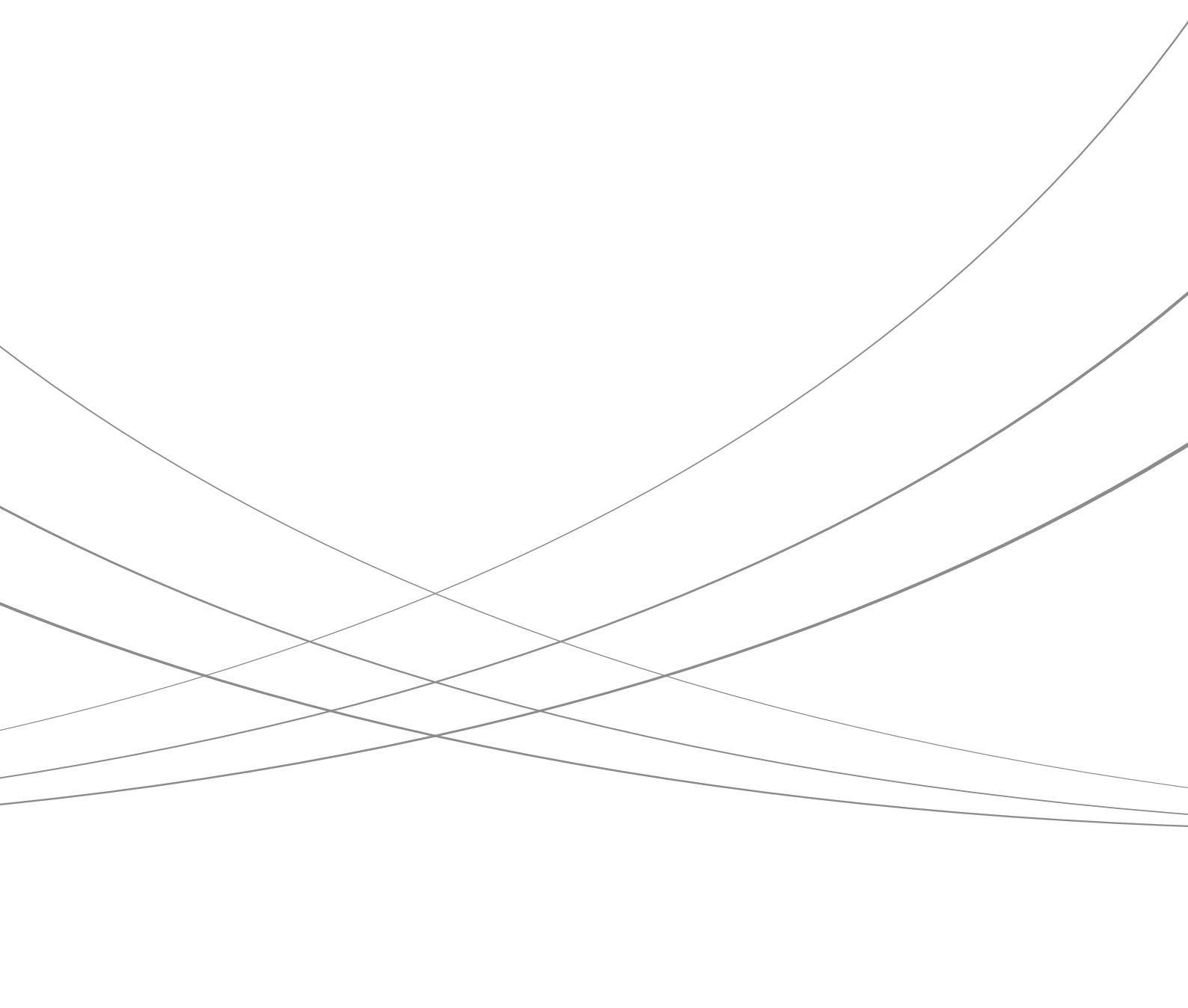


HPLC 方法开发系统 应用文集



前 言

高效液相色谱（HPLC）问世于 20 世纪 60 年代末期，是实验室常用的定性定量分析手段和方式。随着分析检测方法的改进和水平的提高，仪器分析尤其是高效液相色谱法越来越多的应用到包括医药、食品、环境监测、石油化工、电子等行业中，成为现代仪器分析检测中不可或缺的重要手段。

高效液相色谱法以其分析速度快、稳定性高、重复性好、进样量小、定性定量均可进行等优点成为各行业分析检测实验室常用的方法，但是由于待测样品的理化性质的差异，以及分析测试者使用的色谱柱和流动相等分析条件的不同，使得针对某一特定化合物或样品的分析方法的建立具有一定难度。多数情况下，往往需要多次进样，在各种条件下进行筛选才能得到良好的分离结果，从而建立适当的分析方法。一直以来，实验工作者根据已掌握的待测化合物或样品的理化性质并结合平时积累的工作经验通过多次尝试才能得到理想的分析结果，而且，这一过程往往需要花费较长的时间和人力来完成，成为 HPLC 分析方法开发的桎梏。

作为全球知名的分析仪器厂商，岛津公司自 1875 年创建以来，一直秉承“以科学技术向社会做贡献”的创业宗旨，不断钻研领先时代、满足社会需求的先进技术，在高效液相色谱仪等分析测试仪器的研发和生产中一直处于世界领先地位，并以稳定、高效、准确、经济等特点而深受业内好评。方法开发系统，是岛津基于其新一代超高效液相色谱 LC-30A 而研发的用于 HPLC 分析方法开发的自动化方法开发系统。高度自动化的方法编辑和处理方式及全面可靠的结果评价体系使得液相色谱的分析方法开发变得快速和容易，符合当代社会高效、经济、环保的理念，为分析实验室日常运转、人力安排、试剂消耗等带来了创新性的改变。

岛津公司密切与用户单位保持合作，将方法开发系统应用于用户日常工作中急需解决的问题，通过同上海市食品药品检验所中药室、浙江省食品药品检验研究院中药室、江西省出入境检验检疫局食品室等相关单位的合作研究，编辑了本册《方法开发系统应用文集》，以供参考，希望对您的工作提供思路和带来帮助。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

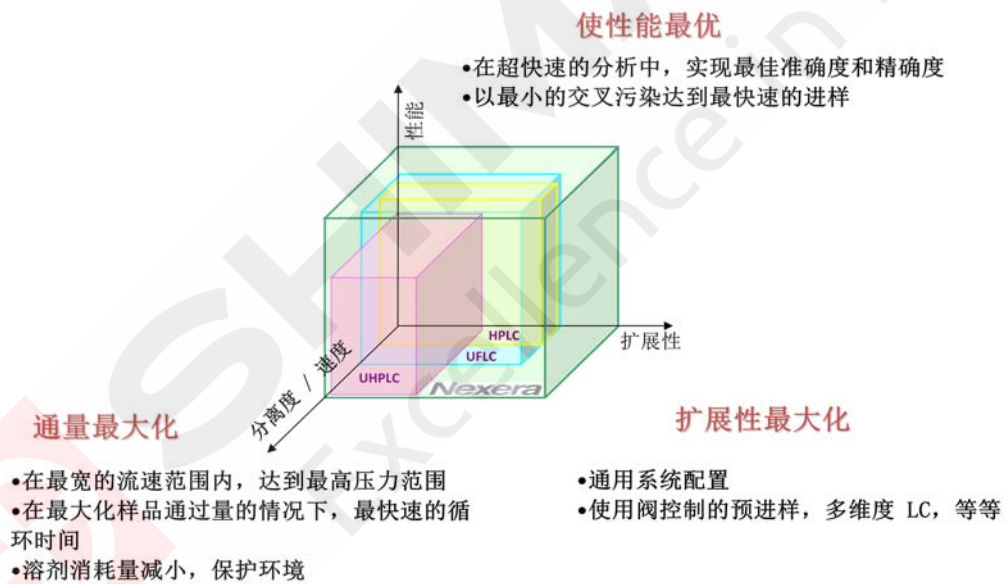
岛津超高效液相色谱简介	I
方法开发系统简介	II
方法开发系统在 7 种激素类药物液相分析方法建立中的应用	1
方法开发系统在建立 6 种人参皂苷 UHPLC 分析方法开发上的应用	10
方法开发系统在建立 4 种水飞蓟素 UHPLC 分析方法开发上的应用	17
方法开发系统在银杏中黄酮提取物分析方法开发上的应用	23
方法开发系统在有机合成色素分析方法开发上的应用	27
方法开发系统在注射用头孢美唑钠分析上的应用	31
方法开发系统在液质联用方法建立中的应用	37



SHIMADZU
Excellence in Science

岛津超高效液相色谱简介

如今，用户对于液相色谱仪的需求呈现多样化的趋势，比如，超快速、高分离分析需求的增加、要求减少环境负担等等。为满足用户的多样化需求，以全能 LC 为目标，岛津开发出超高效液相色谱仪 Nexera UHPLC LC-30A。Nexera 不仅可以满足传统分析的要求，还因具有 130MPa 系统耐压和降低了系统体积而扩大了超快速、高分离分析的应用范围；使用 150℃ 高温柱温箱进行的高温分析减少了有机溶剂使用量，从而降低环境负担；自动样品前处理等功能，使得复杂问题简单化。此外，液相系统的基本性能也获得了提升，比如，进一步抑制了交叉污染，采用低容量高效混合器降低了基线噪声和梯度延迟体积等。进行超快速、高分离分析以及通过分析自动化提高分析效率是广大用户提出的要求，Nexera 正是全面应对用户需求的全能超高效液相色谱系统。



方法开发系统简介

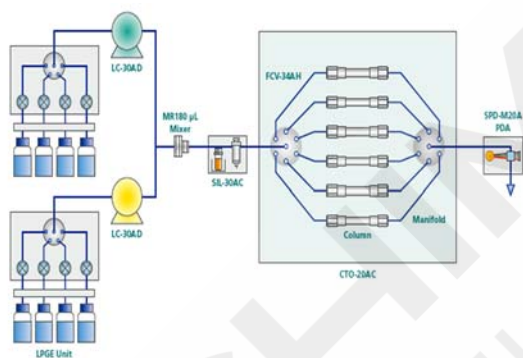
岛津公司于 2012 年在全球开始发售其基于全新一代超高效液相色谱 LC-30A 的方法开发系统，该系统用于缩短分析方法开发过程并实现过程自动化。通过该系统，利用最多 16 种流动相和 6 支色谱柱构成 96 种方法组合，自动获得分析数据。这使得在缩短方法开发总体时间的同时，可以开展全面的分析条件摸索。



方法开发系统

该系统使用专用管路组件以及专用软件 Method Scouting Solution，使得系统的应用更为稳妥和便利。

该系统由配备四元梯度比例阀的两台 LC-30AD 输液泵构成输液单元，工作在

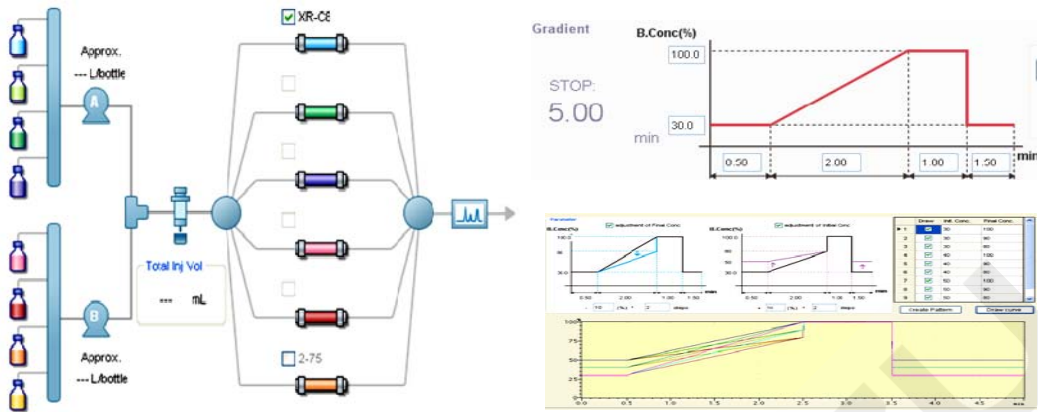


方法开发系统流路特点

高压梯度方式下，四元梯度比例阀做溶剂选择使用。进样单元为岛津 Nexera 系列的 SIL-30AC 或 SIL-30ACMP，实现方法开发过程中的超快速进样和极低残留。柱温箱单元使用 CTO-20A/AC，以满足最多 6 根色谱柱的容纳能力，此外，FCV-34AH 六位七通高压切换阀最

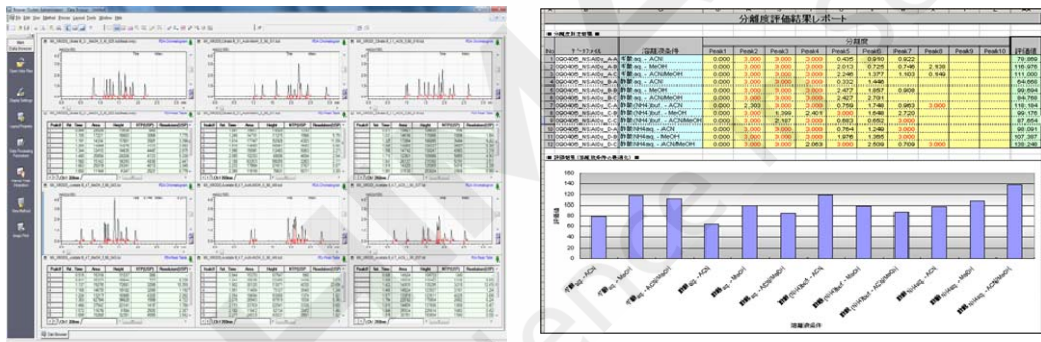
高耐压达到 100 MPa，使得方法开发可以在超高压条件下进行。检测单元可以选择的有 SPD-20A/AV、SPD-M20A/M30A、LCMS-2020 以及 LCMSMS 等，为 HPLC 方法开发及功能拓展提供便利。

全新设计的方法开发专用软件，采用图形化操作界面，从流动相和色谱柱的选择，到溶剂更换和色谱柱切换的方式都可以控制，即使初次使用也可以让操作者在短时间内掌握该系统设置的要领，真正让 HPLC 方法开发能够便利和不再神秘，满足不同需求和技术水平的使用者需要。



图形化软件操作界面

分析结果可以通过 LabSolutions 工作站的数据浏览器窗口查看和比较, 另外, 岛津数据处理的 Class-agent report 软件为庞杂的数据分析提供可靠和快捷的统计方式, 便于最优分析方法的筛选。



数据查看和统计方式

这种新的 Nexera 应用系统显著提高了方法开发的速度和效率, 适用于广泛的分析领域, 如药物发现、合成和药物生产及质量控制中。

方法开发系统在 7 种激素类药物液相分析方法建立中的应用

摘要：本文建立了一种使用岛津 HPLC 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对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。

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 HPLC 方法开发系统进行快速液相分析方法的开发。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 HPLC 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-20A_{5R}×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）。

