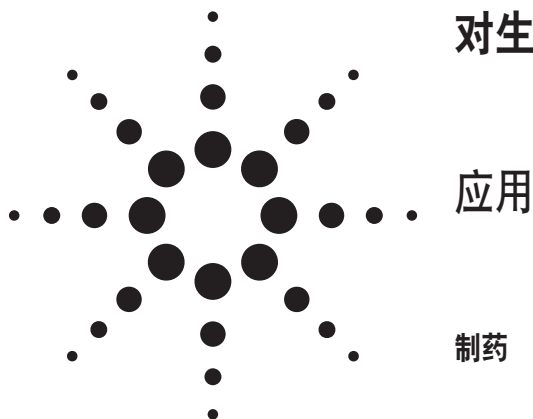


用配置亚 2 微米粒径色谱柱的液相色谱仪改进对生物样品中代谢物的分离



作者

Amanda G. Culp
5 Moore Drive
P.O. Box 13398
GlaxoSmithKline
Research Triangle Park
USA

代谢物只用 LC-MS 鉴定还不够，需要更多结构信息时，用 LC 分离就成了关键步骤，要为核磁共振（NMR）分析等其它鉴定方法提供样品。代谢物要从各种复杂基质中分离，如血浆、尿液、粪便、肝脏和胆汁。在亚 2 微米小粒径柱提供的快速和高分离度的推动下，对常规 HPLC 方法重新评价，是否能作为一种缩短代谢物分离时间的方法[4, 5]。

摘要

近年来，加快新药上市速度的压力越来越大[1]。但是，对分析的各方面要求也要在提高的速度下得到满足，不能影响分析的质量。最近采用亚 2 微米小柱进行液相色谱分离，分离速度更快、分离度更高。从复杂基质（如血浆、尿）中分离代谢物时，提高样品分离速度，要求所收集的代谢物纯度和回收率不可以降低。本文证明了小粒径色谱柱在分离低水平代谢物中的优势。

引言

在药代动力学(DMPK)研究中，体外和体内实验的目的都是鉴定与药物相关的组分 [2,3]。当某些特殊代

实验

高分离度快速液相色谱

用一些实验来确定，在高分离度快速液相色谱（RRLC）系统上用 1.8 微米色谱柱是否改善了色谱分离。所用的 RRLC 系统见图 1。

- 1200 系列 SL 型二元泵，配置微量真空脱气机
- 1200 系列高性能自动进样器
- 1200 系列柱温箱
- 1200 系列高速可变波长检测器
- 1100 系列分析级馏分收集器



Agilent Technologies

色谱柱采用几种不同柱长和填料粒径的 ZORBAX SB-C18。为了保持恒定的样品加载量和流速，内径固定在 4.6 mm。要获得合适体积的馏分，流速设置约为 1 mL/分钟。所用色谱柱的详细情况如下：

- 4.6 x 250 mm, 5 μ m, 部件号 880975-906
- 快速分离 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m, 部件号 863953-902
- 快速分离高通量 4.6 x 150 mm, 1.8 μ m, 部件号 829975-902
- 快速分离高通量 4.6 x 100 mm, 1.8 μ m, 部件号 828975-902

相关的方法参数包括：流动相 A: 10 mM 醋酸铵，用醋酸调至 pH 5.0，流动相 B: 75:25 乙腈: 甲醇。可变波长检测器(VWD)检测波长 235 nm，峰宽设置 > 0.005 分钟，或 0.12-秒响应时间，配置标准流通池(部件号 G1314-60086)。

