

应用纪要

# 使用Alliance iS HPLC System改进氯己定的残留性能

Jennifer Simeone, Paula Hong

Waters Corporation

---

## 摘要

残留在许多用户的高效液相色谱(HPLC)系统上都是一个非常普遍的问题。这些残留形式多样，包括因流路中的空隙体积而导致的体积残留，以及因样品“粘附”或吸附到流路表面而导致的吸附残留。如果分析方法存在残留问题，则必须了解残留的形式，这样才能有效地从根源上消除残留。很多时候，分析方法可能同时存在体积残留和吸附残留。本应用纪要将在不同供应商的各种HPLC系统上评估氯己定的残留。此外，还将探索缓解策略，即实施针清洗和/或延长清洗时间。

## 优势

---

- 使用Alliance iS HPLC System改善残留性能
- Alliance iS系统使用简便易用的免工具接头来消除体积残留
- 改进后的清洗功能可显著减少吸附残留

---

## 简介

制药和生物制药行业普遍需要在各种HPLC平台上开发和运行方法。在不同LC系统（通常由不同供应商制造）之间迁移方法时，无论是何种LC系统，获得一致的方法性能都至关重要。由于关键方法性能通常为保留时间和峰面积精密度、峰分离度和信噪比等属性，而样品残留是一个经常遭到忽视或未得到充分研究的方法性能参数。残留是指一次进样的分析物出现在后续进样中的情况，这是由于分析物具有吸附特性，容易粘附在流路中，或是由于流路中有空隙体积，导致未流经体积可能包含目标分析物并出现在后续进样中。在本应用纪要中，我们通过缩放盐酸氯己定有机杂质分析的USP各论方法，评估了多个HPLC系统的残留性能。

---

## 实验

### 样品描述

称取二盐酸氯己定（Sigma-Aldrich，密苏里州圣路易斯）并用流动相A溶解，使终浓度为1.13 mg/mL氯己定（1.4 mg/mL二盐酸氯己定），制备氯己定极端溶液。用流动相A将储备液稀释至终浓度为11.3 µg/mL氯己定（14 µg/mL二盐酸氯己定），制备氯己定标准溶液。所有空白进样（流动相A）都来自不同的样品瓶。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：

Alliance iS HPLC System、供应商X的HPLC系统（HPLC系统1和2）、供应商Y的HPLC/UHPLC系统（HPLC系统3）、供应商Z的HPLC系统（系统4）

检测:	所有系统均采用紫外检测
样品瓶:	LCGC认证透明玻璃12×32 mm螺口最大回收样品瓶，配有瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫(P/N: 186000327C)
色谱柱:	XSelect HSS C <sub>18</sub> 色谱柱, 100 Å, 2.5 μm, 3 mm x 100, P/N: 186006143
柱温:	30 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.6
流动相A:	0.1%三氟乙酸的80:20水:乙腈溶液
流动相B:	0.1%三氟乙酸的90:10乙腈:水溶液
洗针溶剂:	50:50乙腈/水

## 梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.600	100	0	6
0.6	0.600	100	0	6
9.1	0.600	80	20	6
12.6	0.600	80	20	6
15.4	0.600	70	30	6
17.4	0.600	70	30	6
17.8	0.600	100	0	6
22.0	0.600	100	0	6

## 数据管理

色谱软件：

Empower 3.7.0

---

## 结果与讨论

### 体积残留与吸附残留

在运行任何受管制的HPLC方法时，能够获得一致且准确的定量测定都至关重要。因此，任何LC系统的残留性能都是一个重要属性。然而，不同的HPLC系统在仪器设计、接头和针清洗行为方面存在显著差异。这些差异可能需要用户确定适当的参数和/或清洗溶剂，才能使系统发挥理想性能。由于残留通常分为体积残留或吸附残留，尽管同一种方法中可能会遇到两种形式的残留，这仍然额外增加了残留处理的复杂程度。虽然两种类型的残留都有可能

影响色谱结果，但影响因素却大不相同。

当流路内存在空隙或未流经体积时，样品可能会停留，直到进入后续进样，从而发生体积残留。这通常是衡量系统与器械连接状况的指标。例如，连接时端口中未触底的任何管路，或阀制造过程中的任何器械容差等，都可能是造成未流经体积的来源。显然，制造和组装过程在这里起着重要作用，但由用户进行的连接也极为重要。由于每个供应商使用的接头不同，每个接头的正确连接说明也略有不同，因此用户很容易在不知情的情况下犯错。Alliance iS HPLC System上的免工具接头无懈可击，可完全避免错误连接，从而消除了体积残留的常见来源。

