

全新 UHPLC 技术在药物分析中的应用

龙珍 刘晓达 金燕
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

快速分析 UHPLC 中药指纹图谱 蛋白质 Vanquish

引言

高效液相色谱已有近五十年的发展历史，期间色谱分离时间缩短了好几倍，使用的色谱填料粒度越来越小，如 Accucore Vanquish UHPLC 色谱柱使用 1.5 微米粒径的表面多孔实心核增强技术的固定相。理论上色谱柱的最小塔板高度为 2 dp，受各种因素影响，实际的最小塔板高度约为 3-3.5 dp。最佳流动相线速度与填料粒径 dp 成反比关系，填料粒径越小，最佳线速度越高，最佳流速范围越宽，越适合快速分离分析，如配合使用系统压力脉动更低、检测器灵敏度更高的 Vanquish UHPLC，可实现几十秒梯度时间的超快速分离。

在常规 HPLC 分析中，为了获得较高的分离度，往往需要使用更长的色谱柱和分析时间，并且在一定程度上牺牲检测灵敏度（色谱峰随保留时间延长而展宽）。根据范氏曲线（如图 1）^[1]，当使用小粒径色谱固定相时，如将粒径为 5 μm、柱长为 L 的色谱柱换成 1.7 μm 粒径相同长度的色谱柱，分离效率可增加 3 倍。这意味着可以使用粒径 1.7 μm、柱长为 1/3 L 的色谱柱获得粒径为 5 μm、柱长为 L 的色谱柱同样的柱效，从而极大的缩短分析时间。使用小粒径固定相可以提高分离效率、节约分析时间和流动相，但使用小粒径固定相也将极大增加系统压力。从 Darcy 公式可知，将粒径减小到 1/3，系统压力将增加 9 倍（式 1）^[2]。这对系统压力在 400 bar 以下的常规液相来说，意味着除非使用较短的色谱柱，否则小粒径色谱柱将无法在普通 HPLC 上使用，或者无法以正常流速使用（最佳线速度所需压力超过 HPLC 压力上限）。

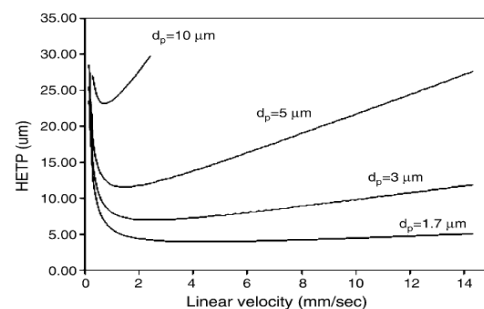
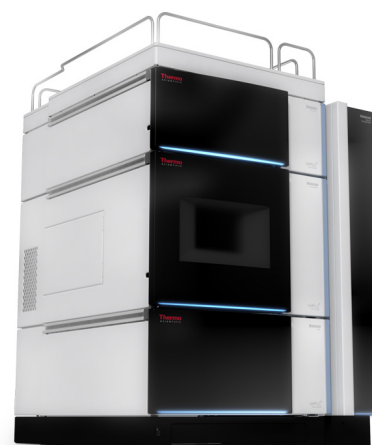


图 1. 不同粒径色谱固定相的范氏曲线

$$\Delta P = \frac{\Phi_0 u_0 \eta L}{d_p^2} \quad (\text{式 1})$$

u_0 : 线速度; d_p : 固定相粒径; Φ_0 : 柱阻抗因子; η : 流动相粘度; L : 柱长

超高效液相色谱 (UHPLC) 是 HPLC 的发展方向, UHPLC 系统除提供更高的耐压能力 (>1000 bar) 外, 还具有更小的梯度延迟体积和检测器池体积, 以及更高的检测器采集

频率^[3,4]。Vanquish 系统将高端 UHPLC 提升到了一个新的水平,带来技术指标上的全面提升,系统可以承受更高的压力、提供更好的热稳定性、优化的系统体积、实现更好的线性和更高的检测灵敏度。

