

## 基于全二维液相色谱的牛黄上清丸指纹图谱研究

吴瑞军<sup>1</sup>, 钟国跃<sup>1</sup>, 曾金祥<sup>1</sup>, 何军伟<sup>1</sup>, 宋 伦<sup>2</sup>, 梁 健<sup>1\*</sup>

1. 江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004

2. 岛津企业管理(中国)有限公司上海分公司, 上海 200233

**摘要:** 目的 研究牛黄上清丸全二维液相色谱指纹图谱的评价方法, 并建立三维指纹图谱, 为牛黄上清丸的质量控制提供新方法。方法 第一维采用 Acquity UPLC HSS CYANO (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 柱温 40 ℃, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇, 体积流量 0.1 mL/min; 第二维采用 Kinetex Phenyl-Hexyl (50 mm×3 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 体积流量 1.5 mL/min, 柱温 40 ℃, 检测波长 254 nm, 样品采集速率为 12.5 Hz; 连接第一维与第二维色谱柱的定量环体积为 100 μL。建立牛黄上清丸的全二维液相色谱指纹图谱, 采用欧氏距离、夹角余弦和相关系数法, 分别以各共有峰峰体积的中位数、平均数的计算结果为标准对照指纹图谱, 对 21 批市售牛黄上清丸样品进行相似度评价。结果 建立了 21 批市售牛黄上清丸的三维指纹图谱, 标定了共有峰 18 个, 并指认了其中的 5 个共有峰: 栀子苷 (1 号峰)、胡薄荷酮 (8 号峰)、黄芩苷 (9 号峰)、欧前胡素 (15 号峰)、汉黄芩素 (16 号峰)。结论 首次建立了基于全二维液相色谱的牛黄上清丸的指纹图谱及其相似度的评价方法, 说明该法可用于中药色谱指纹图谱的建立, 该方法也是对传统液相色谱指纹图谱的补充和提高。

**关键词:** 全二维液相色谱; 三维指纹图谱; 牛黄上清丸; 峰体积; 相似度评价方法; 栀子苷; 胡薄荷酮; 黄芩苷; 欧前胡素; 汉黄芩素

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)03-0588-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.009

## Fingerprinting study on Niu Huang Shangqing Pills based on comprehensive two-dimensional liquid chromatography

WU Rui-jun<sup>1</sup>, ZHONG Guo-yue<sup>1</sup>, ZENG Jin-xiang<sup>1</sup>, HE Jun-wei<sup>1</sup>, SONG Lun<sup>2</sup>, LIANG Jian<sup>1</sup>

1. Research Center for Traditional Chinese Medicine Resourcing and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Shimadzu (China) Corporation Shanghai Branch, Shanghai 200233, China

**Abstract: Objective** To develop a new three-dimensional fingerprinting method and its assessing methods based on comprehensive two-dimensional liquid chromatography using Niu Huang Shangqing Pills (NSP) as an example. The developed method could offer new method for the quality control of NSP. **Methods** In first dimension, the separation was achieved with an Acquity UPLC HSS CYANO column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), methanol-0.1% formic acid in water were used as mobile phases, flow rates were 0.1 mL/min. In second dimension, the separation was achieved with a Kinetex Phenyl-Hexyl column (50 mm × 3 mm, 2.6 μm), acetonitrile-0.1% formic acid in water were used as mobile phases, flow rates were 1.5 mL/min, detection wavelength was set at 254 nm, and acquiring frequency was at 12.5 Hz. Column temperature for each dimension was 40 ℃ and volume of loop linking the two dimensions was 100 μL. Three similarity-calculating methods, Euclidean Distance, Cosine, and Correlation Coefficient, were employed to assess the similarities among the 21 samples on the market using medians with arithmetic means of peak volumes of the common peaks as control fingerprints. **Results** The three-dimensional fingerprints of 21 batches of NSP samples on the market were developed; Eighteen common peaks were assigned and five of them were identified, which were geniposide (1), pulegone (8), baicalin (9), imperatorin (15), and wogonin (16). **Conclusion** A three-dimensional fingerprinting

收稿日期: 2018-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560641); 江西省中医药科技计划项目 (2017A285)

作者简介: 吴瑞军 (1993—), 男, 在读硕士, 从事中药药效物质基础和质量控制方法研究。Tel: (0791)87119061 E-mail: 895588525@qq.com

\*通信作者 梁 健 (1982—), 男, 讲师, 从事中药药效物质基础和质量控制方法研究。Tel: (0791)87118873 E-mail: ocean719@163.com

method and its assessing methods based on comprehensive two-dimensional liquid chromatography using NSP as an example were successfully developed for the first time, suggesting that it is a feasible method for developing fingerprints for Chinese materia medica. This work improves and supplements the traditional liquid-chromatography fingerprints.

**Key words:** comprehensive two-dimensional liquid chromatography; three-dimensional fingerprinting; Niu Huang Shangqing Pills; peak volume; similarity-assessing method; geniposide; pulegone; baicalin; imperatorin; wogonin

中药因其化学成分复杂多样, 高效液相分离技术 (HPLC) 既是中药的化学成分分离鉴定常用的手段也是难度较大的工作。基于色谱技术的中药指纹图谱可从整体与宏观上表征被测中药的主要化学成分的相对关系, 可较全面地反映中药所含化学成分的相对关系, 是符合中药成分复杂性的特点、全面控制中药内在质量的重要方法<sup>[1-5]</sup>。但传统的一维色谱也存在分离度不够、中药中微量化合物的分析会受到常量化合物的干扰、峰重叠现象严重等问题<sup>[6]</sup>。全二维液相色谱 (LC×LC) 是将分离机制不同而又相互独立的两支色谱柱串联而构成的分离系统, 样品经第一维色谱柱分离后, 所有组分均通过阀切换转入第二维色谱柱进行分析的在线二维液相色谱系统<sup>[7]</sup>。全二维液相色谱于 1978 年由 Erni 和 Frei<sup>[8]</sup> 第一次构建, 与一维液相色谱相比, 其峰容量更大, 分离能力更强; 与离线二维液相色谱比, 其操作及分析时间更短, 适合复杂样品的在线分离。近年来, 全二维液相色谱凭借其强大的在线分离分析能力, 在中药以及中药复方样品中的应用逐渐增多<sup>[9-20]</sup>, 成为了中药化学成分分离鉴定以及中药指纹图谱发展的一个新趋势。

