

亲水作用液相色谱(HILIC)方法迁移第1部分： 从传统HPLC系统到Alliance™ iS HPLC System

Elom Y Pedanou, Paula Hong, Neil J. Lander

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了不同行业如何成功地完成传统HPLC系统的方法迁移 — 从亲水作用液相色谱(HILIC)到Alliance iS HPLC System。由于HPLC仪器设计的差异，在进行HILIC方法迁移时可能会影响结果，这一点颇为棘手。Alliance iS HPLC System是一套设计精良的系统，有助于克服这些挑战，实现无缝迁移。本研究在两套传统HPLC系统上分析了美国药典(USP)中关于盐酸西替利嗪含量检测和有机杂质的各论方法，并将其迁移到Alliance iS HPLC System上。三套系统均符合适应性要求，并得到了相当的结果。

优势

- 将HILIC方法从标准HPLC系统无缝迁移至Alliance iS HPLC System
- 提升信噪比 (S/N)

简介

大多数受法规监管的实验室，例如药物质量控制(QC)实验室，都采用高效液相色谱(HPLC)系统分析中间体和终产物。在考虑购买新的HPLC系统时，是否能顺利迁移经过验证的现有方法就显得至关重要。方法的特定属性可能会增加该过程的复杂性。例如，亲水作用液相色谱(HILIC)分离使用高有机含量流动相，并且使用的清洗液不同于更典型的反相色谱(RP)所用的清洗液。这导致了与HILIC方法相关的特定注意事项和挑战。

在本研究中，通过使用USP中的盐酸西替利嗪含量测定和有机杂质各论方法，评估HILIC方法从传统HPLC系统到Alliance iS HPLC System的迁移¹。方法性能则通过分析系统适用性要求进行评估：拖尾因子、分离度、信噪比(S/N)、峰面积%RSD和保留时间%RSD。

实验

含量测定

根据USP各论方法的描述，使用流动相制备标准溶液，浓度为0.5 mg/mL盐酸西替利嗪（CAS编号：83881-52-1）。

有机杂质

- 使用流动相制备系统适用性溶液，浓度为4.0 µg/mL盐酸西替利嗪和4.0 µg/mL西替利嗪相关化合物A（CAS编号：246870-46-2）
- 使用流动相制备灵敏度溶液，浓度为0.1 µg/mL盐酸西替利嗪
- 使用流动相制备标准溶液，浓度为0.5 µg/mL盐酸西替利嗪

液相色谱条件

液相色谱系统：

1. 传统系统1
2. 传统系统2
3. Alliance iS HPLC System

检测：

- 1.2489紫外/可见光检测器，波长230 nm，采集速率10点/秒

| | |
|-------|---|
| | 2. 可变波长检测器(VWD)，波长230 nm，频率6.87 Hz |
| | 3. 双波长UV检测器，波长230 nm，采集速率10点/秒 |
| 样品瓶： | TruView pH控制LCMS认证最大回收样品瓶, (P/N: 186005662CV) |
| 色谱柱： | XBridge™ BEH™ HILIC色谱柱, 130 Å, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm (P/N: 186004454) |
| 柱温： | 25 °C |
| 样品温度： | 10 °C |
| 进样体积： | 10 μL |
| 流速： | 1.0 mL/min |
| 流动相： | 乙腈(ACN)、水和1 M硫酸(93:6.6:0.4) |
| 洗针液： | ACN:水(93:7) |
| 方法： | 含量测定：等度方法，10分钟 有机杂质：等度方法，18分钟 |

数据管理

| | |
|-------|-------------------------------|
| 色谱软件： | Empower™ 3 FR4 Empower 3.7 |
|-------|-------------------------------|

结果与讨论

根据盐酸西替利嗪各论方法，含量测定方法和有机杂质分析方法需要使用相同的流动相和色谱柱，以便进行连续分析。本研究在每次分析之前制备流动相和样品，每个系统均使用新色谱柱。每根新色谱柱在分析前均需老化12小时。所有HPLC系统都遵循相似的样品序列。使用流动相和含量测定标准品进行含量分析，使用系统适用性溶液、灵敏度溶液、有机杂质标准品溶液和流动相进行有机杂质分析。

