

• 综 述 •

超高效液相色谱法在中药分析领域中的应用现状及展望

谭 鹏^{1,2}, 李春雨³, 章从恩⁴, 张定堃², 张海珠^{5*}

1. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 国家癌症中心 中国医学科学院/北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021

4. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050

5. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

摘 要: 中药具有化学成分复杂、性质差异大、分离困难等特点, 药学工作者尝试运用各种分析方法来解析中药中的成分。随着液相色谱技术的发展, 在中药分析领域的应用逐渐增多, 也进一步促进了中药的深入研究。对超高效液相色谱的发展历史进行了梳理, 并总结了其在中药分析领域中的应用现状, 展望了超高效液相色谱未来的发展方向, 为促进超高效液相色谱法在中药分析领域中更合理、更广泛的普及应用提供参考。

关键词: 超高效液相色谱法; 中药; 复杂成分; 成分分析; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)24-5938-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.030

Application status and prospect of ultra-performance liquid chromatography in analysis field of Chinese materia medica

TAN Peng^{1,2}, LI Chun-yu³, ZHANG Cong-en⁴, ZHANG Ding-kun², ZHANG Hai-zhu⁵

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. National Cancer Center, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

4. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

5. Department of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: Chinese materia medica (CMM) have many unique characteristics, such as complex chemical compositions, large differences in properties, and difficulty in separation. Pharmacists try to use various analytical methods to analyze the chemical compositions in CMM. With the development of liquid chromatography technology, the ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) has been applied in the analysis field of CMM, and further promoted the in-depth study of CMM. This paper summarizes the development history of HPLC and UPLC, describes its current application in the analysis field of CMM, and provides an outlook of the future development of UPLC. The purpose of this paper is to promote the more reasonable and wider application of UPLC in the field of CMM analysis.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography; Chinese materia medica; complex composition; composition analysis; fingerprint

收稿日期: 2018-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630100); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-BJ-07); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-HUN-21); 成都市科技局项目 (2016-HM01-00312-SF); 成都市科技局项目 (2018-YF05-01277-SN)

作者简介: 谭 鹏 (1987—), 男, 中药学博士, 主要从事中药材质量标准研究。Tel: (028)85362592 E-mail: 2013tanpeng@sina.com

*通信作者 张海珠, 副教授, 主要从事中药材品质评价研究。Tel: (0872)2257420 E-mail: hzningjing@163.com

中药具有化学成分繁多复杂、性质差异大、分离困难等特点,造成了其因“说不清,道不明”而饱受非议的现状,这也是中药国际化进程中的瓶颈问题^[1]。因此,药学工作者尝试运用各种分析方法来解析中药中的成分。色谱法从 20 世纪初问世以来,经历 1 个世纪的发展(图 1),已经成为一种非常重要的分析方法,中药研究也随着液相色谱的应用有了极大的突破。通过色谱法,中药的化学成分群逐渐得到了分离、解析,不但弄清楚了中药的部分化学组成,还能够定量测定其中的一些标志性成分,使得中药不但可以说清楚,还可以准确控制其质量。

从 1960 年第一台高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)的问世,HPLC 逐渐成为了分析中药复杂样品的重要方法。现代色谱方法正向快速、高效、高灵敏度发展,随着小粒径色谱柱(亚 2 μm 粒径)的应用,美国 Waters 公司在 2004 年推出了第一台商品化的超高效液相色

谱(ultra-performance liquid chromatography, UPLC),采用了 1.7 μm 粒径填料的色谱柱;随后美国 Agilent 公司和日本 Shimadzu 公司分别推出了高分离度快速液相色谱(rapid resolution liquid chromatography, RRLC)和超快速液相色谱(ultra fast liquid chromatography, UFLC),两者分别采用 1.8 μm 和 2.2 μm 粒径的色谱柱填料。UPLC 的问世,使得药学工作者可以在更短的时间、更高的色谱分离度、更少的溶剂消耗下对中药复杂样品进行分析测定。UPLC 在中药的化学成分识别、指纹图谱及代谢组学等分析领域逐步得到了应用,促进了中药的质量评控。UPLC 与 HPLC 基于相同分离原理,但 UPLC 因其分离能力更强大、灵敏度更高、分离速度更快、溶剂消耗更少等优势,因而具有广阔的应用前景。本文尝试对 UPLC 在中药分析领域的应用现状和展望进行综述,以期药学工作者更广泛、更有效地使用该技术提供一些参考信息。

