

根据 USP 方法减少溶剂用量和分析时间

根据 USP 章节 <621> 要求，使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统将方法转移至 UHPLC 条件

作者

Edgar Naegele 和
Sonja Schipperges
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了根据美国药典 (USP) 要求，在标准条件下对药物化合物与其杂质的梯度分离。对于较小的色谱柱内径和较小的粒径，将方法转移至 UHPLC 条件后改善了梯度分离，同时仍然满足相应 USP 方法中列出的分离要求以及 USP <621> 中给出的计算。这些结果是使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统获得的，该系统能够在高达 800 bar 的压力下运行。首先，方法转移至 UHPLC 有利于在保持分离性能的情况下缩短分析时间，并降低分析成本。因此，这种方法转移也有助于您实现实验室的可持续性目标，并在质量控制 (QC) 中实现成本节省。

本应用简报还包含交互式成本节约计算器。利用该工具，了解 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统如何有助于节省资源，从而使您在特定分析中节省成本和溶剂。

注：本 PDF 中包含交互式表格。您可以修改数值进行定制计算。表中的计算结果将相应更新。如需保存数值，请下载并保存文档。请注意，表中数值的修改不会反映在文本中。

前言

USP 提供了与专论中描述的检测和程序相关的一般指导原则。章节 <621> 提供了有关色谱法的专门的指导原则^[1]。最近对 USP 章节 <621> 进行的修改现在允许调整液相色谱法中的色谱梯度条件。在本章节修订后，色谱柱尺寸变更以及从全多孔颗粒 (TPP) 色谱柱转移至表面多孔颗粒 (SPP) 色谱柱对于液相色谱法中的梯度洗脱均为可接受的。表 1 提供了允许对梯度系统色谱条件所做调整的概述。

本应用简报介绍了根据 USP <621> 的要求从 USP 专论标准 HPLC 条件到 UHPLC 条件的方法转移。提供了对喹硫平及其有机杂质的梯度洗脱液相色谱分析。原始 USP 方法使用配备 TPP 色谱柱的传统 Agilent 1100 系列液相色谱系统，将其转移至与 SPP 色谱柱结合使用的 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统。对原始方法与使用 UHPLC 条件的分析的分析时间、溶剂消耗量和每次进样成本进行了分析。

表 1. 根据 USP 章节 <621> 调整用于梯度系统的色谱条件

参数	允许的调整
柱长和粒径	在柱长 (L) 与粒径 (dp) 的比例保持恒定（或在规定的 L/dp 比例的 -25% 与 +50% 之间）的前提下，可以修改粒径和/或柱长。 需要满足系统适用性标准。
色谱柱内径	可以调整色谱柱的内径。
流速	使用以下公式，根据色谱柱内径和填料粒径的变化调整流速： $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$
进样量	当色谱柱尺寸改变时，可使用以下公式调整进样量： $V_{inj2} = V_{inj1} \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$
梯度时间	根据原始梯度时间计算新梯度时间，如下所示： $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$
柱温	在指定操作温度的情况下，除非另有规定，否则为 ±5 °C。

F₁ = 专论中规定的流速
F₂ = 调整后的流速
dc₁ = 专论中规定的色谱柱内径
dc₂ = 使用的色谱柱内径
dp₁ = 专论中规定的色谱柱粒径
dp₂ = 使用的色谱柱粒径
V_{inj1} = 专论中规定的进样量
V_{inj2} = 调整后的进样量
L₁ = 专论中规定的柱长
L₂ = 使用的柱长
t_{G1} = 专论中规定的梯度时间
t_{G2} = 调整后的梯度时间

实验部分

设备

Agilent 1100 系列液相色谱，系统包括以下模块：

- Agilent 1100 系列脱气机 (G1322A)
- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315B)，配有 10 mm 标准流通池 (G1315-60022)

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 HS (G7117C)，配有 Agilent InfinityLab 最大光强卡套式流通池 10 mm (G4212-60008)

软件

Agilent OpenLab CDS 2.6 版

色谱柱

- Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm (部件号 993967-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-906)

表 2. USP 专论中描述的喹硫平有机杂质分析方法^[2]

