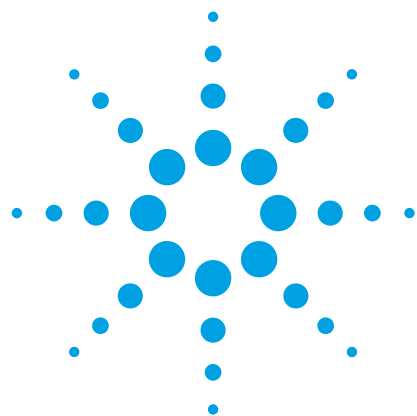




采用 Agilent Poroshell 120 EC-CN 和 SB-C8 色谱柱及 USP 方法分析华法林钠片

应用简报

药物

作者

Anne Mack
安捷伦科技公司

摘要

按照美国药典 (USP) 华法林钠片分析方法测定华法林、华法林相关化合物 A 和对羟苯甲酸丙酯。与 USP 建议的 5 μm 色谱柱相比，使用表面多孔颗粒填料的 Agilent Poroshell 120 色谱柱可提高华法林钠片色谱纯度和含量测定分析。为了节约时间和溶剂，本文采用了 Poroshell 120 色谱柱并根据 USP 第 621 章的指导原则对各分析方法进行了调整。结果表明，经改进的表面多孔色谱柱分析方法可满足所有色谱系统要求。

前言

使用表面多孔颗粒填料的色谱柱来代替较大尺寸的 5 μm 全多孔颗粒填料的色谱柱具有重要意义。表面多孔颗粒填料的色谱柱的分离效率与亚 2 μm 全多孔颗粒填料的色谱柱的分离效率相当。这主要是由于表面多孔颗粒填料的色谱柱具有较短的传质距离和更窄的粒径分布。此外，较大的粒径可产生较低的背压，因此可使色谱柱应用于几乎任何液相系统的分析方法中。将较大粒径填料的色谱柱改为表面多孔颗粒填料的色谱柱后，可显著节约时间和成本，因为表面多孔颗粒填料的色谱柱可在更快的流速下实现最佳运行并且与柱长短得多的色谱柱的分离度相当 [1,2]。

本应用简报描述了 USP 中两种可用于分析华法林钠片的方法，在这两种方法中，USP 建议的 5 μm 色谱柱由较短的 2.7 μm 表面多孔颗粒填料的 Agilent Poroshell 120 色谱柱代替。各分析方法的结果均参照 USP 色谱系统要求以确保色谱柱符合分析要求。结果表明，调整后的分析方法符合 USP 第 621 章的允许范围。



Agilent Technologies

材料与方法

采用配有内径 0.075 mm 短毛细管柱的安捷伦超低扩散工具包（部件号 5067-5189）和安捷伦液相系统支架（部件号 5001-3726），可通过对仪器安装进行优化来获得尽可能低的柱外体积 [3]。分析方法的色谱参数与 USP 方法中指定的参数相同。

华法林和对羧基苯甲酸丙酯购自 Sigma-Aldrich 公司；华法林相关化合物 A 购自 USP。乙腈购自 Honeywell International Inc；实验用水由 18 Mohm.cm Milli-Q 制得。

