

药品检测新技术 从 HPLC 到 UHPLC

中国食品药品检定研究院 组织编写
马双成 主编

 人民卫生出版社

药品检测新技术 从 HPLC 到 UHPLC

王 强 著

中国医药出版社

药品检测新技术:从 HPLC 到 UHPLC

中国食品药品检定研究院 组织编写

主 审 金少鸿 谢天培 庄晨杰

主 编 马双成

副主编 钱 勇 安 蓉

编 者 (以姓氏笔画为序)

丁 慧	马双成	马玲云	邢占磊
米健秋	安 蓉	杨新磊	肖 尧
陈 波	孟 颖	费文静	钱 勇
诸 晨	程 萍		

编写单位

中国食品药品检定研究院 国家食品药品监督管理局直属事业单位,是国家检验药品、生物制品质量的法定机构和最高技术仲裁机构。

上海诗丹德生物技术有限公司 上海市研发公共服务平台“中药标准物质专业技术服务平台”承担单位,致力于药品标准物质开发、药物活性成分的分离纯化、制备以及提供药物质量标准研究、工艺开发、检测等技术服务。

安捷伦科技有限公司 全球比较领先的测量公司,下属生命科学集团(LSG)。在生命科学领域、消费品、软件等方面具有较强的实力,为从基础药物研究到药物生产的整个制药产业价值链提供产品和服务。

人 民 卫 生 出

图书在版编目 (CIP) 数据

药品检测新技术：从 HPLC 到 UHPLC/马双成主编.
—北京：人民卫生出版社，2012.6
ISBN 978 - 7 - 117 - 15723 - 0

I. ①药… II. ①马… III. ①液相色谱 - 色谱法 - 应用 - 药物 - 检测 IV. ①R927.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 059977 号

门户网： www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网： www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有，侵权必究！

药品检测新技术：从 HPLC 到 UHPLC

主 编：马双成
出版发行：人民卫生出版社（中继线 010 - 59780011）
地 址：北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编：100021
E - mail：pmph @ pmph.com
购书热线：010 - 67605754 010 - 65264830
010 - 59787586 010 - 59787592
印 刷：三河市宏达印刷有限公司
经 销：新华书店
开 本：787 × 1092 1/16 印张：14
字 数：341 千字
版 次：2012 年 6 月第 1 版 2012 年 6 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号：ISBN 978 - 7 - 117 - 15723 - 0/R · 15724
定 价：43.00 元
打击盗版举报电话：010 - 59787491 E - mail：WQ @ pmph.com
（凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换）

主编简介

马双成，哲学博士（Ph. D），研究员，药物分析专业硕士研究生导师、中药化学专业博士研究生导师。现任中国食品药品检定研究院标准物质与标准化研究所所长，中国食品药品检定研究院第八届学术委员会委员，第七届全国药品标准物质委员会委员。主要社会兼职为：全国中药标准化技术委员会副主任委员、第九届/第十届全国药典委员会委员、第十届全国药典委员会标准物质专业委员会副主任委员、国家食品药品监督管理局药品/保健食品/化妆品审评专家、国家食品药品监督管理局第一届保健食品安全专家委员会委员、国家中药保护品种审评委员会委员、第四届/第五届中国兽药典委员会委员、中国合格评定国家认可委员会第一届/第二届标准物质/标准样品专业委员会委员。主要从事中（草）药化学成分和有效成分、天然产物化学、中药提取物（对照提取物）、药品标准物质、中药中有害残留物检测、药品安全性、中药检定、药品安全标准的制定等研究。

前言

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 是 20 世纪 70 年代迅速发展起来的一种分离分析技术,亦是自 80 年代以来分离技术中应用最广的技术手段。据估计,世界上几百万种化合物中除约 20% 宜用气相色谱 (GC) 分离分析外,其余 80% 以上的化合物都可用 HPLC 进行分离。HPLC 一般指在实验室规模内使用的液相色谱,它不包括生产流程中的低压液相色谱仪和制备级液相色谱仪。HPLC 仪器一般由输液系统、进样器、色谱柱、检测器和计算机控制与数据处理系统 (即色谱工作站) 组成,其中输液系统、色谱柱、检测器和色谱工作站是 HPLC 四大核心组成部分。

在建立色谱分离方法时,化学分析家们力求在尽可能短的分析时间内获得尽可能多的样品信息。高效、快速、灵敏的色谱分离技术始终是分析化学专业人士梦寐以求的目标。在 HPLC 技术发展过程中,色谱柱填料技术作为色谱分离的核心,一直推动和引领着液相色谱技术的发展。早在 20 世纪就有科学家预测:采用小颗粒填料的色谱柱可以获得更高的柱效、更快的分离速度和更高的灵敏度。随着 21 世纪初亚二微米小颗粒超高效液相色谱填料新技术的发展,引发了这种填料技术对液相色谱及其分析方法影响的深度研究。由于使用亚二微米填料的色谱柱在相同流速下传质阻力大,产生的压力较常规液相色谱显著提高,需要液相色谱系统具有更高的耐压能力;此外,高效小颗粒填料色谱柱又常常用于超快分析,对于液相色谱系统数据采集速率和扩散的要求也更高。因此,超高压 (效) 液相色谱 (Ultra High Pressure/Performance Liquid Chromatography, UHPLC) 系统应运而生。与传统采用 $5\mu\text{m}$ 填料颗粒色谱柱的 HPLC 相比,使用亚二微米填料的 UHPLC 具更高的耐压能力,并以其高分离度、高速、高灵敏度等性能特点,以及节省时间和溶剂的强大优势,已成为液相色谱 (LC) 技术发展的最具价值的方向之一^[1,2]。据权威调查机构数据^[3],UHPLC 全球市场在近五年间呈现高速增长的势头,高居各 LC 类别之首,呈现出一派替代传统分析型 HPLC 之势。

