

LC-40 在 HPLC 和 UHPLC 方法转换中的应用

LC-490

摘要：本文介绍了方法转换工具在盐酸氨溴索原料药、注射液和糖浆分析中的应用，结果表明：方法转换后，系统适用性结果可以满足药典要求，不同品种有关物质测试和含量测试结果在方法转换前后无明显差异。通过监控系统适用性溶液 300 次连续进样过程中，氨溴索峰与杂质 I 峰分离度以及系统压力的变化，证明了转换后的方法稳定可靠。

关键词：盐酸氨溴索 方法转换 中国药典

技术特点：

- ❖ 在本例中，HPLC 方法转换为 UHPLC 方法后，可节省 74% 的分析时间和 90% 的流动相。
- ❖ 方法转换前后，系统适用性结果均可满足要求，不同品种有关物质测试和含量测试结果没有明显差异。

根据《中国药典》四部“0512 高效液相色谱法”规定：“品种正文项下规定的色谱条件（参数），除填充剂种类、流动相组分、检测器类型不得改变外，其余如色谱柱内径与长度、填充剂粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等，均可适当调整”，并明确给出了色谱参数允许调整的范围。

在符合药典规定的前提下，可以通过方法转换工具将 HPLC 方法转换为 UHPLC 方法，从而大幅缩短分析时间，提高效率并节省流动相。

本文以盐酸氨溴索分析为例，对方法转换前后的分析结果进行了比较，并考察了转换后方法的稳定性。

实验部分

1.1 仪器

使用岛津 Nexera LC-40D XR 液相色谱，其具体配置为：

系 统 控 制 器：	SCL-40	输 液 泵：	LC-40D XR ×2
脱 气 机：	DGU-405	自 动 进 样 器：	SIL-40C XR
柱 温 箱：	CTO-40S	检 测 器：	SPD-M40
色 谱 工 作 站：	LabSolutions V5.127		

1.2 分析条件

1.2.1 HPLC 分析条件

HPLC 分析条件参照 2025 版《中国药典》中盐酸氨溴索有关物质分析的色谱条件，具体如下：

色 谱 柱：	Shimpack Scepter HD-C18-80 (250 mm×4.6 mm I.D, 5 μm)		
流 动 相：	A 相 -10 mM 磷酸氢二铵水溶液（磷酸调 pH 至 7.0），B 相 - 乙腈		
流 速：	1 mL/min	柱 温：	40℃
进 样 体 积：	20 μL	检 测 波 长：	248 nm
洗 脱 方 式：	等度洗脱，B 相浓度为 50%		

1.2.2 UHPLC 分析条件准备

色 谱 柱 : Shimpack Scepter HD-C18-80 (100 mm×2.1 mm I.D, 1.9 μm)
流 动 相 : A 相 -10 mM 磷酸氢二铵水溶液 (磷酸调 pH 至 7.0) , B 相 - 乙腈
柱 温 : 40℃ 检 测 波 长 : 248 nm
洗 脱 方 式 : 等度洗脱, B 相浓度为 50%

1.3 样品处理

参照《中国药典》, 制备系统适用性溶液, 以及各品种有关物质测试和含量测定所需的供试品溶液和对照溶液。

■ 结果与讨论

2.1 HPLC 方法的缺点

HPLC 分析方法使用 4.6 mm 内径的 C18 色谱柱 (具体型号和规格见 1.2.1) 作为分析柱, 其单次分析时间为氨溴索目标峰保留时间的 2 倍左右 -23 min, 流速 1 mL/min, 需消耗 23 mL 流动相。虽然系统适用性结果可以满足药典要求 (见图 1) , 但存在分析时间较长和流动相消耗量较大的缺点。

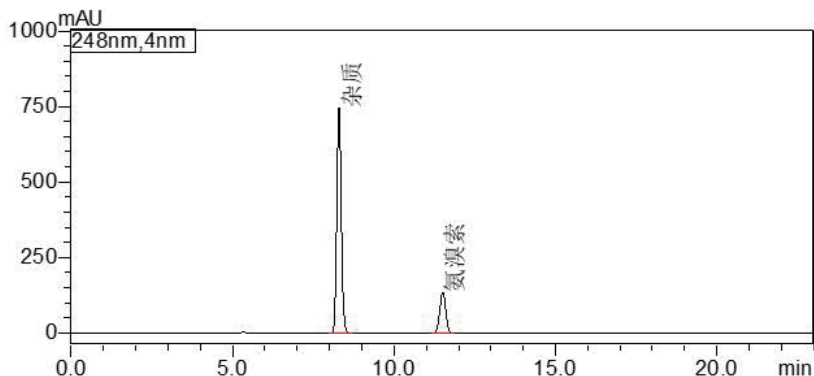


图 1 HPLC 方法系统适用性溶液色谱图 (分离度为 11)

2.2 方法转换的可行性

《中国药典》四部“0512 高效液相色谱法”中提到, 可使用小内径 (约 2.1 mm) 和小粒径 (约 2 μm) 色谱柱来缩短分析时间, 同时药典明确规定了允许调整的参数及其调整范围, 其中涉及到等度洗脱的部分如表 1 所示。