另一种形式的残留是吸附残留，即目标分析物吸附到LC系统的部件中。吸附残留取决于几个因素，包括LC流路中使用的材料、分析物的化学结构以及分析中使用的方法条件。氯己定是一种常用于确定吸附残留的化合物，因为它具有“粘性”，并且经常因为具有吸附性而出现在供应商的残留规范文件中。关于LC流路中使用的材料，本研究中评估的所有系统都使用了主要由不锈钢制成的流路，包括进样针。针是唯一直接接触样品的部件，因此最有可能受到吸附的影响。然而，在本研究中，所有HPLC系统均采用流通针式进样设计，针内部也是流路的一部分，并由程序梯度连续清洗。因此，进样针的清洗机制和清洗溶液对针外部的吸附残留影响最大。虽然每个供应商和LC型号的清洗机制和清洗建议都不同，但所有系统最初使用的都是默认或推荐的清洗。我们通过延长清洗时间来确定额外清洗对残留测定的影响。所有系统选择的清洗溶剂都是50:50水:乙腈的混合溶液，比氯己定的洗脱条件稍强。

## 方法缩放和优化

为了评估氯己定在不同供应商和系统中的残留，我们使用盐酸氯己定的USP各论方法<sup>1</sup>作为起点，但需要进行修改以观察针清洗设置和设计对残留性能的影响。为提高通量，将方法的几何规格从4.6 x 250 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ 色谱柱缩放到3 x 100 mm, 2.5  $\mu\text{m}$ 色谱柱，使运行时间从65分钟减少到19分钟。进样体积从标定值1.7  $\mu\text{L}$ 增加到5  $\mu\text{L}$ ，以放大各种参数变化对残留的影响。最后，缩放方法包括延长梯度步骤4 (80:20 A:B)的保持时间，使氯己定峰在基线的平坦部分洗脱，减少积分的主观性，并且使不同进样与不同系统间的结果更加一致。还可以确保氯己定峰在基线的稳定部分洗脱，无论不同系统的延迟体积是否不同。

