



[ 第43期 ]

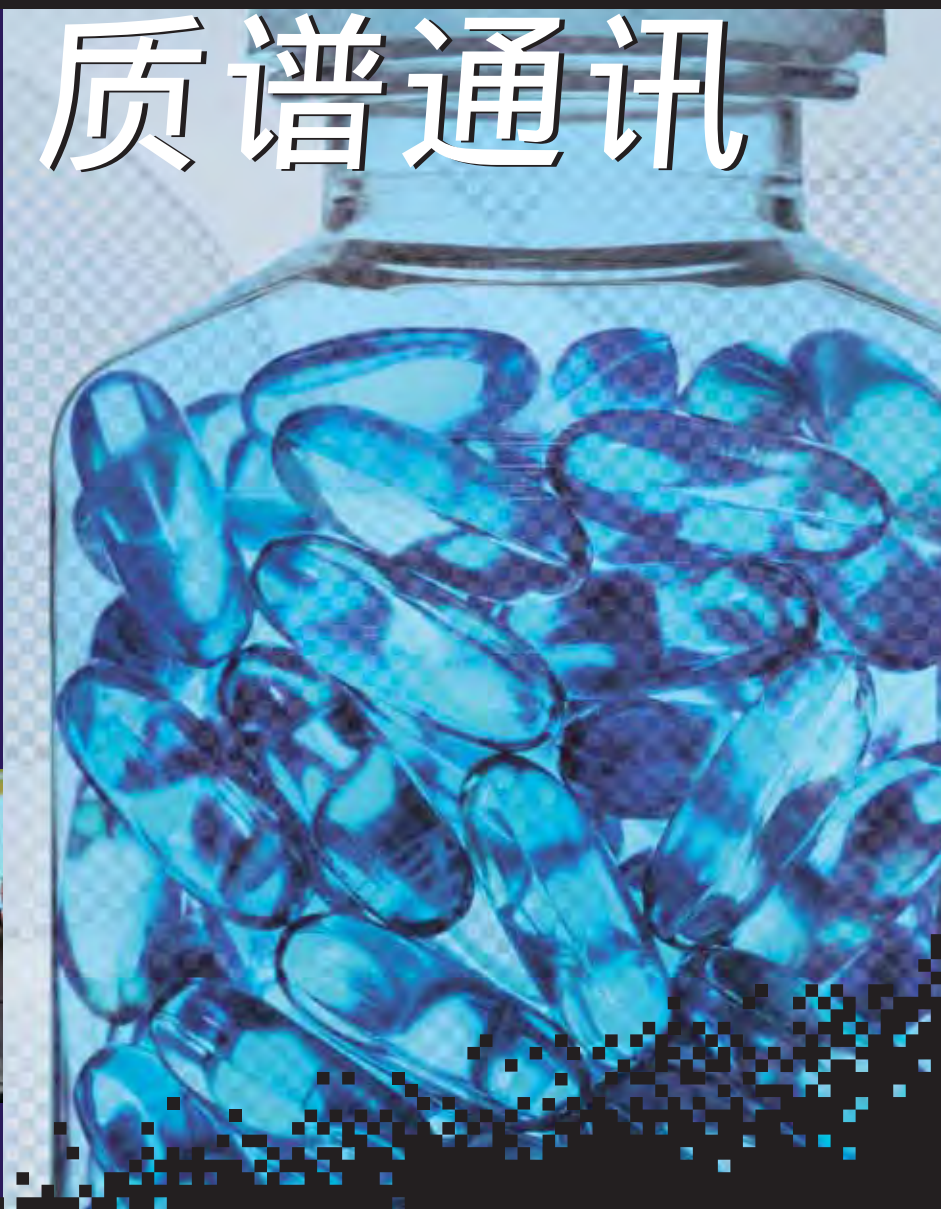
# 液相色谱

■ 公司动态 ■ 应用报告 ■ 经验交流  
■ 色谱分离专栏 ■ 实验室数据管理系统专栏

- 沃特世公司和中国国家环保局共同关注持久性有机污染物
- 将美国药典测定有关物质的HPLC方法转换成ACQUITY UPLC的方法及方法的再开发
- 重组人促红细胞生成素的HPLC与UPLC肽图谱分析
- 用于制药行业设备清洗验证的高通量UPLC-MS方法



# 质谱通讯



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

# 索引

## 公司动态

沃特世公司和中国国家环保局共同关注持久性有机污染物 .....	01
沃特世食品安全研讨会 .....	01
沃特世公司协助美国环保署分析土壤和水中的全氟类化合物 .....	02

## 应用报告

将美国药典测定有关物质的HPLC方法转换成ACQUITY UPLC的方法及方法的再开发 .....	04
重组人促红细胞生成素的HPLC与UPLC肽图谱分析 .....	08
超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱测定食品中对位红的检测方法研究 .....	12

## 经验交流

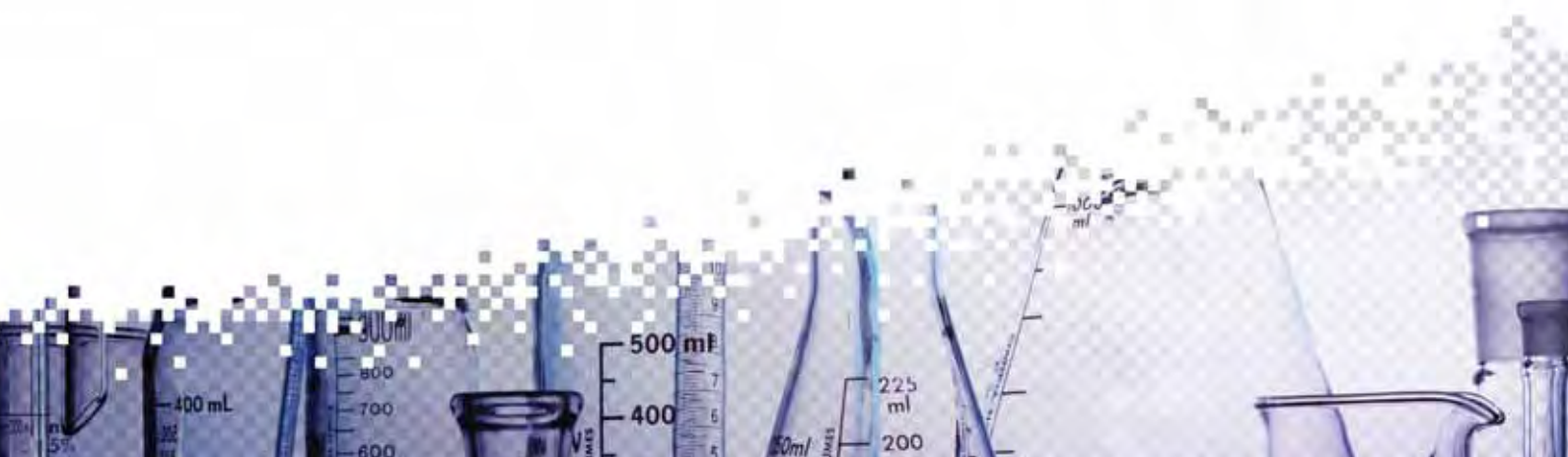
更换2690/2695泵头密封圈 .....	17
------------------------	----

## 色谱分离专栏

用于制药行业设备清洗验证的高通量UPLC -MS方法 .....	19
----------------------------------	----

## 实验室数据管理系统专栏

沃特世科学数据管理系统 (SDMS) 在区域卫生保健实验室的实施 .....	21
--	----



## 沃特世公司和中国国家环保局共同关注持久性有机污染物

### 双方签署建立中国“二恶英实验室和监测网”的采购协议

2007年5月23日，马萨诸塞州Milford – 沃特世公司（NYSE: WAT）今天宣布与中国环保局就建“二恶英实验室和监测网”的实验室仪器设备签订采购协议。协议今天在中美战略对话经济合作论坛商贸合约签字仪式上正式签署，中国商务部副部长王芳女士和美国大湖区八大州州长出席了签字仪式。沃特世公司全球化学分析市场总监James Willis先生和中国环保局规划财务司副司长刘启风先生代表双方签字。



“我们很高兴能和中国国家环保局交流我们真诚的实验室设想和先进技术，协助中国建立‘二恶英实验室和监测网’，沃特世公司James Willis博士说，“这些新二恶英实验室的建成意味着中国环境保护力度的进一步加强，将最终为人民保障环境健康。”

为了解决食品、水和土壤中二恶英和持久性有机污染物这类严重问题，中国政府正在提高日常该类物质的分析测试能力。中国国家环保局选择与沃特世公司合作，为协助建立二恶英实验室和监测网而共同努力。二恶英问题遍及全世界，该物质存在于环境和食品中，为确保人体健康，必须采取连续性监测手段。

将近50年的时间，包括进入中国市场的25年，沃特世公司一直是业内世界领先的合作伙伴。自2003年以来，通过建立环境法规遵从和标准体系，沃特世公司开始和中国国家环保局一道解决最具挑战性的问题。

## 沃特世食品安全研讨会

沃特世公司一直和国内食品安全领域如疾病控制中心、农业部、进出口检验检疫保持行业技术交流，自2005年成功举办海南食品安全研讨会后，沃特世公司今年4月16-18日在青岛又成功举办了此领域专家、学者交流会，通过沃特世公司与行业的交流，不仅了解了沃特世公司最新产品超高效液相色谱，



而且能够及时跟踪欧盟食品法规、最新日本肯定列表动态。国内专家也作了相应专题报告，如食品中二恶英（Dioxin）检测，详细介绍了二恶英实验室技术平台的建立，实验室QA/QC控制等。沃特世公司为业内专家又一次提供了良好的交流机会，并真诚期待下一届您的光临。





## 沃特世公司协助美国环保署分析土壤和水中的全氟类化合物

### 最新合作研究和开发协议（CRADA）旨在开发液相和质谱方法测量低浓度全氟类化合物

2007年4月17日，马萨诸塞州Milford – 沃特世公司（股票代码NYSE: WAT）今天宣布参与美国环保署（EPA）国家人体接触风险评估（EXPOSURE）研究实验室，共同开发微量水平的分析方法检测土壤和水中的全氟类化合物的工作。合作研究和开发协议（CRADA）三年的目标是开发全氟类化合物的采集、储存、提取、纯化和微量水平的分析方法。

全氟类化合物是人工合成化学制品，常在造纸，包装，纺织和室内装修行业中使用。科学研究发现该类化合物具有毒性，持久性和生物富集作用，是全球性的污染物。尽管研究仍在继续，普遍认为该类化合物与实验动物的肝损伤，发育和生殖有关。并且，全氟类化合物可在体内停留很长时间。

另外，合作研究和开发协议试图提供追踪全氟类化合物在环境中的分布和人类接触渠道。沃特世公司科学家将使用液相色谱质谱联用技术测量土壤和水中的微量全氟类化合物。相比气相色谱质谱方法，液相色谱串联质谱方法更适合全氟类化合物的分析，技术升级后的产品也更灵敏。

Joe Romano，沃特世公司化学分析高级经理，表示美国环保署在该研究领域有杰出的声誉。基于此类污染物会对美国公众造成极大的健康威胁，最终，双方合作所带来的专业知识和经验将有助于寻找评价污染物危害的方法。

Andy Lindstrom，美国环保署人体接触风险评估（Exposure）研究室物理学家，谈到“对于美国环保署来说，这是一个重要的机会来衡量领先的分析仪器水平，并解答人体接触全氟类化合物危害的重要问题。合作研究和开发协议在私人企业和联邦政府实验室之间签署，1986年联邦技术转化法规定，此项协议允许双方进行合作。

美国环保署的合作伙伴，知识产权管理部，西弗吉尼亚高技术联盟基金会，主持了合作仪式。

沃特世公司已经是第二次加入政府合作研究和开发协议。2005年二月，沃特世公司宣布参与美国环保署第五中心区域实验室（伊利诺州芝加哥）的合作研究和开发协议。这项合作力图开发280种饮用水中有害物质的筛选方法，而常规方法不容易检测到。

研究目标有两项内容：1帮助当地水质官员快速调查蓄意或过失污染饮用水并依法处置，2提供水分析的常规方法。

关于国家人体接触风险评估（Exposure）研究实验室（[www.epa.gov/nerl/](http://www.epa.gov/nerl/)）。

国家人体接触风险评估（Exposure）研究实验室，是美国环保署研发办公室的三大国家实验室之一，通过改进方法，测量标准和模型来评价、预测人类与生态系统对空气，水，土壤和食物中有害污染物或情况的接触。



## [ 理 论 ]

一项技术  
突破并不仅  
仅影响实验  
室工作。

它还会影响  
到您整个组织  
的运作方式。

当技术不再是科学进步的绊脚石，  
您的组织会有多大的发展空间？拥有了  
革命性的 Waters® ACQUITY UltraPerformance  
LC® 系统后，实验室科学家们便能以  
更大的信心和更高的效率来开发各种  
方法。ACQUITY UPLC® 为科学家们提供了  
远远优于 HPLC 的数据和灵敏度。因此，  
它对实验室、董事会以及任何需要科学  
来提高生活品质的方方面面都深具  
影响力。ACQUITY UPLC 系统是液相色谱  
技术的未来。欲了解更多信息，请访问  
网站 [www.waters.com/al](http://www.waters.com/al)。

©2007 Waters Corporation. Waters, The Science of What's Possible,  
ACQUITY UltraPerformance LC, UPLC and ACQUITY UPLC are  
trademarks of Waters Corporation.



# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



# 将美国药典测定有关物质的HPLC方法转换成ACQUITY UPLC的方法及方法的再开发

Andrew Aubin, Daniel Root, 美国沃特世公司

## 简介

在本文中，我们首先介绍了如何使用简单的几何学方法将美国药典（USP）中收录的测定米氮平有关物质的HPLC方法转移到Waters® ACQUITY UPLC®系统上的过程，结合小颗粒（1.7μm）ACQUITY UPLC BEH柱填料的优势，ACQUITY UPLC系统可以表现出优于传统HPLC的性能。然后，我们介绍了如何对转换后的方法进行再开发和部分验证，并对这些方法进行了比较。

几何学方法转换是一种保留原有方法的流动相组成、柱温和检测参数的方法转换技术。其它的色谱参数，如流速、进样体积、运行时间和梯度斜率（如果采用梯度分离的话）将根据ACQUITY UPLC系统使用的色谱柱尺寸（长度和内径）作相应调整。这种方法非常简单，在保持或提高峰之间的分离度的同时，还能符合系统适用性的其它要求（例如重现性和脱尾因子）。通常，采用ACQUITY UPLC系统后灵敏度会得到改善，运行时间也会缩短。由于经几何学方法转换对方法本身的验证状态的影响不是非常大，只需要进行部分的再验证，因此就给我们提供了一个快速开发和完善方法的机会，以便充分利用ACQUITY UPLC系统和化学柱的优点。

如果用户想要完全重新开发一个分析方法的话，那么这个分析方法中的所有参数都是可以改变的。在这种情况下，原有的耐受性、运行时间、分离度、溶剂使用量等参数就可以提高到过去不可能达到的程度。

对新方法的开发来说，验证是必须进行的工作。由于UPLC®的方法更快，耐受性更好，再加上Empower™ 2软件的验证方法管理器这样易于使用的工具，使得验证工作耗时更少并易于操作。

米氮平（Mirtazapine, 1,2,3,4,10,14b-hexahydro-2-methylpyrazino[2,1-a]-pyrido [2,3-c] [2]benz-azepine）

（图1）是一种抗抑郁药，可通过阻断α<sub>2</sub>受体，同时拮抗5-HT<sub>2</sub>和5-HT<sub>3</sub>受体，提高去甲肾上腺素的活性。

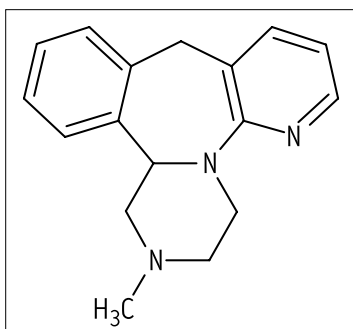


图1: 米氮平

## 实验和结果

### 材料

羟化四甲胺五水合物购自Sigma-Aldrich（St. Louis, MO）。乙腈、甲醇和四氢呋喃购自Fisher Scientific（Fair Lawn, NJ）。碳酸氢铵购自Fluka（St. Louis, MO）。磷酸购自J.T. Baker（Phillipsburg, NJ）。水是由MilliQ Gradient A10系统（Millipore, Billerica, MA）纯化的。米氮平和5个米氮平的相关物质由生产厂商提供，5个米氮平的相关物质分别用A到E进行简单标识。

### HPLC仪器和分析条件

HPLC分析使用Alliance® 2695分离单元加2487双波长紫外检测器。选用满足美国药典L1类要求的5μm，4.6 x 250 mm的XBridge™ C<sub>18</sub>柱。美国药典方法的分析条件是柱温40°C和10μL的进样体积。流动相为pH7.4的羟化四甲胺缓冲液，以及乙腈，甲醇，四氢呋喃的混合液，比例为65:15:12.5:7.5，流速为1.5 mL/分钟。检测波长为240nm。所有样品使用1:1的乙腈/水溶液溶解。

### UPLC仪器和分析条件

UPLC方法的开发是在ACQUITY UPLC系统上进行的，该系统由1个二元溶剂管理器（BSM）、样品管理器（SM）与可调紫外（TUV）检测器组成。色谱柱选用1.7μm，2.1 x 50 mm ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>柱。上述所有仪器的控制、数据采集和分析都使用Empower 2软件。

### 美国药典HPLC方法的确认

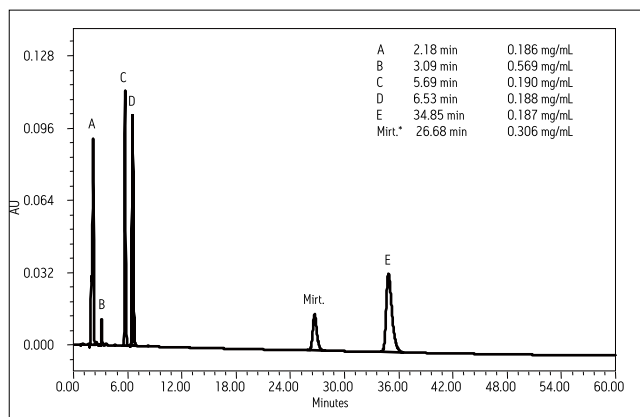
根据美国药典的规定，确认该HPLC方法的接受条件为：

（1）所有组分的分离度（Rs）不得小于2.0；（2）峰对称性（以美国药典脱尾因子的形式计算）应小于2.0，（3）重复3次进样得到的峰面积的RSD不得大于2.0%。根据上述条件，我们对美国药典中的方法进行了评估，方法满足上述这些条件。在此过程中，我们对方法进行了调整，调整的内容包括将流动相中有机相的比例由35%减少到33%。包含米氮平及其5个有关物质的混合对照品使用这个方法进行分析（图2）。所有的组分都得到了成功地分离，其中两个最接近的峰（相

关物质C和D)间的分离度为3.7。重复3次进样得到的每个组分的峰面积的RSD都在2.0%的接受限内(表1)。

该HPLC方法成功地得到了确认,接下来就可以进行适当的比例调整转换到ACQUITY UPLC系统上。

转换经确认的HPLC方法到ACQUITY UPLC系统上



\*Mirt. = 米氮平

图2: 典型的经确认的美国药典HPLC方法的色谱图 (10 $\mu$ L进样体积)

该HPLC方法可以使用几何学方法转换至ACQUITY UPLC系统上。选用满足美国药典1类要求的1.7 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 50mm ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱。分析条件的变化主要是对HPLC方法中的运行时间、流速和进样体积进行比例调整。原来的HPLC方法的运行时间根据美国药典的要求应设为米氮平峰保留时间的2倍, 约为60分钟。

在这些计算的基础上, ACQUITY UPLC系统的运行时间为10分钟。美国药典HPLC方法中原来的流速为1.5 mL/分钟, 现调整为0.30mL/分钟。进样体积由10 $\mu$ L调整为0.40 $\mu$ L。在进样测试中, 选用0.10 $\mu$ L进样体积作为起始进样体积, 以避免由极性非常强的化合物A引起的失真(溶剂效应)。

参数*	A	B	C	D	米氮平	E
RT	2.18 $\pm$ 0.18%	3.09 $\pm$ 0.23%	5.67 $\pm$ 0.50%	6.50 $\pm$ 0.46%	26.5 $\pm$ 0.54%	34.7 $\pm$ 0.40%
RRT	0.08	0.12	0.22	0.25	1.0	1.31
分离度	NA	4.74 $\pm$ 1.13%	14.3 $\pm$ 1.62%	3.70 $\pm$ 0.54%	37.3 $\pm$ 0.64%	8.16 $\pm$
脱尾因子	0.67 $\pm$ 6.0%	1.36 $\pm$ 1.32%	1.20 $\pm$ 0.58%	1.21 $\pm$ 0.25%	1.23 $\pm$ 0.98%	1.49 $\pm$ 0.34%
%RSD	0.57	1.98	0.66	0.76	0.62	0.2

\*RT = 平均保留时间 (分钟), RRT = 相对保留时间

表1 经确认的美国药典HPLC方法的结果[n=3]

参数	公式
运行时间	UPLC运行时间=HPLC运行时间 $\times$ UPLC柱长 HPLC柱长
流速	UPLC流速=HPLC流速 $\times$ (UPLC柱直径) <sup>2</sup> (HPLC柱直径) <sup>2</sup>
进样体积	UPLC进样体积=HPLC进样体积 $\times$ UPLC进样体积( $\pi r^2 L$ ) HPLC进样体积( $\pi r^2 L$ )

表2 等梯度分离基本比例调整公式

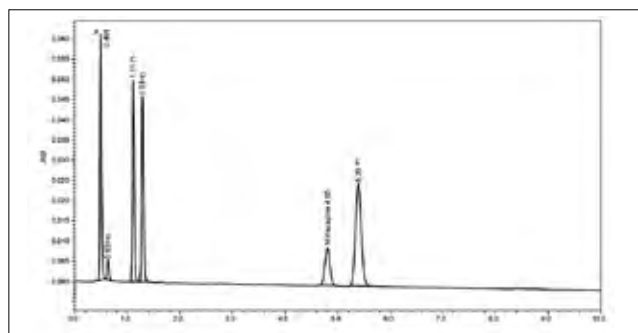


图3 转换的UPLC方法的色谱图 (进样体积为0.10 $\mu$ L)

### 转换的ACQUITY UPLC方法

对UPLC方法进行直接的方法转换并不影响原来各组分的洗脱次序或整个色谱的形态(图3)。3次重复进样的RSD、分离度、脱尾因子和重现性都符合原来美国药典HPLC方法允许的限度范围。

A/B和C/D峰的分离度均大于2.0。每个峰的脱尾因子均小于等于1.6, 3次重复进样的RSD均小于1%。从这一点来讲直接从美国药典HPLC方法转换过来的ACQUITY UPLC方法是完整的, 从总体性能来说与原来美国药典HPLC方法是等效的(表3)。

参数*	A	B	C	D	Mirt.	E
平均RT	0.491	0.631	1.11	1.28	4.80	5.39
Mirt.的RRT	1.10	0.13	0.23	0.27	1.0	1.1
分离度	NA	2.45 $\pm$ 0.57%	7.90 $\pm$ 0.84%	2.62 $\pm$ 0.23%	28.2 $\pm$ 0.48%	3.05 $\pm$ 0.10%
脱尾因子	1.36 $\pm$ 0.05%	1.60 $\pm$ 0.63%	1.24 $\pm$ 0.16%	1.22 $\pm$ 0.16%	1.03 $\pm$ 0.033%	1.07 $\pm$ 0.28%
面积的%RSD	0.67	0.74	0.58	0.65	0.88	0.60

