

# 赛默飞 Hilic 色谱柱与 CAD 检测器在中药配方颗粒寡糖类特征图谱中的应用

彭倩, 金琦芸

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词

中药配方颗粒, 寡糖类特征图谱, Hilic色谱柱, CAD检测器

## 摘要

基于中药成分复杂, 无紫外吸收化合物检测困难等难题, 本文选择巴戟天、制巴戟天、盐巴戟天等中药配方颗粒品种, 基于赛默飞 Vanquish Core 高效液相色谱系统, 采用CAD检测器, 通过筛选不同键合相的赛默飞Hilic色谱柱, 优化色谱条件, 能够充分保留和分离寡糖类化合物。CAD背景低, 能够满足中药配方颗粒标准的保留时间要求。本方法重复性佳, 可用于中药配方颗粒寡糖类特征图谱的研究。

## 1. 引言

随着中药政策和市场的发展, 中药配方颗粒的研究已成为当前热点且具有广阔的市场前景。首批160个中药配方颗粒品种的国家标准已于2021年11月1日正式开始实施, 第二批和第三批国家标准也已正式颁布, 同时各省级的标准也在陆续公示和颁布中。

不同中药品种成分复杂、特定组分紫外吸收弱, 这无疑给中药配方颗粒的质量研究带来一定挑战。电雾式检测器(又称CAD检测器, 下同)作为一种通用的质量型分析检测器, 具有灵敏度高、重复性好、线性范围广等优势, 尤其对无紫外吸收物质的检测具有很大的优势。目前CAD检测器已经收录到2020中国药典通则中, 最早用于配方颗粒标准的品种为盐巴戟天配方颗粒的省级标准, 同时以CAD评价巴戟天炮制前后的寡糖成分变化为数据支撑<sup>[1]</sup>, 被广大中药用户所知晓。截至2022年7月, 共有3个国标、3个省标采用CAD检测器用于配方颗粒质量控制, 为中药等领域的客户采用CAD检测器对待测品种的质量研究带来一定的便利性。

中药材大多含有果糖、蔗糖等糖类成分, 许多配方颗粒品种的标准也对糖类物质的含量测定进行了相关规定。Hilic色谱柱由于具有保留和分离极性化合物的能力, 在单糖和低聚糖分析中应用较多。其中氨基柱作为糖类分析Hilic色谱柱首选, 受到广泛应用。中药配方颗粒中大部分糖的测定方案采用Hilic色谱柱与蒸发光散射检测器(ELSD)相结合测定。但ELSD检测器的重复性差, 且糖类物质在



ELSD检测器内容易残留, 影响检测结果。CAD检测器具有灵敏度高、重现性好等特点, 可完美解决糖类测定这一难题<sup>[2]</sup>。而与CAD配合的Hilic色谱柱选择受到限制, 糖类测定中使用最多的常规氨基柱, 为硅胶基质填料键合氨基, 由于键合相流失大, CAD背景高, 不适合于采用CAD检测器进行糖的分析。

为了解决色谱柱选择这一难题, 本文选择巴戟天及其炮制配方颗粒品种, 参考相应中药配方颗粒标准<sup>[3] [4] [5]</sup>, 对赛默飞诸多Hilic色谱柱与CAD检测器应用于糖的测定进行了研究, 如表1所示, 通过筛选不同键合相的Hilic色谱柱, 优化色谱条件, 能够充分保留和分离寡糖类化合物。CAD背景低, 能够满足中药配方颗粒标准的保留时间要求。本方案重复性佳, 可用于中药配方颗粒寡糖类特征图谱的研究。

表1 不同Hilic色谱柱键合相信息

色谱柱	键合相	结构式
Acclaim HILIC-10	Proprietary	
Acclaim Mixed Mode HILIC-1	Alkyl/diol	
Accucore 150-Amide HILIC	Amide	
Acclaim Trinity P2	WCX / HILIC / SAX	
SHODEX ASAHIPAK NH2P-50 4E	聚合物基质填料键合Amino	

