

# 浅谈20版药典液相方法转换中的色谱条件调整

康文昱 金琦芸

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词

2020版中国药典, 高效液相色谱, 方法转换, 色谱条件调整

## 摘要

本文主要探讨了在2020版药典规定下, 从常规液相色谱方法向快速液相色谱方法转换时可能会遇到的一些色谱条件调整的问题。以部分新版药典增订品种为例, 介绍了这些品种在方法转换时遇到的如流速调整、柱温调整及流动相比比例调整等解决方案。旨在为液相方法转换后结果不佳或者无法满足药典要求的情况提供一些借鉴和参考。

## 1. 引言

2020版《中国药典》实施在即, 在第四部0512高效液相色谱法通则部分, 增加了色谱参数调整范围的内容, 在色谱参数允许调整范围表中提到了从全多孔填料到表面多孔填料的改变, 在满足上述条件的前提下是被允许的, 明确了核壳填

料色谱柱是可以使用的。核壳填料色谱柱的使用以及超高效液相色谱法的使用均可以大幅节约分析时间, 提高实验效率, 并且可以节省大量的溶剂。而在使用快速分析方法时, 就会涉及到方法转换和色谱参数调整等一系列问题。在新版药典0512通则中提到做色谱参数调整时不可变更的参数为填充剂种类、流动相组分和检测器类型; 可以变更的参数为色谱柱内径、长度、粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温以及进样量等等。在色谱参数允许调整范围表(详见表1)中则给出了以上这些可变更参数的转换公式以及转换后可以调整的范围, 为方法转换的合理性提供了依据和准绳。本文以几个新版药典增订品种为例, 列举了这些品种在从常规方法到快速方法转换时遇到的问题以及解决方法, 可以为方法转换的快速合规完成提供一定的参考, 有效提高分析效率。

表1. 色谱参数允许调整的范围(部分参数)

参数变量	参数调整	
	等度洗脱	梯度洗脱
固定相	不得改变填充剂的理化性质, 如填充剂材质、表面修饰及键合相均需保持一致; 从全多孔填料到表面多孔填料的改变, 在满足上述条件的前提下是被允许的	
填充剂粒径(dp), 柱长(L)	改变色谱柱填充剂粒径和柱长后, L/dp值应在原有数值的-25%~+50%范围内	
流速	如果改变色谱柱内径及填充剂粒径, 可按下式计算流速, $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ , 在此基础上根据实际使用时系统压力和保留时间调整	
	最大可在公式计算结果±50%范围内调整	除按公式调整外, 不得扩大调整范围
梯度洗脱程序(等度洗脱不适用)	$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$ , 保持不同规格色谱柱的洗脱体积倍数相同, 从而保证梯度变化相同, 并需要考 虑不同仪器系统体积的差异	
流动相比比例	最小比例的流动相组分可在相对值±30%或者绝对值±2%的范围内进行调整(两者之间选择最大值); 最小比例流动相组分的比例需小于(100/n)%, n为流动相中组分的个数	可适当调整流动相组分比例, 以保证系统适用性符合要求, 并且最终流动相洗脱强度不得弱于原梯度的洗脱强度
柱温	除另有规定外, 可在±10℃范围内调整	除另有规定外, 可在±5℃范围内调整
pH值	除另有规定外, 流动相中水相pH值可在±0.2pH范围内进行调整	
检测波长	不可改变	

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Fisher Ultimate 3000 高效液相色谱仪

2.1.2 Thermo Fisher Vanquish Binary Flex 超高效液相色谱仪

2.1.3 色谱柱: Acclaim C18, 250mmx4.6mm, 5 $\mu$ m (P/N: 059149); Hypersil GOLD, 250mmx4.6mm, 5 $\mu$ m (P/N: 25005-254630); Hypersil GOLD, 150mmx4.6mm, 5 $\mu$ m (P/N: 25005-154630); Accucore aQ, 150mmx4.6mm, 2.6 $\mu$ m (P/N: 17326-154630); Accucore C18, 150mmx3.0mm, 2.6 $\mu$ m (P/N: 17126-153030); Accucore C18, 100mmx4.6mm, 2.6 $\mu$ m (P/N: 17126-104630); Hypersil GOLD Vanquish, 50mmx2.1mm, 1.9 $\mu$ m (P/N: 25002-052130-V)

