

HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究

周新^{*1}, 陈会明¹, 白桦¹, 于文莲¹, 王超¹, 郑健², 张青¹, 陈伟¹, 马强¹

(1. 中国检验检疫科学研究院工业品检验研究所, 北京 100025; 2. 北京市科学技术研究院北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘要: 以分离分析化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂为内容, 对 HPLC 和 UPLC 的色谱条件转换方法进行了研究。比较了采取不同方法转换得到的色谱条件参数的分离状况, 选出了 UPLC 法最佳色谱条件。同时, 用 HPLC 法和 UPLC 法对 4 种化妆品中的 4 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂进行了定量测定, 两种方法的测定结果吻合较好, 相互印证了方法的准确性。

关键词: 超高效液相色谱; 色谱条件转换; 化妆品; 防腐剂

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2008)04-056-03

超高效液相色谱(UPLC)是以 1.7 μm 的超细色谱柱填料为核心技术的新型色谱分离分析技术。该技术自 2004 年由美国 Waters 公司推出商品化仪器 Waters ACQUITY Ultra Performance LC 开始^[1], 以其较高的分析速度和分离效率, 逐渐在科研工作中应用。UPLC 对溶剂和样品的颗粒尺寸要求较苛刻, 其仪器和耗材的价格较 HPLC 贵出很多, 但其灵敏度较之 HPLC 并未得到较大程度的提高, 单纯的分析时间缩短不能在相应领域内找到更充分的替代 HPLC 的依据, 因此, 有关 UPLC 的应用报道尚不多见。

本文以分离分析化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂为内容, 对 HPLC 和 UPLC 的色谱条件转换方法进行探讨, 探讨 UPLC 在分离分析中的优势与弊端, 以期寻找出此项技术的恰当应用范围。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

美国 Waters ACQUITY Ultra Performance LC 系统, Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm i. d. \times 50 mm, 1.7 μm); 美国 Agilent HP-1100 HPLC 系统, 大连依利特 Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm i. d. \times 250 mm, 5 μm); 标准品购自美国 Sigma 公司; 试剂为色谱纯; 水为高纯水。

1.2 样品处理

化妆品样品来自送检单位, 称取样品 0.2 g 置于离心管中, 用 15 mL 甲醇分 3 次提取, 每次 5 mL, 超声提取 20 min, 离心 10 min, 将上清液转入 25 mL 容量瓶中, 提取完毕后用甲醇定容到 25 mL 用于分析。所有流动相和样品溶液均以 0.22 μm 膜过滤。

2 结果与讨论

采用 HPLC 法分离分析 4 种对羟基苯甲酸酯类化合物的方法较成熟^[2], 在此不做重点讨论。而 UPLC 的色谱条件, 是本文讨论的主要内容。

2.1 HPLC 法色谱条件

HPLC 法色谱条件为: 流动相为 $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 70/30$, 流速 0.5 mL/min, 254 nm 检测, 室温, 进样体积 5 μL 。分离状况如图 1 所示。4 种物质标准品在 10 min 内实现基线分离, 且 4 种物质各自的线性关系良好。

2.2 UPLC 法色谱条件

2.2.1 直接将 HPLC 的色谱条件应用于 UPLC
HPLC 的色谱条件如 2.1 所述, 将此条件直接应用于 UPLC 仪器, 得到图 2a 的分离状况。由图 2a 可看出, 直接采用 HPLC 的色谱条件, 未能将此四种物质分开, 并未达到分离分析的目的。

