

# 研究超高效液相色谱法的应用进展

——以药物分析为例

宋娇娇 刘胜杰 王 祥 时二敏 梁 丹

熠品(贵阳)质量科技有限公司 贵州贵阳 550014

**摘要:**近年来,超高效液相色谱法以超高灵敏度、超高分离度、超高速等特点成为新型液相色谱法。本文对超高效液相色谱法作出基本阐述,并对其基本原理作出描述,重点研究了超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展。

**关键词:**超高效液相色谱法;药物分析;应用进展

## Application progress of Ultra-HPLC

— Takes the drug analysis as an example

Jiaojiao Song, Shengjie Liu, Xiang Wang, Ermin Shi, Dan Liang

Yipin (Guiyang) Quality Technology Co., LTD., Guiyang, Guizhou province, 550014

**Abstract:** In recent years, uHPLC has become a new type of UPLC with ultra-high sensitivity, ultra-high separation, and ultra-high velocity. This paper describes the uHPLC fundamentals, and highlights the progress of uHPLC applications in drug analysis.

**Keywords:** ultra-high performance liquid chromatography; drug analysis; application progress

近年来,超高效液相色谱法得到了迅速发展,其是一种液相技术,主要使用小颗粒填料,可以显著提高塔效率,有效缩短检查时间,从而减少溶剂消耗。超高效液相色谱法(UPLC)由于其与普通高效液相色谱(HPLC)相比具有更高的优势,在临床试验中得到了广泛的应用。基于此,本文研究了超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展,具体如下:

### 一、UPLC基本概念

UPLC借助于HPLC的理论及原理,涵盖了小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术,增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量。UPLC是一个新兴的领域,作为世界第一个商品化UPLC产品的Waters ACQUITY UPLCTM超高效液相色谱系统在1996年问世,之后像安捷伦、岛津等公司也陆续开始生产超高效色谱仪,超高效液相色谱仪已经开始逐渐地投入液相实验<sup>[1]</sup>。UPLC的原理与HPLC基本相同,所改变的地方有以下几点:小颗粒、高性能微粒固定相的出现。与HPLC相比,UPLC具有以下优势:高分离度:根据液相色谱分离的解析度方程,解析度正比于柱效能的平方根。而根

据范迪姆特色谱理论,柱效反比于系统固定相粒度大小。UPLC系统运用的固定相粒度能达到 $1.7\mu\text{m}$ ,根据上述方程,该系统达到的效能将比 $5\mu\text{m}$ 粒度系统高70%,而比 $3.5\mu\text{m}$ 高40%;高速度:在保证得到同样质量数据的前提下,UPLC能提供单位时间内更多的信息量。在不影响解析度的情况下,小粒度能提供更高的分析速度,同样也能使柱长减少,根据VanDeemter色谱理论,最优流速反比于粒度大小<sup>[2]</sup>;灵敏度过去对于提高灵敏度的研究大都集中于检测器上,不论是光学检测器还是质量检测器。而UPLC能提高柱效 $N$ ,从而使峰宽 $w$ 变的更窄,而峰高却增加了。同时,由于UPLC运用了更短的柱子(柱长 $L$ 更小),进一步增加了峰高。因此,在提高柱效的同时,运用 $1.7\mu\text{m}$ 的UPLC系统比 $5\mu\text{m}$ 和 $3.5\mu\text{m}$ 的系统灵敏度分别提高了70%和40%,而在柱效下相同情况下,能分别提供3倍和2倍的灵敏度。如今,UPLC主要应用于药物分析,如天然产物中复杂组分的分析;生化分析,如蛋白质、多肽、代谢组学等生化样品;食品分析,如食品中农药残留的检测;环境分析,如水中微囊藻毒素的检测;其他,如化妆品中违禁品的检测<sup>[3]</sup>。

