

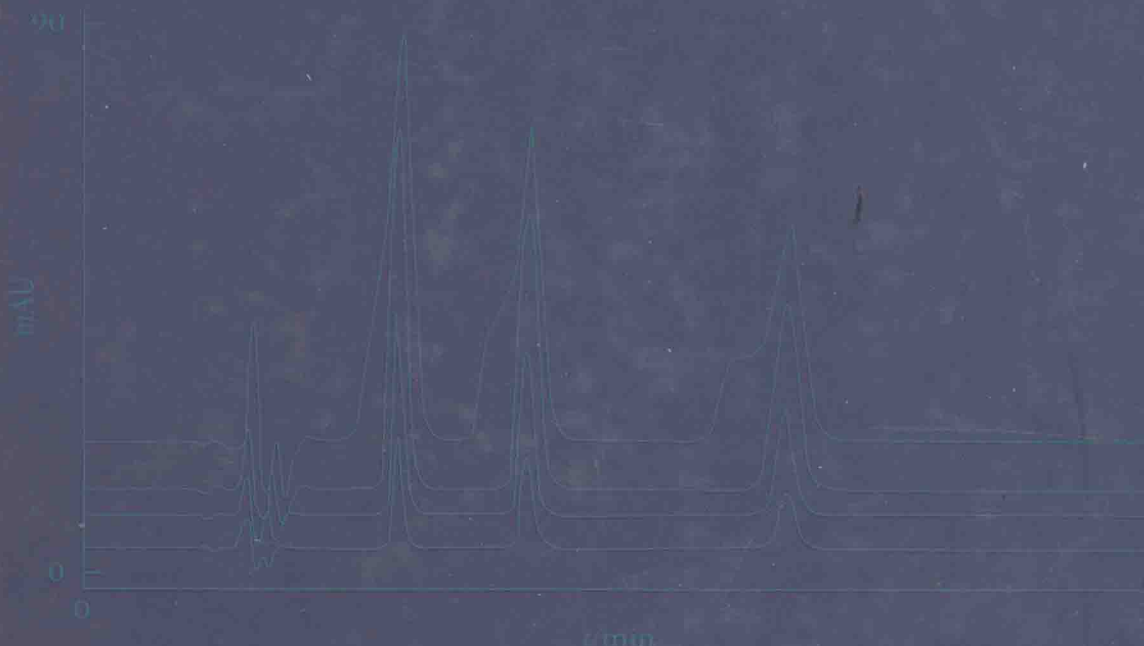
果德安 主编

# 常用中药



## 超高效液相色谱分析

Analysis of Commonly Used Traditional Chinese Medicines  
by Ultra High Performance Liquid Chromatography



化学工业出版社

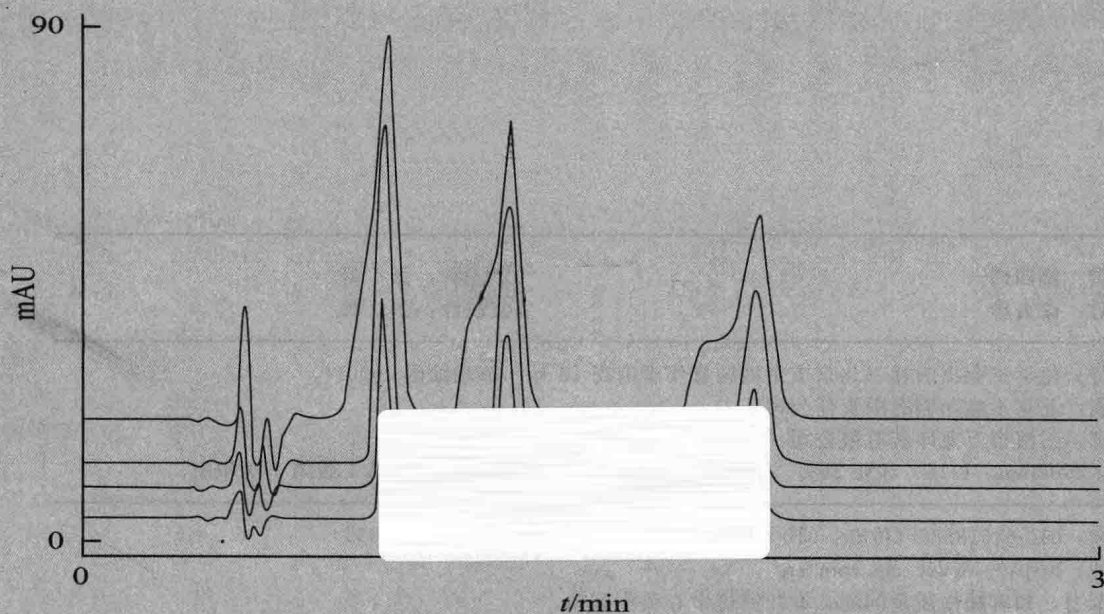
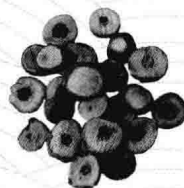
果德安 主编 .....

