

應用高效液相層析法分析中藥成份層析譜峰的純度研究

顧巧珠 鍾玉山 谷 皓

生物技術開發中心 藥物傳遞組

摘 要

應用光電二極體陣列檢測器—高效液相層析儀(DAD-HPLC)分析七種中藥標準品來探討分析譜峰純度,在不同濃度每一濃度打三次HPLC分析,然後兩兩相比較以求得SI值,由SI值和濃度的比較可以明顯的看出SI值會受濃度的影響。當應用參考標準品和分析譜峰的吸收光譜的比對來確認分析譜峰時,因為移動相梯度變化會影響分離管柱的平衡,造成分析譜峰滯留時間和背景(background)的變動,致使參考標準品和分析譜峰之吸收光譜比對無法吻合,經扣除基線的吸收光譜後再比較吸收光譜圖,可以得到較好的結果。本研究亦探討在HPLC分析時執行時間不足對樣品分析所造成的影響,以清氣化痰湯為例,在正常情況分析時整個執行時間是60 min,如果將執行時間改為20 min時連續做八次HPLC分析,可以明顯的看出hesperidin譜峰逐漸受到前次殘餘物之堆疊而影響積分面積。

前 言

中藥方劑通常由許多不同的天然藥材組合而成,經煎煮後飲用;或經濃縮製成中藥濃縮製劑。由於中藥方劑受藥材來源、產地氣候、煎煮過程之不同,而有很大的影響,故中藥藥材和製劑之品質很難掌握。近年來利用定量中藥濃縮製劑中指標成份以做為品質保證依據的報告甚多⁽¹⁻⁷⁾。有關中藥指標成份分析的研究,高效液相層析儀(HPLC)是最常被應用做為定量分析的工具。開發一個HPLC分析方法應用在品質管制和品質保證時,譜峰純度(peak purity)的鑑定非常重要,如果有不純物隱藏在分析譜峰時,將曲解分析結果。應用光電二極體陣列檢測器(diode-array detector, DAD)在HPLC分析時,所獲得的光譜資料可以用來判定譜峰純度。有關譜峰純度和確認的文獻報告⁽⁸⁻¹⁶⁾非常多,有許多譜峰純度演算的方法被提出,這些方法包括:(1)從譜峰的上升部份(upslope),頂點(apex),和下降部(downslope)各取光譜做比較,(2)在分析譜峰前後的時間範圍測量不同波長的吸收比,(3)

比較不同波長所測量的譜峰面積比,(4)比較三度空間的光譜。不論採用何種演算方法來分辨譜峰純度,分析譜峰的濃度和背景(background)皆會影響譜峰純度的判定。中藥的成份非常複雜,而且有些指標成份含量非常低,為了解中藥指標成份在譜峰純度判定時,所允許的最低濃度和受背景的影響,選擇七種常被選為指標成份的標準品,各配成十二種不同濃度,每一濃度打三次HPLC分析,然後兩兩相比較以求得SI(Similarity Index)值,由SI值和濃度的關係,估算譜峰純度判定的最低濃度。有關HPLC分析時執行時間(running time)不足對樣品分析所造成的影響,在本文中亦加以探討。

材料與方法

一、材料

(一)標準品

1. Wogonin (Nacalai Tesque)
2. Berberine·HCl (Nacalai Tesque)
3. Glycyrrhizin (Nacalai Tesque)

高效層析條件

sample	colmn	mobile phase (v/v)	UV (nm)	flow rate (ml·min)
Wogonin	VERCOPAK inertsil 5um ODS2 250×4.6mm	0.1% H ₃ PO ₄ /CH ₃ CN/MeOH =46/27/27	220-360	1
Berberine.HCl	同上	0.5% AcOH/CH ₃ CN=60/40	250-360	1
Glycyrrhizin	同上	0.1% H ₃ PO ₄ /CH ₃ CN=50/50	220-290	1
Ephedrine	同上	CH ₃ CN/TEA/H ₃ PO ₄ /H ₂ O =1.8/0.1/0.1/98	220-360	1
Hesperidin	同上	(1.8% CH ₃ CN, 0.1% TEA, 0.1% H ₃ PO ₄ /H ₂ O)/CH ₃ CN=75/25	250-340	1
Ferulic acid	同上	(1.8% CH ₃ CN, 0.1% TEA, 0.1% H ₃ PO ₄ /H ₂ O)/CH ₃ CN=85/15	260-360	1
Cinnamic acid	同上	0.1% H ₃ PO ₄ /CH ₃ CN=73/27	220-360	1
清氣化痰湯	同上	0.5% AcOH/CH ₃ CN=78/22	285	1
神秘湯	同上	*	225	1

*solvent A : 5mM tetra-n-butylammonium hydroxide, adjusted to pH=6 with H₃PO₄

solvent B : CH₃CN

跑gradient(方法如下):

