

# Acclaim Mixed-Mode 系列色谱柱应用于益母草颗粒、益母草膏中盐酸水苏碱和盐酸益母草碱含量的测定

胡金胜 熊亮 金琦芸

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

**关键词：**盐酸水苏碱，盐酸益母草碱，益母草颗粒，益母草膏，Acclaim Mixed-Mode WAX-1，Acclaim Mixed-Mode WCX-1，高效液相色谱

## 摘要

本文采用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱配合 CAD 检测器，测定益母草颗粒、益母草膏中盐酸水苏碱的含量，以乙腈-甲酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱，在 HILIC 和 WAX 双重作用机理下，增强了对盐酸水苏碱的保留能力，可有效与供试品溶液中的杂质峰分离。同时，采用 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱配合 DAD 检测器，测定益母草颗粒、益母草膏中盐酸益母草碱的含量，以乙腈-甲酸铵溶液为流动相进行等度洗脱，在 RP 和 WCX 双重作用机理下，增强了对盐酸益母草碱的保留能力，可有效与供试品溶液中的杂质峰分离。在两种不同的分析方法下，盐酸水苏碱和盐酸益母草碱的峰形优异，柱效卓越，避免了复杂基质的干扰，可实现准确的定性和定量，助力益母草相关品种的标准提高。

## 1. 引言

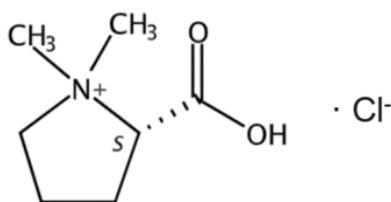
益母草为唇形科益母草属一年或二年生草本植物，广泛分布于全国各地。据《本草纲目》记载，益母草之根、茎、花、叶、实，并皆入药，可同用。益母草含有生物碱类、二萜类、黄酮类及挥发油等多种成分，具有活血调经，利尿消肿，清热解毒之功效，可用于月经不调，痛经经闭，恶露不尽，水肿尿少，疮疡肿毒等病症。《中国药典》规定了益母草的炮制方法：鲜品春季幼苗期至初夏花前期采割；干品夏季茎叶茂盛、花未开或初开时采割，晒干，或切段晒干。

现代医学研究表明，益母草的药理作用和它所含生物碱密切相关，而益母草所含的生物碱主要为水苏碱和益母草碱。在《中

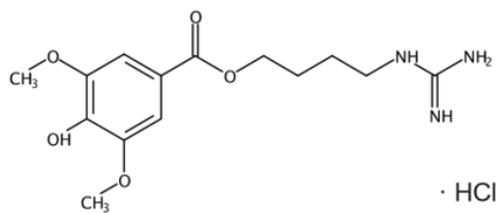
国药典 2020 版》-一部-药材和饮片<sup>[1]</sup>中，收录了益母草相关品种十余个，含量测定项下的目标组分为盐酸水苏碱和盐酸益母草碱（分子结构式如图 1 所示）。水苏碱分子结构含吡咯环和羧基，极性较强，反相保留较弱，并且紫外吸收较弱；益母草碱分子结构含有苯环和胍基，具有一定反相保留能力，但峰形容易拖尾，紫外吸收较强。表 1 汇总了《中国药典 2020 版》中收录益母草相关品种【含量测定】检测方法，其中以亲水作用 (HILIC) 或强阳离子交换 (SCX) 色谱柱配合紫外检测器 (UV) 或蒸发光散射检测器 (ELSD) 为主。

由于益母草本身成分复杂，经过不同的炮制工艺以及与其它药材配伍后得到的中成药或复方制剂，让提取的供试品溶液在液相分析时存在着较多的基质干扰，而现有的分析方法单纯依赖亲水作用或离子交换的分离机理，通常不能有效分离目标峰附近的干扰峰，无法实现准确的定性和定量，这一难题也长期困扰着众多中药分析工作者。

近期，山东中医药大学的劳永真老师与中国中医科学院中药研究所的苏江敏老师等，联合在《环境化学》上发表了一篇题为《高效液相色谱-电雾式检测法测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱》<sup>[2]</sup>的论文，文中“采用高效液相色谱-电雾式检测器法 (HPLC-CAD)，建立定量测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的新分析方法，快速有效的评价复方益母草胶囊的质量”，并且“对比 ELSD 和 CAD 不同检测器的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)，考察市场不同型号色谱柱对复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的分离效果，以及提取溶剂对盐酸水苏碱提取效率的影响”。结果表明：“通过对比 10 种亲水作用色谱柱 (HILIC)，最终确定



盐酸水苏碱 4136-37-2



盐酸益母草碱 24735-18-0

图 1 盐酸水苏碱和盐酸益母草碱分子结构式

利用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱键合相的叔胺官能团, 在 HILIC 模式下对盐酸水苏碱的强保留能力, 可有效与供试品杂质峰分离, 避免基质干扰。采用乙腈- 20 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵 (pH=4.0) = 90:10 作为初始流动相进行梯度洗脱, 配合 CAD 检测器测定盐酸水苏碱含量, 结果显示 CAD 具有较高的灵敏度, 为定量分析盐酸水苏碱提供了新方法新参考。

