

USP专论方法现代化助力节省成本和缩短用时：使用UHPLC/UPLC仪器和色谱柱转换HPLC方法

Kenneth D. Berthelette, Jennifer M. Nguyen, Jonathan E. Turner, Denis Savage

Waters Corporation

摘要

本研究证明，萘普生钠片USP分析方法的现代化能够潜在的节省成本和时间。方法现代化可大幅缩短分析时间并减少流动相用量。为直观展示，我们研究了UPLC色谱柱的使用寿命，结果显示，在进样10,000多次萘普生钠样品后，色谱柱性能未发生变化。我们使用分析运行时间和流速计算了HPLC、UHPLC和UPLC方法进样10,000次所需的预计流动相成本。将萘普生钠片HPLC分析方法向UHPLC或UPLC仪器和色谱柱进行现代化转换，最多可使分析时间缩短至1/8，流动相成本缩减至1/13。

优势

- 将HPLC方法向UHPLC仪器和色谱柱进行现代化转换可使分析时间和溶剂用量减少至1/4
- 将HPLC方法向UPLC仪器和色谱柱进行现代化转换可使溶剂用量减少至1/13，分析时间缩短至1/8
- 按色谱柱使用寿命（10,000次进样）计算，UPLC相比HPLC方法可节省10,000美元的成本，检测时间缩短48天

简介

美国药典(USP)是针对各种药品的检测方法大全。USP专论介绍的方法通常针对杂质分析、溶出度测试和其他分析¹⁻³，涉及的技术包括薄层色谱法(TLC)、气相色谱法和液相色谱法等。但其中许多方法现在已然“过时”，这些方法使用的设备版本老旧，分离能力和速度均劣于现代技术。将这些方法向新技术进行现代化转换，可显著提升分析性能。USP通则<621>中规定了方法的现代化流程，列举出允许变更的液相色谱测试条件，包括色谱柱配置、粒径、流速和进样体积的变化⁴。根据<621>指南，现代化转换后的方法无需重新验证⁵。

在本应用纪要中，我们介绍了萘普生钠片的USP方法从HPLC向UHPLC和UPLC技术的现代化转换。萘普生钠是一种常见的非甾体抗炎药物(NSAID)，属于非处方药，市售产品有Aleve（商品名）及其仿制药。必须定期对萘普生钠批次进行质控测试，以确保化合物正确递送并帮助人体缓解疼痛和炎症。本研究采用小粒径的窄径短色谱柱代替4.6 x 150 mm 5 μm色谱柱。我们对UPLC色谱柱开展了使用寿命研究，进一步展示方法现代化的好处。使用研究结果计算UPLC方法相较于HPLC方法在色谱柱使用寿命内因减少流动相用量而节省的成本。

实验

样品描述

将5片（每片220 mg）萘普生钠磨碎并溶解于1 L流动相:水(85:15)中。根据USP专论中关于样品前处理的规定，使用0.2 μm尼龙过滤器过滤溶液，然后用流动相稀释10倍，得到最终浓度为0.11 mg/mL的样品。

标准品描述

用流动相稀释无杂质的萘普生钠粉末，制备萘普生钠储备液。用流动相将储备液稀释10倍，得到最终浓度为0.11 mg/mL的标准溶液。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：

配备2489紫外/可见光检测器的Alliance HPLC

配备2998 PDA检测器的ACQUITY Arc

配备PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统

检测条件：

UV 254 nm

样品瓶：	LCMS认证透明玻璃样品瓶，容积2 mL（部件号：600000751CV）
色谱柱：	XBridge BEH C ₈ , 5 μm, 4.6 x 150 mm（部件号：186003017） XBridge BEH C ₈ XP, 2.5 μm, 3.0 x 75 mm（部件号：186006046） CORTECS UPLC C ₈ , 1.6 μm, 2.1 x 50 mm（部件号：186008399）
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
流速：	1.20 mL/min (Alliance) 1.02 mL/min (ACQUITY Arc) 0.74 mL/min (ACQUITY UPLC H-Class)
流动相组成：	乙腈:水:乙酸(45:54:1 v/v/v)
进样体积：	20 μL (Alliance) 4.3 μL (ACQUITY Arc) ACQUITY Arc和ACQUITY UPLC H-Class的值使用ACQUITY方法转换器计算而得 1.4 μL (ACQUITY UPLC H-Class)
数据管理	
色谱软件：	Empower 3 Feature Release 5

