

Nexera LC-40 应用文集

——中药、化学药、化妆品



前言

随着全球经济和科技的发展，医药、生命科学、食品、农业、化工、环境等多个行业所制定的国家标准涉及分析物质的范围逐渐加大，定性、定量分析等检测要求也不断提高。在这种环境下，Nexera LC-40 系列液相色谱仪具有工作自动化、高通量、高灵敏度、极低残留、分析速度快、良好的重复性和线性等特点，在检测工作中优势明显。岛津长久以来一直致力于提高 HPLC 的分析性能，同时，岛津认识到，整体效率不仅取决于某一台仪器的性能，更需要统筹管理实验室内的所有设备。如今，在这个将人工智能整合到仪器设备中的时代，岛津解决方案切实实现了真正意义上自动检测。此外，通过物联网（IoT）与仪器设备进行网络化集成，将使实验室管理变得更加直观，仪器状态确认更加简便，资源配置得以更加优化。

岛津公司作为全球著名的分析仪器综合生产厂商，进入中国已有 30 多年，始终以提供“科学解决方案”为使命，努力实践着“以科学技术为社会做贡献”的公司宗旨，不断引领突破性创新、满足各检测行业的技术需求。岛津公司自 1969 年推出第一台 GPC 色谱分析仪起，后相继推出 LC-20A、LC-30A、LC-2030/2040 等多款仪器类型，这些改变使得色谱数据质量不断提高，并对各个行业领域的液相色谱分析带来更有价值的影响。经过近半个世纪的 LC 技术经验沉淀，全新的 Nexera 系列 HPLC 与人工智能和物联网完美结合，将在智能化、高效化和自动化领域引领全新的行业标准。其可在分析过程中通过智能设备进行远程监控；LabSolutions™ 通过历史数据判断色谱柱损耗程度。新增了分析过程中自动诊断以及自动恢复功能；储液盘内置传感器实时监测流动相余量。进样速度较之前产品提升一倍，缩短多样品分析进程时间；微量进样时具有高重复性和超低交叉污染；新增自动样品前处理功能，如样品稀释、内标添加、衍生化反应等，从而减少劳动强度。紫外可见光检测器和二极管阵列检测器具备三重控温技术，提高设备稳定性，获得稳定基线。

Nexera LC-40 系列液相色谱仪具备卓越的仪器性能，岛津中国分析中心现已利用此款液相色谱仪进行了医药行业领域的应用数据开发，形成《Nexera LC-40 应用文集》。本应用文集以医药行业应用为主，同时涵盖了其他行业应用，共分为四章，分别为中药行业、化药行业、化妆品行业、Nexera LC-40 全新功能，供医药、化妆品等行业从业人员参考。

岛津企业管理（中国）有限公司

分析中心

目 录

前 言.....	II
快速索引.....	IV
第一章 Nexera LC-40 简介.....	1
第二章 Nexera LC-40 在中药行业中的应用.....	8
第一节 有效成分分析.....	9
Nexera LC-40 测定护肝丸有效成分含量.....	9
Nexera LC-40 测定逍遥丸中芍药苷的含量.....	14
Nexera LC-40 测定野生甘草中甘草苷和甘草酸含量.....	20
Nexera LC-40 快速测定中药制剂中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1.....	25
Nexera LC-40 智能自动化启动功能在快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量中的应用.....	30
第二节 指纹图谱分析.....	36
Nexera LC-40 应用于复方丹参滴丸指纹图谱的分析.....	36
Nexera LC-40 应用于银杏叶提取物指纹图谱的分析.....	41
第三章 Nexera LC-40 在化药行业中的应用.....	47
第一节 主成分分析.....	48
Nexera LC-40 测定氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量.....	48
Nexera LC-40 测定复方氯唑沙宗片中有效成分的含量.....	53
Nexera LC-40 测定复方愈酚喷托那敏糖浆有效成分含量.....	59
第二节 有关物质分析.....	66
Nexera LC-40 分析盐酸多西环素中的有关物质.....	66
Nexera LC-40 测定阿托伐他汀钙片的有关物质.....	71
Nexera LC-40 结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质.....	77
高效液相色谱法测定多西他赛注射液有关物质.....	85
第三节 遗传毒性杂质分析.....	89
Nexera LC-40 分析盐酸普拉格雷中的遗传毒性杂质对甲苯磺酸乙酯.....	89
高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测.....	96
第四章 Nexera LC-40 在化妆品行业中的应用.....	101
Nexera LC-40 分析化妆品中西咪替丁成分.....	102
第五章 Nexera LC-40 全新功能.....	108
Co-injection 用于 HPLC 分析中溶剂效应的去除应用.....	109
SPD-M40 智能峰解卷积功能 (i-PDeA) 及其应用.....	114

快速索引

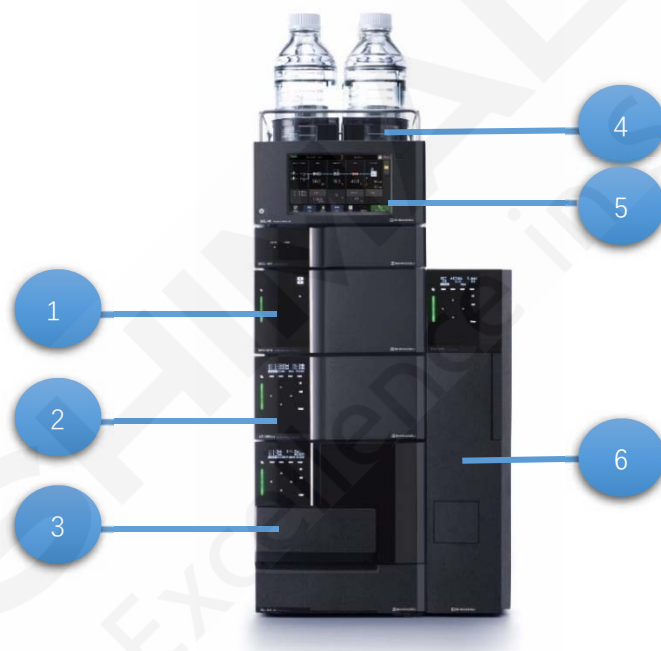
LC-40 单元	特性及功能	岛津应用案例	快速索引
流动相输送单元 LC-40 系列	<p>自动诊断以及自动恢复功能； 送液更加稳定； 节约空间的二元输液泵一体化设计。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 测定护肝丸有效成分含量 2、Nexera LC-40 测定野生甘草中甘草苷和甘草酸含量 3、Nexera LC-40 应用于银杏叶提取物指纹图谱的分析 4、高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测 	<p>P2 P13 P32 P86</p>
	<p>Flow pilot 有效延长色谱柱使用寿命，避免平衡色谱柱时压力瞬间升高对色谱柱造成损害。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 智能自动化启动功能在快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量中的应用 错误!未定义书签。 2、Nexera LC-40 应用于复方丹参滴丸指纹图谱的分析 3、Nexera LC-40 测定复方愈酚喷托那敏糖浆有效成分含量 4、Nexera LC-40 测定阿托伐他汀钙片的有关物质 	<p>P22 P28 P49 P61</p>
自动进样器 SIL-40 系列	<p>进样速度显著提高，缩短多样品分析进程时间； 极低的交叉污染及良好的重复性。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 测定护肝丸有效成分含量 2、Nexera LC-40 应用于银杏叶提取物指纹图谱的分析 	<p>P2 P32</p>
	<p>具备多种预处理程序，可实现在线稀释样品溶液、在线柱前衍生、Co-injection、重叠进样等多项功能。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 测定复方氯唑沙宗片中有效成分的含量 2、Nexera LC-40 结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质 3、Nexera LC-40 分析化妆品中西咪替丁成分 4、Co-injection 用于 HPLC 分析中溶剂效应的去除应用 	<p>P43 P67 P92 P99</p>
二极管阵列 检测器 SPD-M40	<p>通过“三重控温技术”分别对流通池、光源和光学系统的温度进行控制，减少外部温度变化对系统的影响，显著降低基线波动； 通过在软件中智能峰解卷积 (i-PDeA) 功能，PDA 获得的 UV 光谱可通过导数的方式区别共流出成分，使得未分离的组分在不同的通道得以区分。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 测定野生甘草中甘草苷和甘草酸含量 2、Nexera LC-40 智能自动化启动功能在快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量中的应用 3、Nexera LC-40 测定氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量 4、Nexera LC-40 分析盐酸普拉格雷中的遗传毒性杂质对甲苯磺酸乙酯 5、高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测 6、SPD-M40 智能峰解卷积功能 (i-PDeA) 及其应用 	<p>P13 P22 P38 P79 P86 P103</p>
	<p>UV cut-of 功能可抑制低波长紫外光照射到检测池，从而避免样品溶液受到低波长紫外光照射后发生降解。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、Nexera LC-40 测定逍遥丸中芍药苷的含量 	<p>P7</p>


红色字体标注为 Nexera LC-40 新功能

第一章 Nexera LC-40 简介


岛津长久以来一直致力于提高 HPLC 的分析性能，同时，岛津认识到，整体效率不仅取决于某一台仪器的性能，更需要统筹管理实验室内的所有设备。如今，在这个将人工智能整合到仪器设备中的时代，岛津解决方案切实实现了真正意义上自动检测。此外，通过物联网（IoT）与仪器设备进行网络化集成，将使实验室管理变得更加直观，仪器状态确认更加简便，资源配置得以更加优化。

基于近半个世纪的 LC 技术经验沉淀，全新的 Nexera 系列 HPLC 与人工智能和物联网完美结合，将在智能化、高效化和自动化领域引领全新的行业标准。




 UV-VIS 紫外可见光检测器 SPD-40/SPD-40V、二极管阵列检测器 SPD-M40


- 三重控温技术提高设备稳定性。
- 分析数据与消耗品信息相关联，以确保可追溯性。

 流动相输送单元LC-40系列


- 在分析过程中具备自动诊断以及自动恢复功能。
- 更加节约空间的二元输液泵一体化设计。

 自动进样器SIL-40系列/PLATE CHANGER


- 进样速度较之前产品提升一倍，缩短多样品分析进程时间。
- 微量进样时保证高重复性和超低交叉污染。
- 自动样品前处理功能，如样品稀释、内标添加、衍生化反应等，从而减少劳动强度。

 流动相精灵 MPM-40

- 储液盘内置传感器实时监测流动相余量。

 系统控制器 SCL-40, CBM-40

- 可通过智能设备进行远程监控。
- 可通过触摸面板轻松进行Purge与基线检查等操作。

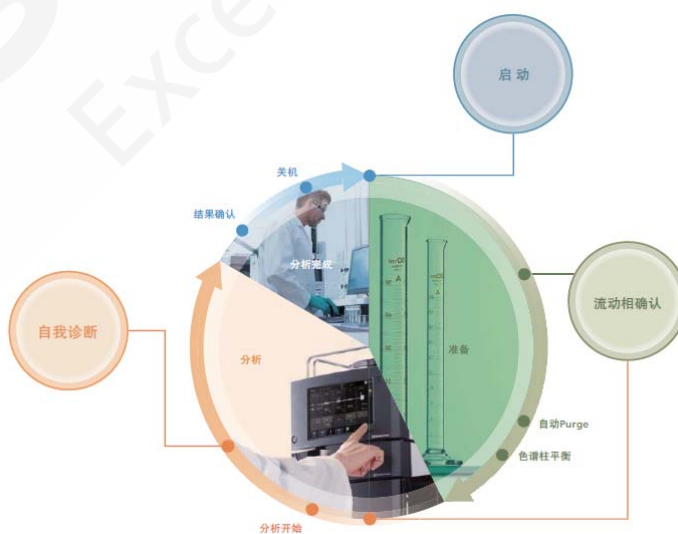
 色谱柱温箱 CTO-40 系列

- 自动生成、记录进样次数、分析压力等色谱柱信息。
- 柱连接更加简单方便，特有接口设计防止色谱峰扩散。
- LabSolutions™ 通过历史数据判断色谱柱损耗程度。

实现从启动到关机全程无人值守操作

Nexera 可以在指定的时间启动，如此可以提前完成自动 Purge、系统平衡和基线检查，并在您到达实验室后立即进行分析。此外，系统可以通过预先设置，实现从启动到运行直至关机全过程无人值守、无需干预。

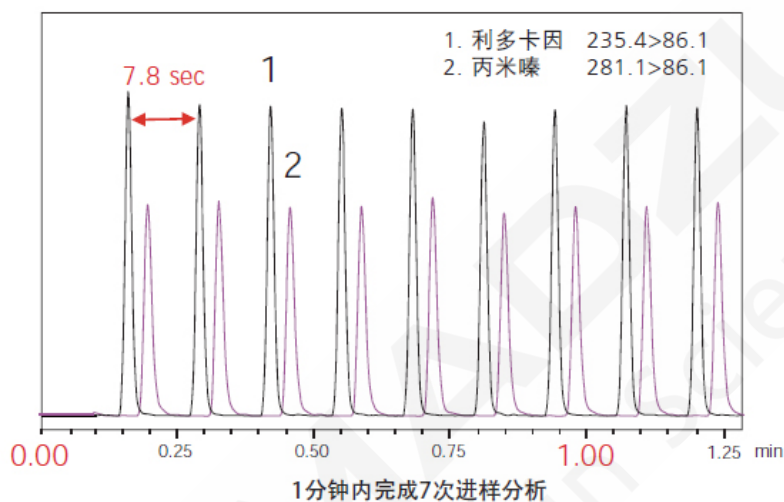
可以通过智能设备在任何位置查看多个系统的工作状态、预测分析完成时间。这些功能不需要任何特殊的软件。



工作自动化，通量最大化

超快速分析周期

SIL-40 自动进样器进样循环时间仅需 7.8 秒，进样速度较之前有显著提高。此外，配合使用 Plate Changers 可实现 44 块 MTP 板的连续分析。如此，显著提高了分析通量。



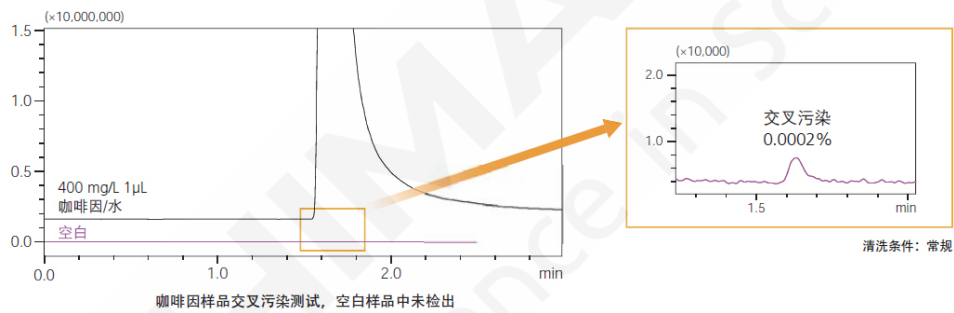
上万个样本的连续、自动分析

结合 SIL-40 系列自动进样器与 Plate Changers，可以在温度控制条件下对一万六千余个样品进行不间断的分析。每个 Plate Changer 中最多可放置 14 个 MTP 板或 7 个 1.5 mL 样品瓶托盘。得益于自动进样器卓越的温度控制，还可实现在分析过程中更换或追加额外的样品瓶或 MTP 板。



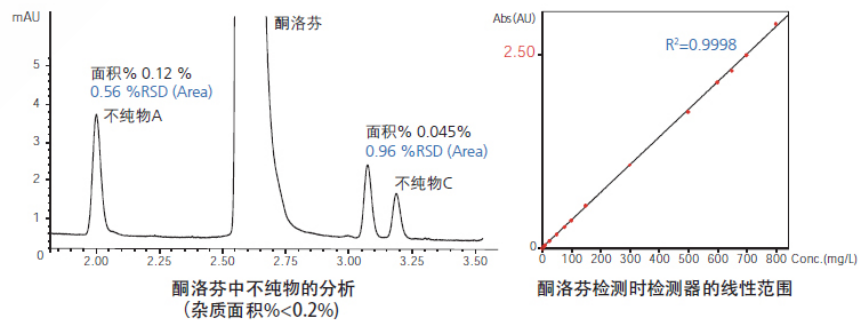
极低的交叉污染

即使是在高灵敏度的 LC-MS/MS 上，Nexera 也同样表现出超低的交叉污染。因此，可以通过减少清洗时间，而缩短了整体分析时间。



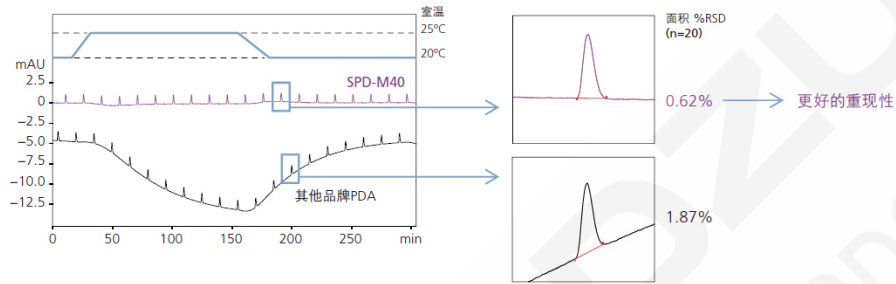
不纯物质的高灵敏分析

二极管阵列检测器 SPD-M40 具有极高的灵敏度和卓越的线性范围 (2.5 AU)。因此，即使在高浓度的样品中，也能定量检测痕量的杂质组分。安装在检测器中的紫外截止滤波器可避免样品因紫外线而降解，有助于在低浓度下保持良好的线性。



稳定的基线

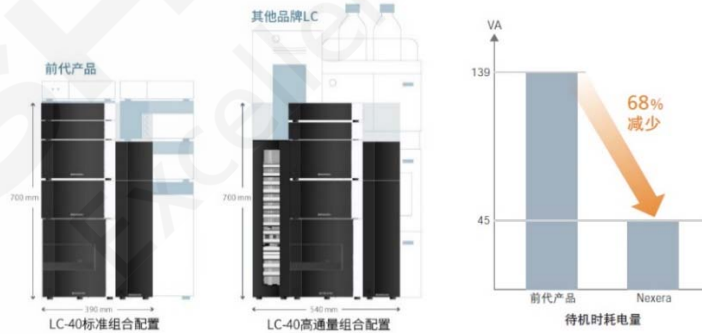
基线波动会影响峰面积的计算，进而降低定量结果的准确性。SPD-M40 通过“高级光学系统控温”功能可分别对流通池、光源和光学系统的温度进行控制，以减少外部温度变化对系统的影响。与之前的产品相比，噪声和漂移有了明显的优化。



紧凑型和创新性

基于空间节约的设计

全新 Nexera 采用更紧凑的设计，其尺寸仅为前代产品的三分之二，进一步释放了空间。



基于能源节约的设计

在待机状态下，全新的 Nexera 耗电量减少了 68% 以上，大大降低了运行成本，并促进实验室环境更加友好。

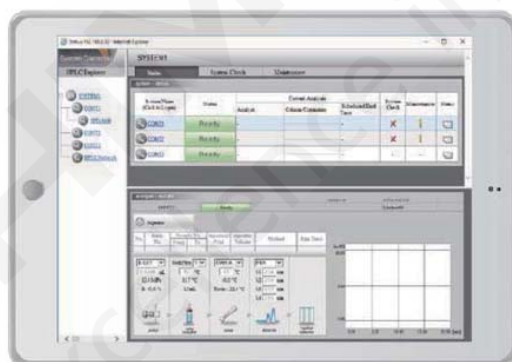
远程监控以及实验室一体化管理

在线确认色谱图

无需返回实验室，即可通过智能设备访问 Web 浏览器，在线查看诸如柱温箱温度和输液泵参数等信息，从而确认仪器的工作状态，同时也可以远程实时监控色谱图。此外，SHIMADZU LabTotal™智能服务网络（选配）还可将仪器的运行参数保存在云端服务器中，诸如"报错信息"的发生时间、报错内容等，并可通过电子邮件发送通知，方便用户及时掌握仪器状态。

远程维护确保仪器稳定运行

SHIMADZU LabTotal™智能服务网络可以统筹管理每个模块的消耗品使用情况、追溯信息、各类日志和报错详情。云端系统能够智能化建议耗材的更换时间，仪器使用过程中发生的问题也可以由岛津售后工程师远程诊断。这将意味着每套 LC 系统均可以保持在最佳工作状态，并且设备管理成本也将随之降低。



确认LC系统的工作状态

选择仪器



实时监测当前采集的色谱图



仪器月度运行状态一览

进一步放大可以查看每个仪器的日常运转状态



第二章 Nexera LC-40 在中药行业中的应用



中药是指在中医药理论指导下使用的药用物质及其制剂，包括中药材、中药饮片和中成药等。在药物疗效上，中药的药效及治疗周期长，但是副作用小、治标治本，克服了西药副作用大和易反弹复发的缺陷。由于中西医用药机理、东西方文化背景不同，并且存在着显著的差别。因此，中药难以进入国际主流市场，造成现阶段中药产业出口比例较低的情况。中药行业的发展主要取决于国内市场的需求。

中药来源广泛、品种繁多、成分复杂，中药材在保管过程中因采取措施不当、或者在药材的生长加工过程中药物残留，重金属含量增高等因素，都可能导致药材的变质、发霉。药材粉末直接入药的制剂，若投料前挑拣清洗不净，外来的无机杂质有可能被带到制剂内，直接影响制剂的质量。中药材的真假、质量的好坏直接影响临床应用的效果和患者的生命安全，所以，对中药材的检测有着十分重要的意义。

在中药的检测中，仪器分析方法因其准确、高效的特点，已成为药检工作者洞察药品内在质量的眼睛。常用的仪器分析方法有：光谱法、色谱法、色谱-质谱联用技术等。其中，高效液相色谱法目前广泛应用于中药材和中成药的质量分析，是中药含量测定的首选方法。岛津 Nexera LC-40 系统具有分离效率高、选择性好、分析速度快、灵敏度高、操作自动化及应用广泛的特点，能够完全满足中药检测分析。本章内容主要介绍岛津 Nexera LC-40 对中药中的有效成分分析及指纹图谱分析，充分展示仪器性能优势及特点，供中药行业从业人员参考。

第一节 有效成分分析

Nexera LC-40 测定护肝丸有效成分含量

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了护肝丸有效成分含量的测定方法。方法采用 1.8 μm 填料色谱柱进行分离，取得了良好的分离效果。连续 6 针进样，五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.02%~0.12%和 0.08%~0.17%之间，表明仪器精密度良好。按五味子乙素峰计理论塔板数为 68692，满足药典中不应低于 15000 的要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定护肝丸中有效成分的含量。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 护肝丸 五味子

护肝丸由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉、绿豆制成，褐色至深褐色丸，味苦，涩。具有疏肝理气，健脾消食的功效。具有降低转氨酶作用。用于慢性肝炎及早期肝硬化。

《中国药典》2015年版中规定，使用高效液相色谱法对其有效成分含量进行测定，每1g成品中含五味子以五味子醇甲 ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$)计，不得少于0.40 mg；以五味子甲素 ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$)计，不得少于70 μg ；以五味子乙素 ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$)

计，不得少于0.20 mg；理论塔板数按五味子乙素峰计算应不低于15000。其中，五味子甲素和五味子乙素与杂质较难分离，常规HPLC法往往需要较长的分析时长来达到令人满意的分离度，却极大地降低了分析效率。本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪，以1.8 μm 填料色谱柱进行分离，建立了护肝丸有效成分含量的测定方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40BXR 输送泵，SIL-40CXR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SPD-M40A 检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱：UHPLC C18 色谱柱 (2.1 mm i.d. \times 100 mm L, 1.8 μm)

流动相：A, 水； B, 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：45 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：250 nm

进样体积：2 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相起始浓度为20%，时间程序如表1所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	45
15.00	Pumps	Pump B Conc.	80
18.00	Pumps	Pump B Conc.	80
18.10	Pumps	Pump B Conc.	45
22.00	Controller	Stop	

2. 样品前处理

对照品溶液制备：取五味子醇甲对照品、五味子甲素对照品和五味子乙素对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1 mL含五味子醇甲80 μ g、五味子甲素20 μ g、五味子乙素50 μ g的混合溶液，即得。
(参照药典)

供试品溶液制备：取本品适量，粉碎，研匀，取约1.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入水饱和的乙酸乙酯25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率500 W，频率60 kHz）30分钟，放冷，再称定重量，用乙酸乙酯补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液10 mL，低温回收溶剂至干，残渣加甲醇溶解，转移至5 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，准备上机。（参照药典）

3. 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图

按照1.2中分析条件，将2中配制的对照品溶液上机分析，色谱图如图1所示。《中国药典》要求理论塔板数按五味子乙素峰计算应不低于15000，本实验结果五味子乙素理论塔板数为68692，完全满足要求。

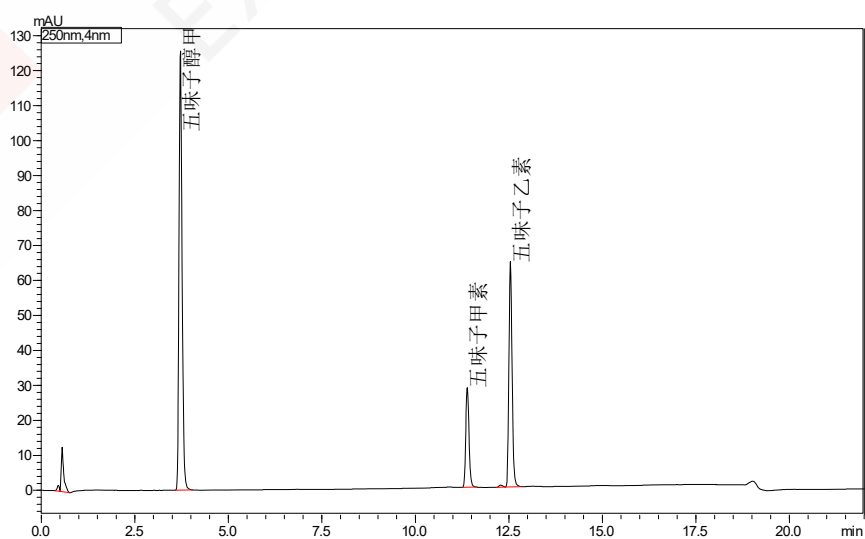


图 1. 对照品溶液色谱图

3.2 精密度实验

将配制得到的对照品溶液连续进样6次，考察仪器精密度。详见图2和表2。

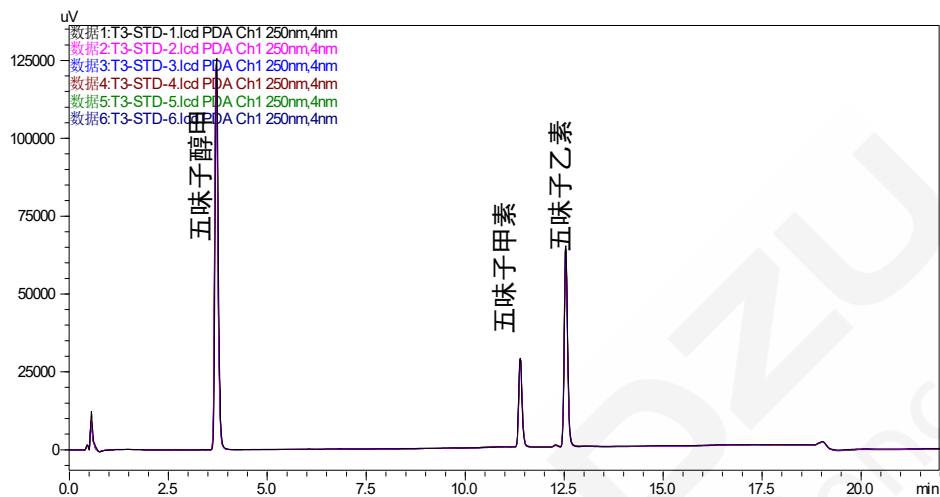


图 2. 对照品溶液 6 针重复性色谱图

表 2. 对照品溶液重复性结果

	五味子醇甲		五味子甲素		五味子乙素	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	3.719	723,089	11.388	168,890	12.540	379,973
2	3.707	721,574	11.391	168,552	12.539	379,189
3	3.706	719,159	11.389	168,475	12.535	377,909
4	3.712	721,354	11.395	168,673	12.542	379,234
5	3.711	721,438	11.393	168,759	12.540	379,422
6	3.710	720,620	11.393	168,591	12.540	379,292
RSD (%)	0.12	0.17	0.02	0.08	0.02	0.17

五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.02%~0.12%和 0.08%~0.17%之间，仪器精密度良好。新 Nexera 液相系统为良好的精密度提供硬件保障，LC-40B XR 输送泵配备 2 台最大耐压 70 MPa 的泵单元，1 台仪器即可实现延时短且精度高的高压梯度。柱塞一次冲程的送液量为 10 μ L，通过对其进行高速驱动，最大程度降低流速脉动值和脉动产生周期，实现了前所未有的精确传输，浓度准确度的误差达到 \pm 0.5%以内。

SIL-40C XR 自动进样器可实现低样品残留和微量进样的重复性。可以使用 2 种清洗液清洗进样针外壁，以及进一步使用 3 种清洗液清洗进样针内壁和进样口，可在所有分析条件下减少样品残留，实验表明，残留控制在 0.0003%以下。

3.3 样品测定

将某厂家生产的护肝丸按照2中步骤得到供试品溶液，上机分析。色谱图如图3所示。连续测定6次，五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的保留时间和峰面积的RSD分别在0.03%~0.11%和0.25%~0.33%之间，仪器精密度良好。详见图4和表3。单点外标法定量，计算得到每1 g样品中五味子醇甲含量为537 μg ，五味子甲素为120 μg ，五味子乙素为284 μg 。

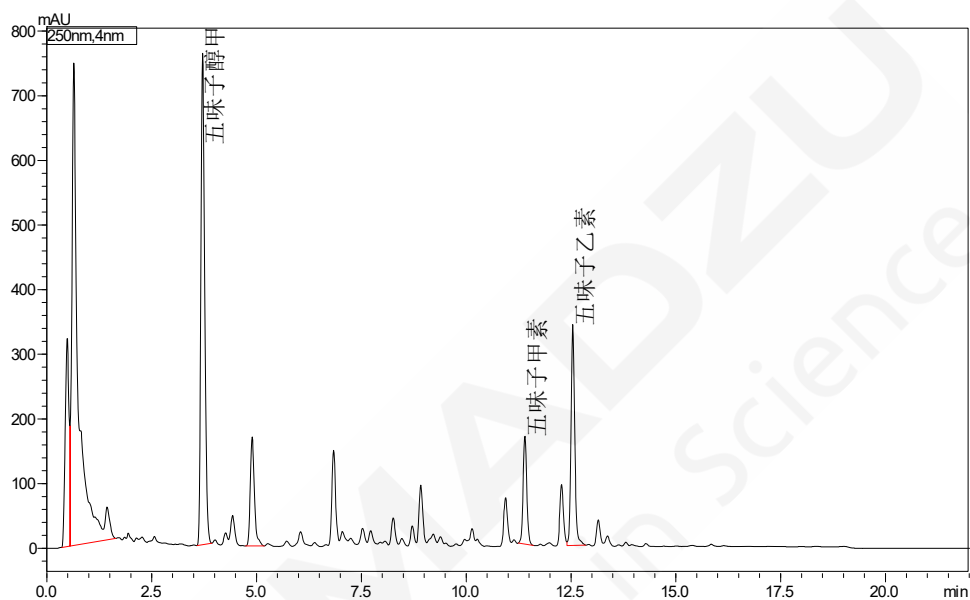


图 3. 供试品溶液色谱图

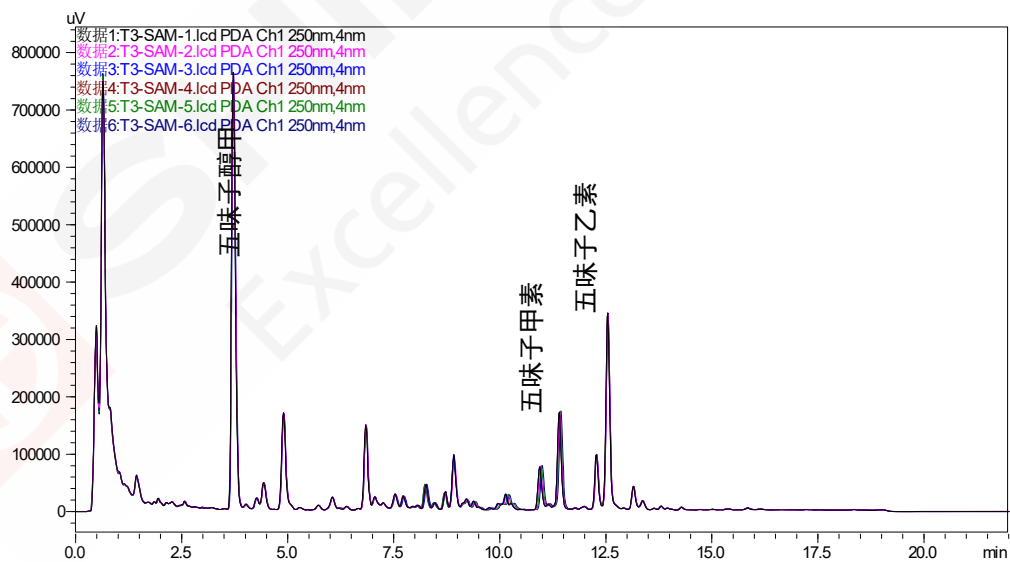


图 4. 供试品溶液 6 针重复性色谱图

表 3. 供试品溶液重复性结果

	五味子醇甲		五味子甲素		五味子乙素	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	3.713	4,846,398	11.400	1,014,166	12.541	2,159,071
2	3.720	4,850,727	11.410	1,015,229	12.549	2,157,604
3	3.725	4,849,455	11.402	1,015,348	12.548	2,156,680
4	3.718	4,835,087	11.399	1,011,143	12.543	2,146,592
5	3.715	4,825,284	11.420	1,010,883	12.542	2,145,173
6	3.718	4,823,616	11.440	1,008,257	12.550	2,142,707
RSD (%)	0.11	0.25	0.13	0.28	0.03	0.33

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了护肝丸有效成分含量的测定方法。方法采用 1.8 μm 填料色谱柱进行分离，取得了良好的分离效果。连续 6 针进样，对照品中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.02%~0.12%和 0.08%~0.17%之间，表明仪器精密度良好。按五味子乙素峰计理论塔板数为 68692，满足药典中不应低于 15000 的要求。使用此方法对某厂家生产的护肝丸进行分析，每 1 g 样品中五味子醇甲含量为 537 μg ，五味子甲素为 120 μg ，五味子乙素为 284 μg ，符合药典要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定护肝丸中有效成分的含量。

Nexera LC-40 测定逍遥丸中芍药苷的含量

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了逍遥丸中芍药苷含量测定的方法。该方法中，芍药苷在 2.0-300.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为 0.9999。精密度实验中，芍药苷的保留时间相对标准偏差为 0.08-0.19%；峰面积的相对标准偏差为 0.20-0.39%。供试品中每 1 g 含白芍以芍药苷计，芍药苷含量为 13.2 mg。实验结果表明，该方法能快速准确地测定逍遥丸中芍药苷的含量。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 逍遥丸 芍药苷

逍遥丸具有疏肝健脾，养血调经的功能，用于肝郁脾虚所致的郁闷不舒、胸胁胀痛、头晕目眩、食欲减退、月经不调。其主成分芍药苷，具有扩张血管、镇痛镇静、抗炎抗溃疡、解热解痉、利尿的作用。

国家药典委员会2019年5月发布了“关于射麻口服液、小儿清热镇静散、逍遥丸（浓缩丸）国家药品标准修订草案的公示”逍遥丸检定方法征求意见稿。按照征求意见稿中逍遥丸含量测定项下要求，使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪对主成分芍药苷含量进行测定。系统适用性试验中，按芍药苷峰计不低于2000；供试品中每1 g含白芍以芍药苷计，芍药苷不得少于4.0 mg。

本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪建立了逍遥丸中芍药苷的含量测定方法，该系统具有分析速度快、稳定性高的特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，具体配置为：SCL-40（系统控制器），DGU-405（脱气机），LC-40BXR（输液泵），SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40C（柱温箱），SPD-M40A（二极管阵列检测器），LabSolutions Ver. 5.97（色谱工作站）。

1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-pack GIST C18（2.1 mm I.D. \times 100 mm L，2 μm ）

流 动 相：A 相- 0.1%磷酸水溶液；B 相- 乙腈

流 速：0.4 mL/min

柱 温：40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：230 nm

进样体积：4 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 12%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
6.50	泵	B Conc	12
7.00	泵	B Conc	80
10.00	泵	B Conc	80
10.10	泵	B Conc	12
16.00	控制器	Stop	

2. 样品前处理

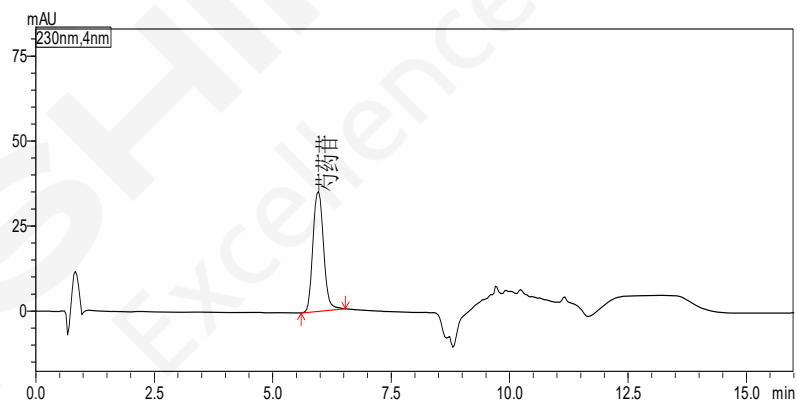
对照品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取芍药苷对照品适量，精密称定，加稀乙醇制成每1 mL中约含60 μg 的溶液，即得。

供试品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取本品适量，研细，取约0.4 g，精密称定，加入稀乙醇25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率250 W，频率33 kHz）30分钟，放冷，再称定重量，用稀乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

