

天然药物分析方法的研究进展

谢苗, 蓝海* (大理学院, 云南大理 671000)

摘要 综述了天然药物有效成分或指标性成分的分析方法, 重点论述了各种分析方法的特点、应用、研究进展, 并且讨论了 UPLC 及色谱联用分析法等新技术在天然药物含量测定中的应用, 以期能为天然药物的研究提供依据。

关键词 天然药物; 色谱; 含量测定

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)29-10059-04

Research Advance of Analyzing Method in Natural Medicine

XIE Miao, LAN Hai* (Dali University, Dali, Yunnan 671000)

Abstract This paper reviews the analysis method of natural drugs effective ingredient or component index, mainly focuses on the characteristics of various analysis methods, application, research progress, and sheds light on the UPLC, HPLC/MS and other new technology in the application of natural medicine content determination, expecting to provide the basis for the research of natural medicine.

Key words Natural medicine; Chromatograph; Content determination

我国传统药学是在人类与疾病长期斗争的实践中发展起来的。在世界回归自然食疗和绿色革命兴起的今天, 天然药物越来越受到关注。天然药物包括植物药、动物药、矿物药及微生物用药, 而植物药的研究最成熟, 应用也最广泛。该研究主要讨论植物药。天然药物之所以能防治疾病, 必然因它的物质基础, 即生物活性物质或有效成分。天然活性物质往往具有结构新颖、活性高、副作用少的特点, 可以作为制药工业中新药研究的活性先导化合物^[1]。我国虽然是天然药物种植大国, 但并不是天然药物研究强国, 主要原因有 2 个: ①天然药物有效成分结构复杂, 并且影响其药效的因素众多; ②产生药效的物质不明, 如何以有效成分为指标来监控药材质量也是一大难题。笔者讨论了现代先进技术在天然药物分析中的应用, 探索天然药物有效成分的定性鉴别和含量测定方法, 进一步完善天然药物质量标准。

1 气相色谱法(GC)

采用气相色谱法, 分析含有挥发油及其他挥发性成分^[2]的天然药物。GC 法已成为药物含量测定和杂质检查、药材挥发油分析、溶剂残留分析、体内药物分析等的一种重要手段。GC 法的优点有: 分离效能高, 可以使一些分配系数很接近的难以分离的化合物得到很好地分离; 高灵敏度, 由于检测器的灵敏度高, 其检测限可达 $10^{-11} \sim 10^{-13}$ g; 高选择性, 挑选适当的固定相, 可以分析同位素、对映体^[3]等理化性质相似而生物活性不同的成分。

1.1 GC 法在天然药物中的应用 天然药物的预处理是能否更好地应用方法进行分析的一个关键技术。缬草中的挥发油含有多种化学成分。咎俊峰等^[4]利用顶空固相微萃取技术(HS-SPME), 经过单因素考察试验得到缬草的最佳萃取条件。该萃取条件的缬草 GC 图谱分离度较高。这样的样品处理使得 GC 法更加准确。此外, 减少有机溶剂使用, 使得操

作更加安全。游离的香豆素易随水蒸气挥发, 将水蒸汽蒸馏提取的当归^[5]经有机萃取, 再用 GC 法进行组分分析和含量测定。肖会敏等^[6]也先将椒目仁油中的不饱和脂肪酸衍生化(用氢氧化钾甲醇溶液酯化), 再采用 GC 法测定其油酸、亚油酸及 α -亚麻酸的含量。

天然药物的质量安全问题是限制其发展的重中之重。GC 法也可以用于控制天然药物的质量。李得堂^[7]在测定冰片和薄荷脑的含量时先超声萃取制剂, 再采用直接进样毛细管 GC 法, 确定冰片 1.178 3 ~ 5.891 5 mg/ml 和薄荷脑 0.509 9 ~ 2.549 5 mg/ml 的线性范围, 计算出冰片和薄荷脑的含量相对标准偏差(RSD)分别为 1.96% 和 2.49%。该方法为筋痛涂膜剂的质量控制提供依据。逢楠楠等^[8]在同时测定芫花中棕榈酸和亚油酸的含量时采用毛细管 GC 法, 先经柱前衍生化(将棕榈酸与亚油酸甲酯化), 再用 GC 法测定其酯的含量, 结果表明棕榈酸甲酯和亚油酸甲酯线性浓度范围分别为 0.079 ~ 1.578 g/L 和 0.030 ~ 0.591 g/L, 含量的平均值分别为 2.795 和 1.306 mg/g, RSD 分别为 2.6%、1.9%。该方法快速、准确, 可作为芫花的质量控制方法。