从 2004 年开始, UHPLC 已用于制药^[1,5]、临床^[6,7]和复杂样品^[8-10]分析,一般使用 3 cm 到 15 cm 长的 UHPLC 色谱柱。现在 Vanquish UHPLC 系统上可串联使用两根 25 cm 长、填充 2.2 μm 颗粒填料的色谱柱,特别适用于复杂样品的分离。本文通过峰容量、分离速度、进样精密性、泵精密性等指标来考察系统性能,同时从药物分析方面的应用来说明如何选择高效的分离系统。

测试条件

仪器

1. U3000 液相色谱系统:

泵: LPG-3400SD

自动进样器: WPS-3000SL

柱温箱: TCC-3000SD

检测器: DAD-3000

2. Vanquish UHPLC 系统:

检测器: Vanquish Diode Array Detector

柱温箱: Vanquish Column Compartment

自动进样器: Vanquish Autosampler

泵: Vanquish Binary Pump

3. 某品牌高端 UHPLC 液相色谱系统

色谱条件

色谱柱: Acclaim C18 柱 (2.1 x 250 mm, 2.2 μm) 用于液相系统性能考察; Acclaim PALL 柱 (2.1 x 150 mm, 2.2 μm) 用于银杏提取液分析; 大连化物所 SEC 柱 (4.6 x 150 mm, 5 μm) 用于蛋白样品分析。

柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

检测波长: 210 nm, 254 nm, 270 nm, 265 nm

样品前处理

(1) 快速分析样品: 哈巴俄苷、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 IIA 溶于 30% 丙酮水溶液;

(2) 复杂样品: 银杏注射液;

(3) 生物样品: IgG, 牛血清白蛋白, 碳酸酐酶, 溶菌酶, 细胞色素 C 和尿嘧啶。

结果与讨论

(1) 液相系统性能考察

本节内容中,我们选择哈巴俄苷、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 IIA 作为分析物,测试和比较各液相系统性能。哈巴俄苷是玄参的重要活性成分,隐丹参酮、丹参酮 I 和丹

参酮 IIA 是丹参的重要活性组分。对这三种化合物的定量、定性分析有利于玄参和丹参两种药材的质量控制。

A. 梯度延迟体积

图 2 为 HPLC、Vanquish 和某品牌高端 UHPLC 系统的梯度延迟曲线。从梯度延迟曲线可知 HPLC、Vanquish 和某品牌高端 UHPLC 的梯度延迟体积依次为 1203、242 和 475 μL 。与普通 HPLC 相比,某品牌高端 UHPLC 对泵体积和管路进行了优化,因此具有更小的梯度延迟体积。与某品牌高端 UHPLC 相比, Vanquish 系统做了进一步优化,在保证混合效果的前提下,具有更小的梯度延迟体积,可实现更快的梯度分离。

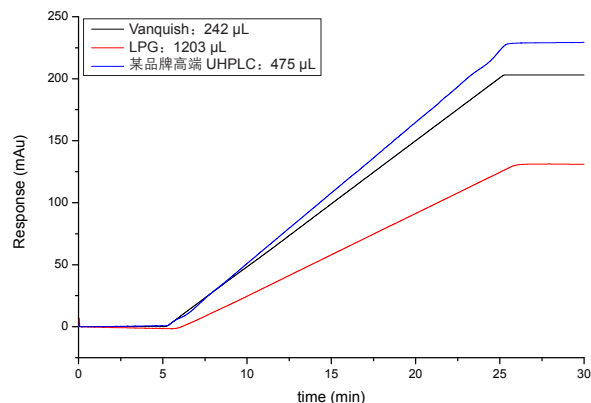


图 2. 普通 HPLC (LPG)、某品牌高端 UHPLC 和 Vanquish 的梯度延迟曲线和延迟体积

以 750 mm x 0.18 mm 管线代替色谱柱;

流动相: A-0.1% 丙酮水; B: 水; 流动相组成: 0-5 min, 5%A; 5-25 min, 5%-95%A; 25-30 min 95%A。

B. 快速分离实验

图 3 比较了相同分析条件下 (流动相组成、进样体积、检测波长和色谱柱), 某品牌高端 UHPLC 系统和 Vanquish 系统对哈巴俄苷、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 IIA 的分离。将 Vanquish 用做分析系统时, 流速为 1 mL/min; 受某品牌高端 UHPLC 系统耐压能力的限制, 将其用做分析系统时, 流速为 0.9 mL/min (>14000 psi)。

