

核离子计数检测器在药物分析中的应用

樊玉丹¹, 李银峰², 陈晓雨¹, 黄凤芸¹, 林秀云¹, 靳朝东^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

摘要: 核离子计数检测器 (NQAD) 是一种新型的通用型高效检测器, 基于水凝粒子计数专利技术和气溶胶原理, 操作简单, 具有较高的信噪比和灵敏度, 检测范围广, 重复性和稳定性好, 可以检测到纳克级水平。该检测器适用于几乎所有物质 (挥发性物质除外), 检测药物一般不需要衍生化处理, 准确度较高。介绍其在抗生素类、糖类、离子类、酸类、聚合物类、皂苷类、甾醇类、脂类和环胺类等化合物分析中的应用。

关键词: 核离子计数检测器; 水凝粒子计数器; 高效液相色谱; 药物分析

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)02-0228-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.026

Advances on the application of nano quantity analyte detector in pharmaceutical analysis

FAN Yu-dan¹, LI Yin-feng², Chen Xiao-yu¹, HUANG Feng-yun¹, LIN Xiu-yun¹, JIN Chao-dong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Nano quantity analyte detector (NQAD) is a new general detector, which is based on the patented technology of water condensation particle counting and aerosol principle. Therefore, some advantages can be achieved such as simple and reliable operation, high signal-to-noise ratio and sensitivity, wide range of detection, excellent precision and stability, and the detection of ng level. The detector is suitable for almost all substances except volatile ones, which does not need derivative processing and has high degree of accuracy. The application of nano quantity analyte detector in analysis of antibiotics, sugar, ions, acids, polymers, saponins, lipids, sterols, and heterocyclic amines are introduced.

Key words: nano quantity analyte detector; water condensation particle counter; HPLC; pharmaceutical analysis

高效液相色谱法 (HPLC) 是 20 世纪 70 年代迅速发展起来的一种高效、快速的普遍分析技术, 是现代分析化学中最主要的分析方法之一, 在药物分析中有广泛的应用^[1]。检测器作为 HPLC 的重要组成部分, 其中最常用的检测器有紫外检测器 (UVD)、蒸发光散射检测器 (ELSD)、示差折光检测器 (RID)、电雾式检测器 (CAD)、荧光检测器 (FLD)、电化学检测器 (ECD)、核离子计数检测器 (NQAD) 等, 检测器的发展程度直接制约着 HPLC 的技术进步与发展速度。一般来说, 选择性和灵敏度是检测器最重要的两个要素。紫外检测器只能检测在紫外

区有吸收的物质, 而且实验所用流动相在相应区域无紫外吸收, 紫外检测器的工作波长不能小于溶剂的截止波长^[2-3], 灵敏度相对偏低。荧光检测器只适用于能够产生荧光的物质, 对溶剂的纯度、pH 值、样品浓度、检测温度, 有很高的选择性^[4]。流动相中溶解的氧气及温度对电化学检测器检测干扰较大^[5]。蒸发光散射检测器不能用非挥发的缓冲盐及表面活性剂, 流动相中有机成分高时信号则可能被假性放大十几倍, 影响定量分析^[6-7]。示差折光检测器一般不能用于梯度洗脱^[8]。电雾式检测器的响应会受流动相组成的影响, 特别在梯度洗脱时, 流动

收稿日期: 2014-11-04

作者简介: 樊玉丹 (1988—), 女, 研究方向为药物分析。E-mail: 1017852043@qq.com

*通信作者 靳朝东, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (022)23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

相中有机相的量上升, 响应增大, 影响分析^[9-10]。但核离子计数检测器弥补这一不足, 最大限度兼顾检测器的适用性和选择性, 它是通用型、高灵敏度检测器, 适用于几乎所有物质(挥发性物质除外)的检测, 线性范围宽且信号响应具有质量一致性, 这种独特的性质可能开拓液相色谱的新领域。

核离子计数检测器最初是由美国南伊利诺伊州代尔本大学于 20 世纪 90 年代中期开始研发, 2006 年由美国 Quant Technologies 公司推出的基于水凝粒子计数专利技术和气溶胶原理的质量型高性能液相色谱检测器, 有的文章中也写作凝结核光散射检测器 (CNLSD)^[11-17]。

