弥补商品化色谱柱的不足是解决中药分离难题的途径之一.

我们成功地将 click chemistry 方法引入到分离材料的制备中^[16],发展了可用于反相条件下二维互补分离的四聚乙二醇固定相(Click OEG-4)^[17]和环糊精固定相(Click β -CD)^[18],其正交性大大优于现有商品化分离材料,在中药复杂体系的分离分析中显示了强大的分离能力和潜力.另外,四聚乙二醇分离材料还具有一定的“聚类”分离功能,图3显示姜黄样品在 Click OEG-4 上的分离结果.姜黄中根据母核不同大致分为三类化合物,它们的紫外吸收图完全不同,根据这一特征我们可以看出,化合物在 Click OEG-4 上的保留不是完全按照极性分布而是按照母核不同而分布.这种“聚类”作用有利于相同母核、不同取代基化合物中微量未知成分的研究,拓展对中药物质基础未知领域的认识.这提示我们:在充分发挥商品化分离材料功能的基础上,针对中药分离中的重点和难点问题,设计功能独特的新型分离材料具有重大意义.

3.4 二维液相色谱分离系统在中药复杂体系中的应用

一维色谱的分离能力远远不能满足中药分离分析的需要,因此二维色谱技术被越来越多地应用到中药的研究中^[19-21].发展新的正交二维体系,尽可能地利用二维空间,对复杂体系进行高效分离,从而有效地提高分离能力是二维色谱研究的重点.结合课题组自主发展的新型色谱固定相,我们构建了多种新型二维液相色谱系统,如:基于 Click OEG-4 和 C18 固定相的 2DRPLC/RPLC 系统、基于 C18 和 Click β -CD 固定相的 2D-RPLC/HILIC 系统等,经数学计算和实际应用验证,它们都具有很好的分离机理正交性,在中药复杂体系分离中显示了强大的分离能力^[22,23].

为了进一步提高二维体系的分离能力,本文构建了离线模式的基于 Click β -CD (5 μ m) 和 BEH RP18 (1.7 μ m) 的 2D-HILIC/RP-UPLC/Q-TOF 系统.第一维 Click β -CD 柱的制备图如图4所示.每分钟的馏分在 RP-UPLC 上分析,图5给出了4个不相邻馏分(Fraction 1, 4, 7, 10)在第二维的总离子流图,这些馏分间不存在交叉的问题,从表观上看,几乎每个