Running time (min)	solvent	
	A(%)	B(%)
0	80	20
30	70	30
60	45	55

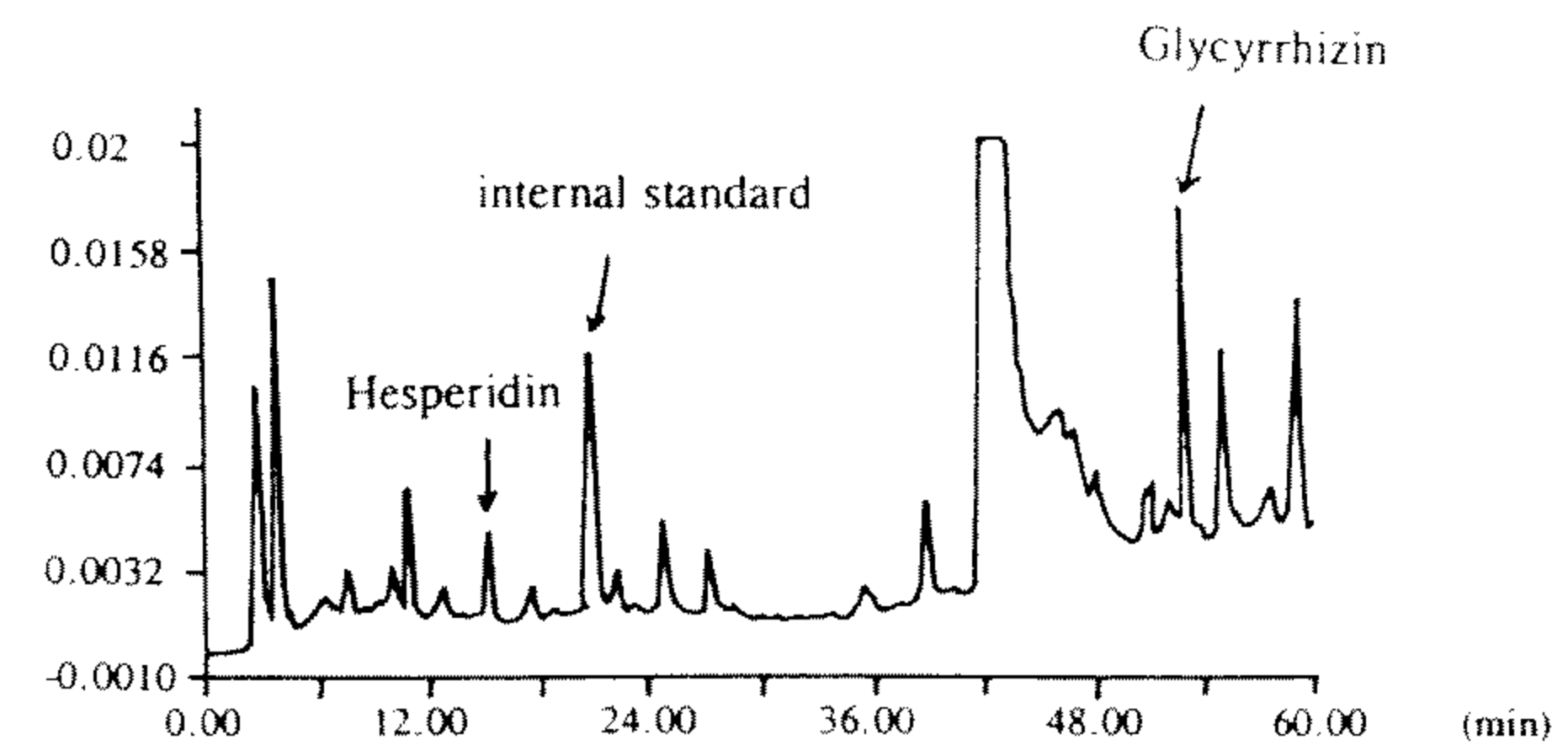


Figure 1. HPLC chromatogram of Shen Mi Tang.

- 4. Ephedrine (Nacalai Tesque)
- 5. Hesperidin (Nacalai Tesque)
- 6. Ferulic acid (Janssen)
- 7. Cinnamic acid (Nacalai Tesque)

(二)中藥製劑

- 1. 神秘湯(市售中藥濃縮製劑)
- 2. 清氣化痰湯(市售中藥濃縮製劑)

(三)試藥

- 1. Tetra-butylammonium hydroxide (Fluka,試藥級)
- 2.Phosphoric acid (Merck,試藥級)
- 3. Acetonitrile (BDH, HPLC級)
- 4. Methanol (BDH, HPLC級)

- 5. Triethylamine (Merck,試藥級)
- 6. Acetic acid (Merck,試藥級)

二、實驗方法

(一)標準溶液之配製

Table 1是七個標準品各稱四個不同之重量,置於10 ml之容量瓶中,用MeOH稀釋至標線,而後每個樣品皆稀釋至原來的1/10,接著再稀釋一次(為1/10);故每一標準品共配成12個不同的濃度。每一樣品每一次注射量皆為20 ul。

(二)檢品之配製

1. 神秘湯

稱0.514g神秘湯置於10 ml容量瓶內,加

入5 ml 50% MeOH,以超音波振盪10 min;再加50% MeOH至10 ml,離心10 min (13,000 rpm)。以2.3 μ m濾膜過濾。

2.清氣化痰湯

稱0.514g清氣化痰湯置於10 ml容量瓶內,加入5 ml 50% MeOH,以超音波振盪10 min;再加50% MeOH至10 ml,離心10 min (13,000 rpm)。以2.3 μ m濾膜過濾。

三、高效液相層析法

(一)高效液相層析系統

HPLC pump : Spectra-Physics SP8800

UV Detector : Spectra-Physics spectra focus

Integrator & controler : IBM PC

Autoinjector : Shimadzu SIL-9A

(二)高效液相層析條件

如附表

結果與討論

一、譜峰純度

有關譜峰純度的探討主要分為三項逐步探討:

(一)樣品之吸收光譜需扣除基線;(二)定義“SI”值;(三)如何以SI值做為譜峰純度之界限指標。

(一)樣品之吸收光譜需扣除基線。

以神秘湯為例

圖一是神秘湯之HPLC圖譜,藉由樣品與標準品吸收光譜圖的比對來確認所找到的譜峰正確無誤。然而溶媒之梯度變化影響分離管(column)平衡狀態之再現性,造成譜峰滯留時間(Retention

Time)的變動;譜峰出現的位置不同,背景也就不同,進而影響了光譜的吸收值,致使樣品與標準品之吸收光譜無法完全吻合(圖二),但經扣除基線後可改善此一缺失(將波峰的光譜吸收值扣除前波谷的光譜吸收值),得到吻合較佳的圖譜(圖三)。

(二)定義“SI”值

“SI”是Similarity Index,其計算法是將標準品的譜峰與樣品的譜峰之光譜吸收值相除:

