

文章编号:1006-6144(2008)06-0677-04

六味地黄丸的串联双检测器高效液相色谱分析

成洪达^{1,2}, 唐 涛², 李 彤², 张维冰^{*3}

(1. 山东万杰医学高等专科学校, 山东淄博 255213; 2. 大连依利特分析仪器公司, 辽宁大连 116023; 3. 华东理工大学, 上海 200237)

摘 要:采用紫外检测器与蒸发光散射检测器串联的方式构建了高效液相色谱分析系统,并用于对六味地黄丸的分析研究。紫外检测器共检测到 26 个色谱峰;蒸发光散射检测器检测到 31 个色谱峰,其中 15 个色谱峰为可以认证的共有峰。所构建的系统适宜于中草药的指纹图谱研究。

关键词:高效液相色谱;紫外检测器;蒸发光散射检测器;六味地黄丸

中图分类号:O657.7⁺2 **文献标识码:**A

近年来,中药指纹图谱的研究逐渐成为分析科学领域的研究热点之一^[1]。凭借实用的指纹图谱既可确认中药材或中药制剂的真伪,又能判断其质量的稳定与否。中药“六味地黄丸”由六种单味药材炮制而成,其化学成分复杂,包括苷类、糖类、氨基酸、有机酸等多种结构和类型的组分。王喜军等^[2]采用紫外检测器对六味地黄丸进行了指纹图谱研究,在 130 min 内,共检测到 10 个峰。丁晴等^[3]对六味地黄丸中主要成分熊果酸和齐墩果酸进行检测,发现由于两者紫外吸收较弱,在最大吸收波长处,流动相干扰较大,基线不稳。鄢立新^[4]曾用蒸发光检测器对六味地黄丸单味药材山茱萸中的熊果酸含量进行测定,结果显示,相对药典中采用的薄层色谱法,采用蒸发光检测器的方法稳定性更高,重现性更好。对于六味地黄丸等复杂样品,采用单一检测方式往往不能对其组成进行全面分析。发展新的高效液相色谱指纹谱图研究方法,对于产品的质量控制、中药现代化研究具有非常重要的意义。

紫外检测器是高效液相色谱常用的检测器,灵敏度较高,但是检测依赖于物质的结构,对于紫外没有吸收或者吸收较弱的物质,检测效果不佳。蒸发光散射检测器是一类质量型通用检测器,虽然其灵敏度不如紫外检测器,但是它的检测不依赖于物质的结构,只要物质的沸点高于流动相的沸点,就可以使用^[5]。本文将紫外检测器与蒸发光散射检测器相串联,将紫外检测器的高灵敏性与蒸发光散射检测器的通用性结合起来,构建成双检测器高效液相色谱系统,并用于对六味地黄丸进行全面的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P230 型高压梯度液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司),包括 P230 高压恒流泵、DAD230⁺ 二极管阵列检测器、UV230⁺ 紫外-可见检测器、ZW 型色谱柱温箱、EC2000 色谱数据处理工作站、DG230-4 在线脱气机等;SEDEX55 型蒸发光散射检测器(法国,SEDERE 公司),7725i 手动进样阀(Rheodyne 公司);Model C3860A 超声仪(CBL Photo-electron Technology Co. Lid.)。

甲醇(色谱纯,Tedia);实验用水由 Millipore 纯水系统(美国,Millipore 公司)制备。

六味地黄丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂。

收稿日期:2008-01-08 修回日期:2008-03-10

基金项目:国家自然科学基金(No. 20675083)

*通讯联系人:张维冰,男,博士,教授,主要从事色谱理论与实践研究。

1.2 系统构建

蒸发光散射检测器是破坏性的检测器,流动相一部分被排空,只有部分被收集,无法复原,因此,在两个检测器串联时,紫外检测器在前,蒸发光散射检测器在后,流程图如图 1 所示。两台检测器串联,流动相流程较长,为减少柱外效应,在构建系统时尽量缩短了连接管路的长度,且在检测器之间采用无死体积三通连接。

