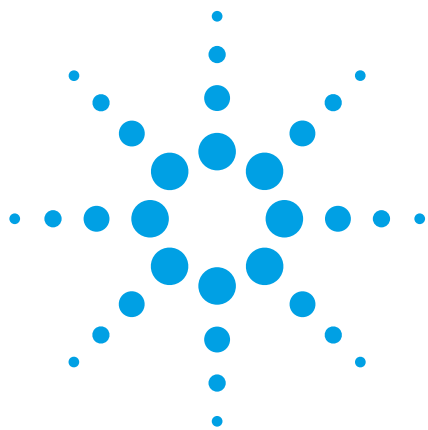




在 USP 限度内运行快速液相色谱

以 USP 普伐他汀钠色谱纯度为例, 研究 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱系统的应用

应用报告

生产 QA/QC

作者

Syed Lateef
Agilent Technologies
Bangalore, India

摘要

美国药典 (USP) 最新修订版的通则 <621> 允许对正文中的色谱条件进行调整, 以提高色谱分离质量, 满足系统适应性的要求。利用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统和安捷伦方法翻译软件, 能够通过调整色谱条件得到一种快速的分析方法。得到快速分离方法的途径有很多, 其中之一就是在既有方法 (如 USP 方法) 的基础上进行调整。

本文阐述了如何从 USP 方法开始, 结合所允许的色谱条件调整, 获得满足系统适应性要求的快速方法。USP 的普伐他汀色谱纯度检查方法中, 建议采用粒径为 $3.5\ \mu\text{m}$ 的色谱柱, 以 $1\ \text{mL/min}$ 流速进行 30 分钟的梯度洗脱。这些色谱条件可以调整为使用粒径 $1.8\ \mu\text{m}$ 的色谱柱和 $1.5\ \text{mL/min}$ 流速, 这样可以得到更快的运行速度。除了粒径和流速, 为提高运行速度, 还可以改变色谱柱尺寸和柱温。使用安捷伦方法翻译软件, 能够快速并且有效地将分析方法转换为快速方法。这种从 USP 方法调整得到的快速方法适用于高通量的分析环境, 因为新方法最接近经过验证的药典方法。



Agilent Technologies

引言

普伐他汀钠有助于降低胆固醇的合成，从而预防心血管疾病。USP 的色谱纯度检查方法中，推荐使用 3.5 μm 粒径的 4.6 mm $\times$ 75 mm L1 色谱柱以及 1 mL/min 流速。然而，根据修订后的通则<621>，USP 允许对色谱参数进行调整，但是仅限于“通过调整能够提高色谱分离质量，以满足系统适应性的要求”¹。本文中，我们在 USP 允许范围内对方法进行了调整，加快了分析速度，并且对系统适应性参数进行了检测。以任何 HPLC 方法作为起始方法，选择内径和填料颗粒较小的色谱柱，并确定需要调整哪些参数，就可能获得更快速的方法。通过升高柱温、加快流速，从而缩短梯度洗脱的时间，能够进一步提高速度²。快速液相色谱方法由于减少了溶剂的消耗，具有节省成本的优点，并且能够提高高通量样品的分析效率。

表 1 显示了允许调整的色谱参数及其在普伐他汀方法中的应用。

按照修订后的通则<621>，也可以对流动相 pH 值、缓冲液中盐的浓度、流动相中各组分的比例以及波长进行调整，但在本实验中未涉及这些方面的调整。

USP 收录的普伐他汀钠有以下六种杂质：

1. 3'-羟基普伐他汀
2. 6'-表普伐他汀
3. 3 α -羟基异美伐他汀（又称相关物质 A 或 RCA）
4. 戊酰基杂质

允许进行的调整	原有的普伐他汀色谱方法	允许调整的限度范围	快速梯度洗脱条件
色谱柱长度 ($\pm$ 70%)	75 mm	22.5–127.5 mm	30 mm
色谱柱内径 ($\pm$ 25%)	4.6 mm	3.45–5.75 mm	4.6 mm
粒径 ($\pm$ 50%)	3.5 μm	1.75 μm	1.8 μm
流速 ($\pm$ 50%)	1.0 mL/min	0.5–1.5 mL/min	1.5 mL/min
进样量（减小至恒定）	10 μL	变量	4.0 μL *
柱温 ($\pm$ 10 $^{\circ}\text{C}$)	未指定	变量	35 $^{\circ}\text{C}$