包括标准品进样在内的分析结果证明，该方法能够在HPLC系统之间成功迁移。与含量测定标准品相关的系统适用性要求（表1）包括峰面积和保留时间的相对标准偏差(RSD)不得超过(NMT) 0.73%，拖尾因子NMT不得超过2.0（表1）。对于该等度方法，其一，保留时间和拖尾因子可能会受到色谱柱和方法条件的影响，因为HILIC方法通常需要较长的平衡时间。其二，峰面积%RSD最有可能受到系统进样精密度的影响，在同时使用高有机含量样品稀释剂（>93%乙腈）的情况下，较为严苛的峰面积%RSD要求(NMT 0.73)可能难以满足。三款系统均符合系统适用性标准，而Alliance iS HPLC System（配备新设计的样品计量泵）产生的总峰面积RSD最低，仅为0.042%。

有机杂质分析方法要使用标准品、系统适用性溶液和灵敏度溶液，其中后者用于确保系统适用于定量低浓度杂质。适应性要求为：保留时间和峰面积NMT 2.0%（标准品），信噪比不低于(NLT) 10（灵敏度溶液），USP拖尾因子 ≤ 2 ，西替利嗪和西替利嗪相关化合物A的USP分离度 ≥ 2 （系统适用性溶液）。如图1所示，所有系统产生的色谱结果相当。虽然所有系统均满足适应性要求（表2），但Alliance iS HPLC System的S/N高于传统系统，并且峰面积RSD最低。

| 盐酸西替利嗪含量测定 | | | | |
|------------|-----------|--------|-------|-------------------------|
| 标准 | USP规定 | HPLC系统 | | |
| | | 传统系统1 | 传统系统2 | Alliance iS HPLC System |
| 峰面积 %RSD | NMT 0.73% | 0.220 | 0.082 | 0.037 |
| 保留时间 %RSD | NMT 0.73% | 0.018 | 0.021 | 0.327 |
| USP 拖尾因子 | NMT 2.0 | 0.737 | 0.688 | 0.649 |

