

高分辨采样二维液相色谱法同时测定金银花中 绿原酸和木犀草苷含量

王智聪*, 傅荣杰, 吉建国, 陈波

(安捷伦科技(上海)有限公司, 上海 200131)

摘要:采用高分辨采样二维液相色谱法(HiRes 2D-LC)对金银花中绿原酸和木犀草苷进行准确定量分析。第一维液相色谱采用C18色谱柱,以乙腈和0.4% (v/v)磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱;第二维液相色谱采用SB-Phenyl色谱柱,以乙腈和0.5% (v/v)乙酸水溶液为流动相进行梯度洗脱;二维接口采用五位十通阀,并配置2个多中心切割阀,对绿原酸组分和木犀草苷组分进行多次连续切割。实验结果表明,二维液相色谱分析提高了绿原酸和木犀草苷色谱峰的确认能力,可揭示一维液相色谱分析中共洗脱或隐藏峰的信息;高分辨采样模式实现了一维目标组分的片段式整峰切割,提高了二维液相色谱分析的准确定量能力;通过线性关系、基质加标回收和重复性等考察结果,表明高分辨采样二维液相色谱具有优异的定量准确性和重复性,为中药等复杂基质组分样品的分离和准确定量提供了新方法。

关键词:高分辨采样二维液相色谱;峰纯度确认;定量分析;绿原酸;木犀草苷;金银花;中药

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2019)02-0201-06

Simultaneous determination of chlorogenic acid and cynaroside contents in *Lonicerae Japonica Flos* by high resolution sampling two-dimensional liquid chromatography

WANG Zhicong*, FU Rongjie, JI Jianguo, CHEN Bo

(Agilent Technology (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 200131, China)

Abstract: An innovative analytical method based on high resolution sampling two-dimensional liquid chromatography (HiRes 2D-LC) was established for determination of chlorogenic acid and cynaroside in *Lonicerae Japonica Flos*. A C18 column was used in the first dimension (¹D)-LC separation with acetonitrile and 0.4% (v/v) phosphoric acid aqueous solution as mobile phases. Five heart cuts of chlorogenic acid and four heart cuts of cynaroside were stored in 2D-LC interface, which was a 5-position-10-port valve equipped with two multiple heart-cutting valves. The stored cuts were sequentially separated in the second dimension (²D)-LC. The ²D separation was carried out on an SB-Phenyl column with acetonitrile and 0.5% (v/v) acetic acid aqueous solution as mobile phases. The results showed that chlorogenic acid peaks in the ¹D were well separated, whereas cynaroside peaks in the ¹D were co-eluted with interferences. The above two targets were accurately quantified through a high resolution sampling mode based on continuous slice cuts of the whole target peaks. The method had good linearity, recovery and repeatability. The HiRes 2D-LC system could be used to improve separation and quantification of (un)targets in traditional Chinese medicine samples.

Key words: high resolution sampling two-dimensional liquid chromatography (HiRes 2D-LC); peak purity confirmation; quantitative analysis; chlorogenic acid; cynaroside; *Lonicerae Japonica Flos*; traditional Chinese medicine (TCM)

中药化学成分是中药药效的物质基础,中药化学成分分析是中药药效物质阐明及质量控制的关键。中药化学成分复杂,传统的一维色谱法往往不能提供足够的分辨率和峰容量,色谱峰重叠现象严重,而二维液相色谱法具有分离效果好和峰容量高等特点,已广泛用于复杂基质样品中目标组分或全组分的分析^[1-4]。基于全二维液相色谱法无样品信息丢失、峰容量高的特点,全二维液相色谱法常用于中药化学成分的解析,如指纹谱图分析、中药物质基础表征、活性成分筛选或痕量杂质筛查等^[5,6];基于中心切割二维液相色谱法灵活的切割方式,常用于特定目标组分的分离分析等^[7,8]。传统的中心切割二维液相色谱法采用大体积样品环,收集并储存第一维目标组分,可能会造成第二维色谱柱的严重过载,导致色谱峰变形、展宽等,也会出现切割体积超过样品环体积的情况,造成色谱峰丢失,从而影响准确定量;如果采用捕集柱进行捕集,需要考察捕集柱的捕集能力,溶剂效应可能会影响二维液相色谱的分离,甚至发生切割组分在捕集柱中不保留等情况^[9]。Giddings^[10,11]指出,二维液相色谱法中各组分间的分离效率不应受后续分离的影响,而传统的以大体积样品环或捕集柱为接口的二维液相色谱,即使切割组分在第一维已经取得较小的分离度,由于在大体积样品环或捕集柱接口重新混合,降低了二维系统的整体分离度。

