Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

利用ACQUITY UPC² 系统分析有机铂类抗肿瘤药物及其杂质

盛佳，徐永威
沃特世科技(上海)有限公司

应用优势

- 采用ACQUITY UPC²® PDA系统分析药物卡铂及其杂质,能很好解决化合物极性强,反相LC保留弱的难题。
- 采用ACQUITY UPC² PDA系统分析药物米铂及其杂质,能很好解决化合物极性差别大,反相LC难以同时分析的难题。
- 采用ACQUITY UPC² Xevo® TQD系统定量分析洛铂中的一对非对映体，分析效率高，为手性药物的生物分析提供很好的解决方案。

沃特世解决方案

ACQUITY UPC² PDA系统
Xevo TQD系统
ACQUITY Torus™非手性色谱柱
ACQUITY Trefoil™手性色谱柱

关键词

超高效合相色谱，有机铂药物，手性分析，定量分析

前言

自从第一代抗肿瘤有机铂类药物顺铂问世以来，铂类药物以其广谱的抗肿瘤活性和较好的治疗效果而受到广泛关注，迄今为止已经发展到第三代家族。过去的30年时间里，通过以金属铂原子为核心，配位取代的方法衍生出了一系列的有机金属铂类化合物，由于各配位取代基的多样性从而导致了此类化合物的物理化学性质的显著差异，包括水溶性，极性，稳定性差异等。这种差异也使得对铂类化合物的分析定量造成了一定的困难，并提出了更高的要求。据文献报道的铂类药物的分析方法以常规液相色谱法为主，包括柱前衍生法，离子交换色谱法，反相液相色谱法，正相液相色谱法等[1]。

沃特世ACQUITY UPC² (Ultra Performance Convergence Chromatography) 超高效合相色谱以超临界流体色谱原理 (Supercritical Fluid Chromatography) 为依托，以超临界二氧化碳为主要流动相，并辅以极性至非极性的宽范围有机助溶剂，从而使其具有更强的分离能力，与反相色谱相比，它能够分离的化合物种类更多，尤其是能够分离含有高疏水性和/或强极性化合物的混合物，并在一台仪器上同时获得正相色谱的分离能力以及反相色谱的易用性和可靠性。

我们通过选择三种不同性质的有机铂类药物：卡铂，米铂，洛铂(化合物信息参考表1.)，并使用ACQUITY UPC²系统对其建立相应的分析定量方法，结果显示ACQUITY UPC²系统与液相色谱分析相比，分析铂类药物时，在涵盖化合物极性范围、大极性化合物，手性分离等方面具有明显的优势。

实验方法

A) 卡铂及其有关物质分离

检测器: ACQ-PDA
检测波长: 220 nm
色谱柱: UPC^2-Diol (3.0*50 mm, 1.7 µm)
柱温: 35°C
背压: 1700 psi
流动相: A: CO_2，B: MeOH+0.5%NH_3H_2O;
流速: 1.0 mL / min
分离方法: 从 30% B 开始，在 1 分钟内梯度提高至 40% B，然后在 4 分钟内梯度提高至 50% B，最后在 0.2 分钟内回到 30% B 洗脱 0.5 分钟，然后在 0.1 分钟内返回 1% B

B) 米铂及其有关物质分离

检测器: ACQ-PDA, ACQ-ELSD
检测波长: 215 nm
气压: 30 psi
雾化器模式: 冷却
漂移管温度: 45°C
增益: 200
色谱柱: UPC^2 2-PIC (3.0*50 mm, 1.7 µm)
柱温: 30°C
背压: 1600 psi
流动相: A: CO_2，B: MeOH/ACN =1:1;
流速: 1.0 mL / min
分离方法: 从 5% B 开始，在 1.5 分钟内梯度提高至 30% B，然后在1 分钟内梯度提高至 50% B，洗脱 1.5 分钟，最后在 0.2 分钟内回到 5% B

C) 洛铂手性异构体分离

检测器: Xevo TQD
色谱柱: UPC^2-CEL2 (3.0*150 mm, 2.5 µm)
柱温: 40°C
背压: 1800 psi
流动相: A: CO_2，B:MeOH+10mMNH_4FA+0.2%FA;
流速: 1.3mL / min
补偿泵: MeOH+1%FA, 0.2 mL / min
分离方法: 从 30%B 开始，洗脱 0.2 分钟，然后在 2.3 分钟内梯度提高至 40% B，再在 1.5 分钟内梯度提高至 50% B，洗脱 1.5 分钟，最后在 0.1分钟内回到 30% B