## 2. 实验方法

### 2.1 仪器，色谱柱与试剂

2.1.1 仪器：Vanquish Core HPLC

2.1.2 色谱柱：Accucore amide hilic，具体规格参见2.3

2.1.3 乙腈、甲酸铵（色谱纯，Fisher），超纯水

### 2.2 样品信息

提供试品和蔗糖、1-蔗糖三糖、耐斯糖、巴戟天寡糖 5 聚糖对照品（品牌：诗丹德），按照相应国家标准或者省标规定制备。

### 2.3 液相色谱方法

项目	巴戟天配方颗粒	制巴戟天配颗粒	盐巴戟天配颗粒
色谱柱	Accucore amide hilic, 2.6 $\mu$ m, 150 x 4.6 mm PN: 16726-154630		Accucore amide hilic, 2.6 $\mu$ m, 100 x 2.1 mm PN: 16726-102130
柱温	50 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C
流速	1.9 mL/min		0.4 mL/min
进样体积	5 $\mu$ L		1 $\mu$ L
流动相	A: 水 B: 乙腈		
梯度条件	见表2	见表3	见表4
检测器：CAD	参数：蒸发温度：35 $^{\circ}$ C 扫描频率：5Hz时间常数：3.6S Power Function值：1.0		

表2. 梯度洗脱程序

Time(min)	%A	%B
0	21	79
2	21	79
2.1	23	77
10.5	40	60
18	40	60
18.1	21	79
22	21	79

表3. 梯度洗脱程序

Time(min)	%A	%B
0	23	77
2.6	23	77
10.5	40	60
12.5	40	60
13.6	23	77
18	23	77

表4. 梯度洗脱程序

Time(min)	%A	%B
0	10	90
1	19	81
7	24	76
13	33	67
30	51	49
30.1	10	90
38	10	90

### 3. 实验结果和讨论

#### 3.1 不同Hilic色谱柱CAD背景值谱图对比

根据前期得到的数据，在CAD上尝试硅胶基质如Hypersil Gold Amino或者APS-2等氨基柱，以及Synchronis Hilic色谱柱，当流动相乙腈比例低于80%时，CAD背景值高于20pA，不太适用于CAD方法开发。本文考察如下5款Hilic色谱柱的CAD背景值，选取0.5-2min的谱图作为参考，进样溶液为0.5 mg/mL的6种对照品混标（果糖、葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、蔗果五糖），除Acclaim Trinity P2色谱柱流动相为乙腈和100mM的甲酸铵（pH=3.66）体系（初始比例80:20），其他色谱柱流动相为乙腈和水（初始比例为79:21）。通常用于CAD分析的色谱柱背景值建议低于5 pA，5款Hilic色谱柱的CAD背景值如图1所示，Acclaim Hilic-10和Hilic-1的CAD背景值较高，Shodex NH2、Accucore amide hilic和Acclaim Trinity P2具有较低的CAD背景值。

