## 目的

利用沃特世(Waters®)ACQUITY UPC<sup>2™</sup>系统,成功地将测定甲苯磺丁脲药物含量的美国药典正相 HPLC 方法转换为超临界流体色谱方法。

## 背景

超临界液体色谱(SFC)是一种正相色谱分离技术,其使用 CO<sub>2</sub> 作为主要流动相,通常使用极性溶剂(如 MeOH)作为改性剂。由于 SFC 的原理与 HPLC 的原理相似,因此,目前的方法应该能够转换成 SFC 方法,从而减少溶剂的用量和处理,降低每次分析的成本,同时增强环境方面的保护。转换成 SFC 的色谱方法必须保持数据质量,而且必须得到与目前正相色谱方法一致的实验结果。目前,美国药典 (USP) 规定了含有甲糖宁 (苯磺酰胺, CAS # 64-77-7) 药物的正相 HPLC 方法。利用 4.0 x 300 mm 的硅胶柱 (L3) 进行等度分离,流速 1.5mL/min,流动相为 475:475:20:15:9 的正己烷:水饱和的正己烷溶液:四氢呋喃:乙醇:冰醋酸的混合溶液,运行时间约为 20 分钟。如大多数药典中的方法一样,本方法经过验证且可靠。但是,分析过程使用了含有正己烷和四氢呋喃的复杂流动相混合溶剂。出于环保和成本的原因,许多实验室都希望杜绝这些溶剂的使用。

## 解决方案

将甲糖宁与内标物甲糖宁混合,利用目前 USP 方法制备和分析样品。分析结果与使用 ACQUITY UPC<sup>2</sup> 方法得到的结果进行对比。UPC<sup>2</sup> 方法的条件如下:

色谱柱: ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH, 3.0 x 100 mm, 1.7 μm

温度: 50℃

流动相: 95 % CO₂:5 % 甲醇 / 异丙醇 (1:1), 含 0.2 % TFA

流速: 2.5 mL/min背压: 120 Bar/1740 psi检测器: UV/PDA, 254 nm

目前的正相 HPLC 方法,获得仍可接受的色谱分离(见图 1),虽然内标物色谱峰拖尾严重(拖尾因子 1.65)。由于已经通过了所列出的适应性标准(重复进样的相对标准偏差不超过 2.0 %;妥拉磺脲和甲糖宁的分离度 R 不小于 2.0),因此也没有再作进一步的改进。