牛黄上清丸 (Niu Huang Shangqing Pills, NSP) 由人工牛黄、栀子、大黄等 19 味药材组成, 具清热泻火、散风止痛的功效, 用于热毒内盛、风火上攻所致的头疼眩晕、目赤耳鸣、咽喉肿痛、口舌生疮、大便燥结等<sup>[21]</sup>, 为中医临床治疗实热证的常用代表性中药大复方。NSP 组成药味多, 成分复杂且各成分的含量相差较大, 其质量控制难度大, 《中国药典》2015 年版以黄芩苷、栀子苷的含量指标来控制 NSP 的质量; 也有研究者采用 HPLC 法对 NSP 进行单一成分或多组分的含量测定<sup>[22-24]</sup>, 对 NSP (片、胶囊) 的挥发油特征图谱进行了研究<sup>[25]</sup>。其质量的全面整体控制方法尚有待研究。本研究以 NSP 为对象, 研究建立了基于全二维液相色谱的 NSP 指纹图谱的方法, 并对 21 批市售样品进行了相似度评价, 以期作为 NSP 的质量控制提供参考依据及新的评价方法。

## 1 仪器与材料

Shimadzu Nexera X2 液相色谱系统, 日本岛津

公司, 包括 DGU-20A<sub>5R</sub> 型在线脱气机、LC-30AD 型二元泵×4、SIL-30AC 型自动进样器、CBM-20A Communication Bus Module、SPD-M30A 型二极管阵列检测器、CTO-20AC 型柱温箱、FCV32AH 型二位六通阀及 2 个 100 μL 的定量环; LabSolutions 色谱工作站管理软件、LC×LC Assist Version 2.0 软件、ChromSquare Version 2.2 软件, 日本岛津公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; CP214 型电子天平, 奥克斯 (上海) 仪器有限公司; 超纯水由 Milipore-Simplicity 超纯水处理系统 (德国默克密理博公司) 制得; 色谱级甲醇、乙腈购自美国 Tedia 公司; 色谱级甲酸购于 Dikma Technologies 公司; 分析级甲醇购自西陇科学股份有限公司。

21 批市售不同生产厂家及不同批次 NSP 样品分别为北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 批号 4015259、4015721、4015724、15015002、15015007、15015097、15015148、15015208、15015213、15015317, 编号 S1~S10; 吉林市鹿王制药股份有限公司, 批号 141201、150501、150502、150503、150504、150901, 编号 S11~S16; 山西天生制药有限公司, 批号 116002、140804, 编号 S17~S18; 内蒙古天奇中蒙制药股份有限公司, 批号 11150311、20131009, 编号 S19~S20; 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 批号 5010069, 编号 S21。栀子苷 (批号 3662, 质量分数 99.6%)、黄芩苷 (批号 5719, 质量分数 99.5%)、汉黄芩素 (批号 5119, 质量分数 99.8%)、连翘苷 (批号 4367, 质量分数 97.5%)、连翘酯苷 A (批号 3639, 质量分数 99%)、藜本内酯 (批号 5408, 质量分数 94.5%)、绿原酸 (批号 2772, 质量分数 99.3%)、胡薄荷酮 (批号 5944, 质量分数 99.8%)、木犀草素 (批号 2226, 质量分数 99.3%)、芹菜素 (批号 6088, 质量分数 99.2%)、金合欢素 (批号 3431, 质量分数 99.5%)、盐酸黄连碱 (批号 6052, 质量分数 90%)、盐酸药根碱 (批号 3898, 质量分数 99.1%)、盐酸巴马汀 (批号 1904, 质量分数 99.6%)、盐酸小檗碱 (批号 5738, 质量分数 98.9%)、芍药苷 (批号 5859, 质

量分数 98.9%)、欧前胡素 (批号 3621, 质量分数 99.6%)、甘草酸 (批号 5744, 质量分数 98.9%)、甘草苷 (批号 5594, 质量分数 99.8%), 19 个对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司, 各对照品在使用前通过 UPLC 分析确定其色谱峰的保留时间及紫外吸收光谱特征。

## 2 方法及结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 供试品溶液的制备** 分别取各批次的 NSP 1 丸, 均匀剪碎, 精密称取约 1.00 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 50% 甲醇, 密塞, 称定质量; 超声处理 60 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 取出并放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 取各对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇水溶液制得含栀子苷 12  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 36.6  $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 14.8  $\mu\text{g/mL}$ 、连翘苷 14.3  $\mu\text{g/mL}$ 、连翘酯苷 A 14.8  $\mu\text{g/mL}$ 、藁本内酯 25.5  $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 14.4  $\mu\text{g/mL}$ 、胡薄荷酮 20.3  $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草素 13.0  $\mu\text{g/mL}$ 、芹菜素 7.6  $\mu\text{g/mL}$ 、金合欢素 12.3  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸黄连碱 13.3  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸药根碱 13.0  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸巴马汀 15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 14.2  $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、欧前胡素 14.0  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 14.5  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 13.4  $\mu\text{g/mL}$  的混合溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.2 全二维液相色谱方法的建立

在全二维液相色谱系统中, LabSolutions 色谱工作站管理软件用于运行控制 Shimadzu Nexera X2

液相色谱系统, LC $\times$ LC Assist Version 2.0 软件用于辅助第一维和第二维液相色谱的时间程序设定, 全二维液相色谱的等高线图 (Contour Plots) 由 Chrom Square Version 2.2 软件生成。

全二维液相色谱系统的流路切换模式示意图见图 1、2, 样品经自动进样器进入一维 (1D) 泵单元, 并经 1D 色谱柱进行分离, 在 1D 分离柱上分离的馏分进入定量环 A (Loop A) 或者定量环 B (Loop B)。当经 1D 色谱柱洗脱的馏分进入 Loop A 时, Loop B 中已储存的馏分经二维 (2D) 泵单元引入 2D 分离柱, 在 2D 分离柱中分离后, 进入流通池并由检测器进行检测。同样地, 当储存在 Loop A 的馏分被 2D 泵单元引入 2D 分离柱进行分离与检测时, 1D 色谱柱分离出的馏分则进入 Loop B 暂时储存。