如图 2 和表 1 所示, 由于 Vanquish 具有更小的梯度延迟体积并且可以承受更高的系统压力, 可在更高流速下做样品分析, 因此 Vanquish 可以提供更快的分离速度。此外, 快速梯度引起的 Vanquish 基线波动较低, 因此用 Vanquish 做快速分析时, 隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 IIA 具有更高的信号响应。由于 Vanquish 具有较小的柱外体积, 并且可应用于更高的流速, 小粒径固定相在高流速下塔板高度降低。因此, 即使保留时间更短, Vanquish 也能提供比某品牌高端 UHPLC 更好的分离效率。

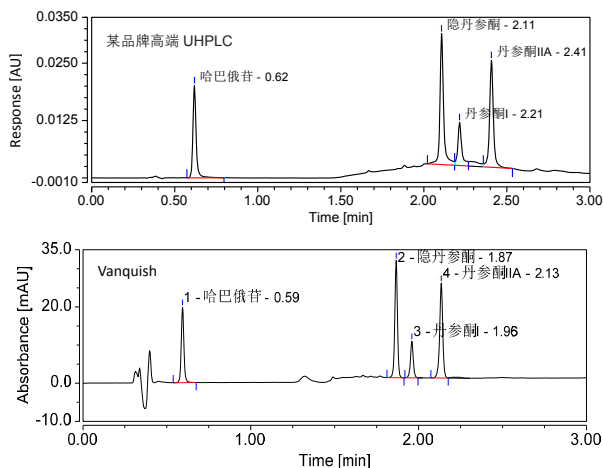


图3. 某品牌高端UHPLC和Vanquish用于活性化合物的快速分析流动相条件：0-0.8 min, 40%-45%乙腈，0.8-1.0 min 45%-80%乙腈，1.0-3.0 min, 80%-90%乙腈，其余为水。某品牌高端UHPLC流速：0.9 mL/min。Vanquish流速：1 mL/min。

表1. 四种分析物在某品牌高端UHPLC和Vanquish系统中的保留行为

化合物	保留时间 (min)		信噪比 (S/N)		塔板数 (Plates/column)	
	Vanquish	某品牌高端UHPLC	Vanquish	某品牌高端UHPLC	Vanquish	某品牌高端UHPLC
哈巴俄昔	0.59	0.62	194.5	200	7233	5873
隐丹参酮	1.87	2.11	757.1	58.9	70237	61151
丹参酮 I	1.96	2.21	198.6	15	71275	58952
丹参酮 IIA	2.13	2.41	717.1	54.1	70059	62882

C. 进样精密度

小体积进样是考察UHPLC的重要方法，表2为0.5 μ L进样体积下，Vanquish和某品牌高端UHPLC的进样精密度。某品牌高端UHPLC可以为哈巴俄昔提供较好的进样精密度，但受基线波动的影响，隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA的进样精密度明显低于哈巴俄昔。经过优化后的Vanquish，不仅可以为哈巴俄昔提供更高的进样精密度，还可以为其它三种化合物提供更高的进样精密度 (RSD < 1%)。

当进样精度较高时，可用同一浓度的样品，进不同体积获取线性曲线。从而减少准备样品的时间并避免样品配制过程中的操作误差。表3为进样体积从0.5-4 μ L条件下四种分析物的线性方程。从结果可知，四种分析物均可在Vanquish上获得较好的线性曲线。此结果进一步证明Vanquish具有优良的进样精密度。

表2. 0.5 μ L进样体积下，Vanquish和某品牌高端UHPLC的进样精密度 (n=6)

化合物	Vanquish	某品牌高端UHPLC
哈巴俄昔	0.70%	1.01%
隐丹参酮	0.54%	3.12%
丹参酮 I	0.99%	2.43%
丹参酮 IIA	0.42%	2.48%

表3. 进样0.5-4 μ L获取四种化合物校正曲线

化合物名称	校正曲线	R ²
哈巴俄昔	A=0.3917C-0.0274	0.9999
隐丹参酮	A=0.5991C-0.0357	1.0000
丹参酮 I	A=0.2000C-0.0114	0.9999
丹参酮 IIA	A=0.5698C-0.0427	1.0000