\*RT=保留时间(分钟), RRT=相对保留时间, Mirt.=米氮平

表3 转移得到的UPLC方法的结果[n=3]

仅仅需要使用简单的比例关系调整, 美国药典HPLC方法可以以最小的代价成功地转换成ACQUITY UPLC系统方法。表4比较了原来的美国药典HPLC和转换后的UPLC方法的参数。这个简单直接的方法转换得到的方法可以非常容易地满足有关

的接受标准（表3）。转换后的UPLC方法在保持美国药典系统适应性要求的同时，单次进样节约了50分钟，进样体积是原来的1/100。运行时间的减少可节约97%的流动相，这不仅降低了采购流动相成分的费用，还减少了流动相处理的费用。这是一个由美国药典HPLC方法简单、直接地转换成ACQUITY UPLC系统方法的一个例子。

在现阶段，转移后的ACQUITY UPLC方法已经可以使用了，如果在验证环境下，就可以按照常规的步骤来进行验证了。尽管通过方法转移，该方法的性能已经得到了极大的改善，但为了充分发挥超高效液相色谱的优势，我们还要进一步的进行方法再开发。

方法的再开发

虽然由美国药典 HPLC方法转换成的UPLC方法后可以完全符合美国药典对于系统适应性的要求，但还是有很多理由来进行方法的重新开发。复杂的流动相、不理想的流速（对于1.7 $\mu$ m 直径的颗粒柱最适宜的流速应为0.65mL/分钟，而本方法中为0.3mL/分钟），相关物质A和B的保留和分离度还不是最好的，耐受性也不是最好的。实验表明即使是有机相比例微小的改变（3个有机相组分中任何一个小于1%的改变）也会使得方法不能满足系统适应性的要求。就象在前面简介中提及的那样，经几何学方法转换对方法本身的验证状态的影响不是非常大，只需要进行部分的再验证。而完全重新开发方法验证的工作就会比较多，但我们还是觉得有必要进行方法再开发。方法再开发的主要目的是在维持原来美国药典方法系统适应性的要求的基础上，进一步缩短运行时间，使方法变得更简单从而提高耐受性。该方法再开发的步骤简单明了，并将在后面说明。作为常识，碱性化合物，例如米氮平及其相关物质，可以在高pH的流动相中得到更好的分离。

参数	美国药典HPLC方法	转移后ACQUITY UPLC方法
色谱柱	4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m XBridge C <sub>18</sub>	2.1 $\times$ 50mm, 1.7 $\mu$ m ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub>
柱温	40 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C
流动相	A: pH7.4的羟化四甲铵五水物	A: pH7.4的羟化四甲铵五水物
	B: 乙腈: 甲醇: 四氢呋喃 (43: 36: 21)	B: 乙腈: 甲醇: 四氢呋喃 (43: 36: 21)
	混合比例为67% A:33%B	混合比例为67% A:33%B
运行时间	60分钟	10分钟
流速	1.5 mL/分钟	0.30 mL/分钟
进样体积	10 $\mu$ L	0.1 $\mu$ L

表 4 美国药典HPLC法和转换后的UPLC方法的参数比较  
ACQUITY UPLC BEH柱可以在高pH值环境下使用。选择重碳

酸铵缓冲溶液是为了确保重新开发的方法在需要的时候可以 和质谱联用。

米氮平及其有关物质的混合样品（浓度均为约1mg/mL溶于1:1的水/乙腈溶液中）用梯度法进行色谱进行分析，柱为2.1  $\times$  50 mm, 1.7 $\mu$ m ACQUITY BEH C<sub>18</sub>柱，流动相为10mM 重碳酸铵的缓冲溶液（pH 10.5）/乙腈。进样体积为1.0 $\mu$ L，流速为0.65 mL/分钟。5 分钟和10分钟的预运行按照乙腈浓度从5%升到85%的线性梯度进行。色谱数据结果传到DryLab软件中进行分析处理。随后得到了一个运行时间为5分钟（包括流速提高到1.2毫升/分钟）符合要求的米氮平及其有关物质的分离方法（表5）。对于梯度的起始浓度和斜率还做了些微小的调整以进一步提高分离度，特别是米氮平和相关物质E的分离。原来的美国药典HPLC方法和新开发的ACQUITY UPLC方法的色谱图见图4和图5。新开发的ACQUITY UPLC方法是完整的，并且在整体性能上等同或优于原来的美国药典HPLC方法和转换的UPLC方法的（表6）。

最终得到的方法需要进行部分验证。对于本方法验证工作主要集中在评估线性、准确性、精确性和定量限（LOD）上。除了相关物质B的线性范围为0.05% 到0.5%以外，该方法对于的所有相关物质在0.01%到0.5%的测试范围中都呈线性，且相关系数r<sup>2</sup>都大于0.99。根据美国药典杂质限度（0.10%）的规定，5个相关物质配制的浓度矩阵均为80%、100%和120%。通过这些样品的回收率测试，方法的正确性得到了验证，平均回收率为99 $\pm$ 7%。以面积计算的精确度以%RSD表示，所有相关物质的%RSD都小于等于2.0%。所有相关物质的定量限都小于美国药典规定的0.1%的杂质限度。方法的快速和软件产品如Empower 2 方法验证管理器的使用，进一步缩短了完成这些部分验证工作的时间。

参数	原来的美国药典HPLC方法	新开发的ACQUITY UPLC方法
色谱柱	4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m XBridge C <sub>18</sub>	2.1 $\times$ 50 mm, 1.7 $\mu$ m ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub>
柱温	40 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C
流动相	A: pH7.4的羟化四甲铵五水物	A: pH10.5的10 mM重碳酸铵
	B: 乙腈: 甲醇: 四氢呋喃 (43: 36: 21)	B: 乙腈
	混合比例为67% A:33%B	4.5分钟内梯度洗提5–37%
运行时间	60分钟	4.6分钟
RT 米氮平	26.7 min	4.15 min
流速	1.5 mL/分钟	1.2 mL/分钟
检测波长	240 nm 5 pps	240 nm 20 pps
进样体积	10 $\mu$ L	1 $\mu$ L

表 5 原来的美国药典HPLC方法和新开发的ACQUITY UPLC方法参数的比较



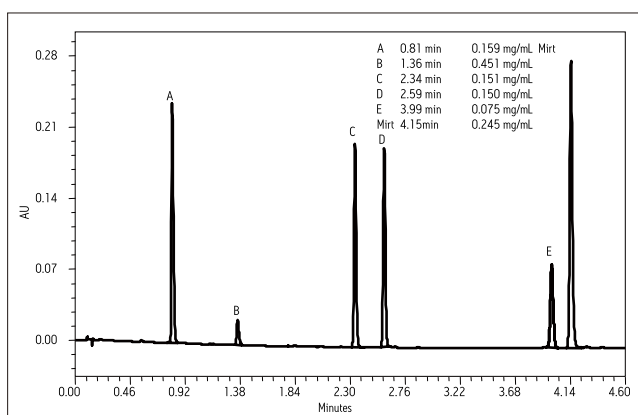


图5: 典型的重新开发的UPLC方法

参数*	A	B	C	D	E	Mirt.
平均RT	0.81 ± 0.12%	1.36 ± 0.18%	2.34 ± 0.11%	2.59 ± 0.11%	3.99 ± 0.06%	4.15 ± 0.07%
Mirt.的RRT	0.20	0.33	0.56	0.62	0.96	1.0
分离度	NA	17.1 ± 0.47%	29.9 ± 0.05%	7.45 ± 0.01%	36.3 ± 0.12%	3.78 ± 0.64%
脱尾因子	1.60 ± 0.01%	1.37 ± 0.80%	1.01 ± 0.02%	1.06 ± 0.00%	1.02 ± 0.09%	1.19 ± 0.20%
面积的 %RSD	0.10	0.19	0.26	0.27	1.44	0.50

\*RT=保留时间 (分钟), RRT=相对保留时间, Mirt.=米氮平

表6 新开发UPLC方法的结果[n=3]

## 结 论

在本文中一个分析米氮平和其相关物质的美国药典HPLC方法首先被成功地使用几何学方法转换成一个UPLC的方法。虽然方法的转移是完全成功的, 但我们还是对其进行了方法的再开发以进一步改善这个UPLC方法。从表6中我们可以看到, 这个方法符合所有的要求, 同时非常快速, 米氮平和相关物质, 以及相关物质之间的分离度也更好。初步的验证结果显示新的UPLC方法能象其它被开发的方法一样得到验证。重新开发的UPLC的方法的运行时间为4.5分钟, 比原先的HPLC的方法 (60分钟) 要快了很多, 也比转换后的UPLC的方法快2倍。

因为验证新方法要花费的时间和精力使得许多色谱工作者不愿重新开发方法。随着UPLC的应用, 时间可以大大减少 (无论是采用几何方法转换或重新开发方法), 再加上新软件产品的使用, 如Empower 2 软件的方法验证管理器, 方法验证已经不再像过去那么复杂和费时了。

总之, 虽然在使用超高效液相色谱时首先会考虑到使用方法转换来转化这些现有的或老的分析方法, 但是, 还是要考虑是否采用方法再开发来改进方法以充分发挥这项技术的全部优势。峰分离度的提高, 分析时间的缩短, 耐受性的提高, 这些对于缩短产品上市时间, 降低总体开发成本都有着非常重要的贡献, 也使得我们在这方面的努力变得非常有意义。



# 重组人促红细胞生成素的HPLC与UPLC肽图谱分析

王敏力<sup>1</sup> 杨鹏云 沈琦  
(中国药品生物制品检定所血液制品室)

**摘要：**目的 分析rHuEPO供试品及对照品酶解后在HPLC与UPLC<sup>®</sup>上的肽图谱。

**方法** rHuEPO供试品及对照品经透析、冻干、重新溶解和胰酶酶切后，用HPLC、UPLC以三氟醋酸/水，三氟醋酸/乙腈/水作流动相，反相色谱柱来分析酶切后肽段。

**结果** rHuEPO供试品及对照品胰酶酶切后的肽段在HPLC上肽图谱表现一致，在UPLC上肽图谱也完全一致。

**结论** UPLC与HPLC一样，能够验证rHuEPO供试品及对照品肽图的一致性，UPLC分析rHuEPO肽图更省时间，更方便快捷，更能降低样品消耗。

**关键词：**重组人促红细胞生成素 胰酶酶解 肽图谱 高效液相色谱 超高效液相色谱

**Abstract :** Objective To elucidate the proteinase trypsin peptide mapping of both recombinant human erythropoietin (rhEPO) and standard rhEPO by HPLC and UPLC.

**Methods** All of the rhEPOs were dialysed, freeze-dried, reconstructed and then digested by trypsin followed by peptide mapping determined by HPLC and UPLC. Each of the rHuEPO samples was chromatographed on a reversed-phase column using water and acetonitrile as eluents and trifluoroacetic acid as an ion pairing agent.

**Results** The data are indicative of each rhEPO with peptide mapping consistent with that standard rhEPOs by HPLC and also by UPLC.

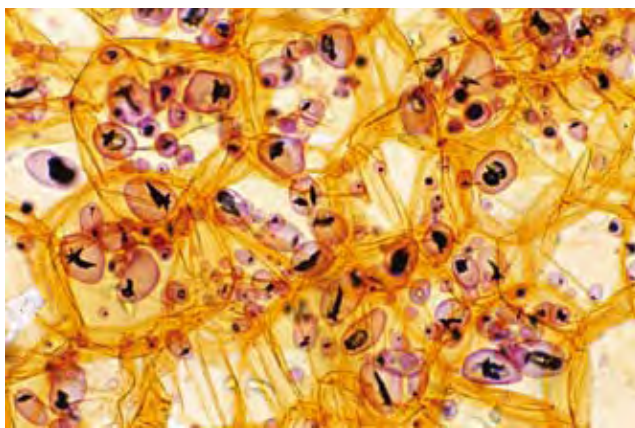
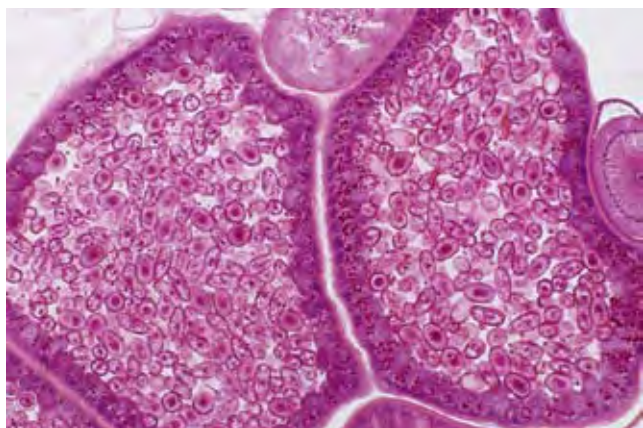
**Conclusion** Consistency of peptide mapping for rhEPOs and standard rhEPOs can also be validated by UPLC as by HPLC. Reversed-phase UPLC is a more advantageous, secure, sensitive and time saving method suitable for separating peptide fragments of rhEPOs.