连接在二位六通切换阀上的 2 个定量环体积相同, 第一与第二维色谱的梯度洗脱是同时进行的, 第一维的洗脱液进入 Loop A 或者 Loop B, 并由阀切换转入第二维进行分离。在全二维方法建立的过程中, 需同时考虑第一维色谱体积流量、定量环体积与阀切换时间的匹配, 使经第一维分离的洗脱液能全部进入第二维, 并在第二维的 1 个阀切换时间内被分析完。第二维的分离时间即为阀切换时间, 1 个阀切换时间也称作 1 个调制周期 (modulation time)。如本研究的第一维液相色谱柱的体积流量为 0.1 mL/min, 定量环的体积为 100  $\mu\text{L}$ , 则第二维的调制周期为 1 min。利用时间程序生成软件 “LC $\times$ LC Assist Version 2.0”, 只需向软件中输入相应的信息即可自动生成第一维和第二维梯度洗脱程序。用该软件所获得的第一维和第二维梯度洗脱程序能够复制并转移到岛津公司 LCMS 工作站软件 “Lab

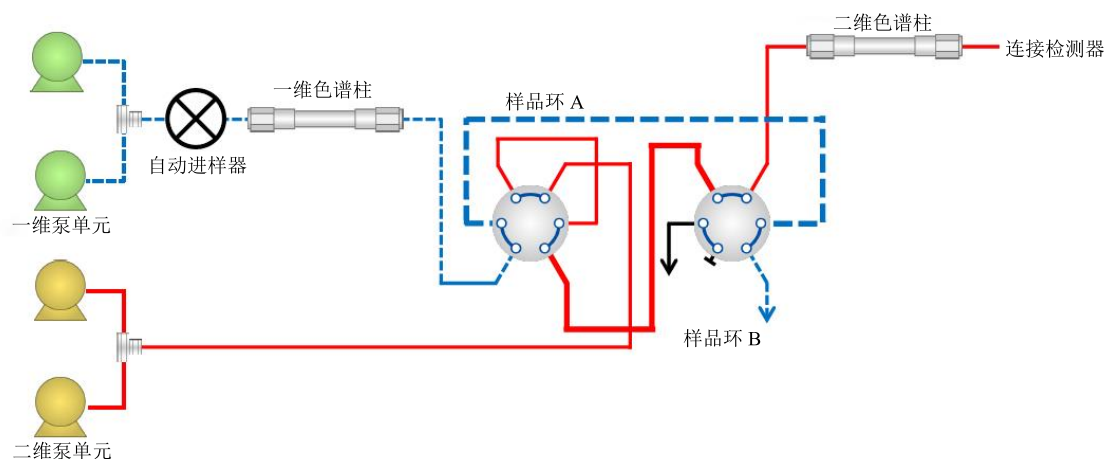


图 1 样品经由第一维色谱柱分离并储存在样品环 A

Fig. 1 Sample fractionated from first dimension and stored in Loop A

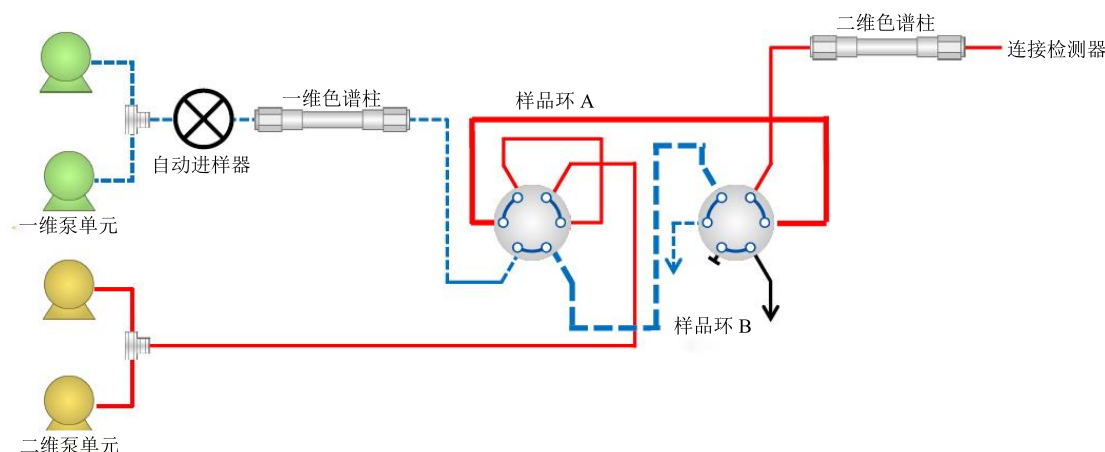


图 2 样品经由第一维色谱柱分离并储存在样品环 B

Fig. 2 Sample fractionated from first dimension and stored in Loop B

Solutions”, 并进行样品的全二维液相色谱分析。

### 2.3 全二维液相色谱分离条件

全二维液相色谱的进样量为 2  $\mu$ L, 第一维色谱中, 色谱柱使用 Acquity UPLC HSS CYANO (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m), 柱温 40  $^{\circ}$ C, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~30% 甲醇; 10~35 min, 30%~45% 甲醇; 35~55 min, 45%~65% 甲醇; 55~65 min, 65%~95% 甲醇; 65~70 min, 95% 甲醇; 体积流量 0.1 mL/min。

第二维色谱中, 使用 Kinetex Phenyl-Hexyl (50 mm $\times$ 3 mm, 2.6  $\mu$ m) 色谱柱, 柱温 40  $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 体积流量 1.5 mL/min; DAD 的样品采集速率为 12.5 Hz, 检测波长为 254 nm; 第二维的调制周期为 1 min, 梯度洗脱程序的设置由时间程序生成软件“LC $\times$ LC Assist Version 2.0”辅助完成, 其洗脱程序如表 1 和图 3 所示。图 3-A 中的蓝线代表第一维梯度洗脱运行的程序, 红线代表第二维梯度洗脱运行的程序; 图 3-B 中的黑线代表第二维的初始梯度洗脱程序。

### 2.4 全二维液相色谱指纹图谱的建立

**2.4.1 精密度试验** 取同一批样品 (S1) 的供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录全二维液相色谱的等高线图, 以黄芩苷为参比峰, 计算各共有峰相对峰体积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 5%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取同一批样品 (S1) 的供试品溶液, 分别在 0、4、8、16、24、48 h 进样, 记录全二维液相色谱的等高线图, 以黄芩苷为参比峰, 计算各共有峰相对峰体积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 5%, 结果表明供试品溶液

在 48 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取样品 (S1) 6 份, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行分析, 记录全二维液相色谱的等高线图, 以黄芩苷为参比峰, 计算各共有峰相对峰体积的 RSD 均小于 5%, 相对保留时间的 RSD 均小于 5%, 结果表明方法重复性良好。

