

# 现代色谱技术 及其在中药分析中的应用

XIANDAI SEPU JISHU  
JIQI ZAI ZHONGYAO FENXI  
ZHONG DE YINGYONG

马志英 编著



兰州大学出版社

西北民族大学重点学术著作资助项目

# 现代色谱技术 及其在中药分析中的应用

XIANDAI SEPU JISHU  
JIQI ZAI ZHONGYAO FENXI  
ZHONG DE YINGYONG

马志英 编著



兰州大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

现代色谱技术及其在中药分析中的应用 / 马志英编  
著. —兰州:兰州大学出版社, 2013. 6  
ISBN 978-7-311-04162-5

I. ①现… II. ①马… III. ①色谱法—应用—中药化  
学成分—化学分析 IV. ①R284.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 141923 号

策划编辑 锁晓梅  
责任编辑 张 萍  
封面设计 刘 杰

---

|      |                                                                 |
|------|-----------------------------------------------------------------|
| 书 名  | 现代色谱技术及其在中药分析中的应用                                               |
| 作 者  | 马志英 编著                                                          |
| 出版发行 | 兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路 222 号 730000)                               |
| 电 话  | 0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心)<br>0931-8914298(读者服务部)   |
| 网 址  | <a href="http://www.onbook.com.cn">http://www.onbook.com.cn</a> |
| 电子信箱 | press@lzu.edu.cn                                                |
| 印 刷  | 兰州瑞昌印务有限责任公司                                                    |
| 开 本  | 710 mm × 1020 mm 1/16                                           |
| 印 张  | 17                                                              |
| 字 数  | 317 千                                                           |
| 版 次  | 2013 年 6 月第 1 版                                                 |
| 印 次  | 2013 年 6 月第 1 次印刷                                               |
| 书 号  | ISBN 978-7-311-04162-5                                          |
| 定 价  | 33.00 元                                                         |

---

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

# 前 言

色谱法因其具有分析速度快、灵敏度高、分离效率高、流动相选择范围大、色谱柱可反复使用等特点，已广泛应用于工业、农业、国防等生产建设领域和食品生产、环境保护、医药质量控制科学研究中。

中药制剂是以中药材为原料，以中医药理论为指导，按照一定的处方和制备工艺加工而成的制剂，因其在疑难杂症方面疗效独特、毒副作用少，越来越受到医药界的广泛关注。同时也由于中药制剂成分复杂，其质量的全面控制还有待于加强。因此，在不断实践的基础上，利用现代色谱技术分析手段，建立多指标分析方法对中药制剂质量控制意义重大。

全书分为上、下两篇。上篇主要对现代色谱技术方法、现代色谱技术的塔板理论和速率理论等基础理论以及色谱方法中的定性参数、定量参数的概念、意义、应用做了阐述，对色谱技术方法的分离、分析条件的选择进行了讨论，对色谱技术中的分析仪器及其在中药分析中的应用做了简介。下篇主要介绍了色谱技术在中药分析中的应用研究，如利用色谱技术对清肺抑火片、牛黄消炎灵胶囊、清热解毒软胶囊等一些中药药效成分的含量测定，建立中药质量控制的研究。