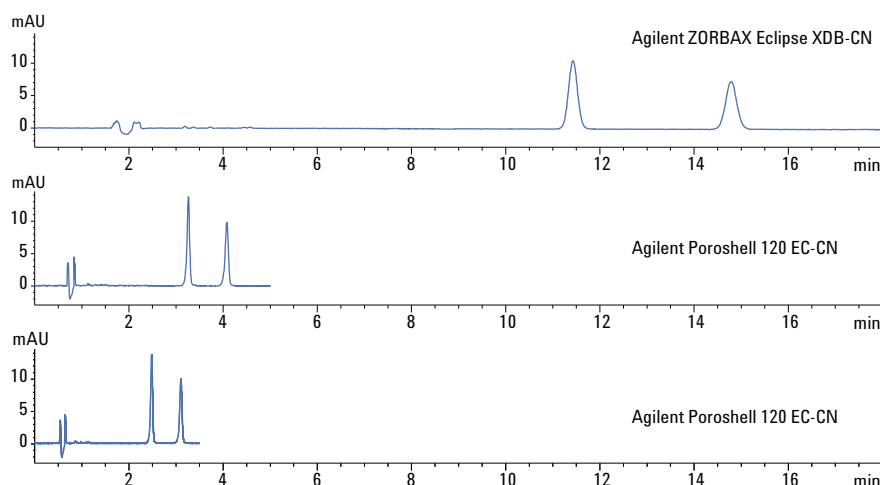
结果与讨论

USP 华法林钠片分析方法测定色谱纯度

图 1 显示了对华法林钠片的 USP 色谱纯度分析测定的色谱图。最上方的色谱图是使用 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱（L10 填料），即 ZORBAX Eclipse XDB-CN 色谱柱和 USP 华法林钠片分析方法测定色谱纯度的色谱图。两种化合物可在大约 16 min 内得到分离。

洗脱顺序

1. 华法林 ($6 \mu\text{g/mL}$)
2. 华法林相关化合物 A ($6 \mu\text{g/mL}$)



色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-CN, 3.0×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 695975-305)
Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ (部件号 990967-905)

样品: 华法林 ($6 \mu\text{g/mL}$), 华法林相关化合物 A ($6 \mu\text{g/mL}$)

流动相: A = 0.1% 的醋酸水溶液
B = 甲醇

进样体积: 4.6×250 mm 色谱柱, $20 \mu\text{L}$
 3.0×100 mm 色谱柱, $3.5 \mu\text{L}$

流速: 4.6×250 mm 色谱柱, 1.5 mL/min
 3.0×100 mm 色谱柱, 0.64 mL/min 或 0.85 mL/min

等度条件: 32% B

柱温: 25°C

检测器: 260 nm

仪器: Agilent 1290 Infinity 液相色谱

图 1. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-CN 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-CN 色谱柱通过 USP 对华法林钠片进行色谱纯度分析所得的色谱图。最下方色谱图显示使用 Agilent Poroshell 120 EC-CN 色谱柱并在最佳流速下运行的结果

根据 USP 第 621 章指导原则，用 3.0×100 mm, $2.7\ \mu\text{m}$ Agilent Poroshell 120 EC-CN 色谱柱来代替 4.6×250 mm, $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱，所得色谱图见图 1 中间位置谱图。最下方为使用相同的 Poroshell 120 EC-CN 色谱柱在最佳流速下运行的色谱图，化合物在 3 min 内实现了理想分离。

USP 色谱系统要求和图 1 所示每个谱图所测得的结果可见表 1。结果表明，不仅 $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱符合 USP 色谱系统要求， $2.7\ \mu\text{m}$ Poroshell 120 色谱柱也符合。此外，与原方法相比，在最佳流速下运行 Poroshell 120 色谱柱可显著减少分析时间和溶剂、提高工作效率，同时可节省分析成本。

表 1. USP 中色谱系统要求和华法林钠片色谱纯度的测定结果（W 代表华法林，A 代表华法林相关化合物 A）

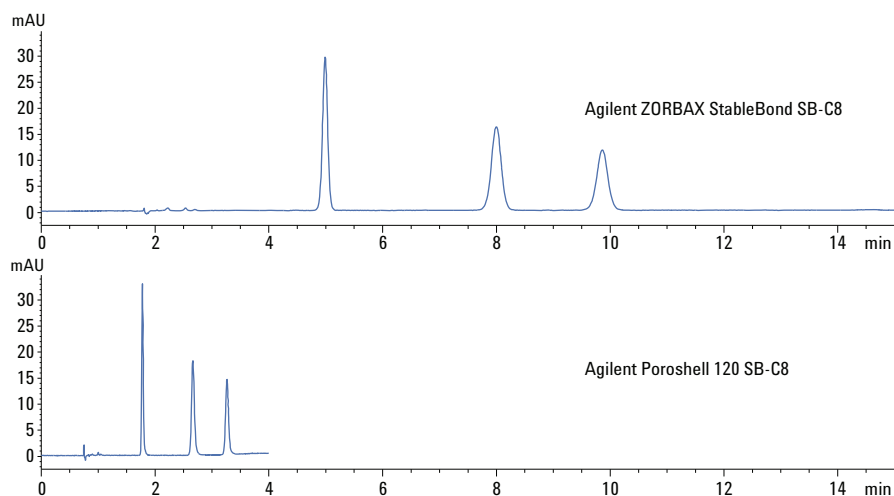
USP 色谱系统要求	$5\ \mu\text{m}$ (1.5 mL/min)	$2.7\ \mu\text{m}$ (0.64 mL/min)	$2.7\ \mu\text{m}$ (0.85 mL/min)
华法林和华法林相关化合物 A 的分离度不低于 3	分离度 (W,A): 8.3	分离度 (W,A): 7.1	分离度 (W,A): 7.1
重复进样的 RSD 不超过 5.0%	W: 0.10% A: 0.10%	W: 0.10% A: 0.10%	W: 0.94% A: 0.10%
华法林和华法林相关化合物 A 的相对保留时间分别为 1.0 和约 1.2	W: 1.0 A: 1.3	W: 1.0 A: 1.3	W: 1.0 A: 1.3

