UPC² 用于手性分析的系统适用性和灵敏度研究

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

陈礼莉、黄俩妮
成都睿智化学研究有限公司分析部

摘要

考察三种手性化合物分别在酸性、中性和碱性的添加剂中用 UPC²®（超高效合相色谱仪）分析的系统适用性和灵敏度情况。结果显示三种手性化合物在 UPC² 的手性分析时间短（小于 5 分钟）；光学异构体之间的分离度大于 2.0；峰形良好，拖尾因子小于 2.0；峰纯度良好，纯度角远远小于纯度阈值；仪器精密度良好（6 针连续进样保留时间的 RSD 均小于 0.2 %，峰面积的 RSD 均小于 1.0 %）；灵敏度高，检测限和定量限分别能达到正常水平的 0.05 % 和 0.1 %。

引言

手性药物对映体在体内的药理活性、代谢动力学过程及毒性等存在着显著差异 [1-2]。美国食品和药品管理局（FDA）在其关于开发立体异构体新药的政策中要求：“为了对单个对映体或对映体混合物的药代学进行评估，制造商应该在早期的药品开发中对体内的单个异构体进行定量分析。”和“对于对映体或外消旋体的原料药和制剂中的分析方法和质量控制中应包括立体专属性的鉴别试验和 / 或立体选择性的分析方法”[3]。2006 年 12 月我国的国家食品药品监督管理局（CFDA）发布手性药物质量控制研究技术指导原则规定：手性药物的质控项目要体现其光学特征的质量控制 [4]。

目前，手性纯度的分析方法常见的有正相高效液相色谱法（NHPLC）和超临界流体色谱法（SFC）。NHPLC 用于手性分析有如下缺陷：使用的正相试剂毒性较大，不能使用梯度进行洗脱和分析时间较长等 [5]。而以往的 SFC 用于手性纯度分析也被分析科学家们有如下的抱怨：在现行药品生产管理规范（cGMPs）的要求中，SFC 对药物活性成分（APIs）放行检测中有准确度不够、重现性不良，相对 HPLC 而言，检测灵敏度不够高（SFC 的 LOD 通常只有正常水平的 0.5 %，远高于 HPLC-UV 的 0.05 %），这些缺陷限制了 SFC 在制药行业中用于手性分析 [6]。

近年，基于超高效液相色谱（UPLC®）的灵感，沃特世（Waters®）公司极大地改进了分析型的 SFC，生产了超高效 SFC，即 UPC²（超高效合相色谱仪）。该仪器系统在 SFC 的基础上优化了如下参数：有极低的死体积、改进了检测器、流通池、泵模块以及背压调节器等，极大地增加了分析通量和效率 [7]。

本研究选用 UPC² 仪器，分析三种手性化合物在中性、碱性和酸性添加剂下的系统适用性和灵敏度。

试验条件

仪器

沃特世 ACQUITY UPC²™ 系统配二元溶剂管理器、合相管理器、样品管理器、带 6 柱的色谱柱管理器和 PDA 检测器。

手性固定相

手性色谱柱均购自大赛璐公司（AD-3，IC），规格均为 100×4.6 mm，3 μm。

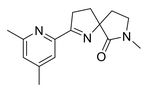
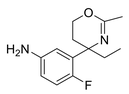
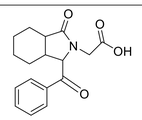
化合物的制备

分别选取表 1 中的三种手性化合物以及消旋体，分别用甲醇溶解，供进样用。

仪器条件

三种化合物采取表 1 的三种仪器条件进行分析。

表 1. 三种手性化合物的 UPC² 分析条件

序号	结构式	分析条件
1		CHIRALPAK AD-3 (4.6×100 mm, 3 μm) A: 二氧化碳 B: 甲醇 A:B=70:30 Back Pressure: 2000 psi Column T: 35 °C Total Flow: 2 mL/min Detect Wavelength: 242 nm
2		CHIRALPAK IC-3 (4.6×100mm, 3 μm) B: IPA (0.1 % DEA) A:B=85:15 Back Pressure: 2000 psi Column T: 35 °C Total Flow: 3 mL/min Detect Wavelength: 233 nm
3		HIRALPAK AD-3 (4.6×100mm, 3 μm) B: IPA (0.1 % TFA) A:B=90:10 Back Pressure: 2000 psi Column T: 35 °C Total Flow: 2 mL/min Detect Wavelength: 214 nm

系统适用性试验

分别将空白溶剂甲醇、灵敏度溶液、消旋体溶液，空白溶剂进 1 针或多针，灵敏度进样 1 针，消旋体溶液重复进样 6 次。

灵敏度试验

分别将手性化合物 1 稀释至适当浓度，以 S/N ≥ 3 为检出限，以 S/N ≥ 10 为定量限。

结果和讨论

1、三种手性化合物在各自的分析条件下，空白溶剂中无干扰手性及其对映体的杂质峰。消旋体中两种构型的分离度、峰形、峰纯度如表 2 和图 1。从上述图表显示，上述三种手性化合物在中性、碱性和酸性剂用 UPC² 的分析下，分析时间短，均短于 5 分钟，即可达到两种光学异构体的基线分离；峰形良好，拖尾因子小于 2.0；峰纯度良好，能满足药物手性分析的要求。