表 1 色谱参数允许调整范围 (等度洗脱)

参数变量	参数调整
固定相	不得改变固定相的理化性质, 如填充剂材质、表面修饰及键合相均需保持一致
填料粒径 (dp) 和柱长 (L)	改变 dp 和 L 后, L/dp 值应保持不变或在原规定值的 -25%~+50% 范围内
从全多孔填料到表面多孔填料	在满足等度要求时可以调整, 且可使用 L 和 dp 的其他组合。前提是应满足系统适用性要求, 且已知成分的选择性和出峰顺序不变
柱内径 (dc)	在 dp 和 L 不变的情况下, 可调整 dc 。为避免 dc 减小可能引起的柱外谱带展宽, 应减小仪器连接死体积、进样量或检测池体积, 适当增加采集速率

流速	等度洗脱柱尺寸未变时，允许流速调整 ±50%。 dc 和 dp 改变时，流速按下式计算调整： $F_2=F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 。柱尺寸变化做上述调整后，允许流速额外变化 ±50%
进样体积	$V_{inj2}=V_{inj1} \times (L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)$ ，即便色谱柱尺寸没有调整，也可调整进样体积以满足系统适用性的要求
等度洗脱流动相比比例	占比小的流动相组分比例可在相对值 ±30% 进行调整，但任何组分比例变化不能超过绝对值 ±10%
柱温	除另有规定外，在原规定温度的 ±10℃ 范围内调整
流动相缓冲液盐浓度	在原规定值 ±10% 范围内调整
pH 值	除另有规定外，水相 pH 值在原规定 ±0.2 pH 范围内调整
检测波长	不允许改变

2.3 岛津方法转换工具

在符合药典关于色谱参数调整规定的前提下，岛津方法转换工具可以将 HPLC 方法转换为 UHPLC 方法：输入转换前后的色谱仪器型号、色谱柱 dc 、 dp 、 L ，以及转换前的流速、进样体积和系统压力，即可显示 L/dp 是否满足药典规定，以及转换后的流速、进样体积和预测系统压力。具体如图 2 所示。



图 2 岛津方法转换工具

本文中转换前后各分析参数的改变如表 2 所示。

表 2 方法转换前后各参数

参数变量	转换前	转换后	是否满足药典要求
固定相	Shimpack Scepter HD-C18-80	Shimpack Scepter HD-C18-80	是
L/dp	250mm/5 μ m=50000	100mm/1.9 μ m=52631	是
柱内径 (dc)	4.6 mm	2.1 mm	是
流速	1 mL/min	0.4 mL/min	是
进样体积	20 μ L	2 μ L	是
等度洗脱流动相比比例	50%B	50%B	是
柱温	40°C	40°C	是
流动相缓冲液盐浓度	10 mM 磷酸氢二铵水溶液	10 mM 磷酸氢二铵水溶液	是
pH 值	7.0	7.0	是
检测波长	248 nm	248 nm	是

方法转换后，分析时间由 23 min 缩短为 6 min 以内，单次进样分析需要的流动相从 23 mL 减少到 2.4 mL，可节省 74% 的分析时间和 90% 的流动相。

