

Vanquish Access 稳健复现中国药典、美国药典中呋塞米的测定

沈国滨¹ 施磊² 管小舒² 冉良骥¹ 金燕¹ 王红芳²

¹ 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 色谱质谱事业部, 中国, 上海

² 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司, 中国创新中心, 中国, 上海

关键字: Vanquish Access, 呋塞米, 中国药典, 美国药典, 系统适应性, 含量, 交互性图表

应用优势

1 Vanquish™ Access HPLC 系统结合 Hypersil™ Gold 色谱柱可以轻松重现药典对于呋塞米含量和杂质的分析方法。

2 Chromeleon™ 变色龙色谱数据系统可以在一个软件中实现多款 HPLC 系统的无缝控制, 并为仪器性能和寿命监测提供可视化的交互工具。

应用目标

为了重现《中国药典》和《美国药典》中呋塞米的测定方法为了演示可以在 QC 日常实验中使用的 Chromeleon™ 可视化交互工具。

引言

可靠的质量控制在药物生产中至关重要, 以确保药物在疗效(药物含量)及安全性(杂质)方面的质量。高效液相色谱法(HPLC)作为药物含量和杂质分析的首选方法, 通常与药典各论(美国、欧洲、中国、日本等)中描述的标准方法一起使用。在药物的质量控制阶段, 借助系统适用性验证, 可以确保液相色谱仪器和色谱柱等, 符合药典对于稳定性和耐用性分析的要求。

本文针对 2020 版中国药典中呋塞米注射液的药物含量和有关物质方法进行系统适用性验证^[1]。呋塞米是最常见的循环利尿剂之一, 结构式见图 1, 通常用于治疗与心脏、肾脏和肝脏功能障碍等疾病引起的水肿^[2-3]。大多数药典方法在实施上相对容易, 不需要高级功能或复杂的设置^[1,4-5]。Thermo Scientific™ Vanquish™ Access 是一款入门级高效液相色谱系



统, 为此类各论方法提供强大的分析性能, 使其成为常规 QC 实验室的理想选择。

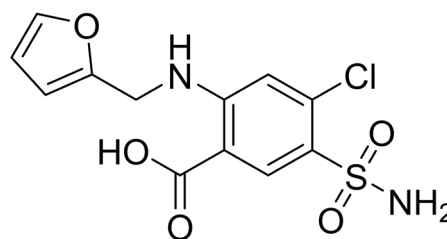


图1 呋塞米结构式

同时, 本文利用呋塞米药典含量和有关物质方法的重现, 通过比较市场上同类型液相色谱平台系统, 结合 Thermo Scientific™ Chromeleon 数据处理系统特色的交互性图表功能, 展示 Vanquish™ Access 液相色谱系统在易用性、稳健性和耐用性等方面的优势。

实验部分

试剂

化学品名称	货号
Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ Pro UV/UF Ultrapure Water Purification System, 18.2 MΩ/cm resistivity or higher	50131950
Fisher Chemical™ Acetonitrile Optima™ LC/MS grade	A955-4
Fisher Chemical™ Isopropanol, Optima™ LC/MS Grade	A416-4
四氢呋喃 (THF): HPLC 级, CNW	CAEQ-4-011321-4000
Fisher Chemical™ 冰醋酸: Optima LC/MS 级	A113-50
呋塞米标准品, ANPEL	CDAA-760060-250 mg
呋塞米有关物质 A 标准品, TRC	CDDM-I818500-50 mg
呋塞米注射液样品, 国内某药厂, 规格: 2 mL:20 mg	-

样品处理

样品处理工具/耗材名称	货号
Fisher Scientific™ Fisherbrand™ 迷你涡旋混合器	14-955-152
Thermo Scientific™ Finnpiquette™ F3 可变量程单通道移液器	4640040 (10-100 uL)
Thermo Scientific™ Finnpiquette™ 移液器吸头	4640060 (100-1000 μL)
Thermo Scientific™ Finnpiquette™ 移液器吸头	9401030
Thermo Scientific™ SureSTART™ 2 mL 玻璃螺口样品瓶, 2 级高通量应用	6ASV9-2PT
Thermo Scientific™ SureSTART™ 9 mm 螺口盖, 2 级高通量应用	6ASC9STBS1