* 收稿日期: 2006-10-28; 修订日期: 2007-01-05

作者简介: 周新(1977-), 男, 副研究员; E-mail: zx@caiq.com.cn

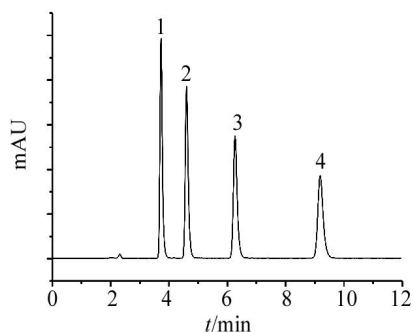


图 1 HPLC 分离对羟基苯甲酸酯色谱图

Fig. 1 Chromatograms of Hydroxybenzoate by HPLC

1 - 对羟基苯甲酸甲酯; 2 - 对羟基苯甲酸乙酯; 3 - 对羟基苯甲酸丙酯; 4 - 对羟基苯甲酸丁酯

2.2.2 利用 Waters 的“HPLC-UPLC 方法转换计算器”计算色谱条件 Waters 随 UPLC 仪器提供了一个方法转换计算器软件, 该计算器兼顾考虑了 UPLC 与 HPLC 分离系统在色谱柱和仪器构造等差异, 对流动相、温度、进样量、流速和梯度曲线进行换算, 使得 HPLC 的色谱条件被量化计算成为 UPLC 的色谱条件, 为 HPLC-UPLC 的方法移植简化步骤, 减少工作量。

此计算器对于等度的 HPLC, 不会改变流动相的组成和配比, 仅对进样量和流速进行换算, 经计算所得 UPLC 色谱条件为: 流动相为 $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 70/30$, 流速 0.62 mL/min , 进样体积 $0.2 \mu\text{L}$ 。

以计算所得的色谱条件进行标准品分离实验, 所得分离效果如图 2b。

由图 2b 可以看出, 采用此计算器计算得到的色谱条件, 在 5 min 内可以将 4 种对羟基苯甲酸酯分离开, 但对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯的峰稍有重叠, 其分离状况不如 HPLC 好, 而且在 0.62 mL/min 的流速下, 柱压达到 55.2 MPa 以上, 因柱压较高, 会导致色谱柱的寿命缩短等问题, 故此方法计算得到的色谱条件不能作为最佳色谱条件。

2.2.3 实验得到 UPLC 的色谱条件 参考 HPLC 的色谱条件数据, 以及计算器计算得到的结果, 建立分离状况更好的 UPLC 色谱条件。

经实验, 在改变流动相配比和流速之后, 得到更好的分离效果, 最终选择的 UPLC 的色谱条件为: 流动相为 $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 50/50$, 流速 0.2

mL/min , 254 nm 检测, 室温, 进样体积 $0.2 \mu\text{L}$ 。其分离状况如图 2c 所示。

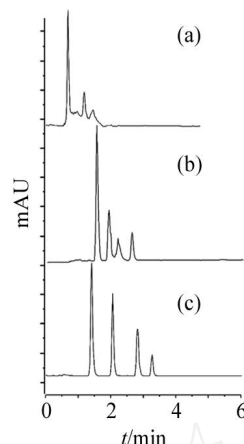


图 2 UPLC 分离对羟基苯甲酸酯色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Hydroxybenzoate by UPLC

从图 2 可以看出, UPLC 法在 2.2.1、2.2.2 和 2.2.3 这 3 种色谱条件下, 对羟基苯甲酸酯的分离效果差异较大, 2.2.3 为最优 UPLC 色谱条件。

2.3 色谱条件改变原因分析

HPLC 与 UPLC 的最佳色谱条件存在一定的差异, 其原因在于色谱柱的不同, 色谱柱的尺寸和填料的改变, 引起了色谱条件的改变, HPLC 的色谱柱填料为 $5 \mu\text{m}$ 的 C_{18} 硅胶颗粒, 柱长 250 mm , 而 UPLC 的色谱柱填料为 $1.7 \mu\text{m}$ 的 C_{18} 硅胶颗粒, 柱长 50 mm , 并且在硅胶基质中内键合了桥式乙烷基^[3]。UPLC 的特殊色谱柱, 填料小, 导致堆积更加紧密, 可以在更短的分析时间内达到分离目的, 桥式乙烷基使得填料能够承受更大的压力, 在较高流速下仍能保持稳定。

HPLC 通常以大比例的甲醇作为流动相, 而 UPLC 因其柱填料密集, 大比例的甲醇会导致柱压升高, 因此降低甲醇浓度会有利于分离。或者换用乙腈作为流动相, 分离效果会更好。