金银花具有清热解毒、疏散分热等功效。《中国药典》(2015 版)一部收录金银花,在“含量测定”项下,对绿原酸和木犀草苷的含量测定分别采用不同的高效液相色谱方法^[12]。金银花化学成分复杂,基质可能干扰目标组分的测定,尤其是共洗脱组分会对目标化合物的定性和定量造成影响;使用二维液相色谱法可以检验色谱峰纯度,揭示一维分离中可能与目标组分共洗脱的隐藏峰^[13,14]。

本文利用高分辨采样二维液相色谱法(HiRes 2D-LC),结合全二维液相色谱法连续切割和中心切割二维液相色谱法多次切割的特点^[15],对金银花样品第一维分析的绿原酸和木犀草苷进行多次高分辨采样,利用多组小体积样品环不间断收集第一维的目标峰,并对第一维的多个目标组分进行“整峰”切割,在第二维实现了目标组分与杂质的分离,为目标峰纯度的确认奠定基础;目标组分在切割、转移过程中也没有损失,基于高分辨采样的定量基础也更为

可信和可靠。相对于全二维液相色谱中样品“全信息”的展示,高分辨采样二维液相色谱法是将第一维分离的部分组分引入第二维,具有较强的针对性,对于中药特定组分的分离确认、准确定量具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

二维液相色谱系统(1290 Infinity II,美国 Agilent 公司),包括高速泵(二元泵,G7120A)、全能泵(四元泵,G7104A)、自动进样器(G7167B)、柱温箱(G7116B)、二极管阵列检测器(G7117B)、阀驱(G1170A)、二维接口阀(G4243A)、多中心切割阀(G4242A)、色谱工作站(OpenLAB CDS ChemStation Edition C01.08)和二维色谱软件(2D-LC Software A.01.04 SR1)等。

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、磷酸(分析纯)和乙酸(分析纯)(德国 Merck 公司);绿原酸和木犀草苷对照品(纯度>98%,上海诗丹德公司);超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备;金银花样品购自当地药店。

1.2 标准溶液的配制

称取适量绿原酸和木犀草苷对照品,分别加入适量 50% (v/v) 甲醇水溶液超声溶解,分别配制成质量浓度为 2.0 g/L 和 1.0 g/L 的绿原酸和木犀草苷标准储备液;取适量绿原酸和木犀草苷标准储备液,加入 50% (v/v) 甲醇水溶液稀释,配制成系列混合标准工作液,绿原酸的质量浓度分别为 1 000、500、250、100、50、25、10 和 5 mg/L,木犀草苷的质量浓度分别为 100、50、25、10、5.0、2.5、1.0 和 0.5 mg/L。

1.3 样品前处理

取金银花样品适量,粉碎,过四号筛;取筛下物约 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入 50 mL 50% (v/v) 甲醇水溶液,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用 50% (v/v) 甲醇水溶液补足减失的重量,摇匀,过滤,精密量取滤液 5 mL,置于 25 mL 棕色量瓶中,加入 50% (v/v) 甲醇水溶液至刻度,摇匀,待测。