与此同时, 赛默飞实验室针对分析工作者及消费者关注度比较高的两个品种—益母草颗粒和益母草膏开展了相关试验。

表 1 《中国药典 2020 版》中收录益母草相关品种【含量测定】检测方法汇总

品种	来源	含量测定	色谱柱	检测器	理论塔板数要求	备注
益母草	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱 盐酸益母草碱	以丙基酰胺键合硅胶为填充剂 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂	ELSD UV, 277nm	≥8000 ≥8000	反相-离子对色谱法
益母草流浸膏	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	薄层色谱法	—	—	
益母草口服液	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	薄层色谱法	—	—	
益母草片	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	强阳离子交换 (SCX) 色谱柱	UV, 192nm	≥2000	
益母草胶囊	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	强阳离子交换 (SCX) 色谱柱	UV, 192nm	≥5000	
益母草颗粒	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	以强阳离子交换键合硅胶为填充剂 (SCX-强阳离子交换树脂柱)	UV, 192nm	≥2000	
益母草膏	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	以强阳离子交换键合硅胶为填充剂	UV, 192nm	≥2000	
复方益母草胶囊	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	以丙基酰胺键合硅胶为填充剂	ELSD	≥8000	
鲜益母草胶囊	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	以丙基酰胺键合硅胶为填充剂	ELSD	≥8000	
茺蔚子	中国药典 2020 版 一部 药材和饮片	盐酸水苏碱	强阳离子交换 (SCX) 色谱柱	UV, 192nm	≥3000	
益母草配方颗粒	中药配方颗粒国家标准 2019 年第一批公示稿	盐酸益母草碱 盐酸水苏碱	以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 以丙基酰胺键合硅胶为填充剂	UV, 277nm ELSD	≥8000 ≥8000	

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

2.1.1 Thermo Scientific™ Vanquish™ Core 高效液相色谱仪, 配置: 泵 VC-P20-A, 自动进样器 VC-A12-A, 柱温箱 VC-C10-A, 检测器 DAD VC-D11-A, CAD VH-D20-A; 数据处理 Chromeleo™ 7.3;

2.1.2 超声波清洗仪 (Fisherbrand™ FB15065);

2.1.3 高速冷冻离心机 (Thermo Scientific™ Hera-eus™ Multifuge™ X3R);

2.1.4 超纯水仪 (Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ Pro UV-TOC);

2.1.5 分析天平, 十万分之一 (Mettler Toledo);

2.1.6 pH 计 (Mettler Toledo FiveEasy Plus FE28);

2.1.7 乙腈, 色谱纯 (Thermo Fisher);

2.1.8 试验用水为超纯水, 18.2 MΩ·cm;

2.1.9 甲酸铵, 甲酸, 色谱纯 (CNW);

2.1.10 对照品: 盐酸水苏碱, 10 mg, 纯度 98.9%, 批次号 FS1620495; 益母草碱, 10 mg, 纯度 99.3%, 批次号 FS1623372 (天津阿尔塔);

2.1.11 供试品: 益母草颗粒、益母草膏均从药房采购;

2.1.12 微孔滤膜 (Titan3™ 亲水性 PTFE, 17 mm, 0.2 μm, P/N: 42213-NPL);

2.1.13 色谱柱 Acclaim Mixed-Mode WAX-1, 5 μm, 4.6×250 mm (P/N: 064985)  
Acclaim Mixed-Mode WCX-1, 3 μm, 3.0×150 mm (P/N: 070092)

### 2.2 缓冲盐溶液、对照品稀释液/供试品提取液、对照品溶液、供试品溶液的制备

2.2.1 缓冲盐溶液: 20 mM 甲酸铵 (1.26 g 甲酸铵溶于 1000 mL 超纯水), 用适量甲酸 (约 350 μL) 调节 pH 至 4.0, 即得;

2.2.2 对照品稀释液/供试品提取液: 乙腈-水-甲酸=500:500:1 (为避免氯离子干扰, 提取液中未添加盐酸);

2.2.3 对照品溶液的制备: 取盐酸水苏碱对照品适量, 精密称定, 加稀释液制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得; 取盐酸益母草碱对照品适量, 精密称定, 加稀释液制成每 1 mL 含 0.01 mg 的溶液, 即得;

2.2.4 供试品溶液的制备：取本品细粉 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入提取液 50 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）15 分钟，放冷，再称定重量，用提取液补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

### 2.3 色谱条件

益母草颗粒、益母草膏中盐酸水苏碱和盐酸益母草碱含量测定的色谱条件，如表 2 所示。

表 2 益母草颗粒、益母草膏中盐酸水苏碱和盐酸益母草碱含量测定的色谱条件汇总

检测方法	盐酸水苏碱 (HPLC-CAD)	盐酸益母草碱 (HPLC-DAD)
液相色谱仪	Vanquish™ Core HPLC 液相色谱系统	
色谱柱	Acclaim Mixed-Mode WAX-1, 5 μm, 4.6x250 mm (P/N: 064985)	Acclaim Mixed-Mode WCX-1, 3 μm, 3.0x150 mm (P/N: 070092)
流动相	A 为 20 mM 甲酸铵 (甲酸调节 pH 至 4.0), B 为乙腈	
洗脱程序	梯度洗脱	
	Time (min)	A (%) B (%)
	-3	10 90
	0	10 90
	8	10 90
	12	50 50
洗脱程序	等度洗脱	
	A:B=75:25	
	15	50 50
	18	10 90
	28	10 90
	28	10 90
采集时间	28 min (预运行 3 min)	15 min (预运行 1 min)
流速	1.0 mL/min	0.5 mL/min
柱温	30 °C	
进样量	10 μL	5 μL
检测器	CAD, 采集频率: 5 Hz; 过滤常数: 3.6 s; 蒸发温度: 50 °C	DAD, 采集波长: 277 nm; 采集频率: 5 Hz; 光谱采集: 190-400 nm

