

亲水作用液相色谱(HILIC)方法迁移第2部分： 西替利嗪峰分裂故障诊断

Elom Y Pedanou, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

亲水作用液相色谱(HILIC)方法以其独特而复杂的分离机理而闻名，由于与反相LC相比强弱溶剂的差异，对该方法不熟悉可能会给系统设置带来挑战。在设置药典分析时，这一挑战可能更为普遍，因为各论中只包含关键方法参数，通常不包含洗针液组成等方法参数，因此应由最终用户进行评估和优化。此外，由于HPLC仪器设计的差异，无法防止清洗液与流路相互作用的系统可能会对色谱分离造成影响。像Alliance™ iS HPLC System这样设计精良的系统可以确保样品流路与清洗溶剂之间不发生相互作用，因此可以使用非常强的HILIC清洗溶剂。本研究使用了盐酸西替利嗪有机杂质USP各论中的系统适应性溶液样品，评估了洗针液和针清洗设计对Alliance iS HPLC System和另一个类似的HPLC系统（称为供应商X HPLC）在HILIC分离中的影响。

优势

- 改进的Alliance iS HPLC System针清洗机制
 - HILIC方法迁移
-

简介

大多数受监管的实验室都拥有多套HPLC系统，这些系统的设计和特性可能各不相同。由于这些设计上的差异，在不同系统间转移方法时需要进行测试，以确保生成的结果相当并且工作流程不受影响。在这些受监管的实验室中执行的一种方法是HILIC方法，该方法可用于分离极性化合物。而HILIC方法存在迁移问题，对于不熟悉其独特特性和处理不同HPLC系统之间设计差异的用户而言尤其如此。

在尝试迁移盐酸西替利嗪有机杂质USP方法时，由于在其中一个系统上观察到系统适应性溶液样品出现分裂峰，系统适应性要求无法满足^{1,2}。在HILIC方法中，过量水的存在可能会导致色谱问题，因此我们开展了调查研究，以确定过量水是否是观察到分裂峰的根本原因。

本研究旨在探讨Alliance iS HPLC System和供应商X的HPLC系统在自动进样器设计上的差异在使用不同的清洗溶剂组成时，如何影响HILIC方法分析的结果。

