Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

利用eXtended Performance (XP) 色谱柱技术实现美国药典克拉霉素分析法的升级

Kenneth D. Berthelette, Mia Summers, 和 Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 利用*XP*色谱柱对现行美国药典方法进行升级，从而减少运行时间和溶剂使用量。
- 分析时间可减少80%，提高样本处理通量。
- 最多可减少90%的溶剂使用量，从而降低运行成本。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class 系统

XSelect™ CSH™ C_{18} 色谱柱

Empower® 3软件

e*X*tended *P*erformance (*XP*) 2.5-µm色谱柱

经LC/MS认证的TruView™高回收率样品瓶

Alliance® HPLC系统

关键词

方法转移、美国药典、克拉霉素、UPLC、*XP*色谱柱

引言

制药企业常采用美国药典方法来对制剂及原料药进行常规分析。其中许多方法是在过去的色谱柱技术和仪器基础上开发出来并进行验证的。但这些方法被开发出来之后，色谱柱技术以及色谱系统都已经有了很大的发展与提升。通过采用HPLC仪器以及更先进的色谱柱，可大幅缩短分离时间，且同时符合美国药典的要求。eXtended Performance(*XP*)2.5-µm色谱柱可用于HPLC和UPLC®仪器，让色谱分析人员同时享受到小粒径色谱柱和低分散系统的双重优势。并且有不同尺寸可供选择，便于操作人员根据美国药典第<621>条指南的要求进行方法升级。*XP*色谱柱可使过去的方法在现有HPLC系统上更快完成分析，并使分析方法在转移到UPLC系统上时效果更好，经济成本更低。

克拉霉素是一种大环内酯抗生素，可用于治疗多种细菌感染，包括扁桃体炎、支气管炎和肺炎。本应用纪要中的方法转移适用于分析克拉霉素片剂，1从传统HPLC色谱柱转移到利用*XP*色谱柱在HPLC及UPLC系统均能使用，展示了在遵循美国药典指南进行方法转移时的广泛适用性。采用*XP*色谱柱对该方法进行升级之后，分析时间可大大缩短，从而增加HPLC仪器的样本分析通量。采用*XP*色谱柱及UPLC仪器，分析灵敏度、分离度都有提高，并且可减少分析过程中的溶剂消耗量，从而显著降低分析实验室的总成本。

实验

色谱条件

流动相：65:35 甲醇：67 mM磷酸二氢钾（pH 4.0，含磷酸）
分离方法：等度洗脱
检测：紫外检测（210 nm）
色谱柱（L1）：XSelect CSH C_{18} 4.6 x 150 mm, 5 µm; XSelect CSH C_{18} *XP* 4.6 x 75 mm, 2.5 µm; XSelect CSH C_{18} *XP* 4.6 x 50 mm, 2.5 µm
柱温：50 °C
针洗：95:5 乙腈/水
样本净化：95:5 水/乙腈
密封件冲洗：50:50 甲醇/水
流速：随方法而定
进样量：随方法而定

系统条件

流动相：65:35 甲醇：67 mM磷酸二氢钾（pH 4.0，含磷酸）
分离方法：等度洗脱
检测：紫外检测（210 nm）
色谱柱（L1）：XSelect CSH C_{18} *XP* 4.6 x 75 mm, 2.5 µm; XSelect CSH C18 *XP* 4.6 x 50 mm, 2.5 µm; XSelect CSH C18 *XP* 2.1 x 75 mm, 2.5 µm
柱温：50 °C
针洗：95:5 乙腈/水
样本净化：95:5 水/乙腈
密封件冲洗：50:50 甲醇/水
流速：随方法而定
进样量：随方法而定
数据管理：Empower 3软件