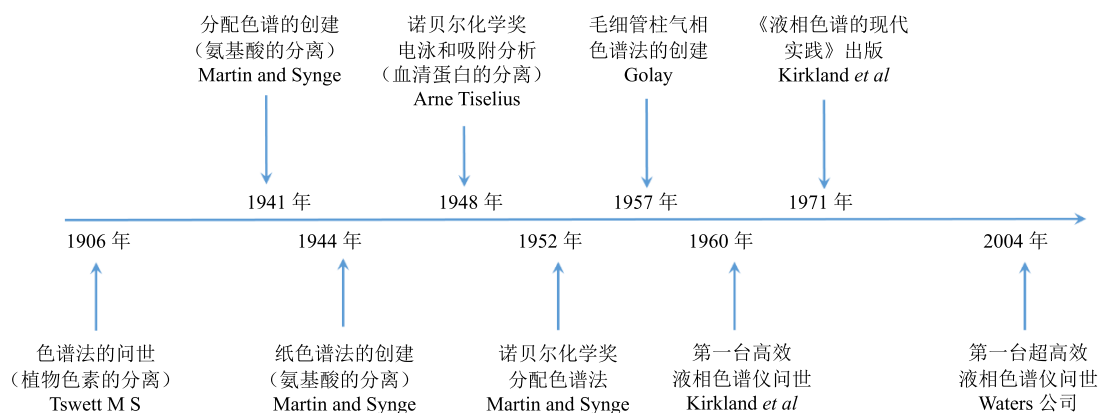


图 1 色谱法的发展历程

Fig. 1 Schematic diagram of development of chromatography

1 UPLC 与 HPLC 的对比分析

1.1 UPLC 与 HPLC 的优势比较

与常规的 HPLC 相比, UPLC 具备许多优势:(1) 通过性能卓越的小粒径色谱柱(UPLC 色谱柱通常采用 1.7 μm 粒径填料, HPLC 色谱柱通常采用 5.0 μm 粒径填料)增加单位长度内的理论塔板数,显著提高了色谱分离度,进而增加了分析通量。(2) UPLC 配备了高精度的超高压输液泵和高灵敏度的检测器,系统硬件和软件的全面改善,使得 UPLC 能够承受更高的系统反压,大大提高了色谱峰容量、灵敏度、分析效率。(3) UPLC 中配备了低扩散、低交叉污染的自动进样系统,改善了小体积样品的

重复性,在长期稳定性实验中,可获得良好的结果重现性,为中药复杂成分的分离、解析提供了良好的技术平台。(4) UPLC 色谱柱能够耐受更高的柱温,使得药学工作者可以在更宽的温度范围内进行方法开发。UPLC 与 HPLC 的一些基本色谱参数比较见表 1。UPLC 的一些重要色谱参数均比 HPLC 有所改善,如分离时间缩短 10 倍,流动相消耗减少 5 倍,色谱峰容量增加 2 倍,灵敏度和理论塔板数提高 3 倍,分离度提升了 1.7 倍,分析效率增加了 10 倍。

1.2 UPLC 与 HPLC 色谱条件的相互转换

在某些情况下,药学工作者希望能够将现有的

表 1 UPLC 和 HPLC 的一些基本色谱参数比较

Table 1 Comparison of some basic chromatographic parameters for UPLC and HPLC

色谱法	柱长/cm	柱内径/ mm	填料粒径/ μm	体积流量/ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	耐受压力/psi (1 psi=6.895 kPa)	耐受柱温/ $^{\circ}\text{C}$	柱外扩散 体积/ μL
HPLC	10、15、25	4.6	3.0~10	≤ 3	<6 000	≤ 50	>30
UPLC	5、10	2.1	<2.0	≤ 1	>15 000	≤ 90	≤ 15

HPLC 分析条件快速转换为 UPLC 分析条件,或者将现有的 UPLC 分析条件快速转换为 HPLC 分析条件,分析参数的快速转换极大地拓宽了 UPLC 的实际应用。UPLC 与 HPLC 的分离原理相同,故互相之间的色谱参数转换比较容易和方便。目前有关 UPLC 与 HPLC 分析参数的相互转换在国外研究较多^[2-4],国内研究相对较少^[5-6]。

HPLC 与 UPLC 方法转换并非所有色谱参数都需要重新建立,实际上主要是对色谱柱、体积流量、梯度洗脱程序进行相应调整,相关参数的折算可通过一些方法转换软件自动进行。Waters 公司开发的 Acquity Column Calculator 和 Agilent 公司开发的 Agilent Method Translator RRLC 是目前应用较广的方法转换器,只需将原方法的色谱参数(如色谱柱长度、内径、体积流量、梯度洗脱程序等)及转换后色谱柱的参数(色谱柱长度、内径等)输入软件,即可得到相应的体积流量和梯度洗脱程序,然后根据转换后的实际分离情况进行验证和调整。Tan 等^[7]建立了基于 UPLC 的大黄中 2 个同分异构体的含量测定方法,并利用 Acquity Column Calculator 转换器将 UPLC 法转化成为常规 HPLC 法,同样获得了较好的色谱分离度,表明 UPLC 向 HPLC 转换过程简便、易行。