表1.在传统系统和Alliance iS HPLC System上进行盐酸西替利嗪含量测定的系统适用性结果。

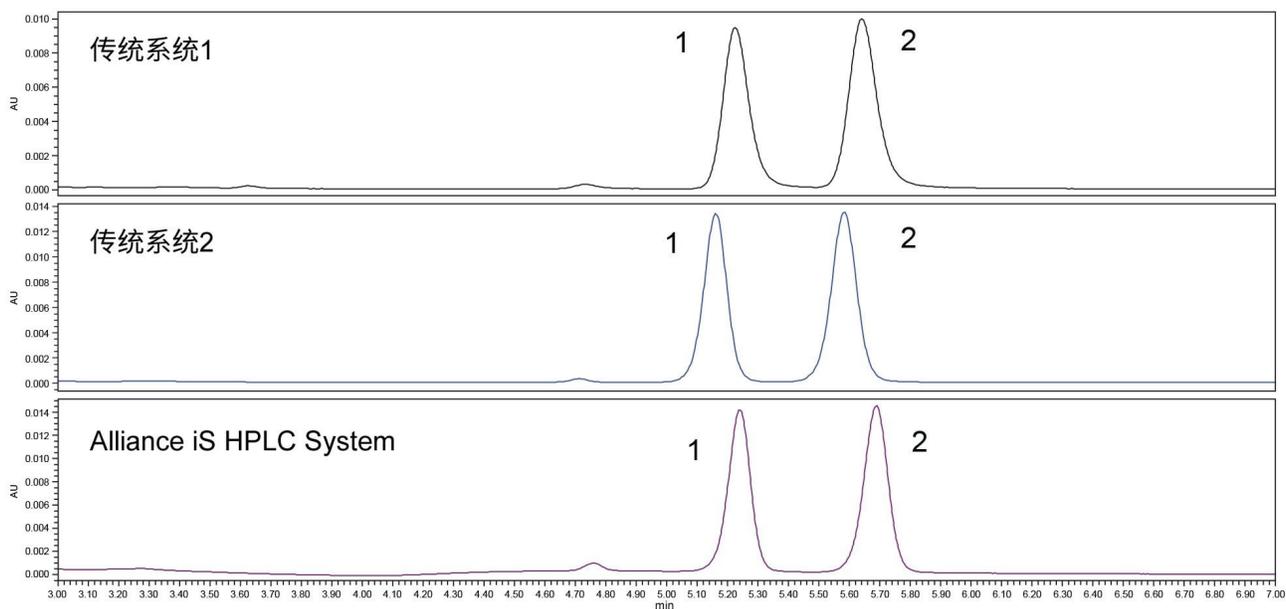


图1.有机杂质系统适用性溶液在所有三套HPLC系统上的代表性色谱图。

峰1 = 西替利嗪相关化合物A。峰2 = 盐酸西替利嗪

| 盐酸西替利嗪有机杂质 | | | | |
|------------|----------|--------|---------------|-------------------------|
| 标准 | USP规定 | HPLC系统 | | |
| | | 传统系统1 | 传统系统2 | Alliance iS HPLC System |
| 峰面积 %RSD | NMT 2.0% | 0.501 | 0.748 | 0.215 |
| 保留时间 %RSD | NMT 2.0% | 0.030 | 0.017 | 0.015 |
| 系统适用性溶液 | | | | |
| USP 拖尾因子 | NMT 2.0 | 1.205 | 0.981 | 1.127 |
| USP 分离度 | NLT 2.0 | 2.569 | 2.842 | 2.649 |
| 灵敏度溶液 | | | | |
| USP 信噪比 | NLT 10 | 30.53 | 21.32 (85.53) | 96.84 |

表2. 盐酸西替利嗪有机杂质在传统系统和Alliance iS HPLC System上的系统适用性结果

注：括号中的传统系统2 USP信噪比是使用以空白样指定区域为中心的噪音计算得出的（见下文）。

使用自定义计算方法计算信噪比：残留的影响

由于最近USP通则<621>发生了变更，现行指南规定计算信噪比(S/N)时应使用空白进样，如果可能，以峰保留时间为中心，用半峰高处峰宽乘以5设置噪声区域²。但是，由于需要空白进样，因此空白样中的任何无关峰都可能影响S/N计算，包括溶剂峰或残留。

在本分析中，S/N根据空白样计算，以峰为中心，用半峰宽乘以5。虽然所有系统均符合系统适用性标准，但传统系统2的灵敏度最低。通过审查数据发现，在传统系统2的空白色谱图中目标分析物的洗脱附近有一个峰（图2）。目标峰的保留时间对齐表明可能存在残留。虽然现代HPLC方法有各种针清洗设计，但许多传统HPLC系统几乎没有选项可以清洗在进样针上进过样的样品。相比之下，在Alliance iS HPLC System的进样周期中，进样前后进样针和穿刺针均会不断抽出，经过清洗溶剂的清洗。因此，Alliance iS HPLC System在空白样中未观察到可观察的峰，S/N更高（图3）。