仪器配置

仪器模块	Part Number
Thermo Scientific™ Vanquish™ Access 系统, 由以下部分组成:	
•Vanquish™ 四元泵 AN	
•Vanquish™ 分流进样器 AT	
•Vanquish™ 柱温箱 A	VA-S22-A-01
•Vanquish™ 可变波长检测器 A	
•可变波长 - 标准流通池, SST, 11 μL	

样品配制

稀释溶剂: 移取冰醋酸 22 mL, 加乙腈 - 水 (1:1, v:v) 至 1000 mL, 混匀即得。

呋塞米标准品储备液: 精密称取呋塞米标准品适量, 用混合溶剂定量配制成 1 mg/mL 的呋塞米标准储备液。

呋塞米标准溶液: 用稀释溶剂将 1 mg/mL 的呋塞米标准储备液稀释成 0.01、0.1 和 0.2 mg/mL 的标准溶液。

呋塞米有关物质 A 标准储备液: 精密称取呋塞米杂质 A 标准品适量, 用混合溶剂定量配制成 1 mg/mL 的呋塞米有关物质 A 标准储备液。

呋塞米供试品溶液 (中国药典): 精密量取呋塞米注射液样品适量, 用混合溶剂定量稀释成 1 mg/mL 的溶液。

系统适应性溶液 (美国药典): 精密量取 1 mg/mL 的呋塞米标准储备液和 1 mg/mL 的呋塞米有关物质 A 标准储备液适量, 用混合溶剂稀释配制成含 20 μg/mL 呋塞米和 12 μg/mL 呋塞米有关物质 A 的混合溶液。

强制降解实验

取上述呋塞米供试品溶液 (1 mg/mL) 5 份, 每份 1 mL, 装入透明进样小瓶中, 至于避光空间中, 在紫外灯 254 nm 波长下, 分别照射 0、1、2、4 和 6 小时进行强制光降解, 降解完直接进样分析。

色谱条件

表1 色谱条件

色谱柱	Thermo Scientific Hypersil™ Gold C18 色谱柱 250 × 4.6 mm, 5 μm (货号: 25005-254630)
流动相	水 /THF/ 冰醋酸 (70/30/1, v/v/v)
流速	1.0 mL/min
柱温	25 °C
自动进样器清洗液	10% 异丙醇 / 水溶液 (v/v)
进样体积	20 μL
检测器参数	波长: 272 nm, 采样率: 10 Hz, 响应时间: 0.5 s

数据采集系统

Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2.10 MUH CDS 用于数据采集和分析。

结果与讨论

良好的耐用性，满足中国药典和美国药典要求

呋塞米方法中使用了四氢呋喃作为流动相^[1,4]，使目标物质在分离时获得更好的效果。然而，由于四氢呋喃为一种中等极性非质子性溶剂，可以溶解很多极性以及非极性物质。其对常规液相色谱系统耐受性也提出了很大挑战，色谱条件见表 1。Vanquish Access 为标配正反相兼容的液相色谱系统，除了可以在甲醇，乙腈等常规极性溶剂中稳定运行，同时，也可以在正己烷、四氢呋喃等不同极性与类型溶剂体系下稳定运行。

Vanquish Access 结合 Hypersil Gold™ C18 色谱柱，可以轻松满足中国药典和美国药典对于系统适应性的要求。其中，中国药典呋塞米注射液项下对于系统适应性的要求主要涉及理论塔板数 (≥4000)，本次研究呋塞米主峰的理论塔板数均在 13700 以上，可以轻松满足药典要求 (图 2)。

