

Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统在药物分析高效液相色谱法中的应用

LC-086

摘要：本文建立了一种使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统对 7 种激素类药物高效液相色谱快速分析条件探索的方法。该方法开发系统可实现液相色谱分析方法开发过程中色谱柱和流动相的自动切换和调整，可以大为节省液相色谱分析方法开发的时间。在雌三醇等 7 种激素类药物的高效液相快速分析方法开发中，实现在三种色谱柱、三种流动相体系、16 种梯度条件间的方法探索，根据所得色谱图结果对各峰进行综合评价，最终确定峰检出数和分离度综合评价最优者为该样品分析方法。

关键词：超高效液相色谱方法开发系统药物分析激素

高效液相色谱法 (HPLC) 是实验室常用的定性定量分析手段和方式。高效液相色谱分析中色谱柱的选择和流动相的配比对样品的分析方法建立至关重要，往往一个合理的分析条件需要较长时间的探索和验证才能真正用于实际样品的分析。以目前高效液相色谱法中最常用同时也是适用性最高的反相色谱为例，可供选择的色谱柱以键合相碳链长度区分有 C18, C8, C4, TMS 等，即便是同一碳链长度的反相色谱柱，又由于封端技术和含碳量的差异而对不同的化合物又有特殊的选择性；就流动相而言，甲醇，乙腈等为常用的有机相溶剂，水相溶剂可以为水或加入一定比例酸、碱、盐的混合溶液；再者，两相流动相最终在分析过程中均匀混合后进行洗脱，其混合比例的选择又是多样的。这样，对于未知或复杂的样品分析方法的探索，传统的方式是以掌握熟练的色谱技术和具有丰富工作经验者为支撑，设计出色谱柱和流动相的选择方式，通过人工更换色谱柱和流动相

并经过多次流动相配比测试来找到适合待测化合物的分析条件，这一过程往往需要大量的时间，并且由于条件的更改需要手动的干预，更加使得整个分析测试过程变得十分漫长，成为制约样品分析效率的关键因素。怎么样在未知或复杂样品的分析方法开发阶段快速准确地确定色谱条件成为提高 HPLC 分析效率亟待解决的难题。

Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统是岛津基于其最新一代超高效液相色谱仪 LC-30A 建立的一套用于液相分析条件探索的自动化装置。它利用工作站控制自动进行色谱柱切换和流动相配比从而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。该系统配备的 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形界面易于操作和理解。本文选择了雌三醇等 7 种激素类药物作为待测样品，利用 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统进行快速液相分析方法的开发。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵，配四元低压梯度比例阀)，DGU-20A5R×2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含 FCV-34AH (高压流路切换阀))，SPD-M20A (二极管阵列检测器)，CBM-20A (系统控制器)，Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站)，LabSolutions Ver. 5.42 (色谱工作站)。