结果与讨论

在验证现代化转换前的USP专论方法时，我们采用了Alliance HPLC系统搭配2489 UV/Vis检测器，并配置适当的L7色谱柱：XBridge BEH C₈, 5 μm, 4.6 x 150 mm色谱柱。分别计算样品和标准品的平均峰面积(n=10)或响应值，然后用于计算萘普生钠含量。计算公式如图1所示，其中r_u代表萘普生钠样品的响应值或峰面积，r_s代表标准品响应值，C_s代表标准品浓度，C_u代表样品浓度。含量测定结果在90%–110%范围内则视为合格。

由于标准品和样品的最终浓度均为0.11 mg/mL，因此C_s和C_u值可以相互抵消，结果仅取决于响应值之比。除含量测定结果外，原测试条件和现代化方法的萘普生峰面积相对标准偏差均不得超过2%，萘普生的USP拖尾因子均不得超过2.0。图1是使用测试色谱柱和系统得到的萘普生代表性色谱图。

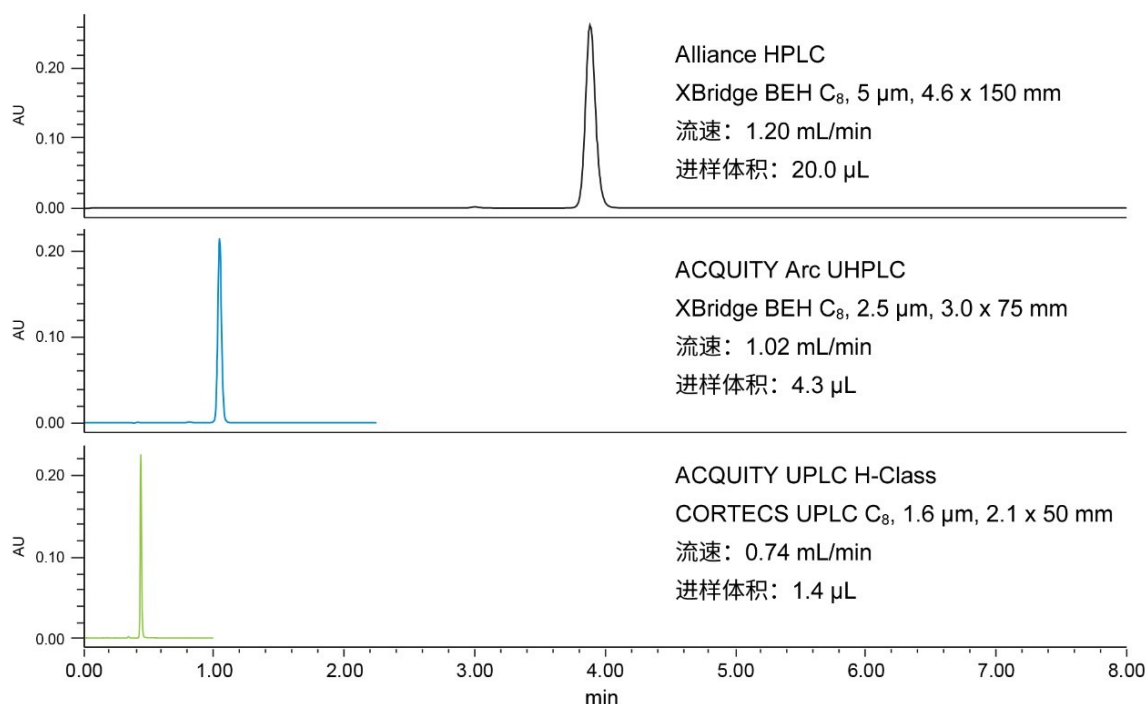


图1.使用规定系统和色谱柱得到的萘普生钠UV色谱图。所有色谱图均采用45:54:1乙腈:水:乙酸(v/v/v)作为流动相，在254 nm UV检测波长下生成。

如表1所示，所有测试系统和色谱柱的分析结果均符合标准。在将HPLC条件向UHPLC系统进行现代化转换时，我们采用了填充2.5 μm颗粒的3.0 x 75 mm色谱柱，以维持恒定的L/dp比。选择XBridge BEH C₈色谱柱，该色谱柱的颗粒和键合技术与测试的原HPLC色谱柱相同，但粒径更小。在向UPLC系统进行现代化转换时，使用了填充亚2 μm颗粒的2.1 x 50 mm色谱柱。本研究在ACQUITY UPLC H-Class系统中安装了CORTECS UPLC C₈ 1.6 μm, 2.1 x 50 mm色谱柱。也可以使用ACQUITY UPLC BEH C₈色谱柱，但CORTECS经过专门设计，能够提升柱效⁷⁻¹⁰。

