

使用USP通则 <621>《色谱法》中允许的液相色谱梯度调整和Alliance™ iS HPLC System完成方法现代化改进

Catharine Layton, Paul D. Rainville

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

美国药典(USP)通则<621>《色谱法》中定义了在不从根本上修改药典分析程序的情况下，各种色谱测试参数可以调整的程度。在本应用纪要中，我们将通则中所述的梯度方法调整与Alliance™ iS HPLC System相结合，对USP抗病毒药物硫酸阿巴卡韦分离各论中的色谱柱尺寸和系统进行现代化改进。

优势

- 与Alliance iS HPLC System搭配使用时，美国药典通则<621>《色谱法》允许的梯度方法调整可生成符合法规要求的优质数据
- Alliance iS HPLC System的色谱背压限制范围更宽，可使用一系列现代色谱柱尺寸提供高效分离，从而减少运行时间、进样体积和溶剂消耗

简介

美国药典(USP)解决方案组合可用于质量保证, 增强监管的可预测性, 并帮助制造商分销优质药品、膳食补充剂和食品。2022年12月1日发布了通则<621>《色谱法》的整合标准。该标准结合了USP与《欧洲药典》(EuPh)第2.2.46节《色谱分离技术》和《日本药典》(JP)第2.01节《液相色谱》的内容。整合这些监管指南后, 可以使用现代化色谱工具, 无需重新验证完整各论, 使方法更具灵活性。

色谱分离受到色谱柱硬件和系统硬件的影响。这些参数对方法性能至关重要, 各论方法经过验证后, 硬件的灵活性受到限制。例如, 现代HPLC色谱柱硬件的直径通常为4.6 mm, 使用各种新的固定相取代基, 而5 μm HPLC粒径被 $\leq 3.5 \mu\text{m}$ 粒径所取代, 以在更短的时间用更少的溶剂实现类似的分离。现代HPLC系统, 如Alliance iS HPLC System (图1), 具有高色谱分离效率、直观的触摸屏界面、免工具色谱柱接头和更宽的HPLC操作背压限制范围, 在调整各论方法时提供可靠的灵活性, 适合现代色谱柱硬件尺寸。



图1. 配备可变波长紫外检测器的Alliance iS HPLC System

在本应用纪要中，我们采用通则<621>《色谱法》中允许的梯度方法调整，对代表性USP各论方法的色谱柱和系统进行现代化改进（表1）。选择抗病毒化合物硫酸阿巴卡韦的杂质分离分析是因为，经验证的梯度方法在该分析中生成一对具有挑战性、部分分离的关键峰，色谱系统的适用性标准正是基于此。执行USP <621>中允许的几项有

助于使用现代化硬件的梯度系统调整后，检查得到的色谱图是否能够满足原始各论方法的系统适用性要求。

参数	梯度洗脱中允许的调整
色谱柱：柱长(L) 粒径(d_p)	每个色谱柱常数 L/d_p 在-25%到+50%之间。
色谱柱：内径	可以调整内径。
进样体积	改变色谱柱直径时调整。 只要满足SST标准，即使未改变色谱柱尺寸，也可以改变进样体积。
流速	改变粒径和/或色谱柱尺寸后，相应地计算流速。 $\pm 50\%$ ，不改变色谱柱尺寸。
梯度曲线	梯度调整基于粒径、色谱柱尺寸和流速进行
固定相	不改变取代基的种类，固定相的理化特性和化学修饰的程度必须相似。
孔隙	如果SST要求已满足，选择性、特定受控杂质的洗脱顺序经证明相同，则允许从多孔颗粒(TPP)改为表面多孔颗粒。如果比值 $(t_R/W_h)^2$ 在-25%至+50%以内，则可以使用L和 d_p 的其他组合。
柱温	$\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ (等度)， $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ (梯度)
流动相	$\pm 0.2\text{ pH}$ 单位，参见二元和三元混合物的详细信息
检测器波长	不允许改变

表1.在不从根本上修改药典分析程序的情况下，各种色谱测试参数可以调整的程度如表中所述。红色方框指示本应用纪要关注的参数。

材料与方法

USP各论：	硫酸阿巴卡韦，有机杂质
液相色谱系统：	配备可变波长紫外(TUV)检测器的Alliance™ iS HPLC系统
色谱柱：	Symmetry™ C ₁₈ 色谱柱，3.9 x 150 mm，5 μm， P/N: WAT046980 Symmetry C ₁₈ 色谱柱，4.6 x 150 mm，5 μm，P/N: WAT045905 Symmetry C ₁₈ 色谱柱，4.6 x 100 mm，3.5 μm， P/N: WAT066220 XBridge™ C ₁₈ 色谱柱，4.6 x 100 mm，3.5 μm，P/N:

