

按照USP <621>指导原则使用MaxPeak™ Premier HPS技术对USP专论中关于对乙酰氨基酚杂质分析的梯度HPLC方法进行现代化改进

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Thomas H. Walter, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

USP专论阐述了对药物的质量期望（包括特性、强度和纯度），还介绍了验证药物或其成分是否符合相关标准的测试。专论中介绍的测试方法已经过验证，可用于分析从滴眼液到口服制剂的各种药品。这些方法虽然适用，但通常使用填料粒径大（例如5 µm）且柱长长的老款HPLC色谱柱，导致分析时间长和流动相用量大。使用填料粒径更小的现代色谱柱可以显著减少分析时间和流动相消耗量，从而节省时间和成本。

我们参考USP <621>指导原则对USP专论中的梯度分离方法进行了现代化改进。专为分析对乙酰氨基酚中的有机杂质而设计的原始液相色谱方法使用4.6 x 250 mm, 5 µm色谱柱，梯度时间为73分钟。改用现代化MaxPeak Premier高性能表面(HPS) 4.6 x 150 mm, 2.5 µm色谱柱后，该方法的梯度时间仅需36分钟，在满足所有系统适应性要求的同时显著减少了分析时间和溶剂消耗。

优势

- 在经现代化改进的方法条件下取得相媲美的色谱结果

- 使用经现代化改进的条件使分析时间缩短51%
- 溶剂用量减少40%

简介

美国药典(USP)专论为特定制剂产品设置了验过验证的测试方法，这些产品可作为非处方或处方治疗药物提供给消费者。由于这些方法已经过验证，因此与从头开发的方法相比，它们更容易被测试实验室采用。尤其是仿制药制造商，因为对于他们而言，快速将产品推向市场至关重要。虽然这些方法可能很容易采用，但它们通常使用老旧的色谱柱技术，包括填充5 μm 颗粒的大口径色谱柱。由于这类色谱柱每单位长度的效率低下，分析时间通常很长。然而，随着色谱柱技术的进步，特别是填料粒径缩小和柱长缩短，分析时间得以减少。

改用亚2 μm 粒径色谱柱后，现代化改造带来的优势更是体现得淋漓尽致。然而，这些色谱柱需要能够在高压下运行且具有低扩散性的LC系统。将老版HPLC方法现代化改为使用2.5 μm 色谱柱依然有显著优势，而且不要求LC系统具有最高性能。USP专论方法在现代化改进过程中若操作不当，可能需要进行代价高昂的重新验证工作。USP通则<621>中概述了一些流程和指导原则，提供了对现代化改进的见解。这些指导原则介绍了允许对流速、色谱柱尺寸和粒径等参数的更改。2022年12月，USP <621>指导原则进行了修订，允许对梯度方法进行现代化改进，并且增加了必要的计算，以确保新测试条件的梯度曲线与原始条件相匹配。<621>中所述的计算很复杂，可能会导致错误，可以使用Waters™方法转换计算器等工具来生成新条件，避免可能出现的计算错误。

本应用纪要展示了使用方法转换计算器将对乙酰氨基酚的有机杂质分析从原始的专论方法现代化改进为采用2.5 μm 粒径填料的UHPLC色谱柱的方法。追踪原始方法和现代化方法的系统适应性标准，确保两者都符合分析要求。原始方法使用4.6 x 250 mm 5 μm L7色谱柱，每个样品需要73分钟的运行时间。现代化方法使用4.6 x 150 mm 2.5 μm 色谱柱，运行时间36分钟。完成分析后，计算了所节省的溶剂和时间，以强调对该分析方法进行现代化改进的好处。

实验

样品制备

按照USP专论方法所述配制三种不同的溶液。系统适应性标准品为20 µg/mL对乙酰氨基酚以及80 µg/mL相关化合物B和C的甲醇溶液。标准品溶液为1.25 µg/mL相关化合物D和0.25 µg/mL相关化合物J的甲醇溶液。样品溶液为25 mg/mL对乙酰氨基酚的甲醇溶液。