3. 结果与讨论

3.1 系统适用性试验

按照1.2中分析条件对2中对照品溶液进行测定，色谱图如图1所示。芍药苷峰理论塔板数为3443，符合系统适用性要求（征求意见稿含量测定项下系统适用性试验按芍药苷峰计不低于2000）。

图 1. 对照品溶液系统适用性色谱图 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.2 标准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 2 所示，芍药苷在 2.0-300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9999，具体结果见表 2。

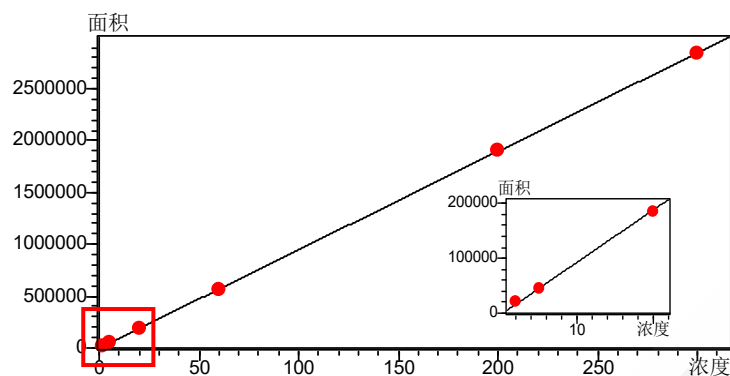


图 2. 对乙酰氨基酚标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	英文名称	CAS No.	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数	准确度%
芍药苷	Paeoniflorin	23180-57-6	2.0-300.0	$Y = (9485.23)X + (-633.029)$	0.9999	95.6-106.8

3.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 5.0、60.0 和 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的芍药苷对照品溶液分别连续进样测定 6 次重复性色谱图如图 3 所示。芍药苷的保留时间 RSD% 为 0.08-0.19%；峰面积 RSD% 为 0.20-0.39%，结果见表 3。精密度实验结果表明，Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度。

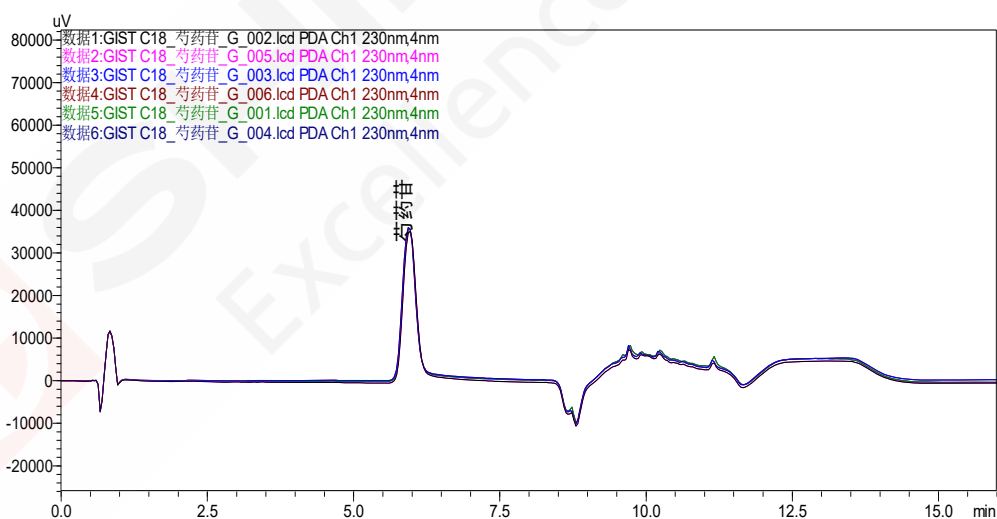


图 3. 对照品溶液重复性色谱图 (60 $\mu\text{g/mL}$)

表 3. 芍药苷对照品溶液精密度的结果 (n=6)

	5.0 µg/mL		60.0 µg/mL		200.0 µg/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	6.054	44,405	6.068	566,561	6.058	1,904,065
2	6.049	44,605	6.071	563,155	6.049	1,901,788
3	6.057	44,223	6.079	563,161	6.044	1,906,296
4	6.060	44,532	6.049	565,371	6.045	1,906,045
5	6.061	44,563	6.052	565,032	6.060	1,899,060
6	6.062	44,216	6.057	564,231	6.031	1,910,113
平均值	6.057	44,424	6.063	564,585	6.048	1,904,561
RSD(%)	0.08	0.39	0.19	0.24	0.17	0.20

3.4 样品含量测定

取某厂家生产的逍遥丸（规格：每8丸相当于饮片3g）适量，研细，精密称取40.12 mg粉末，按照2中步骤得到供试品溶液，上机分析。供试品溶液连续进样测定6次，芍药苷的保留时间RSD%为0.10%，峰面积为0.20%，仪器精密度良好。供试品溶液色谱图及重复性色谱图如图5-图6所示，供试品溶液重复性结果见表4。使用外标法定量，计算得到供试品中每1 g含白芍以芍药苷计，芍药苷含量为13.2 mg，符合征求意见稿要求（征求意见稿含量测定项下供试品中每1 g含白芍以芍药苷计，不得少于4.0 mg）。

Nexera LC-40系列SPD-M40具备UV cut-off滤光片，可抑制低波长紫外光照射到检测池，从而避免样品溶液受到低波长紫外光照射后发生降解。如图4所示，图中分别展示了开启和关闭cut-off功能后的供试品溶液主成分芍药苷光谱图。

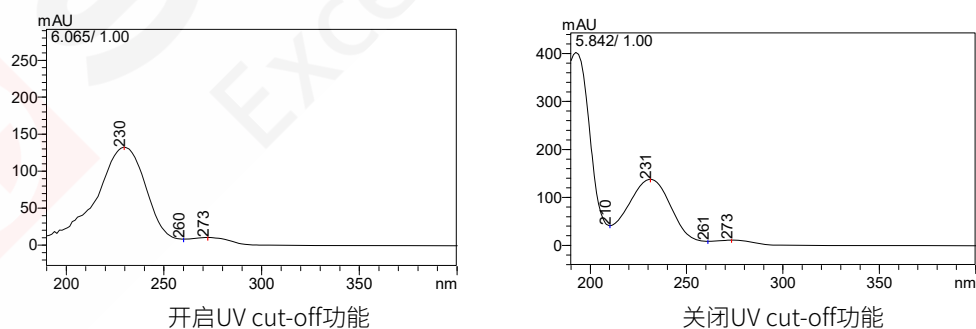


图 4. 供试品溶液主成分芍药苷光谱图

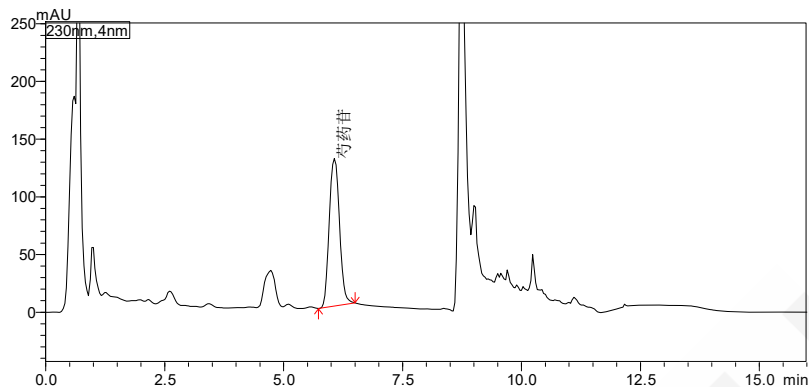


图 5. 供试品溶液色谱图

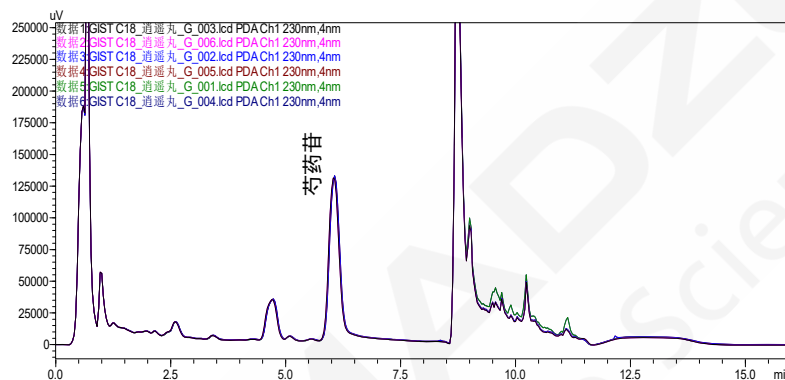


图 6. 供试品溶液连续 6 针重复性色谱图

表 4. 供试品溶液重复性结果 (n=6)

	芍药苷		
	R.T.	Area	浓度 (μg/mL)
1	6.079	2,010,684	211.81
2	6.087	2,005,715	211.29
3	6.082	2,002,800	210.98
4	6.083	2,002,996	211.00
5	6.074	2,001,689	210.86
6	6.091	1,999,365	210.62
平均值	6.083	2,003,875	211.09
RSD (%)	0.10	0.20	

4. 结论

本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，参照“关于射麻口服液、小儿清热镇静散、逍遥丸（浓缩丸）国家药品标准修订草案的公示”逍遥丸检定方法征求意见稿中含量测定项，建立了逍遥丸中芍药苷含量测定的方法。结果表明，芍药苷峰理论塔板数为3443；芍药苷在2.0-300.0 μg/mL线性范围内线性良好，相关系数为0.9999。精密度实验中，芍药苷的保留时间相对标准偏差为0.08-

0.19%；峰面积的相对标准偏差分别为0.20-0.39%，仪器精密度良好；供试品中每1 g含白芍以芍药苷计，芍药苷含量为13.2 mg，结果均符合征求意见稿要求。

岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪分析速度快、稳定性良好、结果准确度高，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。



Nexera LC-40 测定野生甘草中甘草苷和甘草酸含量

摘要: 本文采用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪建立了野生甘草样品中的甘草苷和甘草酸的同时测定方法, 在14 min内完成甘草样品分析。甘草苷在10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甘草酸在100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数 r 在0.999以上, 且精密度和回收率实验结果良好。该方法具有简单、准确、分析时间短和溶剂消耗少等特点, 可应用于野生甘草中甘草苷和甘草酸的快速检测。

关键词: Nexera LC-40 甘草 甘草苷 甘草酸

甘草系豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat.或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.的干燥根和根茎, 我国甘草主要分布于内蒙古、陕西、甘肃、青海、新疆、山东等地。甘草具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药之功效, 其主要成分为三萜类与黄酮类成分, 甘草苷及甘草酸则是这两类化合物中重要的单体活性成分。甘草酸有抗炎、抗病毒等作用, 甘草苷有抗抑郁、神经保护、肝脏毒性保护等作用。甘草属于大宗药材, 药用和食用两方面用量都很大。近几年来, 随着国家对中药材质量监管力度的不断加大, 部分甘草的甘草苷和甘草酸达不到药典的标准。2015年版《中国药典》规定, 使用高效液相色谱法对甘草中甘草苷和甘草酸含量进行测定, 要求干燥甘草品含甘草苷($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$)不得少于0.50%, 甘草酸($\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$)不得少于2.0%。

本实验采用岛津Nexera LC-40高效液相色谱系统同时测定甘草苷和甘草酸含量, 该方法具有分析时间短, 结果准确的特点, 可为甘草中甘草苷和甘草酸含量的快速测定提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪, 包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B XR 输送泵, SIL-40C XR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40A 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱: SHIMADZU InertSustain C18 色谱柱 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2 μm)

流 动 相: A: 0.05%(v/v)磷酸水溶液; B: 乙腈

流 速: 0.4 mL/min

柱 温: 40°C

检测波长: 237 nm

进样体积: 1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 14%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	14
4.00	Pumps	Pump B Conc.	40
10.00	Pumps	Pump B Conc.	50
10.50	Pumps	Pump B Conc.	100
11.00	Pumps	Pump B Conc.	14
14.00	Controller	Stop	

1.3 样品前处理

对照品溶液的制备：取甘草苷对照品和甘草酸对照品适量，精密称定，加 70%乙醇分别制成 1 mg/mL 浓度的对照品溶液储备液。使用 70%乙醇，稀释成不同浓度的甘草苷和甘草酸混合对照溶液。

供试品溶液的制备：取野生甘草样品粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 100 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用 70%乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2. 结果与讨论

2.1 对照品液相图谱

按照 1.2 中分析条件，将浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液上机分析，色谱图如图 1 所示。

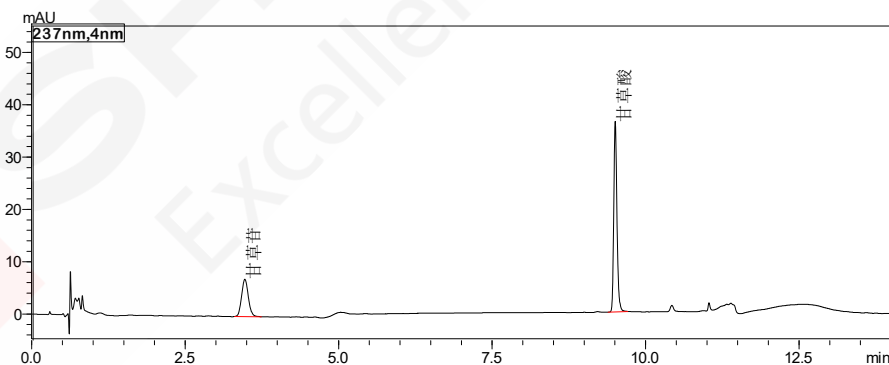


图 1. 对照品溶液色谱图

2.2 专属性考察

采用二极管阵列检测器(PDA)对野生甘草样品色谱图中甘草苷和甘草酸色谱峰进行峰纯度检测。结果显示甘草苷和甘草酸色谱峰最小峰纯度相似度大于 0.995，且纯度指数均大于零，表明甘草苷和甘草酸色谱峰在出峰位置均未检测到杂质，峰纯度良好。可见，甘草中其他成分对含量测定无干扰，检测结果见图 2 和图 3。

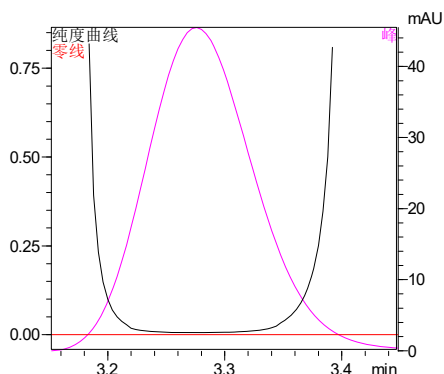


图 2. 甘草苷色谱峰纯度检测结果

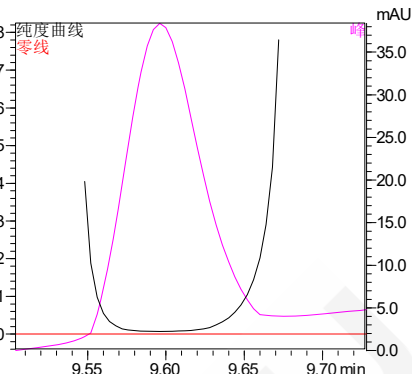


图 3. 甘草酸色谱峰纯度检测结果

2.3 线性关系考察

精密吸取对照品储备液适量，配制成不同浓度的甘草苷和甘草酸混合标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 2。

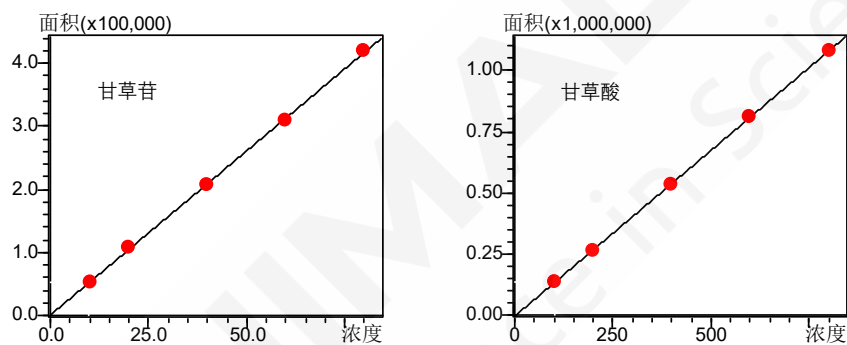


图 4. 标准曲线

表 2. 回归方程与线性范围

化合物	校准曲线	r	线性范围(ng/mL)	准确度
甘草苷	$Y = (5209.73)X + (521.853)$	0.9999	10~80	99.1~102.5%
甘草酸	$Y = (1355.13)X + (-4834.69)$	0.9999	100~800	99.5~101.5%

本试验使用 SPD-M40 检测器，该检测器通过“高级光学系统控温”功能可分别对流通池、光源和光学系统的温度进行控制，减少了外部温度变化对系统的影响，可显著降低基线波动，从而可获得更加准确的目标化合物峰面积。

2.4 精密度试验

精密吸取甘草苷浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 和甘草酸浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，重复进样 6 次，每次进样 1 μL ，按上述色谱条件测定峰面积。结果显示甘草苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.53% 和 0.10% (n=6)，表明仪器精密度良好。

表 3. 精密度试验结果(n= 6)

No.	甘草苷	甘草酸
1	104444	265169
2	105420	264935
3	105986	265468
4	105636	264788
5	106235	264776
6	105602	264749
平均值	105554	264981
峰面积 RSD	0.53%	0.10%

Nexera LC-40 高效液相色谱系统配置了 LC-40B XR 输送泵，可实现延时短且精度高的高压梯度洗脱。每个泵单元柱塞一次冲程的送液量为 10 μ L，能够最大程度降低流速脉动值和脉动产生周期，为仪器良好的精密度提供硬件保障。

2.5 加样回收率试验

分别精密量取已知甘草苷和甘草酸含量的野生甘草样品 5 份，各 0.2 g，再加入一定量的甘草苷和甘草酸的对照储备液，按照 1.3 项下方法制备供试品溶液，测定回收率，结果见表 4。

表 4. 加样回收率试验结果(n= 5)

取样量(g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得含量(mg)		回收率(%)		平均回收率(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.201	3.04	7.99	2.80	3.40	5.75	11.30	96.6	97.3		
0.199	2.99	7.91	2.80	3.40	5.71	11.27	97.1	98.8		
0.200	3.03	7.96	2.80	3.40	5.76	11.28	97.4	97.6	97.5	98.2
0.201	3.05	7.97	2.80	3.40	5.79	11.32	97.9	98.5		
0.200	3.01	7.93	2.80	3.40	5.76	11.28	98.3	98.6		

注：A 为甘草苷；B 为甘草酸

2.6 实际样品分析结果

按照上述试验条件，对市售野生甘草样品中甘草苷和甘草酸进行检测（见图 5），计算供试品中甘草苷和甘草酸的含量分别为 0.15%和 3.96%，均满足 2015 年版《中国药典》规定的甘草中甘草苷和甘草酸含量要求。

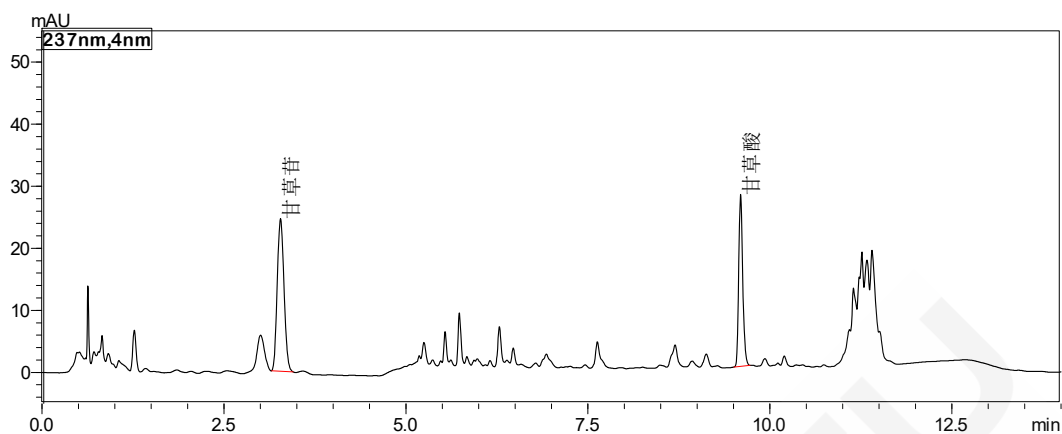


图 5. 野生甘草样品中甘草苷和甘草酸分析图谱

3. 结论

本研究应用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立了野生甘草样品中的甘草苷和甘草酸同时测定的方法, 在 14 min 内完成甘草样品分析, 较传统 HPLC 方法大大缩短了分析时间。甘草苷在 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甘草酸在 100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上, 且精密度和回收率实验结果良好。该方法具有简单、准确、快速和溶剂消耗少等特点, 可用于甘草样品中甘草苷和甘草酸成分的快速检测, 同时为中药有效成分含量的快速测定提供参考。

Nexera LC-40 快速测定中药制剂中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1

摘要: 本文采用 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 建立了中药制剂中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 测定方法。方法采用快速液相方法进行分离, 取得了良好的分离效果。连续 6 针进样, 人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.11%~0.36%和 0.13%~0.47%之间, 表明仪器精密度良好。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定中药制剂中人参皂苷。

关键词: Nexera LC-40 高效液相色谱仪 中药制剂 人参皂苷

人参皂苷 (Ginsenoside) 是一种固醇类化合物, 三萜皂苷。主要存在于人参属药材中。人参皂苷被视为是人参、红参及人参属类中药制剂中的主要活性成分, 因此被广泛研究。

人参皂苷的测定参照《中国药典》2015年版中规定, 使用高效液相色谱法对其有效成分人参皂苷Rg1、人参皂苷Re和人参皂苷Rb1含量进行测定。

在使用常规HPLC进行分析时, 需要长达110分钟的分析时间, 分析效率相对较低, 并且人参皂苷Re和Rg1较难分离。本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪, 以2.2 μm 填料色谱柱进行分离, 建立了快速测定中药制剂中人参皂苷含量的方法, 且人参皂苷Re和Rg1具有良好的分离度。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用 Nexera LC-40 液相色谱仪, 包括 SCL-40 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B X3 输液泵, SIL-40C X3 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

- 色谱柱: C18 色谱柱 (3.0 mm I.D. \times 150 mm L, 2.2 μm)
- 流动相: A, 水; B, 乙腈
- 流速: 0.8 mL/min
- 柱温: 55 $^{\circ}\text{C}$
- 检测波长: 203 nm
- 进样体积: 5 μL
- 洗脱方式: 梯度洗脱, B 相起始浓度为 28%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	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
10	Controller	Stop	

2. 样品前处理

参照《国家食品药品监督管理局 国家药品标准》中规定对对照品及供试品溶液进行制备。

对照品溶液制备：取人参皂苷Rg1、人参皂苷Re和人参皂苷Rb1对照片适量，精密称定，加20%乙腈制成每1 mL分别含0.10 mg、0.08 mg和0.2 mg的溶液，即得。

供试品溶液制备：取样品直接测定（某注射液）。

3. 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图

按照1.2中分析条件，将2中配制的对照品溶液上机分析，色谱图如图1所示。较难分离的Re与Rg1分离度达到2.0以上。

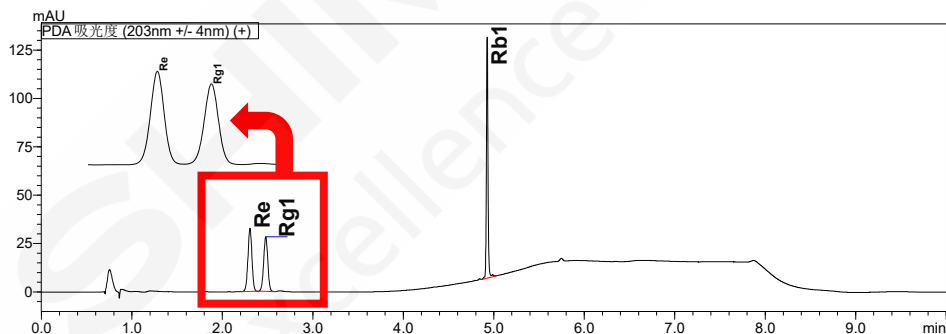


图 1. 对照品溶液色谱图

3.2 精密度实验

将配制得到的对照品溶液连续进样6次，考察仪器精密度。人参皂苷Re、Rg1和Rb1的保留时间和峰面积的RSD分别在0.11%~0.36%和0.13%~0.47%之间，仪器精密度良好。详见图2和表2。

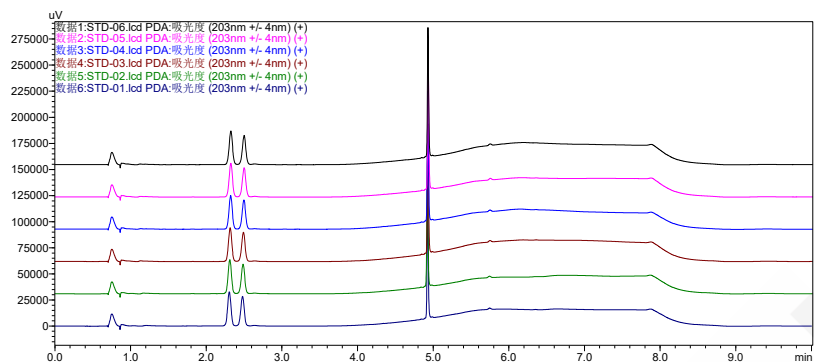


图 2. 对照品溶液 6 针重复性色谱图

表 2. 对照品溶液重复性结果

	Re		Rg1			Rb1	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	分离度	保留时间 (min)	峰面积
1	2.305	101,087	2.479	90,080	2.088	4.925	146,395
2	2.312	100,938	2.487	89,962	2.096	4.922	146,440
3	2.316	100,702	2.491	89,509	2.086	4.933	146,583
4	2.323	100,836	2.498	89,545	2.072	4.931	145,895
5	2.325	100,799	2.501	89,506	2.075	4.936	146,524
6	2.326	100,783	2.501	89,460	2.074	4.934	147,948
RSD (%)	0.36	0.13	0.35	0.30	--	0.11	0.47

3.3 样品测定

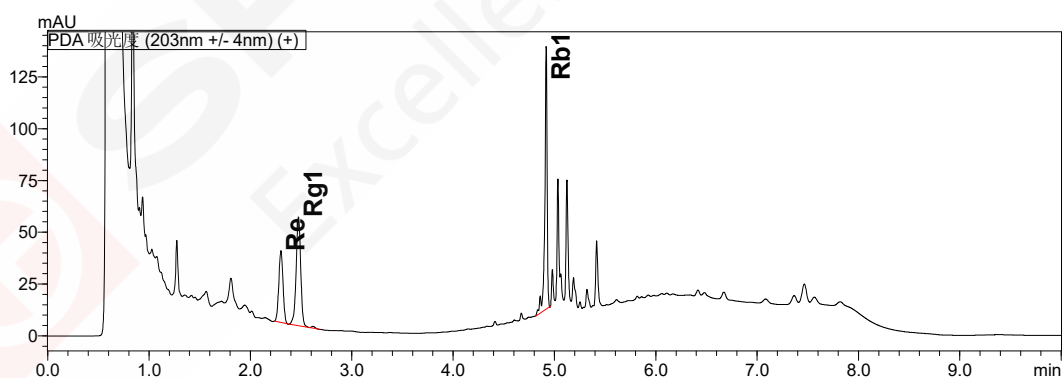


图 3. 供试品溶液色谱图

供试品溶液测定如图 3 所示。连续测定 6 次，人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.09%~0.38%和 0.38%~0.49%之间，仪器精密度良好。Rg1 也 Re 分离度良好，Rg1 分离度大于 2.0。

3.4 常规液相方法与 UHPLC 方法比较

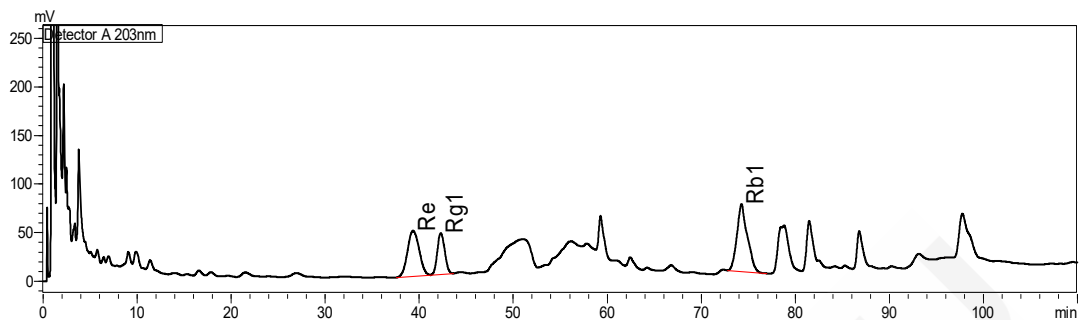


图 4. 人参样品中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 分析色谱图 (常规液相方法)

使用常规液相方法对人参样品进行测定,使用 5 μm 粒径色谱柱 Inertsil ODS-4(4.6 mm I.D. \times 150 mm L., 5 μm) 进行分析,流速为 1.0 mL/min,采用梯度洗脱方式,其他与 1.2 中条件相同。将常规液相方法进行分析的数据与超高效快速液相方法进行对比,参数详见表 3。同时对所用分析时间及流动相消耗进行对比,超高效快速液相方法既将单次分析时间缩短为 10 分钟,同时又大大减少流动相的消耗,仅为常规液相的 1/10,详见图 5。

表 3. 人参皂苷分析常规液相与超高效快速液相方法对比

	分析时长 (min)	流动相消耗 (mL)	Rg1 分离度	峰宽		
				Re	Rg1	Rb1
常规液相方法	110	110	1.57	2.290	1.457	2.410
超高效快速液相方法	10	8	2.07	0.082	0.085	0.032

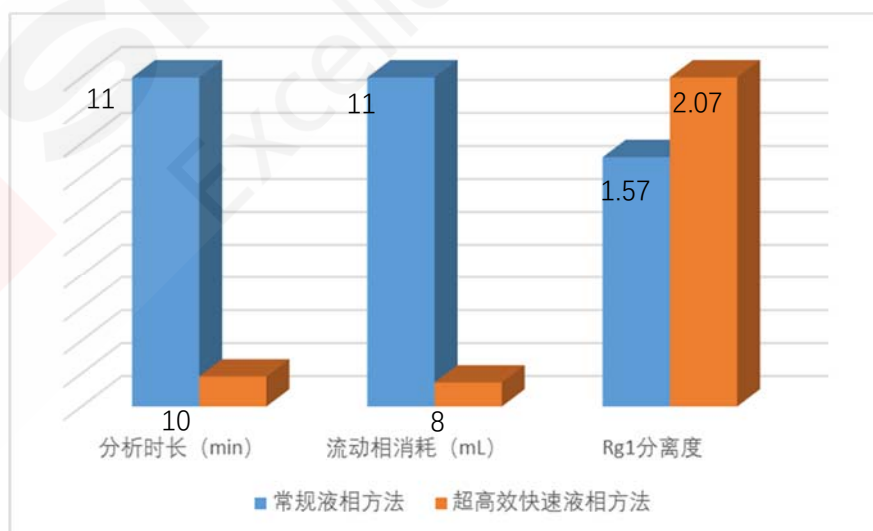


图 5. 人参皂苷分析常规液相与超高效快速液相方法对比

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了中药制剂中人参皂苷的测定方法。方法采用 2.2 μm 填料色谱柱进行分离，取得了良好的分离效果。连续 6 针进样，对照品中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.11%~0.36% 和 0.13%~0.47% 之间，表明仪器精密度良好；且 Rg1 的分离度在使用 Nexera LC-40 进行快速分析测定时优于常规液相中测定方法，分析效率大幅提高，测定时间由 110 分钟缩短为 10 分钟，流动相耗用量降低 92.7%。实际样品分析结果表明，该方法能快速准确地测定中药制剂中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1。



Nexera LC-40 智能化启动功能在快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量中的应用

摘要: 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 建立了快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量的方法。数据采集时利用智能化启动方式对目标物进行快速测定, 取得了良好的精密度。连续 6 针进样, 黄芩苷的保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.10% 和 0.03%。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量, 智能自动启动使用 Flow Pilot 功能能够实现快速样品分析中良好的仪器精密度; 同时, 与 SPD-M20A 测定结果相比, SPD-M40 的三重温控技术使检测结果体现出更佳、更稳定的基线及出色的响应强度。

关键词: Nexera LC-40 高效液相色谱仪 自动启动 Flow Pilot 复方鱼腥草合剂 黄芩苷

复方鱼腥草合剂为黄棕色至棕色液体, 主要处方为鱼腥草、黄芩、板蓝根、连翘和金银花, 清热解毒, 用于外感风热引起的咽喉疼痛; 急性咽炎、扁桃腺炎有风热证候者。其含量测定参照《中国药典》2015年版中规定, 使用高效液相色谱法对其有效成分黄芩苷含量进行测定, 本品每 1 mL 含黄芩苷 ($C_{21}H_{18}O_{11}$) 计,

不得少于 0.45 mg; 理论塔板数按黄芩苷峰计算应不低于 2000。

本实验使用 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 采用 Nexera LC-40 独有的 Flow Pilot 功能智能自动启动, 建立了快速测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量的方法, 且黄芩苷对照品连续测定 6 次, 得到了良好的仪器精密度数据。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪, 包括 SCL-40 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B X3 输液泵, SIL-40C X3 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱:	Shim-Pack GIST (3.0 mm I.D. × 75 mm L., 2 μm) (P/N 227-3002-03, 岛津实验器材(上海)有限公司)
流动相:	A-0.6%磷酸溶液; B-甲醇
流速:	1 mL/min
柱温:	40°C
检测波长:	280 nm
进样体积:	5 μL

洗脱方式： 等度洗脱，A相:B相=58:42 (v:v)

2. 样品前处理

参照《国家食品药品监督管理局国家药品标准》WS-10821 (ZD-0821) -2002-2012Z中复方鱼腥草合计测定方法。

对照品溶液制备：取黄芩苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1 mL含20 μ g的溶液，即得。

供试品溶液制备：精密量取本品2 mL，置50 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

3. 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图

按照1.2中分析条件，将2中配制的对照品溶液上机分析，黄芩苷色谱图如图1所示。测得理论塔板数为2954，满足《中国药典》中规定的理论塔板数按黄芩苷峰计不低于2000的要求。

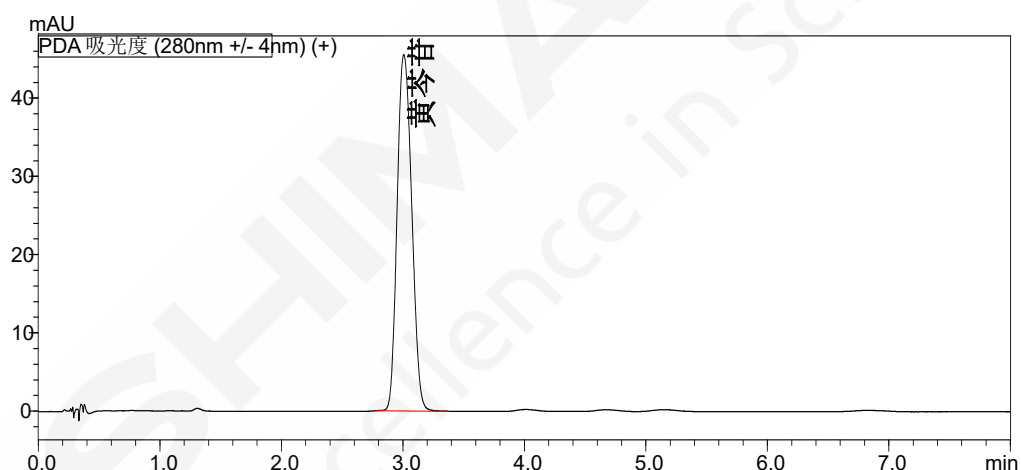


图 1. 黄芩苷对照品溶液色谱图

3.2 自动启动功能及 Flow Pilot 功能的应用

采用智能自动启动功能，只需预先设定好启动程序，仪器将根据指令进行排气、流动相置换、预热以及系统平衡，然后根据批处理表设定进行数据采集。同时在批处理采集中，自动执行在线系统适应性检查。

启动时，设置Flow Pilot功能使流速缓慢增加到设定流速（假设总流速为1mL/min，设定流量到达时间为2 min；那么流速在1 min内将从0 mL上升0.5 mL——设定总流速的一半，然后等待柱温稳定，稳定后，流速在1-2 min由0.5 mL上升到1 mL——设定的总流速），而非即时到达，详见图3。这样可以避免柱压在短时间内快速上升，从而起到保护色谱柱，延长色谱柱使用寿命的目的。