全书由马志英编著。在编写过程中，罗兴平、师永清两位老师提供了部分资料，在此表示衷心的感谢。西北民族大学为本书出版提供了资金资助，在此深表感谢。

由于水平和时间所限，书中疏漏和错误之处在所难免，恳请读者批评指正。

马志英

2013年4月

## 目 录

### 上篇 现代色谱技术

#### 第一章 绪论 / 3

##### 第一节 色谱法概述 / 3

##### 第二节 中药成分分析现状 / 5

#### 第二章 色谱法基础理论 / 7

##### 第一节 基本概念 / 7

##### 第二节 塔板理论 / 13

##### 第三节 速率理论 / 17

#### 第三章 气相色谱法 / 21

##### 第一节 气相色谱法概述 / 21

##### 第二节 气相色谱仪 / 25

##### 第三节 气相色谱固定相 / 28

第四节 气相色谱分离条件的选择 / 33

第五节 气相色谱法检测器 / 37

第六节 气相色谱定性、定量方法 / 48

第七节 毛细管柱气相色谱法 / 53

第八节 气相色谱与质谱联用技术在中药分析中的应用 / 56

第四章 高效液相色谱法 / 60

第一节 高效液相色谱法概述 / 60

第二节 高效液相色谱法的固定相和流动相 / 63

第三节 高效液相色谱法的主要类型及选择 / 66

第四节 高效液相色谱仪 / 81

第五节 超临界流体色谱法 / 88

第六节 液相色谱的定性与定量分析方法 / 92

第七节 液相色谱与质谱等联用技术在中药分析中的应用 / 96

第五章 毛细管电泳法 / 99

第一节 概述 / 99

第二节 毛细管电泳法的基本理论 / 101

第三节 毛细管电泳法分离模式 / 107

第四节 影响毛细管电泳的因素 / 112

第五节 毛细管电泳仪基本结构 / 116

第六节 毛细管电泳法在中药分析中的应用 / 119

第六章 薄层色谱法 / 123

第一节 概述 / 123

第二节 薄层色谱法分离原理 / 124

第三节 固定相和流动相 / 127

第四节 薄层色谱法操作 / 131

第五节 薄层色谱扫描法 / 136

第七章 色谱法在中药分析中的方法 / 147

第一节 中药成分分析的提取方法 / 147

第二节 色谱法在中药分析中的色谱参数及定量方法 / 150

## 下篇 现代色谱技术在中药分析中的应用研究

双波长 RP-HPLC-UV 检测同时测定牛黄消炎灵胶囊中三种药效成分的含量 / 157

双波长 RP-HPLC 法测定清肺抑火片中四种成分的含量 / 166

双波长 RP-HPLC 法测定清热解毒软胶囊中栀子苷和黄芩苷的含量 / 176

HPLC 同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷 / 183

多波长 RP-HPLC 法同时测定导赤丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱 / 189

高效液相色谱法测定参苏丸中甘草酸的含量 / 196

双波长 HPLC 同时测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷的含量 / 199

双波长 RP-HPLC 法同时测定牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷的含量 / 204

双波长 RP-HPLC 同时测定黄连上清片中栀子苷和黄芩苷的含量 / 209

HPLC 测定康儿灵颗粒剂中紫丁香苷的含量 / 214

HPLC 测定强力救心滴丸中华蟾蜍毒基和酯蟾毒配基的含量 / 218

高效液相色谱法测定小儿化痰止咳颗粒中盐酸麻黄碱的含量 / 223

高效液相色谱法测定痛经灵颗粒中丹参素的含量 / 228

高效液相色谱法测定肝泰康胶囊中黄芩苷的含量 / 233

高效毛细管电泳法同时测定苦豆子总碱注射液中 3 种生物碱的含量 / 237

野生与家种大花红景天的质量评价研究 / 242

气相色谱法测定强力救心滴丸中冰片的含量 / 246

天麻胶囊中天麻素含量测定方法的研究 / 250

高效液相色谱法测定手参肾宝胶囊中腺苷的含量 / 255

薄层扫描法测定洋金花及康灵片中东莨菪碱含量 / 259



上篇

# 现代色谱技术



# 第一章 绪论<sup>[1-3]</sup>

## 第一节 色谱法概述

色谱法或色谱分析也称为层析法(chromatography), 是一种物理或物理化学的分离分析方法。它利用混合物中各组分在两相间分配系数的差别进行分离。当溶质在两相间做相对移动时, 各物质在两相间进行多次分配。分配系数大的组分迁移速度慢, 分配系数小的组分迁移速度快, 从而使各组分分离。能完成这种分离的仪器被称为色谱仪。

### 一、色谱法分类

从不同的角度, 色谱法有不同的分类方法, 通常可按流动相与固定相的状态分类, 按操作形式分类, 按色谱过程的分离机制分类, 按使用领域不同分类, 按固定相的几何形式分类。

#### (一) 按流动相与固定相的状态分类

##### 1. 按流动相的状态分类

在色谱中流动相可以是气体、液体或超临界流体, 相应分为气相色谱(GC)、液相色谱(LC)和超临界流体色谱(SFC)。

##### 2. 按固定相的状态分类

固定相可以是固体或液体。因此, 气相色谱法又可分为气-固色谱法(GSC)与气-液色谱法(GLC)。液相色谱又可分为液-固色谱法(LSC)和液-液色谱法(LLC)等。

