

Waters™

应用纪要

Arc HPLC系统：提高HPLC杂质分析方法的效率并进行无缝转移

Margaret Maziarz, 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

用于测试制药原料和成品药的分析方法常常需要在不同实验室间转移，或者转移至不同供应商仪器平台。此外，将新的现代仪器引入实验室时，质量部门需要确保新仪器能够准确运行现有方法。因此，这些方法必须能在不同仪器之间成功转移，以确保产品的一致性与合规性。本应用简报介绍将HPLC杂质分析方法无缝转移至Arc HPLC系统，并使用更小粒径的色谱柱，从而提高实验室效率和分析通量。

优势

- 轻松将HPLC方法无缝转移到Arc HPLC系统
- Arc HPLC系统结合5 μm 和3.5 μm 粒径色谱柱提供稳定、可靠且可重现的性能
- 提升实验室效率并大幅提高分析通量

简介

有效的方法转移能够使同一种分析始终得出相同结果，而不受仪器、实验室或资源的影响。这对于全力减少昂贵且耗时的方法重复验证步骤来说也非常重要。本文介绍将用于杂质分析的HPLC方法无缝转移到Waters Arc HPLC系统。此外，我们发现，在保持流速不变的同时，将色谱柱粒径从5 μm 缩放至3.5 μm ，可减少运行时间和溶剂消耗量，而不影响色谱分离的完整性。根据USP的建议检查色谱分离和系统适应性结果以评估方法转移是否成功¹。

Arc HPLC系统可无缝复制HPLC方法，不会影响色谱分离质量，也不需要进行任何重新验证工作。该系统可以使用3.5 μm 粒径的色谱柱，在保持流速不变的同时进行适当缩放，从而提高实验室的效率和分析通量。

此外，Arc HPLC系统可耐受更高的反压，使方法能够在不更改色谱柱长度、流速或梯度条件的情况下，使用分离能力更强的3.5 μm 粒径色谱柱。

结果与讨论

系统间HPLC方法转移

分别使用Alliance系统和装配5 μm 粒径色谱柱的Arc HPLC系统按照表1所列的条件运行HPLC杂质分析方法。Arc HPLC系统成功重现了通过Alliance系统获得的色谱分离结果，两套系统得到的关键分析物对（峰5和峰6）的USP分离度相同，均为1.7（图1）。

参数	HPLC条件(5 μm)	缩放后的条件(3.5 μm)																																																												
系统	<ul style="list-style-type: none"> 配备2998 PDA检测器的Alliance HPLC系统 配备2998 PDA检测器的Arc HPLC系统，带制冷功能的柱温箱，配备被动预加热器 	配备2998 PDA检测器的Arc HPLC系统，带制冷功能的柱温箱，配备被动预加热器																																																												
色谱柱	XSelect CSH C ₁₈ , 4.6 × 150 mm, 5 μm	XSelect CSH C ₁₈ , 4.6 × 100 mm, 3.5 μm																																																												
L/dp	30,000	28,571																																																												
流速	2.90 mL/min	2.90 mL/min																																																												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>步骤</th> <th>时间</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>曲线</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Initial</td> <td>95.0</td> <td>5.00</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>15.00</td> <td>40.0</td> <td>60.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>16.50</td> <td>40.0</td> <td>60.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>16.80</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>21.00</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	步骤	时间	%A	%B	曲线	1	Initial	95.0	5.00	6	2	15.00	40.0	60.0	6	3	16.50	40.0	60.0	6	4	16.80	95.0	5.0	6	5	21.00	95.0	5.0	6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>步骤</th> <th>时间</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>曲线</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Initial</td> <td>95.0</td> <td>5.00</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>10.00</td> <td>40.0</td> <td>60.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>11.00</td> <td>40.0</td> <td>60.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>11.20</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>14.00</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	步骤	时间	%A	%B	曲线	1	Initial	95.0	5.00	6	2	10.00	40.0	60.0	6	3	11.00	40.0	60.0	6	4	11.20	95.0	5.0	6	5	14.00	95.0	5.0	6
步骤	时间	%A	%B	曲线																																																										
1	Initial	95.0	5.00	6																																																										
2	15.00	40.0	60.0	6																																																										
3	16.50	40.0	60.0	6																																																										
4	16.80	95.0	5.0	6																																																										
5	21.00	95.0	5.0	6																																																										
步骤	时间	%A	%B	曲线																																																										
1	Initial	95.0	5.00	6																																																										
2	10.00	40.0	60.0	6																																																										
3	11.00	40.0	60.0	6																																																										
4	11.20	95.0	5.0	6																																																										
5	14.00	95.0	5.0	6																																																										
进样体积	10.0 μL	6.7 μL																																																												
柱温	45 °C																																																													
流动相	A: 0.1%甲酸水溶液 B: 0.1%甲酸的甲醇溶液																																																													
检测条件	λ范围: 210-400 nm, 提取270 nm的谱图 采集速率: 10点/秒																																																													
清洗溶剂	灌注/样品清洗液: 50:50水/甲醇 密封清洗液: 90:10水/乙腈																																																													
样品温度	10 °C																																																													