此外, GC 法还可以用于药材溶剂残留分析和农药限量检测, 进一步保证天然药物的质量。李志刚等^[9]在测定丹酚酸 A 中乙醇和乙酸乙酯残留量时, 采用 GC 法和 FID 检测器, 结果准确测出乙醇、乙酸乙酯的平均残留量分别为 0.08% 和 0.04%, 符合中国药典 2010 版对有机溶剂残留量的要求, 证明该方法适用于丹酚酸 A 中有机溶剂残留量的测定。在研究叶酸片中溶剂残留量试验中, 彭炳先等^[10]测得叶酸片 3 批样品中丙酮残留量分别为 292.6、300.4、267.4 μ g/g, 而未检测到甲醇、三氯甲烷和甲苯, 表明叶酸片有机溶剂残留量符合国家要求。中国药典 2010 一部规定了有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类的测定方法。除另有规定外, 均采用 GC 法测定有关农药残留量。顾利红等^[11-12]均采用弹性石英毛细管柱和电子捕获检测器(ECD)进行 GC 法测定有机氯类农药残留量, 前者以外标法计算供试样品中 20 种有机氯农药残留量, 后者先将样品经有机溶剂超声提取、以浓硫酸磺化后, 再用外标法计算含量, 结果有机氯农药残留

基金项目 国家自然科学基金(81260512); 云南省大理学院应用开发研究基金(Kyy201102)。

作者简介 谢苗(1989-), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物分析。*通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物防霉方面的研究。

收稿日期 2014-08-27

量均低于中国药典 2010 年版一部的规定要求。因此,该方法可作为天然药物中有机氯农药残留的检测方法。

1.2 GC-MS 联用技术在天然药物中的应用 GC-MS 联用技术是指混合物经 GC 分离成各个单一组分,再由接口进入 MS 仪进行分析测定。它集 GC 法的高速、高分离效能、高灵敏度和 MS 的高选择性于一体。天然药物分子在 MS 离子化过程中易裂解,生成碎片离子,经检测器分析检测,得出的 MS 图谱经软件包检索核对,即可对组分进行结构鉴定。由于 MS 对分析样品的纯度要求较高,可认为 GC 为 MS 分析提供色谱纯化的样品,而 MS 仪给出样品化学结构的数据信息。罗兰等^[13]利用 GC-MS 技术分析毛大丁草的挥发油成分,先采用水蒸气蒸馏法提取出其中的挥发油成分,再经 GC-MS 鉴定挥发油成分,从挥发油中鉴定了 17 个化合物,其中含量较高的成分为 Neryl(s)-2-methylbutanoate(35.99%)、4-羟基-3-甲基苯乙酮(8.74%)、棕榈酸(7.48%)等。该试验利用 GC-MS 法进行指标性成分的分析,并且运用计算机自动检索核对鉴定药材的主要成分。Liu 等^[14]在研究款冬花挥发性成分的试验中,使用水蒸气蒸馏法提取款冬花药材的挥发油成分,采取 GC 法进行分离,采取面积归一化法测定、计算各组分的相对含量,最后用 MS 检测各组分化学结构。该方法鉴定出 65 个化学成分,占总挥发油的 80% 以上,表明该方法不仅适用于检测款冬花中挥发油成分,而且可以测定各组分的含量。Li 等^[15]采用 GC-MS 联用技术,发现无花果树叶中有 121 种挥发性成分,果实中有 108 种,并且确定树叶中挥发油主要为补骨脂素、 β -大马酮、莽醇和二十二烷酸,果实中主要为糠醛、5-methyl-2-furaldehyde 和苯乙醛,表明该方法可用于无花果挥发性成分的检测。

2 高效液相色谱法(HPLC)

HPLC 法因其对混合组分具有强大的分离能力,是天然药物及其制剂含量测定的首选方法,也是应用最广泛的方法。HPLC 法的特点为:分离效率高,使用颗粒极细小、规则均匀的固定相,柱效高;选择性高,可选择不同极性的流动相,来分离极性不同的组分;分析速度快,采用高压输液泵输送流动相,流速快,一般试样的分析几分钟就可完成;高灵敏度检测器的使用提高了灵敏度,紫外检测器(UVD)的最小检测限(LOD)可达 10^{-9} g,而荧光检测器(FD)的 LOD 可达 10^{-12} g;操作自动化,仪器有自动进样装置、柱温控制器和数据处理装置;应用范围更广,由于无需考虑药物的挥发性和热稳定性,几乎可以分析一切天然药物。常见的 HPLC 法有根据流动相极性强弱区分的反相(RP)HPLC 法^[16]和正相(NP)HPLC 法^[17]以及离子抑制色谱法(ISC)和反相离子对色谱法(RP-IPC)。

