

利用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱实现 USP 梯度方法的现代化

根据新修订的 USP <621> 指导原则，将碘海醇 USP 专论中有关化合物分析的 HPLC 方法转移至 2.7 μm 的表面多孔颗粒填料色谱柱

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

根据新修订的 USP <621> 指导原则，将原始 USP 专论 HPLC 方法中碘海醇有关化合物的分析方法更新为 2.7 μm 表面多孔颗粒填料 (SPP) 色谱柱。原始方法使用 Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm 色谱柱进行梯度分离，分析时间为 60 分钟。当方法转移至 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 μm 色谱柱时，分析时间从 60 分钟缩短至 13 分钟，分析时间和溶剂消耗量减少 78%，且无需重新进行方法验证。转移后的分析方法符合所有系统适用性要求，同时分析时间和溶剂消耗量均显著减少。

前言

大多数 USP 专论中，都提供了用于检测原辅料和制剂的 HPLC 方法。这些方法一直是仿制药制造商的常规分析技术。这些方法主要采用包括传统 5 µm 颗粒填料色谱柱在内的较旧的色谱柱技术。由于这些类型的色谱柱柱效较低，因此通常需要使用较长的色谱柱（如柱长 150 mm 或 250 mm），从而导致分析时间较长。分析人员的主要工作是重现 USP 中的方法，以及在许多情况下在不同仪器或实验室之间转移方法。此外，分析人员还对现有的 USP 方法进行了现代化，没有做出任何重大改动，因此无需重新验证。根据先前的 USP <621> 指导原则，USP 仅允许将等度方法从传统的 5 µm 色谱柱转移至较小粒径的色谱柱。现行 USP <621> 指导原则（2022 年 12 月修订）允许使用全多孔颗粒（TPP，具有较小的粒径）和表面多孔颗粒（SPP）色谱柱对梯度方法进行现代化更新^[1]。

在本应用简报中，根据现行 USP <621> 指导原则，将 USP 中使用 4.6 × 250 mm, 5 µm 色谱柱分析碘海醇有关化合物的原始检测方法^[2]转移至较小粒径 SPP 色谱柱。首先在 5 µm 的 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上运行原始方法^[3]，然后转移到新开发的 InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 2.7 µm 色谱柱。

实验部分

仪器与材料

对于 4.6 × 250 mm 和 4.6 × 100 mm 色谱柱，使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统和 0.17 mm 管线。

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级。乙腈、碘海醇及相关化合物购自安谱实验科技公司（中国上海）。水经由 ELGA PURELAB Chorus 系统 (High Wycombe, UK) 纯化所得。根据 USP 碘海醇专论制备系统适用性溶液。

色谱柱

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm（货号 880975-902）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm（货号 695975-742）

表 1. 仪器配置

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112B)	4 位/10 通阀, 600 bar (货号 5067-4287)
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	样品瓶, 螺口, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL, 100/包 (货号 5182-0716) 瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包 (货号 5182-0717)
Agilent Infinity II 高容量柱温箱 (MCT)	标准流路加热器 (G7116-60015) 加热器和色谱柱: InfinityLab Quick Connect 快速连接组件, 105 mm, 0.17 mm (货号 5067-6166)
Agilent 1260 二极管阵列检测器 WR (G7115A)	流通池: 10 mm 13 µL 流通池 (货号 G1315-60022) 长寿命氘灯 (货号 2140-0820)
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版软件	

结果与讨论

之前，根据调整指导原则，任何梯度条件的调整都需要进行重新验证。根据该规则，色谱柱尺寸的任何变化，甚至是 USP 方法中粒径的微小变化（如 2.7 与 2.6 µm）都需要进行重新验证^[4]。2022 年 12 月新修订的 USP <621> 指导原则规定：“在不改变取代基特性，且固定相的其他理化特性（即色谱柱担体、表面改性和化学修饰程度）必须相似的前提下，允许将 TPP 色谱柱改为 SPP 色谱柱。如果 $(t_R/W_h)^2$ 比值保持恒定或在规定 $(t_R/W_h)^2$ 比值的 -25% 至 +50% 范围内，则可改变色谱柱的粒径和/或长度。只要符合系统适用性标准，并证明要控制的特定杂质的选择性和洗脱顺序相同，则可接受这些变更而无需进行重新验证。”采用 Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm 色谱柱和原始 USP 方法，计算用于测定系统适用性参数的碘海醇相关化合物 A 和碘海醇相关化合物 C 的 $(t_R/W_h)^2$ 比值和允许范围。参数值如表 2 所示。