表1.杂质分析方法在系统间转移以及转移至更小粒径色谱柱的仪器条件。

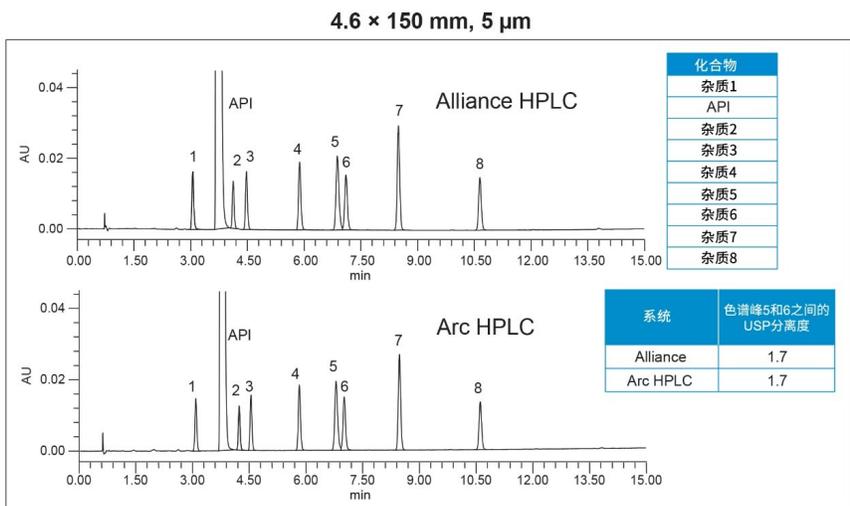


图1.系统间HPLC方法转移的色谱分离结果

使用峰面积相对标准偏差(RSD)、保留时间、分离度和峰拖尾等系统适应性参数评估在Arc HPLC系统上运行方法的色谱性能，并与Alliance系统的数据进行比较。五次重复进样包含杂质和API的混合物得到的系统适应性结果见表2。两套系统的保留时间和峰面积重现性相当。Arc HPLC系统的峰面积RSD ≤ 0.28%，远低于USP标准2.0%¹。两个系统的结果中所有峰之间的USP分离度值也相当，表明方法转移时无分离度损失。USP峰拖尾因子 ≤ 1.2。

化合物	保留时间 %RSD		峰面积 %RSD		USP 分离度		USP 峰拖尾因子	
	Alliance	Arc HPLC	Alliance	Arc HPLC	Alliance	Arc HPLC	Alliance	Arc HPLC
杂质1	0.10	0.05	0.13	0.15	n/a	n/a	1.2	1.1
API	0.08	0.07	0.16	0.24	7.6	7.8	1.2	1.1
杂质2	0.07	0.07	0.16	0.28	3.9	4.2	1.2	1.1
杂质3	0.08	0.06	0.20	0.10	3.7	3.6	1.2	1.1
杂质4	0.06	0.04	0.17	0.10	13.4	12.9	1.1	1.1
杂质5	0.06	0.03	0.19	0.10	7.7	8.0	1.2	1.1
杂质6	0.06	0.03	0.25	0.10	1.7	1.7	1.1	1.2
杂质7	0.06	0.03	0.22	0.07	11.0	11.9	1.1	1.1
杂质8	0.06	0.04	0.16	0.22	17.1	17.3	1.1	1.1