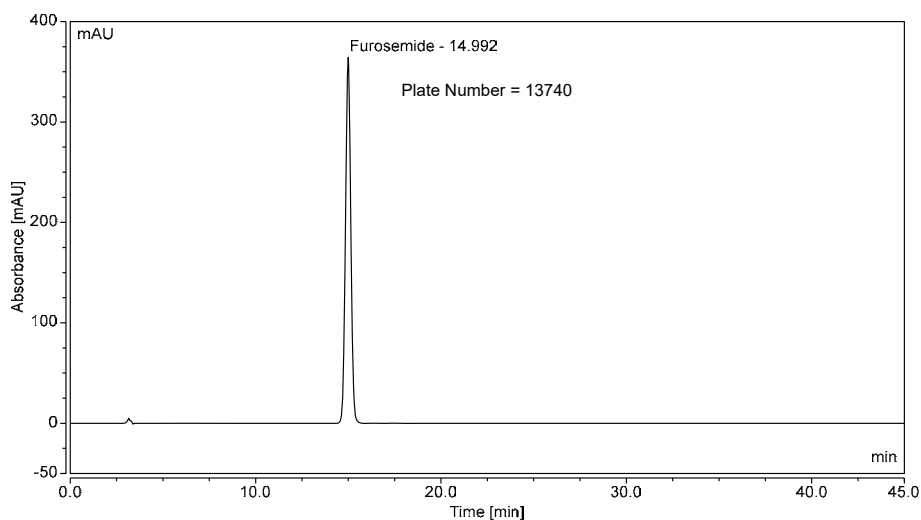


图2 中国药典 0.1 mg/mL呋塞米标准溶液Vanquish Access测试谱图

表2 中国药典系统适应性测试结果 (n=6)

中国药典系统适应性	要求	Vanquish Access	品牌S	品牌A
理论塔板数 :0.1 mg/mL 呋塞米标准溶液	≥ 4000	13740	13933	13309
理论塔板数 :0.01 mg/mL 呋塞米标准溶液	≥ 4000	13824	13984	13254

美国药典中系统适应性主要涉及分离度和峰面积的重复性，Vanquish Access 测试结果均可满足要求（图 3 和表 3）。

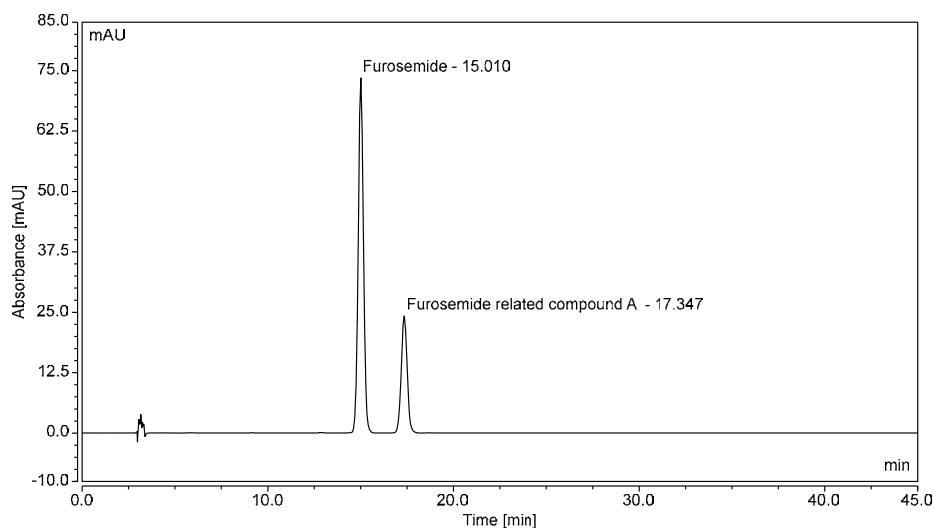


图3 美国药典 系统适应性溶液（20 µg/mL呋塞米 + 12 µg/mL呋塞米有关物质A）Vanquish Access测试谱图

表3 美国药典呋塞米各论中系统适应性测试结果（n=6）

美国药典系统适应性	要求	Vanquish Access	品牌S	品牌A
含量：分离度，系统适应性溶液	≥1.5	4.30	4.36	4.03
含量：呋塞米峰面积 RSD，0.2 mg/mL 呋塞米标准溶液	≤0.73%	0.07%	0.72%	0.22%
有关物质：分离度，系统适应性溶液	≥2.5	4.30	4.36	4.03
有关物质：呋塞米峰面积 RSD，系统适应性溶液	≤2.0%	0.13%	1.42%	0.12%