## 3. 实验结果与讨论

### 3.1 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 应用于益母草颗粒和益母草膏中盐酸水苏碱含量测定

盐酸水苏碱对照品的保留时间为 9.920 min，峰形优异，不对称因子为 1.04，柱效卓越，理论塔板数为 14754，如图 2 所示。

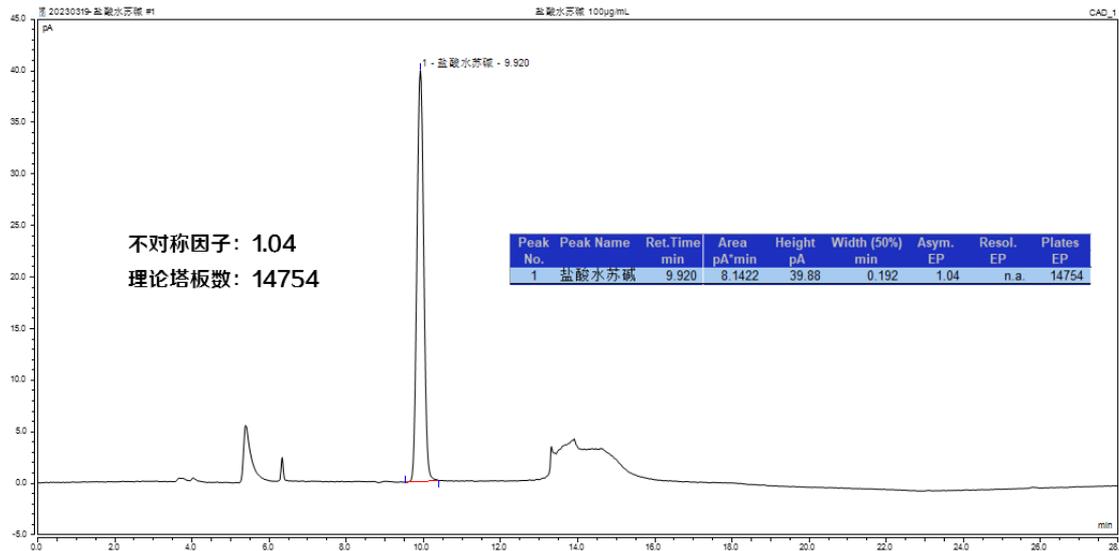


图 2 盐酸水苏碱对照品溶液谱图 (100 μg/mL)

益母草颗粒供试品溶液中盐酸水苏碱的保留时间为 9.927 min，不对称因子为 1.07，理论塔板数为 14270，如图 3 所示。益母草膏供试品溶液中盐酸水苏碱的保留时间为 9.923 min，不对称因子为 1.06，理论塔板数为 13910，如图 5 所示。益母草颗粒和益母草膏供试品溶液连续 3 次进样，重现性良好，保留时间偏差较小，如图 4 和图 6 所示。

