

了解最新版本的 USP <621>

采纳修订后的指南：助力分析方法转移与液相色谱方法现代化

作者

Rongjie Fu, Manu Grover,
Rob Freeman 和 William Long
安捷伦科技有限公司

摘要

液相色谱方法的现代化是分析程序生命周期管理的关键。美国药典 (USP) 通则 <621> 允许进行方法调整和转移，使实验室更容易实现原始 USP 方法的现代化。2022 年 12 月生效的 USP <621> 修订版已根据行业需求进行了更新。USP <621> 修订版允许对梯度方法进行变更，以及将全多孔硅胶分析柱变更为基于表面多孔颗粒填料的色谱柱。在先前版本中则不允许这些变更。本白皮书概述了 USP <621> 的上述修订内容，并展示了分析方法现代化在提高实验室通量和节省运行成本方面的相关优点，包括几项案例研究。

前言

USP 的药典方法和**色谱法通则 USP <621>** 是分析人员检测活性药物成分 (APIs)、成品、辅料等的主要指南。这些药典方法旨在确保跨越不同时区、采用不同技术的各个实验室，在运行方法时均符合系统适用性参数要求。实验室环境的差异、技术变化、对旧专论进行现代化的需求以及生命周期管理等，都导致需要对这些药典方法进行修改，以实现系统适用性。因此，在这些场景下，USP <621> 起着举足轻重的作用。

当前，行业对从传统色谱柱和 LC 方法转移至现代色谱柱和 UHPLC 技术存在需求。USP 通则 <621> 中的指南为方法转移过程中满足系统适用性要求的允许调整，提供了更清晰的定义。USP <621> 修订版自 2022 年 12 月起生效，其已根据行业需求进行了重大更新。例如，它允许更改梯度方法，这在以前是不被允许的。

本白皮书概述了 USP <621> 的修订内容，并根据修订版 USP <621> 指南总结了 LC 方法转移的变更与标准。此外，还讨论了若干关于方法现代化的方法转移案例研究。通过将采用经典色谱柱技术的原始 USP 方法现代化为使用更小颗粒的更新技术，实验室分析效率和成本节约均取得了显著改善。

USP 药典方法

USP 拥有 200 多年历史，通过建立有助于确保质量和安全标准，在全球范围内成为了建立药品、膳食补充剂和食品信任的领军者。USP 与国家处方集 (NF) 以合订本 USP-NF 的形式出版。现行版本 USP-NF 2023 年第 1 期于 2023 年 5 月 1 日生效，收录超过 **4900 篇专论**，其中 APIs 专论约 1500 篇，辅料专论约 450 篇，制剂专论超过 2500 篇。除专论外，**USP-NF** 还包含 330 多个通则，为专论中涉及的含量测定、检测和程序提供清晰的分步指导。

USP 标准在美国及全球许多其他国家/地区得到广泛认可。超过 140 个国家/地区的监管机构和生产商使用这些标准，以确保产品在性状、规格、含量、纯度和一致性方面符合要求。专论的药典方法是用于 APIs 和成品的标准化方法与规格检测。LC 方法是各专论中最常用的方法之一，用于原辅料和各种剂型的含量测定。这些方法是经过验证的检测方法，专为特定配方产品和 APIs 而设计，与从头开始开发的方法相比，更容易被检测实验室采用。

USP <621> 近期变更，自 2022 年 12 月起生效（最新修订于 2023 年 4 月）

制药公司和一些监管实验室经常采用 USP 方法分析 APIs 和成品。分析人员遵循并采用 USP 方法开发和转移指南，包括不同仪器或实验室之间的转移。分析人员还会实施现有 USP 方法的现代化，同时避免进行任何需要重新验证的重大变更。通过确保方法成功转移，制药公司能够在其他实验室使用相同的方法，或与合同研究组织 (CRO)/合同生产组织 (CMO) 等合作伙伴共享方法。方法成功转移也是提高常规分析通量的关键步骤。遵循一定的方法转移规则，可以将传统 HPLC 方法转移至现代 UHPLC 方法，从而提高实验室通量并节省运行成本。方法转移可按照 USP 通则 <621> 的方法调整指南来实现。<621> 指南为满足系统适用性要求的允许调整提供了更清晰的定义。系统适用性是 HPLC 方法不可或缺的组成部分，因为它验证系统是否适合进行预期分析。特定专论中的每种 HPLC 方法可能都有其自身特定的系统适用性要求；这一点很重要，因为如果未能成功满足这些要求，则该分析的结果无效。

通则 <621> 是 USP 最重要的通则之一。它是制药行业的质量标准，旨在确保色谱方法和术语的一致性，并定义允许的方法调整。这也是 USP 协调倡议的一部分，该倡议涉及 USP 与其他组织（包括欧洲药典 (EP) 和日本药典 (JP)) 合作，以[实现药典标准的国际协调](#)。

通则 <621> 描述了一般程序、定义和常见参数的计算，以及系统适用性的一般适用要求。2022 年 12 月 1 日，新协调的 USP 通则 <621>（色谱法）正式生效。修订版 USP <621> 的主要变化涉及定义和允许调整。

USP <621> 的主要变更

USP <621> 的主要变更概述如下：

- 引入了新的定义，包括“塔板高度”和“塔板数”，以及有关体积排阻色谱的定义，包括“总流动相时间”和“分配常数”
- “塔板数” (plate number，以前称为“plate count”) 和“分离度”的公式已修改为使用半峰宽计算。“切线宽度”不再出现在更新后的 USP <621> 中
- “拖尾因子”已更名为“对称因子”
- 信噪比现采用半峰宽五倍范围内的噪音进行计算
- 允许更改梯度色谱条件

