

MethodTransfer 在中药特征图谱 HPLC 与 UHPLC 方法转换中的应用

LC-233

摘要： 本文以赤芍配方颗粒特征图谱分析为例，采用岛津 LabSolutions 软件自带的方法转换利器 MethodTransfer 进行 HPLC 法与 UHPLC 法互相转换，该功能无需经过繁琐的计算即可一键进行方法的快速转换。HPLC 法转换成 UHPLC 法后，赤芍配方颗粒特征图谱分析时长由原来的 60 min 缩短至 16.95 min，分析效率得到明显提高。在 UHPLC 条件下，芍药苷色谱峰的理论塔板数远大于 3000，符合系统适用性要求；空白溶液在各特征峰位置处无明显色谱峰，不干扰特征图谱分析；对照药材参照物溶液连续进样 6 次，各特征峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.026%~0.235% 和 0.272%~0.982% 之间，仪器精密度良好；待测样品中指定特征峰的相对保留时间及相对峰面积均符合《赤芍（芍药）配方颗粒》公示稿标准规定，该 UHPLC 方法可用于赤芍配方颗粒公示稿标准的重现。另外，本实验以特征图谱分析中的赤芍对照药材为考察对象，HPLC 法与 UHPLC 法中指定特征峰相对保留时间和相对峰面积的相对偏差分别在 $\pm 2\%$ 和 $\pm 3\%$ 以内，说明方法转换前后各特征峰的色谱保留行为基本一致。MethodTransfer 可有效地用于 HPLC 法与 UHPLC 法转换，助力中药配方颗粒特征图谱分析。

关键词： 中药配方颗粒 特征图谱 UHPLC HPLC 方法转换

超高效液相色谱 (UHPLC) 与高效液相色谱 (HPLC) 技术具有相同的分离原理，它的理论基础为 VanDeemeter 方程，即填料粒度越小柱效越高，且每种填料粒度尺寸均有自身最佳柱效的流速。相比 HPLC 法，UHPLC 法具有更高的分离度和灵敏度，同时色谱峰容量和分析效率均有显著地提升。

中药具有化学成分复杂，性质差异大，分离难度大等特点，给中药分析带来巨大的挑战。目前，UHPLC

技术在中药的化学成分识别、指纹图谱及代谢组学等分析领域逐步得到了应用，极大的促进了中药研究领域的发展。中药配方颗粒试点统一标准公示稿中特征图谱分析 UHPLC 和 HPLC 方法均有被采用。本文以赤芍配方颗粒为例，利用岛津 Method Transfer 方法转换软件快速将 HPLC 法转换成 UHPLC 法，转换前后特征图谱分析结果均符合标准要求，供相关检验人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验 HPLC 方法采用岛津 Nexera LC-40 XR 液相色谱仪，具体配置见应用报告【赤芍配方颗粒特征图谱分析及结果快速评价】

本实验 UHPLC 方法采用岛津 Nexera LC-40 XS 液相色谱仪，具体配置为：

系统控制器：CBM-40 Lite

脱气机：DGU-405

输液泵：LC-40B XS

自动进样器：SIL-40C XS

柱温箱：CTO-40S

检测器：SPD-40

色谱工作站：LabSolutions Ver. 6.92

1.2 分析条件

HPLC 法条件见应用报告【赤芍配方颗粒特征图谱分析及结果快速评价】

UHPLC 法条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱（100 mm× 2.1 mm I.D., 2 μm）

（P/N: 227-30001-04, 岛津（上海）实验器材有限公司）

流动相：A: 0.05% 磷酸水溶液；B: 乙腈

流速：0.3 mL/min 柱温：30℃

检测波长：0-7.23 min 210 nm; 7.23-16.95 min 230 nm 进样体积：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 5%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.28	Pumps	Pump B Conc.	15
7.23	Pumps	Pump B Conc.	15
9.73	Pumps	Pump B Conc.	18
10.01	Pumps	Pump B Conc.	20
12.51	Pumps	Pump B Conc.	20
12.78	Pumps	Pump B Conc.	45
15.56	Pumps	Pump B Conc.	47
15.84	Pumps	Pump B Conc.	5
16.95	Controller	Stop	

