

- 1993, 9(1): 1.
- [16] 王竹梅, 陈明晖, 李成韶, 等. 马钱子散对家兔肌电潜伏期的影响及其药效动力学研究 [J]. 中成药, 2002, 22(4): 280.
- [17] 肇丽梅, 何晓静, 邱 枫. 药理效应法测定黄芩苷及清热剂的药动学参数 [J]. 广东药学院学报, 2006, 22(1): 22-24.
- [18] 田海军, 郑曙明, 杨治国. 中药复方提取液在鲫鱼体内的药物代谢动力学 [J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(1): 103-105.
- [19] 李艳华, 佟恒敏, 闫清波, 等. 应用药物累积法研究复方中药 II 的药代动力学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(7): 86-87.
- [20] 肖凤霞, 周莉玲, 李 锐. 药物累积法测定四逆汤制剂的药动学参数 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 228-229.
- [21] 李 颖, 中药药代动力学研究方法概况 [J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(3): 62-64.
- [22] 厉将斌, 李海松, 张 壮. 中药药代动力学方法评述 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 25(6): 51-54.
- [23] 黄 熙, 臧益民, 夏 天, 等. 试论“证治药动学”新假说 [J]. 中药药理与临床, 1994, 10(6): 43-44.
- [24] 薛 燕. 中药复方震弹理论 [A]. 第五届全国中药和天然药物学术交流会论文汇编 [C]. 中国药学会, 1997.
- [25] 黄 熙, 陈可冀, 任 平. “复方效应成分动力学”新假说的科学证据、要素、意义及前景 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 250.
- [26] 杨 奎, 蒲旭峰. 论“中药维持药动学研究”的意义及对策 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(1): 36-39.
- [27] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.

超高效液相色谱在中药领域的应用

吴剑威^{1,2}, 赵润怀², 陈 波², 杨美华^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 中国药材集团公司科技研发部, 北京 102600)

摘 要:超高效液相色谱是近年来发展起来的一种相对快速、便捷的分析手段。由于其在高效液相色谱的基础上进行了突破性地改造, 使得其具有较高分离效能和灵敏度, 较短的分析时间以及较少的分析溶剂消耗等优点。超高效液相色谱在天然药物的有效成分检测、质量控制、指纹图谱及代谢等多研究方面得到了愈发广泛的应用。

关键词:超高效液相色谱; 中药; 应用

目前, 高效液相色谱 (HPLC) 在药物分析、化合物制备及指标成分定量等方面有着广泛的应用, 是一种较为常见的分析技术。随着社会及科学技术的不断进步与发展, 人们对液相色谱技术的要求也不断提高, 需要在保证数据可靠性及精密度的前提下, 尽可能的缩短样品分析时间。在不懈的探索及努力下, 超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 应运而生, 并在近年来发展较快, 在中药的有效成分检测、质量控制、指纹图谱及代谢等诸多领域逐步得到了应用。

UPLC 是在 HPLC 的基础上发展起来的, 它通过在色谱柱上使用小颗粒填料以及其他部件的改进最终实现了与传统的 HPLC 相比具有更高的分离效率和更快的分离速度等优点。在分析中, 可以在短短的数分钟内对几十、甚至上百种化合物进行分析测定^[1]。另外, 通过采用合适的接口技术, 同样可以将超高效液相色谱仪与质谱仪联用, 大大提高了分离效能及灵敏度, 缩短保留时间, 减少了分析溶剂的消耗。

UPLC™ 是美国 Waters 公司研制开发的一种超高效液相色谱仪, 采用 1.7 μm 颗粒度的色谱柱填料。同时, 日本岛津公司也研发了一款超快速液相色谱仪 (ultra fast liquid chromatography, UFLC), 其同样是在高效液相色谱的基础上通过改进, 使用小颗粒填料 (2.2 μm) 色谱柱而发展起来的, 也具备更高的分离效率和更快的分离速度等优点, 得到

较为广泛的应用^[2,3]。

由于 UPLC 及其与质谱联用具有较为突出的优越性, 近几年来在中药领域的应用取得了快速的发展。

1 质量控制研究

中药成分十分复杂, UPLC 在中药这个复杂体系的分离分析中发挥了重要作用。Chen 等^[4]使用 1.7 μm 的小颗粒填料 BEH C₁₈ 色谱柱, 采用 UPLC 法对淫羊藿中包括淫羊藿苷、淫羊藿糖苷 C、宝藿苷 VI 等在内的 15 种黄酮类成分进行了分析研究。实验采用乙腈-乙酸水溶液进行梯度洗脱, 15 种黄酮类成分在 15 min 内全部得到了分离, 且分离效果良好。最低检测限及最低定量限分别为 0.13、0.52 ng。

