

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 种人参皂苷的含量

张艳海^{1,2}, 王峥涛², 金燕^{1*}

1.赛默飞世尔科技中国有限公司, 上海, 201206

2.上海中医药大学 中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海, 201203

摘要 目的 基于一法多用策略,建立了在线二维多中心切割液相色谱同时测定三七、人参及其相关产品中人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rb2、Rb₃、Rc、Rd 含量的方法。方法 按照产品的不同类别和制备工艺,分别采用相应的样品制备方法,对于原药材及其复方中药固体制剂,采用加压溶剂萃取法,分别采用三氯甲烷和水饱和正丁醇的二步溶剂提取;优化了一维和二维色谱分离条件,包括色谱柱选择、梯度洗脱等,分别采用 phenyl-x 和 C18 柱作为一维和二维色谱柱,根据各目标物在一维色谱柱上的出峰时间,设置切割时间窗口,将各组分分别转移至 6 个定量环中,交替储存目标物馏分。第二维分离采用 2.6 μ m 颗粒的核-壳柱实现了 8 次的快速循环分离,完成 8 个目标物的测定。结果 8 个目标待测物在药材、提取物和中药复方等基质均可获得较好的分离和定量,线性相关系数>0.999,连续进样的精密度 RSD<2%,方法回收率在 94.57%~103.47%之间,检出限在 0.041~0.18 μ g/ml。结论 方法可准确对不同样品基质中的 8 个皂苷进行定量,结合 8 个皂苷的相对比例变化,可对人参、三七及其相关产品进行质量评价。

关键词 在线二维液相色谱,多中心切割,人参皂苷,人参,三七,参苓白术颗粒

Simultaneous quantitation of eight ginsenosides in notoginseng, ginseng and related products by online multi heart-cutting two dimensional liquid chromatography

Zhang Yan-Hai¹, Wang Zheng-Tao², Jin Yan¹

1. ThermoFisher Scientific Corporation, Shanghai 201206, China

2. The Ministry of Education Key Laboratory for Standardization, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective A rapid method for the simultaneous quantification of eight ginsenosides in notoginseng, ginseng and related products has been developed by using multi hearting-cutting two dimensional liquid chromatography based a“monomethod-heterotrait matrix” (MHM) strategy. **Methods** Corresponding sample preparations were applied to samples, which were different in either product forms or preparation processes. . Pressured liquid extraction (PLE) was developed for the raw herbs and related solid-state Chinese patent medicine using two-steps solvent

第一作者简介: 张艳海, 男, 博士研究生, 研究方向为中药活性成分和质量标准。Email: 15121006875@163.com

extraction with chloroform and water-saturated n-butanol. One and two dimensional separation conditions including columns selection and gradient elution were optimized systematically. Phenyl-X and C18 were confirmed as 1D and 2D columns respectively. Eight targeting ingredients were cut alternately into six loops by starting-to-ending time of peaks in the 1D column. 2D rapid separation for eight cycles was achieved on core-shell column with 2.6 μm particle to complete eight compounds quantitation. **Results** The results showed the eight targeting analytes were well separated and quantified in 50min in different sample matrix (raw herbs, extract and Chinese patent medicine). Method validation was performed in terms of linearity ($R \geq 0.999$), precision (0.52–1.53%) and recovery (ranged from 94.57% to 103.47%), and the LODs ($S/N=3:1$) of the eight analytes varied from 0.041 to 0.18 $\mu\text{g/ml}$ respectively. **Conclusions** Eight ginsenosides could be quantified accurately for different sample matrix. Combined with its relative proportions of eight ginsenosides, quality evaluation for notoginseng, ginseng and related products could be done scientifically.

Keywords Online 2D LC, Multi heart-cutting mode, Ginsenosides, Ginseng, Notoginseng, Shenlingbaizhu granula

人参皂苷是中药三七、人参等五加科植物中所含有的一类重要活性化合物^[1], 对中枢神经系统^[2]、免疫系统^[3]、心血管系统^[4] 都有药理作用。以人参、三七潜方入药的复方中药品种众多, 部分药物在临床应用中较为广泛。由于药材的不同药用部位^[5,6]、产地、生长年限和加工炮制方法^[7,8]等因素影响均会引起总皂苷和单体皂苷的含量变化, 且不同部位或单体的药理作用具有多样性^[9], 决定了人参功效的发挥是多组分协同作用的结果。因此需要对人参中多组分的含量和比例进行研究, 才能科学的评价和控制中药质量。液相色谱法是人参皂苷测定的主要方法^[10-13]。然而当前液相色谱方法仍存在以下问题: 一是方法主要以测定药材或提取物为主, 以人参为君药的中药复方大多尚未建立人参皂苷的含量测定方法; 二是部分以人参为君药的复方中药虽有人参皂苷的测定项, 但测定成分较少, 仅测定人参皂苷 Rg1、Re 等少数几个含量较高的成分, 无法满足中药复方的质量控制要求; 三是无论药材或中成药, 样品制备过程极其复杂, 尤其是提取过程, 耗时费力, 严重影响实际样品分析效率; 四是各测定方法中样品提取方法、净化方法和色谱分析条件各异, 方法缺乏普适性。因此建立简便、快速并能同时测定中药复方中多种人参皂苷的含量测定方法亟待解决。另外基于“一法多用 (monomethod-heterotrait matrix)”^[14]的思路, 对于含有同类成分的不同中药或产品, 采用统一的仪器分析方法, 也具有重要的实际意义。