■ 样品前处理

对照品、对照药材参照物溶液及供试品溶液：同应用报告【赤芍配方颗粒特征图谱分析及结果快速评价】

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

按照 1.2 中色谱分析条件，取空白溶剂、对照品参照物溶液、对照药材参照物溶液和供试品溶液分别上机分析，空白溶剂色谱图如图 1，目标物出峰处无干扰，其余各色谱图见图 2-4。

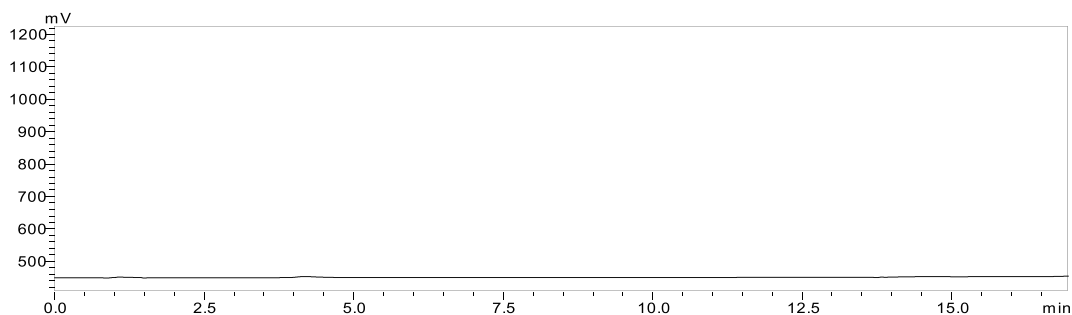


图 1 空白溶剂色谱图

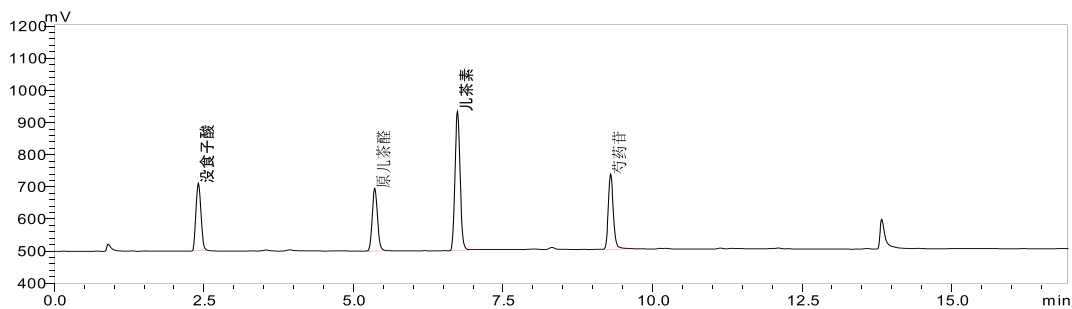


图 2 对照品参照物溶液色谱图

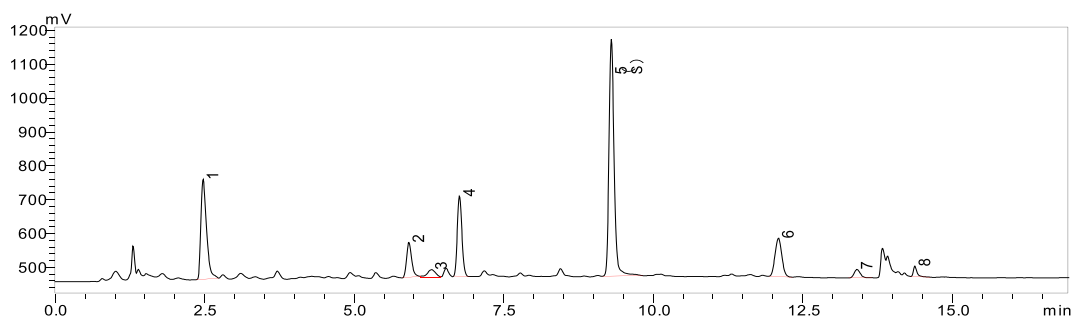


图 3 对照药材参照物溶液色谱图

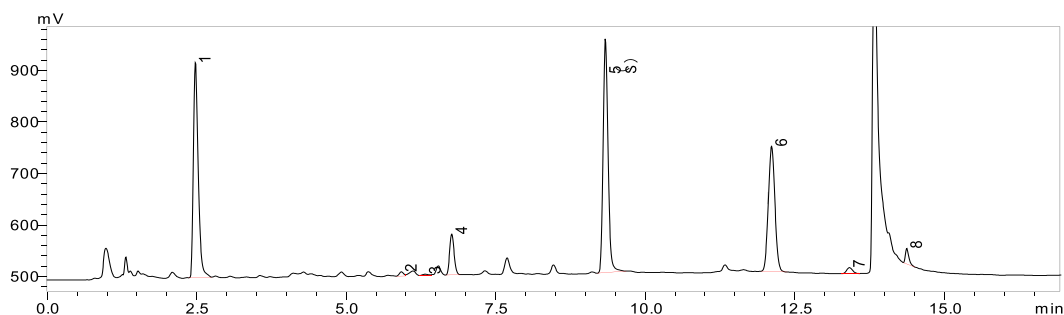