* 由安捷伦方法翻译软件获得的值

表 1.
USP 普伐他汀色谱纯度方法中允许调整的参数

5. 普伐他汀内酯

6. 美伐他汀

在安捷伦高分离度快速液相色谱系统中验证杂质检查快速方法时，仅用到杂质 2、3、5、6。

实验部分

样品制备

- **稀释剂：**甲醇与水 1:1 混合而成。甲醇为 HPLC 级 (J.T. Baker)。实验用水通过 Millipore 的 Milli-Q 制得
- **相对保留时间 (RRT) 试验样品：**取普伐他汀钠及其四种杂质 (6'-表普伐他汀、相关物质 A、普伐他汀内酯和美伐他汀)，以稀释剂溶解并制成普伐他汀浓度为 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且杂质浓度为 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。相对保留时间试验样品用于测定每种杂质的相对保留时间，与 USP 给定的相对保留时间值进行比较。普伐他汀内酯和美伐他汀来自 VARDA

Biotech(Mumbai, India)，相关物质 A 来自 USP，6'-表普伐他汀来自欧洲药典 (EP)

- **系统适应性样品：**按 USP 规定，取普伐他汀 1,1,3,3-四甲基丁胺 (普伐他汀-TMBA) 和相关物质 A，以稀释剂溶解并制成浓度分别为 0.6mg/mL 和 0.001mg/mL 的溶液。系统适应性样品用于测定相关物质 A 对普伐他汀的相对保留时间以及二者之间的分离度。普伐他汀-TMBA 和相关物质 A 均来自 USP
- **标准样品溶液：**普伐他汀-TMBA 以稀释剂溶解并制成浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。标准样品溶液用于测定峰面积的相对标准偏差 (RSD)
- **线性试验样品：**在浓度恒定为 0.5 mg/mL 的普伐他汀钠样品中加入不同量的相关物质 A，制成 6 种浓度水平的溶液，相关物质 A 的浓度范围为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

仪器

Agilent 1200 系列高分离度快速系统包括：

- Agilent 1200 系列双泵，带脱气机
- 带温控装置的 Agilent 1200 系列 SL 型自动进样器和 Agilent 1200 系列 SL Plus 自动进样器，两款进样器可在同一 LC 系统上进行互换
- Agilent 1200 系列二极管阵列检测器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 RRLC 模式：双泵设置为低延迟体积（在流路中不经过混合器和阻尼器），在进样阀之间使用了内径为 0.12 mm 的低延迟体积毛细管。在自动进样器的设置中选择降低延迟体积没有给色谱峰的洗脱带来多大的变化。各模块分两部分堆栈，泵与脱气机和其它模块分离，同前所述，可减小延迟体积³
- HPLC 模式：未对双泵进行延迟体积设置，在所有各点都采用标准绿色管路（0.17 mm）。模块堆栈方式与 RRLC 模式相同
- Agilent 方法翻译软件，2.0 版

参数		详细说明	
DAD 检测波长		238 nm 谱带宽度 (BW) 4, 参比波长 300, 20	
色谱柱		USP 方法：Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 75 mm, 3.5 µm 快速方法：Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 30 mm, 1.8 µm	
稀释剂：		甲醇-水 (50:50)	
注射针清洗		用稀释剂冲洗 3 秒	
样品温度		15 °C	
流动相		pH 7.0 缓冲液：0.08 M 磷酸溶液，以三乙胺调节至 pH7.0 流动相 A：水- pH 7.0 缓冲液-乙腈 (52:30:18) 流动相 B：水- pH 7.0 缓冲液-乙腈 (10:30:60)	
USP 方法		时间	缓冲液 B%
流速	1.0 mL/min	0	0
运行后时间	3.0 min	3.0	0
柱温	25 °C	26.5	100
进样量	10 µL	26.6	0
响应时间	2 sec	30	0
快速方法		时间	缓冲液 B%
流速	1.5 mL/min	0	0
运行后时间	0.8 min	0.8	0
柱温	35 °C	7.07	100
进样量	4.0	7.09	0
响应时间	1 sec	8.0	0

结果与讨论

快速方法中杂质相对于普伐他汀的相对保留时间

使用安捷伦方法翻译软件将 USP 色谱方法转变为快速方法，软件输出的方法未经任何改动即投入应用。将预期的流速输入

翻译软件，即能计算出相应的梯度条件。应用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统的优点在于它可以在 HPLC 和 RRLC 两种模式间互相转换。本文中，HPLC 模式用于运行传统的 USP 方法，RRLC 模式用于运行快速方法。

