

使用 Agilent 1260 Infinity III 液相色谱系统通过药典方法分析碘海醇 — 在平缓梯度条件下获得优异精度



作者

Florian Rieck
安捷伦科技有限公司

摘要

药典中收录的方法是药物分析的主要指导依据。其中一些方法需要使用诸如平缓梯度之类的条件，这对于所使用的液相色谱 (LC) 硬件来说具有挑战性。Agilent 1260 Infinity III 液相色谱在设计时充分考虑了这些需求，即使在严苛的条件下，也能提供高精度的保留时间。本应用简报展示了该系统在对碘海醇进行药典方法分析时的性能。在同一系统上对该方法进行进一步优化，以缩短分析时间并减少溶剂消耗，从而在满足药典方法的系统适用性要求的同时，提高效率和可持续性。

前言

不同药典中收录的方法为许多药物提供了经过验证的分析流程。这些药典方法被广泛用于（例如）药品生产工作流程中的质量控制和杂质检测。当这些方法首次引入新实验室或首次应用于新设备时，需要在“实际使用条件”下进行验证^[1]。在验证方法时，药典通常规定了一些需要满足的系统适用性参数，例如两种分析物之间的最低分离度。为了可靠地测定这些参数，LC 硬件需要能提供准确且可重现的结果。

药典方法的一个示例是对碘海醇及其相关物质的分析^[2]。碘海醇（图 1）常用作 X 射线造影剂^[3]。由于碘海醇及其相关杂质分子极性较强，在反相固定相上的保留性较差。因此，该分离方法从高含水量流动相开始，采用长而平缓的梯度，这对于任何 HPLC 系统来说都是一种挑战。

本应用简报介绍了按照欧洲药典 (Ph. Eur.) 中的方法，在四元液相色谱系统上对碘海醇及两种已知杂质进行分析。然后将药典方法调整为 UHPLC 条件，以尽可能减少溶剂消耗并缩短单次分析的时间。通过监测和报告系统适用性参数（如分离度和保留时间稳定性），对这两种方法的质量进行评估。

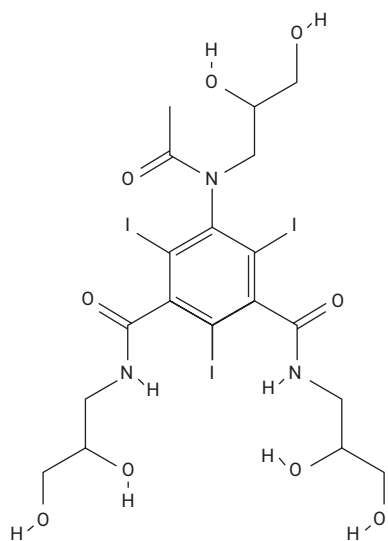


图 1. 碘海醇的化学结构

实验部分

仪器

1260 Infinity III 液相色谱系统包含以下模块：

- Agilent InfinityLab Assist 升级组件 (G7178A)，包括 InfinityLab Assist 触摸屏 (G7179A) 和 InfinityLab Assist 控制器 (G7180A)
- Agilent 1260 Infinity III 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1260 Infinity III 样品瓶进样器 (G7129A)，配备带 3 μ L 热交换器（选件 #063）的集成式柱温箱 (ICC) 和样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1260 Infinity III 可变波长检测器 (G7114A)，配备 10 mm 标准流通池（选件 #018）

色谱柱

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m（部件号 959990-902）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 3 \times 150 mm, 2.7 μ m（部件号 693675-742）

软件

Agilent OpenLab CDS 2.7 版或更新版本

化学品

整个实验均使用液相色谱分析专用 Agilent InfinityLab 梯度级乙腈 (ACN)（部件号 5191-5100*）。新制超纯水产自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。分析级氢氧化钠购自 VWR (Darmstadt, Germany)。