本书将使读者了解超高效液相色谱 (UHPLC) 的原理与优势,了解如何将常规的液相色谱 (HPLC) 方法转换成 UHPLC 方法,并获得理想的分离结果。本书亦以药典中部分中药和西药组分的液相色谱分析方法为例,展示了 UHPLC 技术在药品分析中的优异分离结果和优势。

编者

2012 年 1 月

目 录

上篇 UHPLC 原理与应用	1
1.1 UHPLC 的原理与技术优势	1
1.2 小颗粒填料技术的应用：如何实现技术优势	2
1.3 UHPLC 填料技术及对液相色谱系统的要求	3
1.4 HPLC 到 UHPLC 的方法转换	4
1.4.1 选择合适的 UHPLC 色谱柱	5
1.4.2 计算转换参数	6
1.4.3 设置 UHPLC 参数	7
1.4.4 方法转换实例（柴胡）	8
1.5 UHPLC 的方法优化	9
1.5.1 分离度问题	9
1.5.2 峰形问题：溶剂效应或其他因素	11
1.5.3 重现性问题	12
1.6 方法转换和优化过程中的方法学考察	13
下篇 UHPLC 技术在药物分析中的应用：示例	14
2.1 中药部分	14
2.1.1 药材和饮片	14
柴胡	14
川楝子	17
川牛膝	20
独一味	23
甘草	26
关黄柏	29
金银花	32
救必应	38
菊花	41
卷柏	45
决明子	48
苦楝皮	52
墨旱莲	54
千里光	57
肉苁蓉	63

山银花	66
酸枣仁	72
王不留行	78
豨莶草	82
重楼	85
2.1.2 提取物	89
人参茎叶总皂苷	89
人参总皂苷	92
三七总皂苷	95
2.1.3 成方制剂和单味制剂	98
安宫牛黄丸	98
补脾益肠丸	101
定坤丹	105
独一味胶囊	107
复方丹参滴丸	111
复方血栓通胶囊	112
桂附地黄丸	119
桂枝茯苓胶囊	122
黄连上清丸	133
龙胆泻肝丸	139
脑得生片	142
诺迪康胶囊	145
三黄片	153
麝香保心丸	158
天麻钩藤颗粒	165
天麻丸	170
天舒胶囊	173
稳心颗粒	181
腰痛宁胶囊	184
益心丸	187
2.2 化学药	193
阿奇霉素片	193
氯霉素滴眼液	199
头孢丙烯颗粒	202
头孢克洛干混悬剂	206
乙酰螺旋霉素片	209
参考文献	213
附录 UHPLC 方法说明	214

上篇 UHPLC原理与应用

1.1 UHPLC 的原理与技术优势

超高效液相色谱, 又称超高压液相色谱 (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC), 是近年来液相色谱领域最活跃的发展领域。UHPLC 技术完全基于高效液相色谱 (HPLC) 技术的基本原理, 并以亚二微米 (sub-2- μm) 小颗粒及新型表面多孔层高效填料技术为核心。

由经典色谱的 van Deemter 方程可以诠释小颗粒填料的技术优势。van Deemter 方程是描述线速度 [流速 (u_e)] 与塔板高度 [理论塔板高度 (HETP) 或柱效, 塔板高度与柱效成反比] 关系的经验方程, 可以由实验获得。由该方程得到的曲线 (图 1) 可以直观地了解小颗粒填料的特点与优势。