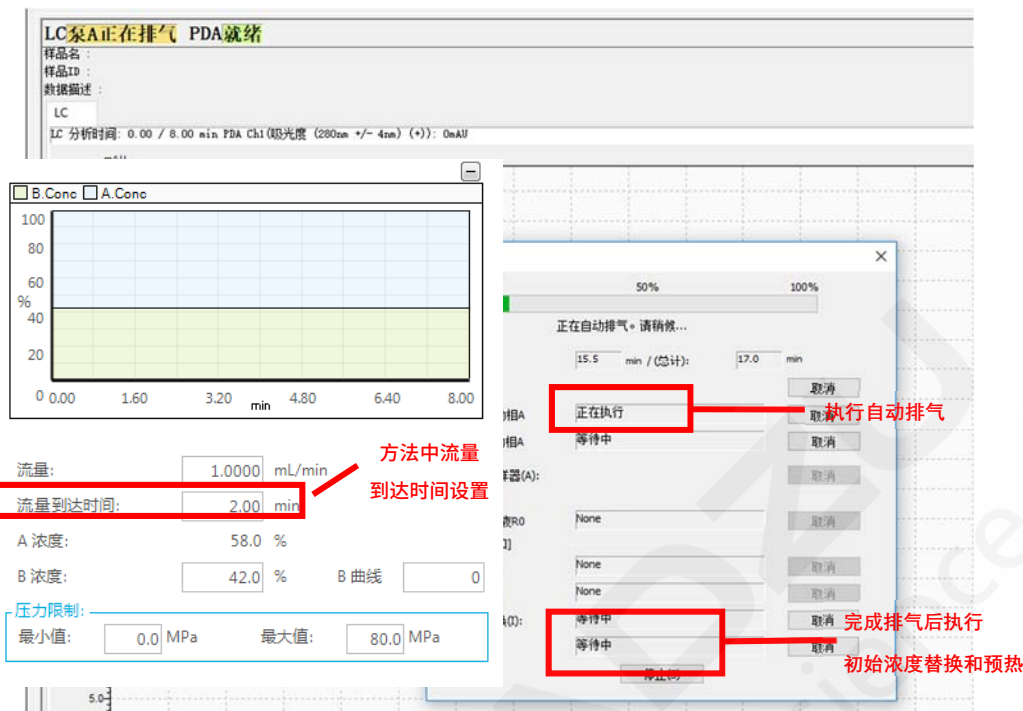


图 2. 自动启动运行过程

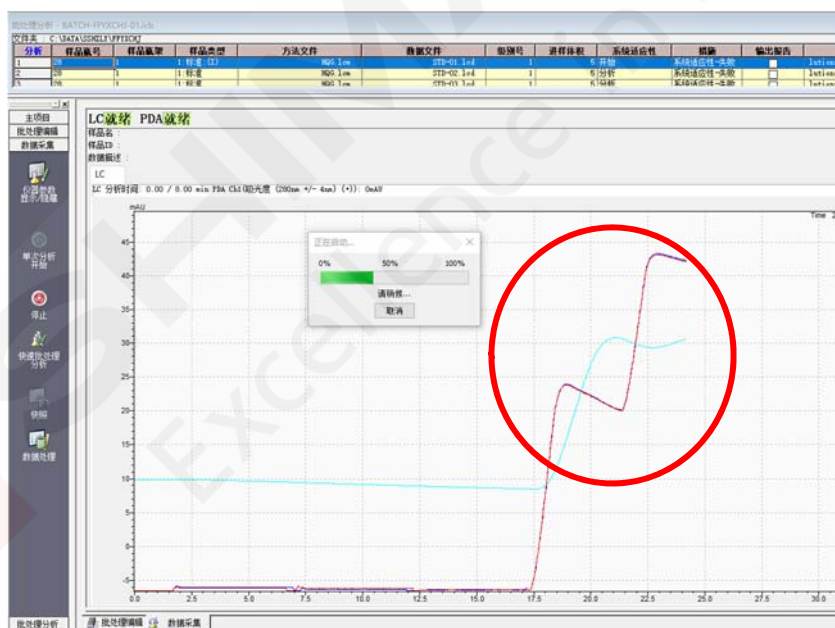


图 3. 使用 Flow Pilot 功能流速到达过程

3.3 在线系统适应性结果

将配制得到的对照品溶液连续进样6次, 通过批处理采集设定执行在线系统适应性考察, 考察保留时间及峰面积RSD%, 设定要求保留时间RSD%小于1%, 峰面积RSD%小于2%。6次数据采集完成后, 自动获得系统适应性评价报告, 综合评价为Pass。

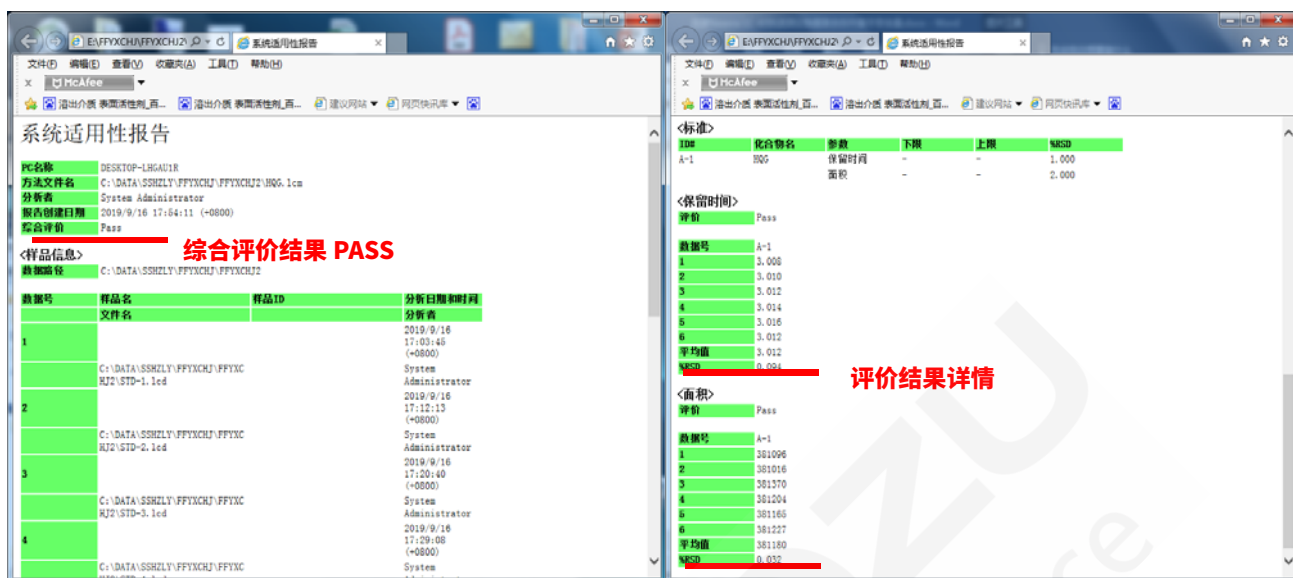


图 4. 在线系统适应性评价结果

黄芩苷的保留时间和峰面积的RSD%分别为0.09%和0.03%，仪器精密度良好。详见图5和表2。

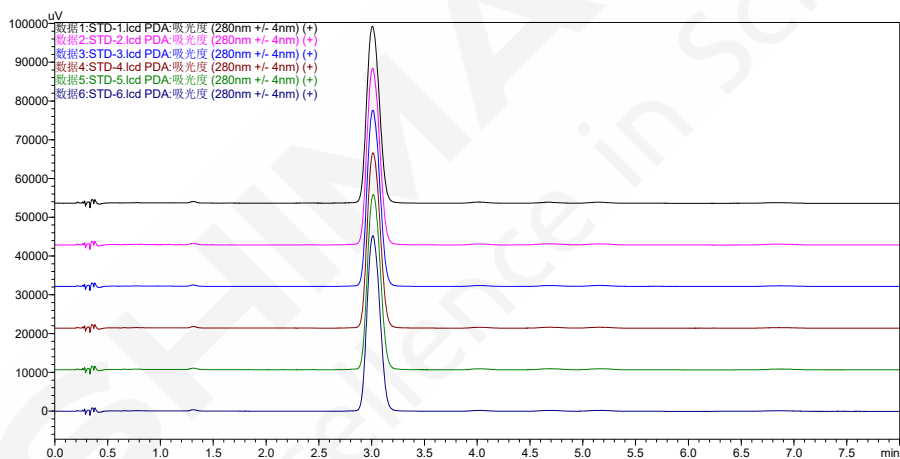


图 5. 黄芩苷对照品溶液 6 针重复性色谱图

表 2. 黄芩苷对照品溶液重复性结果

	保留时间 (min)	峰面积
1	3.008	381,096
2	3.010	381,016
3	3.012	381,370
4	3.014	381,204
5	3.020	381,165
6	3.012	381,227
平均值	3.012	381,180
RSD (%)	0.10	0.03

3.4 样品测定

将某厂家生产的复方鱼腥草合剂作为供试品溶液，上机分析。色谱图如图6所示。连续测定6次，黄芩苷的保留时间和峰面积的RSD%分别为0.13%和0.11%，仪器精密度良好。单点外标法定量，计算得到每1 mL样品中，含黄芩苷1.257 mg。所测定的复方鱼腥草合剂产品符合国家药品质量标准。

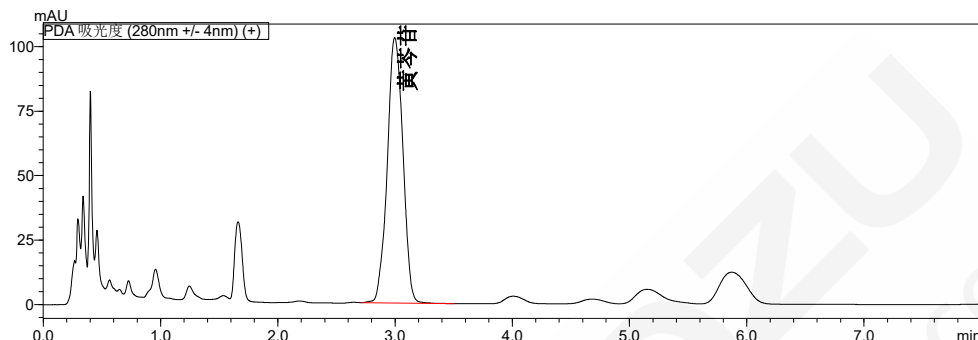


图 6. 黄芩苷供试品溶液色谱图

3.5 SPD-M20A 与 SPD-M40 测定比较

将黄芩苷对照品分别使用 SPD-M20A 和 SPD-M40 进行测定，分析条件、色谱柱、样品浓度 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与进样量完全一致，得到比对图谱如图 7 所示。

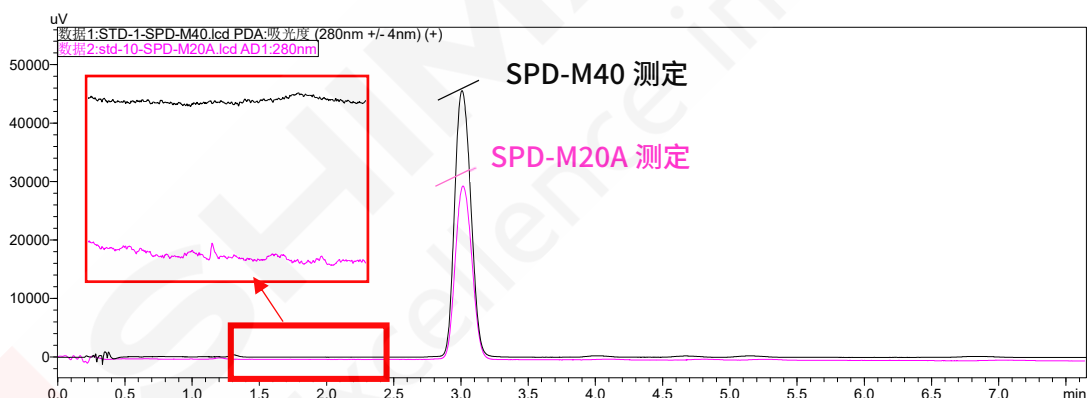


图 7. 黄芩苷对照品不同检测器测定色谱图比较

SPD-M40 采用独有的三重温控技术，不仅流通池控温，且对光源室和分光计单元光路系统进行温控，有效地保证了基线的稳定性，详见图 8。从比对测定得到的数据可以看出，SPD-M40 的基线噪音低于 SPD-M20A，且目标物的响应强度明显高于 SPD-M20A 测定结果，详见表 3。

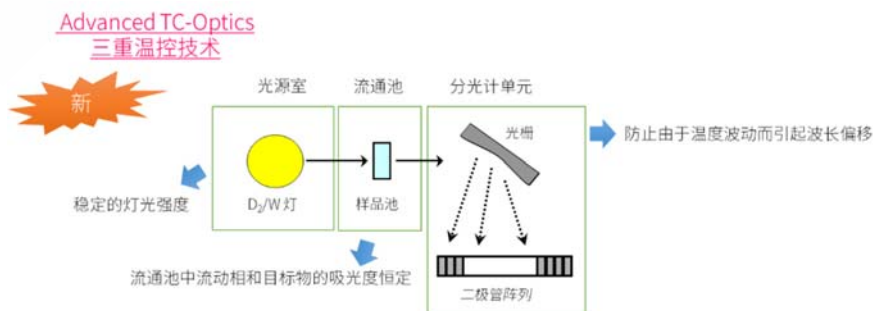


图8. SPD-M40全新的三重温控技术

表 3. 黄芩苷分析参数对比 (SPD-M40、SPD-M20A)

	峰面积	峰高	噪音	S/N
SPD-M20A	255716	29172	38.13	765.01
SPD-M40	382880	44562	21.06	2116.01

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了快速测定复方鱼腥草合剂中有效成分黄芩苷含量的方法。在数据采集时采用了仪器智能自动启动的方式（自动排气，自动流速 Flow Pilot 功能、柱温、方法平衡），使用快速液相方法对数据进行采集，同时进行在线系统适用性评价。实验表明，Nexera LC-40 在智能自动启动的条件下使用快速液相条件分析，能自动达到采集方法要求的平衡状态，且在线系统适用性评价综合结果显示仪器精密度良好，黄芩苷对照品的保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.10% 和 0.03%。使用此方法对某厂家生产的复方鱼腥草合剂进行分析，每 1 mL 样品中，黄芩苷计为 1.257 mg。所测定的产品符合国家药品质量标准，该方法能快速准确地测定复方鱼腥草合剂中黄芩苷含量。

本文中采用了岛津 Nexera LC-40 的 Flow Pilot 全新功能，使仪器在启动的过程中，避免由于泵启动快速达到设定流速而造成的柱压骤升（流速按设定程序逐步稳定上升），从而起到保护色谱柱，延长色谱柱使用寿命的目的。另外，全新的 SPD-M40 检测器采用独有的三重温控功能，表现出了优异的基线噪音与稳定性，同时具备良好的响应强度；适合有高灵敏度和高稳定性检测的需要。

第二节 指纹图谱分析

Nexera LC-40 应用于复方丹参滴丸指纹图谱的分析

摘要: 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统,建立了复方丹参滴丸指纹图谱的测定方法。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算供试品色谱图和国家药典委员会规定的复方丹参滴丸标准指纹图谱的相似度,8 个特征峰相似度在 0.969 以上,满足药典中不低于 0.90 的规定。供试品溶液连续 6 针进样,8 个目标峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.18%~0.67%和 0.11%~1.3%之间,仪器精密度良好。LC-40 全新功能 FlowPilot 可抑制色谱柱寿命降低,降低系统超压风险。该方法可为复方丹参滴丸的质量控制提供帮助。

关键词: Nexera LC-40 高效液相色谱仪 复方丹参滴丸 指纹图谱

复方丹参滴丸,中医方剂名,主要成分是丹参、三七、冰片。方中丹参味苦、性微寒,长于活血祛瘀、通经止痛,为方中之主药。三七活血祛瘀、通络止痛,为本方之辅药;冰片辛香走窜、芳香开窍、引药入心、通脉止痛,为本方之佐药。全方具有活血化瘀,理气止痛功效。本品在临床上广泛用于冠心病、心绞痛的预防、治疗、急救。

指纹图谱分析手段是中药分析领域进行宏观监测的有效措施,在国际范围内被认为是控制中药或天然药物质量最有效的手段之一。

它可以全面的反应化合物所含的化学成分种类、数量以及相互之间比例关系,从而有效表征其内在质量。2015版中国药典规定,复方丹参滴丸供试品色谱图中,应呈现八个与对照指纹图谱相对应的特征峰。

本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱系统对复方丹参滴丸指纹图谱进行研究,该方法分析时间短,精密度高,指纹图谱相似度满足药典中不低于0.90的规定,能够满足中国药典规定复方丹参滴丸质量控制检测要求。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪,包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B XR 输送泵, SIL-40C XR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱: 复方丹参滴丸测定专用色谱柱 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.8 μm)

流动相：A：0.02%磷酸水溶液； B：80%乙腈溶液（含0.02%磷酸）

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

检测波长：280 nm

进样体积：2 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相起始浓度为9%，时间程序如表1所示。

表1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.60	Pumps	Pump B Conc.	9
1.80	Pumps	Pump B Conc.	22
7.30	Pumps	Pump B Conc.	26
8.00	Pumps	Pump B Conc.	39
8.40	Pumps	Pump B Conc.	9
10.00	Controller	Stop	

2. 样品前处理

对照品溶液制备：参照2015版中国药典一部复方丹参滴丸项下制备。

供试品溶液制备：参照2015版中国药典一部复方丹参滴丸项下制备。

3. 结果与讨论

3.1 复方丹参滴丸谱图

按照1.2中色谱分析条件，对复方丹参滴丸和丹参素钠对照品溶液分别进行上机分析，空白溶剂色谱图如图1，目标物出峰处无干扰。丹参素钠和复方丹参滴丸色谱图见图2、3所示，其中供试品色谱图中丹参素峰保留时间为1.071 min，与对照品出峰时间一致。其余7个主峰与药典规定一致。

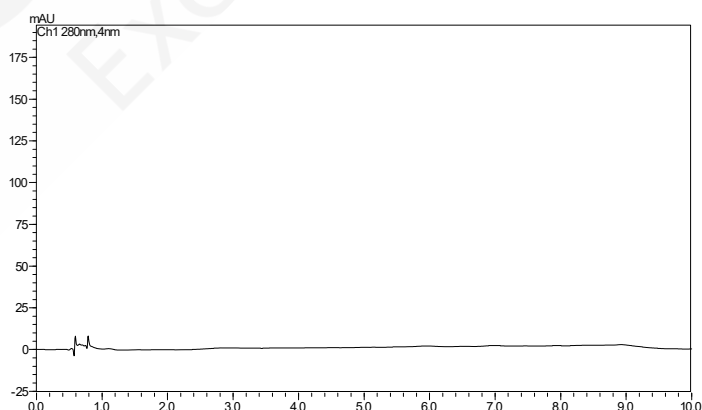


图1. 空白溶剂色谱峰

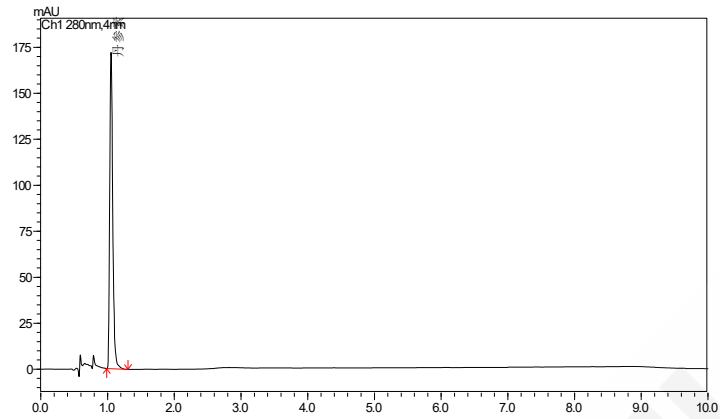


图 2. 参照丹参素钠色谱峰

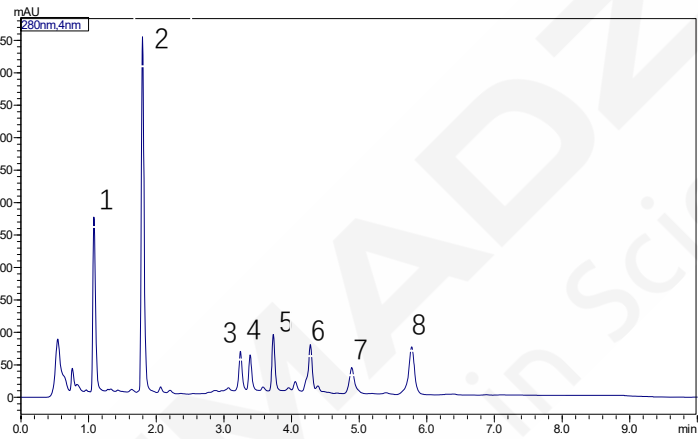


图 3. 复方丹参滴丸指纹图谱

3.2 供试品和对照提取物相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统，将市售复方丹参滴丸指纹图谱与国家药典委员会公布的复方丹参滴丸标准指纹图谱进行相似度比较，结果见图4。结果表明，方丹参滴丸指纹图谱与国家药典委员会公布的复方丹参滴丸标准指纹图谱相似度为0.969，满足药典中不低于0.90的规定。

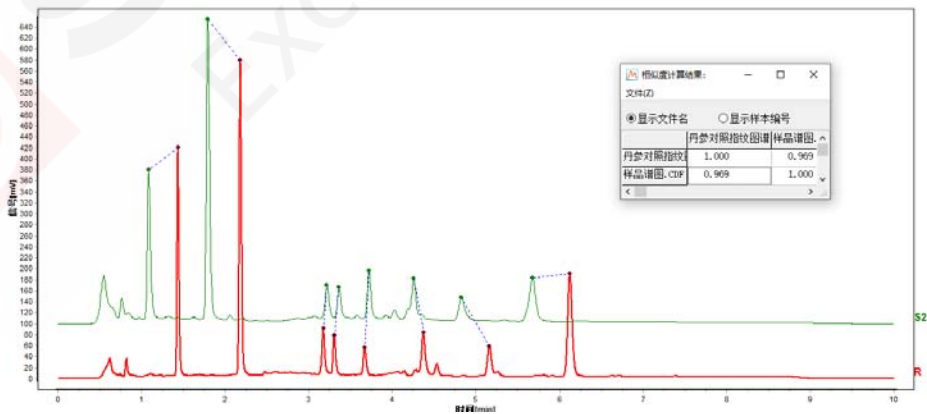


图 4. 供试品色谱图和标准指纹图谱相似度比较 (R: 标准指纹图谱 S2: 供试品色谱图)

3.3 精密度实验

将方法2中配制的复方丹参滴丸溶液连续进样6次，考察仪器精密度。8个主峰的保留时间和面积RSD值分别在0.18%~0.67%和0.11%~1.3%之间，表明仪器精密度良好，具体数据详见表2。

表 2. 复方丹参滴丸溶液重复性结果 (n=6)

峰号	RSD%	
	保留时间	峰面积
1	0.26	0.69
2	0.22	0.11
3	0.33	0.96
4	0.35	1.1
5	0.18	1.3
6	0.27	0.47
7	0.51	0.53
8	0.67	0.59

3.4 FlowPilot 功能介绍

LC-40 高效液相色谱系统采用智能系统启动设计，可根据柱温箱的温度自动设定系统启动时流动相流量，与传统液相色谱启动系统时流速直接达到预设值相比，LC-40 高效液相色谱系统的智能设计可以让流速随着柱温的升高缓慢增加，直至柱温到达预设值才将流速增加到预设值，这样降低开始送液时柱压剧增损坏色谱柱的风险，抑制色谱柱寿命降低，降低系统超压风险。普通液相及 LC-40 液相系统启动时柱温及系统压力变化过程见图 5。

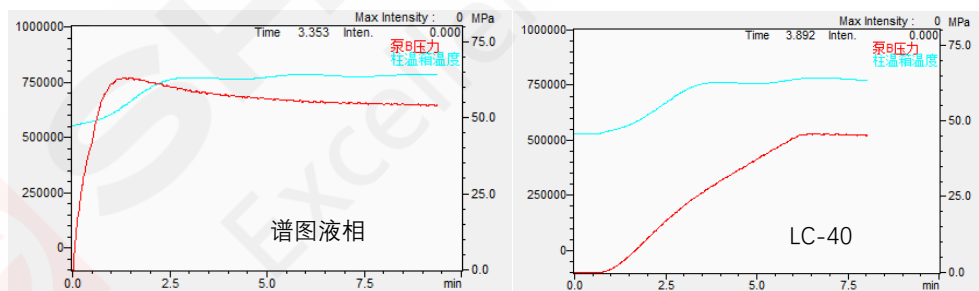


图 5. 普通液相及 LC-40 液相系统启动时柱温及系统压力变化过程

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统，建立了复方丹参滴丸指纹图谱的测定方法。该方法按照药典规定测定条件，供试品色谱图中 8 个主色谱峰分离效果良好。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算供试品色谱图和国家药典委员会规定的复方丹参滴丸标准指纹图谱的相似度，8 个特征峰相似度在 0.969 以上，满足药典中不低于 0.90 的规定。供试品溶液连续 6 针进样，8 个目标峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.18%~0.67%和 0.11%~1.3%之间，表明仪器精密度良好。LC-40 全新功能 FlowPilot 抑制色谱柱寿命降低，降低系统超压风险。因此，该方法可为复方丹参滴丸质量控制提供帮助。



SHIMADZU
Excellence in Science

Nexera LC-40 应用于银杏叶提取物指纹图谱的分析

摘要: 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统,建立了银杏叶提取物指纹图谱的测定方法。该方法分析时间短,供试品和银杏叶对照提取物中 17 个主色谱峰分离效果良好。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算供试品和对照提取物的指纹图谱相似度,全峰相似度在 0.927 以上,满足药典中不低于 0.90 的规定。连续 6 针进样,17 个目标峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.106%~0.636%和 0.152%~2.601%之间,表明仪器精密度良好。

关键词: Nexera LC-40 高效液相色谱仪 银杏叶提取物 指纹图谱

银杏作为我国特有的珍稀树种,在国内种植范围广泛。银杏叶提取物 (EGb) 则是一种治疗心脑血管疾病的有效物质,可以扩张冠状动脉血管、改善脑循环,主要的活性成分包含黄酮醇苷和萜类内酯。

指纹图谱分析手段是中药分析领域进行宏观监测的有效措施,在国际范围内被认为是控制中药或天然药物质量最有效的手段之一。它可以全面的反应化合物所含的化学成分种

类、数量以及相互之间比例关系,从而有效表征其内在质量。银杏叶提取物中各化合物的监测目前也采用指纹图谱的方式,但由于其成分较多,所以采用常规液相分析耗时较长。

本实验使用 Nexera LC-40 高效液相色谱系统对银杏叶提取物指纹图谱进行研究,该方法分析时间短,精密度高,指纹图谱相似度满足药典中不低于 0.90 的规定,能够为各类银杏叶提取物制剂质量控制提供帮助。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪,包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40BXR 输送泵, SIL-40CXR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱: UHPLC C18 色谱柱 (2.1 mm I.D. × 100 mm L, 1.8 μm)

流 动 相: A: 0.4%磷酸水溶液; B: 乙腈

流 速: 0.4 mL/min

柱 温: 35°C

检测波长: 360 nm

进样体积: 1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B相起始浓度为16.6%，时间程序如表1所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.30	Pumps	Pump B Conc.	16.6
4.60	Pumps	Pump B Conc.	19.7
7.30	Pumps	Pump B Conc.	24.0
8.00	Pumps	Pump B Conc.	27.0
10.00	Pumps	Pump B Conc.	30.0
12.00	Pumps	Pump B Conc.	40.0
12.01	Pumps	Pump B Conc.	80.0
13.00	Pumps	Pump B Conc.	80.0
13.01	Pumps	Pump B Conc.	16.6
17.50	Controller	Stop	

2. 样品前处理

参照物溶液的制备：精密称取芦丁对照品适量，加80%甲醇制成每1 mL含30 μg 的溶液，即得。
(参照药典)

对照品溶液制备：精密称取银杏叶对照提取物40 mg，精密加入80%甲醇20 mL，超声处理10分钟，滤过，取续滤液，即得。(参照药典)

供试品溶液制备：精密称取本品40 mg，同对照提取物溶液的制备方法制得供试品溶液。(参照药典)

3. 结果与讨论

3.1 银杏叶对照提取物指纹图谱

按照1.2中色谱分析条件，对银杏叶对照提取物溶液和参照物溶液分别进行上机分析，空白溶剂色谱图如图1，目标物出峰处无干扰。对照提取物和参照物色谱图见图2、3所示，其中6号峰保留时间为3.892 min，与参照物芦丁出峰时间一致。其余17个主峰与药典规定一致。

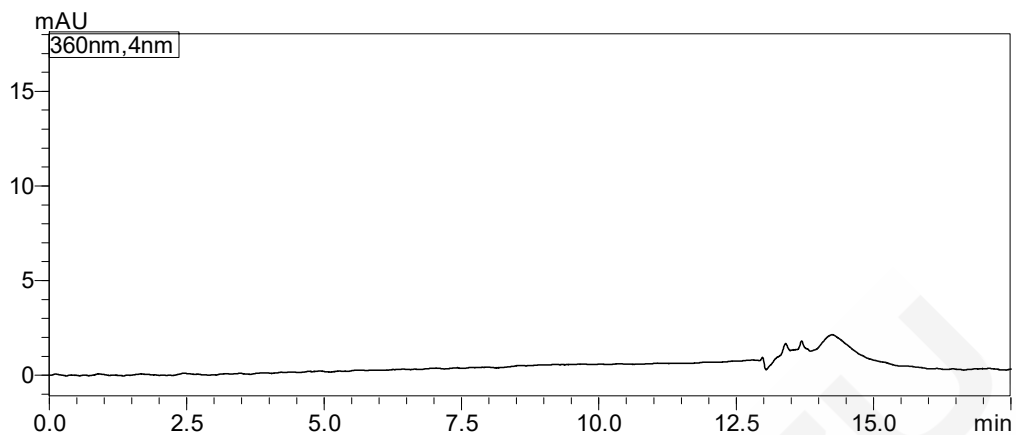


图 1. 空白溶剂色谱峰

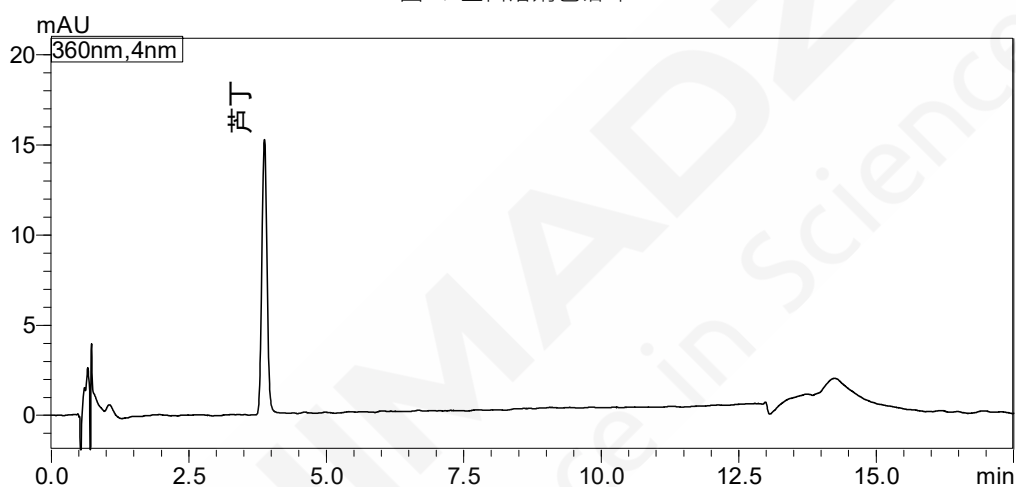


图 2. 参照物芦丁色谱峰

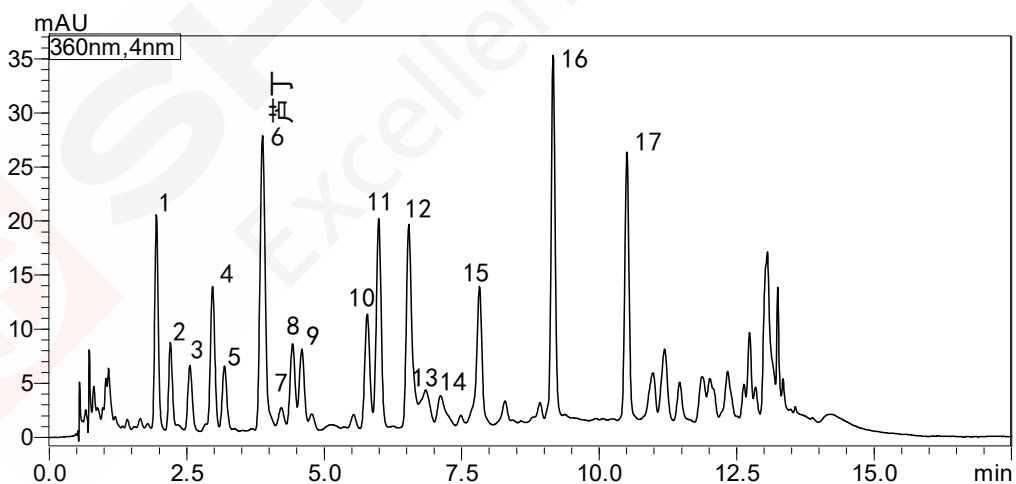


图 3. 银杏叶对照提取物指纹图谱

Nexera LC-40液相色谱系统采用更加节约空间的二元输液泵一体化设计，最大耐压70 MPa，可轻松实现延时短且精度高的高压梯度，流量精确度的误差在0.06%。此外，SIL-40C XR自动进样器可以在5秒内完成进样，进样速度较之前产品提升一倍，有效缩短多样品分析进程时间。因此，与常规液相色谱系统分析相比（图4）Nexera LC-40液相色谱系统缩短了分析时间，提高分析效率。

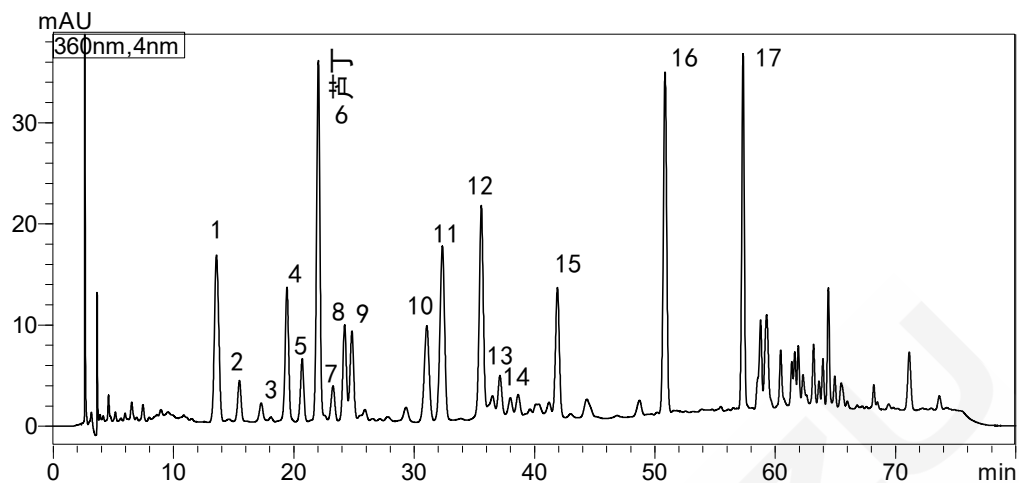


图 4. 常规液相色谱系统银杏叶对照提取物指纹图谱 (岛津常规液相采集图谱)

3.2 供试品和对照提取物相似度评价

选市售某厂家银杏叶提取物片按2中方法处理得到供试品溶液，并按1.2中色谱分析条件上机分析。结果表明，供试品溶液指纹图谱与对照提取物溶液指纹图谱相似。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版计算供试品和对照提取物溶液的指纹图谱相似度，全峰相似度在0.927以上，满足药典中不低于0.90的规定，指纹图谱相似度比较结果如图5所示。

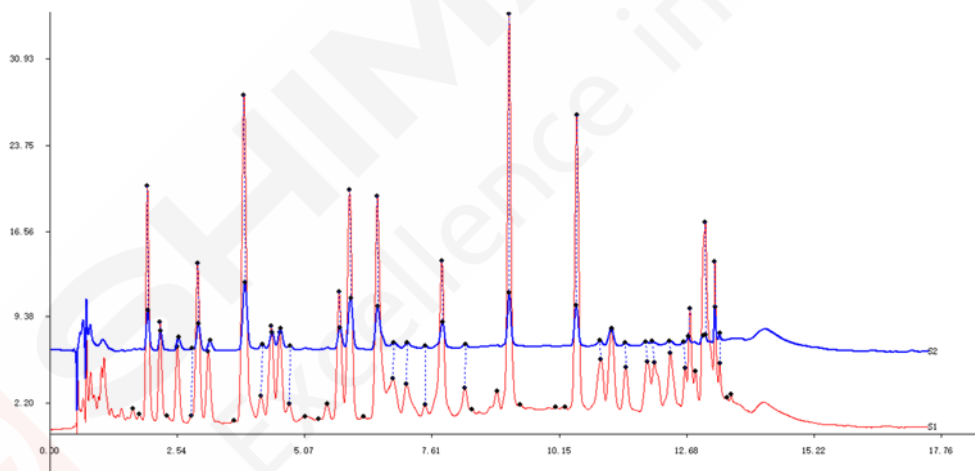


图 5. 供试品和对照提取物指纹图谱相似度比较 (S1: 对照品 S2: 供试品)

表 2. 供试品和对照提取物指纹图谱相似度计算结果

	S1	S2
S1	1.000	0.927
S2	0.927	1.000

3.3 精密度实验

将方法2中配制的银杏叶对照提取物溶液连续进样6次，考察仪器精密度。17个主峰的保留时间和面积RSD值分别在0.106%~0.636%和0.152%~2.601%之间，表明仪器精密度良好，详见图6和表3。

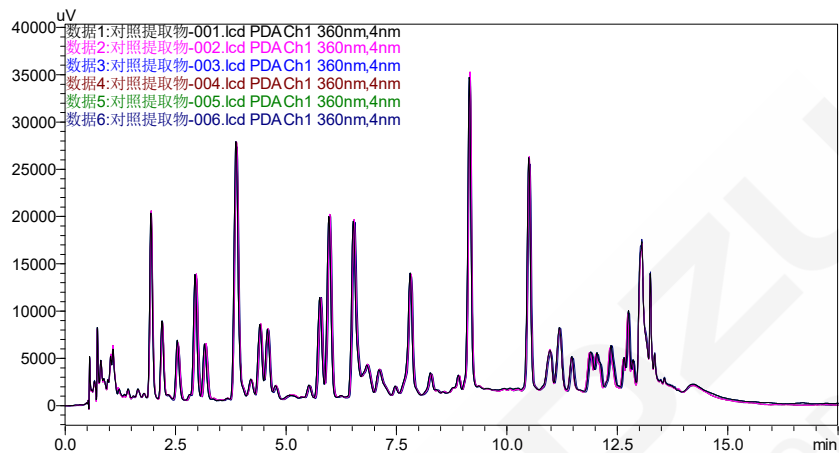


图 6. 银杏叶提取物对照品溶液 6 针重复性色谱图

表 3. 银杏叶提取物对照品溶液重复性结果 (n=6)