使用 HPLC 和 RRLC 模式分别对相对保留时间样品进行了检测，该样品中包含普伐他汀和四种杂质的混合物。图 1 显示了两种模式下相对保留时间样品的色谱图。高分离度快速液相色谱图显示，与传统方法相类似，所有四个杂质均得到了完全分离。

相对保留时间试验样品用于计算各组分的相对保留时间，并与 USP 的给定值进行比较。表 2 显示了实测值与 USP 给定值的对比，二者非常一致。结果显示，USP 给定的相对保留时间值与快速方法所得实测值几乎相同。

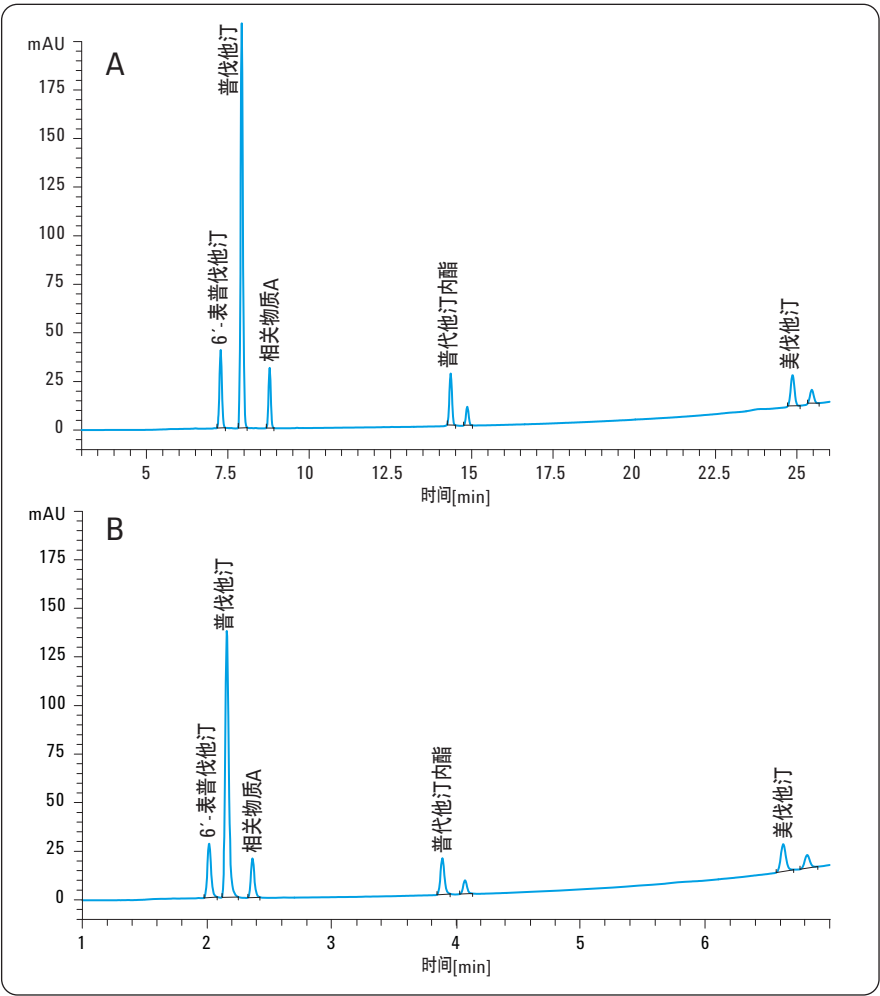


图 1
A) 运行 USP 方法得到的普伐他汀色谱图
B) 由安捷伦方法翻译软件得到的普伐他汀快速方法

名称	USP 给定的相对保留时间值	USP 方法实测值 (4.6 mm × 75 mm, 3.5 μm 色谱柱)	快速方法实测值 (4.6 mm × 30 mm, 1.8 μm 色谱柱)
3"-羟基普伐他汀	0.33	—*	—*
6'-表普伐他汀	0.92	0.92	0.94
3α-羟基异美伐他汀	1.1	1.1	1.1
戊酰基杂质	1.2	—*	—*
普伐他汀内酯	1.8	1.8	1.8
美伐他汀	3.1	3.1	3.2

* 本实验中未包含的杂质

表 2
USP 方法给定的 6 个杂质其中 4 个的相对保留时间值以及用 USP 方法和快速方法得到的实测值

使用 SL plus 自动进样器进行快速分析的系统适应性

按照 USP 的规定，系统适应性混合溶液中包含限定浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的普伐他汀-TMBA 和相关物质 A，普伐他汀-TMBA 和相关物质 A 的分离度应不低于 2.0，且相关物质 A 的相对保留时间约为 1.1。图 2 为用快速方法三次重复进样分析系统适应性样品的叠加色谱图。结果显示，相关物质 A 的相对保留时间约为 1.1，且分离度为 3.8，符合系统适应性要求。