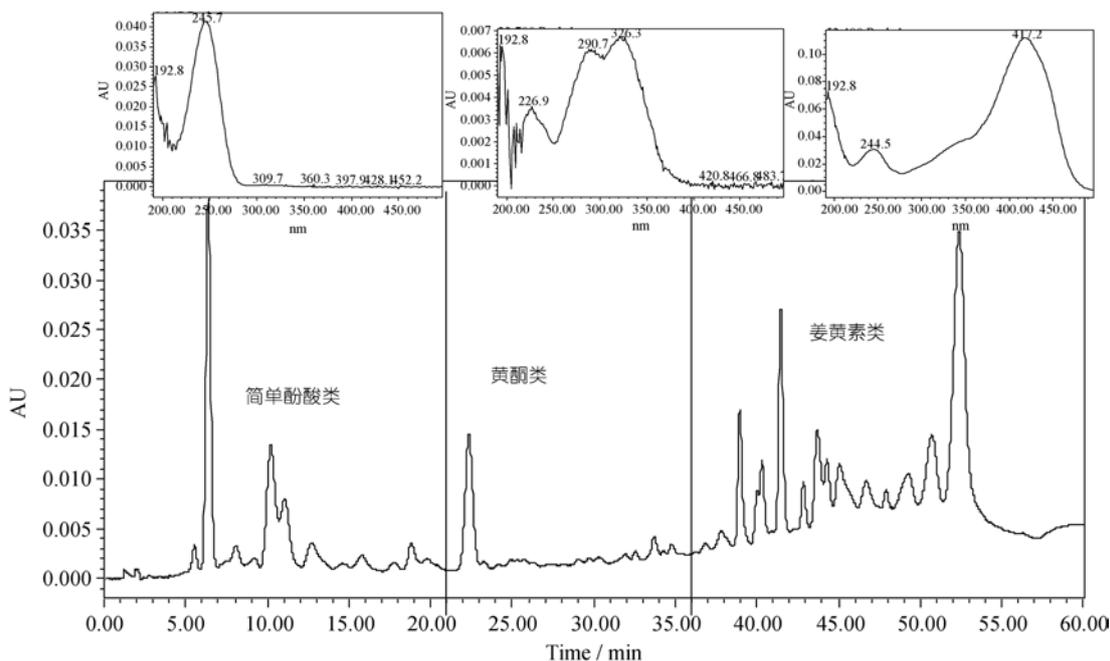


图3 姜黄样品采用 Click OEG-4 色谱柱分析的色谱图
检测波长为 254 nm

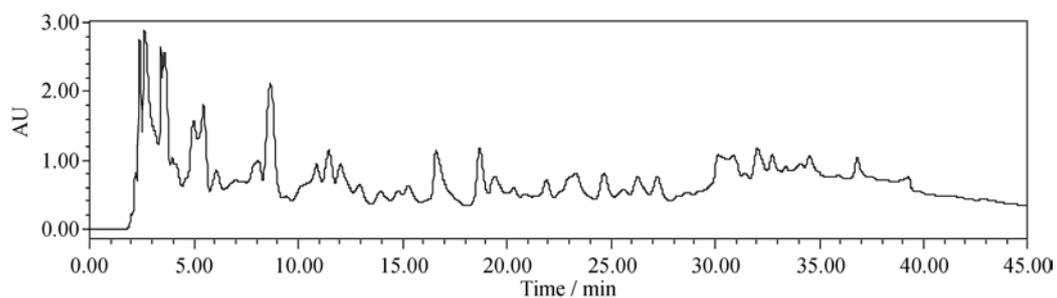


图 4 红花样品在第一维 Click β -CD 柱上的馏分制备谱图

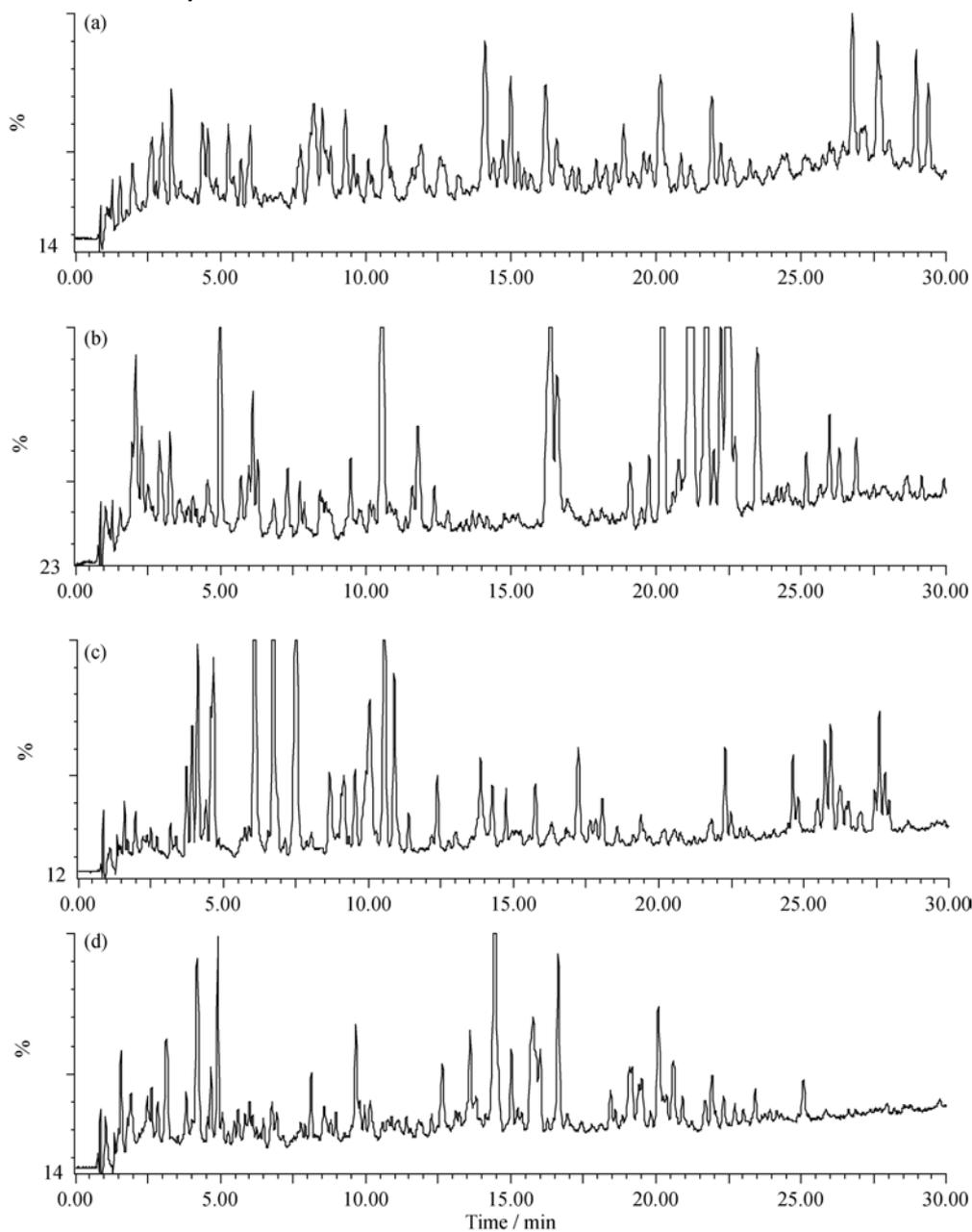


图 5 红花样品在 2D-HILIC/RP-UPLC 系统中第二维分离的代表性谱图(总离子流图)

(a)~(d) 分别为 Fraction 1, 4, 7, 10

馏分分析谱图的复杂程度都不亚于用一维 RP-UPLC/Q-TOF 系统对红花总样的分析谱图(图 1)。其他馏分的情况与这些馏分基本相同。这些结果表明红花样品的复杂性超过了当前最先进的分离技术所能达到的分离水平。这提示我们: 二维液相色谱极大地提高了高效液相色谱的分离能力, 但仍不能满足中药复杂体系的分离要求, 说明多维液相色谱分离具有很大的发展空间。

3.5 高效液相色谱质谱联用技术在中药复杂体系中的应用

