

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

冷泽山 柴瑞平 冉良骥 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词

电雾式检测器 CAD 中药配方颗粒 特征图谱 含量测定

摘要

当今中药配方颗粒具有广阔的市场前景，而对中药配方颗粒的研究也已成为当前热点。基于中药成分复杂、无紫外吸收物质检测困难等难题，本文通过CAD检测器，对不同中药配方颗粒品种的特征图谱和含量测定项进行了研究。实验探讨了CAD检测器的实际检测效果，以及在中药配方颗粒领域的使用价值。

1. 前言

中药配方颗粒是用符合炮制规范的传统中药饮片作为原料，经现代制药技术提取、浓缩、分离、干燥、制粒、包装精制而成的纯中药产品系列。随着中药政策和市场的发展，以及中药配方颗粒公示稿的颁布，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药品标准已于2021年11月1日正式开始实施，第二批36个中药配方颗粒国家药品标准也已正式颁布，同时各省级的公示稿标准也在陆续公示中。不同中药品种中成分复杂、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，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。

本文通过CAD检测器，选取几种含有低紫外吸收甚至无紫外吸收组分的中药配方颗粒品种，分别进行特征图谱和含量测定研究，探讨CAD检测器在中药配方颗粒质量研究中的检测效果。

2. 实验方法

2.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate3000超高效液相色谱仪
泵：LPG-3400RS Pump

自动进样器：WPS-3000RS Autosampler

柱温箱：TCC-3000RS Column Compartment

UV检测器：WWD-3000RS Detector

CAD检测器：Corona Veo RS Charged Aerosol Detector。

2.2 软件

Chromeleon 7.3

2.3 试剂及标准品

乙腈、甲醇、乙醇、二氯甲烷（色谱级，Fisher）

乙酸、三乙胺（质谱级，Fisher）

去离子水（18.2 MΩ@25°C，Thermo超纯水机）

果糖（纯度≥99%，Sigma-Aldrich）

蔗糖（纯度≥99.9%，Macklin）

2.4 样品前处理

各配方颗粒的特征图谱供试品溶液和含量测定供试品溶液的制备均参考对应的标准公示稿^[1]供试品溶液制备项。

2.5 色谱条件

2.5.1 麸炒薏苡仁配方颗粒:

色谱柱: Acclaim 120 C18, 4.6×250mm, 5 μ m (P/N: 059149)

流动相: 等度洗脱, 乙腈-二氯甲烷 (65:35)

流速: 1.2ml/min

柱温: 25 $^{\circ}$ C

进样量: 5 μ L

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

2.5.2 地肤子配方颗粒:

色谱柱: Accucore C18, 2.1×100mm, 2.6 μ m
(P/N: 17126-102130)

流动相: 梯度洗脱, A: 甲醇; B: 0.1%乙酸溶液

时间 (分钟)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~3	60→70	40→30
3~10	70→80	30→20
10~14	80→85	20→15
14~15	85→60	15→40
15~20	60	40

流速: 0.4ml/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 3 μ L

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

2.5.3 枸杞子配方颗粒:

色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 4.6×250mm, 5 μ m

流动相: 等度洗脱, 乙腈-水 (85:15)

流速: 1.0ml/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 5 μ L

检测器: 紫外检测器, 检测波长: 195nm

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

2.5.4 白术配方颗粒:

色谱条件1:

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Amide, 2.1×100mm, 1.7 μ m

流动相: 等度洗脱, 乙腈-0.2%三乙胺溶液 (86:14)

流速: 0.3ml/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

进样量: 1 μ L

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

色谱条件2:

色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 4.6×250mm, 5 μ m

流动相: 等度洗脱, 乙腈-水 (75:25)

流速: 1.0ml/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样量: 5 μ L

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

2.5.5 盐巴戟天配方颗粒:

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Amide, 2.1×100mm, 1.7 μ m

流动相: 梯度洗脱, A: 乙腈 B: 水

时间 (分钟)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~1	90→81	10→19
1~7	81→76	19→24
7~13	76→67	24→33
13~30	67→49	33→51
30~31	49→90	51→10
31~35	90	10

流速: 0.4ml/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样量: 1 μ L

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

2.5.6 巴戟天配方颗粒:

色谱柱: Venusil HILIC, 4.6×150mm, 5 μ m

流动相: 梯度洗脱, A: 水 B: 乙腈

时间 (分钟)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~5	22	78
5~20	22→40	78→60
20~24	40	60
24~26	40→22	60→78
26~30	22	78

流速: 1.0ml/min

柱温: 35°C

进样量: 10 μ L

检测器: CAD, 参数: 同2.5.1

3. 实验结果

3.1 特征图谱检测

3.1.1 麸炒薏苡仁配方颗粒:

薏苡仁的特征组分均为甘油酯类, 其紫外吸收较低。在首批国家标准公示稿中, 麸炒薏苡仁配方颗粒特征图谱是通过蒸发光散射 (ELSD) 检测器进行测定。本次实验采用赛默飞经典的Acclaim 120 C18色谱柱, 结合CAD检测器, 得到较好的特征图谱结果。从图1和表1中可以看出: 各特征峰均有效检出并满足标准公示稿要求, 且分离度好、峰型优异、理论塔板数高; 说明赛默飞色谱柱效果优良, 可以替代标准公示稿中的推荐色谱柱, 满足中药配方颗粒的检测需求。此外, 将供试品溶液的浓度减半, 进样量降为原来的1/4 (原进样量为20 μ L, 本次实验采用5 μ L), 从图中可以看出, 各组分峰响应仍旧比较高, 说明CAD检测器的检出效果好, 灵敏度高。