* 仅在部分国家/地区提供

样品

碘海醇欧洲药典参比化合物、碘海醇杂质 A 欧洲药典化合物和碘海醇杂质 J 欧洲药典化合物购自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。配制所有化合物的混合溶液，溶剂为 1 mM 氢氧化钠水溶液，各种化合物最终浓度为 75 μ g/mL。

方法设置

色谱条件如欧洲药典碘海醇专论中所述^[2]，详见表 1。

为优化分离过程的运行时间和溶剂消耗，对该方法进行了调整并转换为 UHPLC 条件。所有更改均在美国药典 (USP) 章节 621^[4] 以及欧洲药典 (Ph.Eur.) 章节 2.2.46^[5] 中给出的允许调整范围内。关于允许的调整范围及用于方法转换的公式的更多详细信息，请参阅另一份应用简报^[6]。优化后的方法（表 1）采用的色谱柱的填料与欧洲药典专论规定的填料相同，但该色谱柱使用了针对高含水量条件优化的表面多孔颗粒。

表 1. 欧洲药典方法与优化方法的色谱条件

参数	设定值	
	欧洲药典方法	优化方法
流动相	A: 水 B: 乙腈	A: 水 B: 乙腈
流速	1 mL/min	0.788 mL/min
梯度	时间 (min) %B	时间 (min) %B
	0 1	0 1
	60.00 13	19.44 13
	60.01 99	19.45 99
停止时间	67 min	23 min
后运行时间	8 min	4 min
进样量	10 µL	2.55 µL
温度	25 °C	25 °C
紫外检测	254 nm 5 Hz 数据采集速率	254 nm 10 Hz 数据采集速率

结果与讨论

采用欧洲药典中的方法分离了由碘海醇及其杂质 A 和 J 组成的标准溶液。所有化合物均在色谱图的前半部分洗脱，见图 2。两种杂质与碘海醇之间分离良好。由于碘海醇存在内型-外型异构体，因此色谱中会出现两个峰（药典方法条件下通常无法分离这两种异构体）^[2]。杂质 A 与碘海醇之间的分离度为 5.5，符合欧洲药典^[2] 规定的系统适用性要求（不低于 5.0）。杂质 J 与碘海醇也实现了基线分离。该药典方法规定 60 min 内的梯度斜率为 0.2%/min，这对任何梯度泵来说都是一个挑战。尽管如此，在该条件下，所有化合物连续八次进样的保留时间 (RT) 相对标准偏差 (RSD) 均为 0.083% 或更低，见表 2。这些数据表明，1260 Infinity III 四元泵具有高精度混合能力。

表 2. 使用药典方法对样品进行八次重复进样分析获得的峰特性

化合物	RT (min)	相对 RT	分离度 (EP)	RT RSD (%)
杂质 A	15.865	0.83	—	0.069
碘海醇内型异构体	18.096	0.95	5.5	0.083
碘海醇外型异构体	19.041	1.00	2.2	0.078
杂质 J	20.685	1.09	3.8	0.059