进样体积：0.5, 1, 2, 3, 4 μ L；相同体积进样3次，取平均值计算线性曲线。

D. 保留时间重复性

保留时间是色谱定性分析的重要依据，直接影响定性分析的准确性。如表4所示，某品牌高端UHPLC可为待测的四种分析物提供较好的保留时间重复性 (RSD < 0.17%)。Vanquish可以提供比某品牌高端UHPLC更好的保留时间重复性 (RSD < 0.05%)。

表4. Vanquish和某品牌高端UHPLC的保留时间RSD值 (n=6)

	Vanquish	某品牌高端UHPLC
哈巴俄昔	0.00%	0.11%
隐丹参酮	0.05%	0.14%
丹参酮 I	0.05%	0.17%
丹参酮 IIA	0.04%	0.16%

(2) Vanquish系统在中药分离中的应用

银杏制品的质量控制，除对主要成分和已知活性成分定量分析以外，指纹图谱的比较也是一种重要的手段。图4是使用普通HPLC (A)和Vanquish (B)获得的银杏提取物指纹图谱。从图中可以看到，在同样的样品和色谱条件下，使用Vanquish系统可检测到更多的色谱峰。更高的峰容量意味着更好的分离能力。例如，用HPLC分析时，在6.7, 11 min处观察到的组分无法实现分离，呈现出一个个“包”，同样的方法、色谱柱和样品，用Vanquish分离时在4.6, 8 min处将上述组分分离成一个个尖锐的色谱峰。又如，1号组分在HPLC上呈现一个色谱峰，在Vanquish上分

出两个色谱峰；2和3号组分在HPLC上呈现出两个共洗脱的肩峰，在Vanquish上为基线分离的两个色谱峰。综上所述，Vanquish具有更小的梯度延迟体积和柱外死体积，提供强大的分离能力，可为中药等复杂样品获取指纹图谱信息提供更高的分辨率。