# 常用中药



## 超高效液相色谱分析

Analysis of Commonly Used Traditional Chinese Medicines  
by Ultra High Performance Liquid Chromatography



化学工业出版社

· 北京 ·

## 图书在版编目 (CIP) 数据

常用中药超高效液相色谱分析/果德安主编. —北京: 化学工业出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-122-18843-4

I. ①常… II. ①果… III. ①液相色谱-应用-中药化学成分-化学分析-研究 IV. ①R284. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 257104 号

---

责任编辑: 傅四周  
责任校对: 徐贞珍

文字编辑: 张 蕾  
装帧设计: 张 辉

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司  
装 订: 三河市万龙印装有限公司  
787mm×1092mm 1/16 印张 30 $\frac{3}{4}$  字数 757 千字 2014 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 149.00 元

版权所有 违者必究

## 编写人员名单

主 编：果德安

副主编：季申 罗国安 祝 明

编 者：（按姓名汉语拼音排序）

安 蓉	陈碧莲	陈 铭	陈 昕	笪 娟
范雪梅	冯瑞红	关树宏	果德安	侯晋军
胡 青	季 申	李大为	李 浪	李丽敏
梁琼麟	陆静娴	罗国安	邱 实	孙 健
王秋蓉	王 洋	王义明	吴婉莹	谢媛媛
杨 敏	张 晨	张静娴	郑 成	祝 明
庄晨杰				



## 前 言

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术是化学、医学、工业、农学、商检和法检等学科领域中常用的重要工具, 具有高压、高速、高效、高灵敏度、应用范围广泛等特点。从色谱概念的出现到如今被广泛应用, 其间经过了一个世纪的变迁。随着制造技术的日益精密, HPLC 技术不断获得更高的耐压能力和更细的填料颗粒, 从而给色谱过程带来速度、灵敏度和分离度的进一步提高。这就是逐渐走入人们视野的超高效液相色谱 (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) 技术。

毫无疑问, 现代医药从色谱技术的发展中获益良多, 中医药产业也不例外。在中药现代化过程中, 人们逐渐认识到药物起效的本质是其有效成分起作用, 因此控制药物质量的关键是对有效成分的控制。经过众多科学家的努力, HPLC 方法从西药走入了中医药界, 成为了《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 中中药成分含量测定的主要技术手段。2010 年版《中国药典》(一部) 还首次增加了特征图谱 (指纹图谱) 在中药产品质量标准中的应用。

UHPLC 技术无疑为成分极其复杂的中药分析提供了更好的解决方案。但新技术要直接应用于中药的质量标准中, 还需要一个过程。因此, 为了使中药分析领域能跟上时代的进步, 使最新的技术能更快地应用于中药质量控制的实践中, 本书主编召集了一批长期参与中药质量标准研究、制订以及中药产品的检定检验工作的一线人员 (分别来自中国科学院上海药物研究所、清华大学、上海市食品药品检验所、浙江省食品药品检验研究院), 历经一年半的时间, 与安捷伦公司合作, 选择了一批 2010 年版《中国药典》(一部) 中具有 HPLC 含量测定项的常用中药进行研究, 力求为 UHPLC 方法快速应用于中药质量标准做出有益的探索。参与人员所属领域分布广泛, 包括大学、研究所、药检所以及公司技术人员, 具有很好的代表性, 能从不同的视角发现问题、提出问题并解决问题。研究内容既有《中国药典》HPLC 方法直接转换为 UHPLC 方法的考察, 又不乏对重点中药的深入研究, 力求给出一个全面深入的示范性成果。

