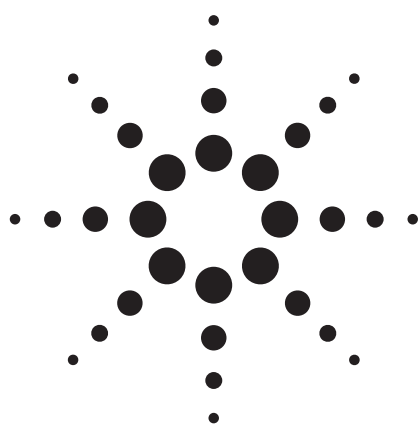




Eclipse Plus C18 柱和 pH 选择性在含氨基药物分析中的作用

应用

药物

作者

John W. Henderson Jr., William J. Long, and Cliff Woodward
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

将三种含氨基药物从其市售剂型中提取出来，并在几种 pH 条件下进行 HPLC 分析，在方法开发中利用 pH 选择性优化分离度。研究发现，Eclipse Plus C18 柱进行含氨基化合物分析时在 pH 2.5 到 7.0 范围内能提供很好的选择性，同时在这些化合物 pKa 附近或远离其 pKa 值的 pH 条件下均能得到良好的峰形。Eclipse Plus 柱之所以能有这样杰出的性能，应当归功于高性能的 ZORBAX 硅胶基质，它降低了硅醇基的活性，采用了先进的键合和封端技术，因而使 Eclipse Plus C18 柱成为含氨基化合物方法开发时改变选择性的良好选择。

引言

在制药行业中，经常用反相 HPLC 分析含氮化合物。生物碱衍生物、抗生素，以及许多生源物质都具有药

理活性。将一个新药推向市场非常昂贵，但也非常有意义。制药行业的竞争要求从药物发现到最终产品的 QA/QC 的各个阶段都提高效率。HPLC 是药物开发的每个阶段中分离和鉴定潜在药物、药物降解产物、杂质、代谢物和其它相关化合物的关键工具。正确选择 HPLC 柱直接关系着实验室的效率，在很大程度上能缩短新药上市的时间。

在本研究中，我们对三种含氨基药物的市售剂型——2 个片剂和一个软膏——进行了 HPLC 分析，证明 Eclipse Plus C18 柱是方法开发（如，在药物开发的 QA/QC 阶段）的首选色谱柱。改变流动相 pH 对改变感兴趣峰与其它峰的选择性和分离度非常有用，但 pH 也可能影响峰形。许多色谱柱在 pH 3 以上都会有活性（离子化）硅醇基。正是这些硅醇基可能与分析物发生相互作用。pH 决定着化合物，特别是含氨基类化合物的离子化程度，同时也决定着它们与 HPLC 柱上离子化的硅醇基之间相互作用的程度。许多色谱柱在中性 pH 下对弱碱和弱酸的分离都出现拖尾现象。但 Eclipse Plus C18 柱却能在 pH 2.7 到 7 范围内对氨基化合物的分离呈现良好峰形。这一点使 Eclipse Plus C18 柱成为选择性实验和方法优化的首选柱。



Agilent Technologies

实验部分

三台 Agilent 1200 系列液相色谱仪均包括二元泵、自动进样器、柱温箱和带半微量流通池的二极管阵列检测器，除流动相外都设置了相同的方法：

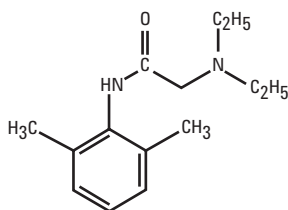
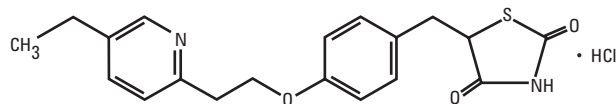
- 系统 1 A: 0.1% 甲酸(v/v) pH 2.7
B: 乙腈含 0.1% 甲酸 0.1% (v/v)
- 系统 2 A: 20 mM 醋酸钠 pH 4.8
B: 乙腈
- 系统 3 A: 20 mM 磷酸钠
pH 7.0
B: 乙腈