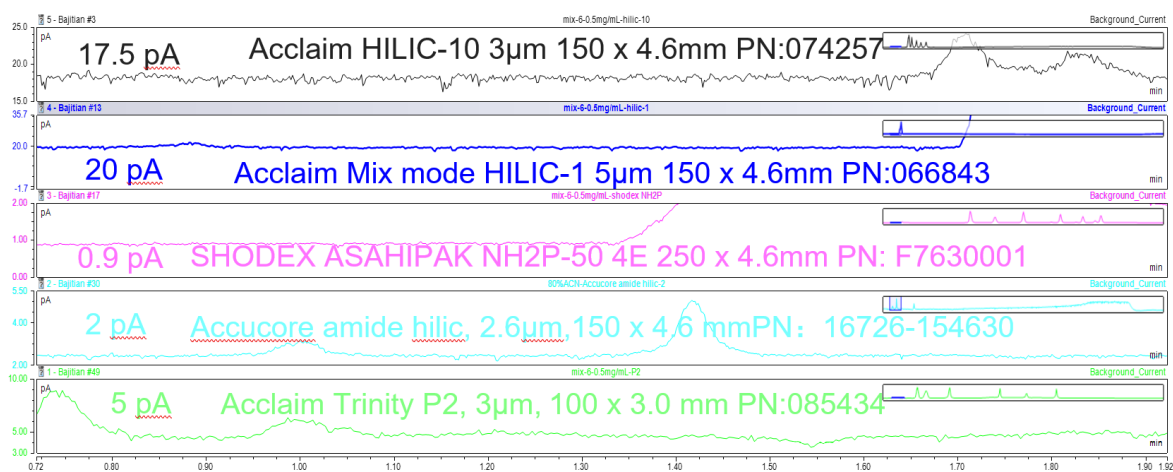


图1. 不同Hilic色谱柱CAD背景值对比谱图

#### 3.2 不同Hilic色谱柱对照品分离谱图对比

如图2所示，考察了5款Hilic色谱柱对于6种对照品混标的分离效果，6个化合物从左至右依次为：果糖、葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖、蔗果五糖。Acclaim Hilic-10和Hilic-1整体保留较弱，Hilic-1没有分开6个化合物。由于果糖和葡萄糖会发生变旋现象，产生 $\alpha$ -型和 $\beta$ -型端基差向异构体，色谱行为表现为分叉峰或双峰，Accucore amide hilic上这两种糖峰型较差。高温及高PH条件能够使两种异构体变成一个峰，由于Accucore amide hilic最高耐受温度为60 $^{\circ}$ C，pH范围2-8，没有尝试更多条件优化。Shodex NH2和Acclaim Trinity P2整体表现较好。从结果可以看出，后续3款色谱柱均可以用于CAD检测器中糖的分析，Accucore amide hilic可以用于除还原糖之外的糖类分析。

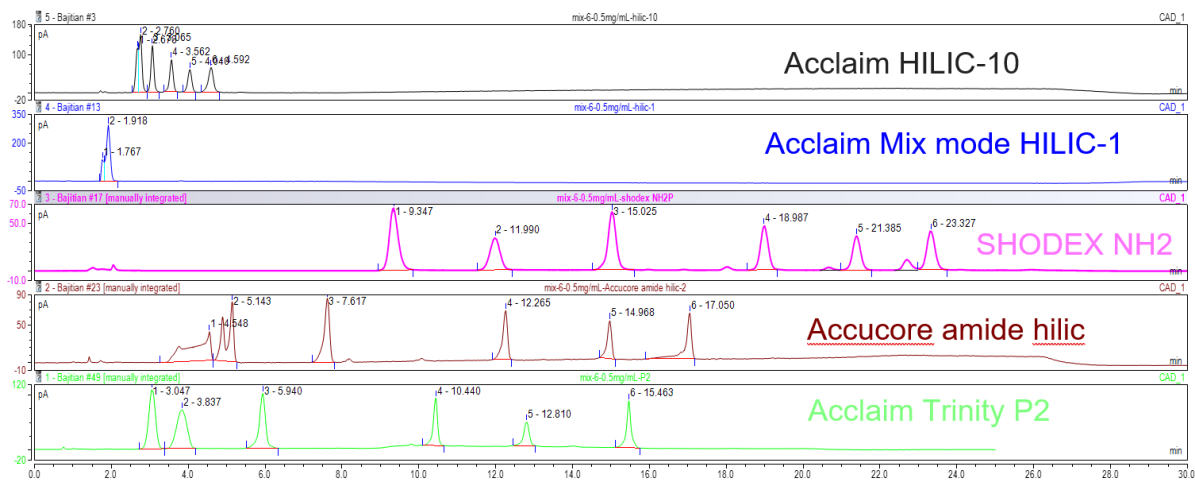


图2. 不同Hilic色谱柱0.5 mg/mL 6种糖对照品分离谱图

#### 3.3 巴戟天寡糖类特征图谱分析

巴戟天配方颗粒为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成。其中含有丰富的蔗糖和耐斯糖、巴戟天寡糖等低聚糖类，具有补肾强筋、活血调经的功效，对提高人体免疫能力和抗肿瘤等也具有一定药理活性。在第一批国家标准巴戟天配方颗粒中，寡糖类特征图谱的测定采用中性酰胺基键合硅胶色谱柱以及ELSD检测器检测。本文采用Accucore amide hilic色谱柱以及CAD检测器进行了研究。

巴戟天配方颗粒标准要求理论板数按耐斯糖峰计算应不低于 2000。供试品色谱中应呈现 9 个特征峰，并与对照药材参照物色谱中的 9 个特征峰保留时间相对应，与耐斯糖参照物峰相对应的峰为 S 峰，计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，峰 1、峰 2、峰 4 其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 范围之内，峰 5、峰 6、峰 7、峰 8、峰 9 其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内，规定值为 0.54（峰 1）、0.77（峰 2）、1.19（峰 4）、1.34（峰 5）、1.47（峰 6）、1.58（峰 7）、1.68（峰 8）、1.76（峰 9）。

