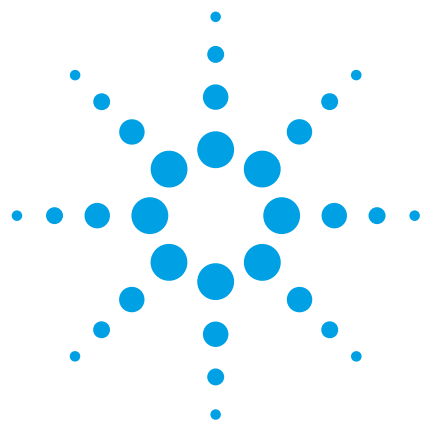




使用 Agilent 1200 系列液相色谱仪和蒸发光散射检测器分析中药柴胡

应用报告

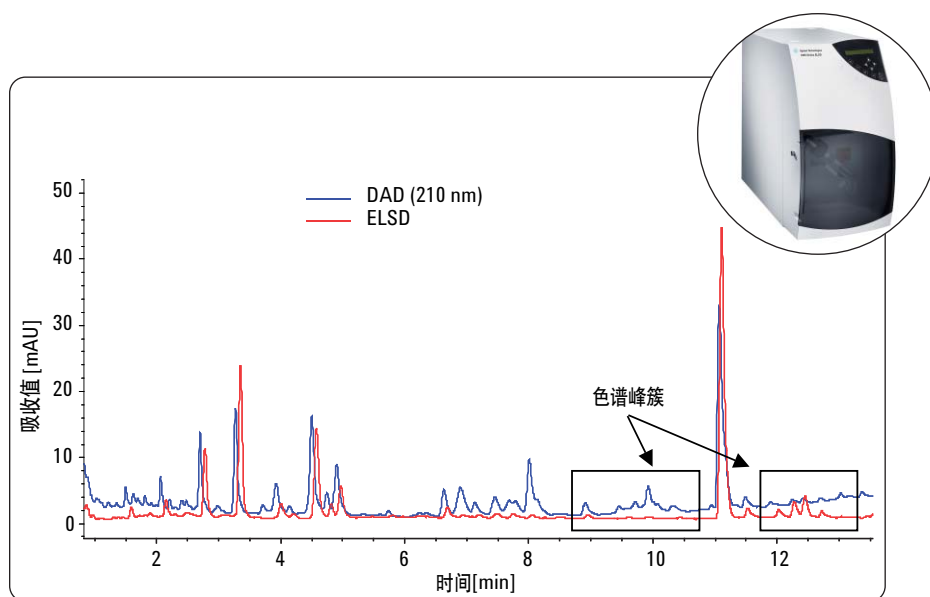
中药

作者

Zhixiu Xu

Agilent Technologies
Shanghai, PR China

Haiqiang Huang, Xi Zhang
School of Pharmacy, Second Military
Medicinal University,
Shanghai, PR China



摘要

本文阐述了用于柴胡分析的传统 HPLC 和高分离度快速液相色谱 (RRLC) 方法的开发。对不同柴胡样品指纹图谱的比较显示了不同产地采集的中药具有不同的色谱峰形。优化了 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器的方法参数,可得到最大的响应值。开发了测定不同中药及其制剂中六种柴胡皂苷含量的定量方法。



Agilent Technologies

前言

柴胡为伞形科植物北柴胡 (*Bupleurum Chinese DC*) 或狭叶柴胡 (*B. scorzonifolium*) 的干燥根, 是最为常用的中药材之一。参照《中国药典》¹, *B. Chinese DC* 和 *B. scorzonifolium* (伞形科) 分别习称为“北柴胡”和“南柴胡”。除了北柴胡与南柴胡, 中国还有其他药材品种以柴胡入药。许多的中成药复方制剂中用到柴胡, 它可以用于治疗感冒发热。

柴胡中含有多种成分, 其中柴胡皂苷被认为与治疗作用关系最大。曾有报道使用 HPLC 以紫外检测器在 210 nm 以下的低波长处对多种柴胡中的柴胡皂苷进行测定。使用甲醇等有机溶剂进行梯度洗脱时, 以如此低的检测波长不可能得到平稳的基线。基线的漂移可能对定量分析产生影响, 因为色谱峰可能无法得到正确的积分。柴胡中的一些柴胡皂苷是多萜类皂苷, 仅在低波长处具有紫外吸收。另一些柴胡皂苷具有二烯结构, 因此较易进行紫外检测。在柴胡的切片或 HPLC 样品制备过程中当处于高温和低 pH 条件时, 多萜类皂苷不稳定, 易转化为二烯结构。

