

利用Alliance™ iS HPLC System根据USP各论分析阿托伐他汀

Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

阿托伐他汀含量分析的USP各论要求在峰面积/保留时间精密度、峰拖尾和分离度方面遵守严格的标准。具体而言，各论中要求阿托伐他汀多次进样（3~6次）的峰面积和保留时间的相对标准差(RSD)小于0.6%。本研究实施了几种策略来满足规定的USP各论标准。这些措施包括：流动相储液瓶使用低蒸发瓶盖；样品瓶盖使用未预切割的隔垫；自动进样器中的样品温度控制在10 °C。这些预防措施与Alliance iS HPLC System配合使用。结果表明，阿托伐他汀及其相关化合物获得了非常一致的峰面积和保留时间。值得注意的是，在六次重复进样中，阿托伐他汀的峰面积和保留时间%RSD分别为0.4和0.1。

优势

- 利用Alliance iS HPLC System可获得高度一致的阿托伐他汀峰面积和保留时间
 - 流速、样品温度和柱温控制能力出色
 - 在流动相中使用挥发性溶剂时，ACQUITY™ APC储液瓶盖的低蒸发特性能够降低蒸发风险
-

简介

阿托伐他汀是一种广泛使用的他汀类处方药物，用于降低胆固醇水平和减少罹患心血管疾病的风险^{1,2}。为确保该药物的安全性和有效性，需使用高效液相色谱(HPLC)等技术分析阿托伐他汀及其相关化合物^{3,4}。USP各论中关于使用HPLC分析阿托伐他汀的方法要求对方法中的各个方面进行严格控制，包括流动相和样品前处理⁵。各论中所规定的条件使方法难以满足系统适应性标准。样品和流动相中的挥发性组分可能在分析过程中蒸发，导致峰面积和保留时间发生变化。即使色谱柱和仪器正常运行，也可能导致方法无法满足系统适应性。具有挑战性的具体条件包括：使用高挥发性样品稀释剂（1:1:2乙腈:四氢呋喃(THF):水），流动相中含有挥发性组分(THF 12%)，以及分析时间较长（两小时）。

之前，我们进行了全面的调查来评估这些条件对满足系统适应性标准的影响⁶。研究发现，样品前处理和流动相组分的影响可以通过实施两项措施得到有效控制。首先，重复进样不应使用单个样品瓶，而应使用多个样品瓶。其次，为流动相储液瓶采用低蒸气压储液瓶盖是有益的。这些措施有助于减轻样品前处理和流动相组分的影响，改善分析的可控性和重现性。本研究将展示依据USP各论使用Alliance iS HPLC System进行的阿托伐他汀分析。图1展示了本研究中使用的阿托伐他汀及其相关化合物的化学结构。

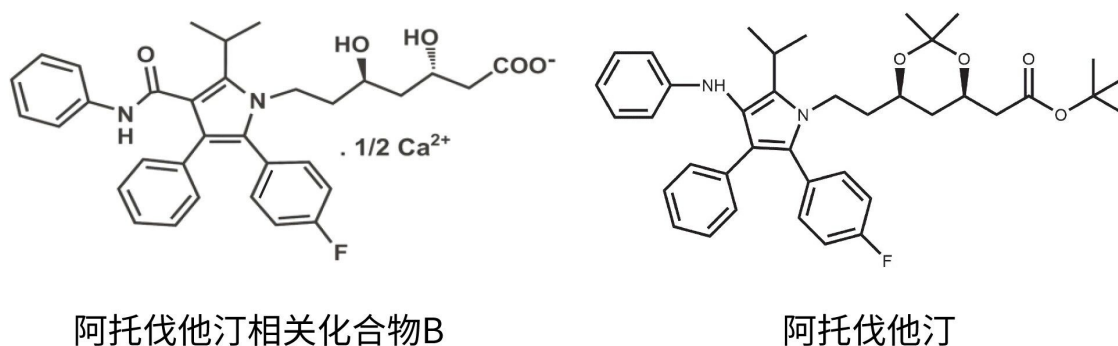


图1.本研究中使用的阿托伐他汀及其相关化合物的化学结构。

实验

参比物质和标准品制备

样品前处理依据USP各论进行⁵。阿托伐他汀和阿托伐他汀相关化合物B的参比标准品均购自USP（马里兰州罗克维尔）。稀释剂的制备方法是将乙腈、不含稳定剂的四氢呋喃和水按1:1:2的比例混合。所有样品均在临分析前制

备。将阿托伐他汀钙和阿托伐他汀相关化合物B溶于稀释剂中，制得最终浓度分别为0.05 mg/mL和0.06 mg/mL的系统适应性标准品。将特定体积(300 μ L)的标准品分装到带预切割和未预切割螺口盖的最大回收样品瓶中。

LC方法条件:

色谱柱详细信息	ZORBAX™ Rx-C ₈ , 80Å, 4.6 × 250 mm, 5 μ m		
柱温	35 °C		
流动相A	乙腈, 无稳定剂THF, 缓冲液(21:12:67)		
流动相B	乙腈, 无稳定剂THF, 缓冲液(61:12:27)		
缓冲液	3.9 g/L乙酸铵水溶液(pH 5.0±0.1)		
流速	1.5 mL/min		
梯度曲线	时间 (min)	流动相A%	流动相B%
	0	100	0
	40	100	0
	70	20	80
	85	0	100
	100	0	100
	105	100	0
	115	100	0
检测器类型	TUV 滤波: 正常 数据采集速率: 10 Hz		
检测器波长	244 nm		
进样体积	20 μ L		
自动进样器针清洗溶剂	甲醇		
清洗溶剂	1:1:2乙腈/THF/水		
运行时间	115 min		
流动相瓶盖:	ACQUITY™ APC储液瓶盖(P/N: 205001152)		

数据管理

色谱软件	Empower 3.6 Feature Release 5
------	-------------------------------

结果与讨论

USP分析结果

根据USP各论中对阿托伐他汀含量分析的HPLC方法，分析运行时间超过两小时，且需要在流动相和样品稀释剂中使用挥发性有机溶剂。这些溶剂的挥发性会从两个方面影响分析的重复性。首先，流动相组分的不同蒸发速率会影响分析物的洗脱或保留时间。其次，样品稀释剂中的有机物蒸发会影响分析物的浓度和溶解度，这两个因素都可能影响系统适应性要求（表1）。因此，遵循之前推荐的步骤来减少这些蒸发问题并降低方法的差异性非常重要⁶。这些步骤包括，为溶剂瓶使用低蒸发瓶盖，以及使用各自封有未预切割瓶盖的单独样品瓶进行重复进样。此外，样品在自动进样器中保持10 °C的低温，以控制稀释剂的蒸发。采用上述步骤，阿托伐他汀的USP分析成功完成。具体而言，该分析符合USP标准（表1），包括峰面积和保留时间%RSD。图2展示了重复进样的叠加色谱图。值得一提的是，Alliance iS HPLC System采用在线计量装置来提高进样精度。该装置通过在采集过程中冲洗流路，可大幅减少气泡的形成⁷。

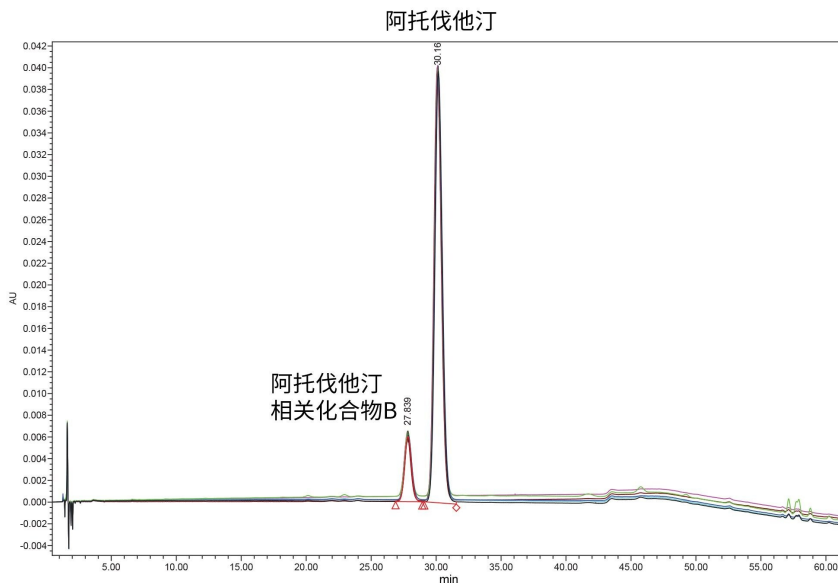


图2.系统适应性混合样品六次重复进样得到的叠加色谱图。每次进样均使用单独的样品瓶进行，每个样品瓶均使用未预切割的隔垫封盖。

	标准	结果
分离度	阿托伐他汀相关化合物B与阿托伐他汀系统适应性溶液峰之间不小于(NLT) 1.5	2.3
拖尾因子	不超过(NMT) 1.6%，标准品溶液	1.1
相对标准差	NMT 0.6%，标准品溶液	对于峰面积为0.4%， 对于保留时间为0.1%

表1.本研究中USP针对阿托伐他汀钙分析的系统适应性标准及实际结果。

未预切割隔垫与预切割隔垫的比较

为了评估不同类型的样品瓶瓶盖对蒸发的影响，研究中比较了使用未预切割瓶盖与预切割瓶盖进行重复进样获得的系统适应性结果。为此，从同一个使用未预切割隔垫瓶盖的样品瓶中进行六次重复进样。实验结果表明，与装有未预切割隔垫的单独样品瓶相比，峰面积的差异性要大得多。例如，如表2所示，使用加盖有预切割隔垫的同一样品瓶，六次重复进样的峰面积%RSD为1.0。这与使用未预切割隔垫进样的结果相比，偏差要大得多。这些结果表明，在处理挥发性样品稀释剂时，使用未预切割隔垫封盖且各自独立的样品瓶是一种非常有用的方法。

需要指出的是，在所有实验中均未观察到明显的保留时间漂移，这可能是由于流动相储液瓶上使用了低蒸发瓶盖(ACQUITY APC)。这类瓶盖经过专门设计，可减少储液瓶中溶剂的蒸发，并配有一个出口减压阀，可释放流动相储液瓶中积聚的压力。表2汇总了此实验的结果。

组分概要表
使用同一样品瓶进行六次进样
(预切割隔垫)

组分概要表
名称: 阿托伐他汀

	样品瓶	进样编号	RT	峰面积	峰高	USP分离度	USP分离度 (HH)	USP拖尾因子
1	1:B,8	1	30.21	1597638	39425	2.27	2.30	1.14
2	1:B,8	2	30.23	1619965	39908	2.26	2.30	1.14
3	1:B,8	3	30.27	1627260	40076	2.27	2.30	1.14
4	1:B,8	4	30.29	1629678	40162	2.27	2.30	1.14
5	1:B,8	5	30.32	1635760	40284	2.28	2.31	1.14
6	1:B,8	6	30.39	1642236	40384	2.28	2.31	1.14
平均值			30.28	1625422.869	40040.036	2.3	2.3	1.1
标准偏差			0.06	15574.292	343.261	0.0	0.0	0.0
% RSD			0.2	1.0	0.9	0.2	0.2	0.2

组分概要表
使用六个不同的样品瓶进行六次进样
(未预切割隔垫)

组分概要表
名称: 阿托伐他汀

	样品瓶	进样编号	RT	峰面积	峰高	USP分离度	USP分离度 (HH)	USP拖尾因子
1	1:B,2	1	30.097	1619285	39995	2.25	2.28	1.13
2	1:B,3	1	30.128	1614908	39748	2.25	2.28	1.13
3	1:B,4	1	30.156	1606862	39448	2.25	2.29	1.13
4	1:B,5	1	30.160	1611359	39762	2.25	2.28	1.13
5	1:B,6	1	30.160	1609817	39722	2.25	2.28	1.13
6	1:B,7	1	30.189	1598913	39310	2.25	2.28	1.13
平均值			30.148	1610190.667	39663.925	2.3	2.3	1.1
标准偏差			0.032	6996.15	245.658	0.0	0.0	0.0
% RSD			0.1	0.4	0.4	0.1	0.1	0.3

表2.阿托伐他汀标准品六次重复进样的数据。表格左侧的数据代表同一样品瓶中样品六次重复进样的结果。表格右侧显示了从六个单独的样品瓶（未预切割隔垫）进行六次重复进样的数据。