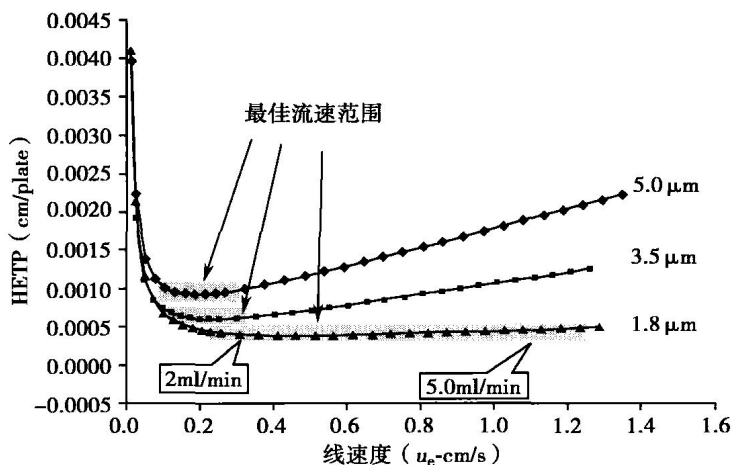


图 1 van Deemter 曲线

首先, 颗粒度越小, 相应曲线的塔板高度越低 (相应纵坐标的数值更小), 意味着其柱效越高, 分离度会更好; 因为高柱效, 获得的色谱峰相对高度亦会提高, 故灵敏度也可以得到改善。其次, 当颗粒度由大变小时, 获得最佳柱效的相应线速度 (流速) 也会提高, 即: 相比较大颗粒度的填料, 小颗粒填料在更高的流速获得最佳柱效 (即最佳分离度)。因此, 使用小颗粒填料可以获得更快的分离速度。最后, 小颗粒填料 (1.8 μm) 相应的塔板高度随线速度提高的变化趋势曲线亦和其他较大颗粒填料的变化趋势曲线有显著的不同: 较大颗粒 (3.5 μm 或 5 μm) 的曲线在超过最佳柱效 (曲线的最低点) 后, 随线速度的提高而显著提升 (即柱效显著降低), 而小颗粒填料的曲线则较为平缓 (即柱效降低不显著)。故当使用小颗粒填料色谱

柱时,可以通过提高流速来进一步加快分离速度,而不损失或分离度(柱效)的损失比较小。综上所述,采用小颗粒填料技术可以获得更快的分离速度,且分离结果具有更好的灵敏度和更高的分离度(峰容量更高)。

1.2 小颗粒填料技术的应用:如何实现技术优势

速度:小颗粒填料技术的速度通常是通过短柱或较高流速来实现的。众所周知:色谱柱的柱效与柱长成正比,与颗粒度成反比。填装良好的不同色谱柱之柱效可以用柱长/颗粒度之比(L/dp)来衡量。即:具有相同 L/dp 比值的不同规格色谱柱具有相近或相同的柱效。比如,4.6mm×150mm,5 μ m 的色谱柱,其 L/dp 值为:150/5 = 30;4.6mm×50mm,1.8 μ m 的色谱柱之 L/dp 值为:50/1.8 $\approx$ 28。两者比值接近,故两个不同规格的色谱柱具有相近的柱效或分离度。但不同的是:1.8 μ m 的色谱柱柱长(50mm)仅为 5 μ m 色谱柱(150mm)的 1/3,故分离速度是后者的 3 倍。而由 van Deemter 方程又可以得知:小颗粒填料的色谱柱获得最佳柱效的线速度比大颗粒要高,且提高流速时小颗粒填料的柱效损失较小,故小颗粒填料的色谱柱可以在较高流速下分离而保持或基本不损失分离度。因此,使用 1.8 μ m 色谱柱时,亦可进一步提高流速来加快分离速度。图 2 是西洋参药材中皂苷的分离结果。由图可知:采用小颗粒短柱(4.6mm×50mm,1.8 μ m)可以大幅度提升分离速度,并获得相同的分离结果。通常情况下,UHPLC 的分离速度较 HPLC 可以快 3~10 倍。

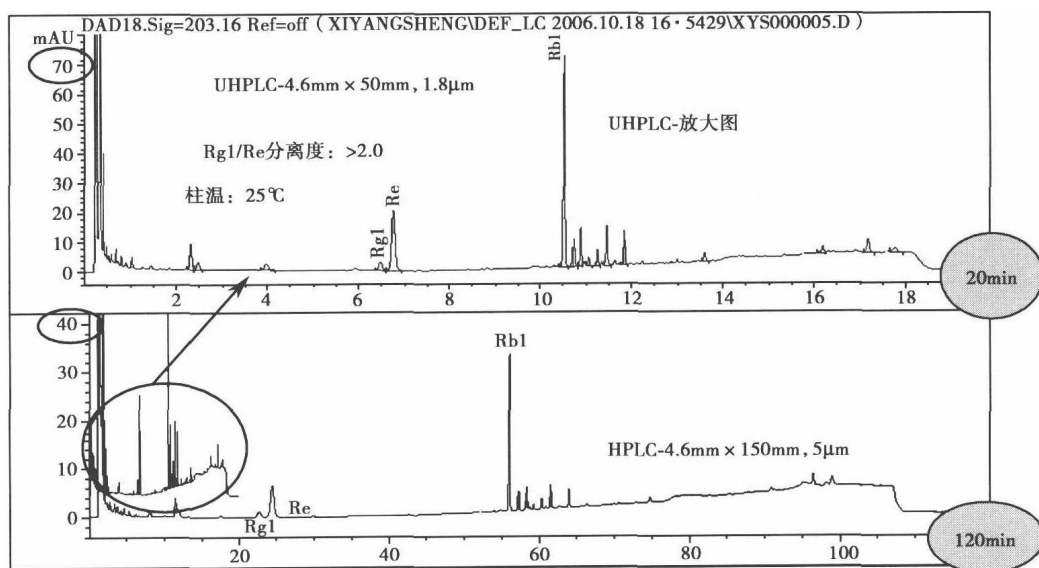


图2 西洋参分析:HPLC与UHPLC分离色谱图比较-UHPLC速度是HPLC的六倍
流动相:A:0.1% H_3PO_4 ,B:乙腈,梯度分离。UHPLC色谱柱长是HPLC色谱柱的三分之一,
其分离采用了2ml/min流速,是HPLC色谱柱的2倍。故获得了6倍的分离速度