这三个系统所用的梯度程序相同，10 分钟内以 1 mL/min 的流速从 10 到 100% B。在 254 nm 和 230 nm 进行 UV

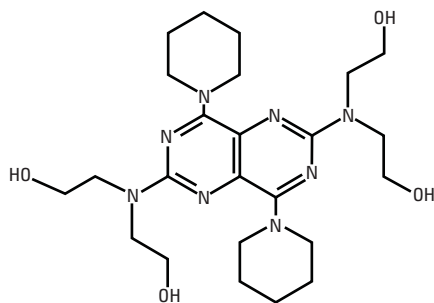
检测。分析柱采用的是 ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 5 μ m, 柱温 40 $^{\circ}$ C。

本文所分析的含氨基药物是盐酸吡格列酮片(Actos, Takeda Pharmaceuticals)、双嘧达莫片(Persantine, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)和利多卡因软膏(E. Fougera & Co.)。将样品制备成 100 mg/mL 活性成分的溶液。两种片剂的样品制备是将片剂用研钵研碎，转移到试管中，加甲醇，超声 10 分钟。提取溶液用 0.45 mm PFTE 注射式过滤器滤至三个自动进样器样品瓶中，后进行 LC 分析。利多卡因的制备过程与之相似，将称量后的软膏至于试管中，用甲醇超声，过滤到自动进样器样品瓶中。化学结构和 pKa 值见表 1。

盐酸吡格列酮 pKa: 5.8 和 6.4



利多卡因 pKa: 7.9



双嘧达莫 pKa: 6.4

图 1. 三种含氮药物的结构和 pKa 值

结果与讨论

含氮药物经常被归为弱酸或弱碱，因为它们在水溶液中发生部分离解。离子化的程度取决于水溶液的pH值和该化合物的pKa值。Henderson-Hasselbach方程描述了它们之间的关系：

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{A}^-] / [\text{HA}]$$

在这里，pH是氢离子浓度的负对数，pKa是50% A-和50% HA时的pH（通常称为电离常数），[A-]和[HA]分别是共轭酸碱的浓度。

应当避免使流动相的pH等于pKa，因为分子互换形式等量存在将导致峰展宽。当pH值与pKa相差一个单位时，分子的95%以一种形式存在，5%以另一种形式存在。当pH相差两个单位时，该比例变成了99:1。最好在与pKa相差两个pH单位的条件下进行分析。另外，氨基(NH+)与硅胶基质离解的硅醇基(SiO-)之间发生相互作用(在pH 3-7之间)，这是第二种保留机制，以及对峰拖尾的影响因素。基于这些原因，使用低pH值流动相更好。

通常在低pH条件下硅醇基的活性最小，碱性化合物的峰形最好。但有时也需要或首选中性pH方法。在许多例子中，通过使用pH缓冲能力良好的流动相，控制其pH值，可以提高分析物与色谱柱之间的选择性相互作用。

双嘧达莫是治疗心脏病的药物，它能使血管舒张，抑制凝血。图2是用Eclipse Plus C18柱在各种pH条件下进行双嘧达莫剂的分析，包括与pKa相差1个pH单位的流动相。尽管双嘧达莫在pH 7和4.8 (pKa 6.4)时有两种形式的平衡，但在接近和远离pKa的三个分离条件下，都得到了良好的峰形。

对药物片剂的分析可能具有挑战性，因为提取出的赋形剂、降解产物或未知成分可能对感兴趣的峰造成干扰。

图2中所用的方法是梯度洗脱。用首选的低pH流动相洗脱时，有一个未知峰（可能是降解产物）与双嘧达莫峰共流出（上图）。未知峰在中间和下面的图中用箭头标记。虽然在梯度方法中不常测定拖尾因子，在这里为了“看见”重叠峰进行了拖尾因子的测定，