低浓度下普伐他汀色谱峰面积的标准偏差

取含有 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 普伐他汀-TMBA 的标准样品重复进样六次，测得普伐他汀色谱峰面积的相对标准偏差（RSD）。按照 USP 方法的规定，标准样品六次重复进样所得峰面积的 RSD 应不超过 10.0%。本文中 RSD 为 1.0%，符合精密度要求。

快速分析普伐他汀钠溶液中标杂质的线性

USP 方法规定相关物质 A 的检测限上限为 0.2%，按照普伐他汀钠溶液浓度为 0.5 mg/mL 计算，即为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。为测试检测器的响应和进样器的精度，在 0.5 mg/mL 的普伐他汀钠溶液中加入 0.25 $\mu\text{g/mL}$ -1.1 $\mu\text{g/mL}$ 的相关物质 A。表 3 显示了不同浓度加标溶液的信噪比（S/N）。

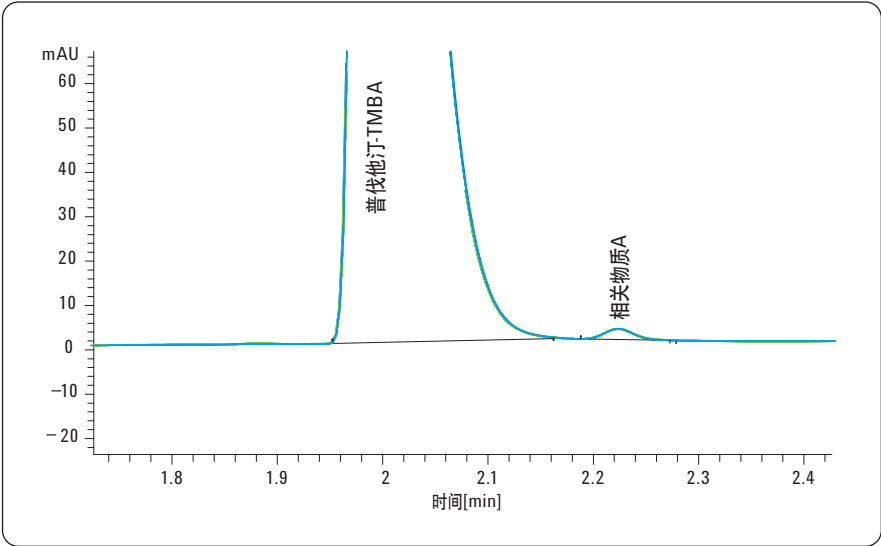


图 2
系统适应性样品的三次重复进样叠加色谱图

浓度水平	相关物质 A 浓度 $\mu\text{g/mL}$ (杂质%)	信噪比
1	0.25 (0.05)	11.8
2	0.5 (0.10)	25.0
3	0.7 (0.14)	32.3
4	0.9 (0.18)	34.9
5	1.0 (0.20)	38.6
6	1.1 (0.22)	43.3

表 3
相关物质 A 加入量在限定浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 上下

加标浓度 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ，即相当于 0.05 %，为快速液相色谱方法的定量限 (LOQ)。图 3 显示各种进样量的色谱叠加图。不同浓度水平加标样品的响应值均随着进样量的增加而相应增大。不同进样量的线性曲线见图 4，其线性相关系数 (R^2) 为 0.998。