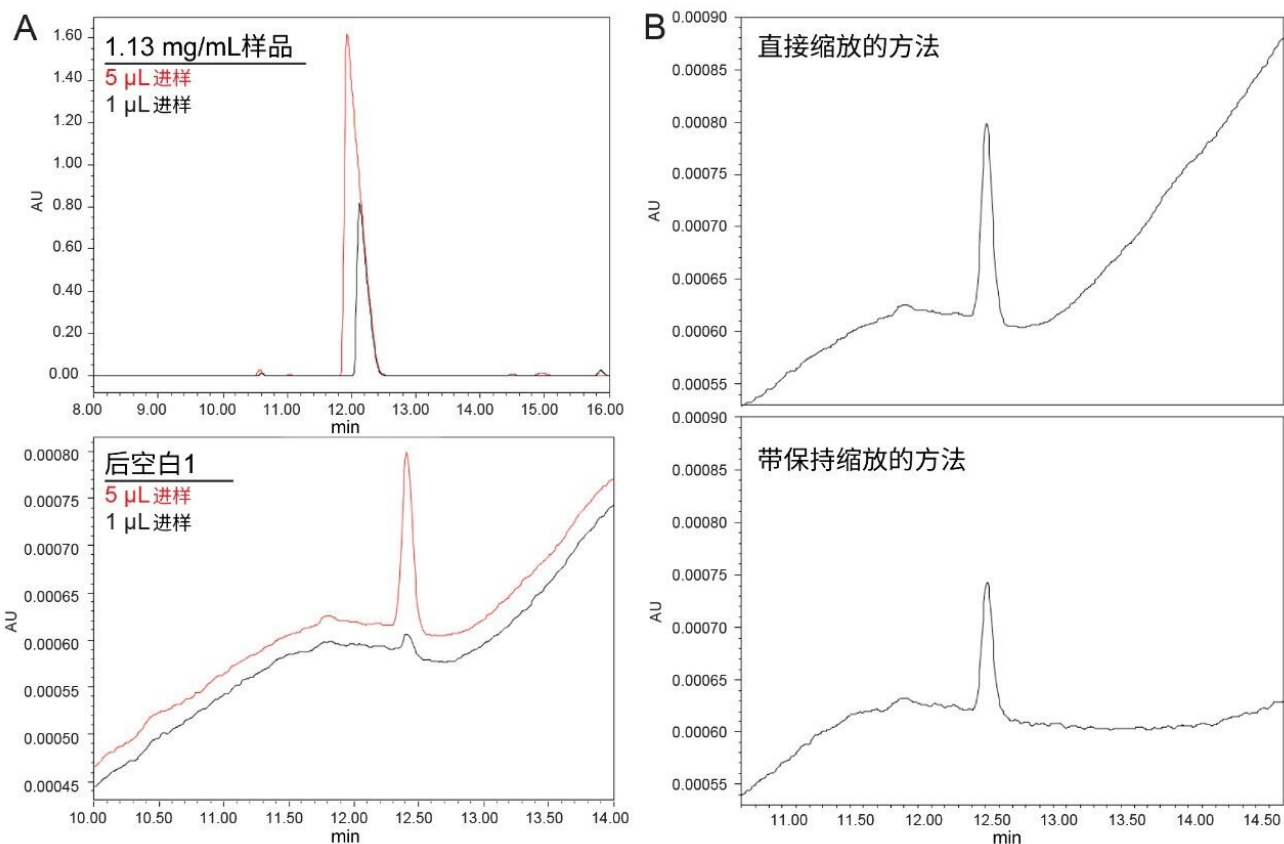


图1.A)极端样品（顶部）和后空白1（底部），展示实测残留与进样体积的关系  
B)延长梯度步骤，使氯己定峰在平坦的基线区域洗脱。

## 实验设计

各残留测定顺序设置为：前空白x3、氯己定标准溶液(11.4 µg/mL) x 3、氯己定极端溶液(1.14 mg/mL) x 3、后空白1（特定样品瓶1）、后空白2（特定样品瓶2），后空白3（特定样品瓶3）。在每次残留测定开始之前，通过多次前空白进样来确认系统是“干净的”。流动相最多使用三天，然后制备新的批次。

## 残留结果

按照上述方法条件和样品顺序，确定每个系统的残留。残留百分比计算如下：

$$\% \text{残留} = \frac{\text{(后空白1的峰面积)}}{\text{(标准溶液的平均峰面积)}} \times \frac{\text{(标准溶液的浓度)}}{\text{(极端溶液的浓度)}} \times 100$$

公式1

如前所述，每个供应商都有自己推荐或默认的清洗模式。仪器方法中更高级的设置（例如针清洗）通常不会更改默认设置，因此初始残留评估是使用供应商默认设置完成的。图2显示了使用供应商推荐/默认清洗模式评估的每个系统的氯己定残留结果。