峰号	RSD% (2 mg/mL)	
	保留时间	峰面积
1	0.283	0.643
2	0.317	2.011
3	0.516	1.875
4	0.592	0.234
5	0.635	0.435
6	0.280	0.152
7	0.234	0.905
8	0.284	0.482
9	0.262	0.338
10	0.282	0.393
11	0.253	0.596
12	0.229	0.526
13	0.209	0.905
14	0.169	1.326
15	0.173	0.781
16	0.115	0.212
17	0.106	2.601

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统，建立了银杏叶提取物指纹图谱的测定方法。该方法分析时间短，供试品和银杏叶对照提取物中 17 个主色谱峰分离效果良好。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算供试品和对照提取物的指纹图谱相似度，全峰相似度在 0.927 以上，满足药典中不低于 0.90 的规定。连续 6 针进样，17 个目标峰保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.106%~0.636% 和 0.152%~2.601% 之间，表明仪器精密度良好。因此，该方法可为银杏叶提取物的制剂质量控制提供帮助。



第三章 Nexera LC-40 在化药行业中的应用



化学药物是从天然矿物、动植物中提取的有效成分，以及经过化学合成或生物合成而制得的药物。结构明确的具有预防、治疗、诊断疾病，或为了调节人体功能、提高生活质量、保持身体健康的特殊化学品。随着生产技术日益先进，药物化学不断进展，消费者的药物开支大幅上升，促使化药行业迅猛发展。

为了保证药物的质量，保障药物上市后人们的使用安全，药物必须进行质量检测分析。如今，顺应社会的发展要求，药物检测分析技术也在不断创新，从药品的研发成分比较到药品上市前的测试再到药品在人体内代谢的过程分析再到许多相关领域，药物检测分析技术任重而道远。在我国药品质量管理法规方面，《中国药典》分析方法的发展中，色谱技术对药品进行鉴别、杂质检查和含量测定在药典中的比重逐年增加，其中，高效液相色谱法在药物分析中占有主流地位。岛津 Nexera LC-40 系统具有分离效率高、选择性好、分析速度快、灵敏度高、操作自动化及应用广泛的特点，适用于化药的检测分析。本章内容主要介绍岛津 Nexera LC-40 对化药中的主成分分析、有关物质分析及基因毒性杂质分析，充分展示仪器性能优势及特点，供化药行业从业人员参考。

第一节 主成分分析

Nexera LC-40 测定氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了氨麻苯美片中对乙酰氨基酚含量测定的方法。该方法中，对乙酰氨基酚在 0.08-30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为 0.9999。精密度实验中，对乙酰氨基酚的保留时间相对标准偏差为 0.17-0.36%；峰面积的相对标准偏差为 0.26-0.63%。供试品中对乙酰氨基酚标示量为 102.1%。实验结果表明，该方法能快速准确地测定氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 氨麻苯美片 对乙酰氨基酚

氨麻苯美片中的主成分对乙酰氨基酚，是非那西丁的体内代谢产物，通过抑制下丘脑体温调节中枢前列腺素合成酶，适用于感冒发热、关节痛、神经痛及偏头痛、癌性痛及手术后止痛。

国家药典委员会2017年10月发布了“关于氨麻苯美片国家药品标准的公示”氨麻苯美片检定方法征求意见稿。按照征求意见稿中氨麻苯美片含量测定项下要求，使用岛津 Nexera LC-40高效液相色谱仪对主成分对乙

酰氨基酚含量进行测定。系统适用性试验中，按对乙酰氨基酚峰计不低于3000；供试品中含对乙酰氨基酚的标示量应为90.0%~110.0%。

本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪建立了氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量测定方法，该系统具有分析速度快、稳定性高的特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，具体配置为：SCL-40（系统控制器），DGU-405（脱气机），LC-40BXR（输液泵），SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40C（柱温箱），SPD-M40A（二极管阵列检测器），LabSolutions Ver. 5.97（色谱工作站）。

1.2 分析条件

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

流动相：A相-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液；B相-乙腈:甲醇（5:1）

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

检测波长：245 nm

进样体积：2 μ L

洗脱方式：等度洗脱，A/B = 90/10 (v/v)

2. 样品前处理

对照品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取对乙酰氨基酚对照品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释成每1 mL中约含20 μ g的溶液，即得。

供试品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取本品10片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于对乙酰氨基酚20 mg），置100 mL量瓶中，加流动相适量，振摇使对乙酰氨基酚溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液5 mL，置50 mL量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

3. 结果与讨论

3.1 系统适用性试验

按照1.2中分析条件对2中对照品溶液进行测定，色谱图如图1所示。对乙酰氨基酚峰理论塔板数为4459，符合系统适用性要求（征求意见稿含量测定项下系统适用性试验按对乙酰氨基酚峰计不低于3000）。Nexera LC-40系统二极管阵列检测器SPD-M40经过光学系统改良，具备了卓越的降噪能力，指定条件下噪音低于 4.5×10^{-6} AU。同时，灯室、流通池和光谱仪具有三重控温技术，有效降低温度波动引起的波长变化，即使室温波动达到10 $^{\circ}$ C也能得到稳定的基线。

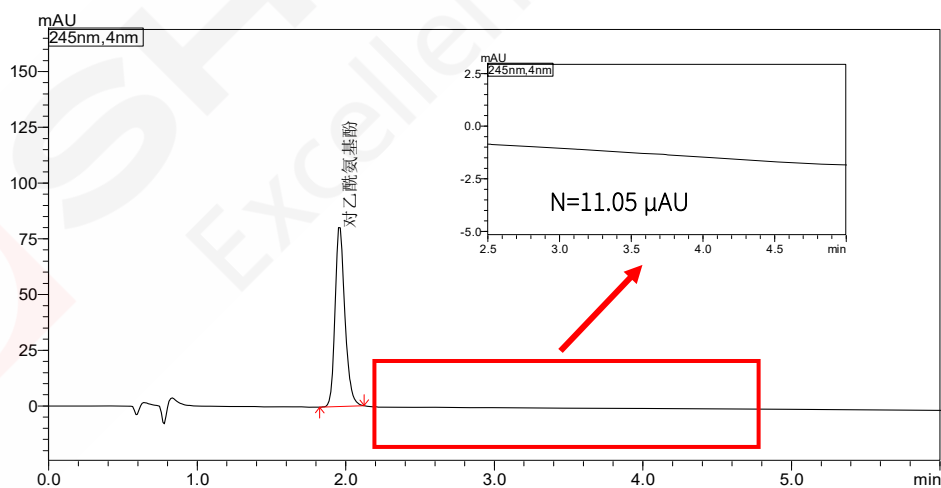


图 1. 对照品溶液系统适用性色谱图 (20 μ g/mL)

3.2 标准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 2 所示，对乙酰氨基酚在 0.08-30.0 μ g/mL 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9999，具体结果见表 1。

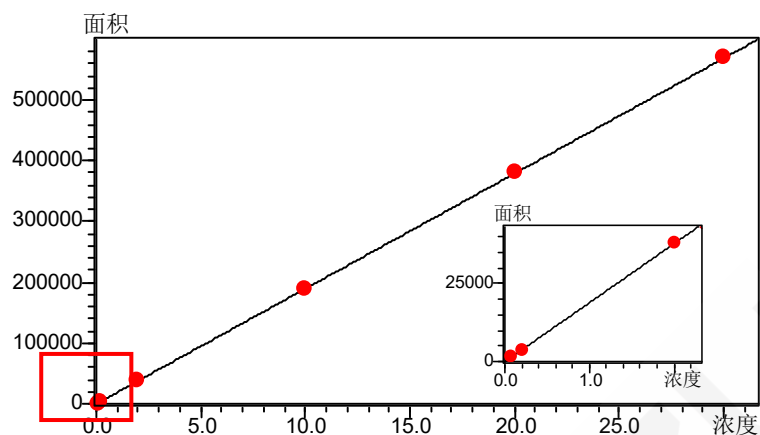


图 2. 对乙酰氨基酚标准曲线

表 1. 标准曲线参数

名称	英文名称	CAS No.	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数	准确度%
对乙酰氨基酚	Paracetamol	103-90-2	0.08-30.0	$Y = (18957.8)X + (-55.7310)$	0.9999	98.0-102.2

3.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.2、2.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对乙酰氨基酚对照品溶液分别连续进样测定 6 次重复性色谱图如图 3 所示。对乙酰氨基酚的保留时间 RSD% 为 0.17-0.36%；峰面积 RSD% 为 0.26-0.63%，结果见表 2。结果表明 Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度。

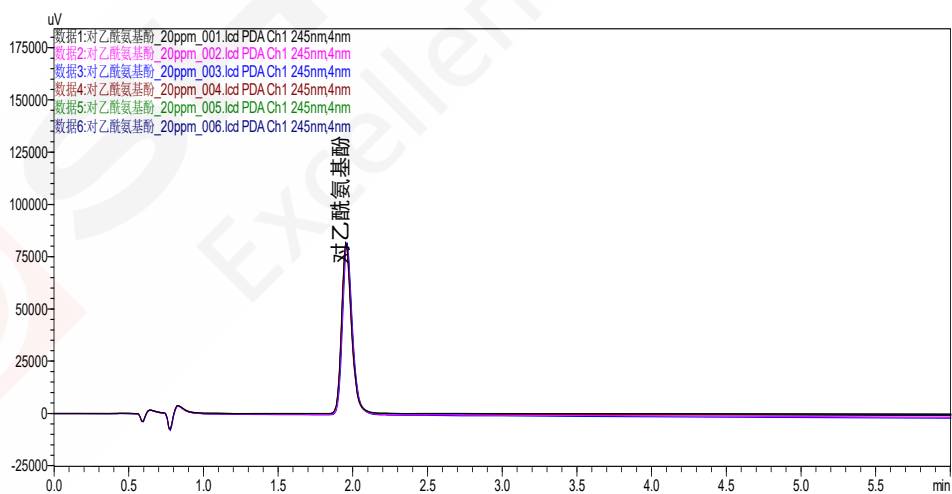


图 3. 对照品溶液重复性色谱图 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表 2. 对乙酰氨基酚对照品溶液精密度的结果 (n=6)

	0.2 µg/mL		2.0 µg/mL		20.0 µg/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.032	3,687	2.024	37,889	1.954	379,694
2	2.032	3,646	2.030	37,697	1.957	378,764
3	2.037	3,693	2.029	37,767	1.961	381,454
4	2.018	3,692	2.014	37,642	1.953	379,380
5	2.021	3,648	2.028	37,790	1.958	380,882
6	2.030	3,654	2.027	37,517	1.955	380,031
平均值	2.028	3,670	2.025	37,717	1.956	380,034
RSD(%)	0.36	0.63	0.29	0.34	0.17	0.26

3.4 样品含量测定

取某厂家生产的氨麻苯美片（规格：每片含对乙酰氨基酚325 mg）10片，精密称定，平均片重为543.51 mg。研细，精密称取35.24 mg粉末，按照2中步骤得到供试品溶液，上机分析。供试品溶液连续进样测定6次，对乙酰氨基酚的保留时间RSD%为0.04%，峰面积为0.26%，仪器精密度良好。供试品溶液色谱图及重复性色谱图如图4-图5所示，供试品溶液重复性结果见表3。使用外标法定量，计算得到供试品中对乙酰氨基酚标示量为102.1%，符合征求意见稿要求（征求意见稿含量测定项下供试品中含对乙酰氨基酚的标示量应为90.0%~110.0%）。

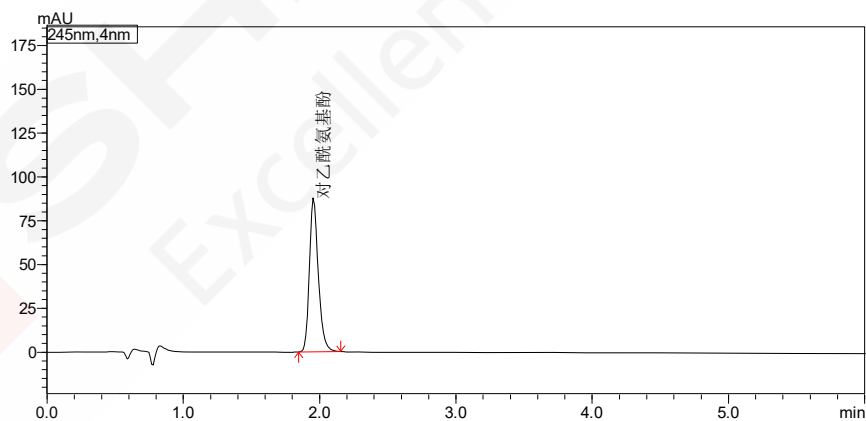


图 4. 供试品溶液色谱图

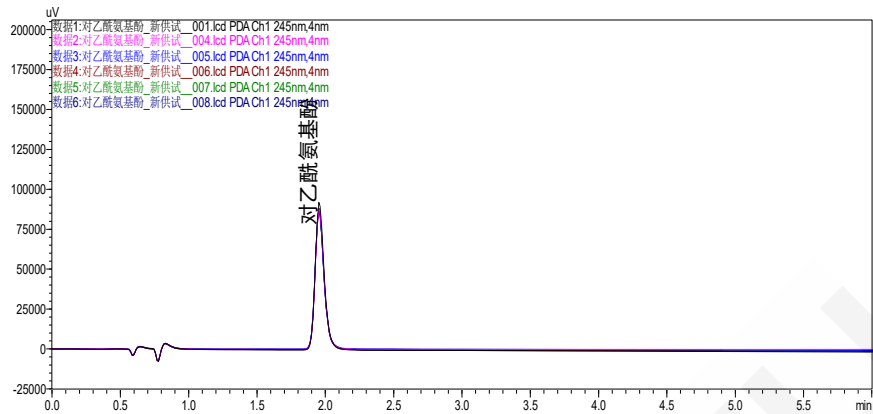


图 5. 供试品溶液连续 6 针重复性色谱图

表 3. 供试品溶液重复性结果 (n=6)

对乙酰氨基酚			
	R.T.	Area	浓度 (µg/mL)
1	1.955	408,727	21.58
2	1.955	406,567	21.47
3	1.954	405,748	21.43
4	1.954	407,830	21.54
5	1.953	407,786	21.53
6	1.954	407,275	21.51
平均值	1.954	407,322	21.51
RSD (%)	0.04	0.26	

4. 结论

本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，参照“关于氨麻苯美片国家药品标准的公示”氨麻苯美片检定方法征求意见稿中含量测定项，建立了氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的含量测定方法。结果表明，对乙酰氨基酚峰理论塔板数为4459；对乙酰氨基酚在0.08-30.0 µg/mL线性范围内线性良好，相关系数为0.9999。精密度实验中，对乙酰氨基酚的保留时间相对标准偏差为0.17-0.36%；峰面积的相对标准偏差分别为0.26-0.63%，仪器精密度良好；供试品中对乙酰氨基酚标示量为102.1%，结果均符合征求意见稿要求。

岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪分析速度快、稳定性良好、结果准确度高，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

Nexera LC-40 测定复方氯唑沙宗片中有效成分的含量

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了复方氯唑沙宗片中有效成分含量测定的方法。该方法中，氯唑沙宗在 0.3-300.0 $\mu\text{g/mL}$ 、对乙酰氨基酚在 0.36-360.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数均大于 0.999。精密度实验中，氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的保留时间相对标准偏差为 0.11-0.33%；峰面积的相对标准偏差为 0.04-0.57%。供试品中氯唑沙宗标示量为 101.3%，对乙酰氨基酚标示量为 105.7%。实验结果表明，该方法能快速准确地测定复方氯唑沙宗片中有效成分的含量。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 复方氯唑沙宗片 氯唑沙宗 对乙酰氨基酚

复方氯唑沙宗片适用于各种急性、慢性软组织扭伤、挫伤，运动后肌肉酸痛、肌肉劳损所引起的疼痛、由中枢神经病变引起的肌肉痉挛，以及慢性筋膜炎等。其有效成分对乙酰氨基酚为非甾体类解热镇痛药，通过抑制前列腺素的合成而产生镇痛、解热作用；氯唑沙宗为一种中枢性骨骼肌松弛剂，通过作用于脊髓和大脑皮层下中枢，缓解痉挛所致疼痛并增加受累肌肉的灵活性。

国家药典委员会2019年3月发布了“关于

复方氯唑沙宗片标准的公示”复方氯唑沙宗片检定方法征求意见稿。按照征求意见稿中复方氯唑沙宗片含量测定项下要求，供试品中含氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的标示量均应为 90.0%~110.0%。

本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪建立了复方氯唑沙宗片中氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的含量测定方法，该系统具有分析速度快、稳定性高的特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，具体配置为：SCL-40（系统控制器），DGU-405（脱气机），LC-40B XR（输液泵），SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40C（柱温箱），SPD-M40A（二极管阵列检测器），LabSolutions Ver. 5.97（色谱工作站）。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack VP-ODS（4.6 mm I.D. \times 150 mm L，5 μm ）

流动相：A相-0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液；B相-甲醇

流速：1.0 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：280 nm

进样体积：5 μ L

洗脱方式：等度洗脱，A/B = 60/40 (v/v)

2. 样品前处理

对照品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取对氯唑沙宗和乙酰氨基酚对照品各适量，精密称定，加甲醇适量使溶解，用流动相定量稀释制成每1 mL中分别约含0.25 mg与0.30 mg的混合溶液，即得。

供试品溶液制备：参照征求意见稿含量测定项下测定法，取本品10片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于氯唑沙宗25 mg），置100 mL量瓶中，加甲醇适量，振摇使氯唑沙宗和对乙酰氨基酚溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品溶液。

3. 结果与讨论

3.1 对照品溶液色谱图

按照1.2中分析条件对2中对照品溶液进行测定，色谱图如图2所示。岛津Nexera LC-40系统自动进样器SIL-40CXR具备多种预处理程序，可实现在线稀释样品溶液、在线柱前衍生、Co-injection、重叠进样等。自动进样器预处理程序稀释功能可实现在线样品溶液稀释进样，操作简便，自动化程度高，准确度高。稀释功能程序设定如图2所示，将对照品溶液（氯唑沙宗300.0 μ g/mL，对乙酰氨基酚360.0 μ g/mL）经离线手动稀释10倍（标准模式）与自动在线稀释10倍（稀释功能模式）的谱图对比，如图3所示，对比结果见表1。

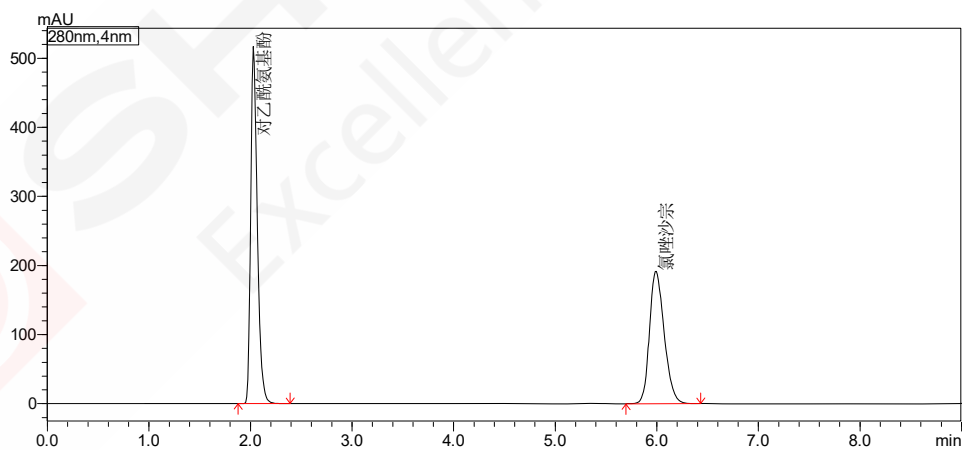


图 1. 对照品溶液色谱图（氯唑沙宗 250.0 μ g/mL，对乙酰氨基酚 300.0 μ g/mL）

模式 稀释

设置样品瓶			
	样品瓶架号	样品瓶号	偏移
原液瓶:	指定样品瓶	1	19
稀释液瓶:	指定样品瓶	1	20

设置稀释			
总体积:	100	μL	
稀释因子:	10	-> 稀释后浓度:	10 %

设置混合			
混合次数:	5	混合体积:	45 μL
混合顶部空气:	<input checked="" type="radio"/> 是 <input type="radio"/> 否	等待时间:	0.1 min

图 2. 自动进样器 SIL-40CXR 稀释功能程序设定

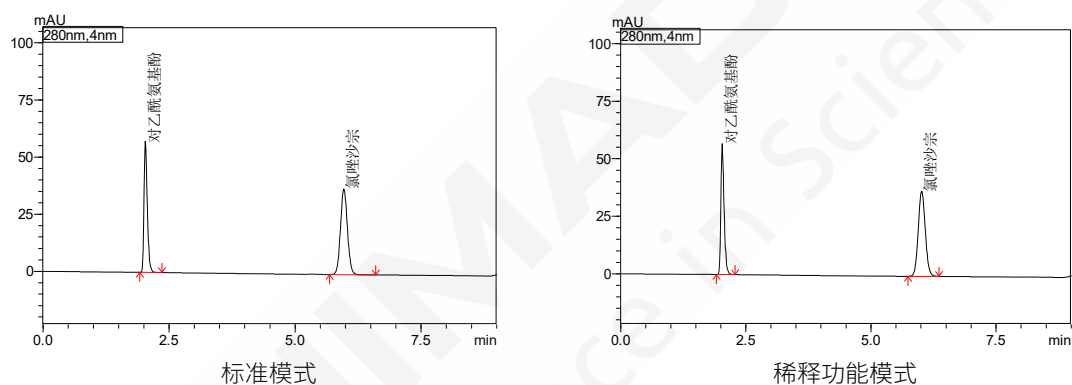


图 3. 对照品溶液色谱图 (氯唑沙宗 30.0 μg/mL, 对乙酰氨基酚 36.0 μg/mL)

表 1. 标准模式和稀释功能模式比对结果

模式	氯唑沙宗 (30.0 μg/mL)		对乙酰氨基酚 (36.0 μg/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area
标准模式	5.966	359,642	2.030	258,837
稀释功能模式	5.969	359,913	2.031	258,933

3.2 标准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 采用外标法建立标准曲线, 结果如图 4 所示, 氯唑沙宗在 0.3-300.0 μg/mL 线性浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数为 0.9997; 对乙酰氨基酚在 0.36-360.0 μg/mL 线性浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数为 0.9999, 具体结果见表 2。

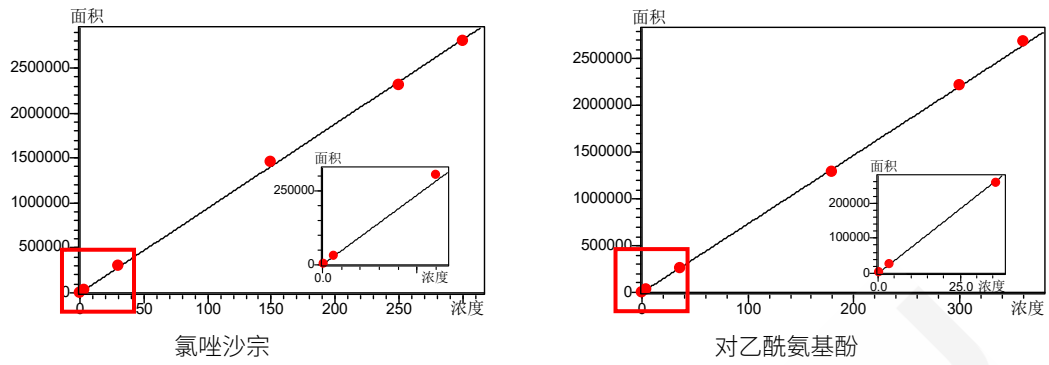


图 4. 氯唑沙宗和对乙酰氨基酚标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	英文名称	CAS No.	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数	准确度%
氯唑沙宗	Chlorzoxazone	95-25-0	0.3-300.0	$Y = (9386.80)X + 1109.64$	0.9997	85.1-108.0
对乙酰氨基酚	Paracetamol	103-90-2	0.36-360.0	$Y = (7359.77)X + (-518.142)$	0.9999	96.2-107.7

3.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择低浓度（氯唑沙宗 0.30 $\mu\text{g/mL}$ ，对乙酰氨基酚 0.36 $\mu\text{g/mL}$ ）、中浓度（氯唑沙宗 30.0 $\mu\text{g/mL}$ ，对乙酰氨基酚 36.0 $\mu\text{g/mL}$ ）、高浓度（氯唑沙宗 250.0 $\mu\text{g/mL}$ ，对乙酰氨基酚 300.0 $\mu\text{g/mL}$ ）的对照品溶液分别连续进样测定 6 次重复性色谱图如图 5 所示。氯唑沙宗的保留时间 RSD% 为 0.19-0.33%；峰面积 RSD% 为 0.04-0.57%；对乙酰氨基酚的保留时间 RSD% 为 0.11-0.14%；峰面积 RSD% 为 0.12-0.41%，结果见表 3。结果表明，Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度。

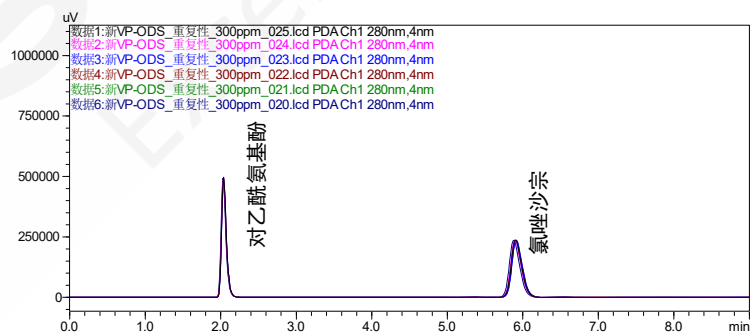


图 5. 对照品溶液重复性色谱图（氯唑沙宗 250 $\mu\text{g/mL}$ ，对乙酰氨基酚 300.0 $\mu\text{g/mL}$ ）

表 3. 对照品溶液精密度的结果 (n=6)

	低浓度(RSD%)		中浓度(RSD%)		高浓度(RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氯唑沙宗	0.33	0.57	0.19	0.09	0.22	0.04
对乙酰氨基酚	0.11	0.41	0.11	0.12	0.14	0.14

3.4 样品含量测定

取某厂家生产的复方氯唑沙宗片（规格：每片含氯唑沙宗0.125 g，含对乙酰氨基酚0.15 g）10片，精密称定，平均片重为321.10 mg。研细，精密称取68.44 mg粉末，按照2中步骤得到供试品溶液，上机分析。供试品溶液连续进样测定6次，氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的保留时间RSD%分别为0.15%和0.07%，峰面积分别为0.10%和0.22%，仪器精密度良好。供试品溶液色谱图及重复性色谱图如图6-图7所示，供试品溶液重复性结果见表4。使用外标法定量，计算得到供试品中氯唑沙宗的标示量为101.3%；对乙酰氨基酚标示量为105.7%，符合征求意见稿要求（征求意见稿含量测定项下供试品中含氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的标示量均应为90.0%~110.0%）。

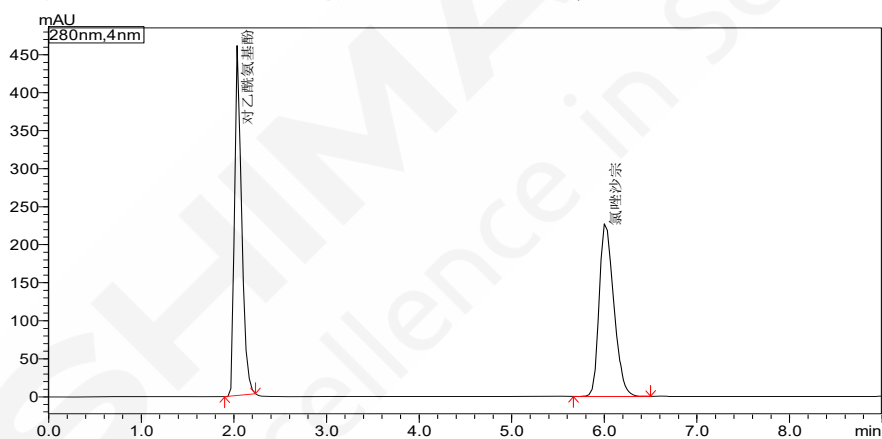


图 6. 供试品溶液色谱图

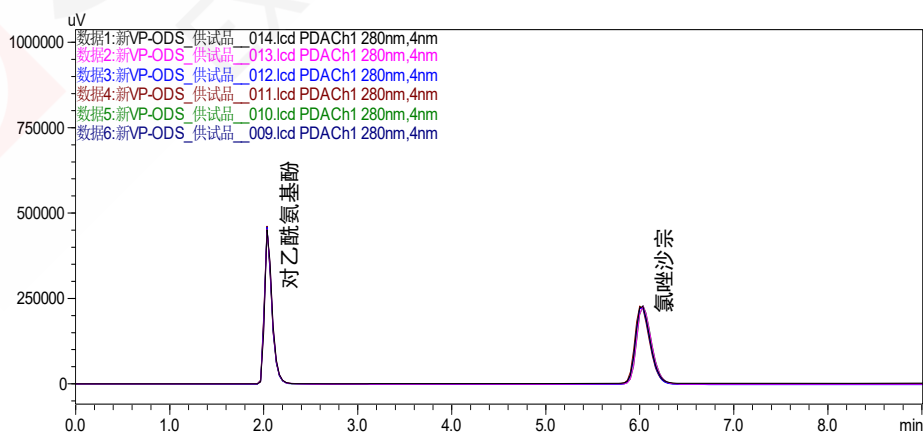


图 7. 供试品溶液连续 6 针重复性色谱图

表 4. 供试品溶液重复性结果 (n=6)

	氯唑沙宗			对乙酰氨基酚		
	R.T.	Area	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	R.T.	Area	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	6.020	2,499,895	270.46	2.042	2,448,738	338.46
2	6.034	2,504,840	271.00	2.042	2,449,027	338.50
3	6.019	2,497,946	270.25	2.040	2,446,230	338.11
4	6.011	2,497,517	270.20	2.039	2,444,493	337.87
5	6.035	2,500,478	270.53	2.041	2,437,871	336.96
6	6.020	2,500,787	270.56	2.039	2,436,579	336.78
平均值	6.023	2,500,244	270.50	2.040	2,443,823	337.78
RSD (%)	0.15	0.10		0.07	0.22	

4. 结论

本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，参照“关于复方氯唑沙宗片标准的公示”复方氯唑沙宗片检定方法征求意见稿中含量测定项，建立了复方氯唑沙宗片中有效成分含量测定的方法。结果表明，氯唑沙宗在0.3-300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、对乙酰氨基酚在0.36-360.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数均大于0.999。精密度实验中，氯唑沙宗和对乙酰氨基酚的保留时间相对标准偏差为0.11-0.33%；峰面积的相对标准偏差为0.04-0.57%，仪器精密度良好；供试品中氯唑沙宗的标示量为101.3%；对乙酰氨基酚标示量为105.7%，结果均符合征求意见稿要求。

岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪分析速度快、稳定性良好、结果准确度高，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

Nexera LC-40 测定复方愈酚喷托那敏糖浆有效成分含量

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了复方愈酚喷托那敏糖浆中愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林含量的测定方法。参考《中国药典》，实验采用 Shim-pack GIST (4.6×150 mm L, 3 μm C18-HP)，使用甲醇-乙腈-0.2%庚烷磺酸钠水溶液（磷酸调节 pH=2.6）为流动相，以 0.8 mL/min 的流速进行等度洗脱，三种目标物分别用 274 nm、215 nm 为检测波长，启用 FlowPilot（智能流量控制）与流动相预测功能，开展精密度实验与复方愈酚喷托那敏糖浆样品含量测定。实验结果表明，LC-40 Flow Pilot 功能的启用，可明显改善因输液泵突然启动所带来的压力骤变对色谱柱的冲击，流动相预测可使实验操控更加直观。愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林三物质的峰面积与保留时间 RSD% 均可在 1.26% 以内，供试品三物质实测含量均在标示量的 90%-110% 之间，符合标准要求。借助 LC-40 独特的功能与优势，所建方法可准确、快速地测定复方愈酚喷托那敏糖浆有效成分含量。

关键词：Nexera LC-40 智能流量控制 复方愈酚喷托那敏糖浆

复方愈酚喷托那敏糖浆，为镇咳祛痰类非处方药药品，常用于感冒引起的咳嗽、多痰。按照处方配比，本品每 1000 mL 含愈创木酚甘油醚 15 g、枸橼酸喷托维林 1.5 g、马来酸氯苯那敏 0.3 g、薄荷脑 0.1 g、苯甲酸 1.5 g、枸橼酸 1.0 g、蔗糖 480 g、其他辅料适量。2018 年 7 月 30 日，国家药典委员会出台《复方愈酚喷托那敏糖浆质量标准征求意见稿》，规定本品含愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林均应为标示量的 90.0%~110.0%，

含薄荷脑应为标示量的 80.0%~110.0%。

为满足国家标准检测要求，本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立复方愈酚喷托那敏糖浆中愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林含量的液相测定方法，并启用 LC-40 独特的 FlowPilot 与流动相预测功能。实验结果证明该系统具有分析速度快、稳定性高、更加智能高效等特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，具体配置为：SCL-40（系统控制器），DGU-405（脱气机），LC-40BXR（输液泵），SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40C（柱温箱），SPD-M40A（二级管阵列检测器），LabSolutions Ver. 5.97（色谱工作站）。

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack GIST (4.6×150 mm L, 3 μm C18-HP)

流动相: A相-0.2%庚烷磺酸钠水溶液 (用磷酸调节 pH 值至 2.6);

B相-甲醇/乙腈 (40/20, v/v)

流速: 0.8 mL/min

柱温: 40°C

检测波长: 274 nm (愈创木酚甘油醚)、215 nm (枸橼酸喷托维林与马来酸氯苯那敏)

进样体积: 20 μL

洗脱方式: 等度洗脱, B相浓度为 60%。

2. 样品前处理

参照国家药典委员会《复方愈酚喷托那敏糖浆质量标准征求意见稿》含量测定项下测定方法。

供试品一溶液制备: 精密量取本品5 mL, 置50 mL量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液。

供试品二溶液准备: 精密量取本品5 mL, 置50 mL量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液5 mL, 置 100 mL量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

系统适用性溶液制备: 取愈创木酚对照品适量, 精密称定, 加水溶解并稀释制成每1 mL中约含 0.1 mg的溶液, 取1 mL与供试品一溶液1 mL混合。

愈创木酚甘油醚对照品溶液制备: 取愈创木酚甘油醚对照品适量, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每1 mL中约含 0.075 mg的溶液。

枸橼酸喷托维林和马来酸氯苯那敏对照品溶液制备: 取枸橼酸喷托维林和马来酸氯苯那敏对照品各适量, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每1 mL中约含枸橼酸喷托维林0.15 mg 和马来酸氯苯那敏0.03 mg的溶液。

3. 结果与讨论

3.1 在线系统适用性试验

岛津LabSolutions软件具有丰富的智能处理功能, 实验启用岛津在线系统适应性考察功能, 按照1.2中分析条件对系统适用性溶液连续进样6次, 通过批处理采集完成该项试验, 考察愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林保留时间与峰面积的精密度与重复性, 设定要求保留时间RSD%小于1%, 峰面积RSD%小于2%, 系统适用性通过则继续分析样品, 不通过则暂时批处理表的采集分析, 智能化地监控并确认色谱系统的有效性与适用性。6次数据采集完成后, 自动输出Excel表、HTML、TXT等文本, 获得系统适用性评价报告。实验结果显示, 该项试验三种目标物的保留时间与峰面积综合评价结果为PASS, 仪器紧密度良好, 见图1、2。此外, 愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林理论塔板数分别为4268、9445、9499, 符合征求意见稿含量测定项下系统适用性试验按愈创木酚甘油醚峰与喷托维林均不低于3000的要求。

系统适用性报告

PC名称	SKCLSM-PC
方法文件名	D:\Shimadzu\岛津工作\2019年\ (19.11.03) 应用开发-LC-40检测复方愈酚喷托那敏糖浆\复方愈酚喷托那敏糖浆-上传数据\愈酚喷托那敏糖浆-Quant Method-GIST 4.6x150-3um-系统适用性.lcm
分析者	System Administrator
报告创建日期	2019/12/4 13:39:16 (+0800)
综合评价	Pass

<样品信息>

数据路径 D:\Shimadzu\岛津工作\2019年\ (19.11.03) 应用开发-LC-40检测复方愈酚喷托那敏糖浆\复方愈酚喷托那敏糖浆-上传数据

数据号	样品名	样品ID	分析日期和时间
	文件名		分析者
1	系统适用性溶液	4.6-150mm	2019/12/4 12:25:24 (+0800)
	D:\Shimadzu\岛津工作\2019年\ (19.11.03) 应用开发-LC-40检测复方愈酚喷托那敏糖浆\复方愈酚喷托那敏糖浆-上传数据\系统适用性溶液_4.6-150mm_09.lcm		System Administrator
2	系统适用性溶液	4.6-150mm	2019/12/4 12:37:54 (+0800)

图 1. 在线系统适用性评价结果

<标准>

ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	愈创木酚甘油醚	保留时间	-	-	1.000
		面积	-	-	2.000
PDA-2	氯苯那敏	保留时间	-	-	1.000
		面积	-	-	2.000
PDA-3	喷托维林	保留时间	-	-	1.000
		面积	-	-	2.000

<保留时间>

评价 Pass

数据号	PDA-1	PDA-2	PDA-3
1	2.914	5.248	9.770
2	2.915	5.251	9.777
3	2.915	5.251	9.778
4	2.915	5.251	9.777
5	2.915	5.251	9.778
6	2.915	5.252	9.780
最小值	2.914	5.248	9.770
最大值	2.915	5.252	9.780
平均值	2.915	5.251	9.777
标准偏差	0.000	0.001	0.003
%RSD	0.014	0.026	0.035

<面积>

评价 Pass

数据号	PDA-1	PDA-2	PDA-3
1	9176169	574330	1099768
2	9180941	573647	1099156
3	9177117	573476	1098169
4	9160684	572364	1096500
5	9161351	571701	1094977
6	9150617	570306	1092333
最小值	9150617	570306	1092333
最大值	9180941	574330	1099768
平均值	9167813	572637	1096817
标准偏差	11975	1482	2814
%RSD	0.131	0.259	0.257

