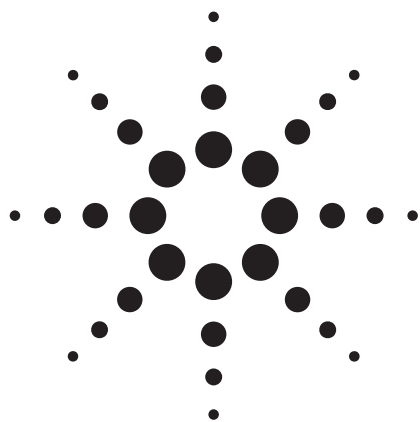




使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分析萘普生：无需头疼的方法 调节

应用报告

制药

作者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809-1610
USA

摘要

使用 Eclipse Plus C18 色谱柱和 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 USP 方法进行萘普生的分析。当使用 4.6 x 50 mm Poroshell 120 EC-C18 色谱柱时，通过调整方法可使分析时间减少到原来的 22%，且不用重新验证。



Agilent Technologies

前言

药物测试的成本不可忽视，许多实验室管理者都在寻找不同的方法来降低开支，如果实验室依旧使用液相色谱，则使用减少溶剂用量和提高效率的方法。

广泛使用美国药典 (USP) 方法测试药物产品和原料。然而，USP 中并不是所有的方法都采用更先进的技术，可能耗费比需要更长的时间。根据 USP <621> 章中的建议，可以对这些方法做一些调整。这种方法中可调节的范围包括：色谱柱长度，色谱柱材料，填料尺寸以及进样量。其他在 USP 可调节的参数中没有一个可以提高方法的通量。除此之外的改变则需要进行方法的重新验证。

萘普生是一类非甾体的消炎药 (NSAID)，可以作为通用药。USP 中萘普生的分析方法采用一根 L1 (C18)，5 μm 色谱柱。萘普生的结构见图 1 所示。

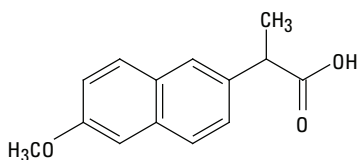


图 1. 萘普生的结构

安捷伦 Poroshell 120 色谱柱是一种液相色谱柱的选择，在典型的液相色谱仪上它可以提供更高的性能。由 2.7 μm 表面多孔的填料填充，在现有的液相色谱仪上较短的色谱柱可以提供更快的分析速度及更高的分离度，并能在较短的时间内检测更多样品。这些色谱柱可提供 C18 键合相，这是一种典型的 L1 材料。图1所示是使用一根 4.6 mm $\times$ 150 mm，5 μm L1 或 C18 色谱柱开始运行该方法的谱图。条件不变，分别使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm $\times$ 100 mm，2.7 μm 色谱柱和安捷伦 Poroshell 4.6 mm $\times$ 50 mm，2.7 μm 色谱柱进行比较。

实验部分

- 安捷伦 1200 系列 SL 型二元泵，流动相 A：乙腈：水：冰醋酸 (500:490:10)；流速 1.2 mL/min，某些实验中流速可增加到 2.2 mL/min (G1312B)
- 安捷伦 1200 系列 SL 型自动液相进样器 (ALS)，150 mm 色谱柱进样量 20 μL ，100 mm 色谱柱进样量 13.34 μL ，50 mm 色谱柱进样量 6.67 μL (G1376C)
- 安捷伦 1200 系列 SL 型柱温箱 (TCC)，温度 25 $^{\circ}\text{C}$ (G1316B)
- 安捷伦 1200 系列 SL 型二级阵列检测器 (DAD)，波长 254，4 nm，配置 G1315-60024 μm 微量流通池 (5 mm 光程，体积 6 μL) (G1316C)

安捷伦 ZORBAX 色谱柱:

- 安捷伦 Eclipse Plus C18，4.6 mm $\times$ 150 mm，5 μm 色谱柱部件号 959993-902
- 安捷伦 Eclipse Plus C18，4.6 mm $\times$ 100 mm，3.5 μm 色谱柱部件号 959961-902
- 安捷伦 Poroshell 120 EC-C18，4.6 mm $\times$ 100 mm，2.7 μm 色谱柱部件号 695975-902
- 安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm $\times$ 50 mm，2.7 μm 色谱柱部件号 699975-902

乙腈是 Burdick&Jackson ACS/HPLC 级溶剂，购自 Honeywell 公司。冰醋酸购自 VWR 公司，ACS/USP 级别。水是用 Millipore 制得 (Milli-Q 系统，18 M Ω 电阻，0.2 μm 过滤) 的超纯水。USP 萘普生购自美国药典。苯丁酮购自 Sigma-Aldrich 公司。根据 USP 进行样品和流动相的制备。[1]