数据采集和处理

UNIFI® 科学信息系统

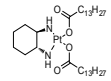
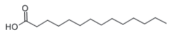
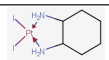
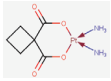
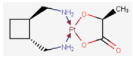
药物名称	成分名称	分子式	结构式	LogP*
米铂	米铂（主）	$C_{34}H_{68}N_2O_4Pt$		9.42
	肉豆蔻酸	$C_{14}H_{28}O_2$		5.48
	二碘环己二胺铂	$C_6H_{14}N_2I_2Pt$		2.21
卡铂	卡铂（主）	$C_6H_{12}N_2O_4Pt$		0.75
	顺铂	$Cl_2H_6N_2Pt$		0.04
	二碘二胺铂	$H_6I_2N_2Pt$		0.64
洛铂	LP-D1 (主)	$C_9H_{18}N_2O_3Pt$		0.04
	LP-D2	$C_9H_{18}N_2O_3Pt$		0.04

表1. 三种有机铂药物的主成分和杂质信息表。

LogP* — *其中P为化合物在正辛醇和水中的分配系数，表中值为ChemAxon软件计算获得。*

结果和讨论

对于药物卡铂，其中的3个组分卡铂、顺铂和二碘二胺铂都是极性很强的化合物，如表1.所示，其logP值在0-1之间；因此，采用反相LC分析时，化合物保留很弱[2]，需要用到极高比例水相洗脱，对柱寿命以及方法的耐受性上会带来一定问题。我们通过UPC^{2}系统建立了卡铂及两个主要杂质顺铂和二碘二胺铂的分离分析方法，从图1可以看出，此方法在四分钟内即可完全分离上述三个物质，高效快速，且不存在传统反相液相方法中的问题。

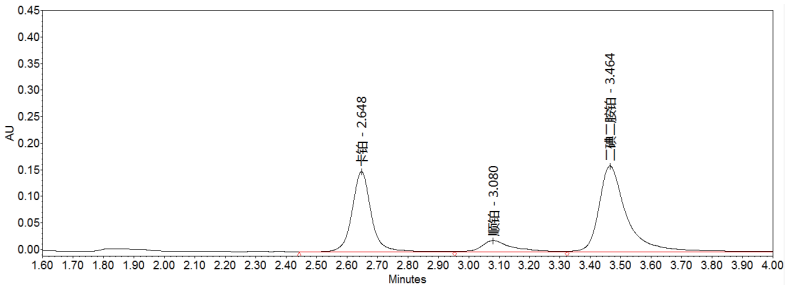


图1. UPC^{2}分析卡铂及其有关物质谱图。

药物米铂的脂溶性很强，两个主要杂质肉豆蔻酸(Impurity A)以及二碘环己二胺铂(Impurity B)的极性差别大[3]，3个化合物的logP值介于2.2-9.4之间，因此在传统反相色谱上分离困难，峰型，分离度都达不到要求。采用UPC²-PDA-ELSD系统建立其分析方法，并对两个主要杂质进行定量。如图2所示：可在5分钟内高效快速的分离米铂及其两个主要杂质，各峰型与传统液相相比得到极大改善。对于紫外吸收较弱的肉豆蔻酸(Impurity A)用ELSD检测定量，杂质二碘环己二胺铂(Impurity B)紫外吸收较强，用紫外定量分析更优。同时对两个杂质建立了定量分析方法，线性良好，R^2都在0.999以上(图3)。