分离度:小颗粒填料可以在更短的时间内获得更高的分离度(峰容量)。其更强的分离能力基于其颗粒度的降低(dp 变小,更高的 L/dp 值),因而可以获得更高的柱效。如,一只柱长为100mm的1.8 μ m色谱柱之 L/dp 值为:100/1.8 $\geq$ 50;而柱长为250mm的5 μ m色谱柱之 L/dp 值为:250/5 = 50,故前者之柱效高于后者,而1.8 μ m色谱柱的分离速度却因柱长

的缩短至少可以提高 2.5 倍($5\mu\text{m}$ 色谱柱的柱长是 $1.8\mu\text{m}$ 色谱柱的 2.5 倍)。如果采用更高流速,则分离速度可以更快。图 3 是川牛膝药材的分离示例。其中,使用传统 HPLC 色谱柱($4.6\text{mm}\times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$)难以分离目标组分杯苋甾酮和周围杂质,而采用小颗粒填料色谱柱($4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$, $1.8\mu\text{m}$)则在更短的时间内(30min)实现了基线分离的结果(分离度 R 分别为 1.64, 1.83)。

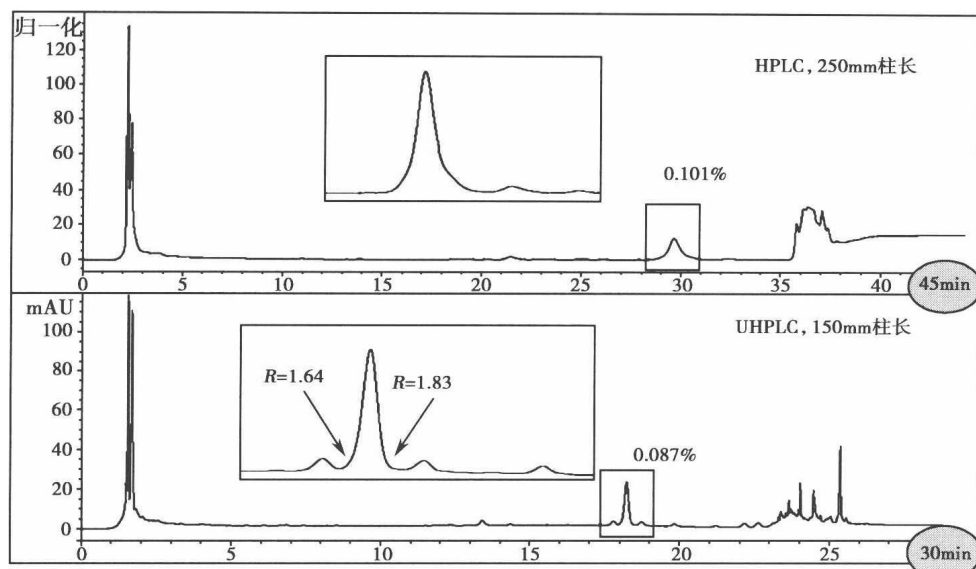


图 3 川牛膝药材中杯苋甾酮与杂质的分离

灵敏度:采用小颗粒填料技术获得的灵敏度提高主要得益于高柱效。柱效的提高使得色谱峰变窄,信噪比(峰高/噪声)提高,从而峰高提高。实际样品的分析结果表明:小颗粒色谱柱常常比相应规格的常规色谱柱($5\mu\text{m}$)进样量更高,故其灵敏度亦可因之而提升(见图 2, Rb1 色谱峰: HPLC 下峰高为 40mAU; UHPLC 下峰高为 70mAU)。需要注意的是:小颗粒对灵敏度的影响与色谱柱规格和进样量等色谱参数有关。

溶剂消耗:UHPLC 分离时间更短,即便采用更高的流速,亦可节省溶剂。图 2 的分离中, HPLC 和 UHPLC 方法采用相同内径的色谱柱(4.6mm),其中 HPLC 分离的溶剂消耗为 120ml; UHPLC 消耗 40ml。如果 UHPLC 采用更小内径的色谱柱,如采用 3.0mm 或 2.1mm 内径,则可节省更多溶剂,因为小内径色谱柱通常会使用更低的流速。通常情况下, UHPLC 分离可节省 80% ~ 90% 的溶剂消耗。

1.3 UHPLC 填料技术及对液相色谱系统的要求

自 2004 年商品化的亚二微米填料技术问世以来,适于 UHPLC 分离的填料技术获得了飞速发展。商品化的小颗粒填料色谱柱以反相填料为主(其中键合相包括 C_{18} , C_8 , 苯基, 氰基等),亦有正相、亲水相互作用色谱(HILIC)等其他分离机制的色谱柱可以选择。除 $1.7\mu\text{m}$ 、 $1.8\mu\text{m}$ 、 $1.9\mu\text{m}$ 等多种不同的全多孔型亚二微米色谱填料外,以 Poroshell 120 为代表的表面多孔层填料(图 4)亦得到愈来愈广泛的应用。与 $1.8\mu\text{m}$ 的全多孔小颗粒填料相比, $2.7\mu\text{m}$ 的表面多孔层技术的填料具有极其相似的 van Deemter 曲线,其柱效可达到前者的