1.4 色谱条件

1.4.1 第一维液相色谱

色谱柱:ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm,美国 Agilent 公司);柱温:35 ℃;自动进样器温度:15 ℃;流动相 A:

0.4% (v/v) 磷酸水溶液;流动相 B:乙腈;流速:0.2 mL/min。梯度洗脱程序:0~1.0 min, 8% B; 1.0~5.0 min, 8% B~14% B; 5.0~6.0 min, 14% B~20% B; 6.0~12.0 min, 20% B~24% B; 12.0~13.0 min, 24% B~95% B; 13.0~18.0 min, 95% B; 18.0~18.1 min, 95% B~8% B; 18.1~23.5 min, 8% B。进样量:2 μ L。

1.4.2 第二维液相色谱

色谱柱:ZORBAX RRHD SB-Phenyl 柱(50 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μ m, 美国 Agilent 公司);柱温:35 $^{\circ}$ C;流动相 A: 0.5% (v/v) 乙酸水溶液;流动相 B:乙腈;流速:1.8 mL/min。梯度洗脱:0~1.0 min, 10% B~30% B; 1.0~1.1 min, 30% B~10% B。第二维梯度停止时间(2 D gradient stop time): 1.1 min;第二维循环时间(2 D cycle time): 1.5 min;检测波长:350 nm;数据采集频率:40 Hz。

二维色谱采样模式:高分辨采样。绿原酸:目标峰切割开始时间 6.02 min;采样时间 6 s;切割次数 5 次。木犀草苷:目标峰切割开始时间 10.50 min;采样时间 4 s;切割次数 4 次。

2 结果与讨论

2.1 二维液相色谱仪的接口

二维液相色谱仪的接口可采用二位八通阀或二位十通阀,并配置两支样品环,交替储存、分析第一维切割的组分;二位八通阀的连接流路比较简单,但其中一个样品环的收集和洗脱会出现不同方向的情况;二位十通阀可以保证两个样品环收集和洗脱方向相同,但收集和洗脱的流路长短不一致,上述两种接口均因流路不对称对二维液相色谱方法的建立和优化有较高要求^[16]。Talus 等^[17]采用二位十通阀接口,发现不对称的流路易造成第二维压力变化较大,显著影响二维分析结果及第二维色谱柱的使用寿命。近期发展的二位四通双流路阀可以实现流路的完全对称,减小阀切换时系统压力的变化,进一步简化了二维液相色谱方法的建立和运用。本文采用五位十通阀作为二维接口,如图 1 所示,该阀在实现一维与二维切割组分转移的同时,还可以进行“在线稀释”,即在不增加第三路稀释溶剂(或泵)的情况下,在线使用第二维溶剂对切割组分进行稀释,从