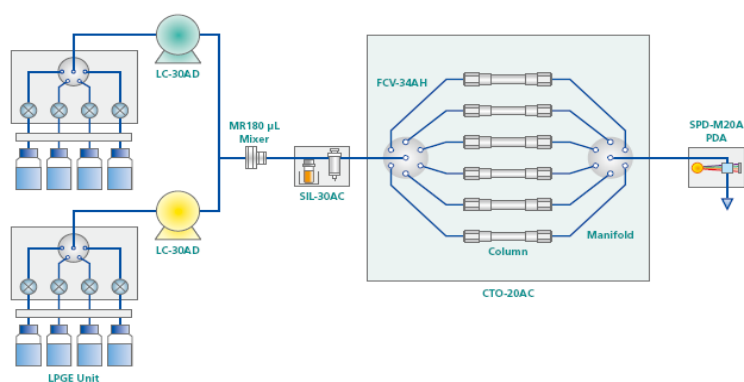


图 1 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统硬件构成示意图

1.2 分析条件

1.2.1 方法建立的流程

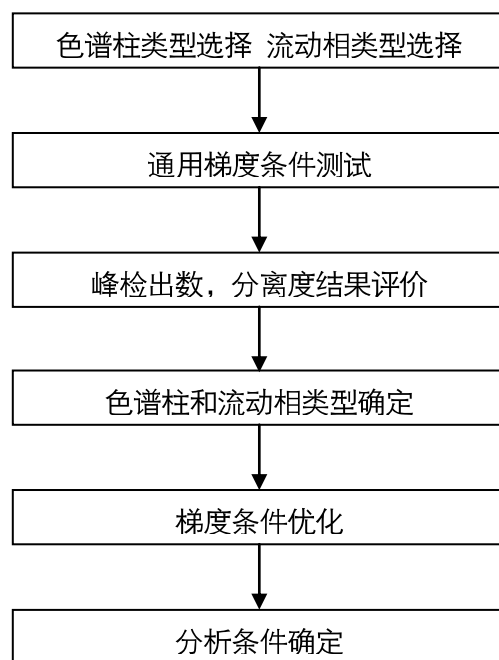


图 2 方法开发系统进行色谱方法建立的流程

1.2.2 液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×50 mmL., 1.6 μm

Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×75 mmL., 1.6 μm

Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相:

A 相 - 水

B1 相 - 甲醇

B2 相 - 乙腈

B3 相 - 甲醇 - 乙腈 (1:1, V/V)

流速：0.4 mL/min
 进样体积：2 μ L
 柱温：55 $^{\circ}$ C
 洗脱方式：梯度洗脱
 检测波长：227 nm

1.3 样品制备

精密称取一定量的雌酮、雌二醇、雌三醇、己烯雌酚、睾酮、甲睾酮和黄体酮，以甲醇溶解分别得到 1 mg/mL 的储备液，吸取各单标储备液以甲醇 - 水 (1:1, V/V) 稀释得到 50 μ g/mL 的标准溶液，经 0.22 μ m 滤膜过滤后进样分析。

结果讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以表 1 所示的通用梯度时间程序对三种色谱柱和三种流动相类型进行测试，如表 2 所示，共进行 9 次分析。

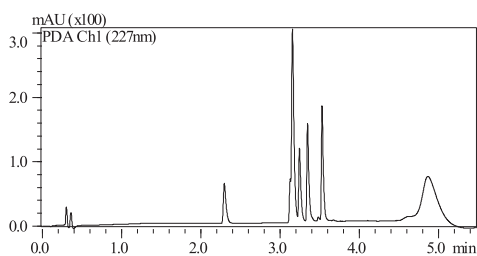
表1 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	20
3.00	Pumps	Pump B Conc.	100
4.00	Pumps	Pump B Conc.	100
4.01	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

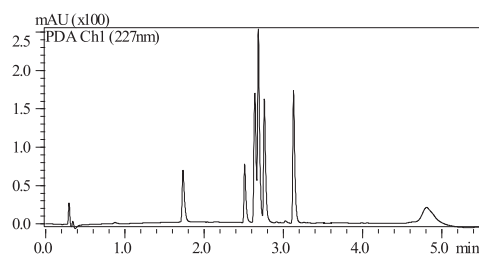
表2 通用梯度分析条件分类

Shim-pack XR ODS III-2 \times 50	Shim pack-XR ODS-III 2 \times 75	Shim- pack-XR C8 2 \times 75	
M.PA-B1	C1M1	C2M1	C3M1
M.PA-B2	C1M2	C2M2	C3M2
M.PA-B3	C1M3	C2M3	C3M3