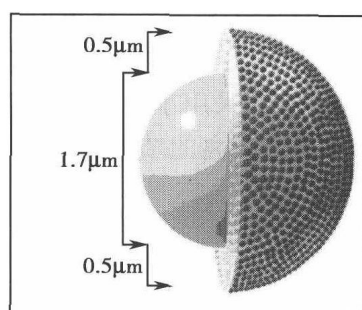


图4 表面多孔层填料的
结构示意图

80% ~ 90%, 但色谱柱压力要低得多(30% ~ 40%)。可以在相对低的压力下获得出色 UHPLC 的分离结果(图5)。

与采用 $5\mu\text{m}$ 填料色谱柱的常规 HPLC 相比,采用小颗粒填料进行的 UHPLC 分离对液相色谱仪器硬件有更高的要求,故 UHPLC 系统亦应运而生。在进行 UHPLC 分离时,由于较小颗粒度会产生较大的传质阻力,故会产生较高的反压。同时,小颗粒填料色谱柱由于高柱效及常常用于快速分离,色谱峰宽随之显著降低,需要具有高采集速率的检测器来采集色谱信号。此外,高柱效的

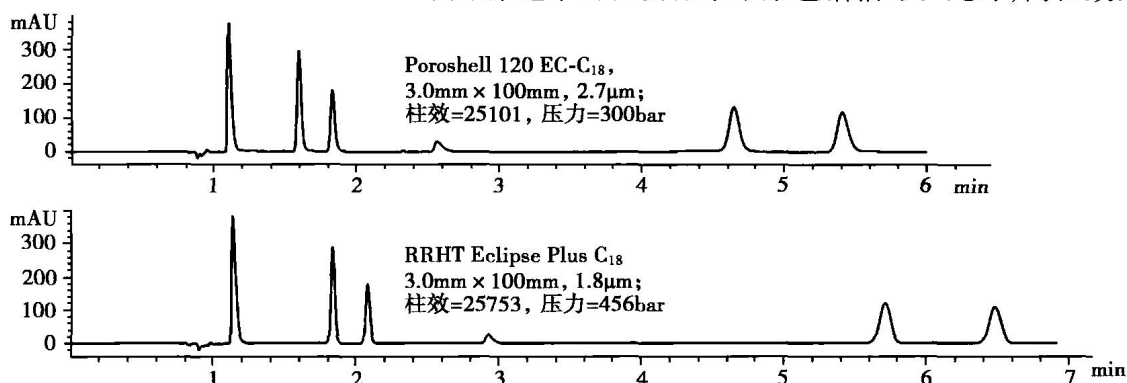


图5 $2.7\mu\text{m}$ 的表面多孔层填料色谱柱与 $1.8\mu\text{m}$ 的小颗粒填料色谱柱分离结果比较

小颗粒色谱柱亦对系统扩散或展宽(死体积)更为敏感,因为微小的系统扩散或死体积会导致柱效的显著降低。因此,为充分发挥小颗粒填料技术的优势,UHPLC 系统需要具有耐高压、快速采集、低扩散等特征。目前,商品化的 UHPLC 系统耐压可以在 $600 \sim 1200\text{bar}$,检测器的数据采集频率可以高达 $40 \sim 160\text{Hz}$ 。

1.4 HPLC 到 UHPLC 的方法转换

UHPLC 技术快速、灵敏、高分离度和节省溶剂等优势,以及 UHPLC 填料及仪器技术的快速发展和普及,使得越来越多的液相色谱工作者希望应用 UHPLC 技术来提高工作效率,并解决实际工作中的问题。如何将现有 HPLC 方法转换成 UHPLC 方法,是大家普遍面临的问题和挑战。

事实上,HPLC 到 UHPLC 的方法转换简单易行。只要掌握转换规律,任何熟悉 HPLC 的液相色谱工作者都能顺利地实现从 HPLC 到 UHPLC 的方法转换。HPLC 到 UHPLC 的方法转换主要包括下面的过程:

首先,选择合适的 UHPLC 色谱柱。

其次,根据所选定的 UHPLC 色谱柱的规格和原始 HPLC 方法所使用的色谱柱规格计算转换参数,主要包括进样体积、梯度及运行时间。

最后,根据上述计算得来的参数设置液相色谱系统,进行 UHPLC 分析。

下面将分别介绍上述各步的具体考虑与影响因素,并通过柴胡药材的 HPLC 到 UHPLC

的方法转换,详细介绍方法转换过程。

1.4.1 选择合适的 UHPLC 色谱柱

色谱柱的选择主要包括两个部分:色谱柱品牌和规格的选择。前者与分离选择性直接相关,后者与分离结果,以及转换参数的计算有关。选择与 HPLC 方法相同品牌的色谱柱,可以确保获得相同的分离选择性,使得方法转换容易实现。相同类型但不同品牌的色谱柱可能会产生分离的选择性差异(图 6)。通常不同颗粒度但相同品牌的色谱柱之间,不存在分离的选择性差异,只有柱效差异(图 7)。