2.1.4 甲醇(色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 实验用水为Milli-Q去离子水; 乙腈(色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 磷酸二氢钾(色谱纯, 安谱公司); 冰乙酸(分析纯, 安谱公司)

2.1.5 来曲唑系统适用性对照品、曲安奈德对照品、乌苯美司对照品、头孢甲肟对照品和1-甲基-5-巯基四氮唑对照品均购自中检所

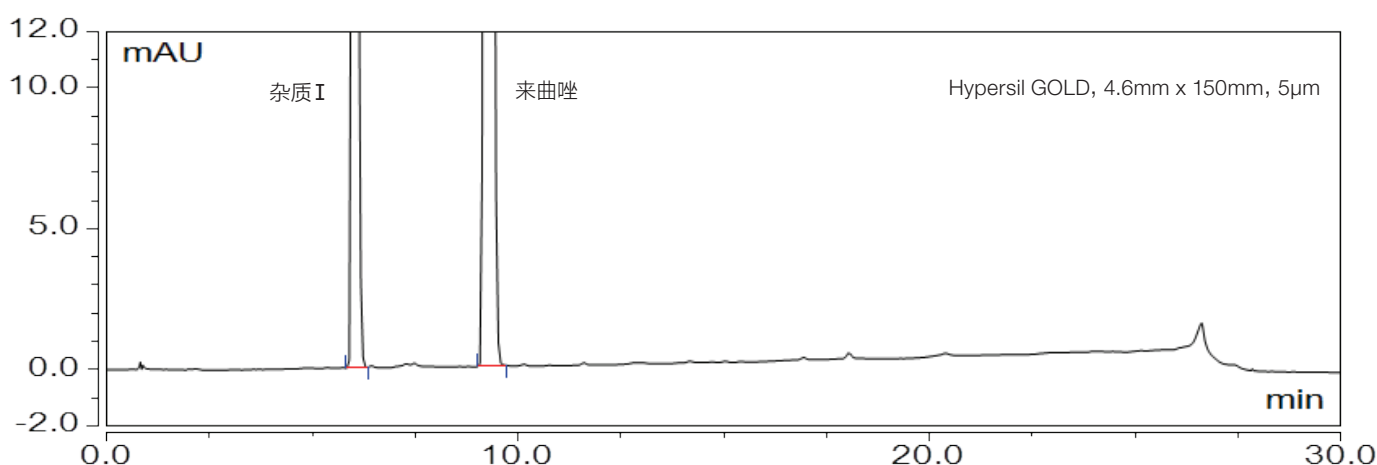
## 3. 实验结果与讨论

### 3.1 梯度方法转换应用案例-来曲唑片

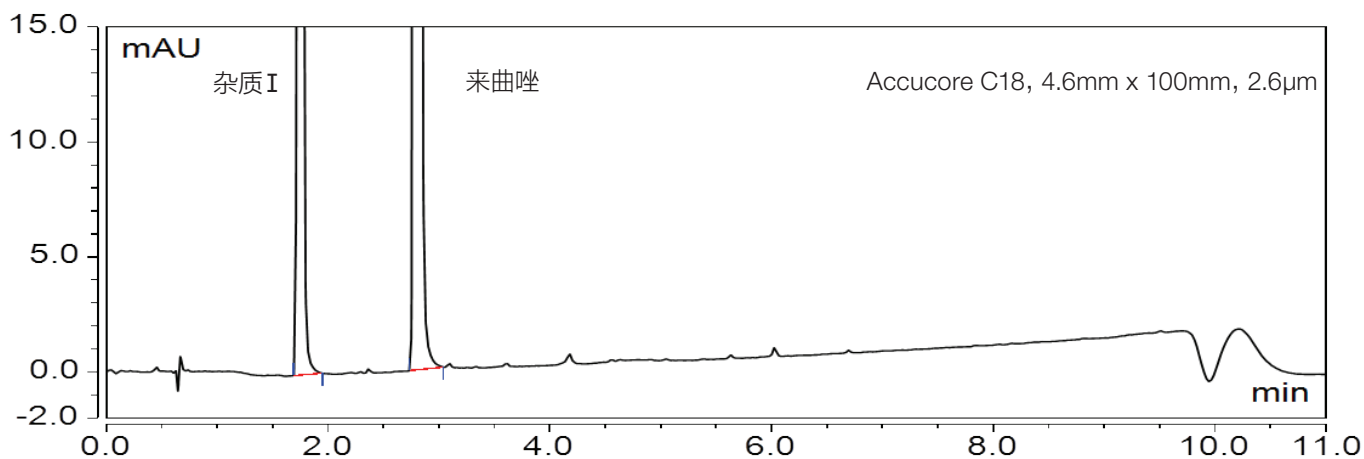
来曲唑片为新版药典新增品种, 系统适用性要求: 系统适用性溶液色谱图中, 来曲唑峰的保留时间约为8-10分钟, 理论板数按来曲唑峰计算应不低于3000, 杂质 I 峰(相对保留时间约为0.67)与来曲唑峰之间的分离度应不低于5.0。本案例分别采用常规柱、核壳柱和亚二微米色谱柱对其进行分析, 方法转换的依据为药典中的色谱参数允许调整范围表, 详见表1。常规柱使用的初始流速为0.8 mL/min, 采用快速法转换后的流速分别为1.5 mL/min和0.4 mL/min, 需要注意的是梯度方法转换后的流速不能进一步调整。常规方法色谱柱采用的规格为150 mm, 转换为快速方法时需注意色谱柱L/dp值要在22.5~45之间。各色谱柱转换后的梯度洗脱程序和系统适用性色谱图及结果见表2、和图1, 三根色谱柱采用直接转换后的方法采集样品, 获得的结果均能满足系统适用性要求, 因此本案例中不需要对色谱参数进行进一步的调整。赛默飞针对方法转换计算公式繁琐的问题推出了网页版LC Method Transfer Calculator, 转换软件中的公式算法均按照药典规定, 可以快速计算转换后各项色谱参数, 下文各应用案例也均采用此转换工具进行方法转换。