**Key words:** recombinant human erythropoietin; trypsin digest; peptide mapping; HPLC; UPLC

## 前言

重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHuEPO) 是一种基因工程药物，含有165或166个氨基酸，与

人类自身基因编码的EPO序列相同，目前多用于治疗贫血。rHuEPO是一种糖蛋白，含大约40%的糖类，分子量大约在30KD左右，含有三个N连接（分别在24，38，83）和一个O连接（126）位点。糖类部分主要影响蛋白稳定性及可溶性而与



体外活性关系不大，其活性主要由蛋白部分决定，因此反映EPO一级结构的指纹图——肽谱图通常是rHuEPO原液药品质量控制的重要实验。目前采用的方法是在特定条件下以胰蛋白酶水解rHuEPO，用HPLC（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）分离酶解后的肽段，与对照品进行对比应保持一致<sup>2</sup>，这也是现行《中华人民共和国药典》中rHuEPO原液药品质控的标准。但HPLC分析rHuEPO胰酶酶解肽段存在单针分析时间较长，响应值相对较低的不足之处。

UPLC（UltraPerformance Liquid Chromatography，UPLC）是基于1.7μm小颗粒填料技术的超高效液相色谱系统，相比于传统的HPLC具有更高的分离能力和灵敏度。如果能够采用UPLC来分析诸如蛋白质肽图谱等复杂试验，会大大减少分析时间，获得更好的结果，从而实现准确、高速、高通量的检定。

本试验对比了两组rHuEPO原液供试品及rHuEPO对照品胰酶酶切后的肽段在HPLC、UPLC上的表现，探讨rHuEPO原液供试品与其相应对照品之间是否一致，同时对比了同批次的rHuEPO样品在HPLC和UPLC上肽图表现，试图寻找一种更为方便快捷的检定方法。

## 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters® Alliance® 2690系统、Waters 2487紫外检测器、Waters Millennium32 色谱管理软件；Waters ACQUITY UPLC系统、TUV紫外检测器、Waters Empower™ 色谱管理软件；Waters ACQUITY UPLC Columns Calculator 方法转换软件。

试剂：乙腈（HPLC，Fisher，US）、三氟醋酸（分析纯）、胰蛋白酶（序列分析纯，Roche），超纯水。

### 1.2 样品及前处理

两批rHuEPO原液供试品（麒麟鲲鹏药业，编号：SJB200601902、SHBJ200600318）及其相应的对照品（麒麟鲲鹏药业，EPO STD1、EPO STD2）经透析、冻干、1%碳酸氢铵重新溶解，使供试品浓度为1.5mg/ml，按1：50（w/w）加入胰蛋白酶，37℃ ± 0.5℃ 保温6小时，50%冰醋酸中止反应，备检。

### 1.3 HPLC色谱条件

色谱柱：反相C<sub>8</sub>柱；流动相A：0.1%三氟醋酸水溶液、流动相B：0.1%三氟醋酸/80%乙腈/20%水溶液；流速0.75ml/min，梯度洗脱条件见下表1。紫外检测波长214nm，进样量20μl。

Table 1

	流速ml/min	时间min	A%	B%	曲线
1	0.75	0	100	0	
2	0.75	30	85	15	6
3	0.75	75	65	35	6
4	0.75	115	15	85	6
5	0.75	120	0	100	6
6	0.75	125	100	0	6
7	0.75	145	100	0	

### 1.4 HPLC方法到UPLC方法的转换

采用WATERS ACQUITY Calculator软件将HPLC梯度洗脱条件换算为适用于UPLC的色谱条件，转换后流速为0.156ml/min。

### 1.5 UPLC色谱条件

色谱柱：2.1 × 50mm WATERS ACQUITY C<sub>18</sub>柱；流动相同上述HPLC流动相；紫外检测波长214nm，进样量0.8μl。梯度洗脱条件见下表2。

Table 2

	流速ml/min	时间min	A%	B%	曲线
1	0.156	0	100	0	0
2	0.156	11.47	85	15	6
3	0.156	20.47	65	35	6
4	0.156	28.47	15	85	6
5	0.156	29.47	0	100	6
6	0.156	30.47	100	0	6
7	0.156	34.47	100	0	

## 结果与讨论

### 2.1 HPLC色谱图

按上表1平衡色谱柱，不进样运行两个空梯度，基线平稳后进样分析，两批rHuEPO原液供试品及其对照品的HPLC色谱图分别见附图1-1、附图1-2，rHuEPO原液供试品与其相应对照品的各肽段保留时间相同，两者肽图谱完全吻合。不同批次的rHuEPO原液供试品之间的色谱峰存在细微差异。

### 2.2 UPLC色谱图

按上表2平衡色谱柱，不进样运行两个空梯度，基线平稳后进样分析，两批rHuEPO原液供试品及其对照品的UPLC色谱图见附图2-1、附图2-2。各肽段保留时间相同，两者图谱完



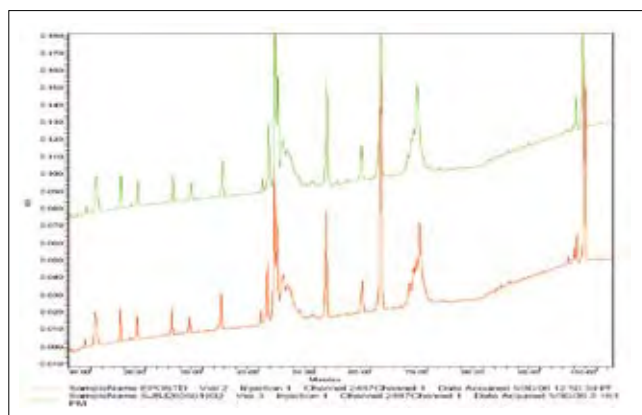


Figure 1-1 Protease trypsin Peptide Maps of rhEPO (SJB200601902) and standard rhEPO (EPO STD1) by HPLC

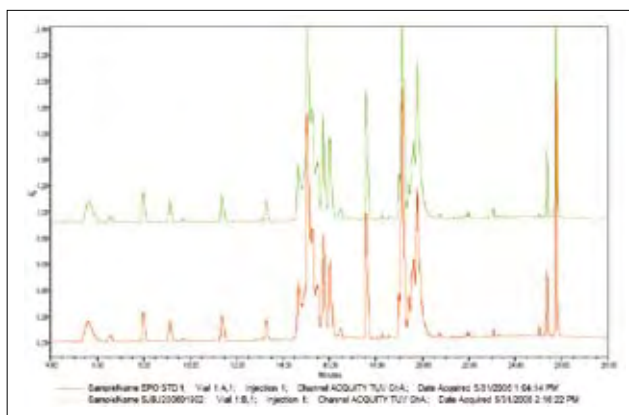


Figure 2-1 Protease trypsin Peptide Maps of rhEPO (SJB200601902) and standard rhEPO (EPO STD1) by UPLC

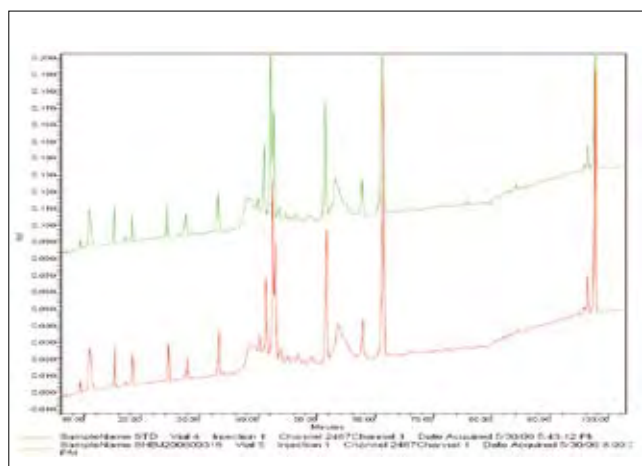


Figure 1-2 Protease trypsin Peptide Maps of rhEPO (SHBJ200600318) and standard rhEPO (EPO STD2) by HPLC

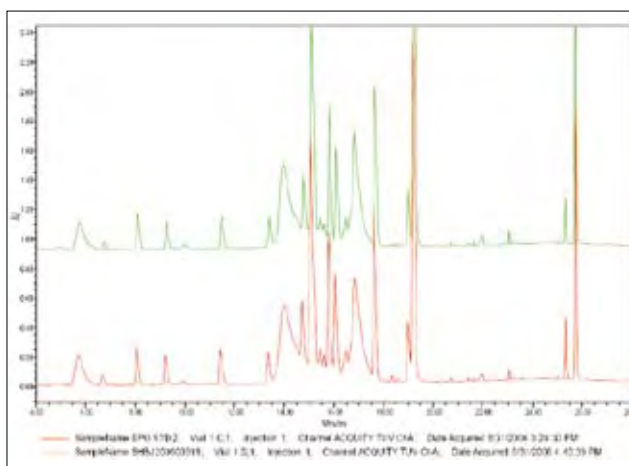


Figure 2-2 Protease trypsin Peptide Maps of rhEPO (SHBJ200600318) and standard rhEPO (EPO STD2) by UPLC

全一致。与HPLC的情况一样，不同批次的rHuEPO原液供试品之间的UPLC色谱峰不完全相同。

### 2.3 HPLC色谱图与UPLC色谱图的对比与讨论

一级结构是蛋白质分子结构的基础，正确表征非常重要。肽图谱就是表征蛋白质一级结构的重要项目之一，其余的项目还包括含量、纯度、等电点、分子量、氨基酸序列和N-端序列等。rHuEPO是一种结构相对比较复杂的糖蛋白，在理论上可被胰酶切成21个肽段，其中包括了3个糖肽（T5,T9,T13）片断，而二硫键（T5,T2-T20）的存在使实际肽段数目为17个。rhEPO的氨基酸序列及胰酶酶解片段如下表3（T为胰酶片段，数字代表酶解肽段数）：

Table 3 Amino Acid Composition of rhEPO and peptide fragments after trypsin digestion

APPR	LICDSR	VLER	YLLEAK	EAENITGCAEHCSLNENITVPDTK	VNFYAWK
T	T2	T3	T4	T5	T6
R	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	AVSGLR		
T7		T8		T9	T10
SLTLLR	ALGAQK	EAISSPPDAASAAPLR	TITADTFR	K	LFR
T11	T12	T13	T14	T15	T16
LK	LYTGEACR	TGDR			
T19	T20	T21			

rHuEPO胰酶酶解后的各个肽段大小存在很大差异，其构成从单个氨基酸到25个氨基酸不等，理论分子量跨度从

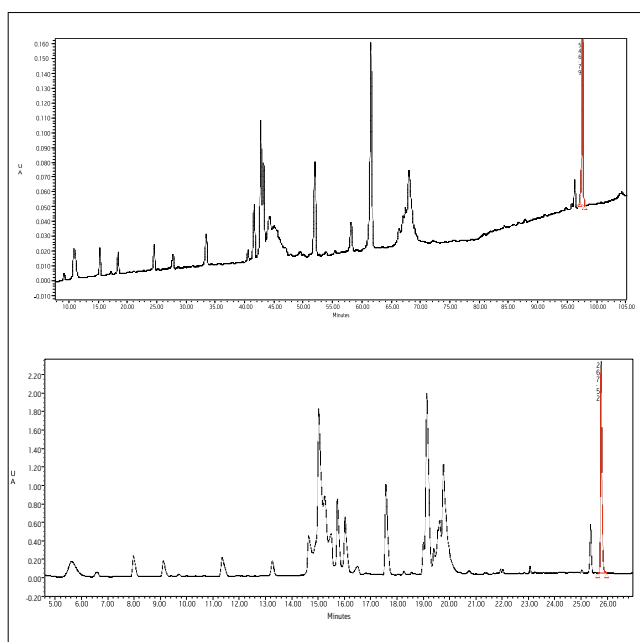


Figure 3 Comparison of Protease trypsin Peptide Maps of rhEPO (SBJ200601902) by HPLC and UPLC