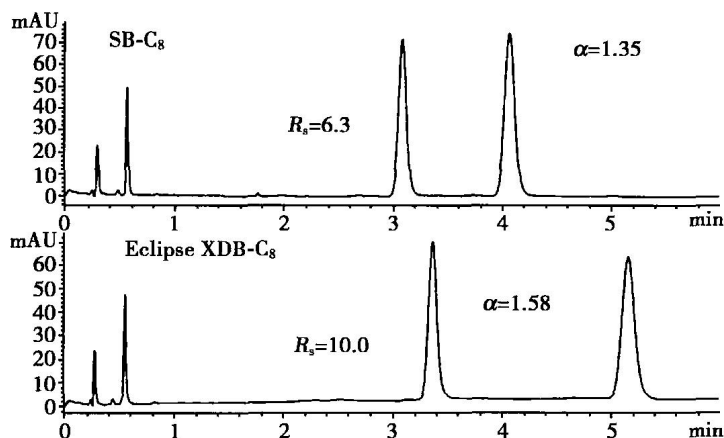


图 6 相同类型但不同品牌色谱柱的选择性差异

上述分离流动相条件和样品完全相同,只是色谱柱品牌不同,即获得了不同的分离选择性(分离度 R_s 与选择性因子 α 各不相同)

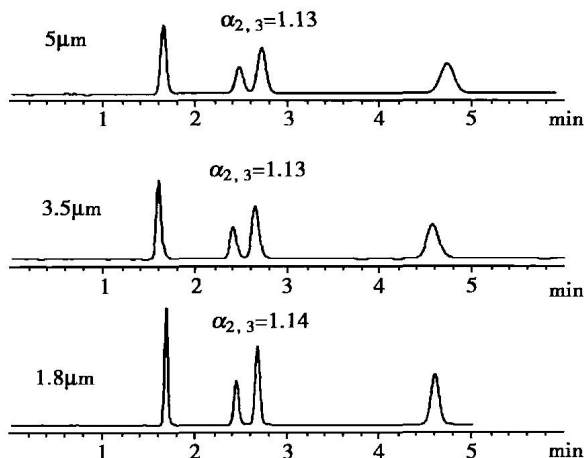


图 7 相同品牌,不同颗粒度色谱柱:相同的分离选择性
(选择性因子 α 几乎相同)

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈分离黄嘌呤化合物

色谱柱规格(长度)的选择与分离目标有关。如果需要加快分离速度而保持分离度,需要挑选与常规液相色谱方法所用色谱柱柱效相同的 UHPLC 色谱柱。如前所述:可以用柱长与颗粒度之比(L/d_p)比值来估算柱效:相同 L/d_p 值的色谱柱具有相同的色谱柱效。如:常

规方法使用了 4.6mm×250mm, 5 μ m 的色谱柱, 其 $L/dp = 250/5 = 50$, 则如果选择相同柱效的 1.8 μ m 色谱柱, 需要选择 L/dp 值相同的色谱柱。按照上述理论计算, 需要选择柱长 $L = 50 \times dp = 50 \times 1.8 = 90$ mm 的色谱柱。但商品化的色谱柱无此长度, 故此处我们可以选择长度为 100mm 的色谱柱, 其柱长与颗粒度之比为: $L/dp = 100/1.8 \approx 56$, 故柱效与分离度皆优于上述 250mm 的 5 μ m 色谱柱。

如果关注更高的分离度, 则可以选择更长的色谱柱, 即 L/dp 值更高的色谱柱, 获得更高的柱效和分离度。如, 常规 HPLC 分析采用 L/dp 值为 50 的 4.6mm×250mm, 5 μ m 色谱柱, 如果选择长度为 100mm 或 150mm 的 1.8 μ m 色谱柱, 则 L/dp 值皆大于 50 (L/dp 值分别约为 $100/1.8 \approx 56$ 和 $150/1.8 \approx 83$), 故两者能获得的分度度皆应好于上述 5 μ m 色谱柱, 且分离速度更快。

色谱柱内径的选择可能直接影响到方法转换结果。选择和 HPLC 分析色谱柱相同的内径(如 4.6mm)会使得方法转换更顺利, 尤其对梯度方法而言, 因为转换过程中色谱柱的流速可以保持不变。选择更小的色谱柱内径(如 3.0mm 或 2.1mm 内径)会节省溶剂和获得更高的质量灵敏度。需要注意的是: 在相同线速度条件下, 小内径色谱柱会使用更低的流速(相同线速度下, 不同内径色谱柱的流速计算见公式 1)。对于延迟体积相同的液相色谱系统, 因为不同流速所导致的梯度延迟时间不同, 可能造成梯度方法转换后的分离度变化。此外, 小内径色谱柱对于液相色谱系统的扩散或展宽体积要求更高, 如果扩散或展宽体积过大会造成严重的谱带展宽。因此, 选用小内径色谱柱时, 需要特别关注系统中扩散体积或死体积的优化。

$$\text{流速}_{柱1} \times \left(\frac{\text{内径}_{柱2}}{\text{内径}_{柱1}} \right)^2 = \text{流速}_{柱2} \quad \text{公式 1}$$

$$1.0 \text{ ml/min} \times \left(\frac{3.0 \text{ mm}}{4.6 \text{ mm}} \right)^2 = 0.42 \text{ ml/min}$$

注: 上述为基于 4.6mm 色谱柱的 1ml/min 流速, 计算内径为 3.0mm 色谱柱在相同线速度下的体积流速 (ml/min)