样品描述

克拉霉素样品：取克拉霉素和克拉霉素相关化合物A美国药典标准品添加到流动相中，制成浓度为0.5 mg/mL的样品，装在TruView高回收率样品瓶中。

结果与讨论

全世界各大制药商都在生产克拉霉素，因此在研发和质控实验室中常要进行克拉霉素的常规分析。本应用纪要记述了使用不同尺寸的色谱柱，采用美国药典所载克拉霉素片剂分析方法来分离克拉霉素以及克拉霉素相关化合物A的实验。许多美国药典方法都采用了HPLC仪器和5-µm粒径色谱柱，分析时间较长且溶剂消耗量较大。然而，通过采用粒径更小的*XP* 2.5-µm色谱柱，可缩短分析时间，且同时满足各项要求。由于单次分析时间更短，因而可增大分析通量且减少溶剂量，从而使总成本降低，并加快产品的投放。最新一版的美国药典 ‹621›色谱分析法章节中，记述了可接受的方法变化，包括色谱柱长度可变化±70%，颗粒粒径-50%，流速±50%。在本文所记述的方法转移中，遵循了这些规定。

原克拉霉素分析方法要求使用L1特制色谱柱。美国药典中所采用的色谱柱为Delta-Pak™ HPI C_{18}。通过查看沃特世反相色谱柱选择表，决定选用相似但更为先进设计的L1色谱柱XSelect CSH C_{18}，同时适用于HPLC系统以及UPLC系统，且填充颗粒的粒径更小，因而加快了分析过程。美国药典所记载的克拉霉素分析方法为：流速1.0 mL/min，在Alliance HPLC系统上，采用4.6 x 150 mm, 5 µm色谱柱，采用原药典方法条件进行分析。有关该方法的所有适用性要求已全部记载在美国药典标准中，如表1所示。

	美国药典标准	4.6 x 150 mm, 5 µm 1.0 mL/min [初始条件]	4.6 x 75 mm, 2.5 µm *XP* 1.0 mL/min	4.6 x 50 mm, 2.5 µm *XP* 1.5 mL/min
美国药典分离度	NLT 2.0	6.3	5.7	3.8
塔板数	NLT 750	4700	3273	1960
分析时间（min）	N/A	10.0	5.0	2.0
背压（psi）	N/A	1400	2900	2600

表1 采用Alliance HPLC系统以及多种不同尺寸的XSelect CSH C_{18}色谱柱固定相，三次重复进样克拉霉素时的适用性要求。

美国药典适用性标准

美国药典分离度：克拉霉素与克拉霉素相关化合物A之间的分离度不少于(NLT) 2.0

美国药典塔板数：克拉霉素峰不少于750

图1说明，可利用*XP* 2.5-µm色谱柱，在不同系统中，将药典中所记载的方法进行升级，且同时保证符合美国药典 <621>中所述要求。eXtended Performance [*XP*]色谱柱是2.5-µm HPLC色谱柱同时是高柱效的UPLC色谱柱，设计用于承受UHPLC系统的较高压力，适用于HPLC及UPLC仪器。