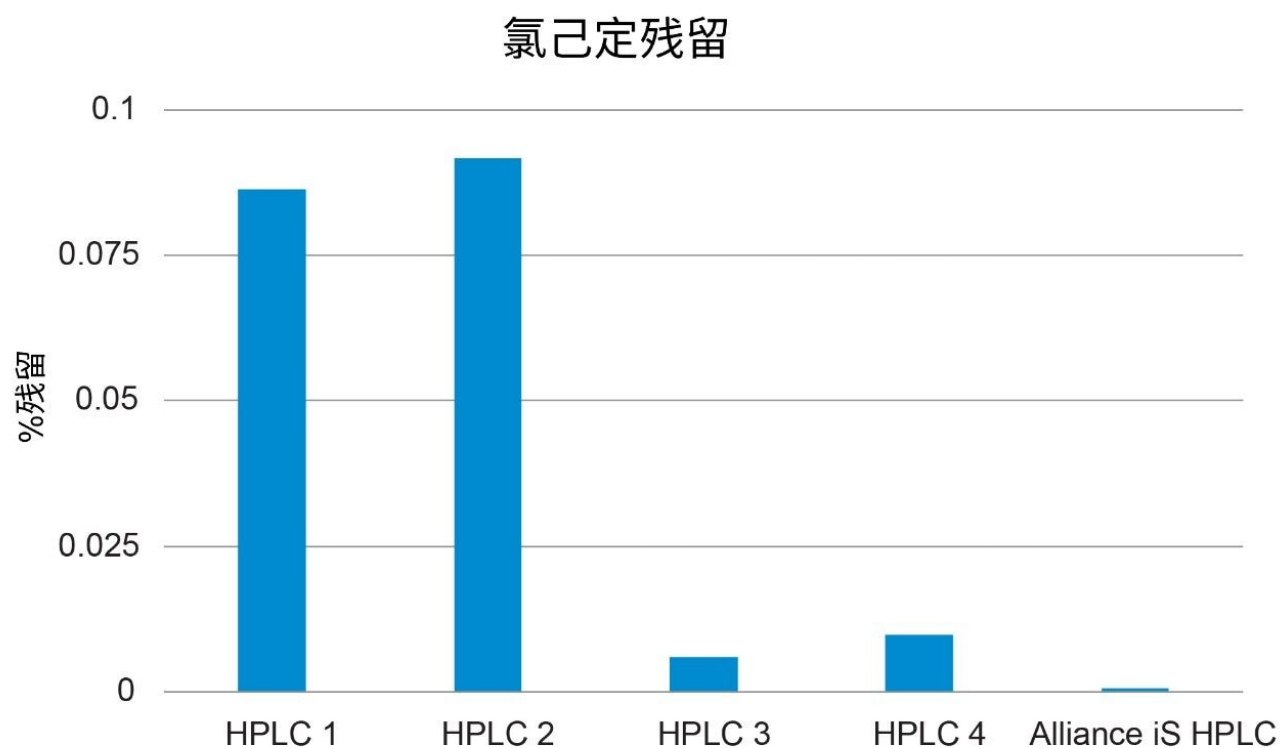


图2.每个LC系统在供应商推荐或默认的清洗模式下获得的氯己定残留结果

HPLC系统1-3默认或推荐的清洗设置是不清洗。不出所料，当不进行清洗时，氯己定有明显残留，特别是在HPLC系统1和2上。相反，默认采用针清洗的系统4和5残留量明显较低。Alliance iS HPLC System默认使用1000  $\mu$ L洗针液，分两部分（进样前和进样后）执行清洗，测试结果显示它的总残留量最低，只有0.00055%（图3）。

