

· 综述 ·

## 蒸发光散射检测器在中药分析中的应用

曹邦静<sup>1</sup>, 苏娟<sup>2</sup>, 叶霖<sup>2</sup>, 林珊<sup>3</sup>, 张卫东<sup>2</sup> (1. 江西中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 福建中医药大学, 福建 福州 350122)

**[摘要]** 目的 总结蒸发光散射检测器(ELSD)在天然药物分析中的优势和应用情况。方法 对有关 ELSD 在中药分析中应用的文献进行综述。结果 蒸发光散射器在中药分析、中药质量标准研究、指纹图谱、多谱联用技术及高通量筛选方面都有较广泛的应用。结论 ELSD 具有广泛的应用前景。

**[关键词]** 蒸发光散射检测器; 中药分析

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0013-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.004

## Application of evaporative light scattering detector in analysis of natural drugs

CAO Bangjing<sup>1</sup>, SU Juan<sup>2</sup>, YE Ji<sup>2</sup>, LIN Shan<sup>3</sup>, ZHANG Weidong<sup>2</sup> (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

**[Abstract]** **Objective** To summarize the advantage and application of evaporative light scattering detector(ELSD) for the analysis of natural drugs. **Methods** The application of ELSD in natural medicine analysis was reviewed in the article. **Results** ELSD in analysis of natural drugs, natural drugs quality standards research, fingerprint, multi-spectrum combination technology and high-throughput screening had been widely applied. **Conclusion** Evaporative light scattering detector had a broad application prospect.

**[Key words]** evaporative light scattering detector; quantitation of natural drugs

蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)是一种通用型质量检测器,与紫外检测器、荧光检测器、示差折光检测器、质谱检测器和核磁共振检测器共同用于检测自然界中几乎所有的物质,可弥补在 HPLC 中应用最广的紫外检测器对检测物质必须具有吸收紫外光的生色团的要求。ELSD 作为一种浓度型检测器,在无紫外或紫外末端吸收的未知化合物的纯度检测过程中,显示出极大的优越性;与荧光检测器相比,其样品检测范围也不仅限于荧光物质;与示差检测器相比,它避免了对工作环境、流速、温度的苛刻要求和无法进行梯度洗脱的局限性;与质谱检测器和核磁共振检测器相比,又具有较大的价格优势。本文综述了近年来蒸发光散射检测器在中药分析中具有代表性的应用。

### 1 ELSD 的工作原理

ELSD 利用流动相与被检测物质之间蒸气压的相对差异,在流动相挥发除去的基础上,不挥发性的组分粒子可以使从激光光源中发出的光受到散射,散射光信号被硅光二极管记录并通过信号输出。

ELSD 的基本构造由雾化器、加热漂移管和光散射池组成,检测主要分为 3 个步骤:①用惰性气体(如 N<sub>2</sub>、He 等)雾化色谱柱洗脱液;②流动相在加热的漂移管中蒸发;③样品颗粒散射光以后得到检测。即雾化-蒸发-检测 3 个步骤。

### 2 ELSD 的优点

蒸发光散射检测器(ELSD)最大的优势在于能检测不含发色团的化合物,响应不依赖于样品的光学特性,任何挥发性低于流动相的样品均能被检测,低温下也能使用。ELSD 常与 HPLC 联用,用于化合物的分析检测。而且,ELSD 与 HPLC-MS 的色谱要求一致,二者可通用。

### 3 ELSD 的应用

**3.1 在中药特定化学成分群分析中的应用** 中药的化学成分复杂,有一部分成分无紫外吸收或仅在

**[作者简介]** 曹邦静,硕士研究生。Tel: 13918220650; E-mail: caobangjing@163.com

**[通讯作者]** 张卫东。Tel: (021) 81871244; E-mail: wdzhangy@hotmail.com

紫外末端有吸收,加上色谱分离的困难以及流动相带来的干扰,使用传统的紫外检测器对其进行定性定量分析十分困难。ELSD在一定程度上弥补了这些不足,在紫外检测器的弱势检测区如皂苷类、糖类、萜类与部分生物碱类成分以及其他一些成分的分析过程中,发挥了重要的作用,为中药化学成分分析提供了支持。