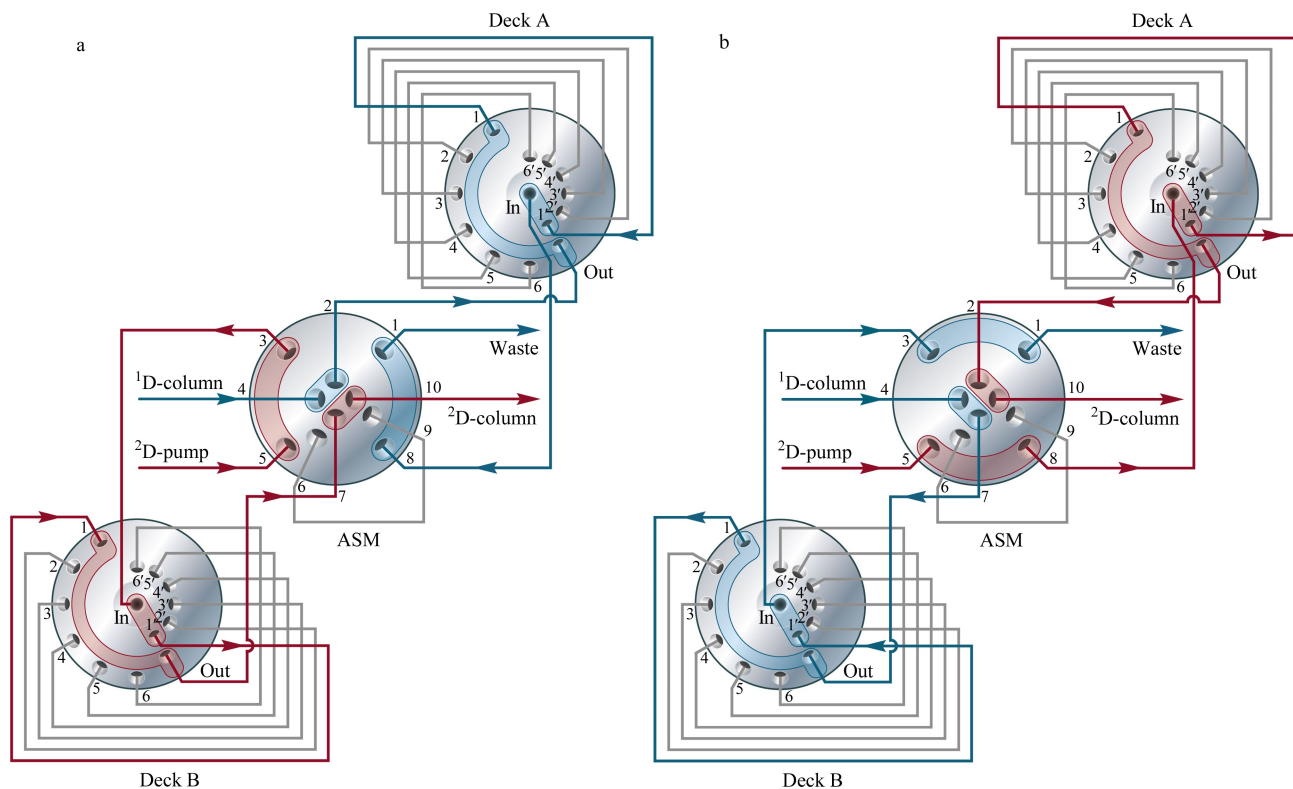


图 1 高分辨采样二维液相色谱仪的接口示意图

Fig. 1 Interface diagram of high resolution sampling two-dimensional liquid chromatography (HiRes 2D-LC)

a. the first dimension (1 D) heat cut through Deck A (multiple heart-cutting valve A capillaries), the second dimension (2 D) separation through Deck B; b. 1 D heat cut through Deck B, 2 D separation through Deck A; ASM: active solvent modulator.

而减小或消除溶剂效应^[18,19];其中“在线稀释”的功能可以打开或关闭,如图 1 所示,ASM 中毛细管 6–9 处于旁路位置,“在线稀释”处于“关闭”状态,此时该阀相当于常规的二位四通双流路阀。

传统的二位八通阀或二位十通阀二维接口配置 2 支样品环,高分辨采样二维液相色谱仪采用具有在线溶剂稀释功能的 ASM 阀作为二维接口,并且将传统的 2 支样品环采用多中心切割阀代替,如图 1 所示,两个多中心切割阀的样品环组件 Deck A 和 Deck B,每个 Deck 可配置 6 支样品环,这样高分辨采样二维液相色谱的接口可扩展至 12 支样品环。如图 1a 所示,第一维目标组分依次储存于 Deck A 的样品环中,然后阀切换至图 1b 所示,第一维目标组分继续依次储存于 Deck B 的样品环中;与此同时,第二维流动相将储存于 Deck B 或 Deck A 样品环中的切割组分依次导入第二维色谱柱进行分析。

2.2 金银花样品的一维液相色谱分析

在《中国药典》方法^[12]的基础上,本文采用 HiRes 2D-LC 对金银花样品中的绿原酸和木犀草苷组分进行峰纯度确认和含量测定。第一维采用 C18 色谱柱,金银花样品的一维液相色谱图见图 2。