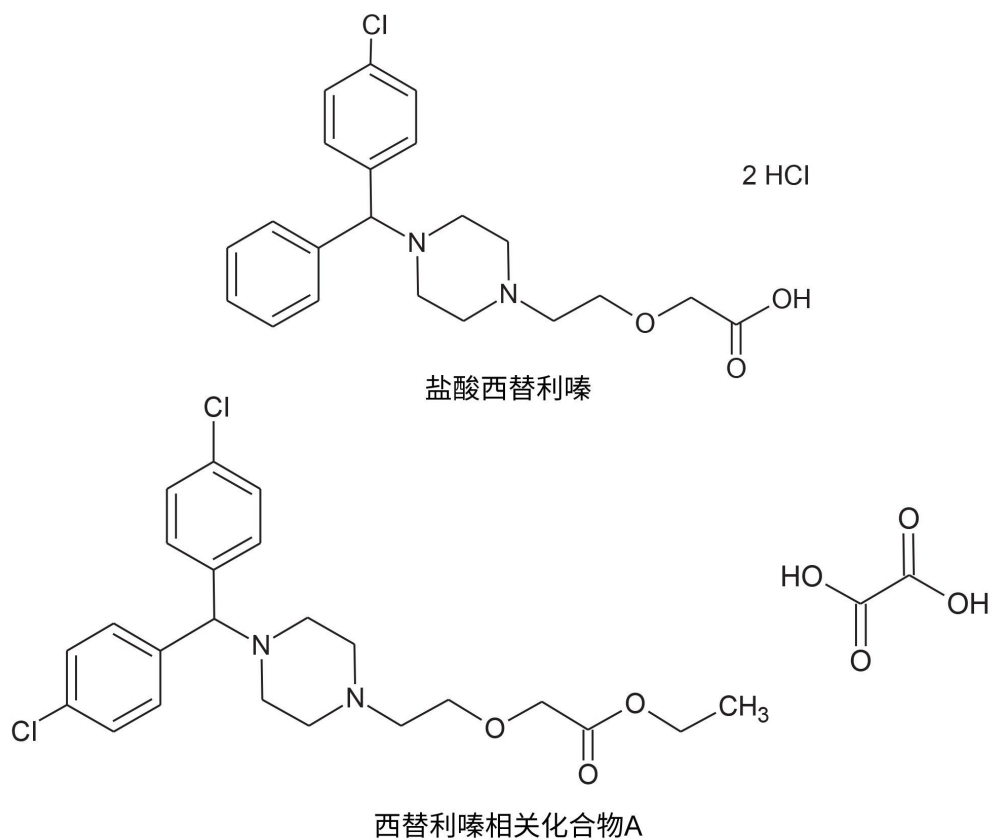


图1. 盐酸西替利嗪和西替利嗪RC A的结构。

实验

样品描述

两种参比标准品获自Sigma-Aldrich：盐酸西替利嗪（CAS号：83881-52-1）和西替利嗪相关化合物A（RC A）（CAS号：246870-46-2）。系统适应性溶液由4.0 µg/mL盐酸西替利嗪和4.0 µg/mL西替利嗪RC A组成，溶于流动相中。

液相色谱条件

液相色谱系统：	1. Alliance™ iS HPLC System 2. 供应商X HPLC系统
检测：	1. 双波长UV检测器，波长230 nm，采集速率10点/秒 2. 可变波长检测器(VWD)，230 nm，10 Hz
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 × 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:1 M硫酸(93:6.6:0.4)

洗针液：

- A. 乙腈:水(93:7)
- B. 乙腈:水(80:20)
- C. 乙腈:水(60:40)
- D. 乙腈:水(40:60)
- E. 乙腈:水(20:80)
- F. 乙腈:水(7:93)

方法： 有机杂质： 18 min等度方法

数据管理

色谱软件： Empower™ 3 FR4
Empower 3.7

结果与讨论

HILIC分离中峰分裂的故障诊断

将USP盐酸西替利嗪有机杂质分析方法迁移至供应商X的HPLC系统时，观察到系统适应性溶液存在峰分裂。鉴于HILIC分离需要较长的平衡时间，最初的故障诊断主要集中在色谱柱上，并确保分析前色谱柱与系统的适当平衡。研究中对其他L3色谱柱进行了分析测试，但产生了类似的峰分裂问题。考虑其他常见误差来源（包括样品前处理和流动相制备），以确定任何潜在的溶剂不匹配效应或样品稀释剂与方法起始条件之间的不匹配。根据USP方法，系统适应性样品是用流动相制备的，因此不应存在溶剂不匹配。对新制样品和流动相的分析结果显示出类似的峰分裂，表明两者都不是导致峰分裂的根本原因。

由于正在迁移的方法是HILIC方法（其中水是强溶剂），过量的水可能会因强溶剂效应对色谱分析产生不利影响³。由于自动进样器的温度被控制在10 °C，因此理论上可能会形成冷凝液，并随着时间的推移引入样品瓶中。研

究对新鲜制备的样品以及之前制备并储存在10 °C自动进样器中的样品进行了分析。在此次分析中，自动进样器温度控制被关闭，以防止任何冷凝液的形成。两种样品的色谱图均显示出现了熟悉的峰分裂问题，证实冷凝作用也不是色谱问题的根本原因。

最后检查的故障诊断步骤是取消针清洗步骤。此次方法迁移使用的洗针液含水量较高，但在之前使用的LC系统上未显示出任何问题。有趣的是，取消针清洗步骤后，峰分裂问题得到了解决。为确认针清洗是否会导致峰分裂，我们重新启用了针清洗步骤，结果导致了峰分裂再次出现。

基于观察到的清洗溶剂的影响，我们随后开展了一项研究，探讨针清洗机制的设计和洗针液组成会如何影响色谱分离。

研究设计

为了减少残留，通常需要将洗针液组成配制成相对较强的溶液。由于使用了HILIC方法，因此水含量越高，溶剂的强度也就越高。本研究评价了不同水/乙腈比例的6种洗针溶液，比例从水:乙腈93:7（最强）到乙腈:水93:7（最弱）。为了说明针清洗设计和机制可能对色谱分析产生的影响，本研究使用了两套针清洗机理明显不同的HPLC系统。评估的两套系统包括Alliance iS HPLC System和供应商X HPLC系统。

盐酸西替利嗪有机杂质分析的USP方法是用于评估洗针液影响的HILIC方法。由于满足系统适应性要求是运行任何药典方法时的关键因素，因此使用系统适应性溶液来评估哪些HPLC系统和洗针液组成可支持成功迁移。

在分析前，每套系统使用相同的色谱柱和流动相在初始条件下平衡24小时。对于评估的每种洗针液组成，都应灌注足够时间的洗针溶剂，确保管路和系统中溶剂的完全转换。在一次空白进样后，采集3次重复进样系统适应性样品的数据。在第三次重复进样后，将洗针溶液更换为新的组成，并再次灌注足够的时间，然后再开始下一次分析。