由于中药基质成分极其复杂, 结构相近或类似化合物众多, 常规色谱分离能力有限。近年来, 随着商品化二维液相色谱仪器技术的逐渐成熟, 结合多种分离模式的多维液相色谱法在中药分析应用中已越来越多^[15-16], 按照一维色谱的馏分是否直接转移到第二维色谱柱中, 可分为离线二维 (offline 2D) 和在线二维 (online 2D), 其中在线二维液相色谱具有自动化程度高、分析速度快等优点, 适于实际大量样品的检测分析。在线二维液相色谱按照一维馏分是否全部转移至第二维色谱柱中, 又可分为全二维 (LC \times LC) 和中心切割 (LC-LC) 模

式, 后者可选择性将目标成分进行分析, 具有更好的普适性和可操作性, 更适于定量分析。但在多组分定量过程中, 传统二维中心切割通常采用 1 个或 2 采样环的接口设计, 常因二维分离速度限制, 导致采样频率的降低, 造成系统分离能力的损失, 尤其对于结构相似、保留时间相近的化合物分离。集合有多个采样环的选择性全二维液相色谱(sLC×LC)法^[17], 可打破一维分离的色谱峰宽和二维分析速度的联系, 能选择性的切割多个目标分析物, 因此可充分优化和发挥一维色谱分离能力, 而不再受制于低采样频率的影响^[18], 从而提升整体的二维系统的分离能力。在复杂基质的多组分分析中具有重要的应用前景。

本文根据选择性全二维液相色谱(sLC×LC)法原理, 构建了在线二维多中心切割液相色谱系统 (Online multi heart-cutting 2D LC, MHC-2D LC), 并初步建立了三七、人参及其提取物, 以及人参相关复方生脉注射液、参苓白术颗粒中 8 种人参皂苷的定量分析方法。

1 仪器与材料

双三元液相色谱系统 (赛默飞世尔科技公司, 美国), 配置 6 通道真空脱气机 SRD3600, 双梯度分析型色谱泵 DGP3600, 自动进样器 WPS3000TSL, 二极管阵列检测器 DAD3000 可变波长检测器 VWD3100, 柱温箱 TCC-3000 (配有一个 2 位置 6 通切换阀), 6 位置 14 通切换阀 (IDEX 公司, 美国), 变色龙色谱管理软件 Chromeleon7.2 SR3, 快速溶剂萃取仪 AS350 (赛默飞世尔科技公司, 美国)

正丁醇、二氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙腈、甲醇 (色谱级, Fisher), 去离子水 (18.2MΩ, Millipore 纯水机), 氨水 (≥95%, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 人参皂苷 Rg1 (供含量测定用, 纯度按 96.3%计, 中国药品生物制品检定所), Re(供含量测定用, 纯度按 92.7%计, 中国药品生物制品检定所), Rf(供含量测定用, 纯度≥98%, 中国药品生物制品检定所)、Rb1 (供含量测定用, 纯度按 92.9%计, 中国药品生物制品检定所)、Rc (99%, 化学对照品, 北京上立方联合化工技术研究院), Rb2 (供含量测定用, 纯度按 94.8%计, 中国药品生物制品检定所), Rd (供含量测定用, 纯度按 94.4%计, 中国药品生物制品检定所), Rb3(供含量测定用, 纯度按 92.7%计, 中国药品生物制品检定所), Accucore phenyl-X (2.1×100mm×2.6μm, 赛默飞世尔科技公司), Accucore C18 (4.6×50mm×2.6μm, 赛默飞世尔科技公司)。人参、三七 (购自药店), 红参粉 (吉林宏久生物科技有限公司), 人参茎叶总皂苷提取物 (含量>80%, 吉林宏久生物科技有限公司), 生脉注射液 (某制药公司, 批号: 15093002); 参苓白术颗粒 (某制药公司, 批号: 15111004)。

2 方法与结果

2.1 标准品溶液配制

取人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2、Rb3、Rd 对照品适量, 精密称定, 至 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成浓度分别为 2.6, 2.6, 2.5, 2.6, 2.0, 2.2, 2.6, 2.6 mg/mL 的储备溶液。取各上述对照品储备溶液适量, 加甲醇分别稀释至一定量, 制成各标准工作溶液。