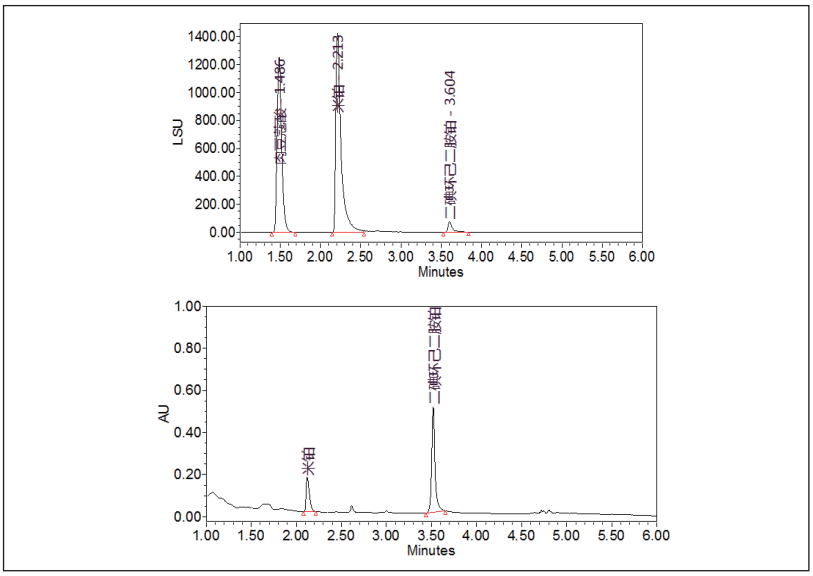


图2. UPC²分析米铂及其杂质图谱(上图为ELSD谱图，下图为PDA图谱)。

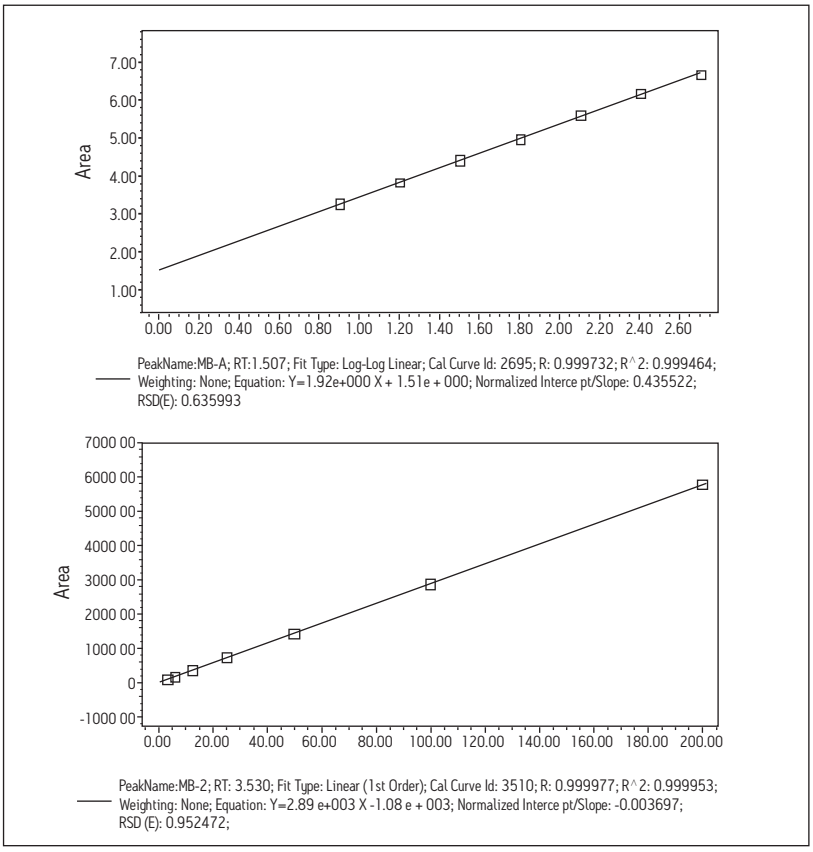


图3. UPC²分析米铂中杂质肉豆蔻酸(上)和二碘环己二胺铂(下)校正曲线。

洛铂具有两个非对应异构体：LP-D1和LP-D2，文献报道采用ODS柱，乙腈-磷酸二氢钠缓冲溶液作为流动相，不仅缓冲溶液配置较复杂，且一针分析需要30分钟时间[4]，采用UPC² Xevo TQD系统对其进行异构体分离(采用ACQUITY UPC²-CEL2色谱柱)，5分钟内即可完全分离两个异构体，峰型良好，效率提升6倍以上(参考图4)。定量范围从10-1000.0ppb(基质加标)，线性相关系数R^2在0.995以上(图5)。