使用全部6种洗针液组成完成分析后，查看并处理所有色谱图。根据各论要求，系统适应性溶液的拖尾应不超过(NMT) 2.0，并且盐酸西替利嗪与西替利嗪相关化合物A之间的分离度应不低于(NLT) 2.0。

针清洗设计对HILIC分离的影响

图2中的叠加色谱图展示了在Alliance iS HPLC System上使用六种洗针液组成获得的系统适应性样品的单次进样结果。

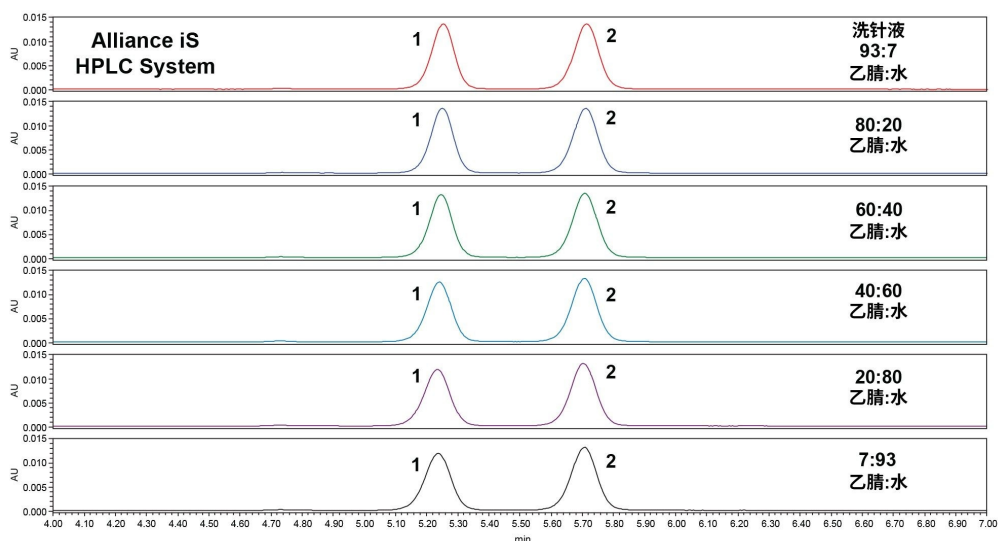


图2.在Alliance iS HPLC System上使用不同洗针液组成获得的盐酸西替利嗪系统适应性溶液色谱图。峰1：西替利嗪RC A。峰2：盐酸西替利嗪。

所有色谱图均显示出对称的峰形，且西替利嗪相关化合物A与西替利嗪峰之间的分离度良好。表1和表2报告了在各种清洗液组成下三次进样的平均峰拖尾和分离度。无论洗针液组成的强度如何，水相成分的含量越高，溶剂越强，满足各论中的所有系统适应性要求。

表1

Alliance iS HPLC System		
洗针液	系统适应性溶液	
	拖尾因子(NMT 2.0)	分离度(NLT 2.0)
乙腈:水(93:7)	1.0	3.2
乙腈:水(80:20)	1.0	3.2
乙腈:水(60:40)	1.0	3.2
乙腈:水(40:60)	1.0	3.1
乙腈:水(20:80)	1.0	3.0
乙腈:水(7:93)	1.0	2.9