这种新型的超高效合相色谱(UPC<sup>2®</sup>)方法得到的数据与目前的HPLC方法相当,甚至更好,速度是目前的HPLC方法10倍,且消耗的溶剂更少。

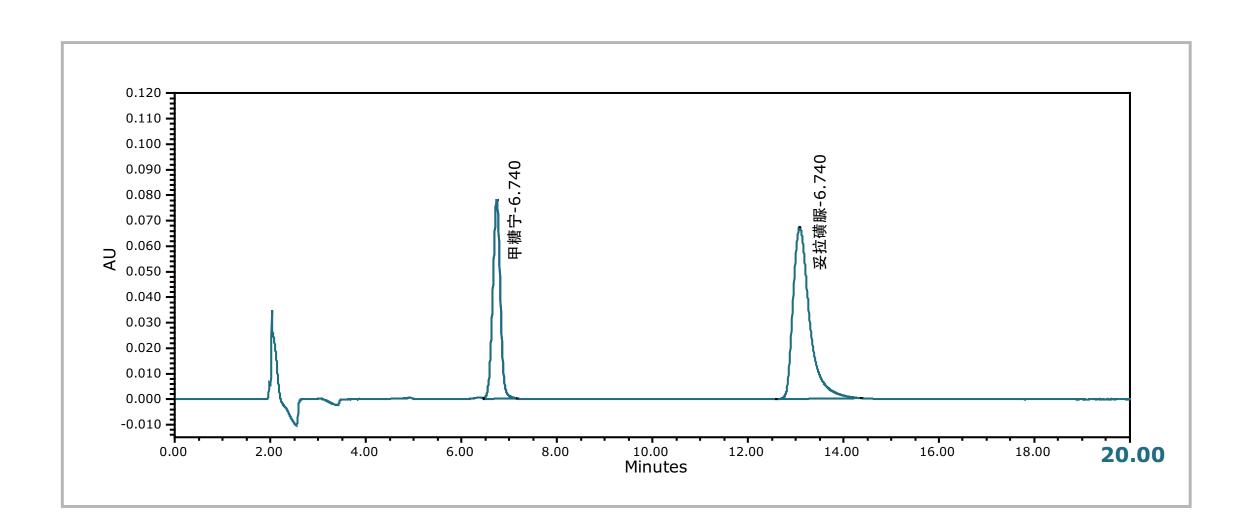


图1. 甲糖宁和妥拉磺脲的正相HPLC分析。

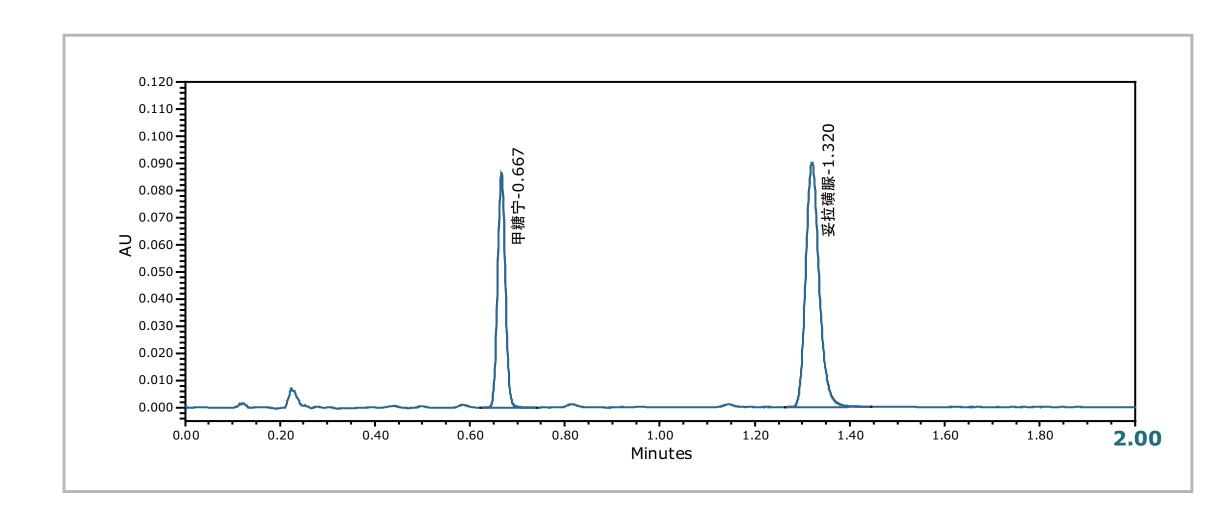


图2. 甲糖宁和妥拉磺脲的ACQUITY UPC<sup>2</sup>分析。

由新开发的 UPC² 方法得到的结果,同样符合美国药典适应性的要求(甲糖宁和妥拉磺脲的保留时间 RSD 值分别为 1.2 % 和 0.9 %,两个化合物的面积 RSD 值小于 0.90 %,n=6),保持两个目标化合物间分离度(R = ~15)的同时,运行时间大大缩短。内标物妥拉磺脲拖尾现象得到大大改善(拖尾因子 1.2)。需要注意的是,利用 UPC² 从混合物中分离并检测出许多小峰,说明了本方法具有很高的分离效率。本例中,每次正相 HPLC 分析大约使用 29 mL 正己烷和各少于 1 mL 的四氢呋喃和乙醇。相比之下,UPC² 方法中每次进样大约使用 0.25 mL 的甲醇和异丙醇。这说明,通过将正相 HPLC 方法转换为 UPC² 方法,可以大大地减少有机溶液的使用。根据目前的溶剂价格,每次正相 HPLC 分析的成本大约是 1.40 美元,而每次 UPC² 分析的成本大约是 0.01 美元,说明通过将正相 HPLC 方法转换为 UPC² 方法可以大大地降低成本。

## 总结

使用 ACQUITY UPC<sup>2</sup>,可以成功地将美国药典的 HPLC 方法转换为 UPC<sup>2</sup> 方法。这种新的 UPC<sup>2</sup> 方法得到的数据与目前的 HPLC 方法相当,甚至更好,速度是目前的 HPLC 方法的 10 倍,并且消耗的溶剂更少。我们以更快的速度得到高品质的分析数据,使实验室生产率提高,每个样本的分析成本降低。对于希望将目前的正相 HPLC 方法转化为更高效、更省钱方法的实验室而言,ACQUITY UPC<sup>2</sup> 系统是一种理想的解决方案,同时也增强了健康、安全和环境方面的保护。