核离子计数检测器的工作原理可分为 4 个阶段。(1) 喷雾: 经色谱柱分离后的组分随着流动相一起进入雾化器针管中, 使用高速气流(氮气、氦气和空气)的汽化器, 使色谱柱中流出的液体通过加热的气体环境形成喷雾。(2) 汽化: 气溶胶雾状颗粒进入可以控制温度的蒸发漂移管中, 蒸发器消除流动相和其他的挥发性成分, 流动相被蒸发, 产生颗粒由流动相中含有不挥发性物质和微粒生成具有一定分布的粒子群, 不挥发性物质和微粒不断移动, 移动的幅度和物质本身的化学结构无关, 仅仅依从于质量。(3) 凝结: 在蒸发过程完成后, 不挥发性及难挥发性的物质被传到水凝粒子计数器中, 在漂移管的末端引入过饱和水蒸汽, 饱和水蒸汽凝结在颗粒上, 通过对增大粒子的长成比例的设定使其接近于激光下粒子能被逐渐检测到的区域。(4) 检测: 光学检测, 利用激光检测出的粒子数量对原有的不同大小的粒子群的分布位置及所溶解物质的量进行推断^[18-20]。

核离子计数检测器检测化合物不针对特异性的官能团, 不需要发色团和荧光基团的检测, 从而避免或减少化合物所需的衍生化作用。对于没有紫外吸收的物质、离子化较难的物质、没有电化学活性的物质、性质不明等物质的检测, 显示出极好的优越性, 主要用于分析抗生素类、糖类、阳离子和阴离子类、酸类、聚合物类、皂苷类、甾醇类、脂类和环胺类等化合物。

1 在抗生素类化合物分析中的应用

氨基糖苷类抗生素是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素, 此类药物无紫外吸收, 一般检测器很难测定。王金凤等^[21-22]利用核离子计数检测器检测氨基糖苷类化合物和硫酸卡那霉素注

射剂, 结果表明核离子计数检测器的灵敏度与电化学检测基本一致, 比紫外末端吸收检测高 3 倍。许明哲^[18]利用 HPLC 和 C₁₈ 色谱柱比较 NQAD 和 ELSD 对氨基糖苷类的硫酸庆大霉素组分测定, NQAD 灵敏度高, 检测限比 ELSD 高出约 100 倍, NQAD 最后检测部分是激光检测, 直接检测粒子个数, 而 ELSD 是光散射检测, 检测的是粒子造成的光散射量, 所以 NQAD 比 ELSD 更加准确, 且灵敏度比 ELSD 高 2 个数量级^[23]。Olsovsk 等^[20]用 NQAD 检测大环内酯类抗生素如竹桃霉素、红霉素、醋竹桃霉素、克拉霉素、罗红霉素, 实验结果与 ECD 检测进行了比较, NQAD 较 ECD 更灵敏, 能检测到的最低检测限为 3.0~5.4 μg/mL。除了大环内酯类抗生素, 核离子计数检测器也适用于检测各种结构的其他抗生素, 如林可酰胺类、嘧啶类、糖肽、氯霉素等。

2 在糖类化合物分析中的应用

糖类化合物在分析检测中大多没有紫外吸收或只有末端吸收, 一般检测器很难测定。蔡秀娟等^[24]对 *D*-木糖研究, 利用 NQAD 检测到的最低检测限为 0.7 μg/mL, 而 ELSD 试验时的最低检测限为 12 μg/mL。陈庆阳等^[25]对氨基葡萄糖类化合物的 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐和 *N*-乙酰基-*D*-氨基葡萄糖进行了检测, 利用 HPLC 和核离子计数检测器检测出 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐与 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖, 前者的检出限为 16 ng, 定量限为 50 ng, 后者的检出限为 8 ng, 定量限为 24 ng, 由于核离子计数检测器的检测部分是光电检测器, 测量的是单个光脉冲, 具有高的信号噪声比, 方便检测, 所有不挥发性、难挥发性的物质被检测到纳克级水平以及更小是可能的, 该超灵敏检测器的动态范围是 4 个数量级^[26]。