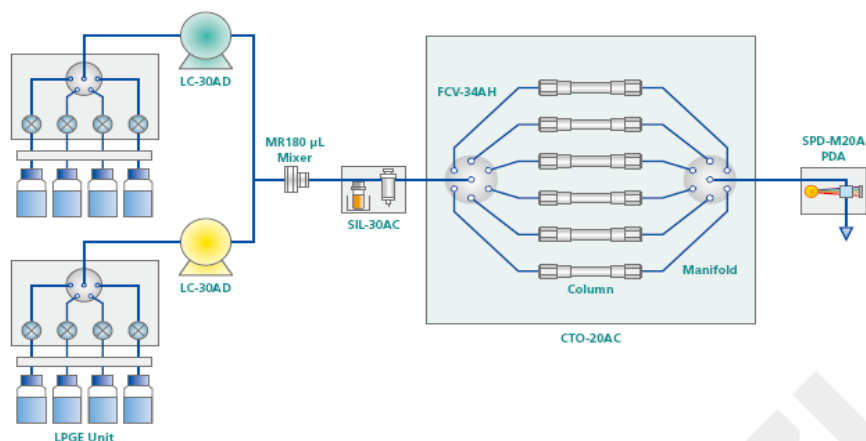


图1 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统硬件构成示意图

1.2 分析条件

1.2.1 方法建立的流程

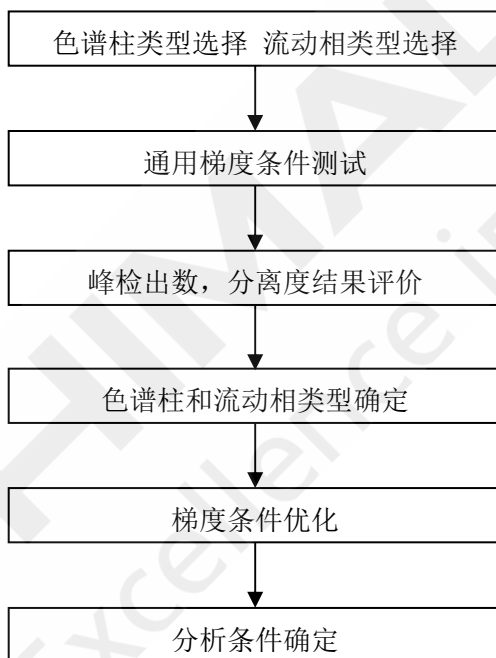


图2 方法开发系统进行色谱方法建立的流程

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。

2. 结果与讨论

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。

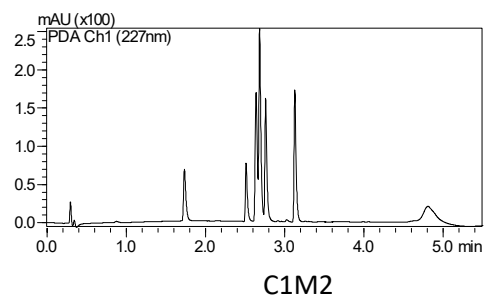
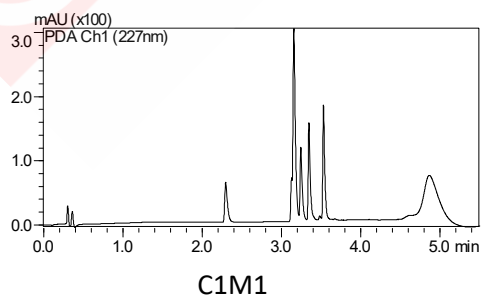
表 1 通用梯度洗脱时间程序

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.P A-B1	C1M1	C2M1	C3M1
M.P A-B2	C1M2	C2M2	C3M2
M.P A-B3	C1M3	C2M3	C3M3

M.P: 流动相



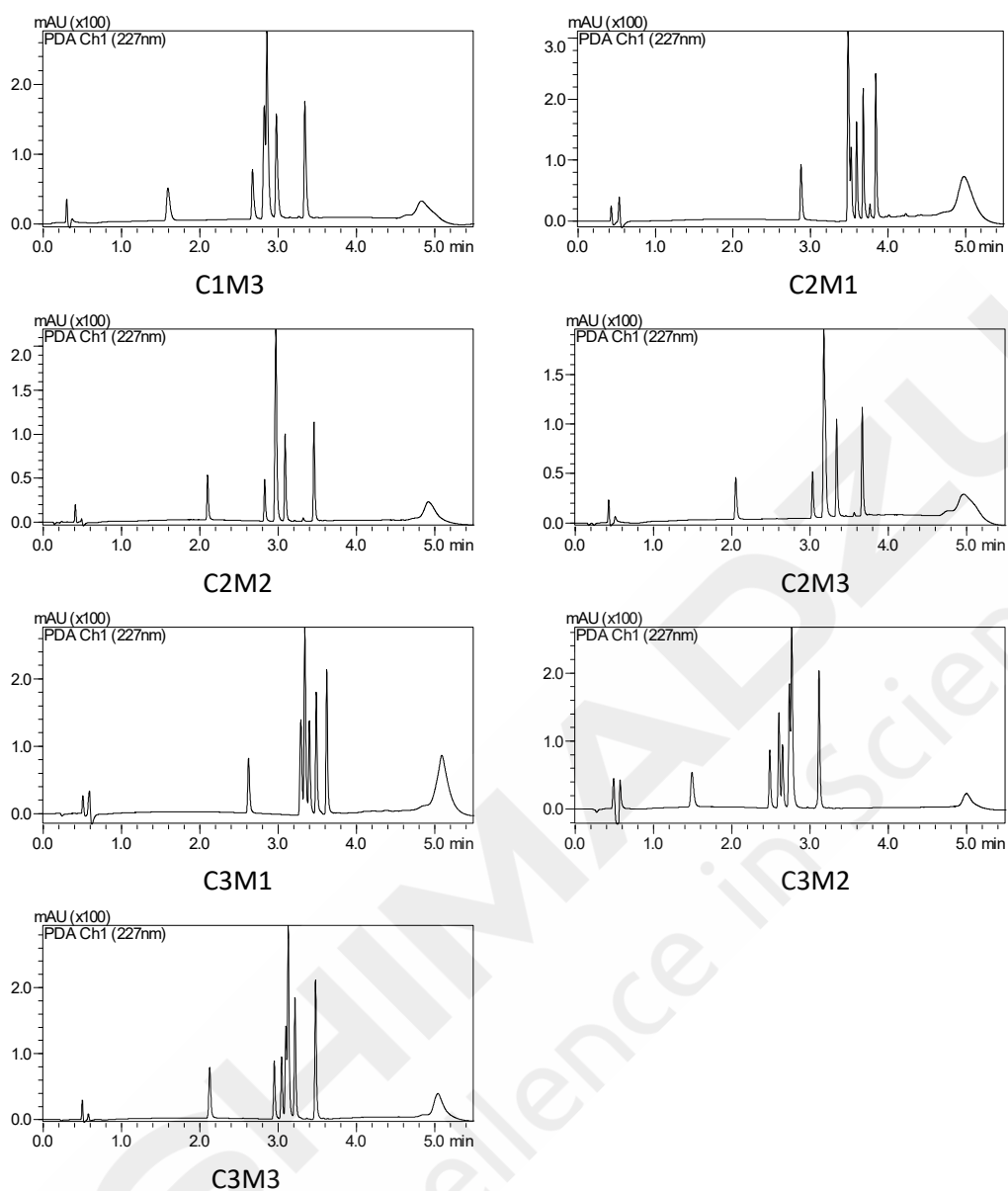


图3 七种激素类药物在通用梯度条件下的色谱图

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。

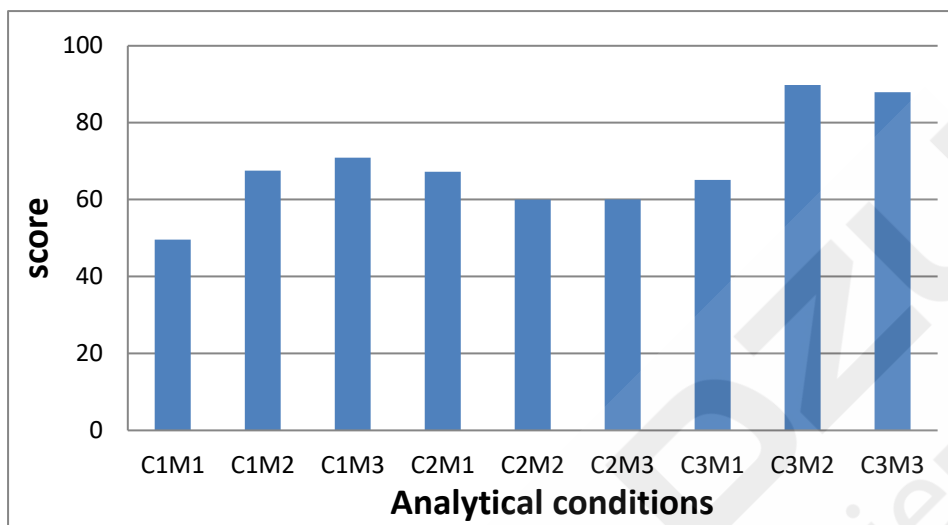


图 4 通用梯度各分析条件下综合评价

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

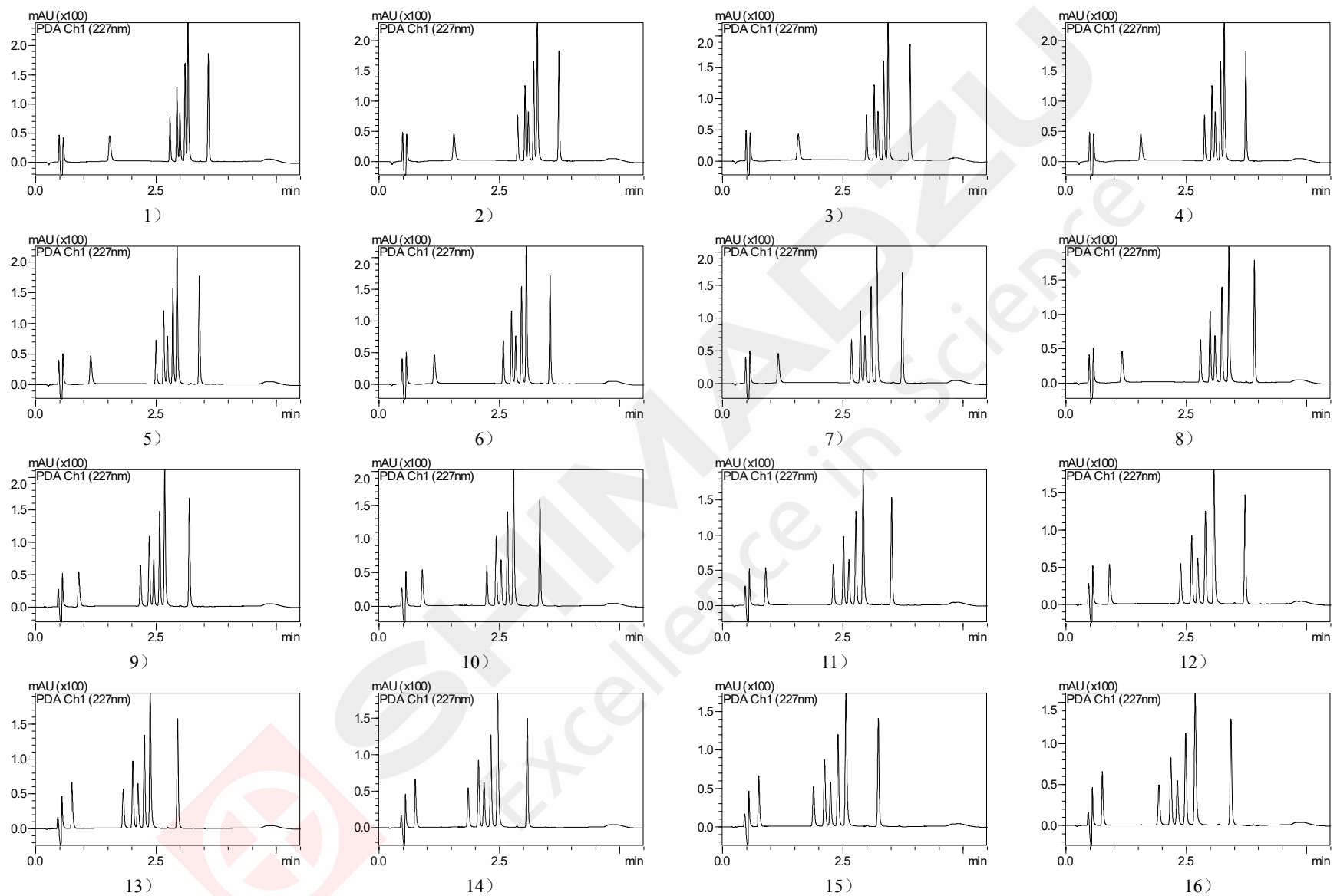


图5 七种激素类药物在梯度条件优化时的色谱图

2.5 梯度优化分析结果评价

表 5 梯度优化分析结果评价

#	Corrected Resolution*															
	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.	106.	109.	105.	108.	111.	115.	108.	111.	114.	117.	108.	111.	113.	116.
		1	2	5	0	3	4	0	3	3	6	7	5	0	8	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

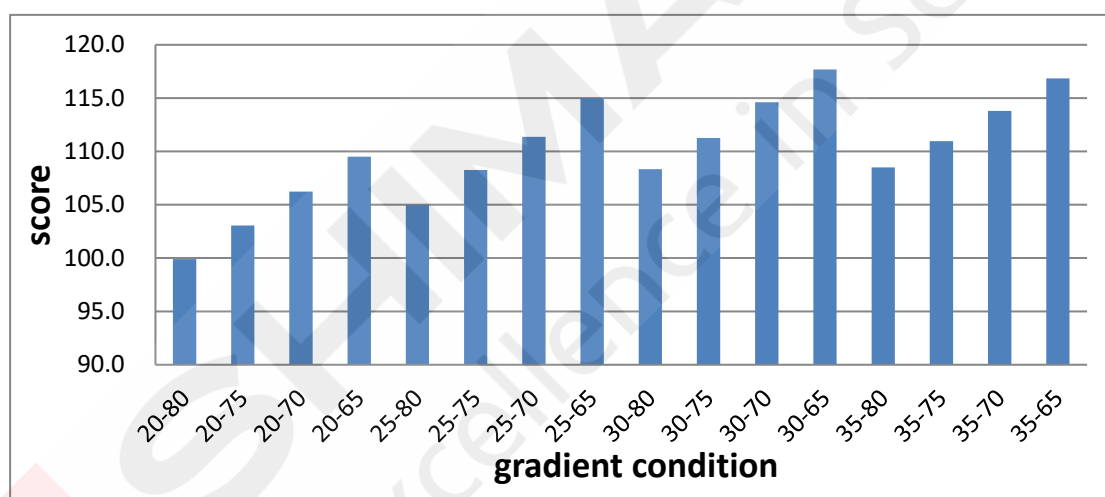


图 6 梯度优化条件综合评价

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 HPLC 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°C