高效液相色谱质谱联用技术(液质联用技术)结合了液相色谱的高效分离和质谱检测的高灵敏度以及能够给出化合物信息的优点, 被广泛应用于中药复杂体系的表征中。其研究内容主要为质谱定性定量分析^[24-26]、质谱裂解规律研究^[27-29]以及质谱指纹谱研究^[30-32]等, 其发展有赖于质谱检测技术自身的发展和进步。经 Markerlynx 软件分析, 2D-HILIC/RP-UPLC/Q-TOF 系统可以从红花样品中检测到 146352 个离子信息, 这比一维 RP-UPLC/Q-TOF 系统的分析结果(6027 个离子)提高了 20 多倍。图 6 中给出了一维 RP-UPLC/Q-TOF 和 2D-HILIC/RP-UPLC/Q-TOF 分析红花样品所得的离子分布平面图, 即以检测到的离子质荷比(m/z)对保留时间作图。从图 6(a)和 (b) 的比较中可以看出, 两张图中点的分布趋势十分相似, 但图 6(b)中 2D-HILIC/RP-UPLC/Q-TOF 系统分析所得的数据点明显要比图 6(a)中一维 RP-UPLC/Q-TOF 系统分析所得的数据点要密集很多, 这提示我们: 二维分离方法强大的分离能力大大减少了离子抑制效应, 质谱检测更为灵敏, 能够从样品中获得更多的化合物组成信息; 随着色谱分离能力的提高和质谱检测技术的发展, 液质联用技术将更好地发挥其优势, 不断深化中药物质基础研究。人们对中药复杂体系的认识将随着分离分析技术的发展而提高, 从最初的几十、几百个化合物达到几千几万的水平。