**3.1.1 糖类成分的分析** 糖类成分大多不存在紫外吸收,以前主要采用分光光度法对这类成分进行定量分析,但只能测定总糖含量,灵敏度和准确度较差。近年来,国内有不少 HPLC-ELSD 法测定中药材及其提取物中单糖的报道。嵇文亚等<sup>[1]</sup>使用 Zorbax RX-SIL 柱,以乙腈-水作为流动相梯度洗脱,采用 HPLC-ELSD 法同时测定熟地黄中果糖、葡萄糖含量,取得了较好的分离度。王志斌等<sup>[2]</sup>采用 HPLC-ELSD 法测定了麦冬药材及其提取物中果糖的含量,色谱条件是 Inertail-NH<sub>2</sub> 柱,乙腈-水(78:22)为流动相。赵奎君等<sup>[3]</sup>采用 Alltech Pevail Carbohydrate ES 色谱柱,乙腈-水(80:20)为流动相,采用 HPLC-ELSD 方法,对 20 批肉苁蓉和管花肉苁蓉中半乳糖醇进行分析,平均回收率( $n=5$ )分别为 100.34% 和 101.11%,RSD 分别为 1.72% 和 1.33%。

**3.1.2 皂苷类成分的分析** 皂苷类成分大多无紫外吸收,或仅在紫外末端有吸收,使用紫外检测法进行检测时容易受到试剂的干扰。应用 HPLC-ELSD 可以避免紫外检测器的不足,较好地检测皂苷成分。ELSD 应用于皂苷类成分分析的例子比较多。张军武等<sup>[4]</sup>采用 HPLC-ELSD 法测定不同生长年限黄芪中黄芪甲苷的含量,色谱柱为 Hypersil C<sub>18</sub> 柱,流动相为乙腈-水(32:68),方法学考察结果良好。Sun 等<sup>[5]</sup>采用 HPLC-ELSD 法同时对人参中人参皂苷进行定量,结果 19 种人参皂苷分离效果良好。Huang 等<sup>[6]</sup>采用 HPLC-ELSD 法同时对柴胡中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、6''-乙酰柴胡皂苷 a、3''-乙酰柴胡皂苷 d、6''-乙酰柴胡皂苷 d 的含量进行了测定。使用 Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱,乙腈-水作为流动相梯度洗脱。ELSD 参数为:漂移管温度 40℃,氮气流速 3.5 L/min。分析时间短,分离效果良好。

**3.1.3 生物碱类成分的分析** 由于贝母类生物碱在结构上无共轭双键,很难用 HPLC-UV 法直接测定;用柱前衍生化的 HPLC-UV 法和气相色谱(GC)分析方法测定贝母生物碱的含量也存在一定的问题,而 HPLC-ELSD 可以很好地测定贝母药材中的主要生物碱。薛燕等<sup>[7]</sup>利用 HPLC-ELSD 法定量测定了几十种不同产地来源的浙贝母中的贝母素甲和贝母素乙的含量,使用 XTerra RP<sub>18</sub> 色谱柱,乙腈-

碳酸氢铵(pH=10.10)梯度洗脱。ELSD 参数:漂移管温度 85℃,氮气压力 0.2 MPa,增益 50。结果表明,浙贝母中的贝母素甲及乙能够获得很好的分离,且分离度及重现性较好。黄林芳等<sup>[8]</sup>利用 HPLC-ELSD 法测定了川贝母中 3 种生物碱贝母辛、贝母甲素和贝母乙素的含量,色谱条件为 Waters XTerra® MS C<sub>18</sub> 柱,以乙腈-水-碳酸氢铵(pH=10.10)流动相。钱敏等<sup>[9]</sup>采用 HPLC-ELSD 法对太白贝母中几种主要生物碱的测定,也为贝母的质量标准建立提供了依据。

**3.1.4 内酯类成分的分析** 中药中萜类化合物以二萜和倍半萜常见,有的以内酯形式存在,其紫外吸收一般都在较低波长范围内,如银杏酮酯中萜类内酯无 C=C 双键和共轭结构,无法采用紫外检测器进行检测,使用 ELSD 作为检测手段可以取得较好的效果。王海涛等<sup>[10]</sup>采用该方法测定舒血宁注射液配伍溶液中银杏内酯含量,使用 Phenomenex C<sub>18</sub> 柱,流动相为甲醇-四氢呋喃-水(20:10:75),为保证舒血宁注射液的临床疗效和保障临床用药的安全提供了有力的技术支持。白娟等<sup>[11]</sup>采用 HPLC-ELSD 法,测定银杏酮酯软胶囊中银杏内酯 A、B、C 及白果内酯的含量,色谱条件为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱,正丙醇-四氢呋喃-水(1:25:74)为流动相,ELSD 漂移管温度 40℃,氮气流速 3.5 L/min,分离良好且阴性对照溶液无干扰。

