Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用CORTECS 2.7 µm色谱柱转换齐多夫定的USP分析方法

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

应用优势

- 与原始药典方法相比最高可缩短75%的分析时间
- 与原始药典方法相比最高可降低63%的溶剂用量
- 使用中性QCRM，通过内部和外部系统检查确保可靠的数据采集

沃特世解决方案

CORTECS® C_{18} 色谱柱

Alliance® HPLC

Empower® 3 CDS

LCMS 认证最大回收样品瓶

中性质量控制标准品(QCRM)

关键词

Alliance HPLC, CORTECS C_{18}, 齐多夫定，
中性QCRM, USP, 药典方法，
系统性能检查

简介

在药物生产中，耗时的USP药典方法会大大降低样品分析的速度，限制工作效率。此外，由于流动相消耗，这类方法还会产生高额的单次分析成本。这些药典方法通常在较大尺寸的5 µm色谱柱上执行，将其转换到全新的CORTECS 2.7 µm实心核颗粒色谱柱，将大大缩短分析时间并降低溶剂用量。

齐多夫定是一种治疗HIV和AIDS的抗逆转录病毒药。分析齐多夫定的USP药典方法所使用的是5 µm, 4.0 x 250 mm L1色谱柱[1]。本应用纪要将该方法从原始色谱柱转换至CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 150 mm色谱柱和CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 100 mm色谱柱，以展示两种可能的转换方式。2014年8月生效的USP通用章节<621>认可上面所提到的两种转换方式[2]。该章节的修改内容允许基于色谱柱柱长与粒径的比率(L/dp)以及理论塔板数(N)来进行方法转换。本应用纪要将使用两种CORTECS 2.7 µm色谱柱来检验上述两种转换方式的可行性。

在该转换研究中，仪器性能测试(PQ)将使用中性质量控制标准品(QCRM)来完成。通过使用能评估系统性能的QCRM，分析人员可对系统进行监控，从而能够更早地检测到系统问题。QCRM可用作样品分析时分批进样的质量控制标准品，以确保所采集的数据在系统正确运行的情况下按照所设定的方法获取。

实验

LC条件

系统:	Alliance HPLC
色谱柱:	全多孔C_{18}, 5 µm, 4.6 x 250 mm; CORTECS C_{18}, 2.7µm, 4.6 x 150 mm (部件号186007378); CORTECS C_{18}, 2.7µm, 4.6 x 100 mm (部件号186007377)
流动相:	80:20水/甲醇
分离模式:	等度
流速:	1.0 mL/min (4.6 x 250 mm色谱柱); 0.9 mL/min (4.6 x 150 mm色谱柱); 1.5 mL/min (4.6 x 100 mm色谱柱)
柱温:	30 °C
检测波长:	265 nm
进样体积:	10.0 µL (4.6 x 250 mm色谱柱); 6.0 µL (4.6 x 150 mm色谱柱); 5.3 µL (4.6 x 100 mm色谱柱)
样品瓶:	LCMS认证最大回收样品瓶 (部件号600000749CV)
QCRM:	中性QCRM (部件号186006360)
数据管理:	Empower 3 CDS

样品制备

齐多夫定及其相关化合物B和C的参比标准品购自USP。用甲醇配制样品(含1.0 mg/mL齐多夫定，1.0 µg/mL相关化合物B和2.0 µg/mL相关化合物C)，并将其加入沃特世LCMS认证最大回收样品瓶以便进样。

结果与讨论

在测试色谱柱的方法转换过程中执行系统检查

作为方法转换的一部分，质量控制标准品被用于监测样品分析。该操作作为一项系统检查，可确定所采集的数据的准确度。中性QCRM可用于检测样品分析，从而确保采集到准确的数据，并且系统(包括色谱柱)在整个分析过程中正确运行。中性QCRM由三种中性化合物组成，它们与多种流动相和色谱柱填料兼容，适用于所有类型的反相分析。图1展示了在三种测试色谱柱上分别于样品分析前和样品分析后进样QCRM的分析结果。