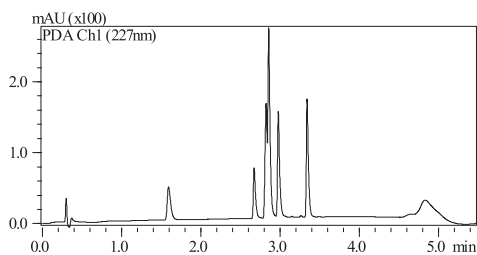
M.P: 流动相



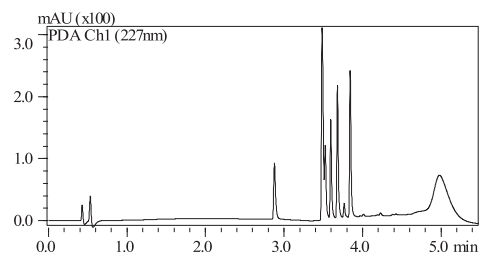
C1M1



C1M2



C1M3



C2M1

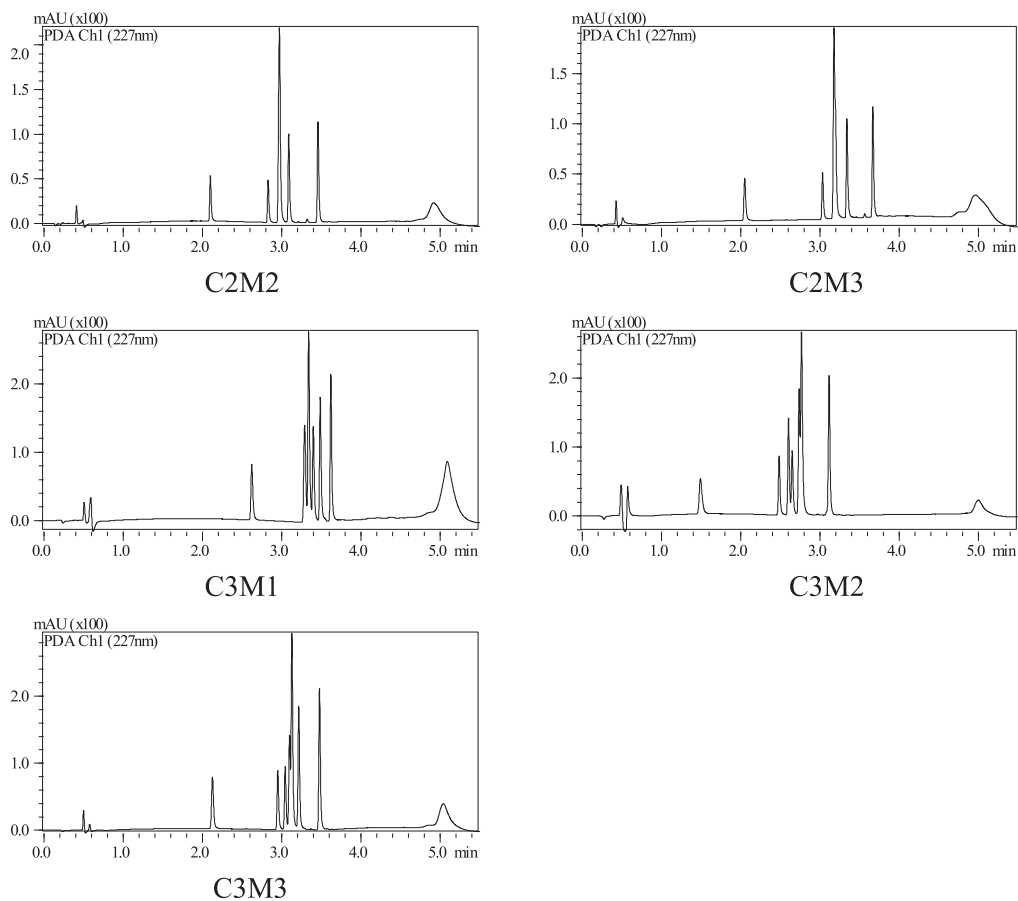


图 3 七种激素类药物在通用梯度条件下的色谱图

2.2 通用梯度分析结果评价

对 2.1 中通用梯度分析结果进行评价，依据为峰检出个数同分离度等参数的综合得分。

表 3 通用梯度各分析条件评价结果

#	Corrected Resolution*								
	C1M1	C1M2	C1M3	C2M1	C2M2	C2M3	C3M1	C3M2	C3M3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
3	1.7	2.7	2.8	0.9	3.0	3.0	1.1	3.0	2.4
4	2.2	0.9	0.6	1.8	3.0	3.0	1.5	1.3	1.3
5	3.0	1.7	2.5	2.5	3.0	3.0	2.2	1.8	0.6
6		3.0	3.0	3.0			3.0	0.6	2.2
7								3.0	3.0
S*	49.5	67.8	71.4	67.2	60.0	60.0	64.8	88.9	87.5

