

将 USP 苯佐卡因含片分析方法轻松转换为使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱

作者

William J. Long
安捷伦科技有限公司

摘要

使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 和 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱展示了 USP 苯佐卡因含片分析方法的转移。初始方法使用 5 μm 4.6 $\times$ 250 mm 色谱柱，分析时间为 15 分钟。使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 $\times$ 150 mm、4.6 $\times$ 100 mm 和 4.6 $\times$ 75 mm, 2.7 μm) 时，分析时间相比原始方法缩短 40%–70%，且无需重新验证或改变流速。监测压力，将其视为转换仪器的一个考虑因素。

前言

制药公司通常采用美国药典 (USP) 方法来检测原辅料和成品。成功实施 USP 方法并确保其可在仪器间转移是提高日常分析通量的关键步骤。有效的方法转移可确保相同分析获得一致的结果，而不受实验室、仪器和特定方法资源的影响。通过确保方法在实验室间成功转移，制药公司能够在更多实验室使用相同的方法或与合同研究组织 (CRO) 或合同生产组织 (CMO) 等合作伙伴共享方法。将基于 HPLC 的 USP 方法转换为 UPLC 技术，为此类组织提供了更多机会来减少分析时间、实现效率目标，同时确保可靠、高质量的色谱分离，这是决定产品质量的基础。UHPLC 技术在提高通量、改善质量和降低成本方面为 QC 和生产工厂提供了显著优势。

在 USP <621> 通则章节允许范围内对色谱分析进行调整，可降低与药物检测相关的成本。这些成本与色谱溶剂用量和分析时间相关。这两项考虑因素中，时间最为重要。

本应用简报中，在允许范围内对 USP 中的现行苯佐卡因含片分析方法进行了调整，以使用表面多孔颗粒填料色谱柱来提高样品通量。

与药物测试相关的成本高昂，许多明智的实验室管理人员仍在实验室中使用 LC 仪器，并设法通过减少溶剂用量和提高效率来降低成本。USP 药典方法广泛用于药品和原辅料检测。尽管这些方法的现代化水平已有所提升，但仍可以利用更新的技术加以改进。

苯佐卡因是对氨基苯甲酸 (PABA) 的乙酯。它是一种局部麻醉剂，常用作局部止痛药或止咳药。它经常出现在许多非处方药品中。USP 含片分析方法使用 5 µm C8 或 L7 色谱柱。

苯佐卡因的化学结构如图 1 所示，其 IUPAC 名称为对氨基苯甲酸乙酯。

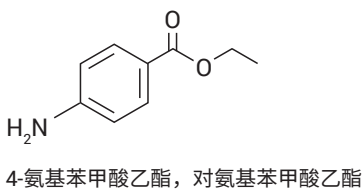


图 1. 苯佐卡因的结构

使用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱可以在传统 LC 仪器上实现更高的性能。这

款色谱柱装填有 2.7 µm 表面多孔颗粒填料，可以以更短的柱长提供 faster 的分析速度和更高的分离度，从而在现有仪器上用更少的时间检测更多的样品。该色谱柱具有多种固定相，包括 L1 (C18)、L7 (C8)、L11 (苯基)、L10 (氰基) 等。本研究采用 L7 固定相 (InfinityLab Poroshell 120 EC-C8)。

实验部分

在整个实验过程中，Agilent 1260 Infinity II LC 均使用 0.17 mm 管线。表 1 列出了相应的详细信息。

USP 级磷酸二氢钾和磷酸购自 Sigma-Aldrich。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson HPLC 认证级)。实验用水为 Millipore Milli-Q 系统 (0.2 µm 滤膜过滤，18 MΩ) 现场制得。USP 苯佐卡因 RS 购自美国药典。根据 USP 方法，配制 1.0 mol/L 磷酸二氢钾溶液，用磷酸调节至 pH 3.0，得到缓冲液。流动相为乙腈、水和缓冲液 (250 mL:500 mL:50 mL) 的混合溶液。

表 1. 仪器配置

Agilent 1260 Infinity II LC	
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7117B)	
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	- 样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL，100/包 (部件号 5182-0716) - 瓶盖，螺口，蓝色，PTFE/红色硅橡胶隔垫，100/包 (部件号 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT; G7116A)	- 标准气流加热器 G7116-60015 - 加热器和色谱柱：Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接组件，105 mm，0.12 mm (部件号 5067-5961)
Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 FS (G7117A)	- 10 mm 1 µL 流通池 (G4212-60008) - 40 Hz
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	

