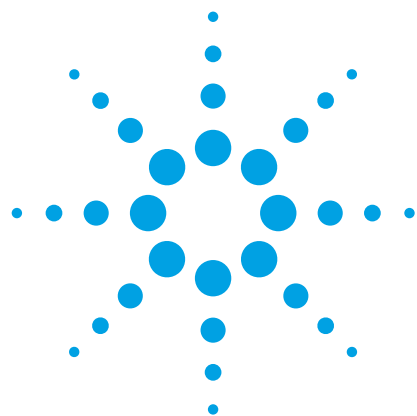




使用 Poroshell 120 PFP 色谱柱开发适用于分析紫杉醇中 USP 相关化合物的方法

应用简报

临床研究

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

采用表面多孔型 Agilent Poroshell 120 PFP 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱运行一种用于分析紫杉醇中 USP 相关化合物的分析方法。本研究采用美国药典介绍的检测紫杉醇中相关化合物的方法。将该分析方法转移至 3.0 × 100 mm, 2.7 μm Poroshell 120 PFP 色谱柱后, 可节省大量的溶剂和时间。两种色谱柱均满足所有系统适用性要求。

前言

紫杉醇 (Paclitaxel) 是一种药物, 也称 Taxol 和 Onxol, 1967 年首次从太平洋紫杉 (短叶红豆杉) 的树皮中分离出来。20 世纪 90 年代以后, 采用合成方法和植物细胞发酵技术进行生产。美国药典 (USP) 中介绍了三种用于相关化合物分析的 HPLC 方法, 分别基于不同的紫杉醇来源。对天然来源的紫杉醇中相关化合物的分析采用 PFP 色谱柱 [1]。

Agilent Poroshell 120 PFP (五氟苯基) 固定相可以为卤代化合物的位置异构体提供卓越的保留时间和选择性。这些 PFP 色谱柱还可以用于非卤代化合物的选择性分析, 如含羟基、羧基、硝基和其他极性基团的极性化合物。当官能团处于芳香或其他刚性环状系统上时, 色谱柱选择性会增强 [2]。



Agilent Technologies

本研究介绍了一种利用 4 μm Poroshell 120 PFP 色谱柱开发的 USP 相关化合物分析方法转移至 2.7 μm Poroshell 120 PFP 色谱柱上的性能。该方法转移能够节省大量时间和溶剂。

材料与方法

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。标准品购自 USP。冰乙酸、甲醇和乙腈购自北京百灵威科技有限公司。根据 USP 的紫杉醇专论章节所述的方法配制标样和分析溶液。采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行 HPLC 分析，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)

色谱柱

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 μm (部件号 689975-902)
- Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 $\times$ 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-308)
- Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 $\times$ 250 mm, 4 μm (部件号 690970-408)

