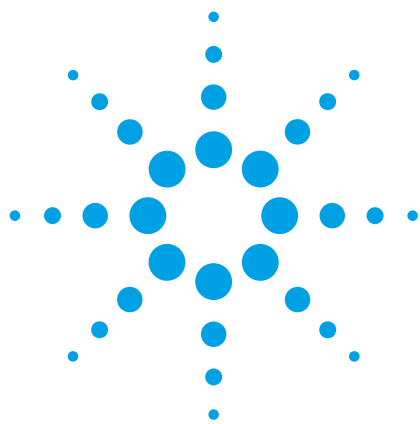




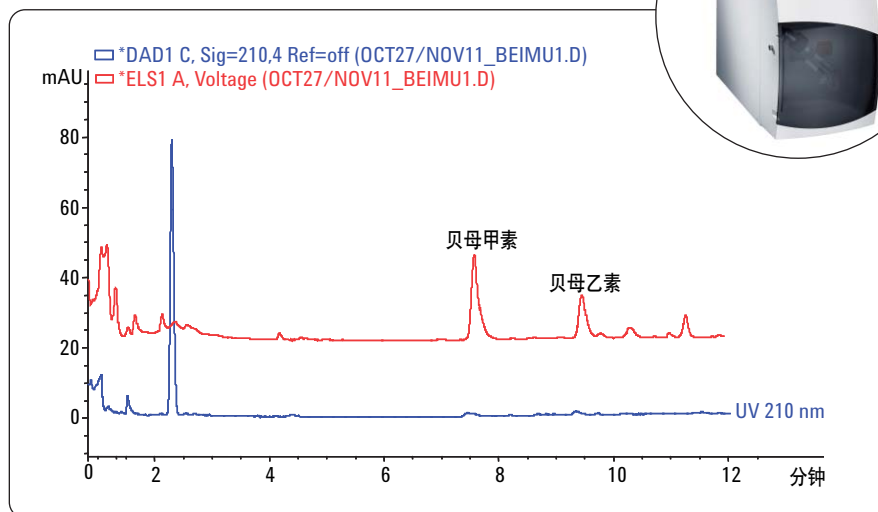
采用 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器分析中药

应用报告

生产 QA/QC

作者

徐智秀
安捷伦科技公司
中国，上海



摘要

本应用报告报导了 5 种中药的 HPLC 分离方法，这些中药是浙贝母、知母、三金片、地肤子和路路通。对 HPLC 方法进行了分离优化，以得到最多的组分。还报导了样品制备方法，以便使读者能够遵循完整的方案。



Agilent Technologies

前言

2005 版中国药典颁布了采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 分析中药的几种重要方法¹。因为这些中药所含的化合物没有生色团或紫外吸收非常弱, 需要用一种像 ELSD 这样的通用检测器对中药中的这些化合物进行定量测定。另一篇应用报告报导了银杏叶和黄芪的 ELSD 分析², 这是药典要求检测的两种中药。浙贝母、知母、三金片、地肤子和路路通是中国药典 2005 版要求用 ELSD 分析特定活性成分的其它中药。

分析方法的起始过程和定量部分已经在前面两篇应用报告中介绍过^{2,3}, 按照药典要求进行定量分析非常简单, 只需要两个数据点, 用这两点的对数得到校正曲线, 即可定量。因此, 在本应用报告中将不再涉及定量分析。本文将介绍分离结果, 以及梯度和仪器参数。

由于中药相当复杂, 二极管阵列检测器 (DAD) 和 ELSD 都不能独立检测出所有成分。在本研究中, 将 DAD 和 ELSD 串联, 以最大限度地获得样品信息, 并监测系统洗脱的所有色谱峰。使最大数量的色谱峰得到良好分离, 还有助于用指纹图谱对其未知组分进行分析。

分离采用的是 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统。在这个系统上, 可以针对中药样品的不同分析需求, 轻松

地选择使用亚 2 微米 RRLC 色谱柱或常规 HPLC 柱。如果使用窄内径色谱柱, 因为峰宽变窄, 需要 RRLC 喷雾器 (安捷伦部件号 G4218-20004)。本应用报告中报导的实例, 兼顾了分离和样品通量两个因素。针对需要加快分离速度或提高峰容量的不同需要, 也可以使用同样填料但内径和长度不同的其它色谱柱。