卓越的精密度表现，更优的稳定性

良好的精密度，不仅是液相色谱系统最基本的性能要求，也是 QC 实验室保证方法稳定性和数据准确性的关键指标。以美国药典中含量精密度为例，比较了 0.2 mg/mL 呋塞米标准溶液在不同品牌、同级别仪器上的分析重复性（图 4），Vanquish Access 的保留时间和峰面积 RSD 均不大于 0.07%（表 4），其明显优于其它同级别品牌仪器的表现，完美诠释了同为入门级液相色谱，Vanquish Access 在稳定性方面的强大竞争力。

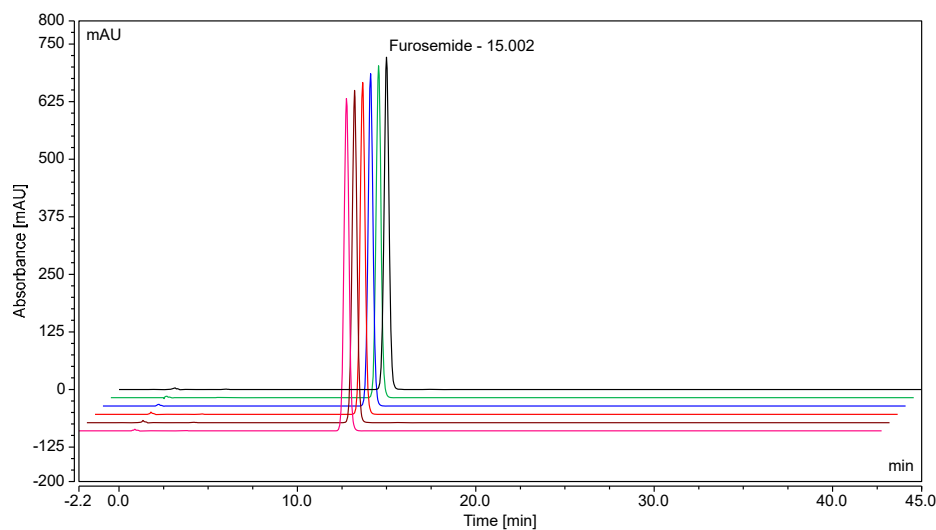


图4 Vanquish Access - 0.2 mg/mL标准溶液重复性测试谱图（n=6）

表4 0.2 mg/mL标准溶液重复性结果比较 (n=6)

咪塞米 (n=6)	保留时间 RSD, %			峰面积 RSD, %		
	Vanquish Access	品牌S	品牌A	Vanquish Access	品牌S	品牌A
含量, 0.2 mg/mL 标准溶液	0.02	0.06	0.07	0.07	0.72	0.22

以上数据展示了 Vanquish Access HPLC 和其它两款同级别 HPLC 系统的比较结果, 结果显示三种标准 LC 系统在性能上具有相似性。同时也证明了 Vanquish Access HPLC 系统, 可以将市场上其它同级别 HPLC 系统的方法, 无缝地转移并复现, 保证了分析结果可重现, 且可靠。

交互性图表, 实现数据图形化

Thermo Scientific Chromeleon 数据处理软件支持使用定制化的交互性图表 (图 5), 软件自动将所有动态链接的数据图形化, 可以在数据处理或报告设计等界面进行多批次数据的比较, 进而满足大数据量分析的需求。例如, 可以将保留时间、峰面积等结果图形化, 分析仪器运行的稳定性 (图 6a); 通过柱压, 理论塔板数和对称度等参数可以判断和预测色谱柱运行状态 (图 6b)。