#### (二) 按操作形式分类

按操作形式可分为柱色谱法、平面色谱法及逆流分配等类别。

#### (三) 按色谱过程的分离机制分类

按色谱过程的分离机制可分为吸附色谱法、分配色谱法、体积排阻色谱法(凝胶色谱)、离子交换色谱法、亲和色谱法、化学键合相色谱法、毛细管电色谱法和毛细管电泳法等。

#### (四) 按使用领域不同分类

按使用领域将色谱仪分为分析型色谱仪和制备型色谱仪。

#### (五) 按固定相的几何形式分类

##### 1. 柱色谱法 (column chromatography)

柱色谱法是将固定相装在一个金属或玻璃柱中,或是将固定相附着在毛细管内壁上做成色谱柱,试样从柱头到柱尾沿一个方向移动而进行分离的色谱法。

##### 2. 纸色谱法 (paper chromatography)

纸色谱法是利用滤纸做固定液的载体,把试样点在滤纸上,然后用溶剂展开,各组分在滤纸的不同位置以斑点形式显现,根据滤纸上斑点位置及大小进行定性和定量分析。

##### 3. 薄层色谱法 (thin-layer chromatography, TLC)

薄层色谱法是将适当粒度的吸附剂作为固定相涂布在平板上形成薄层,然后用与纸色谱法类似的方法操作以达到分离目的。

## 二、色谱法特点

色谱法是以其优良的分离能力为特点,它的分离效率远远高于其他分离技术,如蒸馏、萃取、离心等方法。

(1) 分离效率高。例如毛细管气相色谱柱 ( $0.1\sim0.25\text{ }\mu\text{m}$ )  $30\sim50\text{ m}$  其理论塔板数可以达 7 万 $\sim$ 12 万。而毛细管电泳柱一般都有几十万理论塔板数的柱效,凝胶毛细管电泳柱可达上千万理论塔板数的柱效。

(2) 应用范围广。它几乎可用于所有化合物的分离和测定,无论是有机物、无机物、低分子或高分子化合物,还是有生物活性的生物大分子,都可以进行分离和测定。

(3) 分析速度快。一般在几分钟到几十分钟就可以完成一次复杂样品的分离和分析。近来的小内径 ( $0.1\text{ mm}$ )、薄液膜 ( $0.2\text{ }\mu\text{m}$ )、短毛细管柱 ( $1\sim10\text{ m}$ ) 色谱分析比原来的方法速度提高 5 $\sim$ 10 倍。

(4) 样品用量少。一般用几微升的样品就可以完成一次分离和测定。

(5) 灵敏度高。高效液相色谱已广泛采用高灵敏度的检测器,进一步提高了分析的灵敏度,如荧光检测器灵敏度可达  $10^{-11}\text{ g}$ 。

(6) 分离和测定一次完成。色谱联用或混用,一次可完成定性与定量工作。

(7) 仪器智能化,操作简便。

## 三、色谱法发展

1905 年,俄国的植物学家茨维特将从植物色素中提取的石油醚提取液倒入一

根装有碳酸钙的玻璃管顶端,然后用石油醚淋洗,结果不同色素得到分离,在管内显示出不同的色带,色谱一词也由此得名。这就是最初的色谱法。后来,用色谱法分析的物质已极少为有色物质,但色谱一词仍沿用至今,在 20 世纪 50 年代,色谱法有了很大的发展。1952 年,詹姆斯和马丁以气体作为流动相分析了脂肪酸同系物并提出了塔板理论。1956 年,范第姆特总结了前人的经验,提出了反映载气流速和柱效关系的范第姆特方程,建立了初步的色谱理论。同年,高莱(Golay)发明了毛细管柱,以后又相继发明了各种检测器,使色谱技术更加完善。随着科学技术的发展,特别是检测技术的提高和高压泵的出现使得色谱法的应用范围大大扩展。

20 世纪 70 年代,液相色谱-质谱联用技术将液相色谱分离技术与质谱检测手段联合,集液相色谱的高分离能力和质谱的高灵敏度、极强的定性专属性于一体,已成为一种不可替代的分离分析工具。气相色谱在 20 世纪 80 年代已成功地与质谱联用,并且随着小型台式四极质谱的发展,质谱已成为气相色谱的一种重要的专用检测器,可同时进行上百种不同成分的分离并进行质谱检测。科学家还将四极杆质谱与飞行时间质谱组成串联质谱,结合最新发展的毛细管液相色谱技术组成的,将集高效毛细管、液相色谱、四极杆质谱与飞行时间质谱等的优点,而成为当前解决复杂样品分离分析的最尖端工具之一。色谱与质谱的联用应用范围很广,可以有效地解决众多领域的问题。在发现和分析新型有机污染物方面,色谱-质谱联用技术发挥着至关重要的作用。近来 LC-MS 技术的成熟和发展,使传统 GC-MS 技术遗漏的高极性、水溶性、高分子质量、热不稳定性污染物逐步被鉴定出来。环境污染物的检测正从传统的基于色谱和低分辨色谱-质谱联用的靶标分析技术向基于高分辨色谱、质谱联用以及色谱-串联质谱联用的高通量、高灵敏度、高选择性、高甄别性的非靶标分析方向发展。液相色谱-质谱联用技术已在乌头类生物碱的裂解、成分鉴别、炮制配伍前后成分变化、药物的体内代谢转化、药物代谢动力学及药材、饮片、成药质量控制等方面的广泛应用。