**2.4.4 指纹图谱的建立及部分共有峰的指认** 取 NSP 21 批 (S1~S21), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 依“2.3”项下色谱条件进行测定。通过对比 21 批 NSP 样品的全二维等高线图, 并根据保留时间与紫外吸收特征, 找出并确定了 18 个共有峰, 图 4 为样品 S1 的全二维等高线图及 18 个共有峰在图谱中的位置。

取空白溶剂、供试品溶液和混合对照品溶液, 依“2.3”项全二维液相色谱条件依次测定, 在 Labsolutions 软件上先将供试品溶液和混合对照品的色谱图以空白溶剂作为背景进行扣除处理, 再应用 ChromSquare Version 2.2 软件生成相应的等高线图。表 2 为 19 个混合对照品的一维液相色谱和全二维液相色谱保留时间信息, 图 5 为 19 个混合对照品的一维色谱图与全二维液相色谱的等高线图。通过对比混合对照品和供试品的全二维等高线图指纹图谱共有峰第一维和第二维的保留时间及色谱峰紫外吸收光谱特征, 确定 21 批 NSP 样品共有峰中的 1 号峰为梔子苷 (混合对照品溶液中的 1 号峰), 8 号为胡薄荷酮 (混合对照品溶液中的 8 号峰), 9 号为黄芩苷 (混合对照品溶液中的 11 号峰), 15 号为欧前胡素 (混合对照品溶液中的 15 号峰), 16 号为汉黄芩素 (混合对照品溶液中的 17 号峰)。

表 1 第二维液相色谱的梯度洗脱程序

Table 1 Gradient program for second-dimension liquid chromatography

| t/min | 初始    | 第 10 分钟 | 第 35 分钟 | 第 55 分钟 | 第 65 分钟 | 第 70 分钟 |
|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0     | 5%乙腈  | 15%乙腈   | 25%乙腈   | 45%乙腈   | 55%乙腈   | 55%乙腈   |
| 0.8   | 30%乙腈 | 55%乙腈   | 70%乙腈   | 90%乙腈   | 100%乙腈  | 100%乙腈  |
| 0.8   | 5%乙腈  | 15%乙腈   | 25%乙腈   | 45%乙腈   | 55%乙腈   | 55%乙腈   |
| 1.0   | 5%乙腈  | 15%乙腈   | 25%乙腈   | 45%乙腈   | 55%乙腈   | 55%乙腈   |

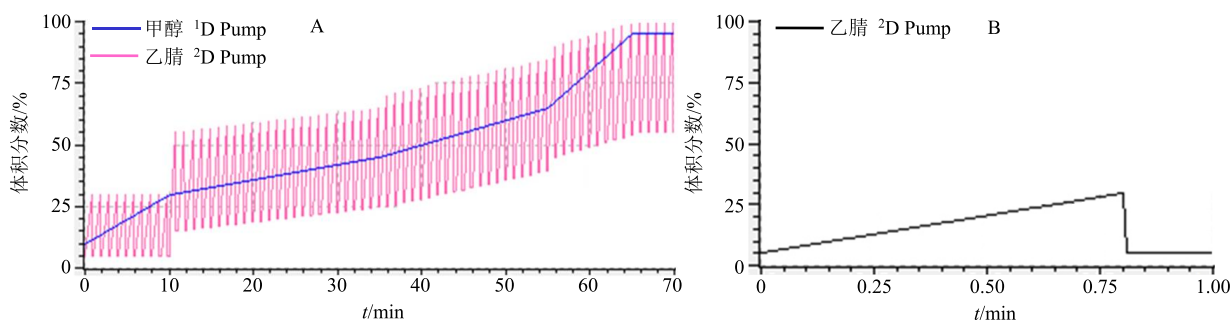


图 3 第一与第二维的梯度洗脱程序 (A) 以及第二维的初始梯度洗脱程序 (B)

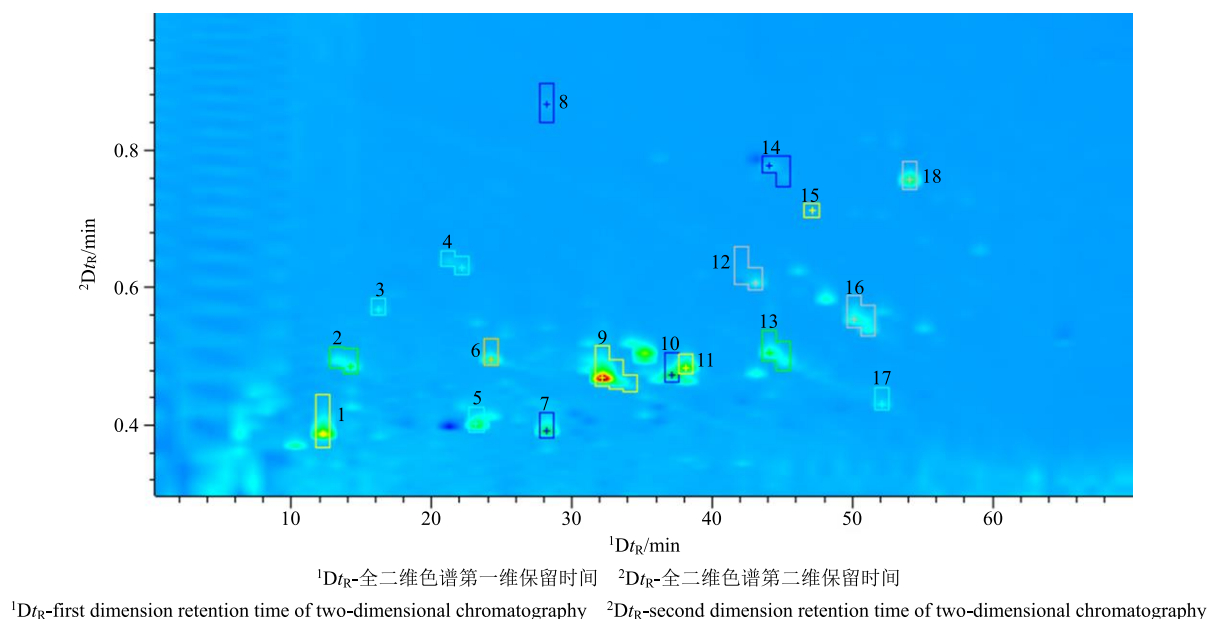
Fig. 3 Gradient programs for LC  $\times$  LC (A) and gradient program at beginning of analysis in second dimension (B)