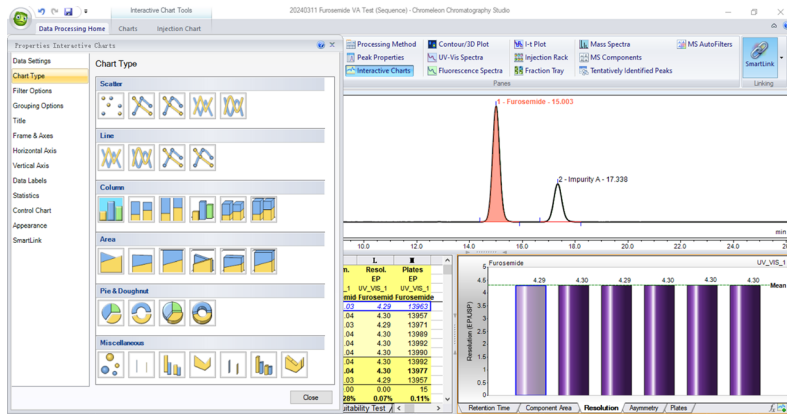


图5 Chromeleon支持基于色谱分析数据定制化交互性图表

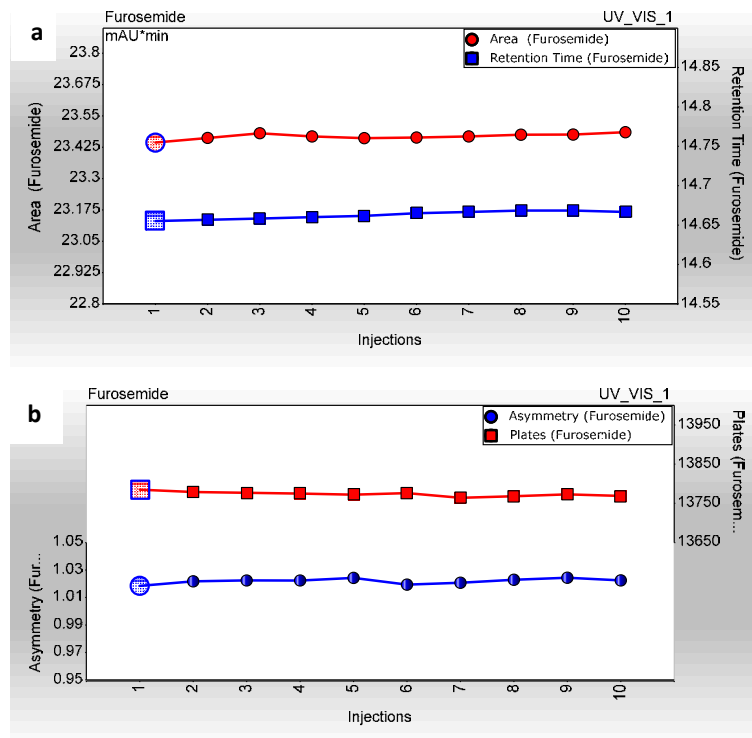


图6 利用交互性图表不需要额外转移数据, 在线自动地统计Vanquish Access 分析结果

- a. 保留时间、峰面积结果; b. 色谱柱理论塔板数和对称度

以在 Vanquish Access 系统上运行呋塞米系统适应性实验时的保留时间、峰面积等关键数据的变化趋势为例，以上交互性图表所展示的结果，进一步印证了 Vanquish Access 始终如一的稳定性，可以满足客户常规分析对于耐用性的要求。

另外，呋塞米对光不稳定，呋塞米及其制剂多要求避光保存，文献也多有关于呋塞米光降解及其相关降解杂质研究的报道^[3,6]。本文通过分析强制光降解的样品，结合交互性图表，在仪器运行、数据采集的过程中，就可以直观、可视化的对样品光降解过程进行分析和监控，为后续呋塞米及其制剂中降解杂质的及时发现、有效控制，产品质量保证和用药安全提供完整的依据(图7)。

