

超高效液相色谱简介及应用比较

胡海燕¹, 朱馨乐¹, 胡昊², 毕言峰¹, 李丹¹, 徐倩¹, 王树槐¹

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2 中国药科大学, 南京 211198)

[收稿日期] 2009 - 09 - 08 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280(2010)04 - 0048 - 03 [中图分类号] R917

[摘要] 介绍了超高效液相色谱的技术特点和优势, 并对磺胺类药物的测定进行了 HPLC 和 UPLC 两种条件下的分析比较, 结果表明: 超高效液相色谱方法的突出优点体现在节省分析时间和溶剂用量上, 尤其对基质复杂的痕量组分测定采用该方法以提高分析通量是今后发展的必然趋势。

[关键词] 超高效液相色谱; 磺胺类药物; 高效液相色谱; 分析

Introduction and Application Comparison of Ultra Performance Liquid Chromatography

HU Hai - yan¹, ZHU Xin - le¹, HU Hao², BI Yan - feng¹, LI Dan¹, XU Qian¹, WANG Shu - hui¹

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; 2 China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: This paper concisely introduced the technical characteristics and advantages of ultra performance liquid chromatography (UPLC), and compared the analysis results of sulfonamides drugs performed by HPLC and UPLC. The results showed that, the outstanding benefits of UPLC embodied in the saving analysis time and solvent consumption in particular, when trace components of complex matrix were measured therefore, it is the inevitable trend to improve the analysis of flux of trace components by using UPLC in the future.

Key words: UPLC; sulfonamides drugs; HPLC; analysis;

自 20 世纪 70 年代以来, 随着高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 技术的不断发展, 美国 Waters 公司于 2004 年的匹兹堡会议上推出了最新研制的 ACQUITY 超高效液相色谱 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC), 其采用 1.7 μm 细粒径的新型固定相, 可获得高达 2 万块 /m 理论塔板数的超高柱效, 并以系统整体设计的创新技术, 全面提升了液相色谱的速度、灵敏度和分离度, 造就了液相色谱性能上的飞跃和进步并形成分离科学的一个新兴领域。

1 UPLC 的技术特点

UPLC 保持了 HPLC 的基本原理, 其理论依据

于 van Deemter 经验方程, 随色谱柱中装填固定相粒度 d_p 的减小, 色谱柱的理论塔板高度 (H) 也愈小, 色谱柱的柱效愈高, 并可获得更宽的线速度范围, 达到分离分析的高速、高效和高灵敏度。为此, UPLC 在技术上实现了各个关键环节系统性的优化创新和组合。

1.1 高效色谱柱 色谱柱中装填固定相的粒度是对色谱柱性能产生影响的最重要的因素。采用杂化颗粒技术 (Hybrid Particle Technology, HPT) 合成了新型全多孔球形、耐高压的 1.7 μm 反相固定相, 运用新设计的装填技术和筛板, 制备了高柱效的 UPLC 色谱柱。其优越性在于采用 1.7 μm 颗粒, 柱

作者简介: 胡海燕 (1956 年 -), 女, 研究员, 主要从事兽药及兽药残留研究和检验。

长可缩短至常规 5 μm 颗粒色谱柱长的三分之一, 其提供的柱效较 5 μm 颗粒提高了 3 倍, 分离度提高了 70%, 并加快了分离过程, 获得更窄的色谱峰和峰容量, 因此, UPLC 比 HPLC 具有更高的分离度、分析速度和灵敏度。

1.2 超高压输液泵 装备了独立柱塞驱动, 可进行 4 种溶剂切换的二元高压梯度泵, 对柱长 10 cm、填充 1.7 μm 固定相的色谱柱, 其达到最佳柱效时的 1.0 mL/min 流速, 耐高压可达 105 MPa (15 000 psi)。溶剂输送系统可在很宽压力范围内补偿溶剂压缩性的变化, 从而在等度或梯度分离条件下保持流速的稳定性和重现性。集成改进的真空脱气技术, 可使流动相溶剂和进样器洗针溶剂同时得到良好的脱气。

