

应用纪要

利用Arc HPLC系统提高USP方法的进样精度

Paula Hong

Waters Corporation



摘要

进样精度是一项关键的方法属性，因此通常在法规管制方法的系统适应性研究中进行考察。现代进样器的设计虽然能够满足大多数分析的进样精度要求，但许多法规管制方法具有严格的要求，其采用的条件与供应商用于确定性能指标的方法中所述的条件不同。这些因素可能导致系统无法日常满足系统适应性要求。本应用纪要专门以美国药典(USP)专论中的系统适应性要求为焦点，展示了Arc HPLC系统的进样精度。所选专论符合以下几项标准之一：100%有机稀释剂、严格的精度要求（例如RSD \leq 0.5%）、进样体积大而样品浓度小。这些变量中的任何一个或其组合都可能导致不可接受的进样差异性。其他研究将比较Arc HPLC系统与同类HPLC系统的性能，证明Arc HPLC系统的高进样精度。

优势

- Arc HPLC系统满足USP专论中严格的进样精度要求
- 在Arc HPLC系统上实现高精度100%有机稀释剂进样

简介

进样精度对于任何HPLC定量分析方法都至关重要。因此，许多法规管制方法对进样精度提出了严格的要求，以确保报告值处于预期的测量不确定度范围内，从而确保其准确度。但是，多种仪器和方法特性会影响液相色谱系统的进样精度。其中包括样品稀释剂，吸液装置的吸液速率、准确度和范围等。

各法规管制方法有一个共同点：由于制剂和/或活性药物成分的溶解度低，因此需要使用高有机含量稀释剂。这些挥发性稀释剂可能会蒸发，导致样品浓度随时间发生变化，从而影响方法的重复性或进样精度。此外，对于低浓度样品，通常将有机稀释剂与大进样体积结合使用，可能导致进样精度出现更多差异性，最终无法满足系统适应性标准。

在本研究中，我们使用多套HPLC系统评估了多种法规管制方法的进样精度。这些不同方法涵盖前文所述的属性，这些属性使日常满足系统适应性要求变得非常困难。我们将提供这些示例展示Arc HPLC系统自动进样器的优异性能及其在确保仪器装置具备低差异性方面的优良设计。

实验

通用LC条件

LC系统：	配有30 CHC的Arc HPLC
检测器：	2998 (PDA)或2489 (TUV)
清除溶剂：	90:10水/乙腈
密封清洗液：	90:10水/乙腈
洗针液：	50:50水/乙腈
密封清洗时间：	0.5 min
样品温度：	10 °C
流通池：	分析型(10 mm)

数据管理

色谱软件：	Empower 3 FR3 Hotfix 1
-------	------------------------

注：Arc HPLC系统自动进样器使用注射器和独立的（已脱气）清除溶剂吸取样品。注射器体积与扩充定量环的组合决定了自动进样器能够注入的体积上限。标准Arc HPLC系统利用50 µL扩充定量环和30 µL进样针，可借助100 µL注射器实现最多60 µL的高精度体积（进样针和定量环体积的75%）。

USP专论中阿奇霉素、有机杂质的分析方法

样品描述

如USP专论所述¹，在7:6:7的甲醇、乙腈和无水磷酸氢二钠的1.73 mg/mL水溶液中，制备浓度为1 mg/mL的USP阿奇霉素RS，并用氨水将pH调节至10。用相同的溶剂将储备液进一步稀释至86 µg/mL。

方法条件

LC系统：	配有30 CHC的Arc HPLC
检测器：	2998 (PDA)

波长:	210 nm
色谱柱:	XBridge, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm (部件号 : 186003117)
柱温:	60 $^{\circ}$ C
样品温度:	15 $^{\circ}$ C
进样体积:	50 μ L
流速:	1.0 mL/min
流动相A:	1.8 mg/mL磷酸氢二钠水溶液, 用10%磷酸将pH调节至8.9
流动相B:	3:1乙腈/甲醇

梯度

时间 (min)	%A	%B
0	50	50
25	45	55
30	40	60
80	25	75
81	50	50
93	50	50

USP专论中喹硫平的分析方法

样品描述

如USP专论所述², 使用流动相制备USP富马酸喹硫平RS的标准储备液, 浓度为0.16 mg/mL。随后用流动相由储备液制备浓度为0.08 mg/mL的标准溶液。

方法条件

LC系统:	配有30 CHC的Arc HPLC
检测器:	2998 (PDA)
波长:	230 nm
色谱柱:	XBridge BEH C ₈ , 5 μm, 4.6×250 mm (部件号: 186003018)
柱温:	25 °C
样品温度:	15 °C
进样体积:	50 μL
流速:	1.3 mL/min
流动相:	54:7:39甲醇/乙腈/2.6 g/L磷酸氢二铵, 用磷酸将pH调节至6.5
运行时间:	15 min