146.2~2525.3道尔顿<sup>3</sup>，所以在色谱柱上的保留特性容易受到影响，再加上肽段分析过程中胰酶效力、流动相洗脱能力等诸多因素的存在，使得不同批次的rHuEPO在肽图表现上可能有轻微差异，所以在对rHuEPO的一级结构进行质控的过程中只进行单一样品的肽图谱分析是远远不够的，必须将供试品与其相应对照品进行平行分析，两者肽图表现完全吻合才能够说明两者具有一致性。

在试验当中，我们分别用HPLC（见附图1-1、1-2）和UPLC（见附图2-1、2-2）证实了两批rHuEPO原液供试品与其相应对照品的肽图谱表现吻合。同时我们也发现由于外部影响因素的存在，不同批次的供试品只能与其相对应的对照品进行对比，不能进行交叉对比分析，结果参见附图1-1、1-2、2-1、2-2。

rHuEPO肽图谱目前多用的分析仪器是HPLC，但HPLC的分析过程非常耗时，样品处理后单针分析时间至少145分钟。而UPLC分析同样的rHuEPO供试品只要35分钟，肽图谱分析时间大为缩短，这在实现快速分析的同时也相应的减

少了有机流动相的使用，降低了检定成本及损害实验人员和环境的危险；同时，UPLC分析rHuEPO肽图仅需0.8μl的进样量，这比HPLC 20μl的进样量降低了20多倍，而响应值却从0.2AU提高到了2.0AU以上，增强了10倍多。UPLC在不降低分离度的同时获得了更高的分离效率和响应值。可以说UPLC在更短的分析时间内验证了供试品与对照品肽图的一致性，在不损失样品信息的情况下，提高了工作效率，降低了分析成本。

对比同一批次rHuEPO在HPLC和UPLC的肽图谱表现可以发现，各酶解肽段在HPLC及UPLC上色谱峰的保留时间和峰形不完全相同，UPLC肽图并没有完全沿袭HPLC的肽图表现，探寻其原因可能是HPLC和UPLC的色谱柱之间的差异造成了肽段保留特性不全一致。如果条件允许，我们采用UPLC新近推出的专门用于多肽分析的色谱柱来进一步分离rHuEPO酶解肽段，优化UPLC的梯度洗脱条件，获得更好的分离效果，或与质谱连用对各肽段进行定性分析，确证肽谱中各峰的归属。

## 结 论

经胰蛋白酶酶解后的rHuEPO原液供试品及对照品在HPLC的保留特性完全一致，在UPLC的肽图表现也完全一致。rHuEPO原液供试品及对照品的肽图存在细微的批间差异。相对于HPLC而言，UPLC在分析rHuEPO酶解肽段时用更短的分析时间、更少的上样量获得了更好的分离度和更高的灵敏度，非常适合快速高效的检品检定工作。

## 参考文献

1 Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, et al: Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987 26:2633

2 杨鹏云 程雅琴, 应用胰蛋白酶裂解反相HPLC法分析rHuEPO肽图 《中国生物制品学杂志》1997, 10(4): 214-217

3 周国华 罗国安 周勇等, 基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱法测定重组人促红细胞生成素 《中国药科大学学报》1998, 29(2): 124\_127

# 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱测定食品中对位红的检测方法研究

宁啸骏<sup>1</sup>, 葛宇<sup>1</sup>, 王丁林<sup>1</sup>, 张燕琴<sup>1</sup>, 孙海芳<sup>2</sup>

(1.上海市质量监督检验技术研究院, 上海200233; 2.沃特世科技(上海)有限公司, 上海, 200233)

**摘要:** 建立了超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定食品中对位红的检测方法。样品经提取后, 采用了Waters Oasis HLB作为固相萃取小柱, 进行样品净化, 经超高效液相色谱分离后采用电喷雾串联质谱进行定性及定量检测。线性范围为0.1~1.0mg/L, 线性相关系数为0.999。方法的定性检出限(S/N=3)为0.26 $\mu$ g/kg, 定量检出限(S/N=10)为0.85 $\mu$ g/kg。高、中、低三个浓度水平的加标回收率范围为80.5~109.5%, 相对标准偏差小于10%。

**关键词:** 超高效液相色谱; 电喷雾串联质谱; 对位红; 食品

## UPLC-ESI-MS/MS Determination of Parared in Food

NING Xiaojun<sup>1</sup>, GE Yu<sup>1</sup>, WANG Dinglin<sup>1</sup>, ZHANG Yanqin<sup>1</sup>, SHUN Haifan<sup>2</sup>

(1. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China; 2. Waters Technologies (Shanghai) Limited, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** A sensitive method for determination of parared in food by UPLC-ESI-MS/MS was proposed. The food sample was extracted and purified on solid-phase extraction column (Waters Oasis HLB), determined by UPLC-ESI-MS/MS. The calibration curve of parared showed good linearity in range of 0.1~1.0mg/L with correlation of 0.999. The detection limit of method was 0.26  $\mu$ g/kg (S/N=3), and the limit of quantification was 0.85  $\mu$ g/kg (S/N=10). The recoveries at three levels ranged from 80.5 to 109.5%, and the relative standard deviations were lower than 10%.

**Key words:** UPLC; ESI-MS/MS; Parared; Food

对位红(parared)亦称对硝苯胺红, 分子式: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 属于偶氮染料, 由于其颜色鲜亮, 不易褪色等优点, 被广泛应用于纺织、印染等化工领域。由于其所含的芳香族结构, 在进入人体后会分解还原出芳香胺, 形成致癌的芳香胺化合物而再被人体吸收, 对人类健康造成很大的危害<sup>[1]</sup>。鉴于这类偶氮染料对人体的危害性, 在1994年, 德国政府修订并颁布了一项关于“禁止使用的致癌物质”的新法规, 并列出了20多种禁用致癌芳香胺, 法规明文规定禁止生产、进口、出售含有致癌偶氮染料的制成品。2002年, 欧盟理事会通过了《关于禁止使用偶氮类染料指令》草案的共同文件。我国的GB2760《食品添加剂使用卫生标准》中也禁止使用“对位红”作为食品添加剂使用。

2005年4月, 食品标准局发现美国大众食品公司生产的商标为“Old El Paso”的辣味墨西哥菜和墨西哥玉米煎饼中含有“对位红”染料, 英国食品标准局2005年5月又在35种食

品中发现“对位红”, 并公布了受到污染的35种肉类制品名单。

现有的测定食品中对位红的方法有高效液相色谱法<sup>[2,3,4,5]</sup>、气相色谱质谱联用法<sup>[6]</sup>、液相色谱质谱联用法<sup>[7]</sup>。样品的前处理方法包括了直接提取法<sup>[2,5,7]</sup>、固相萃取法<sup>[4,6]</sup>、凝胶色谱净化法<sup>[7]</sup>。

本法通过对前处理条件的优化, 使用更少的溶剂进行固相萃取, 减少样品中的杂质对质谱的污染, 降低背景噪音, 提高检测灵敏度, 并采用了超高效液相色谱(UPLC<sup>®</sup>)-电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)法对食品中的对位红进行确认检测, 提高检测效率。经实验证明, 该方法检测效率高, 液相分析时间全程仅需5min, 检测灵敏度高, 检出限小于1 $\mu$ g/kg, 特别适用于低含量复杂样品中对位红的验证试验。



## 实验部分

### 1.1 仪器与设备

超高效液相色谱 (Waters Acquity UPLC并配有TUV检测器), 四级杆串联质谱仪 (Waters Quattro Premier™ XE), 超声仪, 旋转蒸发仪, 氮吹仪, 漩涡混合器, 固相萃取小柱[Waters® Oasis® HLB 3cc (60mg) 固相萃取柱], 超纯水器。

### 1.2 试剂与标准品

正己烷 (色谱纯), 丙酮 (色谱纯), 乙腈 (色谱纯), 甲酸 (色谱纯), 无水硫酸钠 (分析纯)。

标准物质: 对位红 (ABCR试剂, 纯度98%)

### 1.3 标准溶液配制

对位红标准储备溶液: 准确称取0.1000g对位红标准品, 用乙腈定容至100mL, 制备成100mg/L的标准储备溶液。

对位红标准使用液: 根据实验需要, 可用含0.1%甲酸的乙腈-甲醇 (1+1) 溶液将标准溶液稀释成0.1~1.0 mg/L。

### 1.4 仪器条件

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 2.1 × 50mm, 粒径1.7μm, 柱温: 30℃, 进样体积: 5μL, 紫外检测波长 λ = 484nm, 流动相: 梯度淋洗 (见表1)

表1 梯度淋洗表

时间min	流速 mL/min	A相乙腈	B相0.1% 甲酸水溶液
0.0	0.3	75	25
3.0	0.3	75	25
3.1	0.3	100	0
4.0	0.3	100	0
4.1	0.3	75	25
5.0	0.3	75	25

#### 1.4.2 质谱条件

毛细管电压: 3.00kV; 锥孔电压: 40V; 二级锥孔电压: 5.00V; RF电压: 0.2; 离子源温度: 120℃; 脱溶剂气温度: 300℃; 锥孔反吹气流量: 50L/hr; 脱溶剂气流量: 500L/hr。

离子化方式: ESI+, 定量离子: 294.1/156, 定性离子: 294.1/277, 碰撞能量: 18V。

### 1.5 样品前处理方法

#### 1.5.1 样品提取

油状食品: 准确称取1g (精确至0.01g) 样品, 加入5mL正己烷, 漩涡30s后, 过0.22μm的微孔滤膜, 待用。

含水分较少的固体食品: 准确称取1g粉碎后的样品 (精确至0.01g) 样品, 加入10mL正己烷: 丙酮= (4+1) 提取3次 (每次均超声提取5min), 合并提取液于100mL的梨形烧瓶中, 于45℃的水浴旋转蒸发至干, 加入5mL正己烷, 漩涡30s后, 过0.22μm的微孔滤膜, 待用。

含水分较多的食品: 准确称取1g粉碎后的样品 (精确至0.01g) 样品, 加入5g无水硫酸钠拌匀后, 加入10mL正己烷: 丙酮= (4+1) 提取3次 (每次均超声提取5min), 合并提取液于100mL的梨形烧瓶中, 于45℃的水浴旋转蒸发至干, 加入5mL正己烷, 漩涡30s后, 过0.22μm的微孔滤膜, 待用。

#### 1.5.2 净化

取固相萃取小柱, 先用2mL的正己烷预淋洗, 倒入待测样液, 使其受重力作用自然下滴, 待样液完全流出后, 用2 × 2mL的正己烷溶液进行洗脱, 待洗脱液完全流出后, 用4 × 1mL丙酮正己烷溶液 (1+9) 洗脱并收集上述的洗脱液。

#### 1.5.3 吹扫、定容

将收集的4mL的洗脱液, 于45℃氮吹仪上吹扫至干, 用含0.1%甲酸的乙腈-甲醇 (1+1) 溶液定容至1mL, 漩涡30s, 用0.22μm的微孔滤膜过滤后, 待进样。对于含量较高的样品可用定容液进行适当稀释后再进样。