2.2 样品溶液制备方法

人参、红参药材粉末、三七和参苓白术颗粒 (SLBZ granula): 人参、红参和三七粉碎成粉末, 过四号筛, 各取 1g, 参苓白术颗粒取 3g, 精密称定, 与硅藻土混匀后至 10mL 萃取池中, 采用加压溶剂萃取法, 萃取溶剂分别为三氯甲烷和水饱和正丁醇。萃取温度为 140°C, 压力 10Mpa, 先采用三氯甲烷萃取两次, 弃去萃取液, 再采用水饱和的正丁醇溶液萃取两次, 收集萃取液^[20]。以水饱和的正丁醇溶液定容至 25mL 容量瓶中, 混匀后, 准确量取 5mL 在水浴蒸干后, 以 5mL 甲醇溶解, 滤过后进行样分析。

其他: 精密称取人参茎叶总皂苷提取物 20mg 至 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容后, 滤过进行样分析。精密取生脉注射液 (SM injection) 样品 1mL 至 10mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 即可进行样分析。精密取血塞通注射液 2mL 至 10mL 量瓶, 加水定容至刻度, 即可进行样分析。

2.3 色谱条件

一维分析泵的流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1%磷酸溶液, Accucore phenyl-X (2.1×100mm×2.6μm)为第一维分析柱, 梯度洗脱, 0~2min, 95%B; 2~14min, 95%~72%B; 14~25min, 72%~60%B; 25~36%, 60%~5%B; 流速为 0.4 mL/min。二维分析泵的流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1%磷酸溶液, Accucore C18(4.6×50mm×2.6μm)为二维分析柱, 梯度洗脱, 流速为 2.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 203nm, 进样量 5μL。系统流路连接见图 1。

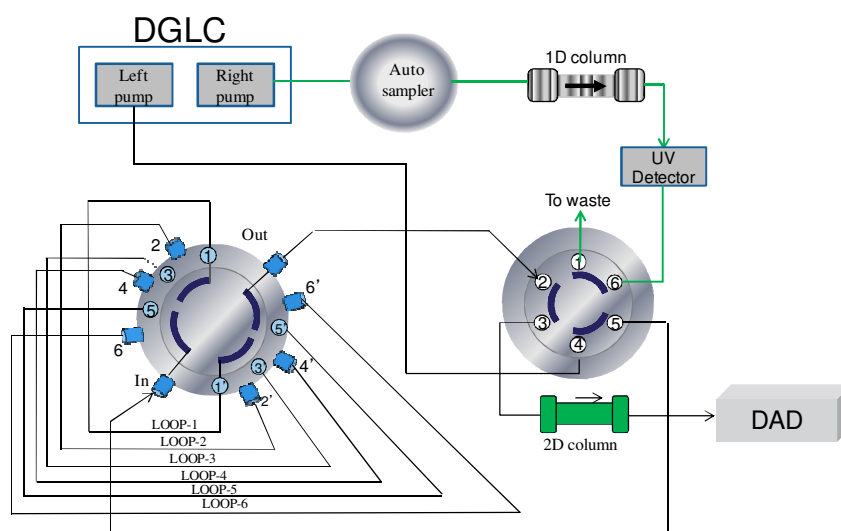


图 1 在线多中心切割二维分离系统连接

Fig.1 Flow scheme of online multi heart-cutting two dimensional column switching system

按照本色谱条件, 分别进样混合标准品和人参药材样品溶液, 分离色谱图如图 2 所示, 本法在 50min 内完成 8 种人参皂苷的测定, 各化合物分离良好, 无基质成分干扰, 可进行准确定量。