3 在离子类化合物分析中的应用

离子类化合物遇水可分解, 检测时一般需要加入离子对试剂。但用核离子计数检测器检测时不需要加入离子对试剂, 如戴安公司工作人员利用亲水性色谱与核离子计数检测器联用, 在不需要添加离子对时测定如钠、氯离子等, 该检测器检测方便, 准确度高^[27]。Risley 等^[28]利用亲水性色谱与核离子计数检测器检测硬脂酸镁药片中的镁, 该实验表现出了优异的线性和准确度, 体现了核离子计数检测器优越的性能。Cohen 等^[29]比较了不同气雾剂型检测器在添加改性剂(三氟乙酸或盐酸)后对挥发性碱的分析, 研究发现核离子计数检测器适合该检测,

并且具有较好的灵敏度。核离子计数检测器除了具有通用型检测器(如 ELSD、UVD、CAD)的一般优点外,还能与任何高效液相色谱系统兼容,通过 Chemstation 工作站控制,不需要 A/D 转换卡,操作简便^[20]。

4 在酸类化合物分析中的应用

Borowska 等^[30]测定游离脂肪酸的量,利用高效液相色谱法、RP-C₁₈ 柱和核离子计数检测器进行分析,响应不受流动相 pH 值变化的影响,检测高效、快速。资生堂公司在含甲酸的流动相条件下,核离子计数检测器用作质谱的辅助检测器对于 6 种胆酸(牛磺胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、鹅去氧胆酸)进行分析,进样量为 2 μL,体积流量为 400 μL/min,重复性、稳定性好,基线影响小,检测器具有高的准确度^[31];检测亚油酸时,使用 Capcell PAK C₁₈ MGII S₅ 色谱柱分别与 UVD 和 NQAD 串联进行比较分析,结果显示 NQAD 较 UVD 有更高的灵敏度^[32]。

5 在聚合物分析中的应用

Takahashi 等^[33]用 ELSD 和 NQAD 分别对聚合物进行检测,结果表明 NQAD 的检测限度是 ELSD 的 10 倍。Cohen 等^[29]用高效液相色谱法与气雾剂型检测器对挥发性碱的分析中提到核离子计数检测器检测聚合物具有很好的灵敏性。Fekete 等^[34]利用反相色谱法和核离子计数检测器检测聚山梨酯 20 和聚乙二醇,该方法既方便省时、节省试剂,又能实现快速分离,达到出色的线性响应,纳克到克级水平,并且极为适合梯度洗脱,比其他检测器有较好的优越性。资生堂公司利用 HPLC 和 Capcell Core MP S_{2.7} 色谱柱与核离子计数检测器对聚乙二醇进行梯度洗脱,得到了较好的分离,且持续的气流会使高浓度样品很快通过水基凝聚核粒子计数器,不会残留在其中^[35-36]。

6 在皂苷类化合物分析中的应用

皂苷由皂苷元与糖构成,是三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,一般检测器检测时需要衍生化处理。核离子计数检测器不但不需衍生化操作,提高了结果的准确度,还可直接测定多组分的量。资生堂公司利用 Capcell PAK C₁₈ MGII S₅ 色谱柱,梯度洗脱的条件下,核离子计数检测器检测出麦冬皂苷 D 和 D' 的分离^[37]。该检测器操作简单、影响因素少,可直接使用干燥空气,环保构造;维护简单,只需要对水基凝聚核粒子计数器的组成配件“wick”

进行半年 1 次的简单更换;触摸屏,数字化显示软键盘操作,具有良好的视觉效果;占地面积小,运行安静。

7 在甾醇类化合物分析中的应用

甾醇类化合物是具有氢化苯环体系的衍生物,资生堂公司利用 HPLC-NQAD 和 Capcell PAK C₁₈ MGII S₃ 色谱柱分析甾醇类化合物非去极性肌松药罗库溴铵及其肌松拮抗剂 sugammadex,两种化合物使用 UVD 检测时灵敏度低,使用 NQAD 能更有效地检出,信号响应不依赖化学结构;且对流动相中有机溶剂量没有特殊要求,可以接受 100%水~100%有机相^[38]。