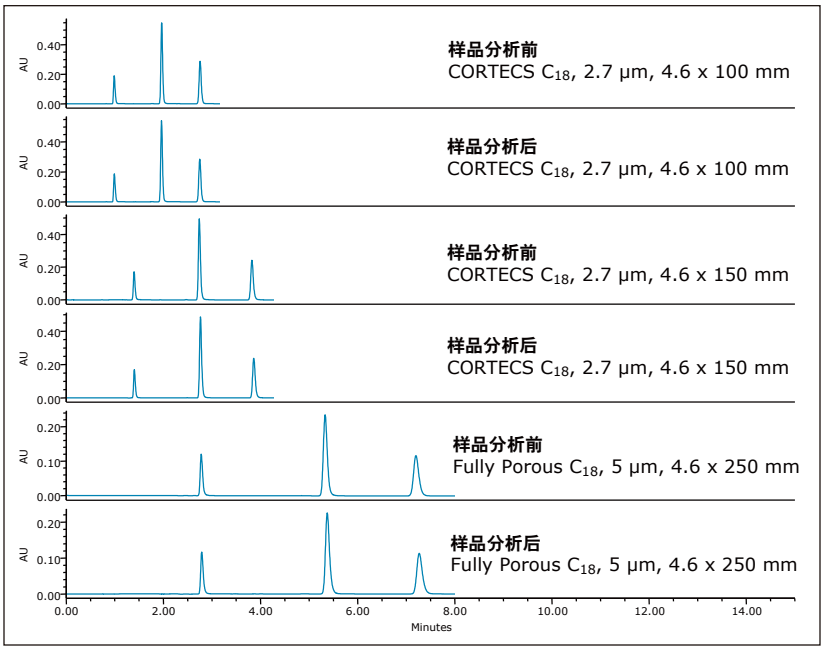

图1. 在测试色谱柱样品分析前后执行中性QCRM(溶于75%乙腈水溶液)的进样谱图。

如图1所示，中性QCRM监测进样分析得到了可重现的结果。这表明在每个测试色谱柱的方法转换过程中采集的数据是准确的。检查系统性能的步骤有助于更早地检测出系统问题，从而缩短潜在的系统停机时间[3]。

基于柱长与粒径(L/dp)比率转换USP方法

USP通用章节<621>概述了无需重复验证即可对USP方法进行的更改。根据2014年8月生效的指导原则，只要色谱柱柱长与粒径的比率(L/dp)在原始色谱柱尺寸的-25%至+50%之间，就能够对等度方法的色谱柱柱长和粒径进行任意更改。对于齐多夫定，原始色谱柱L/dp比率为50,000。使用CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 150 mm色谱柱(L/dp = 55,555)满足上述允许更改的指导原则。CORTECS色谱柱的L/dp比原始色谱柱高11%。L/dp是色谱柱最大分离能力的量度。L/dp比率越高，色谱柱可实现的分离度就越大。图2示出了齐多夫定及其相关化合物在原始5 µm色谱柱和150 mm CORTECS 2.7 µm色谱柱上的分离结果。

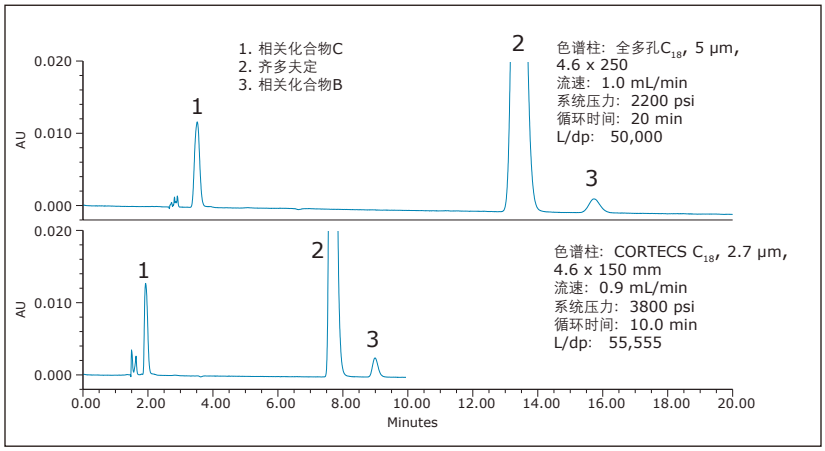

图2. 齐多夫定及其相关化合物在原始5 µm, 4.6 x 250 mm色谱柱和CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 150 mm色谱柱上的分离结果。

如图2所示，使用CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 150 mm色谱柱可将运行时间缩短一半，溶剂用量降低50%。通过在选择色谱柱尺寸时保持L/dp，分析人员可合理地确定分析方法满足USP标准。针对齐多夫定的分析，指导原则中概述了要使分析方法通过必须满足的三个系统适用性标准。表1列出了上述三个标准及其要求的结果，以及样品在每根色谱柱上进行5次重复进样所获得的结果。数据表明，CORTECS 4.6 x 150 mm色谱柱满足要求的所有系统适用性标准。使用这种色谱柱可缩短运行时间并减少溶剂用量，从而能在降低成本的同时提升实验室工作效率，并且所有这些都不需要进行方法重复验证。

	USP指导原则要求	全多孔C_{18} 5 µm, 4.6 x 250 mm	CORTECS C_{18} 2.7 µm, 4.6 x 150 mm	CORTECS C_{18} 2.7 µm, 4.6 x 100 mm
分离度[2,3]	大于等于 1.4	3.9	4.4	3.5
USP拖尾因子[2]	大于等于 1.5	1.12	1.20	1.16
%RSD保留时间[2]	大于等于 2.0	0.03	0.51	0.23