1.若樣品很純則得到下圖圖四a⁽¹⁷⁾,則所有波長之比值都趨近於同一線上

2.若樣品中含有雜值,則所有波長之比值並非都同一線上(圖四b)⁽¹⁷⁾。

而後將所有比值中之最大值除以最小值即是SI值,SI值愈接近1表純度愈高。

(三)如何以SI值輔助peak purity之界定

不同的樣品其吸收圖譜各不相同,因此在計算SI值時應先選定適當之波長範圍,原則上以吸收光譜最高吸收峰之左右兩側的波谷為起迄點。又不同的樣品對UV偵測器的感度(response)也不同,會影響SI值的計算。所以在這裡選擇了七個常用的中藥標準品wogoninn, berberine•HCl, glycyrrhizn, ephedrine, hesperidin, ferulic acid, 和 cinnamic acid,計算它們在不同濃度時之SI值,找出各個標準品能計算SI值之最低濃度(濃度愈低,背景之影響愈大,致使無法計算SI值);根據吸收光譜比對的結果以及SI值,做為判斷譜峰純度時的界限指標。表二至表八是各標準品於不同濃度下,每一濃度皆打三次,然後兩兩比較計算SI值,表中空白部份表示無法計算SI值。由表二至表八中可看出不同的標準品其能計算SI值之最低濃度皆各不相同,其能計算SI值的最低濃度分別為:ephedrine 0.013 mg/ml, hesperidin 0.005 mg/ml, glycyrrhizin 0.074 mg/ml, ferulic acid 0.003 mg/ml, wogonin 0.027 mg/

Table 1. The concentrations of seven kinds of standards (mg/ml)

standard												
Wogonin	1.099	0.868	0.517	0.268	0.1099	0.0868	0.0517	0.0268	0.011	0.0087	0.0052	0.0027
Berberine.HCl	0.41	0.19	0.11	0.04	0.041	0.019	0.011	0.004	0.0041	0.0019	0.0011	0.0004
Glycyrrhizin	0.74	0.44	0.29	0.18	0.074	0.044	0.029	0.018	0.0074	0.0044	0.0029	0.0018
Ephedrine	2.511	1.275	0.782	0.351	0.2511	0.1275	0.0782	0.0351	0.0251	0.0128	0.0078	0.0035
Hesperidin	0.522	0.401	0.245	0.111	0.0052	0.04	0.025	0.011	0.0052	0.004	0.0025	0.0011
Ferulic acid	0.39	0.29	0.2	0.09	0.039	0.029	0.02	0.009	0.0039	0.0029	0.002	0.0009
Cinnamic acid	0.102	0.077	0.050	0.025	0.0102	0.0077	0.0050	0.0025	0.0010	0.0008	0.0005	0.0003

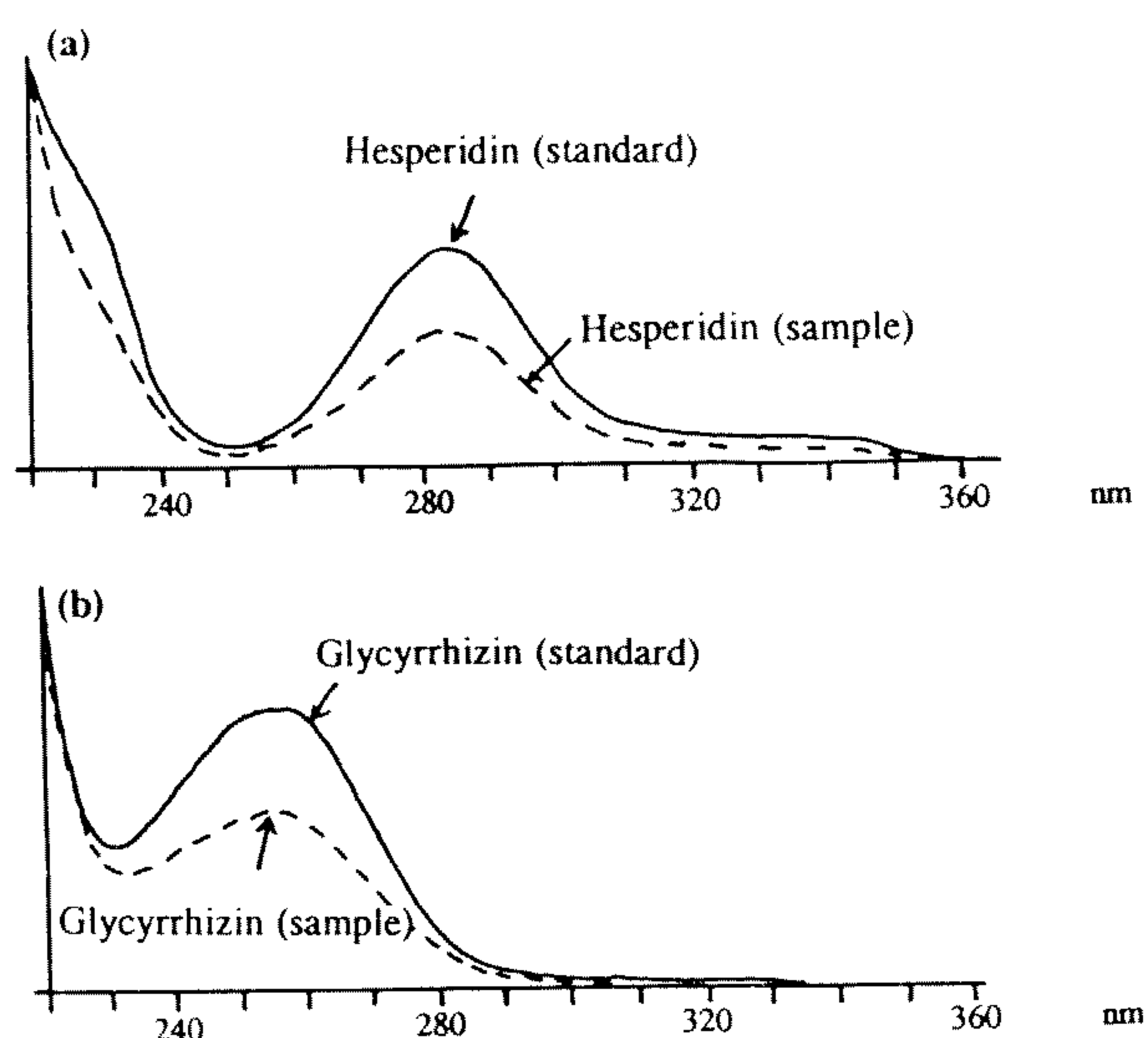


Figure 2. Absorption spectra of (a) Hesperidin (b) Glycyrrhizin in Shen Mi Tang compared with standard.