本实验参照第一批国家标准巴戟天配方颗粒进行，原标准色谱柱规格为：5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm，为了满足标准相对保留时间的要求，根据色谱柱规格进行方法转换后，进行了流动相梯度优化。同时检测器由 ELSD 更改为 CAD，灵敏度和响应更高。最终结果满足标准要求。

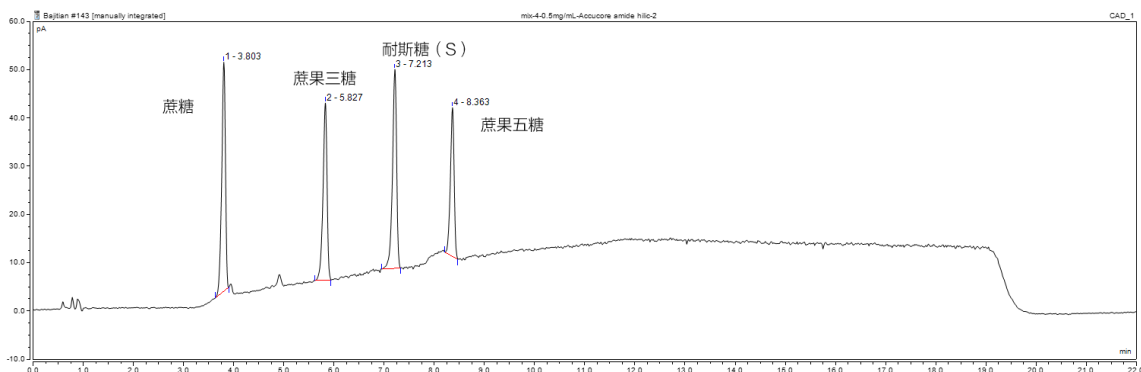


图3. Accucore amide hilic 0.5 mg/mL 4种糖对照品分离谱图

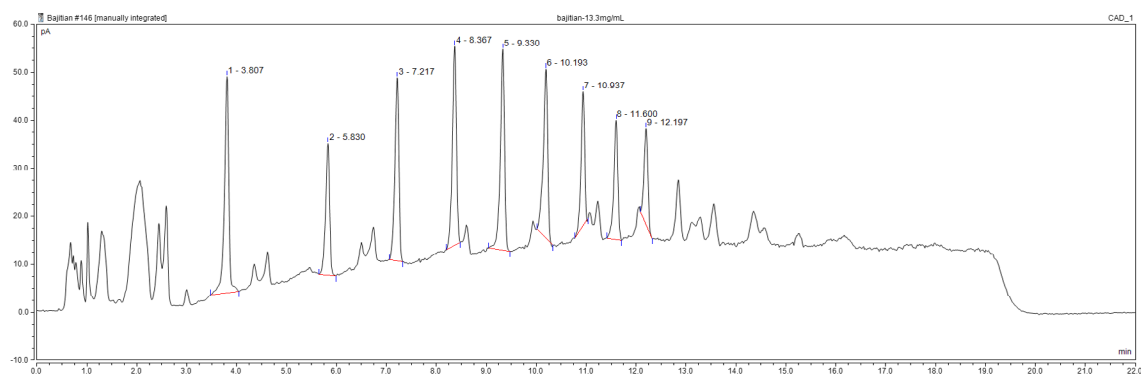


图4. Accucore amide hilic 巴戟天配方颗粒谱图

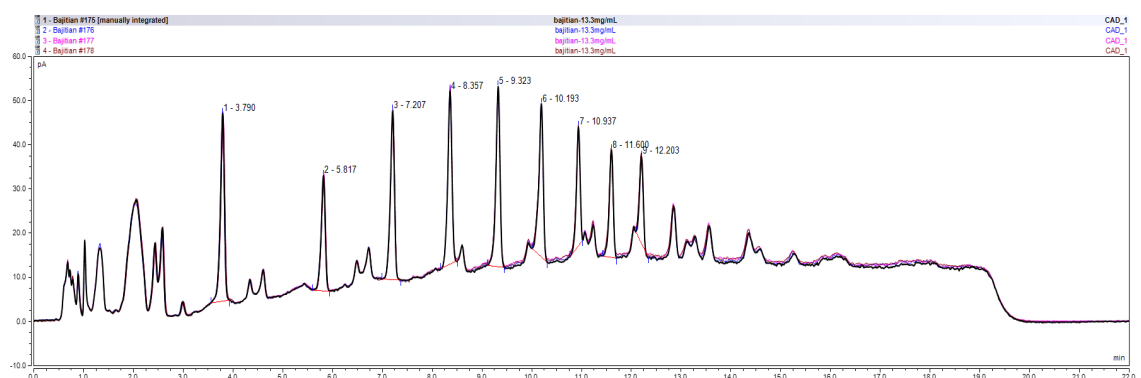


图5. Accucore amide hilic 巴戟天配方颗粒重复性谱图 (n=4)

峰	组分名称	保留时间 (min)	理论塔板数 (USP)	拖尾因子	相对保留时间	
					规定值±5%	实测值
1	蔗糖	3.807	11285	0.79	0.54 (0.51-0.57)	0.53
2	蔗果三糖	5.830	28260	0.81	0.77 (0.73-0.81)	0.81
3(S)	耐斯糖	7.217	38173 (≥2000)	0.81		
4	巴戟天寡糖 5 聚糖	8.367	52433	0.84	1.19 (1.13-1.25)	1.16

峰	组分名称	保留时间 (min)	理论塔板数 (USP)	拖尾因子	相对保留时间	
					规定值±10%	实测值
5		9.330	64531	0.79	1.34 (1.21-1.47)	1.29