表2. 各色谱柱梯度洗脱程序和流速

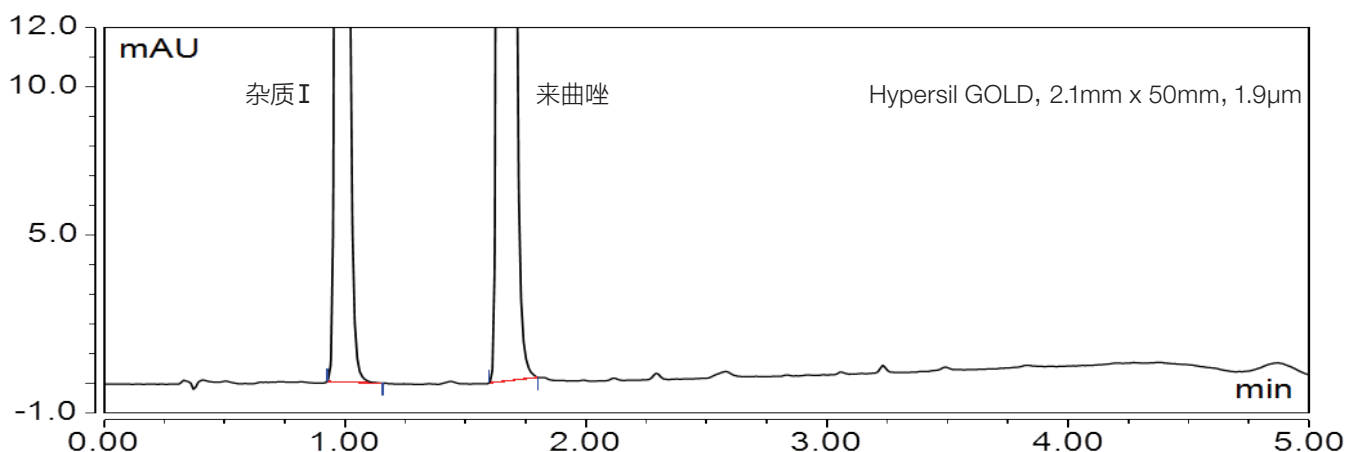
色谱柱	Hypersil GOLD 5 $\mu$ m	Accucore C18 2.6 $\mu$ m	Hypersil GOLD 1.9 $\mu$ m
梯度程序	0-25-25.1-30	0-8.8-8.9-11	0-3.5-3.6-5
A: 水 B: 乙腈	30-70-30-30	30-70-30-30	30-70-30-30
流速	0.8 mL/min	1.5 mL/min	0.4 mL/min



组分名称	保留时间(min)	塔板数	分离度	拖尾因子
杂质 I	6.187	22038	/	1.07
来曲唑	9.033	34043	15.70	1.06



组分名称	保留时间(min)	塔板数	分离度	拖尾因子
杂质 I	1.740	16591	/	1.14
来曲唑	2.793	37845	18.90	1.12



组分名称	保留时间(min)	塔板数	分离度	拖尾因子
杂质 I	0.993	6797	/	1.21
来曲唑	1.690	19936	14.50	1.13

图1. 各色谱柱系统适用性色谱图和结果

### 3.2 等度方法转换流速调整案例-醋酸曲安奈德注射液

醋酸曲安奈德注射液为新版药典修订品种，本案例中常规方法使用的色谱柱为Hypersil GOLD (5 $\mu$ m, 250mmx4.6mm)，使用流速为1 mL/min，快速法使用的核壳色谱柱为Accucore C18 (2.6 $\mu$ m, 150mmx4.6mm)，常规方法转换为快速方法得到的柱流速为0.82 mL/min，在此流速下系统压力约为730bar，由于此色谱条件为等度方法，新版药典规定转换后流速可以在换算值的 $\pm 50\%$ 范围内变化，再考虑到系统压力偏高，于是把转换后的色谱柱流速由0.82 mL/min降至0.43 mL/min，此时系统压力约为470bar，并且图2和图3对照溶液中醋酸曲安奈德峰的理论塔板数也由12527提高到19505，所以最终确定Accucore C18色谱柱使用的流速为0.43 mL/min。