Wang 等^[5]采用 UPLC 法对大黄中 5 种蒽醌衍生物进行分析测定, 结果常规 HPLC 法测定需要 30 min 的待检化合物仅 3 min 内即完成了分离。实验采用 1.7 μm 的小粒径填料填充的 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱以 0.1% 磷酸水溶液-甲醇 (31:69) 为流动相。通过对比实验发现, 分析同样浓度的化合物采用 HPLC 及 UPLC 法的最低检测限、RSD 值分别为 1 μg/mL、5.4% 和 0.40 μg/mL、2.8%, 而此时 UPLC 法的进样量是 1 μL, 仅为 HPLC 法进样量的 1/10。

芮雯等^[6]采用超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术 (UPLC/Q-TOFMS) 对于姜油中姜酚类成分进行分析, 并对主要成分进行鉴别。结果共鉴定出姜油

* 收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7082060)

作者简介: 吴剑威 (1982—), 男, 中国医学科学院药用植物研究所在读硕士研究生, 主要从事中药材质量标准及新药开发研究。

Tel: (010) 62899730

* 通讯作者 杨美华 Tel & Fax: (010) 62899730 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

中 8 个姜酚类化合物,为干姜油姜酚类成分的鉴定提供了一种准确有效的方法。Zheng 等^[7]应用 UPLC-MS/MS 法对中药成分温脾汤进行了组分分析研究,结果鉴定出多种酚类、生物碱类、三萜皂苷类及黄酮苷类物质,达到定性分离与定性鉴别同时在线完成的目的。

近年来,不法分子受利益驱使,利用中成药成分复杂而不易检测,通过在补肾壮阳类中成药及中药保健品中非法添加枸橼酸西地那非,使疗效缓和的中成药具有了暂时的速效或特效,致使患者出现严重不良反应,甚至导致死亡。通过研究发现,应用 BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以乙腈-甲醇-乙酸铵缓冲溶液作为流动相,通过 UPLC-MS 法可以成功地建立快速、准确、高灵敏度的中成药中非法添加西地那非的检测方法。此方法选择性强、灵敏度高,为药监部门有效查处此类不法行为提供依据,切实保障人民用药安全^[8]。杨筱丽等^[9]采用 HPLC 方法,建立了中成药解郁丸中芍药苷和阿魏酸的测定方法。结果解郁丸中的芍药苷、阿魏酸和其他组分在 4 min 内可完全分离,方法的回收率、精密度、重复性均符合要求。相关的研究报道还可见 Jin^[10]和叶茂等^[11]对延胡索、苦参素注射液的分析研究。

2 药动学研究

药动学是揭示药物作用物质基础的有力手段,对阐述药物作用机制及其科学内涵、设计及优选药物给药方案,促进新药开发和剂型改进及质控均有着重要意义。2005 年 Johnson 等^[12]就应用 UPLC-MS 技术对扑热息痛片(对乙酰氨基酚)在人体内的代谢进行了研究,并通过与 HPLC-MS 分析对比发现,UPLC 是复杂混合物分析研究的一种较为新颖的技术手段,灵敏度大约是常规 HPLC 分析方法的 3 倍,并在单位时间内可以检测到更多的代谢产物。由于使用小于 2 μm 的小粒径填料,UPLC 色谱柱的柱压通常较高,可达 3.58×10^7 Pa,因此需要配套其他适合的设备同时进行使用。

中药有效成分极为复杂而且又往往以组方应用,产生的药理作用可能是各个组分协同作用的结果,大大增加了多组分药动学研究的困难。UPLC 具有的高灵敏度、高分离度、高通量的特点使其在复杂体系的分离中发挥了巨大的优势,极大地推动了天然药物药动学的研究和发展。居文政等^[13]采用 UPLC-MS/MS 法研究了注射用银黄制剂在健康人体的药动学。通过对人血浆中黄芩苷和绿原酸的测定,发现静脉滴注后,黄芩苷和绿原酸的药时曲线分别符合二房室和三房室模型,为临床合理用药和该制剂的内在质量评价提供依据。

高分析的时间飞行质谱(TOF-MS)能够测定化合物准确的相对分子质量,当将其与 UPLC 联用后适合于复杂体系的分离分析和未知物的结构鉴定。汪江山等^[14]建立了一种基于 UPLC/TOF-MS 测定人参皂苷 Rg₃ 给药后大鼠尿液中代谢物变化的方法,对其中两种发生显著变化的代谢物分别通过准确的质量测定得到其元素组成,以及 MS/MS 技术得到其结构信息,并通过检索数据库最终分别鉴定代谢物为 4,8-二羟喹啉甲酸和 4-羟基-2-喹啉酸。