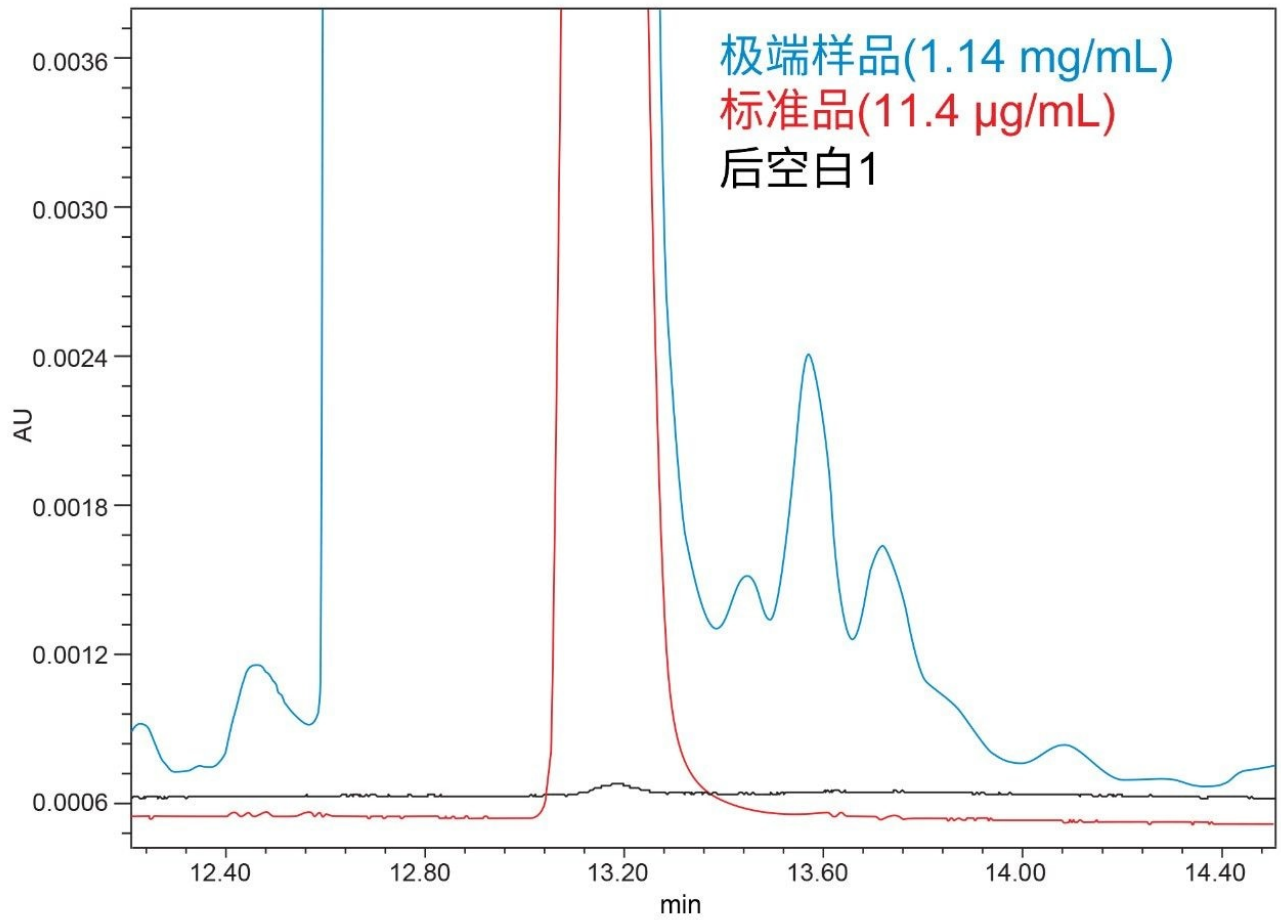
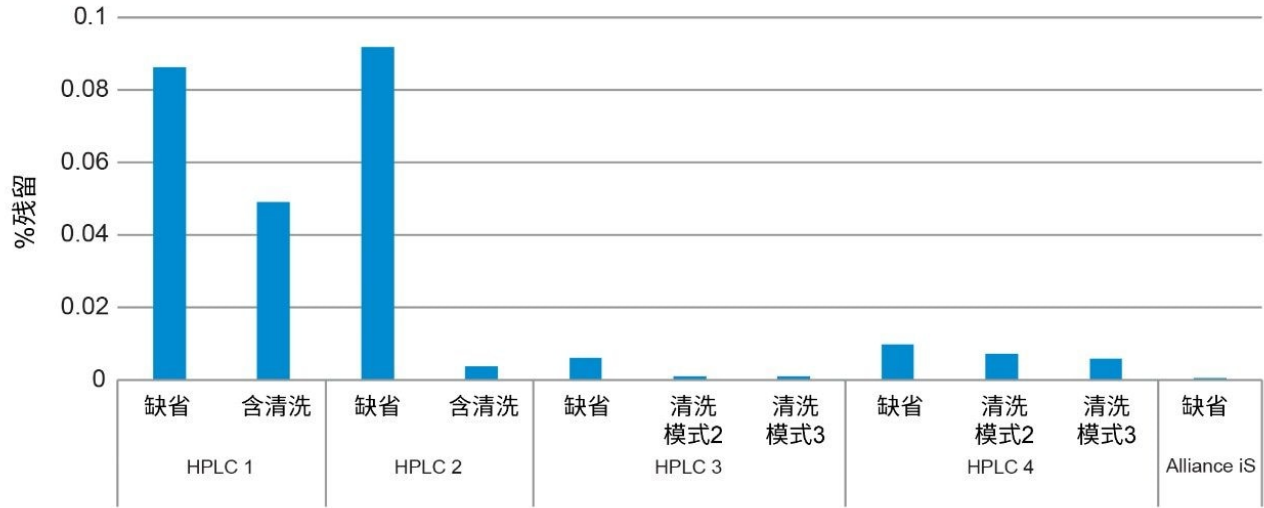


图3.在Alliance iS HPLC System上测得的氯己定残留(0.00055%)

为了评估调整针清洗设置的影响，我们除了评估默认清洗模式外，还检查了每个系统的额外清洗模式和/或清洗持续时间（取决于清洗机制）。这样做的目的是在优化清洗设置后，比较在所有系统上观察到的残留，了解每个系统的最低残留水平。使用各种清洗模式测试的系统结果如图4所示。