## 二、UPLC在药物分析中的应用

### 1. UPLC用于药物含量测定

药物含量是指一种药品制剂中包含的国家标准规定的有效成分的数量。设计其测定方法时,应根据药品特性、剂型、处方、鉴别试验和纯度检查综合考虑,当鉴别试验和纯度检查保证了专属性和纯度的情况下,含量测定方法的选择要着眼于准确性、稳定性和可重复性。采用UPLC用于药物含量测定,主要涉及:①精密度的RSD $\leq 2\%$ ( $n=5$ );②准确度:用于制剂时,要考察辅料的影响,将一定量药物加到按处方比例配制的辅料中(为标示量的80%~120%)制成高、中、低三个剂量,混合均匀后,每个剂量取三份样品,按拟定方法测定回收率,应在98%~102%之间( $n=9$ , RSD $\leq 2\%$ );③线性范围:用已知含量的精制品配制一系列浓度的溶液( $n=5-7$ ),用浓度C对峰面积A或峰高h或被测物的响应值之比进行回归处理,线性方程的相关系数 $r \geq 0.999$ ,截距应趋于零,并提供线性关系图;④专属性:辅料、有关物质或降解产物峰对主药峰应无干扰;⑤耐用性:考察测定条件(供试液稳定性、流动相组成和pH值、不同品牌或批号的同类色谱柱、柱温、流速、样品提取次数、时间等)有微小变动时,测定结果不受影响的承受程度,如测试条件要求苛刻时则应在方法中注明;⑥灵敏度:作为常量分析法,此项可不作主要要求。王晓雯<sup>[4]</sup>等采用UPLC同时测定布洛伪麻片中布洛芬和盐酸伪麻黄碱含量:色谱条件采用Waters BEH Phenyl柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m)色谱柱,氯乙酸溶液(pH3.0)-乙腈(52:48, V/V)流动相,0.5 mL/min流速,257 nm检测波长,35 $^{\circ}$ C柱温,2 $\mu$ L进样量。结果:布洛伪麻片中布洛芬和盐酸伪麻黄碱平均含量分别为99.20%、100.77%,且与使用药典方法测定含量的RSD均未超过0.3%。说明采用UPLC可对布洛伪麻片中布洛芬和盐酸伪麻黄碱含量进行同时测定,且具有快速、准确、合理、便捷的优点。

### 2. UPLC用于测定药物有关物质

检查药物中存在的微量杂质,首要的问题就是要选择一个专属性强的方法,使药物对业含微量杂质的检测也不产生干扰。所以药物中杂质的检查主要是依据药物与杂质在物理性或化学性质上的差异来进行。药物与杂质在物理性质上的差异,主要指药物与杂质在外观始分配或吸附以及对光的吸收等性质的差别;在化学性质上的差异,主要指药物与杂质对某学反应的差别,一般地,是杂质与试剂反应,而药物不反应。根据杂质的控

制要求,可以进行量检查,也可以对杂质进行定量测定。UPLC分离效能高、专属性强和检测灵敏性好,可以准确地测定各组分的峰面积,在杂质检查中的应用日益增多。对于使用UPLC测定含量的药物,可采用同一色谱条件进行杂质检查。检测杂质有四种方法:外标法(杂质对照品法)加校正因子的主成分自身对照测定法、不加校正因子的主成分自身对照法、面积归一化法。王立新<sup>[5]</sup>等采用UPLC测定盐酸莫西沙星片剂有关物质:色谱条件采用Agilent ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m)色谱柱;四丁基硫酸氢铵缓冲液(取0.5 g四丁基硫酸氢铵与1.0 g磷酸二氢钾,加水500 mL使溶解,再加磷酸2 mL,用水稀释至1000 mL,三乙胺调节pH至2.5)-甲醇(80:20)流动相A;四丁基硫酸氢铵-甲醇(20:80)流动相B;进行线性梯度洗脱,1.1 mL/min流速,紫外PDA,293 nm检测波长50 $^{\circ}$ C柱温,20 $\mu$ L进样体积。结果:盐酸莫西沙星主峰与有关物质峰分离良好,杂质检出数远高于较反相液相色谱法;在0.001~1.0 mg/ml范围内盐酸莫西沙星呈良好线性关系( $r^2=0.9995$ ),其检测限为0.1 mg/ml。说明UPLC可有效分离盐酸莫西沙星的11种杂质,可适用于大批量样品中杂质的测定。

### 3. UPLC用于测定药物的血药浓度

血药浓度系指药物吸收后在血浆内的总浓度,包括与血浆蛋白结合的或在血浆游离的药物,有时也可泛指药物在全血中的浓度。药物作用的强度与药物在血浆中的浓度成正比,药物在体内的浓度随着时间而变化。目前,一些有条件的医院对病人除掌握药物的剂量和给药的次数以外,还常常测定血药浓度,以便指导临床选择适合不同个体的最佳治疗方案和最合适的治疗剂量。采用UPLC测定药物的血药浓度,可采用紫外、荧光、电化学或质谱检出。陈君<sup>[6]</sup>等采用UPLC测定人血清中伏立康唑血药浓度:色谱条件:采用Waters UPLC Acquity BEH C18(3.0 mm $\times$ 100 mm, 1.7 $\mu$ m)色谱柱;乙腈(A)-0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(B)流动相,0~5 min梯度洗脱,40%~55%A;5~10 min,55%~75%A;10~15 min,75%~90%A;0.25 mL/min流速;40 $^{\circ}$ C柱温;254 nm检测波长;10 $\mu$ L进样量;Waters PDA检测器;分析时间15 min。结果:8例重症患者血药浓度在1.15~8.08 $\mu$ g/ml之间,血清中伏立康唑线性范围为0.1~20 $\mu$ g/mL,呈良好线性关系( $R^2=0.999$ ),定量下限为0.1 $\mu$ g/mL,保留时间在6.21 min。日间、日内精密度RSD值均 $< 5\%$ ;稳定性RSD值均 $< 10\%$ 。说明UPLC用于测定人血清中伏立康唑血药浓

