

在美国药典萘普生钠片剂分析方法的允许调整范围内进行分析

作者

William J. Long
安捷伦科技有限公司

摘要

使用 Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8 和 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱展示了 USP 萘普生分析方法。使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 × 75 mm 和 4.6 × 50 mm, 2.7 μm) 和 ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱 (4.6 × 100 和 4.6 × 75 mm, 3.5 μm) 时, 分析时间缩短至原始方法的 22%, 且无需使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 50 mm 色谱柱进行重新验证。

前言

制药公司通常采用美国药典 (USP) 方法来检测原料和成品。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 UHPLC 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。这些成本可体现在色谱溶剂用量和分析时间上。这两项考虑因素中，时间最为重要。

随着 USP 提供更多标准，萘普生杂质和萘普生片剂的分析方法也有所更新。并且，片剂分析方法和杂质分析方法可在相同色谱柱上进行。本应用简报中，在允许范围内对 USP 发布的方法进行了调整，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。

萘普生是一种非甾体类抗炎药 (NSAID)，可作为常规片剂购买。此药品于 1967 年获得专利，尽管在全球许多地方其仍然是处方药，但美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 1994 年批准其为非处方药 (OTC)。过往，USP 片剂分析方法使用 5 μ m C18 或 L1 色谱柱，但最近已修订为 5 μ m C8 或 L7 色谱柱，流动相仍然相同。

萘普生钠的化学结构如图 1 所示，IUPAC 名称为 (S)-6-甲氧基- α -甲基-2-萘乙酸钠盐。

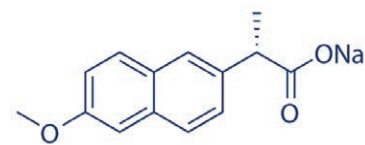


图 1. 萘普生钠化学结构

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 μ m 表面多孔颗粒填料，可以以更短的柱长提供更快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 列出了详细信息。

表 1. 仪器配置

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7117B)	
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	<ul style="list-style-type: none">• 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 大容量柱温箱 (MCT; G7116A)	<ul style="list-style-type: none">• 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)	<ul style="list-style-type: none">• 10 mm 1 μL 流通池 (G4212-60008)• 80 Hz
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	

新鲜冰乙酸为 ACS/USP 级，购自 VWR。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 萘普生钠 RS 购自美国药典。按照 USP 方法混合乙腈、水和冰乙酸 (500 mL:490 mL:10 mL), 制备流动相。

使用不少于 20 片片剂制得 1.0 mg/mL 储备溶液, 用于制备样品。片剂含量约为 220 mg/片, 20 片将获得 4400 mg, 因此仅使用部分研磨至细粉的片剂配制储备液。将约 100 mg 片剂粉末转移到 100 mL 容量瓶中, 并加入 15 mL 水以配制储备液。将容量瓶超声处理 5 分钟, 然后加入 50 mL 制备好的流动相 (乙腈、水和冰乙酸 500 mL:490 mL:10 mL)。进一步超声处理 30 分钟, 间隔振荡容量瓶。待容量瓶冷却后, 加入流动相至容量瓶刻度线。取一部分样品溶液离心 5 分钟。然后将 1 mL 样品转移到 10 mL 容量瓶中, 并用流动相稀释, 制得 0.1 mg/mL 溶液^[1]。

本实验使用的色谱柱

- Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6 × 150, 5 μm (部件号 993967-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 75 mm, 2.7 μm (部件号 697975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 699975-906)
- Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm (部件号 959961-906)

- Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8, 4.6 × 75 mm, 3.5 μm (部件号 959933-906)