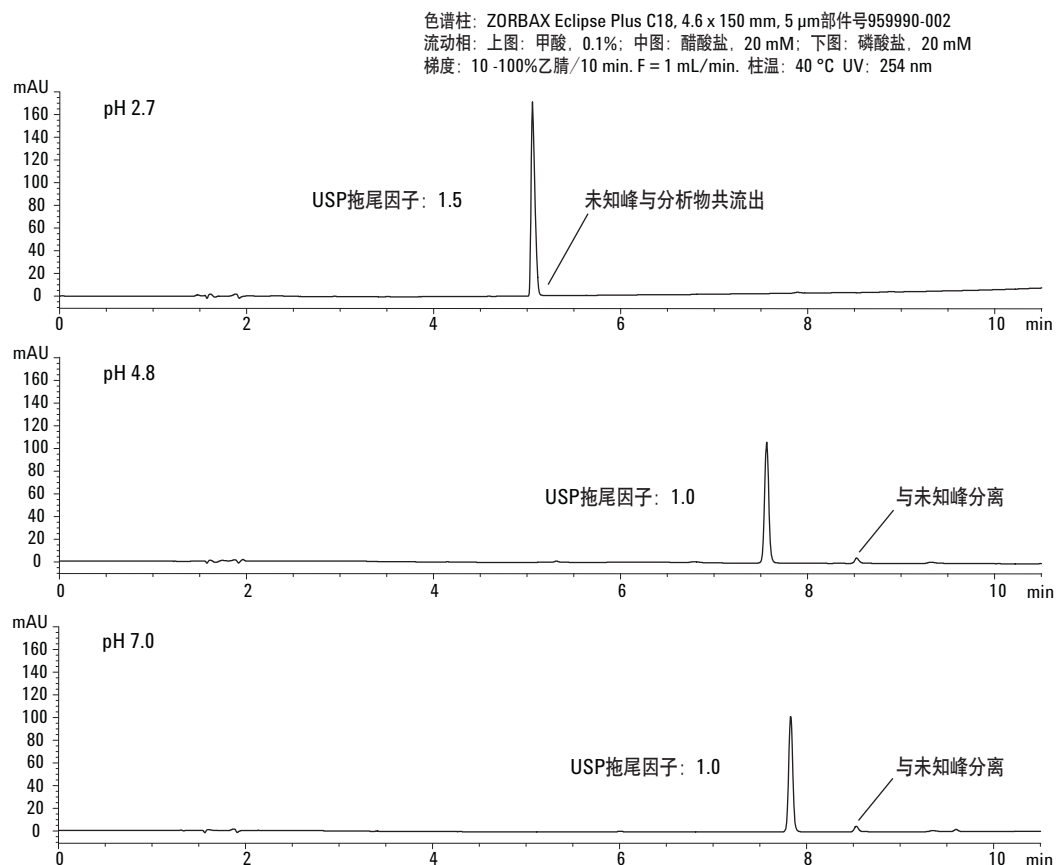


图2. 三种条件下用Eclipse Plus C18柱分析双嘧达莫的峰形和选择性的巨大变化

如，低 pH 条件下拖尾因子较大。在 pH 4.8 和 7 的条件下，选择性得到了改变，两个峰得到了分离。在较高 pH 条件下分离的色谱峰有良好的拖尾因子，这也归功于出色的色谱柱和合适的梯度洗脱方法。