图 4 供试品溶液色谱图

峰 1: 没食子酸 峰 4: 儿茶素 峰 5 (S): 芍药苷 峰 8: 苯甲酰芍药苷

3.2 系统适用性考察对比结果

以芍药苷特征峰的理论塔板数为考察指标，系统适用性结果如下表所示：

表 1 梯度洗脱时间程序

名称	对照品参照物溶液	对照药材参照物溶液	供试品溶液
理论塔板数	50927	51449	51624

HPLC 法转换成 UHPLC 法后，各溶液中芍药苷的理论塔板数均远大于 3000，符合标准规定。

3.3 精密度实验

取对照药材参照物溶液连续进样 6 次，考察仪器精密度。8 个特征峰的保留时间和峰面积 RSD 值分别在 0.026%~0.235% 和 0.272%~0.982% 之间，表明仪器精密度良好，详见图 5 和表 3~4。

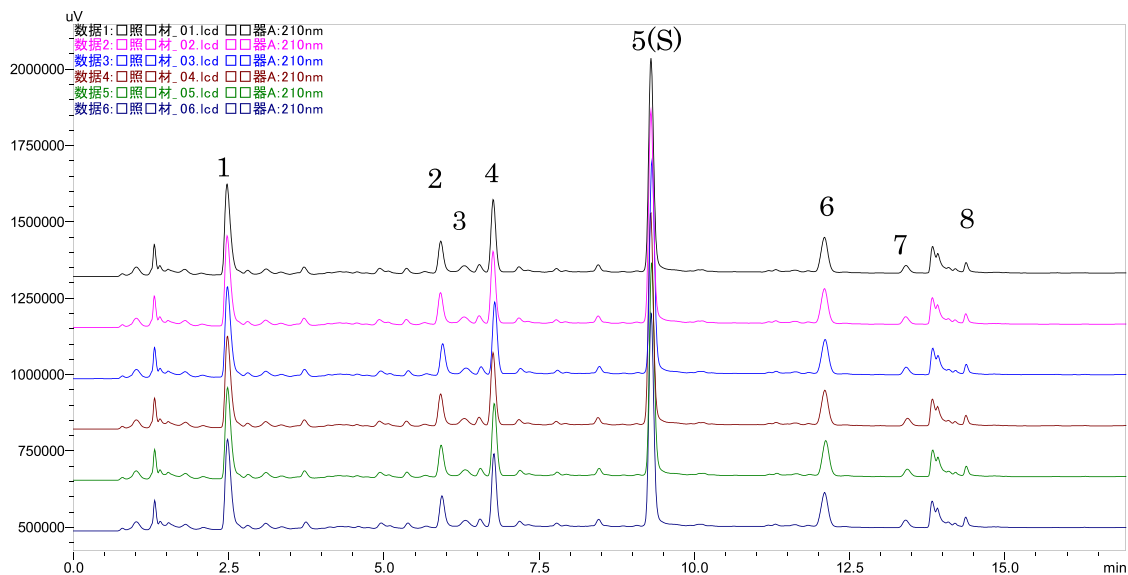


图 5 对照药材参照物溶液精密度测试色谱图 (n=6)