结果与讨论

表 3 列出了 USP 方法中允许的调整, 无需进行方法验证。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。最后, 在精密度和检测限保持不变的情况下可以调整进样量, 并且进样量可以按比例减少^[2]。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 (Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8, 4.6 × 150 mm, 5 μm)
流动相	预混合 (乙腈:水:冰乙酸 450:540:10)
流速	1.2 mL/min
运行时间	萘普生保留时间两倍以上
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	0.1 mg/mL USP 萘普生钠 RS (溶于流动相), 样品相当于 0.1 mg/mL 萘普生钠
检测器	UV: 254 nm
系统适用性要求	拖尾因子: 不大于 2.0% 相对标准偏差: 不大于 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* *在 <621> 中未规定, 假设不允许变化
紫外-可见检测器波长	不允许变化	不允许变化

按照使用原始色谱柱的 USP 方法，在保留时间为 4.55 分钟且系统适用性要求不少于两倍保留时间的情况下，可以将分析时间控制在大约 9 分钟。L/dp 比值为 30000。另外，拖尾因子为 1.05，可轻松满足拖尾因子不大于 2.0 的要求。色谱图如图 2 所示。

将 L/dp 规则应用于装填有 2.7 μm 颗粒填料的 75 mm 色谱柱时，得到的比值为 27778，在 -25% 至 +50% 范围内。使用此规则，可以找到方法允许的调整，从而将分析时间缩短一半，并节省 50% 的流动相。进样量按比例减少为 10 μL（原始 20 μL 进样量的一半）。峰高与原始 5 μm, 150 mm 方法相当，拖尾因子为 1.03。色谱图如图 3A 所示。USP 认为小颗粒填料的最佳线速度更高，因此方法调整后的流速可按粒径比成比例增加，最高达到原始药典方法的 1.5 倍。这些调整遵循公式 1。

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%

公式 1.

该公式还可用于针对小粒径色谱柱进行调整。某些情况下，粒径变化可能表示流速会发生较大变化，但是增加量不会超过原始流速的 +50%。色谱图如图 3B 所示。F₁ 和 F₂ 代表初始和最终流速，dc 代表色谱柱内径，dp 为色谱柱粒径。