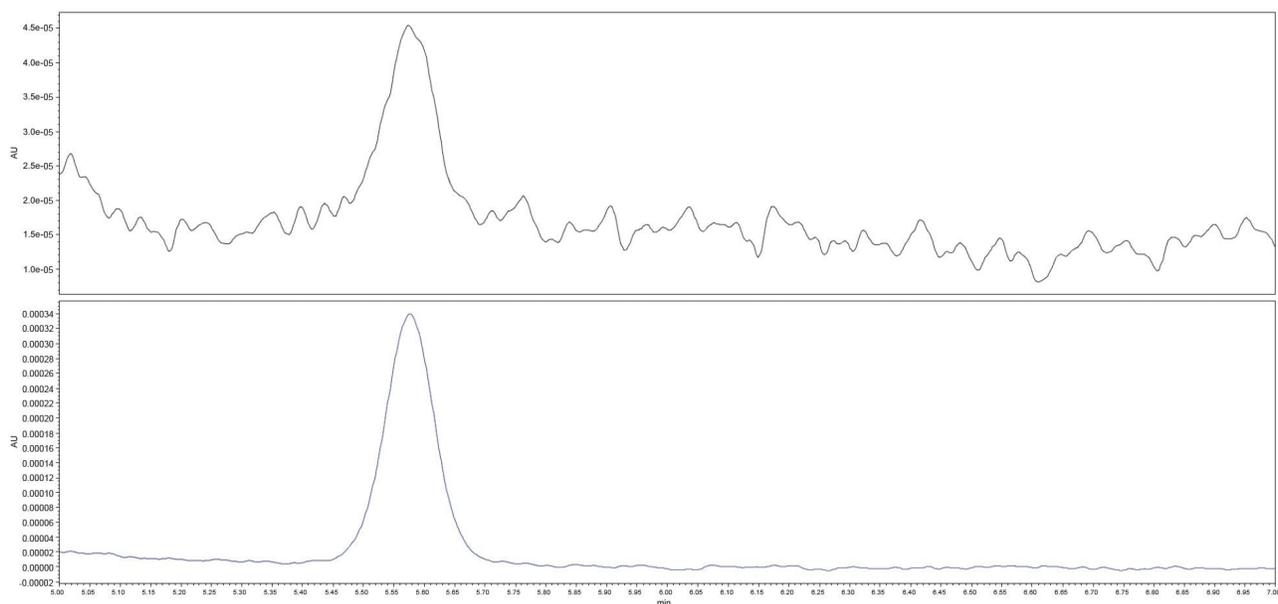


图2.在传统系统2上用于计算信噪比的包含残留的空白样（上图）以及灵敏度溶液（下图）的代表性色谱图。

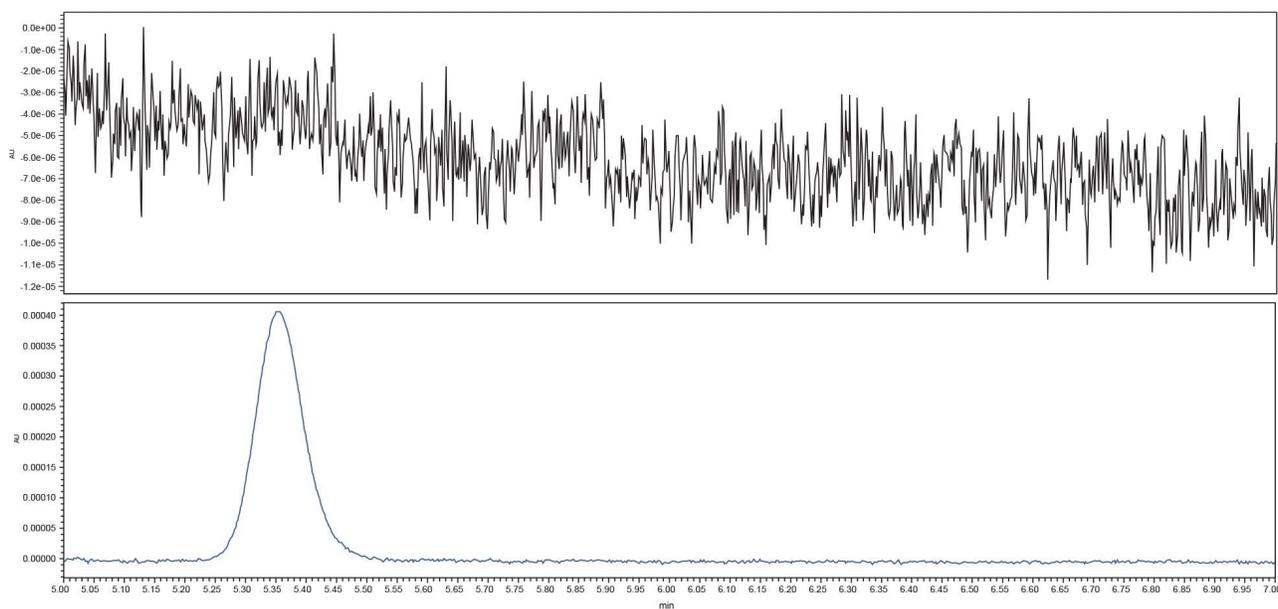


图3.在Alliance iS HPLC System上用于计算信噪比的空白样（上图）以及灵敏度溶液（下图）的代表性色谱图。

虽然传统系统2也满足系统适用性标准，本分析还评估了一种替代方法，用于在无任何残留干扰的情况下计算S/N。该方法使用不受残留影响的不同空白区域。计算时使用自定义字段。自定义字段的创建过程如下：