1860033

XSelect™ HSS™ T3色谱柱, 4.6 x 150 mm, 3.5 μm,
P/N: 186004786

软件: Empower™ 4 FR 5色谱数据系统(CDS)

样品: 硫酸阿巴卡韦系统适用性混合物(P/N: 1000500,
USP)

结果与讨论

采用系统性策略对USP硫酸阿巴卡韦分离各论进行现代化改进。第一步，确定各论方法使用的色谱柱：L1固定相取代基与5 μm粒径和3.9 x 150 mm色谱柱硬件。选择直径4.6 mm，柱长(L) 100 mm和150 mm的现代色谱柱硬件，搭配L1固定相取代基，执行方法现代化。色谱柱的固定相取代基粒径为5 μm或3.5 μm (d_p)。任何情况下，USP <621>指南允许L/ d_p 比在各论方法的-25%至到+50%之间。

根据USP <621>指南中提供的公式，用数学方法调整现代目标色谱柱的流速、进样体积和梯度开始时间。首先，公式1通过调整流速来维持各论分离的线性流速。其次，根据公式2调整进样体积以保持分析物与柱体积的比率。最后，根据计算的目标色谱柱流速、长度和粒径（表2），利用公式3调整梯度开始时间。开始时间调整保留了各论分离中报告的梯度斜率与柱体积比。USP <621>指南提供了公式4，允许调整系统延迟体积（如果在各论验证期间有指定）。硫酸阿巴卡韦各论中未报告系统延迟体积，且分离过程不包括初始等度保持时间。因此，在方法现代化改进过程中，系统延迟体积调整未应用于计算的梯度开始时间。

$$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times dp_1)}{(dc_1^2 \times dp_2)} \right] = \frac{1.00 \text{ mL}}{\text{min}} \times \left[\frac{(4.6 \text{ mm}^2 \times 5 \text{ } \mu\text{m})}{(3.9 \text{ mm}^2 \times 3.5 \text{ } \mu\text{m})} \right] = 1.987 \text{ mL/min}$$

F_1 = 各论方法的流速(mL/min)
 F_2 = 调整后的流速(mL/min)
 dc_1 = 各论方法的色谱柱内径(mm)
 dc_2 = 目标色谱柱内径(mm)
 dp_1 = 各论方法的色谱柱粒径(μ m)
 dp_2 = 目标色谱柱粒径(μ m)

公式1：各论色谱柱和4.6 x 100 mm, 3.5 μ m色谱柱的流速调整。

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \left[\frac{(L_2 dc_2^2)}{(L_1 dc_1^2)} \right] = 20 \text{ } \mu\text{L} \times \left[\frac{(100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}^2)}{(150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ } \mu\text{m}^2)} \right] = 18 \text{ } \mu\text{L}$$

V_{inj1} = 各论方法的进样体积(μ L)
 V_{inj2} = 调整后的进样体积(μ L)
 L_1 = 各论方法的柱长(mm)
 L_2 = 各论方法的柱长(mm)
 dc_1 = 各论方法的色谱柱内径(mm)
 dc_2 = 调整后的色谱柱内径(mm)

公式2：各论色谱柱和4.6 x 100 mm, 3.5 μ m色谱柱的进样体积调整。

$$t_{G2} = t_{G1} \times \left(\frac{F_1}{F_2} \right) \left[\frac{(L_2 \times dc_2^2)}{(L_1 \times dc_1^2)} \right] = t_{G1} \times \left(\frac{1.000 \text{ mL/min}}{1.987 \text{ mL/min}} \right) \left[\frac{(100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}^2)}{(150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm}^2)} \right] = 0.467$$

(应用于各论方法梯度时间的乘数)

t_{G1} = 各论方法的梯度时间(min)
 t_{G2} = 调整后的梯度时间(min)
 F_1 = 各论方法的流速(mL/min)
 F_2 = 调整后的流速(mL/min)
 dc_1 = 各论方法的色谱柱直径(mm)
 dc_2 = 目标色谱柱直径(mm)

公式3：各论色谱柱和4.6 x 100 mm, 3.5 μ m色谱柱的梯度调整。

各论方法的时间(min)	% B		目标色谱柱调整后的时间	% B
0 min	5	→	0 min	5
20 min	30		0 min + (20 min*0.467) = 9.3 min	30
35 min	90		9.3 min + (15 min*0.467) = 16.3 min	90
35.1 min	5		16.3 min + (0.1 min*0.467) = 16.4 min	5
50 min	5		16.4 min + (14.9 min*0.467) = 23.4 min	5

表2.使用乘数的梯度时间调整。

$$t_c = t - \left[\frac{(D - D_0)}{F} \right]$$

t = 各论方法梯度表中的时间设置(min) (如果有)

t_c = 校正后的梯度时间(min)