8 在脂类化合物分析中的应用

脂类化合物一般不存在紫外吸收,用气溶胶型检测器能较好地检测^[39]。Beppu 等用 HPLC-NQAD 和 C₂₈ 柱检测可可脂中的三酰甘油分子,方法简便,检测器检测粒子的数量,最终显示的是被测物的响应值与质量在数学上呈线性关系、灵敏度高、精密度好^[40]。

9 在环胺类化合物分析中的应用

资生堂公司利用 Capcell Core C₁₈ S_{2.7} 色谱柱分析 1-金刚胺和美金刚胺两种治疗帕金森病和阿尔茨海默病药物的三环胺类结构的化合物,用核离子计数检测器检测,9 min 内分离,且无干扰存在,具有较高的灵敏度^[41]。

10 结语

漂移管的温度和载气压力是核离子计数检测器的两个重要参数。漂移管温度影响检测器的响应,温度升高,流动相蒸发趋于完全,信噪比升高,但温度太高,流动相沸腾,增加背景噪声,可能会由于组分的部分气化使响应信号变小。雾化载气压力影响雾化器中颗粒的形成,载气压力越高,气体的流量越大,雾化时形成的颗粒越小,流动相沸腾挥发,信噪比越高^[27]。

虽然核离子计数检测器具有以上局限性,但是其灵敏度高、线性范围宽且信号响应应具有质量一致性,这种独特的性质开拓了液相色谱对几乎所有物质(挥发性物质除外)进行检测的新领域。检测范围广,除了用于检测非挥发性及半挥发性的化学药品,以后还可用于对制药工程、工业产品、石油工程、环境监测、生命科学、麻醉品、农业、食品、饮料和天然产物等的分析。尤其对于不具备紫外发光基团的物质,未知痕量化合物的定量分析,弥补

了其他通用型检测器的不足,是新药研发中检测药物杂质好的降解产物的理想仪器,具有良好的前景。

参考文献

[1] 刘小琳,宋丽明,雷勇胜,等. 制备型高效液相色谱法在药物杂质研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 233-236.

[2] 李昌厚. HPLC 紫外检测器的主要技术指标及其测试方法的研究 [J]. 分析仪器, 2009(6): 36-39.

[3] 吕良,陈霏. 浅谈高效液相色谱仪检测器的发展与展望 [J]. 计量与测试技术, 2008, 35(9): 76-77.

[4] 刘翻,孙元社,唐涛,等. 新型激光诱导荧光检测器的研制及评价 [J]. 现代仪器, 2008, 14(6): 55-57.

[5] 王琰,王明娟,姚尚辰,等. 电化学检测器及其在中美欧药典中的应用与展望 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(11): 801-805.

[6] 张悦晗,甄汉深,成莉. 蒸发光散射检测器 (ELSD) 应用概况 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 831-832.

[7] 纪祥娟,王军,杨新光,等. 蒸发光散射检测器的应用概况及检定方法研究进展 [J]. 计量与测试技术, 2014, 41(5): 50-53.

[8] 霍芳,张志美,王建军,等. 高效液相色谱: 示差折光检测技术研究进展 [J]. 家畜生态学报, 2013, 34(7): 81-84.

[9] 刘路,高旋,杨永健. HPLC-电雾式检测器的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): 227-231.

[10] Almeling S, Ilko D, Holzgrabe U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis [J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 69: 50-63.

[11] Waichigo M M, Koropchak J. Evaluation of the performance of a prototype condensation nucleation light scattering detector for HPLC utilizing nanopure water as condensing fluid [C]. Chicago: Pittcon Conference, 2007.

[12] Mitchell C. Comparison of three universal evaporative aerosol detectors for HPLC [C]. Baltimore: Poster presentation at HPLC, 2008: 10-16.

[13] Hutchinson J P, Li J, Farrell W, et al. Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(12): 1646-1655.

[14] Moreau R A. Lipid analysis via HPLC with a charged aerosol detector [J]. *Lipid Technol*, 2009, 21(8): 191-194.

[15] Lisa M, Lynen F, Holcapek M, et al. Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1176(1/2): 135-142.

[16] Kakigi Y, Mochizuki N, Icho T, et al. Analysis of terpene lactones in a ginkgo leaf extract by high-performance liquid chromatography using charged aerosol detection [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(3): 590-594.