3.0mm 内径的色谱柱可以是 UHPLC 色谱柱的良好选择, 因为这种规格的色谱柱即便在 2 倍的常规流速下(约为 0.8ml/min, 常规流速的计算见上述计算)亦比 HPLC 色谱柱节省溶剂, 而且较高流速可以加快分离速度, 削弱梯度延迟体积与系统扩散对分离的影响。

1.4.2 计算转换参数

确定色谱柱规格(长度与内径)后, 即可进行转换计算。

对于等度方法, 唯一需要计算的参数是进样体积。进样体积的转换遵循进样体积与色谱柱体积成正比的规律。如下式所示:

$$\text{进样体积}_{柱1} \times \left(\frac{\text{柱体积}_{柱2}}{\text{柱体积}_{柱1}} \right) = \text{进样体积}_{柱2} \quad \text{公式 2}$$

如: 柱体积为 2.0ml 的色谱柱 1 进样体积为 20 μ l, 则根据下式可计算柱体积为 0.4ml 的色谱柱的进样体积为 4 μ l。

$$20 \mu\text{l}_{柱1} \times \left(\frac{0.4 \text{ ml}_{柱2}}{2.0 \text{ ml}_{柱1}} \right) = 4 \mu\text{l}_{柱2}$$

注: Zorbax 色谱柱体积 = $3.14 \times r^2 \times L \times 0.6$ (色谱柱半径 r 和柱长 L 单位为 cm)

对于梯度方法,还需要计算梯度运行时间(即梯度变化的时间)。梯度运行时间与柱长成正比,如果流速保持不变(采用相同内径的色谱柱),可用下式进行计算:

$$\text{时间}_{\text{柱}1} \times \left(\frac{\text{柱长}_{\text{柱}2}}{\text{柱长}_{\text{柱}1}} \right) = \text{时间}_{\text{柱}2} \quad \text{公式 3}$$

如,对于 150mm 柱长的 HPLC 色谱柱,如果梯度运行时间为 15min,则 50mm 柱长 UHPLC 色谱柱的运行时间为 5min,如下式所示:

$$15\text{min} \times \left(\frac{50\text{mm}}{150\text{mm}} \right) = 5\text{min}$$

如果相同内径的 UHPLC 色谱柱所采用的流速与 HPLC 色谱柱不同,则需要折算。计算的原则是:保持不同规格色谱柱的洗脱体积相同,以确保梯度变化相同。故流速加倍时,时间应该减半。如上述计算中,如果 50mm 的 UHPLC 色谱柱的流速是 150mm 的 HPLC 色谱柱的一倍,则梯度时间减半,即为 2.5min。

上述所有方法转换所及的计算,包括进样体积和梯度运行时间等折算皆可自动进行。采用方法转换软件(method translator),只需将原始 HPLC 方法的参数(如色谱柱长度,内径,流速,进样体积,梯度表等)及相应 UHPLC 色谱柱的规格信息(长度,内径等)输入软件,即可自动得到相应的进样体积和梯度表。

安捷伦(agilent)产品的方法转换软件(method translator)可以在其网站上获取,或致电索取。

1.4.3 设置 UHPLC 参数

根据上述方法得到的 UHPLC 参数(如进样体积,梯度表等)可直接用于方法设置。唯一需要注意的是:设置 UHPLC 检测器的数据采集速率,这是常规 HPLC 分离通常无须关注的环节。通常采样速率在 20 ~ 40Hz 可以满足 UHPLC 分析的一般要求。如果进行超快分离(分离时间小于 1min),可能需要更高的数据采集速率以捕捉峰宽(PW)非常窄的色谱峰。采集速率的设置不是越高越好,过高的采集速率会导致较大的基线噪声与较高的数据量;而过低的采集速率可能会损失色谱信息,使色谱峰展宽,降低分离度和柱效(图 8)。

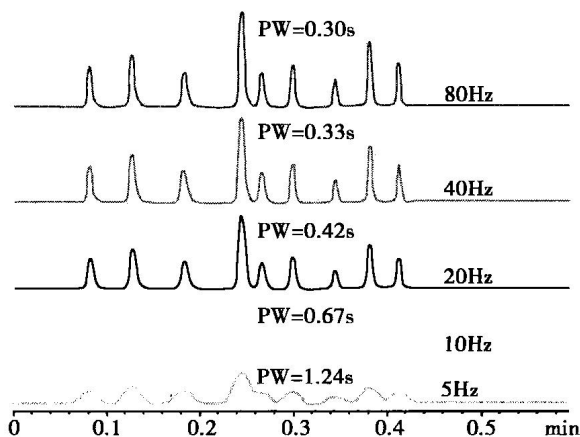


图 8 数据采集速率设置对分离的影响

综上所述,HPLC 到 UHPLC 方法转换中并非所有参数和设置都需要改变。其中,检测波长、流动相种类和比例及柱温皆是无须改变的参数。色谱柱品牌保持不变更是会确保转换的顺利进行。需要改变的参数是进样体积和梯度分离时间,以及检测器的数据采集速率。

1.4.4 方法转换实例(柴胡)

本节将以 2010 年版药典中北柴胡药材的含量测定方法为例,详述对于该含量测定方法从药典的 HPLC 方法转换到 UHPLC 方法的过程。

2010 年版药典中北柴胡药材之含量测定的分析条件与方法:

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,按下表进行梯度洗脱;检测波长为 210nm。理论板数按柴胡皂苷 a 峰计算应不低于 10000。