表 2. 三种手性化合物在 UPC² 上的分析结果

化合物	分离度	拖尾因子	峰纯度	
			Purity Angle	Purity Threshold
1	8.01	1.24	0.098	1.792
		1.5	0.102	1.563
2	2.26	1.28	0.367	8.055
		1.29	0.356	9.255
3	5.13	1.16	0.736	7.014
		1.24	0.747	9.594

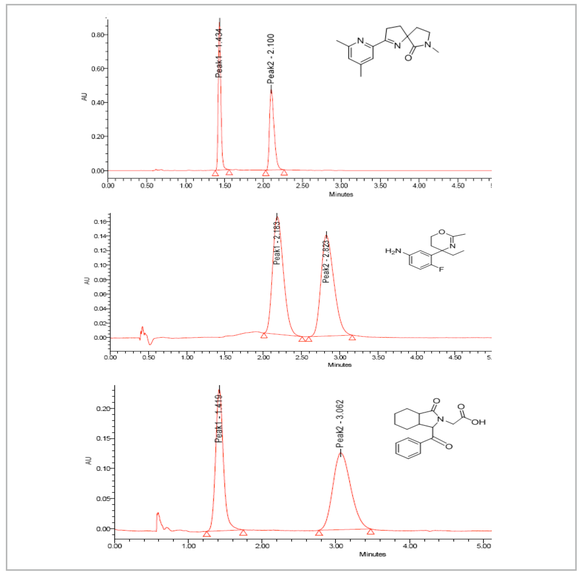


图 1. 三种化合物分别在中性、碱性和酸性添加剂下UPC²分析谱图

2、三种手性化合物在各自的分析条件下，单一光学异构体样品连续进样 6 针，保留时间的 RSD 均小于 0.20 %，峰面积的 RSD 均小于 1.0 %（表 4），表明仪器精密度良好。

表 4. 三种手性化合物在 UPC² 上的保留时间和峰面积的 RSD

化合物	保留时间（min）						峰面积					
1	1.434	1.437	1.436	1.438	1.436	1.437	2012950	1991667	1995959	1991675	2010189	2010740
	RSD: 0.099%						RSD: 0.590%					
	2.1	2.109	2.106	2.107	2.105	2.106	1929376	1914112	1919025	1915218	1933315	1931857
	RSD: 0.144%						RSD: 0.526%					
2	2.183	2.182	2.187	2.184	2.186	2.184	1584248	1582548	1582917	1582252	1584972	1593605
	RSD: 0.092%						RSD: 0.271%					
	2.823	2.821	2.827	2.824	2.825	2.825	1627878	1630007	1625901	1623444	1631474	1624780
	RSD: 0.075%						RSD: 0.191					
3	1.419	1.422	1.42	1.42	1.421	1.421	1720519	1720252	1722646	1721734	1719777	1719777
	RSD: 0.077%						RSD: 0.079%					
	3.062	3.07	3.072	3.061	3.06	3.06	2148993	2138050	2116083	2155336	2149571	2149571
	RSD: 0.075%						RSD: 0.779%					

3、手性化合物 1 在其分析条件下，单一光学异构体的检出限和定量限分别是 1.238 μg/mL（S/N=7.7）和 2.476 ug/mL（S/N=15.5）（图 2），分别相当于正常浓度的 0.05 % 和 0.1 % 的水平，可以满足药物分析中的手性分析放行要求。

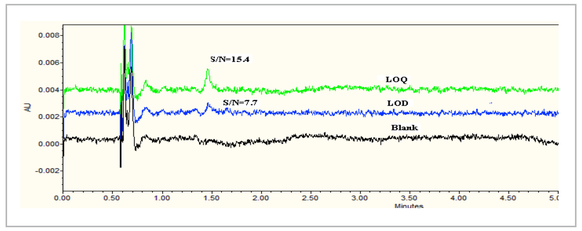


图2. 手性化合物1的检出限和定量限

结论

本研究表明使用沃特世生产的超高效合相色谱仪（ACQUITY UPC²）分析在酸性、中性和碱性添加剂下的三种手性化合物，分析时间短（小于 5 分钟），分离度良好，峰形良好，峰纯度高，灵敏度高和仪器精密度良好，能达到药物手性放行分析的要求。

参考文献

[1] Wainer IW, et.al, Drug stereochemistry-Analytical methods and pharmacology. New York: Marcel Dekker; 1993.
[2] Aboul-Enein HY, Wainer IW, et al. The impact of stereochemistry on drug development and use. New York: Wiley; 1997.
[3] 黄晓龙 , 美国 FDA 关于开发立体异构体新药的政策简介 , 中国新药杂志 , 9 (9): 650-652 (2000)
[4] 手性药物质量控制研究技术指导原则 , 2006
[5] Wong, Megan M. et al. A Comparison of HPLC and SFC Chiral Method Development Screening Approaches for Compounds of Pharmaceutical Interest, Current Pharmaceutical Analysis 4 (2), 101-105 (2008)
[6] ROY HELMY, MIRLINDA BIBA, JIA ZANG, et al. Improving sensitivity in chiral supercritical fluid chromatography for analysis of active pharmaceutical ingredients. Chirality. 19 (10):787-92 (2007)
[7] Wes Schafer, Tilak Chandrasekaran, Zainab Pirzada, et.al, Improved Chiral SFC Screening for Analytical Method Development, CHIRALITY 25:799–804 (2013)

如需下载此海报，请访问*WWW.WATERS.COM/POSTERS*

©2013 Waters Corporation