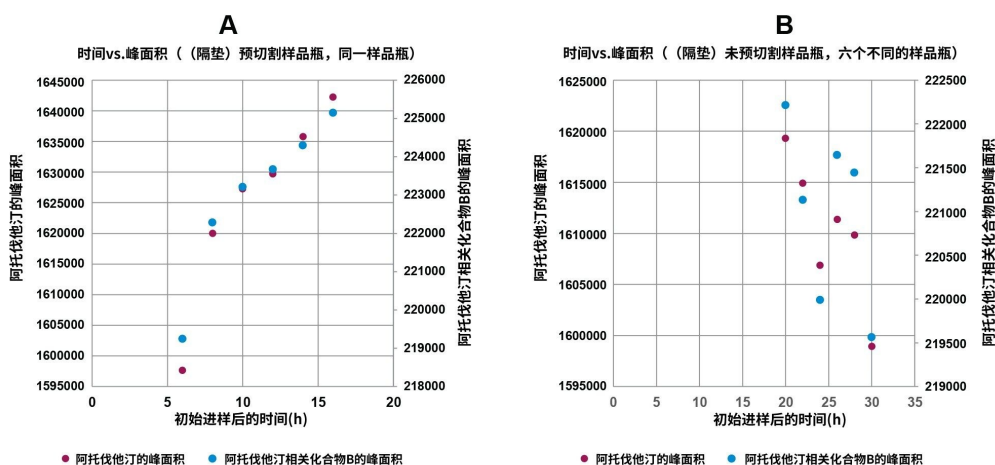


图3.阿托伐他汀及阿托伐他汀相关化合物B 30小时内的峰面积数据。A图展示了使用加盖预切割隔垫的单个样品瓶进行六次进样的数据，B图展示了加盖未预切割隔垫的六个不同样品瓶进行六次进样的数据。

图3展示了阿托伐他汀及其相关化合物B在30小时分析期间的峰面积趋势。数据表明，当使用预切割隔垫瓶盖时，两种分析物的峰面积逐渐增加，这可能是蒸发导致分析物浓度升高的缘故。相比之下，使用未预切割的样品瓶瓶盖时，未观察到明显的峰面积趋势，表明没有发生蒸发。需要注意的是，与使用预切割瓶盖的情况相比，使用未预切割瓶盖的不同样品瓶六次进样得到的峰面积分布在y轴上的值明显更小。

结论

- 这些结果表明，使用Alliance iS HPLC System对阿托伐他汀进行含量分析时，可获得一致的峰面积、保留时间、USP拖尾因子和分离度
- 使用低蒸发ACQUITY APC储液瓶盖可大幅减少流动相中挥发性有机溶剂的蒸发，从而获得非常一致的保留时间
- 对于溶解于挥发性稀释剂中的样品，使用多个配有未预切割隔垫的样品瓶是有益的。

参考资料

1. T. Funatsu, H. Kakuta, H. Tanaka, Y. Arai, K. Suzuki, K. Miyata, [Atorvastatin (Lipitor): A Review of its Pharmacological and Clinical Profile], *Nihon Yakurigaku Zasshi* 117(1) (2001) 65–76.
2. R. Chou, A. Cantor, T. Dana, J. Wagner, A.Y. Ahmed, R. Fu, M. Ferencik, Statin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force, *JAMA* 328(8) (2022) 754–771.
3. N. Jain, R. Raghuwanshi, D. Jain, Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in Tablet Dosage Forms, *Indian J Pharm Sci* 70(2) (2008) 263–5.
4. A.C. Kogawa, A.E.D.T. Pires, H.R.N. Salgado, Atorvastatin: A Review of Analytical Methods for Pharmaceutical Quality Control and Monitoring, *J. AOAC Int.* 102(3) (2019) 801–809.
5. USP Monograph, Atorvastatin Calcium, USP43-NF38, The United States Pharmacopeia Convention, official June 2023.
6. P.R.M. Paula Hong, Patricia R. McConville, USP Method Case Study Part I: Understanding the Impact of Sample Preparation and Mobile Phase Stability, Waters Corporation. Produced in the U.S.A. Waters Application Note [720006254](#), AG-PDF, April 2018.
7. Y.D. N. Wong, E. Pedanou, and P. Hong, Strategies for Improving Injection Precision with Challenging USP Monographs, Waters Poster [PSTR135120473](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135120473&lcid=135120472>> , 2023.

特色产品

Alliance iS HPLC System <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720008031ZH, 2023年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号