## 结果和讨论

### 2.1 液相条件的建立

UPLC采用的色谱柱填料粒径为1.7μm C<sub>18</sub>, 与常规的5μm C<sub>18</sub>色谱柱相比较, 能获得更大的比表面, 使柱效有显著的提高, 能大大减少色谱分离所需的时间, 并且其所使用的0.2~0.4mL/min的流速又巧好能与电喷雾离子化方式所匹配, 因此采用UPLC是非常理想的选择。

在流动相的选择方面, 除了考虑到色谱分离的情况以及样品杂质的洗脱, 还必须考虑到与质谱条件的匹配。分别采用了甲醇-水, 乙腈-水作为流动相进行比较, 经试验后发现, 采用乙腈-水作为流动相反压明显小于甲醇-水的流动相, 并且经梯度转换后, 100%的乙腈流动相比100%的甲醇流动相的洗脱能力更强, 能有效地去除色谱柱中残留的杂质。在水中添加0.1%的甲酸对对位红分离的保留时间及峰型影响不大, 但添加后质谱的离子化效果明显增强, 检测的灵敏度迅速提高。

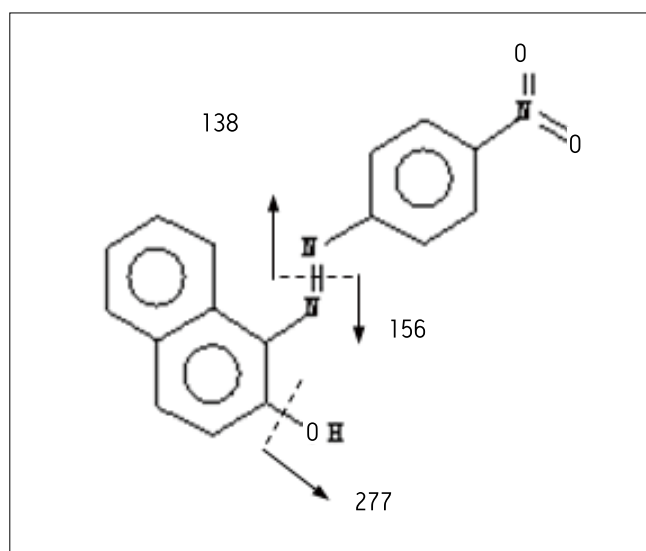


图1 对位红结构式

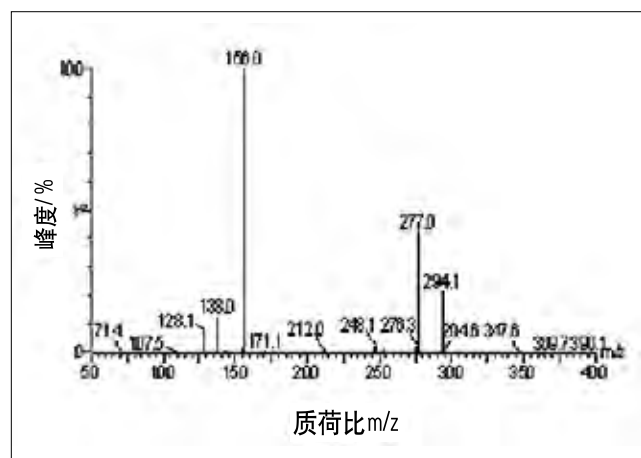


图2: 对位红离子扫描图

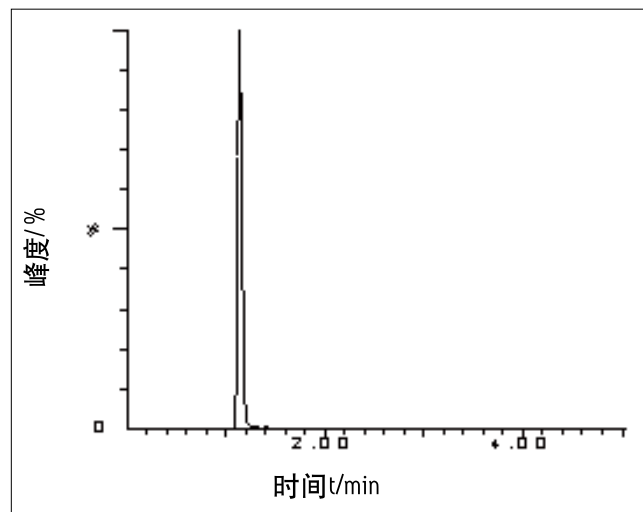


图3: 对位红的总离子流图

## 2.2 质谱条件的建立

通过对对位红 ( $C_{16}H_{11}N_3O_3$ ) 结构分析 (见图1), 其分子量为293, 其母离子分子离子峰 $[M+H]^+$ 应为294, 在确定母离子的基础上, 根据结构可能在 (-OH) 和 (-N=N-) 处断裂, 产生277, 156, 138的子离子。经试验采用子离子的扫描模式 (见图2), 确认 $294 \rightarrow 277$ ,  $294 \rightarrow 156$ ,  $294 \rightarrow 138$ 可作为其定性和定量的离子。

由于分子离子峰的强度与电离电压大小, 锥孔电压大小, 汽化温度, 吹扫气流量等多个因素有关, 经调节碰撞能量等多个参数条件后选定了最佳的质谱条件, 根据其响应值的大小强度, 选择了 $294.1 \rightarrow 156$ 作为定量离子,  $294.1 \rightarrow 277$ 作为辅助的定性离子, 图3为液质测定的对位红总离子流图。

## 2.3 样品提取方法的建立

在实际样品的检测中要获得满意的检测结果, 必须首先选择合适的提取溶剂将被测化合物从分析的样品中提取出来, 因此首先对对位红进行了不同溶剂的溶解性试验, 通过观测溶解所需的时间、所需的溶剂体积以及溶解后的状况, 经综合评定 (结果见表2), 丙酮的溶解性最好, 但采用100%丙酮作为提取溶剂, 杂质过多, 给净化带来困难, 经试验证明采用正己烷: 丙酮 = (4+1) 作为提取溶剂, 经多次提取后, 固体粉末的样品的提取效率可在95%以上, 并且丙酮和正己烷的沸点都较低, 便于浓缩。对于油状食品可完全溶于正己烷, 因此可直接采用正己烷溶解的方式。含水分较多的食品由于水的存在会影响提取效果, 因此在提取前加入无水硫酸钠吸附水分, 以提高提取效率。此外, 在样品过柱净化前用0.22 $\mu$ m的微孔滤膜进行过滤, 能有效去除不溶性物质, 防止净化过程中对小柱的堵塞。

表2 对位红的溶解性比较

溶剂名称	水	正己烷	乙腈、甲醇	丙酮
溶解性能	-	+	++	+++

注: (“-”为不能溶解 “+”为溶解性能的强度)

## 2.4 净化条件的选择

分别选用了硅胶柱Waters Oasis HLB 3cc(60mg), 中性氧化铝柱Supelclean LC-Alumina-N<sup>[4]</sup>, 以及自行填装的中性氧化铝柱<sup>[8]</sup>进行净化条件的摸索, 以辣椒粉作为测试样品, 通过试验发现 (见表3), 采用HLB小柱, 只需少量的正己烷淋洗就能去除大量的干扰色素和油脂。而中性氧化铝小柱由于吸附力过强, 必须通过加入少量水降低氧化铝的吸附能力或配制含少量丙酮的正己烷溶液进行淋洗才能获得较好的净化效果, 在实际的测试中发现, 氧化铝小柱容易吸水等原因, 每次淋洗液的使用量必须以标样作为参照, 增加了操作的难度, 对检

验人员的要求较高，此外采用中性氧化铝作为净化小柱必须使用大量的正己烷进行淋洗，否则洗脱后样液中会含有少量的油脂，降低回收效率，因此采用中性氧化铝小柱所使用的有机溶剂体积远远大于HLB小柱。

表3 净化小柱的性能比较

净化柱名称	回收率	重复性	干扰杂质的去除效果	操作的难易程度	淋洗溶剂的用量/mL
Oasis HLB	高	好	好	易	10
LC-Alumina-N	高	中	中	中	20-30
自行填装的中性氧化铝柱	中	中	中	难	60~80

在确定净化小柱后，对淋洗曲线进行了摸索，将5 $\mu$ g的对位红标准品溶解于5mL正己烷中，按1.6.2步骤进行净化，经2 $\times$ 2mL的正己烷洗脱，收集正己烷洗脱液，吹扫至干、定容后未在正己烷溶液中检出对位红。用丙酮正己烷溶液（1+9）进行洗脱，每隔1mL收集一次并测定洗脱液中对位红的含量（结果如图4）所示，采用4 $\times$ 1mL mL的丙酮正己烷溶液（1+9）洗脱，洗脱效果在99%以上。同时以空白辣椒粉为样品，按1.6步骤提取净化后的样品，与未净化的样品，用紫外分光光度计（ $\lambda = 484\text{nm}$ ）进行比较，经净化后紫外吸光值减少了90%以上，说明净化效果良好。

2.5 进样前样品定容液的选择

样品的定容液除了考虑的溶解能力外，对离子化的效果及色谱峰形都会有影响，分别选用了乙腈/水，乙腈/丙酮，乙腈/甲醇多种溶剂作为定容液进行比较，乙腈/丙酮对样品

的溶解性最好，但丙酮的存在会明显抑制待测物的离子化效率，选用乙腈/水发现对样品的溶解性能不够，溶解后样液产生浑浊，乙腈/甲醇溶解能力适中，离子化效果也较好，在定容液中加入0.1%的甲酸，能起到促进离子化效率的结果。

2.6 标准曲线和线性范围

分别取0, 1, 2, 4, 8, 10 $\mu$ L 100mg/L标准储备液，用0.1%甲酸的乙腈-甲醇（1+1）溶液定容至1mL，配成0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0mg/L的标准系列，以277.1>156 作为定量离子，测的线性方程为 $y = 29627x + 582$ ，相关系数（R<sup>2</sup>）为0.999。

2.7 检出限

以空白的1g辣椒油作为试验样品，加入1ng 的对位红标准品（见图6），按上述检测方法测定，用质谱软件进行测定，S/N为11.7，以S/N = 10/1为最低定量限，S/N = 3/1为最低定性限，测得样品的LOQ = 0.85 $\mu$ g/kg，LOD = 0.26 $\mu$ g/kg。在采用质谱检测的同时用紫外检测器（ $\lambda = 484\text{nm}$ ）进行检测（见图5），两者比较后发现，质谱检测器的灵敏度明显优于紫外检测器。

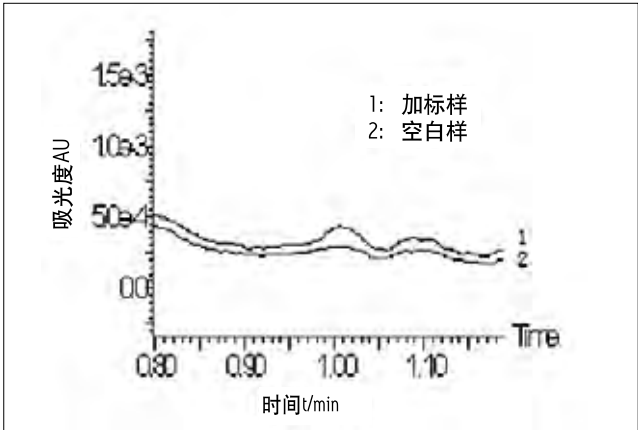


图5：空白与加标样品的紫外吸收图比较图

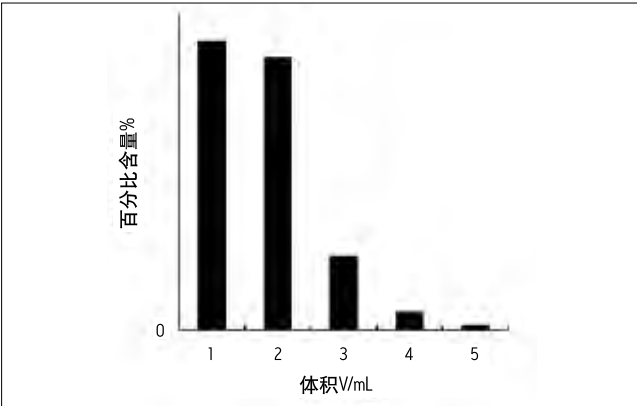


图4：洗脱曲线

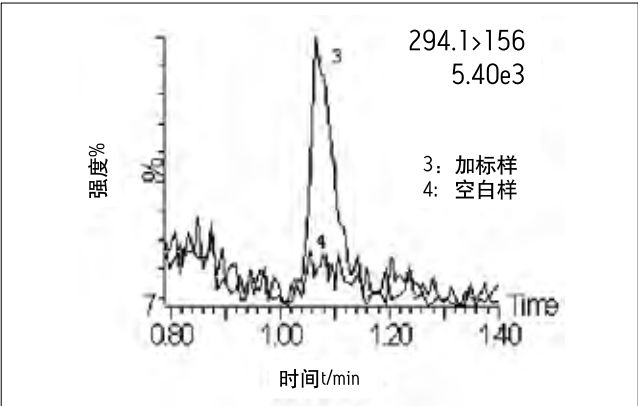


图6：空白与加标样的MRM图比较



2.8 精密度试验

分别取空白的辣椒油、辣椒粉、辣椒酱1g，分别添加1，5，10μg三个不同浓度的对位红标准品，进行加标回收率

试验（n=6），结果见表4。不同类型样品的不同浓度的回收率范围在80.5~109.5%，RSD都小于10%，各类样品的低、中、高浓度的六次重复性均有较好的重现性。