色谱柱	USP拖尾因子 (NMT 2.0)	峰面积 %RSD (NMT 2.0)	平均含量测定结果 计算值(n=10) (90%-110%)	运行时间 (min)
XBridge BEH C ₈ 5 μm, 4.6 x 150 mm	1.11	1.38	103%	8.00
XBridge BEH C ₈ 2.5 μm, 3.0 x 75 mm	1.10	0.24	99%	2.25
CORTECS UPLC C ₈ 1.6 μm, 2.1 x 50 mm	1.17	0.25	101%	1.00

表1.3种测试系统和色谱柱的分析结果和分析标准总结

我们还根据色谱柱使用寿命或分析方法失败/色谱柱需要更换之前的预计进样次数，评估了分析方法节省的时间和成本。在使用寿命研究中，我们选择了配置CORTECS UPLC C₈色谱柱的ACQUITY UPLC H-Class系统，旨在尽可能降低溶剂用量并缩短运行时间。此系统被设置为无中断运行，因此可以在重复进样样品(n=100)后继续重复进样标准品(n=5)。选择此进样顺序是因为萘普生钠样品含有辅料，相比标准品更容易导致色谱柱故障。萘普生标准品进样旨在确保系统适应性仍满足要求。研究期间密切监测USP拖尾因子和系统压力，这是使用寿命测试中最先出现不合格结果的两项参数。使用寿命研究在10,000次进样后中断，无色谱柱性能损失或柱压增加。图2和图3显示了每100次进样萘普生钠样品的系统压力和萘普生USP拖尾因子。