氯己定残留 - 多种清洗模式



氯己定残留 - 多种清洗模式

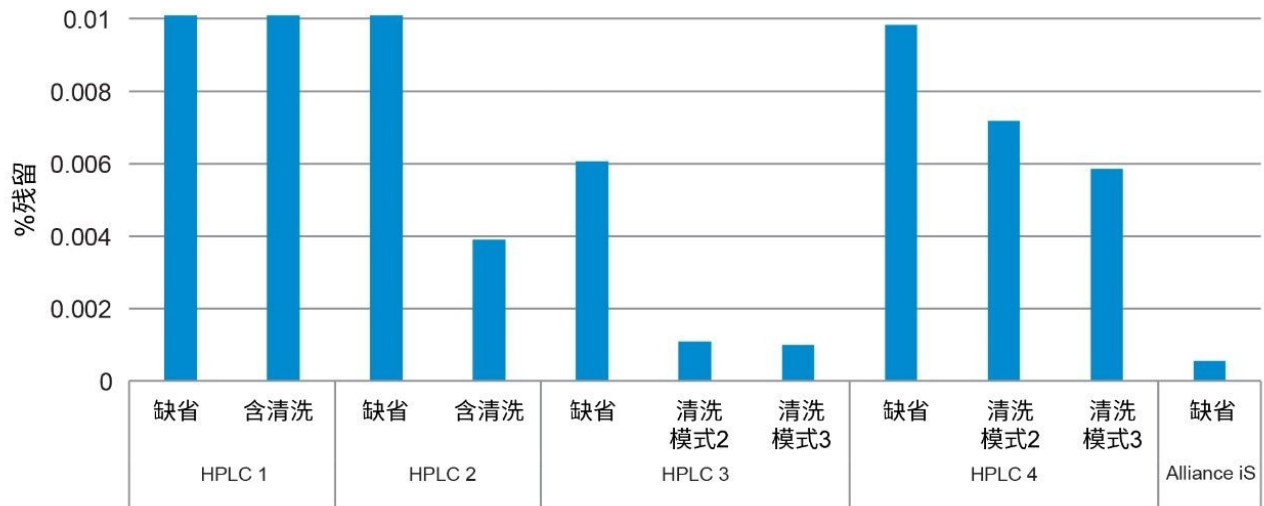


图4.A)每套LC系统使用供应商推荐/默认的清洗模式与选配的额外清洗相比，获得的氯己定残留结果全视图。  
B)放大残留规模% (0~0.01%)。

和预期一样，对建议不清洗的系统添加针清洗步骤后，测得的残留的确有所减少。清洗的机制和设计不同，残留性能的改善差异很大。除了影响残留，精确的清洗机制还会影响运行时间。例如，具有独立清洗站和进样端口的系统，由于针在两个站之间移动要花时间，因此运行时间增加。相比之下，Alliance iS HPLC System从同一个端

口执行针清洗和进样，这种设计更节省时间。此外，Alliance iS HPLC System默认的针清洗设置和针清洗设计已经过优化，可获得优异的残留性能。

HPLC系统1和2的清洗模式是用针吸取样品然后浸入一瓶清洗溶液中。HPLC系统3的清洗机制是将针移动到清洗站（样品吸入之前或之后的某个点），并使用由低压注射器提供的主动流动溶剂来清洗针。HPLC系统4的清洗机制是将针装在进样器组件的密封包中，清洗针的外表面。最后，Alliance iS HPLC System的针清洗分两个阶段执行，针被降低到进样端口，洗针溶剂主动流过针外部。因为清洗与进样在同一个位置，所以因清洗而增加的运行时间可以忽略不计。图5显示了每个系统默认不清洗与添加高级针清洗步骤后的相对运行时间。