USP <621> 中新增的允许调整

在之前的 USP <621> 中，不允许对梯度进行调整。修订版 USP <621> 现已针对梯度定义了新的允许调整。这些变化意味着梯度测试与等度测试之间更加协调一致。更新后的 USP <621> 中允许的调整变化可能对制药实验室的分析效率产生显著影响。以往，USP 中的 LC 方法可能很容易被采用；它们通常使用较老的色谱柱技术，包括传统的 5 μm 颗粒和长柱。由于这类色谱柱单位柱长的柱效较低，分析时间通常较长。然而，随着色谱柱技术的进步，特别是采用更小的颗粒和表面多孔颗粒 (SPP) 填充更短的色谱柱，这些较长的分析时间如今得以缩短。

根据 USP <621> 修订版，等度方法和梯度方法现在均允许转移至现代化色谱柱。这对于正在寻找提高分析效率和节省成本方法的制药商来说尤其重要。

调整色谱条件

所描述的色谱条件已在专论制定过程中经过验证。色谱测试的各项参数均可进行调整，前提是不从根本上改变药典分析程序。

除所述变更外，其他变更均需对程序进行重新验证^[1]。专论中的方法可以从全多孔颗粒 (TPP) 柱转移至 TPP 柱或 SPP 柱。根据新版 USP <621>，方法转移有四种情形。表 1 汇总了 LC 方法的允许调整。

除列出的四种方法转移情形外，还存在其他可能的转移，即从 SPP 柱转移至 TPP 柱，或从 SPP 柱转移至 SPP 柱。请记住：如果调整的任何部分涉及 SPP 柱，请遵循等度方法或梯度方法转移至 SPP 柱的规则进行操作。

表 1. 2022 年 12 月 1 日之后 USP 通则 <621> 允许的调整

参数	方法转移			
	TPP 至 TPP 柱	TPP 至 SPP 柱	TPP 至 TPP 柱	TPP 至 SPP 柱
	等度模式		梯度模式	
固定相	不允许变化			
色谱柱规格 (粒径，长度)	L/dp: -25% 至 50%	N: -25% 至 50%	L/dp: -25% 至 50%	$\left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2$: -25% 至 50%
色谱柱内径	灵活调整			
梯度时间	N/A		调整各梯度阶段 $t_{G2} = t_{G1} \times \left(\frac{F_1}{F_2}\right) \times \frac{[L_2 \times dc_2^2]}{[L_1 \times dc_1^2]}$	
流速	基于柱内径和粒径： $F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$ 允许流速在 ±50% 范围内进行额外调整		基于柱内径和粒径： $F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$	
进样量	基于色谱柱规格： $V_2 = V_1 \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$			
柱温	±10 ° C		±5 ° C	
流动相 pH	±0.2 个单位			
盐浓度	在 ±10% 范围内，前提是满足允许的 pH 变化范围			
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		主峰洗脱时间在原始条件保留时间的 ±15% 以内；更改色谱柱规格时不适用此要求。流动相组成和梯度应使第一个峰获得充分保留，最后一个峰被洗脱。	
UV-Vis 检测器波长	不允许变化			

安捷伦液相色谱柱

在 USP <621> 中，USP-NF 试剂、指示剂和溶液（色谱柱）中收录了 USP-NF 检测和含量测定所用填料 (L)、固定相 (G) 和担体 (S) 的完整列表。该列表旨在为色谱工作者提供便捷参考，帮助识别各专论中指定的相应色谱柱。

安捷伦提供对应不同 USP 编号的 TPP 色谱柱（ZORBAX 系列^[2]）和 SPP 色谱柱（InfinityLab Poroshell 120 系列^[3]），如表 2 所示。这些色谱柱类型均基于 Rx-硅胶担体。Rx-硅胶颗粒为超纯球形颗粒，这对于碱性化合物获得良好峰形非常关键。这些颗粒还具有一致的孔径，因而能产生更高的柱效（更多的塔板数）。硅胶经过完全羟基化处理，能提供超高密度的硅醇基团，有利于碱性化合物的分析，从而全面改善峰形。Rx-硅胶采用溶胶-凝胶工艺制造，硅胶微珠在非水环境中聚集形成最终的硅胶颗粒。该工艺旨在实现更高的颗粒强度和更长的使用寿命。

表 2. Agilent ZORBAX 和 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱的 USP 编号

USP 编号	Agilent ZORBAX 色谱柱	Agilent Poroshell 120 色谱柱
L1	Eclipse Plus C18 Eclipse XDB-C18 RRHD Eclipse Plus PAH SB-C18 Extend-C18 Rx-C18	EC-C18 Aq-C18 SB-C18 HPH-C18 CS-C18
L3	HILIC Plus Rx-SIL	HILIC
L7	Eclipse Plus C8 Eclipse XDB-C8 SB-C8 Rx-C8	EC-C8 SB-C8 HPH-C8
L10	Eclipse XDB-CN SB-CN	EC-CN
L11	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Eclipse XDB-Phenyl SB-Phenyl	Phenyl-Hexyl
L43		PFP
L45		Chiral-CD
L56	SB-C3	
L60	Bonus-RP	Bonus-RP
L63		Chiral-T
L86		HILIC-OH5
L88		Chiral-V
L96	SB-Aq	SB-Aq
L114		HILIC-Z

ZORBAX 系列具备 TPP 色谱柱的所有优势，如更长的保留时间、载样量和对样品溶剂的耐受性。ZORBAX 系列提供多种粒径选择，包括 1.8、3.5 和 5 μm ，以及几款用于制备型 LC 的 7 μm 色谱柱。ZORBAX 系列 HPLC 色谱柱最宝贵的优势之一，是方法在不同粒径之间的可扩展性。这使得方法能够快速可靠地从原始 USP 方法转移至粒径更小、柱长更短的色谱柱，同时将 L/dp 值保持在 -25% 至 50% 范围内。

SPP 的发展使方法从较大的 5 μm TPP 色谱柱转移至 SPP 色谱柱成为可能。安捷伦提供不同粒径的 SPP 色谱柱，包括 1.9、2.7 和 4 μm 的 Poroshell 120 色谱柱。

