

二维液相色谱法用于碘帕醇对映异构体杂质的定量分析

LC-171

摘要： 本实验以岛津 Prominence HPLC 为基础构建二维液相色谱系统，用于建立碘帕醇对映异构体杂质的定量分析方法。该系统使用手性色谱柱为一维分离手段，实现碘帕醇对映异构体的初步分离，后经目标峰捕集再对 R- 碘帕醇进行反相 C18 色谱分析，可显著改善由于手性拆分分离导致的色谱峰展宽问题，从而提高检测灵敏度，实现微量异构体杂质的定量分析。本实验在 20 分钟内完成碘帕醇的二维色谱的分离，分析结果显示，R- 碘帕醇在 1~125 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上，准确度在 96~105% 之间。

关键词： Prominence HPLC 二维液相 碘帕醇 定量分析

碘帕醇是一种医用造影剂，广泛用于神经、血管、关节等组织及器官的影像学辅助检查，其化学名为 (S)-N, N'- 双 [2- 羟基 -1-(羟甲基) 乙基]-5-[(2- 羟基 1- 氧化丙基) 氨基]-2, 4, 6- 三碘 -1, 3- 苯二甲酰胺。碘帕醇含有一对手性异构体，R- 构型碘帕醇由于会导致注射液黏度增大而引发不良反应，因此控制 R- 碘帕醇的含量是碘帕醇注射液质量控制的关键步骤。

目前单独使用手性色谱法拆分碘帕醇的异构体时存在由于柱效不高导致的检测灵敏度差等问题，碘帕醇的分子结构提示其可在反相色谱上有良好保留，因此考虑构建手性色谱体系和反相色谱体系的二维液相色谱系统，对已获分离的异构体杂质再次进行反相色谱分离以提高检测的灵敏度。

实验部分

1.1 仪器 Prominence HPLC 二维液相色谱系统

具体配置为：LC-20AD×3(输液泵)，DGU-20A5(在线脱气机)，SIL-20AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱，含 FCV-36AH 流路切换阀)，SPD-20A(紫外检测器)，CBM-20A(系统控制器)，LabSolutions Ver5.86(色谱工作站)。

1.2 样品信息

称取一定量碘帕醇样品及 R- 碘帕醇样品，加纯水溶解并稀释至 250 mg/L。R- 碘帕醇样品溶液用纯水稀释成 125.0、50.0、25.0、10.0、2.5.0、2.0 和 1.0 mg/L 系列工作液，进样 2 μ L 进行二维液相色谱分析。

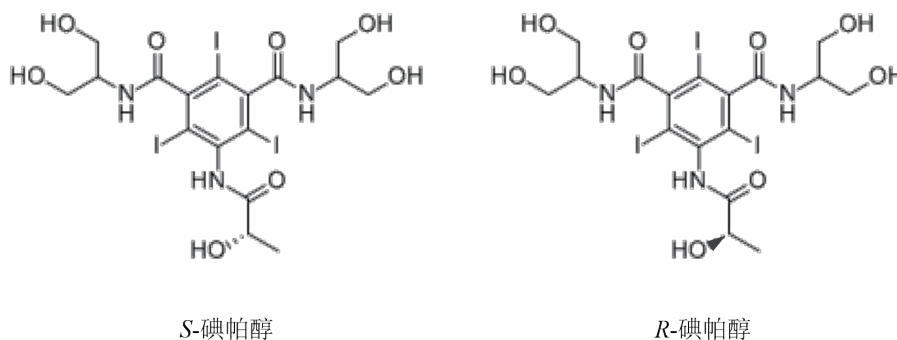


表1 化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	S-碘帕醇	S-Iopamidol	62883-00-5	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈
2	R-碘帕醇	R-Iopamidol	-	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈

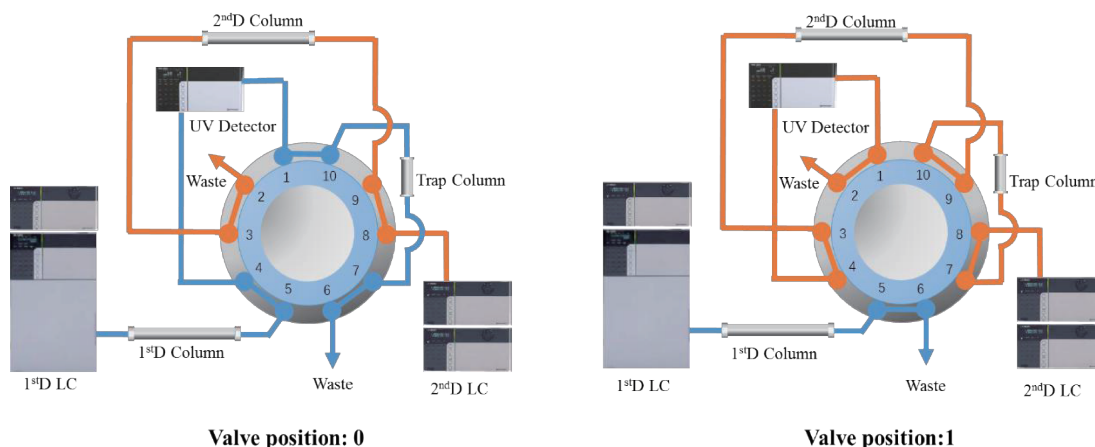
1.3 分析条件

色谱柱 1: Daicel CHIRALPAK MA(+) 4.6 mm ID.×50 mm L., 3 μm
 捕集柱: 反相 C18 4.6 mm ID.×30 mm L., 5 μm
 色谱柱 2: 反相 C18 4.6 mm ID.×150 mm L., 5 μm
 流动相 1: 1 mM CuSO₄ 水溶液
 流动相 2: A- 水; B-MeOH
 柱温: 30°C
 进样量: 2 μL

流速: 0.5 mL/min
 流速: 0.8 mL/min
 检测波长: 240 nm
 洗脱方式: 1stD LC 等度洗脱;
 2ndD LC 梯度洗脱:
 1%B(0-12.5 min)-80%B(16.5-17.5 min)
 -1%B(18.5-21.5 min)

结果与讨论

2.1 二维液相系统流路图



该系统中使用 FCV-36AH 二位十通阀以两个流路、三个色谱柱之间的切换和协同作用来实现目标物质 R- 碘帕醇的手性分离——捕集——反相分离的过程。FCV-36AH 耐压高达 100 MPa，内部体积仅有 0.3 μL，适用于包括 UHPLC 在内的液相色谱系统，安装于 CTO-20A/20AC 或 CTO-30A 柱温箱内，通过 LabSolutions 工作站软件进行控制，便捷可靠。

2.2 1stD LC 分离

1stD LC 是以 Chiralpak MA(+) 色谱柱和硫酸铜溶液为流动相的手性分离体系，该系统建议的硫酸铜溶液浓度在 0.1~2 mM 之间，离子浓度增大会缩短 R/S- 碘帕醇的保留时间并降低分离度，因此从高效和实用考虑，使用硫酸铜溶液浓度为 1 mM。在该条件下，R/S- 碘帕醇分离结果如下所示。

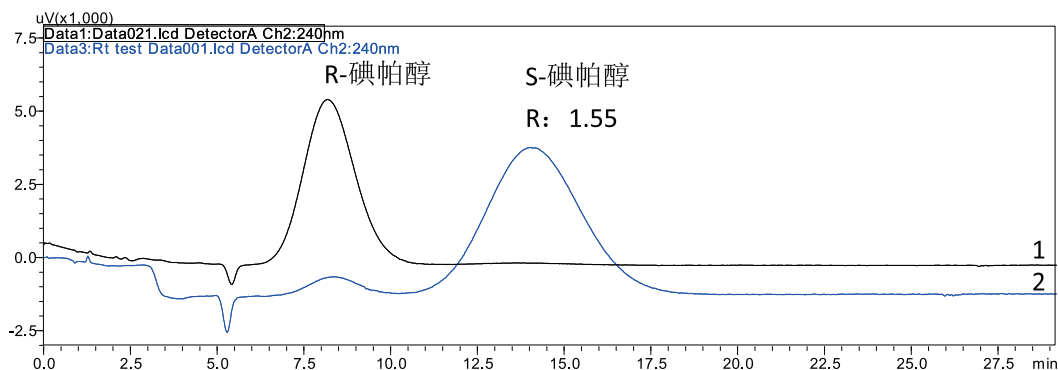


图1 250 mg/L浓度的R-碘帕醇样品溶液(1)和S-碘帕醇样品溶液(2)的1stD LC色谱图

通过分离结果可以看到，该手性分离体系能在 20 min 内实现碘帕醇两种构型的手性分离，但和多数液相手性分离的色谱行为相似，存在柱效较低的缺点，因此在定量分析中对于含量较低的待测物的检出存在不足。