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm
溶剂	溶液 A: 乙腈:缓冲液 (75:25 v/v) 溶液 B: 乙腈
梯度	时间 (min) %B 0.00 0.00 25.00 0.00 60.00 77.7 60.01 0.00 68.00 0.00 停止时间: 68 min
流速	1.50 mL/min
温度	45 °C
检测	250 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm, 10 Hz
进样	进样量: 20.00 μL

表 3. 喹硫平有机杂质分析方法:转移至 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm
溶剂	溶液 A: 乙腈:缓冲液 (75:25 v/v) 溶液 B: 乙腈
梯度	时间 (min) %B 0.00 0.00 12.86 0.00 30.86 70.7 30.91 0.00 34.97 0.00 停止时间: 35 min
流速	1.94 mL/min
温度	45 °C
检测	250 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm, 20 Hz
进样	进样量: 13.33 μL

表 4. 喹硫平有机杂质分析方法:转移至 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm
溶剂	溶液 A: 乙腈:缓冲液 (75:25 v/v) 溶液 B: 乙腈
梯度	时间 (min) %B 0.00 0.00 12.86 0.00 30.86 70.7 30.91 0.00 34.97 0.00 停止时间: 35 min
流速	0.41 mL/min
温度	45 °C
检测	250 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm, 20 Hz
进样	进样量: 2.78 μL

缓冲溶液

乙酸铵 (3.1 g/L) 水溶液，每 1 L 溶液含 2 mL 25% 氢氧化铵。所得溶液的 pH 值不得低于 9.2。

系统适用性溶液的制备

在稀释剂（溶液 A 和溶液 B (86:14)）中的 USP 喹硫平系统适用性 RS (1 mg/mL)。

标准品溶液的制备

标准溶液：在稀释剂中的 0.001 mg/mL USP 富马酸喹硫平 RS。

化学品和溶剂

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。所有化学品 (乙酸铵、25% 氨水溶液) 和 USP 标准品 (富马酸喹硫平 RS 和喹硫平系统适用性 RS) 均购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

结果与讨论

在喹硫平及其有机杂质测定 USP 专论中，强制要求使用 C8 反相色谱柱 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm 填料, L7)。色谱条件见表 2^[2]。图 1 显示了系统适用性溶液和标准品溶液在旧款 1100 系列液相色谱系统上的分析结果。符合 USP 专论中关于分离度和拖尾因子的要求。USP 专论要求，系统适用性溶液中去乙氧基喹硫平与喹硫平之间的分离度不得低于 (NLT) 4.0，喹硫平有关化合物 B 与喹硫平有关化合物 G 之间的分离度不得低于 (NLT) 3.0。要求喹硫平标准品溶液的拖尾因子不得超过 (NMT) 2，且 RSD NMT 5%。