液相色谱条件

液相色谱系统：	带紫外检测器的1260 Infinity LC（专论方法） 带2998 PDA的ACQUITY Arc™（现代化方法）
检测：	UV 254 nm
色谱柱：	Zorbax Eclipse Plus C ₈ , 5 µm, 4.6 x 250 mm（专论方法） XBridge™ Premier BEH C ₈ , 2.5 µm, 4.6 x 150 mm（现代化方法）
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5.0 µL（专论方法） 3.0 µL（现代化方法）
流速：	0.9 mL/min（专论方法） 1.1 mL/min（现代化方法）
流动相A：	甲醇:水:冰醋酸(50:950:1)
流动相B：	甲醇:水:冰醋酸(500:500:1)

梯度条件：

表1.

时间(min) - 原始方法	时间(min) - 现代化方法	%A	%B
0.00	0.00	82	18
8.00	3.93	82	18
53.00	26.02	0	100
58.00	28.47	0	100
59.00	28.96	82	18
73.00	35.94	82	18

表1.原始专论方法和现代化方法的梯度曲线

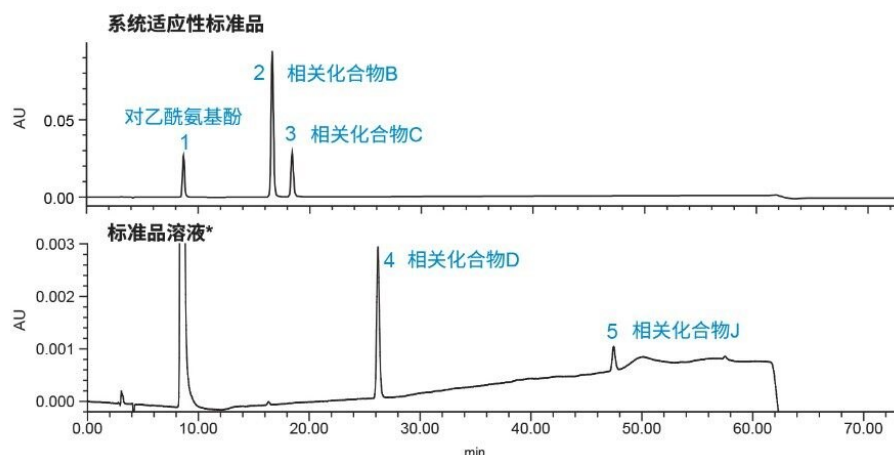
数据管理

色谱软件：

Empower™ 3 Feature Release 4

结果与讨论

USP专论中概述了对乙酰氨基酚有机杂质分析的原始方法¹。该方法的系统适应性标准包括USP拖尾、分离度和峰面积相对标准偏差测定结果。相关化合物D的USP拖尾因子不得超过2.0。对乙酰氨基酚和相关化合物B之间的USP分离度不得低于2.0，相关化合物B和相关化合物C之间的USP分离度不得低于1.5。相关化合物D的峰面积相对标准偏差必须小于5.0%¹。我们先使用Agilent 1260 Infinity LC系统和4.6 x 250 mm, 5 µm Zorbax Eclipse C₈ (L7名称) 色谱柱对这些条件进行了测试。进样的每种标准品的代表性色谱图见图1。还进样了样品溶液，但未显示色谱图，因为没有相关的系统适应性标准。



专论方法使用的色谱柱: 4.6 x 250 mm 5 μ m, L7色谱柱(Zorbax Eclipse Plus C8)

运行73分钟, 流速0.9 mL/min = 每次进样65.7 mL溶剂。

分析1批样品溶液的总时间 = 73分钟*6次重复*3个样品 = 21.9小时

每次分析的总溶剂用量: 65.7 mL/进样*6次重复*3个样品 = 1182.6 mL

USP拖尾因子 R.C.-D	1.16
USP分离度 R.C.-B	21.20
USP分离度 R.C.-C	4.31
保留时间%RSD R.C.-D	0.40%
峰面积%RSD R.C.-D	0.82%
通过所有标准	