[17] Dixon R W, Peterson D S. Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(13): 2930-2937.

[18] 许明哲. 硫酸庆大霉素 C 组分 HPLC 测定方法研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.

[19] Quant Technologies. A new aerosol-based HPLC detector. [EB/OL]. (2007-11-10). [2014-10-28]. <http://www.Quant-NQAD.com>.

[20] Olsovská J, Kameník Z, Cajthaml T. Hyphenated ultra high-performance liquid chromatography: nano quantity analyte detector technique for determination of compounds with low UV absorption [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(30): 5774-5778.

[21] 王金凤,杨化新,陈金泉,等. 新技术在氨基糖苷类药物物质控方面的应用和进展 [J]. 中国药事, 2014, 28(4): 401-412.

[22] 王金凤,杨化新,朱俐,等. HPLC-NQAD 和 HPLC-ELSD 法测定硫酸卡那霉素注射剂的含量 [J]. 药物分析杂质, 2014, 34(4): 644-648.

[23] Dixon R W, Baltzell G. Determination of levoglucosan in atmospheric aerosols using high performance liquid chromatography with aerosol charge detection [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1109(2): 214-221.

[24] 蔡秀娟,许建中,黄宏南,等. 高效液相色谱-核粒子计数检测法测定 D-木糖的含量 [J]. 食品科学, 2013, 34(02): 179-181.

[25] 陈庆阳,许建中,夏金梅,等. 高效液相色谱: 核粒子计数检测氨基葡萄糖类化合物 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(6): 1043-1046.

[26] Koropchak J A, Heenan C L, Allen L B. Direct comparison of evaporative light-scattering and condensation nucleation light-scattering detection for liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 736(1): 11-19.

[27] Liu X D, Christopher Pohl. Is HILIC the best way for determination of active pharmaceutical ingredients and counterions [EB/OL]. (2011-11-03). [2014-10-28]. <http://www.dionex.com>.

[28] Risley D S, Magnusson L E, Morow P R, et al. Analysis of magnesium from magnesium stearate in pharmaceutical tablet formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with nano quantity analyte detection [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, 78/79C: 112-117.

[29] Cohen R D, Liu Y, Gong X Y. Analysis of volatile bases by high performance liquid chromatography with aerosol-based detection [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1229: 172-179.

[30] Borowska A, Antczak T. The usage of immobilized

- preparations of *Mucor circinelloides* lipase in plant oils conversion for polyols production [C]. Kongresszentrum: the 19th Annual Euro-Biotech Partnering Summit, 2011.
- [31] Shiseido. 胆酸的分析 [EB/OL]. (2014-01-08). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [32] Shiseido. 亚油酸的分析 [EB/OL]. (2013-10-11). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [33] Takahashi K, Kinugasa S, Yoshihara R, *et al.* Evaluation of a condensation nucleation light scattering detector for the analysis of synthetic polymer by supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(51): 9008-9013.
- [34] Fekete S, Ganzler K, Fekete J. Simultaneous determination of polysorbate 20 and unbound polyethylene-glycol in protein solutions using new core-shell reversed phase column and condensation nucleation light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2010(1217): 6258-6266.
- [35] Shiseido. 聚乙二醇的分析 [EB/OL]. (2014-01-08). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [36] Shiseido. Nano quantity analyte detector [EB/OL]. (2013-05-02). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [37] Shiseido. 麦冬样品及麦冬皂苷的分析 [EB/OL]. (2014-11-11). [2014-12-30]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [38] Shiseido. 罗库溴铵的分析 [EB/OL]. (2014-02-05). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.
- [39] Schönherr C, Touchene S, Wilser G *et al.* Simple and precise detection of lipid compounds present within liposomal formulations using a charged aerosol detector [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(5): 781-786.
- [40] Beppu F, Nagai T, Yoshinaga K, *et al.* Quantification of triacylglycerol molecular species in cocoa butter using high-performance liquid chromatography equipped with nano quantity analyte detector [J]. *J Oleo Sci*, 2013, 62(10): 789-794.
- [41] Shiseido. 1-金刚胺, 美金刚胺的分析 [EB/OL]. (2014-01-07). [2014-10-28]. <http://hplc.shiseidochina.com>.