首先, 针对研究基础较好的一批中药进行了典型深入的研究 (第二章), 结合研究人员长期在中药标准研究工作中的经验, 从方法建立、方法学考察等方面给读者展示了 UHPLC

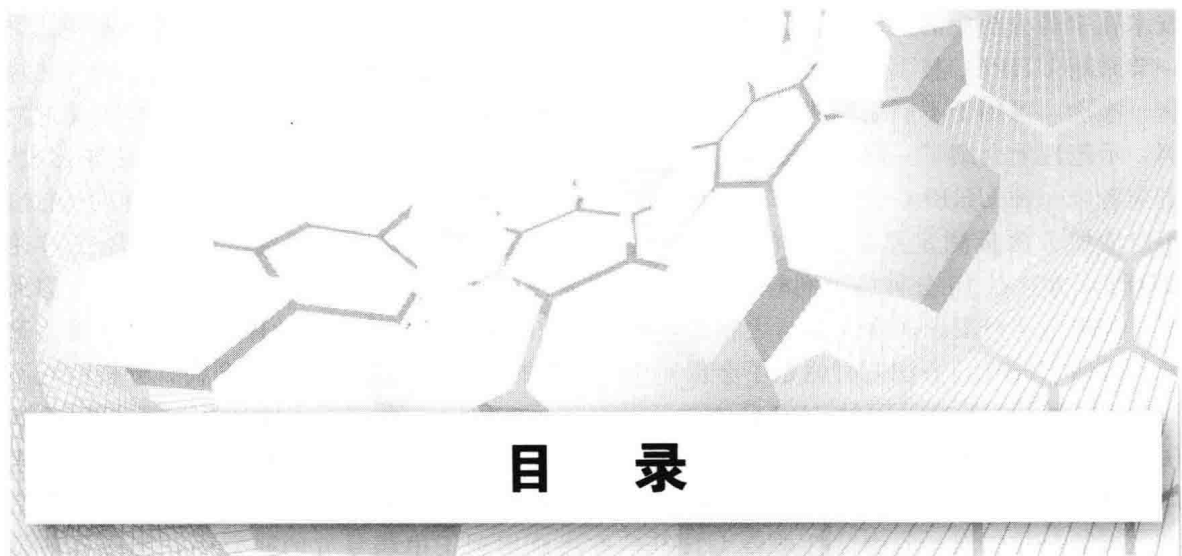
技术在中药分析中的应用情况。由于研究人员关注点不同，品种展示的重点也有所差异。第一节采用 UHPLC 技术建立了人参类药材中 8 种皂苷类成分含量测定方法，所建立的方法快速、准确，可用于不同来源人参类药材的快速分析检测。第二节和第四节以丹参和灵芝为例，示范性地介绍了一测多评技术在中药质量标准中的应用。与之前的 HPLC 方法相比较，研究者以一种 UHPLC 方法、一个对照品对多种成分（丹参 5 个；灵芝 10 个）进行了测定，不但增加了含量测定指标成分的数量，也使测定过程更为快速、便捷、经济。第三节用 UHPLC 方法在 15 分钟内可同时测定牡丹皮中 5 种主要成分的含量，而 2010 年版《中国药典》仅规定了丹皮酚的含量，与之相比，该方法结果更加符合中药复杂体系的质量评价。第五节采用 UHPLC 方法同时测定了金银花中 7 个有机酸类和 2 个黄酮类化合物，分析时间不到 30 分钟，而之前采用的 HPLC 方法至少需要 60 分钟。第六节详细比较了 UHPLC 和 HPLC 方法在莪术油含量测定方法学研究中的差异，显示 UHPLC 分析时间缩短一半，进样体积为 HPLC 的 1/5，溶剂使用量减少到 HPLC 的 1/5，而检测灵敏度提高近一个数量级。而第七节和第八节尝试性地将 UHPLC 方法应用到了中药复方的研究中，其成分种类更加多样，所遇到的情况也更加复杂。其中涉及的问题希望能对后来者起到重要的启示和借鉴作用。

