

## HPLC-ELSD在中药分析及指纹图谱中的应用

陈俊, 黄玉凤, 王彬 (第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

**摘要** 目的:综述高效液相色谱/蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)在中药成分分析和指纹图谱中的应用。方法:介绍蒸发光散射检测器(ELSD)的构造、特点和工作原理。根据中药化学成分的特点,对没有紫外吸收或最大吸收波长在200nm以下的天然化合物皂苷类、糖类、生物碱类、内酯类、萜类等成分和氨基酸进行分析总结。结果:HPLC-ELSD在中药成分分析中起重要作用。结论:HPLC-ELSD在中药成分分析中应用广泛,是一种非常有用的分析技术。

**关键词** HPLC-ELSD;蒸发光散射检测器;中草药;指纹图谱

**中图分类号**: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-0111(2009)04-0251-04

高效液相色谱仪日益普及,所分析的样品范围也越来越广。高效液相色谱以其灵敏、快捷、可分离大多数液体样品等优点,已经广泛应用于中药的有效成分含量测定、组分分析、指纹图谱等方面,高效液相色谱检测器中除了最常用的紫外检测器之外,还有荧光检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器、质谱检测器、核磁共振检测器等。紫外检测器因其高灵敏度和稳定性,在HPLC中应用最广泛,但它所能检测的物质必须具有吸收紫外光的生色团,而相应的流动相在检测波长下则应当是无紫外吸收的。这一特性一定程度上限制了其能检测的物质范围和一些良好溶剂的使用。荧光检测器只能检测有荧光的物质,应用范围很小。示差折光检测器是一种通用的检测器,它是基于色谱柱流出物光折射率的变化来连续测定样品浓度。但它对工作环境要求很苛刻,要求恒温、恒流速,且无法采用梯度洗脱,检测灵敏度也不够高。质谱检测器和核磁共振检测器因其价格较昂贵,普及有一定困难。蒸发光散射检测器一定程度上弥补了HPLC传统检测器的不足,特别是无紫外或紫外末端吸收的大分子有机化合物的检测,显示出极大的优越性。其响应值不依赖于样品的光学性质,不论它具有何种官能团。对所有样品的检测几乎具有相同的响应因子,对未知物和纯度的测定要比UV检测更容易更准确。随着蒸发光散射检测器技术的不断改进和完善,将在中药分析领域广泛的应用。

### 1 蒸发光散射检测器概况

#### 1.1 蒸发光散射检测器组成及工作原理

蒸发光散射检测器(ELSD)由3部分组成。即雾化器,加热漂移管和光散射池。雾化器与分析柱出口直接相连,柱洗脱液进入雾化器针管,在针管的末端,洗脱液和充入的气体(通常为氮气)混合形成均匀的微小液滴,可通过调节气体和流动相的流速来调节雾化器产生的液滴的大小。漂移管的作用在于使气溶胶中的易挥发组分挥发,流动相中的不挥发成分经过漂移管进入光散射池。在光散射池中,样品颗粒散射光源发出的光被检测器检测产生电信号<sup>[1]</sup>。

**1.2 检测步骤** 雾化:从色谱柱中洗脱出来的组分和惰性气体混合,产生出包含流动相和样品的气溶胶。蒸发:作为气溶胶的流动相在通过加热的漂移管时被蒸发掉。检测:留下来的不挥发性样品颗粒和流动相蒸气通过一个光散射池,暴露在光照之下,用光传感器测定样品的散射光产生电信号,信号与样品的质量成比例关系<sup>[2]</sup>。

**1.3 影响检测的因素** 载气气压、雾化器的设计、流动相的组成和流速都将影响雾化过程。被分析物的浓度和体积质量等决定了进入光散射池的气溶胶中的颗粒的直径。被分析物的折射指数,光源发出的光的强度和波长,光电倍增管的位置等将影响散射光强度。光电倍增管的灵敏度和入射光的强度决定了检测的效率反映为实验者所观测的峰面积<sup>[3-5]</sup>。

### 2 HPLC-ELSD在中药分析中的应用

中药的化学成分复杂,部分成分不存在紫外吸收或仅在紫外末端有吸收。加上色谱分离的困难以及流动相带来的干扰,使用传统的紫外检测器对其进行定性定量分析十分困难。ELSD在某种程度上弥补了这方面的不足,被广泛的应用于皂苷类成分、糖类成分、内酯类成分、部分生物碱类成分、萜类成