LC/MS 也已用于柴胡的研究, 其检测限更低, 灵敏度更高, 但是仪器设备较为昂

贵, 而且要求操作人员具备质谱知识。目前, 趋向于使用蒸发光散射检测器 (ELSD) 分析柴胡, 在中国的科学期刊上已有多篇论文发表^{2,3}。ELSD 可用于检测所有比溶剂挥发性小的被分析物, 能够保持平稳的基线, 而与溶剂的紫外吸收或梯度条件无关。柴胡皂苷含有 1 个或 2 个双键, 在 ELSD 上的信号没有差别。一些在低波长处有紫外吸收的挥发性组分, 使用 ELSD 时没有响应, 因此在对柴胡皂苷进行定量分析时不会对积分产生干扰。

柴胡的指纹图谱对于鉴定其产地非常重要。柴胡中除了柴胡皂苷以外的其他成分也对治疗作用具有不同的贡献。为获得柴胡的全面信息, 应同时使用 UV 检测器和 ELSD 以检测柴胡皂苷和其他成分的色谱峰。

根据参考文献, 传统 HPLC 方法分离几种柴胡皂苷需要 50 分钟。为加速分析进程, RRLC 越来越引起人们的关注。RRLC 在保持分析性能的同时, 可以缩短运行时间并降低成本。本文中同时应用了两种方法, 对不同的液相色谱系统配置给出参考。对不同样品得到的不同谱图进行了讨论, 同时, 定量分析结果显示不同样品中柴胡皂苷的含量也有差异。

实验部分

标样和试验材料

6''-乙酰基-SSa (3)、3''-乙酰基-SSd (5) 和 6''-乙酰基-SSd (6) 是在实验室中从中药柴胡的根部分离得到。SSa (2) 和 SSd (4) 购自中国药品生物制品检定所 (中国北京)。SSc (1) 购自中药固体制剂国家研究中心 (中国江西)。通过光谱数据 (UV、MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR) 与文献值的比较, 对这些化合物的结构进行解析。研究用原料药材由研究组成员收集而得。

仪器

一台 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统同时用于传统 HPLC 和 RRLC 方法的开发。该系统包含以下模块:

- Agilent 1200 系列 SL 型双泵, 带真空脱气机
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 具备微量流通池 (容量 2 μ L, 光程 3 mm)
- Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器, 带标准喷雾器
- Agilent ChemStation, 软件版本 B.03.02, 用于仪器控制、数据采集和评价

样品制备

取优质干燥粉末状药材 0.5 g，在 8 mL 甲醇（含 2% 吡啶）中超声 30 分钟后，以 3,000 rpm 转速离心 10 分钟。以上操作重复三次，合并上清液，用旋转蒸发仪浓缩。取浓缩液，加甲醇适量，超声使溶解并准确稀释至 10 mL。直接进样前，所有溶剂均以 0.22 μm 尼龙膜过滤。表 1 为不同样品号及对应的样品名称。

名称	样品
北柴胡	3
狭叶柴胡	12
小叶黑柴胡	21
锥叶柴胡	25
丽江柴胡	27

表 1.
样品名称及编号

传统 HPLC 方法

溶剂 A: 水
溶剂 B: 乙腈
流速: 1 mL/min
梯度: 0 min, 30 %B;
5 min, 40 %B;
25 min, 50 %B;
60 min, 100 %B
进样量: 15 μL
色谱柱: ZORBAX SB C18,
4.6 x 250 mm, 粒径 5 μm
柱温: 室温
UV 检测器: 210 nm, 248 nm,
标准流通池
ELSD: 温度: 40 °C
压力: 55 psi
增益: 7
过滤时间: 3s

RRLC 方法

溶剂 A: 水
溶剂 B: 乙腈
流速: 0.8 mL/min
梯度: 30 %B, 1 min;
40 %B, 5 min;
50 %B, 14 min,
100 %B
进样量: 2 μL
色谱柱: ZORBAX SB C18,
3 x 50 mm, 粒径 1.8 μm
柱温: 室温
UV 检测器: 210 nm, 248 nm,
微量流通池
ELSD: 温度: 40 °C
压力: 55 psi
增益: 7
过滤时间: 3s