表 2. 本研究使用的 HPLC 方法和 UHPLC 方法的比较

参数	USP 中的原始方法	使用 UHPLC
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm (货号 880975-902)	Agilent InfinityLab Poroshell 120-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm (货号 695975-742)
(t _R /W _H) ² 比值	3890 (-25% 至 50%) 20217 (-25% 至 50%)	3023 (-22.3%); 25290 (25.1%)
流动相	A: 水 B: 乙腈	A: 水 B: 乙腈
梯度	时间 (min) B% 0 1 60 13	时间 (min) B% 0 1 13 13
流速	1 mL/min	1.85 mL/min
温度	25 °C	25 °C
进样量	10 µL	4 µL
检测	DAD 信号 254 nm, 参比波长关闭, 采集频率 2.5 Hz	DAD 信号 254 nm, 参比波长关闭, 采集频率 40 Hz

在本研究中，将新型 InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱用于现代化的方法。它在 2.7 µm SPP 的基础上开发，具有较低的 C18 键合密度和 120 Å 的较大孔径，这使得色谱柱能够使用高水性流动相，并减少保留损失。这仍是一种 USP L1 色谱柱，因此 InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱可用于现代化方法。使用的色谱柱尺寸为 4.6 × 100 mm，柱径为 2.7 µm，因为它与亚 2 µm、长度为 100 mm 的色谱柱柱效相近，后者的柱效与 250 mm, 5 µm 的色谱柱相当。使用两种 InfinityLab 色谱柱运行系统适用性溶液，同时计算碘海醇相关化合物 A 和碘海醇相关化合物 C 的 (t_R/W_H)² 比值。两种色谱柱的比值均在允许范围内。参数值汇总于表 2 中。

在本应用简报中，粒径发生了变化，故需要调整流速，因为较小粒径的色谱柱需要更高的线性流速才能实现相同的性能（以换算后塔板高度计算）。使用公式 1，根据色谱柱内径和填料粒径的变化调整流速：

公式 1.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$$

- F₁ = 专论中规定的流速 (mL/min)
- F₂ = 调整后的流速 (mL/min)
- dc₁ = 专论中规定的色谱柱内径 (mm)
- dc₂ = 使用的色谱柱内径 (mm)
- dp₁ = 专论中规定的粒径 (µm)
- dp₂ = 使用的色谱柱粒径 (µm)

色谱柱尺寸的变化以及色谱柱体积的变化都会影响控制选择性的梯度体积。通过改变梯度体积（与色谱柱体积成比例），将梯度调整至色谱柱体积。如公式 2 所示，可通过原始梯度时间 (t_{G1})、流速和色谱柱尺寸计算新的梯度时间 (t_{G2})。

公式 2.

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2)[(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

- t_{G1} = 梯度体积或梯度时间（初始）
- t_{G2} = 新的梯度时间
- F = 流速
- L × dc² = 需要调整每个梯度阶段的梯度时间，使梯度体积与色谱柱体积保持恒定比例关系

如果色谱柱尺寸发生了变化，则可使用公式 3 调整进样量。

公式 3.

$$V_2 = V_1 \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

- V₁ = 专论中规定的进样量 (µL)
- V₂ = 调整后的进样量 (µL)
- L₁ = 专论中规定的柱长 (cm)
- L₂ = 新的柱长 (cm)
- dc₁ = 专论中规定的色谱柱内径 (mm)
- dc₂ = 新的色谱柱内径 (mm)

原始方法和新方法的条件如表 2 所示。采用 4.6 mm 内径色谱柱的方法在配有二元泵的 1260 Infinity II 液相色谱系统上运行。内径为 4.6 mm 的 Poroshell 120 色谱柱与 1260 Infinity II 液相色谱系统匹配良好，系统具有相同的最大压力 (600 bar)。如表 3 所示，所有色谱柱的系统适用性均符合要求。使用 InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm 色谱柱的现代化方法，分析时间从 60 min 缩短至 13 min（节省了 78% 的时间），溶剂消耗量也显著降低了 78%。显然，使用所述方法能够提高实验室工作效率和样品通量。色谱图如图 1 所示。

表 3. 系统适用性总结

USP 系统适用性要求	O-烷基化化合物的保留时间范围为 1.1–1.4，碘海醇外异构体为 1.0	碘海醇相关化合物 A 与碘海醇相关化合物 C 的分离度 R 不小于 20.0	与色谱图中所有峰的总面积相比，碘海醇相关化合物 C 的峰面积为 0.5% ± 0.1%
Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm	20.25–25.78 min	51.1	0.55%
Agilent InfinityLab Poroshell 120-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (货号 695975-742)	5.03–6.40 min	45.9	0.55%