2.1 HPLC 法在天然药物中的应用 天然药物及其制剂因其主要含有弱极性成分而多选用 RP-HPLC 法。固定相常为非极性键合相,如十八烷基硅烷(C_{18});流动相则是以水作为基础溶剂,再加入一定量的有机溶剂与水混溶制成的混合溶剂,有机溶剂可降低流动相的极性,因此固定相极性比流动相弱。RP-HPLC 法是其应用最广泛的的色谱法,适合分析

含有非极性至中等极性组分的天然药物。在格列风内酯含量测定的首次报道中,Niu 等^[18]采用迪马 Kromasil ODS 色谱柱,以甲醇-水(含 0.01% 三氟醋酸,0.05% 四氢呋喃)为流动相,测得 9 个样本的平均回收率为 98.77%,RSD 为 2.77%,证明该方法可以用于格列风内酯含量的测定,并且为天葵子药材质量控制提供依据。

2.1.1 色谱条件的选择对天然药物分析的影响。含有黄酮类、酚酸类成分的天然药物可选择乙腈-水-酸的混合系统作为流动相。张丽等^[19]研究青天葵药材中 7 种黄酮的含量时,就以 0.4% 磷酸-乙腈为流动相,在不同温度下测定且计算出供试品 7 种组分的色谱峰面积 RSD 分别为 1.04%、0.89%、2.61%、1.08%、0.65%、1.68% 和 2.56%,结果表明该方法可以作为黄酮的含量测定方法,而且总黄酮的量可以作为青天葵药材质量评价指标;当含有弱酸性成分时,可在流动相中加入适量醋酸等酸性试剂作为改性剂,以降低酸性药物的分解。Yu 等^[20-21]在测定阿魏酸松柏酯和有机酸时均在流动相加入适量的酸性试剂,发现在流动相中加入弱酸可以使 RP-HPLC 法更加准确、快速地进行天然药物分析,并且为其质量控制提供依据;而酸性组分较强的天然药物,也可以使用 IPC 法,常用的反离子试剂有四丁基溴化铵等。马廉举等^[22]采用 Diamonsil C_{18} 柱和 UVD 测定莽草酸含量时,在流动相中加入离子对试剂四丁基溴化铵,测出莽草酸对照品在 5~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内与峰面积明显呈线性关系,莽草酸样品的平均回收率为 97.51%,说明该方法可以准确地测定马尾松松针中莽草酸含量;当分析碱性较强的组分时,如测定小檗碱,多采用 RP-IPC 法,在酸性流动相中加入烷基硫酸盐等作为反离子试剂。鄢丹等^[23]采用 RP-IPC 法测定左金丸中 7 个生物碱的含量,并且在流动相中加入十二烷基硫酸钠(离子对试剂),使用 Diamonsil C_{18} 柱和 DAD 检测器,测得盐酸小檗碱等 7 个生物碱的 LOD 分别为 0.38、0.11、0.14、0.32、0.29、0.35、0.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$,证明该方法可用于左金丸的质量监控。

2.1.2 供试样品的制备对天然药物分析的影响。天然药物及其制剂多为复杂的混合物。在 HPLC 分析前,都需要采用一定的萃取技术或柱色谱分离方法来纯化样品。在测定赤小豆中儿茶素-7-O-B-D-吡喃葡萄糖苷的含量时,穆合塔尔·卡德尔哈孜等^[24]先比较了超声提取和加热回流萃取 2 种方法,结果表明二者提取效率相当,故选择操作简单且安全性高的超声提取。当有多种试验设计且试验效果相近时,药物分析工作者更倾向于简单快速、安全无污染的方法。陈魁霞等^[25]在测定金银花中 10 个酚酸类含量时也将样品经浓度 50% 乙醇超声 30 min 提取,再进行 HPLC 分析。

HPLC 常用的检测器为选择性检测器(如 UV),只能检测具有某些结构的药物分子。衍生化法在扩大 HPLC 应用范围、提高检测灵敏度、改善分离效能等方面是一种简单、有效的途径。翟旭峰等^[26]采用 RP-HPLC 法测定不同产地灵芝中 6 种氨基酸的含量时,用异硫氰酸苯酯将无紫外吸收的氨基酸转化为有紫外吸收的衍生物,便于用 UV 检测器(波长