实验

标准品和材料

路路通酸、地肤子皂苷 Ic、羟基积雪草苷、知母皂甙元、贝母甲素和贝母乙素均购于国家药品和生物制品检定所 (中国北京)。中药样品购自上海的中药店。

仪器

使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统进行常规和 RRLC 方法开发。该系统包含以下组件:

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵, 配置真空脱气机
- 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, 配置微量流通池 (2 μ L 体积, 3 mm 光程)
- Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器, 配置标准喷雾器
- 安捷伦化学工作站 B.03.02, 用于数据采集和处理

样品制备

路路通: 精确称取 0.6 g 粉末置于样品瓶中, 加入 20 mL 脱水乙醇, 称量混合物, 并超声 15 分钟。冷却后, 再精确称量。加脱水乙醇补充损失的溶剂, 充分混合并过滤。精确量取 10 mL 滤液, 蒸发至干燥。用脱水乙醇溶解残渣, 定容至 2 mL。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

地肤子:

精确称取 0.5 g 粉末置于样品瓶中, 准确加入 10 mL 甲醇。精确称量混合物, 放置过夜, 并超声 30 分钟, 冷却后再称量。加甲醇补充损失的溶剂至最初重量, 充分混合。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

三金片:

取 2 片研磨, 去除糖衣, 研至细粉。精确称取 0.5 g 粉末置于样品瓶中, 准确加入 10 mL 甲醇。溶液超声 30 分钟, 冷却, 充分混合并过滤。然后准确量取 5 mL 溶液, 该溶液用氨水定量冲洗 2 次 (每次 0.5 mL)。蒸干提取物, 用甲醇溶解残渣, 充分混合, 配制成分析溶液。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

知母:

精确称取样品粉末 0.5 g 置具塞样品瓶中, 准确加入 10 mL 乙醇, 称重, 并浸泡过夜。样品超声处理 40 分钟, 冷却, 再称重。用乙醇补充减失重量, 并充分混合。然后, 加入 10 mL 水和 1 mL 盐酸, 回流加热

2 小时。样品冷却后，边振摇边滴加 40% 氢氧化钠溶液，至溶液颜色由橘黄色骤变为橘红色。样品用氯仿萃取 2 次（每次 5 mL）。合并提取液，蒸发至干燥。用甲醇溶解残渣，并用甲醇稀释至最终体积 5 mL，充分混合。溶液用 0.22 µm 尼龙滤膜过滤后，直接进样。

浙贝母：
精确称取样品粉末 2 g 置具塞样品瓶中，加入 4 mL 浓氨水，浸泡 1 小时。准确加入 20 mL 氯仿和甲醇混合物 (4:1)。样品称重，在 80 °C 水浴上回流加热 2 小时。样品冷却后，再称重，用上述混合物补充减失的溶剂。过滤样品，准确量取 5 mL 滤液，在蒸发皿中蒸发至干燥。用甲醇溶解残渣，转移到样品瓶中，用甲醇稀释至最终体积 10 mL，充分混合。溶液用 0.22 µm 尼龙滤膜过滤后，直接进样。

方法

路路通：

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 150 mm, 1.8 µm
溶剂： A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速： 0.8 mL/min
梯度： 0 分钟, 80 %B; 10 分钟, 85 %B; 30 分钟, 100 %B
UV 检测器： 210 nm, 254 nm
ELSD 温度： 40 °C

ELSD 压力： 50 psi
ELSD 增益： 9
ELSD 过滤器： 3 s

地肤子：

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 100 mm, 3.5 µm
溶剂： A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇, 等梯度, 90 %B
流速： 0.8 mL/min
UV 检测器： 210 nm, 254 nm
ELSD 温度： 40 °C
ELSD 压力： 50 psi
ELSD 增益： 9
ELSD 过滤器： 3 s

三金片：

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 100 mm, 3.5 µm
溶剂： A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速： 0.6 mL/min
梯度： 0 分钟, 45 %B; 10 分钟, 55 %B; 20 分钟, 100 %B
UV 检测器： 210 nm, 254 nm
ELSD 温度： 40 °C
ELSD 压力： 50 psi
ELSD 增益： 9
ELSD 过滤器： 3 s

知母：

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse C18, 3 x 50 mm, 1.8 µm
溶剂： A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速： 0.6 mL/min
梯度： 0 分钟, 45 %B; 5 分钟, 45 %B; 10 分钟, 80 %B; 15 分钟, 100%B
UV 检测器： 210 nm, 254 nm
ELSD 温度： 45 °C
ELSD 压力： 50 psi
ELSD 增益： 9
ELSD 过滤器： 3 s