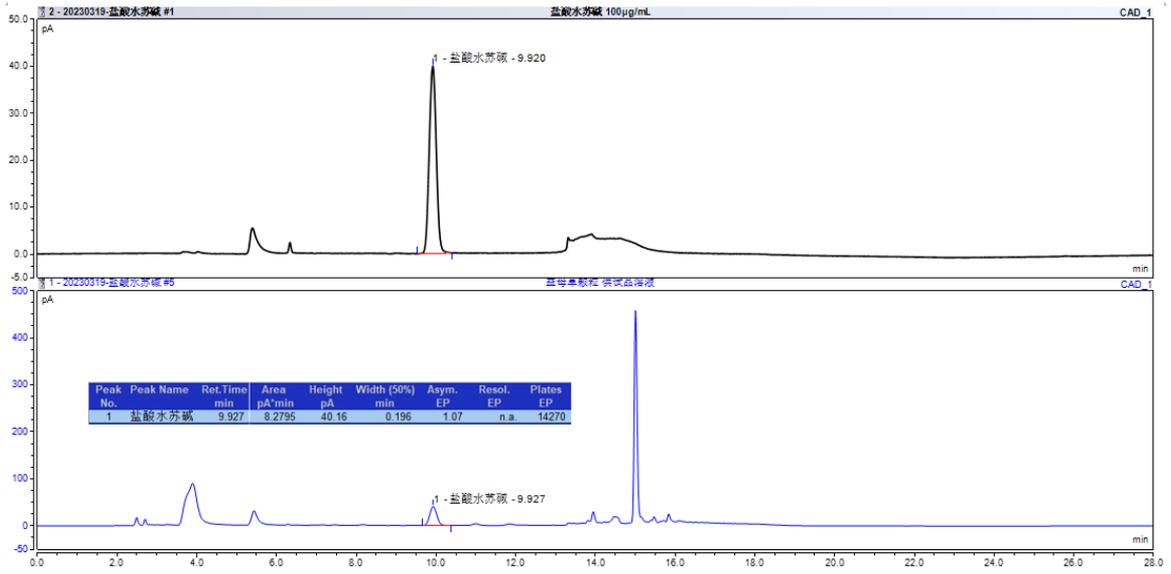


图3 益母草颗粒对照品、供试品溶液叠加谱图

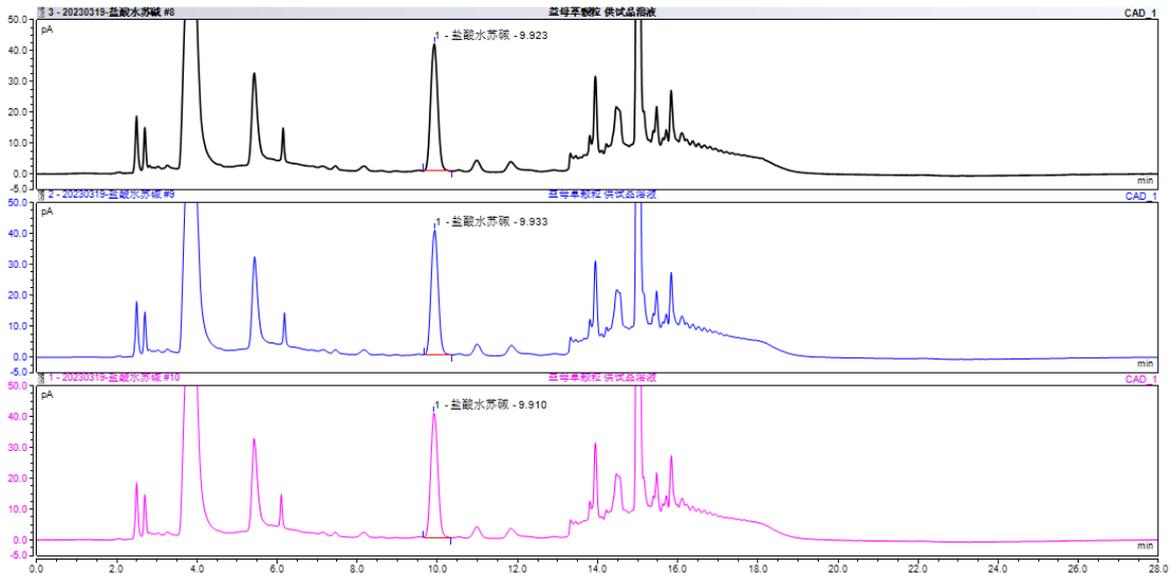


图4 益母草颗粒供试品溶液连续进样叠加谱图 (n=3)