其次，选择了 2010 年版《中国药典》收载的常用 145 种中药材及 41 种中成药进行了方法转换的应用研究（第三章），通过安捷伦公司的方法转换软件进行从 HPLC 到 UHPLC 方法的转换，探索该转换方法是否具有广泛的应用性，并在每个品种的结果与讨论中指出所存在的问题及采用的解决方法，为广大读者提供技术方法与研究思路。研究结果显示，绝大多数品种可以直接进行转换，只有少数品种在方法转换中存在问题，进行适当优化仍可得到满意结果。

由于时间和精力限制，本书难免存在一些不足之处，望广大读者海涵，欢迎批评指正。

编者

2014 年 1 月于上海



# 目 录

<b>第一章 超高效液相色谱分析技术</b> .....	1
<b>第一节 超高效液相色谱的基本原理</b> .....	1
<b>第二节 实例比对</b> .....	3
一、分离度增加.....	4
二、分析速度加快.....	4
三、灵敏度提高.....	5
四、选择性保持不变.....	5
<b>第三节 从 HPLC 向 UHPLC 的方法学转换</b> .....	6
一、色谱柱的柱效、颗粒度及反压.....	7
二、保持原有分离度的前提下提高分析速度的探索.....	7
三、常用公式.....	8
四、色谱柱选择建议.....	9
实例一：决明子的方法转换 .....	11
实例二：人参皂苷 UHPLC 方法的优化 .....	12
<b>第四节 超高效液相色谱仪的使用与保养</b> .....	15
一、UHPLC 仪器使用中的一些特点 .....	15
二、UHPLC 色谱柱的维护及保养 .....	19
三、UHPLC 液相色谱仪器的维护与故障排查 .....	21
<b>参考文献</b> .....	22
<b>第二章 超高效液相色谱技术研究典型实例</b> .....	23
<b>第一节 人参属四种药材</b> .....	23
一、引言 .....	23
二、实验部分 .....	26
三、结果与讨论 .....	38
<b>第二节 丹参</b> .....	44

一、引言 .....	44
二、实验部分 .....	44
三、结果与讨论 .....	59
第三节 牡丹皮 .....	60
一、引言 .....	60
二、实验部分 .....	61
三、结果与讨论 .....	79
第四节 灵芝 .....	81
一、引言 .....	81
二、实验部分 .....	81
三、结果与讨论 .....	97
第五节 金银花 .....	98
一、引言 .....	98
二、实验部分 .....	99
三、讨论 .....	108
第六节 莪术油 .....	110
一、引言 .....	110
二、实验部分 .....	111
三、结果与讨论 .....	123
第七节 安宫牛黄丸 .....	124
一、引言 .....	124
二、实验部分 .....	124
三、讨论 .....	131
第八节 清开灵注射液 .....	132
一、引言 .....	132
二、实验部分 .....	136
三、讨论 .....	152
参考文献 .....	153
<b>第三章 超高效液相色谱技术在中药分析中的应用 .....</b>	<b>158</b>
第一节 概述 .....	158
第二节 中药材 .....	159
一枝黄花 .....	159
丁公藤 .....	160
干姜 .....	162
土贝母 .....	163
大青叶 .....	165
大黄 .....	166
大蒜 .....	168
山银花 .....	170
千里光 .....	171



川牛膝	173
川乌	174
制川乌	176
川芎	178
广东紫珠	179
女贞子	181
小蓟	182
马钱子	184
王不留行	185
天麻	187
木香	188
木贼	190
五味子	191
车前子	193
车前草	194
牛蒡子	196
牛膝	197
升麻	199
水红花子	200
甘草	202
甘遂	203
布渣叶	205
龙胆	206
北刘寄奴	208
生姜	209
仙茅	211
白芍	212
白芷	214
白屈菜	215
白鲜皮	217
瓜蒌子	218
玄参	220
半枝莲	221
母丁香	223
地黄	224
熟地黄	226
地榆	227
地锦草	229
当归	230
肉桂	232

朱砂根	233
延胡索	235
华山参	236
血竭	238
合欢花	239
决明子	241
关黄柏	242
灯盏细辛	244
防己	245
红花	247
赤芍	250
芫花	251
苏木	253
苏合香	254
巫山淫羊藿	256
两面针	257
连翘	259
吴茱萸	262
何首乌	263
佛手	266
羌活	268
补骨脂	269
陈皮	271
附子	272
忍冬藤	274
青皮	277
青黛	279
苦玄参	280
苦杏仁	282
板蓝根	283
刺五加	285
郁李仁	286
虎杖	288
知母	291
侧柏叶	292
金荞麦	294
金钱草	295
金银花	297
肿节风	298
狗脊	300