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	

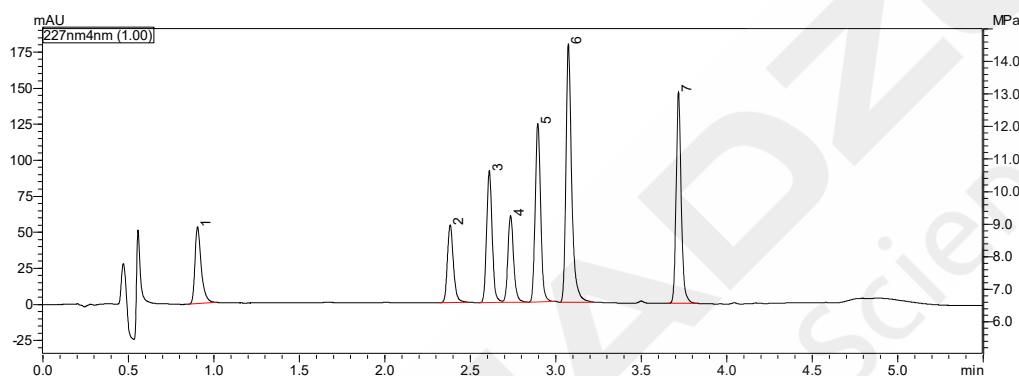


图 7 7 种激素类药物液相色谱图

(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.×4.6 mmID.， 10 μm

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

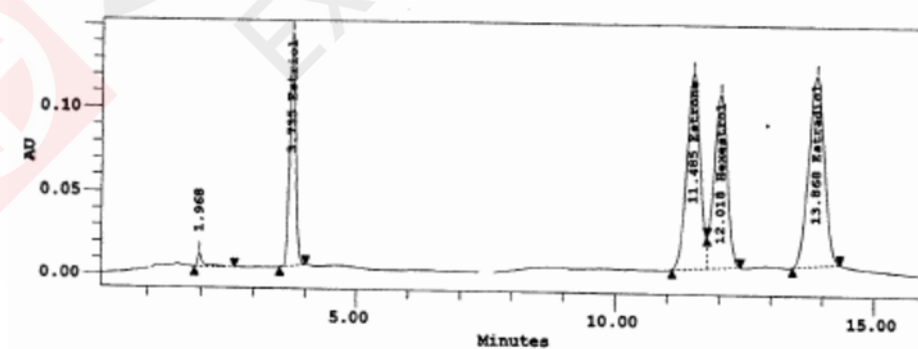


图 8 雄性激素色谱图

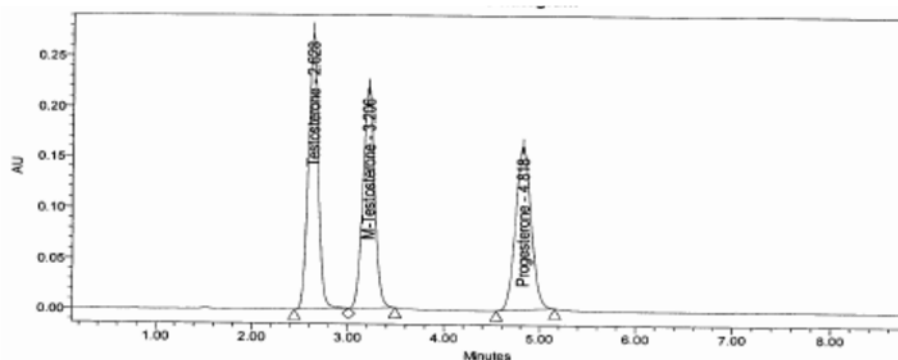


图9 雌性激素色谱图

同图7中岛津HPLC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。

3. 结论

使用岛津HPLC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 μm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离度较难达到1.5，而C8色谱柱利用其对该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。

方法开发系统在建立 6 种人参皂苷 UHPLC 分析方法上的应用

摘要：本文建立了一种使用岛津 HPLC 方法开发系统对 6 种人参皂苷类药物高效液相色谱快速分析条件探索的方法。在人参皂苷 Rb1 等 6 种药物的高效液相快速分析方法开发中，实现在 4 种色谱柱、2 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 人参皂苷

人参皂苷（Ginsenoside）是一种固醇类化合物，主要存在于人参属药材中，具有增加白细胞数量、提高人体免疫力、促代谢、抗疲劳、抗衰老和抗肿瘤等作用。在对人参皂苷分析研究中，由于化合物结构相似的缘故，传统的 HPLC 方法耗时长，分离效果不佳，随着现代液相色谱技术的高速发展，开发超快速液相分析方法进行人参皂苷检测显得尤为重要。

岛津 HPLC 方法开发系统是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。

文中使用该套系统，自动筛选合适的色谱柱和流动相比例建立了快速检测 Re, Rg1,

Rb1, Rb2, Rc, Rd 共计 6 种人参皂苷的 UHPLC 分析方法。

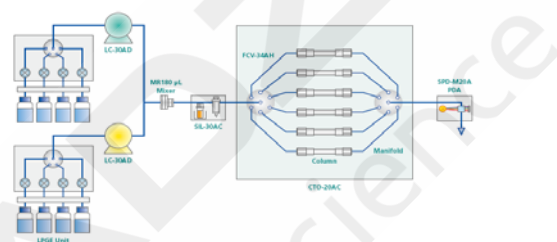


图 1 方法开发系统流路特点

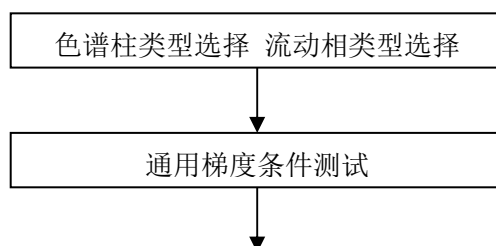
1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 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-M30A（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. 5.54SP1（色谱工作站）。

1.2 分析条件

1.2.1 方法建立的流程



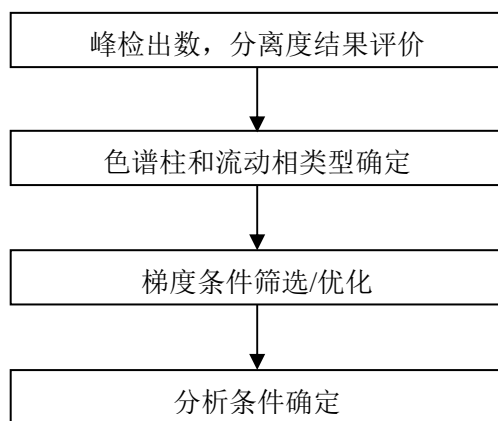


图2 应用方法开发系统进行色谱方法建立的流程

1.2.2 液相色谱条件

色 谱 柱： InertSustain ODS 3.0 mmI.D.×100 mmL., 3 μm
 Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

流 动 相： A 相—水
 B 相—乙腈

流 速： 0.4 mL/min

进样体积： 3 μL

柱 温： 40℃,55℃

洗脱方式： 梯度洗脱

检测波长： 203 nm

1.3 样品制备

分别称取一定量的人参皂苷 Re, Rg1, Rb1, Rb2, Rc, Rd, 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 100 μg/mL 的标准溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2. 结果与讨论

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四种色谱柱在水-乙腈流动相体系下进行测试。

表 1 通用梯度洗脱时间程序 (柱温 40℃)

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
0.50	Pumps	Pump B Conc.	5
3.50	Pumps	Pump B Conc.	95

5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
5.01	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Controller	Stop	

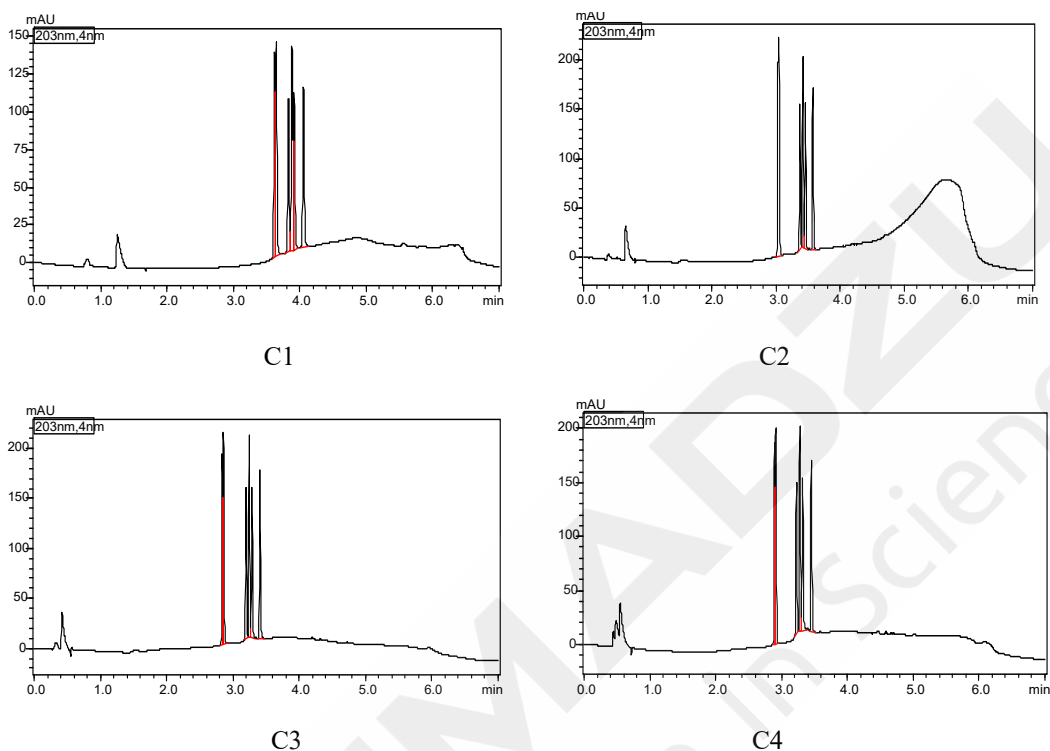


图3 6种人参皂苷在通用梯度条件下的色谱图

C1: InertSustain ODS 3.0 mmI.D.×100 mmL., 3 μm C2: Shim-pack XR-CS 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm
 C3: Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm C4: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

2.2 通用梯度分析结果评价

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

表2 通用梯度条件下4种色谱柱上的分离结果评价

peak#	Corrected Resolution*			
	C1	C2	C3	C4
1	-	-	-	-
2	0.3	3.0	0.3	0.4
3	3.0	1.4	3.0	3.0
4	1.0	1.2	1.5	1.5
5	0.5	3.0	1.2	1.2
6	2.5	-	3.0	3.0
S*	44.2	43.0	54.3	54.8

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。

根据通用梯度各分析条件下分析结果的评价，最终确定的样品分析色谱柱为 C4，即为：
 色谱柱：Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

2.3 梯度条件筛选

由通用梯度时间程序分析结果确定了用于分析 6 种人参皂苷的色谱柱和流动相,为增加分离度和改善分离效果,进行梯度条件筛选。因此在通用时间程序的基础上,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 3 梯度条件设置

	0.01 min-初始浓度 (%)	3.00 min-终止浓度 (%)
1	5	95
2	15	85
3	25	75
4	35	65

2.4 梯度条件筛选结果分析和评判

对 16 种梯度条件下 6 种人参皂苷的分析结果,通过 Class-agent report 软件进行峰检出数和分离度自动综合评判。

表 4 梯度优化分析结果评价

#	Corrected Resolution*															
	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	11)	12)	13)	14)	15)	16)
%B	5-95	5-85	5-75	5-65	15-95	15-85	15-75	15-65	25-95	25-85	25-75	25-65	35-95	35-85	35-75	35-65
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.4	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5	0.7	0.6	0.6	3.0	3.0	3.0	3.0
3	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
4	1.6	1.7	1.9	1.9	1.7	1.7	1.9	2.1	1.9	2.0	2.3	2.5	3.0	3.0	3.0	3.0
5	1.3	1.4	1.5	1.6	1.4	1.4	1.6	1.8	1.6	1.7	1.9	2.1	-	-	-	-
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	-	-	-	-
S	55.9	57.2	58.9	60.1	56.7	57.0	59.4	61.7	59.7	62.9	64.9	67.5	36.0	36.0	36.0	36.0

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

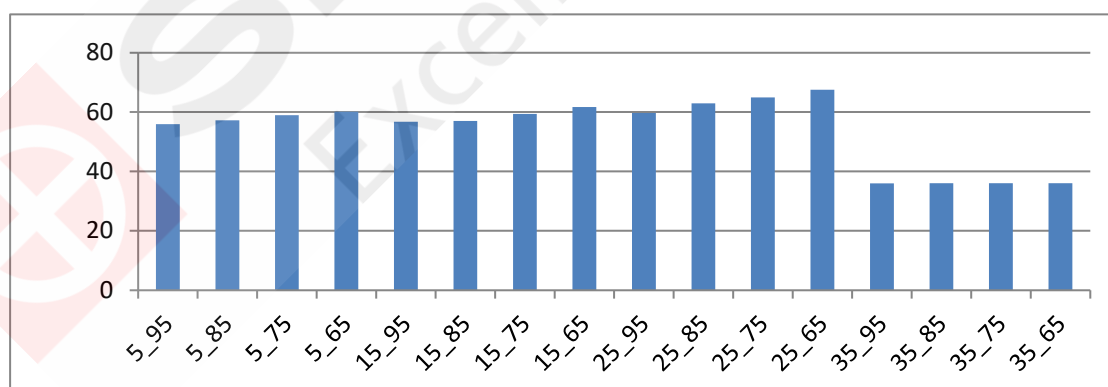


图 4 梯度条件筛选综合评价

根据分析结果评价系统统计结果,筛选出梯度条件为 25%-65%B 进行下一步优化。

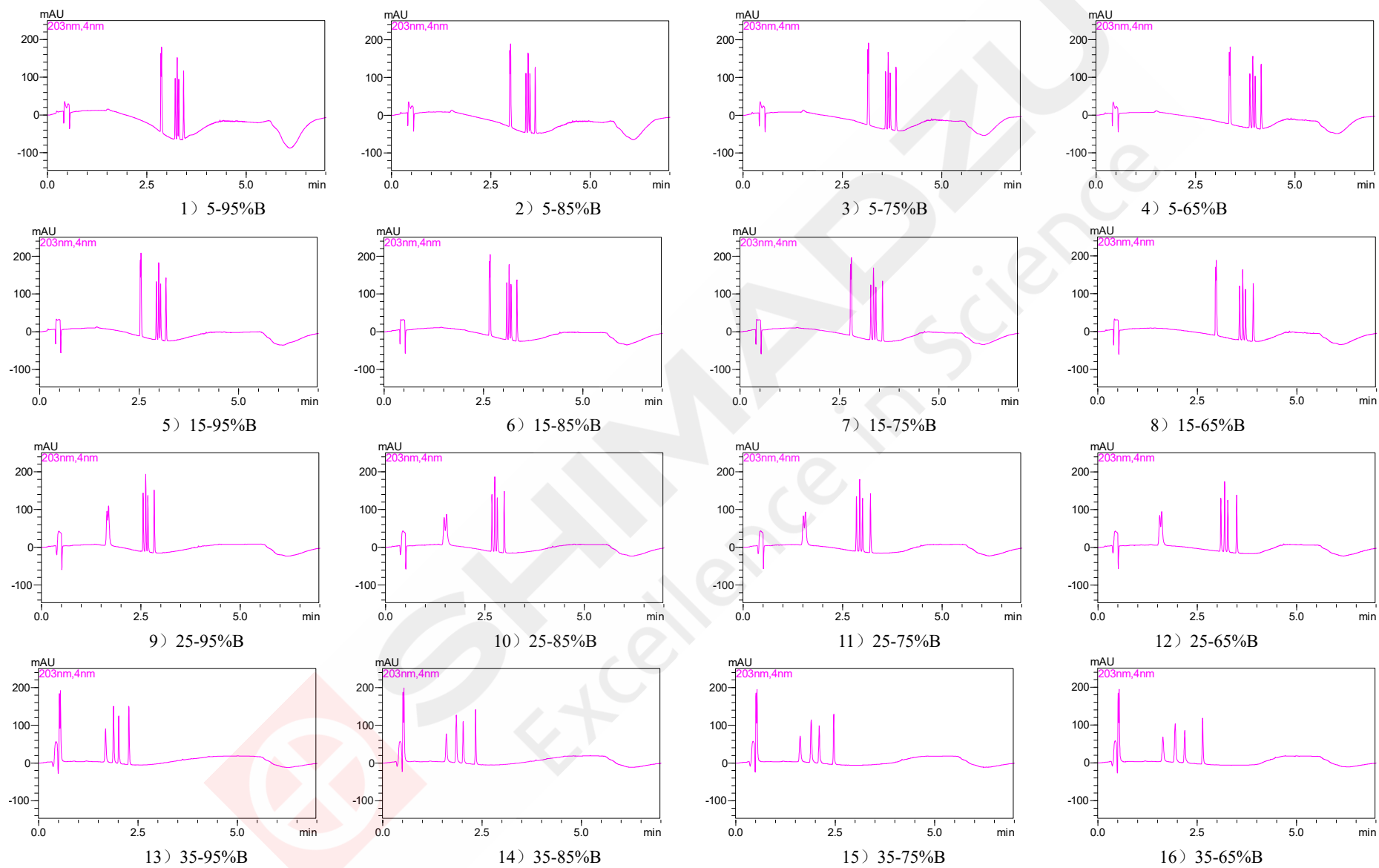


图5 6种人参皂苷在梯度条件筛选时的色谱图

2.5 梯度条件优化

对 2.4 中确定的梯度条件 25%-65%B 为基础, 对梯度条件进行优化, 目的以提高保留时间较小的两种人参皂苷的分离度, 采用保持 2 min 等度洗脱的方式, 如表 5 所示, 优化时间程序中 0-2min 时 B%。