ml, cinnamic acid 0.0005 mg/ml 和 berberine·HCl 0.0041 mg/ml, 其中 ephedrine 在 0.008 mg/ml 的 SI 值為 1.515 和 wogonin 在 0.005 mg/ml 的 SI 值為 2.187, 由於這些 SI 與 1 相差較大, 不予接受其純度。以 SI 值來判定分析譜峰的純度, 並無絕對的界定值, SI 值的界定標準取決於對分析譜峰純度要求的要求程度愈高。從各標準品的濃度與 SI 值之間看出一個大致的趨勢, 即濃度愈低則 SI 值愈偏離 1。因為不同的化合物有不同的吸收光譜波形, 因此很難定一個 SI 值去界定所有化合物的純度, 只能以 SI 值做為輔助的參考數據, 並配合化合物與標準品吸收光譜之疊合情形, 來斷定化合物之純度, 若是主吸收峰偏離, 可能是雜質所致; 若是在波谷處疊合程度不佳, 除了是雜質的影響外, 也可能是背景之影響。中藥指標成份在方劑中有時含量非常低, 進行分析時易受背景影響, 因此在做譜峰純度判定時, 特別要考慮背景的影響, 以避免誤判。

二、探討 running time 不足對 sample 分析所造成的影響

圖五是清氣化痰湯連續打 8 次, 每次分析時間為 20 min 的層析圖譜, 由圖五b 中可以明顯的看出在第三次分析時, 於滯留時間 2 min 位置多出一個很大的譜峰, 而在 13.0 min 位置也多出一個譜峰, 當第八次分析時 (圖五c) 2 min 的譜峰變得更寬大, 而在 11.9 min 和 14.5 min 各有一個譜峰, 其中

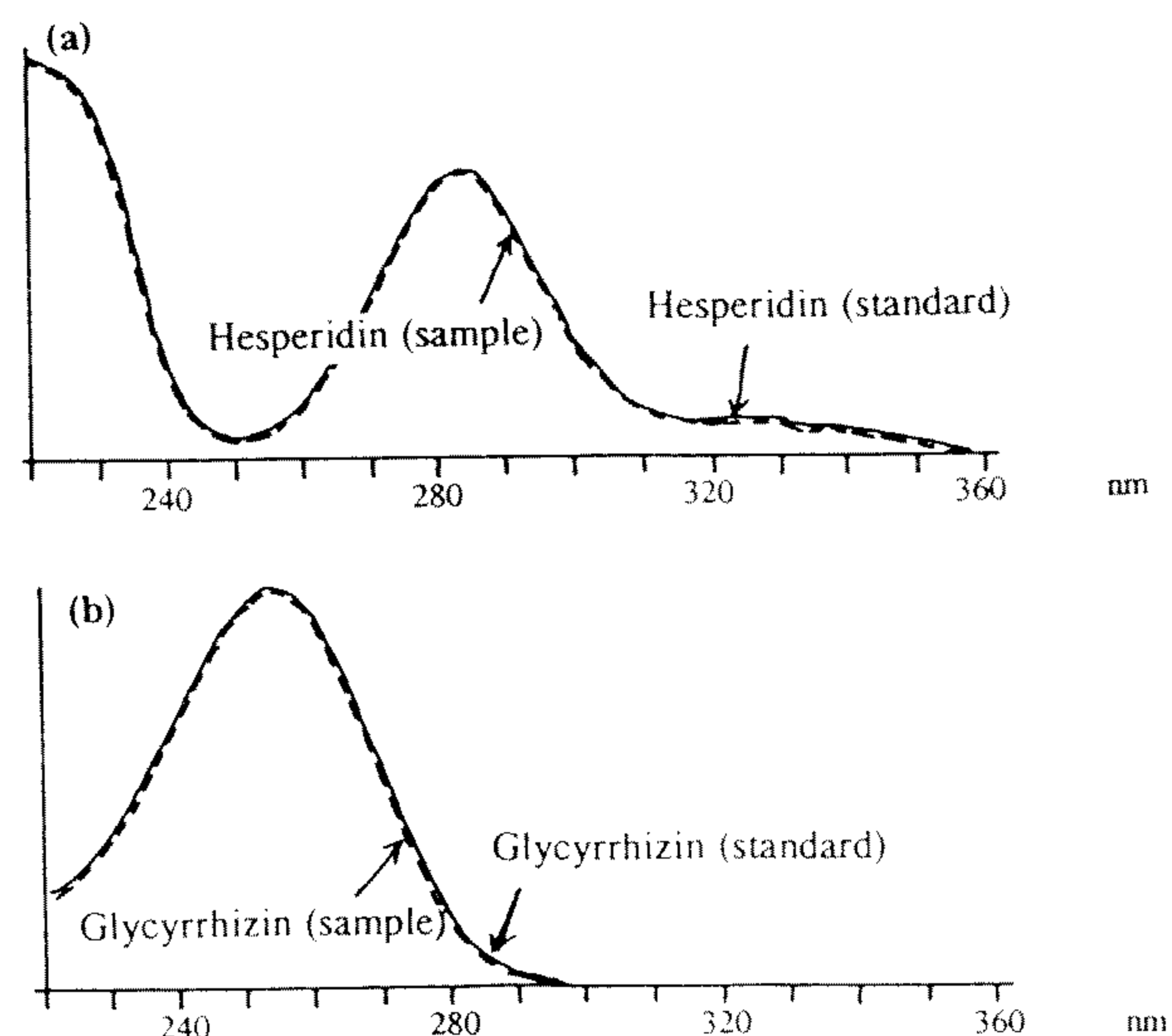


Figure 3. Baseline-corrected absorption spectra of (a) Hesperidin (b) Glycyrrhizin in Shen Mi Tang compared with standards.