图1.在使用4.6 x 250 mm, 5 μ m Zorbax Eclipse C₈色谱柱和Agilent 1260 Infinity LC系统的USP专论条件下获得的对乙酰氨基酚有机杂质分离色谱图

系统适应性溶液和标准品溶液的所有组分都实现了良好分离。需要注意的是, 标准品溶液中加入了对乙酰氨基酚, 以确保标准品溶液和系统适应性标准品溶液之间的梯度性能准确。通常情况下, 标准品溶液中没有对乙酰氨基酚。相关化合物D的USP拖尾因子为1.16, 低于系统适应性限值。对乙酰氨基酚和相关化合物B的USP分离度为21.2, 远高于最低要求2.0。相关化合物B和C的USP分离度为4.31, 同样远高于1.5的最低要求。最后, 相关化合物D的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为0.40%和0.82%, 均低于本测试要求的5.0%。在满足所有系统适应性标准的情况下, 可以测试一批材料来测定有机杂质的浓度。

为了使用这些条件测试一批材料, 总共需要进样18次。由于专论方法要求的相对标准偏差大于2.0%, 因此每个标准品和样品溶液需要重复进样六次²。考虑到每次进样需要73分钟的运行时间并且需要18次进样, 如果使用USP专论方法, 在仪器上分析一批材料需要21.9小时的运行时间。在0.9 mL/min的流速下, 整个测试共需要1183 mL流动相。这些数字并非不值一提, 而是意味着放行一批需要测试一整天。不仅如此, 倘若系统或色谱柱在测试的第21小时出现问题, 那么一整天的测试都会被浪费, 在此期间消耗的流动相也会浪费。

使用沃特世方法转换计算器和USP <621>指导原则, 可以将该专论方法现代化改为使用合适的UHPLC色谱柱, 从而减少分析时间和溶剂消耗。不过, 在进行任何实际测试之前, 必须先选择合适的UHPLC色谱柱。USP专论规定必须使用L7色谱柱。USP <621>允许更改色谱柱配置, 只要L/dp (柱长与粒径比) 保持在原始专论方法所用色谱柱的-25%至+50%范围内即可。填充5 μ m颗粒的250 mm色谱柱的L/dp比为50,000。改用2.5 μ m颗粒色谱柱时

，为了保持该比率，使用的柱长为150 mm。如果使用同样填充的100 mm色谱柱，也可以接受L/dp为40,000。现代化色谱柱的L/dp比率为60,000，完全符合<621>指导原则的规定。在方法的现代化改进中选择XBridge Premier BEH C₈ 4.6 x 150 mm 2.5 μm，因为它的填充颗粒稳定耐用，并且采用了MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术。XBridge BEH C₈固定相基于具有三官能化键合C₈键合相的全多孔杂化硅胶颗粒，可用作L7色谱柱。XBridge BEH C₈固定相是非常现代的L7全多孔色谱柱，粒径可从5 μm缩小到亚2 μm。

选出合适的色谱柱配置后，必须根据新的色谱柱内径、长度和粒径对专论条件进行现代化改进。这些条件包括方法流速、进样体积、梯度曲线和运行时间。通则<621>概述了这种现代化改进所需的计算，但本研究使用了沃特世方法转换计算器。方法转换计算器计算新方法条件的公式与<621>中所述的公式相同，但只需要用户输入很少的信息。图2所示为方法转换计算器，其中填充了原始方法条件以及新的现代化色谱柱信息。此外还包括系统延迟体积测定结果。

原始条件

From...
Describe your original method.

Column

Diameter (D): mm

Length (L): mm

Particle Size (dp): μm

L/dp: **50,000**

System

Dwell volume: mL (?)

Method

Injection volume: μL

Temperature: $^{\circ}\text{C}$

Run time: min

	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A Water	%B Acetonitri	%C Methanol	%D Water	Column Volumes
1	0.00	0.900	82.0	18.0	0.0	0.0	0.00
2	8.00	0.900	82.0	18.0	0.0	0.0	2.63
3	53.00	0.900	0.0	100.0	0.0	0.0	14.77
4	58.00	0.900	0.0	100.0	0.0	0.0	1.64
5	59.00	0.900	82.0	18.0	0.0	0.0	0.33
6	73.00	0.900	82.0	18.0	0.0	0.0	4.59

1,290 psi
Maximum pressure

放大后的条件

To...
Describe your target method.