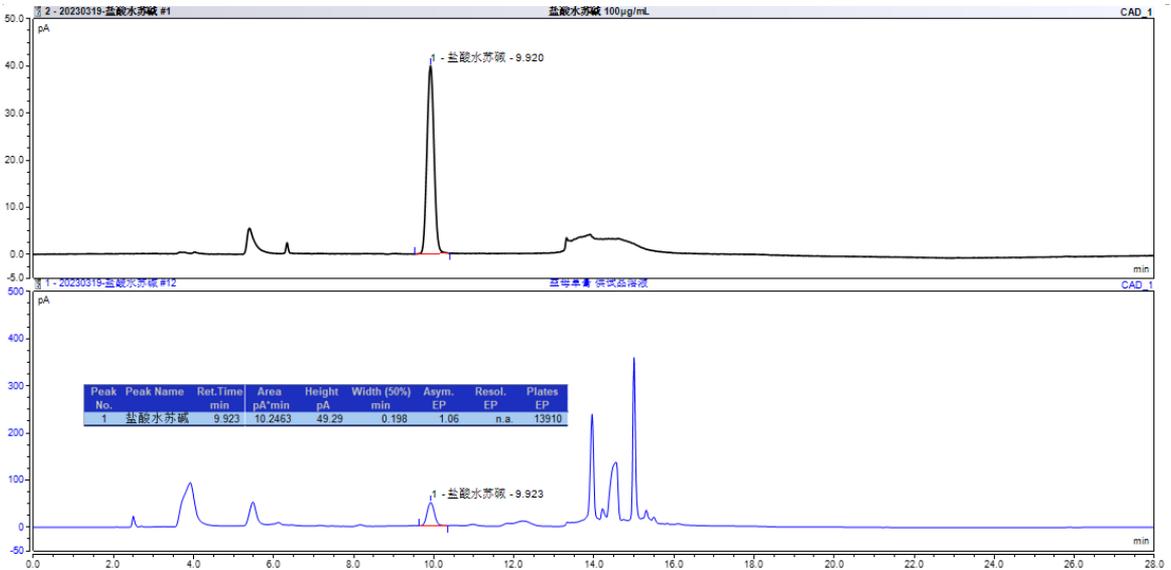


图5 益母草膏对照品、供试品溶液叠加谱图

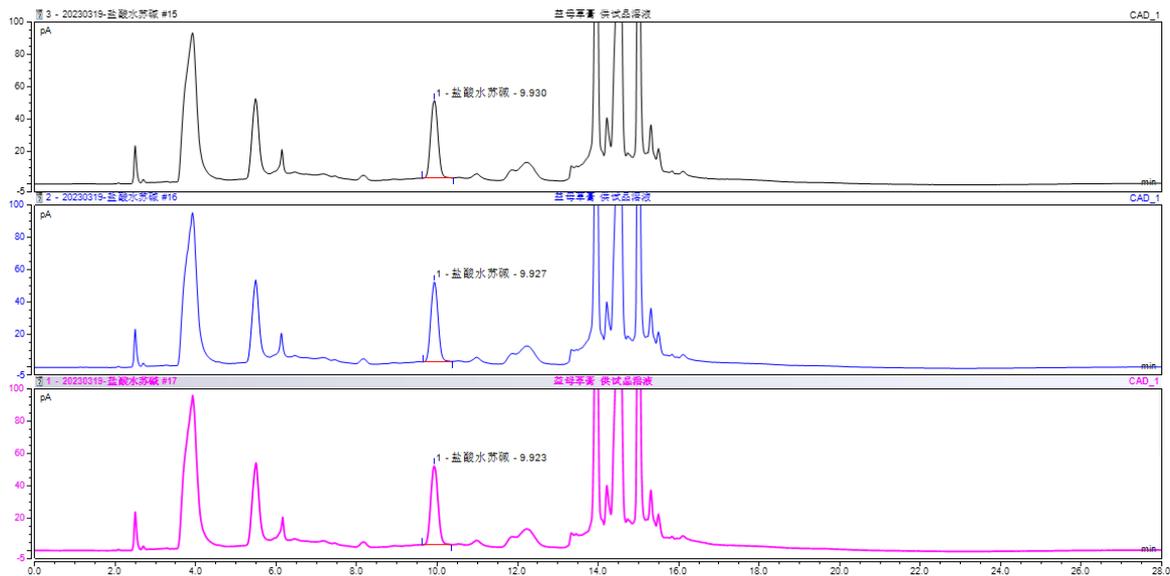


图 6 益母草膏供试品溶液连续进样叠加谱图 (n=3)

### 3.2 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 应用于益母草颗粒和益母草膏中盐酸益母草碱含量测定

盐酸益母草碱对照品的保留时间为 9.310 min，峰形优异，不对称因子为 1.01，柱效卓越，理论塔板数为 14599，如图 7 所示。

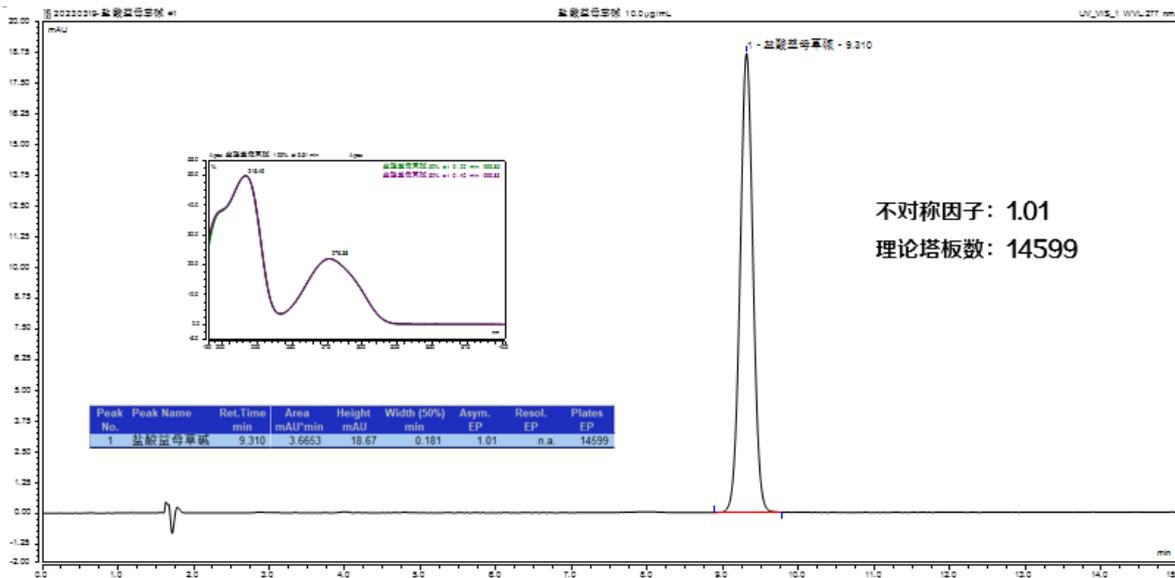


图 7 盐酸益母草碱对照品溶液谱图 (10.0  $\mu\text{g/mL}$ )

益母草颗粒供试品溶液中盐酸益母草碱的保留时间为 9.313 min，不对称因子为 1.01，理论塔板数为 12929，如图 8 所示。益母草膏供试品溶液中盐酸益母草碱的保留时间为 9.297 min，不对称因子为 1.02，理论塔板数为 13054，如图 10 所示。益母草颗粒和益母草膏供试品溶液连续 3 次进样，重现性良好，光谱图匹配度高，保留时间偏差小，如图 9 和图 11 所示。