复方五仁醇胶囊是由五味子、三七、柴胡等 4 味药组成

的一种治疗急性慢性肝炎的制剂。采用常规 HPLC 法进行药代分析,已经标出 10 批含药血清色谱图共有峰 13 个,其中 8 个为制剂原形成分入血,5 个为代谢产物,鉴定出五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素 4 个木脂素类成分。但是,限于 HPLC 灵敏度,估计血清中还有一些质量分数较低的成分没有检测出来。通过采用灵敏度更高的 UPLC-MS/MS 方法,比较复方五仁醇胶囊含药血清、体外制剂、空白血清及对照品离子流色谱图(EIC),并通过质谱图相关离子峰分析,确认进入血液的木脂素类成分。结果表明除以往发现的 4 种木脂素类成分外,制剂中存在的五味子酯甲成分进入了血液。推断这 5 种木脂素类成分很可能是复方五仁醇胶囊体内直接作用物质的重要组成部分,这一研究有助于阐明该制剂药效物质基础^[15]。

不仅如此,国内外学者还使用 UPLC 方法对心迪软胶囊^[16]、黄芩苷^[17]等药物在生物体内的代谢进行了分析研究,结果均能实现在数分钟内使目标化合物达到分离,较好地克服了内源性基质杂质的干扰,结果准确可靠。

3 指纹图谱研究

中药指纹图谱技术是随现代分析技术的发展而诞生的,是中药鉴别技术的循序发展和延伸。该技术系指中药材或中成药经适当处理后,采取一定分析手段,得到能够标示该中药材或中成药特性的共有成分的图谱。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的化学(不包括生物学)鉴定手段,用以对中药材和中成药进行鉴别真伪,评价原料药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性。我国自 2000 年 8 月颁发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》以来,中药指纹图谱的研究已经成为中药研究的热点,各种现代化仪器已经用于该方向研究中^[18]。其中 HPLC 法在中药指纹图谱研究中尤其得到了广泛的应用。传统的 HPLC 用于中药指纹图谱研究时的分析时间通常为数十分钟,有时甚至达到 1.5 h。而采用 UPLC 法,对于一个复杂的待检体系一般可以在数分钟内完成分析任务。目前中药正处于迈向现代化的瓶颈阶段,UPLC 的出现为解决这个问题提供了现代技术手段,成为国内外一种发展趋势。

刘少华等^[19]利用 UPLC 建立了丹参药材中水溶性成分指纹图谱。实验时采用 1.7 μm 小粒径填料填充的 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱,以 0.5%甲酸乙腈-0.5%甲酸水为流动相梯度洗脱,对 12 批陕西商洛药材基地产丹参药材进行测定,标定共有峰,并通过国家药典指纹图谱相似度计算软件中“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”计算出其相似度均在 0.95 以上。该实验方法操作简单,大大缩短了分析时间,重现性、精密度和稳定性良好,可作为丹参药材质量控制方法。

此外,Liu 等^[20]同样应用该技术对丹参的指纹图谱进行了相关研究,标定了丹参缩酚酸、丹参酮在内的 20 个目标化合物,并对 11 批丹参样品进行了验证,效果良好。与常规 HPLC 相比,得到分离的色谱峰变得更窄、更高。将 UPLC 与 MS 相联,质谱为浓度型检测器,当色谱峰变窄时,信噪比

会更高,灵敏度可以提高数倍。

4 存在的局限性

UPLC在具有诸多优点的同时也存在着一定的局限性。首先,UPLC仪器的费用较为昂贵,同比传统的HPLC仪来说,价格上要高很多。其次,由于UPLC色谱柱本身具有较高的技术含量,目前有能力生产高质量色谱柱的企业数量还较少,这给UPLC的推广以及应用领域的拓展带来了一定阻碍。同时,由于UPLC色谱柱的柱颗粒较小,为防止堵塞,样品前处理通常要求更加严格。另外,峰面积的重复性略有不足。Novák et al.^[21]发现UPLC分析样品时峰面积的重复性略逊于HPLC,特别是低浓度样品时更加明显,其峰面积重复性的RSD值约为HPLC的2倍。通过分析,可能是由于UPLC的进样量过少(只有2 µL),或者是由于采用了半环(partial loop)进样的方式,理论上这种进样方式的精密度不如全环(full loop)进样。