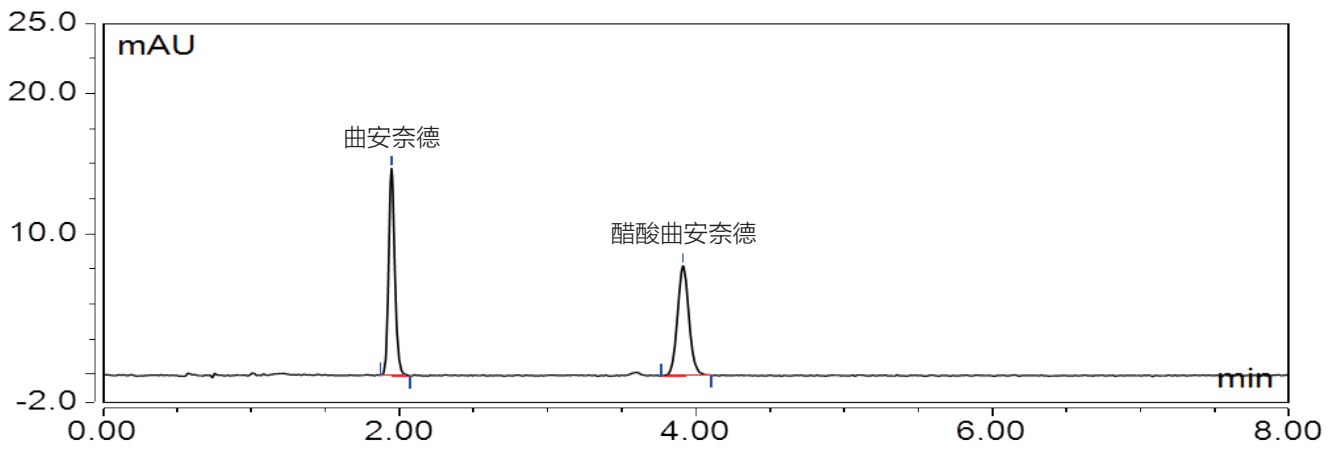


图2. Accucore C18对照溶液色谱图 ( 流速0.82 mL/min )

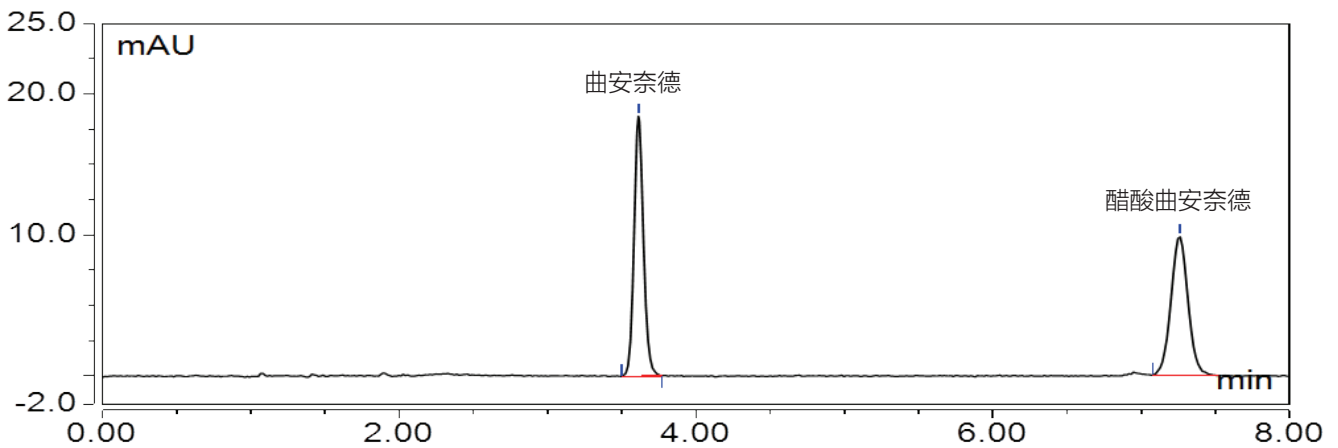


图3. Accucore C18对照溶液色谱图 ( 流速0.43 mL/min )

### 3.3 梯度方法转换柱温调整应用案例-乌苯美司胶囊

乌苯美司胶囊为新版药典修订品种，本案例中常规方法采用Acclaim C18 ( 5 $\mu$ m, 250mm x 4.6mm ) 色谱柱，柱温为25 $^{\circ}$ C，流速为1 mL/min，快速法采用Accucore C18 ( 2.6 $\mu$ m, 150mm x 3.0mm ) 色谱柱，转换为快速方法得到的柱流速为0.82 mL/min，由于是梯度方法，所以流速不能再改变，Accucore C18采集得到的供试品色谱图见图4，从图中可以看到供试品中主峰乌苯美司峰与后面杂质的分离度欠佳，考虑对转换后的方法进行优化，新版药典规定梯度方法转换后柱温可以 $\pm 5^{\circ}$ C范围内变化，于是尝试将柱温调整为20 $^{\circ}$ C，结果见图5，供试品中乌苯美司峰与杂质峰分离度有了明显改善，达到了4.21，所以最后核壳色谱柱的方法柱温确定调整至20 $^{\circ}$ C。