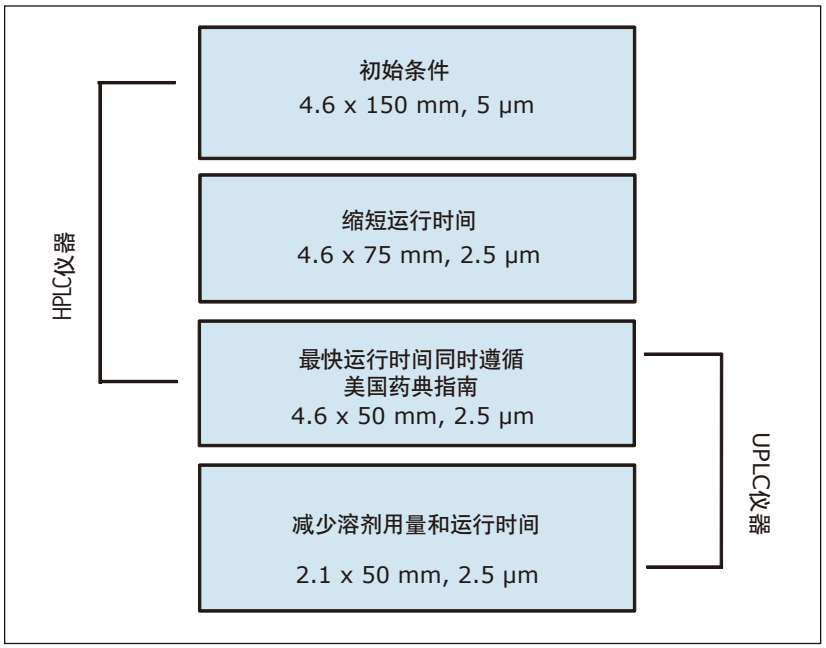

图1 XP 2.5-µm色谱柱灵活运用于不同系统，且符合美国药典 <621>指南的要求。

首先利用ACQUITY UPLC色谱柱计算器将药典规定方法转移到*XP* 4.6 x 75 mm 2.5 µm色谱柱上。[2]长度和粒径比 (L/dp) 与原色谱柱保持相同 (30,000)，从而确保不同色谱柱的分离度相当。经计算得知，进行原方法转移时，需要将流速提高到2.0 mL/min，但这超出了美国药典 <621>指南中的可接受变化范围。由于HPLC系统的背压限制，在本实例中，流速保持与原条件一致 (1.0 mL/min)。图2A及2B分别显示了在原色谱柱以及*XP* 4.6 x 75 mm, 2.5 µm色谱柱上对克拉霉素和克拉霉素相关化合物A进行分离时的结果。采用*XP* 4.6 x 75 mm色谱柱后，分离时间可缩短50%，且同时满足美国药典方法中所规定的分离度要求。由于是非最佳流速，因而该方法的塔板数和分离度有所降低(如表1所示)，但其结果仍符合不少于2.0的要求。