流动相的配制

将乙腈，水和冰醋酸 (500 mL: 490 mL: 10 mL) 混合制得流动相。[1]

样品制备

样品和内标混合物都溶于乙腈/水 (90:10) 混合物。5 mL 苯丁酮用乙腈稀释至 100 mL 即制得内标。取上述溶液 1 mL 用乙腈稀释至 100 mL 得到最终溶液。每毫升溶液中含有大概 0.5 μL 苯丁酮。

USP 标样或 USP 萘普生标样是将准确称量的标样溶于混合溶剂中进行制备的，得到标样溶液浓度大约为 2.5 mg / mL。将 1.0 mL 上述溶液和 2.0 mL 内标溶液混合定容至 100 mL。此时溶液中每毫升含有大概 25 µg USP 萘普生标样。[1]

USP 方法的色谱和性能要求如下。[1]

- 4.6 mm × 150 mm 色谱柱, L1 色谱柱 (C18)
- 分析物理论塔板数不小于 4000
- 分析物和内标峰之间的分离度不小于 11.5

从图 2 中可以看出，USP 方法中色谱和性能要求都很容易达到。在使用 USP 方法分析的一天中，每 9 分钟可以进行一次分析。一个小时可进行 6-7 次分析，或一天大概 160 次进样。使用 150 mm, 5 µm 色谱柱一个星期可以实现 1120 次分析。这样的通量在许多应用中都是足够的。通过调整方法可以实现更高的通量。USP 更新的 <621> 章给出了一些关于具体的调整变化。[2]

- 色谱柱长度 ± 70%
- 色谱柱内径 ± 25%
- 色谱柱填料尺寸：最多降低 50%, 不增加
- 流速 ± 50%
- 进样量改变要求满足系统适用性测试 (SST) 标准
- 色谱柱温度 ± 10%
- 流动相 pH ± 0.2
- UV 波长：不超过生产商的指标
- 缓冲液中盐浓度 ± 10%

这些范围之外的调整被认为是改变，需要对方法进行重新评估。如果分析者选择使用较短的色谱柱，比如图 2 中所示一根 4.6 mm × 100 mm, 3.5 µm 色谱柱，要实现同样的分离只需要原来 67% 的时间 (大概每个样品 6 分钟)。该方法也能很容易的应用于安捷伦 Poroshell EC-C18 4.6 mm × 100 mm, 2.7 µm 色谱柱或安捷伦 Poroshell EC-C18 4.6 mm × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱。50 mm 色谱柱仍然属于允许调整的范围，并很容易使分析时间缩短 33%。

使用安捷伦 Poroshell 120 色谱柱或其他小体积的色谱柱时，为了实现最佳性能需要优化检测器采集速度并减少额外的色谱柱体积。通常采用的数据采集速率是 40 Hz [3]。为了避免色谱柱过载，色谱柱体积减小，进样量也需要比例减少。也就是说，150 mm 色谱柱进样量 20 µL 时，100 mm 色谱柱进样量等于 20 × (100/150) 即 13.67 µL，50 mm 色谱柱进样量等于 20 × (50/150) 即 6.67 µL。

将 5 µm L1 色谱柱换成任何一种表面多孔 2.7 µm C18 色谱柱时，该方法的性能将超出性能要求。使用 100 mm 色谱柱分析比原方法快 2 倍，使用 50 mm 色谱柱分析比原方法快 4.5 倍。选择任何一种都可提高效率。

允许的调整之一是流速改变 ± 50%。在目前的条件下，流速可以增加至 1.8 mL/min。现在要讨论的是色谱柱的线速度和填料粒径保持不变的情况下，允许流速增加将近 100% (达到 2.4 mL/min) 而不用重新评估。[4] 这些改变将会进一步增加通量。

图 3 显示在使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm × 100 mm 色谱柱增加流速的结果。在这种情况下，流量由 1.2 mL/min 增加到 2 mL/min，超过了柱效和分离度要求，而压力仍低于 400 bar。在 2.2 mL/min 流量下，柱效和分离度仍然满足要求，但是压力稍高于 400 bar 的上限。