表 3 对照药材参照物溶液精密度测试结果 - 保留时间 (n=6)

保留时间 (min)	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
1	2.474	5.915	6.294	6.761	9.301	12.095	13.409	14.376
2	2.476	5.912	6.292	6.759	9.300	12.096	13.405	14.371
3	2.480	5.946	6.323	6.785	9.316	12.106	13.412	14.378
4	2.481	5.913	6.293	6.758	9.297	12.102	13.435	14.373
5	2.483	5.922	6.310	6.778	9.312	12.117	13.430	14.379
6	2.482	5.935	6.312	6.772	9.303	12.098	13.403	14.370
RSD(%)	0.145	0.235	0.204	0.166	0.081	0.068	0.100	0.026

表 4 对照药材参照物溶液精密度测试结果 - 峰面积 (n=6)

次数	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
1	1936362	596577	207819	1268727	4162081	891690	173850	122768
2	1929724	593973	205056	1254772	4135958	885902	172573	122766
3	1937239	603092	205071	1260587	4132382	889534	172464	122031
4	1936610	596346	201504	1255153	4127762	888446	171213	123307
5	1944684	598017	205266	1268531	4124309	890719	171705	123459
6	1942521	596594	205161	1273478	4137090	884479	171868	121927
RSD(%)	0.272	0.513	0.982	0.620	0.324	0.315	0.534	0.515

3.4 供试品特征图谱分析结果

采用岛津 LabSolutions CS 网络化软件 Multi-Data Report 功能对赤芍配方颗粒特征图谱分析结果进行快速评价, 结果显示: HPLC 法转换成 UHPLC 法后, 特征峰 3、6、7、8 的相对保留时间及峰 7、8 的相对峰面积均符合标准规定, 与 HPLC 法特征图谱分析结论一致。

供试品特征图谱分析结果:							
峰号	保留时间	峰面积	相对保留时间规定值	相对峰面积规定值	相对保留时间	相对峰面积	结论
1	2.478	2351468	—	—	0.265	0.901	—
2	5.922	40942	—	—	0.634	0.016	—
3	6.322	19333	0.64±8%	—	0.677	0.007	符合规定
4	6.765	412048	—	—	0.725	0.158	—
5 (S)	9.335	2611278	—	—	1.000	1.000	—
6	12.115	1871284	1.36±8%	—	1.298	0.717	符合规定
7	13.416	80078	1.46±8%	≥0.020	1.437	0.031	符合规定
8	14.374	119128	1.67±8%	≥0.020	1.540	0.046	符合规定

图 6 供试品特征图谱分析结果评价

3.5 方法转换对比结果

对于中药配方颗粒特征图谱分析，HPLC 和 UHPLC 方法转换后最关注的指标是特征峰的出峰顺序、相对保留时间和相对峰面积的变化。以对照药材为例，方法转换前后 8 个特征峰的出峰顺序一致，如图 7 所示。各特征峰的相对保留时间和相对峰面积对比结果如表 5 所示。

