

使用合规的 UHPLC 方法对金银花中药配方颗粒进行分析

作者

余彦海
安捷伦科技（中国）有限公司

前言

中药配方颗粒是一种新型中药临床应用形式。它是由传统药材饮片提取后制成的颗粒，只需要采用不同药材的颗粒进行组方调剂，然后用热水冲服即可，解决了饮片煎煮、服用、携带不便等问题。

为加强中药配方颗粒的质量控制，国家药典委员会在 2019 年 11 月初步公布了 160 种中药配方颗粒的国家标准。在这一系列标准中，主要采用特征图谱对中药配方颗粒的批次间质量一致性进行控制。由于特征图谱是多成分分析，标准 HPLC 分析方法使用的是长色谱柱与复杂梯度洗脱程序相结合的方式，因此很难实现快速的样品分析。

本文采用安捷伦超高效液相色谱系统，参照《中国药典》2020 版“0512 高效液相色谱法”（征求意见稿），对金银花中药配方颗粒的标准 HPLC 方法进行了合规的 UHPLC 方法转换，大幅提升了金银花中药配方颗粒的分析效率。

HPLC 到 UHPLC 方法的转换

在金银花中药配方颗粒药典方法中，特征图谱分析采用规格为 250 mm × 4.6 mm, 5 μm 的 HPLC 色谱柱，并使用多步梯度洗脱程序，梯度分析时间为 60 min（见图 1）。加上后运行的冲洗和再平衡时间，预计单针分析时间不短于 80 min。这大大降低了质量控制实验室的分析效率。为提高分析效率，有必要将 HPLC 方法转换为 UHPLC 方法。

【特征图谱】 照高效液相色谱法（中国药典 2015 年版 通则 0512）测定。

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（柱长为 250 mm，内径为 4.6 mm，粒径为 5 μm）；以乙腈为流动相 A，0.4% 磷酸溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0 mL；柱温为 35℃；检测波长为 350 nm。理论板数按木犀草苷峰计算应不低于 2000。

时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0-15	10	90
15-20	10→15	90→85
20-50	15→20	85→80
50-55	20→30	80→70
55-60	30→10	70→90

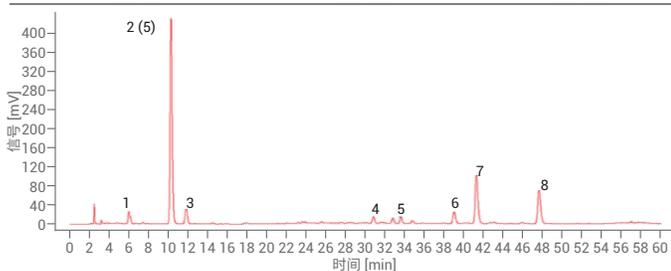


图 1. 金银花配方颗粒标准方法与图

《中国药典》2020 年版四部通则“0512 高效液相色谱法”（征求意见稿）对液相色谱方法的调整做出了明确的规定，允许对已有的标准方法按照“色谱柱等效”的原则进行转换。本文根据此通则，对金银花中药配方颗粒的 HPLC 标准方法进行了转换。色谱参数的转换原则完全依据符合通则的要求，具体操作步骤如下。

第一步，固定相：通则要求不得改变固定相特征。金银花中药配方颗粒原标准方法采用 Agilent HPLC Zorbax SB-C18 色谱柱。因此，UHPLC 固定相仍然选择 Agilent UHPLC Zorbax SB-C18 色谱柱。这样确保色谱柱的选择性不变，从而保证特征图谱的出峰顺序一致。

第二步，填料粒径 (dp)、柱长 (L)：通则要求要保证转换前后柱效相当，也就是柱长与粒径的比值 (L/dp) 要保持一致。金银花中药配方颗粒原标准方法采用柱长为 250 mm (L)、粒径为 5 μm (dp) 的色谱柱，其 L/dp = 50。因此，UHPLC 分析选择柱长为 100 mm (L)、粒径为 1.8 μm (dp) 的色谱柱，其 L/dp ≈ 56，与原方法柱效相当。这样可确保 UHPLC 分析时色谱柱的柱效不变，从而保证特征图谱的色谱峰的分离度一致。

第三步，流速：通则要求根据填料粒径、色谱柱内径以及原方法流速进行换算，计算公式如下：

$$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$$

金银花中药配方颗粒原标准方法采用的色谱柱粒径为 5 μm (dp₁)，内径为 4.6 mm (dc₁)，流速为 1.0 mL/min (F₁)；UHPLC 分析采用的色谱柱粒径为 1.8 μm (dp₂)，内径为 2.1 mm (dc₂)。根据通则公式，计算出 UHPLC 分析所用的流速 (F₂) 为：

$$F_2 = 1.0 \times [(2.1^2 \times 5)/(4.6^2 \times 1.8)] \approx 0.58 \text{ mL/min}$$

