

UPLC在中药组分分析及代谢组学中的应用进展^Δ

刘丹^{1*}, 齐双辉², 马海英^{1#} (1. 中国医科大学附属第四医院药学部, 沈阳 110000; 2. 沈阳军区总医院儿科, 沈阳 110000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0973-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.33

摘要 目的: 为超高效液相色谱(UPLC)法在中药组分分析和代谢组学中的应用进展提供参考。方法: 以“超高效液相色谱”“超高效液相色谱-质谱联用技术”“中药鉴定”“中药含量测定”“中药指纹图谱”“中药代谢组学”“UPLC/MS”为关键词, 组合查询2006年1月—2015年6月在Science Direct、万方、维普等数据库中的相关文献, 并进行归纳和总结。结果: 共检索到相关文献168篇, 其中有效文献35篇。经对UPLC的基本原理及特点、UPLC及其联用技术在中药组分分析与代谢组学中的应用进行归纳总结, 结果表明UPLC及其联用技术凭借其优良的分选性能和高通量的检测水平, 使成分复杂的中药体系的定性和定量检测、代谢组学方面的研究更为准确和高效。结论: UPLC及其联用技术可用于中药的成分鉴别、含量测定、指纹图谱、代谢标记物等方面的研究。

关键词 超高效液相色谱法; 超高效液相色谱-质谱联用技术; 中药组分分析; 代谢组学

超高效液相色谱(UPLC)是一种采用小颗粒填料色谱柱(粒径小于2 μm)和超高压系统(压力大于10⁵ kPa)的新型液相色谱技术, 能显著地改善色谱峰的分选度和检测灵敏度, 因而有利于提高流动相流速、缩短分析时间、提高分析通量^[1]。2004年3月, 美国Waters公司率先推出了第一台商品化的UPLC系统, 填料粒径为1.7 μm, 自此UPLC的应用发展迅速, 且在实践中不断与质谱(MS)设备联用, 应用到农药残留物检测、水质和环境监测、化妆品质量控制、药物及制剂的分析检测和质量控制等各个方面, 尤其在中药复杂组分分析及代谢组学领域的应用^[1], 为推动中药现代化进程做出了较大贡献。笔者以“超高效液相色谱”“超高效液相色谱-质谱联用技术”“中药鉴定”“中药含量测定”“中药指纹图谱”“中药代谢组学”“UPLC/MS”为关键词, 组合查询2006年1月—2015年6月在Science Direct、万方、维普等数据库中的相关文献。结果, 共检索到相关文献168篇, 其中有效文献35篇。现就UPLC的基本原理及特点、UPLC及其联用技术在中药组分分析中的应用、UPLC及其联用技术在代谢组学中的应用3个方面作如下综述, 以期药学工作者更好地利用UPLC技术进行中药组分与代谢组学的研究提供参考。

1 UPLC的基本原理及特点

UPLC保持了传统的高效液相色谱(HPLC)的基本原理, 即Van Deemter速率方程, 但其分离效能和分析速度却得到了全面提升, 这归功于其独特的小颗粒色谱填料技术。随着填料颗粒度减小, 相应的理论板高度下降, 得到更高的柱效^[2]。然而, 只有使用很小粒度的固定相, 并且只有在达到最佳线速度时, 其具有的高柱效和快速分离的特点才能显现出来。因此, 要实现UPLC分析, 除必须制备出装填颗粒度小于2 μm固定相的色谱柱外, 还必须提供与之匹配的高压溶剂输送单元、低死体积的色谱系统、快速的检测器、快速自动进样器和高速数据采集、控制系统等^[3]。这些成果的组合使样品能够提供的信

息达到新的水平, 使得UPLC拥有了不同于HPLC的独特优势: 提高了分析速度; 提高了分离度; 提高了检测灵敏度; 与MS联用, 提高了MS离子化效率, 减小了基质效应^[4]。

2 UPLC及其联用技术在中药组分分析中的应用

中药是一个含有较多化学成分的体系, 尤其是复方中药制剂, 不仅化合物种类繁多、数量不明确, 而且含量差异大、已知化合物少。UPLC及其联用技术具有优良的分选性能和高通量的检测水平, 能够充分适应复杂的中药体系的定性和定量检测^[5]。

2.1 中药组分的鉴定

李小琴等^[6]采用UPLC-电喷雾(ESI)-MS/MS建立了快速定性鉴别7个不同品种金银花药材中化学成分的方法, 采用梯度洗脱17 min, 检测到33个化学成分, 时间快速, 鉴别数量较多, 并且分离良好。张晓旭等^[7]采用UPLC-四极杆飞行时间(Q-TOF)-MS/MS联用技术, 以Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C₁₈为色谱柱, 以水(含0.1%甲酸, A)-乙腈(含0.1%甲酸, B)为流动相进行梯度洗脱, 快速、全面地鉴别出生晒参中人参皂苷类成分, 为目前生晒参的质量控制提供了可靠的依据。窦志华等^[8]采用UPLC-MS/MS联用技术鉴别出复方五仁醇胶囊中五味子醇甲、戈米辛J、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、戈米辛N、五味子乙素、五味子丙素等8个木脂素类成分, 为该制剂药效物质研究奠定了基础。Lou ZX等^[9]应用UPLC-MS/MS法从牛蒡叶的酚类提取物中鉴别出10种化合物。

2.2 中药组分的含量测定

中药中的生物碱类成分通常具有特殊的生理活性, 与其相应的功能主治息息相关, 具有重要的研究意义。但常规的HPLC法分析生物碱时, 由于离子对试剂、有机胺类等改性剂的加入, 会给液相色谱(LC)-MS的检测和响应带来很大的干扰。美国Waters公司研发了双(三乙氧基硅基)乙烷在硅胶中形成桥式乙基基团的技术, 合成了1.7 μm颗粒度的“ACQUITY UPLC™”填料, 避免了流动相中有机胺及盐的加入, 使UPLC-MS的灵敏度进一步提高, 为中药生物碱类成分的定量研究提供良好的检测手段^[5]。

李启艳等^[10]采用快速溶剂萃取-UPLC法, 以Agilent Eclipse Plus C₁₈为色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,

Δ 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(No.2015020463)

* 药师, 硕士。研究方向: 中药质量控制。电话: 024-62036827。

E-mail: qtwwd1986@163.com

通信作者: 主任药师, 教授。研究方向: 药物代谢酶及药物相互作用。电话: 024-62041350。E-mail: cmu4h-mhy@126.com

测定了稳心颗粒中三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁成分的含量;利用优化的UPLC条件在保证分离度的前提下,比普通的HPLC法出峰时间缩短了约40 min。Zhao Y等^[11]采用UPLC-MS/MS法,以BEH C₁₈为色谱柱,以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,建立了同时测定消栓通络方中18种成分的含量分析方法。柴川等^[12]采用UPLC色谱系统,以C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)为色谱柱,以乙腈-0.1%甲酸水溶液(24:76)为流动相,同时测定了淡豆豉中大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的含量,保留时间分别为2.35、2.72、4.50 min;样品分析时间为5 min,与普通HPLC法比较,分析速度提高了5~8倍,同时也具有良好的准确度、精密度和耐用性。殷书梅等^[13]采用UPLC法测定复方南星止痛膏中马兜铃酸A的含量,在UPLC的高灵敏度色谱条件下,信噪比为3:1时马兜铃酸A的最低检测限为0.1 μg。此外,UPLC法在中药含量测定方面的研究还有诸多的报道^[14-18]。

2.3 中药指纹图谱研究

Liu P等^[19]采用UPLC-Q-TOF-MS方法,建立了三七指纹图谱分析法,18 min内得到了51个共有峰,并指认了其中的46个色谱峰,主要为皂苷类成分,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”计算出10批样品相似度,其中9批的相似度均在0.970以上。吕露阳等^[20]采用UPLC法,以乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为238 nm,建立了木香和川木香的UPLC指纹图谱。结果,20 min内检测到57个共有峰,分别指认了木香中8个共有峰和川木香中12个共有峰,进一步应用聚类分析和主成分分析(PCA),可以完全将2种药材区别。李慧等^[21]采用UPLC法检测20批来自辽宁、吉林和黑龙江省的9种人参皂苷(Rg₁、Re、Rb₁、Rf、Rg₂、Rc、Rb₃、Rb₂、Rd)的含量,建立了20批样品的UPLC指纹图谱,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对不同产地人参样品进行质量评价。结果,吉林、辽宁样品中9种人参皂苷的平均含量明显高于黑龙江样品含量,且不同省份样品中的3种人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁含量存在明显差异,20批人参药材图谱的相似度值均在0.930以上。马天成等^[22]采用UPLC法,以ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)为色谱柱,以甲醇-0.03%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,首次建立了川芎的UPLC指纹图谱共有模式。结果,标定了18个共有峰,结合保留时间和紫外光谱分析,指认了8个色谱峰,14批川芎药材中有12批的相似度值在0.900以上。

3 UPLC及其联用技术在代谢组学中的应用

代谢组学是20世纪90年代初,基于核磁共振(NMR)、MS和HPLC等技术发展而兴起的一门新的“组学”,是对细胞、组织或器官以及整个生物体系所有小分子代谢产物进行高通量、全景式的定性、定量分析,研究有机体内物质代谢规律和健康状况的新技术;研究对象主要为生物样本,一般有生物体液(如血液、尿液、唾液和脑脊液等)、细胞提取物、细胞培养液、组织提取液以及粪便等^[23]。它用光谱或波谱检测代谢产物,数据经多元统计分析和模式识别方法,了解外源性物质引起内源性代谢产物的变化,反映相关的代谢途径^[24]。代谢组学在功能基因组学、病理生理学、临床诊断、药理毒理学、营养学等方面有着广泛的应用前景。

TOF-MS是代谢组学研究的一种新技术,该技术可获得精确分子质量(<5 ppm),并具有较高的灵敏度和分辨率。在代

谢组学研究中,采用UPLC-Q-TOF-MS联用技术。UPLC保证了高柱压下实现高分离度的快速分离,而Q-TOF-MS既具有飞行时间质谱的准确分子质量和高分辨率,又能够通过再次碰撞碎裂得到二级质谱,准确鉴定分子结构。杨赟^[25]也建立了一套应用于代谢组学研究的有效分析方法。

李晶晶等^[26]应用UPLC-MS/MS法分别获得补骨脂的一、二级质谱信息,通过与文献或对照品比对确定了补骨脂的化学成分及代谢成分。在补骨脂提取物中检测到22个化学成分,鉴别出了17个成分,在含药血浆中检测出10个人血成分,鉴定出7个成分,含药血浆中的10个人血成分可能为补骨脂体内直接作用的药效成分。王凤云等^[27]采用UPLC-Q-TOF-MS法和PCA、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)相结合,研究大鼠体内的败酱草总皂苷(BJC)对溃疡性结肠炎的药效,同时考察其尿液代谢表型差异,结果显示BJC可明显改善大鼠溃疡性结肠炎。马晓丽等^[28]使用UPLC-Q-TOF-MS对糖尿病患者尿液样本进行分析,采集所有样本的代谢物进行指纹图谱研究,从而寻找影响糖尿病患者体内代谢变化的潜在生物标记物及其相关代谢途径,从代谢组学的角度深入研究了糖尿病的发生机制和疾病筛查方法。Yang B等^[29]采用UPLC-Q-TOF法研究了失眠症的代谢组学以及酸枣仁汤对于失眠症的干预作用,该研究可用于失眠症的吸收和代谢特征研究,采用多种模式识别方法用于研究代谢物的结构并发现新的代谢物。结果,共发现20个差异性代谢产物,这些代谢物的变化与氨基酸和脂肪酸的代谢密切相关,表明UPLC-Q-TOF法适用于传统中药的代谢轮廓分析。近些年UPLC在中药代谢组学中的研究还有很多^[30-34]。

4 结语

中药是中华民族几千年智慧的结晶,但中药的活性成分复杂、体内代谢物浓度低、内源性杂质较多,给中药的现代化和国际化带来了很大的挑战。现代分析技术和方法的发展,尤其是UPLC作为新型液相色谱技术的发展,以其超强分离能力和速度、超高灵敏度,与HPLC简单方便的方法转换,并与TOF-MS等的联用技术,为中药复杂组分分析开拓了崭新的平台。在代谢组学中对代谢标记物的准确性和定量研究,使得近年来一些常见病、多发病(如糖尿病、恶性肿瘤等)的发病机制和药物作用机制研究得以开展,从而为临床诊断和相应的新药研发打下坚实基础。UPLC推出不久,美国Agilent公司和日本岛津公司陆续推出的高分离度快速液相色谱(RRLC)和超快速液相色谱(UFLC),分别采用1.8 μm和2.2 μm颗粒度的色谱柱填料^[35],进一步拓宽了UPLC系统在中药研究领域中的应用。总之,UPLC与相关的液相技术、MS等先进检测手段的强强联用,可用于中药的成分鉴别、含量测定、指纹图谱、代谢标记物等方面的研究。

参考文献

- [1] 杨艳,陈旭冰,陈光勇,等.超高效液相色谱在中药研究中的应用[J].云南中医中药杂志,2012,33(6):70.
- [2] 郝桂明,唐素芳.超高效液相色谱在药物分析中的应用[J].天津药学,2009,21(6):64.
- [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.
- [4] 艾华,王广基,顾轶,等.超高效液相色谱在现代药代动力学中的应用[J].中国药科大学学报,2007,38(4):294.

- [5] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等.超高效液相色谱在复杂体系中药物分离分析中的应用[J].世界科学技术:中医药现代化,2006,8(3):106.
- [6] 李小琴,孙晓红,蔡爽,等.采用UPLC-ESI-MS/MS以及主成分聚类分析研究不同品种金银花的化学成分及其差异[J].药学学报,2009,44(8):895.
- [7] 张晓旭,王洪平,杨阳,等.超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法快速鉴别生晒参中的皂苷类成分[J].中国医药导报,2015,12(9):130.
- [8] 窦志华,丁安伟,王陆军,等.复方五仁醇胶囊主要成分的定位定量分析[J].江苏中医药,2008,40(2):65.
- [9] Lou ZX, Wang HX, Zhu S, *et al.* Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves[J]. *J Chromatogr A*, 2010, doi:10.1016/j.chroma.2009.12.022.
- [10] 李启艳,王荣梅.快速溶剂萃取-超高效液相色谱法测定稳心颗粒中皂苷类成分[J].药物分析杂志,2015,35(3):528.
- [11] Zhao Y, Liu M, Yang Z, *et al.* Simultaneous quantification of eighteen constituents in traditional Chinese medicine XiaoShuanTongLuo by UPLC-MS/MS[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(4):225.
- [12] 柴川,白永涛,文红梅,等. UPLC法测定中药淡豆豉中3种主要异黄酮苷元的含量[J].中国民族民间医药,2012,21(12):44.
- [13] 殷书梅,王宓,林新艳,等. UPLC法测定复方南星止痛膏中马兜铃酸A的含量[J].南京中医药大学学报,2009,25(5):396.
- [14] 陈菲,林晓兰,席海为,等. UPLC-MS-MS同时测定中药活血益气方KLW中三七皂苷R₁、人参皂苷R_g₁、人参皂苷R_b₁的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(16):156.
- [15] Li TX, Hu L, Zhang MM, *et al.* A sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of eleven bioactive components of Tong-Xie-Yao-Fang decoction in rat biological matrices[J]. *J Chromatogr B*, 2014, doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.015.
- [16] 高攀峰,胡明勋,曹爱华. UPLC法同时测定甘肃产蒙古黄芪皂苷类成分的含量[J].中国药房,2015,26(12):1708.
- [17] 陈国辉,佟玲,杭太俊,等.超高效液相色谱法测定养血清脑颗粒中4个酚酸类成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(1):124.
- [18] 喻喜华,陈晓辉,戴荣华,等. UPLC法测定山茱萸生品与酒炙品中齐墩果酸与熊果酸的含量[J].中国现代中药,2010,12(5):26.
- [19] Liu P, Yu HS, Zhang LJ, *et al.* A rapid method for chemical fingerprint analysis of Panax notoginseng powders by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(6):471.
- [20] 吕露阳,张吉仲,张志锋,等.木香川木香药材UPLC特征指纹图谱建立及鉴别研究[J].中国中药杂志,2014,39(14):2699.
- [21] 李慧,许亮,温美佳,等.不同产地人参皂苷成分含量UPLC法测定及质量评价[J].中华中医药杂志,2015,30(6):1963.
- [22] 马天成,崔思娇,张靓琦,等.川芎的UPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2013,24(15):1389.
- [23] 李宁,范雪梅,王义明,等.代谢组学及其分析技术的研究进展[J].中南药学,2014,12(7):668.
- [24] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(6):1075.
- [25] 杨赞.现代分析方法在中药质量控制及代谢组学研究中的应用[D].上海:上海交通大学药学院,2008:63.
- [26] 李晶晶,鹿秀梅,李发美,等.补骨脂的化学及代谢成分的超高效液相色谱串联质谱法鉴定[J].时珍国医国药,2010,21(9):2235.
- [27] 王凤云,伍海涛,韩亮.败酱草总皂苷对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及代谢组学的初步研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(2):217.
- [28] 马晓丽,孟磊,李新霞,等.基于UPLC/Q-TOF MS的糖尿病尿液代谢组学研究[J].分析测试学报,2014,33(6):621.
- [29] Yang B, Zhang AH, 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.
- [30] 苏红宁,李淳瑞,王玉峰,等. UPLC-MS/MS法鉴定五味子酯甲在大鼠体内的代谢产物[J].中国药房,2015,26(13):1759.
- [31] 黎莉,孙鹏,梁琼麟,等.白香丹胶囊干预经前期综合征肝气逆证大鼠血清代谢组学研究[J].中成药,2011,33(5):762.
- [32] 辛杨,张滢,张哲,等.乌头碱给药大鼠尿液生物标记物的检测[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(3):89.
- [33] 刘秀斌,张莹,曾建国,等.基于UPLC-QTOF MSE的代谢组学方法研究不同采收期银杏叶的化学组分[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2014,40(6):650.
- [34] 苗华,张旭.基于UPLC-代谢组学技术研究泽泻结合有氧运动对高脂血症大鼠的改善作用[J].西北大学学报:自然科学版,2014,44(1):83.
- [35] 单玲玲,靳光乾,刘善新. UPLC、RRLC及UFLC在中药质量控制中的研究进展[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2340.

(收稿日期:2015-09-17 修回日期:2015-11-23)

(编辑:余庆华)