**3.2 在多成分群中药质量标准中的应用** 目前,有相当大的一部分中药,其中所含的主要成分、活性成分或者质量控制的目标成分均没有紫外吸收或仅在紫外末端有吸收,给质量控制工作带来了一定的困难。采用 HPLC-ELSD 方法,针对于那些没有紫外吸收或末端吸收的目标成分,可以对中成药、中药饮片及配方颗粒建立科学准确的质量控制方法。方惠娟等<sup>[12]</sup>采用 HPLC-DAD-ELSD 串联技术,同时测定蒺藜中黄酮苷元和皂苷元成分的含量,为蒺藜的全面质量控制提供了一定的科学依据。近来有许多采用 HPLC-ELSD 方法对中药复方进行质量控制的报道,如在血府逐瘀胶囊的研究中,采用 HPLC-ELSD 法同时测定苦杏仁苷、芍药苷、柚皮苷的含量,3 个成分均能达到基线分离,平均回收率分别为苦杏仁苷 97.47%,RSD 为 2.1%( $n=6$ );芍药苷 99.19%,RSD 为 1.9%( $n=6$ );柚皮苷 98.38%,RSD 为 1.3%( $n=6$ )。该方法简便、可靠、重现性好,可作为血府逐瘀胶囊的质量控制方法<sup>[13]</sup>。三七消散丸质量标准研究<sup>[14]</sup>、通窍鼻炎颗粒质量标准的研究<sup>[15]</sup>等采用 HPLC-ELSD 法来定量,也都取得了良好的结果。

**3.3 在中药指纹图谱中的应用** 中药指纹图谱的

研究是目前较多使用 HPLC-UV/DAD 系统的领域,它可以比较全面地反映中药所含内在化学成分的种类和数量,但是不能使弱紫外吸收成分和无紫外吸收成分在指纹图谱中有所体现。ELSD 是通用型检测器,如果选择适当的色谱条件和仪器参数,在确保其稳定性和精密度的前提下,应用于中药指纹图谱的建立,可以全面地控制中药中的整体物质群,更符合中药指纹图谱的要求。采用 HPLC-ELSD 指纹图谱研究比较成功的有河北道地药材知母的指纹图谱研究,首次采用 HPLC-ELSD 法建立了河北道地药材中知母皂苷类成分的指纹图谱,并对不同产地的知母进行了相似度比较,为建立符合规模化生产的知母药材基地提供更多的科学数据,为知母药材及其提取物质量标准的完善提供了科学依据<sup>[16]</sup>。曹进等<sup>[17]</sup>运用 HPLC-ELSD 建立了复方清开灵注射液的指纹图谱,对其中 7 种有效成分进行了定量测定,方法学考察结果良好;通过指纹图谱相似度评价软件,对 10 批清开灵注射液的 HPLC-ELSD 指纹图谱进行了相似度计算,结果表明,10 批样品相似度良好。该方法为中药质量控制提供了一种可以同时实现整体定性、指标成分定量且简便易行的模式。

**3.4 在多谱联用技术中的应用** ELSD 和质谱、波谱或其他色谱进行联用,可以起到互为补充的作用。ELSD 可以作为流速暂停液相色谱-核磁分析系统(LC-NMR)在线检测器,在 NMR 记录化合物波谱数据的同时,记录下化合物保留时间、纯度状况等色谱数据<sup>[18]</sup>。此外,ELSD 可以方便的和 UV/DAD 串联,同时记录数据信号,可以保证在每一次的分析中得到的信息更全面。严诗楷等<sup>[19]</sup>采用所建立的 HPLC-DAD-ELSD 方法,同时定量测定了清开灵注射液中 5 类不同结构类型的 9 种化合物,方法简便易行,分析结果准确可靠,为中药复杂体系的多组分同时定量测定及其质量控制提供了一条新的思路。成洪达等<sup>[20]</sup>在对六味地黄丸的研究中,将紫外检测器的高灵敏性和蒸发光散射检测器的通用性结合起来,结果显示,紫外检测器共检测到 156 个峰,蒸发光散射检测器检测到 195 个峰,其中 41 个色谱峰为共有峰,对样品进行了更全面的分析,适宜于对中药的指纹图谱研究和质量控制。

**3.5 在高通量筛选中的应用** 由于结构的多样性,很多定量天然产物的方法受到限制。Dalisay 等<sup>[21]</sup>通过整合以重氢为溶剂的<sup>13</sup>C-NMR 特征峰来量化天然产物的摩尔量。虽然 NMR 方法准确适用,但是样品制备和分析时间使其用于大量的天然产物受到限制。ELSD 代替了 NMR,它的使用在量化组合库上取得了巨大的成功。在天然产物的研究中,当