得益于更短的传质距离和极窄的粒径分布，SPP 色谱柱的柱效高于相同粒径的 TPP 色谱柱。2.7 μm Poroshell 120 色谱柱的柱效与亚 2 μm TPP 色谱柱相当，而背压仅为其一半。1.9 μm Poroshell 120 色谱柱的柱效比亚 2 μm TPP 色谱柱高 20%，4 μm 色谱柱的柱效则是 5 μm 色谱柱的两倍。

根据新版 USP <621> 指南，若等度方法的 N 值在 -25% 至 50% 范围内，梯度方法的比值在 -25% 至 50% 范围内，LC 方法即可从 5 μm 或其他粒径的 TPP 色谱柱转移至 SPP 色谱柱。从一种方法转移至另一种方法时，保持相似的选择性很重要，因为这能确保方法调整后获得相似的分离度和柱效，从而满足系统适用性要求。

安捷伦将传统的 ZORBAX 化学键合相应用于 Poroshell 120 颗粒，从而简化了从 TPP 色谱柱到 SPP 色谱柱的方法转移。特别是 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 等色谱柱，在制造时采用了相似的化学键合相和保留机制，方法转移更加简便。安捷伦提供多种 Poroshell 120 化学键合相，其中大部分均可在 ZORBAX 系列产品组合中找到，这使得不同色谱柱之间的方法转移更加容易^[4]。

ZORBAX 与 Poroshell 技术背后的科学原理

ZORBAX 和 Poroshell 色谱柱技术具有以下独特优势：

- 批次间差异极小
- 严格的质量检测
- 来源统一且明确的硅胶基质
- 跨不同制备平台和分析平台的可扩展性

ZORBAX

ZORBAX 色谱柱系列属于 HPLC 色谱柱系列。ZORBAX 色谱柱基于传统的全多孔填料颗粒，具有非常高的载样量和分离度。ZORBAX 色谱柱产品系列提供了一系列固定键合相，如 Eclipse Plus、Eclipse XDB、StableBond、Bonus-RP 等等，使您能够选择所需选择性，以满足您的应用需求。采用亚 2 μm 颗粒填料提高分离度以大幅提高系统效率，让科学家可以充满信心地放大至制备型 HPLC，或轻松实现 HPLC 方法转移。

Poroshell

适用于反相 LC 分离的 InfinityLab Poroshell 120 表面多孔色谱柱提供了更高的效率和可靠性。二十种化学键合相（从 C18 色谱柱到其他独特的固定相）具有多达三种填料直径：1.9、2.7 和 4 μm 。该系列化学键合相为可扩展的液相色谱方法开发提供了广泛的选择性，从传统 HPLC 到 UHPLC，再到超低扩散 UHPLC。

方法转移与现代化案例研究

根据修订版 USP <621>，等度方法和梯度方法共有四种常见的方法转移/现代化情形。以下通过若干案例研究阐述这一现代化的概念、过程和优势。

情形 A：等度洗脱的调整

根据 USP <621> 的方法调整规定，等度洗脱条件的变更需要以下四个步骤：

1. 根据 L/dp 比值（TPP 柱转移至 TPP 柱）或 N 值（TPP 柱转移至 SPP 柱）调整柱长和粒径。该比值应保持不变，或在规定值的 -25% 至 50% 范围内

2. 根据粒径和柱内径的变化调整流速。使用公式 1，根据色谱柱内径和填料粒径的变化调整流速：

公式 1.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$$

F_1 = 专论中规定的流速 (mL/min)

F_2 = 调整后的流速 (mL/min)

dc_1 = 专论中规定的色谱柱内径

dc_2 = 使用的色谱柱内径 (mm)

dp_1 = 专论中规定的粒径 (μm)

dp_2 = 使用的色谱柱粒径 (μm)

3. 使用公式 2 调整进样量

公式 2.

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

V_1 = 专论中规定的进样量 (μL)

V_2 = 调整后的进样量 (μL)

L_1 = 专论中规定的柱长 (cm)

L_2 = 新的柱长 (cm)

dc_1 = 专论中规定的色谱柱内径 (mm)

dc_2 = 新的色谱柱内径 (mm)

4. 运行调整后的方法并检查系统适用性结果。分析程序中的其他条件（包括流动相、温度、pH 等）可能也需要调整，但必须处于系统适用性项下描述的允许范围内（见表 1）

案例研究 1：等度洗脱下方法从 TPP 柱转移至 TPP 柱

案例研究 1 的目标是使方法现代化为更小尺寸的色谱柱，以提高实验室分析效率。将方法从 TPP 柱转移至 TPP 柱进行等度洗脱的典型案例，是 USP 苯磺酸氨氯地平含量测定方法^[5]。

USP 方法规定使用 $3.9 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 的色谱柱，填料为 L1。

根据方法调整步骤：

1. 本方法采用相同 L/dp 比值、内径 3 mm 的色谱柱
2. 流速根据公式 1 进行调整
 - 由于粒径不变，只要线速度保持恒定，即可调整柱内径
 - 因此，在 3.9 mm 和 3 mm 色谱柱上，流速分别从 1 mL/min 降至 0.6 mL/min
3. 进样量根据公式 2 进行调整。计算得到的进样量为 30 μL 。由于 Agilent 1290 Infinity II DAD 具有出色的灵敏度，本白皮书采用了 20 μL 的较低进样量
 - 根据 USP <621> 指南，进样量可在符合可接受的精密度和、线性和检出限的前提下进行调整

为缩短分析时间并提高分析效率，将 HPLC 色谱柱替换为具有相同固定键合相的亚 $2 \mu\text{m}$ UHPLC 色谱柱。由于色谱柱规格差异显著，多个方法参数均进行了更改。