卷柏	301
贯叶金丝桃	303
草乌	304
制草乌	306
茵陈	308
葫芦巴	309
胡椒	311
南五味子	312
枳壳	314
枳实	315
栀子	317
威灵仙	318
厚朴	320
重楼	321
独一味	323
姜黄	325
首乌藤	326
穿心莲	328
秦皮	329
桂枝	331
桃仁	332
柴胡	334
铁皮石斛	335
徐长卿	337
高良姜	338
粉葛	340
益母草	341
浙贝母	343
黄芩	344
黄芪	346
黄连	347
黄柏	349
菝葜	350
菊花	352
救必应	354
野菊花	355
蛇床子	357
猪苓	358
淫羊藿	360
密蒙花	361

续断	363
葛根	364
薯蓣	366
蒲黄	367
槐花	369
槐角	370
蜂胶	372
锦灯笼	373
蔓荆子	375
酸枣仁	376
辣椒	378
槲寄生	379
墨旱莲	381
薏苡仁	382
橘红	384
藁本	385
第三节 中成药	387
三七片	387
三黄片	388
大补阴丸	391
小儿腹泻宁糖浆	393
天王补心丸	394
元胡止痛片	396
元胡止痛软胶囊	397
牛黄抱龙丸	399
牛黄解毒片	400
乌鸡白凤丸	402
六味地黄丸	403
心元胶囊	406
双黄连口服液	408
左金丸	412
耳聋左慈丸	413
百令胶囊	415
血府逐瘀口服液	416
安神补心丸	419
妇乐颗粒	422
杞菊地黄胶囊	424
抗病毒口服液	426
辛芩颗粒	428
金果饮	429

注射用双黄连·····	431
胃复春片·····	433
香砂六君丸·····	435
复方丹参片·····	436
复方血栓通胶囊·····	439
复方羚角降压片·····	440
胆宁片·····	442
急支糖浆·····	443
养胃颗粒·····	445
穿心莲片·····	446
桂枝茯苓胶囊·····	448
消炎利胆片·····	452
黄连上清丸·····	455
黄连上清片·····	459
银杏叶胶囊·····	461
银黄口服液·····	464
藿香正气水·····	467
麝香保心丸·····	470
<b>索引</b> ·····	<b>474</b>



# 第一章 超高效液相色谱分析技术

## 第一节 超高效液相色谱的基本原理

超高效液相色谱 (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) 是近年发展最迅速的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 方法之一。UHPLC 越来越多地应用于各个领域, 特别是在中药分析领域得到了广泛应用。其更高的分离度、更快的分析速度为中药分析, 特别是为成分极其复杂的中草药及中成药分析带来了更好的解决方案。

高效液相色谱的分离质量被色谱柱中色谱填料的性能所推动, 同时也被其限制。色谱填料性能的改进会给色谱过程带来速度、灵敏度及分离度的提高。其中, 色谱填料的颗粒度对色谱分离性能的贡献最大。实际上, UHPLC 是完全基于 HPLC 基本原理的技术, 是以亚二微米小颗粒、超高柱效的填料为核心的技术, 文献中称“STM” (sub two-micron) 或 sub-2 $\mu\text{m}$ 。近些年以表面多孔层硅胶技术为基础的新型填料 (如 Poroshell 填料), 虽然颗粒度在 2 $\mu\text{m}$  以上, 但其具有很高的柱效成为 UHPLC 的一个新领域。

早在 1956 年, J. J. van Deemter 就介绍了他著名的理论——van Deemter 曲线及其方程式, 这个方程式是描述线速度与理论塔板高度 (或柱效) 关系的经验方程式。早期这个理论是用于气相色谱上的, 但是在后来出现的液相色谱上也完全能应用这个理论。

