

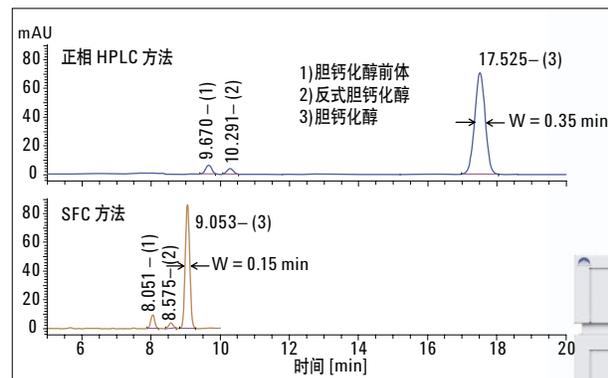
使用 Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统实现 USP 胆钙化醇正相 HPLC 方法向 SFC 的转移

应用简报

制药 QA/QC

作者

Vinayak AK
Syed Salman Lateef
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔



摘要

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统结合了 HPLC 的优势以及超临界流体色谱 (SFC) 的优点, 可提供快速、可靠、环保、稳定且经济有效的解决方案。本应用简报将介绍美国药典 (USP) 胆钙化醇的正相 HPLC 分析方法向使用串联色谱柱的 SFC 方法的转移。HPLC 和 SFC 方法均在 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统上完成。结果表明, 与 USP 方法相比, SFC 方法不仅符合系统适用性标准且分析速度提高 2 倍, 溶剂成本更是减少了 26 倍。稳定性试验结果显示, SFC 方法具有良好的稳定性, 适用于常规分析。



Agilent Technologies

前言

胆钙化醇是维生素 D 的一种，也称为维生素 D₃。胆钙化醇的 USP 分析方法为正相 HPLC 法，其包括分离胆钙化醇及其两个异构体：胆钙化醇前体和反式胆钙化醇（图 1）。

USP 分析方法采用甲苯作为样品稀释溶剂，以无水己烷作为流动相。然而，暴露在浓度范围 10000 到 30000 ppm 的甲苯中将引起昏迷和死亡 (WHO, 1985)。己烷已列入美国毒性物质排放清单 (TRI) 中。相比之下，由于 SFC 使用的是无毒溶剂，并将二氧化碳 (CO₂) 作为流动相的主要成分，因此是一种公认的绿色技术。与正相 HPLC 方法相比，SFC 法提供了更快速的分离，而且不影响柱效，柱平衡更快。在 SFC 中，由于流动相粘度较低，压降比 HPLC 低得多。从而能够将色谱柱串联，实现所需要的分离度。在 SFC 中使用串联柱获得更高柱效和分离度的可能性已得到确认。¹

本应用简报将介绍使用两根具有不同选择性的串联色谱柱开发一种可替代 USP 正相 HPLC 方法进行胆钙化醇分析的 SFC 方法。1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统是整合的一台仪器，HPLC 和 SFC 方法均在该仪器上完成。采用这种独特的混合型解决方案可避免投资两个独立的系统，从而排除了系统之间变异性的影响，大大节省了成本和实验室空间。²

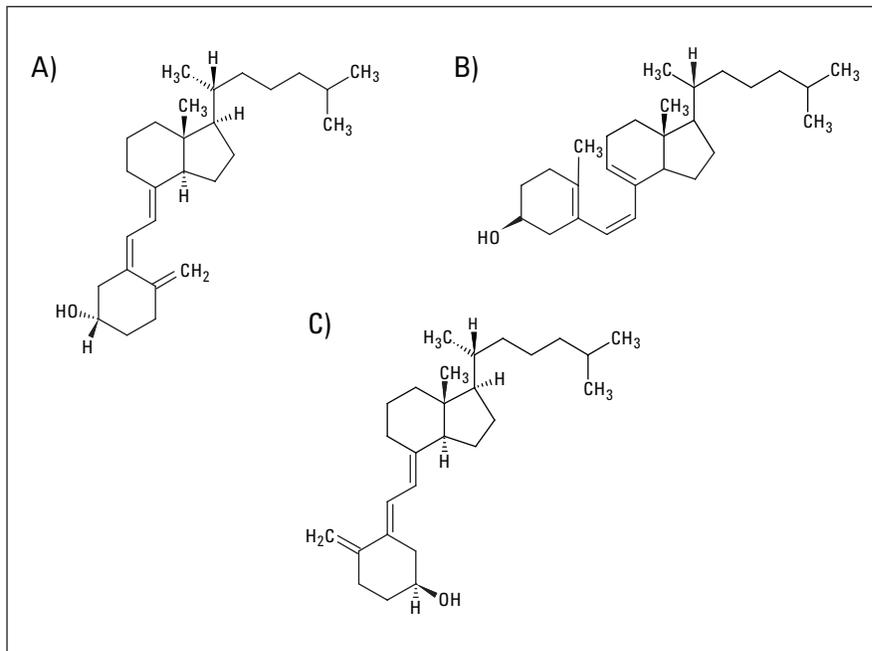


图 1
胆钙化醇 (A)、胆钙化醇前体 (B) 和反式胆钙化醇的分子结构

实验部分

仪器

本实验使用 Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统，其包含下列模块。

描述	型号
Agilent 1260 Infinity 分析型超临界流体色谱系统	G4309A
Agilent 1260 Infinity 二元泵	G1312B
Agilent 1290 Infinity 通用阀驱动	G1170A
Agilent 2 位/10 通阀工具包 – 600 bar	G4232A
Agilent 1260 SFC/UHPLC 混合型毛细管工具包	G4306A

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，
修订版 B.04.03。

试剂与材料

所有溶剂均为 HPLC 级。所用纯净水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore, 美国)。甲醇为超梯度级, 购自 Lab-Scan 公司。HPLC 级正己烷、甲苯、1-戊醇 (*n*-戊基乙醇) 和胆钙化醇均购自 Sigma-Aldrich 公司 (印度)。USP 维生素 D 分析系统适用性混合物购自 USP (印度)。骨化三醇 (胆钙化醇粉末) 由 CADILA 制药公司生产, 用于制剂实验。

色谱参数

表 1 显示了在 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统上进行 SFC 分析的色谱参数。当运行正相方法时, SFC 流速和反压调节器 (BPR) 分别设定为 1 mL/min 和 90 bar, 这样的低值可使系统保持一定的压力。

标样的制备

系统适用性溶液 (正相 HPLC)

取 200 μ L USP 维生素 D 分析系统适用性标样溶解于 1200 μ L 含等量甲苯和正相流动相的混合溶液中。在 90 $^{\circ}$ C 对溶液回流加热 45 分钟, 再冷却到室温。该溶液含有胆钙化醇、胆钙化醇前体和反式胆钙化醇。

系统适用性溶液的制备 (SFC)

100 μ L USP 维生素 D 分析系统适用性标样溶解于 200 μ L 正相流动相 (6/1000 正戊醇的无水己烷混合溶液) 中。使用 Eppendorf Thermomixer 舒适型恒温混合器在 90 $^{\circ}$ C 以 300 rpm 的转速使该溶液与 400 μ L 甲醇混合约 2 个小时并进行加热。该溶液含有胆钙化醇、胆钙化醇前体和反式胆钙化醇。

SFC 耐用性溶液

将 1 mg 胆钙化醇溶解于 10 mL 甲醇中。使用 Eppendorf Thermomixer 舒适型恒温混合器在 90 $^{\circ}$ C 以 300 rpm 的转速对该溶液进行加热约 2 个小时。该溶液含有胆钙化醇和胆钙化醇前体。

线性溶液

将胆钙化醇溶解在甲醇中, 配制成 600 μ g/mL 的储备液。对储备液进行系列稀释, 配制成不同浓度的校准溶液。

标准溶液

称取约 1.6 mg 胆钙化醇溶解于 2 mL 甲苯, 然后加入 8 mL 流动相 (正相)。

参数	正相 HPLC 方法	SFC 方法
色谱柱	Agilent ZORBAX Rx-SIL, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m (部件号 880975-901)	Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 4.6 \times 100 mm, 5 μ m (部件号 959996-912) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m (部件号 959990-902)
检测器	254 nm, 2.5–10 Hz 采集速率	254 and 262 nm, 2.5–10 Hz 采集速率
柱温箱	40 $^{\circ}$ C (柱前和柱后溶剂加热)	40 $^{\circ}$ C (柱前和柱后溶剂加热)
流通池	高压流通池 10 mm 光程和 13 μ L 体积	高压流通池 10 mm 光程和 13 μ L 体积
进样定量管	5 μ L (进样 3 倍定量管体积)	5 μ L (进样 3 倍定量管体积)
反压调节器	90 bar	120 bar
SFC 流速	1 mL/min	2.5 mL/min
正相流速	1.5 mL/min	0 mL/min
流动相	6/1000 正戊醇的无水己烷混合溶液	A: 超临界流体 CO ₂ B: 甲醇
色谱分析	100% A 等度	2% B 等度
运行时间	20 分钟	10 分钟