图 2 在线系统适用性评价结果详情

3.2 精密度考察

按 1.2 项下分析条件, 对样品前处理中愈创木酚甘油醚对照品、马来酸氯苯那敏和枸橼酸喷托维林对照品分别连续进 6 次, 考察仪器精密度。实验结果显示, 三种目标物保留时间 RSD%均小于 0.04%, 峰面积 RSD%均在 1.26%以下, Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度与稳定性。

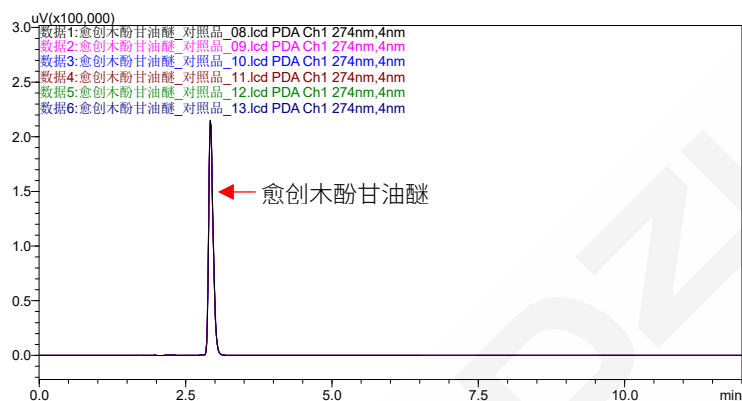


图 3. 愈创木酚甘油醚对照品溶液 6 针重复性色谱图

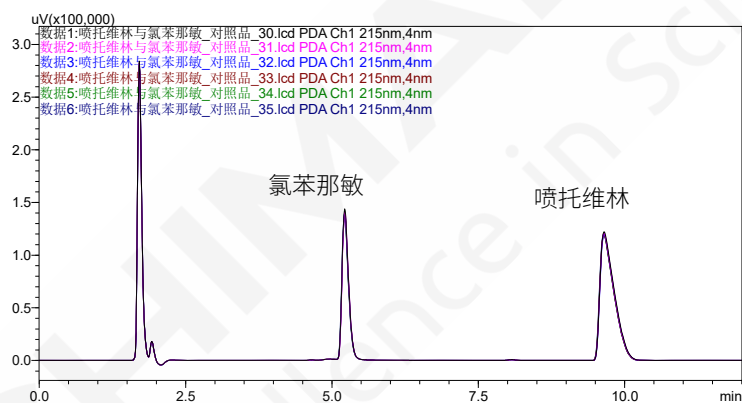


图 4. 马来酸氯苯那敏和枸橼酸喷托维林对照品溶液 6 针重复性色谱图

表 1. 对照品精密度考察结果

	愈创木酚甘油醚		马来酸氯苯那敏		枸橼酸喷托维林	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
平均值	2.925	1,155,534	5.218	1,073,354	9.646	2,036,798
RSD (%)	0.03	0.08	0.04	1.02	0.03	1.26

3.3 样品含量测定

取市售品牌的复方愈酚喷托那敏糖浆作为供试品, 按照“2.样品前处理”项下, 制备供试品一与供试品二, 分别连续进样测定六次。按照征求意见稿要求, 愈创木酚甘油醚含量以供试品二为样品计算含量, 马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林以供试品一为样品计算含量。实验结果所得, 愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林的保留时间 RSD%分别为 0.02%、0.03%、0.02%, 峰面积 RSD%分别为 0.05%、0.04%、0.05%, 仪器精密度良好。供试品溶液色谱图及重复性色谱图见图 5-8, 供试品溶液重复性结果见表 2。单点外标法定量, 计算得到供试品中愈创木酚甘油醚含量

为标识量的 102.7%，马来酸氯苯那敏含量为标识量的 108.8%，枸橼酸喷托维林含量为标识量的 109.0%，符合征求意见稿要求（征求意见稿含量测定项下供试品含愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林均应为标示量的 90.0%~110.0%）。

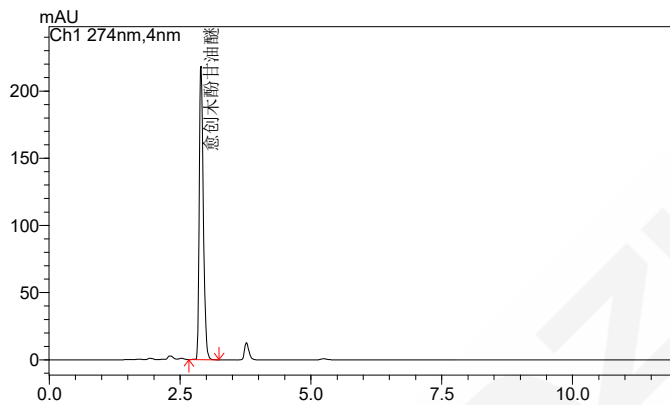


图 5. 供试品二色谱图

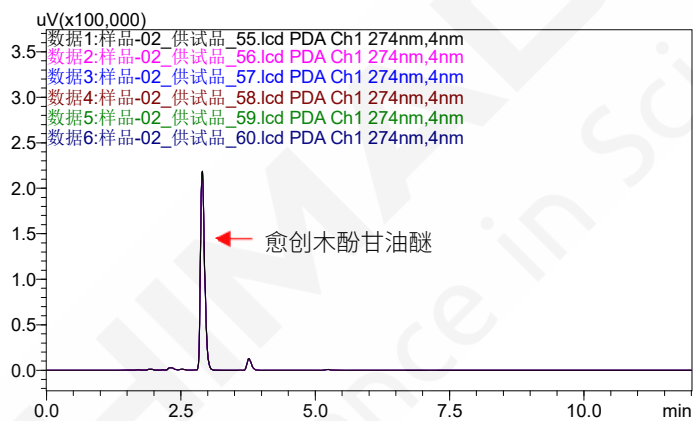


图 6. 供试品二 6 针重复性色谱图

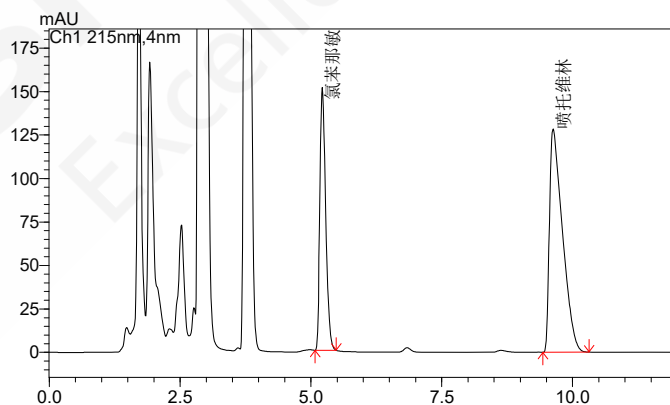


图 7. 供试品一色谱图

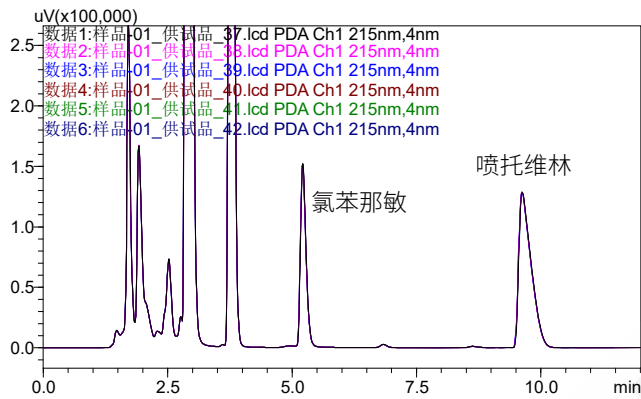


图 8. 供试品一 6 针重复性色谱图

表 2. 供试品含量重复性结果

	愈创木酚甘油醚			马来酸氯苯那敏			枸橼酸喷托维林		
	保留时间 (min)	峰面积	实测量/标 示量 (%)	保留时间 (min)	峰面积	实测量/标 示量 (%)	保留时间 (min)	峰面积	实测量/标 示量 (%)
1	2.897	1,186,866	102.7	5.216	1,167,502	108.8	9.627	2,220,836	109.0
2	2.897	1,186,593	102.7	5.213	1,168,297	108.8	9.622	2,221,327	109.1
3	2.897	1,185,635	102.6	5.212	1,167,604	108.8	9.621	2,219,566	109.0
4	2.897	1,186,751	102.7	5.213	1,167,849	108.8	9.623	2,221,221	109.1
5	2.896	1,185,502	102.6	5.213	1,168,478	108.9	9.624	2,220,073	109.0
6	2.896	1,186,429	102.7	5.214	1,167,138	108.7	9.624	2,218,852	108.9
平均值	2.897	1,186,296	102.7	5.213	1,167,812	108.8	9.624	2,220,312	109.0
RSD (%)	0.02	0.05	-	0.03	0.04	-	0.02	0.05	-

3.4 FlowPilot 功能

高效液相色谱柱可能因泵的突然启动和停止，或极端梯度变化而损坏。Nexera LC-40 系列将分析智能 (AI) 整合到仪器设备中，具有特有的 FlowPilot 功能 (智能流量控制)，可有效避免传统输液泵突然出现的压力骤变对色谱柱带来的损伤。实验启用 FlowPilot 功能，在柱温箱温度未达到设定温度前，液相输液泵会将流速逐渐增加到设定流速值的一半即流速 0.4 mL/min 稳定运行，等待柱温箱达到预设温度 40°C 并柱温稳定后，输液泵在自动将流速逐步提升至设定流速值 0.8 mL/min 稳定运行。该功能可自动运行而无需在每次分析前单独设定，实验效果见图 9。

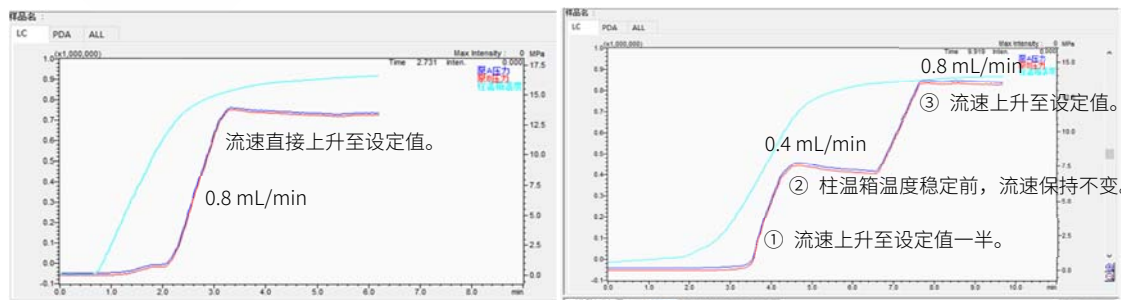


图 9. 流速启动压力对比图 (左: 无 FlowPilot 功能 右: 启用 FlowPilot 功能)

3.5 流动相精灵

Nexera LC-40 系列流动相托盘可选配内置传感器，最多可同时监测 12 个容器中的流动相或自动进样器清洗液的体积，并可通过智能设备进行远程监控。此外，分析开始之前，系统将自动计算实验完成所需流动相体积并提示，如此，不再需要担心因流动相不足而导致的分析进程中断。



图 10. 流动相精灵功能截图

4. 结论

实验参考国家药典委员会《复方愈酚喷托那敏糖浆质量标准征求意见稿》测试方法，使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立复方愈酚喷托那敏糖浆中愈酚喷托甘油醚、马来酸氯苯那敏、枸橼酸喷托维林的含量测定方法。实验结果得出，对照品与供试品中三种物质的保留时间与峰面积精密度与重复性均在 1.26% 以内，表明仪器具有良好的精密度与稳定性。对供试品进行样品含量测定，得到供试品中愈创木酚甘油醚、马来酸氯苯那敏与枸橼酸喷托维林含量均在标识量的 90.0%~110.0% 之间，符合征求意见稿质量标准要求。

岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪融合“AI”与“IoT”尖端技术，具有智能、主控、倍速、高通、精巧、便捷等多种特点与多项智能化功能。实验启用了 LC-40 FlowPilot 与流动相预测功能，极大地降低了色谱柱的使用损耗，实验操控与状态确认变得更加便捷、直观，工作效率大幅度提高。Nexera LC-40 的智能化、高效化和自动化领域将会引领全新的行业标准，为制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作提供更加便捷、高效的检测手段。

第二节 有关物质分析

NexeraLC-40 分析盐酸多西环素中的有关物质

摘要：本文参考美国药典（USP），采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素中有关物质分析的超高效液相色谱测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120（2.1 mm I.D.×50mm L，1.9 μm），以甲醇-水（含磷酸二氢钾、EDTA·Na₂、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5）为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件设置系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均>1.5，满足测定需求。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 盐酸多西环素 有关物质

多西环素（Doxycycline）又名强力霉素或脱氧土霉素，是一种半合成的抗生素，临床上作为广谱抑菌剂，高浓度时具有杀菌功能。该药品以发酵产生的土霉素为原料，经氯代、脱水、催化氢化、转化和成盐等单元反应制备而成。药典将从起始原料带入、生产过程氢化反应不完全、反应副产物等杂质，如：杂质A-6-表多西环素（6-epidoxycycline）、杂质B-甲烯土霉素（metacycline）、杂质C-4-表-多西环素（4-epidoxycycline）、杂质D-4、6-表多西环素（4、6-epidoxycycline）、杂质E-土霉素（oxytetracycline）、杂质F-2-acetyl-2-decarbamoylexycycline等有关物质。因其疗效低、毒性大，各国药典对有关物质的含量进行了限定。《中国药典》2015版规定，杂质A和B面积不得大于对照溶液主峰面积（2.0%），其他单个杂质峰面积不得大于主峰的0.5倍（1.0%），各杂质峰面积之和不得大于对照溶

液主峰面积的2倍（4.0%）。美国药典（USP）采用主成分自身对照法，限定杂质C的限量<0.5%，未知杂质之和<0.5%，总杂质<2.0%。

文献报道，四环素类抗生素会发生光降解，在高温、强酸、强碱、氧化条件下稳定性差。USP采用了超高效液相色谱法，分析时间更短，样品稳定性更好，流动相消耗更少。

本实验参考USP药典，使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，以亚2 μm填料色谱柱进行分离，建立了盐酸多西环素中有关物质的分析方法。Nexera LC-40高效液相色谱仪是岛津公司2019年推出的液相新产品，该产品秉承了岛津一直以来的设计理念，同时还引入了智能分析(AI)、智能物联(IoT)等尖端技术。Nexera LC-40系统耐压70 Mpa，可满足大部分超高效液相分析需求。自动进样器SIL-40CXR采用空气循环式控温，更均匀，有效避免样品降解，配置的二极管阵列检测器SPD-M40具

有极高的灵敏度和卓越的线性范围 (2.5 AU)，能准确定量检测痕量的杂质组分,可为有关物质分析提供参考。
三重控温技术能有效降低基线噪音并提供稳定的基线,因此,即使在高浓度的样品中,也

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪,包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B XR 输送泵, SIL-40CXR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40A 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm i.d.×50mm L., 1.9 μm)

流动相: A, 水 (每升含 3.1 g 磷酸二氢钾、0.5 g EDTA·Na₂、0.5 mL 三乙胺, 氢氧化钠调节 pH=8.5); B, 甲醇

流速: 0.6 mL/min

柱温: 60°C

检测波长: 350 nm

进样体积: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Pumps	Pump B Conc.	10
9.00	Controller	Stop	

2. 样品前处理

样品: 盐酸多西环素片 (市售, 规格: 0.1 g, 批号: 20190204, 有效期至2022.01)

稀释剂: 0.01 M盐酸

系统适应性储备溶液1: 1 mg/mL β-多西环素和盐酸甲烯土霉素, 溶剂为0.01 M盐酸。

系统适应性储备溶液2: 1.2 mg/mL盐酸多西环素, 溶剂为0.01 M盐酸

系统适应性溶液: 取5 mL系统适应性储备溶液2至25 mL容量瓶, 加热60 min, 加热至干燥, 小心不要烧焦, 将残留物溶解在稀释剂中, 加入0.5 mL系统适应性储备溶液1, 以稀释剂定容。过滤。这份溶液包括4-epi多西环素、多西环素有关物质A、甲烯土霉素以及多西环素, 可以保存14 d。

样品溶液：0.25 mg/mL多西环素，稀释剂溶解。操作流程，取不少于20片剂研钵磨粉，取一部分至容量瓶，加50%稀释剂，超声5 min，振摇15 min，定容。过0.22 μm滤膜。

标准溶液：1.5 μg/mL，取适量多西环素标准品，超声溶解，稀释剂定容。

分离度：>1.5，4-epi多西环素和甲烯土霉素；>1.5，4-epi多西环素、多西环素有关物质A；>1.5，多西环素有关物质A和多西环素。

相对标准偏差：<5.0%多西环素峰，标准溶液。

3. 结果与讨论

3.1 系统适应性考察

岛津LabSolutions软件拥有丰富智能的批处理功能，可以实现系统适应性的自动判别，省去了繁琐的人工核验。在方法中设置系统适应性参数,并在批处理中选择相应的判定条件，系统适应性通过则继续样品分析，否则暂停分析。批处理运行后，自动输出一份系统适应性考察结果的HTML文件，如图2所示。由图1所知，标准溶液连续分析6次，多西环素峰面积相对标准偏差（RSD）=2.05%，满足USP药典关于多西环素峰面积重复性的要求。

<标准>					
ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	面积	-	-	5.000

<面积>	
评价	Pass
数据号	PDA-1
1	44408
2	45564
3	46383
4	45815
5	44518
6	44061
平均值	45125
%RSD	2.047

图 1. 系统适应性输出结果

USP药典要求，多西环素、多西环素有关物质A、4-epi多西环素、甲烯土霉素等相邻峰之间分离度大于1.5。在采集方法中设置分离度参数，批处理分析后，即自动出具分离度的系统适应性结果，如图2所示，多西环素与多西环素有关物质A分离度为2.8，多西环素有关物质A与4-epi多西环素之间的分离度为1.7，4-epi多西环素与甲烯土霉素分离度为4.8，分离度均大于1.5，满足要求。

<样品信息>

数据路径 D:\ZX\DOX

数据号	样品名	样品ID	分析日期和时间
	文件名		分析者
1	系统适应性		2019/9/4 11:44:46 (+0800)
	D:\ZX\DOX\0904_系统适应性_00 4.lcd		System Administrator

<标准>

ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	分离度	1.500	100.000	-
PDA-2	多西环素有关A	分离度	1.500	100.000	-
PDA-3	4epi多西环素	分离度	1.500	100.000	-

<分离度>

评价 Pass

数据号	PDA-1	PDA-2	PDA-3
1	2.819	1.709	4.829

图 2. 系统适应性输出结果

3.2 色谱图

稀释剂、系统适应性溶液和标准溶液色谱图如下所示。稀释剂色谱图无干扰峰，系统适应性溶液色谱图中多西环素和杂质分离良好。

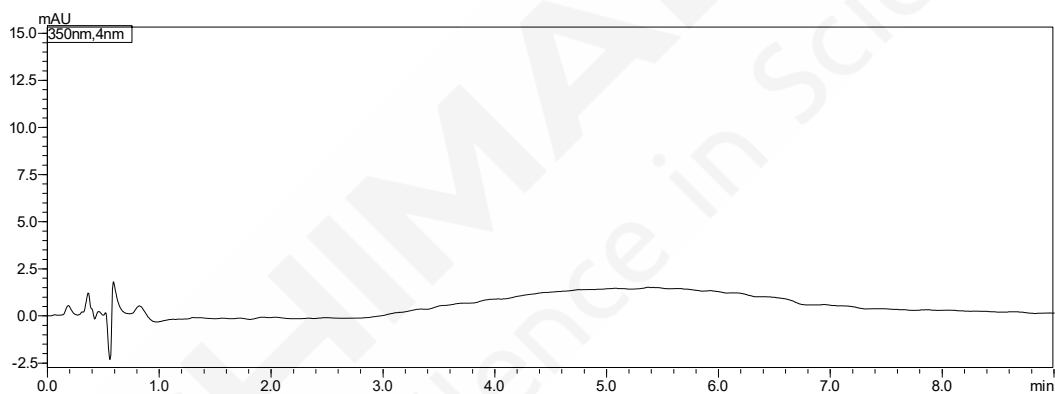


图 3. 空白溶剂色谱图

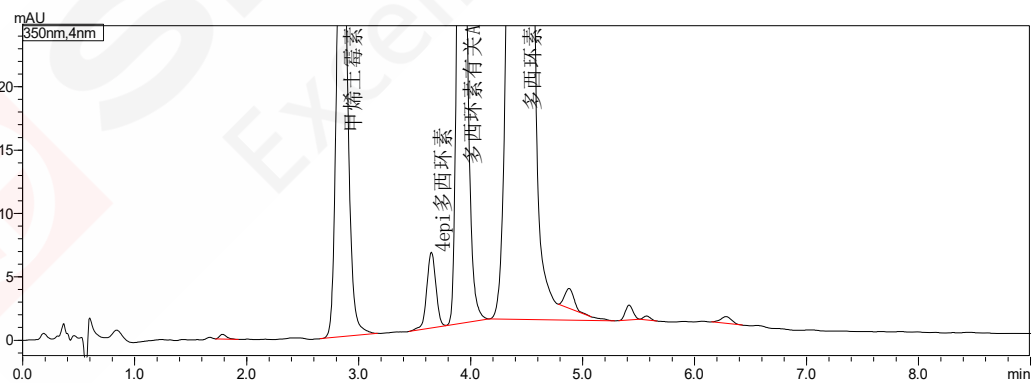


图 4. 系统适应性色谱图

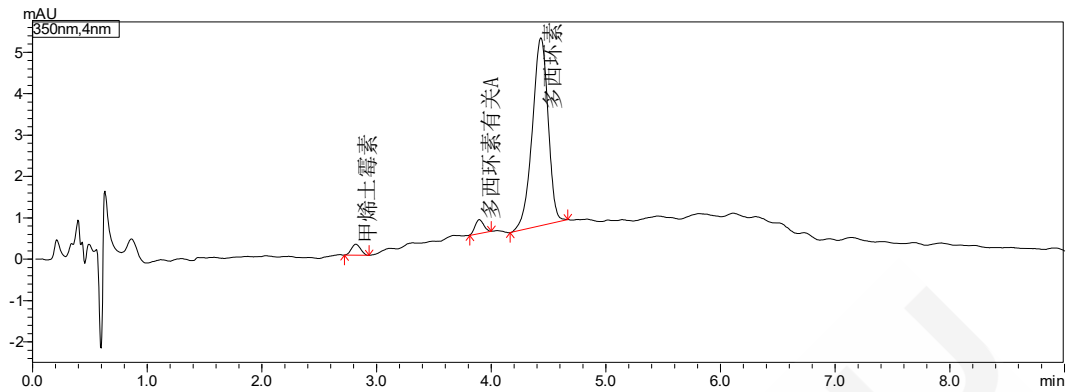


图 5. 标准溶液色谱图 (1.5 µg/mL)

3.3 样品测定

按前述条件，制备样品溶液，并分析。结果如图 6 所示，多西环素、有关物质 A、4-epi 多西环素邻近峰之间实现了基线分离。

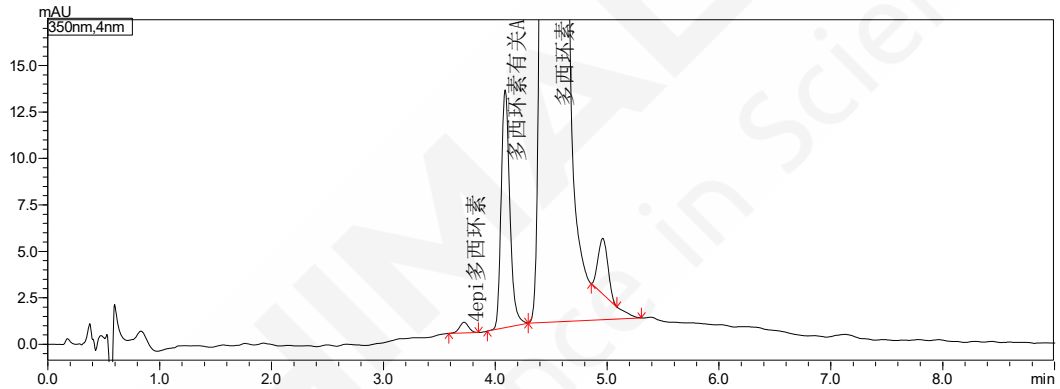


图 6. 样品溶液色谱图 (0.25 mg/mL)

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素片中有关物质测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm I.D.×50mm L, 1.9µm)，以甲醇-水 (含磷酸二氢钾、EDTA·Na₂、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5) 为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件进行系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均>1.5，满足测定需求。

Nexera LC-40 测定阿托伐他汀钙片的有关物质

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了阿托伐他汀钙片中的有关物质测定方法。该方法中符合征求意见稿中阿托伐他汀钙片检查项下有关物质系统适用性要求。限度结果中，供试品溶液中杂质 I 峰面积为对照溶液主峰面积的 0.53 倍；杂质 IV 峰面积为对照溶液主峰面积的 0.25 倍；杂质 VI 峰面积为对照溶液主峰面积的 4.6 倍，各杂质峰面积的和为对照溶液主峰面积的 5.42 倍。实验结果表明，该方法能快速准确地测定阿托伐他汀钙片中的有关物质。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 阿托伐他汀钙片

阿托伐他汀钙片为高胆固醇血症和冠心病药物，能有效降低非致死性心肌梗死的风险，降低致死性和非致死性卒中的风险、降低血管重建术的风险，降低因充血性心力衰竭而住院的风险，降低心绞痛的风险。

国家药典委员会2019年7月发布了“关于阿托伐他汀钙片国家药品标准修订草案的公示”阿托伐他汀钙片检定方法征求意见稿。按照征求意见稿中阿托伐他汀钙片检查项下有

有关物质检定要求，使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪对阿托伐他汀钙片有关物质进行测定。

本实验使用Nexera LC-40高效液相色谱仪建立了阿托伐他汀钙片中的有关物质测定方法，该系统具有分析速度快、稳定性高的特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，具体配置为：SCL-40（系统控制器），DGU-405（脱气机），LC-40BXR（输液泵），SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40C（柱温箱），SPD-M40A（二极管阵列检测器），LabSolutions Ver. 5.97（色谱工作站）。

1.2 分析条件

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

流 动 相：A 相-20 mmol/L 醋酸铵溶液（冰醋酸调节 pH 值至 4.4）；B 相-乙腈

流 速：0.3 mL/min

柱 温：35℃

检测波长：254 nm

进样体积：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 42%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
7.00	泵	B Conc	42
10.00	泵	B Conc	90
14.00	泵	B Conc	100
14.10	泵	B Conc	42
20.00	控制器	Stop	

1.3 Nexera LC-40 流量到达时间设定

岛津Nexera LC-40系列液相色谱仪新增流量到达时间设定功能。使用该功能时，设定流量到达的时间，平衡色谱柱时，流速逐步上升至设定流速的一半并维持至柱温箱就绪状态；此时流速再逐步上升至流速设定值。此功能有效地延长色谱柱使用寿命，避免了平衡色谱柱时压力瞬间升高对色谱柱造成损害。

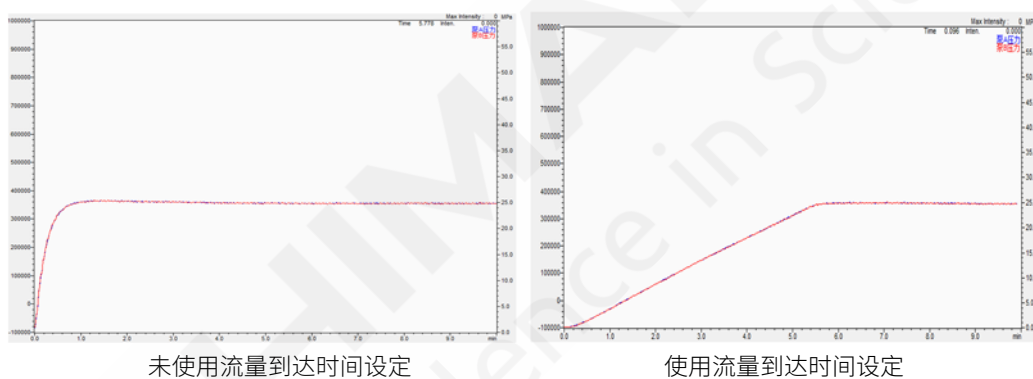


图 1. 压力曲线图

结束时间: min

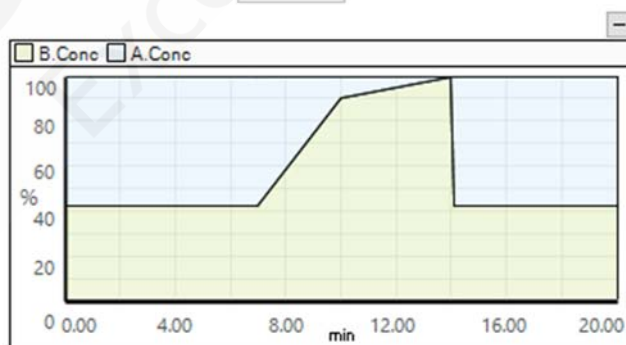


图 2. 泵参数设定 (仪器参数视图)

2. 样品前处理

供试品溶液制备：参照征求意见稿检查项下有关物质测定法，取供试品适量，研细，取细粉适量，加二甲基甲酰胺适量，超声约5分钟使阿托伐他汀钙溶解并稀释制成每1 ml中约含阿托伐他汀1 mg的溶液，滤过，取续滤液。（临用新制）

对照溶液制备：参照征求意见稿检查项下有关物质测定法，精密量取供试品溶液5 ml，置100 ml量瓶中，用二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀，再精密量取2 ml，置50 ml量瓶中，用二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

系统适用性溶液制备：参照征求意见稿检查项下有关物质测定法，取阿托伐他汀钙与杂质I、杂质II、杂质III、杂质IV、杂质V、杂质VI、杂质VII对照品各约2.5mg，置50 ml量瓶中，加二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

灵敏度溶液制备：参照征求意见稿检查项下有关物质测定法，精密量取对照溶液适量，用二甲基甲酰胺定量稀释成每1 ml中含0.5 μg 的溶液。

3. 结果与讨论

3.1 系统适用性试验

按照1.2中分析条件对2中系统适用性溶液进行测定，色谱图如图3所示。系统适用性溶液色谱图中，出峰顺序为杂质VII峰、杂质I峰、杂质II峰、阿托伐他汀峰、杂质III峰、杂质IV峰、杂质VI峰、杂质V峰，符合系统适用性要求。阿托伐他汀峰与杂质II峰之间的分离度为1.78，符合系统适用性要求（征求意见稿检查项下有关物质系统适用性要求阿托伐他汀峰与杂质II峰之间的分离度应不小于1.5）。灵敏度溶液色谱图如图5所示，阿托伐他汀峰峰高信噪比为58.96，符合系统适用性要求（征求意见稿检查项下有关物质系统适用性要求灵敏度溶液色谱图中，阿托伐他汀峰峰高的信噪比应不小于10）。

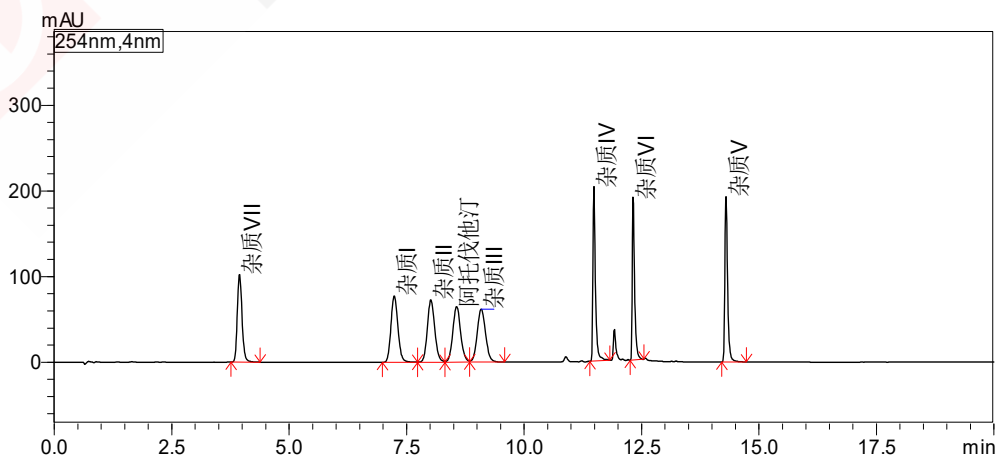


图 3. 系统适用性溶液色谱图

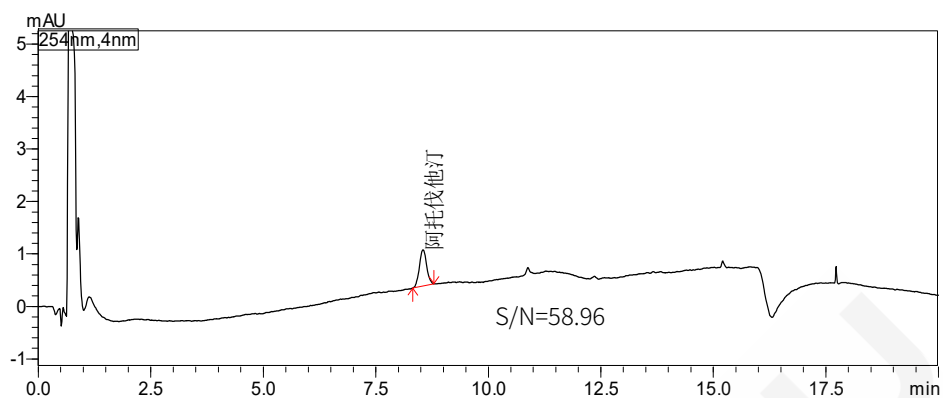


图 4. 灵敏度溶液色谱图

3.2 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择系统适用性溶液连续进样测定 6 次重复性色谱图如图 5 所示。8 种化合物的保留时间 RSD% 为 0.04-0.13%；峰面积 RSD% 为 0.14-0.34%，结果见表 2。精密度实验结果表明，Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度。

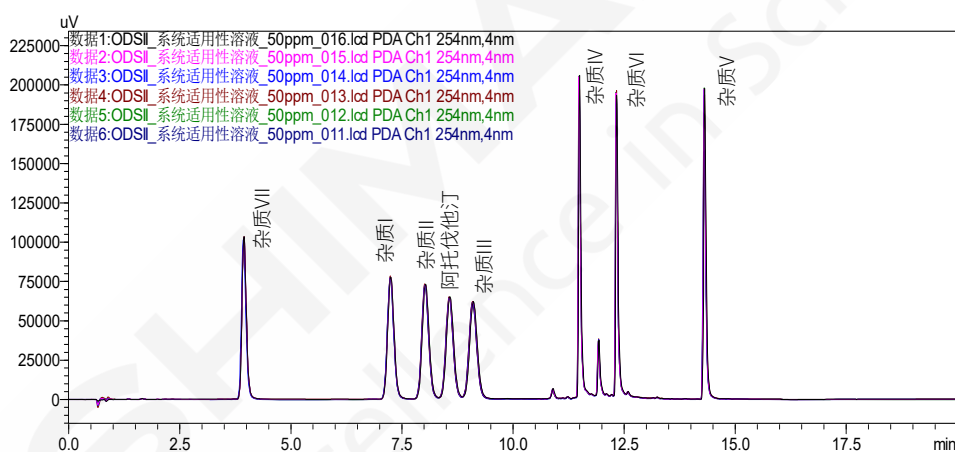


图 5. 对照品溶液重复性色谱图

表 2. 系统适用性溶液精密度结果 RSD% (n=6)

化合物名称	保留时间 (min)	峰面积
阿托伐他汀	0.09	0.17
杂质 I	0.08	0.18
杂质 II	0.09	0.18
杂质 III	0.09	0.16
杂质 IV	0.04	0.31
杂质 V	0.04	0.19
杂质 VI	0.04	0.34
杂质 VII	0.13	0.14

3.3 限度结果

按 1.2 中的分析条件进行测定，供试品溶液色谱图如图 6 所示，对照溶液色谱图如图 7 所示。供试品溶液、对照溶液及灵敏度溶液各峰面积结果见表 3。供试品溶液色谱图中杂质 II、杂质 III、杂质 V 和杂质 VII 峰面积小于灵敏度溶液主峰面积，忽略不计；杂质 I 峰面积为对照溶液主峰面积的 0.53 倍；杂质 IV 峰面积为对照溶液主峰面积的 0.25 倍；杂质 VI 峰面积为对照溶液主峰面积的 4.6 倍，杂质 I、杂质 IV 峰面积符合限度规定，杂质 VI 峰面积不符合限度规定（征求意见稿检查项下有关物质限度规定，供试品溶液色谱图中杂质 I、杂质 II、杂质 IV 和杂质 VI 峰面积分别不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍）。供试品溶液色谱图中各杂质峰面积的和为对照溶液主峰面积的 5.42 倍，符合限度规定（征求意见稿检查项下有关物质限度规定，供试品溶液色谱图中各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 10 倍）。

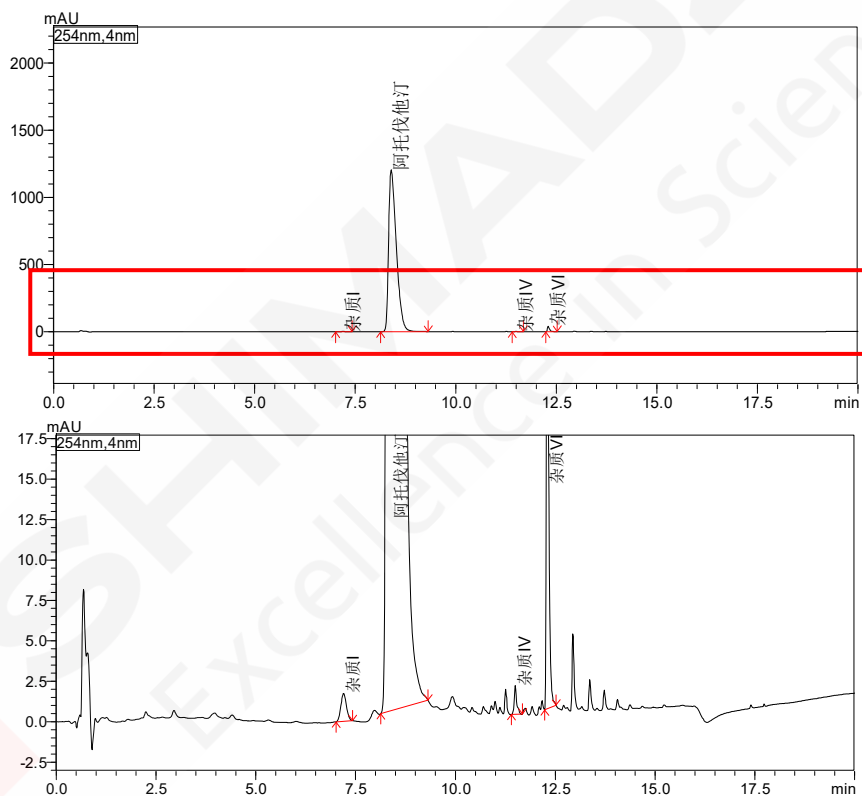


图 6. 供试品溶液色谱图

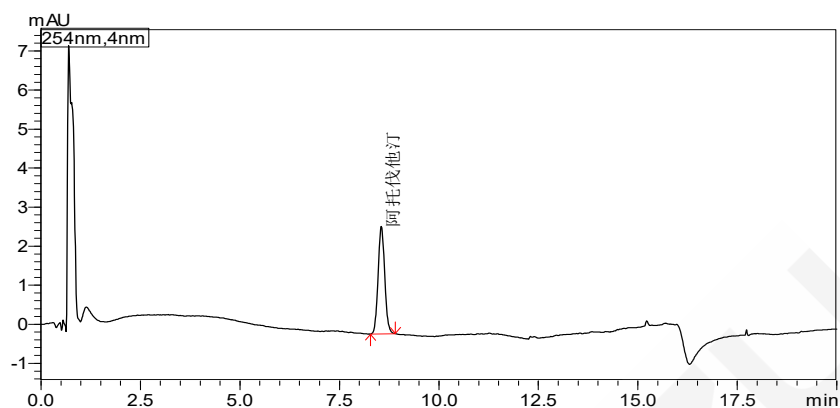


图 7. 对照溶液色谱图

表 3. 供试品溶液、对照溶液及灵敏度溶液各化合物峰面积结果 (n=6)

化合物名称	供试品溶液	对照溶液	灵敏度溶液
阿托伐他汀	16111548	31430	6847
杂质 I	16683	N.D.	N.D.
杂质 II	N.D.	N.D.	N.D.
杂质 III	N.D.	N.D.	N.D.
杂质 IV	7782	N.D.	N.D.
杂质 V	N.D.	N.D.	N.D.
杂质 VI	145756	N.D.	N.D.
杂质 VII	N.D.	N.D.	N.D.