如果只关心理论塔板高度 (柱效的倒数, HETP 或  $H$ )、流速 (线速度,  $u$ ) 及填料颗粒度 ( $d_p$ ) 的关系, 我们可以把方程式简化如下。

$$H = a(d_p) + \frac{b}{u} + c(d_p)^2 u$$

式中, 第一项  $[a(d_p)]$  代表颗粒度和柱床填装的优良程度, 第二项  $\left(\frac{b}{u}\right)$  代表轴向扩散, 而第三项  $[c(d_p)^2 u]$  则代表传质。所得到的曲线如图 1-1。

通常可从实验得到不同颗粒度的具体曲线如图 1-2。

从图 1-2 中可以看出, 颗粒度越小则柱效越高, 颗粒度控制着分离质量。不同颗粒度填

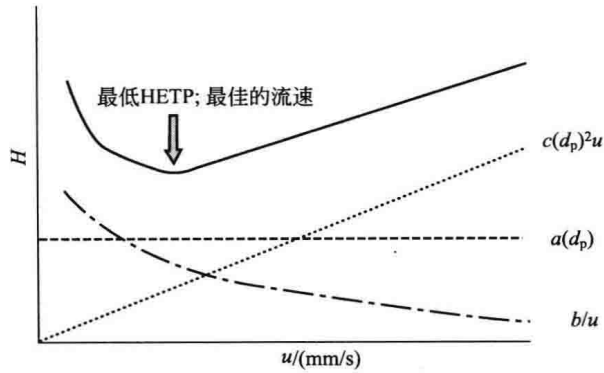


图 1-1 理论上的 van Deemter 曲线

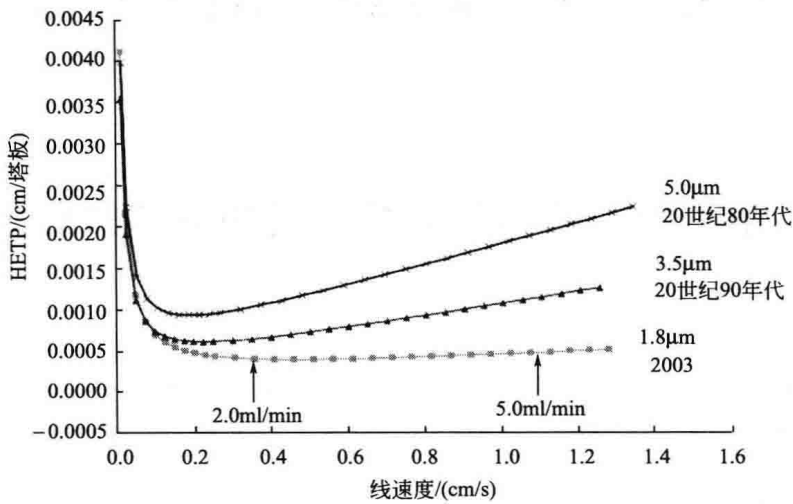


图 1-2 不同颗粒度填料的理论塔板高度与线速度关系的实测曲线

料都有自己最佳柱效的流速，而颗粒度越小，其达到最佳柱效的流速（线速度）就越高。同时，颗粒度越小，曲线后端越平缓，这也意味着柱效随流速升高而降低的程度越小。

所以，降低颗粒度不但可以增加柱效，也提高了分离速度。所以小颗粒填料色谱柱在加快分析速度的同时分离度不受损失。反之，如果流速没有达到最佳流速，色谱柱的柱效就无法充分体现。

相应地，越小的颗粒度所产生的反压也越高。而要同时使用更高的流速，就会受到色谱柱填料耐压及仪器耐压的限制。另外，更高的柱效需要更小的系统体积（死体积）、更快的检测速度等一系列条件的支持，否则小颗粒度填料的高柱效同样无法充分体现。

UHPLC 技术是填料技术和与之相适应的仪器技术的结合。提高色谱柱的性能，除了要降低填料的颗粒度之外，还要解决小颗粒填料本身的耐压问题，以及解决小颗粒填料的装填技术，包括颗粒度的分布以及色谱柱的结构等。而仪器也是为了适应小颗粒填料的使用所设计的，如更高的耐压、更高的数据采集频率。