表 1
Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统所用的色谱参数

胆钙化醇制剂溶液

称取 1 g 胆钙化醇粉末 (含 1.6 mg 胆钙化醇) 溶解于 2 mL 甲苯中, 然后加入 8 mL 流动相 (正相)。超声处理后, 上清液用安捷伦经济型过滤器 Econofilter PTFE, 0.20 μm , 25 mm (部件号 5185-5834) 过滤, 然后取滤液进样分析。

步骤

在 Agilent 1260 Infinity 二元泵混合系统中使用正相泵密封垫 (部件号 0905 1420)。在正相溶剂进入之前, 用异丙醇对泵进行平衡处理。1260 Infinity SFC/UHPLC 混合型系统通过切换 2 位/10 通阀, 在正相模式下操作。使用正相系统适用性溶液进行正相分析, 测定 USP 系统适用性参数。然后再将 2 位/10 通阀切换到 SFC 模式进行 SFC 分析, 测定系统适用性参数、耐用性和线性。使用 SFC 耐用性测试溶液进行耐用性试验, 对 6 个方法参数进行评价。

测定每个耐用性参数时, 采用 6 次重复进样, 计算峰面积和保留时间 (RT)。测定与标准 SFC 方法相比的峰面积和保留时间的百分比偏差 (准确度%)。

进样分析线性溶液以验证方法的线性。所制备的线性浓度稀释样品如表 2 所示。胆钙化醇的最大吸收波长是 262 nm, 因此, 用该波长进行线性研究。进样 100% 甲醇

作为空白, 然后重复进样 9 个线性浓度的溶液。将在线性范围内的各浓度下的平均峰面积针对浓度作图得出校准曲线。胆钙化醇的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 即可基于信噪比的最低线性进样得出。

线性浓度	胆钙化醇 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	8.29
2	18.02
3	38.51
4	77.02
5	148.12
6	224.42
7	307.42
8	385.24
9	458.62

表 2
胆钙化醇稀释表

结果与讨论

分离与检测

用 SFC 系统适用性溶液对分离条件进行了优化。将 ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 4.6 x 100 mm, 5 μm 柱与 ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm 柱串联进行有效的选择性分离。理想的流速和柱温分别为 2.5 mL/min 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 。图 2 显示了 SFC 方法和 USP 正相方法的叠加色谱图。按照 USP 方法, 将两种方法的检测器均设置在 254 nm。