分和氨基酸以及其他一些成分的分析,取得了满意的结果<sup>[6]</sup>。

**2.1 皂苷类成分的分析** 皂苷类成分大多没有紫外吸收,或仅在紫外末端有吸收,容易受到试剂的干扰,使用紫外检测法存在一定的不足。应用高效液相色谱-蒸发光散射检测器可以较好的检测皂苷成分。应用比较成功的有浙麦冬、川麦冬中麦冬皂苷D含量测定<sup>[7]</sup>,酸枣仁中酸枣仁皂苷A及B的含量测定<sup>[8]</sup>,柴胡中柴胡皂苷a、d的含量测定<sup>[9]</sup>,黄芪甲苷的含量测定<sup>[10]</sup>,天麻中天麻苷含量测定<sup>[11]</sup>,西洋参中的人参皂苷<sup>[12]</sup>和伪人参皂苷<sup>[13]</sup>含量测定,麦冬中皂苷的含量测定<sup>[14]</sup>。

**2.2 糖类成分的分析** 糖类成分多不存在紫外吸收,以前主要采用分光光度法对这类成分进行定量分析,但只能测定总糖含量,灵敏度和准确度较差。近来有许多采用HPLC-ELSD方法对糖类成分进行分析的报道,可以直接进行单糖的测定,如云芝糖肽中的单糖<sup>[15]</sup>,对四物汤中D果糖、D葡萄糖和蔗糖含量测定<sup>[16]</sup>,取得了良好的结果。高效液相色谱分离-蒸发光散射检测法测定海藻糖,有良好的线性关系<sup>[17,18]</sup>,也可以用于酒和食品中糖成分的分析<sup>[19,20]</sup>。

**2.3 生物碱类成分的分析** 利用HPLC-ELSD很好地测定浙贝母药材中的主要生物碱贝母素甲、贝母素乙,用于浙贝母药材的质量控制<sup>[21~23]</sup>。分别以环己烷-醋酸乙酯-二乙胺(6:4:1)和环己烷-醋酸乙酯-二乙胺(6:4:0.12)为流动相,对不同来源的样品进行含量测定。实现了贝母类药材中6种异甾体生物碱的分离和测定,得到了良好的重现性和准确度。

**2.4 内酯类成分分析** 有的内酯类化合物不能在UV检测器上产生响应,使用ELSD作为检测手段可以取得较好的效果。采用该方法可以同时测定银杏叶中和市售银杏制剂中的银杏内酯A、B、C以及白果内酯进行了定量分析<sup>[24,25]</sup>。对于穿心莲制剂中的穿心莲内酯,采用ELSD作为检测手段能较好地定量分析<sup>[26]</sup>。

**2.5 萜类成分的分析** 中药中萜类化合物以二萜和倍半萜常见,有的以内脂形式存在,其紫外吸收一般都在较低波长范围内,且含有酚性物质干扰测定,在升麻萜类成分分析中,采用反相高效液相色谱法配合蒸发光检测器,取得较好的效果<sup>[27]</sup>。

**2.6 氨基酸的分析** 此类成分的含量测定多采用氨基酸分析仪或采用衍生化法,用氨基酸分析仪测定,样品处理较复杂;柱前、柱后衍生又易产生误差。采用HPLC-ELSD方法可以较好的测定板蓝根中的氨基酸含量。板蓝根一般水煎提取,其水溶性成分中含有

多种氨基酸类成分,赵宇新等对其中含量相对较高的精氨酸采用HPLC-ELSD进行含量测定<sup>[28]</sup>,采用同样方法,王陆黎等对红景天根中氨基酸含量测定<sup>[29]</sup>,方法简便可行,值得进一步推广使用。