从图 1-2 中可以看到，HPLC/UHPLC 的发展也是色谱柱填料的发展。早期  $10\mu\text{m}$  颗粒度填料对最佳流速的敏感程度最高，稍微偏离最佳流速柱效就会大大下降。而图中 20 世纪 80 年代开始出现的  $5\mu\text{m}$  填料、20 世纪 90 年代开始出现的  $3.5\mu\text{m}$  填料对流速的敏感程度逐渐降低。2003 年  $2\mu\text{m}$  以下填料的出现，对高流速降低柱效的敏感程度降到很低，或几乎没

有影响。这也是UHPLC的特性之一，即能应用更高的流速（线速度）而柱效并不降低，从而完成超高速液相色谱分析。

UHPLC的出现实际上是色谱柱技术的进步，而UHPLC仪器是配合色谱柱的应用做出的改进或性能提升。

HPLC色谱柱在很长的一段时期内都是采用 $5\mu\text{m}$ 作为标准粒径，直到20世纪90年代中期后 $3.5\mu\text{m}$ 粒径柱才得以广泛使用。随着对更快速度、更高分离度需求的增加，色谱工作者开始使用亚 $2\mu\text{m}$ （STM）至 $3\mu\text{m}$ 粒径填料，包括安捷伦公司生产的 $1.8\mu\text{m}$ 填料。使用这些填料可在更短的色谱柱上获得更快的高分离度分离，这即是UHPLC的最初阶段。

$3.5\mu\text{m}$ 粒径填料色谱柱是在常规操作压力下工作的，可以在所有液相色谱仪上使用，包括400bar<sup>①</sup>操作压力上限的仪器。 $1.8\mu\text{m}$ 填料的短柱（50mm及更短）可以在使用优化条件（如较高的温度、较低黏度的流动相）后的普通液相色谱仪上使用，而长柱则需要耐更高压力的液相色谱仪，如快速分离液相色谱或UHPLC，在600~1200bar压力范围下操作，各种规格的UHPLC仪器也应运而生。

近年来UHPLC技术的发展也是在仪器及色谱填料两个方向同时发展的基础上展开。从仪器的角度，性能上更高耐压的色谱泵、更高采样速率的检测器不断出现。同时，也在不断解决超高压带来的问题，例如超高压产生高温造成密封垫寿命的问题、在色谱柱中径向的温度梯度造成扩散的问题等。从色谱填料角度，新型填料的不断涌现也促进了UHPLC的发展，表面多孔填料及整体柱技术是其中的两个方向。

表面多孔填料（superficially porous particle, SPP）柱在小粒径填料中比早先的“薄壳型”全多孔填料柱更受青睐。例如，安捷伦公司的一种表面多孔填料Poroshell 120，填料包括一个实心核（直径 $1.7\mu\text{m}$ ）和覆盖在外的多孔硅胶层（厚 $0.5\mu\text{m}$ ），与常规全多孔柱相比，能够为色谱工作者提供方法开发的明显优势。由于扩散仅发生在多孔外壳，故传质速率更快，而表面多孔填料更容易装填柱床更为均匀的色谱柱，所以此类表面多孔层填料可以实现比相同粒径全多孔填料更高的柱效。

实际上， $2.7\mu\text{m}$ 表面多孔填料的柱效已经接近 $1.8\mu\text{m}$ 全多孔填料。表面多孔填料柱的最大优势在于，在获得高柱效的同时，产生的反压大大降低，从而使色谱工作者可以灵活地通过提高流速加快分析速度，同时得到良好的分离度。此外，Poroshell 120柱装配 $2\mu\text{m}$ 筛板，这一点非常重要，这样使其对于较脏的样品具有更高的忍耐性，而不会像装配更小孔径筛板的色谱柱那样容易堵塞。

整体柱技术是更早就开始发展的一种填料技术，也用于超高效液相色谱。其高渗透性的特点类似于表面多孔技术，而反压更低。目前有硅胶填料基质及聚合物基质两大类填料，其技术各有其特点。比较适合于使用更长的色谱柱得到高柱效。但这种技术还在发展之中，有一些问题还尚未解决。

## 第二节 实例比对

超高效液相色谱（UHPLC）是使用超高效填料（如亚 $2\mu\text{m}$ 填料）的技术，超高效填料带来的好处也是十分明显的。它给液相色谱带来分离度、速度及灵敏度的提高。与常规