用两种方法进行了系统适用性测试。SFC 方法为反式胆钙化醇和胆钙化醇前体提供了更好的分离度 ($R_s = 2.3$)。

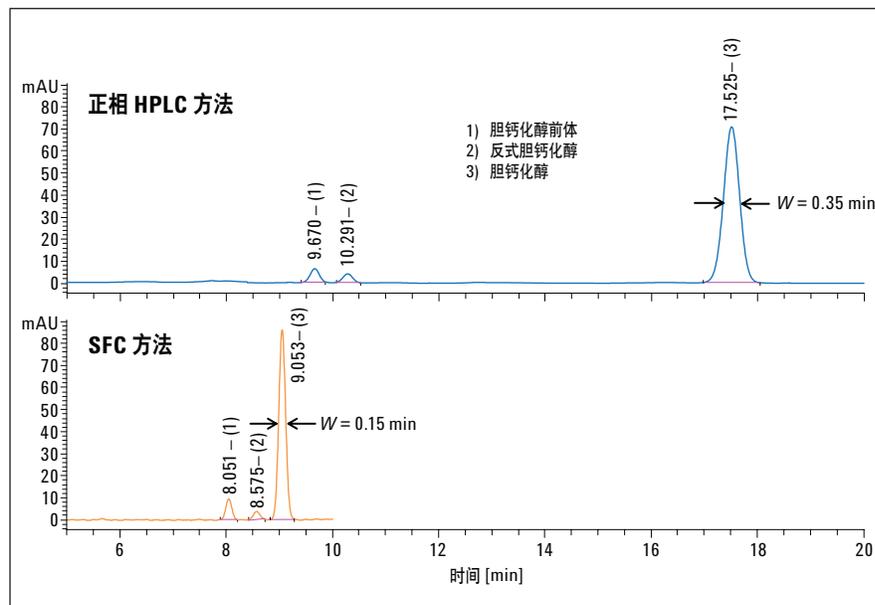


图 2
用正相 HPLC 和 SFC 方法在 254 nm 波长下分离系统适用性混合物。用 SFC 得到了较窄的峰宽

在 SFC 方法中，胆钙化醇和反式胆钙化醇的分离度为 2.0。另外，四次重复进样的峰面积精密度也在 USP 标准限定之内（表 3）。

与 USP 正相方法相比，SFC 的另一优势是显著降低了成本（表 4）。根据每次色谱运行的时间计算出节省的分析时间，并根据材料成本计算方法计算出溶剂的节省量。采用 SFC 方法，每 100 次分析可节约两倍的的分析时间，成本降低 26 倍。假设分析时间成本为每小时 80 美元，间接成本将降低至每小时 40 美元。

耐用性

使用 SFC 耐用性溶液检测方法的耐用性。6 个标准方法参数各不相同（表 5）。峰面积和保留时间的允许偏差分别设定为 $\pm 5\%$ 和 $\pm 3\%$ 。带下划线的数字表示结果超过了允许偏差的范围。

参数	USP 方法	USP 正相 HPLC	
		方法	SFC 方法
反式胆钙化醇和胆钙化醇前体的分离度	不小于 1	1.9	2.3
胆钙化醇的峰面积 (n = 4)	峰面积 RSD 不大于 2%	0.2	0.8

表 3
比较 USP 正相 HPLC 方法与 SFC 方法的 USP 胆钙化醇系统适用性限度

	USP 正相 HPLC		
	方法	SFC 方法	节约量
每个样品的分析时间 (min)	20	10	2x
每 100 个样品的溶剂成本 (美元)	226	8.7	26x

表 4
每 100 次 SFC 分析节省的分析时间和溶剂成本

反压和柱温的变化对方法没有影响。进样体积为 15 μL ，需充满 5 μL 固定进样定量管三次。15 μL 进样体积发生 3% 的变化不会对方法产生影响。根据 USP 的建议，耐用性试验的吸收波长选为 254 nm。2% 的流速变化对胆钙化醇前体的峰面积影响明显，对胆钙化醇和胆钙化醇前体的保留

时间稍有影响。胆钙化醇和胆钙化醇前体的分离度不会因任何耐用性测试参数而发生改变。耐用性试验结果表明，方法在正常使用时是可靠的。即使故意改变方法参数，也能在很大程度上保持性能不受影响。但是，流速和波长等某些参数非常重要，必须小心控制。

参数	变化	胆钙化醇			胆钙化醇前体	
		% 峰面积	% 保留时间	分离度	% 峰面积	% 保留时间
流速: 2.5 mL/min $\pm 2\%$	高: 2.55 mL/min	0.8	0.8	4.5	-0.2	0.7
	低: 2.45 mL/min	-4.5	-3.7	4.5	-8.0	-3.8
色谱柱: 40 °C $\pm 2.5\%$	高: 41 °C	0	-0.6	4.5	0.6	-0.6
	低: 39 °C	-0.3	0.8	4.5	3.0	0.7
进样器: 15 μL $\pm 3\%$	高: 15.5 μL	-1.0	-0.1	4.5	1.0	-0.1
	低: 14.5 μL	-0.4	0.2	4.5	-0.2	0.2
波长: 254 ± 1 nm	255 nm	-3.0	-0.4	4.5	0.8	-0.4
	253 nm	0.6	-0.8	4.5	5.7	-0.8
改性剂浓度: 2% B $\pm 5\%$	高: 2.1% B	-1.4	1.2	4.4	1.4	0.8
	低: 1.9% B	-2.0	-2.5	4.6	-1.5	-2.1
反压: 120 ± 2 bar	高: 122	0.1	1.9	4.5	4.3	1.8
	低: 118	-0.3	-2.1	4.5	1.0	-2.0

表 5
SFC 耐用性测试结果，表格中带下划线的数值表示超出 5% 峰面积允许限度的偏差和超出 3% 保留时间允许限度的偏差

使用 SFC 方法的 LOD、LOQ 和线性

信噪比 (S/N)>3 时的分析物浓度定义为 LOD，S/N>10 时的分析物浓度定义为 LOQ。表 6 列出 SFC 方法中胆钙化醇的 LOD 为 3.8 µg/mL，LOQ 为 8.29 µg/mL。