表4 对位红方法精密度及回收率

添加量μg	辣椒粉			辣椒油			辣椒酱		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10
1	84.3	100.2	99.4	94.3	96.9	96.2	92.6	95.1	101.8
2	80.2	106.3	98.6	88.6	100.4	93.9	90.6	97.4	100.8
3	85.8	103.9	96.3	87.1	99.9	96.6	87.7	109.5	99.0
4	87.8	99.3	96.1	83.6	97.3	94.7	93.6	103.8	98.1
5	93.3	105.2	97.5	88.0	99.3	89.9	91.4	100.9	98.9
6	88.5	102.0	98.2	80.5	101.0	83.3	86.5	106.7	96.2
平均回收率%	86.7	102.8	97.7	87.0	99.1	92.4	90.4	102.2	99.1
RSD %	4.37	2.50	1.19	3.15	2.20	7.91	3.41	6.46	2.90

2.9 不同样品的回收率试验

应用本方法对不同类型的样品进行测定，未检出对位红，同时称取1g的对照样品加入5μg的对位红标准品，测得结果如表5所示，检测结果令人满意。

表5 样品测定结果

样品名称	空白	添加量μg/g	测定结果μg/g
咖喱酱	0	5	4.82
牛肉干	0	5	4.76
胡椒粉	0	5	4.59
酱菜	0	5	5.01
食用调和油	0	5	5.04
咖喱粉	0	5	4.89

结 论

本法通过优化样品的前处理条件，极大地降低了杂质对质谱的污染，减少噪音，并采用超高效液相色谱，样液能在5min完成整个色谱分离过程，对位红出峰时间在1min左右，与高效液相色谱相比较整个运行时间缩短了80%，检测效率极大地提高，配合质谱联用，检测限可以达到小于1μg/kg，是一般紫外检测器灵敏度的5~10倍。

参考文献

[1] 于立青，彭蜀晋。食品色素和人体健康[J]。化学教育，2005，6:5

[2] ASTA ANALYTICAL METHODS Method 28.0, Determination of dyes in Capsicum samples and products by High Performance Liquid[S]

[3] 骆和东，贾玉珠，朱宝平，等。凝胶净化液相色谱法同时检测染红食品中对位红和苏丹红染料[J]，理化检验－化学分册，2006，42(6)：86~90。

[4] 温忆敏，汪国权，张慧敏，等。食品中苏丹红系列和对位红的测定方法研究[J]，环境与职业医学，2006，23(2)：27~30

[5] 曹乃斌，梁玉英，欧阳颖瑜。反相高效液相色谱法测定食品中对位红的研究[J]，中国卫生检疫杂志，2005，15(12)：1450~1452

[6] 邓穗兴，郭兴东，郭茂章，等。固相萃取－气质联用测定辣椒油中对位红[J]，广州化工，2006，34(1):59~67

[7] 瑜凌寒，宋之光，牟德海，等。液相色谱－离子阱质谱联用分析食品中的对位红[J]，分析测试学报，2006，25(5)：86~88

[8] GB/T19681-2005 食品中苏丹红染料的检测方法－高效液相色谱法[S]

联系人：宁啸骏 单位：上海市质量监督检验技术研究院食品检验所

地址：上海市苍梧路381号 邮编：200233 电话：021-54263357，13917120748

## 更换2690/2695泵头密封圈

作者: 韦浩  
(沃特世科技(上海)有限公司北京分公司)

Waters® Alliance® 液相系统作为色谱界的行业标准，得到广泛用户推崇使用，数次评为最可靠的HPLC系统。在日常使用中，精心维护将是仪器正常工作的关键。由于在使用LC当中经常变换流动相及使用各种缓冲盐，正确更换泵头密封圈将是保证以其性能稳定的常见措施之一。

### 何时需要更换

- 保留时间不稳定
- 泵头漏液
- 压力波动

### 所需零部件

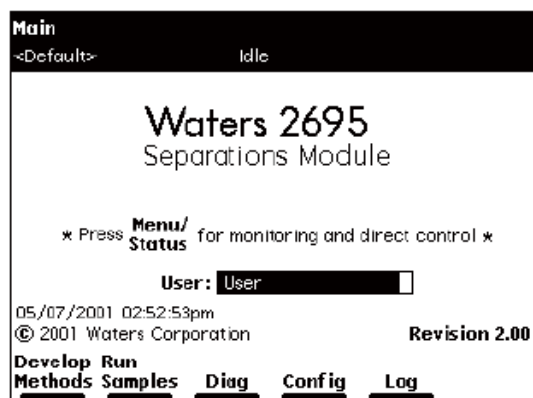
- Head, Plunger Seals Repl. Kit (2/kit), WAT270938
- Head, Face Seals Replacement Kit (4/Kit), WAT270939

工具及试剂

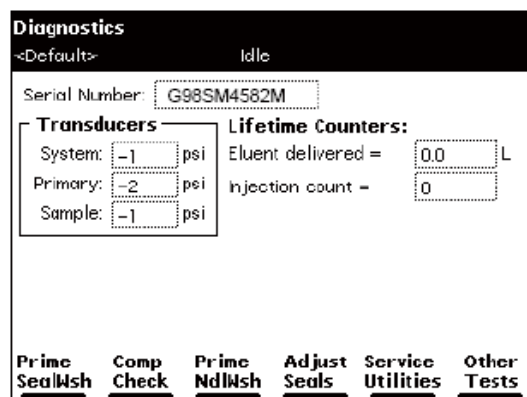
- 色谱甲醇
- 吸湿性软布
- 注射器，30 mL

### 准备

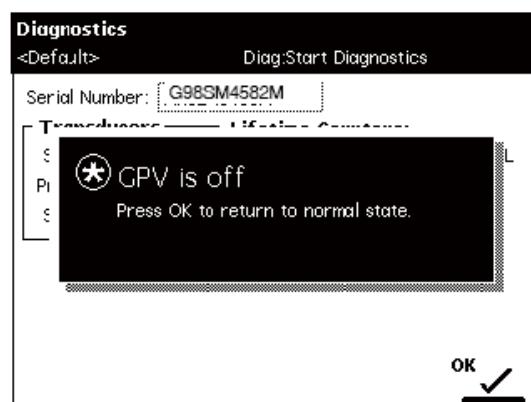
1. 在2690/2695主屏幕，选择 Diag 键。



2. 选择 Other Tests 键，从列表中选择 Turn Off GPV。



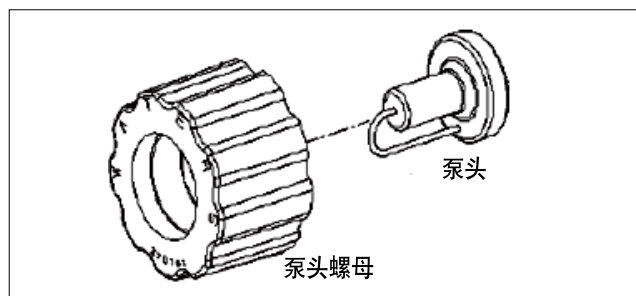
3. 信息框出现，表示比例阀已经关闭。



4. 打开仪器下部溶剂管理系统的门。

### 拆卸泵头

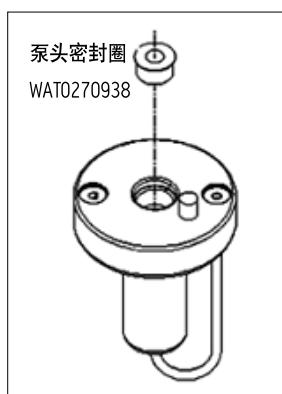
1. 反时针旋转并取下泵头螺母。
2. 拿住泵头向外平移，将泵头从活塞腔中取出。



### 更换泵头密封圈

注意：操作时不要擦伤泵头内表面。

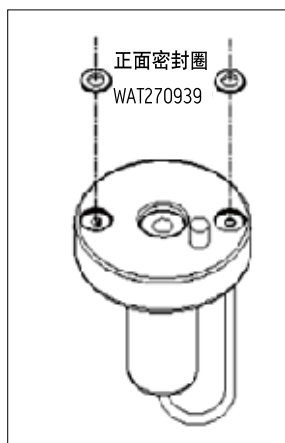
1. 取下旧的泵头密封圈。
2. 必要时清洗泵头。
3. 装入新密封圈，注意密封圈的弹簧面朝向泵头内侧。



### 更换正面密封圈

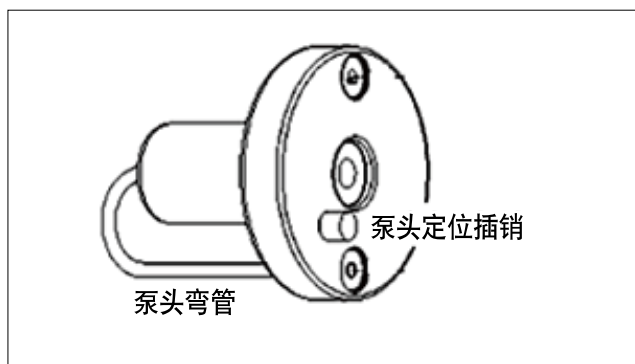
1. 取下旧的正面密封圈。
2. 用甲醇湿润新的密封圈。
3. 将新密封圈放在泵头凹槽处，用平的硬物轻轻挤压使其陷入凹槽内。不要用您的手指或指甲

挤压密封圈，这样难以使其就位，并且可能损坏密封圈。



### 装回泵头

1. 泵头弯管向下，将泵头平直的插入活塞腔中，确认泵头定位插销就位。
2. 顺时针方向旋紧泵头螺母。
3. 按 OK 键打开比例阀。
4. 按 Exit 键退出诊断状态。



### 重新灌注系统

1. 用色谱甲醇，以 Dry Prime 方式重新灌注系统。
2. 灌注完成后，设定流速，检查渗漏，观察压力是否稳定。



## 征稿启事

《液相色谱/质谱通讯》欢迎用户投稿

- 使用沃特世产品（包括UPLC®, HPLC或MS仪器、色谱柱、SPE或其它前处理产品等）的应用报告，使用技巧及成功经验或心得。稿件在3000字以内，以Word文件或A4纸打印稿投稿。
- 刊物一经采用，将酌致作者稿酬。未经录用的稿件，恕不退回，请作者自留底稿。
- 本刊为内部交流刊物，故不影响作者向公开正式出版物继续投稿。
- Word文件请电邮至 [xie\\_ying\\_feng@waters.com](mailto:xie_ying_feng@waters.com)

