Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

一种利用亲水作用色谱（HILIC）分析二甲双胍及其相关物质的UPLC方法

Michael D. Jones[1]和Ben William[2]
[1]沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）
[2]瓦兰特国际制药公司（加拿大马尼托巴省斯坦巴克）

应用优势

- 利用仪器灵活性加快开发速度
- 色谱运行时间缩短6倍，使得全部所需分析时间缩短3.5倍，从而在常规样品分析中获得更高的处理通量且溶剂消耗量更少
- 通过使用ACQUITY UPLC可减少溶剂消耗量，每千次进样可节省5800美元

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱和预柱过滤器

Empower® 2 CDS软件

ACQUITY UPLC方法转换计算器

关键词

方法转换，极性碱性化合物，方法开发，三聚氰胺，氰基胍，药物杂质

简介

盐酸二甲双胍是一种常用口服抗糖尿病药物，用于治疗非胰岛素依赖型（2型）糖尿病[1]。它是世界上使用最为广泛的口服抗糖尿病药之一，仅在美国就有超过四千八百万种通用处方药[2]。由于分子的强极性特征以及分析物的低UV吸收，二甲双胍及其相关杂质的液相色谱分析是一项十分有挑战性的任务。在方法开发中，这些挑战限制了选择性控制方法的使用，尤其是反相（RP）色谱。因此，研究人员们引用了涉及多种技术的大量方法，如离子色谱法、亲水作用色谱法（HILIC）和据报道运行时间长达30分钟的RP LC方法[1,3,4]。

在本应用纪要中开发了一种方法，其中在使用ACQUITY UPLC BEH Amide亚2 µm颗粒固定相色谱柱的ACQUITY UPLC H-Class系统上采用HILIC技术以成功分离和分析二甲双胍以及六种相关物质。利用ACQUITY UPLC H-Class的色谱柱和溶剂切换能力，可自动调整固定相、离子强度、阳离子缓冲液、pH和温度，有利于方法的开发。本文还讨论了二甲双胍及其相关物质能够成功分离的主要因素。并且进行了常规应用评估研究，以探明本方法在QC实验室中的可行性。使用信息学软件实现趋势结果的可视化，以发现所开发方法的不足之处。最终方法将会使常规分析的成本降低，同时确保方法的可靠性。

实验

样品描述

样品由合作药厂提供。盐酸二甲双胍的储备溶液以及杂质A、B、C、D、E和I均使用水配制。工作标准品根据之前的HPLC方法进行配制（70:30乙腈:水）。工作标准混合物中的杂质浓度相对于二甲双胍浓度进行配制：杂质A中的二甲双胍浓度为0.05%，杂质B、C、D、E和I中的二甲双胍浓度为0.1%。还制备了未添加二甲双胍的相同浓度的杂质混合物，作为杂质工作标准品。除了工作标准品和杂质工作标准品以外，还制备了两种分离样品，即在基质中加入含杂质和不含杂质的二甲双胍。还为每种分析物成分制备了各种标准品。

方法条件

仪器：	配有CM-A、CM-AUX、SSV、PDA的ACQUITY UPLC H-Class系统
缓冲液：	20 mM磷酸钾，pH 2.3
流动相：	80:20乙腈/缓冲液
分离模式：	等度
检测条件：	UV，218 nm
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH Amide，2.1 × 150 mm，1.7 µm 部件号186004802
洗针液：	90:10乙腈/水
密封清洗液：	90:10水/甲醇
样品稀释剂：	70:30乙腈/水
流速：	0.5 mL/min
柱温：	40 °C
进样体积：	1.0 µL
数据管理：	Empower 2 CDS

结果与讨论

方法转换

最初提供的用于分离二甲双胍的HPLC方法使用了低pH磷酸钠缓冲液等度条件和乙腈流动相[1]。使用Atlantis® HILIC 4.6 mm × 250 mm，5 µm色谱柱，流速约为2 mL/min，运行时间为30分钟。进样量为10 µL。HPLC方法分离了二甲双胍和全部六种杂质（未显示）。