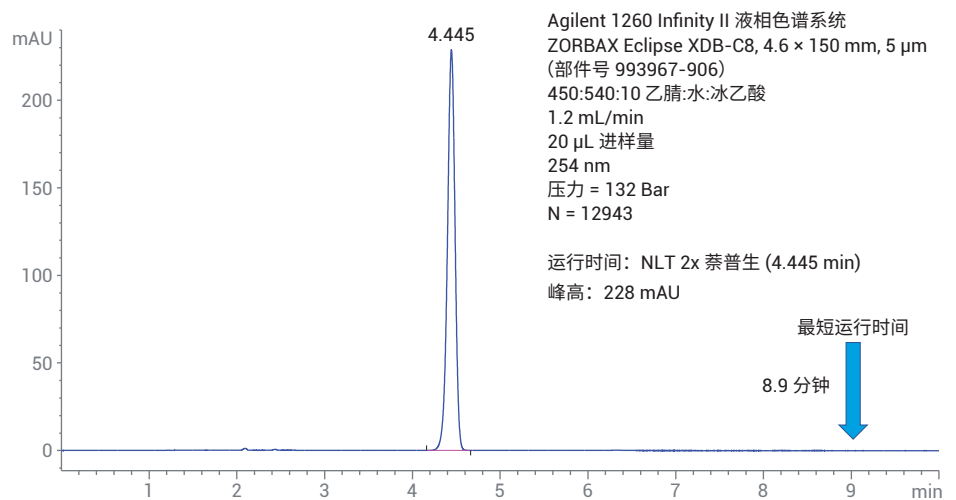


图 2. 使用 USP 方法等效色谱柱获得的萘普生钠色谱图

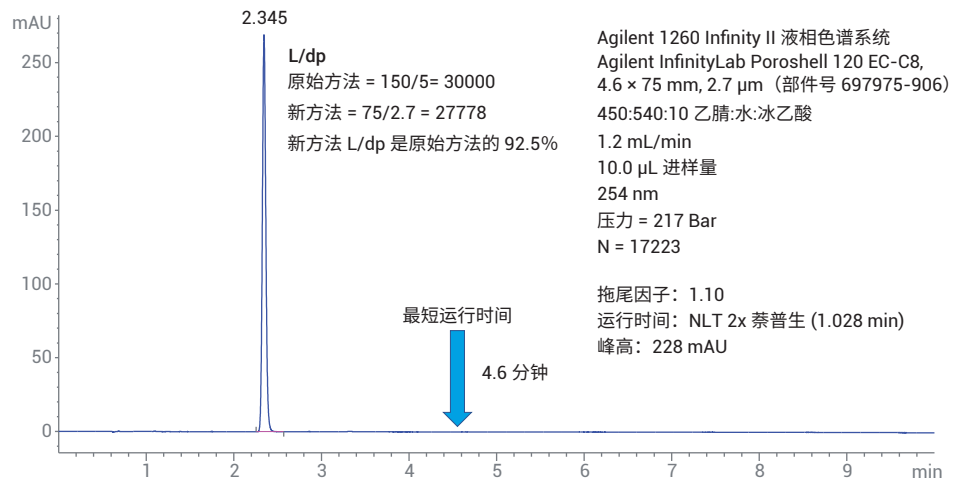


图 3A. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 2.7 μm) 在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

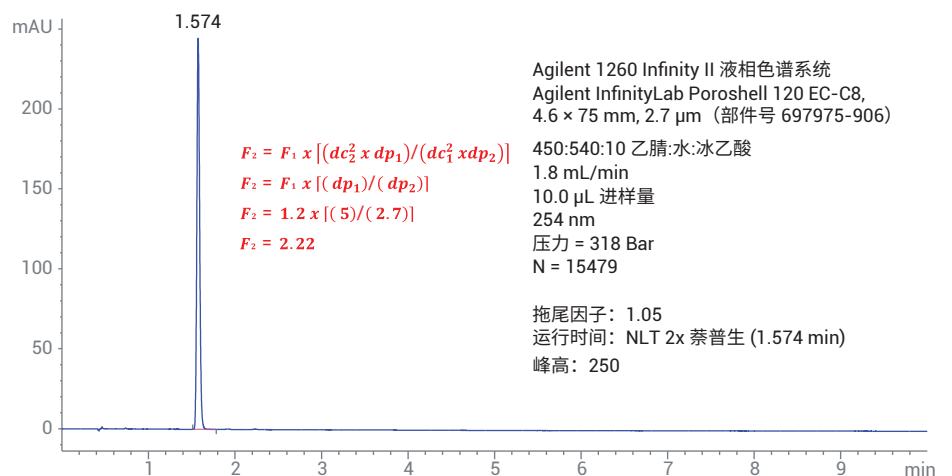


图 3B. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 2.7 μm) 在 1.8 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

表 4 列出了将方法从 5 μm , 150 mm 色谱柱调整为 2.7 μm , 75 mm 色谱柱时方法通量的提升。如结果所示, 在 1.2 mL/min 下通量提高了 48%, 1.8 mL/min 下通量提高了 64%。更换为 75 mm 短色谱柱后, 可节省 50% 的溶剂。

除 L/dp 比值外, 另一种方法是使用较短的色谱柱来保持方法的柱效。此规则通常适用于表面多孔色谱柱。对于粒径为 2.7 μm 的 50mm 色谱柱, 使用目标分析物 (萘普生) 测量色谱柱柱效。将其与 5 μm 粒径原始色谱柱的萘普生分析柱效进行比较。如果新的短色谱柱的柱效在原始色谱柱柱效的 -25% 至 +50% 范围内, 则该调整是可接受的, 并且仅需要进行方法验证。