结果与讨论

研究的第一步是分离柴胡皂苷对照品，同时优化 ELSD 参数，尽管不可能使所有被分析物的响应值达到最高，但可使大部分柴胡皂苷具有最佳灵敏度。ELSD 的温度

和载气压力是需要优化的主要参数。检测器温度设为 40 °C 且压力为 55 psi 时结果最佳。在最终确定的方法中应用这些参数值进行进一步的研究。完整的传统 HPLC 和 RRLC 方法参数详见实验部分。

图 1 是使用传统 HPLC 方法以 ELSD 和 UV 检测器分析六种柴胡皂苷对照品的色谱图。UV 通道检测出更多的色谱峰，但基线有所漂移。样品制备过程中使用的溶剂在 UV 通道中有响应，但是在 ELSD 通道中无信号显示。UV 通道中的其他色谱峰为来自对照品纯化过程的杂质峰。从图中可以看出 ELSD 是分析柴胡皂苷理想的选择，具有较少的基线噪音并且不受杂质干扰。柴胡皂苷相应的色谱峰号和化合物名称见表 2。

色谱峰	化合物
1	柴胡皂苷 c, SSa
2	柴胡皂苷 a, SSa
3	6''-O-乙酰基柴胡皂苷 a, 6''-乙酰基-SSa
4	柴胡皂苷 d, SSd
5	3''-O-乙酰基柴胡皂苷 d, 3''-乙酰基-SSd
6	6''-O-乙酰基柴胡皂苷 d, 6''-乙酰基-SSd

表 2.
柴胡皂苷对照品的名称及对应的色谱峰编号

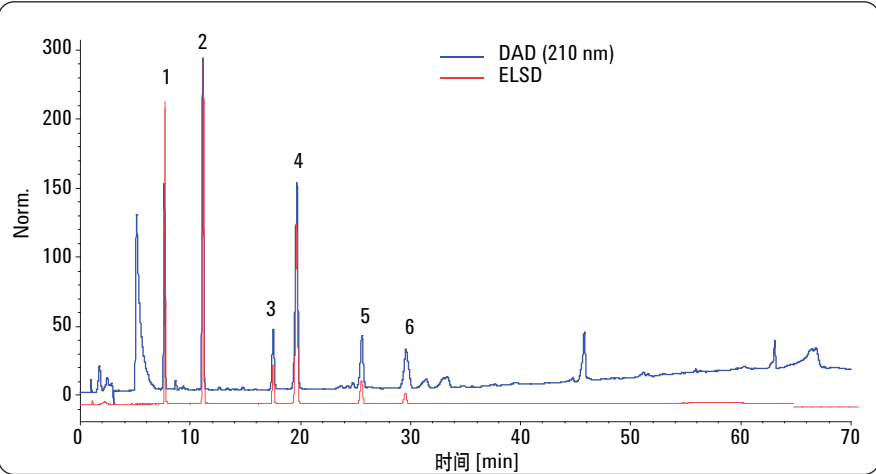


图 1.
使用传统 HPLC 方法以 ELSD 和 UV 检测器分析六种柴胡皂苷对照品的色谱图

图 2 显示了使用 RRLC 方法的分析结果，运行时间由 60 分钟缩短为 6 分钟。色谱图基线平稳，而且色谱峰分离良好。洗脱顺序与传统 HPLC 方法一致，因为两种色谱柱使用了同一种键合类型的填料。

参照《中国药典》，锥叶柴胡（25 号样品）并非典型的柴胡。然而，实际上一些老中医仍然使用这种柴胡。图 3 为 ELSD 和 UV 检测所得色谱图。与典型柴胡相比，25 号样品的 HPLC 谱图中有更多的色谱峰。通过比较 ELSD 和 UV 信号，两类色谱峰能够得到识别。这证明 ELSD 和 UV 检测器因为能够检测不同种类的化合物而具有互补作用。第一类色谱峰中化合物的挥发性比溶剂强，并且含有发色团。第二类色谱峰中化合物的挥发性较溶剂弱，且不含发色团。这些色谱峰的化合物结构仍然未知。将这些结果与药理学研究相结合，能够揭示是否这些色谱峰中的化合物具有治疗作用。