图 4 样品 S1 的等高线图及 18 个共有峰的位置信息

Fig. 4 LC  $\times$  LC contour plots of sample S1 with 18 common peak location information

**2.4.5 指纹图谱的相似度 (S) 评价** 经全二维液相色谱分析得到的数据是一个矩阵, 为分别以第一维、第二维洗脱时间轴表示检测器信号的等高线图<sup>[26]</sup>, 得到的色谱图是三维指纹图谱。由于全二维液相色谱分离的色谱峰为三维体, 其峰值大小以峰体积表示<sup>[27]</sup>。故采用峰体积表征 NSP 样品三维指纹图谱中共有峰的峰值大小。

将 18 个共有峰的峰体积进行归一化预处理, 即以各样品中最大的峰体积为基准, 其余色谱峰均除

以该峰体积, 得到归一化后的数据。在多指标评价体系中, 当各指标间的水平相差很大时, 如果直接用原始指标值进行分析, 就会突出数值较高的指标在综合分析中的作用, 相对削弱数值水平较低指标的作用。在相似度计算中, 采用归一化预处理可以消除不同样品由于提取过程或进样等误差导致样品浓度不同而带来的影响, 从而使 S 计算结果更为准确。故为保证结果的可靠性, 有必要对原始数据进行标准化预处理。最终确定采用 3 种常用的方法欧

表 2 19 个对照品的一维液相色谱和全二维液相色谱保留时间

Table 2 Retention time of <sup>1</sup>D chromatogram and LC × LC contour for 19 reference compounds

| 峰号 | 对照品    | t <sub>R</sub> /min | <sup>1</sup> Dt <sub>R</sub> /min | <sup>2</sup> Dt <sub>R</sub> /min | 峰号 | 对照品   | t <sub>R</sub> /min | <sup>1</sup> Dt <sub>R</sub> /min | <sup>2</sup> Dt <sub>R</sub> /min |
|----|--------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----|-------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1  | 栀子苷    | 10.828              | 11.397                            | 0.397                             | 11 | 黄芩苷   | 29.814              | 31.481                            | 0.481                             |
| 2  | 绿原酸    | 12.649              | 13.363                            | 0.357                             | 12 | 盐酸巴马汀 | 30.523              | 32.469                            | 0.471                             |
| 3  | 芍药苷    | 13.098              | 14.431                            | 0.427                             | 13 | 藁本内酯  | 40.523              | 41.824                            | 0.826                             |
| 4  | 连翘酯苷 A | 18.918              | 20.411                            | 0.409                             | 14 | 木犀草素  | 43.343              | 44.425                            | 0.427                             |
| 5  | 甘草苷    | 19.862              | 21.443                            | 0.444                             | 15 | 欧前胡素  | 45.264              | 46.733                            | 0.735                             |
| 6  | 盐酸黄连碱  | 22.763              | 24.488                            | 0.485                             | 16 | 芹菜素   | 47.123              | 48.445                            | 0.447                             |
| 7  | 连翘苷    | 25.559              | 26.535                            | 0.537                             | 17 | 汉黄芩素  | 48.608              | 49.577                            | 0.577                             |
| 8  | 胡薄荷酮   | 25.947              | 27.881                            | 0.884                             | 18 | 甘草酸   | 50.562              | 51.448                            | 0.447                             |
| 9  | 盐酸药根碱  | 27.047              | 28.447                            | 0.447                             | 19 | 金合欢素  | 52.918              | 54.524                            | 0.525                             |
| 10 | 盐酸小檗碱  | 28.766              | 30.496                            | 0.496                             |    |       |                     |                                   |                                   |

t<sub>R</sub>—一维色谱保留时间 <sup>1</sup>Dt<sub>R</sub>—全二维色谱第一维保留时间 <sup>2</sup>Dt<sub>R</sub>—全二维色谱第二维保留时间

t<sub>R</sub>—retention time of one-dimensional chromatography <sup>1</sup>Dt<sub>R</sub>—first dimension retention time of two-dimensional chromatography <sup>2</sup>Dt<sub>R</sub>—second dimension retention time of two-dimensional chromatography