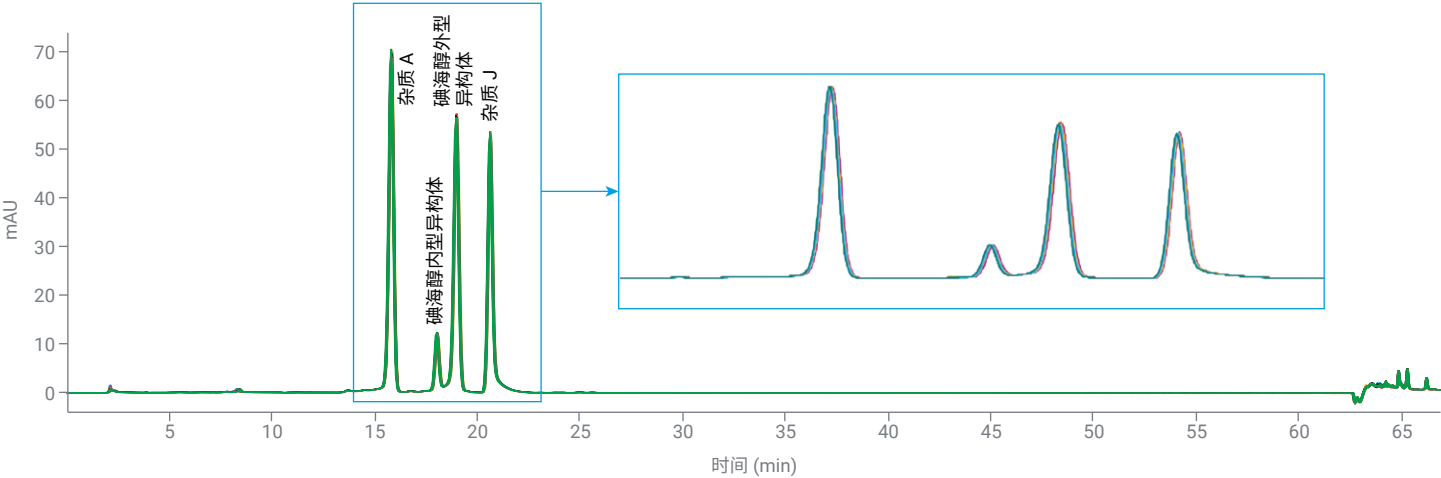


图 2. 采用药典方法进行分离获得的叠加色谱图 (N = 8)

为了减少溶剂消耗并缩短分析时间，对方法进行了优化并转移到更短、孔径和填料颗粒更小的色谱柱上。根据新色谱柱的尺寸，对流速、梯度和进样量进行了调整。所有计算和调整均在欧洲药典章节 2.2.46^[5] 中关于 LC 梯度洗脱的允许范围内进行。色谱柱填料从全多孔 C18 颗粒更换为表面多孔、兼容 100% 水相的 C18 颗粒。这种 Poroshell 120 Aq-C18 颗粒经过 C18 改性并采用了专有封端技术，相比传统的 C18 固定相能更好地避免固定相脱湿现象^[7] — 当在非极性固定相（如 C18）上使用高含水量流动相时容易发生固定相脱湿，这可能会导致保留时间偏移和峰变形。

表 3. 使用优化方法对样品进行八次重复进样分析获得的峰特性

化合物	RT (min)	相对 RT	分离度 (EP)	RT RSD (%)
杂质 A	5.793	0.82	—	0.044
碘海醇内型异构体	6.763	0.96	6.8	0.033
碘海醇外型异构体	7.068	1.00	2.1	0.032
杂质 J	7.380	1.04	2.2	0.026