这些变更也是按照之前描述的步骤，根据 USP 指南进行的，以避免需要对该方法进行全部或部分重新验证。

表 3 汇总了 $5 \mu\text{m}$ 和 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱上的方法设置。表 4 汇总了不同方法的结果比较。图 1 显示了 HPLC 与 UHPLC 结果的对比。

案例研究 1 结论

USP 苯磺酸氨氯地平方法从 HPLC 成功转移至 UHPLC。由于所有变更均在 USP <621> 允许范围内，无需进行方法验证，但可能需要进行方法确认。系统适用性标准均经过评估并达到要求。与原 HPLC 方法相比，分析时间和流动相消耗分别减少了 87% 和 82%。实验室分析效率和样品通量明显提升。

表 3. 案例研究 1 使用的 HPLC 方法和 UHPLC 方法的比较

	USP 原始方法	HPLC 方法	UHPLC 方法
色谱柱	填料 L1, 3.9 × 150 mm, 5 µm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3 × 150 mm, 5 µm (部件号 959993-302)	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 959757-902)
L/dp 比	30000 (~25% 至 50%)	30000	27778 (~7.4%)
流动相	甲醇/乙腈/缓冲液 35/15/50, 等度洗脱		
流速	1 mL/min	0.6 mL/min	0.8 mL/min
温度	未指明	30 °C	30 °C
进样量 *	50 µL	20 µL	10 µL
检测	UV 237 nm	DAD 信号 237/4 nm, 参比波长关闭, 采集频率 5 Hz	DAD 信号 237/4 nm, 参比波长关闭, 采集频率 20 Hz
分析时间	约为氨氯地平保留时间的三倍	23 min	3.1 min

* 如符合可接受的精密度、线性和检出限, 则可进行调整

表 4. 两种方法所得结果的比较

	USP 要求	HPLC 方法	UHPLC 方法 (方法经过现代化)
分离度	不低于 8.5	13.3	9.7
5% 峰高处的拖尾因子	不高于 2.0	1.14	1.31
氨氯地平峰面积 %RSD (n = 6)	不高于 1.0%	0.03%	0.02%
氨氯地平相关化合物 A 峰面积 %RSD (n = 6)	不高于 5.0%	0.29%	0.33%
保留时间	–	7.52 min	1.02 min
分析时间	–	23.00 min	3.10 min (~87%)
流动相消耗量	–	13.8 mL	2.5 mL (~82%)

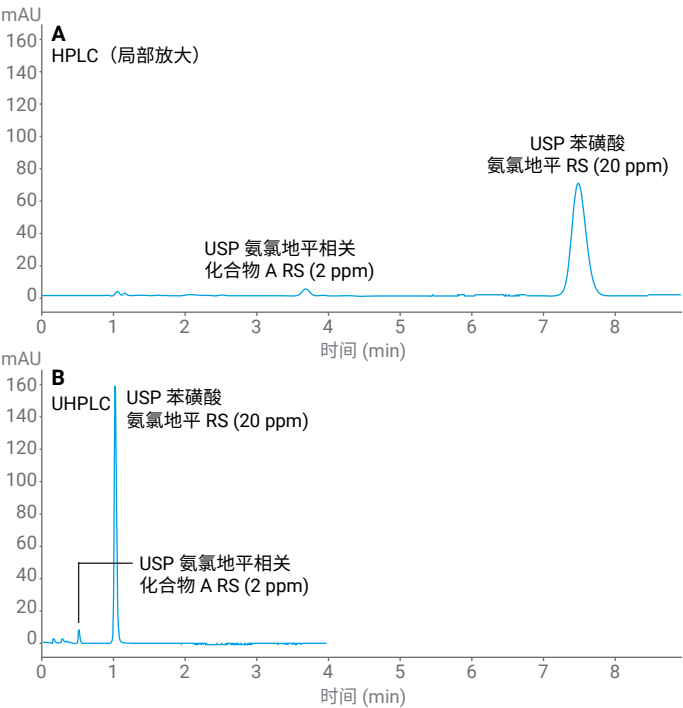


图 1. HPLC 与 UHPLC 分析苯磺酸氨氯地平含量测定方法系统适用性溶液的对比

案例研究 2：等度洗脱下方法从 TPP 柱转移至 SPP 柱

案例研究 2 的目标是将方法从传统 ZORBAX 色谱柱现代化为新型 Poroshell 色谱柱，以提高实验室分析效率和数据质量。将等度洗脱方法从 TPP 柱转移至 SPP 柱的典型示例，是 USP 盐酸苯海拉明杂质检测方法^[6]

按照案例研究 1 的相同步骤操作，但有以下不同：更改柱长和粒径时，可使用 L 和 dp 的其他组合，前提是塔板数 (N) 在 -25% 至 50% 范围内。此规则适用于等度洗脱下从 TPP 柱至 SPP 柱的调整。

在本案例中，原始 HPLC 方法使用 5 µm, 4.6 × 250 mm 色谱柱，填料为 L7，将其转移至采用新技术的色谱柱：Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱 (4.6 × 100 mm, 2.7 µm)。

注：此前，表面多孔色谱柱的调整可采用 L/dp 规则，但根据新指南，仅 N 值规则适用。

按照 L/dp 规则，不允许将 5 µm, 250 mm 色谱柱调整为 2.7 µm, 100 mm 色谱柱，因为 L/dp 略低于允许的范围。这意味着使用表面多孔色谱柱时，必须针对所研究的 API，对原始方法和最终调整方法的柱效 (N) 进行直接比较。