6		10.193	73085	0.76	1.47 (1.32-1.62)	1.41
7		10.937	108416	0.82	1.58 (1.42-1.74)	1.52
8		11.600	113114	0.81	1.68 (1.51-1.85)	1.61
9		12.197	112697	0.92	1.76 (1.58-1.94)	1.69

### 3.4 制巴戟天寡糖类特征图谱分析

制巴戟天配方颗粒为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成。在第二批国家标准制巴戟天配方颗粒中，寡糖类特征图谱的测定采用中性酰胺键合硅胶色谱柱以及ELSD检测器检测。本文采用Accucore amide hilic色谱柱以及CAD检测器进行了研究。

制巴戟天配方颗粒标准要求理论板数按耐斯糖峰计算应不低于 2000。供试品色谱中应呈现 9 个特征峰，并与对照药材参照物色谱中的 9 个特征峰保留时间相对应，其中峰 3 应与对照品参照物峰保留时间相对应。与耐斯糖参照物峰相对应的峰为 S 峰，计算其他各特征峰与 S 峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的±10%范围之内，规定值为：0.54（峰 1）、0.77（峰 2）、1.19（峰 4）、1.34（峰 5）、1.48（峰 6）、1.59（峰 7）、1.68（峰 8）、1.76（峰 9）。

本实验参照第二批国家标准制巴戟天配方颗粒进行，原标准色谱柱规格为：5 μm, 150 x 4.6 mm，为了满足标准相对保留时间的要求，根据色谱柱规格进行方法转换后，进行了流动相梯度优化。同时检测器由ELSD更改为CAD，灵敏度和响应更高。最终结果满足标准要求。