图 4A 展示了使用 4.6 \times 50 mm 色谱柱在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图。由于色谱柱体积仅为原始指定色谱柱的三分之一, 因此进样量也相应减少。在本示例中, 柱效为 11697, 是原始 5 μm , 150 mm 方法的 90.4%。因此该解决方案可以接受。此外, 方法压力为 160 bar, 仅略高于原始方法的 132 bar。分析时间约为 3 分钟。此调整可以在原始方法基础上节省约 66% 的溶剂和 66% 的分析时间。拖尾因子为 1.03。如之前的示例所示, 流速最多可以增加至原始线性流速的 1.5 倍。图 4B 展示了使用 4.6 \times 50 mm 色谱柱在 1.8 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图。在此条件下, 运行时间为 2.1 分钟。溶剂节省量相同, 但相比原始方法节省了 76% 的分析时间, 压力为 244 bar, 完全在仪器性能范围内。

表 4. 萘普生钠测定中, USP 允许对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 \times 75 mm, 2.7 μm) 进行的调整

色谱柱	柱长 (L, mm)	粒径 (dp, μm)	L/dp 比	L/dp 容许范围 (-25% 至 +50%)	N 萘普生标样	时间节省 %	压力 (bar)
全多孔 C8 L7	150	5	30000	22500-45000	12943		132
表面多孔 C8	75	2.7	27778	满足指标要求	17223	48%	217 (1.2 mL/min)
表面多孔 C8	75	2.7	27778	满足指标要求	15479	64.7%	318 (1.8 mL/min)

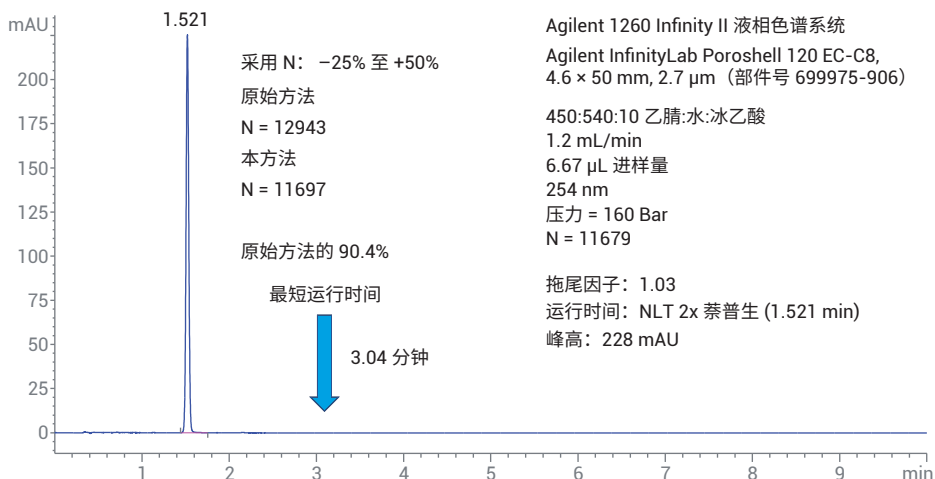


图 4A. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 \times 50 mm, 2.7 μm) 在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

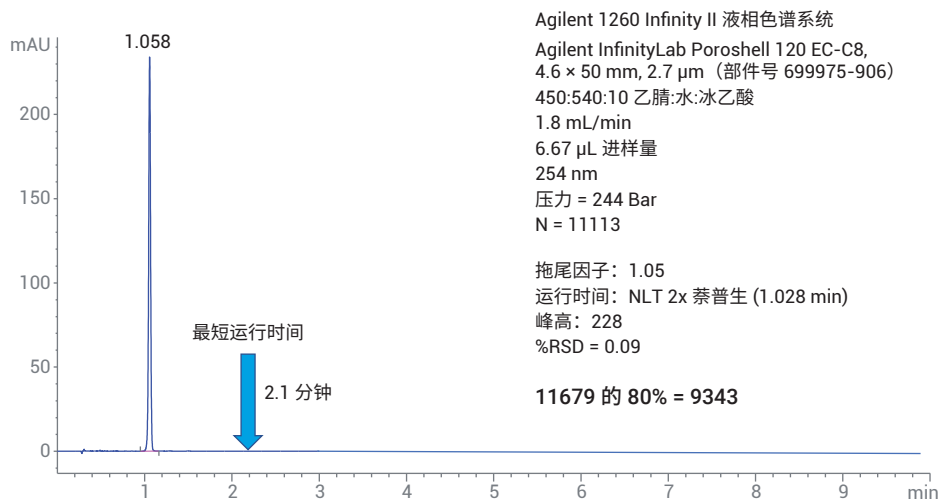


图 4B. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 \times 50 mm, 2.7 μm) 在 1.8 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