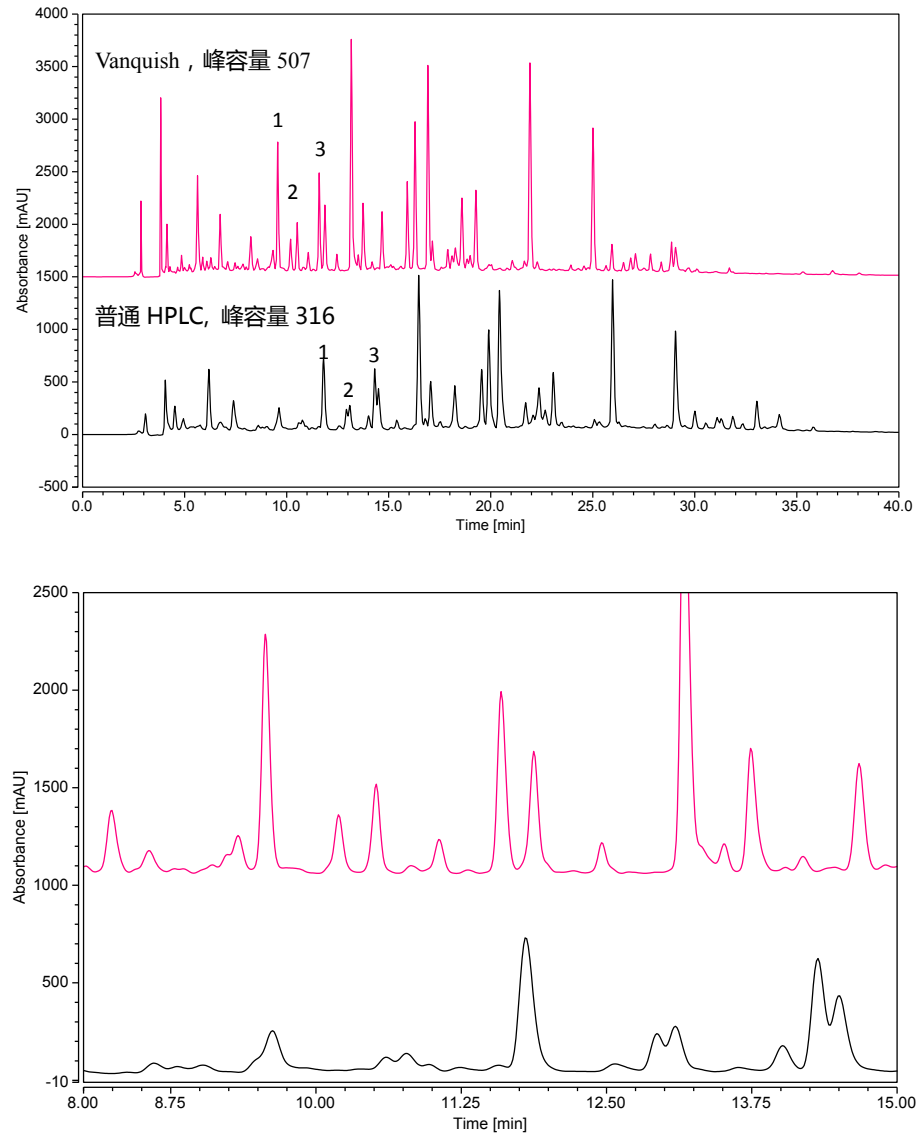


图 4. 普通 HPLC 和 Vanquish 为银杏提取物获取的指纹图谱

- 1 流动相条件：0-25 min, 30%-85% 乙腈, 15% 100 mM 乙酸铵 (pH 5.36);
- 2 流动相条件：0-25 min, 30%-85% 乙腈, 5% 100 mM 乙酸铵 (pH 5.36)。

(3) Vanquish UHPLC 在蛋白质分离中的应用

单抗等蛋白分子的分离需要使用高浓度盐溶液，尤其是 NaCl。普通的不锈钢系统不耐受高盐溶液 (NaCl) 且容易引起蛋白变性和死吸附。因此，蛋白的分离需要使用对蛋白吸附小，能耐受高浓度盐溶液和宽 pH 范围的生物兼容液相系统。Vanquish 是生物兼容的 UHPLC，不仅具有生物兼容的管路材质，还具有优化后的管路体积，为蛋白的分离提供较好方法开发空间。图 5 是以 150 mM NaCl 溶液为洗脱液，体积排阻模式下不同分子量化合物的分离。图 6 是不同浓度 NaCl 用于对 BSA 的体积排阻分离。以上结果显示 Vanquish 可以为生物样品的分离提供较好的峰形和流动相优化空间。

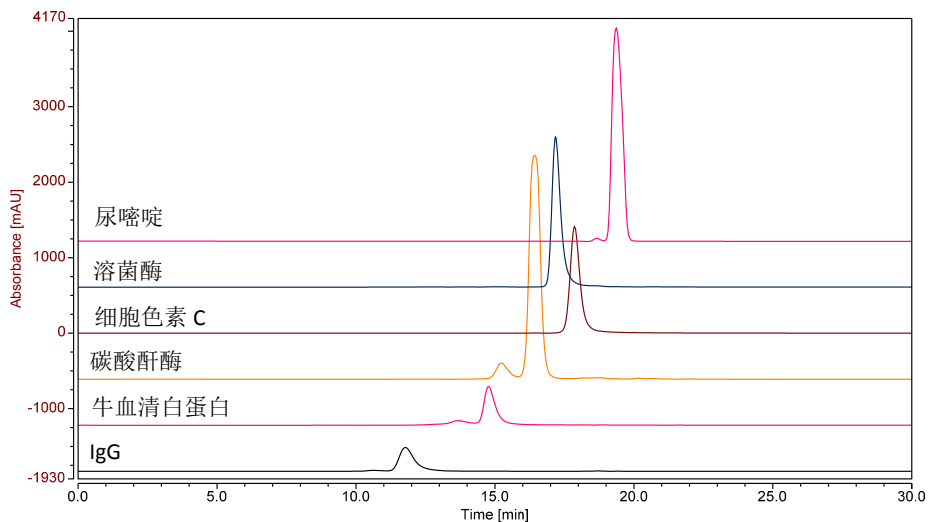


图 5. 不同分子的体积排阻分离。
 流动相：100 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液，pH6.8, 内含 150 mM NaCl；
 流速：0.2 mL/min；紫外检测波长：210 nm.