254 nm) 检测,结果表明该方法适用于氨基酸的含量分析,并且为氨基酸的质量监控提供依据。

2.1.3 检测方法的选择对天然药物分析的影响。由于天然药物成分复杂,使用内标法会增加分离难度,杂质成分易干扰内标峰,在进行含量测定时多采用外标法。当药物具有紫外吸收时,检测时选择 UV 检测器;若药物分子能产生荧光,则可以使用 FD 检测器。但是,还有大部分药物没有紫外吸收,就需要使用蒸发光散射检测器(ELSD)。它是一种通用型质量检测器。在测定黄芪甲苷含量时,由于它无紫外吸收,陈海明^[27]在试验中采用 ELSD 检测器。试验结果表明,该方法可以使待测化合物达到很好地分离。试验数据也说明,ELSD 可以用于黄芪甲苷的检测。如果样品的成分比较简单,且杂质峰不干扰内标峰时,那么就可以使用内标峰测定含量。陈千良等^[28]测定知母中菝葜皂苷元含量时,发现菝葜皂苷元没有紫外吸收,ELSD 检测器是比较好的选择,以胆固醇(知母中不含有胆固醇)为内标物,它的峰并不干扰菝葜皂苷元,是较好内标物。

2.2 HPLC-MS 联用技术在天然药物中的应用 HPLC-MS 联用技术是集 HPLC 的高分离能力与 MS 的高灵敏度于一体的新技术。相比于 GC-MS 技术,HPLC-MS 对药物的热稳定性不作要求,可以分析范围更广的药物。谢婷婷等^[29]采用 HPLC-MS/MS 测定伏马毒素 B₁ 和 B₂ 的含量,HPLC 采用 C₁₈ 色谱柱,流动相为浓度 0.1% 甲酸乙腈溶液 - 浓度 0.1% 甲酸水溶液,MS 使用 ESI、正离子模式检测。试验结果表明,4 种药材伏马毒素 B₁ 的平均回收率分别为 93.7%、90.3%、92.0% 和 91.4%,伏马毒素 B₂ 的平均回收率分别为 93.9%、96.1%、92.3% 和 94.8%,另检测 10 种药材伏马毒素的总含量为 82.4 ~ 2349 μg/kg。该分析方法灵敏度高,适合于多种药材的伏马毒素限量检查,可用于药材质量控制。Du 等^[30]利用 LC-MS 测定异黄酮苷及苷元时,检测出 2 个主要未知色谱峰的结构,分别为毛蕊异黄酮苷 6'''-O-丙二酸酯和芒柄花苷 6'''-O-丙二酸酯。试验结果表明,异黄酮苷类成分药材含量高于饮片,苷元含量则低于饮片。结果证明,LC-MS 法可用于黄酮苷类成分的含量分析,并且通过软件可以鉴别未知化合物的结构。

2.3 LC-NMR 联用技术在天然药物中的应用 HPLC 虽然可以被广泛地用于天然药物、生物样品等复杂混合物的定量分析,但它只能测定已知化合物的含量,而难以检测未知物的结构信息。NMR 是测定未知待测物结构信息最有效的技术之一。相反地,NMR 对样品的纯度要求很高,样品必须为纯净物,对混合物的检测难以得到准确的结果^[31]。LC-NMR 联用技术融合了两者的优点,近年来取得巨大进步,被广泛地应用于天然药物未知成分的结构鉴定。Fan 等^[32]使用 HPLC-NMR 分析小花异裂菊,由 RP-HPLC 分离得到 3 个新的化合物,使用二维的氢谱和碳谱检测到它们的结构,并且最终确定它们的化学式。Yang 等^[33]采用 RP-C₁₈ 色谱柱对无叶假木贼进行分离,得到 6 个化合物,再利用 H-NMR 谱、C-NMR 谱以及 IR 等技术对其进行结构鉴别,得出一个新的化

合物 p-acetyl-phenol 1-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside 和 piceine 等 5 个已知化合物。

3 薄层色谱扫描法(TLCS)