2.3 捕集能力的考察

经过 1stD LC 分离的 R- 碘帕醇在后续会导入 2ndD LC 进行反相色谱分离以提高响应灵敏度，待测物从 1stD LC 到 2ndD LC 的切换间使用反相填料的色谱柱进行捕集。考察了规格为 2.1 mmID.×10 mmL. 和 4.6 mmID.×30 mmL. 的两款反相色谱柱捕集效果。实验结果表明，4.6 mmID.×30 mmL. 的反相色谱柱可以实现化合物大于 1 min 的保留，即能使目标化合物的合理捕集，又不对后续 2ndD LC 的分离产生影响。在切换时间的考察上，分别测试了运行时间为 9.0、9.5、10.0、11.0 min 时进行阀切换后目标物 R- 碘帕醇峰面积的变化，结果表明 10.0 min 时切换可以保证目标峰响应最好并能使得总分析时间最短，同时亦表明所选 4.6 mmID.×30 mmL. 的反相色谱柱可以用于该样品的捕集。

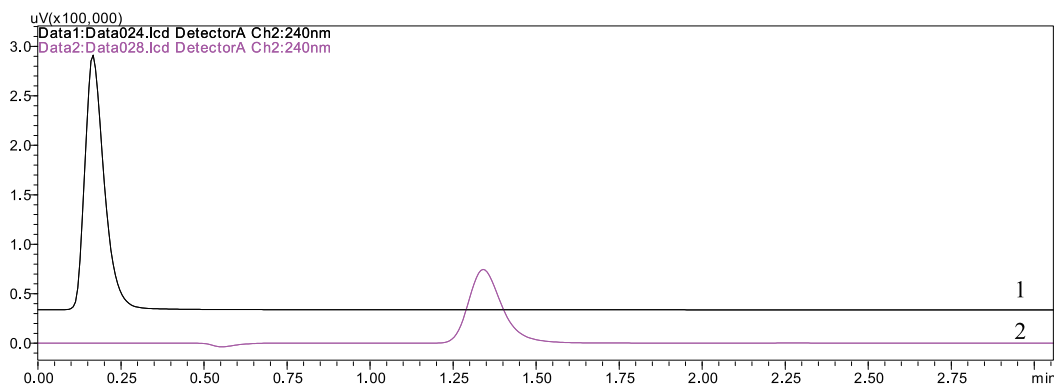


图2 R-碘帕醇样品在1stD LC流动相条件下在两种捕集柱上的保留效果
(1-2.1 mmID.×10 mmL.捕集柱；2-4.6 mmID.×30 mmL捕集柱)

2.4 2ndD LC 分离

经过捕集的 R- 碘帕醇导入 2ndD LC 后经过反相色谱分离，无保留的硫酸铜在高比例水相中快速流出色谱柱，待硫酸铜流出后 R- 碘帕醇在梯度条件下于 16.3 min 左右洗脱。

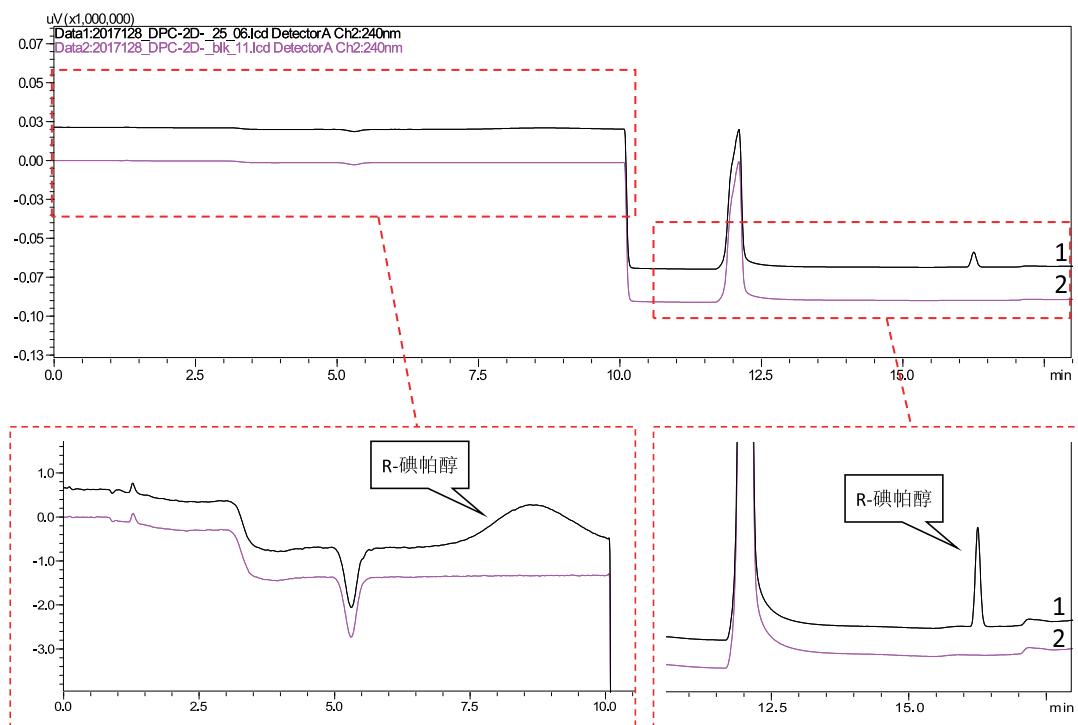


图3 浓度为25 mg/L的R-碘帕醇样品溶液(1)和溶剂空白溶液(2)的2D LC分析色谱图

2.5 灵敏度

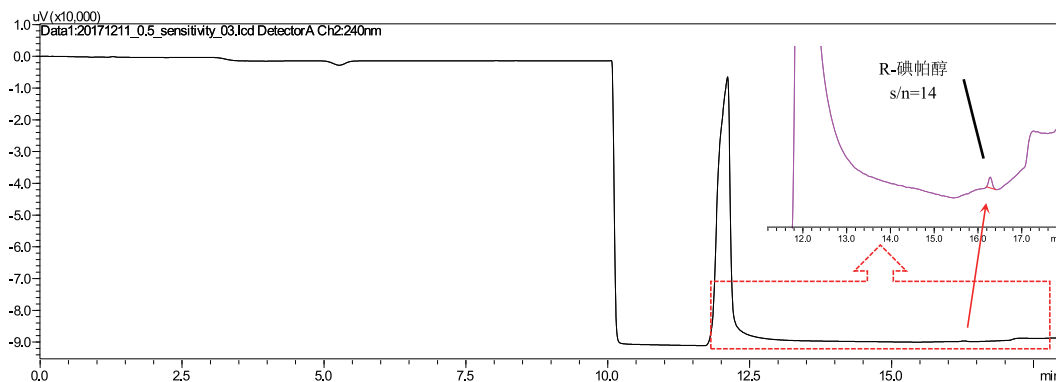


图4 浓度为0.5 mg/L的R-碘帕醇溶液2D LC分析色谱图

浓度为 0.5 mg/L 的 R- 碘帕醇溶液在二维液相色谱上的分离效果如上图所示，7.5–10 min 为 1stD LC 的色谱行为，该处无明显色谱峰；16.7 min 处为经过捕集后的 R- 碘帕醇在 2ndD LC 上的分离结果，S/N 为 14，满足定量分析对定量下限的一般要求。同手性分离的 1stD LC 结果相比（图 6），经过二维液相色谱分离的 R- 碘帕醇灵敏度较之有 10 倍的提升。

2.6 线性

取 R- 碘帕醇适量，以纯水溶解并逐级稀释使成为浓度分别为 125、50、25、10、2.5、2、1 mg/L 的系列标准溶液进样分析，标准曲线及相关信息表明在 1~125 mg/L 浓度范围内，R- 碘帕醇经二维液相色谱分析线性良好，回归系数为 0.9997，各校准点准确度在 97.8~102.3% 之间。

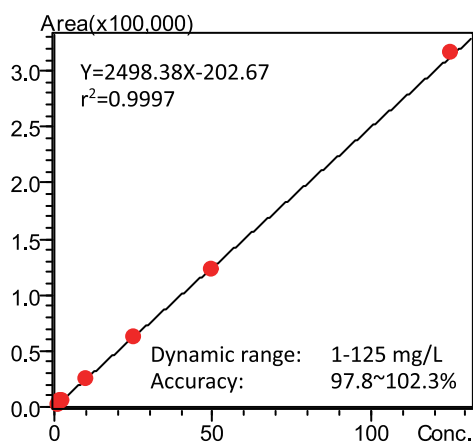


图5 R-碘帕醇样品溶液2D LC分析标准曲线

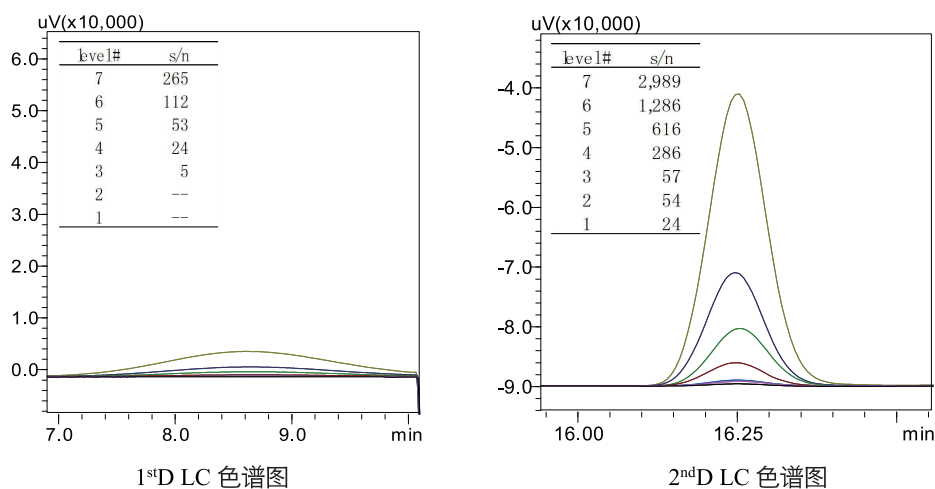


图6 各校准点色谱图及信噪比

2.7 重复性和准确度

以浓度分别为 2.0 和 50.0 mg/L 的 R- 碘帕醇溶液测试系统和分析方法的稳定性, 通过保留时间和峰面积的重复性及测试样品的回收率来表征, 结果表明该系统及方法重复性和准确度良好。

表2 R-碘帕醇样品溶液2D LC分析重复性结果

#	浓度 (mg/L)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	回收率 (X%±SD)
1	2.0	0.03	0.79	104.6±0.4
2	50.0	0.04	0.40	102.5±0.4

2.8 样品分析及加标回收率

称取一定量碘帕醇样品以纯水溶解并稀释使浓度为 0.25 g/L, 进样 2 μL 测定样品中 R- 碘帕醇浓度如表 3 所示。另取相同浓度碘帕醇样品 6 份, 分两组并分别加入一定量 R- 碘帕醇后计算加标回收率, 结果如表 3 所示。

表3 样品测定结果和加标回收率测定结果

#	加标量	测得浓度	加标回收率	RSD (n=3)
样品	-	19.4 mg/L	-	0.9%
加标样品 1	13.68 mg/L	33.5 mg/L	103%	0.3%
加标样品 2	17.10 mg/L	37.6 mg/L	105%	0.8%

结论

本文研究了使用 Prominence HPLC 构建二维液相色谱系统用于造影剂碘帕醇及其手性杂质的分离及定量分析方法的建立。二维液相色谱的使用弥补手性色谱柱效不足的缺点, 既获得两种异构体的有效分离, 又在经过反相色谱分离中获得良好响应。以此建立的二维液相分析方法可在 20 min 内完成 R/S- 碘帕醇的分离和分析, 异构体杂质 R- 碘帕醇的定量下限为 0.5 mg/L, 其在 1-125 mg/L 浓度范围内线性良好, 重复性和回收率满足一般定量分析的需要, 可以作为碘帕醇检测中异构体杂质质量控制的方法予以参考。