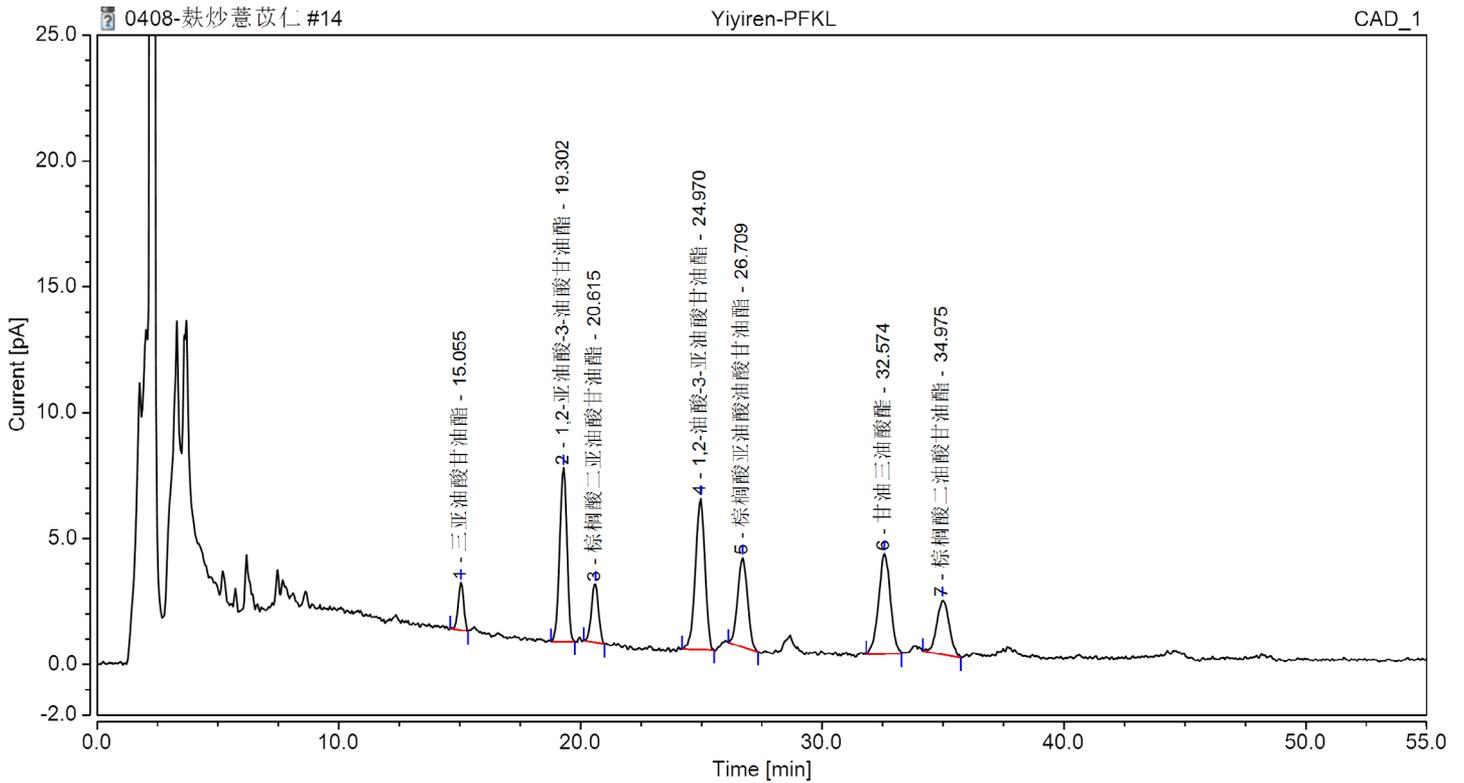


图1 麸炒薏苡仁配方颗粒特征图谱

表1 麸炒薏苡仁配方颗粒检测结果

峰编号	峰名称	保留时间 (min)	峰面积 (pA*min)	峰高 (pA)	对称因子	理论塔板数
1	三亚油酸甘油酯	15.06	0.505	1.89	0.93	20196
2	1,2-亚油酸-3-油酸甘油酯	19.30	2.428	6.91	0.90	18338
3	棕榈酸二亚油酸甘油酯	20.62	0.795	2.31	0.90	23896
4	1,2-油酸-3-亚油酸甘油酯	24.97	2.745	6.00	0.89	19060
5	棕榈酸亚油酸甘油酯	26.71	1.684	3.55	0.99	19603
6	甘油三油酸酯	32.57	2.263	3.98	0.96	21841
7	棕榈酸二油酸甘油酯	34.98	1.295	2.18	1.03	21564

3.1.2 地肤子配方颗粒:

CAD检测器在中药配方颗粒特征图谱检测中应用的另一实例是地肤子配方颗粒。地肤子的主要成分是皂苷类，其紫外吸收较低，国家标准公示稿是采用ELSD检测器进行测定。从图2和表2中可以看出，通过CAD检测器得到的各特征峰与S峰的相对保留时间符合标

准规定，且响应高，峰型优异，地肤子皂苷Ic峰的理论塔板数远高于标准中要求不低于3000的规定，再次体现了CAD检测器在中药配方颗粒检测中的优势。除此之外，实验采用赛默飞Accucore C18核壳型色谱柱，2.6 μ m实心核颗粒和窄粒径分布可以降低谱带展宽并提高分离效率，高流速条件下可以实现低反压的快速、高分离度分离。