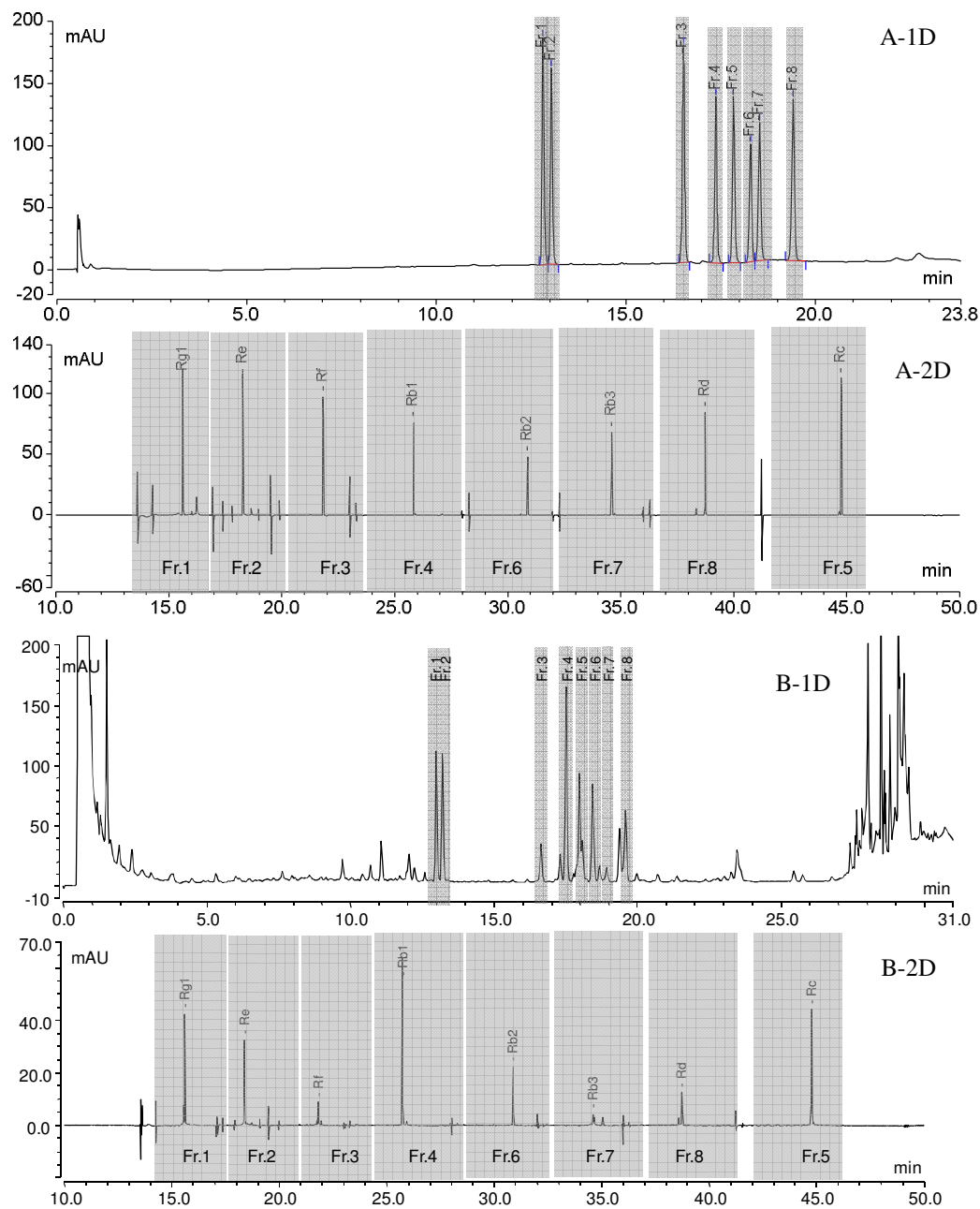


Fig.2. The 1D and 2D HPLC-UV chromatograms (203 nm) of eight reference standards (A) and Panax ginseng sample (B), showing the eight-time transfers between the 1D fractions and 2D separation. Dashed boxes show the heart-cutting time span of eight transferred 1D fractions

2.4 线性关系考察

分别精密量取各对照品储备液置 10mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀后再逐级稀释，制成系列浓度的对照品溶液，进样 5 μ L，结果见表 1。

表 1 线性关系和最低检出限考察结果

Table 1 Results of Linearity and LOD

No.	Peak name	线性范围	线性方程	相关系数	LOD
-----	-----------	------	------	------	-----

		$\mu\text{g/ml}$		R^2	(S/N=3:1, $\mu\text{g/ml}$)
1	Rg1	0.52~260	$y = 0.3402x + 0.2698$	0.9999	0.17
2	Re	0.52~260	$y = 0.3842x - 0.0444$	0.9999	0.18
3	Rf	0.5~250	$y = 0.5261x + 0.4372$	0.9999	0.091
4	Rb1	0.52~260	$y = 0.3464x + 0.4038$	0.9999	0.041
5	Rb2	0.52~260	$y = 0.2497x + 0.2212$	0.9999	0.096
6	Rb3	0.44~220	$y = 0.4067x + 0.1479$	0.9999	0.15
7	Rd	0.52~260	$y = 0.4154x + 0.4035$	0.9999	0.055
8	Rc	2.0~200	$y = 0.8072x + 0.5165$	0.9999	0.13

2.5 精密度试验

取某浓度的混合对照品溶液，连续进样 5 次，结果 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd 保留时间的 RSD(%)均小于 0.01；峰面积的 RSD(%)分别为 0.55, 0.78, 0.93, 0.99, 1.53, 0.86, 0.95, 0.52。表明方法连续进样的精密度较好。

2.6 重复性试验

取生脉注射液样品，按照 2.3 项下的样品溶液制备方法，制备进样溶液，按照本法进行测定，结果 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd 保留时间的 RSD(%)均小于 0.01；含量的 RSD(%)分别为 2.87, 2.01, 1.47, 1.81, 2.24, 1.50, 1.92, 2.76。表明方法重现性较好。

2.7 回收率试验

精密称取生脉注射液 6 份，每份 1mL，至 10mL 量瓶中，分别加入混合对照品溶液(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd 的浓度分别为 0.26, 0.26, 0.25, 0.26, 0.2, 0.22, 0.26 和 0.26mg/mL) 1mL 和 1.5mL，再加甲醇定容至刻度，摇匀后，进样分析，按照本法进行测定。按照如下公式 (2) 计算回收率。结果见表 2。

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(\text{detected amount} - \text{original amount})}{\text{spiked amount}} \times 100 \quad (2)$$

表 2 8 个目标物的平均回收率 (n=2)