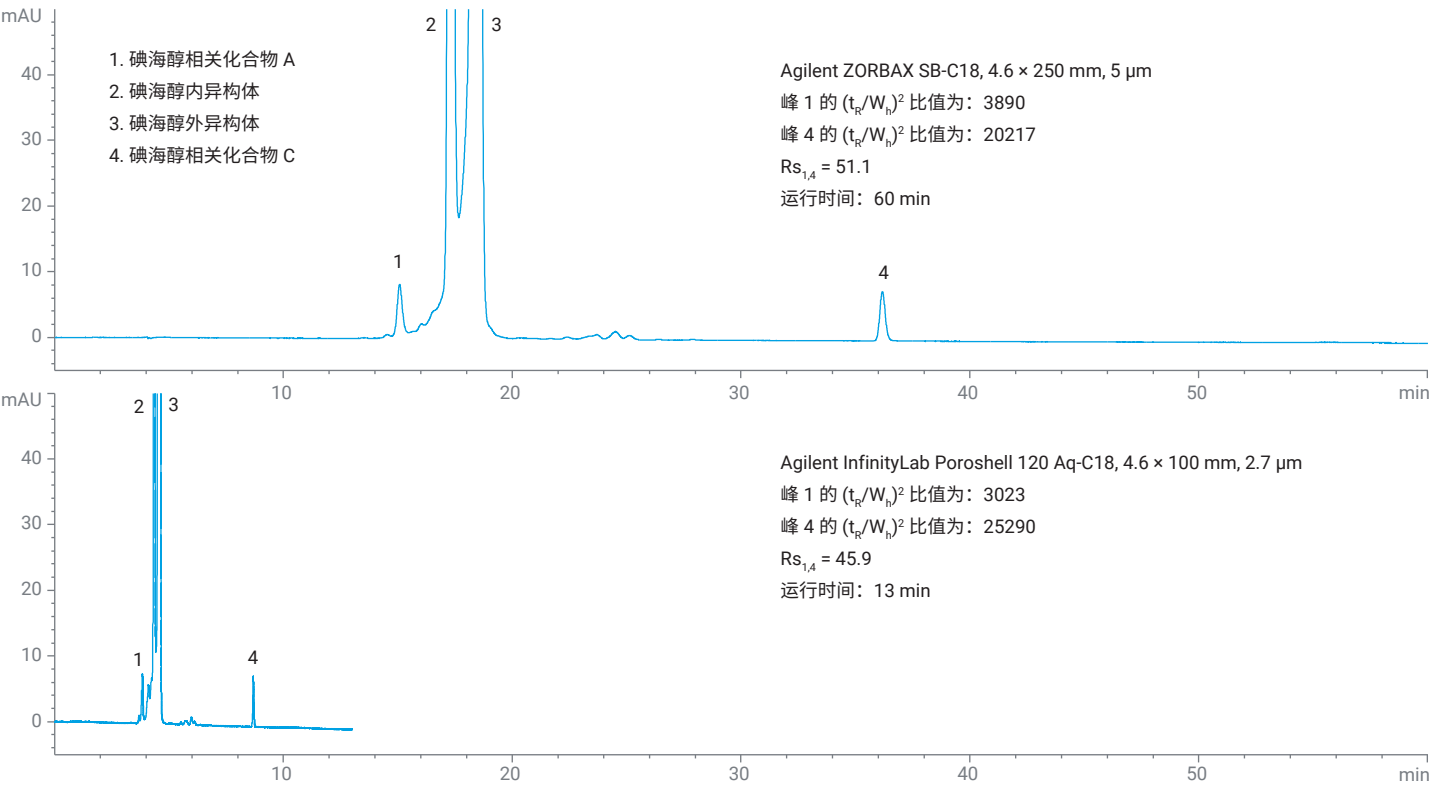


图 1. 使用两种不同粒径色谱柱分析碘海醇系统适用性溶液中有关化合物的色谱图

结论

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱，成功对使用传统全多孔 5 μm 色谱柱分析碘海醇相关化合物的 USP 方法实现了现代化。现代化后的方法在提供相近结果的同时，还大大减少了分析时间和溶剂用量。使用这种方法可以提高实验室的生产率和样品通量。根据新修订的 USP <621> 指导原则，这些方法调整符合要求，无需进行额外的方法重新验证。

参考文献

1. USP Harmonized Standards Home Page. Supplement USP Stage 4 Harmonization, Official, December 1, **2022**
2. USP 35 Monographs. Iohexol, United States Pharmacopeia: 3534-3536
3. Fu, R. 将碘海醇相关化合物 USP 专论 HPLC 梯度方法转移至较小粒径 ZORBAX 色谱柱，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-6544ZHCN，**2023**
4. Long, W. J. A Simple Conversion of the USP Assay Method for Diphenhydramine HCl to the Agilent InfinityLab Poroshell 120 Column EC-C8 (将 USP 盐酸苯海拉明分析方法轻松转换为使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-5400EN，**2022**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE49474901

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023 年 9 月 28 日，中国出版
5994-6756ZHCN