根据 USP 流程，制备两种稀释剂：指定稀释剂 A 和稀释剂 B。稀释剂 A 由 0.1 mol/L 盐酸组成，用 1 升水稀释 8.3 mL 37% HCl 配制而成。稀释剂 B 为 1:1 的乙腈:水溶液。用稀释剂 A 溶解标准品，得到 0.01 mg/mL 标准溶液 A；用稀释剂 B 溶解标准品，得到 0.01 mg/mL 标准溶液 B。这些标准溶液用于系统适用性测试和校准。方法条件见表 2^[1]。

本实验使用的色谱柱：

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 250, 5 µm（部件号 959990-906）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm（部件号 693975-906）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695975-906）
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 75 mm, 2.7 µm（部件号 697975-906）

结果与讨论

表 3 列出了在无需进行方法验证的情况下，USP 方法中允许的调整。允许调整的一个示例是 L/dp 规则。色谱柱长度与粒径之比在 -25% 至 +50% 范围内保持不变。由于色谱柱的柱效几乎保持不变，所以并未创建新方法。我们的目的不是创建更高效的方法，而是更快速的方法。如果未重新验证，则不能对检测进行任何调整。流动相未做任何调整。在精密度和检测限保持不变的情况下可以调整进样，并且进样量可以按比例减少。精密度是分析方法中的一项重要标准。

表 2. 初始液相色谱方法条件

参数	值
色谱柱	L7, 4.6 × 250 mm, 5 µm (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8)
缓冲液	用磷酸将 1.0 mol/L 磷酸二氢钾滴定至 pH 3.0
流动相	预混合（乙腈:水:缓冲液 200:750:50）
流速	1.5 mL/min
运行时间	约 15 分钟
温度（色谱柱）	25°C
进样量	20 µL（对于小粒径色谱柱成比例减少）
样品浓度	使用稀释剂 A 或稀释剂 B 溶液配制的 0.01 mg/mL USP 苯佐卡因 RS
检测器	UV: 280 nm
系统适用性要求	拖尾因子：不超过 1.5% 相对标准偏差：不超过 2.0%

表 3. USP 通则 <621> 允许的调整汇总

系统适用性参数	USP37-NF32S1	
	等度	梯度
填料粒径	L/dp: -25% 至 +50% 或 N: -25% 至 +50%	不允许变化
柱长		
色谱柱内径	灵活，线速度相等	不允许变化
流速	根据粒径 (dp) 调整: $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 其他调整: ±50%，假设 N 降低 ≤ 20%	不允许变化
进样量	在精密度和检测限保持一致的范围内调整	在精密度和检测限保持一致的范围内调整
柱温	±10 °C	±10 °C
流动相 pH	±0.2 个单位	±0.2 个单位
盐浓度	在 ±10% 范围内（只要在 pH 值变化的允许范围内）	在 ±10% 范围内（只要在 pH 值变化的允许范围内）
流动相的组分比	小比例组分 (≤ 50%): 相对值的 ±30%，但不能超过绝对值的 ±10%；只能在三元混合物中调整一种小比例组分	不允许变化*
紫外-可见检测器波长	不允许变化	不允许变化

* 在 <621> 中未规定，假设不允许变化

本方法使用的原始色谱柱为 250 mm (250000 μm), 5 μm 色谱柱。该色谱柱的 L/dp 计算值为 50000。表 4 显示了使用 5 μm 和 3.5 μm 全多孔颗粒 (TPP) 色谱柱以及 4 μm 和 2.7 μm 表面多孔颗粒 (SPP) 色谱柱可以实现的一系列 L/dp 组合。对 TPP 和 SPP 色谱柱进行相同的 L/dp 计算。按照 -25% 至 +50% 的 L/dp 规则, 并使用 50000 作为基数, 当比值范围在 37500–75000 之间时, 表示该调整可以接受, 无需重新验证。根据 L/dp 规则, 可以考察因调整而实现的节省程度。不改变流速的情况下, 该方法可以节省时间和溶剂: 使用 4 μm 250 mm 色谱柱, 不会节省时间或溶剂。相比之下, 使用 4 μm 150 mm、3.5 μm 150 mm 或 2.7 μm 150 mm 色谱柱可节省 40% 的时间和溶剂。2.7 μm 100 mm 色谱柱过短且 L/dp 偏低, 根据 L/dp 规则, 未重新验证的情况下无法使用。可能的组合已在表 4 中突出显示。基于这些计算和提高通量的愿望, 选择 4.6 $\times$ 150 mm, 4 μm 和 2.7 μm SPP InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱进行评估。按比例减少进样量后, 观察到分析速度更快且节省了色谱溶剂, 分析物保留时间缩短至 6.4 分钟甚至更短。使用 InfinityLab Poroshell 2.7 μm 150 mm 色谱柱时压力为 421 bar, 在该仪器上能够正常运行, 但可能不适用于一些旧款仪器。然而, 使用 4 μm , 150 mm 色谱柱运行该方法时压力为 264 bar。色谱图如图 2 所示。