Table 2 The average recoveries for eight compounds

加标量	Rg1	Re	Rf	Rb1	Rc	Rb2	Rb3	Rd
R-1	99.77	100.04	102.46	91.51	101.23	99.59	102.38	100.34
R-2	101.68	100.66	104.48	97.64	98.06	103.61	101.32	103.26
平均值	100.72	100.35	103.47	94.57	99.65	101.60	101.85	101.80

2.8 样品测定

分别取各样品适量，精密称定，按照 2.4 项下的样品前处理方法制备样品溶液，测定各人参皂苷的含量，结果见表 3。其中复方中药生脉注射液及其参苓白术颗粒分离见图 3。

表 3 样品中 8 种人参皂苷的含量测定结果

Table 3 Results of eight ginsenosides determination in samples

No.	样品 待测物	人参		红参		血塞通 注射液	人参茎叶 总皂苷	三七		生脉注 射液	参苓白术 颗粒
		$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/mL}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g}$
1	Rg1	2135.82	0.21	2269.37	0.23	9726.50	10.47	89.55	8.95	194.68	14.51
2	Re	792.51	0.08	4176.22	0.42	1595.15	22.17	10.61	1.06	178.58	144.34
3	Rf	259.75	0.03	220.58	0.02	120.97	0.06	0.12	0.01	54.62	5.34
4	Rb1	1833.20	0.18	3504.40	0.35	8092.89	1.31	59.67	5.97	589.47	239.69
5	Rb2	706.03	0.07	1504.96	0.15	211.38	4.42	0.53	0.05	212.85	63.56
6	Rb3	158.78	0.02	813.47	0.08	35.24	2.30	0.11	0.01	39.37	29.52
7	Rd	537.94	0.05	2385.55	0.24	2054.93	10.61	13.72	1.37	157.45	66.65
8	Rc	769.04	0.08	1718.82	0.17	23.48	2.22	0.83	0.08	262.94	115.16
Sum		7193.06	0.72	16593.38	1.66	21860.54	53.56	175.14	17.51	1689.97	678.77

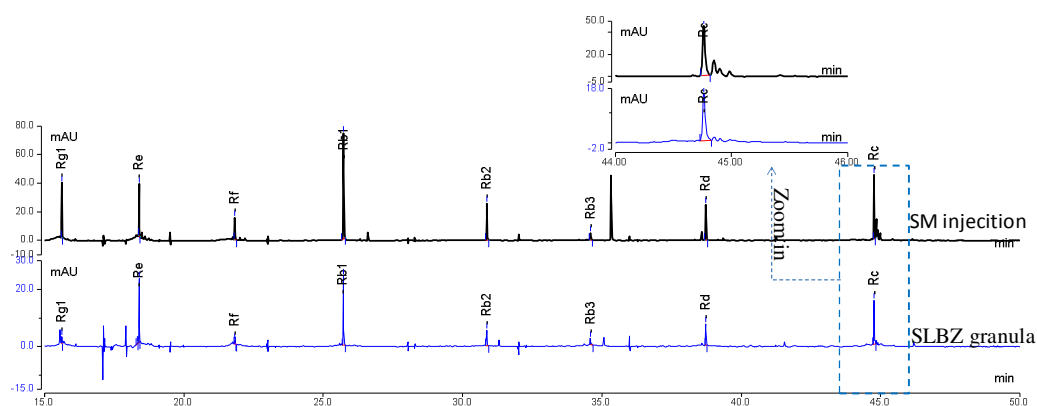


图3 生脉注射液及其参苓白术颗粒样品第二维分离谱图

Fig.3 Two-dimensional Chromatographs of ShengMai injection and SLBZ granula sample

2.9 样品中8种人参皂苷相对比例分析

除通过人参皂苷的含量对人参及其相关复方进行质量评价外, 8种人参皂苷的相对比例在区分不同种属、不同入药部位等也具有重要参考价值^[27-30]。本文将各样品中所含的8种人参皂苷的相对含量绘制成雷达图(图4, 5), 利用雷达图的整体轮廓及其关键皂苷比例(如Rg1/Re)可对不同种属及不同入药部位进行明显区分。如人参皂苷R_x/Rg1或R_x/Re的比值常被用做评价人参产品质量^[27-28]。血塞通注射液及其三七中人参皂苷Rf, Rc, Rb2、Rb3的相对含量较低, 而人参皂苷Rg1和Rb1的含量相对较高, 其中Rg1/Re比值显著高于人参及其茎叶总皂苷, 与文献^[28]所报道特征一致, 可据此对人参和三七进行区分; 人参和人参茎叶中8种皂苷相对含量也存在较大差异, 前者Rg1/Re的比值显著大于后者, 且后者所有人参皂苷R_x/Re均小于1, 与文献^[27,29]报道特征基本一致。