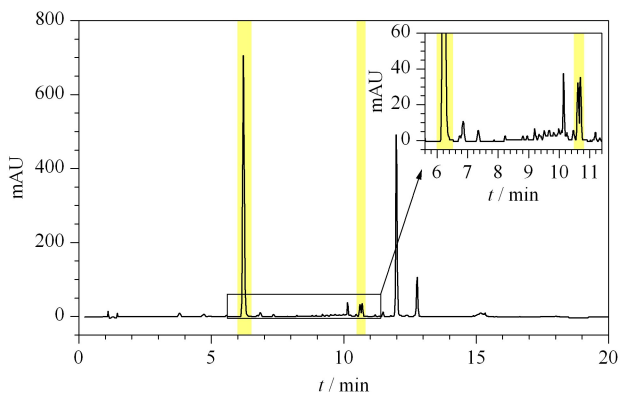


图 2 金银花样品的一维液相色谱图

Fig. 2 ¹D LC chromatograms of *Lonicerae Japonica Flos*
Yellow parts were for ¹D multiple target heart cuts.

2.3 标准品的二维液相色谱分析

按 1.4 节色谱条件,对绿原酸和木犀草苷标准品进行二维液相色谱分析(见图 3),其中图 3a 为绿原酸 5 个切割片段叠加的色谱图,图 3b 为木犀草苷 4 个切割片段叠加的色谱图。

高分辨采样二维液相色谱法可以对第一维的目标组分或多个目标组分进行切割,每个组分可进行一次或多次连续切割;高分辨采样模式是基于时间触发的切割方式,在二维方法设置中,对各组分设置

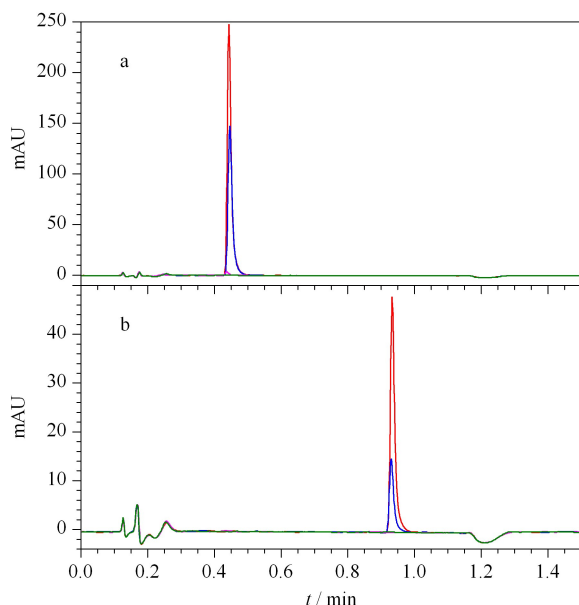


图 3 (a) 绿原酸和(b) 木犀草苷标准品的第二维叠加色谱图
Fig. 3 ²D overlay chromatograms of (a) chlorogenic acid and cynaroside standard samples

切割开始时间、采样持续时间和切割次数等。本文对绿原酸的色谱峰进行 5 次切割,每次切割采样持续时间 6 s,对木犀草苷的峰进行 4 次切割,每次切割采样持续时间 4 s。第一维的流速为 0.2 mL/min,每次切割体积为 20 μ L,多中心切割阀配置的样品环体积为 40 μ L;对绿原酸和木犀草苷来说,切割体积分别约占样品环体积的 50% 和 33%。