5 结语

UPLC是一种较为新颖的技术手段,与传统分析方法相比具有多方面的优势。目前,无数学者正致力于推动其在天然药物方面更为广泛的应用研究中。利用已经建立的分析模型,可以利用待分析物在传统HPLC法中测定的保留参数计算出在UPLC中的相关参数,进行分离预测,实现分离结果的优化及两种方法的相互转换^[22]。另外,一些较为新颖、便捷的样品前处理方法,如QuEChERS法^[23]、搅拌吸附萃取法(stir bar sorptive extraction)^[24]、薄膜辅助溶媒萃取法(membrane-assisted solvent extraction)^[24]、固相分散基质萃取(matrix solid-phase dispersion extraction)法^[25]等已经应用到UPLC检测样品的前处理中,不仅节约了分析时间,还保证了小粒径填料色谱柱不被堵塞。可以相信,随着技术的不断发展,UPLC必然会在天然药物以及更多领域得到广泛应用,日后也会有更多先进、快捷的分析方法不断涌现及更新。

参考文献:

- [1] Anton K, Patrick B, Kathryn M, et al. Quantitative multi-residue method of about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-µm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1194(1): 66-79.
- [2] Min J Z, Shimizu Y, Toyooka T, et al. Simultaneous determination of 11 designated hallucinogenic phenethylamines by ultra-fast liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873(1-2): 187-194.
- [3] 杨义芳. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用 [J]. *中草药*, 2008, 39(8): 1259-1263.
- [4] Chen X J, Ji H, Zhang Q W, et al. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(2): 226-235.
- [5] Wang J B, Li H F, Jin C, et al. Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(4-5): 765-770.
- [6] 芮雯, 冯毅凡, 吴妍, 等. 干姜油中姜酚类成分的UPLC/Q-TOFMS分析 [J]. *中草药*, 2008, 39(5): 667-668.
- [7] Zheng X T, Shi P Y, Cheng Y Y, et al. Rapid analysis of a Chinese herbal prescription by liquid chromatography-time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1206(2): 140-146.
- [8] 张翠英, 李振国, 徐金铃, 等. UPLC/MS/MS法检测补肾壮阳类中成药中非法添加枸橼酸西地那非的定性定量研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(10): 1741-1743.
- [9] 杨筱丽, 李耿. 超高效液相色谱法同时测定解郁丸中芍药苷和阿魏酸的含量 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(11): 946-947.
- [10] Jin G W, Xue X Y, Zhang F F, et al. Prediction of retention times and peak shape parameters of unknown compounds in traditional Chinese medicine under gradient conditions by ultra performance liquid chromatography [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 628(1): 95-103.
- [11] 叶茂, 谢国祥, 赵爱华, 等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱法测定苦参素注射液中的苦参碱和氧化苦参碱 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(12): 1398-1401.
- [12] Kelly A J, Robert P. Investigating the human metabolism of acetaminophen using UPLC and exact mass or TOF MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3-4): 805-810.
- [13] 居文政, 刘芳, 吴婷, 等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中黄芩苷和绿原酸 [J]. *药学学报*, 2007, 42(10): 1074-1077.
- [14] 汪江山, 赵欣捷, 郑育芳, 等. 超高效液相色谱/飞行时间质谱用于人参皂苷Rg₃作用后大鼠尿液代谢物指纹图谱分析及标记物的鉴定 [J]. *色谱*, 2006, 24(1): 5-9.
- [15] 窦志华, 丁安伟, 居文政, 等. 复方五仁醇胶囊含药血清中木脂素类成分的UPLC-MS/MS分析 [J]. *中成药*, 2007, 29(4): 550-555.
- [16] Zhao X J, Zhang Y, Meng X L, et al. Effect of a traditional Chinese medicine preparation Xindi Soft Capsule on rat model of acute blood stasis: A urinary metabolomics study based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873(2): 151-158.
- [17] Huang H F, Zhang Y, Yang R, et al. Determination of bacicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 874(1-2): 77-83.
- [18] 庞涛涛, 杜黎明. 苦丁茶红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(3): 486-489.
- [19] 刘少华, 金郁, 周大勇, 等. 超高效液相色谱(UPLC)用于丹参药材水溶性成分指纹图谱研究 [J]. *世界科学技术——中医药现代化*, 2007, 9(6): 46-51.
- [20] Liu M, Li Y G, Chou G X, et al. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1157(1-2): 51-55.
- [21] Novák A L, Solichová D, Solich P. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(16): 2433-2443.
- [22] 金郁, 薛兴亚, 肖远胜, 等. 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 [J]. *世界科学技术——中医药现代化*, 2008, 10(1): 80-84.
- [23] Romero-González R, Garrido F A, Martínez V J L. Multi-residue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2008, 76(1): 211-225.
- [24] Pilar V, Nerea A, Natalia C, et al. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide residues in wines and juices [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1194(2): 178-183.
- [25] Keskinen G, Naujalis E, Padaruskas A. Matrix solid-phase dispersion extraction of carbadox and olaquinox in feed followed by hydrophilic interaction ultra-high-pressure liquid chromatographic analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1209(1-2): 83-87.