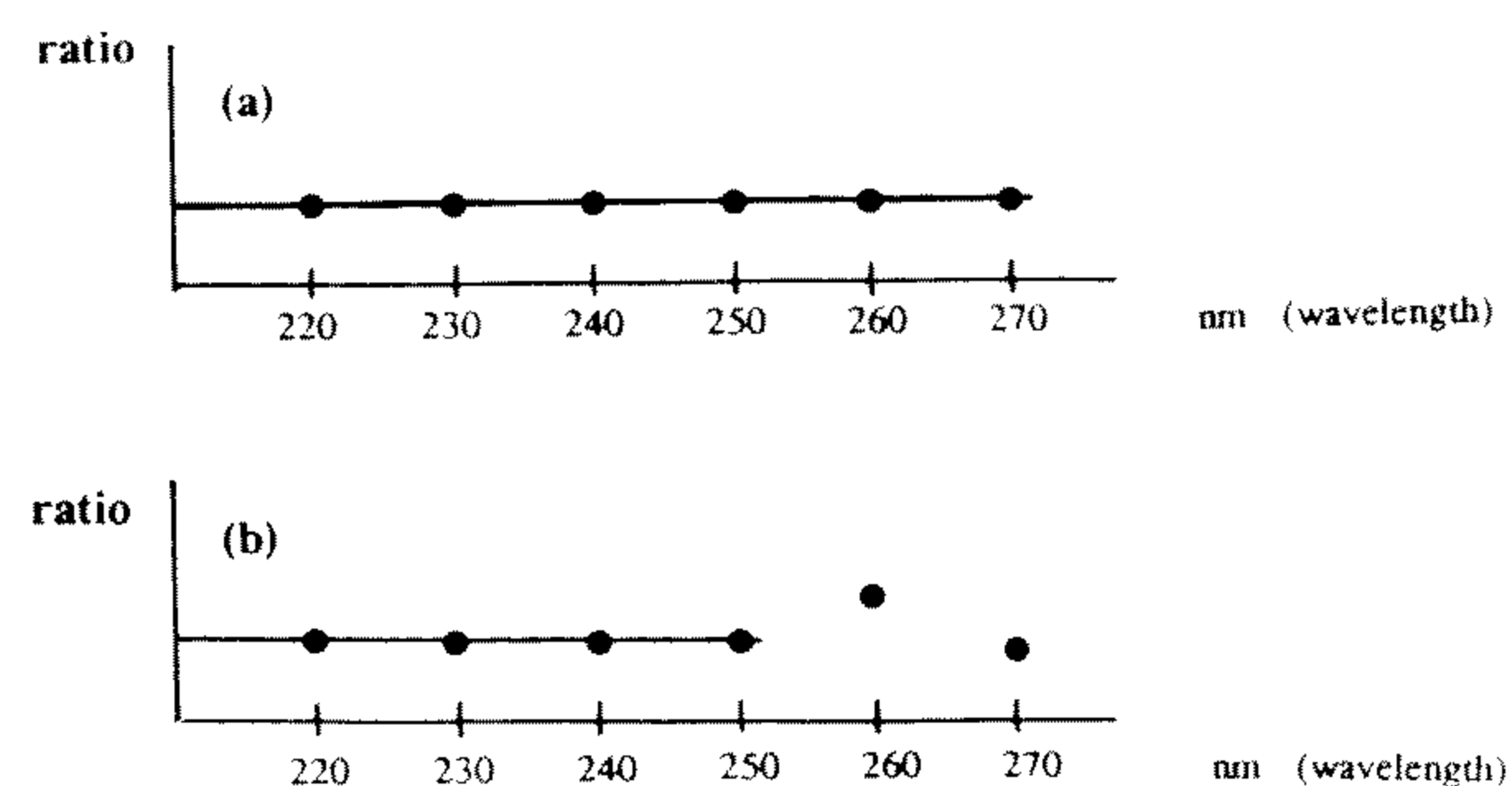


Figure 4. Plot ratio versus wavelength for a pure compound (a), and a compound with impurities (b).

11.9 min 的譜峰與 hesperidin 的譜峰重疊。圖六是清氣化痰湯分析時間為 60 min 的層析圖譜, 比較圖五c 和圖六, 可知在圖五c 中, 2 min 位置所多出的譜峰是圖六中 26 min 位置的譜峰, 在圖五c 中由於分析時間不足, 前次分析時的殘餘物堆疊的結果。此種現象常會發生在使用固定比率 (isocratic) 移動相做 HPLC 分, 由於中藥方劑成份複雜, 在分析的樣品中可能含有各種不同極性的化合物, 因此當使用固定比率溶媒為移動相時, 極性相差較大的化合物可能較慢出來而被忽略, 當連續分析幾次以後, 就會發生殘餘物堆疊的情形, 影響分析結果。為了避免此種現象, 在建立分析方法時, 對已經找到的分析條件以五倍長的分析時間來做分析方法確認的工作, 以確認所有的分析物皆已排出分離管。在執

Table 2. The SI values of Ephedrine standard in various concentration

Ephedrine *(220-360nm)												
conc.(mg/ml)	2.511	1.275	0.782	0.351	0.251	0.128	0.078	0.035	0.025	0.013	0.008	0.0035
SI	1.043	1.013	1.04	1.06	1.033	1.039	1.08	1.38	1.148	1.079	1.702	—
	1.054	1.029	1.041	1.089	1.015	1.035	1.054	1.37	1.091	1.125	1.756	—
	1.046	1.015	1.003	1.138	1.019	1.013	1.03	1.048	1.053	1.087	1.088	—
AV	1.048	1.019	1.028	1.096	1.022	1.029	1.055	1.266	1.097	1.097	1.515	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector

AV : mean value

Table 3. The S values of Hesperidin standard in various concentration

Hesperidin *(250-340nm)												
conc.(mg/ml)	0.522	0.401	0.245	0.111	0.052	0.04	0.025	0.011	0.005	0.004	0.003	0.0011
SI	1.004	1.007	1.004	1.004	1.018	1.022	1.033	1.043	1.152	—	—	—
	1.002	1.004	1.004	1.003	1.012	1.018	1.042	1.06	1.182	—	—	—
	1.003	1.008	1.005	1.002	1.014	1.009	1.018	1.024	1.099	—	—	—
AV	1.003	1.006	1.004	1.003	1.015	1.016	1.031	1.042	1.144	—	—	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector

AV : mean value

Table 4. The SI values of Glycyrrhizin standard in various concentration

Glycyrrhizin *(220-290nm)												
conc.(mg ml)	0.74	0.44	0.29	0.18	0.074	0.044	0.029	0.018	0.007	0.004	0.003	0.0018
SI	1.013	1.024	1.04	1.01	1.18	—	—	-	1.052	—	—	—
	1.012	1.012	1.045	1.019	1.17	—	-	—	1.065	—	—	—
	1.013	1.02	1.018	1.014	1.19	—	-	-	1.071	—	—	—
AV	1.013	1.019	1.034	1.014	1.18	—	—	—	1.063	—	—	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector

AV : mean value

Table 5. The SI values of Ferulic acid standard in various concentration

Ferulic acid *(260-360nm)												
conc.(mg ml)	0.39	0.29	0.2	0.09	0.039	0.029	0.02	0.009	0.004	0.003	0.002	0.0009
SI	1.006	1.04	1.005	1.006	1.004	1.064	1.009	1.048	1.057	1.114	—	—
	1.006	1.042	1.004	1.006	1.012	1.065	1.02	1.038	1.133	1.195	—	—
	1.001	1.004	1.004	1.004	1.012	1.009	1.018	1.031	1.092	1.129	—	—
AV	1.004	1.029	1.004	1.005	1.009	1.046	1.016	1.039	1.094	1.146	—	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector

AV : mean value

Table 6. The SI values of Wogonin standard in various concentration

Wogonin *(220-360nm)												
conc.(mg/ml)	1.099	0.868	0.517	0.268	0.11	0.087	0.052	0.027	0.005	0.004	0.003	0.0011
SI	1.003	1.002	1.003	1.076	1.033	1.026	1.159	1.073	2.837	—	—	—
	1.003	1.002	1.006	1.071	1.037	1.021	1.18	1.118	2.48	—	—	—
	1.003	1.002	1.005	1.02	1.022	1.042	1.083	1.108	1.245	—	—	—
AV	1.003	1.002	1.005	1.056	1.031	1.03	1.141	1.1	2.187	—	—	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector
AV : mean value

Table 7. The SI values of Cinnamic acid standard in various concentration

Cinnamic acid *(220-360nm)												
conc.(mg/ml)	0.012	0.077	0.05	0.025	0.01	0.008	0.05	0.003	0.001	8E-04	5E-04	0.0003
SI	1.073	1.098	1.141	1.054	1.108	1.029	1.064	1.038	1.009	1.005	1.016	—
	1.052	1.12	1.083	1.074	1.158	1.026	1.037	1.051	1.018	1.019	1.027	—
	1.071	1.2	1.128	1.036	1.049	1.016	1.049	1.05	1.055	1.014	1.014	—
AV	1.065	1.139	1.117	1.055	1.105	1.024	1.05	1.046	1.027	1.013	1.019	—

* Detection wavelength range by diode-array-detector
AV : mean value

Table 8. The SI values of Berberine. HCl standard in various concentration

Berberine. HCl*(250-360 nm)												
conc.(mg/ml)	0.41	0.19	0.11	0.04	0.041	0.019	0.011	0.004	0.004	0.002	0.001	0.0004
SI	1.005	1.006	1.015	1.12	1.036	1.063	1.135		1.078	—	—	—
	1.008	1.006	1.012	1.159	1.027	1.063	1.135	—	1.116		—	
	1.006	1.008	1.011	1.15	1.031	1.065	1.047	—	1.124	—		
AV	1.006	1.007	1.013	1.143	1.031	1.064	1.106	—	1.106	—	—	