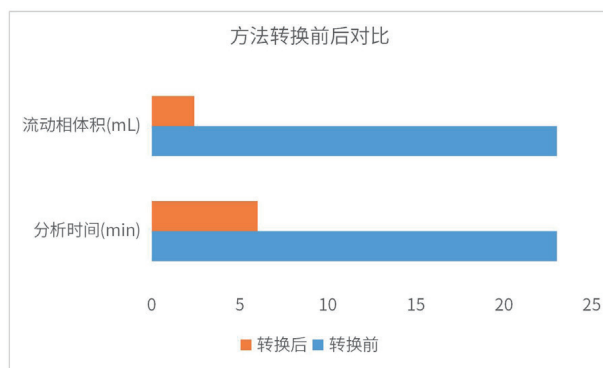


图 3 方法转换前后分析时间和流动相体积对比

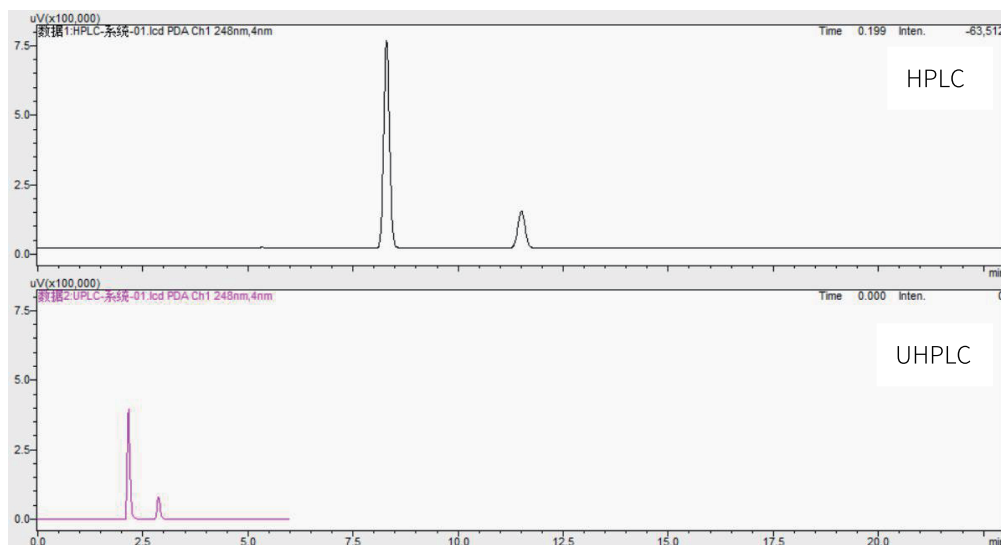


图 4 方法转换前后系统适用性溶液色谱图

2.4 系统适用性

《中国药典》二部，盐酸氨溴索品种正文中明确规定：系统适用性溶液色谱图中，氨溴索峰与杂质I峰（相对保留时间约为 0.8）之间的分离度应大于 4.0。

实验结果表明：方法转换前后，氨溴索峰与杂质I峰的分离度以及杂质I峰的相对保留时间，均满足药典要求。

表 3 方法转换前后系统适用性结果

No.	方法	杂质 I 峰相对保留时间	分离度 (USP2)
1	HPLC 法	0.73	11.0
2	UHPLC 法	0.76	6.2

2.5 有关物质

《中国药典》对盐酸氨溴索原料和注射液有关物质的限度均进行了明确规定，本文使用 HPLC 和 UHPLC 方法对原料和注射液分别进行了测试，测试结果如表 4 所示，方法转换前后，两种方法测试的结果接近。

表 4 方法转换前后有关物质测试结果

有关物质要求项目	药典具体要求	HPLC 测试结果	UHPLC 测试结果
原料药：各杂质峰面积和	不大于对照品溶液主峰面积的 0.3 倍 (0.3%)	0.13 倍	0.14 倍
注射液：杂质 I 峰面积	不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍 (0.3%)	0.06 倍	0.06 倍
注射液：其他单个杂质峰面积	不得大于对照溶液主峰面积的 1 倍 (0.2%)	不大于 0.25 倍	不大于 0.27 倍
注射液：各杂质峰面积和	不大于对照品溶液主峰面积的 5 倍 (1.0%)	0.35 倍	0.39 倍

2.6 含量测定

《中国药典》对盐酸氨溴索原料、注射液和糖浆含量均进行了明确规定，本文使用 HPLC 和 UHPLC 方法对 3 个品种进行了测试，测试结果如表 5 所示，方法转换前后测试结果接近。

表 5 方法转换前后含量测试结果

No.	品种	药典含量要求	HPLC 测试结果	UHPLC 测试结果
1	原料药	按干燥品算，含量不得低于 99.0%	99.8	99.8
2	注射液	标示量的 95.0% ~ 105.0%	102.7	103.1
3	糖浆	标示量的 95.0% ~ 105.0%	101.4	101.5

2.7 UHPLC 稳定性考察

方法转换后，系统适用性溶液连续 300 次进样分析，监控氨溴索和杂质 I 分离度及系统压力的变化，以此考察 UHPLC 方法的稳定性。

结果表明：连续 300 次进样分析，氨溴索与杂质 I 分离度在 5.6~6.2 之间，系统压力在 49.1~49.4 MPa 之间，转换后方法的稳定性良好。具体如图 5 所示。

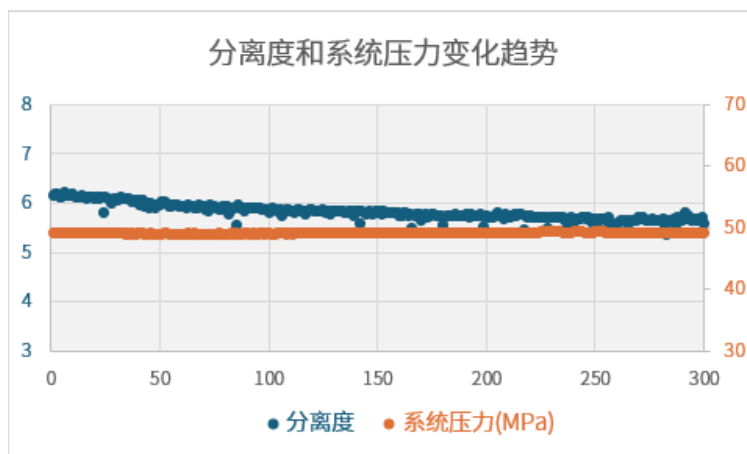


图 5 分离度和系统压力变化趋势图

■ 结论

本文以盐酸氨溴索分析为例，使用岛津方法转换工具，将 HPLC 方法转换为 UHPLC 方法，系统适用性溶液分析、有关物质分析和含量测定的结果以及 UHPLC 方法稳定性考察结果均证明了方法转换的可行性。

岛津应用云