表 5 梯度条件优化设置 (柱温 55℃)

	2 min-初始浓度 (%)	5 min-终止浓度 (%)	Peak2 保留时间	Peak2 分离度
1	24		4.23	0.7
2	26		3.11	1.4
3	28	65	1.83	1.8
4	30		1.52	1.7

综合考虑 peak2 分离度和保留时间, 0-2 min 选择 28%可在合理的保留时间内获得更高的分离度, 再对 5 min 终止浓度进行考察, 如表 6。

表 6 梯度条件优化设置 (柱温 55℃)

	2 min-初始浓度 (%)	5 min-终止浓度 (%)	评价系统结果 S
1		75	75.4
2		70	77.5
3	28	65	79.4
4		60	80.1

通过对梯度条件的优化, 根据评价系统统计结果, 选择为 28-60%B 方式为最优方法。

梯度优化过程对初始浓度和终止浓度分别先后进行考察, 用尽可能少的步骤完成优化过程。

2.6 分析条件的确定

通过 HPLC 方法开发系统对 6 种人参皂苷的 UHPLC 分析方法进行探索, 经过两种实际样品 (高丽红参, 生脉注射液) 验证, 将终止浓度调整到 55%可以提高实际样品中极性较小区域杂质的分离度, 因而最终确定的液相色谱分析条件为:

色谱柱: Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

流动相: A 相-水, B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

检测波长: 203 nm

柱温: 55℃

进样量: 3 μL

梯度洗脱时间程序: 表 5

表 6 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	28
2.00	Pumps	Pump B Conc.	28
4.50	Pumps	Pump B Conc.	55
7.00	Pumps	Pump B Conc.	55
7.01	Pumps	Pump B Conc.	28
9.00	Controller	Stop	

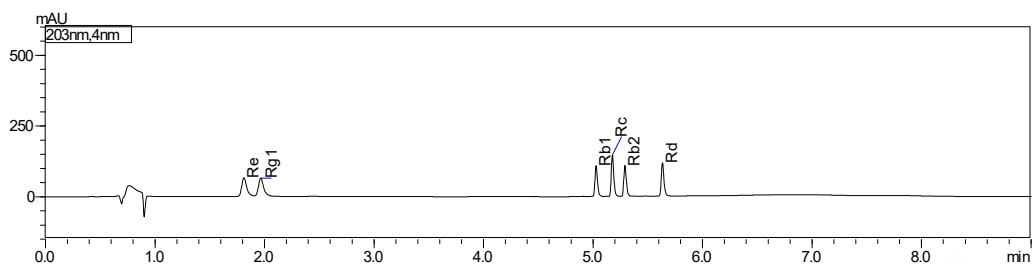


图 6 6 种人参皂苷对照品溶液 UHPLC 色谱图

2.7 含人参皂苷的中药及制剂样品分析结果

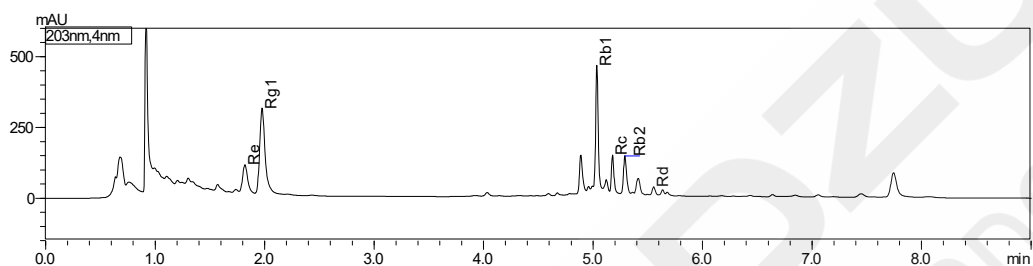


图 7 高丽红参甲醇提取液的 UHPLC 色谱图

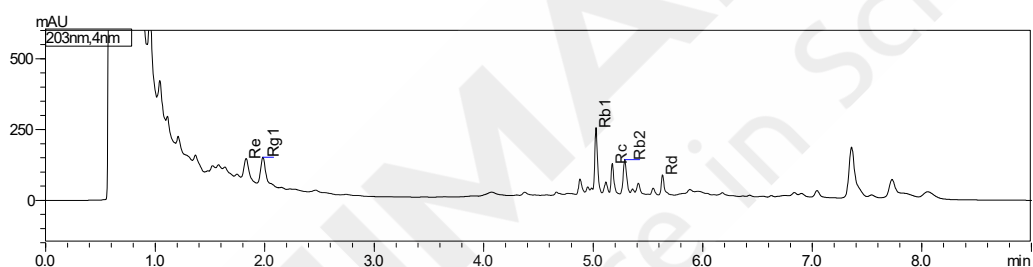


图 8 生脉注射液的 UHPLC 色谱图

3. 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统建立了 Re、Rg1 等 6 种人参皂苷超高效液相色谱分析方法，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，通过 Class-agent Report 报告生成软件自动进行分析结果中峰检出数和分离度综合评估从而筛选最优条件。分析结果显示，6 种人参皂苷在 10 分钟内实现基线分离，各峰分离度均能达到 1.5 以上，从而为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。

方法开发系统在建立 4 种水飞蓟素 UHPLC 分析方法上的应用

摘要: 本文建立了一种使用岛津 HPLC 方法开发系统对 4 种水飞蓟素进行高效液相色谱快速分析条件探索的方法。在该分析方法开发中, 使用 4 种反相高效液相色谱柱、5 种流动相体系和 16 种梯度条件进行自动化方法探索, 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 水飞蓟素

水飞蓟素是从水飞蓟种子中提取的黄酮木酯素化合物的混合物, 具有保肝、抗氧化和降血脂的作用, 主要包括水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁等。其中水飞蓟宾、异水飞蓟宾均含有一对非对映异构体, 因此, 对 HPLC 分析水飞蓟素条件的建立带来一定的困难。该样品的传统 HPLC 方法耗时长, 分离效果不佳, 随着现代液相色谱技术的高速发展, 开发超快速液相分析方法进行此类样品的分析显得尤为重要。

岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统是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选择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。专用 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。

文中使用该套系统, 自动筛选合适的色谱柱和流动相体系及梯度建立了快速检测

四种水飞蓟素共计 6 个化合物的 UHPLC 分析方法。

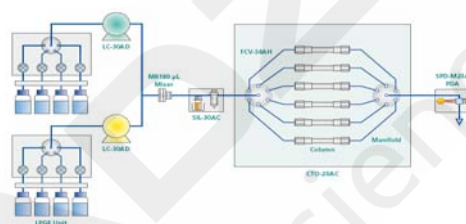


图 1 方法开发系统流路特点

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 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-M30A (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. 5.54SP1 (色谱工作站)。

表 1 4 种水飞蓟素信息

#	名称	英文名	CAS 号	分子式	备注
1	水飞蓟宾	Silybin	245-302-5	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	非对映异构体
2	异水飞蓟宾	Isosilybin	72581-71-6	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	非对映异构体
3	水飞蓟亭	Silychristin	33889-69-9	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	
4	水飞蓟宁	Silydianin	2288-70-6	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-C8 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm
 Inertsil ODS-4 2.1 mmI.D.×50 mmL., 3 μm
 Inertsil ODS-SP 2.1 mmI.D.×100 mmL., 3 μm
 Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×75mmL., 1.6 μm

流动相: A₁相—水 流速: 0.4 mL/min
 A₂相—0.1%甲酸水溶液 进样体积: 2 μL
 B₁相—乙腈 柱温: 40℃
 B₂相—甲醇 洗脱方式: 梯度洗脱
 B₃相—乙腈-甲醇(1:1, V/V) 检测波长: 288 nm

1.3 样品制备

甲醇溶解并稀释水飞蓟宾, 异水飞蓟宾, 水飞蓟亭, 水飞蓟宁四种对照品得浓度为 50 μg/mL 的混合标准溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2. 结果与讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以表 2 所示的通用梯度时间程序对色谱柱和流动相体系进行测试。

表 2 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.51	Pumps	Pump B Conc.	10
5.50	Controller	Stop	

共进行 2×3×4=24 次快速液相分析, 获得通用测试条件下各色谱柱和流动相体系的样品色谱保留行为。

2.2 通用梯度分析结果评价

对 2.1 中通用梯度分析结果评价, 依据为峰检出个数同分离度等参数的综合得分, 为避免较高分离度值过分影响计算结果, 计算中各峰分离度大于 3 的以 3 记, 不足 3 的以实际计算结果记。

表 3 通用梯度分析条件下分离结果评价

	Shim-pack XR-C8	Inertsil ODS-4	Inertsil ODS-SP	Shim-pack XR-ODS III
M.PA1-B1	18.3	11.9	10.4	18.8
M.PA1-B2	22.3	20.5	18.2	15.0
M.PA1-B3	23.3	21.3	21.2	25.2

M.PA2-B1	12.3	12.1	10.7	20.8
M.PA2-B2	23.3	21.6	18.3	23.6
M.PA2-B3	23.0	21.7	21.5	26.3

M.P: 流动相

根据通用梯度各分析条件下分析结果的评价，确定如下色谱柱和流动相体系：

色谱柱：Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×75 mmL., 1.6 μm

流动相：A: 0.1%甲酸水溶液

B: 乙腈-甲醇（1：1，V/V）

2.3 梯度条件筛选

在确定本实验使用的色谱柱和流动相体系后，以通用分析条件为基础，以改善分离度为目的，对流动相的梯度变化方式进行考察，按表 4 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 梯度条件设置

	初始浓度 (%)	2.50 min-终止浓度 (%)
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60

2.4 梯度条件筛选结果分析和评判

对 16 种梯度条件下 4 种水飞蓟素分析结果通过 Class-agent report 软件进行峰检出数和分离度自动综合评判。

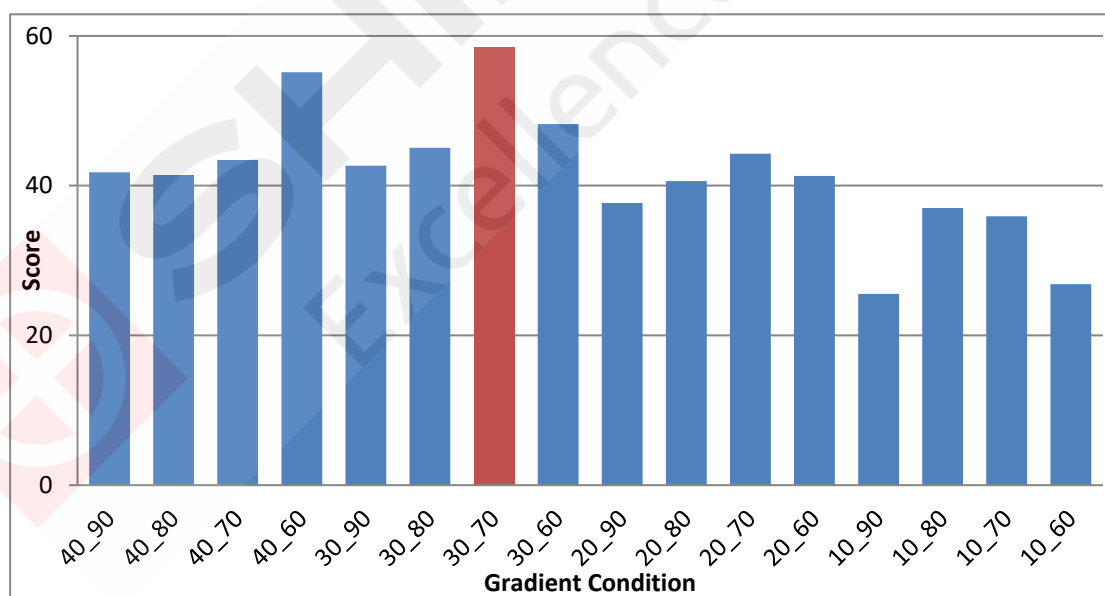


图 2 梯度条件筛选综合评价

根据分析结果评价系统统计结果，筛选出梯度条件为 30-70%B 进行下一步优化。

2.5 梯度条件优化

以 2.4 中确定的梯度条件 30-70%B 为基础，对梯度条件进行优化，优化方案如表 5 所

示, 共计进行 24 次分析, 为增大各峰分离度, 优化方法中适当延长梯度洗脱时间到 7 分钟。

表 5 梯度条件设置

初始浓度 (%)	7 min-终止浓度 (%)
	70
	65
	60
30	55
35	50
40	45
	40
	35

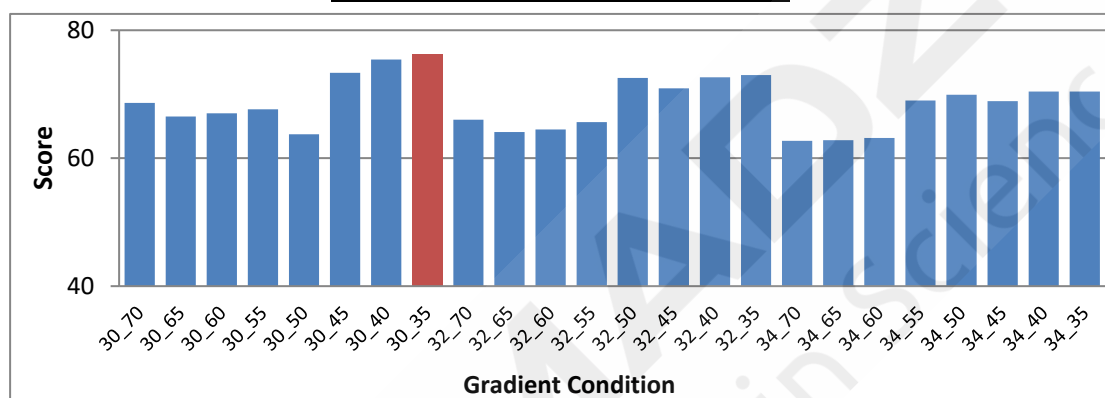


图 3 梯度条件优化综合评价

通过对梯度条件的优化, 根据评价系统统计结果, 选择为 30-35%B 方式为最优方法。

2.6 分析条件的确定和样品分析结果

通过 Nexera LC-30A 方法开发系统, 对 4 种水飞蓟素进行 UHPLC 分析方法探索, 经过评价系统综合评定, 最终确定的液相色谱分析条件为:

色谱柱: Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mmI.D.×75 mmL., 1.6 μm

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液, B 相-乙腈-甲醇 (1:1, V/V)

流 速: 0.4 mL/min

检测波长: 288 nm

柱温: 40℃

进样量: 2 μL

梯度洗脱时间程序: 表 7

表 6 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	30
7	Pumps	Pump B Conc.	35
7.01	Pumps	Pump B Conc.	40
10.5	Pumps	Pump B Conc.	40
10.51	Pumps	Pump B Conc.	30

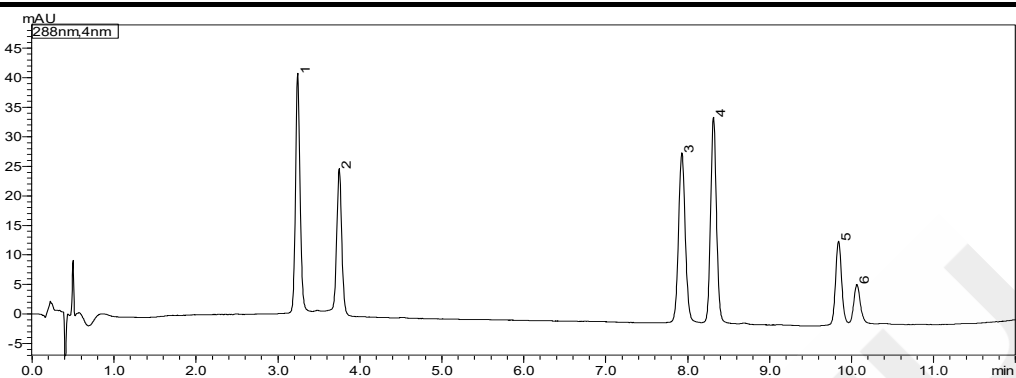
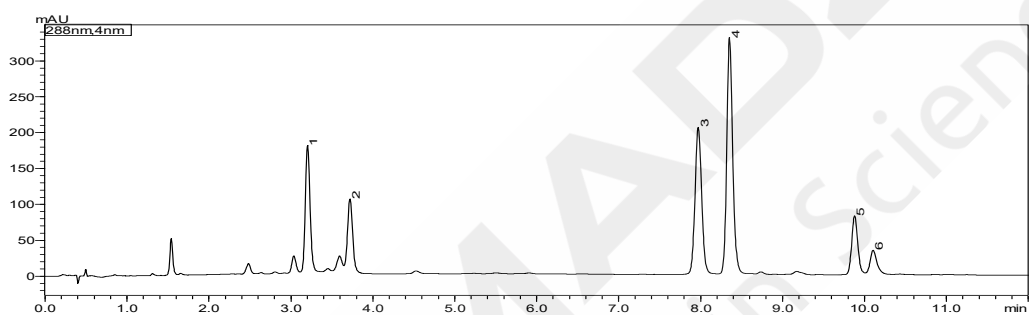


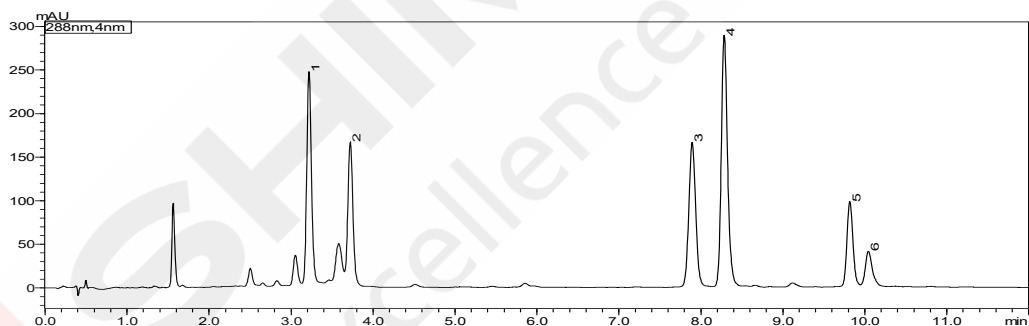
图4 4种水飞蓟素对照品溶液UHPLC色谱图

1. 水飞蓟亭 2. 水飞蓟宁 3.4. 水飞蓟宾 A+B 5.6. 异水飞蓟宾 A+B

2.7 水飞蓟相关样品的分析



a)



b)

图5 a)水飞蓟素片提取溶液UHPLC色谱图 b)乳蓟提取物甲醇水溶液UHPLC色谱图

1. 水飞蓟亭 2. 水飞蓟宁 3.4. 水飞蓟宾 A+B 5.6. 异水飞蓟宾 A+B

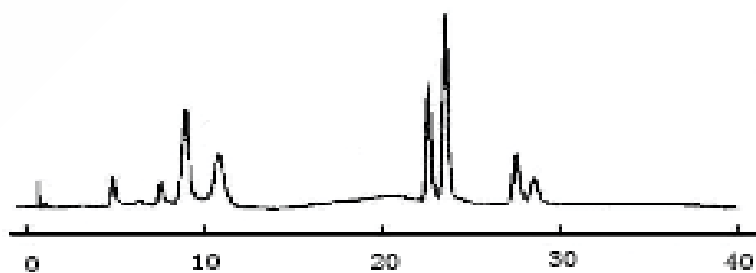


图6 常规液相方法检测水飞蓟素色谱图

3. 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统建立了 4 种水飞蓟素的高效液相色谱分析方法，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，通过 Class-agent Report 报告生成软件自动进行分析结果中峰检出数和分离度综合评估从而筛选最优条件。分析结果显示，12 分钟内实现 4 种水飞蓟素共计 6 个同分异构体（其中包括两对非对映异构体）的基线分离，各峰分离度均能达到 1.5 以上，对于通过质谱检测获得的质量数色谱图而言，同分异构体尤其是非对映异构体可以满足定量分析的要求，从而为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。



SHIMADZU
Excellence in Science

方法开发系统在银杏中黄酮提取物分析方法开发上的应用

摘要: 本文中使用了岛津 HPLC 方法开发系统, 建立了银杏黄酮提取物高效液相色谱快速分析条件探索的方法。在该分析方法开发中, 在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×150 mm L., 2.2 μm 色谱柱上进行 4 种流动相和 6 种梯度条件的自动化方法探索, 根据所得色谱图结果使用自动评测软件对各峰进行综合评价, 以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 银杏黄酮提取物

银杏 (*Ginkgobiloba*), 又名白果, 是世界上十分珍贵的树种之一, 具有较高的食用和药用价值, 银杏叶提取物 (GBE) 含有丰富的黄酮类化合物, 能够增加脑血管流量, 改善脑血管循环功能, 保护脑细胞, 扩张冠状动脉, 防止心绞痛、心肌梗塞和血栓形成, 提高机体免疫能力。对冠心病、心绞痛、脑动脉硬化、老年性痴呆、高血压病人均十分有益。

银杏黄酮提取物中各化合物的种类和含量是甄别其品质的关键, 也是保证中药生成质量管理和临床用药安全规范的关键, 因此利用 HPLC 综合全面的特点将 HPLC 指纹图谱技术引入到银杏黄酮研究中用于质量控制。由于成分复杂, 传统 HPLC 方法耗时长, 分离效果不佳, 随着现代液相色谱技术

的高速发展, UHPLC 和对应的超快速分析色谱柱在以其超快速高分离的特点, 越来越多的用于中药指纹图谱的研究中, 为此开发超快速液相分析方法进行此类样品的分析显得尤为重要。

岛津 HPLC 方法开发系统是基于 UHPLC 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选择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。专用 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。

本实验使用该套系统对银杏黄酮样品进行分析, 筛选优化获得最优的 UHPLC 分析方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵, 配四元低压梯度比例阀), DGU-20A_{SR}×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-M30A (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. 5.54SP1 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色 谱 柱: Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×150 mm L., 2.2 μm

流 动 相: A₁ 相—水

A₂ 相—0.1%三氟醋酸水溶液

A₃ 相—0.2%磷酸水溶液

B 相—乙腈
 流速： 0.4 mL/min
 柱温： 40℃
 检测波长： 360 nm

1.3 样品制备

以甲醇-水 (1/1, V/V) 溶解，浓度为 40 mg/mL；以 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2. 结果与讨论

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色谱柱和流动相体系进行测试。

表 1 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	10
24.00	Pumps	Pump B Conc.	50
27.00	Pumps	Pump B Conc.	50
27.10	Pumps	Pump B Conc.	10
30.00	Controller	Stop	

表 2 通用分析条件分析结果及评价

#	流动相类型	峰检出数	综合得分*
1	A1-B	35	2168
2	A2-B	36	2255
3	A3-B	35	2195

*综合得分：以峰检出数乘以各峰分离度之和记，分离度值大于 3 者均以 3 记。

根据评价结果，确定流动相 A2-B 类型为该样品分析用流动相体系，即为 A 相-0.1%三氟乙酸水溶液，B 相-乙腈。

2.2 梯度条件筛选及结果

在上步确定的流动相体系下进行梯度条件的筛选。筛选方案和结果如表 3 所示。

表 3 梯度筛选方案和结果

起始浓度 (B%)	终止浓度 (30 min)	峰检出数	综合得分
	50	33	2329
10	40	36	2714
	30	36	3031

通过梯度条件筛选，确定合理的梯度条件为 10-30%B。

2.3 梯度条件优化及结果

为进一步提高各峰分离度，对梯度条件筛选结果为依据，以表 4 方案进行梯度优化。

表 4 梯度优化方案

起始浓度 (B%)	终止浓度 (30 min)
10	30
11	25
12	

共进行 3×2=6 次优化分析，结果如下所示。

表 5 梯度条件优化结果

#	分析方法	峰检出数	综合得分
1	ODSIII_0.1%TFA_ACN_12_30	35	2692
2	ODSIII_0.1%TFA_ACN_12_25	24	1298
3	ODSIII_0.1%TFA_ACN_11_30	35	2804
4	ODSIII_0.1%TFA_ACN_11_25	26	1627
5	ODSIII_0.1%TFA_ACN_10_30	35	2678
6	ODSIII_0.1%TFA_ACN_10_25	28	1653

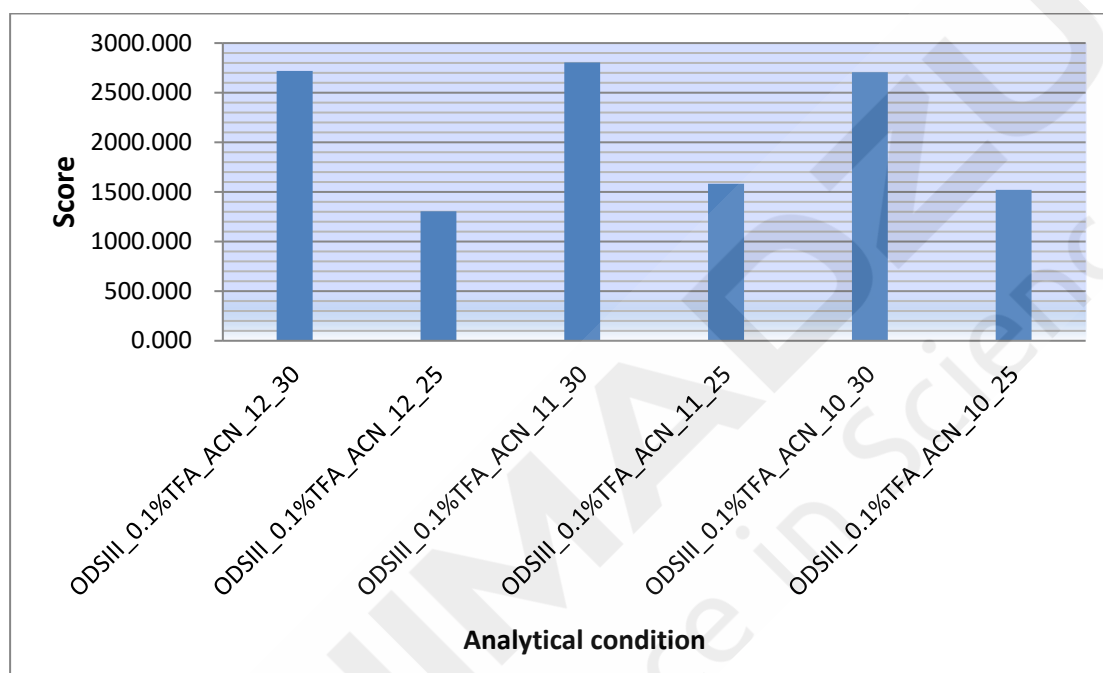


图1 梯度条件优化分析结果评价

根据上述评价结果，确定该样品的最佳分析条件为：

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×150 mm L., 2.2 μm

流动相：A-0.1%三氟醋酸水溶液 B-乙腈

流速：0.4 mL/min

梯度条件：详见表 6

柱温：40℃

样品浓度：40 mg/mL

进样量：1 μL

表 6 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Action	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	11
30.00	Pumps	Pump B Conc.	30
33.00	Pumps	Pump B Conc.	30
33.01	Pumps	Pump B Conc.	11
36.00	Controller	Stop	