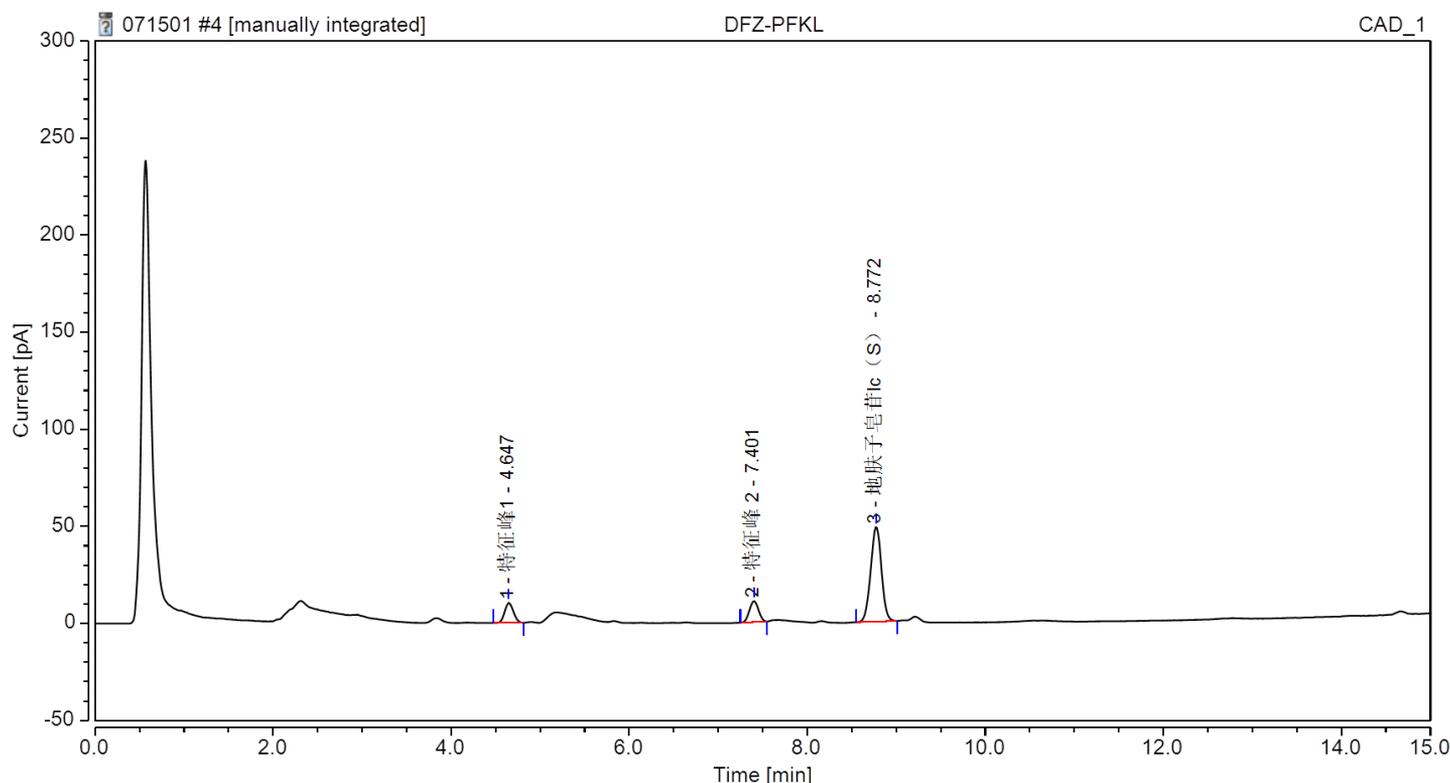


图2 地肤子配方颗粒特征图谱

表2 地肤子配方颗粒检测结果

峰编号	峰名称	保留时间 (min)	峰面积 (pA*min)	理论塔板数	相对保留时间 (规定值)	相对保留时间 (实测值)
1	特征峰1	4.65	1.164	10340	0.50 \pm 10%	0.53
2	特征峰2	7.40	1.281	23887	0.84 \pm 10%	0.84
3	地肤子皂苷Ic (S)	8.77	6.864	25245	/	/

3.2 含量测定

中药配方颗粒中部分品种的主要成分属于弱紫外甚至无紫外吸收，这也给含量测定项带来一定的挑战，以枸杞子配方颗粒为例。枸杞子中的主要成分甜菜碱是一种生物碱，属季铵碱类物质，其结构中并没有生色团，属于末端吸收。2020中国药典中甜菜碱的检测是采用UV检测器（195nm）^[2]，容易受到基线噪音的影响，且灵敏度低；江苏省标准公示稿中是选用ELSD检测器，通过外标两点法对方程法计算含量。本次实验采用UV检测器和CAD检测器串联的方

式同时对甜菜碱组分进行含量测定，并考察检测效果。从图3中可以看到，CAD检测器可以有效检测枸杞子配方颗粒样品中的甜菜碱组分，且峰型好、响应高。同时，利用UV检测器也能检测得到甜菜碱的峰，但灵敏度欠佳。通过测定浓度为8.15 μ g/mL的甜菜碱标准品对两种检测器的灵敏度进行比较，结果如图4所示：甜菜碱在CAD检测器上的响应远远高于UV检测器。通过计算发现，此浓度是甜菜碱在UV检测器的定量限浓度（S/N=16.5），而在CAD检测器上S/N高达109，这体现了CAD检测器对低紫外吸收物质检测的灵敏度优势。