表 4. 可能的 L/dp 组合

L/dp (μm)	5	4	3.5	2.7
250	50000	62500	71429	92593
150	30000	37500	42857	55555
100	20000	25000	28571	37037
75	15000	18750	21428	27778
50	10000	12500	14285	18519

按照 -25% 至 +50% 的 L/dp 规则, 并使用 50000 作为基数, 当比值在 37500–75000 范围之间时, 则可以接受。橙色突出显示的部分为此规则下允许的调整。

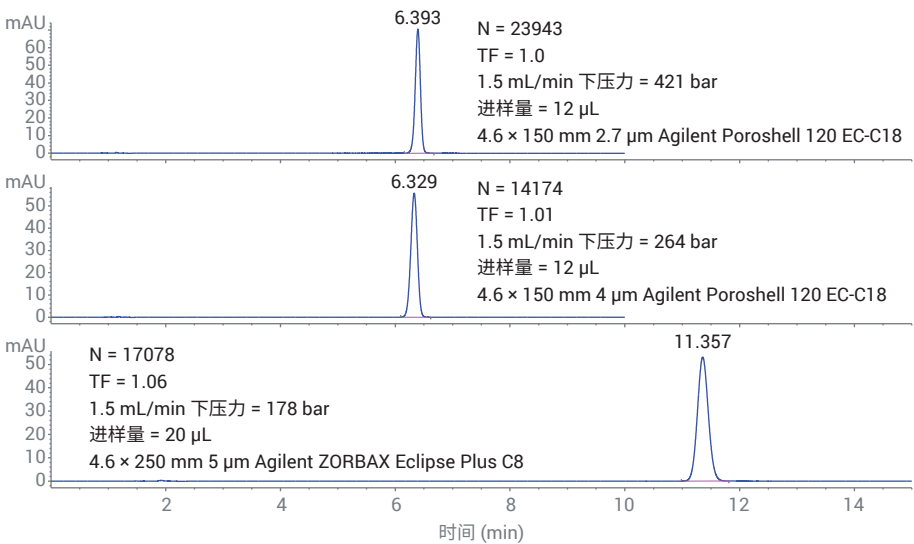


图 2. USP 苯佐卡因含片: 采用 L/dp 规则, 由 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 转换为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8

值得注意的是，2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱生成的 N 约为 24000 或 160000 N/m。该计算值表明，该方法使用较短的 100 mm 或 75 mm 色谱柱可以满足 N -25% 至 +50% 的规则。比较的基础是原始色谱柱 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm) 与方法中的分析物。N 规则的范围为 12808–25617。图 3 比较了 2.7 μm , 75 mm 和 100 mm 色谱柱的色谱图。100 mm 色谱柱在 315 bar 时 N = 18325，而 75 mm 色谱柱在 263 bar 时 N = 14065。两种色谱柱都满足 N -25% 至 +50% 的规则。此外，使用更短的色谱柱可以节省更多的时间和色谱溶剂^[2]。

表 3 的汇总信息显示了在 L/dp 比值满足 -25% 至 + 50% 的限值范围或 N 满足 -25% 至 + 50% 的条件时，可以对粒径和色谱柱长度进行的调整。

表 5 汇总了实验结果，并给出了节省的时间。可以观察到，4.6 $\times$ 75 mm 色谱柱可以在运行原始色谱柱的仪器上轻松运行，并且节省了 70% 的时间和色谱溶剂，而且无需重新验证。使用 N -25% 至 + 50% 规则进行的调整显示了 SPP 色谱柱的实际优势。