表 5 汇总了 5 µm 和 2.7 µm 色谱柱上的方法设置。表 6 汇总了不同方法的系统适用性结果比较。图 2 比较了 HPLC 与 UHPLC 色谱图。

表 5. 案例研究 2 使用的 HPLC 方法和 UHPLC 方法的比较

	USP 原始方法	HPLC 方法	UHPLC 方法
色谱柱	填料 L7, 4.6 × 250 mm, 5 µm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 250 mm, 5 µm (部件号 959990-906)	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm (部件号 695975-906)
苯海拉明塔板数	原始方法的 -25% 至 50% 范围	10334	12873 (+24.6%)
流动相	预混合 缓冲液: 5.4 g/L 磷酸二氢钾, 用磷酸调节 pH 至 3.0 乙腈与缓冲液 (35:65)		
流速	1.2 mL/min	1.2 mL/min	1.5 mL/min
温度	未指明	25 ° C	25 ° C
进样量 *	10 µL	10 µL	4 µL
检测	UV 220 nm	DAD 信号 220, 参比波长关闭, 采集频率 5 Hz	DAD 信号 220 nm, 参比波长关闭, 采集频率 40 Hz
运行时间	至少是苯海拉明保留时间的七倍	37.1 min	12.3 min

* 如符合可接受的精密度、线性和检出限，则可进行调整

表 6. 两种方法所得结果的比较

	USP 要求	HPLC 方法	UHPLC 方法 (方法经过现代化)
苯海拉明有关物质 A 与苯海拉明的分离度不低于 2.0	不低于 2.0	2.85	3.02
苯海拉明的保留时间	-	5.30 min	1.76 min
运行时间	-	37.1 min	12.3 min (-66%)
流动相消耗量	-	13.8 mL	2.5 mL (-82%)

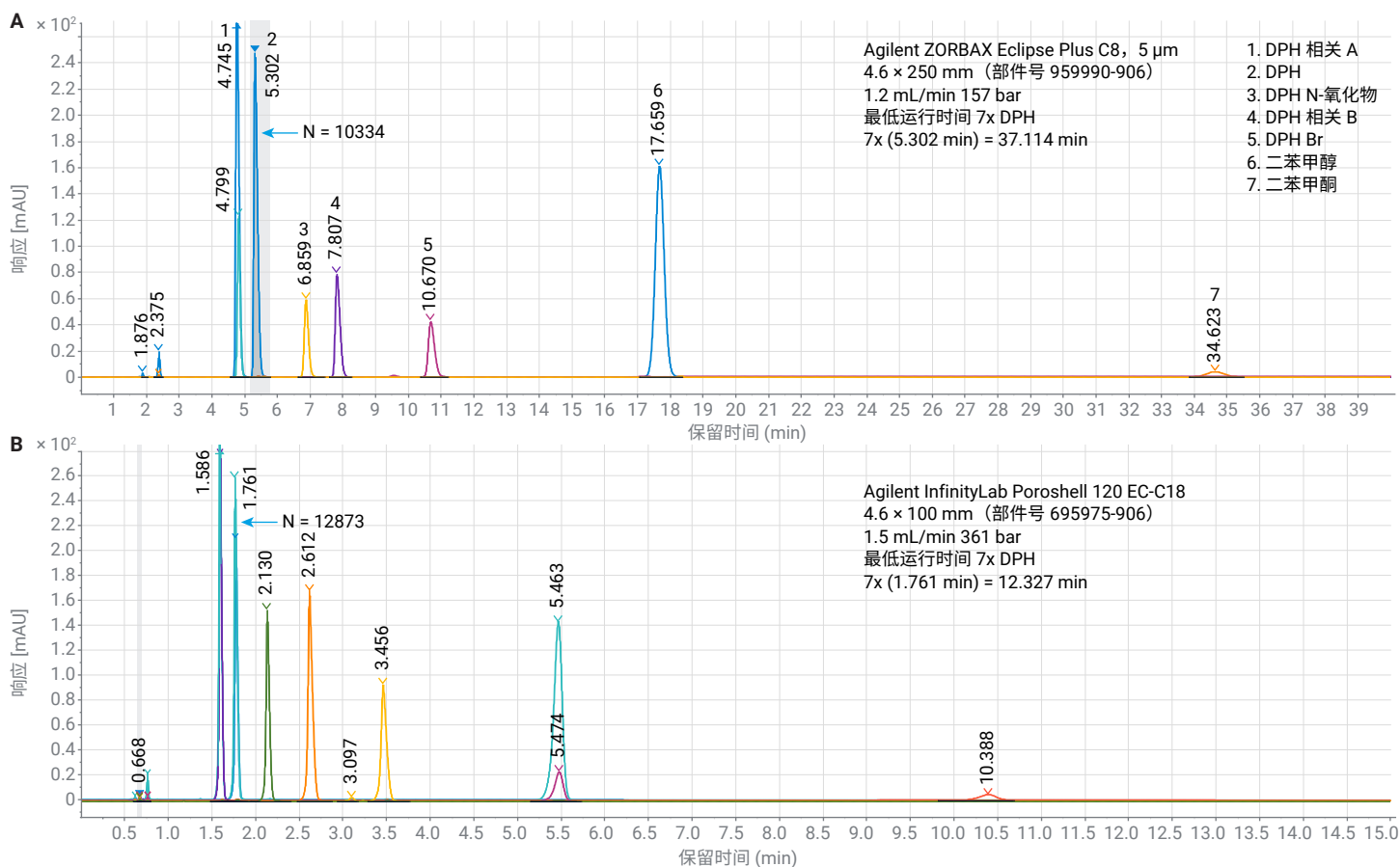


图 2. HPLC 与 UHPLC 分析盐酸苯海拉明杂质系统适用性溶液的对比

案例研究 2 结论

在本案例中，USP 盐酸苯海拉明杂质方法从 5 μm TPP 色谱柱成功转移至 2.7 μm SPP 色谱柱（无需额外的方法验证）。系统适用性标准均经过评估，两种方法均达到要求。与原 HPLC 方法相比，分析时间和流动相消耗分别减少了 66% 和 82%。采用所述方法可提高实验室分析效率，并降低单个样品的分析成本。

情形 B：梯度洗脱的调整

USP37-NF32S1（2014 年 8 月 1 日正式生效）不允许对梯度洗脱进行调整，而 USP 第 4 阶段协调版（2022 年 12 月 1 日正式生效）则放开了这一限制。

根据 USP <621> 的方法调整规定，梯度洗脱条件的变更需要以下步骤：

1. 根据 L/dp 比值（TPP 柱转移至 TPP 柱）或 $(t_R/W_R)^2$ 比值（TPP 柱转移至 SPP 柱）调整柱长和粒径。该比值应保持不变，或在规定值的 -25% 至 50% 范围内
2. 根据粒径和柱内径的变化调整流速。使用公式 1，根据色谱柱内径和填料粒径的变化调整流速：

公式 1.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2)/(dp_2 \times dc_1^2)]$$

3. 使用公式 2 调整进样量

公式 2.