USP专论中氯沙坦钾的分析方法

样品描述

如USP专论所述³, 使用甲醇制备浓度为0.25 mg/mL的氯沙坦钾RS。

方法条件*

LC系统:	配有30 CHC的Arc HPLC
检测器:	2489 (TUV)
波长:	254 nm

色谱柱:	XSelect HSS T3, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm (部件号 : 186004793)
柱温:	35 $^{\circ}$ C
样品温度:	15 $^{\circ}$ C
进样体积:	13.2 μ L
流速:	1.32 mL/min
流动相:	2:3乙腈:0.1%磷酸水溶液
运行时间:	20 min

*原始专论规定采用4.0 \times 250 mm色谱柱，本方法转换为使用4.6 \times 250 mm色谱柱，并对进样体积和流速进行相应调整。

结果与讨论

USP专论中的进样精度

本研究按照<621>⁴和单独章节的描述执行USP专论，评估Arc HPLC系统的性能。阿奇霉素和喹硫平分析使用各自对应的USP专论中所述的条件和样品制备方法进行。氯沙坦钾的分析方法需要经过调整。具体而言，此USP分析方法规定采用4.0 \times 250 mm色谱柱，但该色谱柱未提供现代化耐用的填料。本研究将色谱柱转换为4.6 \times 250 mm HSS T3色谱柱，并对流速和进样体积进行相应的调整。

Arc HPLC系统的结果表明，在测试的所有专论方法中均获得了高精度，完全符合系统适应性标准（如果适用）。USP未对阿奇霉素和有机杂质提出进样精度要求，但该方法在Arc HPLC系统上运行时（运行时间为93 min），表现出良好的精度，相对标准偏差(RSD)值为0.6%。

专论	稀释剂	进样体积	进样精度 系统适应性 (RSD)	结果 (RSD)
阿奇霉素, 有机杂质	7:6:7 甲醇/乙腈/缓冲液	50 μ L	N/A	0.6%
氯沙坦钾分析	甲醇	13.2 μ L*	0.5%	0.08%
喹硫平分析	54:7:39 甲醇/乙腈/缓冲液	50 μ L	2.0%	0.11%

表1.在Arc HPLC上运行USP专论方法的进样精度标准和结果($n=5$)

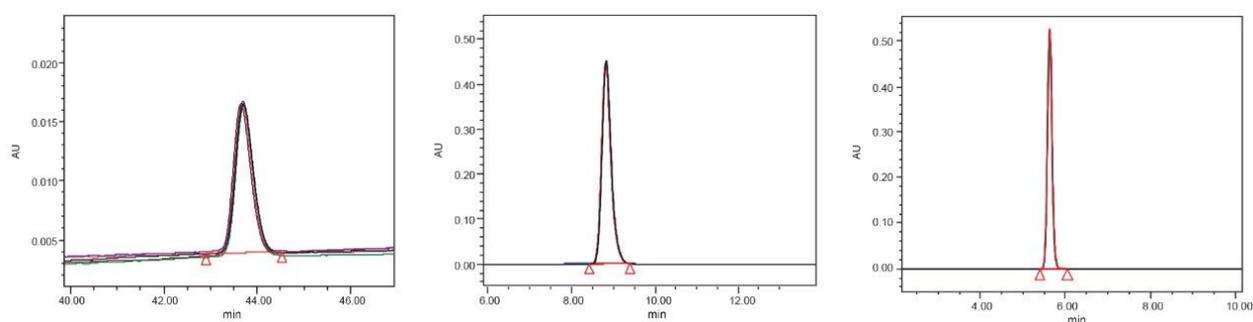


图1.阿奇霉素、氯沙坦和喹硫平标准品的进样叠加图($n=5$)

Arc HPLC系统的日间性能

为评估Arc HPLC系统的日间进样精度，连续三天运行USP专论中氯沙坦钾的分析方法，该方法具有严格的进样精度要求。专论的系统适应性标准包括保留时间、峰面积RSD、USP拖尾因子和五次重复进样的效率。如表2所示，三天内每天的值均处于指定范围内。特别值得注意的是，该分析对峰面积RSD%有着严格要求：不超过(NMT) 0.5%。这些结果证明Arc HPLC系统上的自动进样器具有高重现性进样精度。

系统适应性	标准	第1天	第2天	第3天	平均值
保留时间RSD%	NMT 0.5%	0.115	0.134	0.143	0.131
峰面积RSD%	NMT 0.5%	0.082	0.105	0.058	0.082
USP拖尾因子	NMT 1.4	1.1	1.1	1.1	1.1
效率	NLT 5600	12404	11460	11416	11760

表2.在三天内分析氯沙坦钾得到的系统适应性结果($n=5$)

Arc HPLC系统和同类HPLC系统的日间进样精度

对于任何HPLC系统，日间结果对于确保方法日常满足系统适应性标准都至关重要。为比较其他HPLC系统与Arc HPLC系统的性能，使用氯沙坦钾专论评估了日间进样精度。如USP专论所述，每个样品组包含五次重复进样。于不同日期在同一系统上对所有样品重复分析三次。计算每天的RSD值。