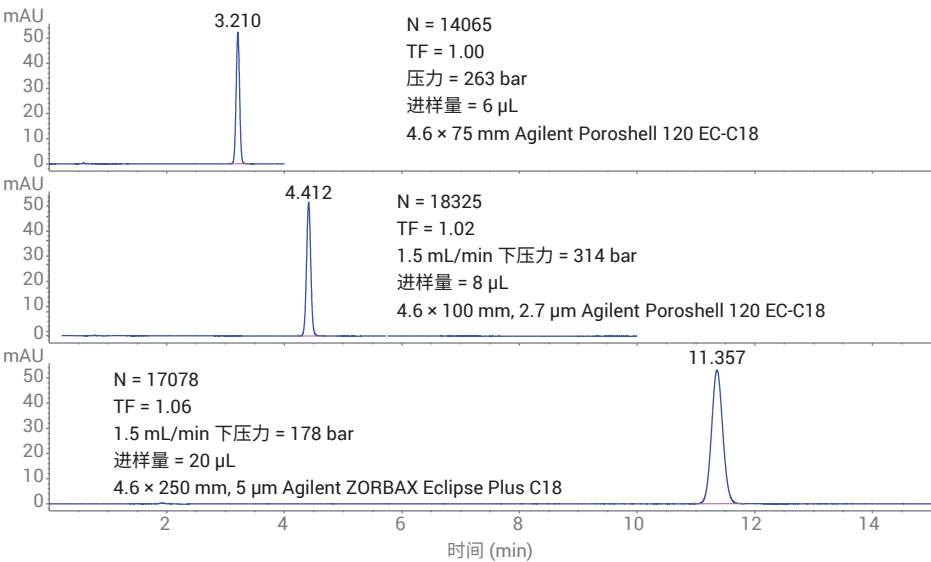


图 3. USP 苯佐卡因含片：采用 N 规则，由 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 转换为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 4.6 $\times$ 75 或 100 mm 2.7 μm

系统适用性要求是调整是否可接受的评判标准。对于苯佐卡因含片分析，该方法使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 4.6 $\times$ 75 mm, 2.7 μm 色谱柱可以将分析时间从原始方法的 15 分钟缩短到 4.5 分钟。除了提高效率外，溶剂消耗量也减少了 70%。这是采用 75 mm InfinityLab Poroshell 120 2.7 μm 色谱柱的方法的典型优势。使用苯佐卡因含片方法的系统适用性要求分别使用稀释剂 A (0.1 mol/L

盐酸) 和稀释剂 B (乙腈和水 (1:1)) 制得的 0.01 mg/mL 溶液分别进行。结果符合拖尾因子不超过 (NMT) 1.5、RSD 不超过 2.0% 的要求，如表 6 所示。系统适用性数据 (RSD $\leq$ 2) 通常使用 5 张色谱图得到。如果运行时间为 15 分钟，则至少需要等待 75 分钟才能进样实际样品。使用更快的基于 2.7 μm SPP 色谱柱的 75 mm 方法时，只需要 27 分钟。

表 5. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱上苯佐卡因分析的 USP 调整结果汇总

色谱柱	柱长 (L, mm)	粒径 (dp, μm)	L/dp 比	L/dp 容许范围 (-25% 至 +50%)	N 苯佐卡因 标样	N 容许范围 (-25% 至 +50%)	时间节省 %	压力 (bar)
ZORBAX Eclipse Plus C8	250	5	50000	37500–75000	17078	12808–25617		176
Poroshell 120 EC-C8	150	4	37500	满足指标要求	23943	无需检查	40%	264
Poroshell 120 EC-C8	150	2.7	55555	满足指标要求	14174	无需检查	40%	421
Poroshell 120 EC-C8	100	2.7	37037	不满足指标要求	18325	满足指标要求 (+7%)	60%	314
Poroshell 120 EC-C8	75	2.7	27778	不满足指标要求	14128	满足指标要求 (-17%)	70%	287

结论

使用 2.7 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 表面多孔色谱柱可提高速度、节省溶剂，并且无需更换仪器，使用全多孔 5 μm 色谱柱进行药典分析的实验室可因此受益。也许更重要的是，所述的方法使实验室经理能够灵活地将工作分配至实验室中的任何仪器。更短的分析时间有助于提高通量，进而提高实验室效率。在允许范围内对这些较短的色谱柱进行调整，无需进行额外的验证。在本实验中，表面多孔色谱柱可比 5 μm 色谱柱更快获得结果，在轻松满足系统适用性要求的同时可提高实验室效率。

参考文献

1. USP Benzocaine Lozenge Method, *United States Pharmacopeia* **2020**, 42(4), Rockville, MD
2. USP General Chapter 621, USP 37-NF32, First supplement

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

DE44279.0580439815

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，2021
2021 年 4 月 5 日，中国出版
5994-3221ZHCN

表 6. 系统适应性测试结果和分析时间汇总

	系统适用性要求	Agilent Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 75 mm, 2.7 μm 1.5 mL/min 标样 A		Agilent Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 75 mm, 2.7 μm 1.5 mL/min 标样 B	
USP 拖尾因子	不超过 2.0%	1.0		1.0	
相对标准偏差	不超过 2.0%	峰面积	0.3%	峰面积	0.3%
		保留时间	0.3%	保留时间	0.2%