方法要求 $N > 4000$, R_s 高于 11.5

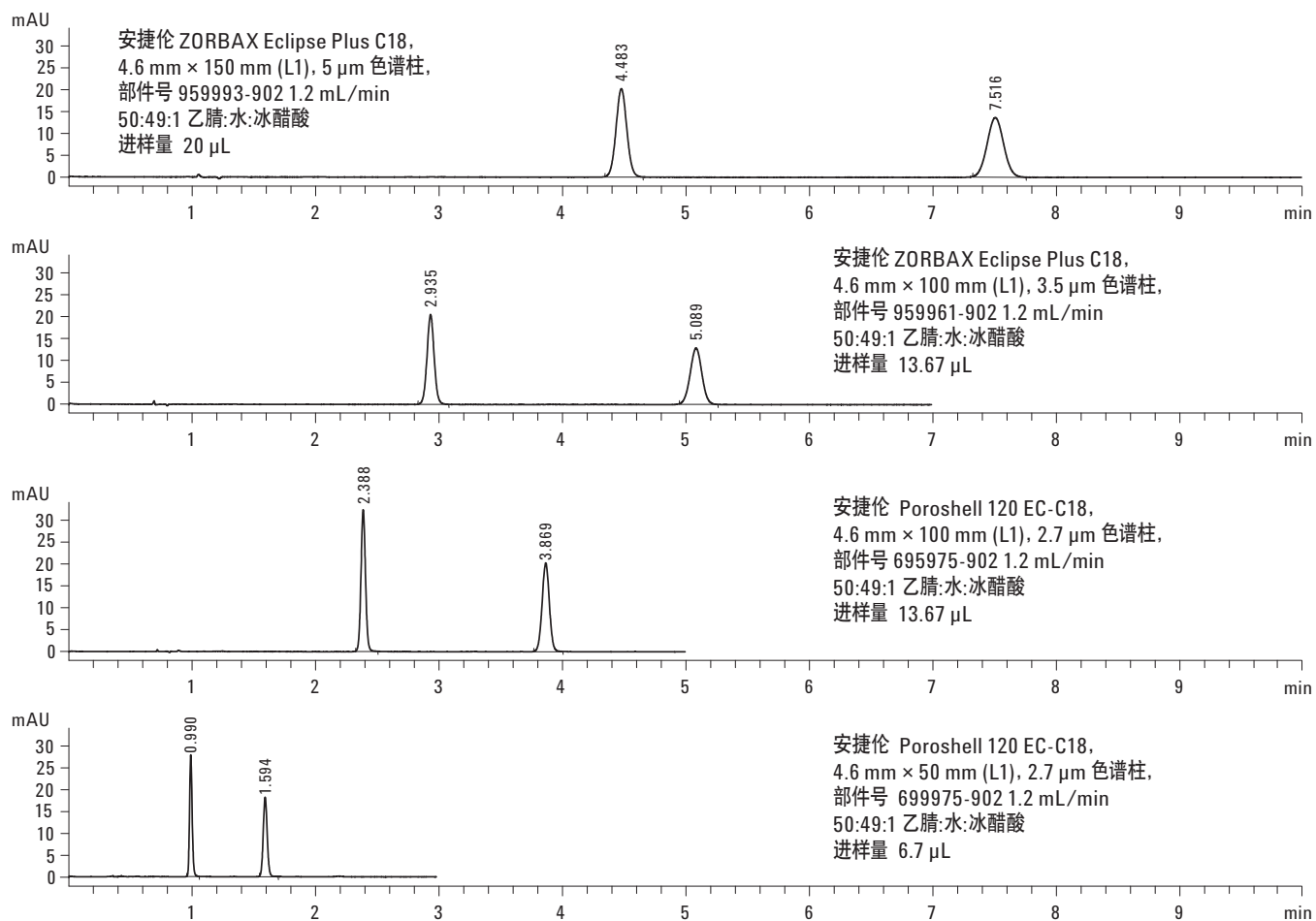


图2. 在全多孔色谱柱和表面多孔色谱柱上运行 USP 萘普生分析方法的色谱图

方法要求 $N > 4000$, R_s 高于 11.5

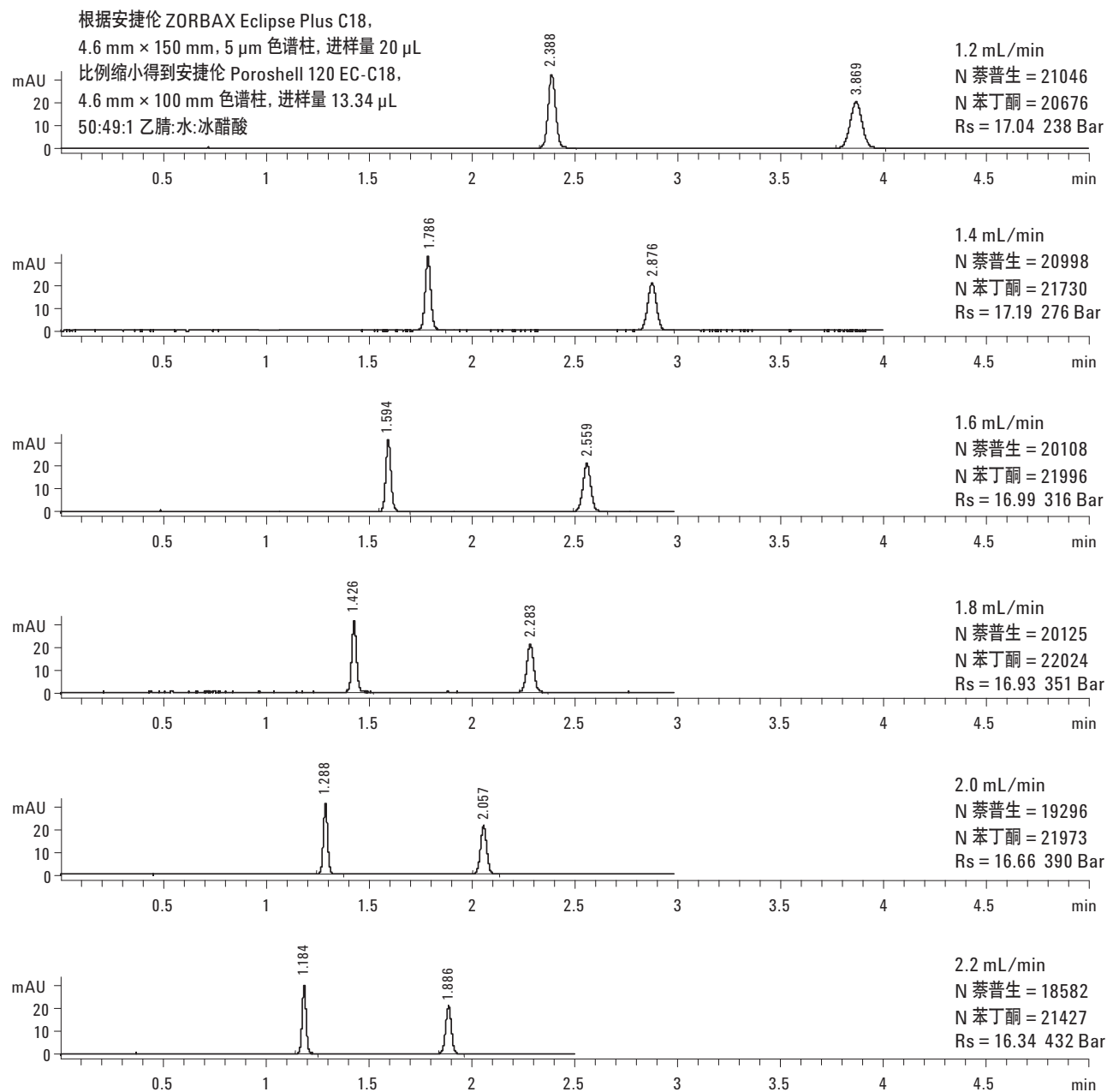


图 3. 采用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 100 mm 色谱柱和 USP 萘普生分析方法在不同流速下运行的色谱图

图 4 显示使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 50 mm 色谱柱增加流速的结果。此时流速从 1.2 mL/min 增加到 2.4 mL/min, 超过了效率和分离度要求, 压力仍低于 300 bar。