TLCS 系用一定波长的光对薄层板上具有紫外吸收、可见光吸收或可以发射出荧光的斑点进行扫描,将扫描得到的图谱或数据用于鉴别和含量测定的分析方法。TLCS 可以作为 HPLC 法的补充,用于测定无紫外吸收的药物组分。采用 TLCS 法分析样品的前提是选择合适的色谱条件。该条件应能使组分完全分离,斑点对称不拖尾且有合适的 R_f。沈静等^[34]采用 TLCS 法测定游离棉酚含量,使用含浓度 0.5% CMC-Na 的硅胶 G 高效薄层板,以甲苯 - 甲酸乙酯 - 甲酸 - 丁酮(体积比 50.0:8.0:1.5:1.0)为展开剂,测定波长 550 nm,参比波长 750 nm,扫描方式双波长紫外反射法扫描。试验表明,选择该展开剂有利于棉酚与棉籽油中其他物质的分离。结果证明,TLCS 法可用于棉籽油中游离棉酚含量的测定。测定槐米中的芦丁和槲皮素含量的试验^[35]采用 TLCS 法,十二烷基硫酸钠 - 正丁醇 - 正己烷 - 水 - 甲酸为展开剂,检测波长 370 nm,参比波长 550 nm,双波长锯齿状扫描。该展开剂可以使芦丁和槲皮素完全分离,表明该方法可作为芦丁和槲皮素的含量分析方法。

4 超高效液相色谱(UPLC)

随着天然药物研究的不断深入,分析方法和分析仪器始终都向着灵敏、专一、准确、快速、微量方向发展,同时对方法和仪器的自动化、智能化和微型化提出更高的要求。一种基于小颗粒填料的液相色谱分析技术——超高效液相色谱(UPLC)应运而生。UPLC 不仅继承了 HPLC 优点,而且提高了速度、分离度和灵敏度^[36]。傅晓燕等^[37]分别采用 HPLC 和 UPLC 法对比测定 2 种川芎中阿魏酸含量,HPLC 法采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱,流动相为乙腈 - 浓度 0.085% 磷酸溶液(17:83),而 UPLC 法采用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱,流动相为乙腈 - 浓度 0.085% 磷酸溶液(15:85),检测波长均为 316 nm,2 种方法测得的阿魏酸含量均准确、可靠,但与 HPLC 相比,UPLC 法检测灵敏度更高、分析速度更快的优点使得它可以代替 HPLC 法来测定川芎药材中阿魏酸的含量。

UPLC 超强分离能力提高了目标成分与杂质的分离,降低了杂质对灵敏度的影响,所以 UPLC-MS 联用可以获得更高的灵敏度以及更好的分离效果。天然药物及其制剂成分多样,含量不等。UPLC-MS 联用技术可以对其进行分析。Zhao 等^[38]利用 UPLC-TOF-MS 技术测定知母中 7 个甾体皂苷的含量,使用 T3 色谱柱,以乙腈 - 水(浓度 0.1% 甲酸)为流动相,MS 数据采集模式是 MSE,数据采集范围为 50 ~ 1 500 D,样品的平均回收率分别为 101.30%、99.52%、99.29%、97.13%、101.98%、98.21% 和 101.57%,RSD ≤ 5%。该试验提供了一种快速分析知母中 7 种甾体皂苷含量的新方法,可用于知母药材的质量控制。

5 展望

5.1 我国天然药物的研究现状 目前,我国天然药物的研究内容主要是活性成分的提取、分离、结构鉴定及药理作用

的研究。天然药物的研究工作主要有两大类:一是在传统天然药物原有药理作用的基础上进行活性成分提取、分离;二是在活性成分已清楚的传统天然药物中,寻找且发现新的活性组分进行提取、分离。现代先进技术的快速发展使得上述两类工作可以更加简便、快速地进行,得到的活性单体再利用 IR、MS、NMR 等手段进行结构鉴定。搞清活性成分的结构,是为了探索它们的人工合成或半合成方法,也是一种新药研究的途径。新抗生素的获得就是利用天然抗生素为母体,进行化学合成加上或去掉某些基团以提高它的抗生素效率或降低其毒副作用。HPLC-MS、HPLC-NMR 等新技术的发展极大地促进了天然药物的研究,使得复杂混合体系中的微量组分也可以得到纯化分离,并且确定其化学结构。