Corrected Resolution*: 各峰分离度中大于 3 的以 3 记, 不足 3 的以实际计算结果记。

S*: 综合得分, 以峰检出数 × 各峰分离度之和。

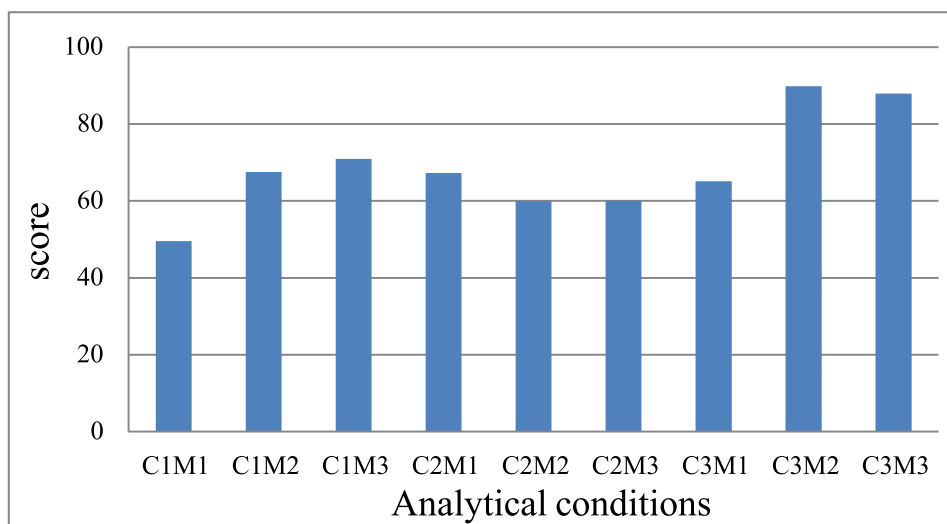


图 4 通用梯度各分析条件下综合评价

根据通用梯度各分析条件下分析结果的评价, 确定的样品分析色谱柱和流动相体系为 C3M2, 即为:

色谱柱: Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相:

A 相 - 水, B 相 - 乙腈

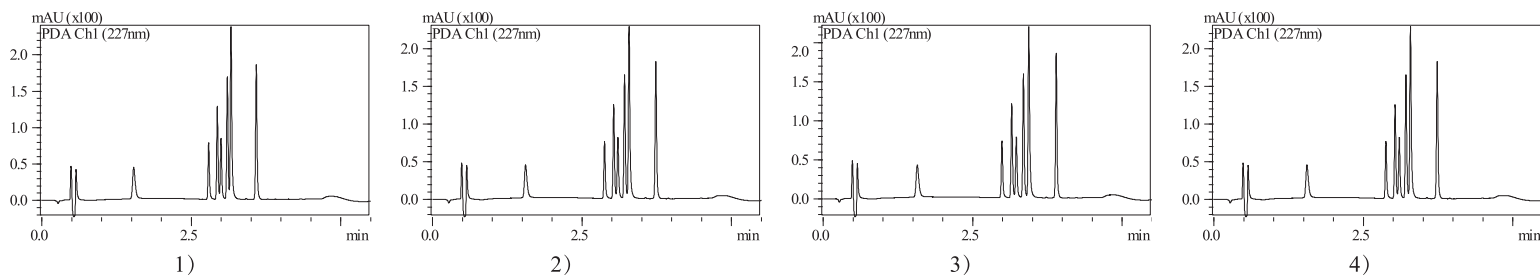
2.3 梯度条件优化程序

由通用梯度时间程序分析结果选定了用于分析 7 种激素类药物的色谱柱和流动相, 为增加分离度和改善分离效果, 再次进行梯度条件优化, 以通用时间程序为基础, 按表 3 优化梯度程序中的初始浓度和终止浓度, 总共考察 4×4=16 种梯度条件。