2.4 金银花样品的二维液相色谱分析

金银花样品的二维色谱图如图 4 所示,从图 4a 可以看出,绿原酸的 5 个切割组分在第二维色谱中均未检出其他杂峰,说明在第一维分离中,绿原酸与杂质分离良好,无共洗脱峰或隐藏峰;从图 4b 可以看出,通过第二维色谱分离,在木犀草苷的第 2 和第 3 个切割组分中均显示有杂质。高分辨采样二维液相色谱法通过第二维不同分离机理或不同选择性色谱柱的进一步分离,提高了目标峰与杂质的分离度,可用于色谱峰纯度的确认,或检查目标峰是否包含隐藏的共洗脱杂质。

高分辨采样二维液相色谱法使用连续切割的特点,可以控制目标组分的切割窗口,对某一个或多个目标组分实现片段式“整峰”切割,从而为实现目标峰的准确定量提供技术基础。对系列混合标准工作液进行二维液相色谱分析,结果显示,在 5~1 000 mg/L 范围内,绿原酸的线性关系良好,相关系数(r)为 1.000 00;在 0.5~100 mg/L 范围内,木犀草

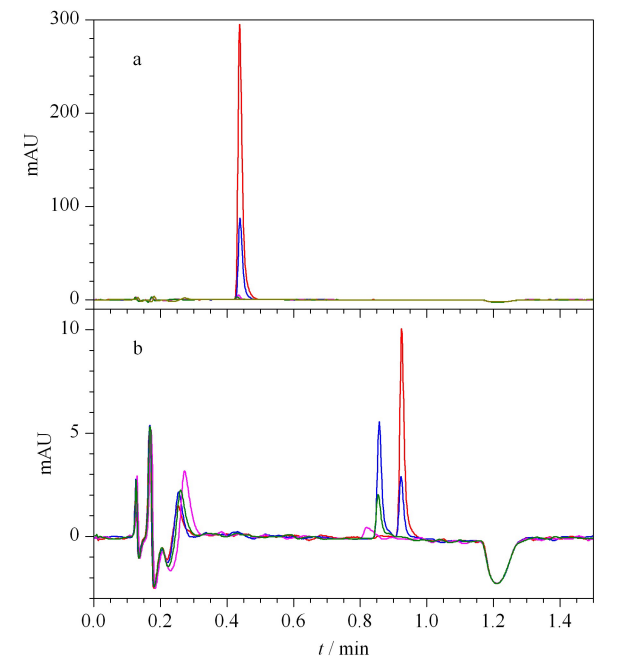


图 4 金银花样品中 (a) 绿原酸和 (b) 木犀草苷的第二维叠加色谱图

Fig. 4 ²D overlay chromatograms of (a) chlorogenic acid and (b) cynaroside in *Lonicerae Japonica Flos*

苷的线性关系良好, r 为 0.999 97。

2.5 加标回收率的考察

进行了两个水平的基质加标回收试验的考察,每个水平平行制备 3 份,分析结果见表 1。在低浓度和高浓度加标水平下,绿原酸和木犀草苷的平均加标回收率为 94.0% ~ 101.6%,相对标准偏差 (RSD) 小于 3.3%,说明高分辨采样二维液相色谱法定量准确。

表 1 绿原酸和木犀草苷的加标回收率和相对标准偏差 ($n=3$)					
Table 1 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of chlorogenic acid and cynaroside ($n=3$)					
Compound	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Chlorogenic acid	246.3	50.0	297.1	101.6	3.3
	166.4	200.0	363.9	98.8	0.7
Cynaroside	6.7	5.0	11.4	94.0	2.5
	4.4	20.0	23.8	97.0	2.6

2.6 重复性考察

按 1.3 节样品前处理方法制备金银花样品提取液,按照 1.4 节二维液相色谱条件进行分析,重复分析 6 次,第二维连续色谱图的叠加图如图 5 所示,绿原酸和木犀草苷保留时间的 RSD 分别为 1.2% 和 0.6%,峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 4.3%,说明高分辨采样二维液相色谱法具有优异的重复性。