5.2 我国天然药物研究的发展趋势 我国是天然药物原料生产大国,也是天然药物的消费大国。部分珍贵的动植物资源匮乏。从资源可持续利用的角度来看,开展大规模系统、规范的化学成分研究,建立天然药物的质量管理标准,加强知识产权保护这一政策符合我国国情。我国天然药物研究的发展趋势主要有:一是加强单一活性组分的研究,单一组分特别是活性组分的化学结构的研究是选择天然先导化合物和创制新药的基础;二是有效利用天然活性先导化合物,天然先导化合物很有希望成为治疗重大疾病的新药,而且天然产物的药理作用筛选的命中率比有机合成化合物更高;三是天然药物的生物学研究,通过药理试验研究天然药物 ADME 的动态变化及个体化、种族之间的差异;四是加强天然药物复方药效的研究,天然药物的独特疗效往往并不是通过一种药物体现,而是多种药物的联合使用的结果。复方药效是药效物质多成分、多途径、多受体的综合作用,因此研究药效物质是天然药物复方研究的核心。揭示复方药效物质基础,阐明复方药效作用机制及处方配伍关系,也是 21 世纪天然药物研究的重要内容。

5.3 天然药物的研究对我国新药创制的影响 新药创制是一项高投入、高风险、长周期的系统工程,而我国的天然药物资源丰富,经济能力较弱,从天然产物中寻找创新药物适合我国现阶段国情。天然先导化合物的发现为新药的目标化合物提供了基础结构,在天然活性成分的结构上进行系统的化学生物学的结构修饰和活性研究,分析结构对活性的影响,再进一步设计目标新药化合物。新药创制涉及分子生物学、生物工程学等多学科,又是微量分离分析技术、基因重组技术等多种技术的联合应用。我国的新药研究和国际先进水平还有很大差距,最根本的原因是基础科学研究水平较低。基础科学研究水平的提高根本在于创新。基础研究经验的累积可以开拓新的思路,从而间接地促进新药的开发。随着生命科学和各种现代新技术的发展,我国天然药物基础研究和创新药物的开发研究必将取得辉煌的成就。

参考文献

[1] 刘屏,陈凯先.我国天然药物研究的现状与未来[J].中国药物应用与监测,2007(3):1-2.
[2] 姜振元,李清,赵龙山,等. GC 法测定茺菟茎叶中 4 种挥发性成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(12):938-941.