图 3 是另一个药物，吡格列酮，分析条件与图 1 中的相同。吡格列酮用于改善 2 型糖尿病人的血糖控制。同样，当在通常首选的低 pH 条件下分离时，有一个未知峰与分析物共洗脱，见拖尾峰。将 pH 调高，改变了选择性，将吡格列酮峰与未知峰分离，结果得到了更对称的峰。吡格列酮有两个 pKa: 5.8 和 6.4。在 pH 7 条件下与 pH 4.8 相比保留前移，表明该化合物在 pH 6.4 条件下可能比 pH 7 时的极性大。pH 4.8 的保留缘于 2 个正电荷，而 pH 7 时带 1 个正电荷。梯度改变了离子强度可能也起到了一定作用。

第三种药物，利多卡因软膏，是一种皮肤局麻药。这是一种非结合型、单苯环药物，所以在 254 nm 下检测信号不强（数据未显示），但在 218 nm 下吸收更强，利多卡因检测灵敏度更高。图 4 显示了用三种不同缓冲液分离利多卡因的色谱图。醋酸色谱图基线下移是因为醋酸在 218 nm 下有一定吸收。随着梯度的改变，有机相比比例增加，醋酸盐减少，UV 吸收逐渐降低。磷酸盐流动相在 218 nm 几乎没有吸收，所以其基线相对平坦。如在前面的例子中所述，pH 差异强烈地影响着化合物的选择性和分离度，在整个 pH 范围，甚至接近利多卡因 pKa 7.9 的 pH，峰形都非常好。