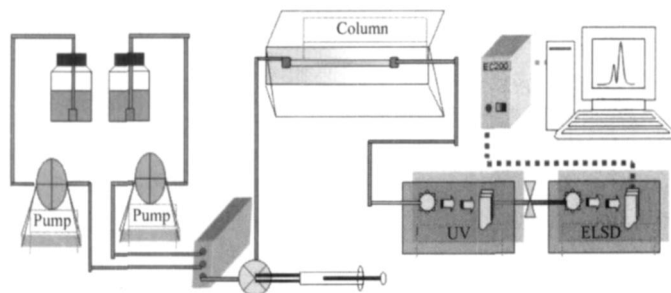


图 1 双检测器液相色谱系统流程图

Fig. 1 The flow chart of HPLC with series double-detector

构建的系统采用硝酸钠标记系统死时间,流动相甲醇/水(85/15, V/V),流速 1 mL/min。经测试紫外检测器系统死时间为 2.49 min,蒸发光散射检测器系统死时间为 2.94 min。

1.3 色谱条件

Kromasil C18 色谱柱(250 × 4.6 mm i. d., 5 μm);依利特佳杰保护柱(10 × 4.6 mm i. d., 5 μm);柱温 30 °C;流动相 A:水;流动相 B:甲醇;梯度程序如表 1 中所列;流速 1 mL/min;ELSD 漂移管温度 60 °C;气体压力 0.2 MPa。

采用 DAD230⁺ 二极管阵列检测器,获得样品在 199 ~ 618 nm 范围内的所有信息。综合考虑样品组分在各波长下的吸收及系统出峰数、分辨率,选择 240 nm 作为紫外检测波长。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient programs of mobile phase

Mobile phase	Time (min)			
	0	33	65	100
A (%)	90	22	0	0
B (%)	10	78	100	100

1.4 样品预处理

取六味地黄丸丸剂 5 g,加硅藻土研磨成粉。将粉末加入 100 mL 乙醚中,索氏提取 2 h。减压回流,将所得物质转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,供色谱检测。

2 结果与讨论

串联双检测器检测得到的整体谱图如图 2 所示。可以看出,紫外检测器的灵敏度更高,色谱峰主要集中于前 40 min;蒸发光散射检测器灵敏度低于紫外检测器。如果以 3 倍噪声作为峰检出指标,在紫外光谱图上可以检测到的峰数为 125 个;在蒸发光散射检测器谱图上可以检测的峰数为 120 个。

蒸发光散射检测器谱图中,色谱峰主要集中于三个区域:0 ~ 40 min,40 ~ 70 min,70 ~ 100 min,以下将对这三个区域进行一一解析。

2.1 0 ~ 40 min 的局部分离效果

图 3 为 0 ~ 40 min 的局部分离效果。按峰高门槛为 1 mV 计,图中标记出了检测到的色谱峰序号。根据保留时间推断,UV 谱图中 3、4、5、7、8、10、11、12、13、14、15、16、18、19 分别对应于 ELSD 谱图中峰 1、2、3、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16,UV 谱图中 1 号峰所处位置在 ELSD 中为一高峰,推断为无紫外吸收的无保留混合物所形成的峰,2 号峰、6 号峰、9 号峰和 17 号峰可能含量太低,ELSD 没有检测到或者是