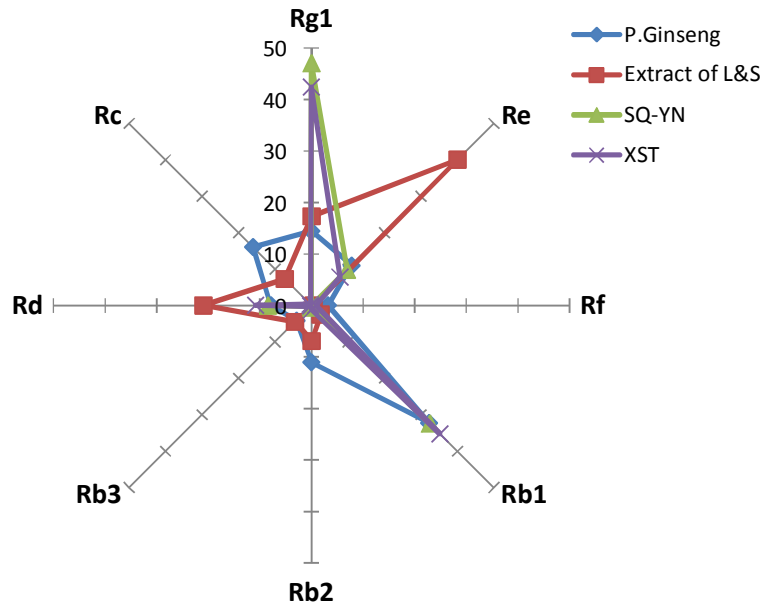


图 4 人参 (P.Ginseng)、人参茎叶总皂苷 (Total ginsenoside of L&S) 和三七 (SQ)、血塞通 (XST) 中 8 种人参皂苷的相对含量的雷达图

Fig.4 Radar graph of relative content for eight ginsenosides in P.Ginseng, Total ginsenoside of ginseng stems and leaves , P.notoginseng and XST injection

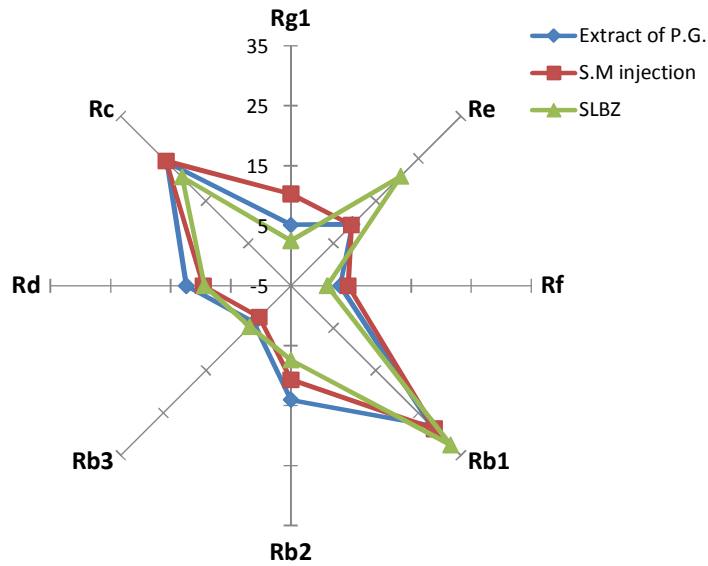


图 5 人参提取物 (Extract P.G)、生脉注射液 (S.M injection) 和参苓白术颗粒 (SLBZ) 中 8 种人参皂苷的相对含量的雷达图

Fig.5 Radar graph of relative content for eight ginsenosides in extract of P.Ginseng (Extract P.G), Shenmai injection (S.M injection) and SLBZ granula (SLBZ)

另外在复方评价上,生脉注射液与参苓白术颗粒的总体特征与人参提取物基本类似(如图5),但参苓白术颗粒在 Rg1/Re 比值上与其他两个有一定差异,可能与其制备工艺过程相关,需要继续进行深入研究。

3 讨论

3.1 样品制备方法

本文针对人参、三七不同产品形式,分别采用不同的样品制备方法。作为提取物和生脉注射液(由人参,麦冬和五味子组成),其基质成分相对较为简单,因此无需复杂样品制备过程,即可进样分析。而人参药材及其成方固体制剂均需要进行提取和净化过程,如在2015版药典一部^[19]人参就需要采用三氯甲烷和正丁醇溶剂分步进行回流提取,从药材浸泡过夜到制备完成约需16h,整个过程耗时,且溶剂消耗量大。加速溶剂萃取法(Accelerated solvent extraction, ASE)是采用高温高压条件下进行萃取的一种方法,在高压和高温条件下,通过降低提取溶剂粘度和表面张力,使其更易浸润和穿透胞壁,并使化合物在溶剂中的扩散速率和溶解度增加,从而加快并提高目标物的提取率。因此本文针对不同样品基质均采用相同的ASE法提取。提取温度、压力、静态萃取时间和循环次数等是影响提取率的重要因素,袁斌等^[20]已对人参药材的提取条件进行了系统的优化,本实验参考其条件,分两步溶剂萃取,样品与少量硅藻土拌匀后置于萃取池中,第一步采用三氯甲烷,以去除脂溶性基质成分;第二步采用水饱和正丁醇溶液选择性提取人参皂苷部位,其他萃取条件相同,整个过程在密闭系统中30min内自动完成,方法重现性更佳。

3.2 在线二维多中心LC系统构建及其色谱条件优化

Giddings^[21]指出了二维分析方法开发中的两个基本挑战:一是色谱分离的正交性;二是第一维的分离效能要得以保持。后者实际上是由低采样频率而引起, Murphy等^[22]研究了采样频率对全二维系统分离性能的影响,得出低采样频率会降低二维系统的分离性能,并指出第一维的每个色谱峰至少要完成三次切割,才能获得较高的分离效能。因此实际分析常以牺牲一维分离的部分柱效的方式,来实现全二维分离。而多中心切割模式可打破一维采样周期和二维分离循环时间之间的限制^[16],在充分优化第二维色谱条件的同时,也充分发挥了第一维色谱柱的分离效能。因此本文建立了基于6个loop环的在线多中心切割模式,用于多组分的定量分析,如图1所示,通过2位6通切换阀可选择性将目标待测组分转移至定量环中进行临时储存,左泵即第二维泵再将目标馏分转移至第二维色谱柱中进行分离。

目标分析物人参皂苷按照其苷元结构类型可分为原人参二醇型、原人参三醇型、齐墩果烷型和其他类型等;人参二醇型人参皂苷的成苷位置主要在C-3位和C-20位,糖多为葡萄糖、阿拉伯糖和木糖,而原人参三醇型皂苷成苷的位置主要在C-6位和C-20位,糖多为葡萄糖、鼠李糖和木糖,大多化合物的疏水基团及亲水基团比较类似,因此增加一维和二维分离机制的多样性和正交性,可提升系统的分离能力。反相色谱仍是LC较为普遍的一种分离模式,具有分离柱效高、重现性好和化学键合相丰富等优点, Snyder和Dolan^[23-24]对反相色谱柱进行了系统研究,创建了疏水减法模型(1),用于筛选等效色谱柱或评价正交性。

$$F_s = \{ [12.5(H_2 - H_1)]^2 + [100(S^*_2 - S^*_1)]^2 + [30(A_2 - A_1)]^2 + [143(B_2 - B_1)]^2 + [83(C_2 - C_1)]^2 \}^{1/2} \quad (1)$$

(H, Hydrophobicity, S, Steric interaction, A, hydrogen-bond acidity, B, hydrogen-bond basicity, C, cation-exchange activity)

F_s 值越大表示色谱柱间的分离机制差异越大, 因此本文在色谱柱组合中尝试了 Polar-embedded C18×Accucore C18 ($F_s=47.2$), PFP×Accucore C18 ($F_s=66.36$), Phenyl-X×Accucore C18 ($F_s=40.77$) 和 Phenyl-Hexyl×Accucore C18 ($F_s=15.21$) 等, 前两种虽均具有较高的正交性, 但考虑到人参皂苷 Rg₁ 和 Re 的分离, 本文最终选择了 Phenyl-X 与 RP 的组合, 以 8 种目标待测皂苷进行预实验, 调整保留时间在两种色谱柱上的相关系数为 0.9878, 具有一定的正交性, 且 Phenyl-X 较 Phenyl-Hexyl 具有更强的空间选择性, 适于同系化合物分离, 如图 A-1D 所示, 8 个目标人参皂苷化合物分离良好, 且 Rg₁ 与 Re 分离度达到 2.0 以上。由于各目标待测物在紫外下均为末端吸收, 高背景吸收的流动相体系(如甲醇)会影响目标物的检测灵敏度, 同时考虑到溶剂的兼容性, 因此一维和二维分离均采用乙腈和 0.1% 磷酸水作为流动相。一维和二维在反相体系下, 采用梯度分析有助于改善系统的分离性能和峰容量^[25-26], 因此本实验的两维分离均采用梯度分析, 针对每个 cycle 优化了梯度条件, 调整各目标物的保留时间和分离度。第二维色谱柱选择实心核-壳柱 (Accucore C18), 在 2.0mL/min 的高流速下进行快速梯度分析, 获得了较好的分离效果, 同时系统背压也不会过高。综上, 本文确定了最终的色谱分离条件, 混合标准品和样品第二维分离谱图见图 2-A-2D 和 B-2D, 各目标化合物分离良好; 由复方中药生脉注射液及其参苓白术颗粒第二维的分离谱图(图 3) 也可看出, 各目标物分离基本无基质干扰, 可进行准确定量, 且对于含量较低的组分(如人参皂苷 Rf), 通过第二维的超高效分离, 峰宽由一维的 18 S 压缩为第二维的 5 S 以内, 改善了目标物的检测灵敏度。