1. 在样品组方法中标记“空白”（图4）。

| Inj Vol (uL) | # of Injs | Label | SampleName | Sample Type | Level | Function | Method Set / Report or Export Method |
|--------------|-----------|-------|----------------------|-------------|-------|----------------|--------------------------------------|
| 10.0 | 1 | | Blank | Unknown | | Inject Samples | Cetirizine OI MS |
| 10.0 | 1 | Blank | Blank | Unknown | | Inject Samples | Cetirizine OI MS |
| 10.0 | 6 | | Sensitivity Solution | Unknown | | Inject Samples | Cetirizine OI MS |
| 10.0 | 2 | | Blank | Unknown | | Inject Samples | Cetirizine OI MS |

图4.使用单次空白进样或使用标签定义计算S/N。

2. 使用样品间语法创建自定义字段，在公式字段框中输入空白进样的标签定义（图5）。完整公式如下：

$$2 * (\text{峰高} - (0.5 * \text{空白样}.1.(\text{峰到峰噪音} / \text{缩放至} \mu V))) / \text{空白样}.1.(\text{峰到峰噪音} / \text{缩放至} \mu V)$$

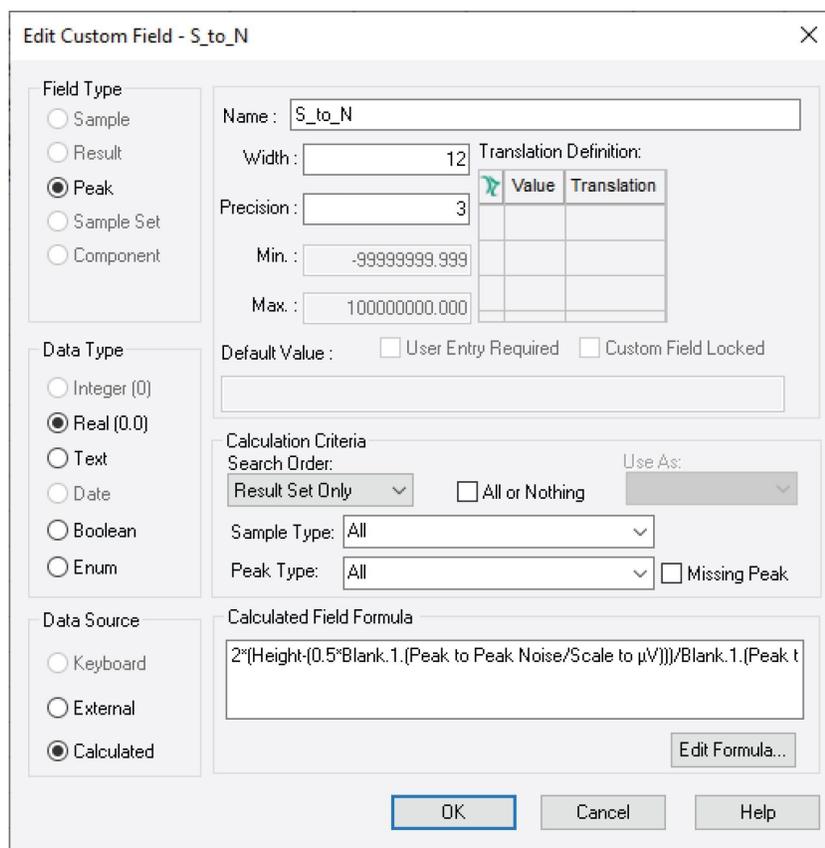


图5.使用空白样品计算S/N的自定义字段。

3. 在处理方法的“适用性”选项卡中设置S/N的噪音值。对于该自定义字段，Noise Value for s/n（S/N的噪音）值必须为Peak to Peak Noise（峰到峰噪音）（图6）。

Calculate Suitability Results

Calculate Suitability Results for Unknown Peaks

System and Separation Efficiency

Void Volume Time (min)

Pharmacopoeia:

USP EP JP ChP All

Tangent Percent for Resolution

Tangent Percent for Plate Count

Calculate USP, EP, JP and ChP s/n

Use noise centered on peak region in blank injection

Half Height Multiplier for s/n Noise Region:

USP JP

EP ChP

Noise Value for s/n

Baseline Noise and Drift Measurements

Maximum Allowable Noise Maximum Allowable Drift

% Run Time Over Which to Average

Baseline Noise Minimum

Baseline Start Time (min) Baseline End Time (min)

Calculate Peak Statistical Moments

图6.处理方法的“适用性”选项卡。

4. 接下来，在处理方法的“噪音和漂移”选项卡中设置适当的区段以用于空白样（图7）。

Noise and Drift Parameters

Calculate Detector Noise and Drift

Start Time: (min)