信号太低。ELSD 谱图中 4 号峰和 7 号峰紫外吸收较弱,在紫外检测器上不明显。

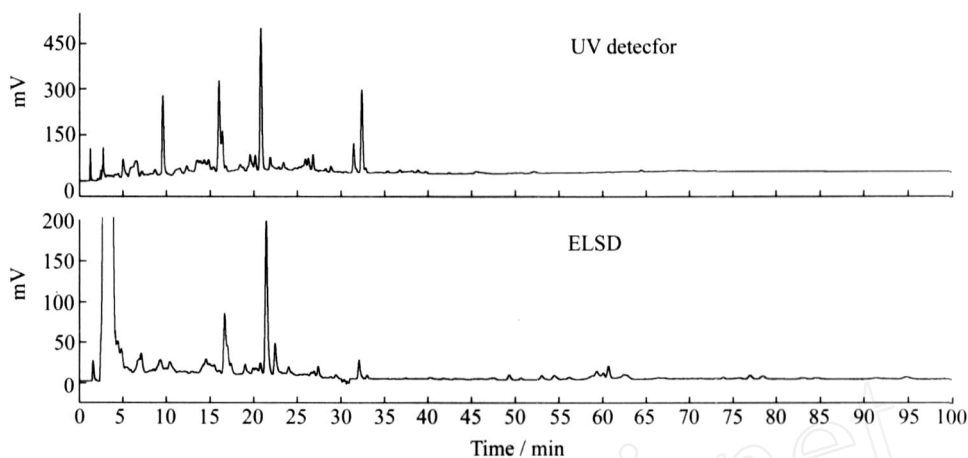


图 2 双检测器测试六味地黄丸谱图
Fig. 2 Chromatograms of Liuwei Dihuang Pills by double-detector

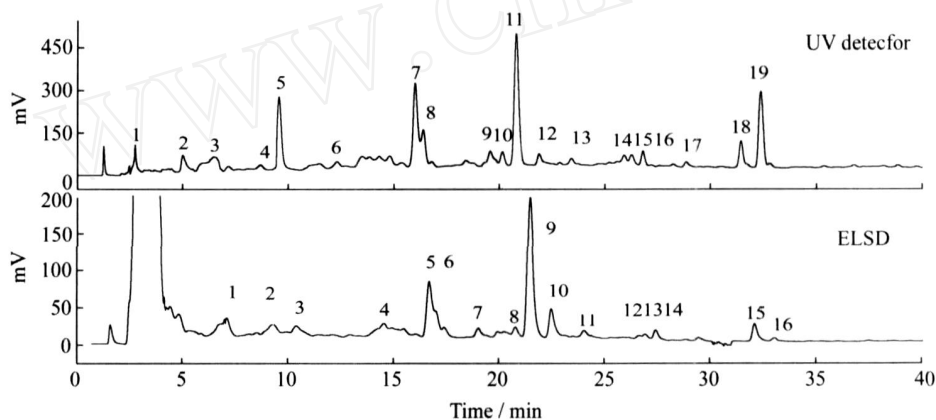


图 3 0~40 min 局部分离谱图
Fig. 3 Partial chromatograms between 0 ~ 40 min

2.2 40~100 min 的局部分离效果

图 4 为分析时间 40~70 min 的局部分离效果。在这个区域内,ELSD 检测到的峰较多,有 8 个峰,而 UV 只检测有 4 个峰。对照保留时间,UV 中的 22 号峰与 ELSD 的 19 号峰为同一峰,UV 中的 20、21、23 号峰和 ELSD 中 16、17、19、20、21、22、23 号峰分别为各自检测到的峰。

图 5 为 70-100 min 的局部分离色谱图。这个区域 UV 检测与 ELSD 检测没有相同的峰。ELSD 检测到的峰为 25~31 号,UV 检测到的峰为 24~26 号。