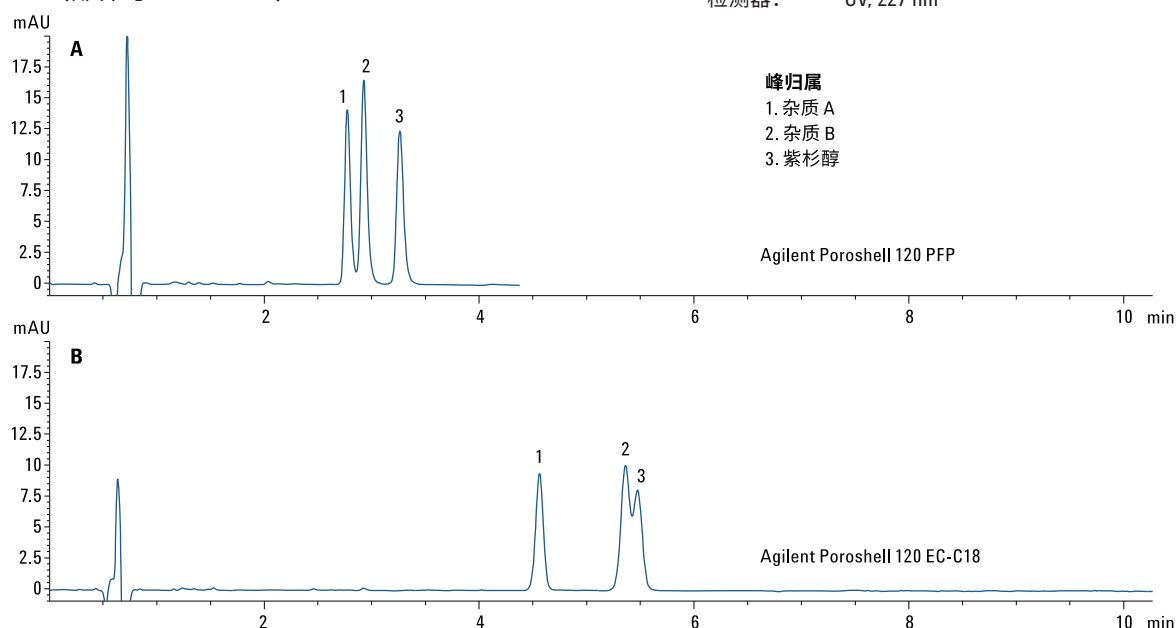


图 1. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP 和 EC-C18 色谱柱分离紫杉醇及其杂质的选择性比较

结果与讨论

选择性比较

Poroshell 120 PFP 固定相可以为卤代化合物的位置异构体提供卓越的保留时间和选择性。在之前的一份简报中，利用该色谱柱成功分离了拉帕替尼中的同分异构体 [4]。PFP 色谱柱还可用于非卤代化合物的选择性分析，尤其是用于分析芳香或其他刚性环状系统上的官能团。紫杉醇及其杂质是此类化合物的代表，在 Poroshell 120 PFP 和 EC-C18 色谱柱上得以分离 (图 1)。两种色谱柱表现出不同的选择性。PFP 色谱柱具有较短的保留时间，但是在杂质和紫杉醇之间具有良好的分离度。相反，EC-C18 色谱柱具有较长的保留时间，却无法完全分离杂质 B 和紫杉醇。

条件

色谱柱:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 μm (部件号 689975-902) Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 $\times$ 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-308)
样品:	紫杉醇、杂质 A 和杂质 B，溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
流动相:	水:乙腈 (55:45)
柱温:	30 $^{\circ}\text{C}$
流速:	4.6 $\times$ 100 mm 色谱柱为 1.5 mL/min 3.0 $\times$ 100 mm 色谱柱为 0.64 mL/min
进样量:	4.6 $\times$ 100 mm 色谱柱为 4 μL , 3.0 $\times$ 100 mm 色谱柱为 2 μL
检测器:	UV, 227 nm

系统适用性测试

USP 中包括用于标记为天然来源的紫杉醇的测试 1。用于分析紫杉醇中相关化合物的色谱条件要求“液相色谱仪配备 227 nm 检测器，并使用 5 μm 填料 L43 的 4.6 mm × 25 cm 色谱柱” [1]。

在该实验中，我们首先在 USP 方法中规定的液相色谱条件下使用 Poroshell 120 PFP, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱。图 2 示出在该色谱柱上分析相关化合物的系统适用性分析结果。色谱图表明杂质 A 和杂质 B、杂质 B 和紫杉醇之间获得了足够高的分离度，满足系统适用性要求（如表 1 所列）。

条件

- 色谱柱：Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 × 250 mm, 4 μm
(部件号 690970-408)
- 样品：紫杉醇、杂质 A 和杂质 B，溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
- 流动相：A：水
B：乙腈；0-35 min, 35% A；35-60 min, 35% A-80% A；
60-70 min, 80% A-35% A；70-80 min, 35% A
- 柱温：30 °C
- 流速：2.6 mL/min
- 进样量：10 μL
- 检测器：UV, 227 nm

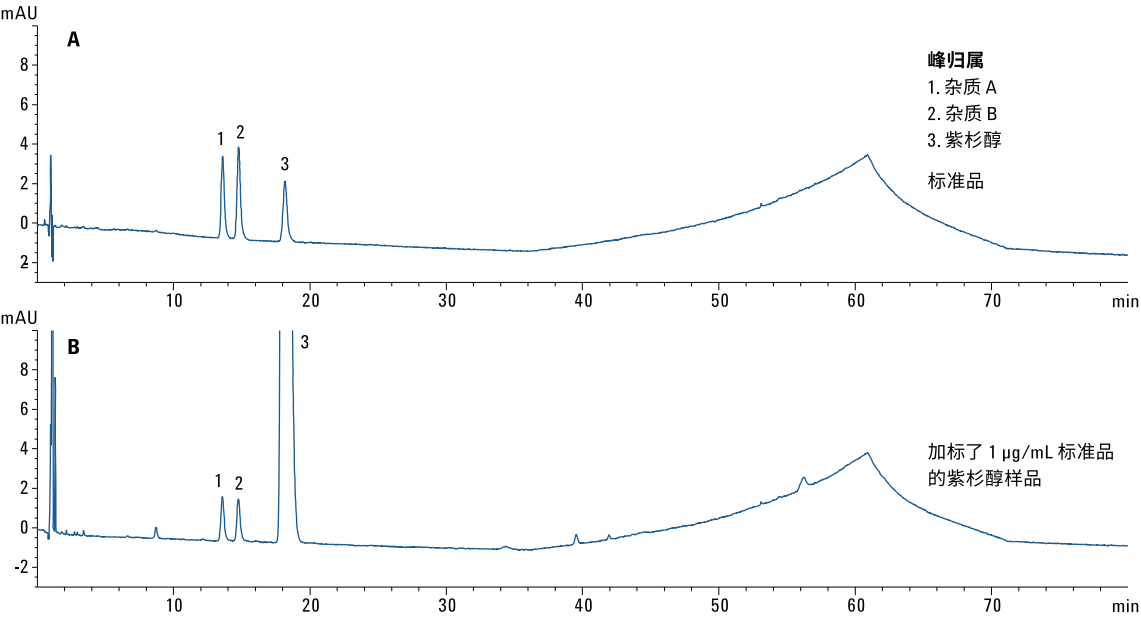


图 2. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱获得的紫杉醇标准品和加标样品的色谱图

表 1. 紫杉醇中相关化合物的 USP 色谱系统适用性要求及测定值

USP 要求	Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 × 254 mm, 4 μm	Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm
紫杉醇相关化合物 A 的相对保留时间约为 0.78， 紫杉醇相关化合物 B 的相对保留时间为 0.86	T _R A = 0.75 T _R B = 0.81	T _R A = 0.75 T _R B = 0.81
紫杉醇相关化合物 A 与紫杉醇相关化合物 B 之间的分离度 R 不小于 1.0	Rs _{1,2} = 2.7	Rs _{1,2} = 2.2
重复进样的相对标准偏差 不大于 2.0%	RSD = 0.78%	RSD1 = 0.59%

方法转移

将分析方法转移至 Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱 (图 3)。分析时间由原色谱柱的 80 分钟缩短至 32 分钟。杂质 A 与杂质 B 的分离度为 2.2, 与采用 4.6 × 250 mm 色谱柱获得的分离度 2.7 相当。窄径色谱柱显著节省了时间和溶剂, 同时仍可提供满足 USP 系统适用性要求的结果。根据 USP 所述紫杉醇中相关化合物的分析方法, 使用两种色谱柱测定了 USP 色谱系统适用性要求。表 1 列出了 USP 系统要求以及在色谱柱上测得的结果。由表可知, 在色谱柱上运行的方法完全满足 USP 色谱系统要求。

条件

色谱柱:	Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-308)
样品:	紫杉醇、杂质 A 和杂质 B, 溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
流动相:	A: 水 B: 乙腈; 0-14 min, 35% A; 14-24 min, 35% A-80% A; 24-28 min, 80% A-35% A; 28-32 min, 35% A
柱温:	30 °C
流速:	1.1 mL/min
进样量:	2 μL
检测器:	UV, 227 nm