Column

Diameter (D): mm

Length (L): mm

Particle Size (dp): μm

L/dp: **60,000**

System

Dwell volume: mL (?)

High pressure limit: psi

Method

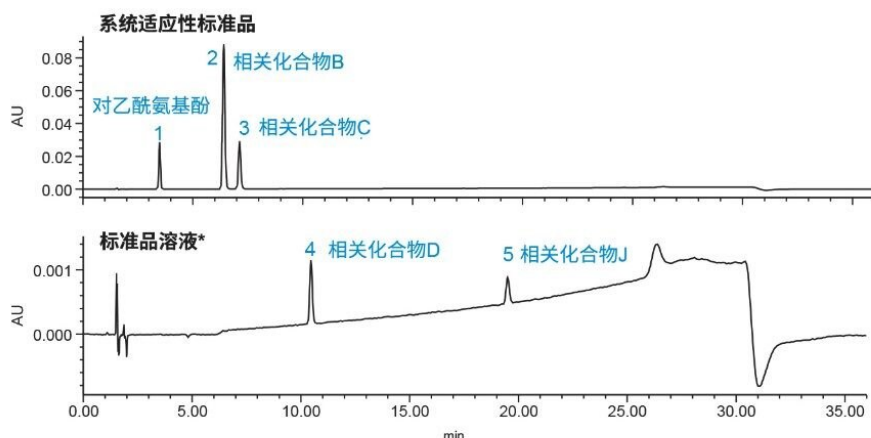
Flow rate: ☐ Scaled: (**1.800** mL/min)
☒ Custom: mL/min

	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A Water	%B Acetonitrile	Column Volumes
1	0.00	1.100	82.0	18.0	0.00
2	3.93	1.100	82.0	18.0	2.63
3	26.02	1.100	0.0	100.0	14.77
4	28.47	1.100	0.0	100.0	1.64
5	28.96	1.100	82.0	18.0	0.33
6	35.84	1.100	82.0	18.0	4.59

3,784 psi **3.0 μL** **35.84 min** **480 μL (?)**
Maximum pressure Injection volume Run time Pre-injection volume

图2.用于现代化改进USP专论中对乙酰氨基酚有机杂质分析方法的方法转换计算器屏幕截图

蓝色突出显示的区域需要用户输入，包括原始色谱柱尺寸、粒径、流速、系统延迟体积、进样体积、温度和运行时间。此外，对于梯度分析，必须在计算器的左下角输入梯度曲线，以便计算新的梯度。最后，在右上部分，必须输入现代化色谱柱信息以及新的系统驻留时间和压力上限。橙色突出显示的区域是根据用户输入计算的值。缩放后的流速（在本例中为1.8 mL/min）基于原始流速和色谱柱尺寸。如果缩放后的流速对目前使用的系统造成太大压力，也可以设置自定义流速。本例选择了1.1 mL/min的自定义流速，因为缩放后的流速导致系统压力过大。根据所选的自定义流速以及原始和现代化条件下的色谱柱尺寸，可以计算出新的梯度曲线。在右下方可以看到新的梯度曲线以及重要信息，例如进样体积和总运行时间。使用这些条件分析与之前相同的样品，只是改用 ACQUITY Arc系统和之前讨论过的色谱柱。ACQUITY Arc系统非常适合用于2.X μm 颗粒，因为与HPLC系统相比，它的系统扩散更低。图3所示为使用这些新条件获得的系统适应性和标准品溶液的代表性分离色谱图。



现代化色谱柱: 4.6 x 150 mm, 2.5 μ m L7 (XBridge Premier BEH C8色谱柱)

运行35.9分钟, 流速1.1 mL/min = 每次进样39.5 mL溶剂。
分析1批样品溶液的总时间 = 35.9分钟*6次重复*3个样品 = 10.77小时
每次分析的总溶剂用量: 39.5 mL/进样*6次重复*3个样品 = 711 mL