表2.系统间HPLC方法转移的系统适应性结果。

提高分析效率

将方法转移到更小粒径的色谱柱可减少运行时间和溶剂消耗量，从而提高实验室通量和分析效率。缩放到更小颗粒时，柱长(L)与粒径(dp)的比率必须与原始方法相同，以保持原始方法的分离能力。其它参数（包括进样体积和梯度时间）则按几何比例缩放以保持相同的色谱分离质量，此操作可以使用方法转换器进行²。本例未对流速进行几何缩放以减少分析运行时间。

本研究将杂质分析方法从5 μm颗粒色谱柱缩放到柱长更短的3.5 μm颗粒色谱柱，同时保持内径不变（表1）。按相同的流速(2.9 mL/min)将方法更新至3.5 μm颗粒色谱柱，运行时间减少33%，同时分离完整性保持与5 μm方法相同（图2）。使用5 μm和3.5 μm方法得到的系统适应性在保留时间和峰面积%RSD、USP分离度以及峰拖尾方面的结果相当（表3）。

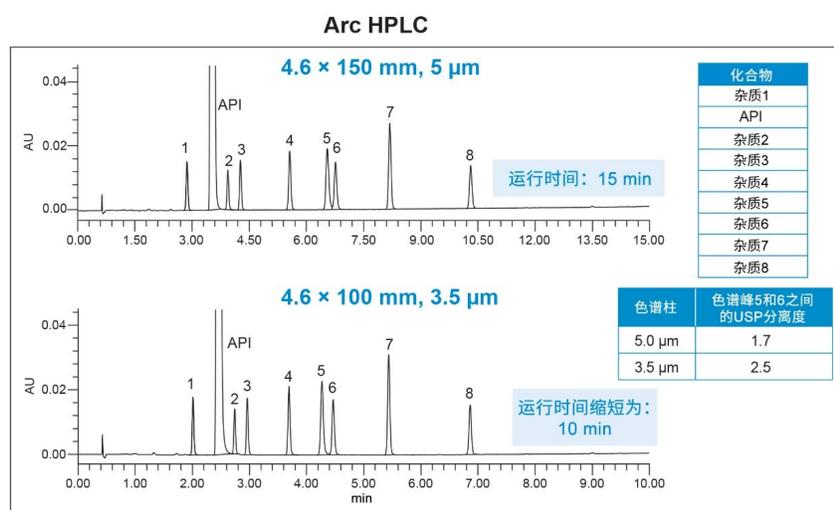


图2.在Arc HPLC系统上将方法从5 μm缩放到3.5 μm颗粒色谱柱的方法可扩展性，分离能力(L/dp比率)保持不变。

化合物	保留时间 %RSD		峰面积 %RSD		USP 分离度		USP 峰拖尾因子	
	5 μm	3.5 μm						
杂质1	0.05	0.10	0.15	0.15	n/a	n/a	1.1	1.1
API	0.07	0.04	0.24	0.22	7.8	8.6	1.1	1.2
杂质2	0.07	0.04	0.28	0.06	4.2	4.4	1.1	1.1
杂质3	0.06	0.04	0.10	0.12	3.6	3.8	1.1	1.2
杂质4	0.04	0.04	0.10	0.21	12.9	11.7	1.1	1.1
杂质5	0.03	0.05	0.10	0.08	8.0	7.6	1.1	1.2
杂质6	0.03	0.04	0.10	0.12	1.7	2.5	1.2	1.1
杂质7	0.03	0.02	0.07	0.10	11.9	12.9	1.1	1.1
杂质8	0.04	0.00	0.22	0.08	17.3	18.6	1.1	1.1