注: N.D.= Not Detected。征求意见稿检查项下有关物质限度规定, 小于灵敏度溶液主峰面积的色谱峰忽略不计。

4. 结论

本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪, 参照“关于阿托伐他汀钙片国家药品标准修订草案的公示”阿托伐他汀钙片检定方法征求意见稿中检查项, 建立了阿托伐他汀钙片中有关物质测定方法。结果表明, 阿托伐他汀钙片检查项下有关物质系统适用性符合征求意见稿要求。限度结果中, 供试品溶液中杂质VI峰面积为对照溶液主峰面积的4.6倍, 不符合征求意见稿限度规定; 其余结果均符合征求意见稿限度规定。

岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪分析速度快、稳定性良好、结果准确度高, 适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

Nexera LC-40 结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质测定方法。对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中采用了自动进样器 Co-injection 功能，相较于传统的直接进样（标准模式）可以获得更高的柱效及分离度；系统适用性试验，空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定干扰情况及分离度溶液测试结果均满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.051 $\mu\text{g/mL}$ 。精密度实验中，双氯芬酸钠的保留时间相对标准偏差为 0.040~0.071%；峰面积的相对标准偏差为 0.191~1.621%。供试品中单个杂质均小于 0.5%，并且总杂质小于 1.0%，结果符合药典要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 双氯芬酸钠肠溶片 有关物质

双氯芬酸钠肠溶片为解热镇痛及非甾体抗炎镇痛药，用于缓解各种关节炎的关节肿痛症状，治疗非关节性的各种软组织风湿性疼痛，急性的轻、中度疼痛，对成人和儿童的发热有解热作用。其主要靠抑制环氧合酶减少前列腺素的合成，以及一定程度上抑制脂氧酶而减少白三烯、缓激肽等产物的生成而发挥解热镇痛及抗炎作用。

国内外对双氯芬酸钠制剂的HPLC方法报

道较多，但较少有使用UHPLC法对其有关物质进行检测的研究。和HPLC法相比，UHPLC法能有效节省分析时间和有机溶剂的消耗。

参照2015版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下方法，本研究采用岛津新款液相色谱仪LC-40，建立UHPLC法测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质，该方法准确、快速、灵敏度高，可用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 NexeraLC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B XR 输送泵，SIL-40CXR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SPD-M40A 检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D.×100mm L, 2.2 μm)

流动相：A 相-4%冰醋酸溶液；B 相-甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

检测波长：254 nm

进样体积：4 μL

洗脱方式：等度洗脱，A/B = 35/65 (v/v)

2. 样品前处理

供试品溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，取本品细粉适量（约相当于双氯芬酸钠 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使双氯芬酸钠溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，离心，取上清液作为供试品溶液。

对照溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，另取邻苯二甲酸二乙酯 5 mg，置 200 mL 量瓶中，精密加供试品溶液 1 mL，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

分离度溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠有关物质项下，取双氯芬酸钠对照品适量，用水制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液，取该溶液暴露于紫外光灯（254 nm）下照射 15 分钟，取 4 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，在与主峰相对保留时间约 0.8 处出现一杂质峰，两者的分离度应大于 6.0。

3. 结果与讨论

3.1 进样模式考察

岛津Nexera LC-40系统自动进样器SIL-40CXR具备多种预处理程序，可实现在线稀释样品溶液、在线柱前衍生、Co-injection、重叠进样等多项功能。Co-injection模式相较传统直接进样（标准模式）可以去除溶剂效应，改善峰型，提高定量灵敏度。尤其当样品溶液含高比例有机溶剂时，可以直接进样分析而无需担心溶剂效应。本实验选择以水作为同时注入试剂，Co-injection模式程序设定如图1所示。将100%甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式与Co-injection模式的谱图对比，如图2所示；对照溶液分别在两种模式下连续进样测定6次重复性色谱图如图3及图4所示，对比结果见表1。



图 1. 自动进样器 SIL-40CXR 同时注入功能 (Co-injection) 程序设定

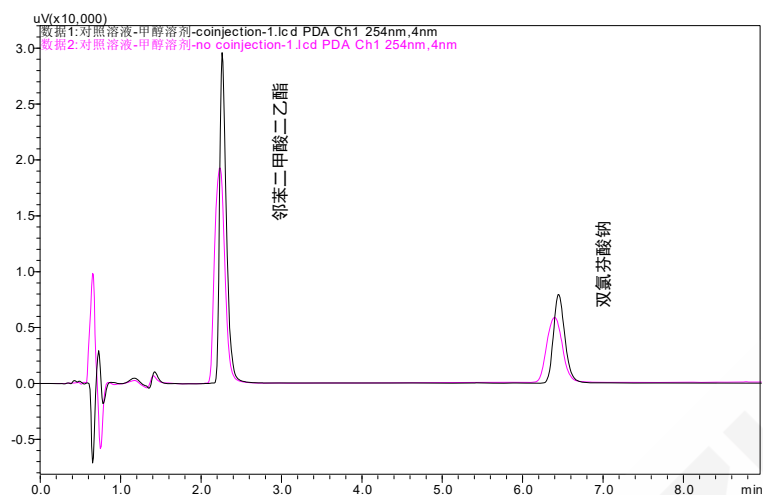


图 2. 对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: Co-injection 模式; 数据 2: 标准模式)

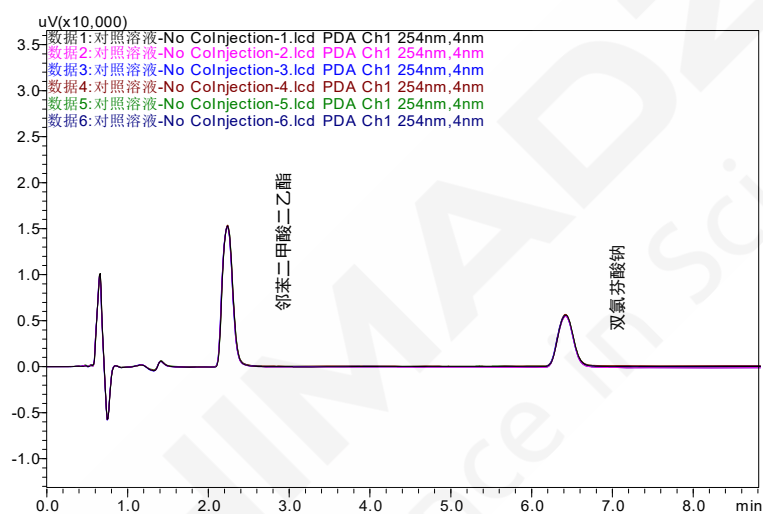


图 3. 对照溶液标准模式下重复性色谱图

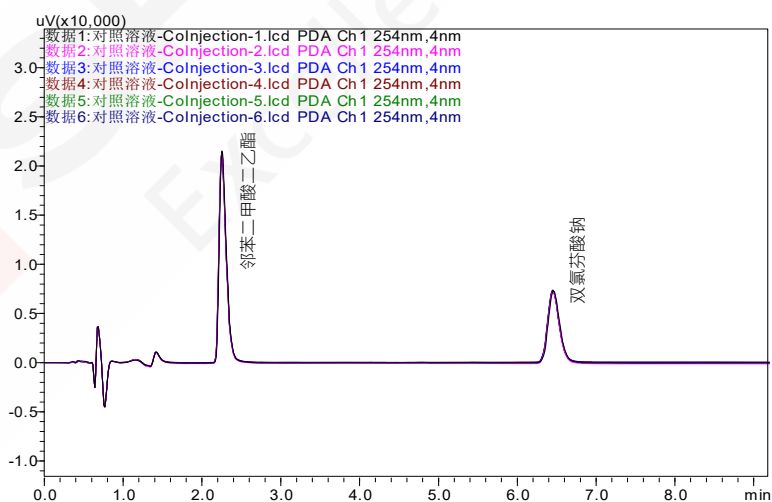


图 4. 对照溶液 Co-injection 模式下重复性色谱图

通过所列图表, 可见当样品溶液含高比例有机溶剂时, 采用 Co-injection 模式的色谱峰型明显优于标准模式下的色谱峰型; 对比可知, 仪器精密度考察结果表明峰面积及保留时间 RSD 与标准模式基本一致, 但是由于色谱峰型较标准模式得到改善, 进而提高了分离度及理论塔板

数。

表 1. 标准模式和 Co-injection 模式下双氯芬酸钠色谱参数比对结果

No.	Co-injection 模式				标准模式			
	保留时间	峰面积	分离度*	理论塔板数	保留时间	峰面积	分离度*	理论塔板数
1	6.447	75,543	18.014	8,380	6.422	74,922	14.041	5,164
2	6.452	75,386	17.963	8,368	6.422	74,536	14.023	5,133
3	6.451	75,484	17.932	8,328	6.418	74,320	13.997	5,120
4	6.450	75,251	17.983	8,351	6.419	74,479	14.047	5,171
5	6.452	75,378	18.029	8,396	6.421	74,706	14.045	5,177
6	6.451	75,420	17.947	8,352	6.422	74,737	14.018	5,128
平均值	6.450	75,410	17.978	8,363	6.421	74,617	14.028	5,149
RSD(%)	0.027	0.133	0.212	0.287	0.028	0.287	0.137	0.481

*: 双氯芬酸钠色谱峰与邻苯二甲酸二乙酯色谱峰的分度度

为了进一步说明 Co-injection 功能对峰型改善的能力, 将以水和 65% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式的谱图与以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式的谱图对比, 如图 5 所示。以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式所得色谱图, 其色谱峰型与以水或 65% 甲醇为稀释溶剂时在标准模式下的色谱峰型基本一致。结果表明, 当样品溶液含高比例有机溶剂时, 可以采用 Co-injection 模式分析而无需担心溶剂效应。

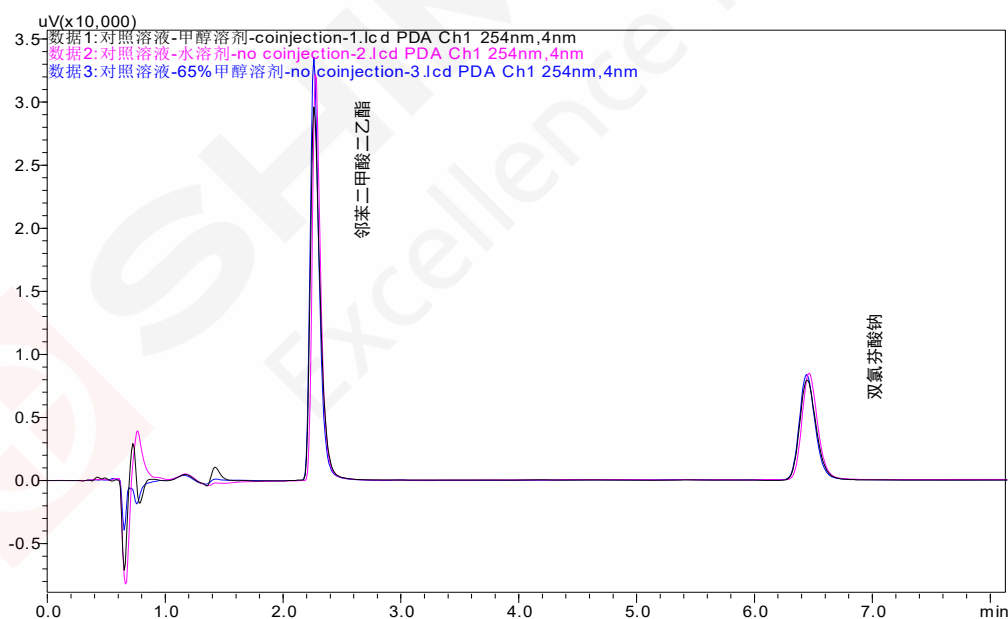


图 5 不同稀释溶剂的对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: 甲醇, Co-injection 模式; 数据 2: 水, 标准模式; 数据 3: 65% 甲醇, 标准模式)

3.2 系统适用性试验

按照 1.2 中分析条件对空白溶剂、对照溶液、分离度溶液进行测定, 色谱图如下所示。结果显示空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰; 经光照破坏的分离度溶液中主峰与各杂质峰均能有效分离, 分离度均大于 1.5; 在与主峰相对保留时间约 0.8 处出现一杂质峰, 两者的分离度为

6.45, 满足药典要求。

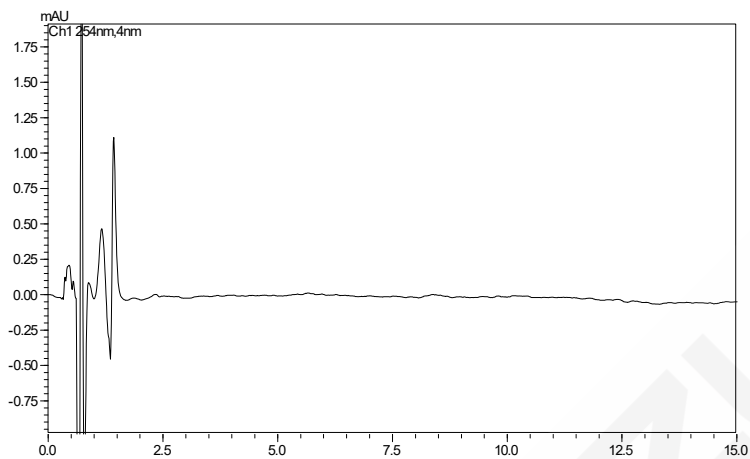


图6. 空白溶剂（甲醇）色谱图

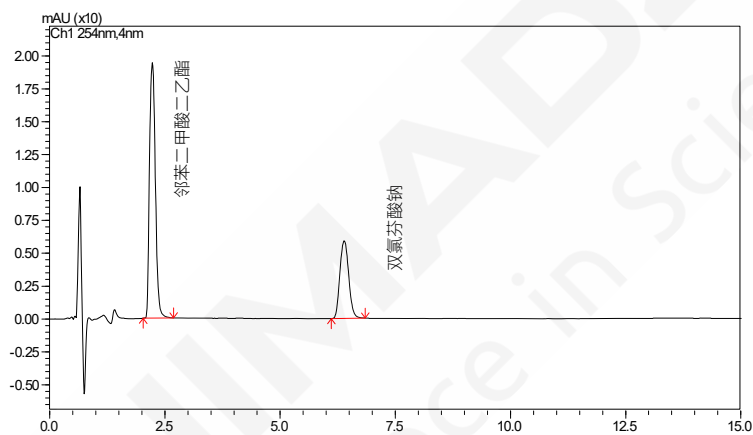


图7. 对照溶液色谱图

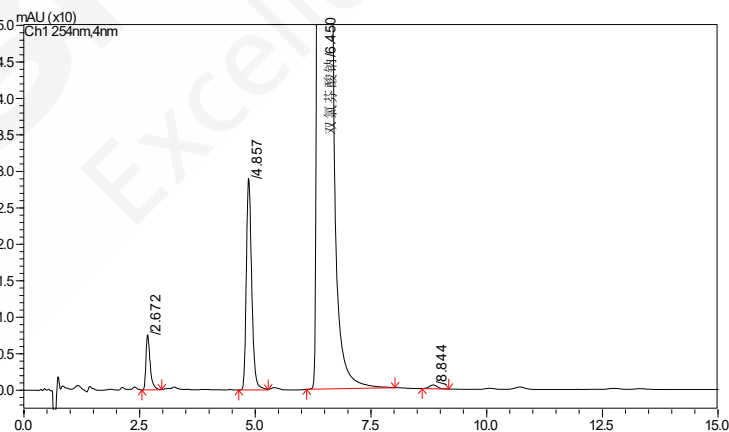


图8. 分离度溶液色谱图

3.3 标准曲线

对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的线性及范围。按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 9 所示，双氯芬酸钠在 0.1-10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9996，具体结果

见表 2。

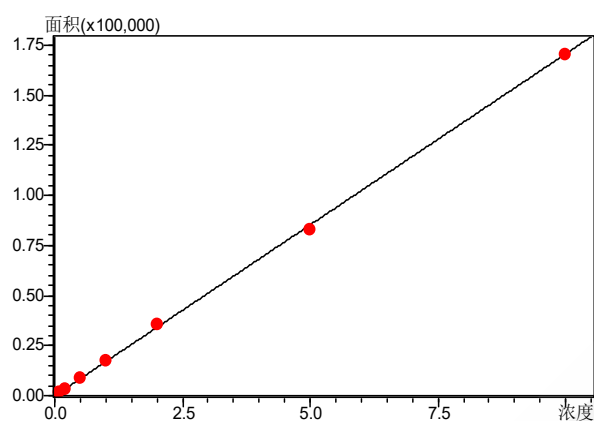


图 9. 双氯芬酸钠标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数 r	准确度%
双氯芬酸钠	0.1-10.0	$Y = (17064.5)X + (-13.8032)$	0.9996	96.9-103.5

3.4 检测限和定量限

对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的检测限及定量限。根据 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 双氯芬酸钠标准溶液数据，计算检出限 ($S/N=3$, LOD 表示)、定量限 ($S/N=10$, LOQ 表示)，色谱图如图 10 所示，结果如表 3 所示。

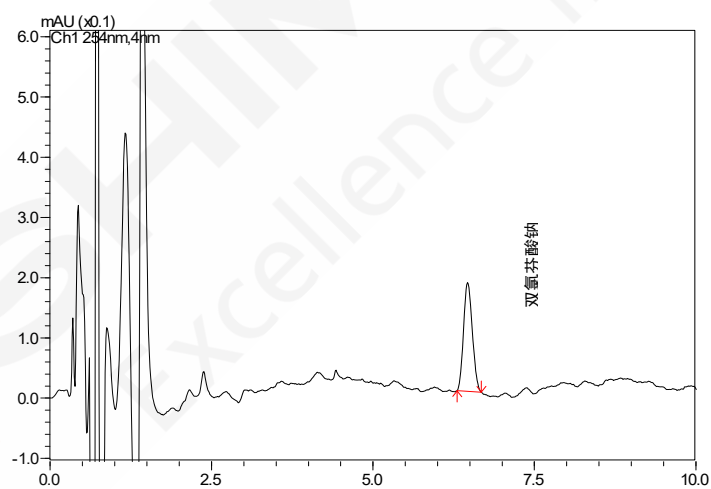


图 10. $0.1 \mu\text{g/mL}$ 标准溶液色谱图

表 3. 检测限和定量限测定结果

化合物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	信噪比	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
双氯芬酸钠	0.103	20.16	0.015	0.051

3.5 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.1 、 0.5 和 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 的双氯芬酸钠对照品溶液分别连续进样测定 6 次，结果见表 4。双氯芬酸钠的保留时间 RSD 为 $0.040\sim 0.071\%$ ；峰面积

RSD 为 0.191~1.621%。结果表明 Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的稳定性。

表 4. 双氯芬酸钠对照品溶液精密度的结果 (n=6)

NO.	0.1 µg/mL		0.5 µg/mL		5.0 µg/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	6.466	1,829	6.476	8,102	6.48	82,799
2	6.465	1,749	6.481	8,110	6.476	82,492
3	6.467	1,759	6.484	8,272	6.473	82,580
4	6.471	1,775	6.482	8,244	6.472	82,435
5	6.475	1,799	6.481	8,115	6.474	82,517
6	6.476	1,772	6.483	8,388	6.474	82,335
平均值	6.47	1,781	6.481	8,205	6.475	82,526
RSD(%)	0.071	1.621	0.040	1.413	0.044	0.191

3.6 样品测定

按照1.2分析条件测定,精密量取供试品溶液与对照溶液分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的2倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,除邻苯二甲酸二乙酯峰和其之前的色谱峰外,在相对保留时间1.2~1.3处的杂质峰(杂质III),其峰面积乘以0.5后不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积(0.5%),其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积(0.5%),各杂质峰面积的和(杂质III按校正后的峰面积计)不得大于对照溶液双氯芬酸峰面积的2倍(1.0%)。

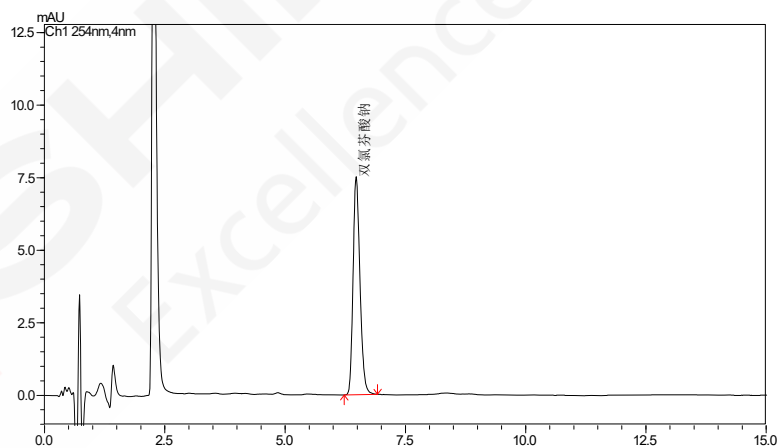


图 11. 对照溶液色谱图

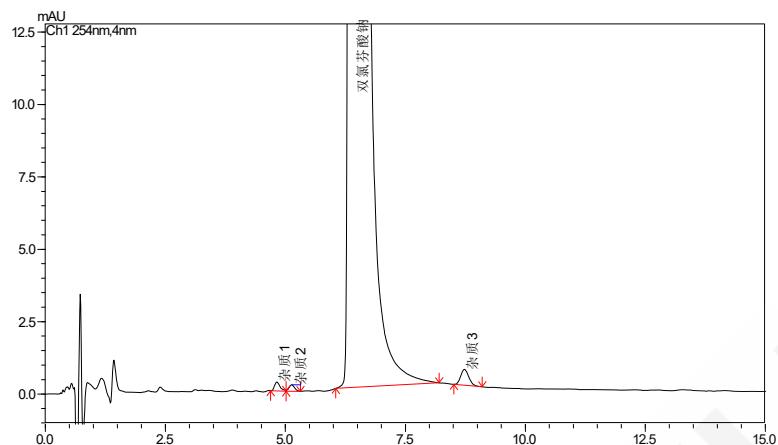


图 12. 供试品溶液色谱图

表 5. 样品杂质测定结果

	保留时间	峰面积	杂质含量 (%)
对照溶液主峰	6.473	75260	-
杂质 1	4.824	2497	0.017
杂质 2	5.131	1694	0.011
杂质 3	8.732	6455	0.021
总杂质	-	-	0.049

4. 结论

本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项，建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质的测定方法。对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中，采用 Co-injection 功能，相较标准进样模式可以获得更高的柱效及分离度；系统适用性试验，空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰，分离度溶液测试结果满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.051 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密密度实验中，双氯芬酸钠的保留时间 RSD% 为 0.040~0.071%；峰面积 RSD% 为 0.191~1.621%，仪器精密密度良好。采用主成分自身对照法对杂质进行定量，供试品中单个杂质均小于 0.5%，并且总杂质小于 1.0%，结果符合药典要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

高效液相色谱法测定多西他赛注射液有关物质

摘要：本实验使用 Nexera LC-40 建立了多西他赛注射液有关物质分析的 HPLC 分析方法，同时对 Nexera LC-40 和 LC-20A 进行分析，表明在多西他赛注射液有关物质项目上，Nexera LC-40 超高效液相色谱仪具有分离效能高、分析时间短等特点。

关键词：LC-40 有关物质 多西他赛注射液

多西他赛注射液为一种抗癌类药物，多用于先期化疗失败的晚期或转移性乳腺癌以及顺铂化疗失败的晚期或转移性非小细胞肺癌的治疗。

本文参考国家食品药品监督管理局标准 YBH04022012, 采用高效液相色谱法进行

多西他赛注射液有关物质的测定，进行 Nexera LC-40 和 LC-20A 对比分析，表明 Nexera LC-40 高效液相色谱仪能够提供更出色的分析效果、缩短分析运行时间，为客户色谱分析提高通量、降低成本。

1. 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 系统。具体配置为：LC-40B X3 输液泵，SIL-40C X3 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SCL-40 系统控制器，SPD-M40 光电二极管阵列检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱	： Shim-pack GIST 2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2 μm (P/N:227-30001-04, 岛津（上海）实验器材有限公司)	
流 动 相	： 乙腈/甲醇/水 (30/30/40, v/v/v)	
流 速	： 0.4 mL/min	波 长： 232 nm
柱 温	： 40°C	洗 脱 程 序： 等度洗脱
进 样 量	： 5 μL	

2. 结果讨论

2.1 LC-20A 分析结果

根据国家食品药品监督管理局标准 YBH04022012 所列方法，精密量取多西他赛注射液 1 mL，置于 100 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。图 2 为 LC-20A 用于多西他赛注射液有关物质测定结果色谱图。由表 1 可以看出多西他赛主成分出峰时间为 14.04 min，完成多西他赛注射液有关物质一针分析时间约为 35 min（参考标准 YBH04022012，运行时间为主成分出峰时

间的 2.5 倍)。

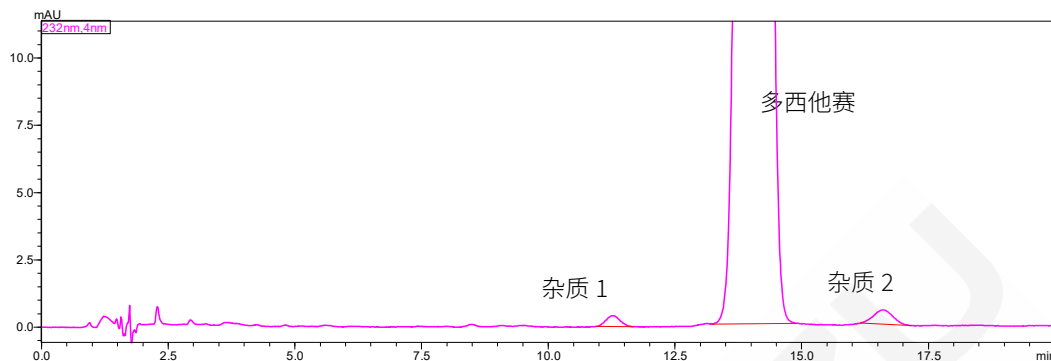


图 1. LC-20A 测试色谱图

(色谱柱: InertSustain C18 4.6 mm I.D. × 150 mm L. 5 μm,
流动相:乙腈/甲醇/水 (30/30/40, v/v/v), 流速:1.0 mL/min, 进样量:10 μL)

表 1. LC-20A 分析结果

成分	保留时间 (min)	分离度	面积归一化 (%)
杂质 1	11.29	N/A	0.1
多西他赛	14.04	4.70	99.7
杂质 2	16.61	3.73	0.2

2.2 Nexera LC-40 分析结果

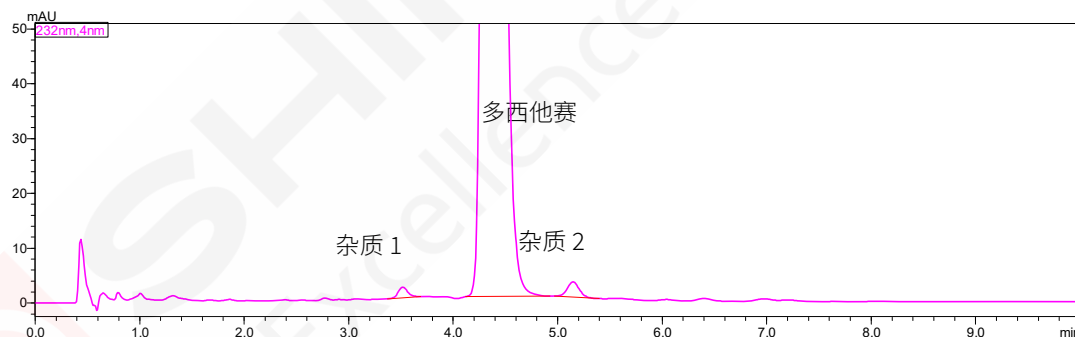


图 2. Nexera LC-40 测试色谱图

图 2 为 Nexera LC-40 用于多西他赛注射液有关物质测定结果色谱图。由表 2 可以看出多西他赛主成分出峰时间为 4.35 min, 完成多西他赛注射液有关物质一针分析时间约为 10 min。相比于 LC-20A 分析多西他赛注射液的有关物质, 在保证分离度良好的前提下, 一针分析时间从 35 min 减少为 10min, 效率提升显著。

表 2. Nexera LC-40 测试结果

成分	保留时间 (min)	分离度	面积归一化 (%)
杂质 1	3.52	N/A	0.1
多西他赛	4.35	4.35	99.7
杂质 2	5.15	3.60	0.2

2.3 重复性

在 UHPLC 分析条件下对待测样品连续进样 6 次，进行重复性考察。

结果显示，多西他赛及有关物质保留时间的 RSD% 小于 0.25%、峰面积的 RSD% 小于 3.0%，均在可接受范围内，表明 Nexera LC-40 超高效液相色谱仪稳定可靠、重复性良好。

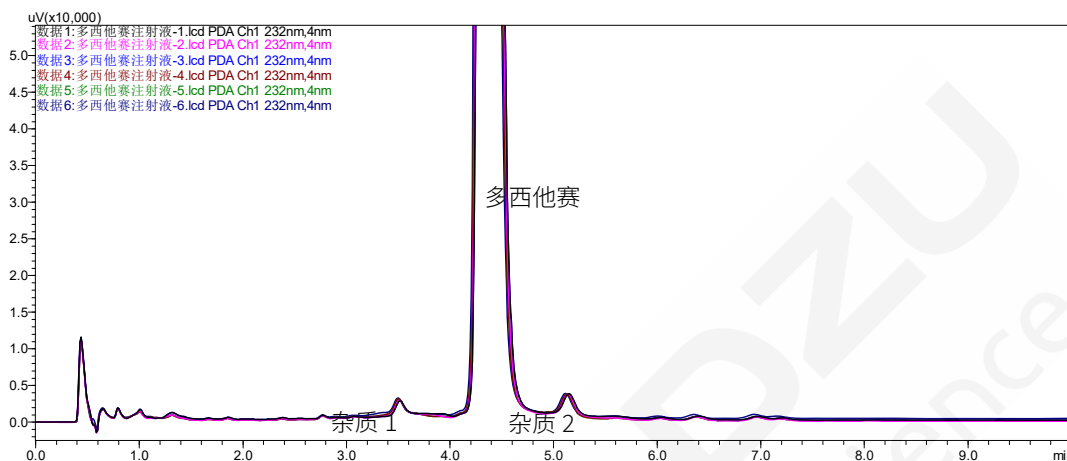


图 3. Nexera LC-40 进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

表 3 重复性结果

	杂质 1		多西他赛		杂质 2	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	3.51	12349	4.35	11817192	5.14	22139
Injection-2	3.51	13197	4.34	11796368	5.13	22469
Injection-3	3.51	12349	4.35	11817192	5.14	22139
Injection-4	3.50	12348	4.34	11807379	5.13	21534
Injection-5	3.50	13384	4.34	11807379	5.12	21534
Injection-6	3.50	13283	4.33	11813940	5.12	21425
Average	3.51	12485	4.34	11809908	5.13	21873
RSD%	0.22	2.8	0.17	0.07	0.17	2.0

2.4 成本计算

从表 4 中可以看出，Nexera LC-40 超高效液相色谱仪相较于 LC-20A 进行多西他赛注射液有关物质的分析时，连续 24h 工作可完成 144 针运行，相同时间下比 LC-20A 运行针数多出 103 针，效率提升 250%，大大提高了分析通量、节省时间。从经济和环保角度看看，有机相使用量降低 58%，降低色谱分析成本同时节省环保相关费用的支出。

表 4. 成本计算结果

	时间成本	
	LC-20A	Nexera LC-40
单针运行时间	35 min	10 min
24 h 可运行针数	41 针	144 针
	经济成本	
	LC-20A	Nexera LC-40
流速	1.0 mL/min	0.4 mL/min
运行 24h 消耗流动相	1440 mL	576 mL
流动相节省		864 mL
流动相比例		乙腈: 甲醇: 水=30:30:40
乙腈节省量		259 mL
甲醇节省量		259 mL
有机相单价	乙腈 0.13 RMB/ mL	甲醇 0.05 RMB/ mL
24h 有机相节省成本		46 RMB

有机溶剂价格来源于试剂供应商当月报价

3. 结论

采用 Nexera LC-40 建立多西他赛注射液有关物质的 UHPLC 分析方法，并与原 HPLC 方法进行对比，结果显示在有效提升分析效率的同时，Nexera LC-40 开发的 UHPLC 方法稳定可靠，且分离度、重复性良好、结果一致。另外，从时间成本和经济成本角度出发，极大为客户节省运行时间、降低运行成本。

第三节 遗传毒性杂质分析

Nexera LC-40 分析盐酸普拉格雷中的遗传毒性杂质对甲苯磺酸乙酯

摘要：本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸普拉格雷中遗传毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的测定方法。方法采用 Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm×100 mm, 1.9 μm)，以乙腈-水为流动相，0.5 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 225 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，0.05 μg/mL 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液 S/N 大于 50。对甲苯磺酸乙酯在 0.01~10 μg/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数达 0.9999 以上，精确度在 95.8%~103.5%之间。0.05 μg/mL 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液连续进样 6 针，保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.29%和 1.77%，仪器精密度良好。对照品溶液室温 10°C放置 8 h，溶液稳定性良好。待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量 7 ppm, 低于毒理学关注阈值。低中高不同浓度加标回收率范围在 94.96%~101.19% 之间，RSD 范围为 0.31%~2.32%，准确度良好，该方法能够有效地检测盐酸普拉格雷中的对甲苯磺酸乙酯。

关键词：Nexera LC-40 高效液相色谱仪 对甲苯磺酸乙酯 盐酸普拉格雷

近年来，遗传毒性杂质（基因毒性杂质）因存在重大的安全隐患，而受到了广泛关注。欧洲药物管理局(EMA)、美国食品药品监督管理局(FDA)及人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 等机构陆续发布了针对基因毒性杂质的指南，对该类杂质的控制与评估提出要求。2006年，EMA首先颁布了《基因毒性杂质限度指南》，提出有必要采用“可接受风险水平”的概念，以毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)控制基因毒性杂质，TTC为1.5 μg/day (终身癌症风险小于百万分之一)。根据患者每天预计的服用剂量，便可计算出原料药中所允许的基因毒性杂质的含量。

盐酸普拉格雷是日本第一三共制药和美

国礼来公司共同开发的新一代口服抗血栓药物，于2009年2月获欧盟批准上市。盐酸普拉格雷合成方法较多，部分合成工艺中使用对甲苯磺酸进行脱保护，中间体经过对接和乙酰化后得到目标产物，产物选择以乙醇为精制溶剂时则会产生基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯。口服盐酸普拉格雷的推荐日负荷剂量为60 mg，由此计算出原料中允许的对甲苯磺酸乙酯含量为25 ppm。目前对甲苯磺酸乙酯残留量的检测多采用GC-MS, LC-MS和HPLC-UV法。常规HPLC法往往需要较长的分析时长来满足基因毒性杂质与待测原料及其其它杂质之间的分离度。本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，以亚2 μm填料色谱柱进行分离，建立了盐酸普拉格雷中基因毒性杂质对甲苯