### 3 HPLC-ELSD在中药指纹图谱研究中的应用

中药指纹图谱的研究,目前应用比较多的是HPLC-UV/DAD系统。它可以比较全面地反映中药所含内在化学成分的种类和数量,但是,中药是一个复杂作用体系,是各种不同成分综合作用于人体的结果,使用HPLC-UV/DAD系统,并不能使弱紫外吸收成分和无紫外吸收成分在指纹图谱中有所体现。ELSD是通用型检测器,如果选择适当的色谱条件和仪器参数,在确保其稳定性和精密度的前提下,应用于中药指纹图谱的建立,可以全面控制中药中的整体物质群,真实反映中药内在的化学成分,更符合于中药指纹图谱的要求。采用HPLC-ELSD指纹图谱研究比较成功的有清开灵注射液的研究,曹进等运用HPLC-ELSD建立了复方清开灵注射液的指纹图谱,对其中7种有效成分进行了定量测定,方法学考察结果良好;通过指纹图谱相似度评价软件,对10批清开灵注射液的HPLC/ELSD指纹图谱进行了相似度计算,结果表明:10批样品相似度很好。该方法为中药质量控制提供了一种可以同时实现整体定性、指标成分定量且简便易行的方法模式<sup>[30]</sup>。在中药中研究比较多的是知母的研究,采用HPLC-ELSD方法,对知母70%乙醇提取物进行指纹图谱研究,并通过对照品外标法确定知母皂苷B<sup>-</sup>、知母皂苷B<sup>-</sup>、anemarthenasaponin Ia、schidigerasaponin-F2、知母皂苷A<sup>-</sup>的色谱峰,其中前4个单体化合物为首次归属,分析结果能够反映不同来源知母药材的内在质量差异,可为知母药材的质量控制提供有价值的参考<sup>[31]</sup>。

### 4 HPLC-ELSD在中药分析应用中的问题

ELSD作为一种通用型质量检测器,并非适合所有的化合物,同时也是一种破坏性检测器,样品无法回收,对于一些挥发性比较强的成分,可能在较高的温度下会随着流动相挥发成气体状态,不适用于ELSD检测。

**4.1 对ELSD检测性能的研究不够全面** HPLC-ELSD在中药分析和指纹图谱研究中尚处于起步阶段,尤其对ELSD本身的检测性能在中药成分中的分析没有进行系统的研究,也没有得到比较规律性的结论。主要是关于影响ELSD检测各种参数的选择,以及流动相中修饰剂对物质响应值的改变,漂移

管温度对基线的影响,还需要进一步的研究<sup>[32]</sup>。

**4.2 结果重现性不如传统的分光光度法** HPLC-ELSD方法所检测物质的响应值同质量相关,同时检测范围广,优于传统的分光光度法,但是与UV检测相比较,结果的准确度和重现性有待于进一步的提高。主要的原因可能是出在气源的纯度、气体流速控制的精度、流动相配比的准确性以及仪器参数等设置其它问题上。如果使用高纯氮气代替压缩空气,采用更精确的装置控制气体的流速,可能会使实验结果更加令人满意。

**4.3 并不是所有的中药成分都可以用ELSD检测** ELSD虽然是通用型质量检测器,但是对于一些挥发性比较强的成分,可能在较高的温度下会随着流动相挥发成气体状态,不适于用ELSD检测。如果采用加入内标物的方法,如何选择合适的内标物也是应该解决的问题。

**4.4 无法回收破坏性检测样品** ELSD是一种破坏性检测器,对于较贵重的样品无法回收;同时不便配备在制备型HPLC进行样品的纯化制备。

## 5 结语

HPLC-ELSD方法将在各类中药材质量标准制定、中药指纹图谱规范研究以及中药新药质量标准和稳定性等领域蕴藏极大的潜力。应用HPLC-ELSD方法已经对多种常用中药中进行分析,有效的建立或提高了质量控制方法;在《中国药典》已经收载了HPLC-ELSD方法作为质量控制的方法之一。随着HPLC-ELSD仪器的普及和HPLC-ELSD方法在中药研究中的广泛应用,HPLC-ELSD将成为一种有效的中药质量控制方法,将是UV检测器的有力补充。在中药定性鉴别的研究中,ELSD也可以比较全面的反映样品的信息。随着ELSD检测技术和仪器本身的不断完善,相信会在中药成分分析和指纹图谱研究中起到越来越重要的作用。ELSD和UV检测器的在中药定性定量分析中的联合应用,必将给中药质量控制带来革命性的改变,也大大提高我国中药制剂质量标准水平。

## 参考文献:

[1] Stolywo A, Colin H. Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography[J]. *Chromatogr*, 1983, 265.  
 [2] Stolywo A. Stay of the qualitative and quantitative properties of the light scattering detector[J]. *Chromatogr*, 1984, 288: 253.  
 [3] Fang L, Wan M, Pennacchio M, *et al* Evaluation of evaporative light scattering detector for combinatorial library quantitation by reversed phase HPLC[J]. *Comb Chem*, 2000, 2(3): 254.  
 [4] 邓海根,曹雨震. 高效液相色谱仪的通用型质量检测器 蒸发