[3] 黄善定,方海飞. 手性药物拆分的研究进展[J]. 医药导报,2005,24(8):710-712.
[4] 咎俊峰,方颖,龚占峰,等. 缬草中挥发性成分的 HS-SPME-GC 法分析[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1259-1261.
[5] 李丽丽,刘向前,高敬铭,等. 中、日、韩当归中挥发油成分研究和总香豆素含量测定[J]. 中国药师,2009,12(10):1344-1347.
[6] 肖会敏,何悦,杨倩,等. GC 法测定椒目仁油中油酸、亚油酸及 α -亚麻酸[J]. 中成药,2011,33(8):1361-1364.
[7] 李得堂,唐洪梅,蔡庆群,等. GC 法同时测定疗筋汤膜剂中冰片和薄荷脑的含量[J]. 中成药,2010,32(12):2101-2103.
[8] 逢楠楠,于勇,毕开顺,等. GC 法同时测定莞花中棕榈酸与亚油酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(1):47-50.
[9] 李志刚,倪广才,孙学伟,等. GC 测定中药丹酚酸 A 中有机溶剂残留量[J]. 中国现代应用药学,2013,30(1):59-61.
[10] 彭炳先,洪艳平,陈莉莉. 液固顶空 GC 法测定叶酸片中的有机溶剂残留量[J]. 华西药理学杂志,2008,23(2):221-224.
[11] 顾利红,郑清媛,钱浩泉. SPE-GC-ECD 法测定中成药中 20 种有机氯类农药残留量[J]. 药物分析杂志,2005,25(11):1945-1951.
[12] 李辉,吴虹,沈晨,等. 不同产地黄芪中有机氯农药残留的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):131-134.
[13] 罗兰,邓金梅,廖华卫. GC-MS 分析毛大丁草挥发油成分[J]. 中药材,2013,36(6):944-945.
[14] LIU Y F, YANG X W, WU B. GC-MS Analysis of Essential Oil Constituents from Buds of *Tussilago farfara* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2006, 15(1):10-14.
[15] LI J, TIAN Y Z, SUN B Y, et al. Analysis on Volatile Constituents in Leaves and Fruits of *Ficus carica* by GC-MS [J]. Chinese Herbal Medicines, 2011, 4(1):63-69.
[16] ZHANG W M, FU W W, SUN M Y, et al. Simultaneous determination of five nucleosides and nucleobases of *Rehmannia glutinosa* Libosch. by high performance liquid chromatography [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2011, 46(11):1380-1384.
[17] 黄秋研,王力清,刘嘉亮,等. 正相高效液相色谱法测定鱼肝油中的维生素 D3 [J]. 食品研究与开发,2012,33(11):173-175.
[18] NIU F, XIE G B, CUI Z, et al. Determination of Griffonilide in Roots of *Semiaquilegia adoxoides* by RP-HPLC [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2006, 15(3):168-171.
[19] 张丽,祝晨霞,赵钟祥,等. HPLC 法同时测定青天葵药材中 7 种黄酮的含量[J]. 药学学报,2011,46(10):1237-1240.
[20] YU Y, ZHANG Q W, WANG Y T, et al. A rapid HPLC method for determination of coniferyl ferulate in *Angelica sinensis* and *Ligusticum chuannong* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2007(16):197-201.
[21] 刘敏彦,高淑丽,刘丽华,等. HPLC 法同时测定不同产地金银花和山银花中 6 种有机酸成分[J]. 中药材,2013,36(2):196-198.
[22] 马廉举,刘新. 反相离子对色谱法测定马尾松松针中莽草酸的含量[J]. 中药材,2008,31(1):63-65.
[23] 鄢丹,廖庆文,肖小河,等. 反相离子对色谱法同时测定左金丸中 7 种生物碱的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(10):1626-1629.
[24] 穆合塔尔·卡德尔哈孜,王海涛,屠鹏飞,等. RP-HPLC 测定中药赤小豆中儿茶素-7-O-B-D-吡喃葡萄糖苷的含量[J]. 中国药理学杂志,2011,46(10):778-780.
[25] CHEN K X, ZHANG Y T, YANG X W, et al. Simultaneous quantification of ten phenolic acids in *Lonicerae Japonicae* Flos by HPLC-DAD [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2013, 22(6):521-526.
[26] 翟旭峰,郭晓蕾,朱龙,等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定不同产地灵芝中 6 种氨基酸的含量[J]. 中药材,2011,34(12):1846-1848.
[27] 陈海明. HPLC-ELSD 方法测定黄芪及其复方制剂中黄芪甲苷的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(3):426-428.
[28] 陈干良,王文全,马长华,等. HPLC-ELSD 内标法测定知母药材中菝葜皂苷元含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(3):350-353.
[29] 谢婷婷,仇峰,杨美华,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定中药材中的伏马毒素 B1 和 B2 [J]. 药学学报,2011,46(7):822-827.
[30] DU X G, BAI Y J, WANG B, et al. Analysis of Principal isoflavone glycosides and aglycones in *Radix astragalii* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2008, 17(3):230-235.
[31] RAGASA C Y, CORNELIO K B. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(5):528-533.

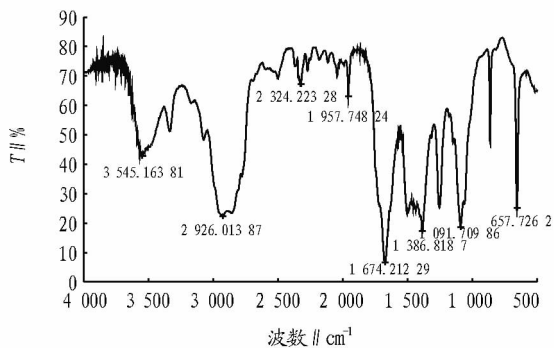


图7 可变液体池测得的DMF红外光谱图

3 结论与讨论

现代红外光谱制样技术关键是针对不同的样品类型和试验条件采用不同制样方法^[6]。选择适合的制样方法,要结合实际,从影响谱图质量的因素、样品的要求、样品的预处理和各类物相不同分子大小的样品制样方法等进行讨论,并且对不同性质、不同性质的样品确定合理的制样方法。

液体样品可以用液体法或压片浸渍法。这2种方法都能达到定性分析的要求。可测液体池法只需将液体样品滴加在窗片上,不用压片,操作简单,可避免KBr法中因KBr吸收空气中水汽而影响谱图,理论上不出现水的吸收峰,但由于液体样品并非100%纯度,因此谱图中水的吸收峰不可避免。可测液体池法不足在于:窗片易受到水或水蒸气的侵蚀,当水被它们的表面所吸收时,这些盐类会产生局部的溶解^[7],形成蚀斑或雾翳,起雾的窗片将通过它的辐射发生散射,使样品透过率降低,并且不容易清除样品在其表面留下的最后痕迹,亦即液体池窗片维护起来相当不易^[8]。对于挥发性不强的液体,可采用KBr片基浸渍法,不仅可绘制出同等效果的图谱,而且可对含水的或吸水性强的化合物进行测试,避免了晶体盐窗受损^[9]。对于未知化合物,该方法可以检测出是否有水的存在,然后决定是否用晶体盐窗制样绘制出较高质量的红外图谱^[10]。另外,KBr压片一次性使用,避免了清洗窗片的烦琐过程。相对于昂贵的液体池窗片来