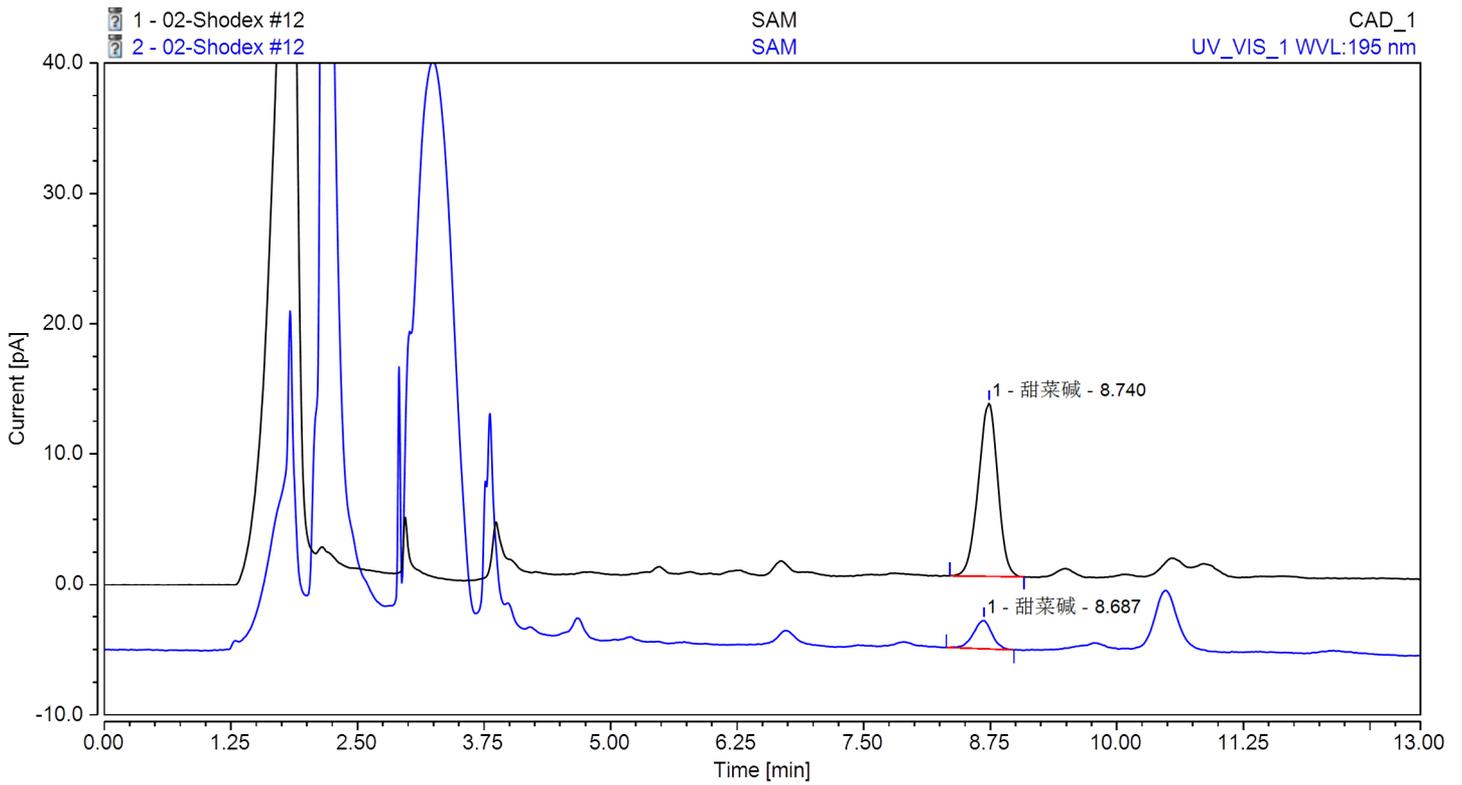


图3 枸杞子配方颗粒中甜菜碱检测图谱

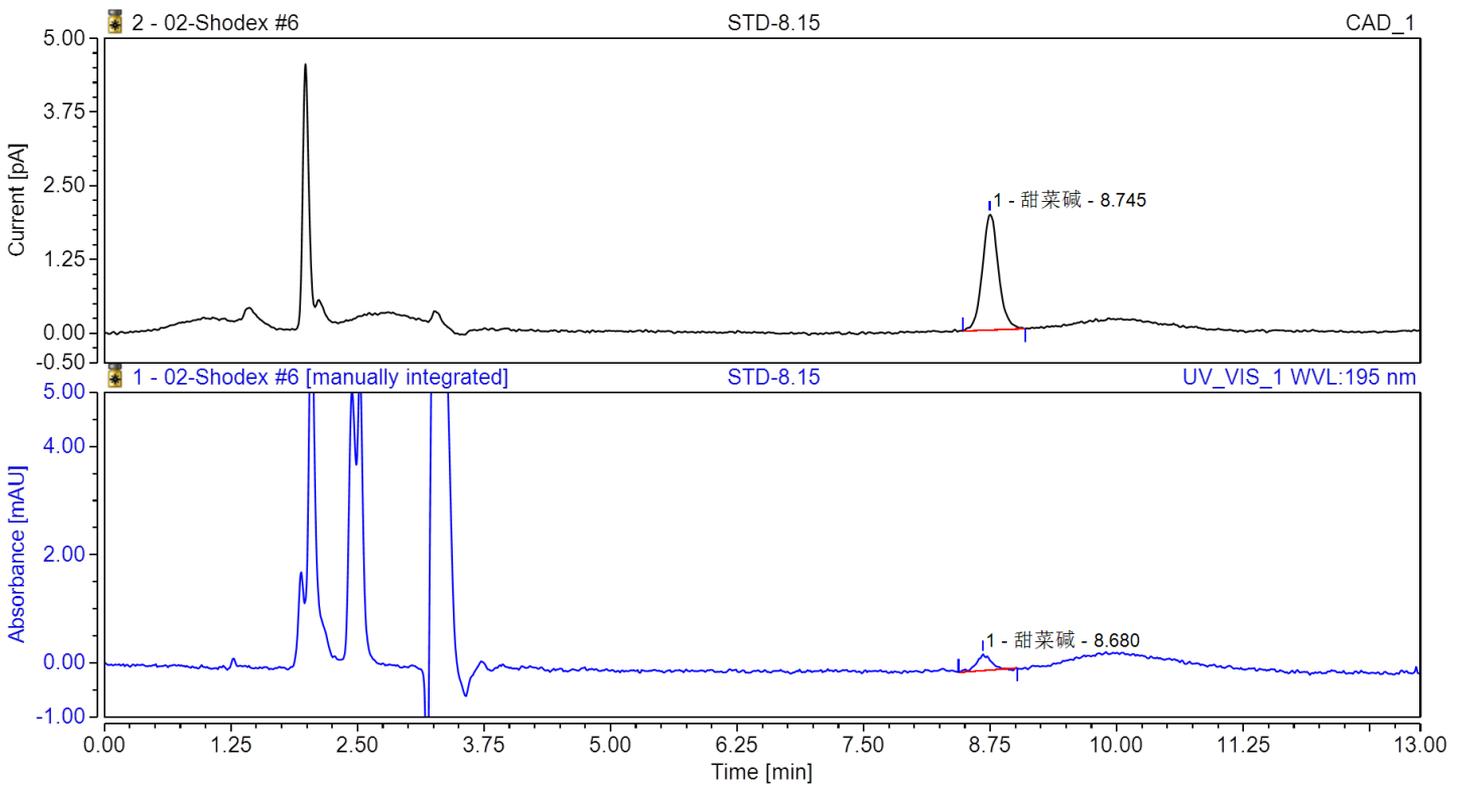


图4 浓度8.15μg/mL甜菜碱标准品检测图谱

另外，本次实验还配制了一系列不同浓度的甜菜碱标准品溶液，并考察了在CAD检测器的线性情况，结果见图5。甜菜碱在1.63-163μg/mL的宽浓度范围内呈良好线性关系， $R^2 > 0.9999$ ，并且不