使用ACQUITY UPLC方法转换计算器，将HPLC方法转换到2.1 × 100 mm，1.7 µm ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱上。需要注意的是，尽管沃特世色谱柱选择应用程序指明两种固定相具有相似的选择性，但由于基体颗粒的差异，ACQUITY UPLC BEH HILIC固定相的选择性并非完全与Atlantis HILIC固定相相同。在此应用中，观察到了Atlantis HILIC色谱柱和BEH HILIC色谱柱的选择性差异。图1中的色谱图显示了使用UPLC®技术时BEH HILIC色谱柱上的共洗脱以及整体保留性的缺乏。有机组分的细微变化都可能导致杂质峰无法分离。在许多情况下，由于高浓度缓冲液和较高组成有机流动相的混合，流动相中的盐将会发生沉淀。沉淀出的盐会导致压力增加和基线吸收等问题。这时需要进行少量的再开发工作，寻找到合适的变量后，才能对二甲双胍及其相关物质进行分离。

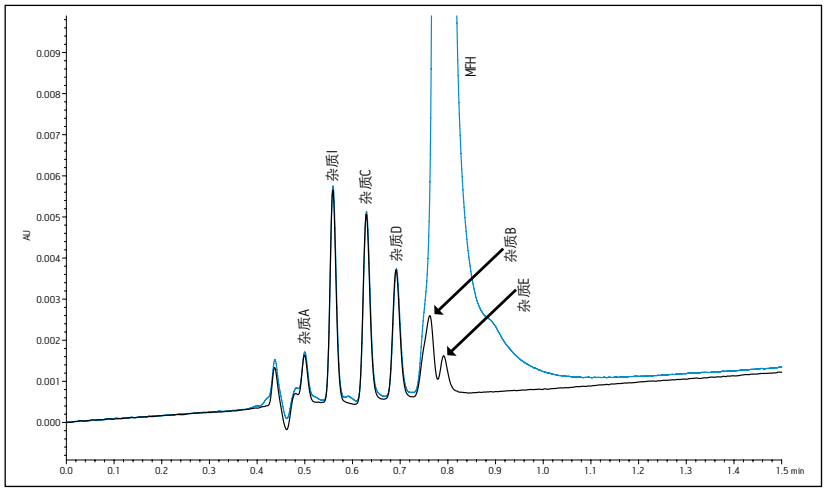

图1. 工作标准品（蓝色）和杂质混合物（黑色）叠加图。直接放大到BEH HILIC色谱柱并不能将两种杂质从API中成功分离出来。流动相为84:16的乙腈/28 mM磷酸钠缓冲液（pH 2.2）。流速为0.736 mL/min，并且温度保持在20 °C。进样体积为0.8 µL。

控制HILIC的选择性

用于分析二甲双胍及其相关物质的方法开发是一项具有挑战性的任务。当分析物的低UV光谱吸收波长为218 nm时，将会影响常用质谱缓冲液的使用，例如甲酸铵和醋酸铵，因为它们的UV截止波长为230 nm。由于化合物的极性碱性特征，因此反相LC无法保留分析物。

采用一种方法开发方案研究两种HILIC固定相：ACQUITY UPLC BEH HILIC和ACQUITY UPLC BEH Amide。离子强度、缓冲液阳离子选择和温度被作为其它可改变选择性的方式。鉴于使用ACQUITY UPLC BEH HILIC固定相时，这些化合物的保留性和分离度都很差，因此对ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱进行了研究。

将工作标准品注入ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1 × 100 mm，1.7 µm色谱柱中。从图2中的色谱图可以看到，除了杂质B和杂质D有轻微的共洗脱现象，所有化合物都能基线分离。并获得杂质E中期望的峰形和灵敏度。由于为等度条件，所以考察了流速和温度对关键目标杂质峰的分离情况。此外，还使用了更高的流动相pH值进行实验，但许多杂质峰无法保留或者保留时间很短。在酰胺基色谱柱上的分离方法开发中，发现了下列关系：

- 有机含量的增加延长了杂质D和B的保留时间，并与杂质E发生共洗脱。当使用磷酸钠作为水性流动相时，400 µL/min的流速和25 °C为最佳条件（图2）。
- 温度升高时，杂质E的保留时间缩短并与杂质B发生共洗脱（图3）。
- 流速增加时，杂质B、D和E的分离度降低。

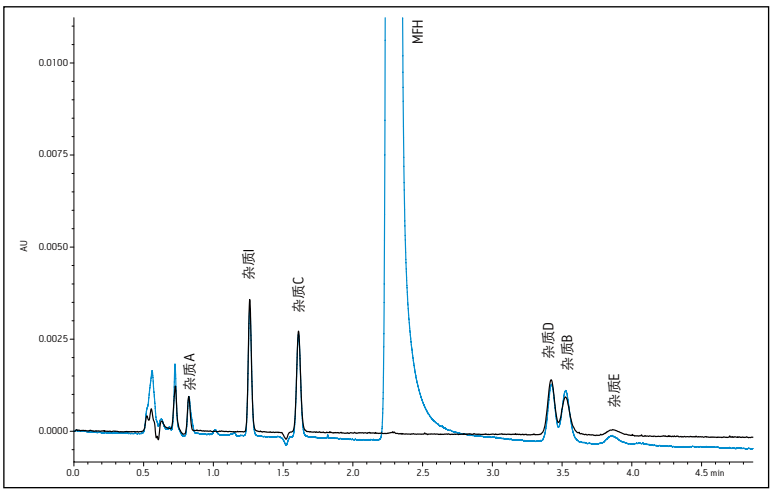

图2. 工作标准品和杂质混合物在ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱上进样。采用通用方法进行再开发。条件取自于初始方法条件。流动相为80:20的乙腈/30 mM磷酸钠缓冲液 (pH 2.2)。流速为0.4 mL/min，并且温度保持在25 °C。进样体积为1.0 µL。

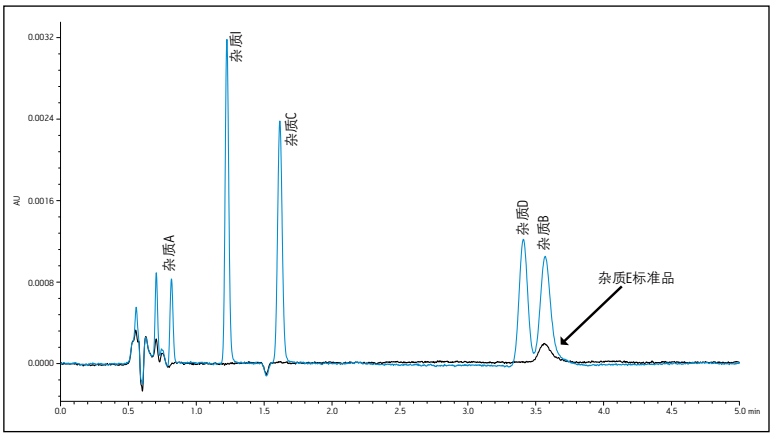

图3. 温度增至30 °C后，杂质E的保留时间缩短，并与杂质B发生共洗脱。流动相为80:20的乙腈/30 mM磷酸钠缓冲液 (pH 2.2)。流速为0.4 mL/min，并且温度保持在30 °C。进样体积为1.0 µL。

缓冲液中阳离子的适当选择有助于控制色谱柱表面以及其它情况下的离子相互作用，从而改变选择性。将30 mM磷酸钠缓冲液替换为30 mM磷酸钾缓冲液， pH值保持为2.2。通过将缓冲液阳离子更换为钾，结果立即获得了改善，从而确定最佳条件。将阳离子的改变与流速和温度的细微调整相结合，可使关键峰达到理想分离度。图4中的色谱图显示出，杂质峰B、D和E获得了更好的峰形和分离度。同样，杂质E的保留时间发生改变并在杂质B和D之前洗脱。由于基线噪音比图4所示方法更高，因此降低了缓冲液强度，以减少盐沉淀的可能性。将离子强度降低至10 mM，导致了杂质B和D的共洗脱。浓度为20 mM的磷酸钾获得了可接受的峰形和分离度（图5）。

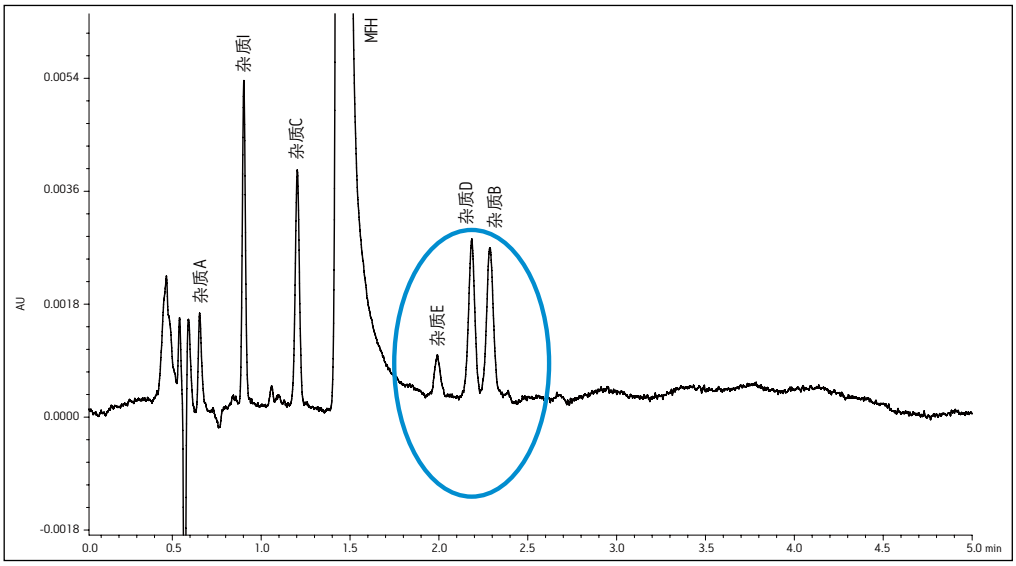

图4. 将阳离子从Na+更换为K+。可以看到，杂质E、D和B的分离度和峰形立即获得了改善。流动相为80:20的乙腈/30 mM磷酸钾缓冲液 (pH 2.2)。流速为0.5 mL/min，并且温度保持在40 ˚C。进样体积为1.0 µL。

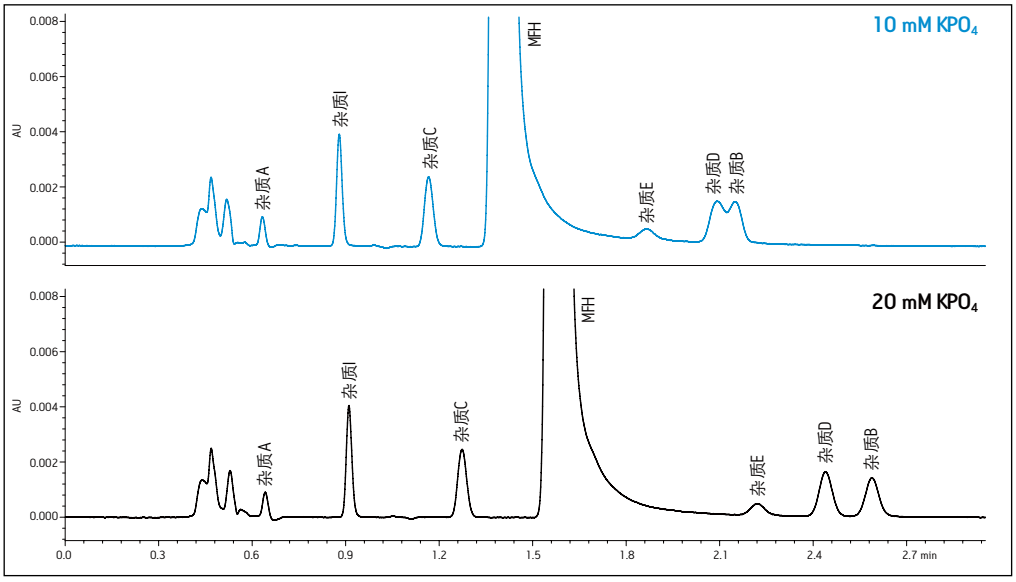

图5. 缓冲液浓度的影响。
注：杂质D和B受到缓冲液离子强度的影响。

我们继续对使用磷酸钾缓冲液时温度对选择性的影响进行了研究。以10 ˚C 为增量，从20 ˚C 升温至50 ˚C 。随着温度升高，杂质B、D和E的分离度得到提高。最终确定40 ˚C 的温度可以为关键的分析物对提供足够的分离度（图6）。采用较高的温度会导致色谱柱压力降低，使得在使用较长的色谱柱时最终方法的分离度得到提高（图7）。