表 4 梯度条件优化设置

	0.01 min-初始浓度(%)	3.00 min-终止浓度(%)
1	20	80
2	25	75
3	30	70
4	35	65

2.4 梯度条件优化分析结果



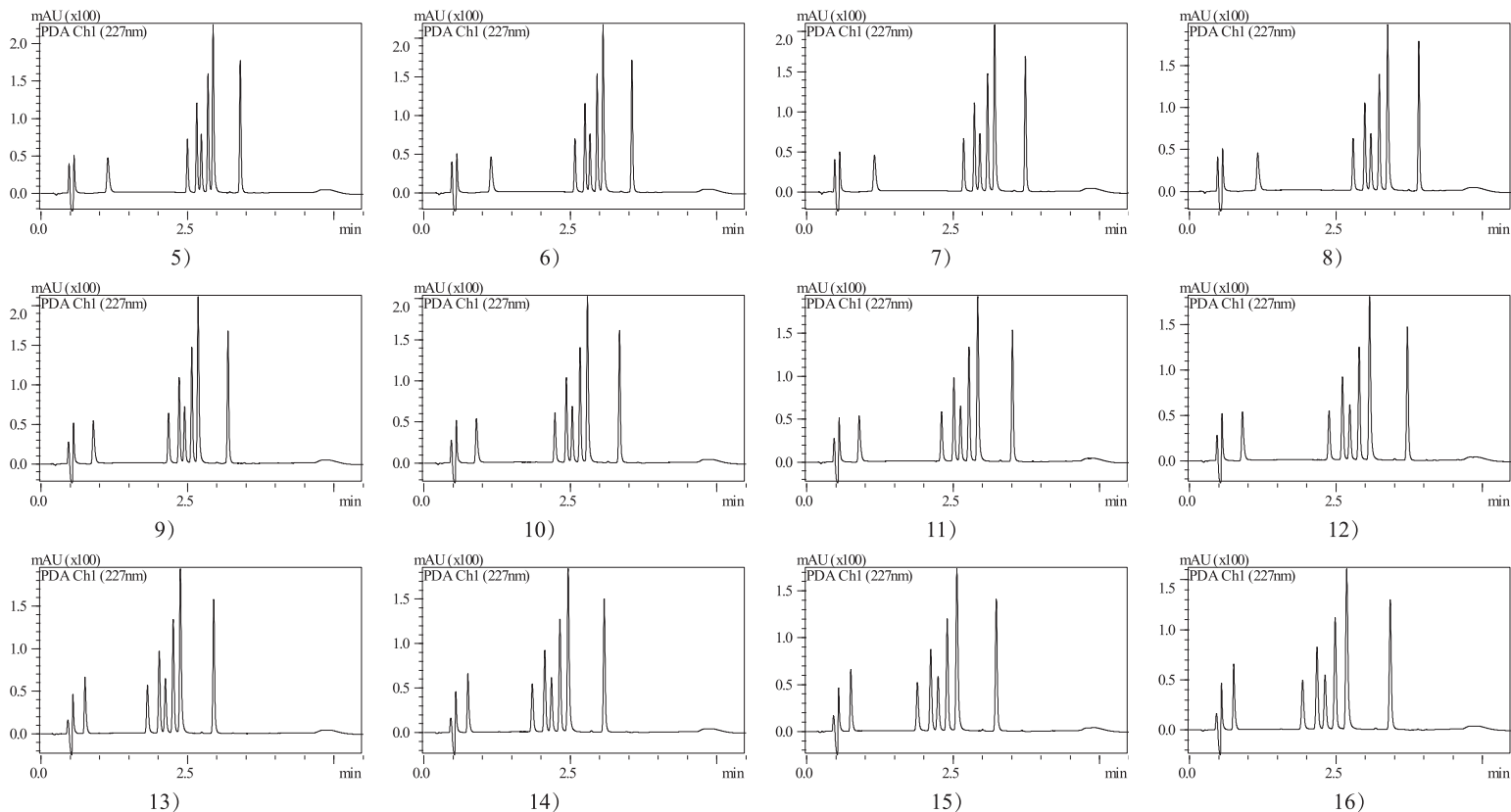


图 5 七种激素类药物在梯度条件优化时的色谱图

2.5 梯度优化分析结果评价

表 5 梯度优化分析结果评价

#	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	11)	12)	13)	14)	15)	16)
1	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
2	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
3	1.4	1.6	1.7	1.8	1.7	1.8	1.9	2.0	1.8	1.9	2.0	2.1	1.9	1.9	2.0	2.1
4	2.4	2.5	2.6	2.7	2.5	2.5	2.6	2.7	2.5	2.6	2.6	2.7	2.4	2.5	2.5	2.6
5	1.4	1.7	1.9	2.2	1.9	2.1	2.4	2.7	2.2	2.4	2.7	3.0	2.2	2.4	2.7	3.0
6	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
7	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
S	99.9	103.1	106.2	109.5	105.0	108.3	111.4	115.0	108.3	111.3	114.6	117.7	108.5	111.0	113.8	116.8

