

基于高效液相色谱法的药品中多组分定量检测与快速分析方法优化

蔡 怡*

(阿克苏地区市场监督管理局食品药品安全审查服务中心, 阿克苏 843000)

摘要: 目的 优化高效液相色谱法(HPLC), 实现药品多组分的快速定量检测与分析, 提高检测效率和灵敏度。**方法** 采用水和乙腈(均含0.1%甲酸)为流动相, 使用反相C₁₈柱, 结合梯度洗脱、自动进样及UV-VIS检测器进行分析, 评估线性关系、检测限和分离度。**结果** 优化后的HPLC系统检测限为0.01 mg/mL, 定量限为0.05 mg/mL, 浓度与峰面积线性关系良好($r^2=0.999$), 分析时间缩短至30 min以内, 分离度与灵敏度显著提升。

结论 该方法显著提升了多组分检测的灵敏度和效率, 适用于复杂样品的快速检测, 为药品质量控制和高通量检测提供技术支持。

关键词: 高效液相色谱法; 药品检测; 多组分定量检测; 快速分析

0 引言

高效液相色谱法(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)是一种高分辨率和高灵敏度的分离分析技术, 在医药、化学及生物等领域具有广泛应用。尤其在药品的多组分检测中, 由于药物成分的多样性和复杂性, 对分析的分离效果、灵敏度和效率提出了更高的要求。传统的HPLC分析在满足基本检测需求的同时, 往往在分析速度上有所不足。本文优化HPLC方法, 提高多组分药品检测效率与灵敏度, 建立快速高灵敏度分析方法。优化后显著缩短分析时间, 降低检测限, 适用于复杂药品的大批量分析, 为药品质量控制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样品准备与处理

样品前处理是确保实验结果准确的关键环节, 包括溶剂选择、样品浓度控制和过滤。本实验采用乙腈和甲醇作为溶剂, 具有良好的溶解性能, 确保样品成分完全溶解。通过METTLER TOLEDO XS205电子分析天平称量10 mg目标化合物, 加入10 mL容量瓶, 用少量溶剂溶解后, 用乙腈或甲醇定容至1 mg/mL, 制备样品储备液。为满足多组分分析需求, 采用稀释法配制0.1、0.5、1、5、10 mg/mL浓度梯度, 供

标准曲线绘制及定量分析, 配制溶液经混匀后储存于棕色样品瓶内, 防止光照和降解^[1]。为排除颗粒杂质对色谱柱的影响, 所有溶液使用0.22 μm尼龙微孔滤膜过滤, 过滤过程中严格控制环境洁净, 避免污染。处理后的样品溶液由Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪自动进样器注入系统, 进样体积精确控制为10 μL, 确保准确性和一致性。实验前通过标准工作液绘制标准曲线验证系统灵敏度与线性范围。上述严谨的前处理步骤有效减少杂质干扰, 保护色谱柱, 提升分离效果和检测精度, 为HPLC分析提供可靠的基础。

1.2 HPLC 检测条件

1.2.1 色谱柱选择

在HPLC分析中, 色谱柱的选择直接决定了多组分样品的分离效果。为确保药品中各活性成分的有效分离, 本实验选用了反相C₁₈柱(规格: 250 mm×4.6 mm, 填料粒径为5 μm)。反相C₁₈柱(ODS柱)在药物分析中应用广泛, 因为其疏水性固定相(以十八烷基硅烷为键合基团)可以有效分离中等极性和非极性化合物, 这种特性特别适合含多种活性成分的药品样品^[2]。固定相的疏水性与流动相极性差异产生的相互作用, 使得各成分在柱内的保留时间不同, 从而实现良好的分离效果。此外, 实验将柱温设定为30°C, 确保色谱柱内的流动相和样品成分在较稳定的温度下流动, 降低温度波动对保留时间和峰形的影响。

* 通信作者: 蔡怡, 中级实验师, 研究方向为食品药品安全检验、生产工艺审查评价。E-mail: haoyan202307@163.com

1.2.2 流动相的选择与梯度设置

在 HPLC 分析中，流动相的组成和梯度洗脱程序对多组分样品的分离效果至关重要。本实验选择了水(含 0.1% 甲酸)和乙腈(含 0.1% 甲酸)作为流动相。水作为极性组分，乙腈作为有机相共同组成流动相体系，以平衡分析物的极性和非极性特性^[3]。0.1% 甲酸的加入不仅调节了 pH 值，还抑制了某些化合物的离子化，使峰形更为对称，进而提高了检测的灵敏度和分离效果。为进一步优化多组分的分离，采用了线性梯度洗脱程序。具体梯度程序如表 1 所示。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序

时间(min)	乙腈比例(%)	水比例(%)
0	10.0	90.0
10	30.2	69.8
20	50.5	49.5
30	70.3	29.7
40	90.1	9.9
45	90.1	9.9
46	10.2	89.8
50	10.0	90.0