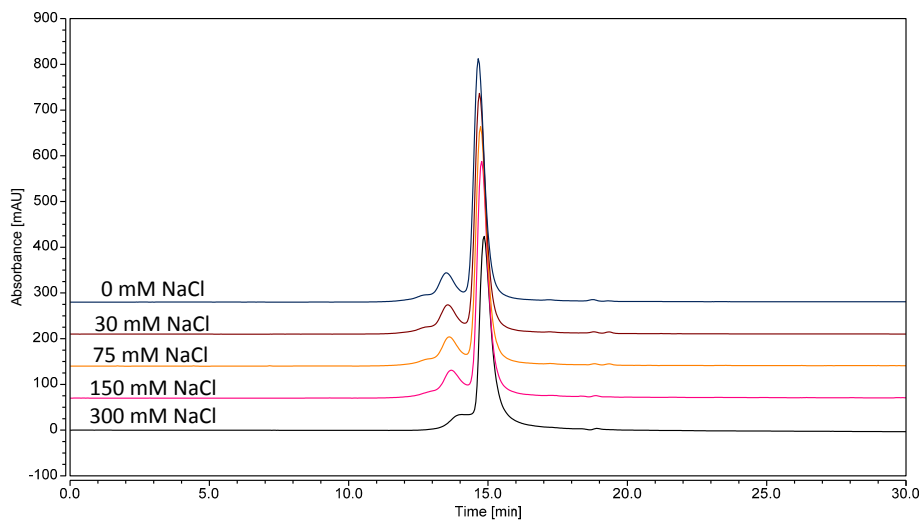


图 6. 不同浓度 NaCl 用于 BSA 分离
 流动相：100 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液，pH6.8, 内含不同浓度 NaCl；
 流速：0.2 mL/min；紫外检测波长：210 nm.

三、应用前景

Vanquish 具有较小的梯度延迟体积（242 μL ，实验数据）和最高的耐压能力（1500 bar, 22000 psi），可以实现其它 UHPLC 无法实现的快速梯度分析。

Vanquish 具有较小的柱外死体积，可提供比 HPLC 更高的峰容量，将为复杂样品指纹图谱分析提供极大的帮助。

Vanquish 具有较高的进样精密密度，即使进样体积低至 0.5 μL ，6 针重复进样峰面积的 RSD 值小于 1%。可通过进样同一样品的不同体积获取线性曲线，可节约大量样品配制时间并减少样品配制带来的误差。

Vanquish 具有较高的流速精度和较好的流动相混合效果，即使在快速梯度分离中，也能表现出较好的保留时间重复性（RSD <0.5%），较小的基线波动。因此，Vanquish 可提高化合物定性分析的准确性和定量分析的灵敏度。

综上所述，Vanquish 无论是在简单样品的快速分离中，还是复杂样品的指纹图谱分析中都具有优良的表现。

参考文献

- [1] Novakova L, Matysova L, Solich P (2006) *Talanta* 68:908-918
- [2] Nguyen DTT, Guillaume D, Rudaz S, Veuthey J-L (2006) *Journal of Separation Science* 29:1836-1848
- [3] Carr PW, Wang X, Stoll DR (2009) *Analytical Chemistry* 81:5342-5353
- [4] Chen S, Kord A (2009) *Journal of Chromatography A* 1216: 6204-6209
- [5] Gilpin RK, Gilpin CS (2007) *Analytical Chemistry* 79: 4275-4294
- [6] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R, Human Serum Metabolome HC (2011) *Nature Protocols* 6:1060-1083
- [7] Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH (2007) *Analytical Biochemistry* 363:185-195
- [8] Liu M, Li Y, Chou G, Cheng X, Zhang M, Wang Z (2007) *Journal of Chromatography A* 1157: 51-55
- [9] Crockford DJ, Holmes E, Lindon JC, Plumb RS, Zira S, Bruce SJ, Rainville P, Stumpf CL, Nicholson JK (2006) *Analytical Chemistry* 78:363-371
- [10] Tistaert C, Dejaegher B, Heyden YV (2011) *Analytica Chimica Acta* 690: 148-161

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC