

使用 Agilent GPC/SEC 软件计算中国药典中所述肝素钠和右旋糖酐的分子量

应用简报

制药行业

作者

左夏龙

安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文建立了肝素钠和右旋糖酐药物的分子量测定方法，分别使用 Agilent Bio SEC 和 Aquagel-OH 色谱柱进行分离，以水相流动相进行洗脱，选用示差检测器进行检测，采用 Agilent GPC/SEC 软件进行计算。本文使用宽分布标样校正方法建立校正曲线，用于肝素钠分子量计算，并得到分子量大于 24000、分子量 16000 - 24000、分子量 8000 - 16000 范围内级分的百分含量；使用窄分布标样校正方法建立校正曲线，用于右旋糖酐分子量计算，得到 10% 大/小分子部分重均分子量。Agilent GPC/SEC 软件使得计算过程简单、快捷。本文所述方法满足中国药典中对分子量计算的所有要求。

前言

体积排阻色谱 (GPC) 计算聚合物分子量和分子量分布通常采用三种方法^[1]。方法一：使用分子量已知的标样建立保留时间与分子量的校正曲线，然后使用校正曲线对未知样品进行分子量计算。方法二：联用粘度检测器与浓度型检测器，采用普适校正原理计算未知样品的分子量。方法三：联用光散射检测器与浓度型检测器，根据散射原理直接计算分子量。其中，方法一对于仪器要求最低且操作最简单，被广泛使用。方法一中，建立校正曲线也有多种方式，可以通过一组窄分布标样建立校正曲线，也可以通过宽分布标样建立校正曲线。



Agilent Technologies

2015 年版《中国药典》中对于肝素钠^[2] 采用的便是宽分布标样校正方法，准确计算对照品溶液色谱图中肝素峰的总面积（不包括盐峰）及每个点的累积峰面积百分比，确定与肝素分子量对照品附带的宽分布标样表中累积峰面积百分比最接近点的保留时间及对应分子量，以保留时间对分子量的对数值做校正曲线。而对于右旋糖酐^[3] 采用的是窄分布标样校正方法，取 4 - 5 个已知分子量的右旋糖酐对照品，由 GPC 软件计算回归方程。2015 年版《中国药典》要求肝素钠的重均分子量应为 15000 - 19000，分子量大于 24000 的级分不得大于 20%，分子量 8000 - 16000 的级分与分子量 16000 - 24000 的级分比应不小于 1.0。对于右旋糖酐，以右旋糖酐 40 为例，要求以葡萄糖峰计算的理论塔板数不小于 5000；10% 大分子部分重均分子量不得大于 120000，10% 小分子部分重均分子量不得小于 5000。这些校正曲线的建立和样品分子量的计算均可以在 Agilent GPC/SEC 软件 (A.02.01) 中完成。

实验部分

试剂和样品

肝素钠对照品使用 USP 标准品。葡萄糖、葡萄糖 2000、右旋糖酐对照品来自中药标准对照品研究中心。新制超纯水产自 Millipore 纯水机。醋酸铵购自迪马公司、硫酸钠购自 Acros 公司。

仪器和设备

实验采用配有示差折光检测器的 Agilent 1260 Infinity GPC/SEC 系统（单元泵/四元泵）对肝素钠和右旋糖酐进行分离和分析。软件采用 Agilent GPC/SEC 软件 (A.02.01)。

色谱条件

肝素钠

色谱柱: Agilent Bio SEC-5 500A, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 部件号 5190-2531

Agilent Bio SEC-5 300A, 7.8 × 300 mm, 5 μm, 部件号 5190-2526

洗脱液: 0.1 mol/L 醋酸铵溶液

流速: 0.6 mL/min

进样体积: 25 μL

右旋糖酐 40

色谱柱: Agilent PL aquagel-OH MIXED-M, 7.5 × 300 mm, 8 μm, 部件号 PL1149-6801

洗脱液: 0.71% 硫酸钠溶液

流速: 0.5 mL/min

进样体积: 20 μL

结果与讨论

肝素钠宽分布标样校正及分子量区间百分含量计算设置

对标样谱图（图 1）进行基线选择和色谱峰积分。在方法编辑中（图 2），选择“Broad Integral”（积分表宽峰校正），点击“Setup”，在弹出的表中（图 3）按照标样说明书输入累积峰面积百分比和对应的分子量，即可完成校正曲线的建立。

计算特定分子量区间含量百分比。在“MW Ranges”中（图 4）输入需要计算的分子量区间，最大的以“M⁺”替代，最小的以“M⁻”替代，根据药典要求填入分子量区间 M⁺ - 24000、24000 - 16000、16000 - 8000。在计算结果报告中即会生成相对应的结果，如图 5 所示。

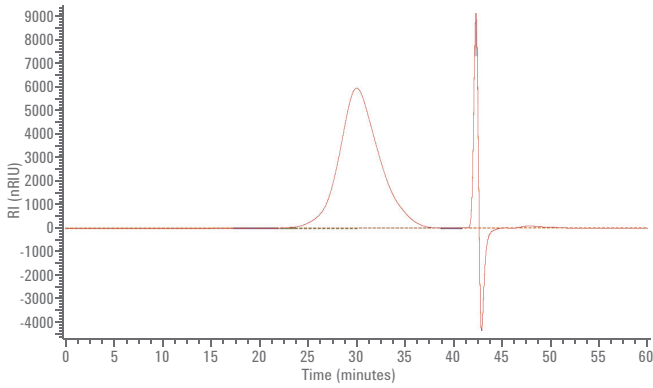


图 1. 肝素钠宽分布标样的示差折光检测器谱图

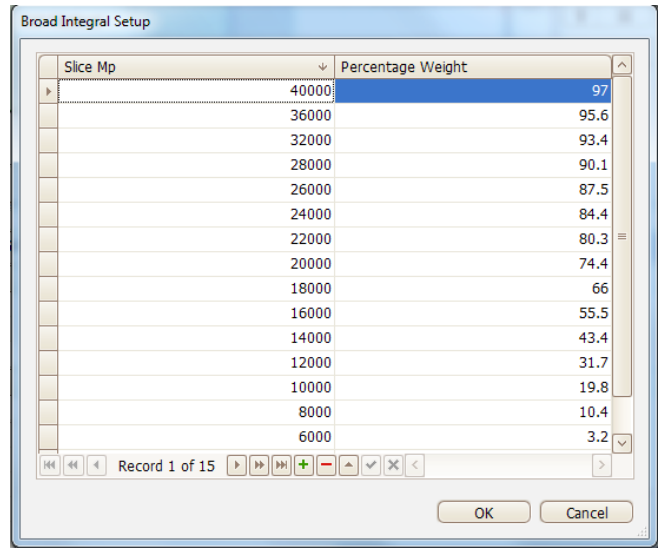


图 3. 方法编辑中宽分布标样校正的设置

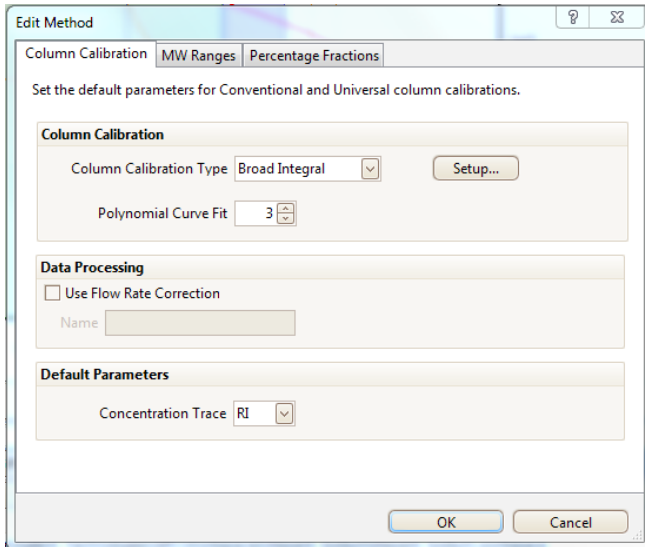


图 2. 方法编辑中校正曲线的设置

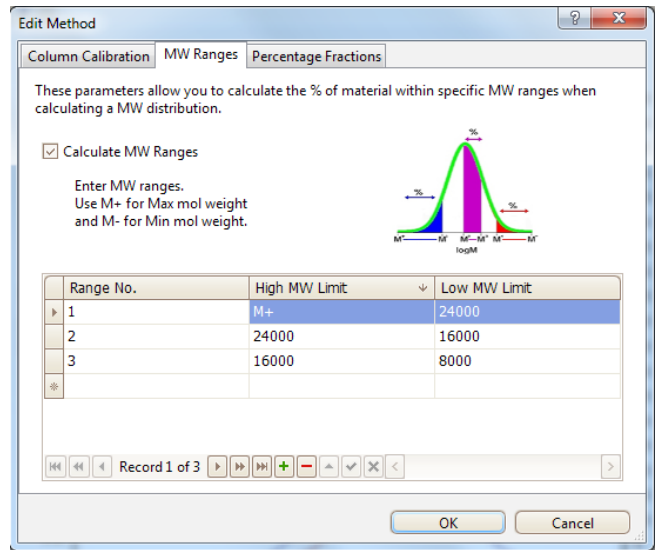


图 4. 分子量区间百分含量计算的设置

Results

Analysed by

xialozuo at 2:41:36 PM on Friday, April 08, 2016

Comments

Molecular Weight Averages

Peak	Mp (g/mol)	Win (g/mol)	Mw (g/mol)	Mz (g/mol)	Mz+1 (g/mol)	Mv (g/mol)	PD
Peak 1	15824	13715	15817	18229	21348	17829	1.153

MW Ranges Calculated

Peak Number	High Limit MW	Low Limit MW	Percent MW
1	74275	24000	7.96
1	24000	16000	34.59
1	16000	8000	51.44

Peak Information

	Start (mins)	End (mins)
Baseline region 1	17.33040	21.87360
Baseline region 2	38.70000	40.86720
Peak 1	22.16160	38.70000

Peak Trace Information

Peak	Trace	Peak Max RT (mins)	Peak Area (mV.s)	Peak Height (mV)
Peak 1	RI	29.99520	1698690.233	5920.411

图 5. 分子量区间百分含量计算的结果报告

右旋糖酐大分子量和小分子量级分区间的重均分子量计算的设置

使用葡萄糖谱图计算理论塔板数，如图 6 所示。使用已知分子量对照品建立校正曲线，在“Percentage Fractions”中（图 7）输入需要计算的大分子量级分区间和小分子量级分区间，根据药典要求，分别在大分子量级分区间和小分子量级分区间输入“10%”，即可在结果报告中计算出这两个级分的平均分子量，如图 8 所示。