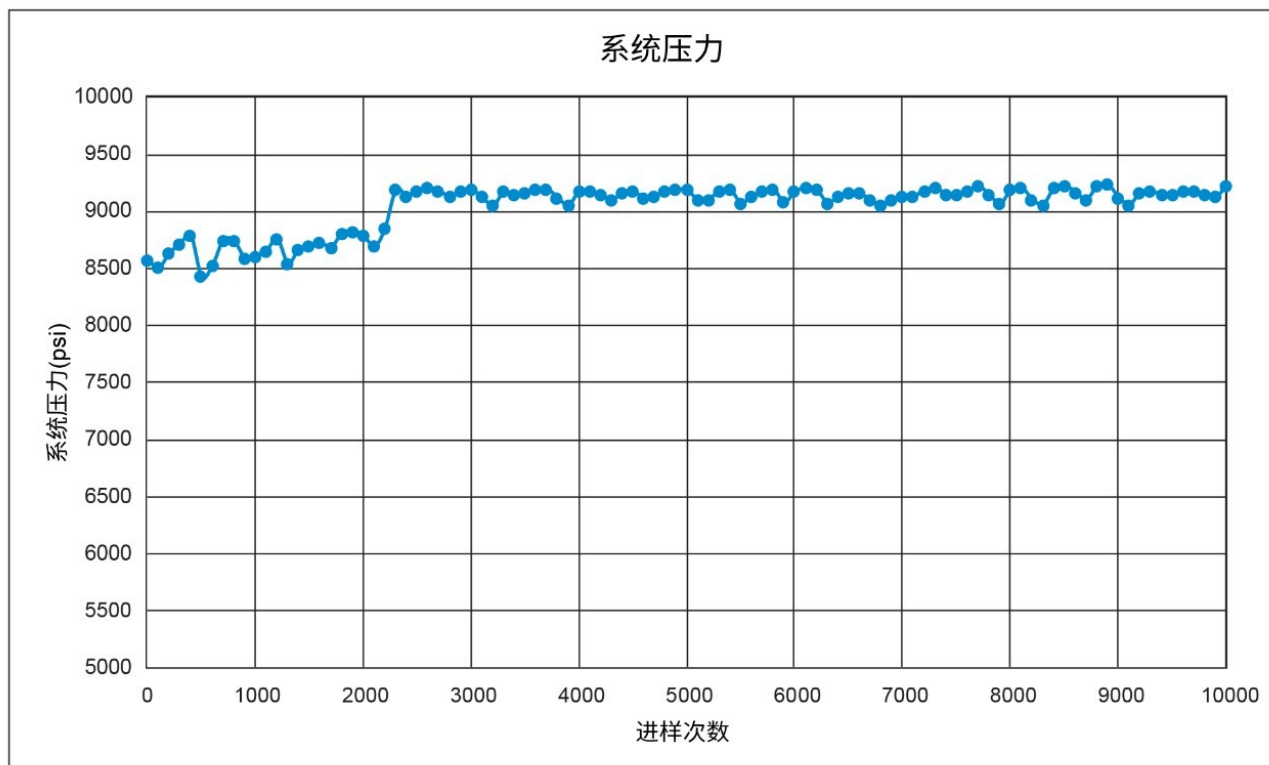


图2.在每100次进样萘普生钠样品后运行0.5分钟时的系统压力(psi)。第1-2100次进样期间的压力较低，这是因为色谱柱上游的系统漏液所致。

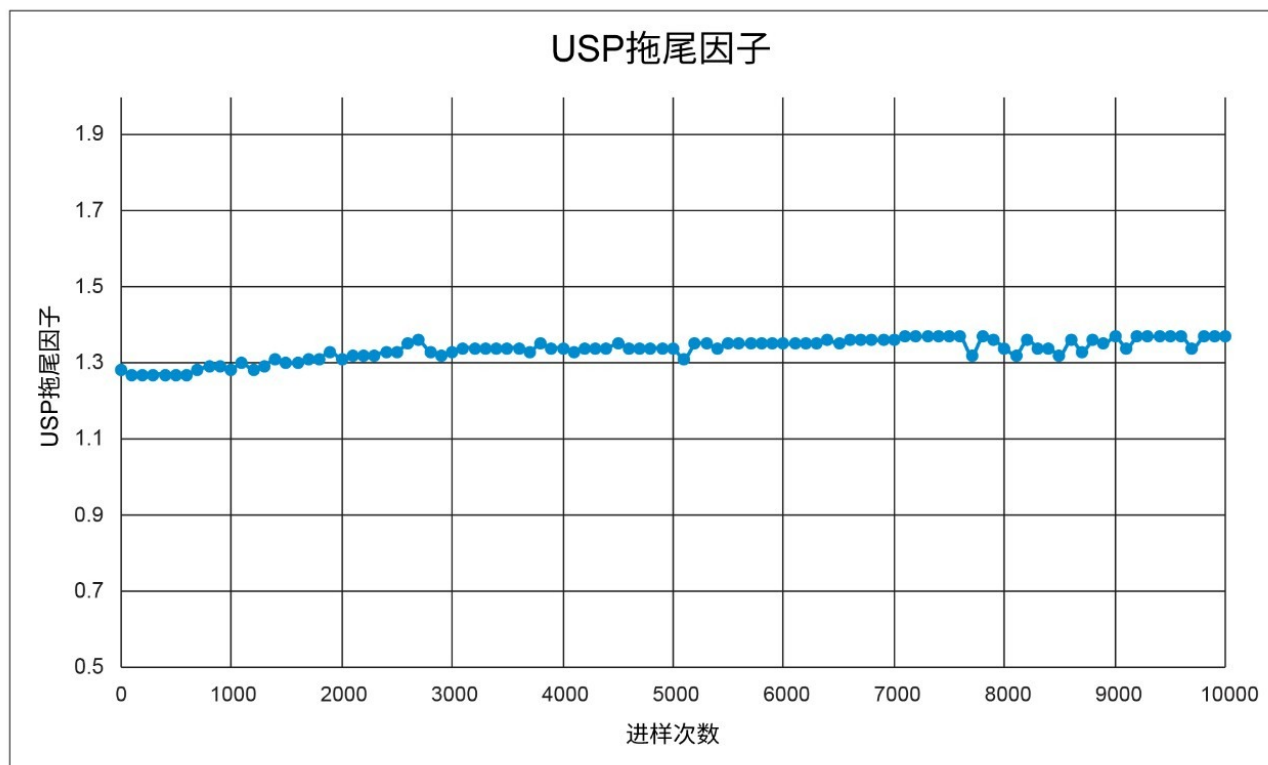


图3.色谱柱使用寿命测试期间每100次进样萘普生钠样品的萘普生USP拖尾因子

在整个测试期间，虽然最初溶剂管理器中的系统漏液导致柱压较低，但在修理后，含量测定结果、相对标准偏差和USP拖尾因子均在质量标准要求范围内。随着时间推移，观察到USP拖尾略有增加，但仍远低于USP拖尾的2.0限值。在10,000次进样期间，系统压力稳定，只能检测到轻微压力变化，未出现预期的色谱柱故障导致压力增加现象¹¹。通常，在使用寿命研究期间，药物制剂中的辅料会污染色谱柱入口筛板，导致系统压力稳定增加，色谱柱性能下降，表现为峰形劣化。鉴于色谱柱持续完成10,000次进样，可大致预计成本和时间。表2是使用3种系统类型和测试条件计算的色谱柱使用寿命内的溶剂成本初略估计值。

系统	每升溶剂成本	每次进样的流动相用量(mL)	色谱柱使用寿命内的流动相用量(L)	色谱柱使用寿命内的流动相成本	色谱柱使用寿命(天) -10,000次进样
Alliance HPLC	\$112.81	9.60	96.0	\$10,830	55.5