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

4. 根据柱长、柱内径和流速的变化，使用公式 3 调整各梯度阶段的梯度时间

公式 3.

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

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 × dc = 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

5. 运行调整后的方法并检查系统适用性结果。分析程序中的其他条件（包括流动相、温度、pH 等）可能也需要调整，但必须处于系统适用性项下描述的允许范围内（见表 1）

案例研究 3：梯度洗脱下方法从 TPP 柱转移至 TPP 柱

本案例研究的目标是将方法从传统 ZORBAX 色谱柱现代化为更小颗粒的色谱柱，以提高实验室分析效率和数据质量。

将梯度洗脱方法从 TPP 柱转移至 TPP 柱的典型示例，是 USP 碘海醇有关物质分析方法^[7]。

请遵循以下步骤进行梯度洗脱的调整：

- 更改柱长和粒径时，可使用 L 和 dp 的其他组合，前提是柱长 (L) 与粒径 (dp) 的比值保持不变，或在规定 L/dp 比值的 -25% 至 50% 范围内
 - 此规则适用于梯度洗脱下从 TPP 柱至 TPP 柱的调整
 - USP 方法规定使用 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱进行该分析，根据梯度方法调整步骤：
- 本方法采用 L/dp 比值相近（在 37500 至 75000 范围内）的色谱柱，包括 3.0 × 150 mm, 3.5 μm 和 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱，固定键合相均与 ZORBAX SB-C18 相同
- 流速根据公式 1 进行调整。然后根据公式 2 调整进样量，根据公式 3 调整梯度时间

表 7 汇总了 5、3.5 和 1.8 μm 色谱柱上的方法设置。表 8 汇总了不同方法的结果比较。图 3 比较了 HPLC 与 UHPLC 结果。

表 7. 案例研究 3 使用的 HPLC 方法和 UHPLC 方法的比较

	USP 原始方法	HPLC 方法	UHPLC 方法	UHPLC 方法
色谱柱	填料 L1, 4.6 × 250 mm, 5 μm	Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm (部件号 880975-902)	Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm (部件号 863954-302)	Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 858700-902)
L/dp 比	50000 (-25% 至 50%)	50000	42857 (-14.3%)	55555 (+11.1%)
流动相	A) 水 B) 乙腈			
流速	1 mL/min	1.0 mL/min	0.6 mL/min	0.58 mL/min
梯度	时间 (min) B% 0 1 60 13	时间 (min) B% 0 1 60 13 后运行: 6 min	时间 (min) B% 0 1 25 13 后运行: 4 min	时间 (min) B% 0 1 8.6 13 后运行: 2 min
温度	未指明	25 °C	25 °C	25 °C
进样量 *	10 μL	10 μL	3 μL	1 μL
检测	UV 254 nm	DAD 信号 254/4 nm, 参比波长关闭, 采集频率 5 Hz	DAD 信号 254/4 nm, 参比波长关闭, 采集频率 10 Hz	DAD 信号 254 nm/4 nm, 参比波长关闭, 采集频率 40 Hz
分析时间	60 min	60 min	25 min	8.6 min

* 如符合可接受的精密性、线性和检出限，则可进行调整

表 8. 所有方法所得结果的比较

	USP 要求	HPLC 方法	UHPLC 方法 (方法经过现代化)	UHPLC 方法 (方法经过现代化)
相关化合物 A 和 C 之间的分离度	不低于 20	51.1	44.0	40.7
分析时间	–	60 min	25 min (–58%)	8.6 min (–86%)
流动相消耗量	–	60.0 mL	15 mL (–75%)	5.0 mL (–92%)