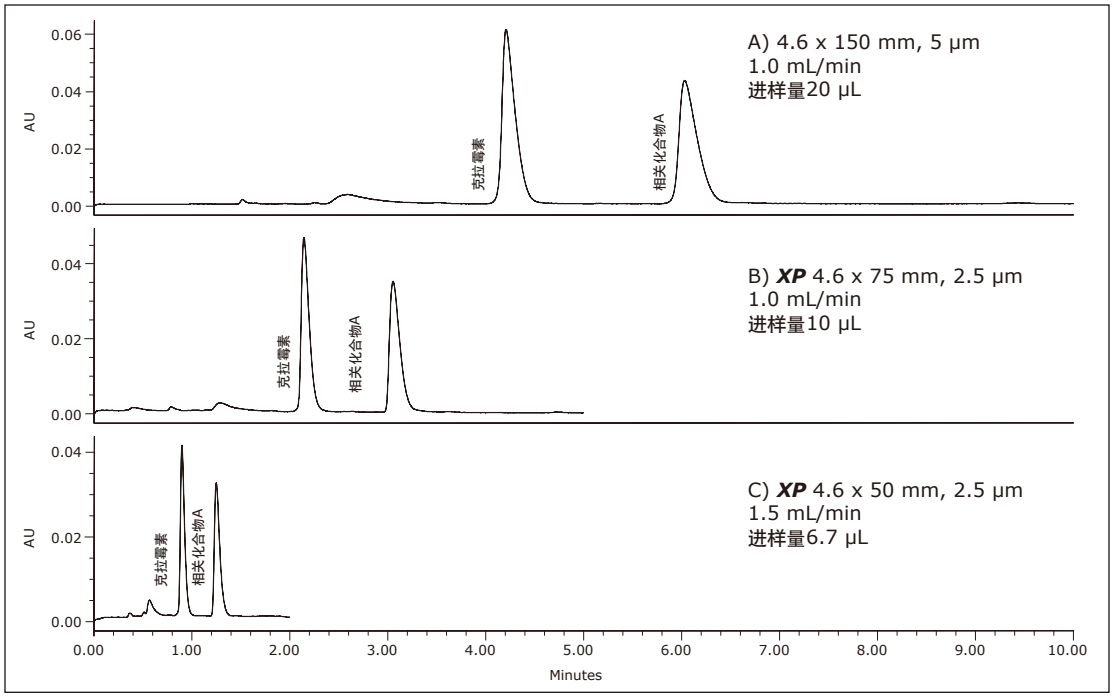

图2 利用不同规格的XSelect CSH C18 XP,2.5 µm色谱柱，在HPLC仪器上分离克拉霉素和克拉霉素相关化合物A时的结果比较。

由于其他杂质或其他方法不一定要求有如此高的分离度，因此我们还选用了长度更短的***XP*** 4.6 x 50 mm, 2.5 µm色谱柱进行测试，以知晓在美国药典 <621>色谱分析法指南所规定的可变化范围内，在采用HPLC系统时，所能达到的最快分析时间以及最大样本通量。采用***XP*** 4.6 x 50 mm, 2.5 µm色谱柱进行分离时的流速为1.5 mL/min（美国药典规定的可接受的最快流速）。如图2C所示，通过采用***XP*** 4.6 x 50 mm, 2.5 µm色谱柱，在流速1.5 mL/min下，分析时间可减少80%。由于4.6 x 50 mm色谱柱的分离能力（L/dp 20,000）比原色谱柱小，因此分离度减小至3.8；但塔板数以及分离度仍在本方法规定范围内（见表1）。通过采用***XP*** 2.5-µm色谱柱以及HPLC仪器，在满足美国药典适用性标准的情况下，本法的分析时间较之药典原方法可减少80%，溶剂用量可减少70%。

如图1——方法转移流程图所述，随后将本分析法从Alliance HPLC系统转移到ACQUITY UPLC H-Class系统。采用更先进的仪器，例如ACQUITY UPLC H-Class系统，可使分离时间更短且分离效率更高，这是由于：该系统可承受较高背压，且两次进样之间平衡更快，系统体积和分散度更小。为了比较HPLC和UPLC系统的分离能力，在ACQUITY UPLC H-Class系统上重新进行如图2C所示的采用 ***XP*** 4.6 x 50 mm, 2.5 µm色谱柱的分析方法，结果见图3B。采用同样的方法和***XP***色谱柱，仅仅是把仪器从HPLC变为UPLC，就可使分离度提高25%，灵敏度（基于峰高计算）提高26%，如表2所示。