2 UPLC 与不同检测器联用在中药分析中的应用

2.1 UPLC 与 UV、ELSD 联用在中药指纹图谱与定量分析中的应用

UPLC 与不同检测器联用,可以对含不同化学类型的中药进行研究,尤其是结合指纹图谱技术在中药质量评价中显示出了独特的优势。邓少东等^[8]比较了土茯苓药材的 UPLC-UV 和 HPLC-UV 指纹图谱,结果显示 HPLC 需要 75 min 才能完成分析,而 UPLC 在 10 min 内完成了色谱分离,大大节省了分析时间。Wang 等^[9]采用 UPLC-UV 法对大黄中 5 种蒽醌衍生物进行分析测定,结果显示 HPLC 需要 30 min 才能完成分析,而 UPLC 在 3 min 内即完成色谱分离,分析效率提高了 10 倍。针对 HPLC 难以分离的红参类

药材,冯伟红等^[10]开展了基于 UPLC-UV 的红参研究,得到了高分离度和高纯度的色谱指纹图谱,该研究建立的方法具有专属性强、分离度高、色谱峰纯度高的特点,可用于人参类药材的品种鉴定和质量控制。目前 UPLC-UV 指纹图谱技术越来越多地应用于中药的质量研究,如狼毒^[11]、五味子^[12]、吴茱萸^[13]、肿节风^[14-15]、鸡骨草^[16]等。

针对一些含皂苷类或化学成分无紫外吸收的中药, UPLC-ELSD 则优势尽显。王欢等^[17]采用 UPLC-UV-ELSD 法对 6 个产地 28 个批次西洋参药材的指纹图谱进行聚类分析、主成分分析及相似度评价等研究,为西洋参药材的品质评价提供了参考方法。刘金欣等^[18]建立了 UPLC-ELSD 法同时测定北柴胡药材中柴胡皂苷 a、c、d 的含量,是评价北柴胡药材质量优劣的一种较好的方法。Kong 等^[19]建立了超声辅助固液萃取与 UPLC-ELSD 相结合同时提取和测定天然牛黄和替代品中 6 种胆汁酸含量的方法,测定结果显示,这些样品的内在质量存在一定差异。Duan 等^[20]利用 UPLC-ELSD 指纹图谱分析和测定生物碱来研究贝母硫熏蒸过程的潜在破坏作用,该研究表明硫熏蒸对样品中的主要活性成分损失较大。

2.2 UPLC 与 UV、ELSD 联用在中成药指纹图谱与定量分析中的应用

由于中成药的化学成分比单味药材的化学成分更加复杂,常规 HPLC 往往在较短的时间内很难获得分离度较高的色谱图, UPLC 的高分离度帮助药学工作者可以更好地应对分离中成药中复杂成分的挑战。陈喆等^[21]利用 UPLC-UV 对益母草颗粒和益母草膏中的益母草碱进行了含量测定,进一步完善了益母草制剂的质量控制方法。An 等^[22]运用 UPLC-UV 对葛根芩连汤中 11 种成分进行了含量测定,结果表明新建立的质控方法具有更好的质量管控力。Zhou 等^[23]运用 UPLC-UV 比较了三七原料药和颗粒剂中 5 种成分的含量差异,定性、定量地评价了三七不同产品的质量信息,获得比较满意的结

果。李莉等^[24]建立了 UPLC-DAD-ELSD 切换波长法并应用于酸枣仁颗粒中 8 种成分的含量测定,对酸枣仁颗粒的质量控制评价提供了参考方法。孙冬梅等^[25]利用 UPLC-UV 建立了复方芪麻胶囊的指纹图谱,并定量测定了 8 种成分,建立了该制剂一种比较全面的质量评价方法。吴亿晗等^[26]利用 UPLC-UV 建立了葛根芩连丸的指纹图谱及 7 种成分的定量测定方法,与之前单一质控标准相比,显著提升了其质量控制水平。

2.3 UPLC 与 MS 联用在中药/中成药成分辨识中的应用

UPLC 与质谱 (mass spectrometer, MS) 检测器联用可以显著改善质谱检测结果的质量。由于低流速下色谱峰扩散较小,增加了峰浓度,有利于提高离子源的效率。同时 UPLC 强大的分离能力有助于目标化合物和与之竞争电离的杂质峰的分离,从而使 MS 的灵敏度由于离子抑制现象的减弱而得到进一步的提高。故 UPLC 与 MS 联用可以获得灵敏度更高、质量更好的信息,在提高分离效能、缩短分析时间的同时大大提高了检测灵敏度,有利于中药或中成药中复杂成分的分析。