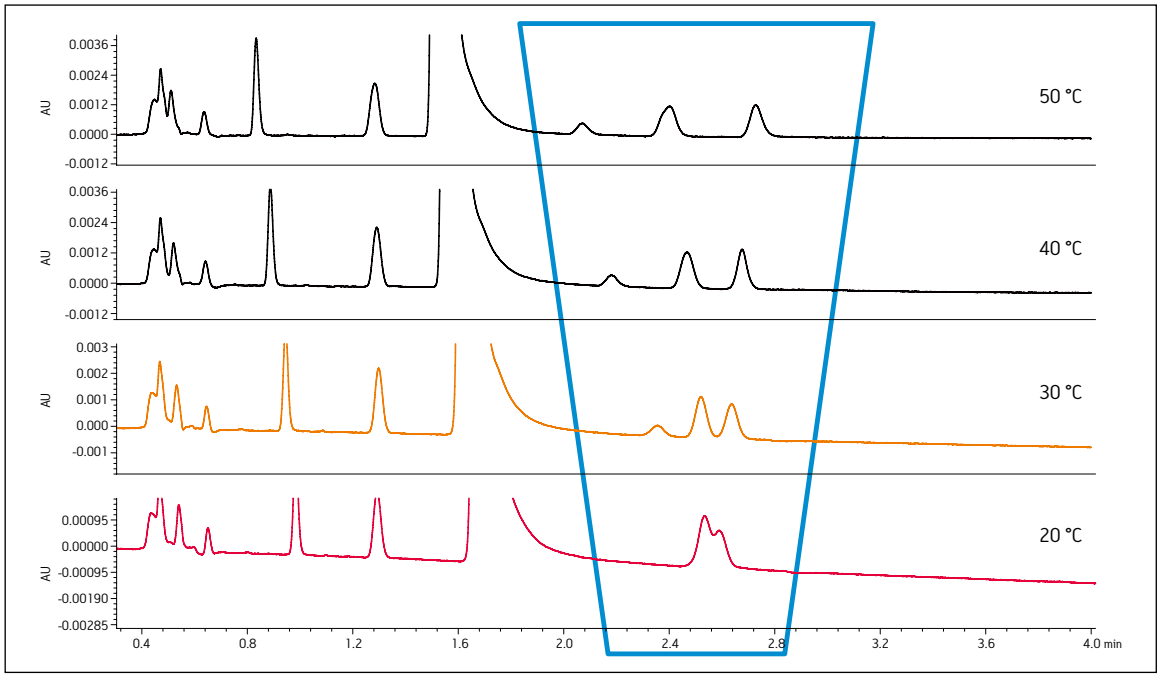

图6. 温度对选择性的影响。随着温度升高，关键分析物对之间的分离度得到提升。
注：杂质E、D和B的分离度受到温度或者可能线性速度的影响。

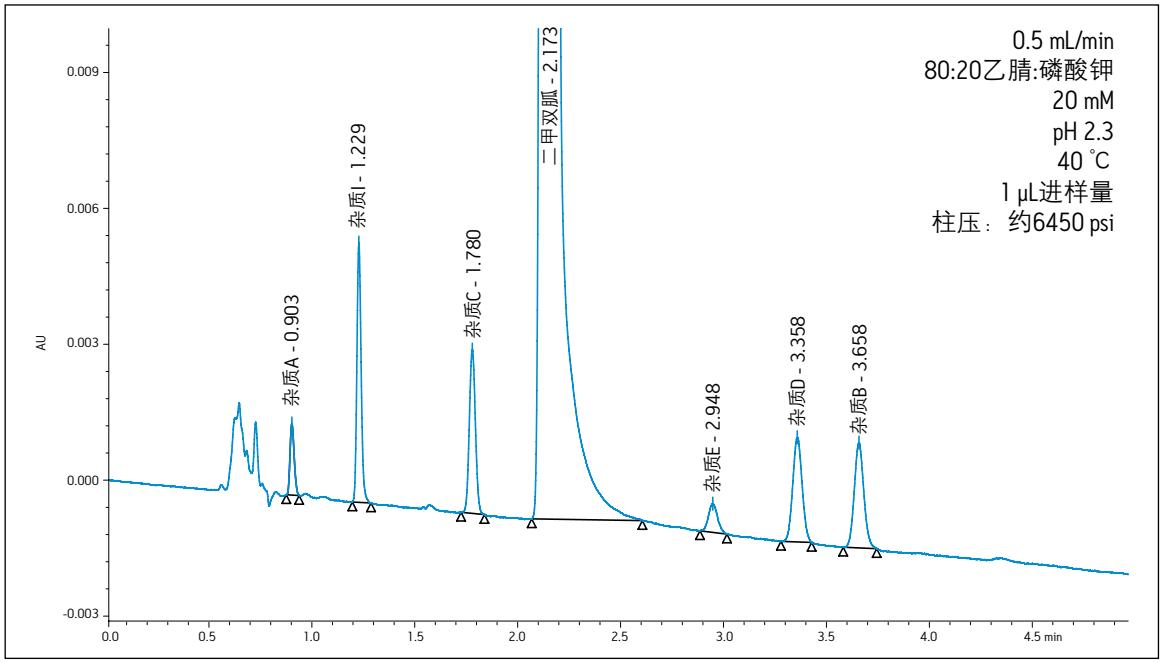

图7. 最终条件。ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1 mm × 150 mm，1.7 µm，配有预柱过滤器。流动相为80:20的乙腈/20 mM磷酸钾缓冲液(pH 2.2)。流速为0.5 mL/min，并且温度保持在40 ˚C 。进样体积为1.0 µL的工作标准品。

常规应用研究

为了评估高有机组成的条件下使用磷酸钾缓冲液的影响，在一段时间内进行标准品和样品的进样，重现了该方法在QC实验室中的常规应用。样品组涉及一系列过程，由工作标准品制备、各个标准品的制备以及加标和不加标样品基质的配制组成，在一次给定的实验运行中总共要进行超过360次进样。一组分析包括30次进样，重复60次即1800次进样，以完成设计用于重现质量控制检测实验室中实践方法的研究。此外，还安装了预柱过滤器，对研究中压力随时间升高的情况起到了预防和研究的目的。

为了了解数据的趋势，我们在Empower 2 CDS中创建了自定义的计算方法和报告，经过处理的数据能够以趋势图的形式呈现，无需转成电子表格。初始压力读数大约为6500 psi，在最初的860次进样后稳步升高至约6700 psi，如图8a中的汇总压力趋势图所示。仔细研究汇总趋势数据，可得到这一样品组的进一步趋势（图8）。Empower 2 CDS生成的趋势图显示出，一旦注入了基质样品，系统压力就会上升。这表明了初始样品制备过程的不足。对样品制备过程进行了更改，其中延长了离心时间，并使用0.2 µm过滤器盘替代0.4 µm过滤器盘。使用过滤器盘过滤出上清液，加入样品瓶中。结果，消除了由于样品制备而引起的压力升高，并且使压力增至适合进行方法验证的值。