Corrected Resolution*: 各峰分离度中大于 3 的以 3 记, 不足 3 的以实际计算结果记。

S*: 综合得分, 以峰检出数 × 各峰分离度之和

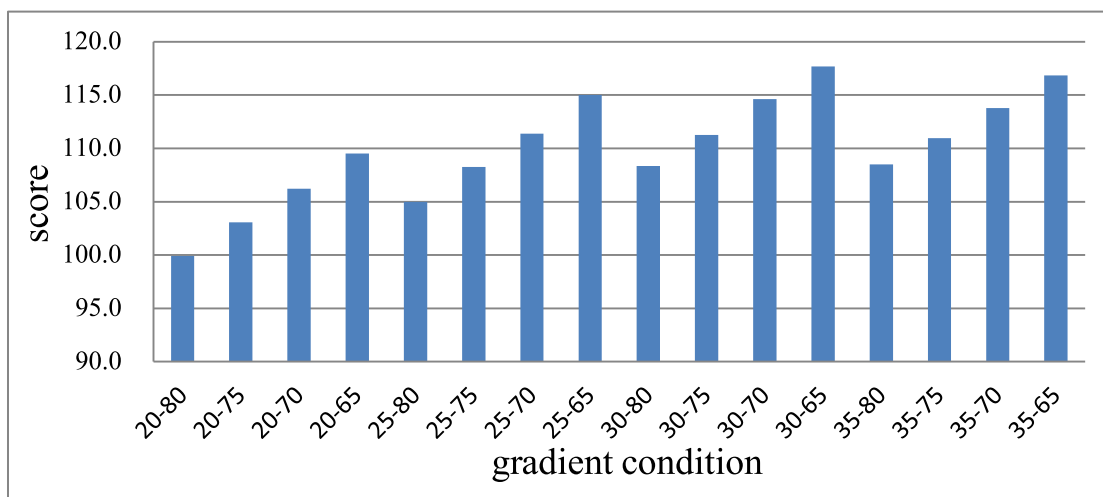


图6 梯度优化条件综合评价

根据评价系统得分，确定梯度条件为 30-65。

2.6 样品分析条件确定

通过 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统对 7 种激素类药物高效液相分析方法进行探索，最终确定的液相色谱分析条件为：

色谱柱：Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相：

A 相 - 水，B 相 - 乙腈

检测波长：227 nm

柱温：55℃

进样量：2 μL

梯度洗脱时间程序：表 6

表 6 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	30
3.00	Pumps	Pump B Conc.	65
3.01	Pumps	Pump B Conc.	80
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.01	Pumps	Pump B Conc.	30
5.50	Controller	Stop	

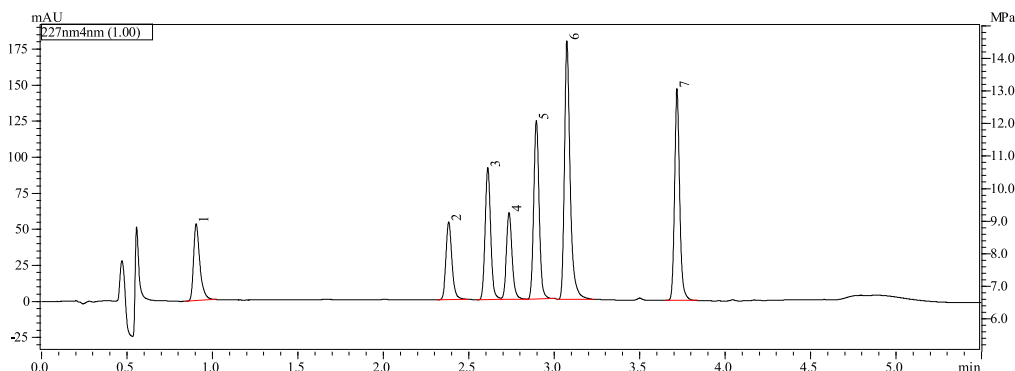


图 7 7 种激素类药物液相色谱图

(1.雌三醇 2.雌二醇 3.睾酮 4.雌酮 5.甲睾酮 6.己烯雌酚 7.黄体酮)