华法林钠片的 USP 含量测定分析

图 2 显示了使用 USP 对华法林钠片进行含量测定分析的色谱图，内标为对羟基苯甲酸丙酯。最上方为使用 USP 建议的 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ L7 (ZORBAX StableBond SB-C8) 色谱柱分析所得的色谱图。最下方为使用 4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ Poroshell 120 SB-C8 色谱柱所得的色谱图。本实验中，由于压力限度的限制，使用 Poroshell 120 色谱柱无法在最佳流速下进行运行。但是 3 个化合物仍可在 3.5 min 内实现分离，而原方法需 10 min。

洗脱顺序

1. 对羟基苯甲酸丙酯 ($10 \mu\text{g/mL}$)
2. 华法林 ($5 \mu\text{g/mL}$)
3. 华法林相关化合物 A ($5 \mu\text{g/mL}$)



色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 SB-C8, 4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 685975-906)
Agilent ZORBAX StableBond SB-C8, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ (部件号 880975-906)

样品: 华法林 ($5 \mu\text{g/mL}$)、华法林相关化合物 A ($5 \mu\text{g/mL}$) 和对羟基苯甲酸丙酯 ($10 \mu\text{g/mL}$)

流动相: A = 0.1% 醋酸水溶液
B = 甲醇

进样体积: 4.6×250 mm 色谱柱, $15 \mu\text{L}$
 4.6×100 mm 色谱柱, $5 \mu\text{L}$

流速: 1.4 mL/min

等度条件: 64% B

柱温: 30°C

检测器: 280 nm

仪器: Agilent 1290 Infinity 液相色谱

图 2. 采用 Agilent ZORBAX StableBond SB-C8 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 SB-C8 色谱柱通过 USP 对华法林钠片进行含量测定分析

所得色谱图的显示结果均符合 USP 色谱系统要求，见表 2。因此，为节约成本和提高工作效率，可用表面多孔填料的 Poroshell 120 色谱柱代替传统的 5 μm 色谱柱。

表 2. USP 色谱系统要求和华法林钠片含量的测定结果（P 代表对羟苯甲酸丙酯，W 代表华法林，A 代表华法林相关化合物 A）

USP 色谱系统要求	5 μm (1.4 mL/min)	2.7 μm (1.4 mL/min)
对羟苯甲酸丙酯和华法林的相对保留时间分别为约 0.75 和 1.0	P: 0.63 W: 1.0	P: 0.67 W: 1.0
对羟苯甲酸丙酯和华法林的分离度不低于 2.0	分离度 (P,W): 12.0	分离度 (P,W): 12.5
重复进样的 RSD 不超过 2.0%	P: 0.26% W: 0.26% A: 0.16%	P: 0.10% W: 0.73% A: 0.97%

结论

使用表面多孔填料的 Agilent Poroshell 120 色谱柱代替传统的 5 μm 色谱柱，按照 USP 对华法林钠片进行含量测定并分析其色谱纯度。用较小尺寸的表面多孔填料的 Agilent Poroshell 120 色谱柱代替传统的较大尺寸的 5 μm 色谱柱，可以满足 USP 的规定，同时提高了工作效率、节省了分析时间和成本。

参考文献

1. A. Gratzfeld-Hüsgen, E. Naegele. “使用 Agilent Poroshell 120 色谱柱最大限度地提高柱效,” 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5990-5602CHCN (2010)

2. V. R. Meyer. *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Fourth Ed., p. 34. Wiley (2004).

3. A. Mack. “通过改善安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散性能, 实现安捷伦 BORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能的最大化,” 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5990-9502CHCN (2011)

更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息, 请访问我们的网站: www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2013
中国印刷
2013 年 1 月 3 日
5991-1686CHCN



Agilent Technologies