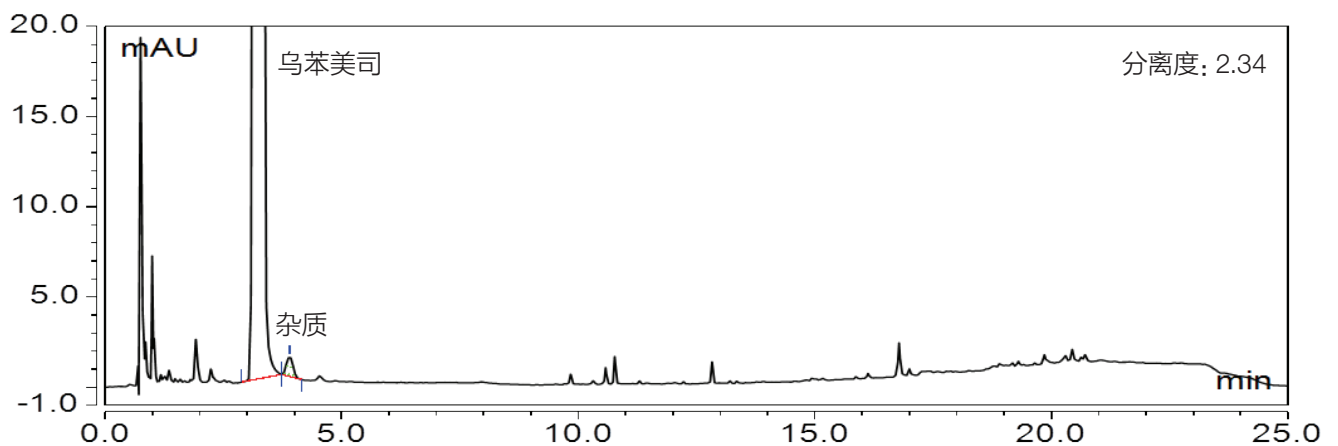


图4. Accucore C18色谱柱供试品色谱图 ( 柱温25 $^{\circ}$ C )