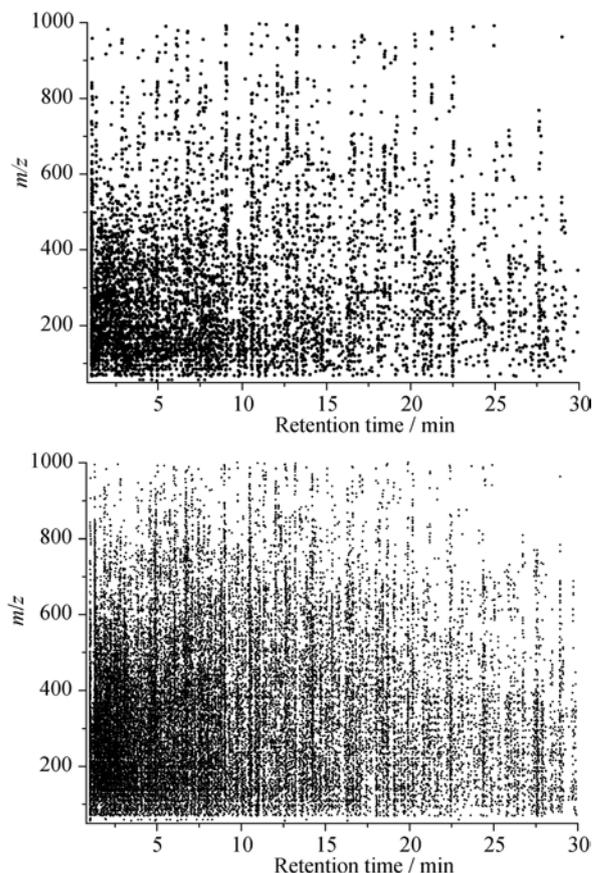


图 6 红花样品一维(a)和二维(b)高效液相分离系统的离子分布平面图

4 结论

高效液相色谱技术已成为中药复杂体系研究的强有力的分析技术支撑, 不论是在对照品的制备, 还是中药质量控制方面都占据着重要的地位。然而随着研究的深入, 中药物质基础研究对高效液相色谱方法提出了更多的要求, 既要分离脂溶性物质, 又要对强极性、水溶性物质有保留, 既要有高的峰容量, 又要有不同的选择性。针对这些挑战, 研究者们可发展和应用亲水作用色谱模式, 结合新型的色谱分离材料, 构建正交二维液相色谱分离系统和液质联用技术, 以期解决强极性物质和高效分离等难点问题, 使得中药物质基础研究不断深入。

参考文献

- 1 Jin W, Ge R L, Wei Q J, Bao T Y, Shi H M, Tu P F. Development of high-performance liquid chromatographic fingerprint for the quality control of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. *J Chromatogr A*, 2006, 1132(1-2): 320—324

- 2 Liu M, Li Y G, Zhang F, Yang L, Chou G X, Wang Z T, Hu Z B. Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS). *J Sep Sci*, 2007, 30 (14): 2256—2267
- 3 Yi L Z, Yuan D L, Liang Y Z, Xie P S, Zhao Y. Quality control and discrimination of *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and multivariate statistical analysis. *Anal Chim Acta*, 2007, 588(2): 207—215
- 4 Yu R M, Ye B, Yan C Y, Song L Y, Zhang Z, Yang W, Zhao Y. Fingerprint analysis of fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(3): 818—823
- 5 Wang Y P, Xue X Y, Xiao Y S, Zhang F F, Xu Q, Liang X M. Purification and preparation of compounds from an extract of *Scutellaria barbata* D. Don using preparative parallel high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2008, 31: 1669—1676
- 6 Zhang J, Jin Y, Liu Y F, Xiao Y S, Feng J T, Xue X Y, Zhang X L, Liang X M. Purification of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang using preparative 2-D HPLC. *J Sep Sci*, 2009, 32: 1401—1406
- 7 Dong H Q, Ning Z X, Yu L J, Li L, Lin L C, Huang J B. Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. *Molecules*, 2007, 12(3): 552—562
- 8 Liu C, Han J Y, Duan Y Q, Huang X, Wang H. Purification and quantification of ginsenoside Rb-3 and Rc from crude extracts of caudexes and leaves of *Panax notoginseng*. *Sep Purif Technol*, 2007, 54(2): 198—203
- 9 Li L, Tsao R, Dou J P, Song F R, Liu Z Q, Liu S Y. Detection of saponins in extract of *Panax notoginseng* by liquid chromatography-electro spray ionisation-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2005, 536(1-2): 21—28
- 10 Liu C, Han J Y, Duan Y Q, Huang X, Wang H. Purification and quantification of ginsenoside Rb-3 and Rc from crude extracts of caudexes and leaves of *Panax notoginseng*. *Sep Purif Technol*, 2007, 54(2): 198—203
- 11 Huang L Y, Chen T W, Ye Z, Chen G N. Use of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl. *J Mass Spectrom*, 2007, 42(7): 910—917
- 12 Ye M, Guo H, Guo H Z, Han J, Guo D. Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections. *J Chromatogr B*, 2006, 838(2): 86—95
- 13 Jiang Z J, Smith N W, Ferguson P D, Taylor M R. Hydrophilic interaction chromatography using methacrylate-based monolithic capillary column for the separation of polar analytes. *Anal Chem*, 2007, 79(3): 1243—1250
- 14 Hemstrom P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29(12): 1784—1821
- 15 Gika H G, Theodoridis G A, Wilson I D. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabonomic analysis of Zucker rat urine. *J Sep Sci*, 2008, 31(9): 1598—1608
- 16 Guo Z M, Lei A W, Liang X M, Xu Q. Click chemistry: A new facile and efficient strategy for preparation of functionalized HPLC packings. *Chem Commun*, 2006, 43: 4512—4514
- 17 Guo Z M, Liu Y F, Xu J Y, Xu Q, Xue X Y, Zhang F F, Ke Y X, Liang X M, Lei A W. Novel reversed-phase high-performance liquid chromatography stationary phase with oligo(ethylene glycol) “click” to silica. *J Chromatogr A*, 2008, 1191(1-2): 78—82
- 18 Guo Z M, Jin Y, Liang T, Liu Y F, Xu Q, Liang X M, Lei A W. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click beta-cyclodextrin” stationary phase. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(2): 257—263
- 19 Hu L H, Chen X G, Kong L, Su X Y, Ye M L, Zou H F. Improved performance of comprehensive two-dimensional HPLC separation of traditional Chinese medicines by using a silica monolithic column and normalization of peak heights. *J Chromatogr A*, 2005, 1092(2): 191—198
- 20 Tian H Z, Xu J, Xu Y, Guan Y F. Multidimensional liquid chromatography system with an innovative solvent evaporation interface. *J Chromatogr A*, 2006, 1137(1): 42—48
- 21 Ma C F, Wang H H, Lu X, Li H F, Liu B Y, Xu G W. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1150(1-2): 50—53
- 22 Liu Y M, Guo Z M, Jin Y, Xue X Y, Xu Q, Zhang F F, Liang X M. “Click oligo(ethylene glycol)”: An excellent orthogonal stationary phase to C18 for two-dimensional reversed-phase/reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1206(2): 153—159
- 23 Liu Y M, Xue X Y, Guo Z M, Xu Q, Zhang F F, Liang X M. Novel two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, an excellent orthogonal system for practical analysis. *J Chromatogr A*, 2008, 1208(1-2):