度中,具有一定准确性、灵敏性和稳定性,具有较高临床使用价值。

#### 4. UPLC用于体内药代动力学研究

药物代谢动力学是定量研究药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄规律,并运用数学原理和方法阐述血药浓度随时间变化的规律的一门学科。随着药物化学的发展及人类健康水平的不断提高,对药物的药代动力学性质的要求越来越高:判断一个药物的应用前景特别是市场前景,不单纯是疗效强,毒副作用小;更要具备良好的药代动力学性质。肽类药物就是最典型的例子。一般来说,体内的许多生物活性肽如内啡肽等均具有高效低毒的特点,但是,体内不稳定,口服无效。UPLC用于体内药代动力学研究更灵敏,在化学药代动力学研究中具有明显优势。同时,其强大的分离和分析能力适用于复杂中药成分和复杂化合物系统的内部代谢。UPLC在药代动力学研究中极其优越,自诞生以来取得了许多成就。董维冲<sup>[7]</sup>等采用UPLC分析人血清中拉莫三嗪、奥卡西平及其代谢物浓度:色谱条件:采用Waters UPLC BEH C<sub>18</sub>柱(50.0mm×2.1mm, 1.7 μm)色谱柱,乙腈-磷酸二氢钾(pH 4.5)=26:74流动相,220nm检测波长,30℃柱温,0.2mL/min流量,2 μL进样量。结果:血清中LTG、OXC和MHD分别在0.25-25.00 μg/ml、0.25-25.00 μg/ml、0.50-50.00 μg/ml范围内呈良性线性关系(R<sup>2</sup>=0.999);方法回收率在88.37%-105.00%之间,LTG、OXC和MHD的绝对回收率分别在78.45%、62.50%和75.76%以上。说明UPLC便捷准确,有效提升了分析效率,可用于临床常规药物代谢浓度研究中。

#### 5. UPLC用于指纹图谱测定

指纹图谱是指某些复杂物质,比如中药,某种生物体或某种组织或细胞的DNA,蛋白质经适当处理后,采用一定的分析手段,得到的能够标示其化学特征的色谱图或光谱图。指纹图谱主要分为中药指纹图谱, DNA指纹图谱和肽指纹图谱。潘晓君<sup>[8]</sup>等采用UPLC测定蛇床子药材的指纹图谱:色谱条件:采用YMC Trait C<sub>18</sub>柱(2.1mm×100mm, 1.9 μm)色谱柱,30℃柱温,1 μL进样量。甲醇(A)-水(B)为流动相;0.20mL/min流

速,310nm为指纹图谱检测波长,248nm为定量分析检测波长。结果:共识别出21批蛇床子药材的指纹图谱中10个共有峰,具有0.997-1.000相似度;其中花椒毒素为峰4,佛手柑内酯为峰8,欧前胡素为峰9,蛇床子素为峰10。由此说明采用UPLC可成功建立蛇床子药材的指纹图谱。

自UPLC推出以来,以其分离速度快、注入量小、溶剂消耗低和分辨率高等优点被广泛应用于许多行业。近年来,国内对这项技术的关注和研究项目不断增加,这也表明这项技术正在成为我们社会中一项重要的分析技术。随着我国医疗卫生监督的发展,UPLC在药品检验中的应用价值也在不断提升,成为药品质量监督的重要技术之一,也为临床药品生产和药品检验提供了便利。

#### 参考文献:

- [1]罗鸣.药物检验分析中应用超高效液相色谱法的研究[J].江西医药,2022,57(5):450-453.
- [2]赵静芝,宿亮,朱婧,等.超高效液相色谱法测定富马酸伏诺拉生原料有关物质[J].中国药事,2022,36(7):800-809.
- [3]李祥胜,高家敏.超高效液相色谱法测定化妆品中15种防晒剂含量[J].安徽医药,2021,25(2):246-249.
- [4]王晓雯,丁大中,栾成章.超高效液相色谱法同时测定布洛伪麻片中布洛芬和盐酸伪麻黄碱含量[J].中国药业,2022,31(16):80-82.
- [5]王立新,田冶,王晨,等.盐酸莫西沙星片剂有关物质超高效液相色谱法的建立[J].中国药物评价,2022,39(3):194-198.
- [6]陈君,黄春新,王敏.超高效液相色谱法测定人血清中伏立康唑血药浓度与临床应用[J].海南医学,2021,32(2):173-176.
- [7]董维冲,郭家良,李亚前,等.超高效液相色谱法分析人血清中拉莫三嗪、奥卡西平及其代谢物浓度[J].中国临床药理学杂志,2022,38(5):453-456.
- [8]潘晓君,吕渭升,杨文惠,等.蛇床子药材指纹图谱及4种香豆素类成分含量测定方法的建立[J].中国药房,2022,33(2):185-190.