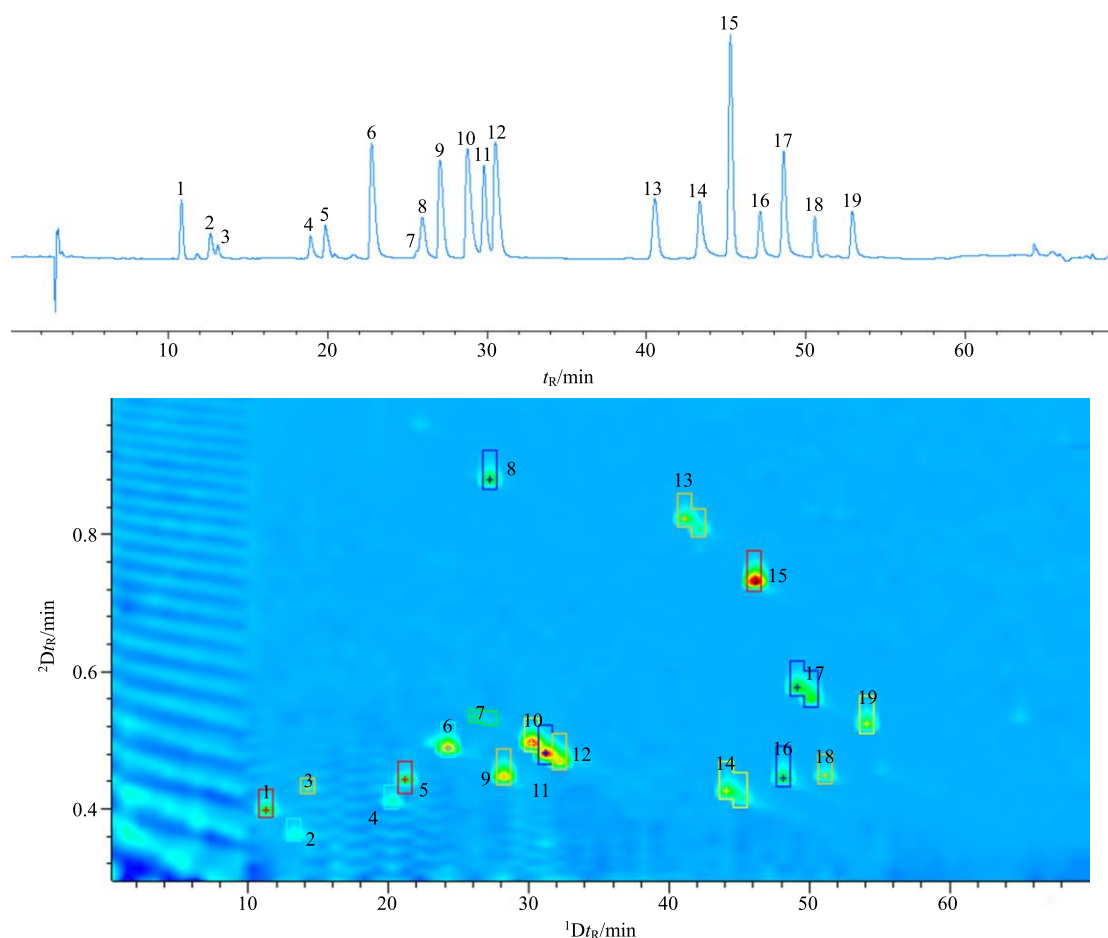


图 5 19 个对照品的一维液相色谱图及全二维液相色谱等高线图

Fig. 5 <sup>1</sup>D chromatogram and LC × LC contour plot of 19 reference compounds

氏距离、夹角余弦和相关系数法，并分别以各共有峰峰体积的中位数和平均数为标准对照指纹图谱，计算样品的 S，结果见表 3。

### 3 讨论

3.1 全二维液相色谱较一维液相色谱的优势与不足  
全二维液相色谱较传统的一维液相色谱峰分离

能力强,峰容量有了很大的提高。以样品 S1 为例,在检测波长为 254 nm 下,经全二维液相色谱分析其有效分离的色谱峰超过 100 个,而以传统的一维

液相色谱分析其有效分离的色谱峰则为 40 个左右。在一维液相色谱的重叠成分,可通过全二维液相色谱实现分离。如图 6 所示,样品 S1 在一维液相色谱

表 3 3 种  $S$  计算方法结果

Table 3 Results of three similarity calculation methods

| 样品  | 欧氏距离法 $S/\%$ |       | 夹角余弦法 $S/\%$ |       | 相关系数法 $S/\%$ |       | 样品  | 欧氏距离法 $S/\%$ |       | 夹角余弦法 $S/\%$ |       | 相关系数法 $S/\%$ |       |
|-----|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-----|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|     | 平均数          | 中位数   | 平均数          | 中位数   | 平均数          | 中位数   |     | 平均数          | 中位数   | 平均数          | 中位数   | 平均数          | 中位数   |
| S1  | 78.30        | 88.00 | 97.70        | 99.40 | 96.40        | 99.10 | S12 | 70.60        | 60.90 | 96.40        | 90.20 | 94.10        | 84.70 |
| S2  | 77.50        | 92.60 | 97.40        | 99.80 | 96.10        | 99.70 | S13 | 57.30        | 50.80 | 91.90        | 83.50 | 86.70        | 74.00 |
| S3  | 78.50        | 89.60 | 97.70        | 99.60 | 96.50        | 99.40 | S14 | 56.10        | 49.70 | 89.40        | 80.10 | 82.80        | 68.90 |
| S4  | 75.30        | 83.50 | 96.90        | 99.10 | 95.40        | 98.70 | S15 | 54.40        | 48.60 | 84.80        | 74.10 | 75.20        | 59.30 |
| S5  | 76.00        | 86.10 | 97.10        | 99.40 | 95.50        | 99.10 | S16 | 77.30        | 66.80 | 97.70        | 93.10 | 96.30        | 89.20 |
| S6  | 80.00        | 87.80 | 98.20        | 99.50 | 97.10        | 99.30 | S17 | 68.00        | 60.80 | 97.20        | 92.90 | 95.40        | 89.10 |
| S7  | 80.10        | 92.00 | 98.10        | 99.80 | 97.00        | 99.70 | S18 | 72.50        | 77.80 | 95.70        | 97.40 | 94.40        | 96.60 |
| S8  | 75.70        | 89.70 | 96.80        | 99.60 | 95.40        | 99.40 | S19 | 72.10        | 84.50 | 95.40        | 98.90 | 93.70        | 98.70 |
| S9  | 75.40        | 88.70 | 96.70        | 99.50 | 95.30        | 99.30 | S20 | 74.90        | 80.60 | 96.60        | 98.10 | 95.90        | 97.70 |
| S10 | 80.10        | 94.50 | 98.10        | 99.90 | 97.20        | 99.80 | S21 | 72.00        | 79.00 | 95.60        | 97.90 | 95.10        | 97.80 |
| S11 | 65.20        | 57.00 | 93.70        | 86.40 | 90.00        | 78.90 |     |              |       |              |       |              |       |