在本研究中，每种自动进样器采用不同的吸样设计。对于Arc HPLC系统，自动进样器使用注射器和独立的清除溶剂吸取样品。其他自动进样器采用计量装置、注射器或泵头来吸取样品，其使用或不使用单独的清除溶剂。无论采用哪种方式，为确保发挥理想性能，每种自动进样器均使用推荐的设置进行清除或灌注。执行这些步骤是为了减少由于气泡或未脱气溶剂引起清除管路或注射器准备不当而发生的故障。

多套HPLC系统的结果如图2所示。Arc HPLC系统的进样精度优于同类系统(W-Z)，RSD%值远低于指定范围。在Arc HPLC系统上获得的三组数据均满足系统适应性要求。在测试的其他系统中，仅系统W在所有三组进样中满足系统适应性标准，系统X、Y和Z都不满足。此外，Arc HPLC系统的RSD%值最低。上述结果表明，与其他HPLC系统相比，Arc HPLC系统能够日常满足这些严格的精度要求。

进样精度 (峰面积RSD%)

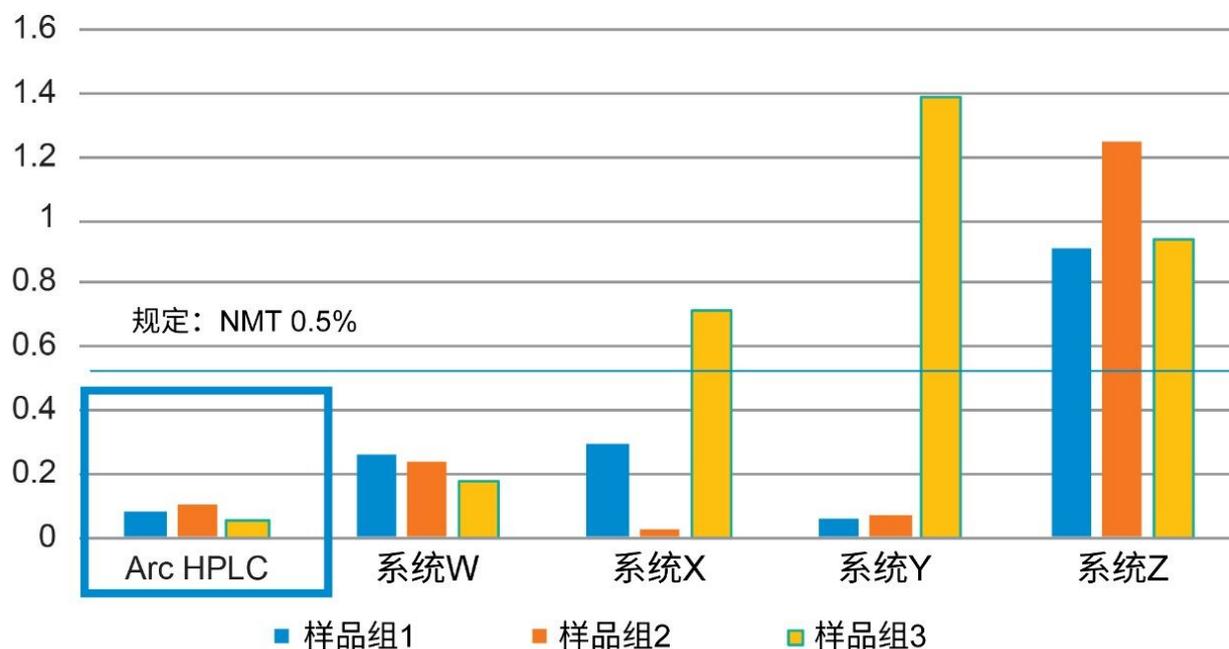


图2. Arc HPLC系统和同类HPLC系统在氯沙坦钾分析中表现出的进样精度

结论

Arc HPLC系统旨在确保进样体积具有高重现性，满足严格的系统适应性标准。自动进样器利用单独的已脱气清除管路来确保峰面积可重现。即使对于采用高有机含量稀释剂和较大进样体积（这些特性可能影响进样精度）的HPLC方法，该系统也可确保高水平的重现性。

参考文献

1. USP, Azithromycin, Organic Impurities. *United States Pharmacopeia and National Formulary* (USP 43-NF38) 2020, (GUID-34C99575-55AF-407A-8C43-79D17394E453_5_en-US), 446.

2. USP, Quetiapine Fumarate. *United States Pharmacopeia and National Formulary* (USP 43-NF38) 2020, (GUID-DBEED03E-7C75-4167-BD21-4E30BA2EFF2B_2_en-US), 3800.
 3. USP, Losartan Potassium. *United States Pharmacopeia and National Formulary* (USP 43-NF38) 2020, (Current DocID: GUID-26D67006-2847-43C4-AEE8-8610488016B6_4_en-US), 2686.
 4. <621> CHROMATOGRAPHY. In *United States Pharmacopeia and National Formulary* (USP 43 NF38), United Book Press, Inc.: Baltimore, MD, 2020; 6853.
-

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/513188>>

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

720007043ZH, 2020年10月