打印稿投稿请邮寄至上海办事处市场部收（见目录索引页封底）



## 用于制药行业设备清洗验证的高通量UPLC-MS方法

**摘要：**本文重点介绍用UPLC®和快速扫描SQD单重四极杆MS检测器联用开发的一个通用分析方法用于8种原料药的分析，以保证制药生产中必不可少的设备清洗验证过程符合法规要求。我们建立的方法分析时间为1.2分钟、检测限为0.2-4ng/mL，而且可用于检测8种不同的原料药。新开发的UPLC /MS通用分析方法可显著降低QC实验室的运作成本，提高分析效率，并最终提高生产力和制药企业的行业竞争力。

药品生产设备必须采用适合的方法进行清洗，以避免交叉污染。相关法规对不同的API原料药有不同的安全残留标准要求。例如，更高效的药物需要更低的安全残留可接受限度。一般来讲，设备清洗的目的是为了达到法规要求的比较低的药物残留可接受限度（一般为100ppb-1ppm）。这需要灵敏度高的分析技术。

UPLC/UV技术可以在相对较短的时间内（分析时间少于5min）保证设备清洗后的原料药残留低于安全可接受限；同时当UV的检测灵敏度达不到法规要求时，MS是一个非常有力的检测工具。

在采用UPLC技术之前，我们需要采用八个不同的HPLC方法来测定设备清洗后不同药物的残留，切换不同的流动相和色谱柱，耗时很长。而新建立的UPLC /MS方法的分析时间低于2min、而且我们可以用同一个方法来分别检测8种不同的原料药。这完全超越了我们对于UPLC的预期要求。

以下将具体介绍这个方法并对分析结果进行探讨。

### 实验条件

#### UPLC条件

系统：ACQUITY UPLC®，带PDA检测器

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>柱，2.1 × 30mm，1.7μm  
(订货号186003910)

流动相A：10mM 碳酸氢铵，pH 10.0

流动相B：乙腈

梯度表：0.3min内 35-100%B，维持100%B 0.45min，然后重新平衡（整个过程维持1.2min）

流速：0.8mL/min

进样量：2μl

温度：50°C

UV@230nm

采样速度：40Hz，无数字滤波器

样品是某公司提供的药物分子；分子量和稀释溶剂信息见表1

**表1 选择的化合物的分子量和稀释溶剂根据洗脱顺序化合物列于下表**

峰序号	分子量 (g/mol)	稀释溶剂
1	367.1663	水
2	204.0721	甲醇
3	313.0863	DMF
4	244.1212	甲醇
5	379.1696	DMF
6	661.8522	乙腈
7	296.0483	2-丙醇
8	368.2252	乙醇



### 质谱条件:

系统: ACQUITY™ SQ检测器  
 电离模式: ESI+  
 毛细管电压: 3500 V  
 锥孔电压: 30 V  
 解吸气体温度: 500 °C  
 解吸气体流速: 800 L/hr  
 离子源温度: 150 °C  
 扫描范围: 150-750 m/z  
 扫描速度: Full scan -0.06 s scan  
 SIR- 0.005 s dwell

## 结果和讨论

UPLC对8种原料药的分离色谱图见图1。所有化合物全部在梯度表时间内被洗脱出来, SQD质谱检测器确证了对八种不同的化合物的洗脱顺序, 完全不需要单独对每个化合物进样来考察化合物的洗脱顺序。

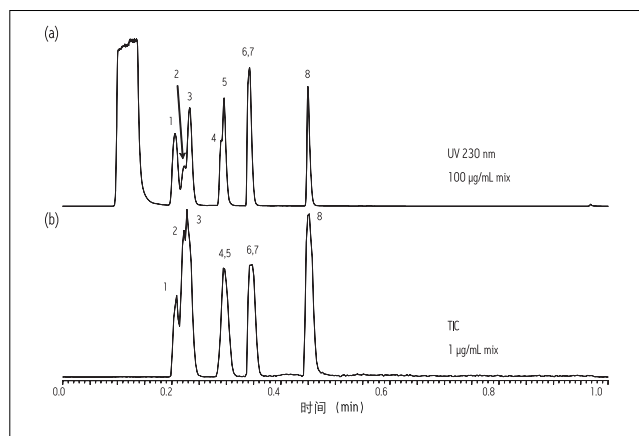


图1: 8种原料药在紫外 (A) 和质谱 (B) 检测器中的分离。UV中最大峰为10%DMF。

我们按照以下方法来考察此方法的重复性: 在两根不同色谱柱上分别重复进样100针, 样品为亲水性强的化合物1 (50 $\mu$ l/ml) 以及疏水性的化合物4和8的混合物 (50 $\mu$ l/ml), 考察100次进样的结果。UV@230nm条件下保留时间和峰面积

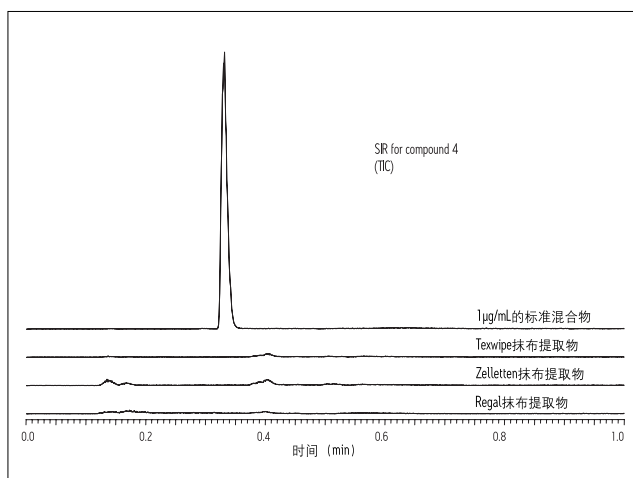


图2: 1 $\mu$ g/mL化合物4的标准品与8种原料药混合物, 以及三种不同抹布中甲醇提取物的SIR图谱

的RSD值分别为0.6%和1.0%。方法线性范围0.05-50 $\mu$ g/ml ( $R^2 = 0.9999-1.000$ )。UV检测限为100-200 ng/ml, 质谱检测限0.2-4 ng/ml。

如果在设备清洗过程中使用的清洗剂或纱布中的干扰物质如果在药物分析过程中被洗脱下来, 将影响定量的准确性和清洗后残留药物的分析结果。我们采用UPLC/MS方法对清洗剂或纱布的干扰物质进行评价。图2显示单离子检测 (SIR) 对1 $\mu$ g/mL化合物4的标准品与8种原料药的混合物, 和用甲醇提取的三种不同厂家的纱布提取物检测。显而易见, 所有测试的纱布中都没有干扰检测的杂质, 使原料药残留的精确检测限达到ng/mL级别。

## 总结

本文建立了一个通用的UPLC/MS分析方法用于对8种原料药的设备清洗验证过程。整个方法时间为1.2分钟, 适合高通量的分析。本应用展示了UPLC/MS在制药行业对于提高QC实验室工作效率以及提高生产力方面的优势。UPLC能够在0.5min内分离大量的化合物, 这能够极大地提高样品通量并同时减少流动相消耗。SQD质谱检测器的使用消除了峰鉴定方面的误差。

# 沃特世科学数据管理系统 (SDMS) 在区域卫生保健实验室的实施

客户：区域制药QA实验室，英国国民健康服务部

## 背景

英国国民健康服务部 (NHS) West Midlands区域制药品质保证 (QA) 实验室，是为地区保健工作者提供有关QA/QC方面建议的机构。它是监督和报告市场上的劣药和在药品生产和管理中使用的特种药和医疗仪器的中心。该实验室为NHS药物合同管理中心的一级和二级管理的售出药品和中草药非法活性成分的筛查工作提供QA支持和评价。同时也对医用管道排风系统和制药行业的洁净室提供测试和认证。

除此之外，该实验室还为伯明翰医学院NHS基金会对未获得许可的无菌室提供类似制药QA/QC的审计服务。

当样品到达实验室后，法规遵从和验证分析师会核对标准操作流程 (SOP) 文件并根据批号记录在书面实验室记录本中。分析师进行必要的法规核对检查后，将样品送至技师手中按SOP要求分析。当所有分析工作完成并输入书面实验室记录本之后，该批药品由验证分析师和负责分析工作的实验室主任签署。结果记录到趋势分析系统中，呈交给放行人员批准。放行人员将数据输入实验室信息管理系统 (LIMS) 并决定该批药品的命运。

## 挑战

制药QA实验室总是有多个书面实验室记录本系统。分析师花大量的时间寻找针对某一种分析的书面记录本。随着地域范围的扩大，样品量的增加，这种物流的矛盾日益加剧，而持续上涨的样品量也预示着未来的趋势。

面对低效的书面记录本系统和不断增加的工作量，这家实验室希望通过实施电子化的解决方案来应对这一挑战。这种方法必须和现在的工作流程一模一样。

## 解决方法

沃特世科学数据管理系统 (SDMS) 为客户提供从纸面到自动实验室流程管理的转换能力，涵盖所有科学信息的整个生命周期，从药物发现，发展，到生产和QA/QC。SDMS为实验室提供了日常分析工具和其它软件（例如微软Excel，Word 或色谱数据软件如沃特世的Empower™ 2 软件）等的无缝界面。

在满足法规遵从要求（包括电子签名和审计追踪）的同时，SDMS可使科学数据采集和存储自动化。

在实施中，SDMS的规模扩大到使用600种不同的模版完成每年2000个分析任务。实施初期的工作主要集中在模版的开发，后来扩大到区域样品模版和实验数据的采集。

SDMS中的模版主要分为三组，原料，成品和特殊样品。该实验室测试约150种原料，150种成品，根据SOP规定为每一种样品分配一个模版。每个分析人员都有属于自己的一个账号，并用这个账号签署每种原料的SOP文件。经签署的SOP以PDF的形式保存在每个原料模版中。Excel表格可以被锁定，仅留下可编辑的部分允许更改。

该实验室还使用原料和成品的趋势分析文件来监测不同样品的整个生命周期。在建立SOP的时候，每种产品都被分配一个代码，并建立趋势分析文件。不同物质在不同时间的分析结果都从分析证书中采集并转入趋势分析文件。趋势分析文件作为一个实验的一部分保存在SDMS中。

## 商业利益

沃特世SDMS的使用已经使得West Midlands区域制药品质保证 (QA) 实验室受益匪浅，分析能力得到了极大提高。对于生产分析工作来说，SDMS开始使用后，分析师每周可以节省半天用于查找数据的时间，以及每周半天时间用于检查、核对和数据录入工作的时间。这意味着分析师可节约出百分之二十的时间从事其他工作。对于区域实验室研究，大约每项研究每月也能节省一天时间。

除了生产效率提高之外，沃特世SDMS的贡献还在于通过自动数据输入模版的使用减少了计算错误，同时通过追踪不符合规格的结果，以及其它一些异常报告，减轻了日益增加的法规压力的负担。

其它SDMS的功能包括整合的信息交流中心和数据浏览功能。整合的信息中心，可以通知客户接下来的工作和相关记录的变化，对于管理分析流程很有帮助。数据浏览功能可使客户通过一个接口就可以查看多种来源的数据，如热电Nicolet的FTIR，热电 Unicam的紫外，沃特世的Alliance® HPLC，安捷伦的HP1100，菲尼根的LC/MS和Totalchrom的GC。



## 沃特世科技（上海）有限公司

地址：上海漕河泾开发区钦州北路  
1198号82号大厦16楼

邮编：200233

电话：021 - 6495 6999

传真：021 - 6495 1999

## 北京分公司

地址：北京市朝阳区八里庄西里98号  
住邦2000商务中心3号楼22层

邮编：100025

电话：010 - 8586 8899

传真：010 - 8586 7099

## 广州分公司

地址：广东省广州市流花路  
中国大酒店商业大厦406 - 407室

邮编：510015

电话：020 - 8626 6678

传真：020 - 8668 6217

## 沃特斯中国有限公司

地址：香港九龙柯士甸道102号901室

电话：852 - 2964 1800

传真：852 - 2549 6802

## 免费售后服务热线：

800 (400) 820 2676

[www.waters.com](http://www.waters.com)

[www.waterschina.com](http://www.waterschina.com)

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



©2007 沃特世公司。中国印刷  
2007年6月 86GN00005CN  
沃特世公司版权所有。