通过这种反比梯度，程序有效平衡了分离度和峰形质量，避免了峰重叠并提高了检测精度，实现了对多组分样品的高效分离。

1.2.3 检测器参数优化

本实验选用紫外-可见光检测器(UV-VIS)，这是药物分析中常用的检测器类型，具有较高的灵敏度和适应性。检测波长的选择基于药物组分的紫外吸收特性，主要波长设定为 254 nm，同时辅助使用 280 nm，适应不同组分的吸收峰，以确保灵敏度和全面性^[4]。多波长的应用使得检测器能够在一次进样中监测不同活性成分，提升了分析效率和分离效果。此外，为提高数据精度，采样率设为 10 Hz，高采样率能够捕获细节峰形，有助于数据的精细分析。响应时间设定为 0.1 s，保证检测器响应速度适中，从而在灵敏度和信噪比之间取得平衡。

1.3 标准曲线与定量方法

通过配置一系列不同浓度的标准溶液，对每种浓度的样品进行检测，记录峰面积，并绘制浓度与峰面积的标准曲线。标准曲线采用线性回归方法拟合，回归公式为：

$$A = k \cdot C + b$$
 (1)

式中， A 代表峰面积， C 代表样品浓度， k 与 b 代表回归系数。

为进一步提高定量精度，实验中采用了内标法^[5]。内标物选择为不干扰目标成分的咖啡因，内标溶液的配制步骤如下：称取一定量的咖啡因溶解于适量的溶剂中，制备成浓度为 1 mg/mL 的内标储备液，并稀释成工作溶液(浓度为 0.1 mg/mL)^[6]。在样品

和标准溶液中，按照固定比例加入内标工作溶液，以校正因进样量、样品前处理等带来的误差，确保定量结果的准确性。定量公式如下：

$$C_{\text{sample}} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{internal}}} \cdot C_{\text{internal}} \cdot \frac{1}{k}$$
 (2)

式中， A_{sample} 代表目标成分， A_{internal} 代表内标的峰面积， C_{internal} 代表内标的已知浓度， k 代表标准曲线的斜率。通过这种内标校正方法，可以显著减少样品处理和进样中的误差，确保定量结果的可靠性^[6]。

2 结果与分析

2.1 线性关系与检出限、定量限

通过优化 HPLC 参数，实验获得的色谱图显示了各个目标成分的清晰分离，峰形对称且保留时间稳定。这种分离效果源于流动相和梯度的精确控制，确保了多组分样品在色谱柱中的有效分离。具体来说，采用水(含 0.1% 甲酸)与乙腈(含 0.1% 甲酸)作为流动相，以 10% 乙腈开始逐步增加至 90%，使得极性较大的成分在初始阶段被洗脱，而疏水性成分在高比例有机相下被分离，从而保证了不同组分的良好峰形。柱温设置为 30°C，检测器采样率为 10 Hz，响应时间为 0.1 s，这些参数的稳定控制进一步提升了分离过程的稳定性。为了验证定量能力，对浓度为 0.1、0.5、1、5、10 mg/mL 的标准样品进行了标准曲线绘制。见图 1 所示。

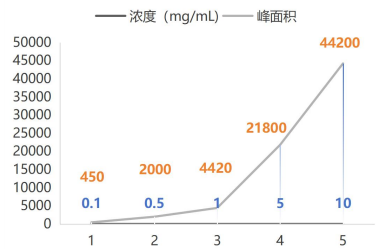


图 1 标准曲线数据

实验数据表明，标准曲线的相关系数 r^2 为 0.999，浓度与峰面积之间呈现出高度线性关系。对于低浓度成分，检出限(LOD)达到了 0.01 mg/mL，定量限(LOQ)为 0.05 mg/mL。这些结果表明，优化后的 HPLC 系统在低浓度检测中具备了优越的灵敏度，能够满足多组分样品中微量成分的定量需求。

2.2 多组分检测的精确性与灵敏度分析

本实验在多组分检测中表现出极高的精确性与灵敏度，相关数据见表 2。

系统在多次进样过程中具有良好的重现性和一致性，通过高斯拟合分峰算法有效避免了重叠峰对峰面积计算的干扰，确保了低浓度样品的检测精度。随着样品浓度的增加(从 0.1 mg/mL 到 5 mg/mL)，峰面积呈现良好的线性增长趋势，表明方法具有优异的线性响应特性。峰面积 RSD 值随浓度

增加呈现下降趋势(从 1.25% 降至 0.98%),说明在高浓度范围内方法具有更好的精密度。特别是在低浓度(0.1 mg/mL)条件下,RSD 仍保持在 1.25% 的较低水平,体现了方法在低浓度检测中的稳定性。方法的检出限为 0.01 mg/mL,定量限为 0.05 mg/mL,验证了优化方法在低浓度检测下的稳定性和灵敏度。为验证方法的准确性,进行了加标回收率实验。分别在浓度为 0.1、1、5 mg/mL 的样品中添加已知量的目标物质,回收率均在 95.2%~102.8% 之间。加标样品的 RSD 均小于 1.5%,进一步证明了方法的准确性和良好的重复性。这些数据表明,该方法在不同浓度范围内都具有可靠的定量能力,满足药品多组分检测的质量控制要求。