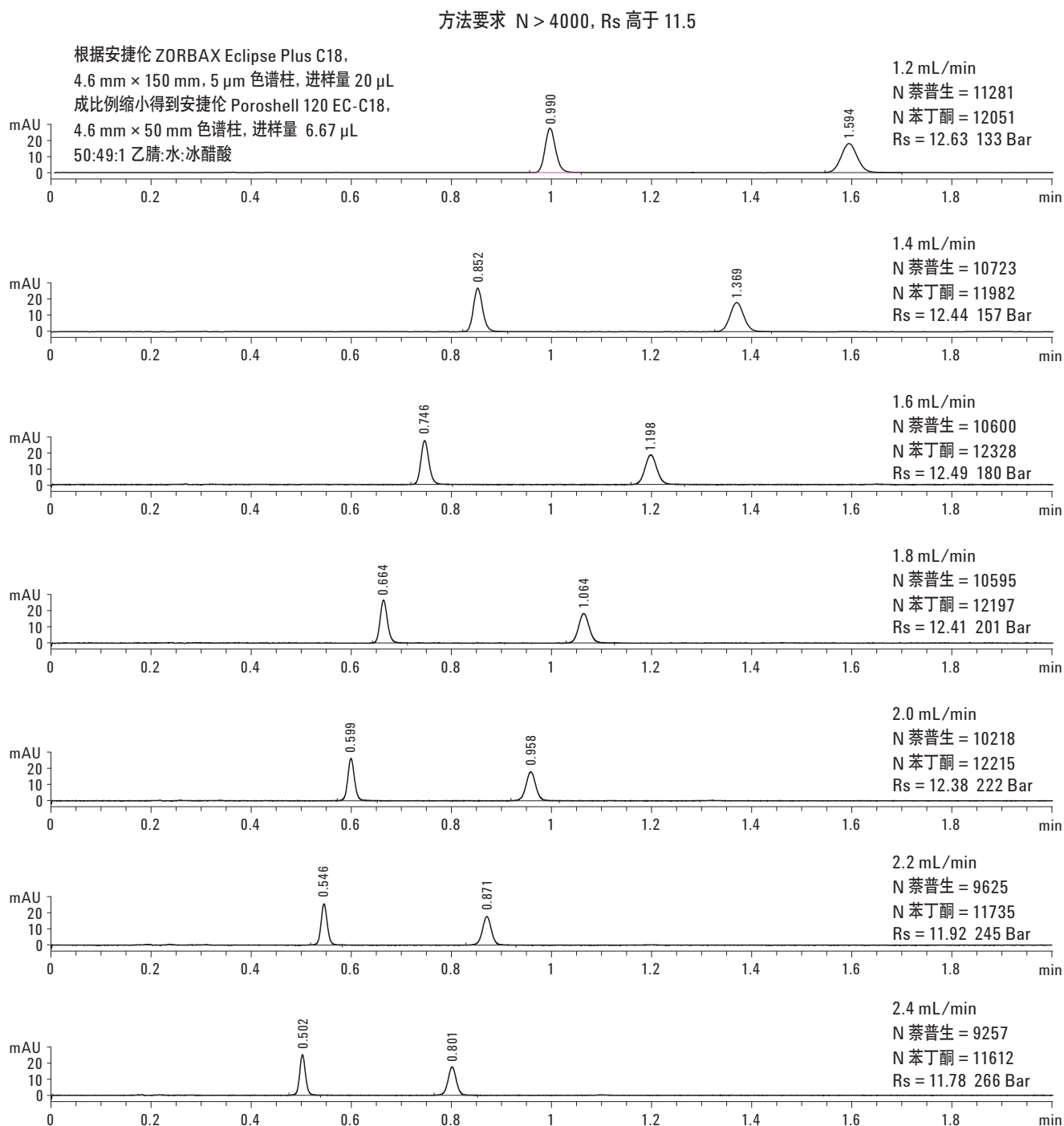


图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 50 mm 色谱柱和 USP 萘普生的分析方法在不同流速下运行的色谱图

结论

采用全多孔液相色谱柱进行的分析方法在改用表面多孔安捷伦 Poroshell 120 色谱柱后，流速、分离度和灵敏度都有所提高，且不用改变仪器。

采用安捷伦 Poroshell 120 色谱柱分析时间较快，因此能带来更高的通量和更高的效率。方法调整后，使用较短的色谱柱和较小的填料尺寸 (2.7 μm) 能够改进分析结果。

更多信息

如需了解关于我们产品的服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

参考文献

1. USP Naproxen Tablet Method, "United States Pharmacopeia 31 NF 26" Rockville, MD. 2008.
2. USP Method Validation Guidance. "United States Pharmacopeia 30 Supplement 2: System Suitability Testing, Rockville, MD. 2007, Chapter <621>.
3. William J. Long, Anne E. Mack, John W. Henderson, Jr. "Optimization of HPLC Instrument for Use with Poroshell 120 Columns," Poster Number 2080-9 Pittsburg Conference 2010 Orlando, FL, USA.
4. Transfer of HPLC Procedures to Suitable Columns of Reduced Dimensions and Particle Sizes, Uwe D. Neue, Doug McCabe, Vijaya Ramesh, Horacio Pappa, Jim DeMuthc, Pharmacopeial Forum, Vol. 35(6) [Nov.–Dec. 2009].

www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司对本资料中包含的错误，或者由于提供、展示或使用本材料造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 2 月 11 日 中国印刷
5990-7456CHCN



Agilent Technologies