需要对结果数据进行对数换算，仅通过变色龙软件进行二次线性拟合就可以直接、轻松得到线性方程。数据表明，CAD检测器可以实现甜菜碱的高灵敏度、宽线性范围的有效检测。

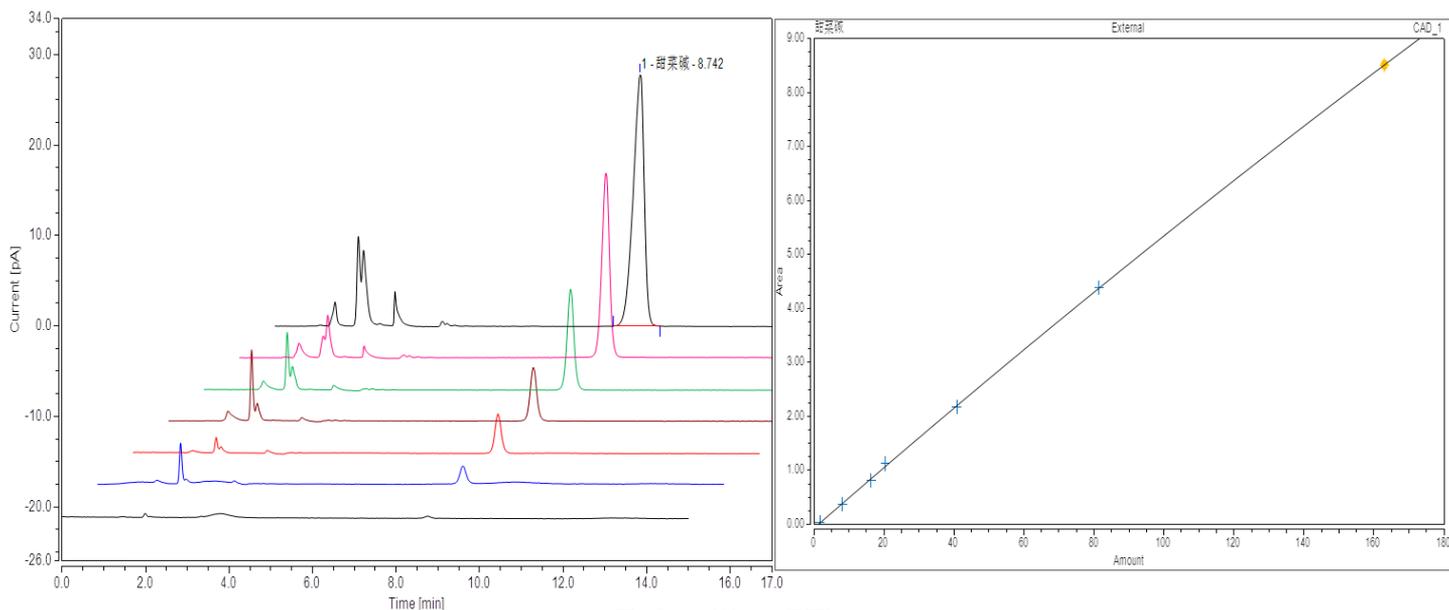


图5 甜菜碱性线性结果图谱

3.3 糖类物质检测

3.3.1 白术配方颗粒:

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公示稿也对糖类物质的含量测定进行了相关规定。由于糖类组分没有紫外吸收，多数检测方法是采用示差折光（RI）检测器或者ELSD检测器。但RI检测器的稳定性差，糖类物质在ELSD检测器上容易残留，影响检测结果。因此，近几年大家纷纷选用CAD检测器测定糖类物质。本次实验以白术配方颗粒为例，研究CAD检测器对糖类组分的检测效果。首先采用标准公示稿推荐的色谱条件1对

白术配方颗粒实际样品进行检测，结果发现（图6）：果糖和蔗糖均有效检测，且峰型好，分离度高，理论塔板数满足要求，其他组分对检测无干扰，说明CAD检测器对糖类物质同样拥有杰出的检测效果。但是，流动相中加入了三乙胺，会使得基线噪音有一定的提升（约0.2pA），这可能会对灵敏度会产生些许的影响。因此，实验又研究采用色谱条件2对糖类组分进行测定，并考察检测效果，结果如图7所示。结果表明，实际样品中果糖和蔗糖组分均能有限检出，且峰型好，理论塔板数满足要求，分离度高，其他组分对检测无干扰影响。并且流动相为乙腈和水体系，不加入任何添加剂成分，基线噪音小（约0.04pA），有利于高灵敏度检测。