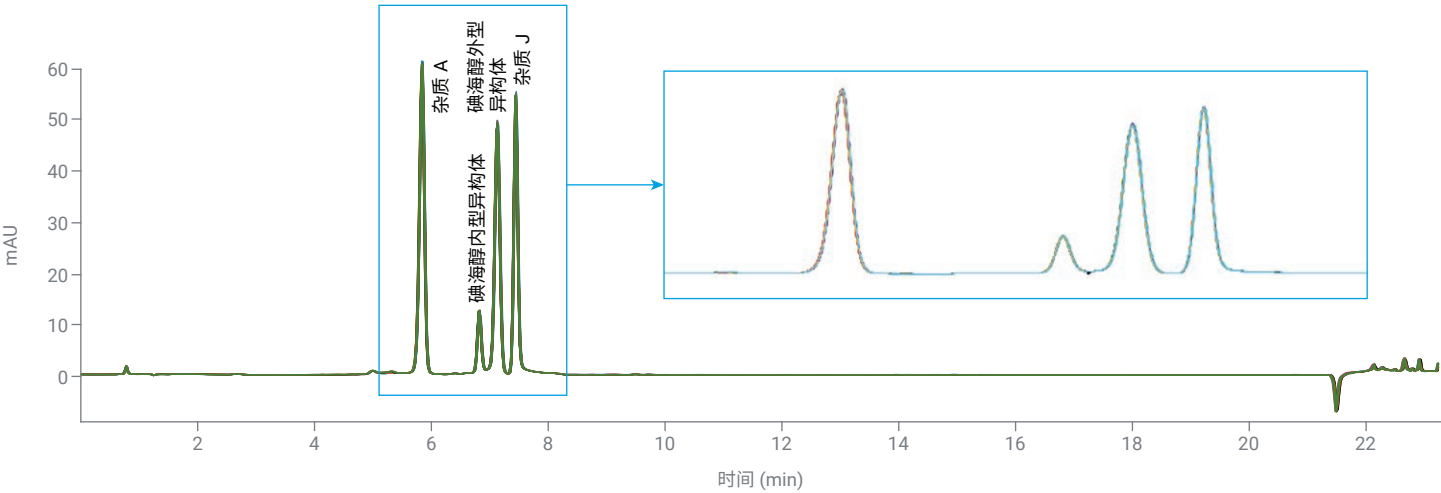


图 3. 优化条件下进行分离获得的叠加色谱图 (N = 8)

方法优化后，运行时间由 75 分钟（包括柱冲洗和重新平衡）缩短至 27 分钟，缩短了 64%。在调整后的条件下对样品进行了八次分析。图 3 为八次分析的叠加色谱图。四种化合物再次实现良好分离，并在梯度的前半部分洗脱。杂质 A 与碘海醇之间的分离度提高至 6.8。杂质 J 与碘海醇外型异构体实现基线分离，但分离度相比之前有所降低。RT 精度仍然非常高，RSDs 甚至低于原始方法，详见表 3。调整后的方法满足药典方法关于最小分离度的系统适用性要求，表明该方法适用于上述分析。

在调整后的参数下，分析时间缩短为原方法的 36%，所用溶剂不到原方法的 29%，同时仍严格满足系统适用性要求和 RT 精度要求。

结论

本研究采用了一种平缓二元梯度药典方法对碘海醇及其两种杂质进行了分离。该方法满足欧洲药典的系统适用性要求，保留时间 RSDs $\leq 0.083\%$ (N = 8)。在美国药典章节 621^[4] 和欧洲药典章节 2.2.46^[5] 的允许范围内，对原本耗时 75 分钟的方法进行优化并转移到 UHPLC 条件下。优化后的方法在保持原方法分离度的同时，进一步降低了保留时间 RSD ($\leq 0.044\%$)，分析时间和溶剂消耗分别减少了 64% 和 71%。这些数据表明，即使在药典方法要求的具有挑战性的平缓梯度条件下，Agilent 1260 Infinity III 液相色谱也能提供高度可重现的结果，同时还能灵活地优化这些方法，从而节省时间并提高可持续性。

参考文献

1. The United States Pharmacopoeia. General chapter <1226> Verification of Compendial Procedures, **2019**. https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M870_03_01.html (accessed 2024-06-17)
2. The European Pharmacopoeia 11.0, Iohexol. 01/2017:1114
3. National Drug Code Directory, United States Food and Drug Administration
4. The United States Pharmacopoeia. General chapter <621> Chromatography, **2023**. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_8_en-US (accessed 2024-06-17)
5. The European Pharmacopoeia 11.0, Chapter 2.2.46, Chromatographic Separation Techniques
6. Schipperges, S.; Naegele, E. Reduce the Cost per Injection for Your USP Compendial Method (降低 USP 药典方法的单次进样分析成本)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-5897EN，**2023**
7. Fu, R.; Wei, T. Analysis of Polar Compounds Using an Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 Column with Improved and Reliable Performance (使用性能经过优化的可靠 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱分析极性化合物)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-5555EN，**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

DE21315027

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，2024
2024 年 10 月 28 日，中国出版
5994-7571ZHCN