1.3 高速检测器 使用 10 mm 光程 (与普通 HPLC 相同) 而池体积仅为 500 nL (约为 HPLC 池体积的 1/20) 的新型光纤导流通池, 利用聚四氟乙烯池壁的全析射性能, 不损失光能量, 采样速率达 20 ~ 40 点 /s, 满足 UPLC 高速、高分辨的要求, 检测灵敏度较 HPLC 有极大的提高。

1.4 低污染自动进样器 设置“针内针”进样探头, 使用液相色谱管路 (PEEK 材料) 充当进样针以减少死体积, 而“外针”是一小段硬管, 用来扎破样品瓶盖; 采用一强、一弱的双溶剂进样针清洗步骤, 降低交叉污染, 保证仪器长时间运行自动进样的快速性、可靠性和重现性。

1.5 优化系统 有效的系统管路和连接, 使 UPLC 系统的死体积远低于常规 HPLC, 很小的系统体积减少了色谱柱的平衡时间。

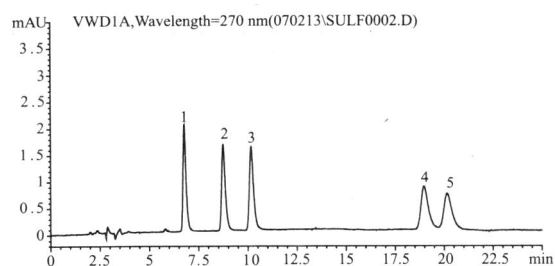
2 UPLC 的应用比较

与传统的 HPLC 相比, UPLC 的速度、灵敏度和分离度分别是 HPLC 的 5 ~ 9 倍、3 倍和 1.7 倍, 这就拓展了我们进一步研究的空间: 保持分离度而追求更快的分析速度, 或在同样及较 HPLC 更短的时间内优化分离度再分出更多的色谱峰。笔者利用 UPLC 转化参数换算, 将同时测定磺胺二甲嘧啶 (SM_2)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺甲基异噁唑 (SMZ)、磺胺地索辛 (SDM) 和磺胺喹噁啉 (SQ) 5 种磺胺类药物的 HPLC 方法转换并优化为 UPLC 方法, 通过两种测定条件 (表 1) 和检测图谱 (图 1、图 2) 比较可知: 5 种磺胺类药物的分离由原来的 25 min (HPLC) 缩短至 3 min (UPLC), 从而使一个样品检测的分析时间缩短了约 1/8, 进样量减少了 1/

10, 溶剂用量降低了约 1/17, 并且 UPLC 对 SDM 和 SQ 后两个峰的分度好于 HPLC, 即在基本上保持分离度的同时得到了更快的分析时间。经与猪肉盲样 (含 SM_2 、SMM、 SDM 3 个组分, 3 个平行样) 和添加样品 (含 SM_2 、SMM、SMZ、 SDM 、 SQ 5 个组分, 3 个平行样) 在 HPLC 与 UPLC 两种色谱条件下测定数据比较 (表 2): 结果基本吻合, 各组分相对偏差并不高于 5.08%, 使猪肉中 5 种磺胺类药物残留检测的 HPLC 法^[1]成功地转化为快速、灵敏、低损耗、高通量的 UPLC 方法。另外, 在上述 UPLC 色谱条件下, 选择较佳的梯度洗脱条件 (表 3), 可在较短的时间 (3.5 min) 内分离出更多的色谱峰 (图 3)

表 1 HPLC 与 UPLC 测定条件比较

项目	HPLC	UPLC
色谱柱 (C_{18})	4.6 mm \times 250 mm, 5 μm	2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm
流动相 (V/V)	甲醇 - 乙腈 - 水 - 乙酸 (2 2 9 0.2)	50% 甲醇乙腈溶液 - 2% 乙酸水溶液 (23 77)
流速 / (mL \cdot min ⁻¹)	1.0	0.5
柱温 /	30	30
进样量 / μL	20	2
波长 /	270	270
分析时间 /min	25	3
溶剂用量 (mL) / 样	25	1.5



1. SM_2 ; 2. SMM; 3. SMZ; 4. SDM ; 5. SQ (图 2 同)

图 1 HPLC 测定 5 种磺胺类药物 ($250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 色谱图