胡春秀等^[27]运用 UPLC-Q-TOF-MS 快速分析了人参根中的皂苷类化合物,共鉴定出 27 种化合物,新建的方法成功地应用于分析同一产地、不同生长时间的人参干燥主根中皂苷的差异。Jiang 等^[28]运用 UPLC-Q-TOF-MS 对未加工和加工的黄连进行了化学成分分析,共鉴定出了 13 种化合物,其中有 3 种是首次检测出,结合主成分分析结果表明 2 种不同加工方式的黄连化学成分存在显著差异。Liu 等^[29]在参芪扶正注射液中运用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分离鉴定了 81 个主要成分,包括有机酸、氨基酸、寡糖和生物碱等,为该制剂的质量评控奠定了基础。许文等^[30]建立了 HPLC-Q-TOF-MS 快速鉴定三叶青化学成分的方法,并用 UPLC-QQQ-MS 测定三叶青中 4 种成分的含量,结果表明建立的 UPLC-QQQ-MS 定量分析方法快捷、准确,为综合评价三叶青的质量提供参考。Jia 等^[31]运用 UPLC-DAD-Q-TOF-MS 对连花清瘟胶囊的主要成分进行定性、定量分析,通过比较保留时间和精确质量测定及参考化合物或文献数据,初步确定了包括类黄酮、苯丙素类、蒽醌类、三萜类等 61 种化合物。张定堃等^[32]运用 UPLC-Q-TOF-MS 分析了不同产地泥附子的化学成分差异,为从次生代谢产物多样

性揭示附子道地性的形成机制提供了新的参考。Fan 等^[33]运用 UPLC-Q-TOF-MS 对 3 种不同种类升麻的化学成分进行快速分析,共鉴定出 32 种共有组分以及 8 种不同成分,为进一步研究 3 个不同品种的升麻提供了参考。庞颖等^[34]运用 UPLC-TQ-MS 法研究了丹七软胶囊中不同活性成分的溶出规律,为该中成药的质量评控提供了参考。

2.4 UPLC 与 MS 联用在中药代谢组学分析中的应用

代谢组学是目前研究中药药理作用机制和发现活性成分的最佳手段之一,UPLC-MS 技术为中药代谢组学分析提供了技术平台^[35]。UPLC 可与多种类型的质谱串联,高分辨质谱包括飞行时间 (TOF)、四极杆-飞行时间 (Q-TOF)、串联飞行时间 (TOF-TOF) 及离子阱-飞行时间 (IT-TOF) 质谱等。UPLC 与高分辨质谱串联可应用于中草药非靶向代谢组学的研究,尤其是 UPLC-Q-TOF/MS 能够更好地用于代谢物和同分异构体的分离鉴定。此外,UPLC 还可与三重四级杆 (QQQ) 或四极杆离子阱 (Q-IT) 等串联应用于中药靶向代谢组学分析。目前,新型的串联质谱如四极杆线性离子阱 (Q-Trap) 质谱由于具有较强的定性和定量能力,与 UPLC 联用在中药非靶向代谢组学及靶向代谢组学方面逐渐得到应用。Li 等^[36]研究了岭南山竹子 *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth. 的叶、枝和果实的比较代谢谱和生物活性,使用 UPLC-Q-TOF/MS 共鉴定了 40 种化合物,结合化学计量学分析,揭示了所研究的 3 种植物代谢物谱的变化和生物活性差异相关联,表明 UPLC-Q-TOF/MS 可用于鉴定在单个物种的不同部位中差异表达的生物活性成分。Zhou 等^[37]提出了一种基于目标糖组学和非靶向代谢组学策略的综合色谱技术,利用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 同时分离鉴定地黄的碳水化合物和次级代谢物取得了成功,并进一步阐明了碳水化合物和次级代谢产物的化学转化机制,从而揭示了碳水化合物和次生代谢产物之间固有的化学联系。贺晶等^[38]利用 UPLC-MS 背景扣除法联合代谢组学技术研究了柴胡-白芍药对配伍前后化学成分的整体变化情况,从整体化学组成上比较了柴胡-白芍药对配伍前后的差异,为其配伍机制的阐释奠定了基础。Yang 等^[39]利用基于超高效液相色谱/电喷雾电离 synapt 高清质谱 (UPLC/ESI-SYNAPT-HDMS) 结合模式识别方法研究了酸枣仁汤治疗失眠症的代谢