柱温:25℃;进样体积:20 μ l(对照品),10 μ l 或 20 μ l(供试品)

梯度表如下:

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~50	25→90	75→10
50~55	90	10

上述药典方法未包括梯度平衡过程。为确保实际工作中重复进样的重复性,加入下面的梯度平衡:即在 56min,将梯度调整为 25% 乙腈/75% 水,保持 5~61min。故完整的梯度表为:

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~50	75→10	25→90
50~55	10	90
56	75	25
61	75	25

对于上述 HPLC 方法进行方法转换,其转换过程是:

首先,选择色谱柱(规格与品牌):上述药典方法未指定色谱柱规格,基于梯度条件和中药的复杂性,认为该 HPLC 方法采用了中药分析中经常采用的 4.6mm×250mm,5 μ m 的色谱柱。基于流动相仅为乙腈和水,可选择 Agilent 生产的在常规条件下峰形良好的通用型 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱。因分离目标是在保持分离度前提下,提高分离速度和节省溶剂,故 UHPLC 方法可选择与上述 HPLC 方法柱效相近的规格为 2.1mm×100mm,1.8 μ m 色谱柱。此 UHPLC 色谱柱的 L/dp 值略大于上述 250mm,5 μ m 的 HPLC 色谱柱,但柱长仅为其的 2/5,故可以在分离度略微改善的前提下,将分离速度提升 2.5 倍。

其次,计算转换参数:采用计算软件既可自动计算转换参数(进样体积与梯度时间),亦可通过下面的转换公式进行计算。其中,进样体积可由下式计算:

4.6mm×250mm,5 μ m 的色谱柱的进样体积为 20 μ l,则 2.1mm×100mm,1.8 μ m 色谱柱的

进样体积为: $20\mu\text{l} \times (2.1^2 \times 100 / 4.6^2 \times 250) \approx 1.67\mu\text{l}$ 。实际工作中, 为方便起见, 在 UHPLC 分析中选择 $2\mu\text{l}$ 的进样体积。

梯度时间的折算亦可使用自动计算软件, 或依下法计算: 对于 $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}, 5\mu\text{m}$ 的色谱柱的梯度运行时间为 50min (流速为 $1\text{ml}/\text{min}$), 则在相同线速度 (体积流速为 $0.2\text{ml}/\text{min}$) 下 $2.1\text{mm} \times 100\text{mm}, 1.8\mu\text{m}$ 色谱柱的梯度分离时间为:

$$50\text{min} \times 100 / 250 = 20\text{min}$$

因小颗粒填料在较高的线速度下可以保持柱效 (分离度), 故可以通过提高流速的方式进一步提高分离速度。如需保持分离度相同, 则在流速调整时, 保持流速与梯度时间乘积 (梯度洗脱体积) 不变——即提高流速的同时, 等比缩短梯度时间。对于上述内径 2.1mm 的 $1.8\mu\text{m}$ 色谱柱, 一般采用 $0.4\text{ml}/\text{min}$ 的流速分离, 故此时的梯度运行时间仅为 10min 。

经上述转换过程, 可以得到的 UHPLC 色谱柱分离梯度表为 (与 HPLC 对比):

2.1mm×100, 1.8μm, 0.4ml/min	4.6mm×250mm, 5μm, 1ml/min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
时间 (min)	时间 (min)		
0 ~10	0 ~50	75→10	25→90
10 ~11	50 ~55	10	90
11.1	56	75	25
13	61	75	25

注: 梯度表中的最后两行的梯度平衡并非转换而来。需根据色谱柱平衡情况和仪器的延迟体积进行调整。调整的依据是: 平衡时间适当时, 重复进样的保留时间应该具有重现性。

最后, 进行 UHPLC 分析: 根据上述条件安装 UHPLC 色谱柱和设置仪器梯度和进样体积。采用的色谱柱是 Zorbax Plus C₁₈ $2.1\text{mm} \times 100\text{mm}, 1.8\mu\text{m}$; 和 HPLC 方法保持相同的参数是: 检测波长 210nm , 柱温 25°C 和流动相为乙腈和水。流速设置为 $0.4\text{ml}/\text{min}$ 。此外, 可设置检测器的数据采集速率为 $20 \sim 40\text{Hz}$, 或根据具体分离状况进行适当的优化。此例的分离谱图请参见本书下篇 2.1.1 药材和饮片部分的柴胡项。

1.5 UHPLC 的方法优化

采用 UHPLC 短柱进行方法开发和优化可以节省大量的时间和溶剂。UHPLC 的方法优化和 HPLC 遵循相同的规律。如果所选择的条件不能满足分离的要求 (如分离度、峰形或重现性), 则需要调整色谱柱或色谱条件以优化色谱方法。以下将以具体示例介绍中药液相色谱分离中常见的方法优化内容。

1.5.1 分离度问题

反相色谱的选择性可以受到色谱柱固定相 (色谱柱品牌和键合相), 流动相条件 (流动相种类和比例), 以及柱温的影响。因而, 当初始条件不能满足分离度要求时, 可以适当调整流动相条件 (注意药典对流动相调整的限度要求) 或柱温来优化分离, 亦可选择不同的色谱柱来适应该分离条件。