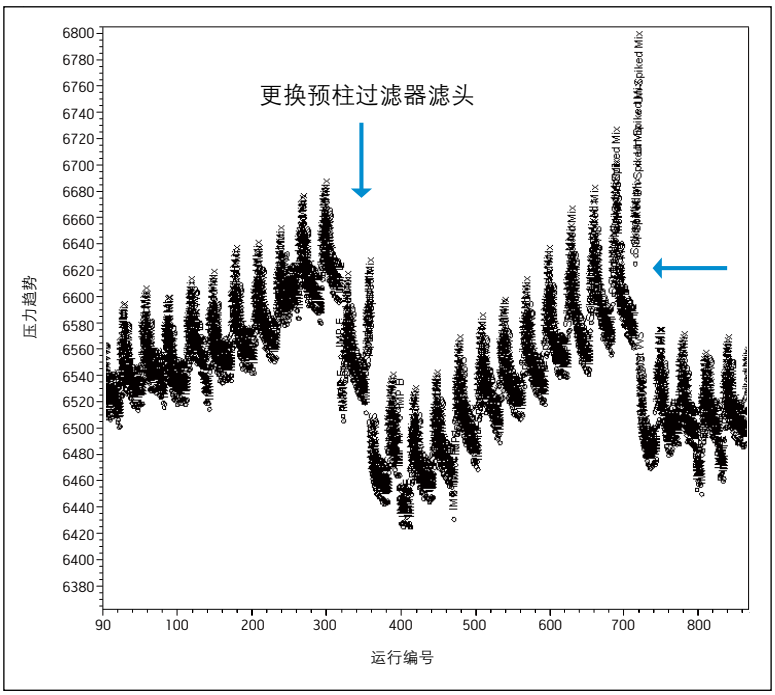

图8a. 860次进样的压力趋势。压力随时间稳步上升。预柱过滤器滤头的更换使压力恢复到初始值，但是压力仍旧稳步上升。

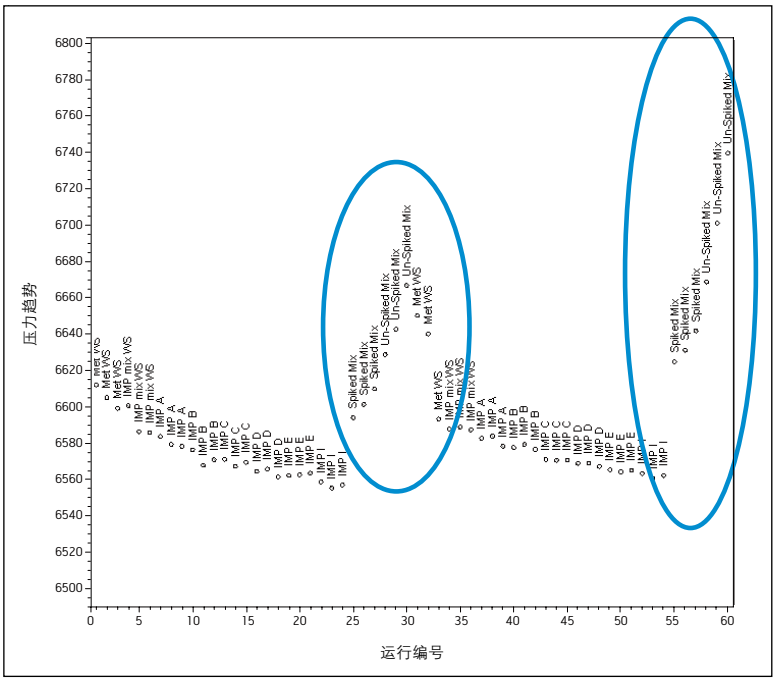

图8b. 进一步研究趋势数据，得到此样品组的主要趋势。基质样品的注入是总压力随时间提高的根本原因。圈出的区域表示基质进样的压力读数。

结论

完整的解决方案包括信息学工具、灵活的仪器和多种色谱柱填料，所得方法相比UPLC方法可使分析时间缩短达6倍。改变缓冲液阳离子实现了杂质E和杂质对（B与D）之间选择性的变化。缓冲液的离子强度影响了杂质B和杂质D的保留性能。对于HILIC方法开发而言，温度是一个有用的选择性影响因素。Empower中的信息学解决方案提供了趋势信息，有效解决了样品制备不理想的问题。预柱过滤器的使用同样也有助于在超过1500次进样中实现杰出的色谱柱性能。

回想一下，原先HPLC方法的常规应用研究都花费极大。通过比较HPLC与UPLC分别在1500次进样中的流动相消耗量，发现HPLC需要使用约65升流动相，而UPLC仅仅耗费了11升。每升乙腈的平均价格为165美元，所以这种方法能够节省大约8800美元的溶剂消耗。利用UPLC技术可为每1500次进样节约26天的时间，或缩短约80%的分析时间，以便更充分地利用资源，提升盈利能力。

参考文献

1. Ali, M.S., Rafiuddin, S., Ghori, M., Khatri, R., *Chromatographia* **67**, 517-525 [2008].
2. *The Use of Medicines in the United States: Review of 2010*. IMS Institute for Healthcare Informatics (April 2011). Retrieved on April 28, 2011.
3. Tache, F. and Albu, M., *Revue Roumaine de Chimie* **52**(6): 603-609 [2007].
4. Arayne, M.S., Sultana, N., *Zuberi, M.H., Pak J Pharm Sci* **19**(3): 231-5 [2006].

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，ACQUITY UPLC，Atlantis和UPLC是沃特世公司的注册商标。Empower和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年3月 720004080ZH VW-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com