对六味地黄丸进行了紫外检测器和蒸发光检测器的串联检测,相比单独使用一种检测器,串联的分析

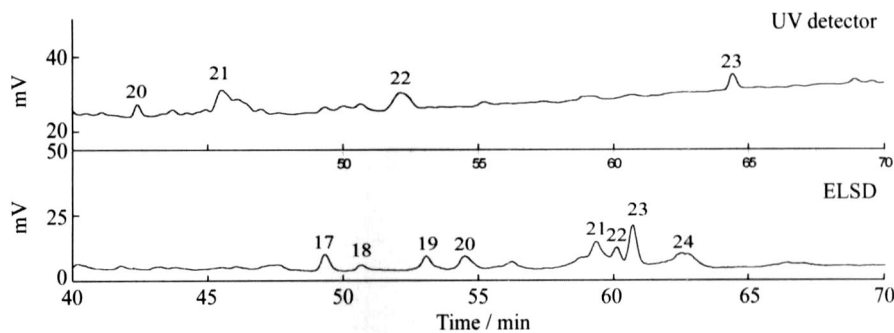


图 4 40~70 min 局部分离谱图
Fig. 4 Partial chromatograms between 40 ~ 70 min

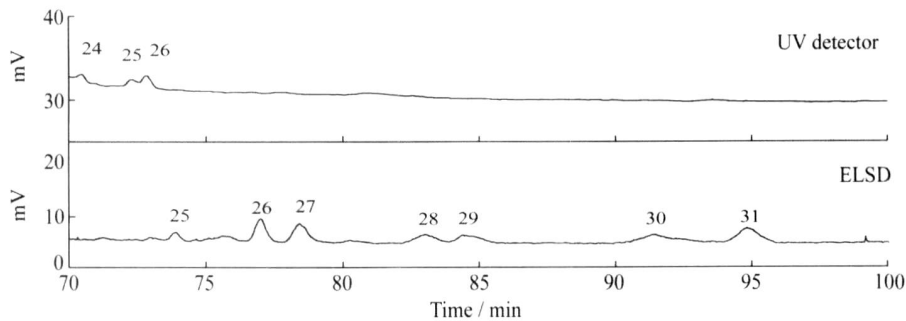


图 5 70~100 min 局部分离谱图
Fig. 5 Partial chromatograms between 70~100 min

结果更为准确和详实。按峰高门阈为 1 mV 计,紫外检测器共检测到 26 个峰,蒸发光散射检测器共检测到 31 个峰,其中,两者共同检测到的峰有 15 个,紫外检测器和蒸发光散射检测器各自检测到的峰分别为 11 个和 16 个,两个检测器总共检测到的色谱峰数达到 42 个。

参考文献:

- [1] HAN Feng-mei(韩凤梅),CAI Min(蔡敏),CHEN Yong(陈勇). Journal of Analytical Science(分析科学学报) [J],2004,20(16):647.
- [2] WANG Xi-jun(王喜军),ZHANG Nin(张宁),SUN Hui(孙晖). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志) [J],2004,29(10):1004.
- [3] DING Qing(丁晴),XU De-ran(徐德然),WANG Zheng-tao(王峥涛). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志) [J],2002,27(8):587.
- [4] YAN Li-xin(鄢立新),TANG Wei-wen(唐卫文),JI Yuan-qiao(及元乔). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志) [J],2003,23(5):358.
- [5] WANG Ming-juan(王明娟),HU Chang-qin(胡昌勤),JIN Shao-hong(金少鸿). Chinese Pharmaceutical Affairs(中国药事) [J],2002,16(7):431.

Analyse of Liuwei Dihuang Pills by HPLC with Series Double-detector

CHENG Hong-da^{1,2}, TANG Tao², LI Tong², ZHANG Wei-bing^{*3}

(1. Shandong Wanjie Medical College, Zibo, Shandong 255213; 2. Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., Dalian, Liaoning 116023; 3. East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: A double-detector HPLC system in which an ultraviolet detector (UVD) and evaporative light scattering detector (ELSD) were connected in series has been developed and used to analyze Liuwei Dihuang Pills. 26 and 31 peaks were resolved by UVD and ELSD respectively and totally 41 peaks were resolved by this HPLC system. The results demonstrated that the double-detector system could afford more exact and detailed information.

Keywords: HPLC; UV detector; ELSD; Liuwei Dihuang Pills