光散射检测器(ELSD)[J]. *药物分析杂志*, 1994, 14(3): 61.  
 [5] 魏 泱,丁明玉. 蒸发光散射检测技术[J]. *色谱*, 2000, 18(5): 398.  
 [6] 黄永焯,王宁生. HPLC/ELSD在天然药物分析中的应用[J]. *中药新药与临床药理*, 2001, 12(6): 444.  
 [7] 俞建平,马月光,邵建峰,等. ELSD-HPLC法测定浙麦冬、川麦冬中麦冬皂苷D含量的方法研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2002, 13(4): 253.  
 [8] 李会军,李 萍. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定酸枣仁中酸枣仁皂苷A及B的含量[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(2): 82.  
 [9] 陈 妍. HPLC-ELSD法测定柴胡中柴胡皂苷a、d的含量[J]. *天津药学*, 2002, 14(3): 73.  
 [10] 田南卉,杨国红,方 颖,等. 高效液相色谱-蒸发光散射器测定黄芪甲苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(3): 199.  
 [11] 魏 泱,丁明玉,李红霞. 高效液相色谱-蒸发光散射和紫外检测法测定天麻中天麻甙含量[J]. *高等学校化学学报*, 2001, 22(4): 563.  
 [12] 江英桥,王 强,魏 国,等. 高效液相色谱-蒸发激光散射检测器分析西洋参中的人参皂苷[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(1): 41.  
 [13] Wenkui L, John F. Determination of 24(R)-pseudoginsenoside F11 in north american ginseng using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25: 257.  
 [14] 吴 韬,余伯阳,程志红,等. HPLC/ELSD法测定湖北麦冬中主要皂苷的含量[J]. *中草药*, 2000, 31(3): 175.  
 [15] 张 哲,邹巧根,宋 哲,等. 云芝糖肽的单糖组成分析[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(2): 137.  
 [16] 梁乾德,马百平,王升穆. 液相色谱-蒸发光散射测定四物汤煎液中单糖和双糖的含量[J]. *中草药*, 2004, 35(4): 395.  
 [17] 周 坚,杨 波,戴秀玉. 转基因烟草中海藻糖的测定[J]. *微生物学报*, 2001, 41(3): 378.  
 [18] 魏 泱,丁明玉. 高效液相色谱分离-蒸发光散射检测法测定海藻糖的纯度[J]. *分析试验室*, 2001, 20(1): 5.  
 [19] 董海鸥,倪 钟,张津枫,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器分析糖类化合物[J]. *食品科学*, 1999, 20(11): 50.  
 [20] Wei Y, Ding MY. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 904(1): 113.  
 [21] 薛 燕,顾好粮. HPLC-ELSD法测定浙贝母中主要生物碱的含量[J]. *药学报*, 2005, 40(6): 550.  
 [22] 朱丹妮,谭丰萍,高山林. HPLC-ELSD分析测定贝母药材中生物碱成分[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(2): 87.  
 [23] Song LL, Ge L, Shun WC, *et al* Determination of the isoteroidal alkaloids in bulbs of fritillaria by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *Chromatogr A*, 2001, 909: 207.  
 [24] 田南卉,王 劫,历进忠,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定银杏叶提取物中萜内酯的含量[J]. *药物分析杂志*, 1997, 17(4): 282.  
 [25] Wenkui L, John F. HPLC determination of flavonoids and terpenelactones in commercial Ginkgo Biloba products[J]. *Liq Chromatogr Relat Technol*, 2002, 25(16): 2501.