表 5 列出了将方法从 5 μm , 150 mm 色谱柱调整为 2.7 μm , 50 mm 色谱柱时方法通量的提升。如结果所示, 在 1.2 mL/min 下通量提高了 66%, 1.8 mL/min 下通量提高了 76%。更换为 50 mm 短色谱柱后, 可节省 66% 的溶剂。

此外, 与 3.5 μm 全多孔色谱柱进行了比较。在 1.2 mL/min 和 1.8 mL/min 流速下对 4.6 \times 100 和 4.6 \times 75 mm 色谱柱进行了评估。图 5A 展示了使用 4.6 \times 100 mm ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图。根据 L/dp 规则, 该色谱柱在允许的调整范围内。使用上述条件, 与原始方法相比, 可以节省 33% 的溶剂和分析时间。线性流速同样可提高到 1.8 mL/min。色谱图如图 5B 所示。对 4.6 \times 75 mm, 3.5 μm 色谱柱也进行了评估。这种情况不满足 L/dp 规则, 但是如果采用针对柱效的 $N = -25\%$ 至 $+50\%$, 该色谱柱在 1.2 mL/min 流速下属于允许范围内的调整。色谱图如图 5C 所示。分析时间和溶剂消耗均减少了 50%。系统压力与原始方法相同, 为 130 bar。但是, 当流速提高到 1.8 mL/min (200 bar) 时, 色谱柱的柱效降至 -25% 以下, 因此该解决方案不属于可接受的调整。色谱图如图 5D 所示。表 6 列出了比较结果。

表 5. 萘普生钠测定中, USP 允许对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 \times 50 mm, 2.7 μm) 进行的调整

色谱柱	柱长 (L, mm)	粒径 (dp, μm)	L/dp 比	L/dp 容许范围 (-25% 至 +50%)	N 萘普生标样	N 容许范围 (-25% 至 +50%)	时间节省 %	压力 (bar)
全多孔 C8	150	5	30000	22500-45000	12943			132 (1.2 mL/min)
表面多孔 C8	50	2.7	18518	不满足指标要求	11679	满足指标要求	66%	160 (1.2 mL/min)
表面多孔 C8	50	2.7	18518	不满足指标要求	11113	满足指标要求	76%	244 (1.8 mL/min)

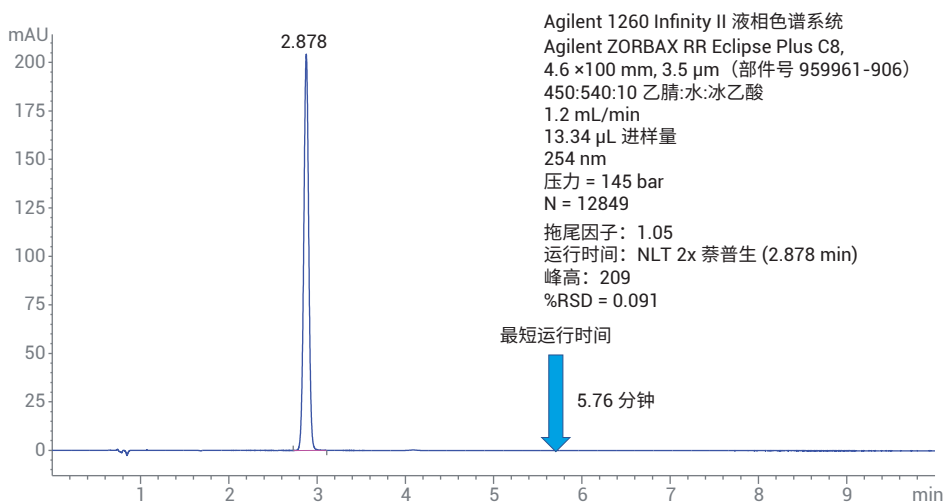


图 5A. 使用 Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱 (4.6 \times 100 mm, 3.5 μm) 在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