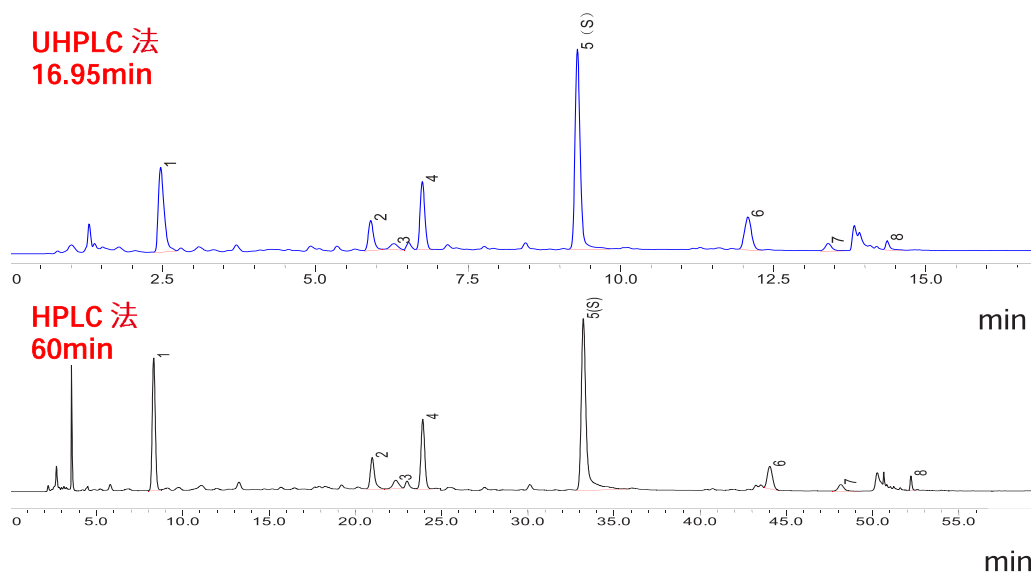


图 7 方法转换前后对照药材参照物溶液色谱图

表 5 方法转换前后相对保留时间和相对峰面积对比结果

峰号	相对保留时间		相对偏差 (%)	相对峰面积		相对偏差 (%)
	HPLC	UHPLC		HPLC	UHPLC	
1	0.251	0.266	-5.976	0.466	0.465	0.215
2	0.632	0.636	-0.633	0.152	0.143	5.921
3	0.673	0.677	-0.594	0.054	0.050	7.407
4	0.720	0.727	-0.972	0.304	0.305	-0.329
5 (S)	1.000	1.000	0	1.000	1.000	0
6	1.325	1.300	1.887	0.131	0.214	-63.359
7	1.449	1.442	0.483	0.043	0.042	2.326
8	1.571	1.546	1.591	0.029	0.029	0

由表 5 结果可知，HPLC 法转换成 UHPLC 法，赤芍公示稿标准中规定的峰 3、6、7、8 色谱峰相对保留时间的相对偏差在 $\pm 2\%$ 以内，峰 7 和峰 8 相对峰面积的相对偏差在 $\pm 3\%$ 以内。所有特征峰相对保留时间的相对偏差在 $\pm 6\%$ 以内，除峰 6 外，其余特征峰相对峰面积的相对偏差均在 $\pm 8\%$ 以内。采用 HPLC 法分析时，峰 6 与相邻色谱峰未进行完全分离，相邻峰对峰 6 的积分产生了影响，而在 UHPLC 法条件下，峰 6 与相邻色谱峰分离完全，故峰 6 的相对峰面积明显高于 HPLC 法。