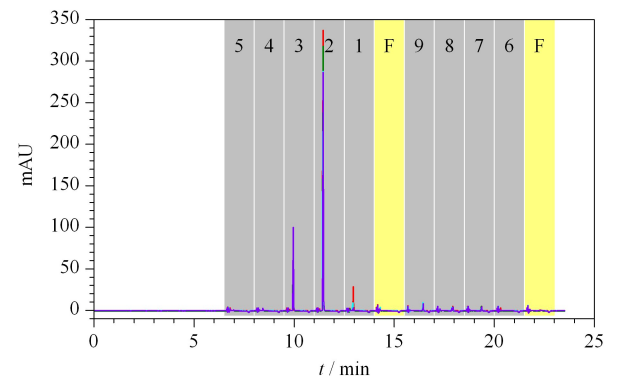


图 5 金银花样品连续 6 次进样的第二维叠加色谱图

Fig. 5 ²D overlay chromatogram of *Lonicerae Japonica Flos* for the six replicates of consecutive

Nos. 1-5; chlorogenic acid cuts; Nos. 6-9; cynaroside cuts; F: loop flush.

2.7 实际样品测定

按 1.3 节样品前处理方法制备金银花样品提取液,按照 1.4 节二维液相色谱条件进行分析,样品测试液中绿原酸和木犀草苷的质量浓度分别为 257.3 mg/L 和 5.9 mg/L,换算为金银花样品中绿原酸和木犀草苷的质量分数分别为 3.2% 和 0.077%,《中国药典》(2015 版)^[12] 中规定绿原酸和木犀草苷的量分别不得少于 1.5% 和 0.050%,测试样品中指标成分满足其要求。

3 结论

本文使用高分辨采样二维液相色谱法对金银花中绿原酸和木犀草苷进行分析。高分辨采样二维液相色谱法可以实现目标组分的峰纯度确认和准确定量分析,该技术可用于中药的质量控制,以及食品、制药、生物、环境等领域复杂基质样品的分析。

参考文献:

[1] Qiao X, Song W, Ji S A, et al. J Chromatogr A, 2014, 1362: 157

[2] Cacciola F, Dugo P, Mondello L. TrAC-Trends Anal Chem, 2017, 96: 116

[3] Cao J L, Wei J C, Chen M W, et al. J Chromatogr A, 2014, 1371: 1

[4] Iguiniz M, Heinisch S. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145: 482

[5] Iguiniz M, Rouvière F, Corbel E, et al. J Chromatogr A, 2018, 1536: 195

[6] Ji S, Wang S, Xu H S, et al. J Pharm Biomed Anal, 2018, 160: 301

[7] Tong C Y, Peng M J, Shi S Y. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(3): 278

- 童超英, 彭密军, 施树云. 色谱, 2018, 36(3): 278
- [8] Petersson P, Haselmann K, Buckenmaier S. J Chromatogr A, 2016, 1468: 95
- [9] Li X P, Carr P W. J Chromatogr A, 2011, 1218: 2214
- [10] Giddings J C. Anal Chem, 1984, 56(12), 1258A
- [11] Giddings J C. J High Res Chrom, 1987, 10(5): 319
- [12] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 221
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221
- [13] Stoll D R, Venkatramani C J, Rutan S C. LC GC N AM, 2018, 36(6): 356
- [14] Pursch M, Buckenmaier S. Anal Chem, 2015, 87(10), 5310
- [15] Venkatramani C J, Huang S R, Al-Sayah M, et al. J Chromatogr A, 2017, 1521: 63
- [16] Gao W, Song H P, Yang H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(1): 121
高雯, 宋慧鹏, 杨华, 等. 色谱, 2017, 35(1): 121
- [17] Talus E S, Witt K E, Stolla D R. J Chromatogr A, 2015, 1378: 50
- [18] Stoll D R, Shoykhet K, Petersson P, et al. Anal Chem, 2017, 89(17): 9260
- [19] Purscha M, Wegener A, Buckenmaierb S. J Chromatogr A, 2018, 1562: 78