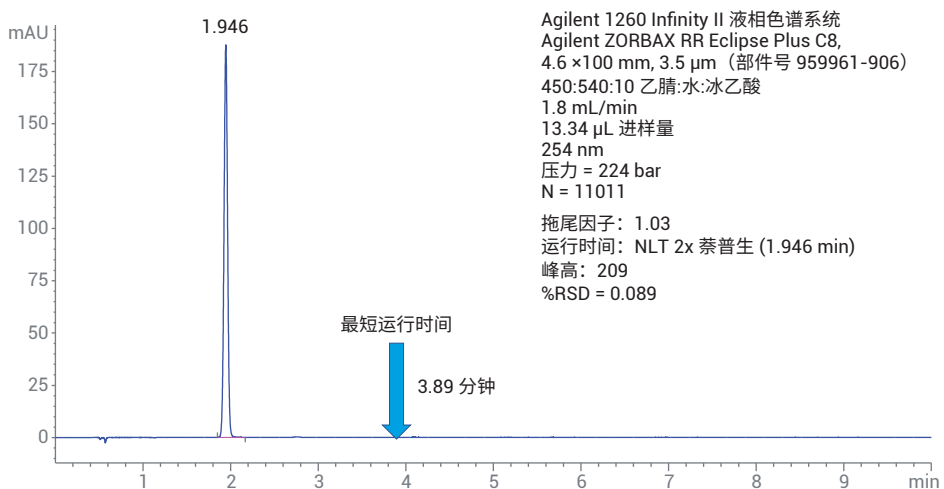


图 5B. 使用 Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱 (4.6 \times 100 mm, 3.5 μm) 在 1.8 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

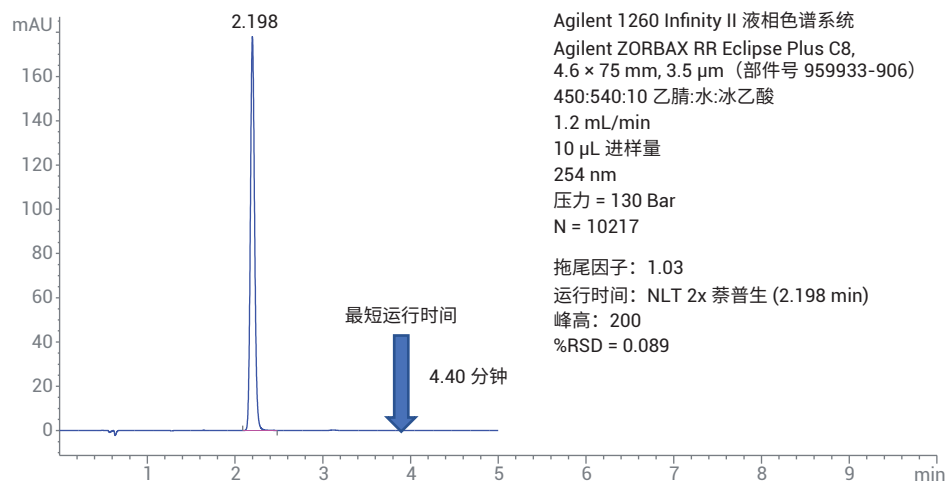


图 5C. 使用 Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 3.5 μm) 在 1.2 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