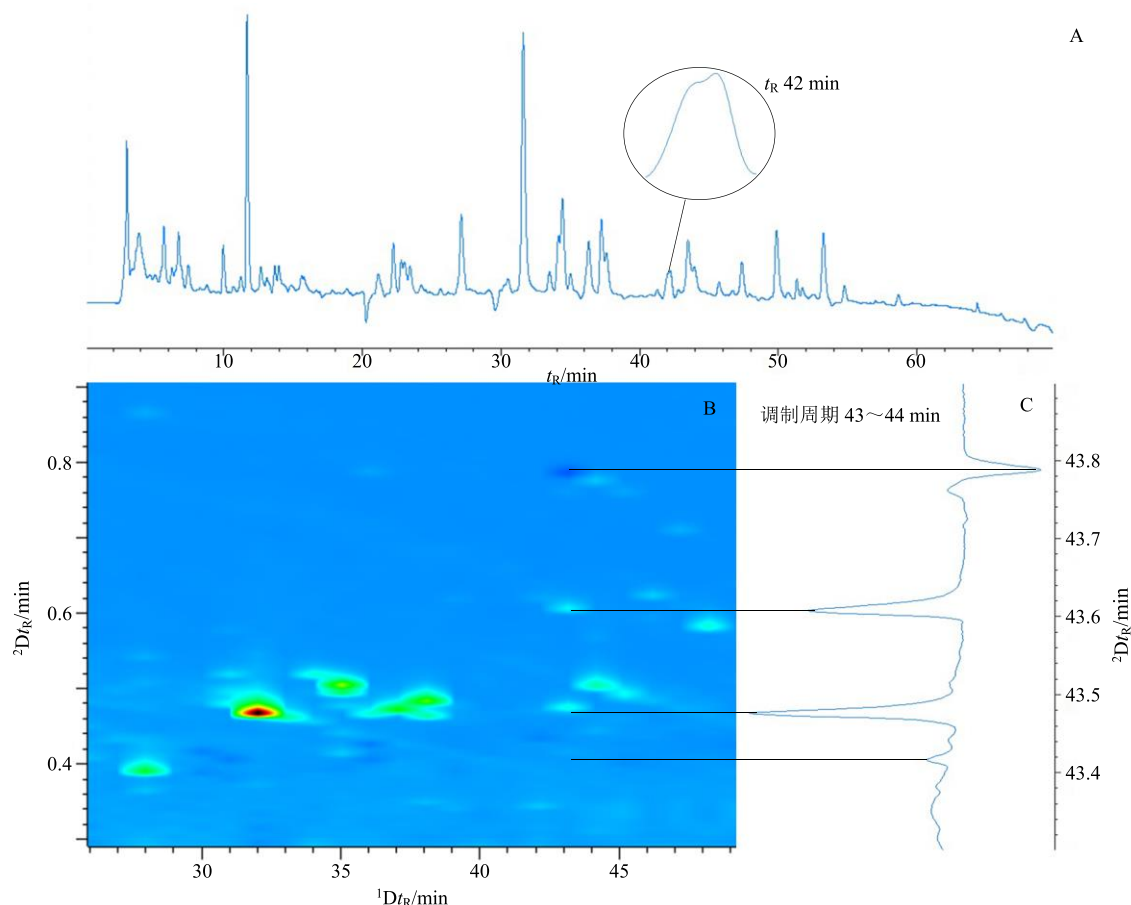


图 6 S1 的第一维液相色谱图及 42 min 色谱峰图 (A)、43~44 min 的全二维液相等高线图 (B) 和 43~44 min 的第二维色谱图 (C)

Fig. 6  $^1D$  chromatogram of S1 and its chromatogram at 42 min (A), contour plot of comprehensive two-dimensional liquid chromatography at 42—43 min (B), and  $^2D$  chromatogram at 42—43 min (C)

谱保留时间为 42 min 的未分离色谱峰(图 6-A),经全二维液相色谱分离后,在调制周期为 43~44 min 的等高线图中可观察到 4 个斑点(图 6-B),其对应的色谱图含 4 个独立的色谱峰(图 6-C)。

通过对 21 批 NSP 样品进行全二维色谱指纹图谱测定,根据保留时间与紫外吸收特征找出共有峰,并且对共有峰进行了方法学考察,确定了 18 个共有峰。全二维由于强大的分离能力,在共有峰的确认过程中,各批次间的共有峰数量较多,但在方法学考察时,共有峰中大部分含量较低的成分其峰体积的 RSD 值较大。其原因可能是与仪器的每一次切阀,对全二维液相色谱系统的影响不能完全准确一致有关。因此,本研究最终只选取了仪器精密度、样品的稳定性、方法的重复性考察时共有峰峰体积 RSD 值均小于 5% 的共 18 个共有峰。

### 3.2 全二维液相色谱条件的优化

在全二维液相色谱分离中,样品在第一维色谱柱的分离采用相对较长、内径较窄且粒径小的柱子以获得较好的色谱分离效果,并用较慢的体积流量洗脱,使洗脱液充分注入第二维色谱柱;在第二维色谱的分离采用较短的、内径较宽的色谱柱分离,并以较高的体积流量洗脱<sup>[28]</sup>。本研究中色谱柱组合方式采用 RPLC×RPLC,在优化色谱柱的组合时,采用以下 4 根色谱柱并以体积流量为 0.1 mL/min 对第一维色谱分离进行测试:Acquity UPLC BEH Shield RP<sub>18</sub> (100 mm×3.0 mm, 1.7 μm)、Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Acquity UPLC HSS CYANO (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Acquity UPLC HSS PFP (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);第二维色谱分离采用 Kinetex Phenyl-Hexyl (50 mm×3 mm, 2.6 μm)、Kinetex XB-18 (50 mm×3 mm, 2.6 μm) 色谱柱以及体积流量 1.5 mL/min 进行测试,应用以上色谱柱的组合分别对 NSP 样品 S1 进行分离,最终筛选出以 Acquity UPLC HSS CYANO (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Kinetex Phenyl-Hexyl (50 mm×3 mm, 2.6 μm) 分别为全二维液相色谱系统的第一、二维色谱柱时样品 S1 的分离效果最好。

考虑到流动相的兼容性与适用性,流动相的溶剂系统采用甲醇水溶液和乙腈水溶液。并选用洗脱能力相对较强的乙腈作为第二维色谱柱的有机相,以洗脱能力相对较弱的甲醇作为第一维色谱柱的有机相,使从第一维色谱柱洗脱出来的样品能更好地

聚集在第二维色谱柱的柱头,减小带宽效应<sup>[29]</sup>。通过参考文献方法<sup>[30]</sup>并对流动相的改性剂进一步考察,最终以甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液分别为第一维和第二维的流动相。

研究发现<sup>[13,31]</sup>在以反相色谱柱分别作为第一和第二维色谱柱的全二维液相色谱中,第二维采用漂移梯度程序(shift gradient)能显著提高第二维色谱的分辨能力。本研究的第二维采用漂移梯度程序方法进行梯度洗脱条件的优化,最后以样品的分离效果确定第二维的梯度洗脱程序(图 2)。由于第一维刚开始(0~10 min)洗脱出来的组分在反向色谱柱保留的较弱,所以第二维的洗脱程序跨度范围比较窄,乙腈从 5%到 30%,体积分数跨度为 25%;而在第一维后期(35~55 min)洗脱出来的组分由于在反相色谱柱的保留较强,故第二维乙腈体积分数跨度设为 45%。

### 3.3 相似度评价结果

在 NSP 尚无标准对照制剂的情况下,本研究采用了国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)的 2 种方法来生成标准对照指纹图谱:第 1 种是以平均数法生成对照指纹图谱;第 2 种是以中位数法生成对照指纹图谱。从表 4 可以看出,以平均法、中位数法生成的对照指纹图谱计算出的相似度结果基本一致,以平均数法生成对照指纹图谱并采用欧氏距离、夹角余弦和相关系数法计算 21 批 NSP 样品的相似度均值分别为 72.25%、95.67%、93.40%;以中位数法生成对照指纹图谱并采用欧氏距离、夹角余弦和相关系数法计算 21 批 NSP 样品的相似度均值分别为 76.62%、94.68%、91.83%。并且,采用的欧氏距离、夹角余弦和相关系数法 3 种评价结果中样品相似性的变化趋势一致,故 3 种相似度评价方法均能准确表征 NSP 各批次样品指纹图谱的相似性。