2.7 与相关法规中样品分析结果比较

卫生部《化妆品卫生规范》中对以上七种激素类药物采用常规高效液相色谱分析，其色谱图 8 和图 9 所示。色谱条件如下。

色谱柱：C18，250 mmL. × 4.6mmID., 10 μ m

流动相：甲醇 - 水 (60/40, V/V)

流速：1.3 mL/min

检测波长：雌激素 204 nm，雄激素 245 nm

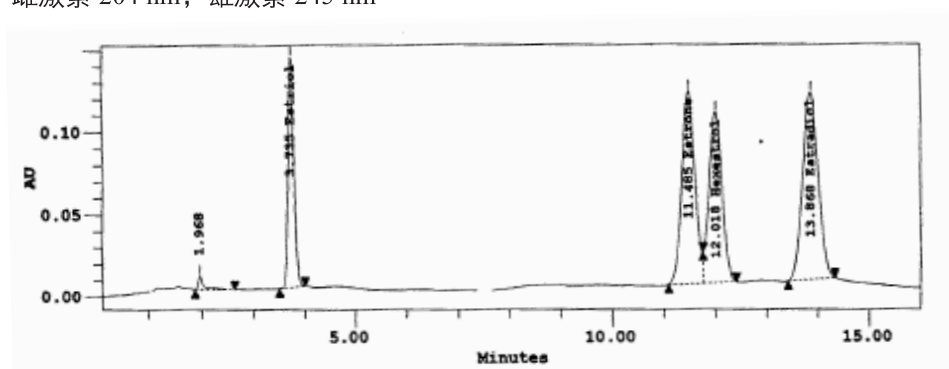


图8 雄性激素色谱图

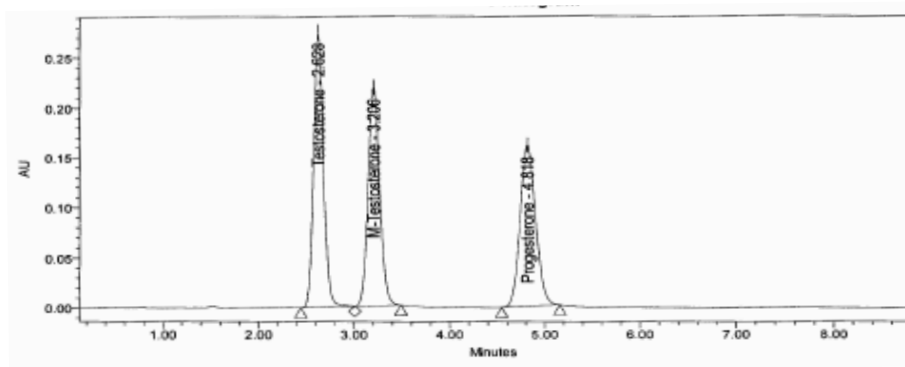


图9 雌性激素色谱图

同图 7 中岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统的分析结果相比，后者在 5 min 内完成 7 种激素类药物的分析，并且分离度优于常规分析结果。

结论

使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统对雌三醇等 7 种激素类药物高效液相色谱快速分析方法建立过程，利用 Method Scouting Solution 工作站控制来自动实现色谱柱切换和流动相梯度比例调整。软件界面友好，操作过程易于控制，自动调用 LabSolutions 工作站批处理表批量运行，所设条件规律并合理，解决分析方法开发过程中色谱柱和流动相切换问题，大为节省了分析方法开发阶段的时间消耗。通过对各种分析条件下所得数据中峰检出数和峰分离度的综合评价，最终选择 Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μ m 色谱柱和 30-65 的梯度时间程序等为分析条件。由于 7 种激素类药物中除雌三醇外其他 6 种极性相对较小，并且较为相近，在使用 ODS 色谱柱分离时需要较强的溶剂和较长的洗脱时间，并且实验表明个别峰的分度较难达到 1.5，而 C8 色谱柱利用其对这类样品相对保留较弱的特点，在适当的流动相比例下便可实现各峰的分离，该分析条件快速，灵敏，高效，并且各峰分离度均在 2.0 以上，有效提高分析检测结果的准确性和可靠性。