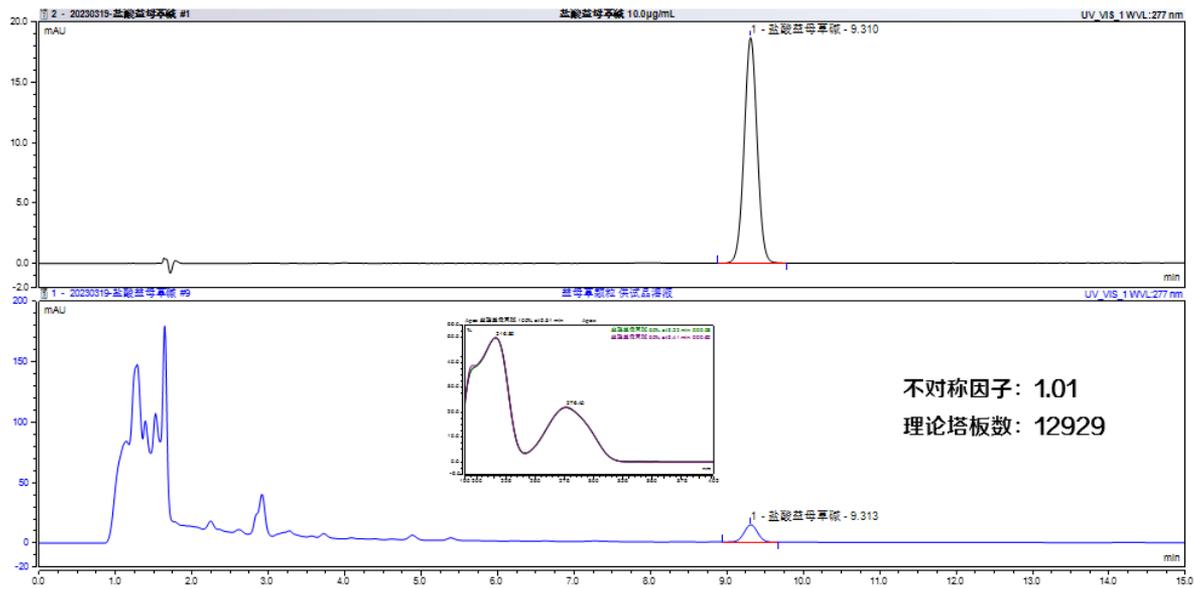


图 8 益母草颗粒对照品、供试品溶液叠加谱图

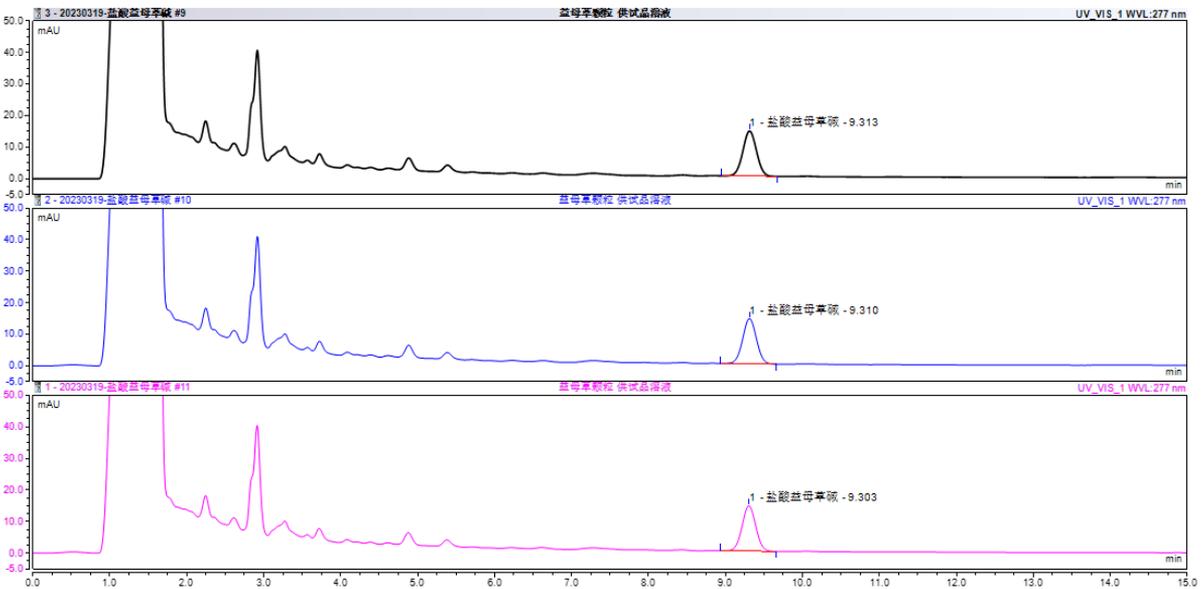


图 9 益母草颗粒供试品溶液连续进样叠加谱图 (n=3)