Arc UHPLC		2.30	23.0	\$2,595	15.6
ACQUITY UPLC H-Class		0.74	7.4	\$835	6.9

表2.基于最初的现代化结果，使用规定的系统类型时色谱柱使用寿命内的预计流动相成本。

流动相成本基于Sigma Aldrich官网上的乙腈、水和冰醋酸价格以及流动相组成计算¹²⁻¹⁴。按规定计算每升流动相成本¹⁵。

在计算这些成本时未考虑废液处置、溶剂储存以及分析人员投入时间。如表2所示，使用旧的HPLC系统和色谱柱

所需的成本大约是使用UHPLC仪器的5倍。此外，就萘普生钠分析而言，在10,000次进样中，UPLC技术与HPLC相比预计可节省10,000美元。UPLC分析条件与HPLC相比可节省48天的时间。

结论

USP专论所述方法采用的技术大多老旧过时。根据通则<621>中提供的指南，可以使用新的仪器和颗粒技术来取代宽径色谱柱、大粒径固定相和HPLC仪器。我们使用USP方法分析萘普生钠片，展示了方法现代化的价值。将原HPLC分析条件缩放至ACQUITY Arc UHPLC系统和ACQUITY UPLC H-Class系统，采用小粒径固定相和窄径短色谱柱，大幅缩短分析时间并减少流动相成本。在色谱柱使用寿命内（预计10,000次进样），流动相用量减少节省的成本多达10,000美元，分析运行时间缩短48天。