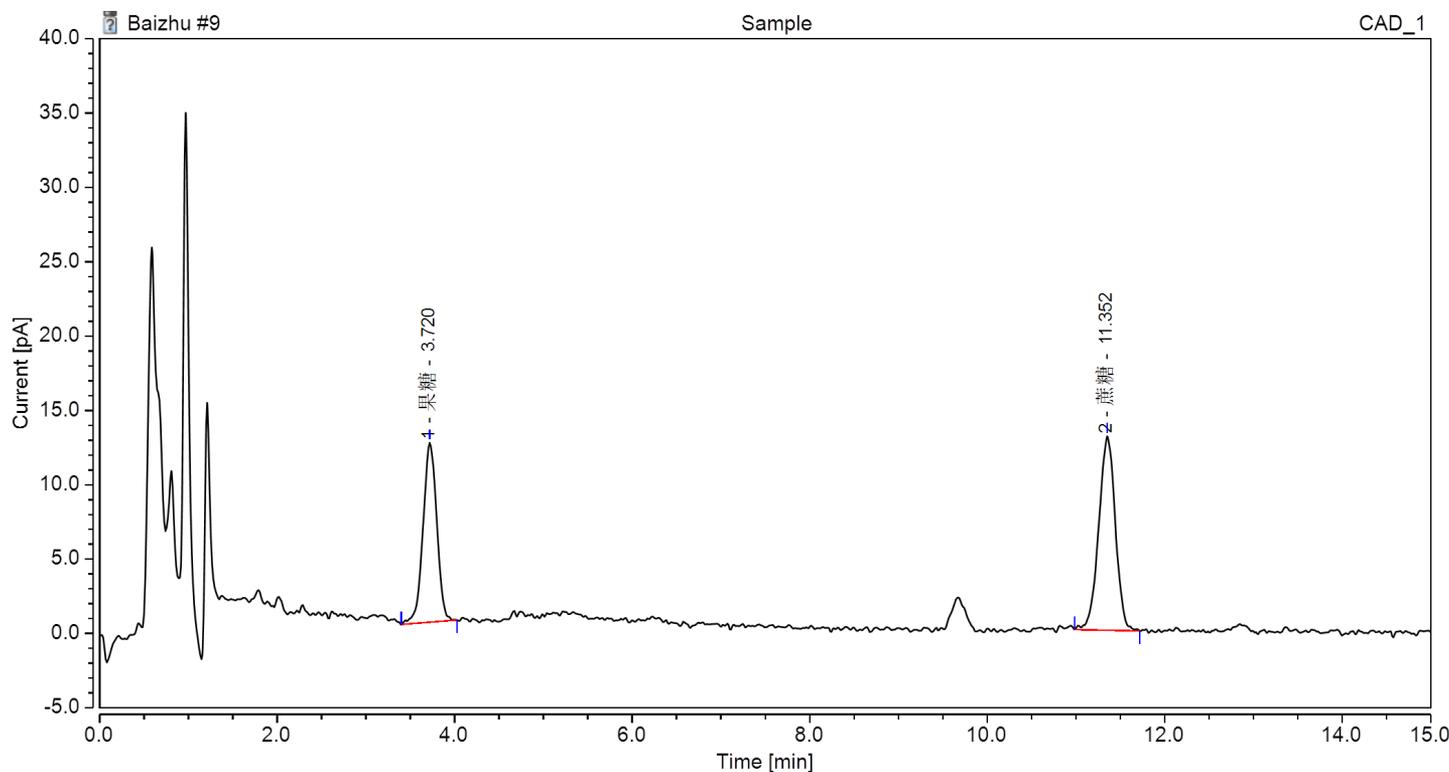


图6 白术配方颗粒中糖类测定图谱（色谱条件1）

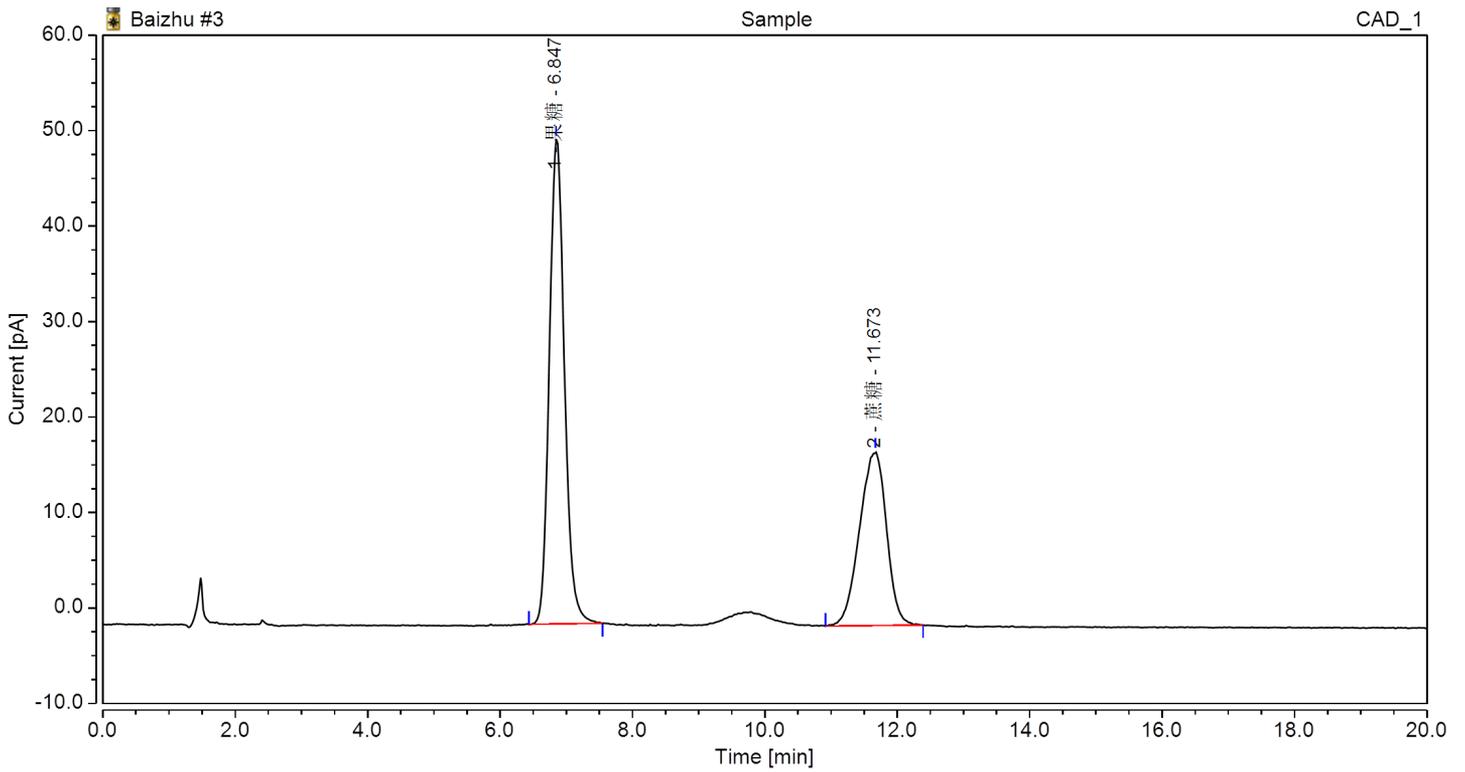


图7 白术配方颗粒中糖类测定图谱（色谱条件2）

关于定量标准曲线的建立，标准公示稿是通过ELSD检测器的外标两点法对数方程计算得到，而CAD检测器无需进行对数换算，仅通过一次线性拟合，就可以直接得到标准曲线，结果见图8。果糖和

