

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

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

根据新修订的美国药典 (USP) 通则 <621> 指导原则，将原始 USP 专论 HPLC 方法中碘海醇相关化合物的 HPLC 分析方法转移至 3.5 和 1.8 μm 的较小粒径 Agilent ZORBAX 色谱柱。原始方法使用 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm 色谱柱进行梯度分离，分析时间为 60 分钟。将方法转移至 Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 $\times$ 150 mm, 3.5 μm 色谱柱时，分析时间从 60 分钟缩短为 25 分钟（分析时间缩短 58%，溶剂消耗量减少 75%）。此外，当方法转移至 Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μm 色谱柱时，分析时间从 60 分钟缩短为 8.6 分钟（分析时间缩短 86%，溶剂消耗量减少 92%），且无需重新进行方法验证。转移以后的分析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配制产品的 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旧款色谱柱技术。由于这些色谱柱的柱效较低，因此通常需要较长的色谱柱（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。分析人员还需要对现有的 USP 方法进行现代化，而不进行任何需要重新验证的重大变更。对于等度方法，先前的 USP <621> 仅允许将方法从传统的 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）色谱柱和表面多孔颗粒（SPP）色谱柱同时对梯度方法进行现代化^[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 色谱柱分析碘海醇相关化合物的原始检测方法^[2]转移至较小粒径色谱柱。首先在 5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上运行原始方法，然后转移至 3.5 或 1.8 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱。

实验部分

仪器与材料

对于 5 µm 和 3.5 µm 色谱柱，使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统以及 0.17 mm 管线，对于 1.8 µm 色谱柱，使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统以及 0.12 mm 管线。表 1 列出了仪器配置。

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。根据 USP 碘海醇专论制备系统适用性溶液。

使用的色谱柱如下：

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm（货号 880975-902）
- Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 µm（货号 883975-302）
- Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm（货号 858700-902）

表 1. 仪器配置

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112B)	安捷伦 4 位/10 通阀, 600 bar (货号 5067-4279)
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	安捷伦样品瓶, 螺口, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL (货号 5182-0716) 安捷伦瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫 (货号 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)	Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接热交换器, 标准 (G7116-60015) 加热器和色谱柱: Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头组件, 105 mm, 0.17 mm (货号 5067-6166)
Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)	安捷伦流通池, 10 mm, 13 µL (货号 G1315-60022)
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	安捷伦流通池, 10 mm, 13 µL (货号 G1315-60022) 安捷伦长寿命氙灯 (货号 2140-0820)
Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)	Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换阀头, 4 位/10 通阀, 1300 bar (货号 5067-4233)
Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)	安捷伦样品瓶, 螺口, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL (货号 5182-0716) 安捷伦瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫 (货号 5182-0717)
Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)	Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接热交换器, 标准 (G7116-60015) 加热器和色谱柱: Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头组件, 105 mm, 0.12 mm (货号 5067-5957)
Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)	Agilent InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (货号 G4212-60008) 安捷伦长寿命氙灯, 40 Hz (货号 5190-0917)
Agilent OpenLab CDS, C.01.10 版	

结果与讨论

之前，根据允许的调整指导原则，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 µm 与 2.6 µm）都需要进行重新验证^[3]。然而，2022 年 12 月发布的新修订的 USP <621> 指导原则允许将梯度方法从 TPP 色谱柱调整为 TPP 色谱柱，前提是取代基的性质不变，且固定相的其他理化特性（即色谱固定相、表面改性和化学修饰程度）相似。如果 L/dp 比值保持恒定或在规定 L/dp 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。

在本应用简报中，使用与 ZORBAX SB-C18 相同的固定相分析碘海醇中的相关化合物。L/dp 比的允许范围为 37500–75000。小尺寸 ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm (42875) 和 ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (55555) 色谱柱的比值均在该范围内。

在本应用简报中，粒径发生了改变。因此需要调整流速，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：

- $$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2) / (dp_2 \times dc_1^2)]$$
 - 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。根据下面的公式，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})：

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

随着色谱柱尺寸的变化，可使用以下公式调整进样量：

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

原始方法条件列于表 2。使用 ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱运行原始方法，然后转移至 ZORBAX SB-C18, 3 × 150 mm, 3.5 μm 色谱柱。两种方法均在配备二元泵的 1260 Infinity II 系统上运行。尽管 ZORBAX SB-C18, 3 × 150 mm, 3.5 μm 色谱柱的粒径和内径较小，但配备二元泵的 1260 Infinity II 液相色谱系统仍适用于该方法。如果将该方法转移至 ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱，峰体积将显著减小；因此，需要大幅减小柱外体积和延迟体积。因此，使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱运行该方法。

3.5 μm 色谱柱和 1.8 μm 色谱柱的分析时间分别缩短了 58% 和 86%，流动相消耗量分别减少了 75% 和 92%。显然，使用所述方法能够提高实验室工作效率和样品通量。使用 5 μm 色谱柱以及 3.5 和 1.8 μm 色谱柱时的梯度条件见表 3。如表 4 所示，所有色谱柱的系统适用性均符合要求。