特征和治疗效果, 鉴定出 20 种离子作为“分化代谢物”, 结果表明酸枣仁汤的治疗效果可能通过 5-羟色胺能激活介导实现, 该研究结果还表明 UPLC/ESI-SYNAPT-HDMS 技术可用于中药的代谢物分析, 开辟了使用代谢组学解决特殊中药问题的新视角。彭琳秀等^[40]利用 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术对复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学进行研究, 结果表明复方祖师麻片主要通过下调继发性病变期溶血磷脂酰胆碱的水平而达到治疗效果。

由于样品组分的分离在先, 离子化和检测在后, 因而能够有效地减少干扰, 诸如基质效应、离子化抑制、离子化竞争等, 大幅度增加代谢物的鉴别数量和准确度。UPLC-MS 除了分析速度快、样品无需衍生化等优点, UPLC 的高分离度使得峰宽变窄、信噪比增强, 从而提高了生物样品分析的选择性和灵敏度。因此, 与传统 HPLC 相比, UPLC 能获得中药更多代谢物的信息, 对于复杂生物样品的分离具有显著优势, UPLC 与 MS 联用在中药代谢组学研究中将发挥越来越重要的作用。

2.5 UPLC 与 MS 联用在中药真菌毒素分析中的应用

目前中药的安全性检测受到越来越多的关注和研究, 但是中药含有真菌毒素往往是微量 (1~100 $\mu\text{g/g}$)、痕量 (0.01~1 $\mu\text{g/g}$) 级别, 常规分析手段往往很难到达检测限和定量限。UPLC 与 MS 联用带来的高灵敏度帮助药学工作者可以很好地定量分析中药中的真菌毒素。范妙璇等^[41]建立了一种基于 QuEChERS-UPLC-QQQ-MS/MS 法定量测定白茅根中 16 种真菌毒素, 充分利用 UPLC 的高分离度, 获得了较好的结果。王莎等^[42]建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定麦芽中 11 种真菌毒素的污染水平, 通过相同保留时间处的特征离子二级碎片排除了假阳性结果, 检测限和定量限分别为 0.05~30.00 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.15~87.50 $\mu\text{g/kg}$, 表明该方法可以准确、灵敏、快速地监测麦芽受真菌毒素污染的状况。王少敏等^[43]使用 UHPLC-MS/MS 法测定淡豆豉、麦芽、薏苡仁和酸枣仁中黄曲霉毒素的含量, 结果显示不同药材的黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 的检出限分别为 0.04~0.1 $\mu\text{g/kg}$ 、0.01~0.02 $\mu\text{g/kg}$ 、0.01~0.03 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.02~0.03 $\mu\text{g/kg}$, 表明了该方法具有较高的灵敏度。苏春燕等^[44]亦采用 UPLC-MS/MS 法对三七、党参和柴胡中的黄曲霉毒素进行了检测, 该研究表明分离条件对分离结果有一定影响, 3 种药材中曲

霉属真菌的污染值应得到重视。陈勇等^[45]建立了一种基于 ESI-LC/MS 同时检测三七药材中 10 种真菌毒素方法, 结果表明该方法净化效果好、灵敏度高、重复性好, 适用于成分复杂的三七药材中多种真菌毒素的定量检测。Chen 等^[46]对决明子、菟丝子、薏苡仁等 12 种药材种子中黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 和赭曲霉毒素 A 进行了测定, 结果发现黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 和赭曲霉毒素 A 在 12 种药材种子中的检出率较低, 但一旦检测到即为高水平。实现快速、准确地同时测定多种真菌毒素一直是中草药分析领域的热点和难点, UPLC-MS/MS 联用技术将会越来越多地应用于中药的真菌毒素分析。