浙贝母：

色谱柱： Agilent ZORBAX Eclipse C18, 3 x 50 mm, 1.8 µm
溶剂： A = 水 (0.03 % 氨水, pH 9), B = 乙腈
流速： 0.6 mL/min
梯度： 0 分钟, 45 %B; 5 分钟, 45 %B; 10 分钟, 70 %B
UV 检测器： 210 nm, 254 nm
ELSD 温度： 45 °C
ELSD 压力： 50 psi
ELSD 增益： 9
ELSD 过滤器： 3 s

结果和讨论

路路通

图 1 显示了 Fructus Liquidambaris (中文名, 路路通) UV-254 nm 通道和 ELSD 通道的色谱图。图 1 标出了路路通酸。比较两个通道的结果, 可以看出其中的区别。路路通酸在 UV-254 通道中没有响应, 而对 ELSD 有良好响应。分析之初洗脱出的其它组分在 ELSD 上没有响应, 但 254 nm 紫外检测有响应。这里没有显示 210 nm 通道的图谱, 因为只有几个色谱峰, 而且吸收值很低。

有 2 对色谱峰, 分别标记为 1 和 2。我们对这 2 对色谱峰的分离进行了优化, 因为它们对 ELSD 比 UV210 nm 的响应更强, 将来有可能成为要用 ELSD 进行定量分析的潜在化合物, 尽管我们还不知道它们的确切结构。

地肤子

图 2 显示了用 ELSD 和 UV-210 nm 两个通道对地肤子分离组分的检测结果。图中标示为地肤子皂苷 Ic, 其在 210 nm 有非常弱的紫外吸收。用 ELSD 比 UV 检测器检测到了更多的色谱峰, 说明地肤子中的某些组分没有声色团, 需要两个检测器串接, 在一次分析中得到两个通道的信息。一些较早洗脱的组分没有声色团, 只在 ELSD 通道中有响应。