表3.在Arc HPLC系统上将方法从5 μm 缩放到3.5 μm 颗粒色谱柱的系统适应性，分离能力 (L/dp 比率) 保持不变。

提升方法性能

现代LC仪器对工程设计进行了改进，因此传统的压力限制不再适用。对于旧版LC仪器，缩放色谱柱尺寸和粒径对于确保新方法可以在较低的压力限制下运行至关重要。Arc HPLC系统可承受较高的反压，因此在相同分析条件下可使用分离能力更强的色谱柱。

增加 L/dp 比率可以提高方法的分离能力；也就是说，在保持柱长(L)与原始方法相同的前提下减小粒径(dp)。但是，由于色谱柱尺寸和分析条件相同，转移到粒径较小的色谱柱通常会产生较高的反压。

以杂质分析方法为例，该方法使用与5 μm 方法相同的仪器条件，采用粒径3.5 μm 的4.6 x 150 mm色谱柱进行重复分析（表1）。利用3.5 μm 色谱柱执行分析产生的色谱峰更窄且更高效，但反压更高（图3）。此外，与5 μm 方法相比，3.5 μm 方法得到的色谱峰之间的USP分离度以及峰高明显提升（图4），从而能够更轻松、更稳定地进行积分以实现准确定量，并提高灵敏度。