D = 目标仪器的系统延迟体积(mL)

D₀ = 各论方法中列出的系统延迟体积(mL)

F = 流速(mL/min)

公式4.各论仪器的延迟体积调整 (如果有)

使用沃特世OBD制备级方法转换计算器和方法转换计算器2.0 (图2) 确认目标色谱柱的手动梯度计算。在线计算器特别重要,因为它们能够为调整后的梯度估计最大梯度背压。尽管这一估计是针对100%有机流动相组成,而不是各论中的85%有机相组成计算的,但增加了对调整后的方法不会超过Alliance iS HPLC System 10,000 psi背压限制的信心。



图2.沃特世OBD制备级方法转换计算器和方法转换计算器2.0在线方法调整计算器(www.waters.com)。

使用调整后的梯度和现代化色谱硬件分析了各论方法的系统适应性杂质混合物(SST)。对于所有现代色谱柱尺寸，未分离的阿巴卡韦关键峰对成功达到NLT 1.5的各论系统适用性分离要求（图3）。将SST相对保留时间(RRT)与用于初始各论分离的固定相生成的相对保留时间进行比较时，相同L1固定相取代基的色谱柱表现最相似，而不同L1固定相取代基的RRT有所不同（图4）。如USP <621>中所述，使用各种取代基可能会观察到峰缺失和/或反转，因此在通过替代系统上的PDA谱图分析进行方法调整后鉴定色谱峰。