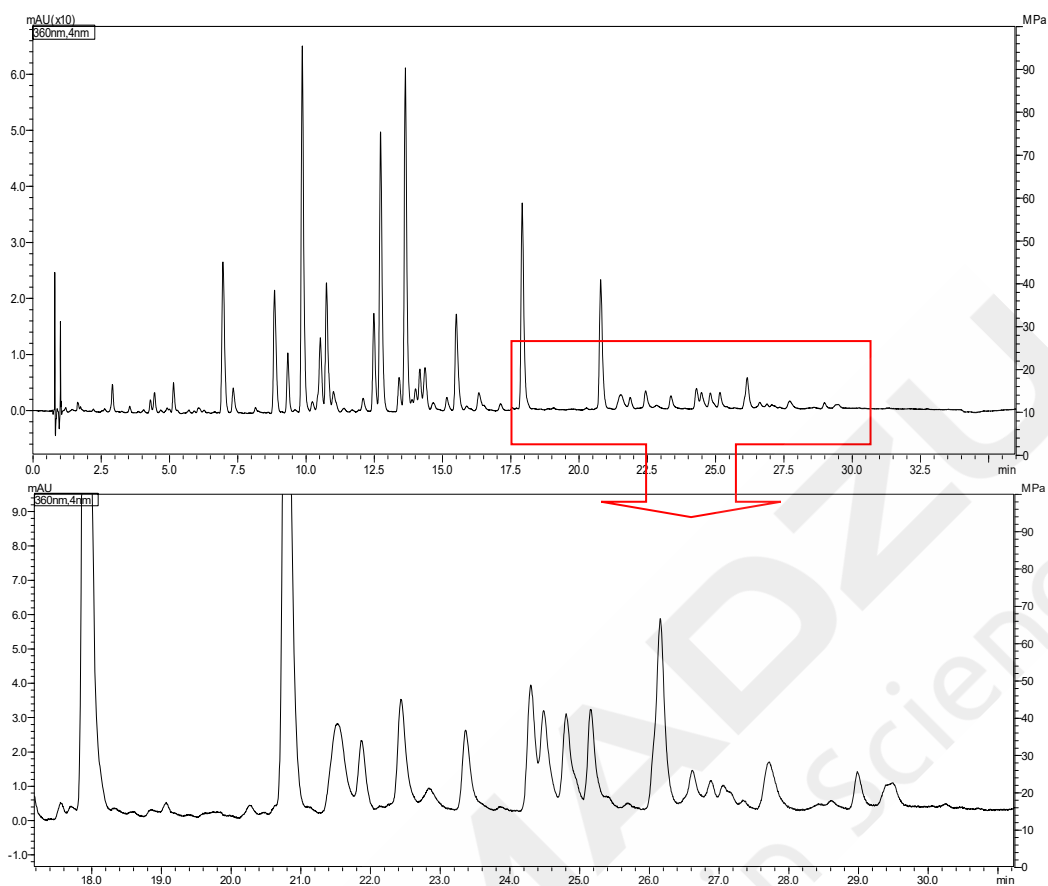


图2 优化 UHPLC 条件样品分析色谱图

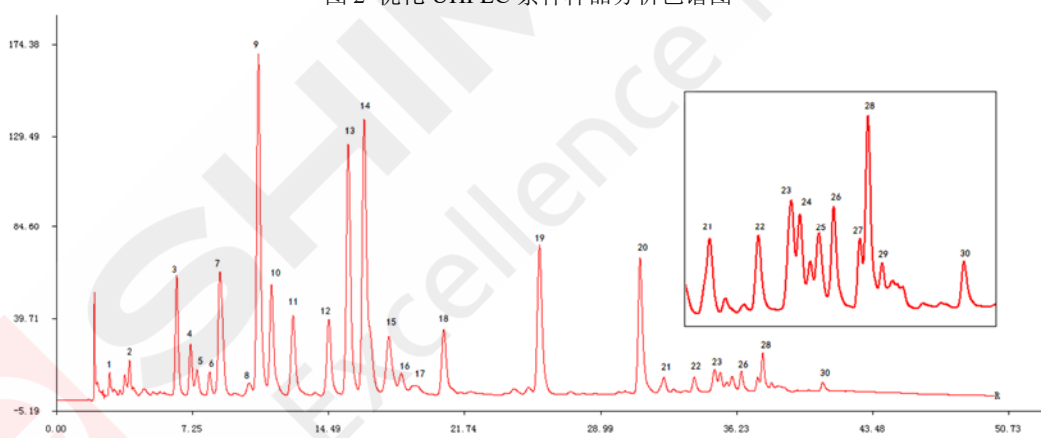


图3 原常规液相方法样品分析色谱图

3. 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统对银杏中黄酮提取物的 HPLC 分析方法进行开发，经过通用条件分析、梯度条件筛选和梯度条件优化三个步骤进样分析，对所得数据使用 Class-agent report 软件处理，根据峰检出数和分离度综合得分，以获得评价最高的分析条件建立该样品的分析方法。本例为中药或天然产物等此类待测组分或化合物数量未知的样品分离条件的探索提供可行的方法。

方法开发系统在有机合成色素分析方法开发中的应用

摘要: 本文中使用了岛津 HPLC 方法开发系统, 进行 29 种有机合成色素进行高效液相色谱快速分析方法建立。实验中在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×150 mm L., 2.2 μm 色谱柱上进行 4 种流动相和 7 种梯度条件的自动化方法探索, 根据所得色谱图结果使用自动评测软件对各峰进行综合评价, 以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 有机合成色素 方法转化

色素一般是日常生活中人们对食用色素的简称, 食用色素包括天然色素和人工合成色素两种。人工合成色素大都由来源于煤焦油中分离出来的苯胺染料为原料制成, 医学研究表明, 该类物质除具有一般毒性、致泻性和生殖毒性外, 还可以可导致严重的致畸、致突变和致癌等严重危害。为此包括我国在内的世界各国均在食用色素的管理、合成色素的使用方面均有严格的规定, 如我国的 GB2760-2007, 欧盟的 94/36/EC 指令, 美国联邦规定法 21CFR70 中都对多种合成色素要求禁止或严格限量使用。人工合成色素包括有机合成色素、无机合成色素、天然等同合成色素以及其他合成色素。其中有机

合成色素从结构上分为偶氮色素类和非偶氮色素类, 这些色素的分子量在 450-880 之间, 最大吸收波长在 428-630nm 之间。为了应对不法份子在食品中违规添加多种有机合成色素的做法, 开发能够同时检测多种色素的 HPLC 方法在食品安全检测领域具有迫切需求。然而, 常规的 HPLC 方法开发阶段耗时长, 效率低, 如果遇到同时检测的化合物数量较多则更为突出, 所以该阶段往往成为整个 HPLC 分析过程的制约因素。

本实验使用方法开发系统建立了柠檬黄等 29 种有机合成色素 HPLC 分析方法, 为食品中有机合成色素的检测提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵, 配四元低压梯度比例阀), DGU-20A_{SR}×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. 5.54SP1 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色谱柱: Shimpack XR-ODS III 2 mm ID×150 mm L., 2.2 μm

流动相: A1 相—0.1%甲酸水溶液

A2 相—20 mM 醋酸铵水溶液

B1 相—乙腈

B2 相—甲醇-乙腈 (1/1, V/V)

流 速： 0.45 mL/min

柱 温： 40℃

检测波长： Max Plot: 400-650 nm

2. 结果与讨论

2.1 通用梯度时间程序分析

以 5%B(0-1.5min)-90%B(17.5-22.5min)-5%B(22.51-25min)通用梯度时间程序对色谱柱和流动相体系进行测试。

表 1 通用分析条件分析结果及评价

#	流动相组成	综合得分*
1	A1-B1	105
2	A1-B2	55
3	A2-B1	1819
4	A2-B2	1760

*综合得分：以峰检出数乘以各峰分离度之和记，分离度值大于 3 者均已 3 记。

根据评价结果，确定流动相 A2-B1 类型为该样品分析用流动相体系，即为 A 相-20 mM 醋酸铵水溶液，B 相-乙腈。

2.2 梯度条件筛选及结果

在上步确定的流动相体系下进行梯度条件的筛选。筛选方案和结果如表 2 所示。

表 2 梯度筛选方案和结果

#	梯度初始%B	梯度终止%B	评价系统得分
1		90	1819
2		85	1808
3		80	1785
4		75	1847
5	5	70	1765
6		65	2046
7		60	2085
8		55	1952
9		50	1947

以第 7 种梯度变化方式 5-60%B 综合评价得分最高，确定该样品的最佳分析条件为：

色 谱 柱： Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×150 mm L., 2.2 μm

流 动 相： A-20 mM 醋酸铵水溶液 B-乙腈

流 速： 0.45 mL/min

梯度程序： 5%B(0-1.5min)-60%B(17.5min)-90%B(17.51-22.5min)-5%B(22.51-25min)

柱 温： 40℃

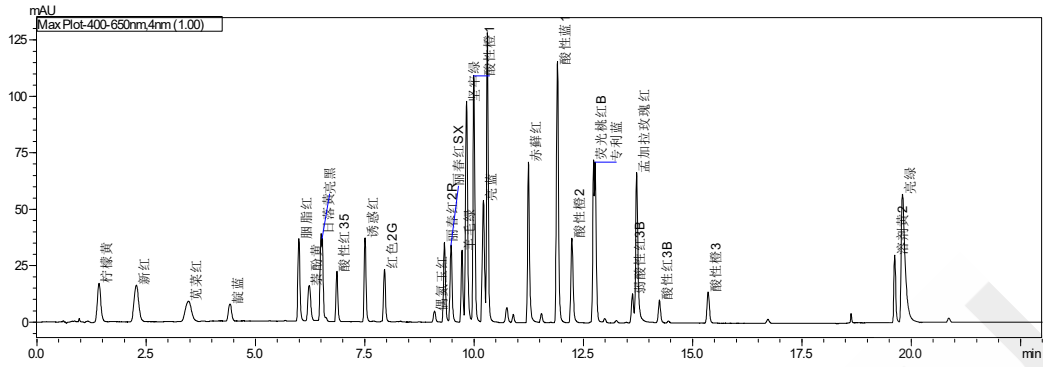


图 1 29 种色素 UHPLC 分离结果 (400-650nm 最大绘图方式)

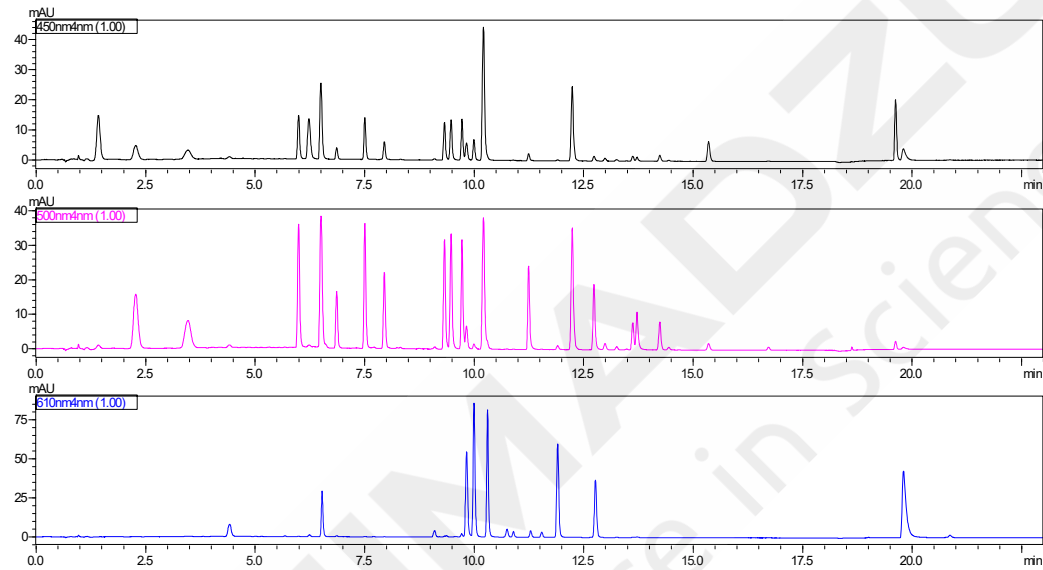


图 2 29 种色素在三波长下 UHPLC 分离结果 (450、500、610 nm)

2.3 经过方法转化软件后的分析结果

对经过筛选后确定的分析条件进行方法转换软件 Shimadzu Method Transfer V1.00 转换, 按下列转换后分析条件所得结果如图 2 所示。

分析仪器: LC-20A

色谱柱: GL Science Inertsil ODS-4 2.1 mmID.×200 mmL., 5 μm

流动相: A-20 mM 醋酸铵水溶液 B-乙腈

流速: 0.2 mL/min

梯度程序: 5%B(0-4.4min)-55%B(52.4min)-90%B(52.41-67.4min)-5%B(67.42min)

柱温: 40℃

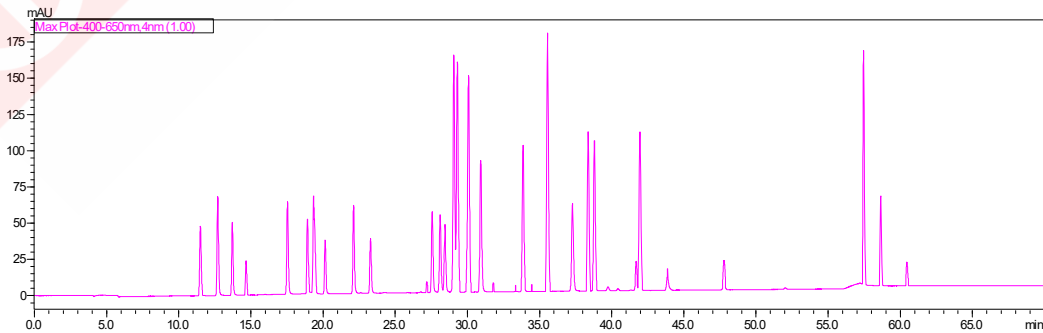


图 2 29 种色素 HPLC 分离结果 (400-650nm 最大绘图方式)

3. 结论

使用岛津 HPLC 方法开发系统对 29 种合成色素的液相分析方法进行开发, 经过通用条件分析和梯度条件筛选分析, 对所得数据使用 Class-agent report 软件处理, 根据峰检出数和分离度综合得分, 获得评价最高的分析条件建立该样品的分析方法, 该方法可在 30 min 内完成 29 种化合物的分析, 为多组分样品分离条件的探索提供可行的方式。

附表 本实验中所涉及的 29 种色素类化合物

ID#	中文名	英文名	CAS#	保留时间 (min)
1	柠檬黄	Tartrazine	1934-21-0	1.422
2	新红	New red	220658-76-4	2.275
3	苋菜红	Amaranth	915-67-3	3.468
4	靛蓝	Indigo blue	482-89-3	4.419
5	胭脂红	Acid Red 18	2611-82-7	5.993
6	萘酚黄 S	Naphthol Yellow S	846-70-8	6.229
7	日落黄	Food Yellow 3	2783-94-0	6.502
8	亮黑	Brillant Black BN	2519-30-4	6.529
9	酸性红 35	Acid red 35	6441-93-6	6.863
10	诱惑红	Allura acid AC	25956-17-6	7.507
11	红色 2G	Acid scarlet G	3734-67-6	7.952
12	偶氮玉红	Food Red 3	3567-69-9	9.096
13	丽春红 2R	Ponceau 2R	3761-53-3	9.323
14	丽春红 SX	PONCEAU SX	4548-53-2	9.475
15	羊毛绿	Acid green BS	3087-16-9	9.725
16	坚牢绿	Food green FCF	2353-45-9	9.829
17	酸性橙 1	ORANGE I	523-44-4	9.996
18	亮蓝	Brilliant Blue	3844-45-9	10.214
19	赤藓红	Erythrosine	16423-68-0	11.245
20	酸性蓝 1	Acid blue 1	129-17-9	11.907
21	酸性橙 2	Orange 2 sodium salt	633-96-5	12.240
22	荧光桃红 B	Phloxine B	18472-87-2	12.737
23	专利蓝	Acid blue 2 calcium salt	3536-49-0	12.770
24	弱酸性红 3B	weak acid red 3B	6826-53-5	13.624
25	孟加拉玫瑰红	Rose Bengal	632-69-9	13.719
26	酸性红 3B	acid pink 3B	6459-69-4	14.241
27	酸性橙 3	acid orange 3	6373-74-6	15.355
28	溶剂黄 2	Solvent Yellow 2	66-11-7	19.623
29	亮绿	Brilliant green	633-03-4	19.802

方法开发系统在注射用头孢美唑钠分析上的应用

摘要：本文建立了一种使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统快速分析注射用头孢美唑钠药物的液相分析方法。参照文献提供的四种分析条件，使用同一根色谱柱，该方法开发系统可自动完成对四种流动相的优化，可以大为节省液相色谱分析方法开发的时间。根据各个峰的检出数和分离度，利用 Class-Agent 报告软件对各峰进行综合评价，以确定最佳的分析条件。在确定该方法条件下进行样品考察，2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢美唑钠连续 6 针进样所得峰面积和保留时间的相对标准偏差分别为 3.46%、0.174%，表明系统具有较好的精密度。

关键词：超高效液相色谱 方法开发系统 头孢美唑钠 药物分析

头孢美唑钠近年来广泛应用于临床，对革兰阳性菌和阴性菌具有良好的抗菌效能，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、脆弱拟杆菌及厌氧菌，对 β -内酰胺酶也有很强的耐受性和稳定性，体内分布好，不良反应少。传统的 HPLC 方法分析耗时长，分离效果不佳，随着现代液相色谱技术的高速发展，开发超快速液相分析方法显得尤为重要。

岛津 HPLC 方法开发系统是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。本文使用该套系统，建立了快速检测头孢美唑钠的 UHPLC 分析方法。