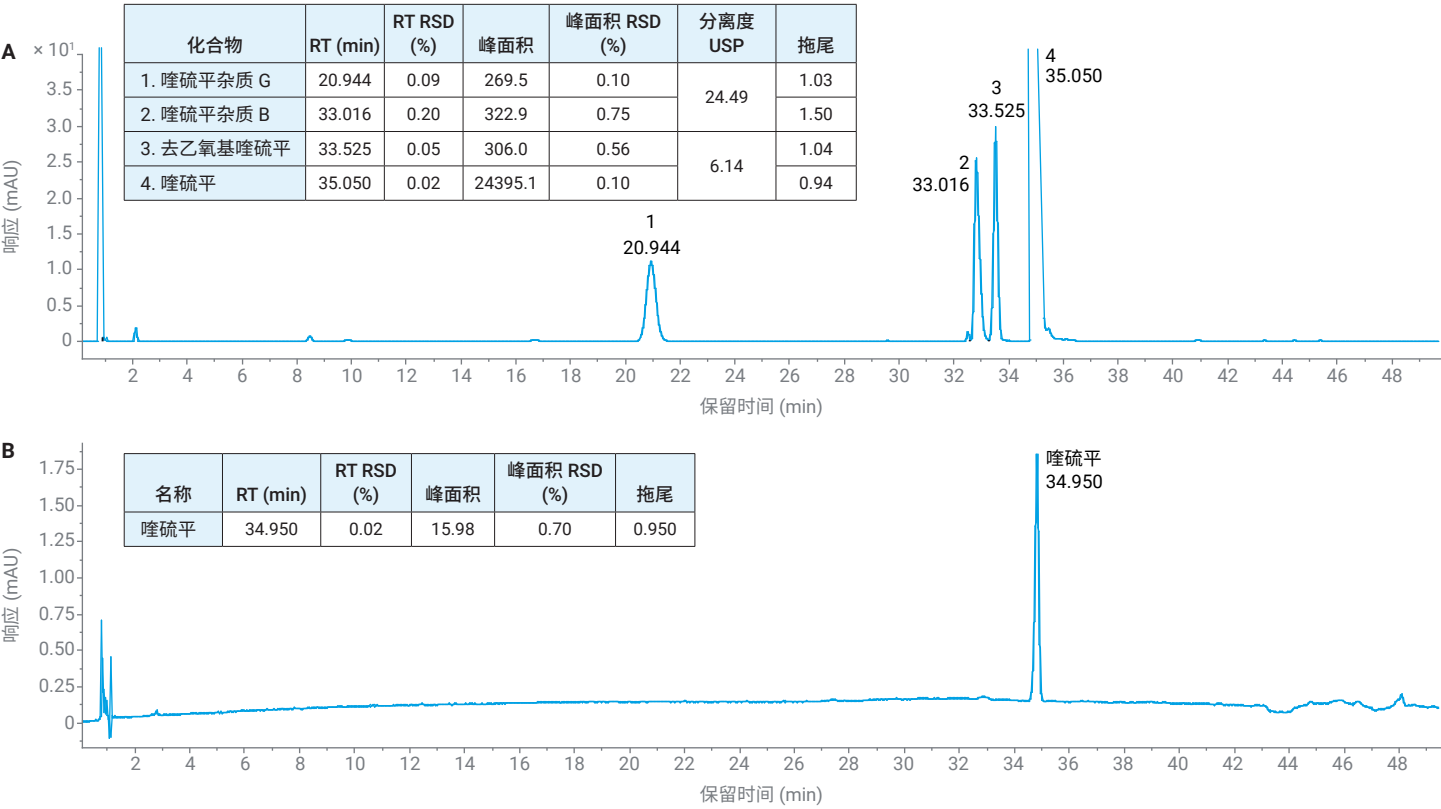


图 1. 按照 USP 专论中所述分析喹硫平的有机杂质。(A) 系统适用性溶液；(B) 标准品溶液。1. 喹硫平有关化合物 G；2. 喹硫平有关化合物 B；3. 去乙氧基喹硫平；4. 喹硫平。计算 RSD 时，N = 6

为使用 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统，将用于分析喹硫平有机杂质的方法转移至 UHPLC 条件下。方法转移至 InfinityLab Poroshell EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱使得 L/dp 与原始色谱柱相比降低了 14%，这符合 USP 章节 <621> 的要求。应用于该色谱柱的色谱条件见表 3。

使用 InfinityLab Poroshell EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分析系统适用性溶液和标准品溶液所得到的结果如图 2 所示。