本文采用在线二维多中心切割液相色谱方法 (MHC-2D LC), 初步对人参、三七药材及其相关产品中 8 种人参皂苷的含量进行了测定, 结合相对比例及关键峰的比值, 可对人参等同属及其不同入药部位做出快速识别和质量评价。但与常规 LC 方法比较, 本法从方法开发到实际运用尚存在一定距离, 本法在应用过程中受到的影响因素更多, 如色谱柱的稳定性及切割时间窗口等。未来在 8 种成分的相对比例分析方面, 尚需积累更多的不同产地、不同采收期的样本, 构建更加稳定、可靠的雷达图, 以区分不同种属及其入药部位。另外在以人参或三七为君药的复方中药应用方面, 还需继续拓展, 以验证本法的稳定性。本文的实验结果初步证实了二维液相色谱的分离能力, 可为中药复方多组分定量分析方法开发提供参考。

References

- 1 白敏, 毛茜, 徐金娣. 人参属药用植物地上部位皂苷类成分的化学和分析研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 412-422
- 2 王筠默. 人参药理研究的进展[J]. 人参研究, 2001, 13(3): 2-8
- 3 窦德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(2): 151-156
- 4 钟国赣, 孙成文, 李云义. 人参二醇组皂苷 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc 和 Rd 的钙通道阻滞

-
- 作用和抗自由基作用[J]. 中国药理学报, 1996, 16(3): 255
- 5 鱼红闪, 陈琪, 金凤燮. 不同种类人参及其各部位中皂苷组成和比例的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(2): 24-28
 - 6 李闯, 王义, 张美萍等. 人参不同部位皂苷成分的 HPLC 测定[J]. 吉林中医药, 2010, 30(4): 347
 - 7 王启祥, 吕修梅, 张晋秀. 人参皂苷含量变化研究概况[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(5): 233-235
 - 8 李翔国, 全炳武, 李虎林等. 人参皂苷量变异的研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2300-2304
 - 9 窦德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(2): 152
 - 10 Sun B S, Gu L J, Fang Z M, *et al.* Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from Panax ginseng by HPLC-ELSD[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50: 15-22
 - 11 Ouyang L F, Wang Z L, Dai J G, *et al.* Determination of total ginsenosides in ginseng extracts using charged aerosol detection with post-column compensation of the gradient [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2014, 12(11): 0857-0868
 - 12 Li W K, Fitzloff J F. HPLC WITH EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETECTION AS A TOOL TO DISTINGUISH ASIAN GINSENG (PANAX GINSENG) AND NORTH AMERICAN GINSENG (PANAX QUINQUEFOLIUS)[J]. J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 2002, 25(1): 17-27
 - 13 Li L, Luo G A, Liang Q L, *et al.* Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 52 : 66-72
 - 14 Yao C L, Yang W Z, Wu W Y, *et al.* Simultaneous quantitation of five Panax notoginseng saponins by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography: Method development and application to the quality control of eight Notoginseng containing Chinese patent medicines [J]. Journal of Chromatography A, 2015: 1402 : 71-81
 - 15 Cao J L, Wei J C, Chen M W, *et al.* Application of two-dimensional chromatography in the analysis of Chinese herbal medicines[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1371: 1-14
 - 16 黄竞怡, 佟玲, 丁黎. 二维液相色谱在中药分析的应用[J]. 药学进展, 2015, 39 (5): 357-363
 - 17 Groskreutz S R., Michael M S, Secor L B, Stoll D R.. Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography Part I: Principles and instrumentation Journal of Chromatography A[J]. 2012, 1228: 31-40
 - 18 Larson E D, Groskreutz S R., Harmes D C, *et al.* Development of selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel first-dimension sampling and second-dimension separation-application to the quantitative analysis of furanocoumarins in apiaceous vegetables[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405: 4639-4653
 - 19 中国药典. 一部 [S]. 2015: 8
 - 20 袁斌, 车金水, 金燕, 等. 快速溶剂萃取-高效液相色谱法测定人参药材中人参皂苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (7) : 188-191

-
- 21 Giddings J C, Two-dimensional separations: concept and promise[J]. *Anal.Chem.*, 1984, 56: 1258A – 1270A
 - 22 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: 1585-1594
 - 23 Snyder L R., Dolan J W, Carr P W. A new look at the selectivity of RPC column [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (9): 3254–3262
 - 24 Snyder L.R., Dolan J W, Carr P W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1060: 77-116
 - 25 Ikegami T, Hara T, Kimura H, *et al.* Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions[J]. *J. Chromatogr. A* , 2006, 1106: 112
 - 26 Jandera P, Hájek T, Cesla P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 1995–2006
 - 27 徐 静, 贾 力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价[J]. *药物评价研究*, 2011, 34 (3) : 199-203
 - 28 张玉婷, 冯克然, 曹 进, 等. UPLC法评价多种人参提取物中人参皂苷的含量[J]. *食品科学*, 2013, 34(24): 102-106
 - 29 Wan J B, Li S P, Chen J M, Wang Y T. Chemical characteristics of three medicinal plants of the *Panax* genus determined by HPLC-ELSD[J]. *J. Sep. Sci.*, 2007, 30: 825 – 832
 - 30 Shi W, Wang Y T, Li J, Zhang H Q, Ding L. Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panax ginseng*[J]. *Food Chemistry* , 2007, 102 : 664–668