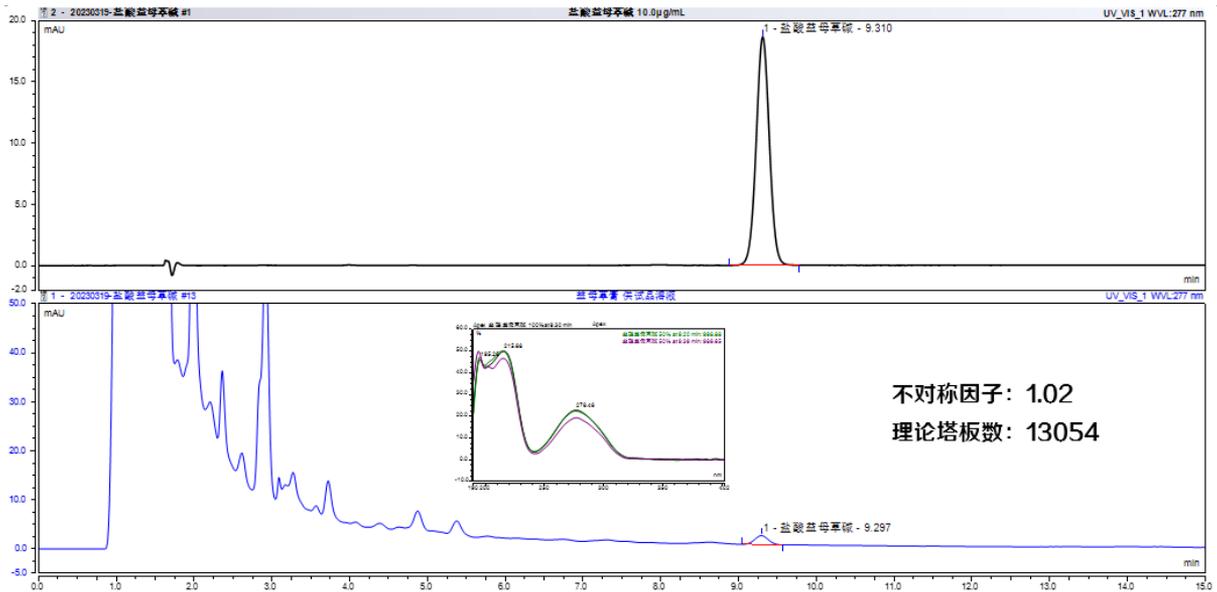


图 10 益母草膏对照品、供试品溶液叠加谱图

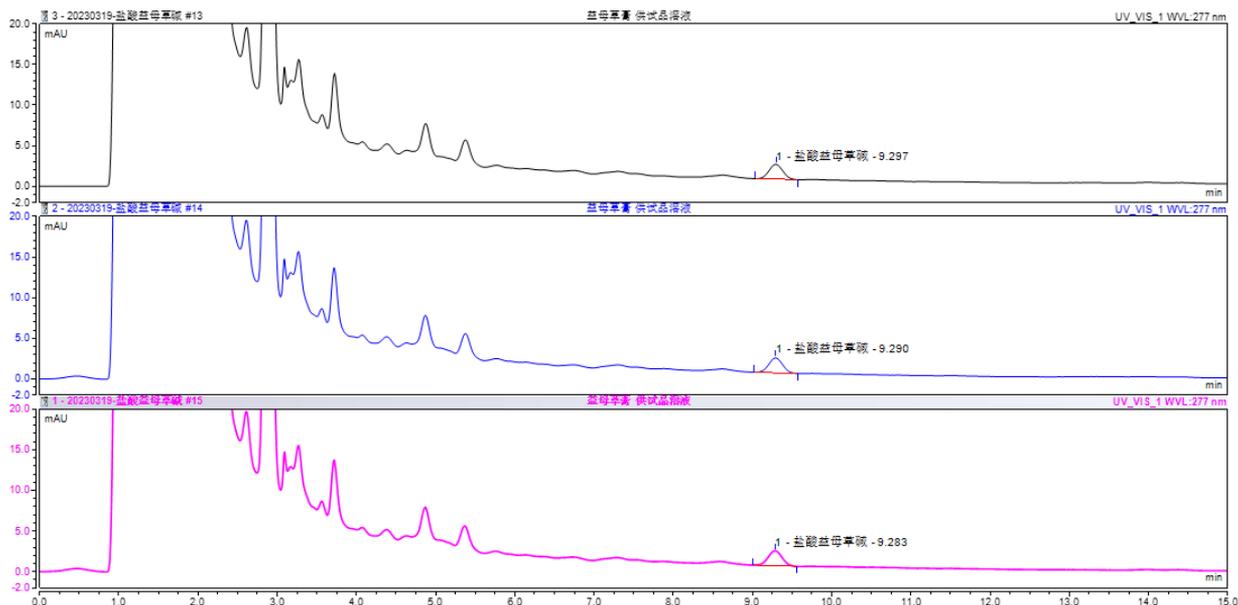


图 11 益母草膏供试品溶液连续进样叠加谱图 (n=3)

### 3.3 分离模式的选择

盐酸水苏碱的分子结构含吡咯环和羧基，两性离子的构型使其具有较强的极性，反相无保留。在混合模式条件下，仅依靠弱阳离子交换或弱阴离子交换，保留均较弱，并且容易受到基质干扰。得益于 Acclaim Mixed-Mode 系列色谱柱的多重保留机制，通过不断优化色谱条件，最终确定在 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱的 HILIC 和 WAX 双重作用机理下，能够增强了对盐酸水苏碱的保留能力。与此同时，盐酸益母草碱分子中的苯环和胍基通过 RP 和 WCX 的双重作用机理，在 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱上有着出色的保留。