* Detection wavelength range by diode-array-detector
AV : mean value

行例行分析時,可以在每隔幾次分析之後,用不同極性的溶媒來清洗分離管。

結 論

1. 以HPLC配合光電二極體陣列檢測器對譜峰純度之判定進行探討時,樣品的吸收光譜會受背景的影響,當樣品濃度低時,吸收光譜受影響的情

形更甚,此現象可以藉由扣除基線的演算方法得以改善。

2. SI值可以用來做為判定化合物純度的輔助數據,當濃度低時,SI值的變化較大,而SI值愈偏離1時,可能是分析譜峰有雜質隱藏在其中,也可能是受到背景的影響。

3. 每一樣品的分析時間(running time)一定要足夠,否則將造成前一樣品之殘餘堆疊在下一樣品

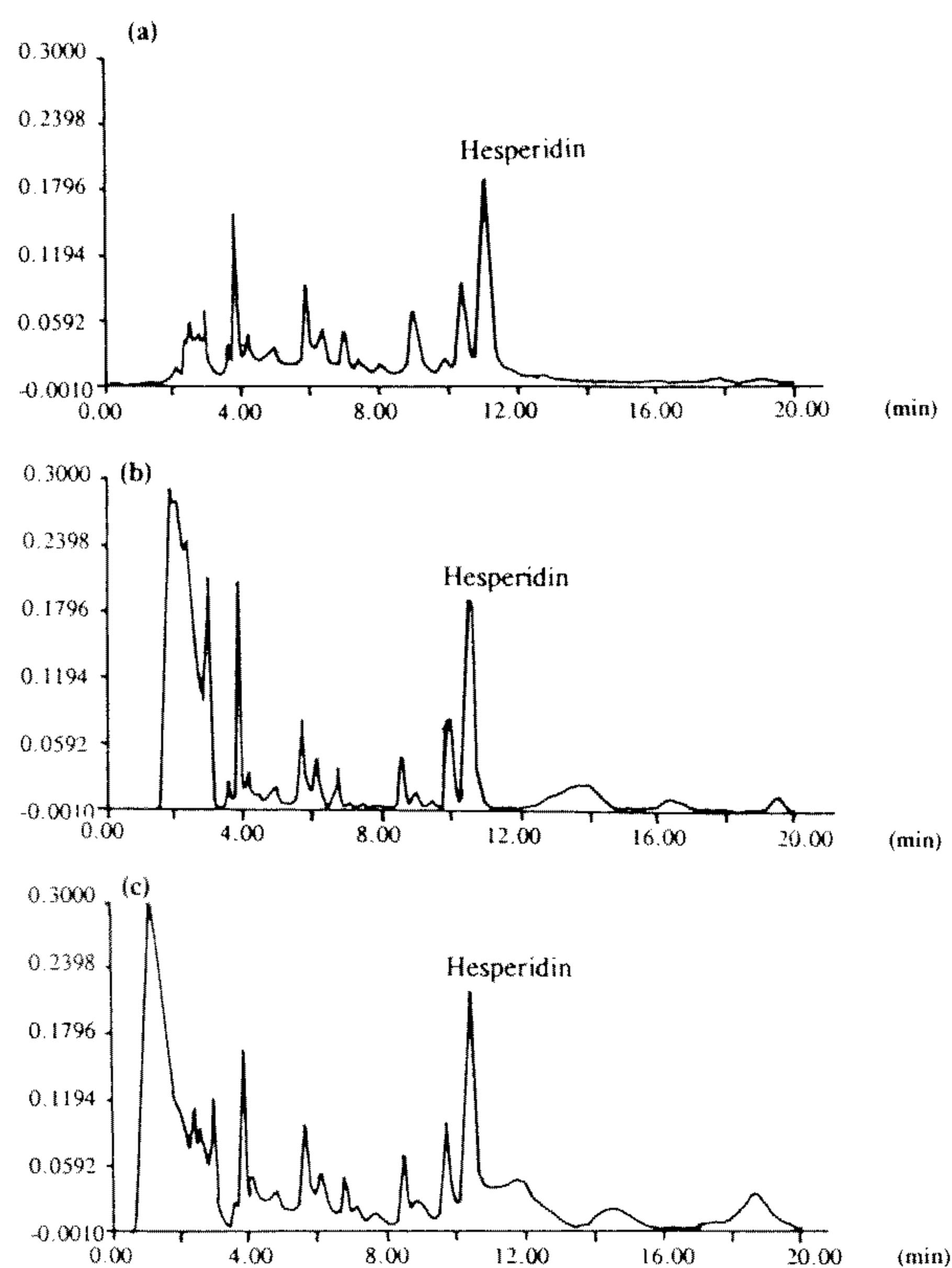


Figure 5. HPLC chromatograms of Ching Chi Hua Tan Tang by continuous eight injections at 20 min running time. (a), the first injection; (b), the third injection; (c), the eighth injection.

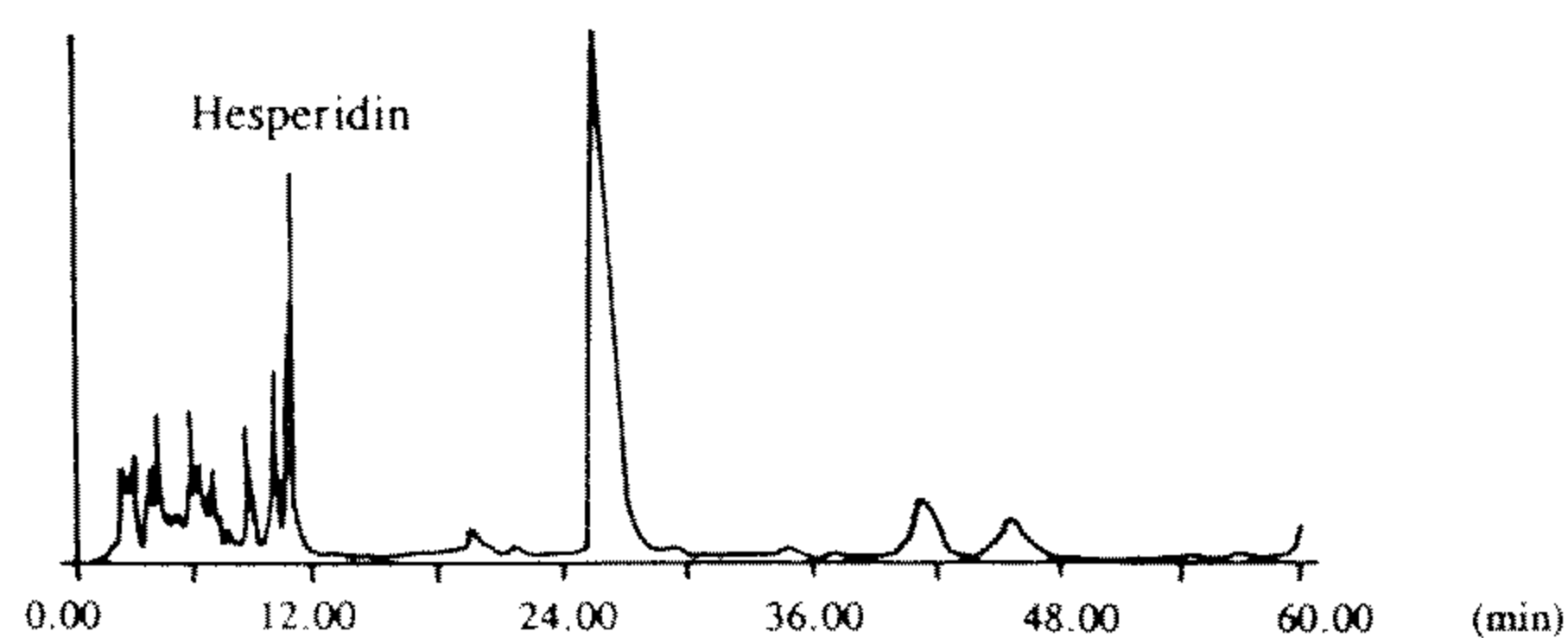


Figure 6. HPLC chromatogram of Ching Chi Hua Tan Tang.