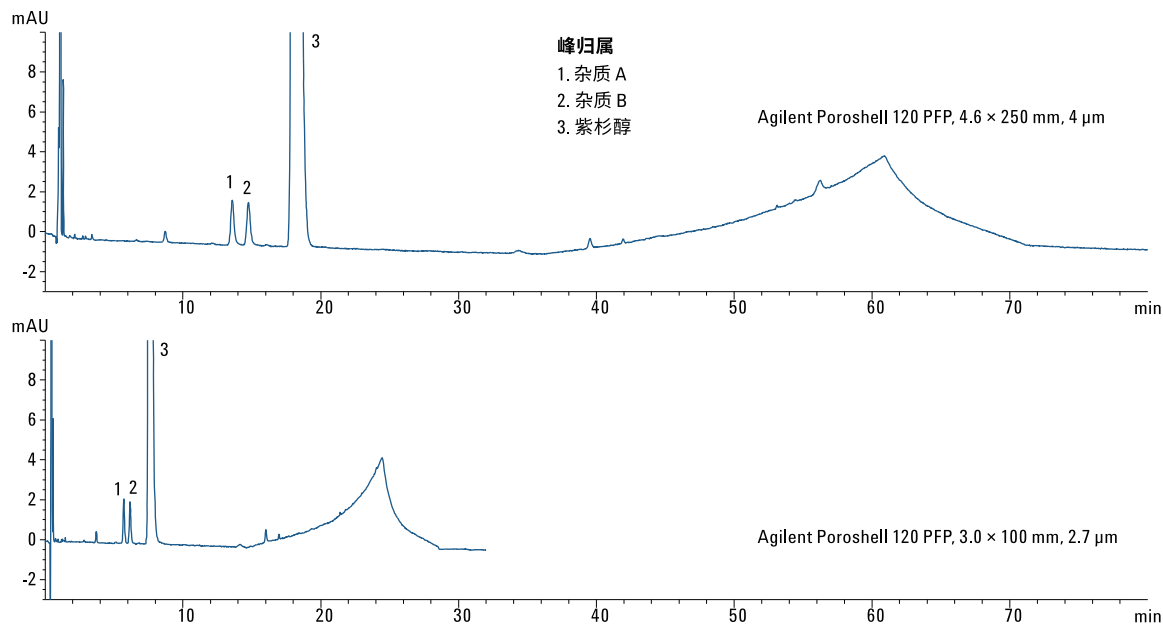


图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 × 250 mm, 4 μm 色谱柱和 3.0 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱获得的紫杉醇加标样品色谱图

根据 2014 年 8 月 1 日以后实施的 USP37 NF32S1 指南要求，不允许改变梯度分离的柱长、色谱柱内径和填料粒径。因此，为实现 Poroshell 120 PFP 色谱柱的分离速度和分离度优势，需要进行一些方法开发工作，并需要对多个实验参数进行测试。这些参数包括稳定性、线性、准确度、精密度、检测限、定量限、分析特异性/选择性、范围和耐用性。方法开发过程在此前的一份安捷伦应用简报中进行了详细介绍 [4]。

结论

本应用简报表明 Agilent Poroshell 120 PFP, 4 μm 色谱柱适用于紫杉醇中 USP 相关化合物的分析，该分析采用 USP 方法条件。通过方法改进，采用窄径 3.0 $\times$ 100 mm 色谱柱能够使分析时间缩短 60%，并节省大量溶剂。

参考文献

1. Anon. USP Paclitaxel, United States Pharmacopeia 35 NF 30. United States Pharmacopeia, Rockville, MD, USA
2. Long, W; Horton, J. 采用 Agilent Poroshell 120 PFP 色谱柱分析位置异构体，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-4373CHCN，**2014**
3. Rongjie Fu, Linhai Zhang. *Analysis of Positional Isomers in Lapatinib with Agilent Poroshell 120 PFP Columns* (采用 Agilent Poroshell 120 PFP 色谱柱分析拉帕替尼的位置异构体)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-5262EN，**2014**
4. Long, W.; Brooks, A.; Yun Zou. *Improved Simvastatin Analysis Using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm , 3.5 μm and 1.8 μm Columns* (采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm , 3.5 μm 和 1.8 μm 色谱柱改善对辛伐他汀的分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-3883EN，**2009**

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2017

2017 年 3 月 1 日，中国出版

5991-6283CHCN



Agilent Technologies