磺酸乙酯的分析方法。Nexera LC-40高效液相色谱仪是岛津公司2019年推出的液相新产品，该产品秉承了岛津一直以来的设计理念，同时还引入了智能分析(AI)、智能物联(IoT)等尖端技术。配置的二极管阵列检测器SPD-M40具

有极高的灵敏度和卓越的线性范围 (2.5 AU)，三重控温技术能有效降低基线噪音并提供稳定的基线，因此，即使在高浓度的样品中，也能定量检测痕量的杂质组分，可为基因毒性杂质检测提供参考检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B XR 输送泵，SIL-40C XR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SPD-M40A 检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm i.d.×100 mm L, 1.9 μm)

流 动 相：A, 水； B, 乙腈

流 速：0.5 mL/min

柱 温：45°C

检 测 波长：225 nm

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 40%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	45
7.10	Pumps	Pump B Conc.	95
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.01	Pumps	Pump B Conc.	40
12.00	Controller	Stop	

2. 样品前处理

标准曲线溶液配制：取对甲苯磺酸乙酯对照品适量，精密称定，加乙腈溶解并稀释制成100 μg/mL的溶液，作为贮备液。分别精密量取贮备液适量，用5 mM甲酸铵水:乙腈(3:2)逐级稀释制成0.01、0.02、0.05、0.2、1、2、5、10 μg/mL的溶液即得。

供试品溶液配制：取盐酸普拉格雷原料约20 mg置10 mL容量瓶中，精密称定，分别加入1 mL乙腈和5 mM甲酸铵水:乙腈(3:2)溶解并定容至刻度，制得约2 mg/mL的样品溶液，经滤膜过滤后，取续滤液即得。

3. 结果与讨论

3.1 检测波长选择

取2 $\mu\text{g/mL}$ 的对甲苯磺酸乙酯对照品溶液，于190 nm~400 nm波长范围内进行紫外吸收波长扫描。结果显示：对甲苯磺酸乙酯在225 nm波长处有最大吸收，故本实验选择225 nm为检测波长。

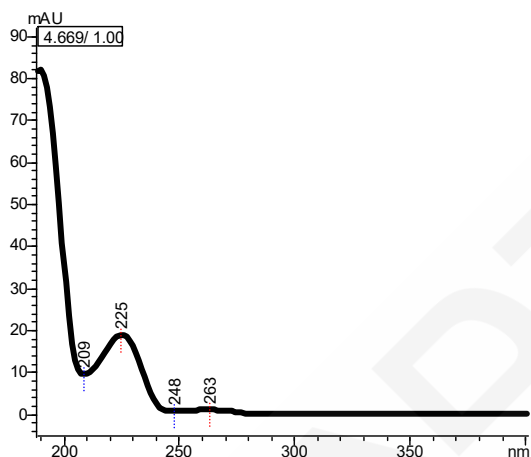


图 1. 紫外吸收波长扫描谱图

3.2 标准溶液液相色谱图

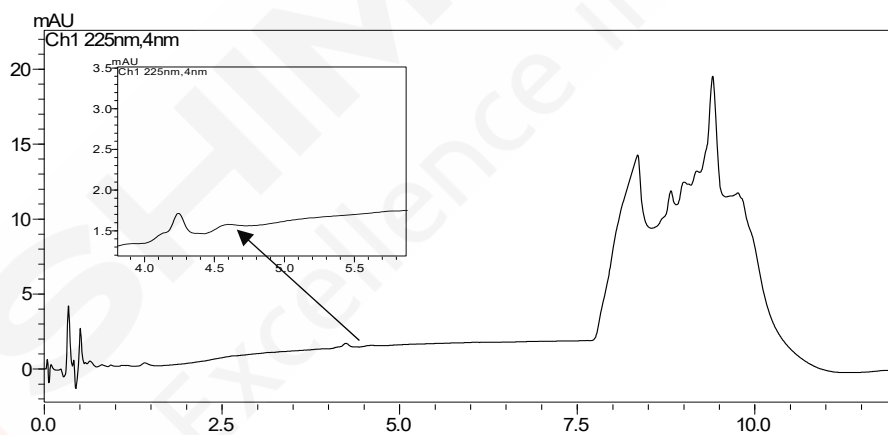


图 2. 空白溶剂色谱图

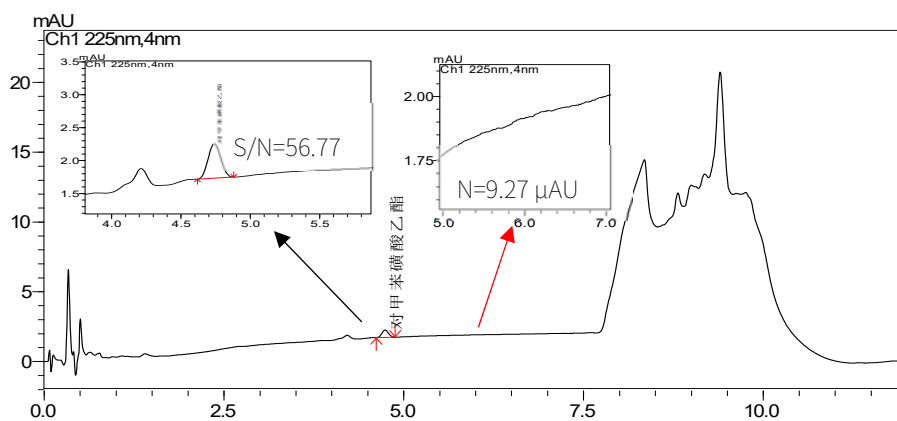


图 3. 标准溶液色谱图 (0.05 $\mu\text{g/mL}$)

本实验中样品溶液浓度为 2 mg/mL,根据盐酸普拉格雷原料中允许的对甲苯磺酸乙酯含量限度 (25 ppm), 计算出对甲苯磺酸乙酯的限度浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图所示, 该浓度下目标化合物的 S/N 达到 56.7, 让定量结果的检测更加准确可靠。本实验使用新 Nexera 系列 SPD-M40 二极管阵列检测器, 通过光学系统的改良, 不仅扩大了线性范围在一定条件下达到 2.5 AU, 还具备了卓越的噪音抑制能力, 指定条件下噪音低于 4.5×10^{-6} AU 性能。同时, 流通池、分光器和光源室的三重控温技术, 提高了检测器的稳定性。

3.3 标准曲线

取0.01、0.02、0.05、0.2、1、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对甲苯磺酸乙酯对照品溶液各10 μL 进样, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标做标准曲线, 标准曲线及线性信息如图4和表2所示。

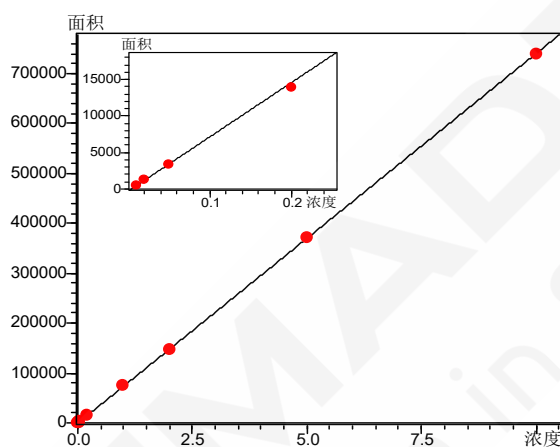


图 4. 对甲苯磺酸乙酯标准曲线

表 2. 对甲苯磺酸乙酯线性信息

组分名称	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数 (R)	精确度 (%)
对甲苯磺酸乙酯	0.01~10	$Y=74041.5X-263.090$	0.99998	95.8~103.5

3.4 精密度实验

取0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 限度浓度的对照品溶液10 μL , 连续进样6次, 考察仪器精密度, 测定结果见表3。结果显示: 连续测定6次, 对甲苯磺酸乙酯保留时间和峰面积的RSD分别为0.29%和1.77%, 仪器精密度良好。

表 3. 重复性结果

ID	保留时间	峰面积
1	4.695	3264
2	4.690	3231
3	4.702	3210
4	4.724	3197
5	4.688	3268
6	4.690	3113
RSD (%)	0.29	1.77

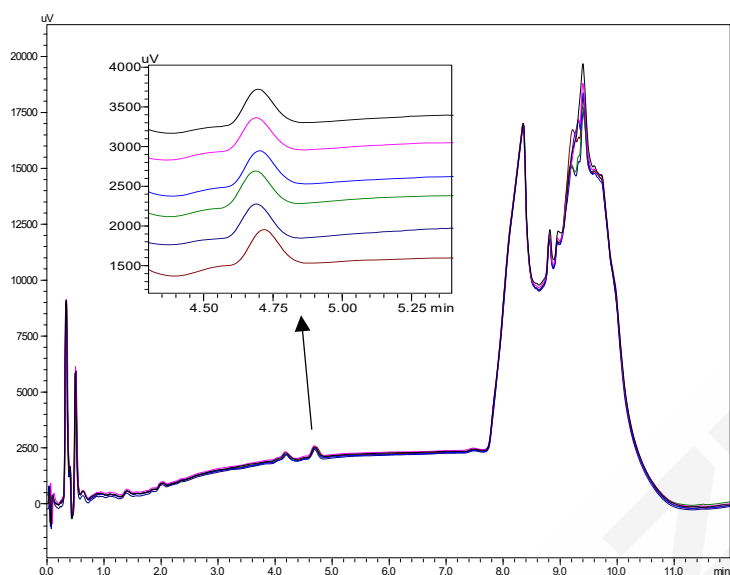


图 5. 重复性色谱图

3.5 溶液稳定性

取0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液，室温 10°C 放置，分别于0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h取样进行分析，对照品溶液稳定性结果如表4。结果显示：室温 10°C 放置8 h，对甲苯磺酸乙酯峰面积无明显变化，峰面积RSD为1.68%，对照品溶液稳定性良好。

表 4. 对照品溶液稳定性结果

序号	取样时间 (h)	峰面积	RSD(%)
1	0	3264	1.68
2	1	3113	
3	2	3210	
4	4	3196	
5	6	3236	
6	8	3162	

3.6 样品测定

取 2 mg/mL 的样品溶液 10 μL 进样，样品溶液色谱图如图 6，将测定结果带入 3.3 项下标准曲线，测得样品中对甲苯磺酸乙酯的浓度是 0.014 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量为 7 ppm，低于毒理学关注阈值。

3.7 加标回收率

取盐酸普拉格雷原料适量，分别加入对甲苯磺酸乙酯对照品 0.2 μg 、0.5 μg 和 2.5 μg ，按照上述前处理方法处理后，分别制得对甲苯磺酸乙酯加入水平为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (限度浓度的 40%)、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (限度浓度) 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5 倍限度浓度) 的 2 mg/mL 样品溶液各 3 份，考察加标回收率。具体结果如下：低中高 3 种水平的加标回收率在 94.96%~101.19%之间，RSD 为 0.31%~2.32%，该方法准确度良好。

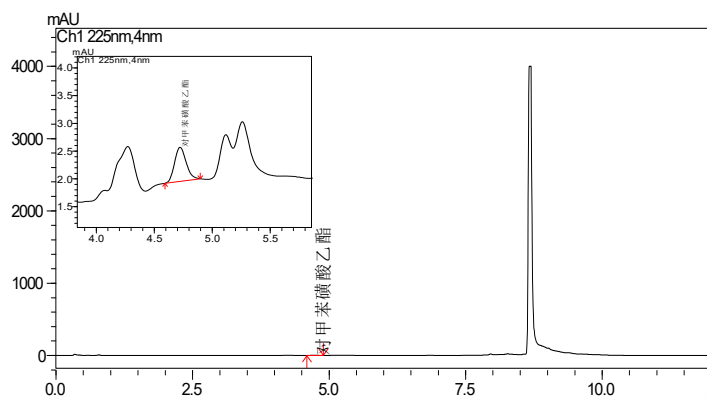


图 6. 样品溶液色谱图 (2 mg/mL)

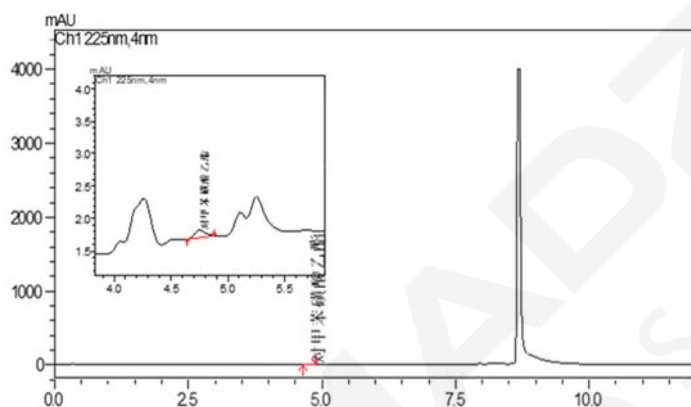


图 7. 样品加标色谱图 (加标水平 0.5 µg)

表 5. 加标回收率结果

序号	样品中杂质含量 (µg)	加标水平 (µg)	加标后杂质测 定含量 (µg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.137		0.350	103.86		
2	0.139	0.2	0.340	100.29	101.19	2.32
3	0.142		0.340	99.42		
4	0.139		0.610	95.46		
5	0.148	0.5	0.620	95.68	97.13	1.44
6	0.143		0.630	97.98		
7	0.133		2.480	94.19		
8	0.137	2.5	2.480	94.05	94.96	0.31
9	0.138		2.470	93.63		

4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪,建立了盐酸普拉格雷中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的测定方法。方法采用 Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm×100 mm, 1.9 µm),以乙腈-水为流动相,0.5 mL/min 的流速进行梯度洗脱,检测波长为 225 nm。分析结果表明:该方法测定基线噪音良好,0.05 µg/mL 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液 S/N 大于 50。对甲苯磺酸乙酯在 0.01~10 µg/mL 浓度范围内线性关系良好,相关系数达 0.9999 以上,精确度在

95.8%~103.5%之间。0.05 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液连续进样 6 针，保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.29%和 1.77%，仪器精密度良好。对照品溶液室温 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置 8 h，溶液稳定性良好。待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量为 7 ppm，低于毒理学关注阈值。低中高浓度加标回收率范围在 94.96%~101.19%之间，RSD 为 0.31%~2.32%，准确度良好，该方法能准确高灵敏地检测盐酸普拉格雷中的对甲苯磺酸乙酯。



高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测

摘要: 本文以 Nexera LC-40 超高效液相色谱建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法, 该方法定量限为 0.08 ppm, 重复性结果显示, NDMA 和 NDEA 保留时间和峰面积%RSD 均在 5.0%以内, 重复性良好, 满足 ANSM French OMSL 法规的要求, 可以作为分析厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的选择。

关键词: LC-40 遗传毒性杂质 NDMA NDEA

遗传毒性杂质是一类能够直接或间接损害 DNA, 导致基因突变或产生癌症的物质, 包括磺胺类、N-亚硝胺类等, 自从沙坦类原料药中报道检测出 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 和 N-亚硝基二乙胺 (NDEA), 社会广泛关注。各国监管机构 (FDA、EMA) 发布了关于 N-亚硝胺类遗传毒性杂质的液质和气质的相关检测方法。最新, ANSM French OMSL 发

布了用液相色谱和紫外检测器进行 NDMA 和 NDEA 的检测方法, 该方法要求 5 ng/mL 标准品溶液 S/N 大于 10, 回收率为 90.0%-110.0%。

本文根据 ANSM 法规要求, 建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱进行沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 X3 系统。具体配置为: LC-40B_{x3} 输液泵, SIL-40C_{x3} 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SCL-40 系统控制器, SPD-M40 光电二极管阵列检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱	: Shim-pack Scepter C18-120, 4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm (P/N:227-31020-06, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)		
流 动 相	: A 相-甲醇/水(35/65, v/v); B 相-甲醇/水(25/75, v/v)		
流 速	: 1.0mL/min	波 长	: 228 nm
柱 温	: 30°C	洗 脱 程 序	: 梯度洗脱
进 样 量	: 50 μL		

表 1. 梯度程序

Time (min)	Module	Command	Value
5	Pumps	Pump B Conc.	0
10	Pumps	Pump B Conc.	100
25	Pumps	Pump B Conc.	100
27	Pumps	Pump B Conc.	0
35	Controller	Stop	

2. 结果与讨论

2.1 专属性

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 进行对照品和样品溶液的制备。图 1 表明空白溶液在 NDMA 和 NDEA 出峰处无干扰，专属性良好。

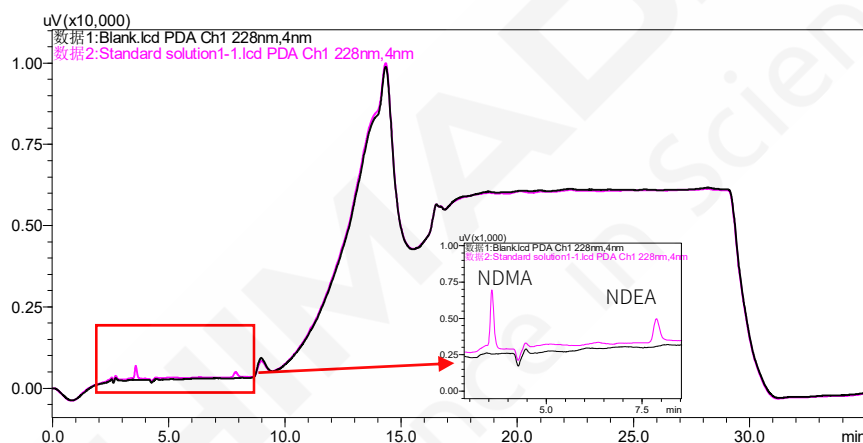


图 1. 专属性色谱图 (10 ng/mL 对照品溶液)

2.2 灵敏度

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 取浓度为 5 ng/mL 标准品溶液按照上述方法进样分析考察灵敏度，结果显示，NDMA 和 NDEA 的 S/N 分别为 29.8 和 15.6，均大于 10，满足法规要求。

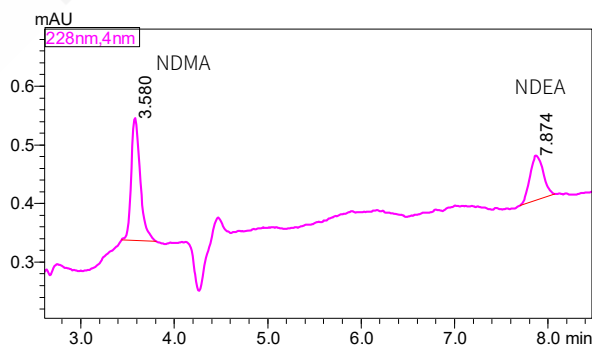


图 2. 灵敏度色谱图

2.3 重复性

以浓度为 10 ng/mL 对照品溶液进行方法重复性考察，测定 6 次，结果如下。

从图 3 中可以看出，NDMA 和 NDEA 连续进样 6 针，保留时间%RSD 分别为 0.01%和 0.04%，峰面积%RSD 分别为 0.85%和 3.7%，均在可接受范围内，重复性良好。

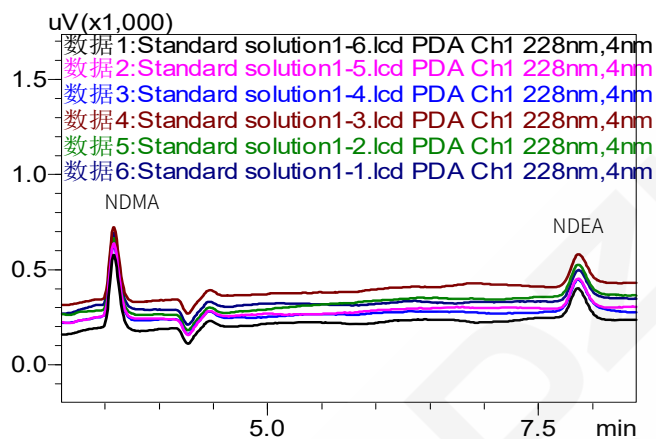


图 3. 10 ng/mL 对照品溶液进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

表 2. 重复性结果

	NDMA		NDEA	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	3.578	2449	7.873	1563
Injection-2	3.578	2413	7.872	1669
Injection-3	3.579	2419	7.869	1609
Injection-4	3.579	2449	7.868	1699
Injection-5	3.579	2450	7.864	1548
Injection-6	3.579	2468	7.869	1585
Average	3.579	2441	7.869	1612
RSD%	0.01	0.85	0.04	3.70

2.4 加标回收率

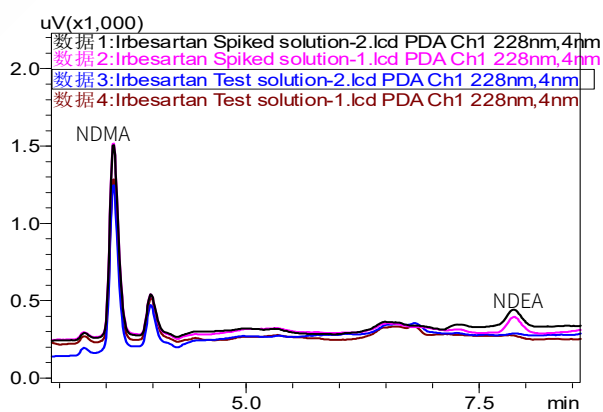


图 4. 样品加标溶液色谱图

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01, 准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中, 加入 1 mL 浓度为 25 ng/mL 对照品溶液, 并加入 4 mL 稀释液 (甲醇: 水=35:65, v/v), 震荡 5 min, 超声 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为样品加标溶液进样分析, 进行加标回收率计算。NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2%和 107.8%, 在 90.0-110.0%范围内, 满足法规要求。

表 3. 样品加标回收率(n=2)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	5.0 ng/mL	
		回收率%	RSD%
NDMA	28.4	103.2	1.9
NDEA	ND	107.8	1.2

2.5 实际样品分析

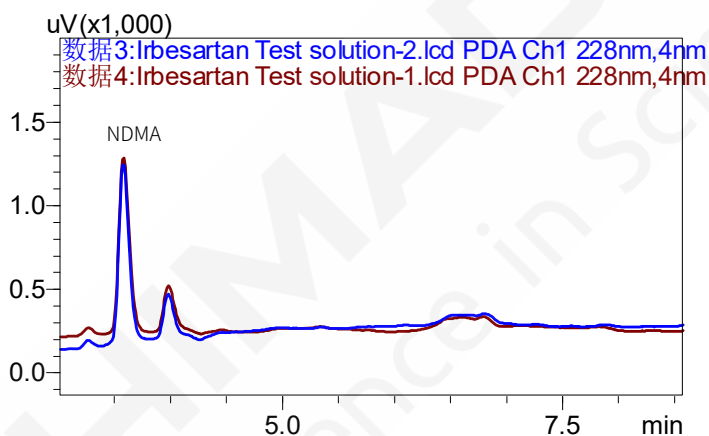


图 5. 样品溶液色谱图

依据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 要求, 采用液相色谱法进行分析。准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 稀释液 (甲醇: 水=35:65, v/v), 震荡 5 min, 超声 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为样品溶液进样分析, 结果显示, 厄贝沙坦原料药样品 NDMA 浓度为 0.47 ppm, NDEA 为未检出。

表 4. 样品计算结果

#	称样量(mg)	NDMA			NDEA		
		峰面积	浓度(ng/mL)	含量(ppm)	峰面积	浓度(ng/mL)	含量(ppm)
对照品	/	2441	10	/	1612	10	/
样品 1	300.10	6,953	28.5	0.47	/	/	ND
样品 2	300.06	6,919	28.3	0.47	/	/	ND

3. 结论

根据 ANSM French OMSL Method 19A0416-01 建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱仪进行厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法。实验结果显示该方法专属无干扰、灵敏度为 0.08 ppm，重复性结果显示 NDMA 和 NDEA 的保留时间%RSD 分别为 0.01%和 0.04%，峰面积%RSD 分别为 0.85%和 3.7%，重复性良好，NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2%和 107.8%。Nexera LC-40 超高效液相色谱的低噪音、高灵敏度和高稳定可靠等特点可轻松应对 HPLC 方法检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA。



第四章 Nexrea LC-40 在化妆品行业中的应用



化妆品是指以涂抹、喷洒或者其他类似方法，散布于人体表面的任何部位，如皮肤、毛发、指趾甲、唇齿等，以达到清洁、保养、美容、修饰和改变外观，保持良好状态为目的的化学工业品或精细化工产品。随着现代科学技术的不断发展，化妆品产业也在快速发展的过程中。化妆品本身作为一个化学类工业产品，其与广大人民群众的健康的关系也是越来越密切。在激烈发展的化妆品市场当中，化妆品的质量控制问题一直是当前社会所广泛关心的问题。近年来，层出不穷的化妆品质量问题的出现，导致了消费者使用之后皮肤变薄变脆，时间长会产生许多不良反应，甚至可能诱发或加重某些疾病以及令胎儿致畸等等。

化妆品检验检测体系是化妆品监管体系的重要组成部分，针对于我国的具体情况，构建一套科学、完善的化妆品质量控制检验体系，已经成为了保障整个化妆品行业健康发展，保护广大人民群众自身利益的重要举措。2019 年国家药监局印发《化妆品检验检测机构能力建设指导原则》作为指导检验检测机构能力建设的通用性指南。根据《指导原则》要求，化妆品检验检测机构能力建设层级采用 A 级“全面能力”、B 级“较高能力”和 C 级“常规能力”三个层级，原则上 A 级至 C 级能力逐级向下覆盖。其中，A 级要求设备种类达 112 种，包含了高效液相色谱仪。岛津 Nexera LC-40 系统具有分离效率高、选择性好、分析速度快、灵敏度高、操作自动化及应用广泛的特点，适用于化妆品的检测分析。本章内容介绍岛津 Nexera LC-40 对化妆品中的有害物质的检测分析，展示了仪器性能优势及特点，供化妆品行业从业人员参考。

NexeraLC-40 分析化妆品中西咪替丁成分

摘要: 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统, 优化了化妆品中西咪替丁成分的测定方法。该方法分析时间短, 目标物和其他组分色谱峰分离效果良好。采用 Nexera LC-40 的在线稀释功能, 在 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内建立标准曲线, 线性关系良好, 相关系数 r^2 大于 0.999; 续 8 针进样, 保留时间和峰面积两者的 RSD 分别在 0.120%~0.349%和 0.791%~1.727%之间。在 0.5~10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 加标量下, 西咪替丁的回收率分布在 93.86%~96.58%之间。西咪替丁物质检出限 (LOD) 为 0.011 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限 (LOQ) 为 0.036 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: Nexera LC-40 高效液相色谱仪 化妆品 西咪替丁

近年来, 人们对化妆品的品质要求越来越高, 国家也对化妆品的安全性要求更加严格。人们不仅追求大牌产品, 还更加注重化妆品内所含有的成分是否安全。例如, 在化妆品中的云母、矿物油、合成香料、二苯甲酮等都是有害物质, 如果长期使用含有这些成分的化妆品, 对于皮肤健康是不利的。化妆品安全性问题主要来源于: 违规添加禁用物质或超范围使用限量物质; 违规使用未经批准的原材料等。添加西咪替丁成分的化妆品对慢性荨麻疹、痤疮、

女性多毛症等有一定的治疗作用, 但是长期使用会导致严重心肺疾病、严重肝肾功能不全、器质性脑病等副作用。本实验参照国家药监局发布 2019 年第 48 号通告《化妆品中西咪替丁的检测方法(高效液相色谱法)》, 使用 Nexera LC-40 高效液相色谱系统对化妆品中的西咪替丁成分进行了分析和研究, 该方法分析时间短, 精密度高, 且稳定性良好, 能够为化妆品中有害物质的定量分析提供帮助。

1. 实验部分

1.1 仪器配置

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪, 包括 SCL-40 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40BXR 输送泵, SIL-40CXR 自动进样器, CTO-40C 柱温箱, SPD-M40 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODSII 色谱柱 (2.0 mm I.D. \times 100 mm L, 2.2 μm)
流动相: A: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH = 7.0); B: 乙腈
流速: 0.4 mL/min
柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$
检测波长: 215 nm

进样体积：3 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 10%，时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	10%
6.00	Pumps	Pump B Conc.	50%
8.00	Pumps	Pump B Conc.	50%
9.00	Pumps	Pump B Conc.	10%
15.00	Controller	Stop	

2. 样品前处理

准确称取样品 0.5 g（精确到 0.001 g）于 25 mL 比色管中，加入 20.0 mL 色谱级甲醇，在涡旋混匀器上高速振荡 30 s，使样品与提取溶剂充分混匀。然后超声提取 20 min，静置至室温，再用色谱级甲醇定容至刻度摇匀，溶液经 0.45 μm 滤膜过滤后取滤液作为待测溶液。必要时可用适量的甲醇做稀释。

3. 结果与讨论

3.1 方法对比结果

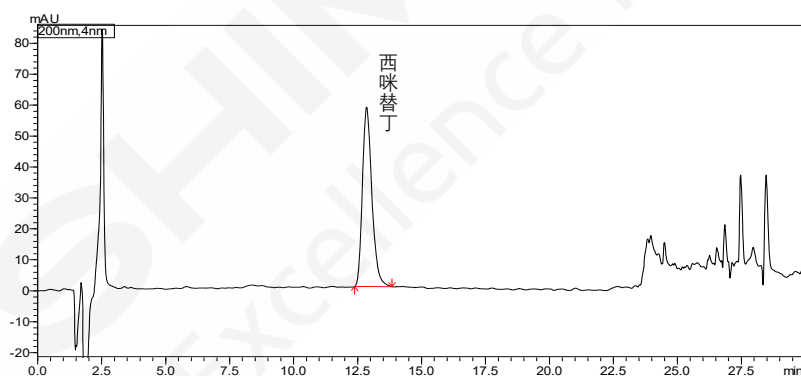


图 1. 25 $\mu\text{g/mL}$ 西咪替丁标准品使用国家药监局审议稿方法测试谱图

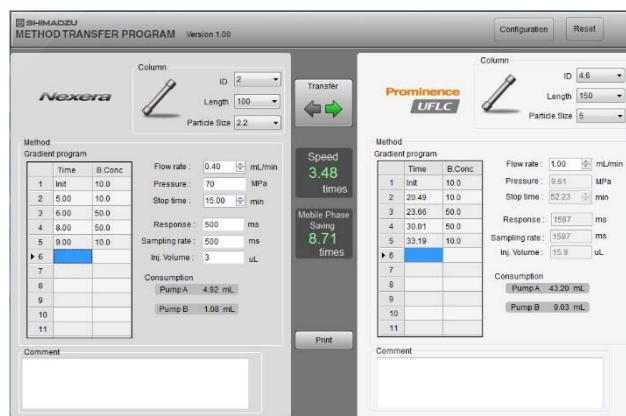


图 2. Nexera LC-40 与 Prominence LC-2030C 参数转化图

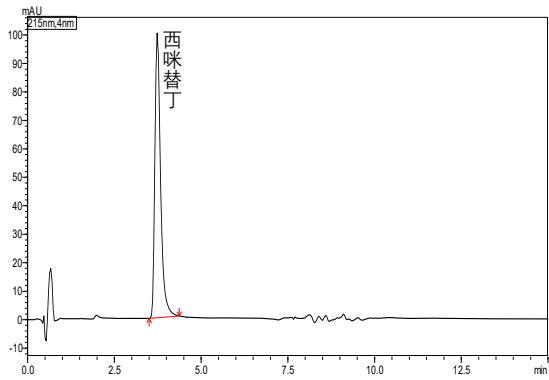


图3. 25 µg/mL 西咪替丁标液 (LC-40)

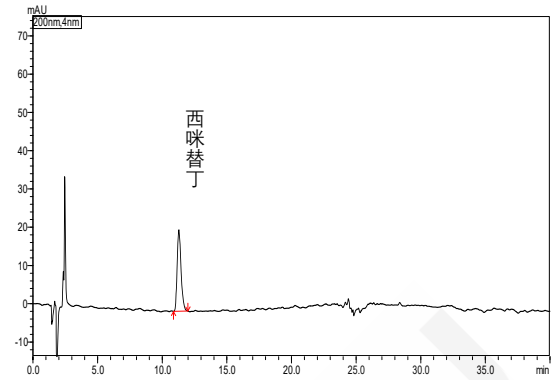


图4. 25 µg/mL 西咪替丁标液 (LC-2030C)

如图3、4所示，使用Nexera LC-40超高效液相色谱系统的优化方法进行测试，可以达到良好的分离度和灵敏度，并且缩短分析时间近4倍以上。

3.2 样品溶液色谱图

按照1.2中的分析条件对样品溶液进行测定，色谱图如图6所示。Nexera LC-40系统二极管阵列检测器SPD-M40经过光学系统改良，具备了卓越的降噪能力。同时SPD-M40检测器部分具有三重控温技术，有效降低温度波动引起的波长变化，可以达到良好的分离效果和响应效果。

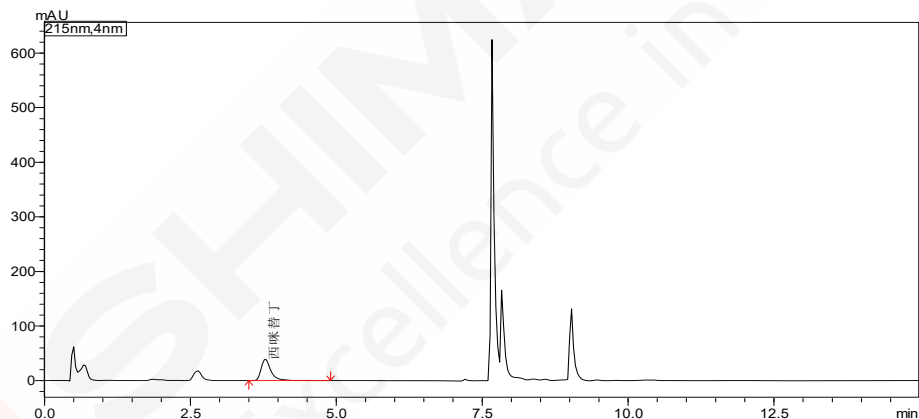


图5. 样品溶液色谱图

岛津Nexera LC-40系统自动进样器SIL-40CXR具备多种预处理程序，可实现在线稀释、在线柱前衍生、合并进样、重叠进样等功能。自动进样器预处理程序中的稀释功能可实现样品及标准品溶液的在线稀释，自动化程度及准确度较高。

稀释功能程序设定如图6所示，使用Nexera LC-40自动进样器SIL-40CXR的在线稀释功能配制成5 µg/mL的西咪替丁浓度点，再将西咪替丁标准品溶液通过手动稀释配制成5 µg/mL的浓度点后进行仪器分析和谱图对比。

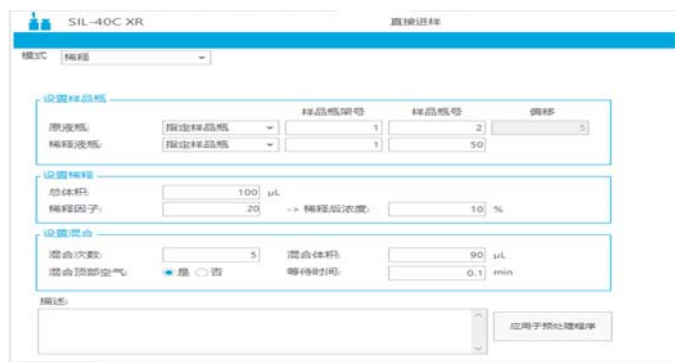


图 6. 自动进样器 SIL-40CXR 稀释功能程序设定

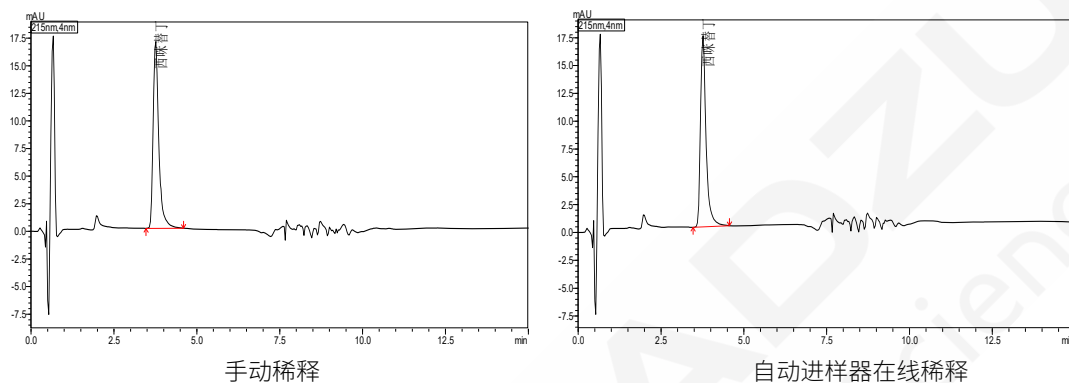


图 7. 不同模式下标准品溶液色谱图对比

如图7所示，使用LC-40自动进样器SIL-40CXR的在线稀释功能配制成5 μg/mL的浓度与手动稀释配制成5 μg/mL的浓度，对比两者响应情况基本一致。

3.3 标准系列溶液的制备

使用 Nexera LC-40 液相色谱仪 SIL-40CXR 自动进样器的在线稀释功能分别配出 0.5、5、10、25、50 μg/mL 的系列标准溶液。标准曲线如图 8 所示。

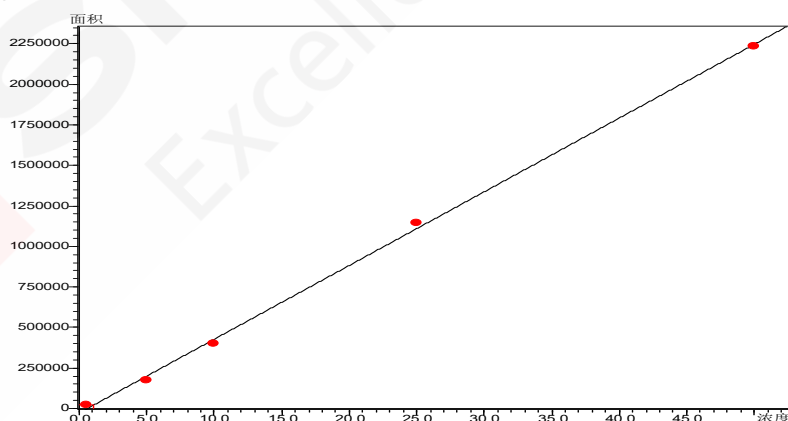


图 8. 西咪替丁标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	线性范围 (μg/mL)	线性方程	相关系数	检出限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
西咪替丁	0.5-50.0	$Y=45311.2X-37156.6$	0.9993	0.011	0.036