2.4 样品检测

选取送检化妆品 4 种, 分别采用 2.1 的 HPLC 方法和 2.2.3 的 UPLC 方法对 3 种化妆品中的对羟基苯甲酸酯类防腐剂进行测定。HPLC 方法, 4 种物质的回收率在 $90.2\% \sim 102.7\%$ 之间, 且 5 次平行测定的 RSD 值小于 3% ; UPLC 方法, 4 种物质回收率在 $92.5\% \sim 98.1\%$ 之间, 且 5 次平行测定的 RSD 值小于 2.5% , 测定结果见表 1。

表 1 样品检测结果
Tab. 1 Determination results of samples

样品编号	成分	HPLC 法测得值	RSD/ %	UPLC 法测得值	RSD/ %
		w/(mg/g)	(n = 5)	w/(mg/g)	(n = 5)
HZIP2006-0058	对羟基苯甲酸甲酯	0.279	1.3	0.271	0.9
	对羟基苯甲酸乙酯	-	-	-	-
	对羟基苯甲酸丙酯	0.058	2.9	0.053	1.9
	对羟基苯甲酸丁酯	0.049	2.4	0.057	2.0
HZIP2006-0059	对羟基苯甲酸甲酯	0.263	0.9	0.284	1.4
	对羟基苯甲酸乙酯	0.026	0.8	0.041	0.7
	对羟基苯甲酸丙酯	-	-	-	-
HZIP2006-0067	对羟基苯甲酸甲酯	0.142	1.6	0.183	2.4
	对羟基苯甲酸乙酯	-	-	-	-
	对羟基苯甲酸丙酯	0.106	1.9	0.142	1.8
	对羟基苯甲酸丁酯	-	-	-	-
HZIP2006-0081	对羟基苯甲酸甲酯	0.052	0.6	0.049	1.9
	对羟基苯甲酸乙酯	0.091	1.8	0.073	2.3
	对羟基苯甲酸丙酯	0.164	1.6	0.182	2.1
	对羟基苯甲酸丁酯	-	-	-	-

注：“-”代表未检出

3 结论

HPLC法和UPLC法均可作为测定化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂的有效定量分析方法，UPLC法的分离分析时间在4 min以内，而HPLC法的分离分析时间在10 min以内，且UPLC的样品用量比HPLC少。

HPLC的色谱条件需经过转换才可以应用于UPLC的实验中，Waters所提供的“HPLC-UPLC方法转换计算器”并不能完全解决方法转换的问题，最佳色谱条件仍需优化。

高浓度的甲醇容易导致柱压升高，在通常情况下，HPLC色谱条件转换到UPLC色谱条件时，换用低浓度的甲醇会有利于分离状况的改善。

参考文献

- [1] Waters. 环境化学, 2005, 24(5): 626
- [2] 李琛琛, 刘虎威等. 广西师范大学学报(自然科学版), 2003, 21(3): 76
- [3] Wyndham KD *et al.* Anal Chem, 2003, 75: 6781

Study on conversion of chromatographic process between HPLC and UPLC

ZHOU Xin¹, CHEN Hui-ming¹, BAI Hua¹, YU Wen-lian¹, WANG Chao¹, ZHENG Jian², ZHANG Qing¹, CHEN Wei¹ and MA Qiang¹ (1. Institute of Industrial Product Inspection, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025; 2. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing 100089), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(4): 56~58

Abstract: The conversion of chromatographic process between HPLC and UPLC was studied on the basis of separation and determination of hydroxybenzoate preservatives in cosmetics. The optimal chromatographic conditions of UPLC was selected by comparison of chromatographic conditions of different methods. 4 hydroxybenzoate preservatives in four kinds of cosmetics were determined quantitatively by HPLC and UPLC, and the results coincided with each other, indicating that two methods are accurate.

Key words: Ultra performance liquid chromatography (UPLC); Conversion of chromatographic process; Cosmetic; Preservative