3.6 讨论

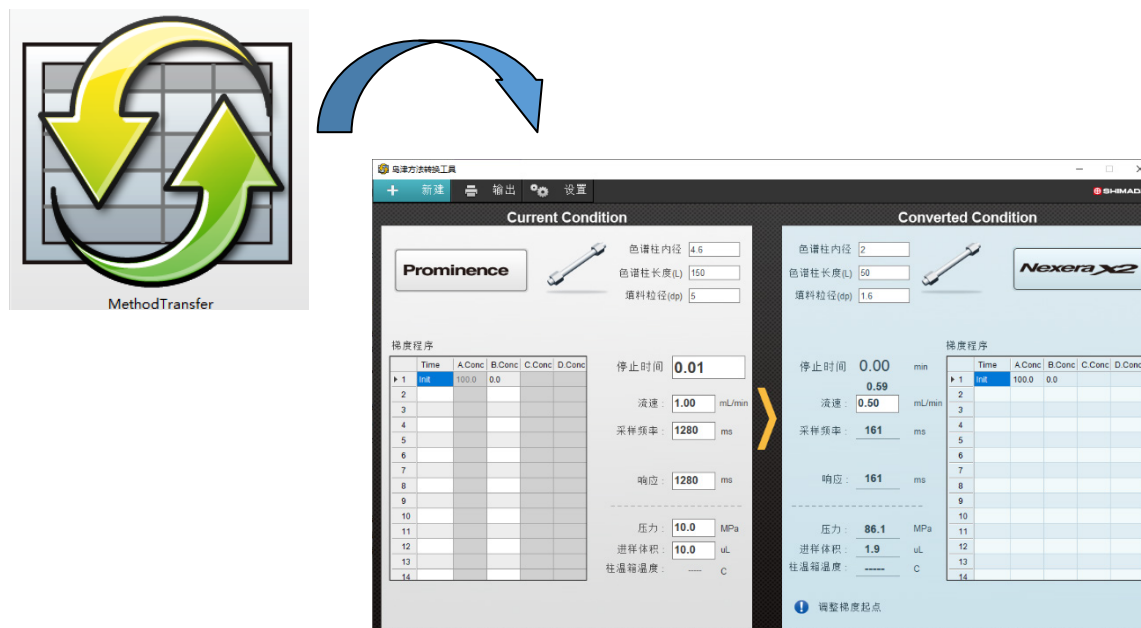
3.6.1 色谱柱的选择

在进行 HPLC 和 UHPLC 方法转换之前需优先选择好色谱柱。不同的色谱柱对化合物的保留、分离及出峰顺序的影响不同，为保证方法转换前后色谱行为的一致，最好采用同品牌同填料不同粒径的色谱柱，如本实验中均采用岛津 Shim-pack GIST C18 系列色谱柱。为使方法转换前后柱效和分离的相当，柱长 (L) / 粒径 (dp) 应保持相当，如本实验 HPLC 方法采用 250 mm, 5 μm 的色谱柱 (L/dp=50)，UHPLC 法采用 100 mm, 2 μm 的色谱柱 (L/dp=50)，二者的 L/dp 一致。实验中如分离效果不佳，也可采用较高 L/dp 值的色谱柱提升分离效果。

3.6.2 方法的快速转换

HPLC 和 UHPLC 方法转换需要调整的参数主要有流速、进样体积和梯度洗脱程序。对于等度洗脱分析，只需要调整流速和进样体积即可。若要保持转换前后线速度一致，则依据流速与柱内径的平方成比例进行计算，实际使用时可根据系统压力和分析时长对流速进行调整。若保持待测样品浓度不变，进样体积与色谱柱柱体积分成正比，实际使用时也可根据灵敏度适当调整进样体积。对于梯度洗脱分析，由于采用不同规格的色谱柱，为保证洗脱体积倍数相同，需调整梯度洗脱程序，不同系统的延迟体积可能不同，在进行方法转换时需考虑此因素。

岛津 LabSolutions 软件自带方法转换利器 MethodTransfer，可轻松实现 HPLC 和 UHPLC 方法的互换。只需在 MethodTransfer 中选择好方法转换前后的液相色谱系统并输入相应的色谱柱信息，在左侧界面输入当前方法的梯度洗脱程序、停止时间、流速及进样体积等，点击转换键，软件则自动计算转换后对应的液相条件参数，无需实验人员进行繁琐的计算。若方法转换前后系统的延迟体积不同，可在软件中设置调整梯度起点。



■ 结论

本文以赤芍配方颗粒特征图谱分析为例，采用岛津 LabSolutions 软件自带的方法转换利器 MethodTransfer 进行 HPLC 法与 UHPLC 法互相转换，该功能无需经过繁琐的计算即可一键进行方法的快速转换。HPLC 法转换成 UHPLC 法后，赤芍配方颗粒特征图谱分析时长由原来的 60 min 缩短至 16.95 min，分析效率得到明显提高，且方法的专属性、系统适用性、精密度及待测样品的分析结果均符合标准规定，该 UHPLC 方法可用于《赤芍（芍药）配方颗粒》公示稿标准的重现。另外，本实验以特征图谱分析中的赤芍对照药材为考察对象，HPLC 法与 UHPLC 法中指定特征峰相对保留时间和相对峰面积的相对偏差分别在 $\pm 2\%$ 和 $\pm 3\%$ 以内，即方法转换前后各特征峰的色谱保留行为基本一致，MethodTransfer 可有效地用于 HPLC 法与 UHPLC 法转换，助力中药配方颗粒特征图谱分析。

岛津应用云