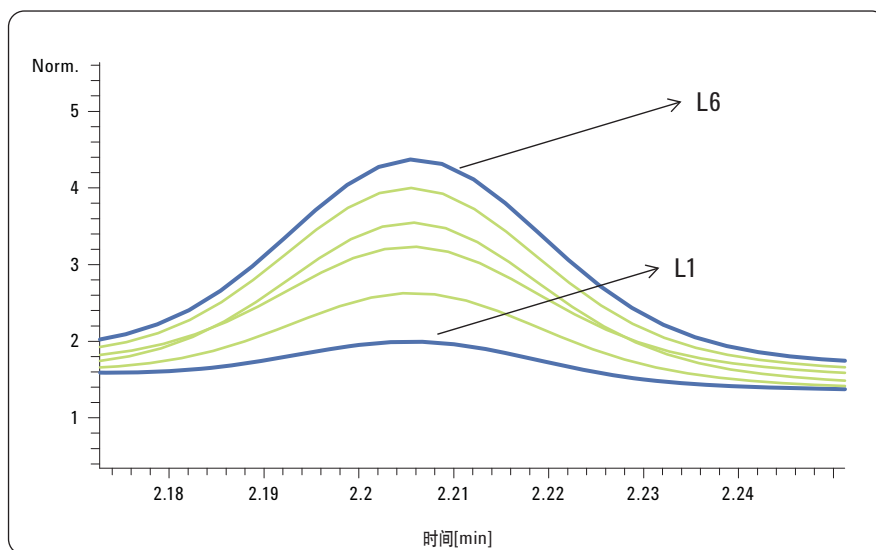


图 3
加标浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (L1)-1.1 $\mu\text{g/mL}$ (L6) 的相关物质 A 的线性曲线

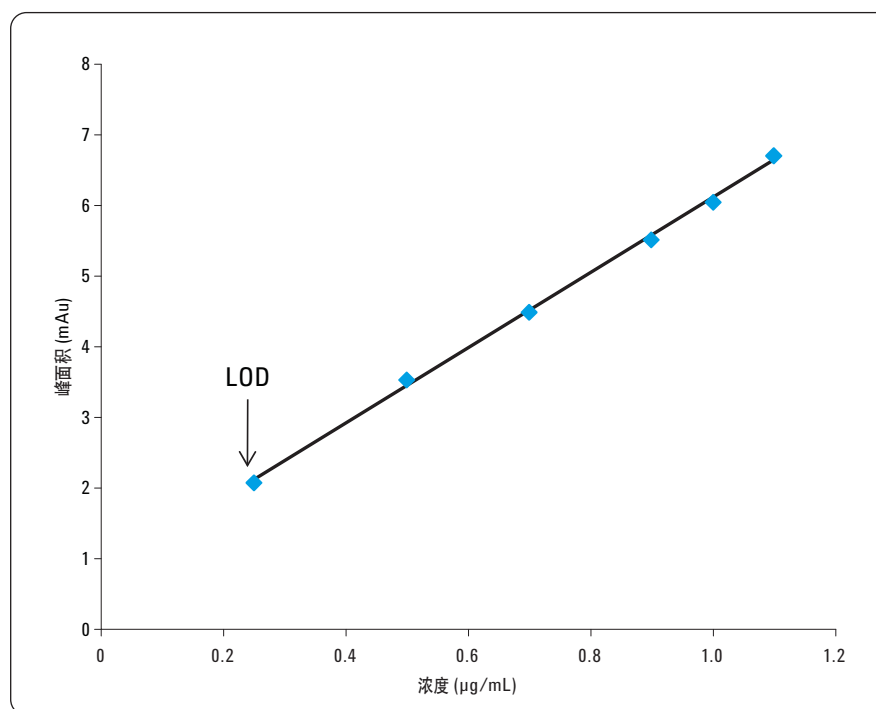


图 4
相关物质 A 的线性曲线表明浓度水平 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 最接近检测限 (LOD)

结论

如果运行时间的缩短不损害色谱分离性能，则验证分析方法可以缩短时间消耗。快速运行有助于在日常质量保证/质量控制工作中节约成本。从原来耗时 30 分钟的 USP 普伐他汀色谱纯度方法得到的快速普伐他汀色谱法仅耗时 8 分钟。这种快速方法仅仅在最新修订的 USP 允许范围内调整了色谱参数。通过安捷伦方法翻译软件获得了新的梯度条件，并且不经任何改动直接用于检测。新的快速方法符合所有的系统适应性要求。相关物质 A 与普伐他汀的分离度为 3.8，超出了“不低于 2.0”的限度规定。以标准溶液进行的精密度试验结果为 RSD 1.0%，低于 10%的可接受限度。快速方法的检测器线性试验得到的 R^2 值为 0.998。在 USP 规定范围内修改色谱参数所得的快速方法表明，每个样品的分析成本能够降低三倍以上。

参考文献

1. *U.S. Pharmacopeia 31-NF 26*, second supplement, **2008**
2. M. Frank, "Achieving Faster Analysis with the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System and 2.1 mm ID Columns," Agilent Application Note, Publication number 5989-4502EN, **2006**
3. M. Woodman, "Improving the Effectiveness of Method Translation for Fast and High Resolution Separations," Agilent Application Note, Publication number 5989-5177EN, **2006**

www.agilent.com/chem/cn

© 安捷伦科技公司版权所有，2009 年
2009 年 2 月 1 日印刷
出版号 5990-3528CHCN



Agilent Technologies