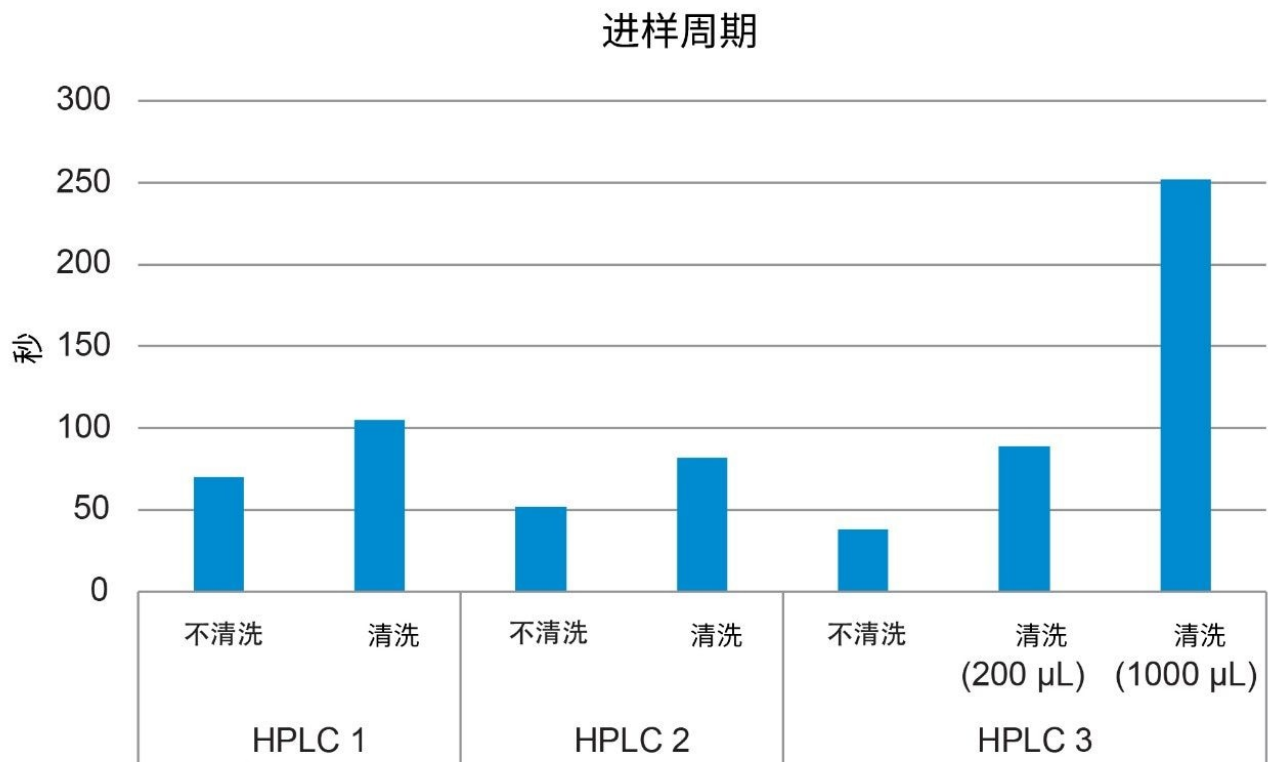


图5.各种HPLC系统默认不清洗与添加清洗步骤后的运行时间

对于使用清洗机制为将针浸入一瓶清洗溶液中的两套HPLC系统（HPLC 1和HPLC 2），运行时间平均增加了30-35秒。对于使用独立清洗站并使溶剂流过针外部的HPLC系统，运行时间的增加在很大程度上取决于洗针液的用量。200 µL洗针液使运行时间大约增加50秒，而量更大的1000 µL洗针液使运行时间增加了高达214秒。作为参考，Alliance iS HPLC System的运行时间（包括使用默认清洗条件最终得到最低残留量）比默认不清洗的3个HPLC系

统都短。因此，即使不使用会导致运行时间大幅增加的高级清洗机制，测得的残留也非常低，这种性能更多地取决于系统本身的设计。

---

## 结论

在通常来自不同制造商的各种LC系统上运行HPLC方法对于制药和生物制药行业很常见。此外，残留是一个重要的方法性能参数，在不同LC系统之间迁移方法时应考虑和监测。在本应用纪要中，我们通过缩放盐酸氯己定有机杂质分析的USP各论方法，评估了多个LC系统的残留性能，其中 Alliance iS HPLC System在所有测试系统中的总体残留最低。Alliance iS HPLC System对所有常用接触点（包括色谱柱连接）使用免工具接头。这些接头设计为零死体积，这意味着因连接不当而导致流路中出现空隙的风险很低。此外，Alliance iS HPLC System的针清洗机制经过改进，能得到优异的残留性能，即使用于具有挑战性的化合物（如氯己定）也是如此。Alliance iS HPLC System获得优异的残留性能不需要耗时的方法优化，也不需要会显著增加运行时间的清洗机制。

---

## 参考资料

1. Monograph: USP.Chlorhexidine Hydrochloride.In: USP–NF.Rockville, MD: USP; May 1, 2022.  
DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M15650\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M15650_03_01) <  
[https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M15650\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M15650_03_01)> .

---

## 特色产品

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

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

720007868ZH, 2023年2月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)