表 2. 用于碘海醇中相关化合物分析的原始液相色谱方法条件

参数	相关化合物分析方法的值	
色谱柱	L1: 4.6 × 250 mm	
流动相	A: 水 B: 乙腈	
梯度	时间 (min)	B%
	0	1
	60	13
流速	1.0 mL/min	
柱温	未指明	
进样量	10 μL	
检测器	254 nm	

表 3. 三种不同粒径色谱柱的梯度条件

色谱柱	流速 (mL/min)	梯度	进样量 (μL)	高容量柱温箱 (°C)	二极管阵列 检测器
Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm (货号 880975-902)	1.0	时间 (min) %B 0 1 60 13	10	25	254 nm, 5 Hz
Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm (货号 863954-302)	0.6	时间 (min) %B 0 1 25 13	3	25	254 nm, 10 Hz
Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (货号 858700-902)	0.58	时间 (min) %B 0 1 8.6 13	1	25	254 nm, 40 Hz

表 4. 系统适用性总结

参数	保留时间	分离度	峰面积
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 ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm	9.91–12.61 min	44.0	0.55%
Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	3.34–4.25 min	40.7	0.56%

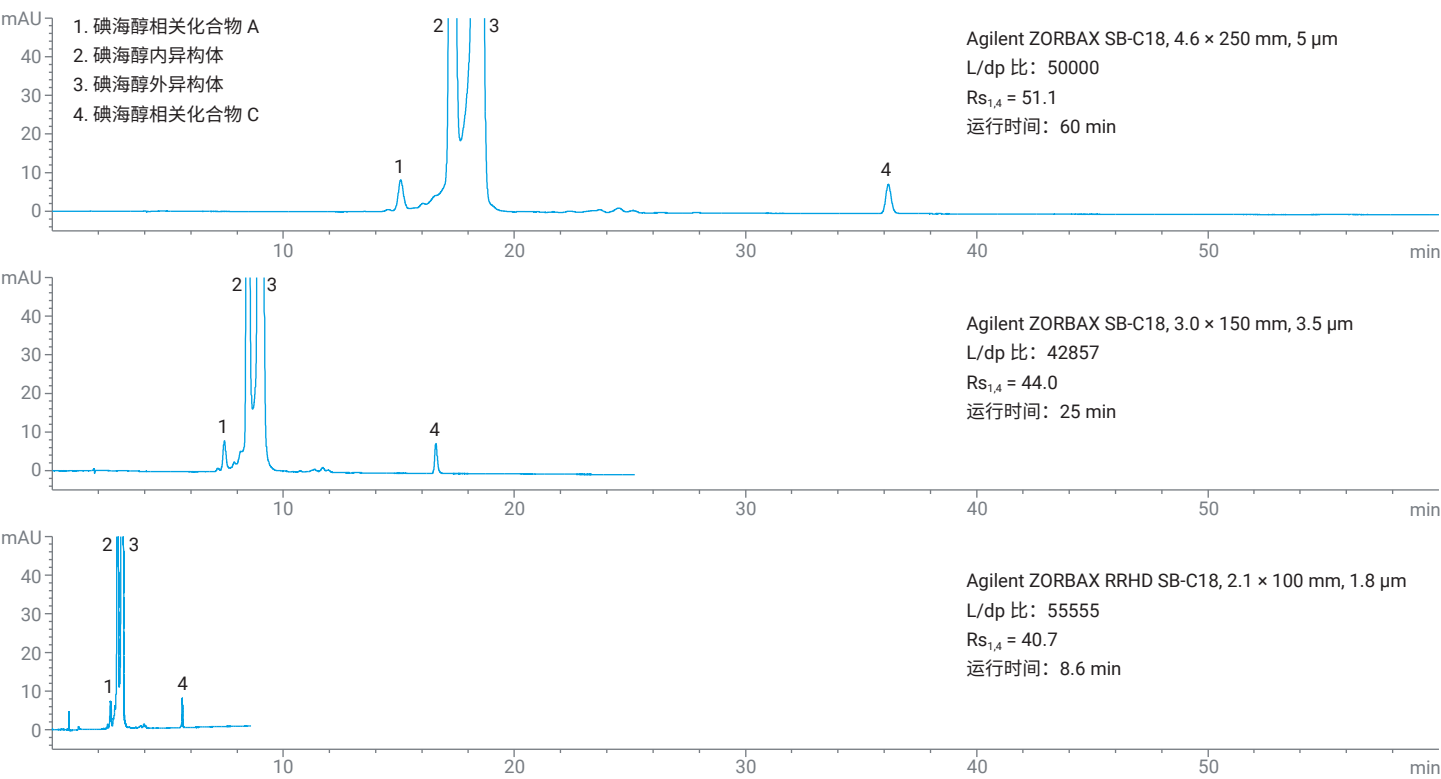


图 1. 使用三种不同粒径色谱柱分析碘海醇中相关化合物的系统适用性解决方案色谱图

结论

在 L/dp 比为规定值 -25% 至 50% 的条件下，成功地将使用常规 5 μm TPP 色谱柱分析碘海醇相关化合物的 USP 方法转移至较小粒径的色谱柱。使用粒径较小、柱长较短色谱柱的方法提供了相似或更好的结果，同时显著缩短了分析时间并减少了流动相用量。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. 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

DE12524595

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 27 日，中国出版
5994-6544ZHCN