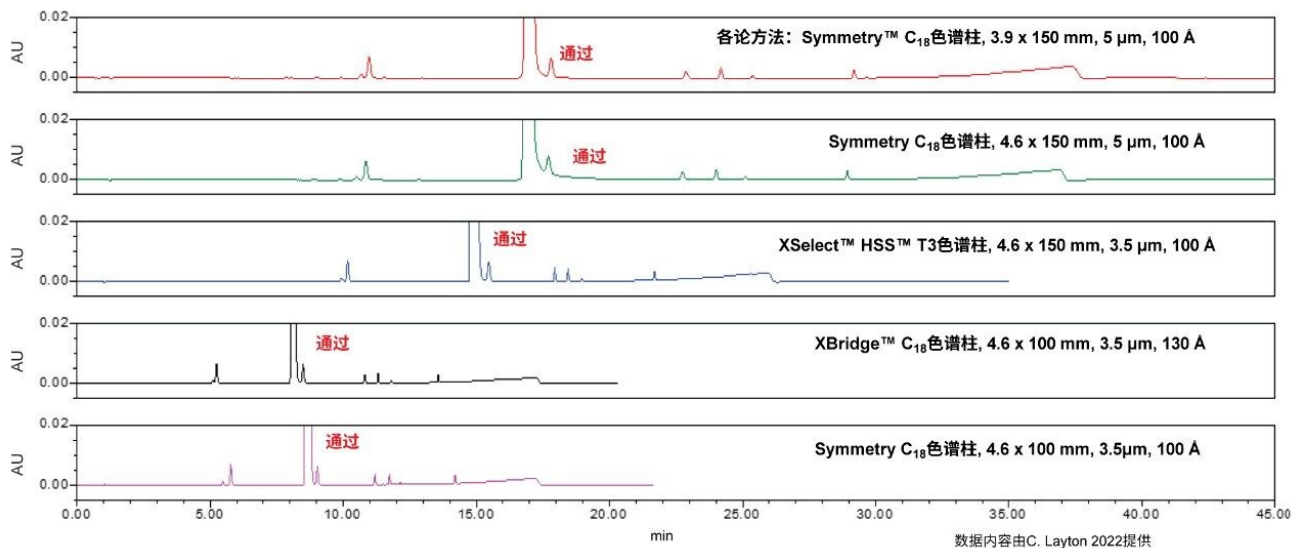


图3: 各论和调整后的色谱柱的叠加色谱图

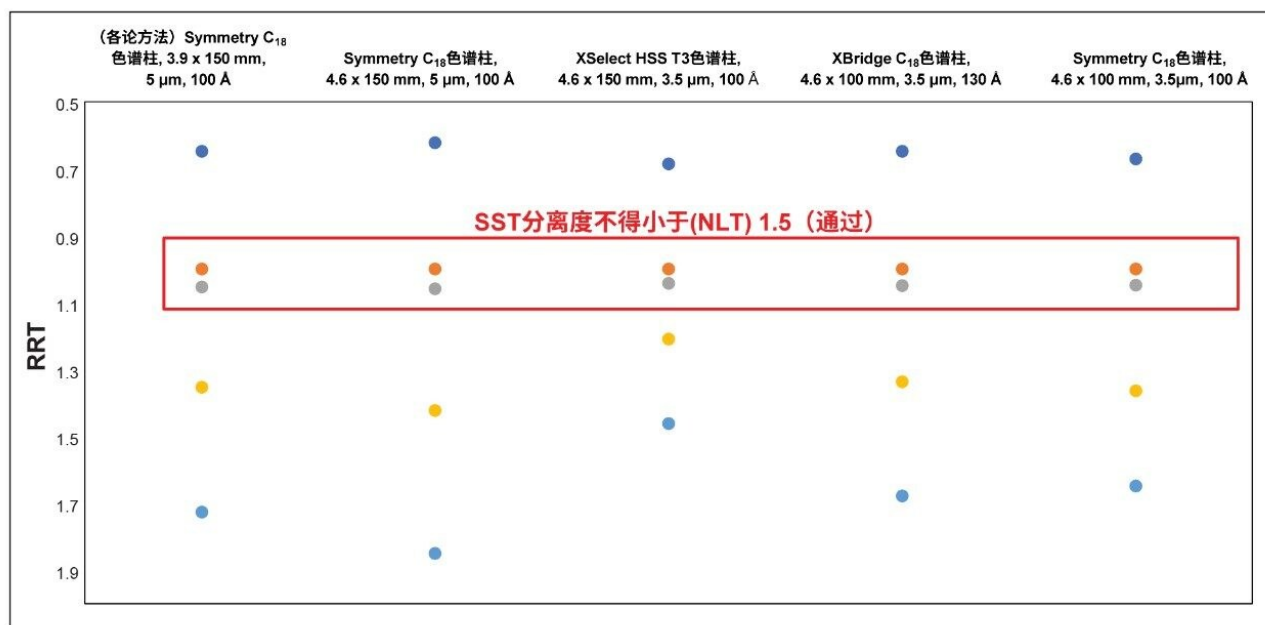


图4: 系统适用性混合物杂质的相对保留时间(RRT)比较

Alliance iS HPLC System与现代化色谱柱硬件尺寸相结合，为经验证的各论分离提供了特有的优势。与背压限制仅为5,000 psi的传统HPLC系统相比，采用现代化管路直径的LC系统有利于使用分离背压高达10,000 psi的色谱柱硬件。此外，在保留USP <621>指南L/d_p比要求的同时，各论方法的粒径从5 μm成功降至3.5 μm。这些硬件组合显著减少了经验证的各论分离的运行时间、进样体积和溶剂消耗（表3）。

HPLC色谱柱				
	(各论方法) 3.9 × 150 mm, 5 μm, 100 Å	4.6 × 150 mm, 5 μm, 100 Å	4.6 × 150 mm, 3.5 μm, 100 Å	4.6 × 100 mm, 3.5 μm, 100 Å, 130 Å
L/dp	30,000	30,000	42,900	28,600
运行时间	50 min	50 min	35 min	23 min
每小时运行次数	1.2	1.2	1.7	2.6
流动相总量	50 mL	71 mL	71 mL	47 mL
进样体积	20 μL	27.8 μL	27.8 μL	18.5 μL
潜在优势	—	优化后的直径	优化后的直径/减少 运行时间/减少进样体积	优化后的直径/减少运行时间/ 减少流动相用量/减少进样体积

表3.搭配Alliance iS HPLC System使用时，现代化色谱柱硬件带来的好处

结论

根据通则<621>《色谱法》（2022年12月1日），可以成功调整USP各论的梯度分离，以维持Alliance iS HPLC System的系统适用性验收标准。Alliance iS HPLC System具有直观的触摸屏界面，简单易用，可在不影响经验证的各论系统适用性的情况下实现色谱柱现代化。该硬件提供了支持各种现代HPLC色谱柱直径的操作背压限制，可以观察到特有的色谱优势，例如节省了运行时间、进样体积和溶剂。

参考资料

1. General Chapter <621> Chromatography, Official Date: 01-Dec-2022, www.USP.org, referenced 01/06/2023.

2. Abacavir Sulfate Monograph official 01-May-2020, www.uspnf.com, referenced 01/06/2023.
3. OBD制备级方法转换计算器, www.waters.com <<http://www.waters.com/>> , 访问日期01/06/2023.
4. 方法转换计算器2.0, www.waters.com <<http://www.waters.com/>> , 访问日期01/06/2023.

特色产品

[Alliance™ iS HPLC System](http://nextgen/cn/zh/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html) </nextgen/cn/zh/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器](https://www.waters.com/514228) <<https://www.waters.com/514228>>

[Empower色谱数据系统](https://www.waters.com/10190669) <<https://www.waters.com/10190669>>

720007865ZH, 2023年2月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)