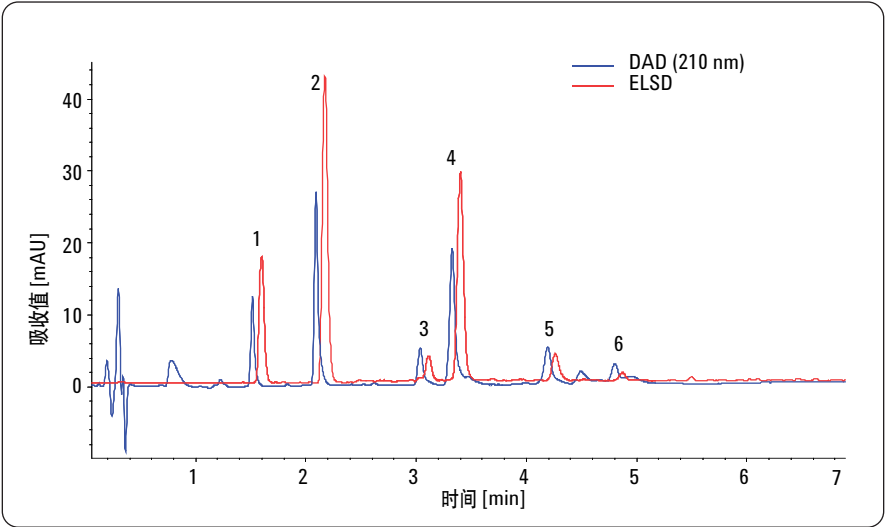


图 2.
六种柴胡皂苷对照品的 RRLC 色谱图，分别使用 ELSD 和 UV 检测器

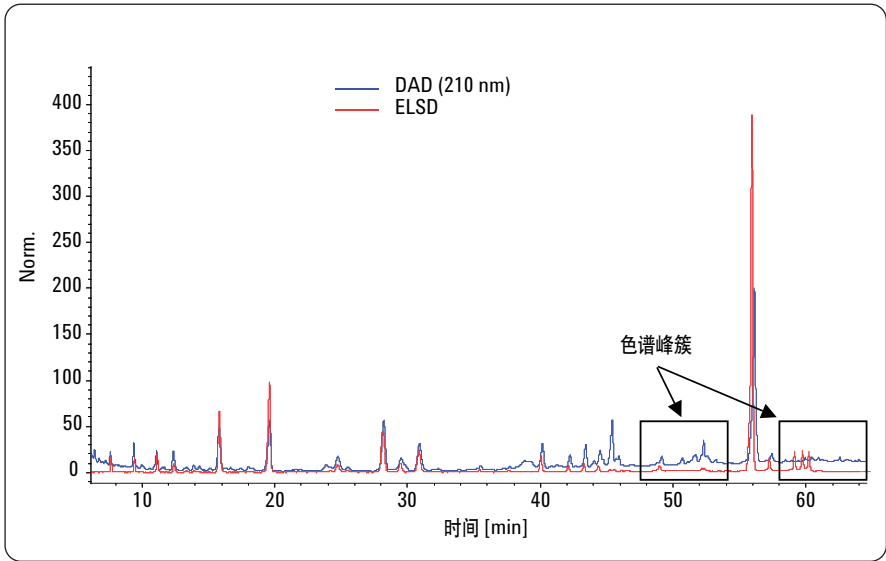


图 3.
锥叶柴胡（25 号样品）的传统 HPLC 色谱图，分别使用 ELSD 和 UV 检测器

图 4 为对一样品使用 RRLC 方法进行分析的结果。运行时间仅需不到 14 分钟，能够使样品通量提高 5 倍。与传统 HPLC 方法相比，由于固定相的化学性质相同，因此保留了相同的洗脱顺序，能够得到相似的谱图。为了缩短分析时间，同时降低成本，在本研究的剩余部分应用 RRLC 方法测得不同中药样品的色谱图。

并非所有成分在使用 ELSD 和 UV 检测时具有相同的信号，因此，在同一色谱系统中配备两种检测器可以更好地监测是否所有被分析物都得到洗脱。这样可以避免一些色谱峰不被检出，确保没有成分残留在色谱柱中。