说,该法成本也很低。

固体样品可用压片法和浸渍法^[11]。这2种方法都能达到定性分析的要求。压片法为常规方法,其成本低,操作简单,不足的是样品的浓度、厚度不易控制,样品太稀或太薄会使弱峰或光谱细微部分消失,样品太浓或太厚会使强峰超过零透过率而无法确定其峰位,常要返工多次才能得到高质量的红外谱图。能用低沸点有机溶剂溶解的样品可用浸渍法,制样,绘制红外图谱。该方法样品用量易控制,样品过多,可用滤纸吸掉过多的部分或将溶液稀释后另取空白KBr片浸渍;若样品过少,则可增加浸渍次数或增大溶液的浓度后另取空白KBr片测试。这种方法省去了耗时较长的重新压片过程。采取浸渍法绘制样品的红外图谱比压片法更加快速、经济、简洁易行。其局限性为:对于不能用低沸点有机溶剂溶解的样品,不能用该法,还得借助常规的压片法制样。

总之,根据自己的体会、经验和工作条件的需要,总结出一套适合于自己工作的制样方法,得到高质量的红外光谱图。

参考文献

- [1] 韩海洪,张德.现代红外光谱分析中的试样制备技术[J].青海师范大学学报,2003(1):47-51.
- [2] 吴汉福.红外光谱技术的应用[J].六盘水师范高等专科学校学报,2006,18(3):51-54.
- [3] 林德娟,尤秀丽.傅里叶变换红外光谱固体制样技术[J].光谱实验室,2003,20(1):48-50.
- [4] 朱蕾,苏艳.傅里叶红外光谱分析在环境试验中的应用[J].环境技术,2002(3):5-9.
- [5] 何旭元,陈远斗,蔡湘雯,等.基于空白KBr压片的红外光谱制样方法[J].湖南文理学院学报,2004,18(2):31-33.
- [6] 郭文芳.现代制样技术中影响因素的研究[J].工艺·材料汽车科技,2007(5):47-51.
- [7] 李攻科,胡玉玲,阮贵华.样品处理前仪器与装置[M].北京:化学工业出版社,2007:12-309.
- [8] 时亮,丁佳.红外光谱样品制备中常见问题及解决办法[J].分析仪器,1999(4):45-48.
- [9] 陈韵,史振志,徐可欣,等.溶液近红外光谱分析中温度影响的修正[J].光谱学与光谱分析,2009,28(11):46-48.
- [10] 范雪芳,徐淼,侯晓涛,等.红外光谱分析技术及其应用[J].成都医学报,2009,17(3):53-56.
- [11] 林德娟,尤秀丽.傅里叶变换红外光谱固体制样技术[J].光谱学与光谱分析,2008,19(6):27-30.

(上接第10062页)

- [32] FAN X N, LIN S, ZHU C G, et al. Minor new constituents from *Heterolepis microcephala* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(1): 82-86.
- [33] YANG Y, LI W L, GONG T, et al. Studies on the chemical constituents of *Anabasis aphylla* L. [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(12): 1523-1526.
- [34] 沈静, 阳胜, 于红, 等. 高效薄层色谱法测定棉籽油中游离棉酚含量 [J]. *光谱实验室*, 2011, 28(1): 235-238.
- [35] 周璇, 宋粉云, 钟兆健. 薄层色谱扫描法测定槐米中的芦丁和槲皮素

- [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(8): 14-15.
- [36] 陈佳, 王钢力, 姚令文, 等. UPLC和HPLC方法对丹参药材中丹酚酸B含量测定结果的对比 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(5): 749-751.
- [37] 傅晓燕, 黄巧玲. HPLC与UPLC法对比测定两种川芎药材中阿魏酸的含量 [J]. *中药材*, 2011, 34(7): 1070-1072.
- [38] ZHAO Y, KANG L P, YU H S, et al. Simultaneous determination of steroidal saponins in *Anemarrhena asphodeloides* Bge. by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2013, 22(3): 226-233.