*样品溶液, 用于定量杂质, 已分析但未显示

USP拖尾因子 R.C.-D	1.08
USP分离度 R.C.-B	17.04
USP分离度 R.C.-C	3.57
保留时间%RSD R.C.-D	0.03%
峰面积%RSD R.C.-D	0.50%
通过所有标准	

图3.在使用4.6 x 150 mm, 2.5 μ m XBridge Premier BEH C₈色谱柱和ACQUITY Arc系统的现代化条件下获得的对乙酰氨基酚有机杂质分离色谱图

初看现代化方法条件与原始条件产生的色谱结果相当, 仔细观察系统适应性结果可以证实现代化条件适用于此分析。相关化合物D的USP拖尾因子为1.08。对乙酰氨基酚/相关化合物B和相关化合物B/C的USP分离度分别为17.0和3.5。相关化合物D的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为0.03%和0.50%。这些结果满足所有系统适应性标准。此外, 每次进样的总运行时间从73分钟减少到36分钟。在现代化条件下, 一次完整测试只需要不到11小时的运行时间, 而在原始测试条件下需要22小时。流动相用量也有所减少, 与需要约1180 mL的原始条件相比, 现代化条件仅需要约700 mL。节省的时间和流动相的详细比较如表2所示。

条件	色谱柱尺寸	流速 (mL/min)	运行周期/进样 (min)	mL流动相/ 进样	mL溶剂/批	总分析时间/批 (分钟/小时)	溶剂用量(mL) 减少百分比	每批次分析时间 (小时) 减少百分比
原始USP方法	4.6 x 250 mm 5 μ m	0.9	73.0	65.7	1182.6	1314.0/21.9	-	-
现代化方法	4.6 x 150 mm 2.5 μ m	1.1	35.9	39.5	711.0	646.2/10.8	40%	51%

表2.原始方法和现代方法之间的运行时间和流动相用量比较

对该分析方法进行现代化改进可以节省大量分析时间和溶剂。如果在实验室中同时对多个分析方法进行现代化改进，效果会更加明显。通过改用UHPLC色谱柱而不是UPLC亚2 µm颗粒色谱柱，该方法可以在常规HPLC系统上运行，这些系统无法承受亚2 µm颗粒色谱柱产生的极端压力。XBridge Premier色谱柱是一个良好的平台，对未来的分析方法也适用，因为该系列提供各种粒径，适用于HPLC、UHPLC或UPLC分析。得益于颗粒的可扩展性，对老版USP专论方法进行现代化改进更轻松。通过使用XBridge Premier色谱柱和方法转换计算器，USP专论方法的现代化改进可以顺利完成，基本避免返工的情况。

结论

USP方法广泛用于各种药品测试。其中一些测试方法，尤其是对那些已经上市很长时间的产品，使用的是老旧的色谱柱技术。新技术（例如粒径更小的色谱柱）可以提供类似的结果，同时减少分析时间和流动相用量。按照USP通则<621>中的指导原则，可以将USP专论中的LC方法现代化改进为新技术，在此过程中，可以借助方法转换计算器等工具来准确确定新方法条件。

本研究展示了对用于对乙酰氨基酚有机杂质分析的梯度HPLC方法进行的现代化改进。专论方法使用4.6 x 250 mm, 5 µm色谱柱，测试一批材料需要几乎一整天的运行时间和超过一升的流动相。改用4.6 x 150 mm, 2.5 µm XBridge Premier BEH C₈色谱柱后，运行时间减少51%，流动相用量减少约40%。方法现代化看似复杂，但使用适当的工具可以顺利执行该过程，从而显著降低运营成本。

参考资料

1. USP monograph: Acetaminophen. Accessed 16-Dec-2022.
https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/acetaminophen.pdf <
https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/acetaminophen.pdf> .
2. USP General Chapter <621>. Accessed 16-Dec-2022.
<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf> <
<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf>> .

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

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

720007846ZH, 2023年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

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

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号