图 5 显示使用带 ELSD 检测器的 RRLC 分析 4 种中药样品所得色谱图。3 号和 12 号样品分别为《中国药典》所述的北柴胡和南柴胡。两种样品的主要区别体现在谱图的最后部分。不同样品的柴胡皂苷谱图有所不同。仅仅依靠测定柴胡皂苷的含量难以对不同产地的柴胡进行分析。和其他样品相比，21 号和 25 号样品的色谱峰更多，其中一些色谱峰相同。12 号样品 (*B. scorzonrifolium*) 和 27 号样品 (*B. rockii*) 在洗脱的最后部分色谱峰比其他样品少。

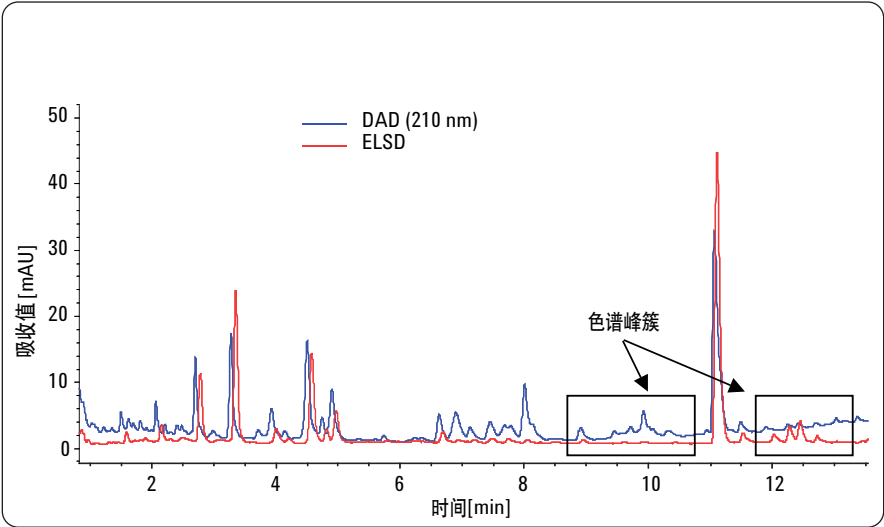


图 4.
ELSD (25 号样品) 的 RRLC 色谱图，分别使用 ELSD 和 UV 检测器

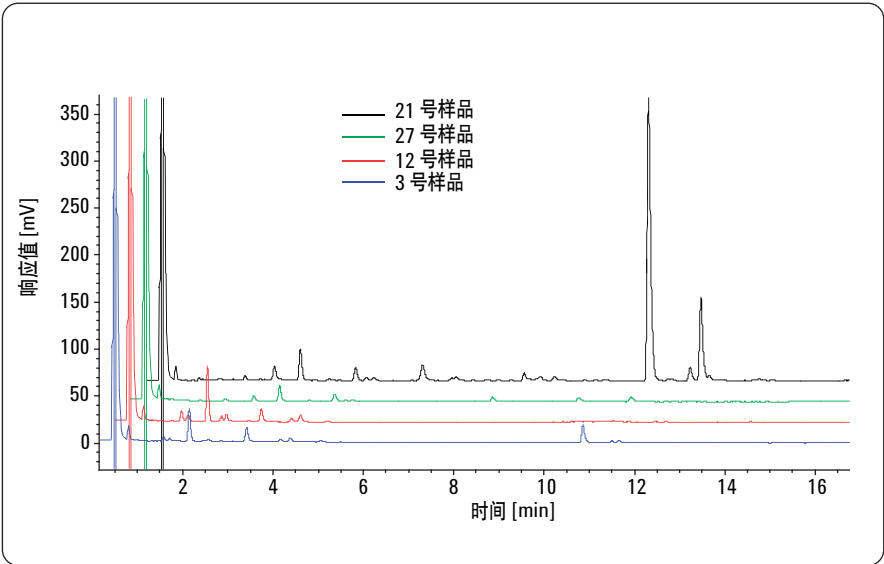


图 5.
使用 RRLC 以 ELSD 分析 4 种中药实样的色谱图

不同的中药谱图有助于对中药材的产地进行初步判断。当前，信息学研究要求更多的样品建立谱图库以进行比较分析。如果能够得到更多样品，还可以继续深入研究。

六种柴胡皂苷的定量分析

为缩短运行时间，使用 RRLC 系统和方法进行定量分析。ELSD 检测通常不成线性，其校正曲线与样品和仪器参数有关。表 3 显示了定量分析结果，其中 y 表示峰面积的对数， x 表示柴胡皂苷对照品浓度 (mg/mL) 的对数。检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 不是正好成三倍的关系，因为检测器响应值与所分析的柴胡皂苷浓度不成线性。样品的挥发性不同，同时喷雾器喷出的粒径不同，意味着在选定的分析条件下，并非所有样品都能得到最大的分析灵敏度。