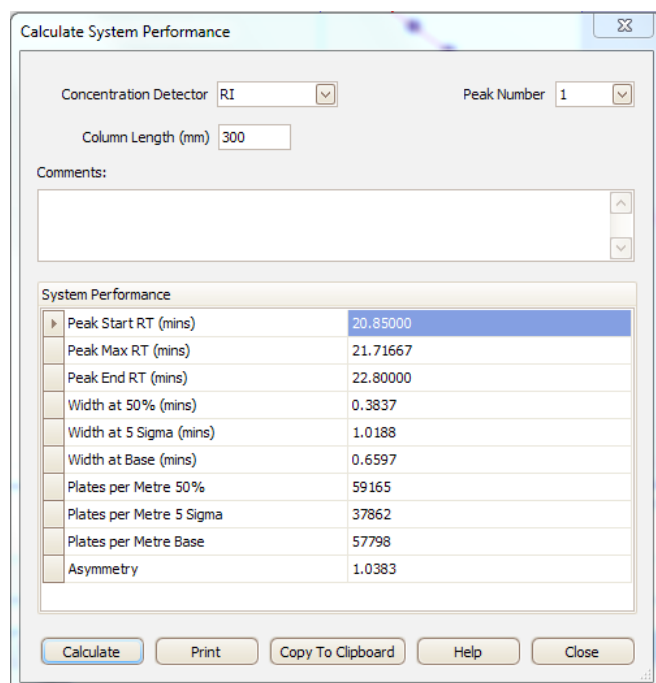


图 6. 使用 Agilent GPC/SEC 软件计算理论塔板数

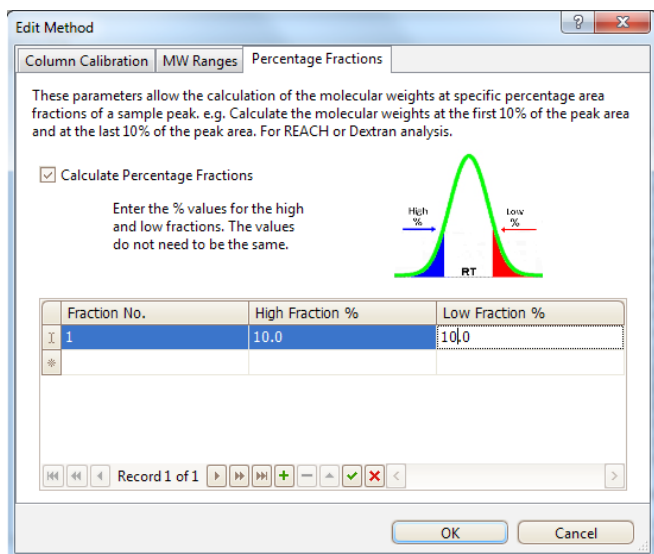


图 7. 大分子量级分区间、小分子量级分区间的设置

Results

Analysed by xialozuo at 2:36:53 PM on Monday, April 25, 2016

Comments

Molecular Weight Averages

Peak	Mp (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	Mz (g/mol)	Mz+1 (g/mol)	Mv (g/mol)	PD
Peak 1	26743	17381	35728	64676	132952	58810	2.056

High Percentage Fractions

Peak Number	Fraction Percent	Fraction Retention Time (mins)	MW at Fraction (g/mol)	Fraction Mn (g/mol)	Fraction Mw (g/mol)
1	10.0	16.67015	69342	104315	129254

Low Percentage Fractions

Peak Number	Fraction Percent	Fraction Retention Time (mins)	MW at Fraction (g/mol)	Fraction Mn (g/mol)	Fraction Mw (g/mol)
1	10.0	19.31674	8972	5665	6512

图 8. 大分子量级分区间和小分子量级分区间的分子量计算的结果报告

结论

Agilent GPC/SEC 软件 (A.02.01) 具有强大的分子量计算功能, 可以满足 2015 年版《中国药典》中肝素钠和右旋糖酐的各项分子量计算要求, 包括系统适用性实验的理论塔板数计算; 窄分布标样法、宽分布标样法建立校正曲线; 平均分子量计算中的数均分子量、重均分子量、Z 均分子量、粘均分子量等的计算; 指定分子量区间的百分含量计算, 以及指定的大分子量级分和小分子量级分的平均分子量计算等。

参考文献

- 1 5990-8844CHCN 安捷伦 GPC/SEC 解决方案
- 2 中华人民共和国药典-2015 年版二部, 517
- 3 中华人民共和国药典-2015 年版二部, 170

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

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2016

2016年06月01日, 中国印刷

5991-7012CHCN



Agilent Technologies