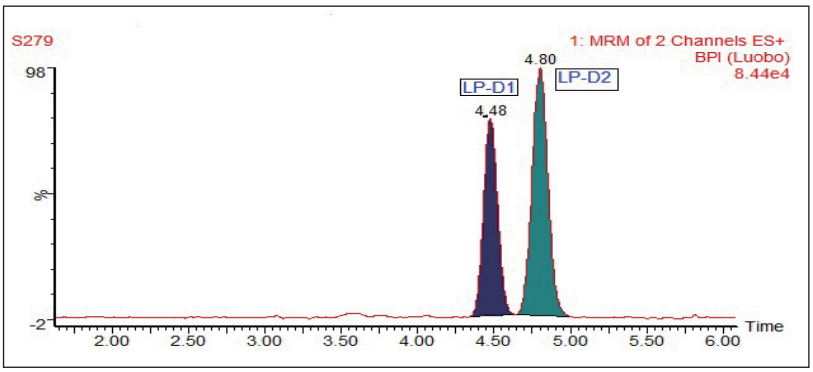


图4. UPC²分离洛铂两个非对映异构体谱图。

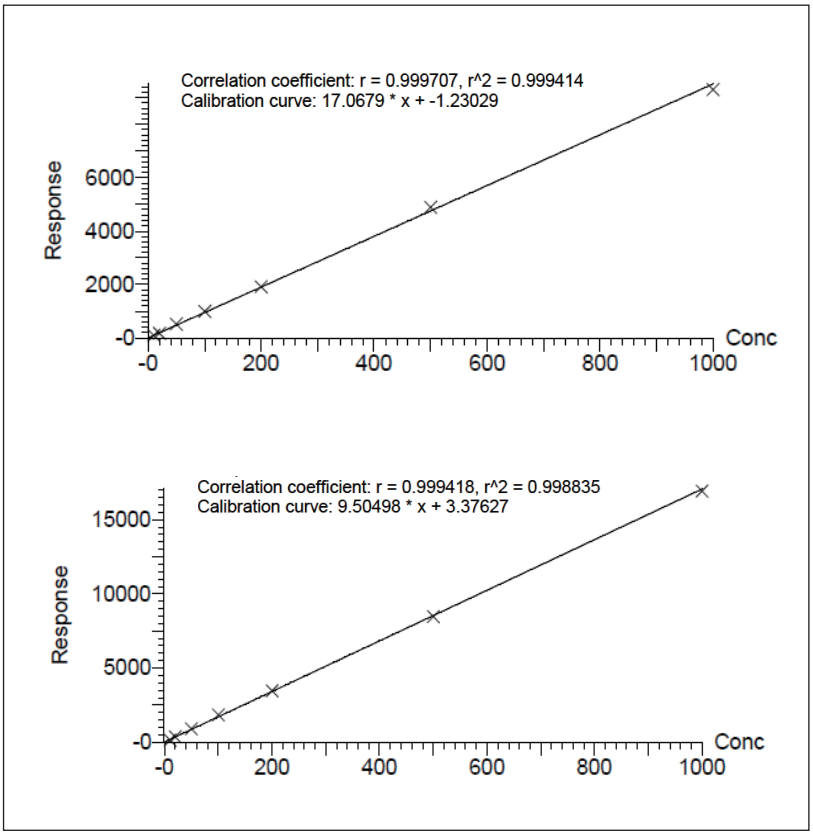


图5.洛铂非对映异构体标准曲线LP-D1(上)，LP-D2(下)校正曲线。

结论

使用ACQUITY UPC^{2}系统成功地建立了三种不同极性特性铂类抗肿瘤药物的分析方法，与传统液相方法相比，在峰型、分离度方面有很大改善，而且分离效率提升明显，充分体现了ACQUITY UPC^{2}高效，环保，通用性广的特点。同时，也体现了在分离大极性化合物、极性范围跨度大的复杂体系，以及手性药物生物定量分析等方面，具有独特的优势。

参考文献

1. 杨水艳，叶青松，郑萍；“铂类抗癌配合物的高效液相色谱法研究进展”；贵金属，2011(32)，3。
2. a) 魏培海，张延昌，许青；卡铂的反相高效液相色谱法测定；山东师范大学学报，2003(18)，3。
   b) Agrawal, G. P. ; Asian Journal of Chemistry (2011), 23 (11), 5095-5098。
3. a) 王庆琨，普绍平；抗肿瘤药米铂的一种新合成方法及结构表征。
   b) Okada, Yoko; Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1998) , JP 10142215 A 19980529。
4. J.Welink B Pechstein; Journal of Chromatography B. 1996,675; 107-111。

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPC^2, Xevo和UNIFI是沃特世公司的注册商标。Trefoil和Torus是沃特世公司的商标。所有其它商标均为其各自所有者的资产。

©2015年 沃特世公司　　中国印刷

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 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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