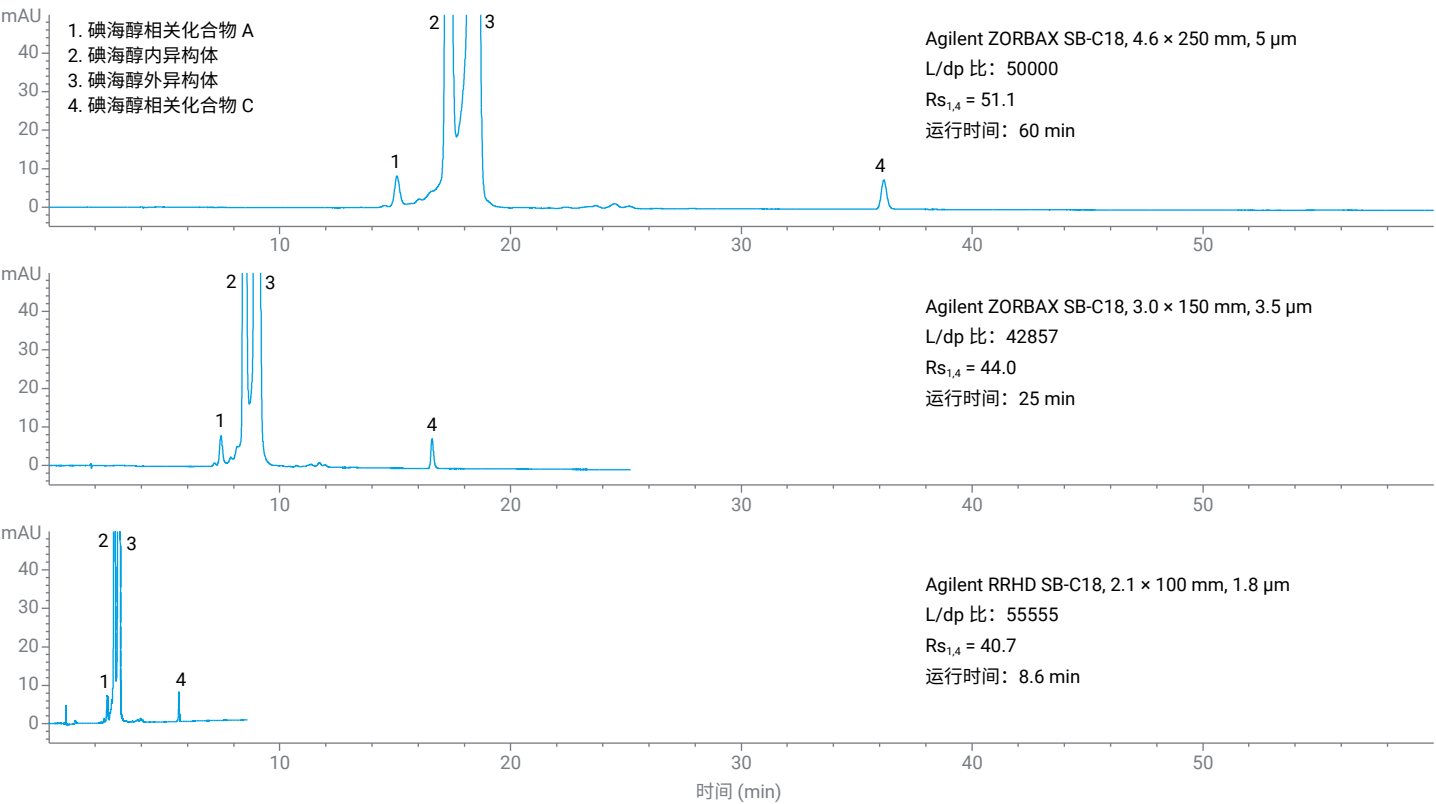


图 3. HPLC 与 UHPLC 分析碘海醇有关物质系统适用性溶液的对比

案例研究 3 结论

在本案例中，USP 碘海醇有关物质分析方法从 5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱转移至 3.5 或 1.8 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱，无需额外的方法验证。系统适用性标准均经过评估，所有方法均符合要求。分析时间在 3.5 μm 色谱柱上缩短了 58%，在 1.8 μm 色谱柱上缩短了 86%。流动相消耗也大幅降低，3.5 μm 色谱柱减少了 75%，1.8 μm 色谱柱减少了 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。

案例研究 4：梯度洗脱下方法从 TPP 柱转移至 SPP 柱

案例研究 4 的目标是将方法从传统 ZORBAX 色谱柱现代化为新型 Poroshell 色谱柱，以提高实验室分析效率和数据质量。将梯度洗脱方法从 TPP 柱转移至 SPP 柱的典型示例，是 USP 盐酸苯海拉明含量测定方法^[6]。

针对梯度洗脱的调整规则如下：更改柱长和粒径时，可使用 L 和 dp 的其他组合，前提是 (t_R/W_n)² 比值在 -25% 至 50% 范围内。此规则适用于梯度洗脱下从 TPP 柱至 SPP 柱的调整。

在本案例中，USP 现行盐酸苯海拉明含量测定方法使用 ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱，在允许范围内进行调整，改用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱，以提高样品通量。流速根据公式 3 从 1.2 mL/min 提高至 2.0 mL/min 以调整梯度，最终实际采用 1.8 mL/min。

表 9 汇总了 5 μm 和 2.7 μm 色谱柱上的方法设置。表 10 汇总了不同方法的系统适用性结果比较。图 4 比较了 HPLC 与 UHPLC 色谱图。

表 9. 案例研究 4 使用的 HPLC 方法和 UHPLC 方法的比较

	USP 原始方法	HPLC 方法	UHPLC 方法
色谱柱	填料 L7, 4.6 × 250 mm, 5 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 × 250 mm, 5 μm (部件号 959990-906)	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-906)
苯海拉明的 (t _R /W _R) ²	原始方法的 ~25% 至 50% 范围	2410 (1805–3615)	2778 (+15.3%)
流动相	A) 缓冲液: 5.4 g/L 磷酸二氢钾, 用磷酸调节 pH 至 3.0 B) 乙腈 稀释液: 乙腈与缓冲液 (35:65)		
流速	1.2 mL/min	1.2 mL/min	1.8 mL/min
梯度	时间 (min) B% 0 35 4 35 7 80 9 35 13 35	时间 (min) B% 0 35 4 35 7 80 9 35 13 35	时间 (min) B% 0 35 1.1 35 1.9 80 2.4 35 3.5 35
温度	未指明	25 °C	25 °C
进样量 *	10 μL	10 μL	4 μL
检测	UV 220 nm	DAD 信号 220, 参比波长关闭, 采集频率 5 Hz	DAD 信号 220 nm, 参比波长关闭, 采集频率 40 Hz
运行时间	13 min	13 min	3.5 min

* 如符合可接受的精密度、线性和检出限，则可进行调整

表 10. 两种方法所得结果的比较

	USP 要求	HPLC 方法	UHPLC 方法 (方法经过现代化)
苯海拉明有关物质 A 与苯海拉明的分离度	不低于 1.5	–	2.96
标准溶液的 %RSD	不高于 0.85%	–	0.68%
拖尾因子	不高于 1.8	–	1.11
运行时间	–	13 min	3.5 min (–73%)
流动相消耗量	–	15.6 mL	6.3 mL (–60%)