在供应商X的HPLC系统上运行相同的方法，系统适应性色谱图示例见图3。很明显，对于最后评估的两种洗针液组

成，观察到了明显的峰分裂现象。

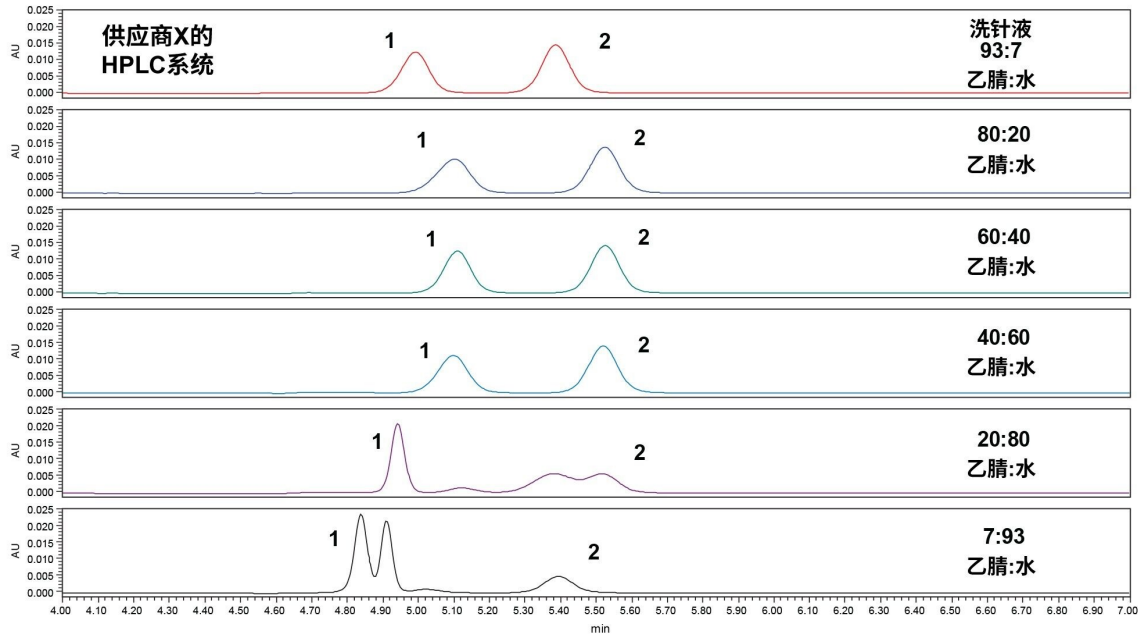


图3.在供应商X的HPLC系统上，使用各种洗针液组成获得的盐酸西替利嗪系统适应性样品色谱图。
峰1：西替利嗪RC A。峰2：盐酸西替利嗪。

93:7、80:20、60:40和40:60乙腈:水的洗针液组成获得了可接受的色谱图，同时也满足系统适应性要求，如表2所示。而对于20:80和7:93乙腈:水，由于明显的峰分裂问题，产生的色谱图不可接受，未能满足系统适应性要求（表2）。

表2

供应商X的HPLC系统		
洗针液	系统适应性溶液	
	拖尾因子(NMT 2.0)	分离度(NLT 2.0)
乙腈:水(93:7)	1.0	2.6
乙腈:水(80:20)	1.0	2.3
乙腈:水(60:40)	1.0	2.8
乙腈:水(40:60)	1.0	2.5
乙腈:水(20:80)	无法处理	无法处理
乙腈:水(7:93)	无法处理	无法处理

通过分析Alliance iS HPLC System和供应商X HPLC系统的清洗机制，可以深入了解在供应商X HPLC系统上观察到的峰分裂。对于供应商X的HPLC系统，针清洗序列包括：在吸取所需的样品量后，针从样品瓶中移出，然后移动到含有一定量洗针液的清洗口中。然后清洗针外部，然后针移至针座开始进样。由于供应商X的HPLC系统清洗进样针的方式不同，针会直接从清洗站移动到进样口，因此一部分清洗液会随着样品一同被进样到系统中。由于HILIC方法对水的存在非常敏感，因此供应商X HPLC系统的清洗机制所使用的强水相清洗液会导致上述观察到的色谱问题。

Alliance iS HPLC System的设计可确保针得到正确清洗，但洗针液不会随样品一起被引入流路。具体而言，针臂从样品瓶移动到进样站，在那里进行针清洗和样品进样。清洗溶剂由清洗站顶部和底部的两条管路输送。清洗周期开始时，穿刺针与进样针一起通过顶部进入站内，并停留在顶部清洗溶剂口附近。然后，顶部和底部进样口引入清洗液，同时清洗穿刺针、进样针及其之间的空间。随后清洗液被吸出，进样针在高压下向下移动到密封圈中，开始进样，而穿刺针则停留在顶部清洗口附近。进样过程中更多清洗液被引入并抽吸出去，同时清洗进样针的剩余部分。进样完成后，清洗继续进行，针移回清洗站的顶部。无论洗针液组成如何，在Alliance iS HPLC System上均未观察到峰分裂。

结论

使用强水相清洗液在不同系统间迁移HILIC方法（例如USP盐酸西替利嗪有机杂质各论），可能会由于不同系统的清洗机制差异而导致迁移失败。Alliance iS HPLC System经过精心设计，可以尽可能地减少残留并减少洗针液进入样品基质。无论使用何种清洗溶剂，Alliance iS HPLC System都能妥善清洗针，同时减少清洗溶剂引入进样的

情况，并提供可接受的色谱图以供分析。

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. Pedanou E, Hong P, Lander N. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) Method Migration Part 1: From Legacy HPLC Systems to the Alliance™ iS HPLC System. Waters Application Note. [720007993](#). June 2023.
3. Malm M, Kjellström J. Elimination of the Sample Solvent Effect when Analysing Water Solutions of Basic Peptides by HILIC. *Chromatography Today*. February / March 2020, Pages 28–30.

特色产品

Alliance iS HPLC System <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>>

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

720008063ZH, 2023年10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](#)