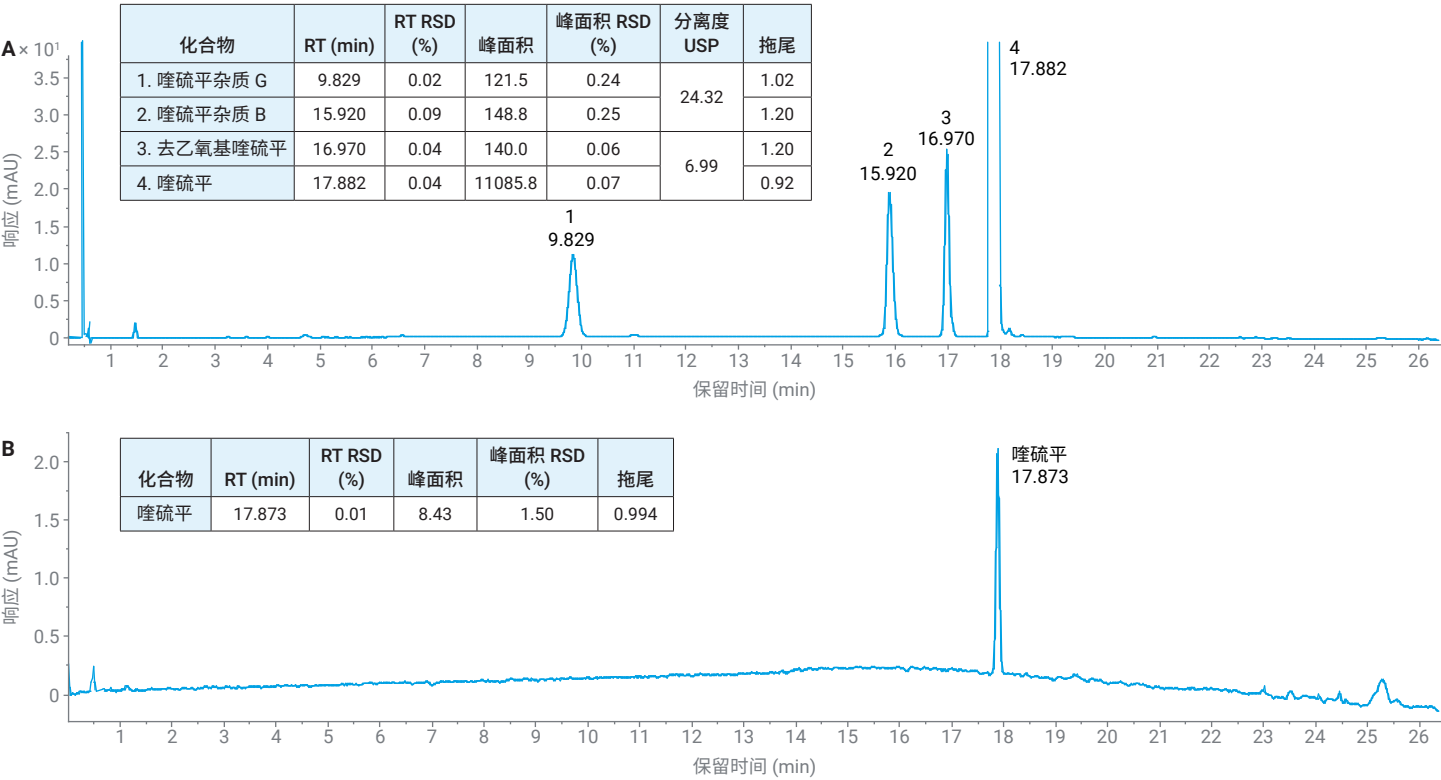


图 2. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 分析喹硫平的有机杂质。(A) 系统适用性溶液；(B) 标准品溶液。1. 喹硫平有关化合物 G；2. 喹硫平有关化合物 B；3. 去乙氧基喹硫平；4. 喹硫平。计算 RSD 时，N = 6

为进一步节省溶剂，减小色谱柱的内径，使其仍然处于 USP 章节 <621> 中所述的要求范围内。图 3 显示了使用 InfinityLab Poroshell EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分析系统适用性溶液和标准品溶液所得到的结果。调整后的色谱条件见表 4。USP 专论中描述的喹硫平有机杂质分析与两种 UHPLC 分析的比较见表 5。

方法从 4.6 × 150 mm, 3.5 μm 色谱柱转移为 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 或 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱使得 L/dp 比降低 14% 或提高 9.3%，并且符合 USP 章节 <621> 中描述的要求。所有方法均符合喹硫平 USP 专论的系统适用性和标准品溶液标准。转移至 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱后，每次进样的溶剂消耗量减少 33.5%，且分析时间缩短 48.5%。转移至 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱后，每次进样的溶剂消耗量减少 85.9%。