计、溶出度仪、纯水系统等,可满足学生制剂研发、质量标准、药物动力学和药效学实验的要求。军特药中试基地已经通过军队验收,基地配备了各种剂型的中试流水线,可以充分满足药学专业本科生药剂学实践教学的要求。

### 3 药学多学科综合性实验的实施

2008年首先在药学本科 2005级学生中实施了药学综合实验改革。采用三步法实验教学,提供学生乙酰水杨酸片剂制备需要的多种辅料,由学生以组为单位制定制备方案并自主完成,教员仅在讨论和实验操作中给予指导,然后,学生完成了自制片剂的硬度、崩解、溶出和含量测定等实验,明确了制剂质量标准的意义。片剂制备完成后,采用体外模拟实验测定乙酰水杨酸的药物动力学,利用药物吸收、分布和排泄的机理,让学生掌握药动学隔室模型和数据处理方法。制剂在临床研究前还必须要进行制剂的中试放大实验,通过在中试基地的中试生产验证了剂型处方和工艺可行性,同时让学生熟悉了工业生产机器。通过连续的实验程序,药学本科 2005级学生基本完成了新药研发的药学研究流程,这必将有助于他们毕业后尽早完成由学生向药学专业技术人员的转变。

教学组还对药动学实验进行了改革,在药学本科 2006级的药动学实验中采用家兔发热模型,将药理效应数字化,同时得到药物动力学和药物效应学实验结果,并进行了药物动力学-药物效应学的相关性评价。药动-药效模型是对本科学生药动学教学的提高,在实施中发现学生不仅没有畏难情绪,而且对这一挑战表现出极大的兴趣,各组内分工明确、配合协调,尤其是实验报告中的结论和实验总结可以看出他们自己参阅了很多文献,叙述细致、分析严谨。

### 4 改革体会和展望

通过目前开展的药学多学科综合性实验的教学

改革,学生通过以新药研发为思路的程序性实验将药学各个学科之间联系起来,并通过军特药基地的中试实验对药物制剂的工业生产建立了感性认识,在提高学生独立思考问题、解决科研问题的能力上取得了积极效果。同时,多组学生平行实验,不同的自主实验设计和实验操作,在最终的产品质量上产生差异,通过结果比较也更加激发了学生的学习热情。

但是实践中笔者也认识到这个实验改革还需要一些继续改善的方面。首先,建议训练部门在本科第三学年的教学计划中划出相对集中的时间,便于学生进行自主性实验;其次,课程设置安排上,如果能保证药理学、药剂学、药物动力学与生物药剂学的先后顺序,有助于促进药学多学科综合性实验的教学效果。

经过教员的不懈努力以及两届药学本科学生的积极配合,药学多学科综合性实验的结构已经初步建成并初见成效。下一步,课题组还将计划开展中药制剂的多学科综合性实验《山楂总黄酮片剂的研发》,利用药物分析学已有山楂总黄酮的鉴定和分析四步实验,组织实施片剂研发、质量标准、药物动力学和临床前中试实验。

### 参考文献:

- [1] 邹豪,陈琰,鲁莹,等. 药物动力学教学实践中常见问题的探讨. 药学实践杂志, 2008, 26 (3): 226.
- [2] 鲁莹,张翮,樊莉,等. 药剂学课程群全程考核模式探讨. 药学教育, 2008, 24 (2): 33.
- [3] 陈安朝,谭桂山,姚瑶,等. 注重实践教学 培养药学创新人才. 药学教育, 2005, 21 (4): 38.
- [4] 应晓英,袁弘,杜永忠,姚彤炜. 药学多学科综合设计性实验的实践 [J]. 中国高等医学教育, 2007, 12: 75.

收稿日期: 2009-06-03

(上接第 253 页)

- [26] Wenkui L, John F. Determination of andrographolide in commercial andrographis (*andrographis paniculata*) products using HPLC with evaporative light scattering detection [J]. *Liq Chromatogr Relat Technol*, 2002, 25 (9): 1335.
- [27] Liang Kong, Xin Li, Hanfa Zou, et al. Analysis of terpene compounds in *cimicifuga foetida* L. by Reversed-phase high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *Chromatogr A*, 2001, 936: 111.
- [28] 赵字新,李曼玲. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定中药板蓝根中精氨酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10 (1): 8.

- [29] 王陆黎,张甲生,肖国拾,等. 红景天根中氨基酸含量测定 [J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 25 (1): 26.
- [30] 曹进,徐燕,张永知,等. 清开灵注射液 HPLC/ELSD 指纹图谱建立及质量相关性研究 [J]. 分析化学, 2004, 32 (4): 469.
- [31] 可维,马春辉,张如隽,等. 不同来源母药材 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (1): 100.
- [32] 冯埃生,邹汉法,汪海林,等. 影响高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测性能基本因素的考察 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16 (6): 414.

收稿日期: 2008-12-17