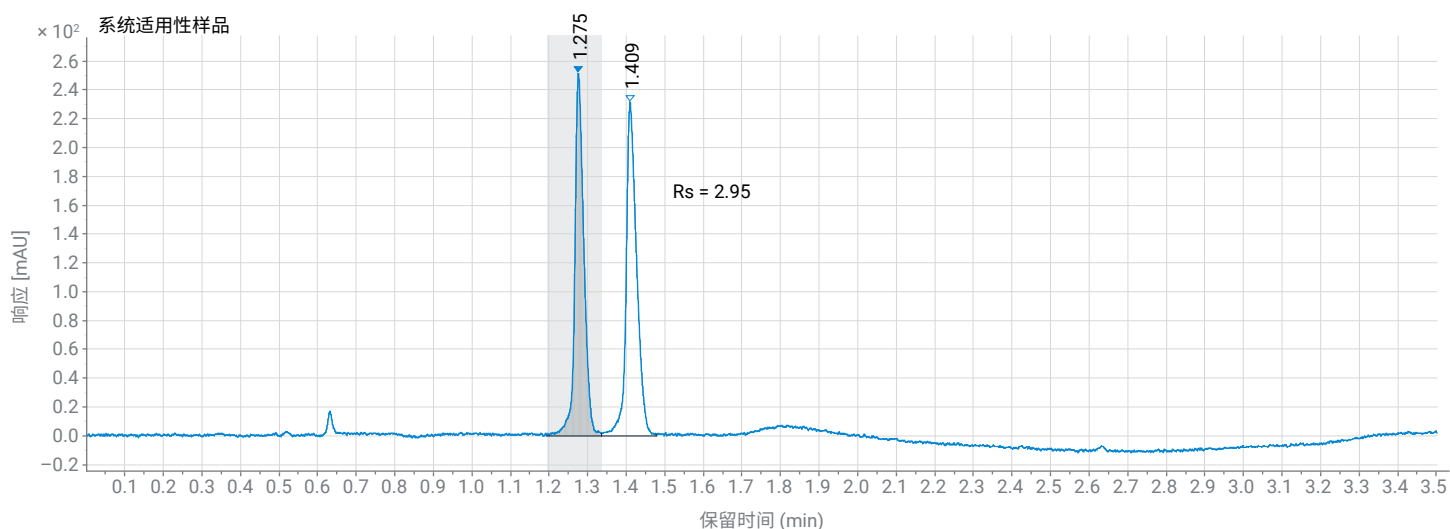


图 4. UHPLC 分析盐酸苯海拉明含量测定系统适用性溶液的色谱图

案例研究 4 结论

在本案例中，USP 盐酸苯海拉明含量测定方法从 5 μm TPP 色谱柱转移至 2.7 μm SPP 色谱柱。系统适用性标准均经过评估，两种方法均符合要求。与原 HPLC 方法相比，分析时间和流动相消耗分别减少了 73% 和 60%。显然，使用所述方法能够提高实验室工作效率和样品通量。

USP <621> 强调：“当由于粒径减小或柱内径变小而导致峰体积减小时，需格外谨慎。这种情况下可能需要进行调整，以尽量减少仪器连接、检测器流通池体积和采样速率以及进样量等因素造成的柱外谱带展宽。”安捷伦建议进行风险评估，以评估跨色谱柱平台进行现代化和方法转移时多次调整的累积效应。系统适用性是确认性能是否满足要求的主要依据。

将延迟体积和扩散体积作为方法转移的其他主要考量标准

各专论最好在梯度程序开始之前包含一个等度步骤。这样便可对梯度时间点进行调整，以补偿分析方法开发所用系统与实际使用系统之间延迟体积的差异。修订版 USP <621> 给出了延迟体积的计算方法。

结论

USP 药典方法广泛用于全球药品检测。部分 HPLC 方法使用较老的色谱柱技术，导致重现性差、峰形不佳且结果不一致，运行时间通常也较长。采用常规硅胶、批次间差异极小的新型 LC 色谱柱技术（包括粒径更小的色谱柱和 SPP 色谱柱），可提供相似甚至更优的结果，同时节省分析时间和流动相消耗。修订版 USP 通则 <621> 指南使方法调整或转移更加灵活，可从传统 5 μm TPP 色谱柱转移至粒径更小的色谱柱或 SPP 色谱柱，无需额外的方法验证。这些方法转移或现代化带来的益处包括节省时间和溶剂消耗，并进一步降低废液处理成本。这些节省最终将降低实验室运行成本，提高实验室分析效率。

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

DE4865502

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 8 月 30 日，中国出版
5994-6618ZHCN

参考文献

1. USP Harmonized Standards Home Page. Supplement USP Stage 4 Harmonization, Official, December 1, **2022** (latest revision in April 2023)
2. Agilent ZORBAX 系列, 安捷伦科技公司海报, 出版号 5994-2212ZHCN
3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 系列, 安捷伦科技公司海报, 出版号 5991-9013ZHCN
4. Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns (Poroshell 120 EC-C18 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱之间的方法转移), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5990-6588EN, **2011**
5. Vanhoenacker, G.; Steenbeke, M.; Sandra, K. HPLC to UHPLC Transfer of USP Method for Amlodipine Besylate Using the Agilent 1290 Infinity II LC (将采用 Agilent 1290 Infinity II LC 的 USP 苯磺酸氨氯地平方法从 HPLC 转移到 UHPLC), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-6540EN, **2016**
6. Long, W. J. A Simple Conversion of the USP Method for Diphenhydramine HCl Impurities to the Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 Column (将 USP 盐酸苯海拉明杂质检测方法轻松转换至 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 色谱柱) 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-5391EN, **2022**
7. Fu, R. Gradient Method Transfer of the Iohexol USP Monograph HPLC Method for Related Compounds to Smaller Particle Size ZORBAX Columns (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), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-6544EN, **2023**
8. 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 盐酸苯海拉明含量测定方法轻松转换至 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**