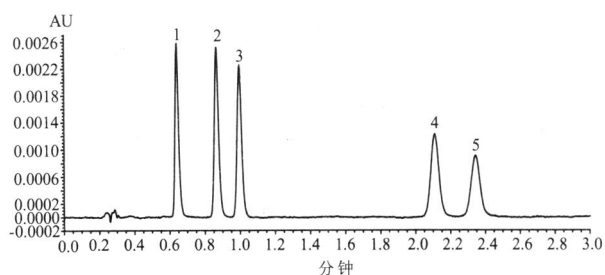


图 2 UPLC 测定 5 种磺胺类药物 ($250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 色谱图

表 2 UPLC与 HPLC测定猪肉中磺胺类药物数据比较

2 - 1 比对盲样 (编号: PS231 农业部畜禽产品质量监督检验测试中心提供)

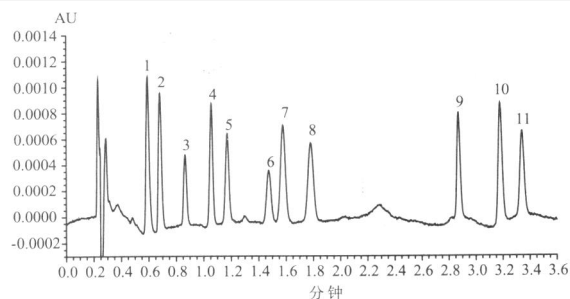
名称	批号	UPLC测定量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	HPLC测定量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	相对偏差 /%
SM2	PS231 - 1	125	131	128	132	0.76
	PS231 - 2	132		129		
	PS231 - 3	137		138		
SMM	PS231 - 1	132	127	129	125	1.59
	PS231 - 2	121		119		
	PS231 - 3	129		127		
SDM	PS231 - 1	137	134	138	131	2.26
	PS231 - 2	129		123		
	PS231 - 3	136		131		

2 - 2 添加样品回收 (批号: 081107 添加浓度: $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

名称	回收率 /% (UPLC测定)	平均值 /%	回收率 /% (HPLC测定)	平均值 /%	相对偏差 /%
SM2	86.7	90.2	90.1	94.9	5.08
	90.0		95.8		
	93.9		98.7		
SMM	89.5	93.3	86.4	91.0	2.50
	92		92.1		
	98.3		94.5		
SMZ	86.3	92.1	91.1	96.1	4.25
	94.2		96.9		
	95.7		100.2		
SDM	93.8	91.9	89.8	89.1	3.09
	86.2		83.6		
	95.7		93.9		
SQ	82.6	87.8	85.8	88.1	0.34
	89.7		84.9		
	91.1		93.7		

表 3 流动相梯度表

时间 /min	流速 / ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	A /%	B /%
0	0.5	10	90
0.7	0.7	15	85
2.0	0.7	13	87
2.5	0.7	25	75
3.4	0.7	25	75
4.0	0.7	10	90
5.5	0.5	10	90



1. 磺胺嘧啶; 2. 磺胺噻唑; 3. 二甲氧苄啶; 4. 磺胺二甲嘧啶;
5. 磺胺甲氧嘧; 6. 磺胺氯吡啶; 7. 磺胺间甲氧嘧啶; 8. 磺胺甲基异噻
唑; 9. 磺胺氯吡啶; 10. 磺胺地索辛; 11. 磺胺喹噁啉

图 3 11种磺胺类药物 (80 ng/ml) UPLC 色谱图

3 讨论与结论

3.1 通过对磺胺类药物 HPLC和 UPLC的分析结果比较,显示 UPLC的主要优势在于缩短了分析时间,同时减少了溶剂用量降低了分析成本。

3.2 利用 UPLC技术,有助于解决传统 HPLC遇到的分离组分愈多,耗时、耗能愈大的技术问题,有效地提高工作效率,并可进一步拓宽液相色谱的应用范围,特别是对于基质复杂的混合痕量组分的分析,通过 UPLC方法研究或从 HPLC到 UPLC方法转换可获得更高的分析通量。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 猪肉 (NY5029 - 2001) 附录 E 磺胺类药物在动物可食性组织中残留的高效液相色谱检测方法 [S].