蔗糖在标准公示稿的规定范围内均呈现良好线性， $R^2 > 0.999$ 。实验表明，CAD检测器可以实现中药配方颗粒的糖类物质含量测定。

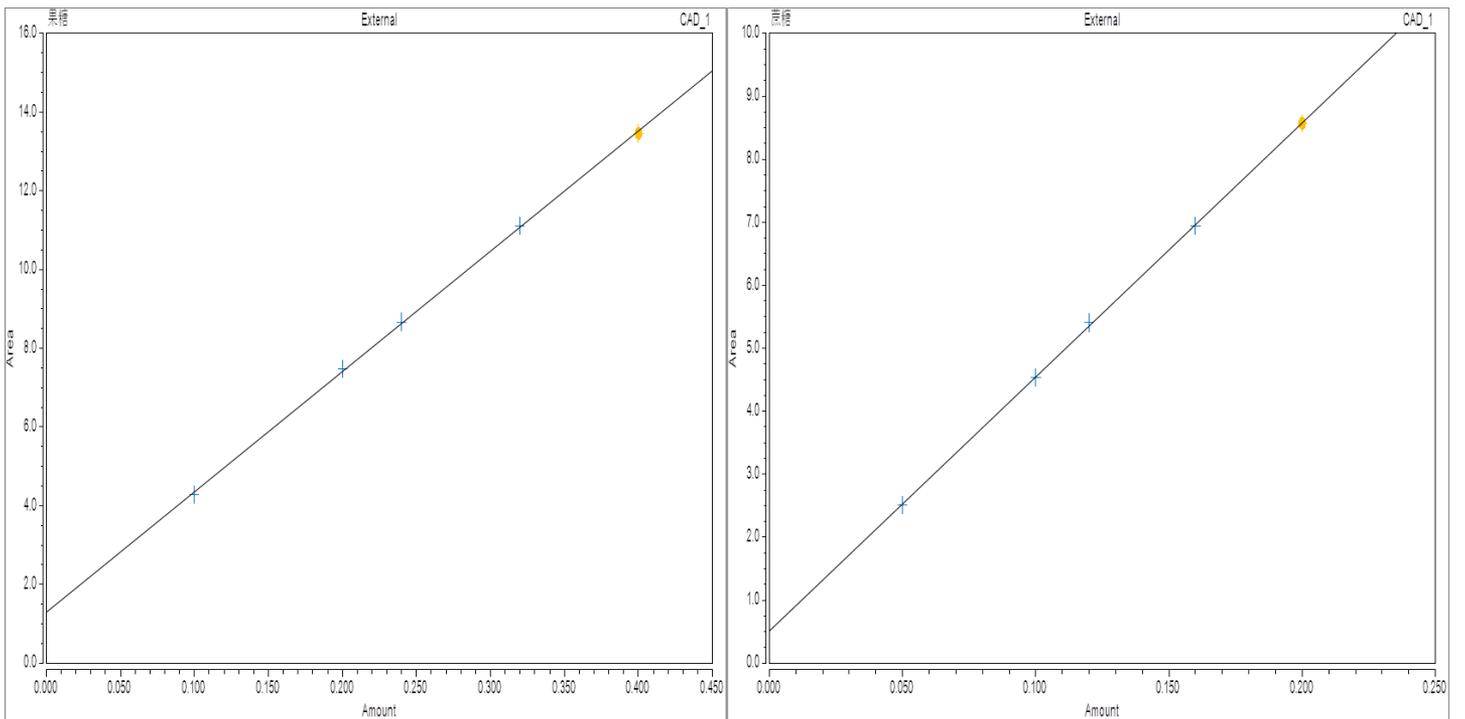


图8 果糖和蔗糖的线性结果（色谱条件2）

3.3.2巴戟天配方颗粒:

(盐)巴戟天配方颗粒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。由于糖类成分复杂,对这些成分的整体检测也具有一定难度,CAD检测器和酰胺基色谱柱则可以有效解决这一难题。2021年5月广东省公示的盐巴戟天配方颗粒省

级标准公示稿中就是采用酰胺基色谱柱分离和CAD检测器检测的方式,实现盐巴戟天配方颗粒中糖类组分的特征图谱检测和耐斯糖的含量测定。如图9所示,通过此方法,各糖类成分均能实现有限分离检测,且峰型较好,理论塔板数高,说明CAD检测器不仅可以实现单糖的检测,对低聚糖组分也有优异的检测效果。目前,广东、四川、青海等多个省份的盐巴戟天配方颗粒省级标准公示稿均采用了此方案。

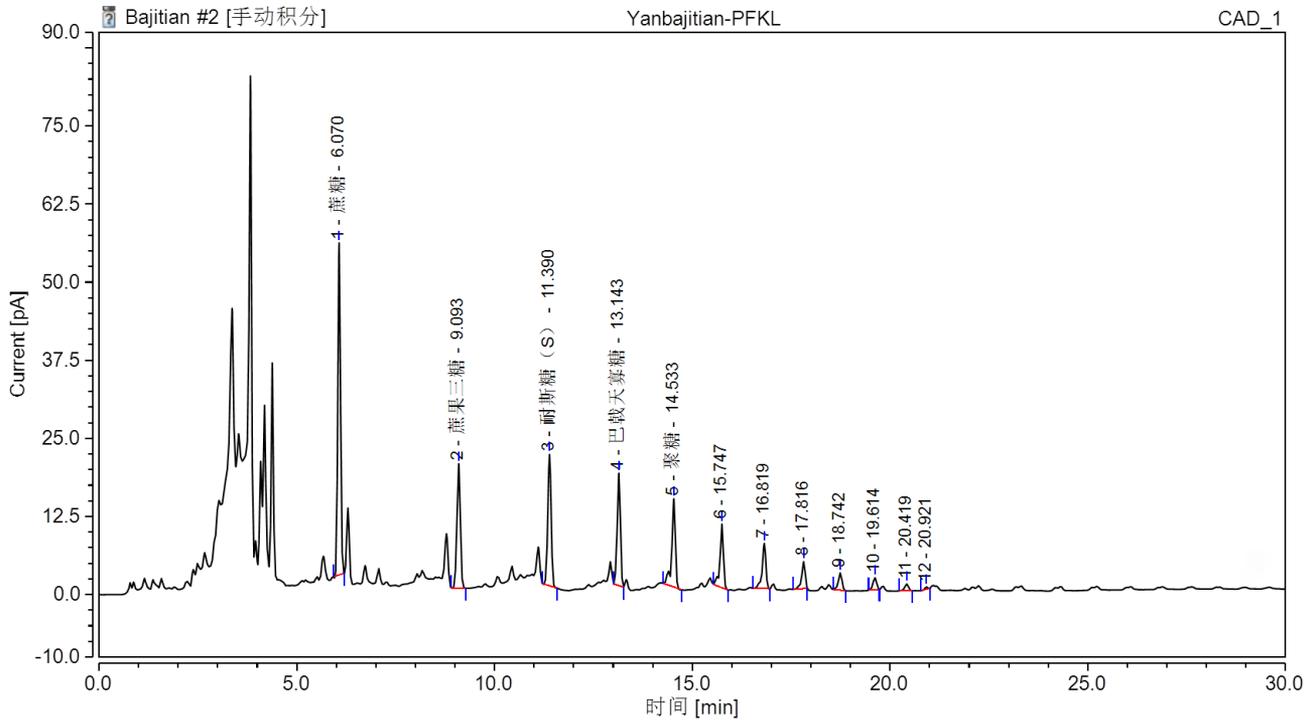


图9 盐巴戟天配方颗粒糖类特征图谱

另外,巴戟天配方颗粒的国家标准公示稿是采用ELSD检测器实现糖类组分的特征图谱检测。实验结果表明(图10),通过CAD检测

器也可以获得良好的检测效果,且耐斯糖峰的理论塔板数(10499)远高于标准中不低于2000的要求。

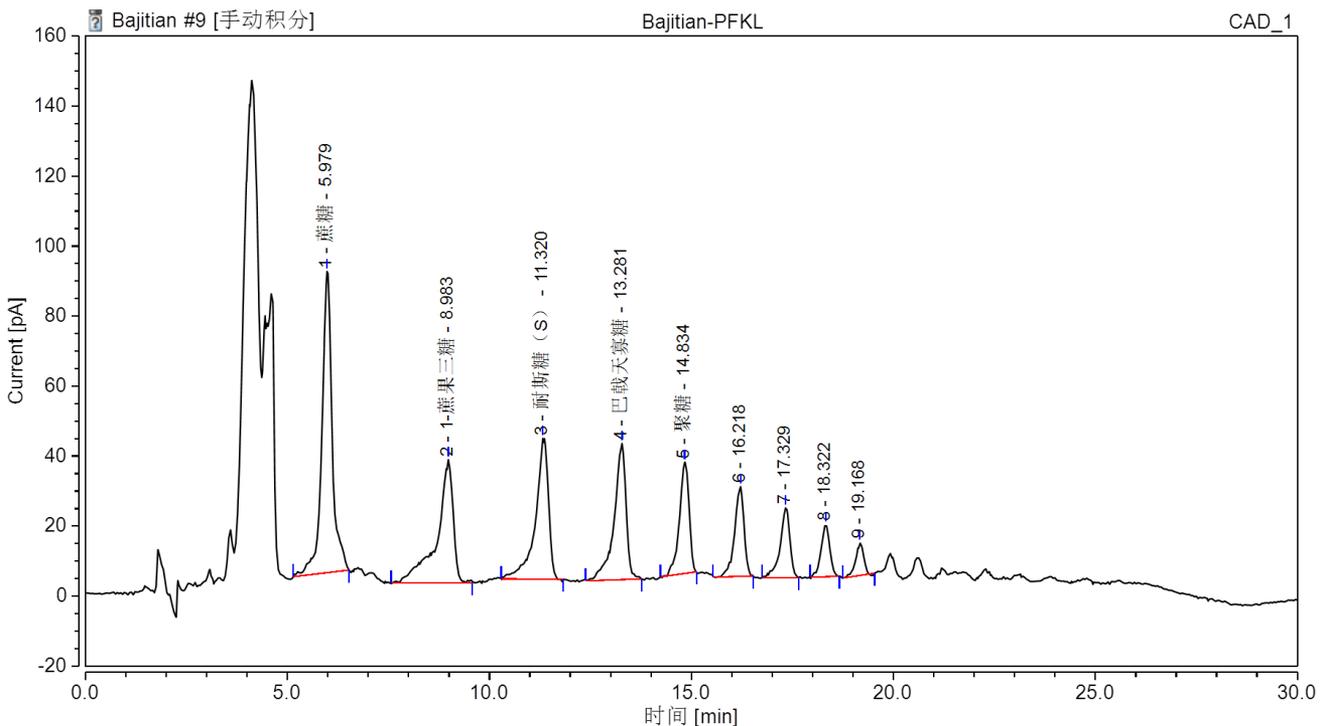


图10 巴戟天配方颗粒糖类特征图谱

结论

本文通过Thermo Fisher Ultimate3000超高效液相色谱仪和CAD检测器，结合实际案例，对不同品种中药配方颗粒的特征图谱和含量测定项进行了实验研究。结果表明，CAD检测器对中药配方颗粒中的低紫外吸收或无紫外吸收物质具有良好的检测效果。作为一种通用的质量型分析检测器，CAD检测器拥有高灵敏度、宽线性范围的检测特点，在中药配方颗粒的检测领域中具有较高的普适性。实验结果对中药配方颗粒的质量研究有一定的参考价值。

参考文献

[1] 各标准公示稿参考链接：

<https://pan.baidu.com/s/1gUcHYT3KSeICVqoM36KKGQ>

[2] 中国药典2020版第一部



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com