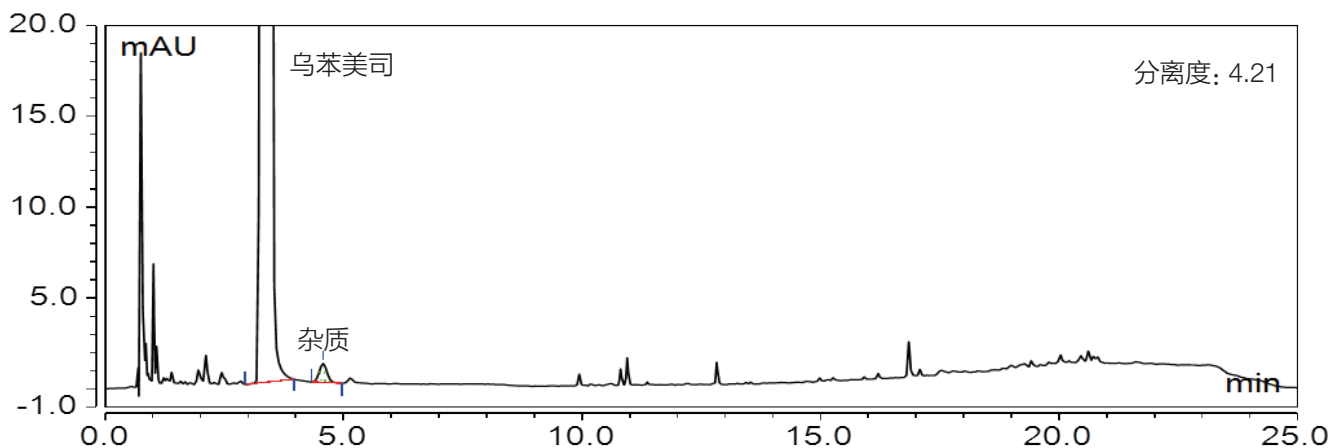


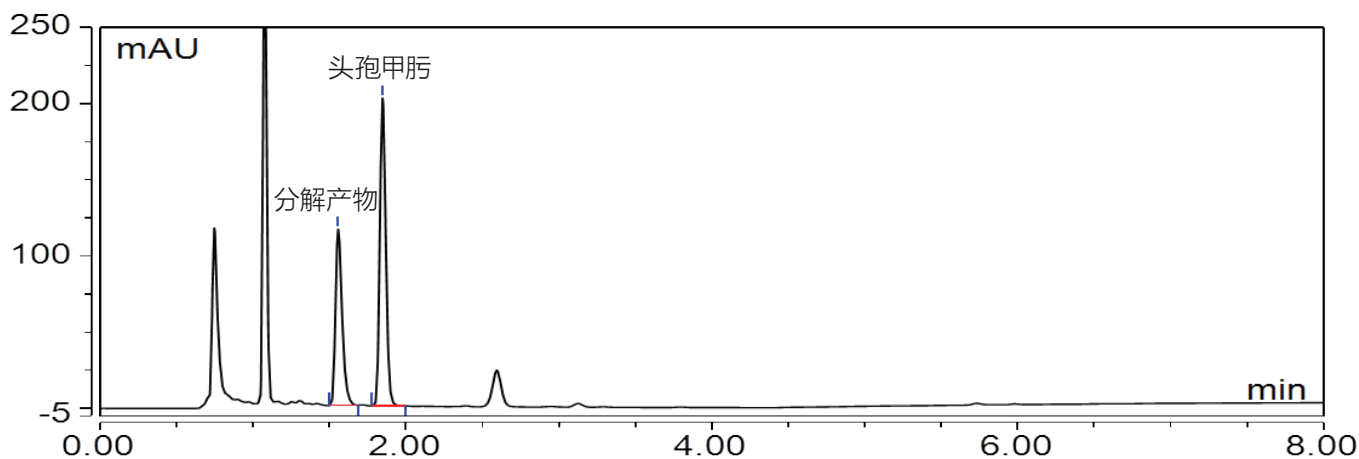
图5. AccuCore C18色谱柱供试品色谱图（柱温20℃）

### 3.4 梯度方法转换流动相条件调整应用案例-盐酸头孢甲肟

盐酸头孢甲肟为新版药典修订品种，系统适用性要求在系统适用性溶液（1）色谱图中，头孢甲肟峰与相邻分解产物峰（相对保留时间约为0.77）间的分离度应大于4.5。本案例中采用的色谱柱及梯度洗脱程序等条件见表3。从常规方法Acclaim C18（5μm, 250mm x 4.6mm）色谱柱，直接方法转换为核壳色谱柱AccuCore aQ（2.6μm, 150mm x 4.6mm）的快速方法后，分析系统适用性溶液（1）的结果见图6，由结果我们发现，在初始流动相比例条件下，系统适用性溶液（1）的结果是无法满足药典要求的，考虑到此方法中的色谱条件情况，再结合新版药典的规定，对流动相条件进行了调整。尝试将流动相A的组成比例做调整，由初始的“水-冰乙酸-乙腈（85:1.7:15）”，调整为“水-冰乙酸-乙腈（89:1.7:11）”，符合药典规定，调整后系统适用性溶液的结果见图7，由结果可见，流动相比例调整后系统适用性溶液（1）中，相邻分解产物与头孢甲肟之间分离度有了明显改善，系统适用性溶液（1）结果满足药典要求，所以最终确定流动相A比例为水-冰乙酸-乙腈（89:1.7:11）。