目前,由于高效能的色谱柱、高灵敏的检测器及微处理机的使用,使得色谱法已成为一种分析速度快、灵敏度高、应用范围广的分离分析方法。

## 第二节 中药成分分析现状

中药制剂是以中药材为原料,以中医药理论为指导,按照一定的处方和制备工艺加工而成的制剂,因其在疑难杂症方面疗效独特、毒副作用少,越来越受到医药界的广泛关注。由于中药制剂成分复杂,药效学研究滞后,《中国药典》(一部)收录的中药含量测定的成分,一种是活性有效成分,一种是指标成分。我国科研人

员经过几十年的不断努力,使现代色谱技术成为中药质量控制的主要分析手段。从1985年版《中国药典》开始引入色谱技术到2010年版《中国药典》,在25年时间内,现代色谱技术在中药质量控制方面得到快速的发展,取得了可喜的成果。2005年版《中国药典》(一部)中收载564种中药制剂,其含量测定项中有32种采用薄层色谱(TLC)法,338种采用高效液相色谱(HPLC)法,23种采用气相色谱(GC)法。而2010年版《中国药典》(一部)收载中药制剂达1063种,在含量测定项中709种采用HPLC法,24种采用GC法,12种采用薄层扫描色谱(TLC-CS)法。显然,2010年版与2005年版《中国药典》相比,定量分析项中色谱技术的应用明显增加,现代色谱技术在中药质量控制中所扮演的角色越来越重要。

目前,HPLC法因具有分离效能高、分析速度快、重现性好、流动相选择范围大、色谱柱可反复使用等特点,已广泛应用于中药材及中药制剂的活性和指标成分分析;GC法分离效能高、灵敏度高、分析速度快,主要用于一些挥发性成分的测定;CE法是以高电场为驱动,毛细管为分离通道,依据样品中各组分淌度和分配行为上的差异而实现分离的技术,适用于中药制剂中带电荷化合物的分离分析。TLC和TLCS操作简便,具有分离和鉴别的双重功能,但定量分析误差较大,因此多用于中药制剂的定性鉴别。

随着中药事业的不断发展,中药制剂品种的推陈出新,其质量的全面控制还有待加强。因此,在不断实践的基础上,利用现代色谱分析手段,建立多指标分析方法,对中药制剂质量控制意义重大。提高中药复杂成分的分析水平,并在中药制剂安全、有效的前提下,确保其质量可控,进一步实现中药的现代化,是药学工作者的重要而艰巨的任务。

## 参考文献

- [1]盛龙生,苏焕华,郭丹滨.色谱质谱联用技术[M].北京:化学工业出版社,2006:25-27.
- [2]张根衍,潘桂湘.液质联用技术在乌头类生物碱定性定量研究中的应用[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(6):26-29.
- [3]田颂九,胡昌勤,马双成,等.色谱在药物分析中的应用[M].北京:化学工业出版社,2003:13.



噪声随时间变化的曲线,  $EF=26GH=Y_{1/2}$ 。稳定的基线是一条直线(水平方向)。基线反映仪器及操作条件的稳定性, 基线的高低反映检测器的本底高低。色谱图经常出现基线漂移、基线噪声。

## (二) 基线漂移和基线噪声

基线漂移指基线随时间定向的缓慢变化。基线漂移与柱温波动、流动相(种类、比例、纯度)、流通池被污染或有气体、检测器出口阻塞等有关。主要由试验操作条件不稳定引起。

基线噪声指由各种偶然因素所引起的基线起伏。基线噪声一般由仪器电源不稳定引起。

## (三) 色谱峰

流出曲线上的突起部分称为色谱峰。正常色谱峰近似于对称形正态分布曲线(高斯曲线)。不对称色谱峰有两种: 前延峰(leading peak)和拖尾峰(tailing peak), 前者少见。色谱峰对称性以拖尾因子大小表示。一个样品组分的色谱峰一般用峰高、峰位、峰宽描述。