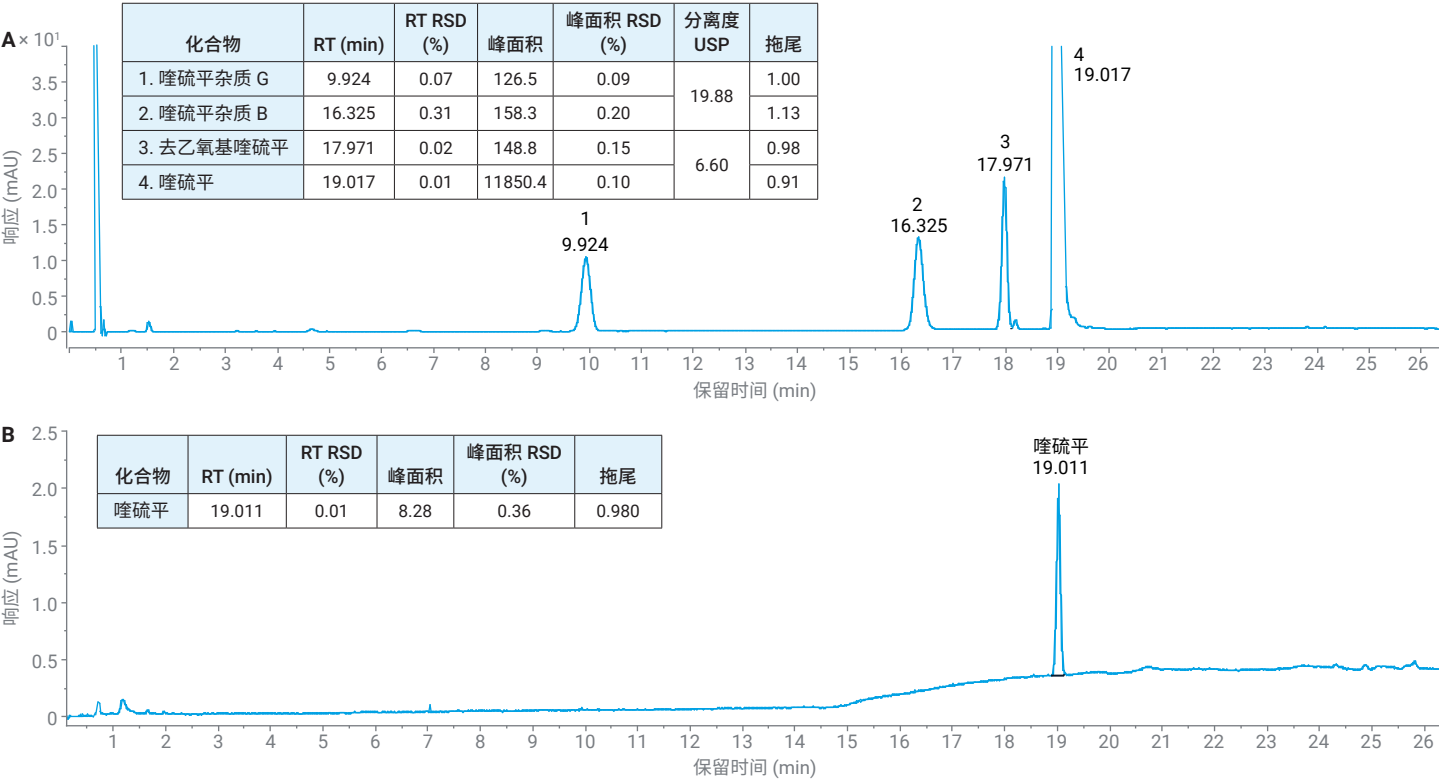


图 3. 采用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 分析喹硫平的有机杂质。(A) 系统适用性溶液；(B) 标准品溶液。1. 喹硫平有关化合物 G；2. 喹硫平有关化合物 B；3. 去乙氧基喹硫平；4. 喹硫平。计算 RSD 时，N = 6

表 5. USP 专论中描述的喹硫平有机杂质分析与 UHPLC 分析的比较。满足 USP 要求的结果以绿色标记

色谱柱和方法			
	Agilent Eclipse XDB-C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 µm	Agilent Poroshell EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm	Agilent Poroshell EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm
L/dp	43000	37000 (–14%)	47000 (+9.3%)
流速	1.5 mL/min	1.97 mL/min	0.41 mL/min
每次进样的溶剂消耗量	102 mL	68.95 mL (–33.5%)	14.34 mL (–85.95%)
运行时间	68.00 min	35.00 min (–48.5%)	35.00 min (–48.5%)
喹硫平专论中的系统适用性要求			
去乙氧基喹硫平与喹硫平之间的分离度， NLT 4.0	6.14	6.99	6.60
喹硫平有关化合物 B 与喹硫平有关化合物 G 之间的分离度，NLT 3.0	24.49	24.32	19.88
喹硫平专论中的标准品溶液要求			
喹硫平拖尾因子，NMT 2.0	0.95	0.99	0.98
喹硫平 RT RSD，NMT 5%	0.01	0.01	0.01