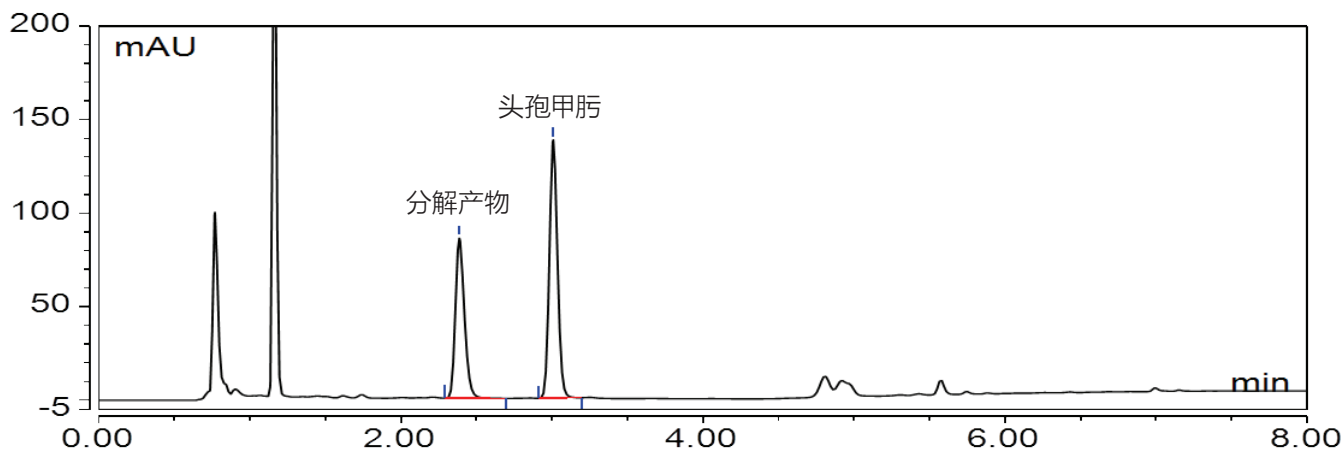
表3. 各色谱柱梯度洗脱程序和流速

流动相	色谱柱	Acclaim C18 5μm	AccuCore aQ 2.6μm
A: 水-冰乙酸-乙腈（85:1.7:15） B: 水-冰乙酸-乙腈（50:1.7:50）	梯度	时间(min)	0-10-40-50-51-60
		B%	100-100-0-0-100-100
	流速	1.0 mL/min	1.9 mL/min



组分名称	保留时间(min)	分离度
相邻分解产物	1.557	/
头孢甲肟	1.847	3.92

图6. AccuCore aQ系统适用性溶液（1）色谱图（流动相A: 水-冰乙酸-乙腈（85:1.7:15））



组分名称	保留时间(min)	分离度
相邻分解产物	2.387	/
头孢甲肟	3.009	6.07

图7. Accucore aQ系统适用性溶液 (1) 色谱图 (流动相A: 水-冰乙酸-乙腈 (89:1.7:11))

#### 4. 结论

本文主要探讨了在新版药典的规定下, 从常规液相色谱方法向快速液相色谱方法转换时可能会遇到的一些色谱条件调整的问题。2020版《中国药典》四部0512通则则在色谱参数允许调整范围表中对方法转换后色谱参数可以调整的范围的规定非常详细, 是做色谱参数调整的重要依据, 本文以几个新版药典增订品种为例, 列举了这些品种在方法转换时遇到的问题以及解决方法, 可以为方法转换的快速合规完成提供一定的参考, 有效提高分析效率。

#### 5. 参考文献

- 2020版《中国药典》第二部和第四部
- LC Method Transfer Calculator 网址: <https://apps.lab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)