色谱峰峰高和峰面积是定量参数, 也就是说, 通过峰高和峰面积, 在知道该峰是何种物质峰的情况下, 是可以定量求出该物质的含量的。峰位用于定性。峰宽是衡量柱效的。

# 二、定性参数

## (一) 保留值

### 1. 保留时间 (retention time, $t_R$ )

(1) 保留时间: 从进样开始到某个组分的色谱峰顶点的时间间隔, 称为该组分的保留时间, 即从进样到柱后某组分出现浓度极大时的时间间隔。如图 2-1 中  $t_M$  及  $t_R$  分别为空气峰及预测组分的保留时间。

(2) 死时间 ( $t_0$ ): 分配系数为零的组分的保留时间, 称为死时间。通常把空气或甲烷视为此种组分, 用来测定死时间。

(3) 调整保留时间 ( $t_R'$ ): 某组分由于溶解(或被吸附)于固定相, 比不溶解(或不被吸附)的组分在柱中多停留的时间, 称为调整保留时间。调整保留时间与保留时间和死时间有如下关系:

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (2.1)$$

在试验条件(温度、固定相等)一定时, 调整保留时间仅决定于组分的性质, 因此调整保留时间是定性的基本参数。

### 2. 保留体积 ( $V_R$ )

(1) 保留体积: 从进样开始到某个组分在柱后出现浓度极大时所需通过色



谱柱的载气体积,称为该组分的保留体积。对于正常峰,该组分的  $1/2$  量被带出色谱柱时所消耗的载气体积为保留体积。保留体积与保留时间和载气流速 ( $F_C$ , mL/min) 有如下关系:

$$V_R = t_R \cdot F_C \quad (2.2)$$

载气流速大,保留时间短,但两者的乘积不变,因此  $V_R$  与载气流速无关。

(2) 死体积 ( $V_0$ ): 由进样器至检测器的流路中未被固定相占有的空间,称为死体积。死体积是进样器至色谱柱间导管的容积、色谱柱中固定相颗粒间间隙、柱出口导管及检测器内腔容积的总和。死体积与死时间和载气流速有如下关系:

$$V_0 = t_0 \cdot F_C \quad (2.3)$$

死体积大,色谱峰扩张(展宽),柱效降低。死时间相当于载气充满死体积所需的时间。

(3) 调整保留体积 ( $V'_R$ ): 由保留体积扣除死体积后的体积,称为调整保留体积。

$$V'_R = V_R - V_0 = t'_R F_C \quad (2.4)$$

$V'_R$  与载气流速无关,是常用的色谱定性参数之一。

## (二) 相对保留值

相对保留值也叫选择因子,定义为组分 2 与组分 1 的调整保留值之比:

$$\alpha = t'_{R2}/V'_{R1} = V'_{R2}/V'_{R1} \quad (2.5)$$

其值只与柱温和固定相性质有关,与其他色谱操作条件无关,它表示了固定相对这两种组分的选择性。

相对保留值的优点:只要柱温、固定相不变,即使柱径、柱长、填充情况及流动相流速有所变化, $\alpha$  值仍保持不变,(重要参数)相邻两组分的  $t'_R$  相差越大,分离的越好, $\alpha=1$  时两组分不能分离。

## (三) 保留指数 (retention index)

保留指数又称科瓦茨指数 (Kovatsin-dex),是气相色谱定性指标的一种参数。将正构烷烃的保留指数定为它的碳数的 100 倍。待测物质的保留指数是与待测物质具有相同调整保留值的假想的正构烷烃的碳数的 100 倍。通常以色谱图上位于待测物质两侧的相邻正构烷烃的保留值为基准,用对数内插法求得。在同一柱上,物质的保留指数与柱温呈线性关系。

保留指数 ( $I$ ) 的计算公式 (恒温分析) 如下:

$$I = 100Z + 100n \left[ \log_{10} t'_{R(X)} - \log_{10} t'_{R(Z)} \right] / \left[ \log_{10} t'_{R(Z+n)} - \log_{10} t'_{R(Z)} \right] \quad (2.6)$$

式中,  $t'_R$  为校正保留时间;  $Z$  和  $Z+n$  分别为目标化合物 ( $X$ ) 流出前后的正构烷烃所含碳原子的数目,  $n$  可为 1、2,通常  $n=1$ 。

这里:  $t'_{R(n)} < t'_{R(X)} < t'_{R(Z+n)}$ , 一般正构烷烃所含碳原子的数目  $n$  大于 4。