3.4 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，分别选择低、中、高浓度的标准品溶液连续进样 8 次测定重复性。西咪替丁保留时间 RSD% 为 0.120%~0.349%；峰面积 RSD% 为 0.791%~1.727%；结果见表 3，Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的精密度。

表 3. 标准品溶液精密度结果 (n=8)

序号	5.0 µg/mL		25.0 µg/mL		50.0 µg/mL	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	3.756	203,137	3.770	1,164,753	3.771	2,245,883
2	3.764	203,111	3.734	1,169,594	3.763	2,245,997
3	3.757	202,439	3.752	1,176,940	3.761	2,245,377
4	3.762	204,652	3.738	1,177,197	3.765	2,261,385
5	3.750	206,656	3.738	1,190,589	3.765	2,357,736
6	3.763	201,319	3.735	1,179,348	3.761	2,246,725
7	3.755	202,802	3.759	1,164,064	3.756	2,240,376
8	3.760	202,995	3.752	1,158,419	3.767	2,256,146
RSD%	0.126	0.791	0.349	0.885	0.120	1.727

3.5 样品加标回收率

在待测样品中添加标样物质进行平行测定，如图9、10所示；测试结果显示，样品的加标回收率在93.86%~96.58%之间，具体加标量和测定结果见表4。

表 4. 样品加标回收率结果

物质名称	样品含量 (µg/g)	0.5 µg/g	2.0 µg/g	10.0 µg/g
西咪替丁	ND	93.86%	96.58%	95.01%

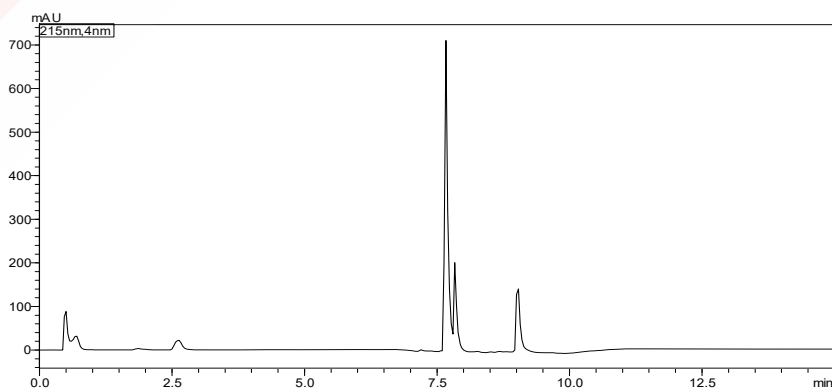


图 9. 空白样品谱图

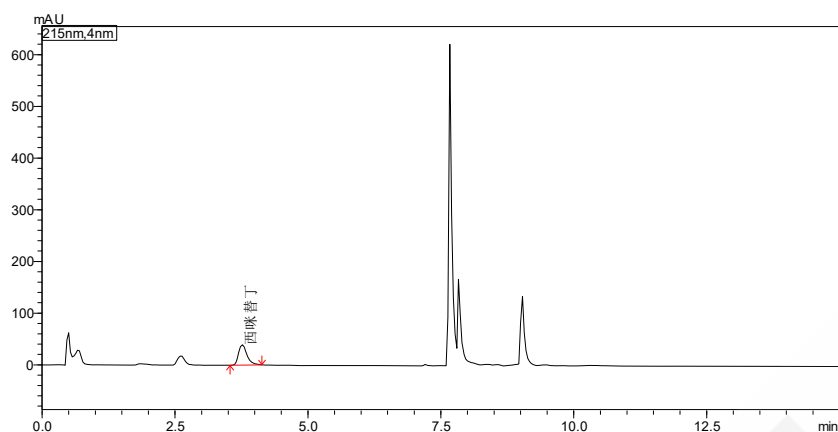


图 10. 加标样品谱图

4. 结论

本实验使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪,参照国家药监局发布2019年第48号通告《化妆品中西咪替丁的检测方法(高效液相色谱法)》进行方法优化,有针对性的建立了化妆品中西咪替丁成分及含量的测定方法。结果表明,西咪替丁在0.5~50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性良好,相关系数大于0.999;精密度实验中,西咪替丁保留时间的RSD%在0.120%~0.349%之间;峰面积的RSD%在0.791%~1.727%之间,仪器精密度良好;并且西咪替丁的回收率分布在93.86%~96.58%之间。岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪具有分析速度快、稳定性好、结果准确度高等特点,适用于多种相关行业的质量控制及分析检验工作。

第五章 Nexera LC-40 全新功能



在液相分析实验中，溶剂的物理和化学性质影响反应平衡和反应速度的效应，称为溶剂效应。当样品溶剂洗脱强度明显强于流动相时，产生色谱峰前沿、拖尾、分裂、色谱柱柱效降低等现象，这些现象会影响定量结果。Nexera LC-40 液相色谱仪所提供的 Co-injection 进样功能可在液相分析实验中，消除样品溶剂效应，保证色谱分离效果，提供实验便利性和准确性。

在数据处理过程中，当两个成分无法通过色谱完全分离时，通常不能进行准确的积分，造成定量不准确的问题。SPD-M40 光电二极管阵列检测器（PDA）能同时得到全波长范围的吸光度值，即光谱图信息。当两个化合物未能被色谱柱完全分离时，可使用软件的智能解卷积功能（i-PDeA II），通过将紫外光谱图求导数的方法区别共流出物，两个化合物可在不同的通道显示，色谱图峰形无干扰。i-PDeA II 功能在之前版本的基础上进一步优化，能够更好地量化没有被色谱柱充分分离的组分/峰。通过简单地设定 LabSolutions 中的时间和波长参数来实现色谱峰分离。

本章内容主要介绍岛津 Nexera LC-40 系统 Co-injection 功能及 SPD-M40 智能峰解卷积功能（i-PDeA）的应用，充分展示仪器全新功能的优势和特点，供相关行业从业人员参考。

Co-injection 用于 HPLC 分析中溶剂效应的去除应用

摘要： Nexera LC-40 液相色谱仪，融合多种尖端技术，让 HPLC 分析进入智能化时代。本文就其中自动进样器 Co-injection 功能在消除进样分析时的溶剂效应进行介绍。

关键词： LC-40 Co-injection 溶剂效应

在液相分析实验中，溶剂的物理和化学性质影响反应平衡和反应速度的效应，称为溶剂效应。以反相色谱为例，当流动相为水+甲醇，样品溶剂为纯甲醇，且进样体积较大时，样品注入色谱系统后，两端靠近流动相的目标物逐渐扩散进入流动相，中心区域目标物仍溶在原溶剂中，目标物进入色谱柱后，流动相氛围中的目标物以正常速度被洗脱，

溶剂氛围中的目标物因强溶剂洗脱，移动速度快，样品在空间上开始分裂，即当样品溶剂洗脱强度明显强于流动相时，产生色谱峰前沿、拖尾、分裂、色谱柱柱效降低等现象，会影响定量结果。Nexera LC-40 液相色谱仪所提供的 Co-injection 进样功能可在液相分析实验中，消除样品溶剂效应，保证色谱分离效果，提供实验便利性和准确性。

1. 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 系统。具体配置为：LC-40B X3 输液泵，SIL-40C X3 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SCL-40 系统控制器，SPD-M40 光电二极管阵列检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色 谱 柱 : Inertsustain™ C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm)
流 动 相 : A 相为超纯水, B 相为甲醇
流 速 : 1.0mL/min
柱 温 : 40°C
进 样 量 : 20 μL
波 长 : 254 nm
洗 脱 程 序 : 梯度洗脱, 初始 B%为 65。

表 1. 梯度时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.01	Pumps	Pump B Conc.	65
12.00	Controller	Stop	

2. 结果讨论

2.1 溶剂效应

对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯属于尼泊金复合酯，是一种广谱性高效食品防腐剂，应用范围广泛。由于尼泊金复合酯较难溶于水，所以通常是将它们先溶于有机溶剂中，然后分析。

在进行上述尼泊金复合酯实验时，发现四个化合物色谱峰发生明显峰前沿现象，拖尾因子均已小于 1.0，严重影响峰型，进而影响实验定量结果准确性，出现了色谱分析中典型的溶剂效应现象。

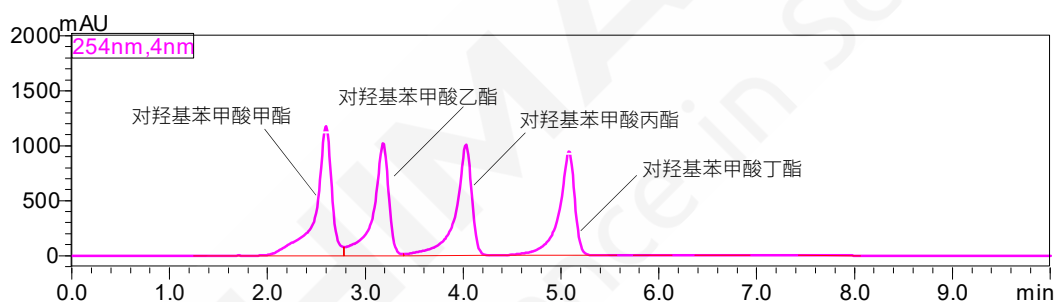


图 1. 典型的溶剂效应色谱图

色谱分析中溶剂效应发生的原因，以反相色谱为例，一般认为是样品溶剂强度明显强于流动相强度时，而造成色谱峰前沿等展宽现象。溶剂效应消除的办法，有 1) 使用初始流动相比例作为样品溶剂；2) 使用弱洗脱强度的溶剂稀释样品；3) 减少进样体积等手段。但相应存在一些问题，如在方法开发过程中，无法得到明确的初始流动相比例；使用弱洗脱强度溶剂溶剂样品，有时无法保证样品溶解性；减少进样量自然就降低灵敏度。面对以上问题，以下介绍一种使用自动进样器进样前自动稀释功能实现溶剂效应消除的方法，称为 Co-injection。

2.2 Co-injection

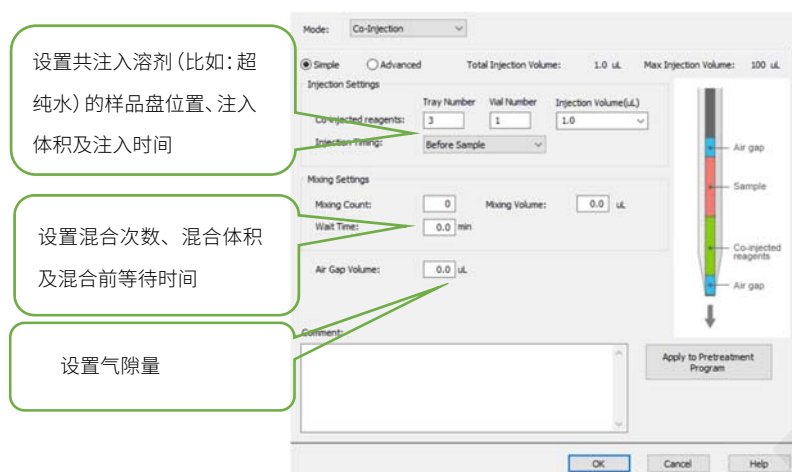


图 2. Co-Injection 功能示意图

针对上述四种对羟基苯甲酸酯类化合物分析中出现的溶剂效应现象，采用 Co-injection 功能进样分析。以下对 Co-Injection 功能中的共进样溶剂体积进行考察，探究其对溶剂效应的影响。

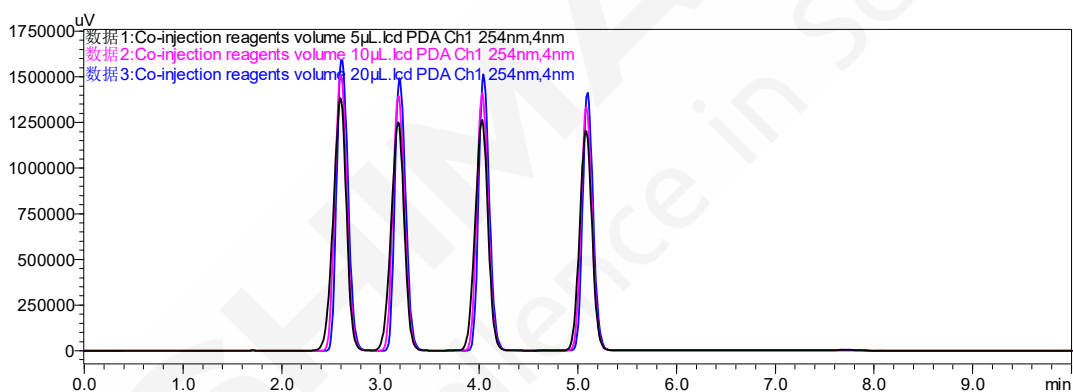


图 3. Co-injection 共进样溶剂体积优化色谱图

从表 2 可以看出，不同 Co-injection 溶剂体积对样品溶剂效应具有一定影响。保留时间和峰面积会随着 Co-injection 溶剂体积的变化而变化，但不显著，充分保证了样品的定性和定量能力；分离度随着 Co-injection 溶剂体积的增加而变大，表明样品色谱峰分离效果变好；拖尾因子也随着 Co-injection 溶剂体积的增加而变大，从图 4 中可以看出，Co-injection 模式下的色谱峰较之未进行 Co-injection 模式下的色谱峰，峰型尖锐、匀称，无峰前沿现象，明显消除溶剂效应。在此实验中，Co-injection 溶剂体积为 10 μL 时，拖尾因子较接近于 1.0，表明色谱峰较匀称，接近正态分布，故选择 10 μL 的 Co-injection 溶剂体积进行重复性实验。

表 2. 不同共进样溶剂体积对分离结果的影响

	对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯			
	RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.
5 μL	2.60	12937942	N/A	0.91	3.18	11668417	2.23	0.93	4.03	11572538	3.26	0.96	5.08	10551416	4.17	0.99
10 μL	2.60	12919572	N/A	1.06	3.18	11652615	2.46	1.07	4.03	11558558	3.63	1.08	5.08	10546697	4.62	1.09
20 μL	2.61	12902212	N/A	1.17	3.19	11633100	2.61	1.17	4.04	11531310	3.87	1.15	5.09	10524937	4.87	1.13

注：RT 表示保留时间 (min)，Area 表示峰面积，Res.表示分离度，Tail.表示拖尾因子。

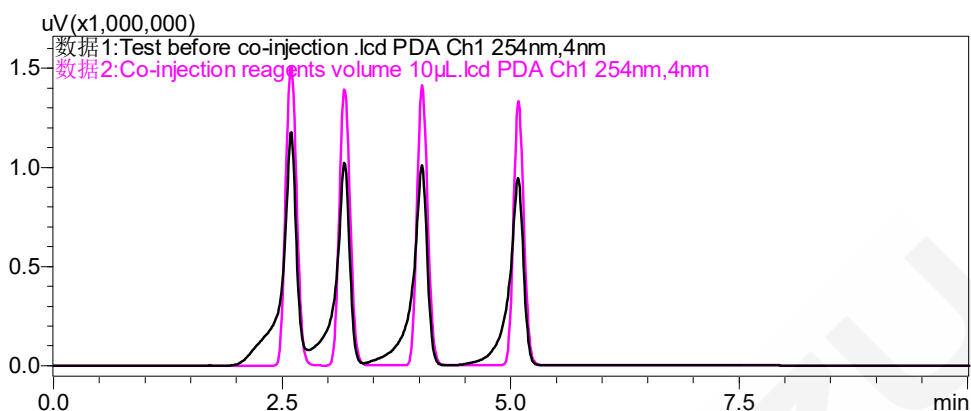


图 4. Co-injection 共进样前后色谱图对比图

2.3 重复性

在 Co-injection 共进样溶剂体积为 10 μ L 时的分析条件下进行重复测定 6 次，进行重复性考察。

从表 3 中可以看出，Co-injection 模式下 6 针连续进样条件下，各个化合物保留时间和峰面积的 RSD%均小于 0.1%，表明 Nexera LC-40 液相色谱仪在 Co-injection 进样模式下，能够明显消除溶剂效应，且仪器稳定可靠、重复性良好。

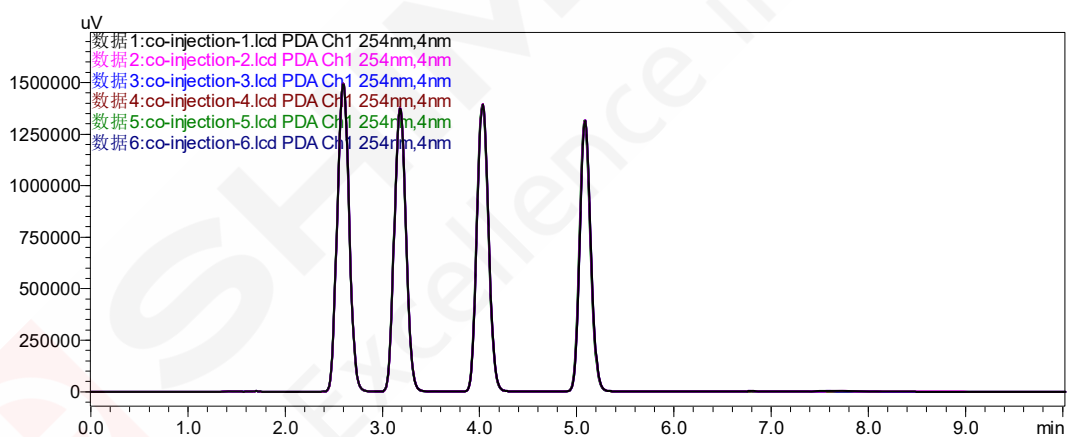


图 5. Co-injection 模式进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

表 3. 重复性结果

	对羟基苯甲酸甲酯		对羟基苯甲酸乙酯		对羟基苯甲酸丙酯		对羟基苯甲酸丁酯	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	2.597	12865808	3.182	11603398	4.032	11500452	5.086	10499547
Injection-2	2.597	12874155	3.182	11609120	4.031	11510229	5.085	10507809
Injection-3	2.597	12864378	3.183	11600888	4.032	11503641	5.086	10498763
Injection-4	2.596	12865977	3.182	11600413	4.031	11500034	5.085	10494479
Injection-5	2.596	12858989	3.18	11597275	4.028	11496792	5.081	10492201
Injection-6	2.596	12851041	3.181	11590686	4.030	11493240	5.083	10487131
Average	2.596	12863391	3.182	11600297	4.030	11,500731	5.084	10496655
RSD%	0.02	0.06	0.03	0.05	0.03	0.05	0.04	0.07

3. 结论

针对 HPLC 分析中常见的溶剂效应现象, 本实验以四种对羟基苯甲酸酯类化合物分析为例, 在 Nexera LC-40 液相色谱仪上采用 Co-injection 进样功能, 明显消除了溶剂效应。同时, 重复性实验结果显示, 连续 6 针进样分析, 四种化合物的保留时间和峰面积 RSD% 均小于 0.1%, 表明仪器稳定可靠、重复性良好。Nexera LC-40 液相色谱仪, 融合多种尖端技术, 为实验工作者提供了可靠的、智能的分析模式, 并保障了数据可靠性、实验简便性。



SPD-M40 智能峰解卷积功能 (i-PDeA) 及其应用

摘要: 液相色谱分析中,当两个成分无法通过色谱完全分离时,光电二极管阵列检测器(PDA)可获得与单一主成分不同的光谱图,是用于确认共流出成分(杂质)存在的有利工具。通过在软件中使用智能峰解卷积(i-PDeA)功能,PDA获得的UV光谱可通过导数的方式区别共流出成分,使得未分离的组分在不同的通道得以区分。

关键词: Nexera LC-40 光电二极管阵列检测器 智能峰解卷积功能 i-PDeA

当两个成分无法通过色谱完全分离时,通常不能进行准确的积分,造成定量不准确的问题。如下图中的甲苯磺丁脲(Tolbutamide,前峰)和伏立康唑(Voriconazole)分别是降血糖和广谱抗真菌的药物,在色谱上未能达到基线分离,如使用紫外检测器分析,则不能进行准确定量。但如果使用光电二极管阵列检测器(PDA),定量不准确的情况是否可以改善呢?

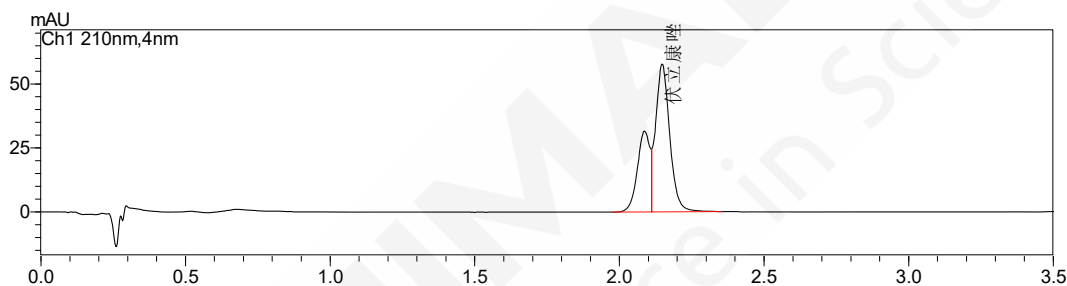


图 1. 伏立康唑和甲苯磺丁脲的原始色谱图

众所周知,相比紫外可见检测器,光电二极管阵列检测器(PDA)能同时得到全波长范围的吸光度值,也就是其光谱图信息。当两个化合物未能被色谱柱完全分离时,可使用软件的智能解卷积功能(i-PDeA),通过将紫外光谱图求导数的方法区别共流出物。图2是使用i-PDeA功能后获得的导数色谱图。此时,伏立康唑和甲苯磺丁脲可在不同的通道显示,色谱图峰形无干扰。

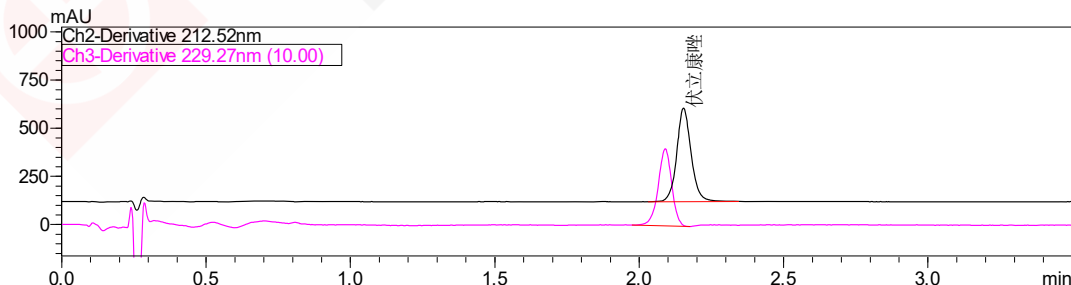


图 2. 伏立康唑和甲苯磺丁脲的导数色谱图

下面以甲苯磺丁脲和伏立康唑这两个化合物的分离为例,介绍i-PDeA的功能及使用。图3为PDA检测器采集的甲苯磺丁脲和伏立康唑3D色谱-光谱图,通过色谱图和UV光谱这两组信息,可对数据进行解卷积并确定共流出峰中每种化合物的含量。

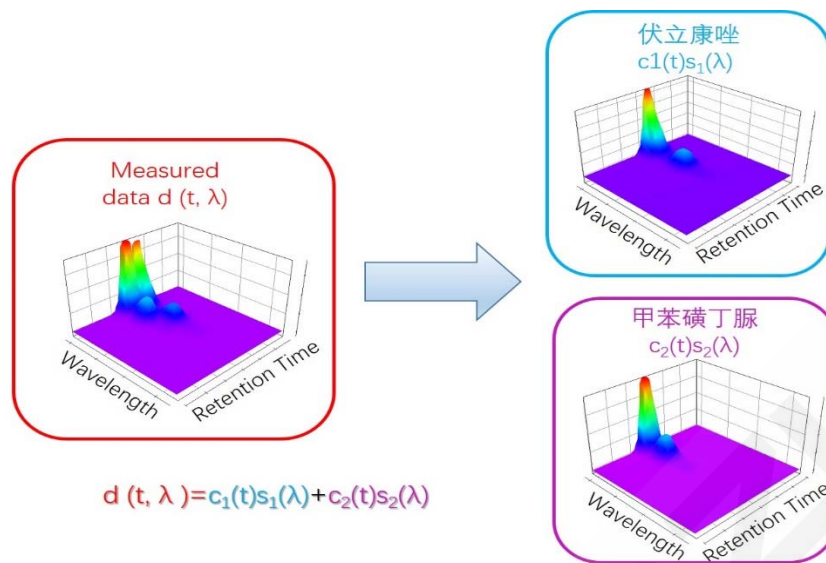
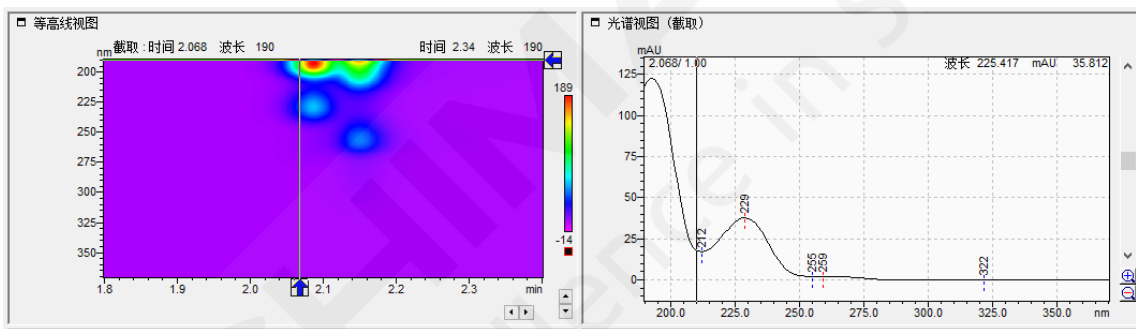


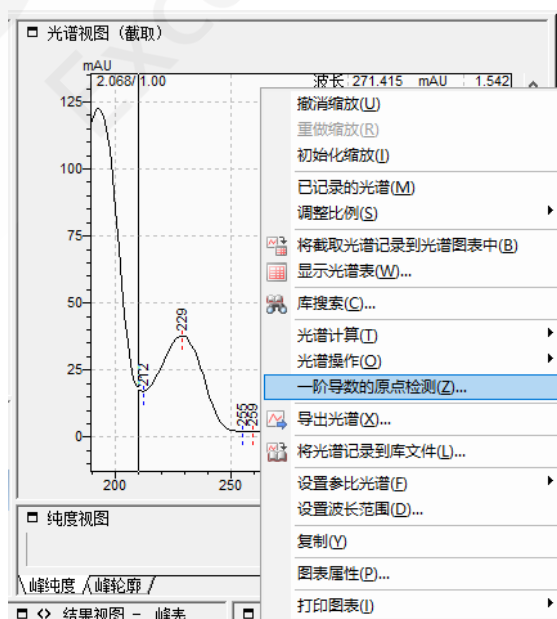
图3. PDA检测器采集的甲苯磺丁脲和伏立康唑3D色谱-光谱图

1. i-PDeA 操作步骤说明

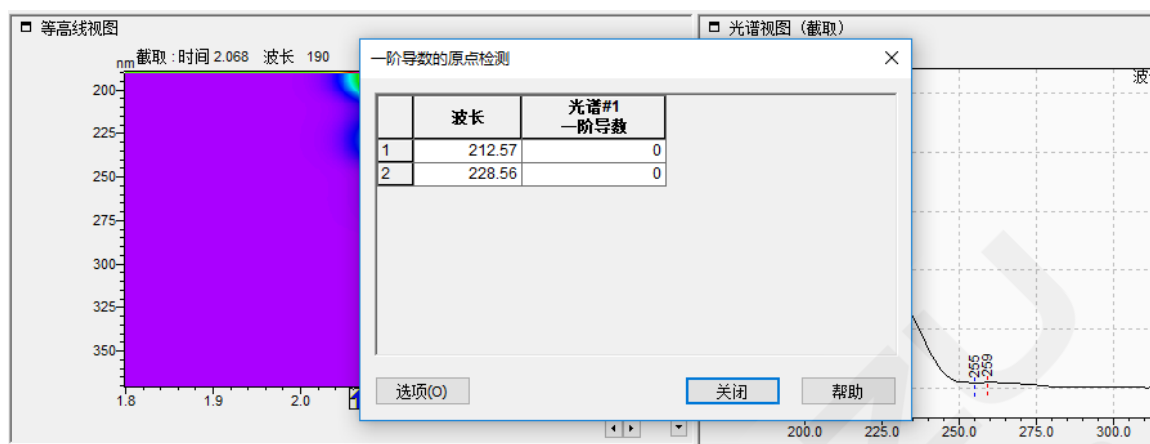
1) 打开数据文件，选择截取的光谱图



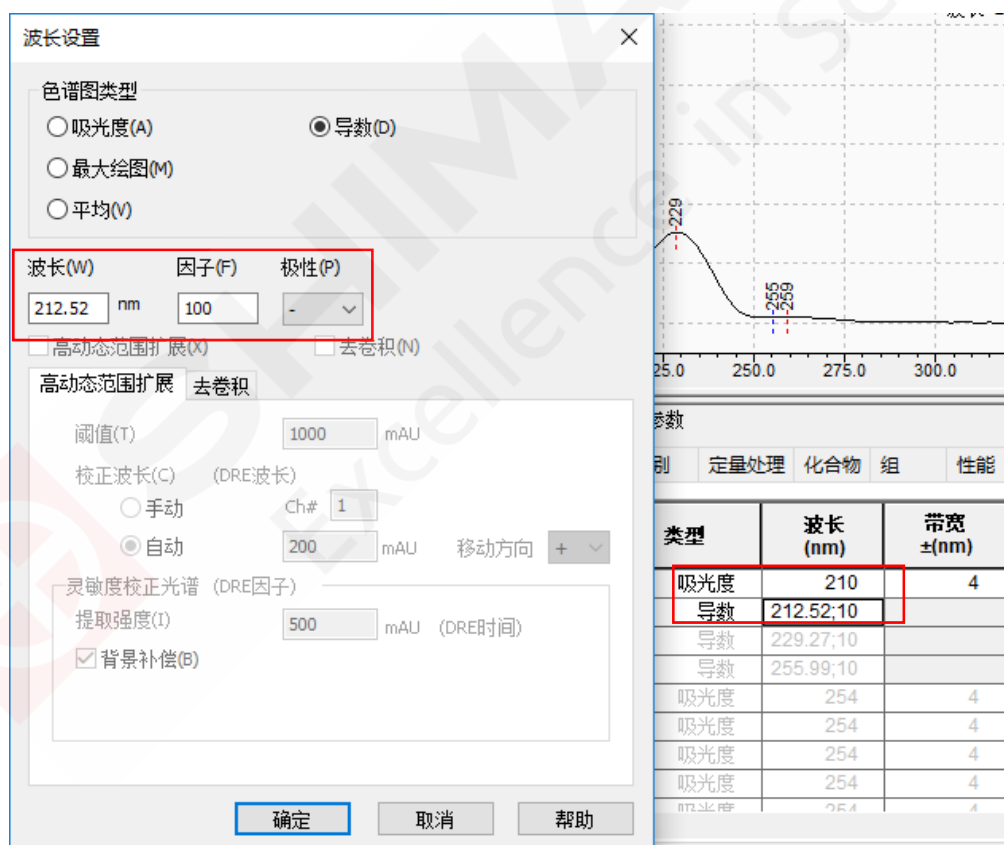
2) 右键选择“一阶导数的原点检测”



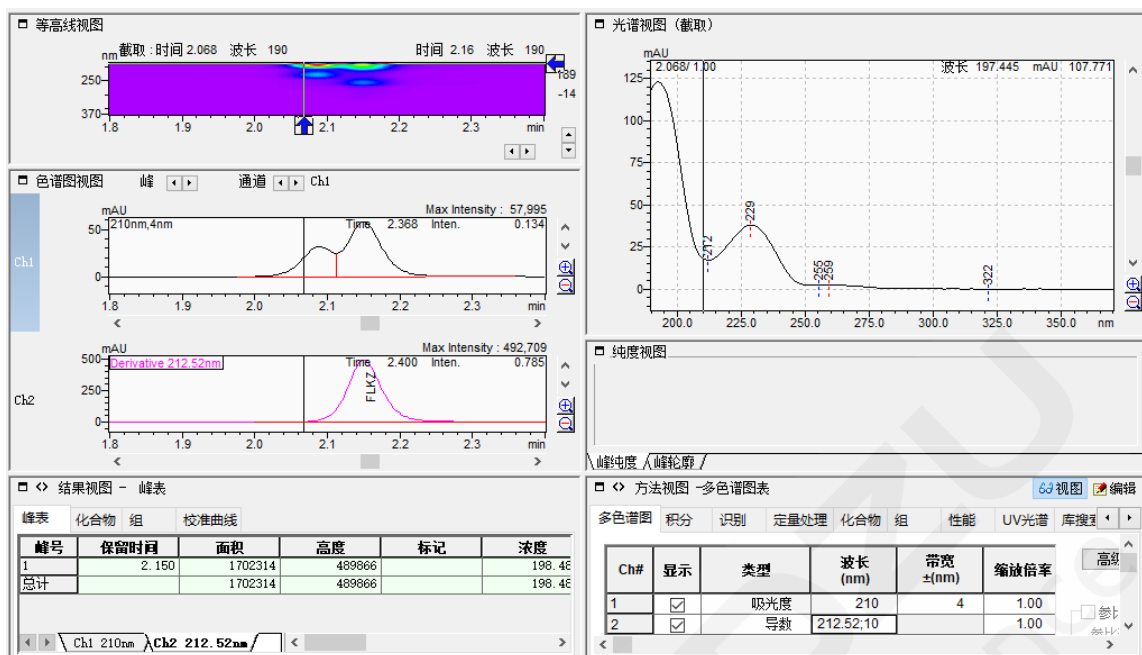
3) 从“一阶导数的原点检测”中选择最合适的波长，212.57 在此例中是最合适的波长。



4) 在方法视图中打开“多色谱图”选项卡，设置 CH1 波长为 210 nm, CH2 为导数色谱图。在波长设置窗口中，如果在'波长'框中输入在'一阶导数的原点检测'窗口中检测到的波长值（本例中为 212.57 nm），则将显示新计算的色谱图。另外，还需根据创建的色谱图在“因子”和“极性”框中进行适当的设置。



5) 点击“查看”按钮，将显示 CH2 色谱图。如果感兴趣的是前峰（此例中为第一个峰），请将“一阶导数的原点检测”应用于后峰（第二个峰），反之亦然。如果处理的色谱图为倒峰，则需要在波长设置窗口更改极性设置。



2. i-PDeA 功能定量计算

2.1 标准曲线

应用 i-PDeA 功能对该例中的后峰（伏立康唑）进行定量计算，保持甲苯磺丁脲的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，伏立康唑的浓度为 0.2、2、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配制标准曲线（见下图 4），标准曲线为 $Y=42034.2 X+895.575$ ，相关性系数 $R^2=0.9997$ ，准确度在 96.1%至 134.3%之间。

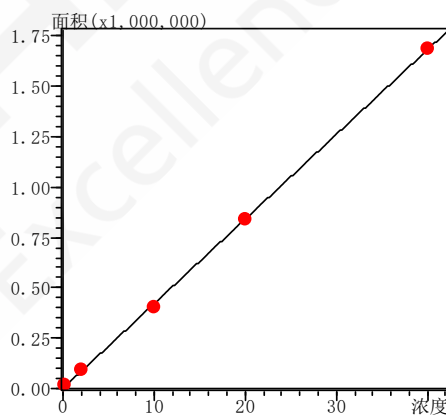


图 4. 应用 i-PDeA 功能得到的伏立康唑的标准曲线

2.2 重复性考察

将甲苯磺丁脲的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，伏立康唑的浓度为 0.2、10 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三个溶液连续进样 6 次，考察 i-PDeA 功能下伏立康唑的重复性，保留时间的 RSD 在 0.09~0.11% 之间，峰面积的 RSD 在 0.17~3.16% 之间，具体值如下表 1 所示。

表 1. 应用 i-PDeA 功能得到的伏立康唑重复性结果

	0.2 $\mu\text{g/mL}$		10 $\mu\text{g/mL}$		40 $\mu\text{g/mL}$	
	保留时间	面积	保留时间	面积	保留时间	面积
RSD%	0.09	3.16	0.10	0.17	0.11	0.40

3. 结论

采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱系统的 SPD-M40 智能峰解卷积功能 (i-PDeA)，对色谱中未完成分离的伏立康唑进行定量计算，峰形尖锐无干扰，线性相关性系数良好，对高中低不同浓度的样品进行重复性考察，峰面积 RSD 在 0.17~3.16% 之间，完全可满足定量分析的需要。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 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 14F
邮政编码: 100020
电话: (010) 8525-2310/2312
传真: (010) 8525-2326/2329

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

沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F
邮政编码: 110016
电话: (024) 2325-5577
传真: (024) 2383-6378

四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层
邮政编码: 610015
电话: (028) 8619-8421/8422
传真: (028) 8619-8420

武汉

湖北省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) 59080488
传真: (027) 59080470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦4-5楼
邮政编码: 510656
电话: (020) 37183888
传真: (020) 37183804

西安

陕西省西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710000
电话: (029) 6273-7878
传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座
邮政编码: 830000
电话: (0991) 230-6271/6272
传真: (0991) 230-6273

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) 315-2987
传真: (0871) 315-2991

南京

南京市鼓楼区汉中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元
邮政编码: 210005
电话: (025) 8689-0258
传真: (025) 8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室
邮政编码: 400010
电话: (023) 6380-6057/6058
传真: (023) 6380-6551

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼P2.6-1C
邮政编码: 518042
电话: (0755) 8340-2852
传真: (0755) 8389-3100

河南

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
传真: (0371) 8663-2982

香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,
Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong
电话: (00852) 2375-4979
传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线: 800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知