2.6 UPLC 与在线分离、在线检测器联用在中药成分辨识中的应用

中药分析时常面临样品的前处理过程繁琐耗时、前处理过程可能导致不稳定化合物降解、目标化合物低丰度峰无法识别等诸多困难和挑战, 因此推动了 UPLC 与在线分离和在线检测联用技术的发展和运用。超临界流体萃取 (supercritical fluid extraction, SFE) 和超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 是其中的代表。基于 UPLC 的在线 SFE-SFC 分析无需进行复杂的样品预处理, 即可完成从萃取至分离检测的流程, 并且实现了自动化, 大幅度减少了操作步骤。此外, 由于能够在避光、无氧、无水的环境下进行前处理, 所以对于中药中易光解、氧化和水解的不稳定化合物的分析非常有效。相对于常规液相分析, SFE-SFC 运行时间缩短 10 倍, 溶剂消耗减少 95%, 分析成本降低 99%, 比手性和非手性分离的正相色谱更为环保。SFE-SFC 由于信噪比更大, 峰形更好, 峰容量更高, 对于中药中的微量活性成分、手性化合物分离来说, 意味着使药学工作者能够快速确认低至 0.01% 化合物的纯度, 或结合质谱法确认化合物的特性。李振宇等^[47]建立了基于 SFE-SFC 的吴茱萸中吲哚类生物碱的快速分析方法, 在柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 和 20.7 MPa 条件下, 15 min 内完成了复杂样品的分析, 结果表明 SFC 可用于天然产物的高效、快速分析, 同时该方法与 UPLC 在分离选择上的差异有助于天然产物分析方法的拓展。Fu 等^[48]利用 SFC-DAD-MS 在 10 min 内对雷公藤样品进行了分析, 鉴定出了 72 个不同的大环内酯倍半萜类生物碱。Ganzera 等^[49]通过 SFE-SFC 分析了葛根中异黄酮类成分, 该方法能够在 8 min 内分离 9 种异黄酮, 并具有低至 0.2 ng 的

检测限; Wu 等^[50]对异黄酮的分离也完成类似研究。Sammi 等^[51]采用了 SFE-SFC 技术提取西洋参, 同时利用 SFC-ELSD 分析了人参皂苷混合对照品和 SFE 提取部分, 确定了 SFE 提取部分中各种人参皂苷的含量分布。吕惠生等^[52]利用 SFE-SFC 技术对赤芍的活性成分进行了分离, 制备得到了质量分数为 94.11%的芍药苷和 85.65%的芍药内酯苷, 收率分别为 95.6%和 88.3%。袁云等^[53]发展了一种离线二维反相液相色谱/超临界流体色谱(2D RPLC/SFC)分离瓜蒌子的方法。第一维采用反相色谱, 从瓜蒌子样品中制备得到的 12 个组分, 并将得到的组分在第二维使用 SFC 分离。这些组分在反相色谱和 SFC 的分离对比说明, 该二维方法具有良好的分离正交性, 可至少检测到 150 个色谱峰, 对于解决结构相似物质的分离、微量成分的富集表现出了明显的优势。基于 UPLC 的在线 SFE-SFC 技术应用于中药材分析的还有厚朴^[54]、补骨脂^[55]、蛇床子^[56]、知母^[57]等。

基于 UPLC 的 SFE-SFC 技术具有很好的分离性能, 广泛的色谱柱选择范围等优点, 能够解决一些其他色谱技术无法解决的成分分离的难题, 将会越来越多地应用于分析中药中的极性化合物。

3 展望

目前有几个因素阻碍了 UPLC 的广泛普及应用。首先, 相比传统的 HPLC 仪来说, UPLC 仪器价格要贵很多, 阻碍了 UPLC 的普及应用。其次, 在实际应用中由于 UPLC 使用的色谱柱柱填料较小, 为防止堵塞, 样品前处理要求更加严格。UPLC 是在 HPLC 的基础上发展起来的, 由于 UPLC 能够显著提高色谱分离度、缩短分析时间、提高分析效率、节省溶剂消耗, 同时提供智能化的分析, 确保分析数据的可靠性和高效率, 因此将成为中药分析领域的主要分析手段, 其应用将会越来越多。随着联用技术的发展以及药学工作者对色谱分离的要求更高, UPLC 将逐渐向二维液相色谱发展^[58]。利用 2 个独立的 UPLC 分离系统, 构成全二维系统能够实现一维 UPLC 无法达到的高分离度。在线二维液相色谱是基于 2 种分离模式构建的色谱分析技术, 主要包括中心切割二维液相色谱和全二维液相色谱 2 种模式, 因二者具有更高的峰容量而在中药研究中备受青睐^[59-61]。二维 UPLC 以其强大的色谱分离能力、色谱峰容量, 对于解析中药中的复杂成分潜力巨大, 因此在中药分析领域将得到更多的发展和应用。