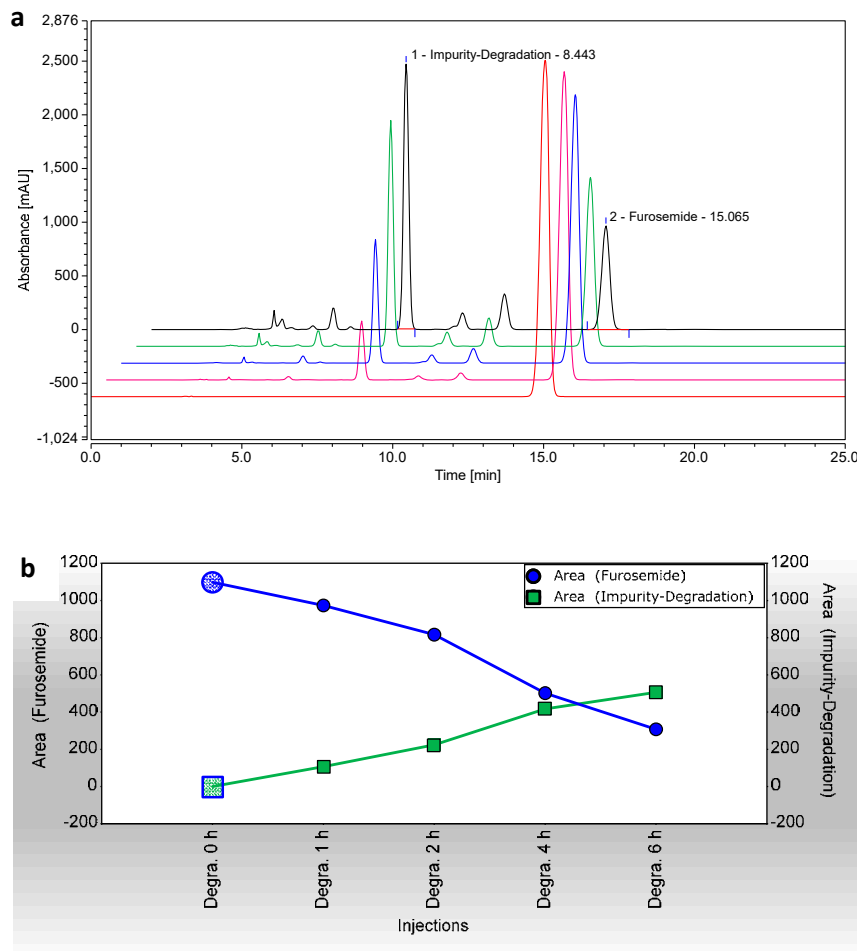


图7 变色龙交互性图表分析样品降解过程.

a 紫外线强制降解色谱图, b 交互性图表自动绘制含量 (峰面积) 变化

结论

本文对中国药典和美国药典中呋塞米品种液相方法在 Vanquish Access 液相色谱系统进行了重现。本研究表明，Vanquish Access HPLC 系统可以满足 USP 和 ChP 方法的分析要求，远高于药典的系统适应性要求使其完全有能力应用于制药行业的质量控制。

1. Vanquish Access 结合 Hypersil GOLD C18 色谱柱，能轻松满足中国药典和美国药典对于系统适应性的要求；
2. 市场上其它同级别 LC 系统和 Vanquish Access HPLC 系统之间的方法转移可以无缝执行，结果显示其在性能上具有相似性；
3. 交互性图表是连接用户、软件、硬件和耗材的桥梁。尤其在分析大量数据时，用户不需要转移至第三方软件，变色龙即可提供实时的、可视化的分析图表用于和在线监测。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典（二部）[M] 2020 年版 北京：中国医药科技出版社，2020：575-576.
- [2] Furosemide Monograph for Professionals - Drugs.com, The American Society of Health-System Pharmacists (accessed December 2023)
- [3] Micaela Giannetti. An Insight into the Degradation Processes of the Anti-Hypertensive Drug Furosemide[J]. Molecules, 2023, 28(1):381. <https://doi.org/10.3390/molecules28010381>
- [4] United States Pharmacopeia, USP Monographs, Furosemide, USP-NF. (2022).
- [5] Thermo Scientific Application Note 001634: Out-of-the-box usability of Thermo Scientific UltiMate 3000 and Vanquish Core HPLC instruments for the compendial analysis of commonly prescribed drugs, 2023, Application Note: Out-of-the-box usability of Thermo Scientific UltiMate 3000 and Vanquish Core HPLC instruments for the compendial analysis of commonly prescribed drugs (thermofisher.com)
- [6] 刘爽 . 一种呋塞米及其制剂中的光照降解杂质的 HPLC 检测方法 [P]. CN116794172A, 2023.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific