

提高小分子药物分析方法开发效率

01-00018-CN

寺田 英敏

对用户的好处

- ◆ 可大幅减少 HPLC 分析条件考察的工作量，提高效率。
- ◆ 通过简单的操作即可自动更换并考察不同的分析条件。
- ◆ 使用多数数据报告功能，定量评估考察结果，轻松确定最佳条件。

简介

为了更高效地开发 HPLC 的分析方法，实施方法条件考察时，首先筛查对保留和分离影响较大的参数 - 色谱柱（固定相）和流动相的种类。但是，在此过程中，为了从为数众多的流动相（缓冲液 pH、盐浓度、有机溶剂比例等）和色谱柱（ODS、C8、Phenyl 等）中找出适合的方法，实际上需要以各种不同的条件进行分析。更换色谱柱和配制不同的流动相等工作需要耗费大量的精力和时间。

为实现方法开发过程的自动化，岛津开发了“Nexera™ 方法开发系统”和专用软件“Method Scouting Solution”，本文介绍了如何使用该系统来快速考察并确定多种小分子药物同时分析的方法条件。

分析系统和专用软件的概述

Nexera 方法开发系统的外观与 Method Scouting Solution 的界面如图 1 和图 2 所示。其外观与标准的高压梯度系统保持一致，但如图 2 界面内的流程图所示，可在分析时自动更换流动相和色谱柱条件。

流动相考察方面，可通过在各泵中安装四元低压梯度比例阀，自动考察最多 16 种流动相条件。此外，使用流动相混合功能，可在线自动配制不同 pH 的缓冲液和有机相。

色谱柱考察方面，可通过在柱温箱内安装柱切换阀，使用最多 12 根（图 2 流程图图中为 6 根）色谱柱来自动考察色谱柱条件。

可在 Method Scouting Solution 界面中轻松设定考察条件。



图 1 Nexera 方法开发系统

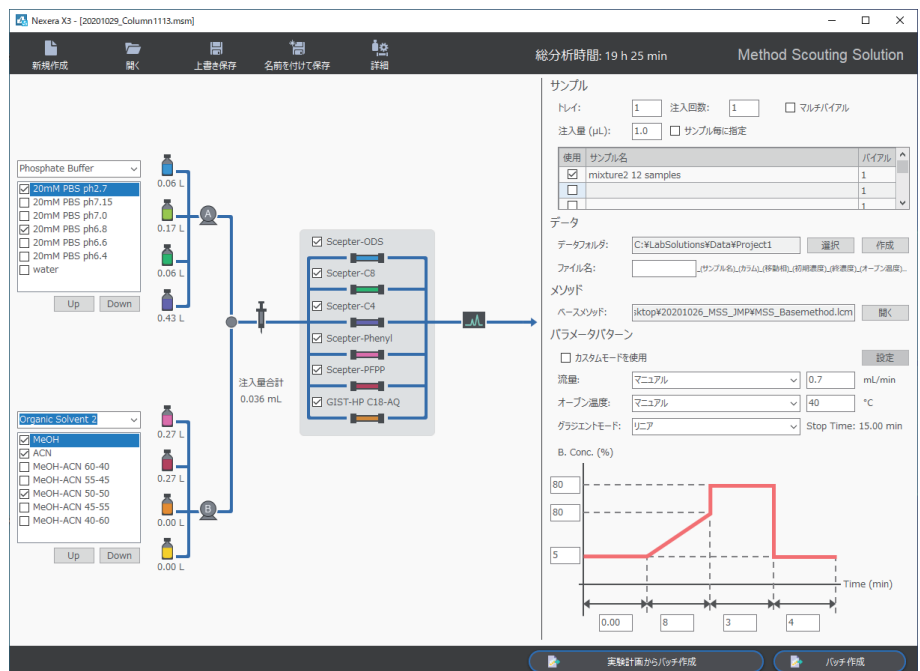


图 2 Method Scouting Solution 界面

目标药物组分

本文中同时分析的 12 种药物组分和其相关性质如表 1 所示。

表 1 目标组分

| 序号 | 化合物 | Log P | pKa |
|----|--------------|-------|------|
| 1 | 丙磺舒 | 3.21 | 3.4 |
| 2 | (S)-(+)- 萘普生 | 3.18 | 4.15 |
| 3 | 乙酰水杨酸 | 1.19 | 3.49 |
| 4 | 双氯芬酸钠 | 4.51 | 4.15 |
| 5 | 盐酸罂粟碱 | 3 | 6.4 |
| 6 | 盐酸辛可卡因 | 4.4 | 8.85 |
| 7 | 盐酸阿米替林 | 4.92 | 9.4 |
| 8 | 吲哚美辛 | 4.27 | 4.5 |
| 9 | 安替比林 | 0.38 | 1.4 |
| 10 | 利多卡因 | 2.44 | 8.01 |
| 11 | 奎尼丁 | 3.44 | 8.56 |
| 12 | 甲氧氯普胺 | 2.62 | 9.27 |

考察条件和色谱图

流动相和色谱柱的考察条件如表 2 所示。使用在线混合功能对 A 相进行自动配制，得到 pH 分别为酸性和中性的缓冲溶液。此外，混合有机溶剂时也同样采用了在线混合功能。手动变更条件进行考察时，需要配制及更换流动相、更换色谱柱和创建分析方法及批处理表等大量工作，而使用 Nexera 方法开发系统和 Method Scouting Solution 可通过简单操作自动完成所有工作。

本文实现了 2 种缓冲液、3 种有机溶剂、6 种色谱柱共 36 种分析条件的自动考察。

按各色谱柱归纳的色谱图如图 3~8 所示。安替比林和乙酸水杨酸酯中含有杂质，最多分离出 14 个峰。结果显示，保留和分离结果由于色谱柱、缓冲液的 pH 和有机溶剂的不同而发生了较大变化。

表 2 流动相和色谱柱的考察条件

| 流动相: | |
|---|---|
| 泵 A | 缓冲液* ¹ |
| A1 | 20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 2.7) |
| A2 | 20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) |
| 泵 B | 有机溶剂* ² |
| B1 | 乙腈 |
| B2 | 乙腈 / 甲醇 = 1 : 1 |
| B3 | 甲醇 |
| 色谱柱: | |
| 1 | Shim-pack Scepter™ C18-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)* ³ |
| 2 | Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)* ⁴ |
| 3 | Shim-pack Scepter C4-300 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)* ⁵ |
| 4 | Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)* ⁶ |
| 5 | Shim-pack Scepter PFPP-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)* ⁷ |
| 6 | Shim-pack™ GIST C18 AQ HQ (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.0 μm)* ⁸ |
| 分析条件: | |
| 时间程序 : 泵 B. 浓度 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min) | |
| 流速 | : 0.7 mL/min |
| 进样量 | : 1.0 μL |
| 柱温 | : 40°C |
| 检测波长 | : 220- 400 nm (SPD-M40) |

*1 缓冲液通过以下溶液在线混合自动调整。

| 溶剂 | | A1 比例 | A2 比例 |
|----|------------------|-------|-------|
| A | 50 mmol/L 磷酸水 | 16% | 0% |
| B | 50 mmol/L 磷酸二氢钠水 | 24% | 24% |
| C | 50 mmol/L 磷酸二钠水 | 0% | 16% |
| D | 水 | 60% | 60% |

*2 有机溶剂通过以下溶剂在线混合自动调整。

| 溶剂 | | B1 比例 | B2 比例 | B3 比例 |
|----|----|-------|-------|-------|
| A | 乙腈 | 100% | 50% | 0% |
| B | 甲醇 | 0% | 50% | 100% |

*3 P/N 227-31013-03、*4 P/N 227-31034-03、*5 P/N 227-31176-03

*6 P/N 227-31064-03、*7 P/N 227-31054-03、*8 P/N 227-30808-02

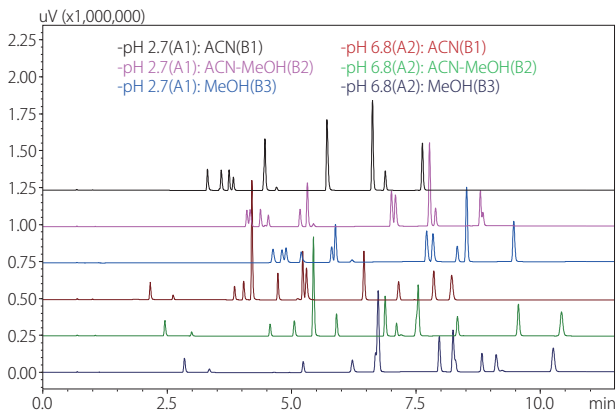


图 3 Shim-pack Scepter C18-120 的色谱图

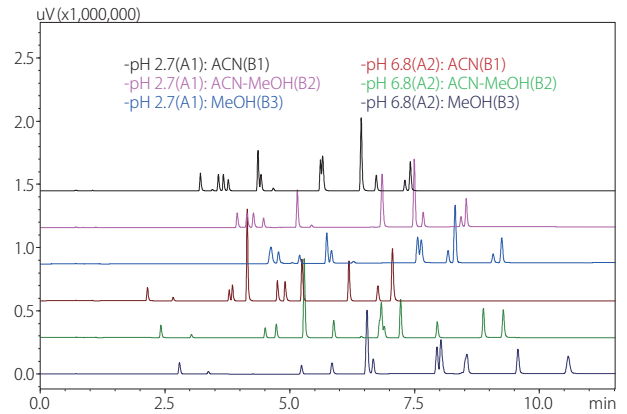


图 4 Shim-pack Scepter C8-120 的色谱图

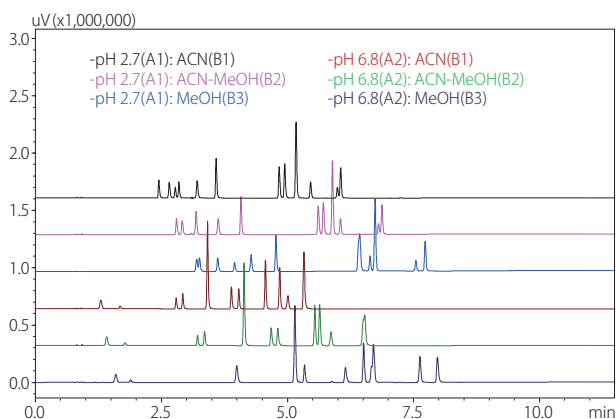


图 5 Shim-pack Scepter C4-120 的色谱图

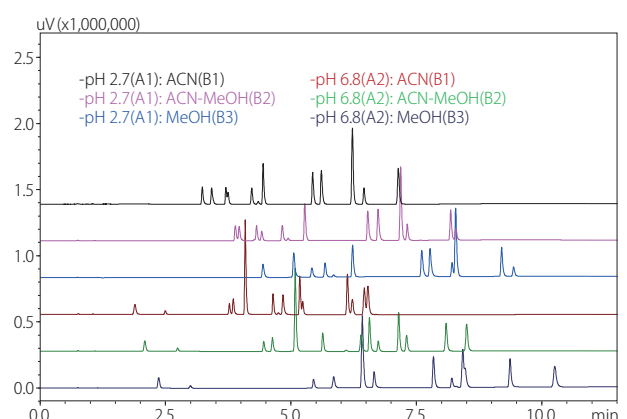


图 6 Shim-pack Scepter Phenyl-120 的色谱图

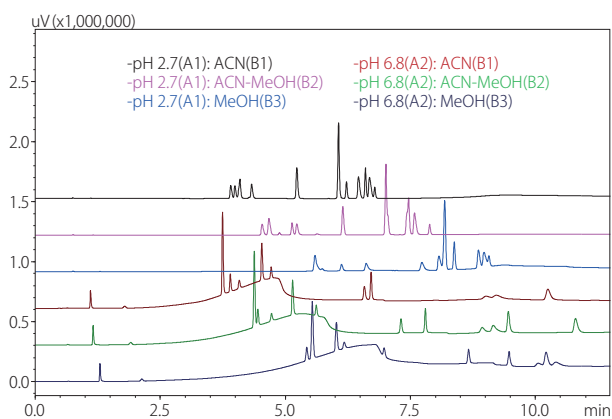


图 7 Shim-pack Scepter PFPP-120 的色谱图

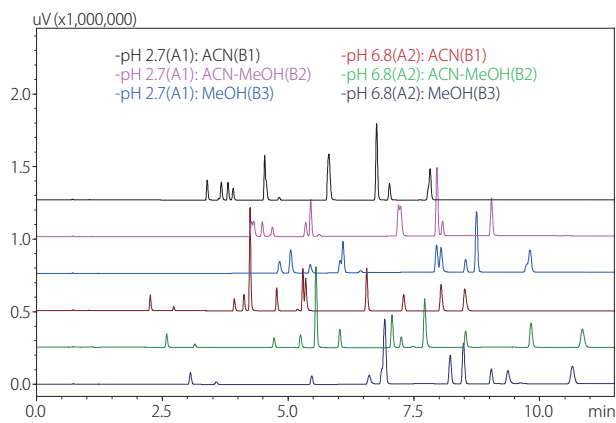


图 8 Shim-pack GIST C18 AQ 的色谱图

■ 色谱图的定量评估

由于实验中获得的色谱图数量与考察条件数量相同，因此需要评估在何种条件下可获得目标物的最佳分离效果。如果全部由人工来确认详查色谱图的话，则会比较麻烦。

本文使用以下公式定量评估各分析条件下的分离效果。根据实验所得数据文件，利用 LabSolutions™ 的多数数据报告功能，计算评估值。

$$E = P \times (Rs1 + Rs2 + \dots + RsP) \quad \dots \quad (式1)$$

利用色谱峰检测数 (P) 与分离度 (Rs, 上限值为 3.0) 计算出评估值 (E)。

多数数据报告功能可从多个数据中自动提取用于色谱图分离度等评估的参数，并制作电子表格。仅需使用事先准备的报告模板进行输出，即可自动显示计算结果。

图 9 所示为以柱形图来表示各分析条件下所得评估值的结果。由此可在视觉上判断并轻松确认哪种分析条件的分离结果最好。

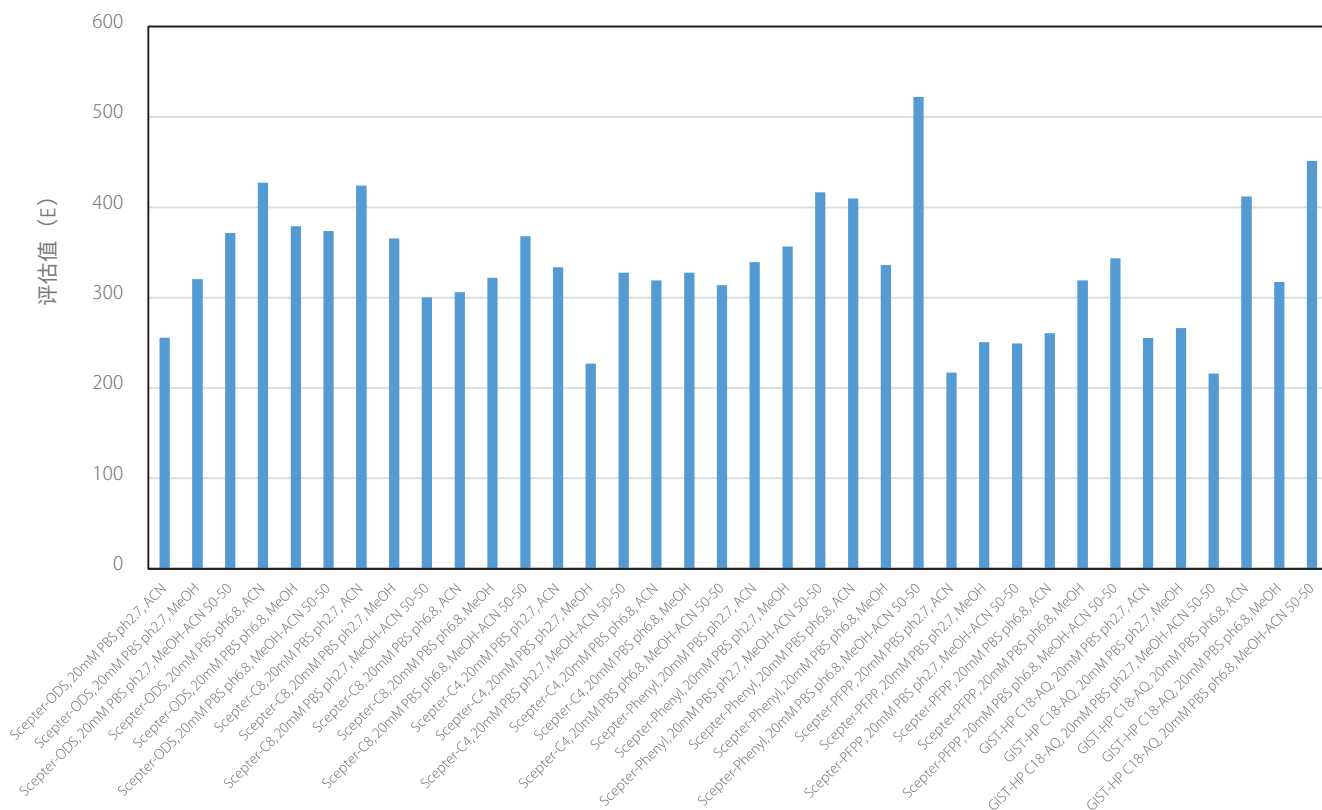


图 9 分析条件和评估值

分析结果

通过多数据报告获得最高评估值的分析条件如表 3 所示。此外，得到的色谱图如图 10 所示，色谱峰参数如表 4 所示。

所有色谱峰均获得了分离度在 2.3 以上的分离，因此以本条件为最佳分析条件。即使经过考察后分离并不充分，但通过组合分离最佳的色谱柱和流动相条件，优化梯度条件和色谱柱温度等，可实现高效的分析条件考察。

确定条件后，在相同条件下进行各组分的标准样品分析，确定色谱峰。

表 3 评估值最高的分析条件

| | |
|---|-------------------------------|
| 流动相: | |
| 泵 A | 缓冲液 |
| A2 | 20 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) |
| 泵 B | 有机溶剂 |
| B2 | 乙腈 / 甲醇 = 1 : 1 |
| 色谱柱: | |
| 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) | |
| 分析条件: | |
| 时间程序 : 泵 B. 浓度 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min) | |
| 流速 | : 0.7 mL/min |
| 进样量 | : 1.0 μL |
| 柱温 | : 40°C |
| 检测波长 | : 220- 400 nm (SPD-M40) |

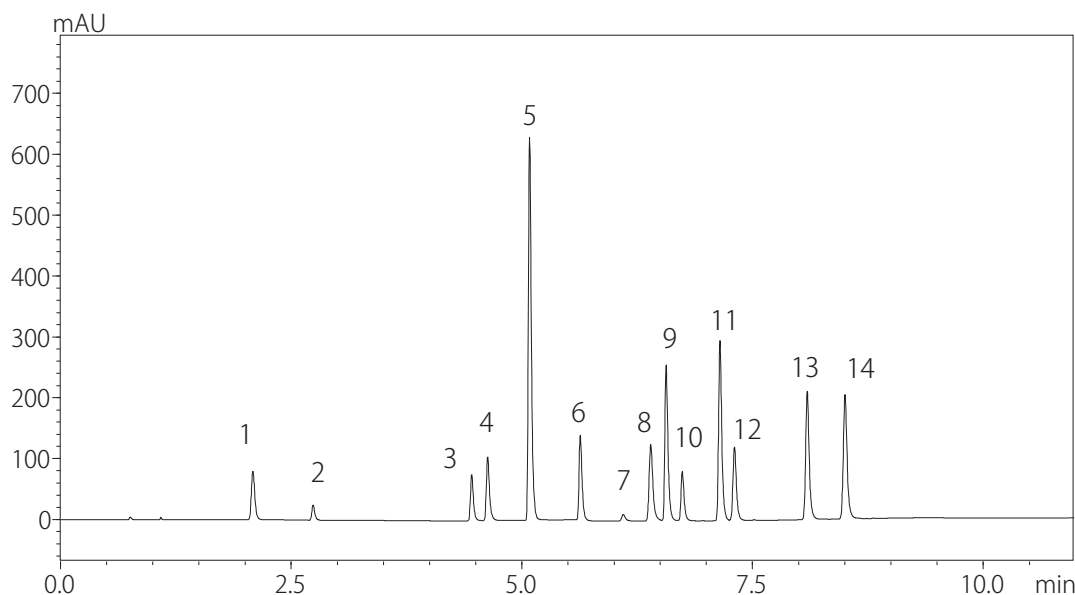


图 10 最佳条件的色谱图

表 4 最佳分析条件下的结果

| 峰值编号 | 化合物 | R.T. (min) | 面积 | 高度 | 分离度 (USP) | 对称因子 |
|------|--------------|------------|---------|--------|-----------|-------|
| 1 | 乙酰水杨酸 | 2.085 | 207910 | 79624 | -- | 1.243 |
| 2 | 乙酰水杨酸的杂质 | 2.736 | 54637 | 24698 | 10.0 | 1.367 |
| 3 | 安替比林 | 4.456 | 169100 | 75912 | 28.7 | 1.378 |
| 4 | 甲氧氯普胺 | 4.629 | 251454 | 104804 | 2.8 | 1.424 |
| 5 | (S)-(+)- 萘普生 | 5.083 | 1408900 | 628679 | 7.3 | 1.493 |
| 6 | 丙磺舒 | 5.632 | 317401 | 139466 | 9.0 | 1.475 |
| 7 | 奎尼丁的杂质 | 6.099 | 31171 | 10936 | 6.9 | 1.47 |
| 8 | 奎尼丁 | 6.397 | 364149 | 125731 | 4.0 | 1.378 |
| 9 | 双氯芬酸钠 | 6.563 | 612211 | 256567 | 2.4 | 1.509 |
| 10 | 吲哚美辛 | 6.739 | 190695 | 81710 | 2.8 | 1.401 |
| 11 | 盐酸罂粟碱 | 7.147 | 709025 | 295553 | 6.4 | 1.385 |
| 12 | 利多卡因 | 7.304 | 317027 | 120963 | 2.3 | 1.294 |
| 13 | 盐酸辛可卡因 | 8.093 | 570512 | 211125 | 11.2 | 1.296 |
| 14 | 盐酸阿米替林 | 8.501 | 593951 | 204085 | 5.5 | 1.326 |

结论

本文通过同时分析多种小分子药物的方法条件考察案例，介绍了方法开发系统的自动化流程。结果表明，受流动相和固定相的影响，logP 和 pKa 等不同的组分，其分离结果会发生较大变化。

在开发分析方法时，自动更换对目标组分分离和保留影响较大的因素 - 色谱柱和流动相的组合，确认最佳分离条件。通过使用 Nexera 方法开发系统和专用软件“Method Scouting Solution”，可自动实施条件变更和数据采集，大幅减轻 HPLC 分析条件考察的负担，提高效率。

各分析条件所得的色谱图分离效果可使用多数据报告功能进行定量评估，也可以图表形式将考察结果可视化，因此可有效地筛查最佳分析条件。

岛津应用云



Nexera、Shim-pack Scepter、Shim-pack、和 LabSolutions 是岛津制作所株式会社在日本与其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2021年3月