第四步，进样体积：通则要求根据色谱柱规格进行换算，计算公式如下：

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

金银花中药配方颗粒原标准方法采用的色谱柱柱长为 250 mm (L₁)，内径为 4.6 mm (dc₁)，进样体积为 10 μL (V_{inj1})；UHPLC 分析采用的色谱柱柱长为 100 mm (L₂)，内径为 2.1 mm (dc₂)。根据通则公式，计算出 UHPLC 分析所用的进样体积 (V_{inj2}) 为：

$$V_{inj2} = 10 \times [(100 \times 2.1^2)/(250 \times 4.6^2)] \approx 0.85 \mu\text{L}$$

第五步，梯度洗脱程序：通则要求根据色谱柱规格进行换算，计算公式如下：

$$t_{G2} = t_{G1} \times F_2/F_1 \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

将上述 L₁、dc₁、F₁ 和 L₂、dc₂、F₂ 代入上式，计算出 UHPLC 分析所用的梯度洗脱程序变化时间的转换系数 (t_{G2})：

$$t_{G2} = t_{G1} \times 1.0/0.58 \times [(100 \times 2.1^2)/(250 \times 4.6^2)] \approx t_{G1} \times 0.14$$

根据转换系数 (t_{G2}) 将原始 HPLC 梯度洗脱程序转换为 UHPLC 梯度洗脱程序，转换结果如表所示：

表 1. 原始 HPLC 梯度洗脱程序转换为 UHPLC 梯度洗脱程序

HPLC 梯度洗脱程序				UHPLC 梯度洗脱程序		
梯度时间 (t_{G1})	乙腈 (A)	0.4% H_3PO_4 (B)	转化系数	梯度时间 (t_{G2})	乙腈 (A)	0.4% H_3PO_4 (B)
0	10	90	0.14	0.0	10	90
15	10	90		2.1	10	90
20	15	85		2.8	15	85
50	20	80		7.0	20	80
55	30	70		7.7	30	70
60	10	90		8.4	10	90

UHPLC 分析结果

利用上文所述的转换后的 UHPLC 方法，对金银花中药配方颗粒进行分析。所得到的结果如图 2 和表 2 所示。

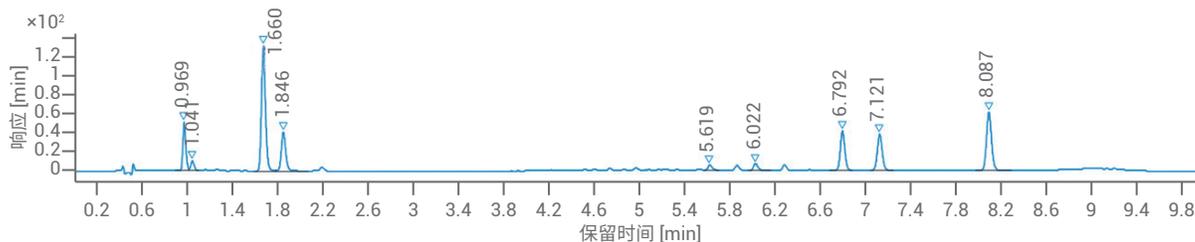


图 2. 金银花配方颗粒 UHPLC 分析色谱

表 2. 金银花配方颗粒 RRT 结果

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8
第一针	0.971	1.673	1.852	5.616	6.015	6.790	7.119	8.087
RRT-1	0.58	1.00	1.11	3.36	3.60	4.06	4.26	4.83
第二针	0.971	1.671	1.849	5.616	6.016	6.787	7.115	8.063
RRT-2	0.58	1.00	1.11	3.36	3.60	4.06	4.26	4.83
第三针	0.969	1.669	1.846	5.619	6.022	6.792	7.121	8.087
RRT-2	0.58	1.00	1.11	3.37	3.61	4.07	4.27	4.85
标准 RRT	0.58±10%		1.15±10%			3.80±10%	4.02±10%	4.64±10%
	0.522-0.638		1.035-1.265			3.42-4.18	3.618-4.422	4.175-5.104

根据以上结果，可以得出：

1. 参照《中国药典》2020 版“0512 液相色谱法”（征求意见稿）将 HPLC 方法等效转换为 UHPLC 方法后，分离度和灵敏度均不受影响。
2. HPLC 方法转换为 UHPLC 方法后，某些参数可能不是整数或有效位数过多，可按照修约规则适当修约取整或者取一位有效数字即可，不影响色谱分离行为。
3. 使用 Agilent Infinity II UHPLC 系统按照转换后的方法条件分析真实样品，所得到的结果 RRT 完全符合金银花中药配方颗粒的标准要求，且 UHPLC 分析可在 10 min 内完成，仅为标准 HPLC 方法所需时间的 1/6，分析效率得以大幅提升。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020年4月16日，中国出版