### 3.4 检测器的适用性

盐酸水苏碱的紫外吸收较弱，而盐酸益母草碱的紫外吸收较强，在药典方法中测定盐酸水苏碱推荐的检测器为蒸发光散射检测器 (ELSD) 和紫外检测器 (UV)，其中 UV 检测器的采集波长设定为 192 nm，接近紫外端，基线波动大，基质干扰强，在大多数品种中适用性较差。在 0512 通则收录的检测器中，同属于质量型检测器的电雾式检测器 (CAD)，其灵敏度和稳定性均高于 ELSD 检测器<sup>[2]</sup>，因此盐酸水苏碱含量的测定选择 CAD 检测器。另外，供试品中盐酸水苏碱的含量是盐酸益母草碱的 10 倍多，且盐酸益母草碱在 CAD 检测器上响应低，峰形容易受到干扰，而在 DAD 检测器上的特征吸收波长为 277 nm，可配合保留时间和光谱图定性，因此盐酸益母草碱含量的测定选择 DAD 检测器。本试验中两个分析方法采用了相同的流动相及供试品溶液制备方法，后续实验室可选择 Vanquish Duo 双三元液相系统配合 CAD 和 DAD 双检测器，同时分析两个目标组分以提高检测效率。

### 3.5 洗脱程序的优化

益母草颗粒的辅料为蔗糖和糊精，益母草膏的辅料为红糖。在 HILIC 模式下测定盐酸水苏碱时，初始流动相为乙腈-20 mM 甲酸铵 (pH=4.0)=90:10，并保持至 8 min，考虑到洗脱延迟，盐酸水苏碱基本上是在等度出峰，基线比较平稳。如果整个方法采用等度洗脱，在高比例有机相下，辅料中高浓度的蔗糖等在 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱上会有较强的保留，持续采集 20 min，依然有基质被洗脱下来，并且会残留到下一针进样，从而影响整个方法的重现性和稳定性。相较于传统的 HILIC 柱不耐受高比例水相（水相比例须低于 40%），Acclaim Mixed-Mode WAX-1 可在 100% 水相（水相须含缓冲盐）条件下运行。在盐酸水苏碱出峰后，将水相比例提高至 50%，可快速洗脱柱上残留的强保留基质，如图 3 和图 5 所示，主要集中在 13-17 min 出峰。经过一段时间的平衡后，即可恢复至初始状态。蔗糖在紫外检测器上无响应，并且盐酸益母草碱在 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱上保留较强，比较容易与益母草中的疏水性基质分离开来，因此，盐酸益母草碱的测定方法采用乙腈-20 mM 甲酸铵 (pH=4.0)=25:75 进行等度洗脱。

## 4. 结论

试验结果表明：采用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 配合 CAD 检测器，应用于益母草颗粒和益母草膏中盐酸水苏碱含量测定，对照品和供试品溶液中盐酸水苏碱主峰附近均无干扰峰，不对称因子均接近 1.0，理论塔板数均大于 12,000；采用 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 配合 DAD 检测器，应用于益母草颗粒和益母草膏中盐酸益母草碱含量测定，对照品和供试品溶液中盐酸益母草碱主峰附近均无干扰峰，不对称因子均接近 1.0，理论塔板数均大于 12,000。本试验中所涉及的两个检测方法均具有一定创新性，盐酸水苏碱和盐酸益母草碱的峰形优异，柱效卓越，理论塔板数是药典规定值的两倍多，可为益母草相关品种的药典标准提高提供参考。

## 关于 Acclaim Mixed-Mode 混合模式色谱柱

Acclaim Mixed-Mode 系列混合模式色谱柱能够在单一键合相上提供多种保留机制，选择性与 C18 反相色谱柱互补。Acclaim Mixed-Mode WAX-1 键合相为带有叔胺末端的疏水烷基链键合硅胶，保留机制有 RP、WAX、HILIC 等，其中疏水烃链提供反相保留 (RP)，叔胺端基主要提供弱阴离子交换 (WAX)，适用于酸性化合物分析，如含羧酸、磺酸官能团结构，有机酸类。Acclaim Mixed-Mode WCX-1 键合相为带有羧基末端的疏水烷基链键合硅胶，保留机制有 RP、WCX、HILIC 等，其中疏水烃链提供反相保留 (RP)，羧基端基主要提供弱阳离子交换 (WCX)，适用于碱性化合物分析，如含伯/仲/叔胺及季铵结构，有机胺类、含氮杂环等。

## 关于电雾式检测器 (CAD)

电雾式检测器 (Charged Aerosol Detector; CAD) 是赛默飞独有的一款新型的质量型通用检测器，它灵敏度高，重复性好，对非挥发和半挥发的化合物均有良好响应，为无紫外吸收和弱紫外吸收化合物的液相分析提供了新的利器。目前已有去氧胆酸和钆布醇等多个品种的 CAD 方法被美国药典和欧洲药典收录。在 2020 版中国药典 0512 通则中，CAD 检测器也已被收录。在中药配方颗粒国家标准中，青箱子、麦冬等品种采用了 CAD 检测器进行特征图谱或含量的测定。

## 参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 劳永真, 苏江敏, 章军等. 高效液相色谱-电雾式检测法测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱[J]. 环境化学, 2023, 42(02): 675-678.
- [3] Acclaim Mixed-Mode 系列色谱柱应用于益母草颗粒、益母草膏中盐酸水苏碱和盐酸益母草碱含量的测定. CCS-ZY-470



赛默飞  
官方微信

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

thermo scientific