表1. USP指导原则的中概述的适用性标准汇总，以及5次重复进样所得的结果(n=5)。

基于理论塔板数(N)的USP指导原则

通用章节<621>为等度方法的方法转换提供了另一种途径。根据2014年8月生效的指导原则，如果色谱柱的理论塔板数在原始色谱柱的-25%和+50%之间，则该色谱柱可用于方法转换。理论塔板数是柱效，并且受到分离参数的影响。为了计算N，必须记录峰基线处的保留时间和峰宽。公式1用于计算N，其中tR为峰的保留时间，W为峰在基线处的峰宽。

$$N=16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

公式1.等度分离理论塔板数(N)的计算，其中t_R为保留时间，W为基线处的峰宽。

为运行分离的特定色谱柱计算出N之后，只要新色谱柱的理论塔板数满足通用章节<621>概述的指导原则，就可以使用新的色谱柱。在本应用纪要中，使用最迟洗脱峰计算出的原始5 µm, 4.6 x 250 mm色谱柱的平均N值为2957。为满足USP指导原则，对于将用于转换的色谱柱，使用其最迟洗脱峰计算出的理论塔板数必须在2217-4435之间。使用CORTECS C_{18}, 2.7 µm, 4.6 x 100 mm色谱柱进行转换。图3示出了两种色谱柱上的分离结果。

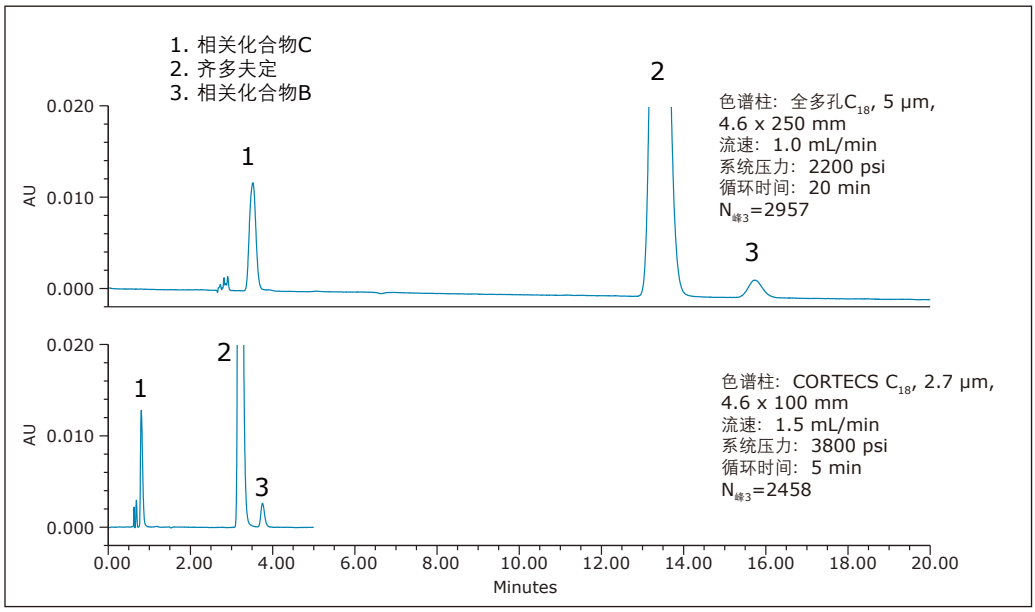

图3. 在原始5 µm, 4.6 x 250 mm色谱柱和CORTECS 2.7 µm, 4.6 x 100 mm色谱柱上分离齐多夫定及其相关化合物。

如图3所示，使用CORTECS 4.6 x 100 mm色谱柱进行的分离满足指导原则。由于最迟洗脱峰的N值为2458，该色谱柱的分离结果满足-25%的指导原则。使用该色谱柱，运行时间可缩短75%，从而大大提高样品通量。此外，还可减少63%的溶剂用量，因而每次分析都能节省大量溶剂。由表1还可看出，在CORTECS 4.6 x 100 mm色谱柱上进行分析的系统适用性标准可以满足指导原则的要求。

结论

过去，USP药典方法采用5 µm色谱柱，运行分析需要耗费大量时间和溶剂。2014年8月开始生效的USP通用章节<621>将概述两种将等度方法转换至较小颗粒色谱柱的途径。第一种途径是保持色谱柱长度与粒度的比率(L/dp)。第二种途径是保持理论塔板数(N)。本应用纪要采用两种转换方法将齐多夫定的等度分离分别转换到了两个CORTECS 2.7 µm色谱柱上，以展示新型实心核色谱柱的通用性。使用CORTECS 2.7 µm色谱柱进行分离的分析速度比传统方法快4倍，并且降低了溶剂用量。此外，由于遵循USP通用章节<621>指导原则，无需重新验证方法，从而实现了色谱柱之间的快速方法转换。这些优势可以提高实验室的工作效率，并降低单次分析的成本。

参考文献

1. *USP Monograph: Zidovudine*. USP-NF.
2. General Chapters:<621> *Chromatography* USP-NF.
3. Berthelette, K.; Summers, M.; Fountain, K.; Troubleshooting Common System Problems Using Waters Neutrals Quality Control Reference Material, Waters Application Note 720004635EN, 2013.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、CORTECS、Alliance和Empower是沃特世公司的商标。
其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司 印制于中国 2014年10月 720005157ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

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