化合物缺乏生色团时,ELSD 是液相色谱定量的首选检测器。Johnson 等<sup>[22]</sup>构建了以 LC-MS-UV-ELSD 为基础建立天然产物库的方法,适合高通量筛选,且用 ELSD 检测到一种新的缺乏生色团的化合物-aignopsanoic acid B。此外,Camp 等<sup>[23]</sup>最近采用 RP HPLC-UV-ELSD,研究一个两步分馏法生成类似药物理化性质的天然产物库。随后,高通量筛选了 202 983 个化合物,产生了 60 个对抗疟疾和 58 个对抗锥虫病的活性化合物。自动化程度的提高,增加产生大量的天然产物库的可行性。采用低湿蒸发光散射检测器(low-temperature evaporative light scattering detectors, ELSD-LT)定量天然产物,通过建立平均校准曲线对天然产物的“通用”量化进行评估<sup>[24]</sup>。ELSD-LT 硬件和参数的优化提高了灵敏度和通量,并将 ELSD-LT 用于大型天然产物库的量化。作为一种通用型检测器,ELSD 在高通量药物筛选研究领域发挥了重要的作用。

#### 4 结语

ELSD 最大的局限性是它的流动相必须能够全部蒸发,以避免不挥发物沉积在加热室及光学检测池体中。因此,只能使用挥发性化合物来调节流动相的 pH,例如氨、乙酸和三氟乙酸等。ELSD 的灵敏度还不是很理想,如果采用微径色谱柱,将会大大提高其灵敏度。另外,ELSD 的数据处理问题尚需做进一步的深入探讨。虽然 ELSD 还有一些不足的地方,不可能完全代替 UV 检测器,但是对于一些弱紫外吸收或无紫外吸收成分的分析,ELSD 在定量分析中发挥了重要作用;在定性鉴别的研究中,ELSD 也可以比较全面地反映样品的信息。随着检测技术和仪器本身的不断完善,相信 ELSD 会起到越来越重要的作用。

#### 【参考文献】

- [1] 稽文亚,周利艳,孟江. HPLC-ELSD 法同时测定熟地黄中果糖、葡萄糖含量[J]. 齐鲁药事,2007,26(6):338-340.
- [2] 王志斌,陈有根,李慧. HPLC-ELSD 法测定麦冬药材及其提取物中果糖的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(2):47-48.
- [3] 赵奎君,梁丽娟,毕丹,等. HPLC-ELSD 测定肉苁蓉及管花肉苁蓉中半乳糖醇含量[J]. 中国中医药信息杂志,2012,8(19):52-54.
- [4] 张军武,赵琦,王昌利. 不同生长年限黄芪中黄芪甲苷的含量测定[J]. 西部中医药,2012,3(25):30-31.
- [5] Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, et al. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from Panax ginseng by HPLC-ELSD[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(1): 15-22.
- [6] Huang HQ, Zhang Xi, Xu ZX, et al. Fast determination of sai-