Stop Time: (min)

Segment Width: (sec)

图7.处理方法的“噪音和漂移”选项卡，所选区段位于空白样上。

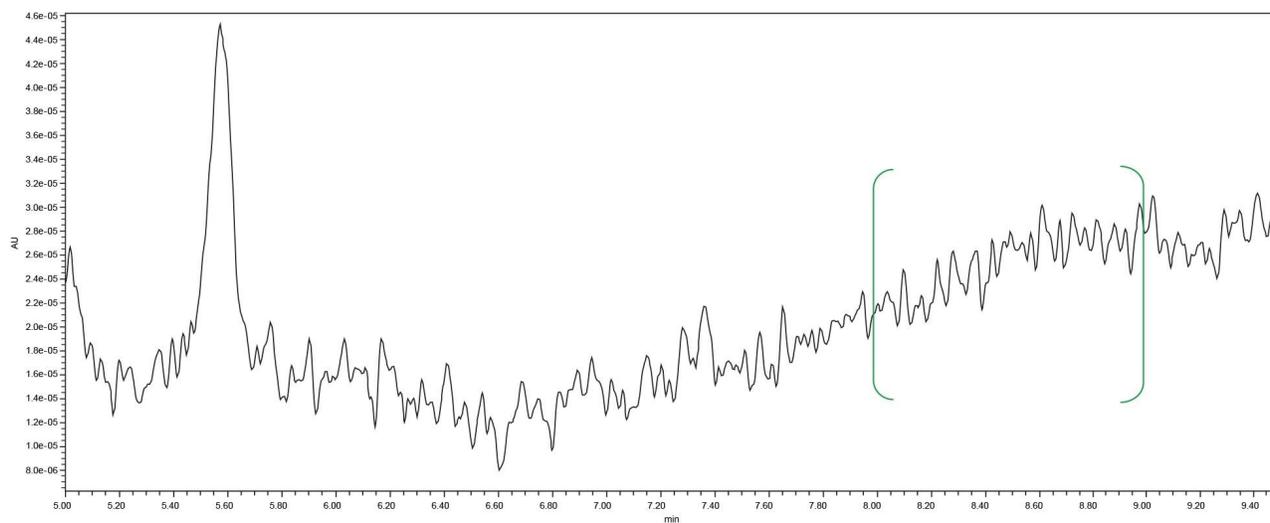


图8.选择空白进样中的区段用于S/N计算。

使用此样品内自定义计算方法，重新处理后传统系统2的S/N结果从21.32增加到85.53，证明空白S/N值中存在外

来峰的影响。

结论

Alliance iS HPLC System等现代HPLC系统具有许多优势，例如可以成功运行传统HPLC系统中的方法，并产生与之相似甚至更好的S/N结果。能够将常规分析中存在问题的HILIC方法从传统HPLC系统成功迁移至Alliance iS HPLC System。使用Alliance iS HPLC System进行盐酸西替利嗪含量测定和有机杂质USP方法迁移符合所有适用性标准，并且色谱性能媲美传统系统，峰面积%RSD和灵敏度略有改善。此外，由于Alliance iS HPLC System改进了针清洗机制，因此未观察到残留。

参考资料

1. Monograph: USP. Cetirizine Hydrochloride. In: USP-NF. Rockville, MD: USP; 01 Sep 2021. DOI: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M2902_06_01.html <
https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M2902_06_01.html>
2. General Chapter: USP. 621 Chromatography. In: USP-NF. Rockville, MD: USP; 01 Apr 2023. DOI: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99380_07_01.html <
https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99380_07_01.html>
3. “如何创建样品间自定义字段 - 提示93”。沃特世，2022年11月11日，
https://support.waters.com/KB_Inf/Empower_Tips_of_the_Week/WKB68884_How_to_create_an_Intersample_Cu
<
https://support.waters.com/KB_Inf/Empower_Tips_of_the_Week/WKB68884_How_to_create_an_Intersample_Cu
>

特色产品

Alliance iS HPLC System <<https://www.waters.com/534293>>

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

[2489紫外可见光\(UV/Vis\)检测器 <https://www.waters.com/515198>](https://www.waters.com/515198)

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

720007993ZH, 2023年6月



© 2023 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](#)