传统的LC系统由于无法承受较高反压，因此无法进行此分析。而Arc HPLC系统的压力上限高，可以运行采用较小颗粒色谱柱的方法，有望获得更高的柱效和分离能力。

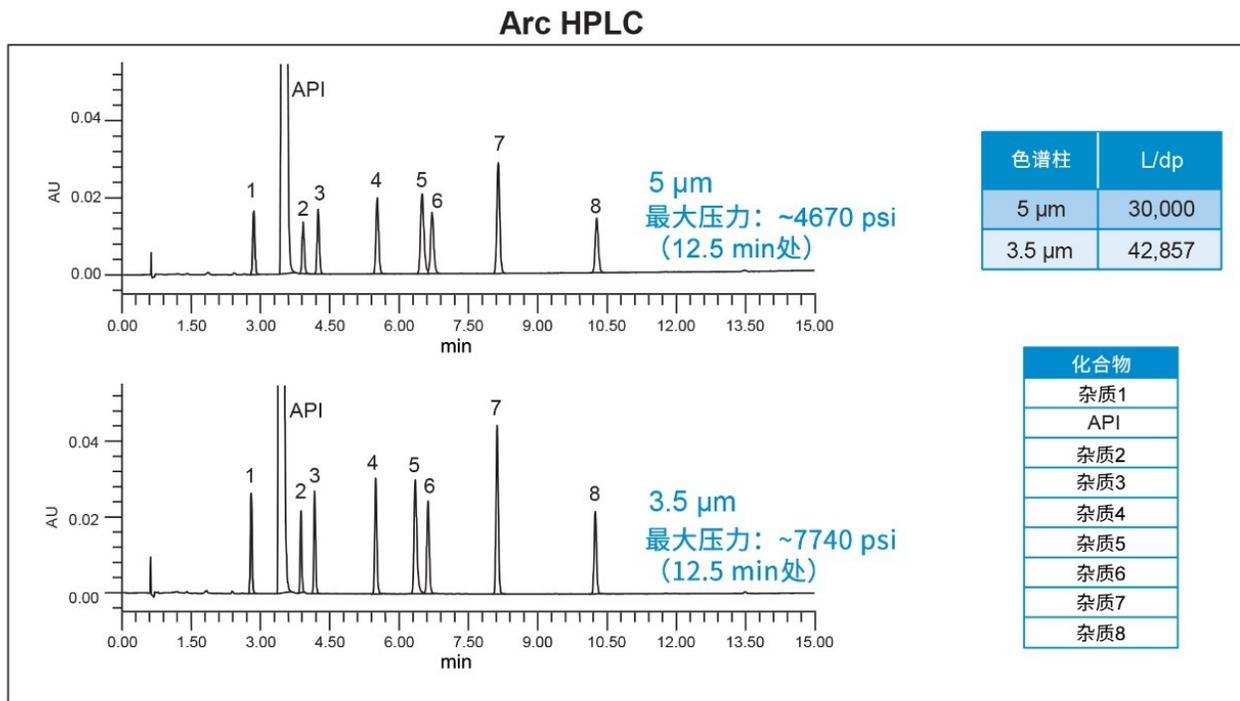


图3.利用5 μm和具有更高分离能力 (L/dp比率) 的3.5 μm颗粒色谱柱执行的分析。两根4.6 x 150 mm色谱柱在相同条件下运行。

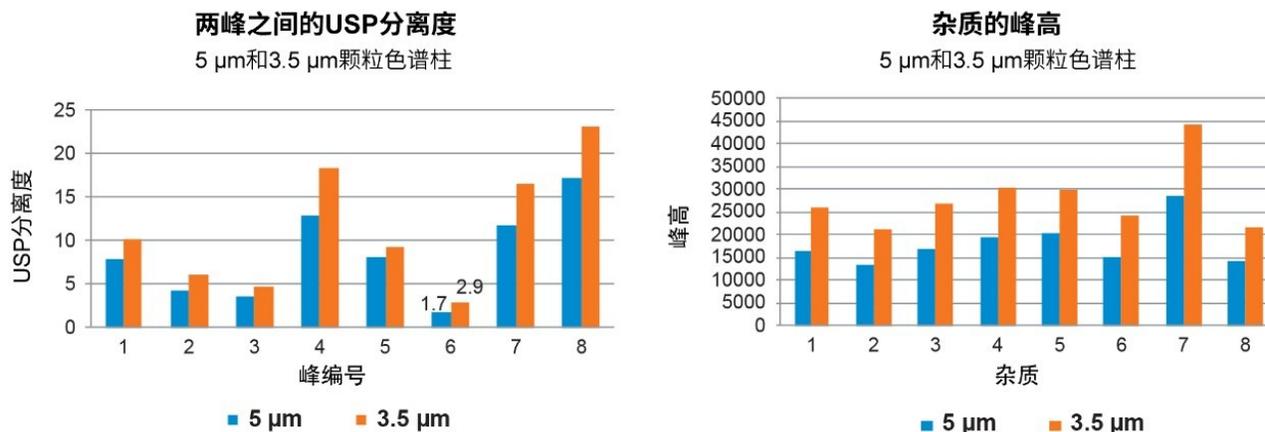


图4.将方法从5 μm转移到具有更高分离能力 (L/dp比率) 的3.5 μm颗粒色谱柱得到的USP分离度和峰高比较。两根4.6 x 150 mm色谱柱在相同条件下运行。

结论

Arc HPLC系统可无缝接受和复制HPLC方法，不会影响方法完整性。此外还可以使用3.5 μm颗粒色谱柱，与5 μm

方法相比可通过缩放梯度步长减少运行时间和溶剂消耗量，或者由于不再受限于高反压，可通过缩小粒径提高效率 and 增加分离能力。分析速度更快且峰积分更加稳定，可以提高QC实验室常规检测的效率和分析通量。

Arc HPLC系统具有稳定、可靠、可重现的性能，能够从任何LC平台进行高效方法转移，并进行有效的方法改进。Arc HPLC系统的压力上限为9500 psi，因此方法可使用高流速和更小粒径的色谱柱。总体而言，这使分析实验室能够确保产品一致性和数据质量，同时减少对数据完整性的担忧。

参考资料

1. USP General Chapter <621> Chromatography, United States Pharmacopeia Convention, Official 1- August-2017.
2. Column Calculator 2.0, 下载地址：
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134891632&type=DWNL> <
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134891632&type=DWNL>>

特色产品

- [Arc HPLC系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659)
- [Alliance HPLC系统 <https://www.waters.com/534293>](https://www.waters.com/534293)
- [2998光电二极管阵列\(PDA\)检测器 <https://www.waters.com/1001362>](https://www.waters.com/1001362)
- [Empower 3色谱数据软件 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720006947ZH, 2020年7月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.