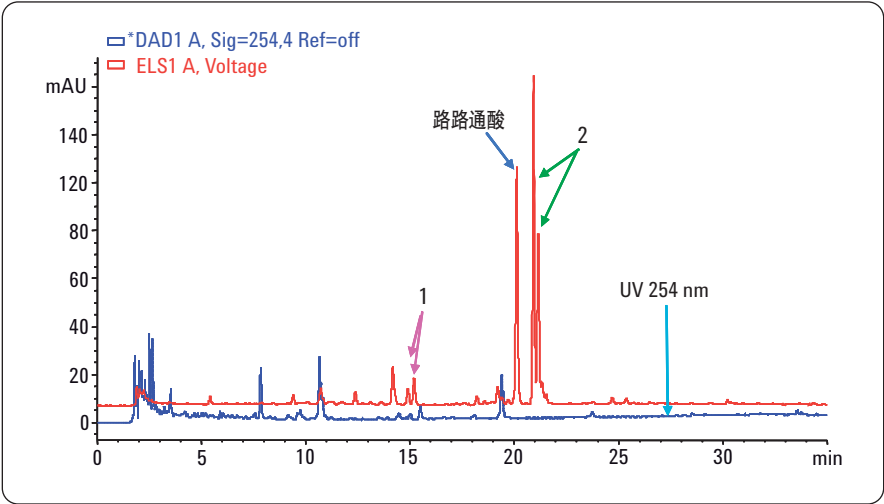


图 1
路路通的 ELSD 检测 (红色) 色谱图和 UV 通道 (蓝色) 色谱图的叠加

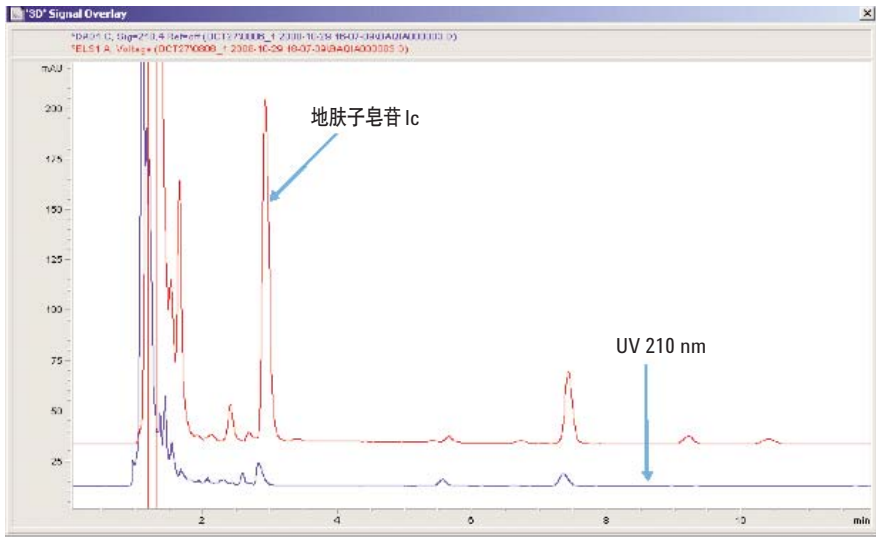


图 2
地肤子 ELSD 通道 (红色) 和 UV 210 nm 通道 (蓝色) 的色谱图

三金片

图 3 显示了三金片 ELSD 和 UV-210 nm 通道分析的色谱图。标出了其活性成分，羟基积雪草苷。210 nm 的紫外吸收信号显示色谱峰比 ELSD 通道少，因为注入色谱柱的大多数组分都没有声色团。另外，210 nm 的 UV 信号基线不平坦，因为用于分离的溶剂的吸收在梯度变化过程中有所改变。如果没有 ELSD，将不会得到三金片色谱峰的更多信息，也无法达到质量控制指纹图谱。

知母

ELSD 通道的色谱图显示，从中药店购得的知母质量不太好，因为知母皂甙元的峰很小。知母皂甙元在 210 nm 紫外检测波长下没有响应。对于知母的其他组分，ELSD 通道检测到的比紫外 210 nm 通道的色谱峰更多，而且两张色谱图有差异。要得到知母中有声色团和没有声色团组分的更多信息，需要使用这两种互补的检测器。