根据实际中药样品的峰面积所得的不同柴胡皂苷含量见表 4。结果显示不同产地的药材中柴胡皂苷含量不同。SSd 和 SSa 是所有样品中均存在的柴胡皂苷主要形式。几乎所有样品都含有 SSa，但是其含量不如 SSa 和 SSd 高。其他三种柴胡皂苷为 SSa 和 SSd 的分解产物。一些样品不含这类柴胡皂苷分解产物，这使得谱图具有相当大的差异。

化合物(μg/mL)	校正曲线 *	r ²	检测范围 (μg/mL)	LOD (μg/mL)	LOQ
SSc	$y = 1.5642x + 3.2933$	0.9982	30–2000	10	30
SSa	$y = 1.3892x + 3.0992$	0.9967	33.5–3350	8.38	25.16
6''-乙酰基-SSa	$y = 1.8218x + 3.1273$	0.9955	37.5–600	25	37.5
SSd	$y = 1.4256x + 3.0996$	0.9954	29–2900	14.5	29
3''-乙酰基-SSd	$y = 1.3251x + 2.8098$	0.9976	30–2400	18	30
6''-acetyl-SSd	$y = 1.6341x + 3.0564$	0.9988	60–1200	22.5	45

表 3.
对用于六种柴胡皂苷测定的线性回归方程的统计分析
(* 回归方程中 $y = ax + b$, y 为峰面积的对数, x 为柴胡皂苷对照品浓度 (mg/mL) 的对数)

化合物	样品 3 (μg/mL)	样品 12 (μg/mL)	样品 21 (μg/mL)	样品 25 (μg/mL)	样品 27 (μg/mL)
SSc	70	99	50	28	N/A
SSa	110	290	73	43	40
6''-乙酰基-SSa	N/A	80	90	N/A	N/A
SSd	208	187	352	232	205
3''-乙酰基-SSd	106	138	N/A	N/A	N/A
6''-乙酰基-SSd	83	N/A	83	62	64

表 4.
中药实样的定量分析结果
(N/A: 低于检测限)

结论

Agilent 1200 系列 RRLC 系统能够同时运行传统 HPLC 方法和 RRLC 方法以进行柴胡皂苷分析。其中，传统 HPLC 方法需要 70 分钟才能使柴胡中的所有成分得到分离，而 RRLC 方法仅需 15 分钟，因此，能够提高样品通量，降低每次分析的成本。使用 Agilent 1200 系列 ELSD 进行检测，并且通过检测参数的优化，所有柴胡皂苷均获得了良好的响应。结果显示，对于不含发色团的化合物，ELSD 是最佳选择之一，同时对于柴胡皂苷这类含弱发色团的

化合物，ELSD 有更好的信号。如果使用在低波长区有紫外吸收的溶剂，ELSD 能够得到更平稳的基线。

柴胡的 ELSD 和 UV 检测谱图不同，显示了两种检测技术串联使用的必要性，因为单独使用任何一种检测技术均不能检出所有色谱峰。当要求进行中药产地鉴定时，ELSD 能够对指纹图谱有所补充。从中药样品的指纹图谱可以看出，不同的谱图有助于判断中药的产地。本文中所述方法可以进行定量分析，能够应用于质量控制。

参考文献

1.

China Pharmacopeia, China
Pharmacopeia Commission, People's
Medical Publishing House, Version **2005**.

2.

Xiao Rong et. al., Chin. J. Pharm. Anal.,
26(2), 162-167, **2006**.

3.

Zhang Hongna et. al., Chin. J. Pharm.
Anal., 27(8), 1150-1153, **2007**.

4.

Bing-Chung Liao et. al., Journal of
Pharmaceutical Biomedical Analysis,
43, 1174-1178, **2007**.

www.agilent.com/chem/elsd

© 安捷伦科技版权所有，2008 年
2008 年 11 月 1 日印刷
出版号：5889-9834CHCN



Agilent Technologies