参考资料

1. Baksam V, Nimmakayala S, Devineni SR, Muchumarri RM, Shandilya S, Kumar P. Isolation and Characterization of Thermal Degradation Impurity in Brimonidine Tartrate by HPLC, LC-MS/MS, and 2DNMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021. (205) 114297.
2. Aliyu AO, Garba S, Balogun LO, Awe FE. Quality Assessment of Some Selected Brands of Amoxicillin Clavulanate from Pharmaceutical Stores in Kaduna Metropolis, Nigeria. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2021-Apr. (16) 33-40.
3. Monisha ST, Ela KN, Islam R, Ether SA, Rahman FI. Quality Attributes Comparison of Selected Brands of Rosuvastatin Calcium Tablets Marketed in the US and Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021 (33) 46-55.
4. 621-Chromatography.pdf Accessed 9-Sept-2021. <https://www.bioglobax.com/wp-content/uploads/2018/08/621-Chromatography.pdf> <<https://www.bioglobax.com/wp-content/uploads/2018/08/621-Chromatography.pdf>> .
5. Swann T, Nguyen JM. USP Method Modernization Using “Equivalent L/dp” and “Equivalent N” Allowed Changes with CORTECS C₈ and CORTECS UPLC C₈ Columns. Waters Application Note. 2016, [720005666EN](#).
6. Naproxen-sodium-tablets.pdf. Naproxen Sodium Tablets USP monograph. Accessed 9-Sept-2021.

https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/iras/naproxen-sodium-tablets.pdf <
https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/iras/naproxen-sodium-tablets.pdf>.

7. Berthelette KD, Summers M, Fountain KJ.利用CORTECS UPLC色谱柱改善分离度.沃特世应用纪要.2013, [720004737ZH](#).
8. Berthelette KD, Nguyen JM, Turner JE.在Agilent 1290液相色谱系统上使用CORTECS色谱柱在保持选择性的同时提高峰容量.沃特世应用纪要.2021, [720007250ZH](#).
9. Shia JC, Yabu M, Tran KV, Young M. 提高百草枯和敌草快的分离度：使用CORTECS UPLC HILIC色谱柱进行饮用水分析.沃特世应用纪要.2013, [720004732ZH](#).
10. Danaceau JP, Chambers EC, Fountain KJ.利用CORTECS C₁₈ 2.7 μm色谱柱和XBridge BEH Phenyl XP 2.5 μm色谱柱对镇痛药物的综合性药物组进行法医毒理学分析的优势.沃特世应用纪要.2014, [720005185ZH](#).
11. Berthelette KD, Fountain KJ, Summers M. Improving Method Robustness for Routine Analysis of Pharmaceutical Formulations.Waters Application Note.2013, [720004807EN](#).
12. 梯度级别≥99.9%的HPLC级乙腈产品页。每升成本：185.00美元。
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigald/34851?context=product> <
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigald/34851?context=product>>.
13. HPLC级水产品页。每升成本：51.20美元。
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigald/270733?context=product> <
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigald/270733?context=product>>.
14. 符合ACS规格的HPLC级冰醋酸产品页。每500 mL成本：87.90美元。
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/mm/ax0074?context=product> <
<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/mm/ax0074?context=product>>.
15. 每升流动相成本计算方式。

$$\left[\frac{\$187.00}{1000 \text{ mL 乙腈}} * 450 \text{ mL 乙腈} \right] + \left[\frac{\$51.20}{1000 \text{ mL 水}} * 540 \text{ mL 乙腈} \right] + \left[\frac{\$87.90}{500 \text{ mL 乙酸}} * 10 \text{ mL 乙酸} \right] = \text{溶剂成本/L}$$

特色产品

- Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

- [ACQUITY Arc系统 <https://www.waters.com/134844390>](https://www.waters.com/134844390)
- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007427ZH, 2021年11月



© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.