分析中,影響了譜峰的判定及面積值之計算。此種情形可以在每隔幾次分析以後,用不同極性的溶媒來清洗分離管得以解決。

參考文獻

1. Harada, M., Ogigara, Y., Kano, Y., Akahori, A., Ichio, Y., Miura, O., Yamamo K. and Suzuki H. 1988. Quantitative Analysis of

Chinese Pharmaceutical Preparations (II). Iyakuhi Kankyn. 20(6) : 1300-1309.

2. Hayakawa, J., Noda, N., Yamada, S., Mikami, E. and Uno, K. 1985. Studies on Physical and Chemical Quality Evaluation of Crude Drugs Preparations III. Analysis of Gardenia Frutis and Its Preparations. Yakugaku Zasshi. 105(10) : 996-1000.
3. Harada, M. 1989. Phellodendron Bark and Copits Rhizoma. 藥用生藥成分定量. pp.49-74, 408-416. 廣川書局.
4. Liang, P.W., Chen, Y.P. and Hsu, H.Y. 1991. Application of High Performance Liquid Chromatography in the Assay of Some Chinese Herbal Preparations I, Chin. Pharm. J. 43(6) : 373-383.
5. Chang, L.C. and Sheu, S.J. 1993. Quantitative Analysis of Cardamon and Fennel Combination, Journal of Food and Drug Analysis. 1(2) : 183-189.
6. Liu, F.S., Lin, L.D. and Wen, K.C. 1993. Determination of Paeoniflorin and Geniposide in Traditional Chinese Medicinal Preparation by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food and Drug Analysis. 1(2) : 191-198.
7. Liang, J.W., Hsiu, S.L., Huang, H.C. and Chao Lee, P.D. 1993. HPLC Analysis of Emodin in Serum, Herbs and Chinese Herbal Prescriptions. Journal of Food and Drug Analysis. 1(3) : 251-257.
8. Fasmanade, A.A., Fell, A.F. and Scott, H.P. 1986. Three Dimensional Derivative Spectrochromatograms in High Performance Liquid Chromatography and Their Implications for Peak Homogeneity Validation. Anal. Chim. Acta. 187 : 233-240.
9. Seaton, G.G.R., Darr, J.G.D., Clark, B.J. and Fell, A.F. 1986. Chemometric Methods for the Validation of Peak Homogeneity in HPLC. Anal. Proceed. 23 : 424-427.
10. Marr, J.G.D., Horvath, P., Clark, B.J. and Fell, A.F. 1986. Assessment of Peak Homogeneity in HPLC by Computer Aided Photodiode Array Detection. Anal. Proceed. 23 : 254-257.

11. Schieffer, G.W. 1985. Limitations of Assessing High Performance Liquid Chromatographic Peak Purity with Photodiode Array Detectors. *J. Chromatogr.* 319 : 287-291.
12. Cheng, H. and Gadde, R.R. 1985. Absorbance Ratio Plots in High Performance Liquid Chromatography : Some Software Problems and Remedies. *J. Chromatogr. Sci.* 23 : 227-230.
13. Ebel, S. and Muck, W. 1989. Implementation and Efficiency of an Automatic Peak Purity Control Procedure in HPLC-UV/Vis Coupling Based on Principal Component Analysis. *Chromatographia.* 25 : 1075-1086.
14. Grant, A. and Bhattacharyya, P.K. 1985 Application of Derivative Spectroscopy to the Determination of Chromatographic Peak Purity. *J. Chromatogr.* 347 : 219-235.
15. Strasters, J.K., Billiet, H.A.H., Degalan, L., Vandeginste, B.G.M. and Kateman, G. 1987. Evaluation of Peak Recognition Techniques in Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *J. Chromatogr.* 385 : 181-200.
16. White, P.C. and Catterick, T. 1987. Evaluation of Absorbance Ratioing for Solute Identification in High Performance Liquid Chromatography Using a Diode Array Detector. *J. Chromatogr.* 402 : 135-147.
17. Spectra-Physics, Inc. 1990. Spectra FOCUS™ Software Operators Manual. DD. 20-21. Spectra-Physics Inc., San Jose, CA, U.S.A.

The Study of Peak Purity of Chinese Medicinal Compositions by HPLC/DAD

CHIAO-CHU KU, YUH-SHAN CHUNG AND HAO KU

*Division of Drug Delivery Development, Center for Biotechnology
81 Chang Hsing street, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

Peak purity was studied by diode-array detector in high performance liquid chromatography (DAD-HPLC) to assay seven chinese medicinal standards which were prepared of various different concentrations. Three injections were executed for each concentration sample, then the SI values were obtained by comparing the absorption spectra of three injections of each concentration's value. The results showed that SI values increased when the concentrations decreased. The absorption spectra of peaks of reference standards and samples are usually not matched while running a gradient system, be-

cause the background of the solvent is continuously changed. However, a good match was obtained by subtracting absorption spectrum of baseline before comparing absorption spectra of reference standards and analytical peaks.

The effect of insufficient running time for HPLC analysis was also studied. For example, Ching-Shy-Huah-Tarn Tang normally had a running time of 60 min. If the running time was changed from 60 min to 20 min, the peak area was significantly interfered by the previous run during a continuous eight injections trial.

Key words : DAD-HPLC, Peak purity