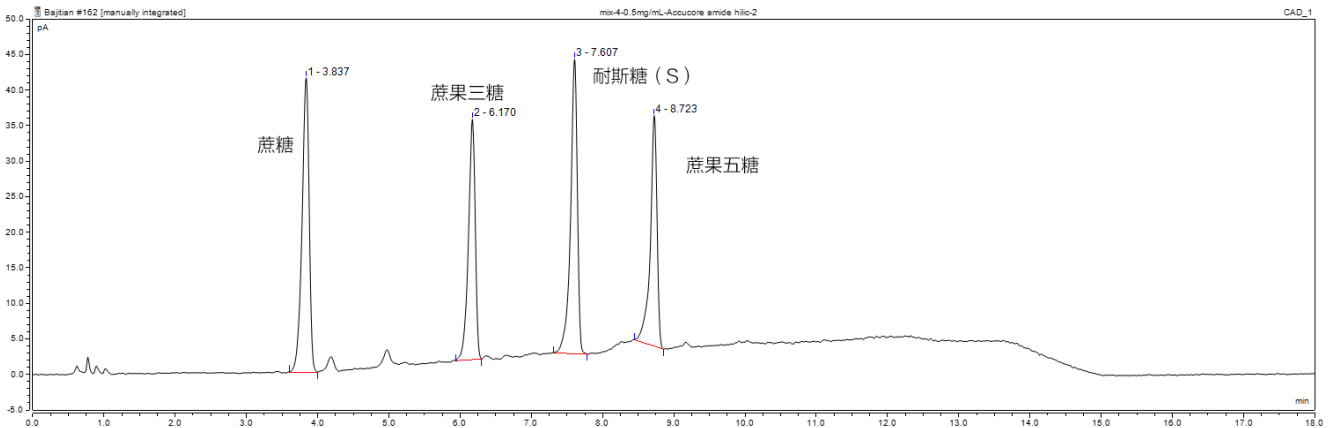


图6. Accucore amide hilic 0.5 mg/mL 4种糖对照品分离谱图

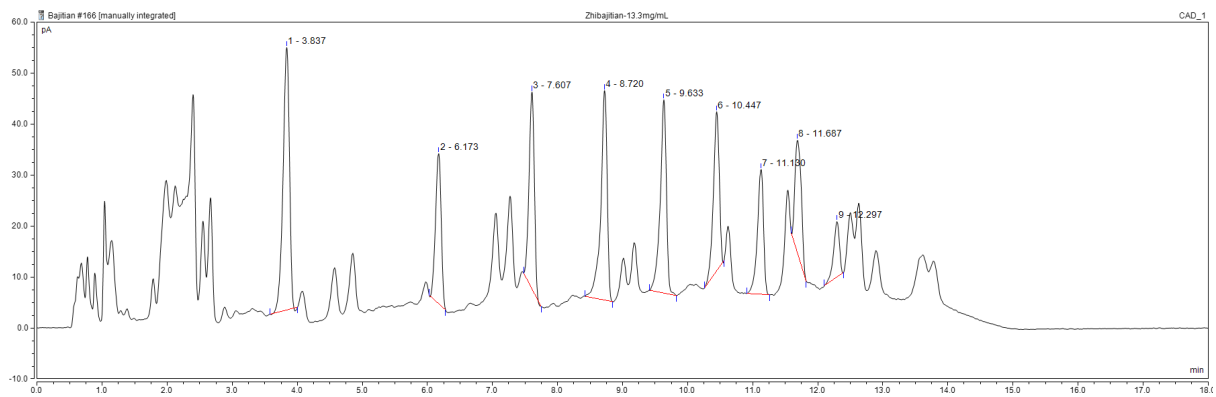


图7. Accucore amide hilic 制巴戟天配方颗粒谱图

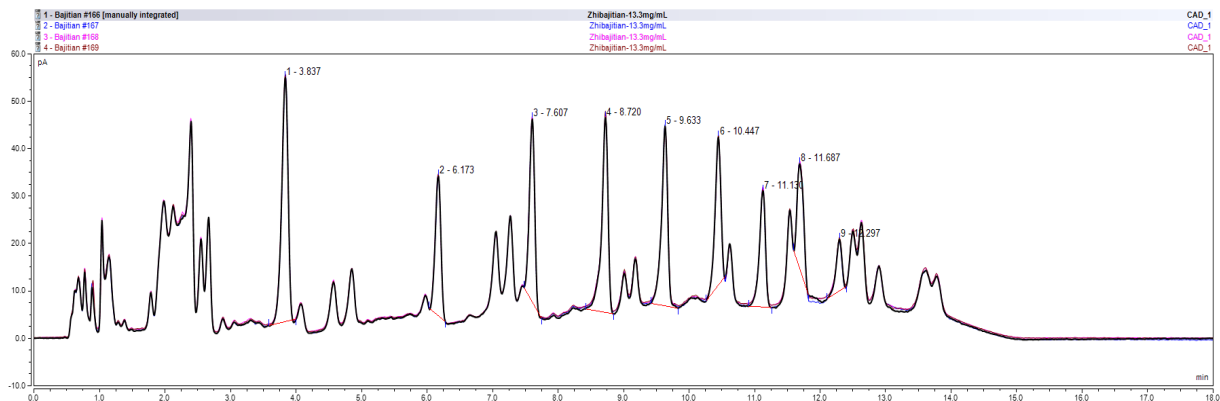


图8. Accucore amide hilic 制巴戟天配方颗粒重复性谱图 (n=4)