表 2 多组分样品检测的精确性与灵敏度

样品浓度 (mg/mL)	峰面积均值	峰面积 RSD(%)	检出限 (mg/mL)	定量限 (mg/mL)
0.1	2456.78	1.25	0.01	0.05
1	9876.45	1.03	—	—
5	24589.32	0.98	—	—

2.3 快速分析性能评价

通过流动相梯度控制、检测器响应时间和采样率的优化,分析时间从传统方法的约 40 min 缩短至 30 min 以内,节省了超过 20% 的时间。这种显著的时间优化源于精确控制流动相梯度程序,实现了各组分的快速分离,避免了传统等度洗脱方法中容易出现的拖尾现象^[7]。优化后的检测器响应时间设置为 0.1 s,配合 10 Hz 的采样率,在保证数据采集质量的同时提高了分析速度。在保证分离度和灵敏度的前提下,分析时间的缩短大幅提高了检测效率。该快速分析性能的提升得益于检测限的进一步降低(至 0.01 mg/mL),即使在较短分析时间内,系统仍然能够检测到低浓度成分,确保数据的可靠性。检测器响应时间的优化设置(0.1 s)有助于快速捕捉目标成分的峰形,同时有效避免峰宽的显著增大,保证了色谱图的分辨率和峰形质量^[8]。对于复杂样品,这种快速分析方法在实际应用中表现突出:提高了实验室的样品检测通量,显著提升工作效率;保证了多组分样品的高分辨率分离,满足复杂基质中目标物的准确定量需求;降低了分析成本,减少了流动相的消耗。这些特点使该方法特别适合于制药企业质量控制实验室和药品检验机构的日常检测工作,为大批量、多组分样品的快速分析提供了可靠的技术支持^[9]。

3 讨论与结论

本研究通过对高效液相色谱法的关键参数进行系统优化,

成功建立了一种快速、高灵敏度的药品多组分定量检测方法。实验结果表明,该方法检出限达到 0.01 mg/mL,定量限为 0.05 mg/mL,线性关系良好($r^2=0.999$)。通过内标法结合优化的检测器参数设置,显著提高了分析的准确度和精密度,加标回收率在 95.2%~102.8% 之间^[10]。系统优化后分析时间缩短至 30 min 以内,较传统方法提升效率超过 20%,同时保持了良好的分离度和灵敏度。

该方法的建立为药品质量监管提供了可靠的技术支持。展望未来,可通过探索新型色谱柱材料提高分离效率,研究智能化数据处理算法提升分析准确度,并扩展检测范围至更多类型的药品。结合人工智能等新技术,有望实现更快速、更准确的药品质量检测,为药品安全保驾护航。

参考文献

[1] 陈艳.高效液相色谱法快速检测食品中 12 种添加剂[J].食品安全导刊,2024,(09):59-62.

[2] 杨杰.农产品质量安全检测中高效液相色谱法的应用分析[J].中文科技期刊数据库(全文版)农业科学,2024,(06):0167-0170.

[3] 师保炜,吴艳阳,武斌,等.高效液相色谱法检测葡萄糖酸- δ -内酯[J].化学工程,2024,52(06):1-5,32.

[4] 张宁,叶巧燕,郑百芹,等.高效液相色谱法检测奶及奶制品中未变性乳铁蛋白[J].食品安全质量检测学报,2024,15(15):20-28.

[5] 伏广想,张婷,彭俞霖,等.电膜萃取/高效液相色谱法检测生物样品中 3 种喹诺酮类抗生素[J].分析测试学报,2024,43(09):1467-1473.

[6] 王晔,谢剑晨,黄灵洁,等.三相中空纤维-液相微萃取-高效液相色谱法快速测定烟用香精中 9 种防腐剂[J].色谱,2024,42(08):749-757.

[7] 武传香,魏莉莉,薛霞,等.固相萃取-高效液相色谱法检测食品中酸性大红 GR[J].中国食品添加剂,2024,35(03):246-253.

[8] 赵昕,张静,李东辉,等.高效液相色谱法同时检测水果加工品中 18 种食品添加剂[J].食品安全质量检测学报,2024,15(20):297-306.

[9] 郭新颖,陈峰.高效液相色谱法测定川贝母和川贝粉中三嗪代谢物残留[J].食品安全质量检测学报,2024,15(11):189-194.

[10] 王丁林,周耀斌,付昕媛.高效液相色谱法测定化妆品中海藻糖的含量[J].香料香精化妆品,2024,(03):191-194.