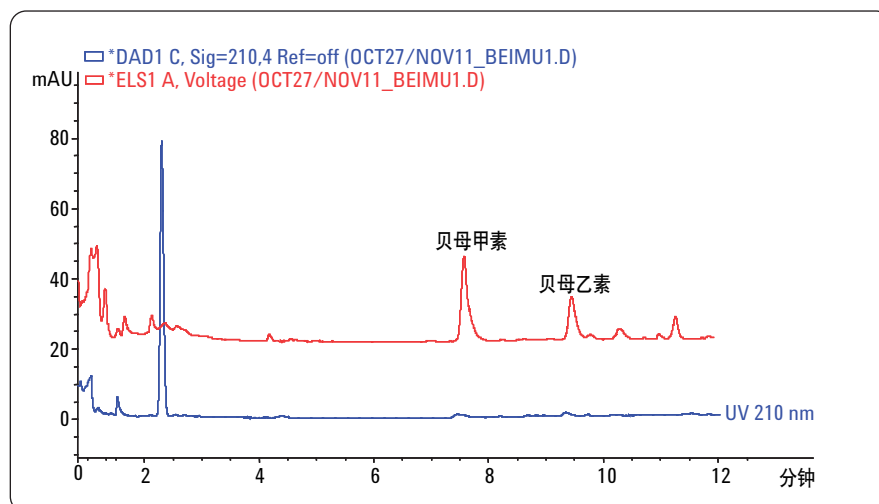


图 3
三金片 ELSD 通道（红色）和 UV 210 nm 通道（蓝色）的色谱图

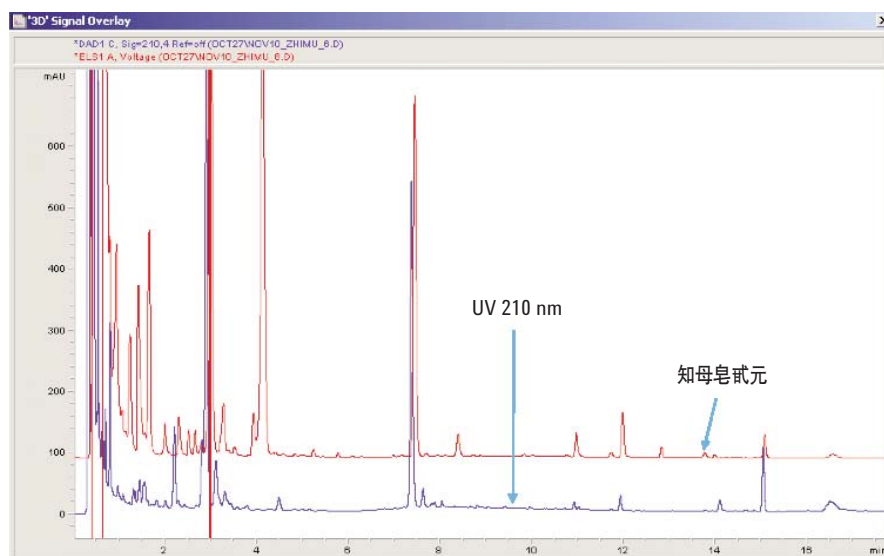


图 4
知母 ELSD 通道（红色）和 UV 210 nm 通道（蓝色）的色谱图

浙贝母

贝母甲素和贝母乙素是浙贝母中两种最重要的成分。210 nm 紫外检测只有很少的几个色谱峰。ELSD 检测结果显示，两种活性组分得到了良好分离，用亚 2 微米色谱柱在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上，只用 12 分钟即可完成分离。用现在的方法，这两种组分可以完全分离。如果峰容量不是问题，可以用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统加快分析速度，得到更高的样品通量。

结论

在本应用报告和以前的应用报告 2 中，我们建立了中国药典 2005 版要求用 ELSD 检测中药的分析方法。探讨了各种样品的制备方法和仪器参数。

ELSD 是分析不含发色团化合物的最佳选择。当化合物在紫外区没有良好紫外吸收的官能团时，ELSD 可以提供更好的信号。当流动相采用有 UV 吸收的溶剂时，ELSD 还可以保持基线平稳。

将 UV 和 ELSD 串接进行检测非常必要，可以获得两个通道的信号，因为任何一种检测器单独使用都不能检测到所有的色谱峰。本应用报告所报导的方法可以用于质量控制部门，因为这里提供了详细信息。

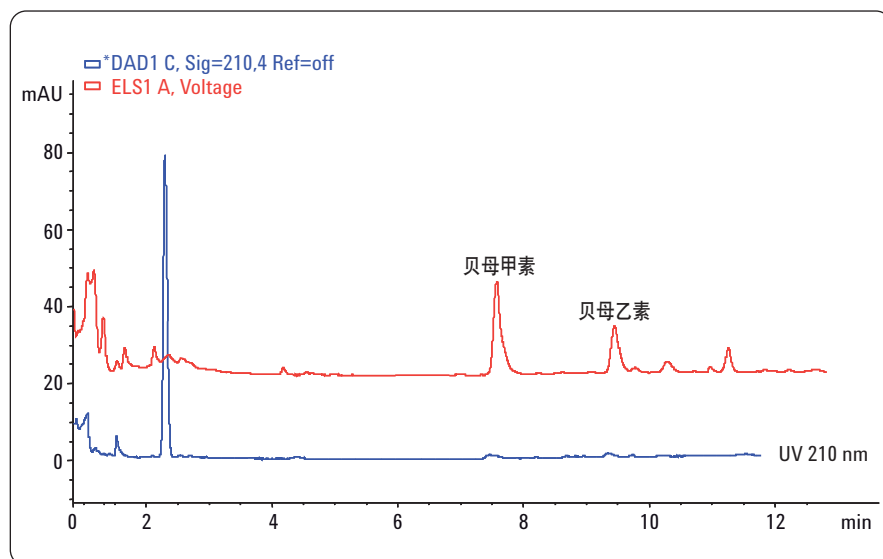


图 5
浙贝母 ELSD 通道（红色）和 UV 210 nm 通道（蓝色）的色谱图

参考文献

1.

Pharmacopoeia of the People's Republic of China, volume 1, China Pharmacopoeia Commission, *People's Medical Publishing House*, **2005**.

2.

Z. Xu, "Analysis of traditional Chinese medicines with the Agilent 1200 Series evaporative light scattering detector," *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-8922EN, **2008**.

3.

Z. Xu, H. Huang, X. Zhang, "Analysis of Radix Bupleuri (Chaihu) using Agilent 1200 Series LC Systems with Evaporative Light Scattering Detector," *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-9834EN, **2008**.

www.agilent.com/chem/elstd

© 安捷伦科技公司, 2009
2009 年 1 月 1 日印刷
出版号 5990-3412CHCN



Agilent Technologies