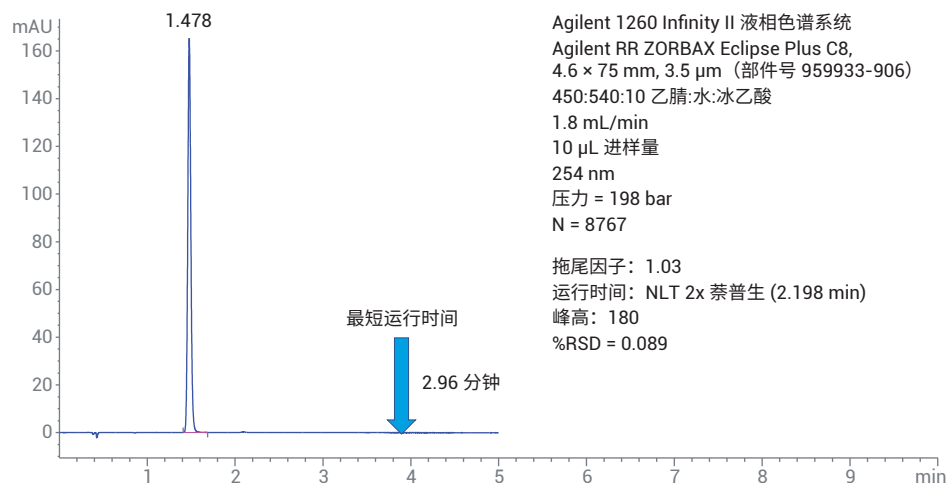


图 5D. 使用 Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C8 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 3.5 μm) 在 1.8 mL/min 流速下获得的萘普生钠色谱图

表 6. 萘普生钠测定中, USP 允许对 Agilent ZORBAX EC-C8 色谱柱 (4.6 × 100 和 75 mm, 3.5 μm) 进行的调整

色谱柱	柱长 (L, mm)	粒径 (dp, μm)	L/dp 比	L/dp 容许范围 (-25% 至 +50%)	N 萘普生标样	N 容许范围 (-25% 至 +50%)
全多孔 C8	150	5	30000	22500-45000	12943	9707-19414
全多孔 C8	100	3.5	28571	满足指标要求	12849	满足指标要求
全多孔 C8	100	3.5	28571	满足指标要求	11011	满足指标要求
全多孔 C8	75	3.5	21428	不满足指标要求	10217	满足指标要求
全多孔 C8	75	3.5	21428	不满足指标要求	8767	不满足指标要求

系统适用性要求是调整是否可接受的评判标准。对于萘普生钠测定，使用基于 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱的方法可将分析时间从原始方法的 10 分钟缩短到 2 分钟。除了提高效率，还节省了 66% 的溶剂。这是采用 50 mm InfinityLab Poroshell 120 2.7 μm 色谱柱的方法的典型优势。使用萘普生钠片剂分析方法时，系统适用性要求规定 RSD 不超过 (NMT) 2.0%。0.064% 的峰面积 RSD 以及 0.050% 的保留时间 RSD 可以轻松满足这一要求。此外，拖尾因子为 1.05，可轻松满足 USP 拖尾因子不超过 2.0 的要求。汇总结果如表 7 所示。

结论

使用 InfinityLab Poroshell 120, 2.7 μm 表面多孔色谱柱和 3.5 μm 全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。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，无需进行其他验证。在本实验中，表面多孔色谱柱可比 3.5 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。

表 7. 系统适用性测试结果和分析时间汇总

	系统适用性要求	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 (4.6 × 50 mm), 1.2 mL/min	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 (4.6 × 50 mm), 1.8 mL/min
USP 拖尾因子	NMT 2.0	1.03	1.03
RSD	NMT 2.0%	峰面积 = 0.046%	峰面积 = 0.064%
		保留时间 = 0.036%	保留时间 = 0.050%
运行时间 (2 × t _r)	标准溶液	3.042 分钟	2.056 分钟

参考文献

1. USP Naproxen Sodium Tablet Method, *United States Pharmacopeia* 42 (4) Proposed IRA, Rockville, MD **2017**
2. USP General Chapter 621, USP 37-NF32, First supplement

www.agilent.com

DE.9783217593

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, 2020
2020 年 5 月 14 日, 中国出版
5994-1972ZHCN

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