- kosaponins in Bupleurum by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 1048-1055.
- [7] 薛 燕, 顾好粮. HPLC-ELSD 法测定浙贝母中主要生物碱的含量[J]. *药学报*, 2005, 40(6): 550-552.
- [8] 黄林芳, 陈士林, 刘 辉, 等. HPLC-ELSD 测定不同加工方法川贝母中 3 种生物碱[J]. *中成药*, 2009, 10(31): 1560-1564.
- [9] 钱 敏, 彭 锐, 马 鹏. 太白贝母中几种主要生物碱的 HPLC-ELSD 测定[J]. *重庆中草药研究*, 2011, 12(2): 24-30.
- [10] 王海涛, 冯志琼, 蔡海燕, 等. HPLC-ELSD 法测定舒血宁注射液配伍溶液中内酯含量[J]. *世界中医药*, 2011, 11(6): 530-531.
- [11] 白 娟, 张 洁, 李成网. HPLC-ELSD 法测定银杏酮酯软胶囊中萜类内酯的含量[J]. *化学分析计量*, 2012, 1(21): 64-66.
- [12] 方惠娟, 毕开顺, 钱忠直, 等. HPLC-DAD-ELSD 测定藜藜中 5 个活性成分含量[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(6): 966-969.
- [13] 高 颖, 高文远, 董 玄, 等. HPLC-ELSD 法测定血府逐瘀胶囊中苦杏仁苷、芍药苷和柚皮苷[J]. *中草药*, 2009, 11(40): 1756-1758.
- [14] 李素梅, 江志强, 孙冬梅. 三七消散丸质量标准研究[J]. *中医研究*, 2010, 7(23): 17-20.
- [15] 桑育黎, 郝延军. 通窍鼻炎颗粒质量标准研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17): 83-85.
- [16] 张志斐, 肖 蓉, 袁志芳, 等. 河北道地药材知母 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(11): 1569-1573.
- [17] 曹 进, 徐 燕, 张永知, 等. 清开灵注射液 HPLC-ELSD 指纹图谱建立及质量相关性研究[J]. *分析化学*, 2004, 32(4): 469-473.
- [18] Petfitts K, Gellaizeau I, Elfakir C, *et al.* Evaporative light scattering detection for in-line monitoring of stopped-flow liquid chromatography-nuclear magnetic resonance analysis of compounds with weak or no chromophore groups[J]. *J Sep Sci*, 2002, 25(9): 593-600.
- [19] 严诗楷, 辛文峰, 罗国安, 等. 应用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器联用技术同时测定清开灵注射液中的五类有效成分[J]. *色谱*, 2005, 5(23): 482-486.
- [20] 成洪达, 邢占芬, 李 彤, 等. 双检测器串联色谱柱分析六味地黄丸[J]. *四川大学学报*, 2011, 1(48): 159-162.
- [21] Dalisay DS, Molinski TF. NMR quantitation of natural products at the nanomole scale[J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(4): 739-744.
- [22] Johnson TA, Sohn J, Inman WD, *et al.* Natural product libraries to accelerate the high-throughput discovery of therapeutic leads[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(12): 2545-2555.
- [23] Camp D, Davis RA, Campitelli M, *et al.* Drug-like properties: guiding principles for the design of natural product libraries[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(1): 72-81.
- [24] Adnani N, Michel CR, Bugni TS. Universal quantification of structurally diverse natural products using an evaporative light scattering detector[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4): 802-806.
- [收稿日期] 2013-03-28 [修回日期] 2013-12-04  
[本文编辑] 陈 静

(上接第 12 页)

- [13] Li J, Huang S, Shao K, *et al.* A choline derivate-modified nano-probe for glioma diagnosis using MRI[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1623.
- [14] Malcor JD, Payrot N, David M, *et al.* Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(5): 2227-2241.
- [15] Zhang B, Sun X, Mei H, *et al.* LDLR-mediated peptide-22-conjugated nanoparticles for dual-targeting therapy of brain glioma[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(36): 9171-9182.
- [16] Zhu L, Wang H, Wang L, *et al.* High-affinity peptide against MT1-MMP for *in vivo* tumor imaging[J]. *J Control Release*, 2011, 150(3): 248-255.
- [17] Gu G, Gao X, Hu Q, *et al.* The influence of the penetrating peptide iRGD on the effect of paclitaxel-loaded MT1-AF7p-conjugated nanoparticles on glioma cells[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(21): 5138-5148.
- [18] Li J, Feng L, Fan L, *et al.* Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4943-4950.
- [19] Guo J, Gao X, Su L, *et al.* Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(31): 8010-8020.
- [20] Gao H, Qian J, Cao S, *et al.* Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(20): 5115-5123.
- [21] Gao JQ, Lv Q, Li LM, *et al.* Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(22): 5628-5639.
- [22] Paleček J, Dräger G, Kirschning A. A practical large-scale synthesis of cyclic RGD pentapeptides suitable for further functionalization through 'click' chemistry[J]. *Synthesis*, 2011, (4): 653-661.
- [23] Zhang P, Hu L, Yin Q, *et al.* Transferrin-modified c[RGDfK]-paclitaxel loaded hybrid micelle for sequential blood-brain barrier penetration and glioma targeting therapy[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(6): 1590-1598.
- [24] Sugimoto Y, Tsukahara S, Imai Y, *et al.* Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(1): 105-112.
- [25] Tian W, Ying X, Du J, *et al.* Enhanced efficacy of functionalized epirubicin liposomes in treating brain glioma-bearing rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41(2): 232-243.
- [26] He H, Li Y, Jia XR, *et al.* PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(2): 478-487.
- [27] Du J, Lu WL, Ying X, *et al.* Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals[J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(3): 905-917.
- [收稿日期] 2013-11-12 [修回日期] 2014-04-21  
[本文编辑] 陈 静