峰	组分名称	保留时间 (min)	理论塔板数 (USP)	拖尾因子	相对保留时间	
					规定值±10%	实测值
1	蔗糖	3.837	7475	0.82	0.54 (0.49-0.59)	0.50
2	蔗果三糖	6.173	23861	0.88	0.77 (0.69-0.85)	0.81
3(S)	耐斯糖	7.607	40997 (≥2000)	0.88		
4	巴戟天寡糖 5 聚糖	8.720	48837	0.74	1.19 (1.07-1.31)	1.15
5		9.633	58478	0.77	1.34 (1.21-1.47)	1.27
6		10.447	63016	0.81	1.47 (1.32-1.62)	1.37
7		11.130	78194	0.76	1.58 (1.42-1.74)	1.46
8		11.687	72797	1.22	1.68 (1.51-1.85)	1.54
9		12.297	85148	0.75	1.76 (1.58-1.94)	1.62

### 3.5 盐巴戟天寡糖类特征图谱分析

盐巴戟天配方颗粒为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成。在广东省标准盐巴戟天配方颗粒中，寡糖类特征图谱的测定采用酰胺基色谱柱以及CAD检测器检测。本文采用Accucore amide hilic色谱柱以及CAD检测器进行了研究。

盐巴戟天配方颗粒标准要求理论板数按耐斯糖峰计算应不低于 5000。供试品色谱中应呈现 7 个特征峰，并应与对照药材参照物色谱或配方颗粒对照提取物参照物色谱中的 7 个特征峰保留时间相对应，其中峰 1、峰 3 应分别与相应的对照品参照物峰保留时间相对应。

本实验参照广东省标准盐巴戟天配方颗粒进行，无色谱参数调整，所得结果满足标准要求。

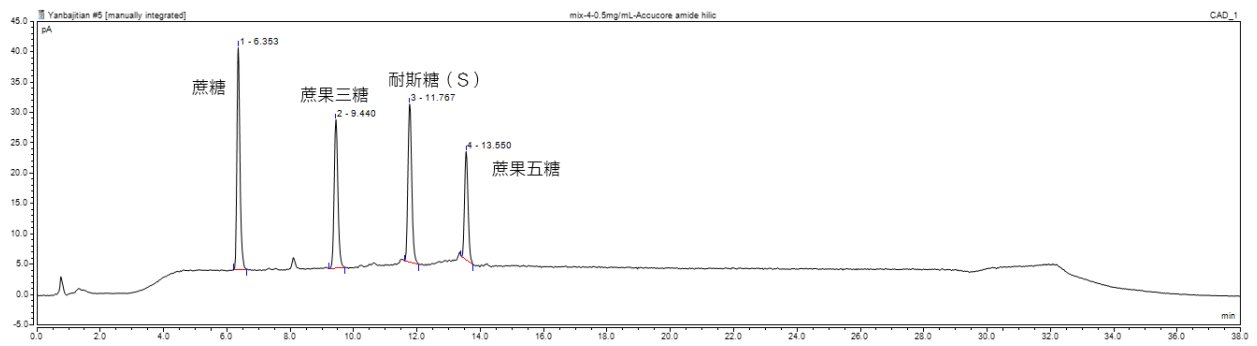


图9. Accucore amide hilic 0.5 mg/mL 4种糖对照品分离谱图

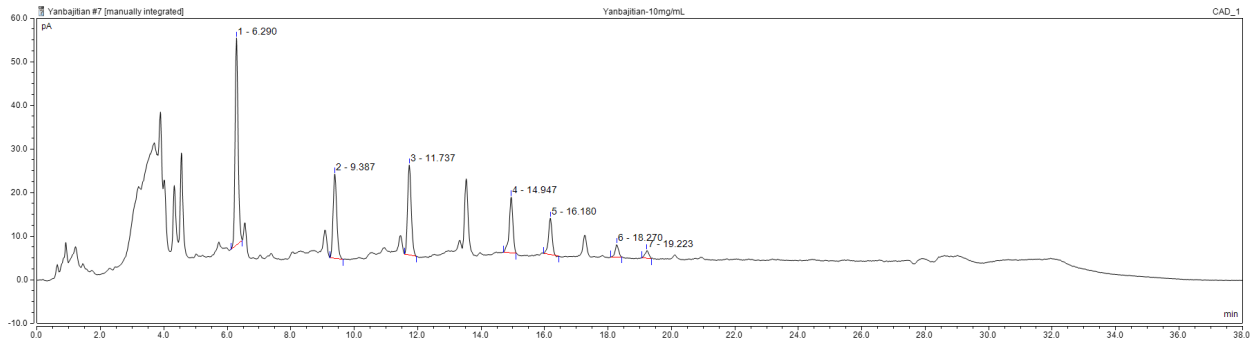


图10. Accucore amide hilic 盐巴戟天配方颗粒谱图

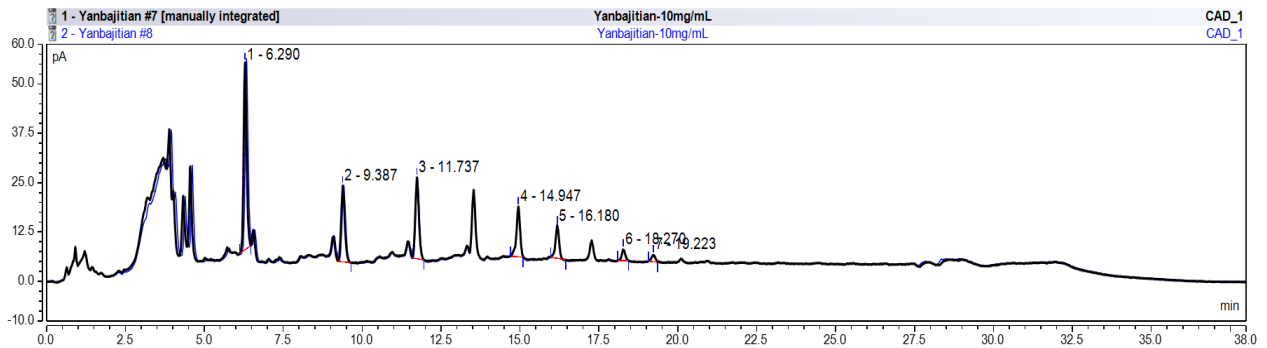


图11. Accucore amide hilic 盐巴戟天配方颗粒重复性谱图 (n=2)

峰	组分名称	保留时间 (min)	理论塔板数 (USP)	拖尾因子
1	蔗糖	6.290	21610	1.15
2	蔗果三糖	9.387	33440	1.18
3	耐斯糖	11.737	49382 (≥5000)	1.16
4		14.947	89108	0.83
5		16.180	104448	0.90
6		18.270	162354	0.99
7		19.223	191516	0.96

## 4. 结论

本文为了解决配合CAD检测器Hilic色谱柱选择这一难题，通过筛选不同键合相的Hilic色谱柱，最终结果表明Shodex NH2、Accucore amide hilic和Acclaim Trinity P2具有较好的CAD背景值以及糖类分离效果，这3款色谱柱均可以用于CAD检测器中糖的分析，Accucore amide hilic可以用于除还原糖之外的糖类分析。

选择巴戟天、制巴戟天、盐巴戟天等中药配方颗粒品种，基于赛默飞 Vanquish Core高效液相色谱系统，使用Accucore amide hilic色谱柱，采用CAD检测器，优化色谱条件，能够充分保留和分离寡糖类化合物。CAD背景低，能够满足中药配方颗粒标准的保留时间要求。本方法重复性佳，可用于中药配方颗粒寡糖类特征图谱的研究。

## 5. 参考文献

- [1] 丁青, 刘晓霞, 魏梅, 等. 巴戟天盐炙前后寡聚糖类与环烯醚萜类指纹图谱差异[J]. 中国现代中药, 2021.
- [2] AN\_21049\_HPLC\_药物\_电雾式检测器 (CAD) 在中药配方颗粒特征图谱与含量测定中的应用
- [3] 第一批国家标准巴戟天配方颗粒 YBZ-PFKL-2021001
- [4] 第二批国家标准制巴戟天配方颗粒 YBZ-PFKL 2021194
- [5] 广东省标准盐巴戟天配方颗粒 粤PFKL20210022



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**Thermo Fisher**  
SCIENTIFIC