- 24 Horvath C R, Martos P A, Saxena P K. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 2005, 1062(2): 199—207
- 25 Zhang H J, Shen P, Cheng Y Y. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicine Si-Wu-Tang by HPLC coupled with DAD and ESI-MS. *J Pharm Biomed Ana*, 2004, 34(3): 705—713
- 26 Ren L, Xue X Y, Zhang F F, Wang Y C, Liu Y F, Li C M, Liang X M. Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(18): 3039—3050
- 27 Li C M, Zhang X L, Xue X Y, Zhang F F, Xu Q, Liang X M. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(12): 1941—1954
- 28 Jin Y, Zhang X L, Shi H, Xiao Y S, Ke Y X, Xue X Y, Zhang F F, Liang X M. Characterization of C-glycosyl quinochalcones in *Carthamus tinctorius* L. by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(8): 1275—1287
- 29 Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2004, 39: 312—321
- 30 Cai M, Zhou Y, Gesang S L, Bianba C R, Ding L S. Chemical fingerprint analysis of rhizomes of *Gymnadenia conopsea* by HPLC-DAD-MSn. *J Chromatogr B*, 2006, 844(2): 301—307
- 31 Hu P, Liang Q L, Luo G A, Zhao Z Z, Jiang Z H. Multi-component HPLC fingerprinting of *radix salviae miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(6): 677—683
- 32 Kumar V, Mehrotra N, Lal J, Gupta R C. Pattern profiling of the herbal preparation picroliv using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, 1045(1-2): 145—152

The study of high-performance liquid chromatography methods for the separation and analysis of traditional chinese medicines

LIU YanFang, LIU YanMing, DONG Jun, LI Wei, WANG ChaoRan, ZHANG XiuLi & LIANG XinMiao*

Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: The high-performance liquid chromatography (HPLC) methods have played an important role in the quality control of traditional Chinese medicines (TCMs), the preparation of standards of TCMs, the discovery of active compounds from TCMs and so on. Since, our data showed that there may be above ten thousands of compounds contained in a certain kind of TCMs, the separation and analysis of TCMs becomes a big challenge to the HPLC methods. This article discussed the problems and the development of the HPLC methods in the following aspects: hydrophilic interaction chromatography (HILIC) modes, novel HPLC stationary phase, two-dimensional HPLC separation system and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) method by investigating the extracts of *Carthamus tinctorius* L, *Coptis chinensis* Franch and *Curcuma longa* L. It shows that new technologies and new methods of HPLC have great potential and application prospects in the separation and analysis of TCMs.

Keywords: the material basis of TCMs, HPLC-MS, chromatography stationary phase, HILIC, 2D-HPLC