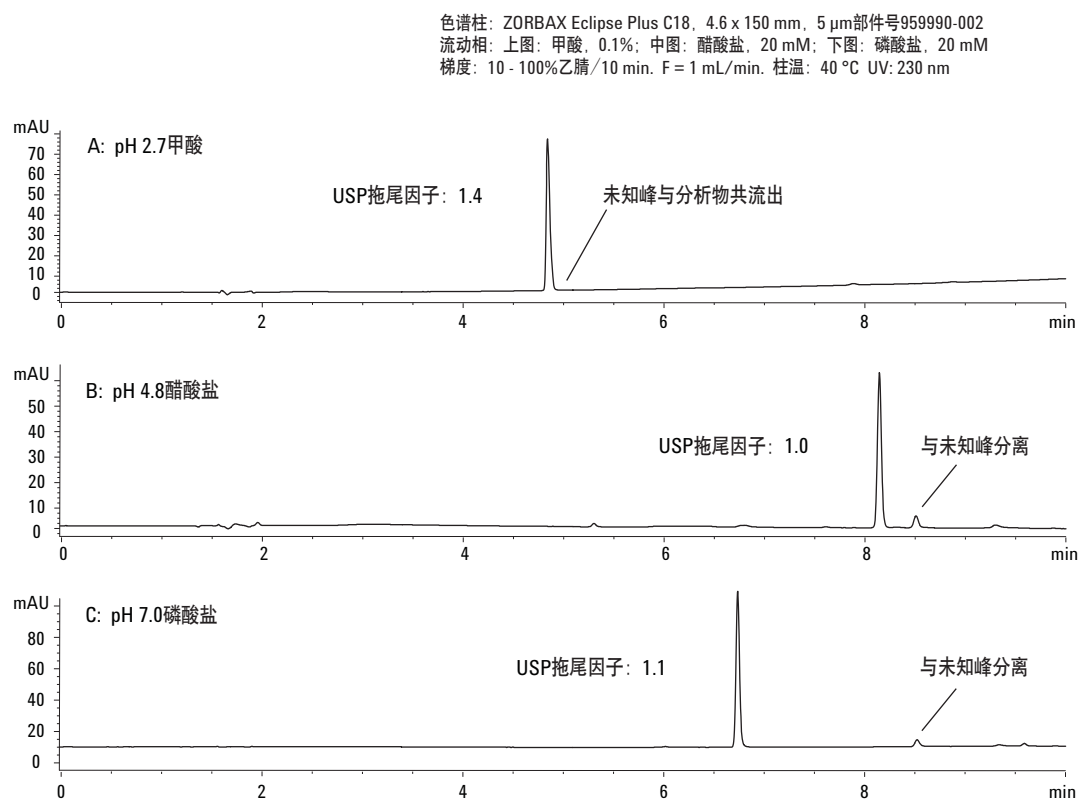


图 3. 三种条件下用 Eclipse Plus C18 柱分析吡格列酮的峰形和选择性的巨大变化

色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 5 μ m 部件号 959990-002
流动相: 上图: 甲酸, 0.1%; 中图: 醋酸盐, 20 mM; 下图: 磷酸盐, 20 mM
梯度: 10 - 100% 乙腈 / 10 min. F = 1 mL/min. 柱温: 40 $^{\circ}$ C UV: 230 nm

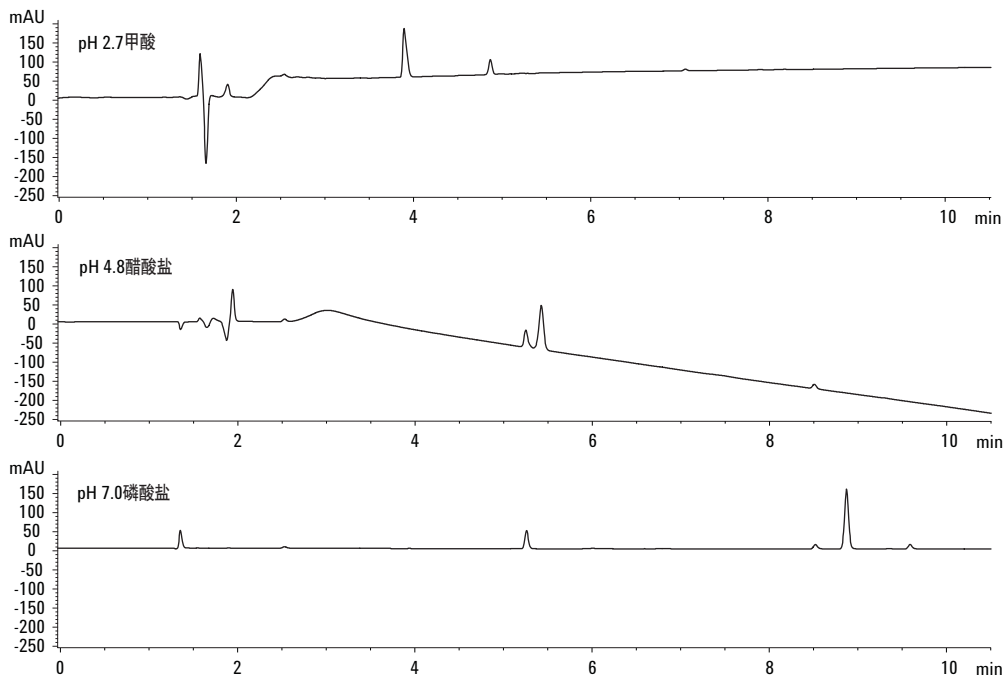


图4. 三种条件下用 Eclipse Plus C18 柱分析利多卡因的峰形和选择性的巨大变化

结论

Eclipse Plus C18 柱使用了增强的 ZORBAX 基质硅胶, 这种硅胶降低了硅醇基/分析物的活性, 采用了先进的键合和封端技术, 进一步减少了峰拖尾。因为这种固定相的硅醇基相互作用少, 有助于通过改变 pH 或阴离子添加剂来改变选择性。在有机相梯度相同, pH 缓冲液不同的条件下, 解离的含氮药物都能从 Eclipse Plus C18 柱上洗脱下来。不同的流动相 pH 条件改变了色谱峰的选择性, 无论远离还是接近分析物 pKa 值, 都保持了良好的峰形。

更多信息

如需了解有关我们产品和服务的更多信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

本文中所含信息仅适用于研究，不可用于诊断。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、介绍和性能指标如有更改恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

2007年8月，中国印刷
5989-5973CHCN



Agilent Technologies