参考文献

- [1] 刘昌孝. 对中药现代化及中药国际化发展的思考 [J]. 中国药房, 2016, 27(11): 1441-1444.
- [2] Guillarme D, Nguyen D T, Rudaz S, *et al.* Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 66(3): 475-482.
- [3] Guillarme D, Nguyen D T, Rudaz S, *et al.* Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68(2): 430-440.
- [4] Fountain K J, Morrison D. Method transfer between HPLC and UPLC using acquity UPLC H-class and method transfer kits [J]. *LC-GC Asia Pac*, 2010, 23(7): 43.
- [5] 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.
- [6] 高青, 刘颖, 钱忠直, 等. 超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1279-1286.
- [7] Tan P, Zhao Y L, Cao J L, *et al.* Development and validation of ultra-highperformance liquid chromatography for the determination of sennoside A and sennoside B in laxatives based on optimal chromatographic parameters [J]. *Anal Methods*, 2015, 23(7): 9817-9824.
- [8] 邓少东, 肖凤霞, 林励, 等. 不同产地土茯苓药材 UPLC 及 HPLC 指纹图谱的构建研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 308-311.
- [9] Wang J B, Li H, 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.
- [10] 冯伟红, 李春, 王智民, 等. 基于高分离度和高色谱峰纯度的红参 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3798-3804.
- [11] 刘阳熙, 卢燕, 陈道峰. 中药狼毒及其醋炙饮片的 UPLC 指纹图谱 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2060-2064.
- [12] 刘芷, 贾英, 毕开顺, 等. 五味子的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1631-1633.
- [13] 张敏娟, 黄秀梅, 姜世贤. HPLC 和 UPLC 法测定复方黄连素片中吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的方法比较 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2077-2081.
- [14] 韦卓纯, 姚志红, 姚新生, 等. UPLC 结合化学计量学

- 方法的肿节风指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 895-900.
- [15] 姚志红, 王其意, 姚新生, 等. 超高效液相色谱法同时测定肿节风中 6 个成分的含量 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(6): 641-647.
- [16] 徐柯心, 尹泽楠, 林瑞超, 等. 鸡骨草 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 168-174.
- [17] 王 欢, 曾凡琳, 谢彩香. 西洋参 UPLC-UV-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 143-148.
- [18] 刘金欣, 孟繁蕴, 李 耿, 等. UPLC-ELSD 同时测定北柴胡中柴胡皂苷 a, c, d 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 83-86.
- [19] Kong W J, Xing X Y, Yang M H, *et al.* Multi-component analysis of bile acids in natural *Calculus bovis* and its substitutes by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and UPLC-ELSD [J]. *Analyst*, 2012, 137(24): 5845-5853.
- [20] Duan B, Huang L F, Chen S L. Study on the destructive effect to inherent quality of *Fritillaria thunbergii* Miq. (Zhebeimu) by sulfur-fumigated process using chromatographic fingerprinting analysis [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(6): 562-568.
- [21] 陈 喆, 宋 康, 李晓娟, 等. UPLC 测定益母草颗粒和益母草膏中益母草碱含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1509-1511.
- [22] An R, You L, Zhang Y, *et al.* A rapid UPLC method for simultaneous determination of eleven components in 'Ge-Gen-Qin-Lian' decoction [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(40): 464-469.
- [23] Zhou X, Razmovski-Naumovski V, Chan K. A multivariate analysis on the comparison of raw notoginseng (Sanqi) and its granule products by thin-layer chromatography and ultra-performance liquid chromatography [J]. *Chin Med*, 2015, doi: 10.1186/s13020-015-0040-2.
- [24] 李 莉, 叶晓川, 宋小英, 等. UPLC-DAD-ELSD 切换波长法同时测定复方酸枣仁颗粒中 8 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1722-1728.
- [25] 孙冬梅, 林晓燕, 刘梦云, 等. 复方芪麻胶囊 UPLC 指纹图谱建立和同时测定 8 种成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4186-4191.
- [26] 吴亿晗, 王 迪, 杨晓琴, 等. 葛根芩连丸 UPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1083-1087.
- [27] 胡春秀, 孔宏伟, 朱 超, 等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱快速分析人参根中的皂甙化合物 [J]. 色谱, 2011, 29(6): 488-494.
- [28] Jiang X, Huang L F, Chen S L, *et al.* UPLC-QTOF/MS analysis of alkaloids in traditional processed *Coptis chinensis* Franch [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2012, doi: 10.1155/2012/942384.
- [29] Liu M H, Tong X, Wang J X, *et al.* Rapid separation and identification of multiple constituents in traditional Chinese medicine formula Shenqi Fuzheng Injection by ultra-fast liquid chromatography combined with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 74(4): 141-155.
- [30] 许 文, 傅志勤, 林 婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QQQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365-4372.
- [31] Jia W, Wang C, Wang Y, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medical preparation Lianhua-Qingwen capsule by UPLC-DAD-QTOF-MS [J]. *Sci World J*, 2015, doi: 10.1155/2015/731765.
- [32] 张定堃, 韩 雪, 李瑞煜, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 463-469.
- [33] Fan M, Qin K, Ding F, *et al.* Identification and differentiation of major components in three different "Sheng-ma" crude drug species by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(2): 185-192.
- [34] 庞 颖, 杨 健, 高 峰. 基于 UPLC-TQ MS 的丹七软胶囊中 8 种活性成分的溶出度考察 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(3): 413-418.
- [35] Wu H, Guo J, Chen S, *et al.* Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72(2): 267-291.
- [36] Li P, Wu S B, Liu B, *et al.* Comparative UPLC-QTOF-MS-based metabolomics and bioactivities analyses of *Garcinia oblongifolia* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.061.
- [37] Zhou L, Xu J D, Zhou S S, *et al.* Integrating targeted glycomics and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of herbal medicines, a case study on *Rehmanniae Radix* [J]. *J Chromatogr A*, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.10.043.
- [38] 贺 晶, 高晓霞, 秦雪梅, 等. UPLC-MS 背景扣除法联合代谢组学技术分析柴胡-白芍药对配伍前后化学成分变化 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1779-1788.
- [39] Yang B, Zhang A, Sun H, *et al.* Metabolomic study of insomnia and intervention effects of Suanzaoren decoction using ultra-performance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass

- spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2011.09.033.
- [40] 彭琳秀, 陈良慧, 狄留庆, 等. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术的复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1964-1970.
- [41] 范妙璇, 董娇娇, 王京辉, 等. QuEChERS-超高效液相-三重四极杆串联质谱测定白茅根中 16 种真菌毒素 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3770-3775.
- [42] 王莎, 孔维军, 杨美华. 同位素内标-超高效液相色谱串联质谱法检测麦芽中 11 种真菌毒素 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 110-115.
- [43] 王少敏, 陈洁, 季申, 等. UHPLC-MS/MS 测定中药材中 4 种黄曲霉毒素 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(2): 190-193.
- [44] 苏春燕, 魏江春, 胡永建, 等. 三种根类药材上污染真菌的分离方法优化 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 688-692.
- [45] 陈勇, 陈重均, 李劲, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测三七药材中 10 种真菌毒素 [J]. 药理学, 2015, 50(1): 81-85.
- [46] Chen A J, Jiao X, Hu Y, *et al.* Mycobiota and mycotoxins in traditional medicinal seeds from China [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(10): 3858-3875.
- [47] 李振宇, 傅青, 李奎永, 等. 超临界流体色谱对吴茱萸中吲哚类生物碱的快速分析 [J]. 色谱, 2014, 32(5): 506-512.
- [48] Fu Q, Li Z Y, Sun C C, *et al.* Rapid and simultaneous analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. using supercritical fluid chromatography-diode array detector tandem mass spectrometry [J]. *J Supercrit Fluids*, 2015, doi: 10.1016/j.supflu.2015.05.006.
- [49] Ganzera M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.01.013.
- [50] Wu W, Zhang Y, Wu H, *et al.* Simple, rapid, and environmentally friendly method for the separation of isoflavones using ultra-high performance supercritical fluid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(13): 2827-2837.
- [51] Sammi R, Xu W Z, Alsharari Q, *et al.* Supercritical fluid chromatography of North American ginseng extract [J]. *J Supercrit Fluids*, 2014, doi: 10.1016/j.supflu.2013.12.004.
- [52] 吕惠生, 周锦怡, 耿中峰, 等. 基于超临界流体色谱技术的赤芍活性组分分离工艺 [J]. 高校化学工程学报, 2018, 32(2): 295-301.
- [53] 袁云, 辛华夏, 彭子悦, 等. 离线二维反相液相色谱/超临界流体色谱在瓜蒌子分离中的应用 [J]. 色谱, 2017, 35(7): 683-687.
- [54] Deng L, Guo Y D, Yang M, *et al.* Simultaneous determination of honokiol and magnolol in *Magnolia officinalis* by supercritical fluid chromatography [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1696-1698.
- [55] 陆峰, 刘荔荔, 李玲, 等. 超临界流体色谱法测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素含量 [J]. 药理学, 1999, 34(4): 62-64.
- [56] 亢静静. 超临界流体色谱分离纯化蛇床子、补骨脂等中药有效成分的研究 [D]. 聊城: 聊城大学, 2016.
- [57] 朱玲玲. 超临界流体色谱分离中药甾体皂苷的色谱行为及规律 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [58] 高雯, 宋慧鹏, 李萍, 等. 在线二维液相色谱技术在中药研究中的应用进展 [J]. 色谱, 2017, 35(1): 121-128.
- [59] Chen X, Kong L, Su X, *et al.* Separation and identification of compounds in *Rhizoma Chuanxiong* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040(2): 169-178.
- [60] Qiao X, Guo D A, Ye M, *et al.* Separation and detection of minor constituents in herbal medicines using a combination of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.038.
- [61] Qiao X, Guo D A, Ye M, *et al.* A chemical profiling solution for Chinese medicine formulas using comprehensive and loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.02.034.