采用 SFC 方法从胆钙化醇的 LOQ 浓度开始测定其线性浓度溶液。线性校准曲线显示的相关系数 (R^2) 值为 0.999 (图 3)，表明 SFC 作为正相方法的替代方法具有良好的性能。

制剂分析结果

通过分析胆钙化醇制剂溶液，并与标准溶液中检测到的含量进行比较，测定出制剂中胆钙化醇的含量。同一份样品分别用正相和 SFC 方法进行分析。两个方法对制剂中的胆钙化醇含量的分析结果相似 (表 7)，说明两个方法的准确度相似。

名称	LOD		LOQ		线性范围 (µg/mL)	R ² 值	浓度水平数
	µg/mL	信噪比	µg/mL	信噪比			
胆钙化醇	3.80	9.2	8.29	14.04	8.3 – 458.6	0.999	9

表 6
使用 SFC 方法分析胆钙化醇的 LOD、LOQ 和线性

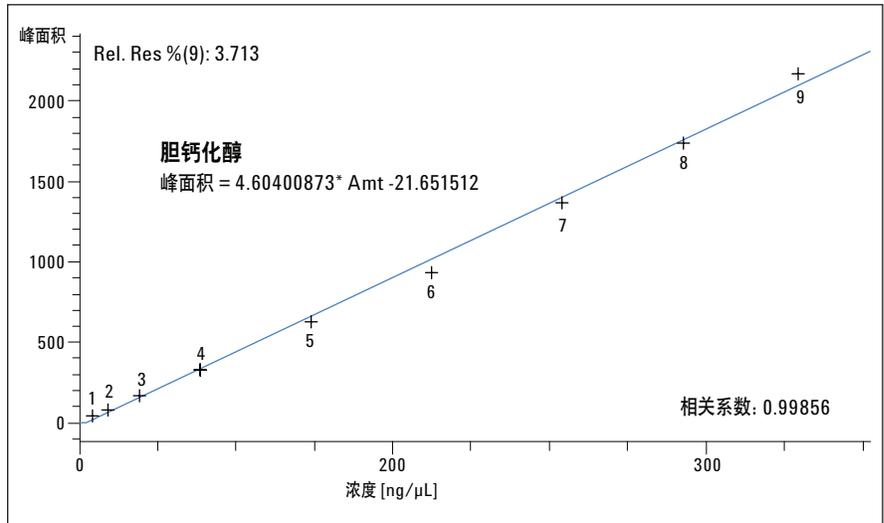


图 3
胆钙化醇的线性曲线

方法	表 1 分析结果 (1 g 制剂中的 mg)	表 2 分析结果 (1 g 制剂中的 mg)
SFC 方法	2.0	1.8
正相 HPLC 方法	2.0	1.9

表 7
用 SFC 方法和 USP 正相 HPLC 方法测定的制剂中胆钙化醇含量

结论

我们用 Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统开发了新的 SFC 胆钙化醇分析方法，并将该方法与原 USP 正相 HPLC 方法进行了比较。采用串联色谱柱使胆钙化醇及其两个异构体得到了有效的分离。在符合系统适用性要求的情况下，SFC 方法比正相 HPLC 方法速度快 2 倍，成本节省 26 倍。另外，用两种方法对两组制剂中胆钙化醇的含量测定，给出了相似的结果。SFC 方法的线性和耐用性结果令人满意，LOD 值约为 4 ppm。另外，采用 SFC 方法不需要购买和消耗价格昂贵且对环境有害的化学试剂。因此，SFC 方法提供了一种快速、环境友好、经济有效的解决方案。

参考文献

1. Melissa N. Dunkle 等人, "High resolution separations by supercritical fluid chromatography using a coupled column approach with the Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System" (使用串联色谱柱方法和 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统通过超临界流体色谱实现高分离度分离), *安捷伦应用简报*, 出版号 5990-6934EN, **2010**
2. Martin Vollmer, Markus Becker, "Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC System" (Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统), *安捷伦技术概览*, 出版号 5990-9514EN, **2012**

www.agilent.com/chem/sfc

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012年12月1日，中国出版
5991-1456CHCN



Agilent Technologies