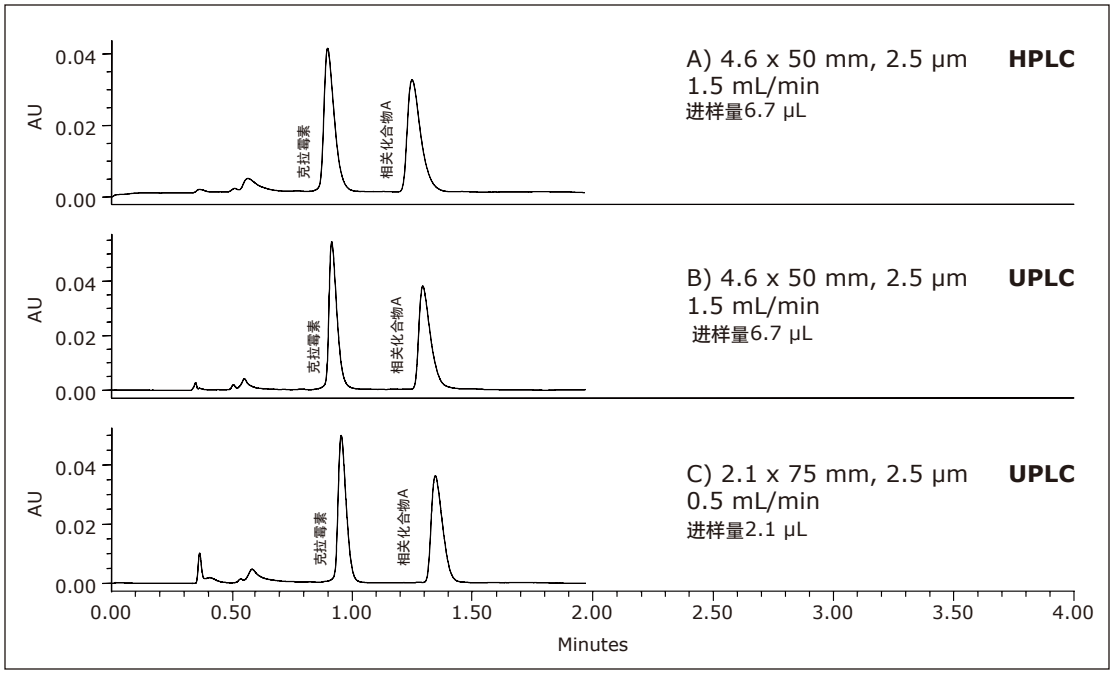

图3 采用XP 4.6 x 50 mm, 2.5 µm色谱柱，在HPLC (A) 及UPLC (B) 上进行分离时的结果比较。
图 (C) 表示在UPLC仪器上，采用XP 2.1 x 75 mm色谱柱进行分离时的实验结果。

最后，选用*XP* 2.1 x 75 mm, 2.5 µm色谱柱进行测试，以证明是否可以在维持L/dp为30,000的前提下，通过减小色谱柱内径 (I.D.) 来进一步减少溶剂用量，且同时保证分离度在可接受范围内。根据ACQUITY UPLC色谱柱计算器计算，得知进行该分离法的最佳流速为 0.42 mL/min；但是，该流速已经超出了美国药典 <621>指南的可变化范围。因此，还是采用0.5 mL/min的流速，以符合美国药典的要求。结果如图3C所示，该方法的分离时间比如图2A所示的原药典HPLC方法减少80%，且符合适用性要求，结果如表2所示。此外，通过采用*XP* 2.1 x 75 mm色谱柱，每次分析所用溶剂量可比原药典法减少90%，比分析速度最快的*XP* 4.6 x 50 mm方法减少30%，如此可显著降低成本。

	美国药典标准	4.6 x 50 mm, 1.5 mL/min [HPLC 系统]	4.6 x 50 mm, 1.5 mL/min [UPLC 系统]	2.1 x 75 mm, 0.5 mL/min [UPLC 系统]
美国药典分离度	NLT 2.0	3.8	5.1	5.2
塔板数	NLT 750	1960	3625	3736
分析时间 (min)	N/A	2.0	2.0	2.0
背压 (psi)	N/A	2600	5600	5600
峰高	N/A	0.040	0.054	0.049

表2 采用XP 4.6 x 50 mm色谱柱，在HPLC和UPLC仪器上进行分离时的适用性结果比较。
同时，也显示了采用XP 2.1 mm I.D.色谱柱，在UPLC系统上进行分析时的适用性结果。

结论

通过将e*X*tended *P*erformance [*XP*] 2.5 µm色谱柱应用于现有的HPLC系统，可将分离时间以及溶剂用量分别减少多达80%和70%（与原美国药典方法相比）。通过联合采用*XP*色谱柱和UPLC仪器，可将分离时间减少多达80%，且溶剂用量可减少90%。由于*XP*色谱柱能够同时应用于HPLC仪器及UPLC仪器，因此该美国药典方法可利用*XP*色谱柱进行升级（在满足当前<621>指南要求的前提下）。通过采用*XP*色谱柱以及HPLC仪器，原方法运行得更快。当采用UPLC系统时，还可进一步提高分离效率和降低成本。对于任何常规分析实验室而言，通过采用粒径更小的色谱柱对美国药典方法进行升级，可显著减少运行时间及运行成本。

References

1. USP Monograph. Clarithromycin Tablets, USP35-NF30, 2692. The United States Pharmacopeial Convention, official from Aug 1, 2012.
2. Jones MD, Alden P, Fountain KJ, Aubin A. Implementation of Methods Translation between Liquid Chromatography Instrumentation. Waters Application Note 720003721en. 2010 Sept.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, Alliance和UPLC是沃特世公司的注册商标。Empower、XSelect、CSH、TruView、Delta-Pak和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。 其他所有商标均归其各自所有者所有。

©2012 年 沃特世公司。印制于中国

2012 年 10 月 720004461ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com