21 批 NSP 的相似度值相差较大,采用中位数法生成对照指纹图谱并以夹角余弦法计算的相似度值其范围为 74.10%~99.90%。其中,样品 S1~S10 (均为北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂生产)的相似度值范围为 99.10%~99.90%,样品 S11~S16 (均为吉林市鹿王制药股份有限公司生产)的相似度值范围为 74.10%~93.10%,山西天生制药有限公司(S17、S18)、内蒙古天奇中蒙制药股份有限公司(S19、S20)及天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂(S21)的样品相似度值范围为 92.90%~

98.90%。以上结果表明,所测定的多个批次的 NSP 样品在不同生产厂家间的化学成分含量相差较大;同仁堂制药厂的不同批次样品的成分组成及其含量一致性较好,批次间质量较为稳定,而鹿王制药股份有限公司的不同批次样品的成分组成及其含量变异较大,批次间质量稳定性较差;其他生产厂家的样品(S17~S21)的相似度值接近同仁堂制药厂的各批次样品,其质量的稳定性介于同仁堂制药厂与鹿王制药股份有限公司之间。

### 3.4 小结

本研究建立了基于全二维液相色谱的 NSP 三维指纹图谱的方法,并对 21 批 NSP 样品进行相似度评价。全二维液相色谱系统的第一维与第二维的色谱柱由分离机制不同的两反相柱组成,第二维采用漂移梯度洗脱程序以提高全二维液相色谱系统的分离效能,建立的全二维液相色谱方法其分离能力明显优于传统的一维液相色谱方法。研究中采用的 3 种不同相似度评价方法均能准确表征 NSP 各批次样品指纹图谱的相似性,并且结果基本一致。本研究建立的全二维三维指纹图谱及其相似度的评价方法切实可行,为有效控制 NSP 的质量提供新的方法,也是对传统一维液相色谱指纹图谱的补充和提高。

### 参考文献

- [1] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [2] 张娟娟, 孙 巍, 张 磊, 等. 复方丹参滴丸及原药材指纹图谱研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 859-865.
- [3] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [4] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [5] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [6] Stoll D R, Li X, Wang X, *et al.* Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1168(1/2): 3-43.
- [7] Dugo P, Herrero M, Kumm T, *et al.* Comprehensive normal-phase  $\times$  reversed-phase liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection for the analysis of free carotenoids and carotenoid esters from mandarin [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1189(1/2): 196-206.
- [8] Erni F, Frei R W. Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixture [J]. *J Chromatogr A*, 1978, 149: 561-569.
- [9] Wang Y, Kong L, Lei X Y, *et al.* Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and reversed-phase column for separation of complex traditional Chinese medicine Longdan Xiegan Decoction [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2185-2191.
- [10] Wang C, Wang S W, Fan G, *et al.* Screening of antinociceptive components in *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by comprehensive two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(5): 1731-1740.
- [11] Liu Z, Zhu D, Qi Y, *et al.* Elucidation of steroid glycosides in *Anemarrhena asphodeloides* extract by means of comprehensive two-dimensional reversed-phase/polyamine chromatography with mass spectrometric detection [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(17): 2210-2218.
- [12] Wang S, Wang C, Zhao X, *et al.* Comprehensive two-dimensional high performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and monolithic column for separation of the traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 713: 121-129.
- [13] Li D, Schmitz O J. Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(20): 6511-6517.
- [14] Li D, Schmitz O J. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography tandem diode array detector (DAD) and accurate mass QTOF-MS for the analysis of flavonoids and iridoid glycosides in *Hedyotis diffusa* [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 407(1): 231-240.
- [15] Qu L, Xiao Y, Jia Z, *et al.* Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry for chemical constituents analysis of tripterygium glycosides tablets [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1400: 65-73.
- [16] Wang S, Wang Q, Qiao X, *et al.* Separation and characterization of triterpenoid saponins in *Gleditsia sinensis* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Planta Med*, 2016, 82(18): 1558-1567.
- [17] Cao J L, Wang S S, Hu H, *et al.* Online comprehensive

- two-dimensional hydrophilic interaction chromatography × reversed-phase liquid chromatography coupled with hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry for the analysis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1536: 216-227.
- [18] Zhou W J, Guo Z M, Yu L, *et al.* On-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of *Curcuma kwangsiensis* [J]. *Talanta*, 2018, 186: 73-79.
- [19] 朱靖博, 籍立新, 萧伟, 等. 反相二维色谱制备甘草中黄酮类化合物 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2033-2040.
- [20] 张艳海, 金燕, 王峥涛. 在线二维多中心切割液相色谱法测定三七、人参及其相关产品中 8 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 894-901.
- [21] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [22] 周文杰. RP-HPLC 法测定牛黄上清丸中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中国药师, 2009, 12(2): 264-265.
- [23] 范红. 牛黄上清丸中多指标成分含量测定方法研究 [J]. 中国医药导刊, 2011, 13(6): 1074-1075.
- [24] 杨小军, 丁永辉. RP-HPLC 法测定牛黄上清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、小檗碱的含量 [J]. 西部中医药, 2016, 29(2): 27-33.
- [25] 吴芳, 乔蓉霞, 杨瑞瑞, 等. 牛黄上清丸 (片、胶囊) 挥发油特征图谱研究 [J]. 中成药, 2012, 34(7): 1388-1390.
- [26] Murphy R E, Schure M R, Foley J P. Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1998, 70(8): 1585-1594.
- [27] Thekkudan D F, Rutan S C, Carr P W. A study of the precision and accuracy of peak quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography in time [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(26): 4313-4327.
- [28] Dugo P, Cacciola F, Kumm T, *et al.* Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1184(1/2): 353-368.
- [29] Bedani F, Schoenmakers P J, Janssen H G. Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography-a review [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(14): 1697-1711.
- [30] Wang D D, Liang J, Yang W Z, *et al.* HPLC/qTOF-MS-oriented characteristic components data set and chemometric analysis for the holistic quality control of complex TCM preparations: Niu Huang Shangqing pill as an example [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 130-141.
- [31] Qiao X, Song W, Ji S, *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, 1362: 157-167.