① 1bar=10<sup>5</sup>Pa。



HPLC 填料相比, 由于 UHPLC 填料的变化仅仅在于颗粒度, 而填料化学性质保持不变, 故两者皆基于相同的 LC 理论, 分离选择性相同。否则 UHPLC 就不能使用 HPLC 的理论, 而且从 HPLC 到 UHPLC 的转移会变得十分麻烦。

## 一、分离度增加

图 1-3 是使用不同颗粒度的色谱柱对药物杂质分离的色谱图。在这个实验中, 分别使用了同样规格(外形尺寸及填料种类)而只是填料颗粒度不同的色谱柱。在相同的条件下, 我们看到了颗粒度对分离度的影响。

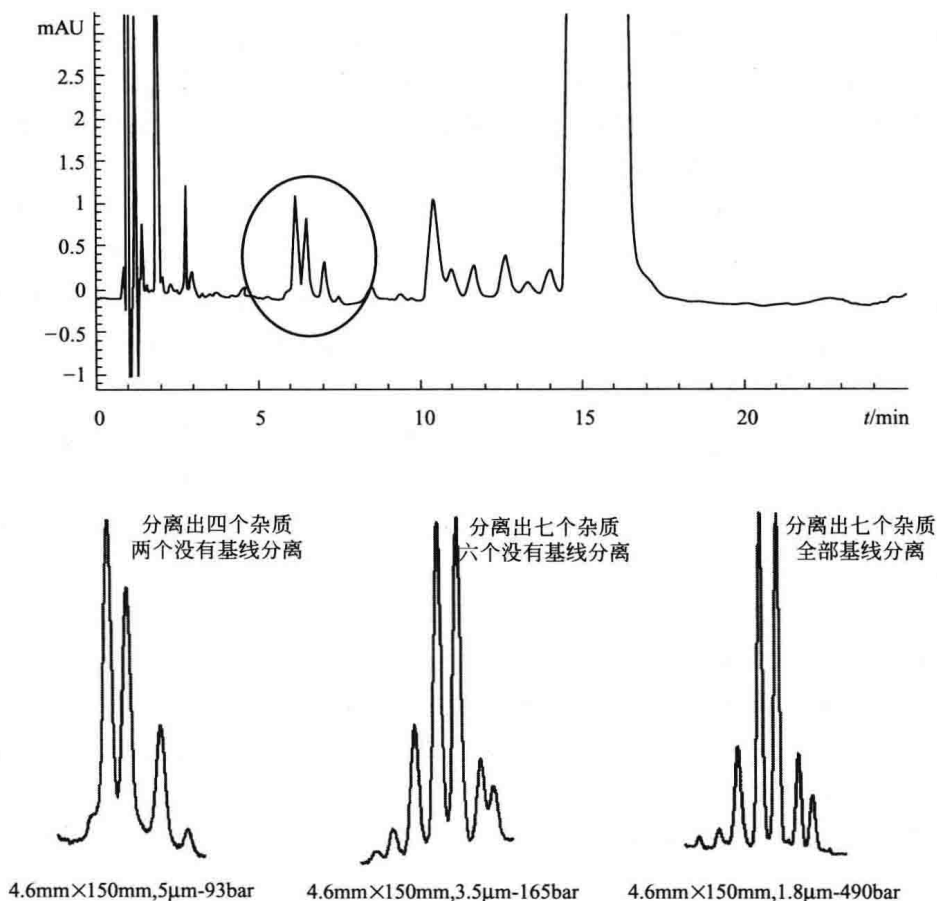


图 1-3 不同颗粒度色谱柱对药物杂质分离色谱图

可以看出, 在同样条件下使用小颗粒填料可以分离出更多的杂质。特别是在分析成分十分复杂的中药时, 能多分离并鉴定出一个杂质, 对该药物的了解程度就越高, 同时对用药者的可能潜在伤害也就越小。

## 二、分析速度加快

在保持同样分离度的前提下, UHPLC 的分析速度可以大幅度提高。图 1-4 展示了 UHPLC 对分析速度的提高。原始的分析条件使用 5µm 颗粒度填料、4.6mm×150mm 规格的 HPLC 色谱柱, 保持同样分离度的前提下, 可以使用与之柱效相当的 1.8µm 颗粒度、50mm 长的 UHPLC 色谱柱。而相对于 2.1mm 内径的色谱柱来说, 1.0ml/min 流速的线速度是