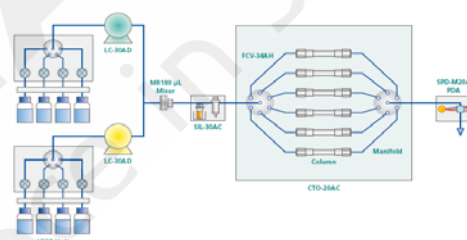


图 1. 方法开发系统示意图

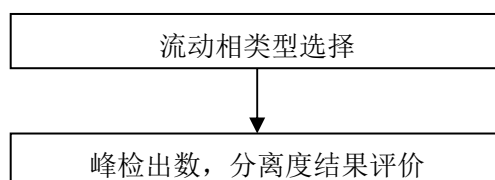
1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 HPLC 方法开发系统，包括 LC-30AD \times 2（输液泵，配四元低压梯度比例阀）、CBM-20Alite（系统控制器）、CTO-30A（柱温箱）、SIL-30AC（自动进样器）、DGU-20A₅（脱气机）、SPD-M20A（二极管阵列检测器）、Method Scouting Solution Ver. 1.00 SP2（方法开发系统工作站）、LabSolutions Ver. 5.53 SP2（色谱工作站）

1.2 分析条件

1.2.1 本实验方法建立的流程



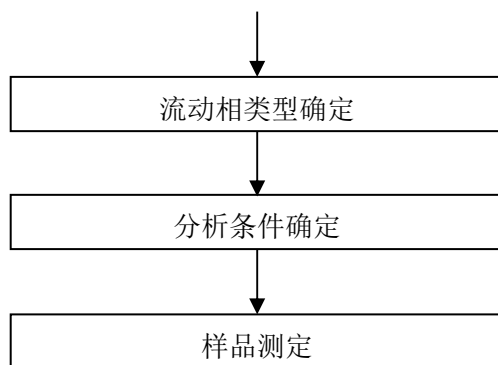


图 2. 本实验方法开发系统建立流程

1.2.2 液相色谱条件

色 谱 柱： Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D.×100 mm L.,2.2 μm)

流 动 相：

水相：

MA-磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 730 mL 使溶解，加 10%四丁基氢氧化铵 19.2 mL）加 12.5 mL 四氢呋喃（用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

MB-磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 700 mL 使溶解，加 10%四丁基氢氧化铵 3.2 mL）加 25 mL 四氢呋喃（用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

MC-磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 700 mL 使溶解，加 10%四丁基氢氧化铵 3.2 mL）加 20 mL 四氢呋喃（用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

MD-含 0.1%溶液四丁基氢氧化铵的磷酸二氢钾溶液（取磷酸二氢钾 1.36 g，加水溶解并稀释至 1000 mL，用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

有机相： 甲醇（MeOH）或乙腈(ACN)

流 速： 0.4 mL/min

洗脱方式： 等度洗脱，MA：MeOH=9:1 (v/v)； MB：MeOH=9:1 (v/v)； MC：MeOH=9:1 (v/v)；

MD：ACN=7:3 (v/v)

进样体积： 5 μL

柱 温： 35℃

检测波长： 214、254、272 nm

1.3 样品制备

取头孢美唑钠标准品 25 mg（精确到 0.1 mg），置于 25 mL 容量瓶中，加 6%过氧化氢溶液 1 mL，放置 5 min，加水 20 mL，加每 1 mL 中含 5-巯基-1-甲基四氮唑杂质对照品 0.5 mg

的溶液 1 mL，用水稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性溶液①，经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液溶解标准品，配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min，取 1 mL 该溶液与 2 mL 标准储备液于 20 mL 容量瓶中，纯水定容，作为系统适用性溶液②，经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2. 结果与讨论

2.1 采集波长优化

考察不同采集波长 214、254、272 nm 对目标物采集信号的影响，由图 3 可知 254 nm 和 272 nm 具有比 214 nm 更强的信号响应，考虑到在 254 nm 和 272 nm 采集波长下，两者的信号响应相当，最终选择 272 nm 为最大吸收波长，同时可以减少低波长杂质吸收带来的干扰。

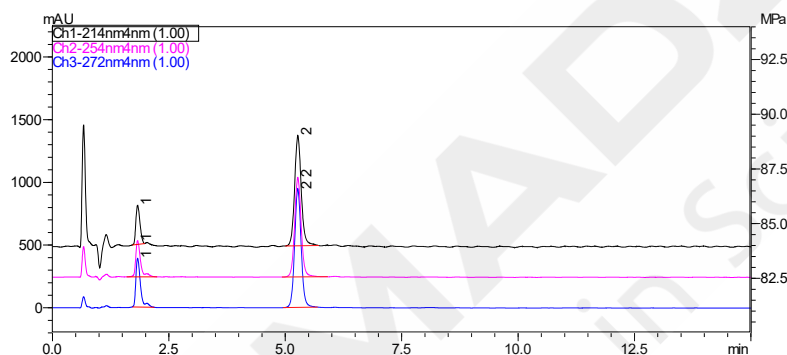


图 3. 不同采集波长下的信号响应强度比较

峰型归属（同下）：1: 5-巯基-1 甲基四氮唑（杂质）；2: 头孢美唑钠（目标物）

2.2 方法开发系统优化

按照文献提供的四种分析方法，使用岛津 HPLC 方法开发系统进行自动优化，优化结果的色谱图如图 4 至图 7，四种分析方法中目标物和杂质的出峰时间、峰面积、分离度、理论塔板数、拖尾因子、信噪比结果见表 1。

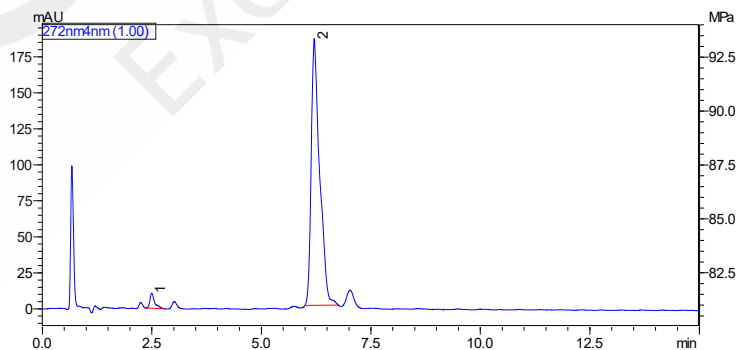


图 4. 系统适用性溶液 1 在 MA : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

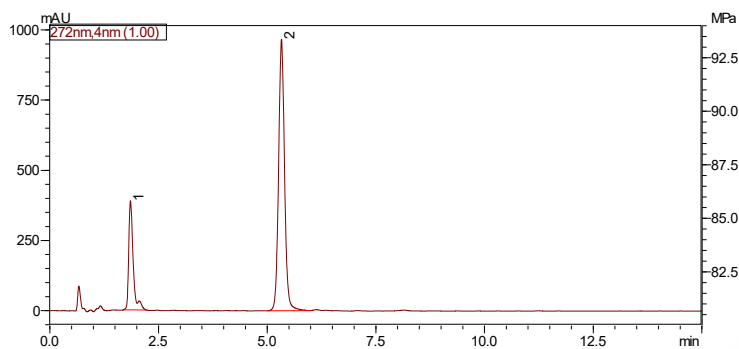


图 5. 系统适用性溶液 1 在 MB : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

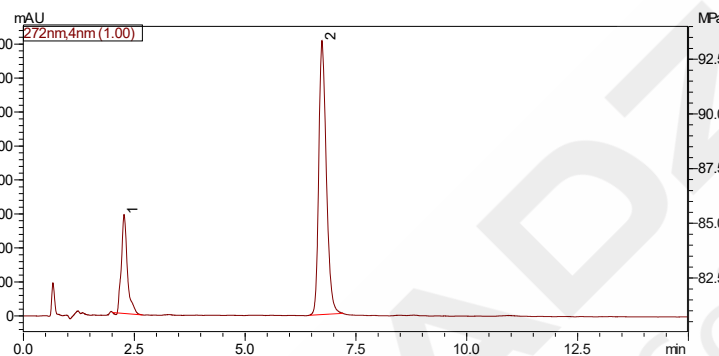


图 6. 系统适用性溶液 1 在 MC : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

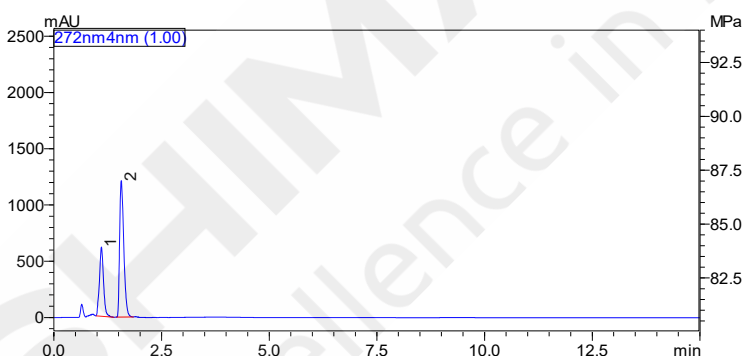


图 7. 系统适用性溶液 1 在 MD : ACN=7:3 (v/v)分析条件下的色谱图

表 1. 四种分析方法中杂质和目标物的测定信息

分析方法	化合物名称	保留时间	峰面积	分离度	理论塔板数	拖尾因子	信噪比
MA-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	2.496	78761	--	3372	1.664	48.6
	头孢美唑钠	6.207	2510777	15.3	6259	1.521	865.1
MB-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	1.854	2814355	--	1804	2.062	1226.8
	头孢美唑钠	5.329	9133180	16.6	7608	1.071	3038.4
MC-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	2.253	2494181	--	1703	1.332	1003.6
	头孢美唑钠	6.724	8586967	17.0	7629	1.264	2706.6
MD-ACN (7:3, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	1.103	4005406	--	691	1.100	1013.1
	头孢美唑钠	1.564	8097964	2.677	1247	1.476	2004.9

2.3 Class-Agent 软件评价

采用 Class-Agent 软件进行评价，该软件是基于峰检出数、分离度进行评价（以分离度低于 3.0 按照实际值进行结果报出，等于或高于 3.0 全部按照 3.0 进行计算，将所有峰的分离度总和乘以峰的检出个数作为最终得分进行评价，得分最高者则视为最佳优化方法）。由上面表 1 可知，目标物在前三者方法的分析中，获得的分离度数值均大于 3.0（分别为 15.3、16.6、17.0），只有最后一种方法分析获得的分离度数值为 2.677，依据峰的容量检出个数为 2 个，Class-Agent 软件进行自动计算，最后一种分析方法得分为 5.354，其余前三种方法得分均为 6，如图 8 所示。考虑到分析效率和信噪比等信息，最终选择分析方法为 MB-MeOH（9:1, v/v）作为流动相，Shimadzu Shim-pack XR-ODS II（2.0 mm I.D.×100 mmL, 2.2 μm）作为分析用色谱柱进行后续实验。

Evaluation report										SHIMADZU
Results of Peak Resolution										
No.	Data File	Analytical Condition	Resolution						Peaks	Score
			Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6		
1	20130816_1_MD_ACN.lcd	20130816_1_MD	0.000	2.677					2	5.354
2	20130816_1_MC_MeOH.lcd	20130816_1_MC_	0.000	3.000					2	6.000
3	20130816_1_MA_MeOH.lcd	20130816_1_MA_	0.000	3.000					2	6.000
4	20130816_1_MB_MeOH.lcd	20130816_1_MB_	0.000	3.000					2	6.000

图 8. Class-Agent 软件对四种分析方法的评价得分情况

2.4 样品分析考察

选择上述分析条件 MB-MeOH（9:1, v/v）作为流动相进行样品分析考察，色谱图如图 9 和图 10 所示，可以看到 1 号样品系统适用性溶液②和 2 号样品系统适用性溶液②的两份样品因为添加氢氧化钠溶液，与 1 号系统适用性溶液①和 2 号系统适用性溶液①进行比较，具有较低的信号响应（纵坐标读数），表明氢氧化钠的加入具有破坏作用。

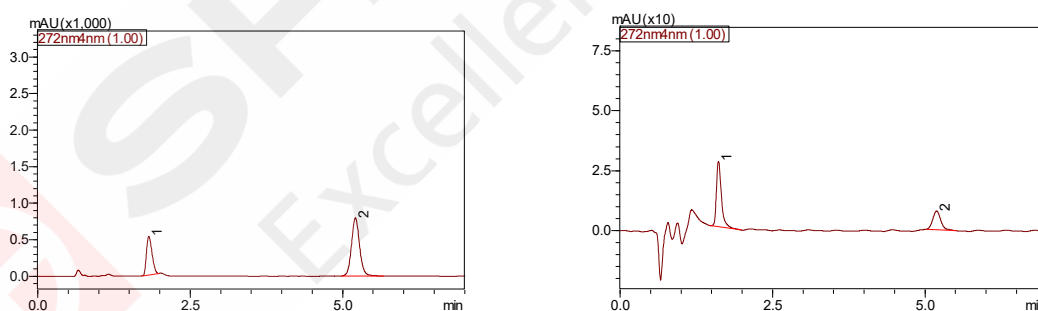


图 9. 1 号样品系统适用性溶液①（左图）和系统适用性溶液②色谱图（右图）

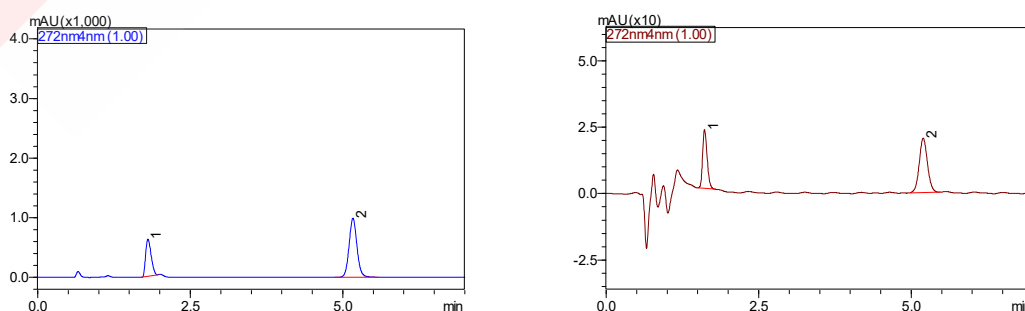


图 10. 2 号样品系统适用性溶液①（左图）和系统适用性溶液②色谱图（右图）

2.5 系统精密度考察

选择上述优化分析条件 MB-MeOH (9:1, v/v) 作为流动相进行实验, 图 11 为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢美唑钠的色谱图, 该浓度下连续 6 针进样所得峰面积和保留时间相对标准偏差(RSD%) 结果见表 2, 所得峰面积 RSD% 为 3.46%, 保留时间 RSD% 为 0.174%。

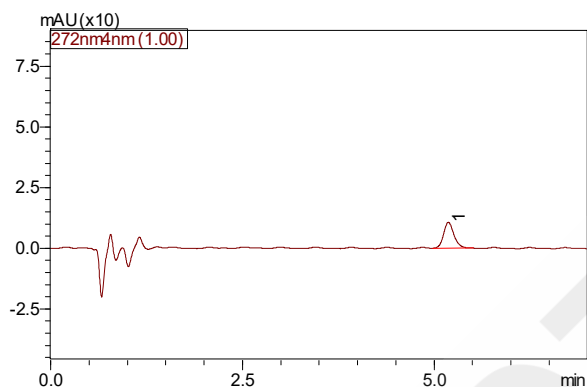


图 11. 头孢美唑钠 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的色谱图

表 2. 系统精密度考察 (n=6)

编号	保留时间 (min)	峰面积
1	5.185	95898
2	5.173	93399
3	5.168	95248
4	5.167	95726
5	5.160	88668
6	5.162	89525
RSD%	0.174	3.46

3. 结论

本实验使用岛津 HPLC 方法开发系统, 按照文献提供的四种分析测试条件, 利用 Method Scouting Solution 工作站控制来自动实现条件优化, 通过 Class-Agent 报告生成软件自动进行峰检出数和分离度综合评估从而筛选最优条件, 最终确立分析方法为 MB-MeOH (9:1, v/v) 作为流动相, Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D. \times 100 mmL, 2.2 μm) 作为分析用色谱柱。在确定该方法条件下进行样品考察, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢美唑钠连续 6 针进样所得峰面积和保留时间的相对标准偏差分别为 3.46%、0.174%, 表明系统具有较好的精密度。岛津 HPLC 方法开发系统为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。

方法开发系统在液质联用方法建立中的应用

摘要: 使用岛津 HPLC 方法开发系统同三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用, 进行 32 种 β -受体激动剂样品液质联用分析方法建立过程中的流动相考察。实验中在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×75 mm L., 1.6 μ m 色谱柱上进行 5 种流动相在通用梯度条件下对样品中各化合物的保留行为以及质谱响应情况的影响, 通过谱图对比综合考虑, 2 mM NH₄Ac-MeOH 为适合该样品分析的流动相体系。

关键词: 超高效液相色谱 方法开发系统 β -受体激动剂 三重四极杆质谱

液质联用 (LCMS) 技术问世于 20 世纪 70 年代, 该技术体现了色谱和质谱优势的互补, 将色谱对复杂样品的高分离能力, 与 MS 具有高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来, 在药物分析、食品分析和环境分析等许多领域得到了广泛的应用。

以 ESI (电喷雾电离) 方式为主的大气压电离方式是现代液质联用技术中的主要手段, 从大极性到中等极性, 从挥发性物质到非挥发性物质, 从 100 以内的小分子到大分子蛋白质, 都可以使用该手段予以检测。然而就 ESI 方式的离子化效果而言, 流动相 (溶剂) 的选择对化合物质谱响应具有显著影响, 因此选择合适的流动相类型对于

LCMS 分析方法开发至关重要。

岛津 HPL 方法开发系统是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选择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。专用 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。

本实验通过岛津 HPLC 方法开发系统同三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用, 对 32 种 β -受体激动剂样品的 LCMS 分析方法进行实验, 重点考察不同流动相对化合物质谱响应的影响, 从而通过该系统确定适用的流动相体系。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵, 配四元低压梯度比例阀), DGU-20A_{SR}×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)), LCMS-8040 (三重四极杆液质联用仪), CBM-20A (系统控制器), Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站), LabSolutions Ver. 5.53 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色 谱 柱: Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d.×75 mm L., 1.6 μ m

流 动 相: A₁ 相—水

A₂ 相—0.1%甲酸水溶液

A₃相—2 mM 醋酸铵水溶液

B₁相—乙腈

B₂相—甲醇

流 速： 0.4 mL/min

柱 温： 40℃

质谱仪： LCMS-8040

干燥气流速： 氮气 20 L/min

离子源： ESI

碰撞气： 氩气

加热模块温度： 400℃

驻留时间： 100 ms

脱溶剂管温度： 250℃

延迟时间： 3 ms

雾化气流速： 氮气 3 L/min

扫描模式： MRM (+)

MRM 参数： 见表 1



图 1 方法开发系统与 LCMS-8040 联用

表 1 32 种 β -受体激动剂 MRM 参数

#	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	西马特罗	219.80	202.00*	-23	-9	-20
			160.20	-23	-14	-30
2	特布他林	226.00	152.00*	-23	-15	-29
			125.00	-23	-22	-22
3	沙丁胺醇	240.00	148.00*	-25	-18	-28
			222.00	-25	-9	-22
4	齐帕特罗	262.00	244.00*	-27	-12	-25
			185.00	-27	-23	-18
5	麻黄碱	166.00	148.05*	-30	-15	-29
			91.00	-30	-30	-17
6	异丙喘宁	234.00	160.05*	-26	-13	-17
			143.00	-26	-24	-27

7	西布特罗	234.00	160.20*	-25	-13	-30
			143.10	-25	-24	-26
8	非诺特罗	304.00	107.00*	-22	-32	-20
			135.00	-22	-18	-25
9	利托君	288.00	270.10*	-20	-12	-19
			121.05	-20	-22	-22
10	克仑塞罗	318.70	301.10*	-15	-15	-15
			203.00	-15	-15	-15
11	纳多洛尔	310.00	254.10*	-22	-17	-28
			201.00	-22	-22	-21
12	克伦普罗	262.90	245.10*	-27	-9	-25
			132.20	-27	-24	-24
13	氯丙那林	213.80	154.10*	-22	-15	-28
			196.20	-22	-10	-19
14	克伦特罗	276.90	203.00*	-29	-15	-20
			259.20	-29	-10	-17
15	美托洛尔	268.00	116.10*	-30	-19	-21
			72.05	-30	-21	-28
16	妥布特罗	228.00	154.00*	-24	-16	-28
			119.10	-24	-28	-21
17	溴布特罗	366.90	292.90*	-17	-19	-30
			349.00	-17	-13	-24
18	马布特罗	310.80	237.10*	-30	-16	-24
			217.10	-30	-25	-21
19	班布特罗	368.10	294.20*	-17	-20	-30
			72.15	-17	-35	-27
20	瑞普特罗	390.00	304.00*	-28	-29	-21
			317.05	-28	-25	-23
21	丙卡特罗	291.00	273.05*	-30	-11	-19
			203.00	-30	-15	-21
22	克伦异磅特罗	291.00	273.05*	-30	-11	-30
			203.00	-30	-15	-21
23	马喷特罗	324.80	237.10*	-26	-17	-24
			217.10	-26	-26	-22
24	克伦潘特	327.00	239.00*	-23	-15	-26
			219.00	-23	-26	-23
25	莱克多巴胺	302.00	284.30*	-30	-12	-19
			164.20	-30	-16	-30
26	苯氧丙酚胺	302.00	284.20*	-30	-14	-30
			107.00	-30	-29	-18
27	普萘洛尔	260.00	116.10*	-18	-17	-21
			183.05	-18	-17	-19
28	倍他洛尔	308.00	116.10*	-22	-20	-21

			72.05	-22	-23	-29
29	福莫特罗	345.00	327.10*	-27	-13	-23
			121.05	-27	-32	-22
30	苯乙醇胺 A	344.80	327.20*	-16	-14	-21
			150.20	-16	-23	-27
31	沙美特罗	416.00	398.30*	-19	-14	-27
			380.30	-19	-20	-26
32	喷布特罗	292.00	236.15*	-30	-16	-26
			133.05	-30	-25	-25

*表示为定量离子

表 2 9 种 β -受体激动剂内标化合物 MRM 参数

#	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	西马特罗-D7	227.00	209.15	-30	-9	-22
2	西布特罗-D9	243.00	151.05	-30	-18	-28
3	沙丁胺醇-D3	243.00	151.20	-29	-17	-27
4	克伦普罗-D7	270.00	252.05	-30	-10	-28
5	克伦特罗-D9	285.80	204.00	-13	-16	-21
6	马布特罗-D9	320.00	238.00	-30	-18	-25
7	马喷特罗-D11	336.00	238.00	-30	-17	-25
8	莱克多巴胺-D3	305.10	287.00	-21	-12	-20
9	沙美特罗-D3	419.00	401.25	-30	-15	-29

2. 结果与讨论

以表 1 所示的液相梯度时间程序对流动相体系进行测试。

表 1 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.51	Pumps	Pump B Conc.	5
4.50	Controller	Stop	

通过方法开发系统 Method Scouting Solution 软件自动生成批处理表（图 2）在 3 种 A 相和 2 种 B 相间进行选择，组合成 3×2 的方式，各种组合方式下化合物质谱响应离子流图（MRM）如图 3 所示。

Analysis	Vial#	Tray	Inj. V	AutoPur	Sample Name	PumpA	PumpB	Column Position	Run Mode	Data File
1	-1	1	2	✓		C:2 mM NH4Ac			DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#_001.lcd
2	-1	1	2	✓		B:0.1%FA			DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#_002.lcd
3	-1	1	2	✓			B:MeOH		DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#_003.lcd
4	-1	1	2	✓		A:Water	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#004.lcd
5	1	1	2	✓	Beta agonist	A:Water	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II Water_ACN_15_90_005.lcd
6	-1	1	2	✓		A:Water	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#006.lcd
7	1	1	2	✓	Beta agonist	A:Water	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II Water_MeOH_15_90_007.lcd
8	-1	1	2	✓		B:0.1%FA	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#008.lcd
9	1	1	2	✓	Beta agonist	B:0.1%FA	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II 0.1%FA_ACN_15_90_009.lcd
10	-1	1	2	✓		B:0.1%FA	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#010.lcd
11	1	1	2	✓	Beta agonist	B:0.1%FA	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II 0.1%FA_MeOH_15_90_011.lcd
12	-1	1	2	✓		C:2 mM NH4Ac	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#012.lcd
13	1	1	2	✓	Beta agonist	C:2 mM NH4Ac	A:ACN	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II 2 mM NH4Ac_ACN_15_90_013.lcd
14	-1	1	2	✓		C:2 mM NH4Ac	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquilibData#014.lcd
15	1	1	2	✓	Beta agonist	C:2 mM NH4Ac	B:MeOH	I:XR-ODS II 60C,50MPa	W:3 DL AQ	XR-ODS II 2 mM NH4Ac_MeOH_15_90_015.lcd

图2 自动生成批处理表

批处理表中进样位为“-1”的运行后执行系统中流动相的快速置换和色谱柱的平衡。平衡的方式和时间根据所设定的系统策略及数据库中色谱柱长度和内径等信息而定，批表自动生成，避免人工建立时费时费力，甚至考虑不周引发的方法错误等情况发生。

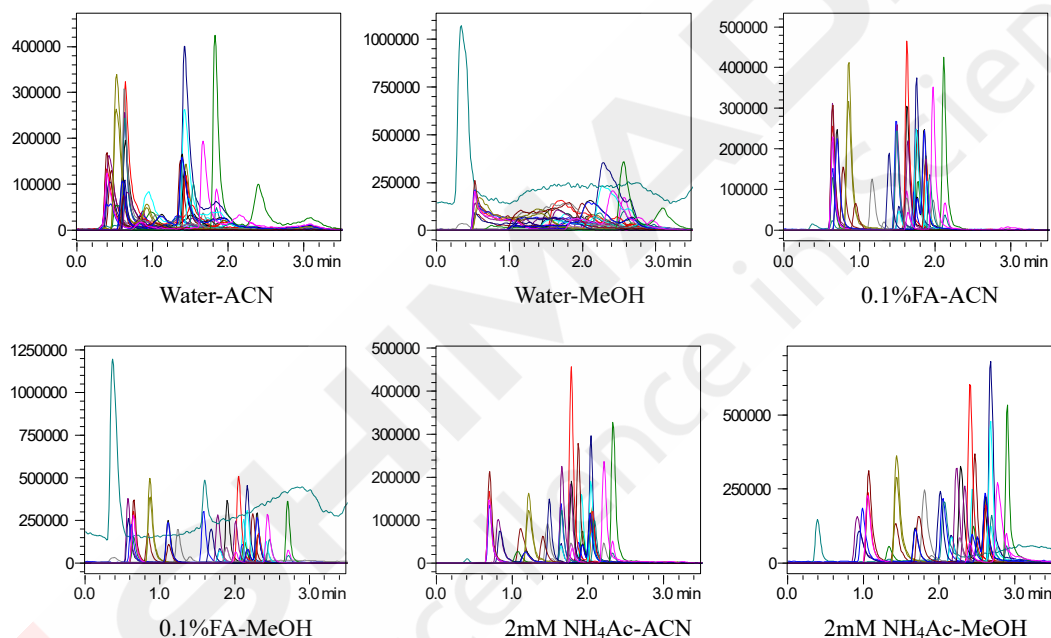


图4 优化UHPLC条件样品分析色谱图

图4是通过方法开发系统进行流动相筛选时采集到的化合物MRM色谱图，Water-ACN、Water-MeOH、0.1%FA-MeOH三种条件由于色谱峰拖尾，灵敏度低等原因，不适合该类样品的分析。综合考虑灵敏度和分离度结果，该样品的分析以2 mM NH₄Ac-MeOH为优。

在以大气压电离源为主的液质联用分析中，流动相的选择和参数条件不仅仅对色谱峰的分度、峰形、对称性等保留行为产生影响，更重要的是往往直接影响化合物在质谱上的响应信号强度，进而影响分析检测的灵敏度，尤其是电喷雾电离源（ESI）的影响更为明显。

表2 液相色谱条件对质谱响应信号的影响

影响因素		主要影响方面
流动相	流动相类型	ESI方式中对离子化效率影响大于APCI
	有机相比比例	保留时间、基质干扰等
	水相pH值	保留时间、离子化效率
	流动相添加剂	峰形、分离度、离子化效率
色谱柱		保留时间、峰形、分离度

流速	保留时间、峰形、分离度、离子化效率
柱温	保留时间、峰形、分离度

3. 结论

本实验使用岛津 HPLC 方法开发系统同 LCMS-8040 联用, 对 32 种 β -受体激动剂样品的 LCMS 方法建立进行优化。通过对 3 种有机相和 2 种水相组成的 6 种流动相组合方式快速筛查, 综合考察质谱响应和分离效果, 确定了对该类化合物分析适合的流动相组成方式, 对进一步优化方法提供帮助。联用方式拓展了方法开发系统的应用领域和效果, 使得对 LCMS 尤其是 ESI 源作为分析条件时质谱条件探索中关键的流动相影响因素的考察变得自动和高效化, 为样品分析或方法开发前期工作赢得时间, 促进整体工作效率的提高。

附表 本实验中所用的 32 种 β -受体激动剂

#	化合物名称		CAS#
	中文名	英文名	
1	西马特罗	Benzonitrile	54239-37-1
2	特布他林	Terbutaline	23031-25-6
3	沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9
4	齐帕特罗	Zilpaterol	117827-79-9
5	麻黄碱	Ephedrine	299-42-3
6	异丙喘宁	Orciprenaline	586-06-1
7	西布特罗	Cimbuterol	54239-39-3
8	非诺特罗	Fenoterol	13392-18-2
9	利托君	Ritodrine	26652-09-5
10	克仑塞罗	Clencyclohexerol	157877-79-7
11	纳多洛尔	Nadolol	42200-33-9
12	克伦普罗	Clenproperol	38339-11-6
13	氯丙那林	Clorprenaline	3811-25-4
14	克伦特罗	Clenbuterol	37148-27-9
15	美托洛尔	Metoprolol	51384-51-1
16	妥布特罗	Tulobuterol	41570-61-0
17	溴布特罗	Brombuterol	41937-02-4
18	马布特罗	Mabuterol	56341-08-3
19	班布特罗	Bambuterol	81732-65-2
20	瑞普特罗	Reproterol	54063-54-6
21	丙卡特罗	Procaterol	72332-33-3
22	克伦异磅特罗	Clenisopenterol	157664-68-1
23	马喷特罗	Mapenterol	54238-51-6
24	克伦潘特	Clenpenterol	37158-47-7
25	莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7
26	苯氧丙酚胺	Isoxsuprin	579-56-6
27	普萘洛尔	Propranolol	318-98-9
28	倍他洛尔	Betaxolol	63659-18-7
29	福莫特罗	Formamide	67346-49-0
30	苯乙醇胺 A	Phenylethanolamine A	暂无
31	沙美特罗	Salmeterol	89365-50-4
32	喷布特罗	Penbutolol	38363-32-5

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容,以本版本为准,资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考,如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 ® 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。