表 6 显示了成本节约计算器，其中考虑到所描述的喹硫平有机杂质分析方案。当方法转移至 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统时，您可以针对自己的分析添加成本、假设和方法设置，以计算潜在的节省。对于常规液相色谱系统，采用 USP 专论中描述的喹硫平有机杂质分析方法，每次进样的总成本为 74.40 美元。更换为 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统并将方法转移至 2.1 × 100 mm, 2.7 µm 色谱柱后，每次进样的总成本为 63.84 美元。

根据表 6 中应用的成本和假设，可以计算出盈亏平衡点为 990 次进样或 10 个月，此时节省的成本将与购置 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统的较高投资成本（与传统液相色谱系统相比）相抵消。

实现可持续运营是有助于任何现代实验室盈利的另一个重要因素。采用新修订的 USP <621> 方法，UHPLC 及其提供的更高效的色谱法现在甚至可以应用于 QC 实验室的现有方法。可实现溶剂消耗量大幅减少 85.9% 且分析时间缩短近 50%。更换旧款设备还可以减少分析实验室的仪器体积，并可能对能耗等因素产生积极影响^[3]。

结论

本应用简报介绍了根据 USP 章节 <621>，将用于分析喹硫平及其有机杂质的 USP 方法转移至 UHPLC 条件。新开发的 UHPLC 方法可节省多达 85.9% 的溶剂和 48.5% 的分析时间。对于 QC 实验室，这提供了在色谱分析中保持分析确定性的同时实现实验室运营额外目标（即节约成本）的可能性，并提供了为全公司可持续性目标作出贡献的机会。

将在标准 USP 条件下运行的旧款 Agilent 1100 系列液相色谱系统更换为在 UHPLC 条件下运行的 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统，可在 990 次进样后收回新仪器增加的投资。此外，即使在 QC 条件下，通过减少溶剂用量和分析时间所实现的环境足迹的大幅减小也符合绿色化学的 12 项原则^[4]。

表 6. 用于分析喹硫平的有机杂质的交互式成本节约计算器。在成本节约计算器中输入您自己的成本、假设和方法设置，了解 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统如何帮助您节省特定分析的费用

常规设置	
每升溶剂成本	
每升废液成本	
每年每名操作人员的人工成本	
线性折旧（年）	
每年额外的实验室费用	
每日运行小时数	
每周运行天数	
每年运行周数	
每年所需的进样次数 (包括空白、标准品等)	

仪器设置	传统 LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC
仪器成本		
每年正常运行时间		
每台仪器每年维护费用		
每根色谱柱的成本		
色谱柱寿命：进样次数		
每台仪器的操作人员人数		
每次进样的消耗品成本 (例如样品瓶、瓶盖、过滤器、注射器等)		

方法设置	传统 LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC
运行时间（包括色谱柱清洗和平衡）		
流速		

进样和仪器	传统 LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC
每年最多进样次数		
所需的仪器数量		

财务视图	传统 LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC
仪器成本		
维护成本		
色谱柱成本		
消耗品成本		
溶剂成本		
废液成本		
其他实验室费用		
操作人员成本		
年度运行总成本		
每次进样的总成本		

盈亏平衡计算	Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪
进样次数	
月数	

可持续性视图	传统 LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC
使用的溶剂体积		

参考文献

1. United States Pharmacopeia General Chapter <621> Chromatography. The National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1 Dec 2020

2. United States Pharmacopeia USP Monograph on Quetiapine. The National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1 Jan 2023
3. Rieck, F. Do You Know the Environmental Impact of Your HPLC? (您清楚 HPLC 对环境的影响吗?) 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-2335EN, 2022

4. Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice; Oxford University Press, 1998.

www.agilent.com

DE41656484

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 7 月 28 日，中国出版
5994-6126ZHCN

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