原方法(4.6 x 250 mm 柱)的梯度表如下：

时间	%B
0	20
35	35
50	55
55	100
55.1 到 60	20

快速分离（RR）和快速分离高通量（RRHT）柱越短，时间将成比例地缩短。

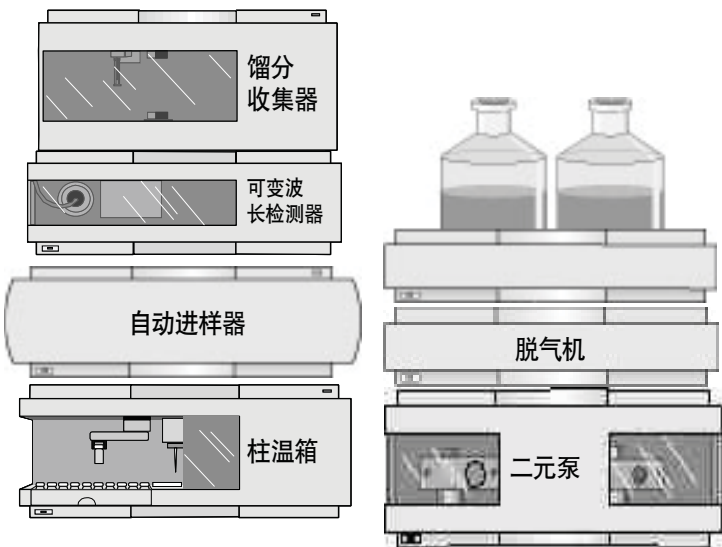


图 1. 快速同时检测和分离药物代谢产物的 RRLC 系统

样品

尿样的分析结果见图 2 和图 3。尿液样品的制备包括，取 10 倍量的尿液在室温下真空离心干燥浓缩，然后用起始流动相复溶。进样前，样品再次离心，去除微粒。

这种方法也可以用于血浆、肝脏匀浆和粪便匀浆。样品制备包括，用三倍体积的溶剂（1:3，样品：乙腈）旋涡混合分别提取三次，并离心。取出上清，混合，干燥。提取物用起始流动相复溶，离心，然后进样。在大多数情况下，胆汁可以不经样品制备直接进样。

尿样分析的结果见图 1 和图 3。鉴定出的感兴趣药物代谢物为色谱图中的 M5、M13、M15 和 M17。

结果与讨论

在我们实验室里，因为待测样品的复杂性，用 4.6 mm x 250 mm, 5 微米柱进行色谱分析的时间，可能在 60 分钟到 3 个小时。本研究的目标就是要用现有的方法，在保持分离度和测试量的同时，缩短分析时间。

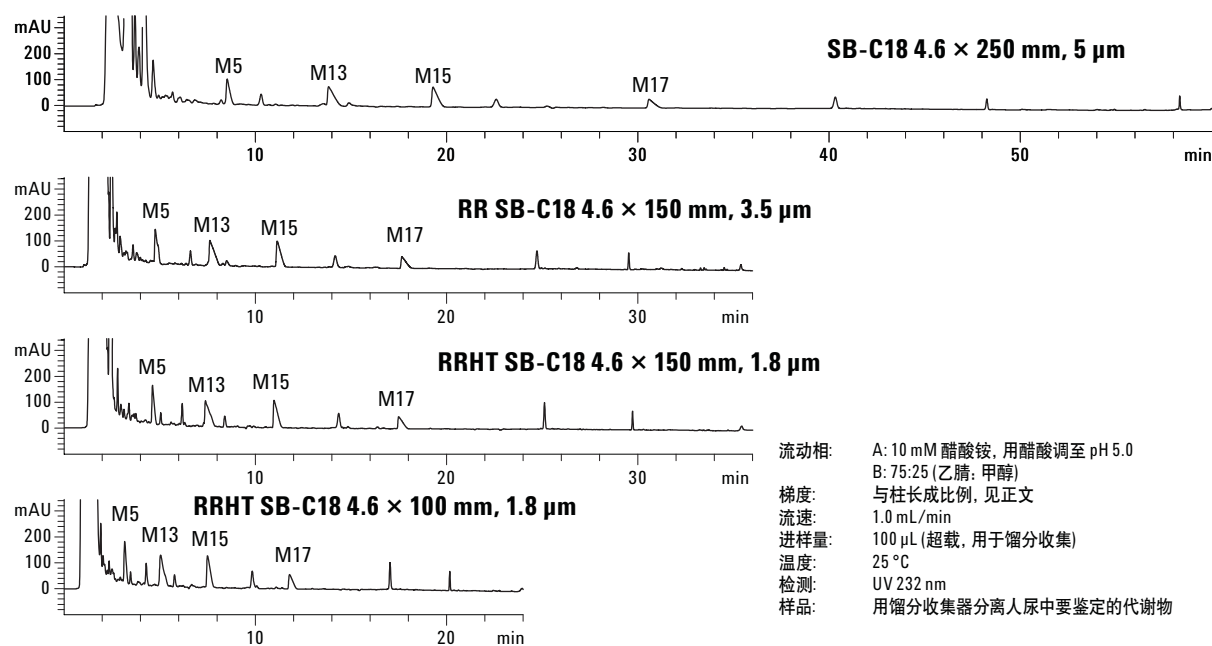


图 2. SB-C18 柱的可缩放性提高了 DMPK 代谢物分离方法的通量

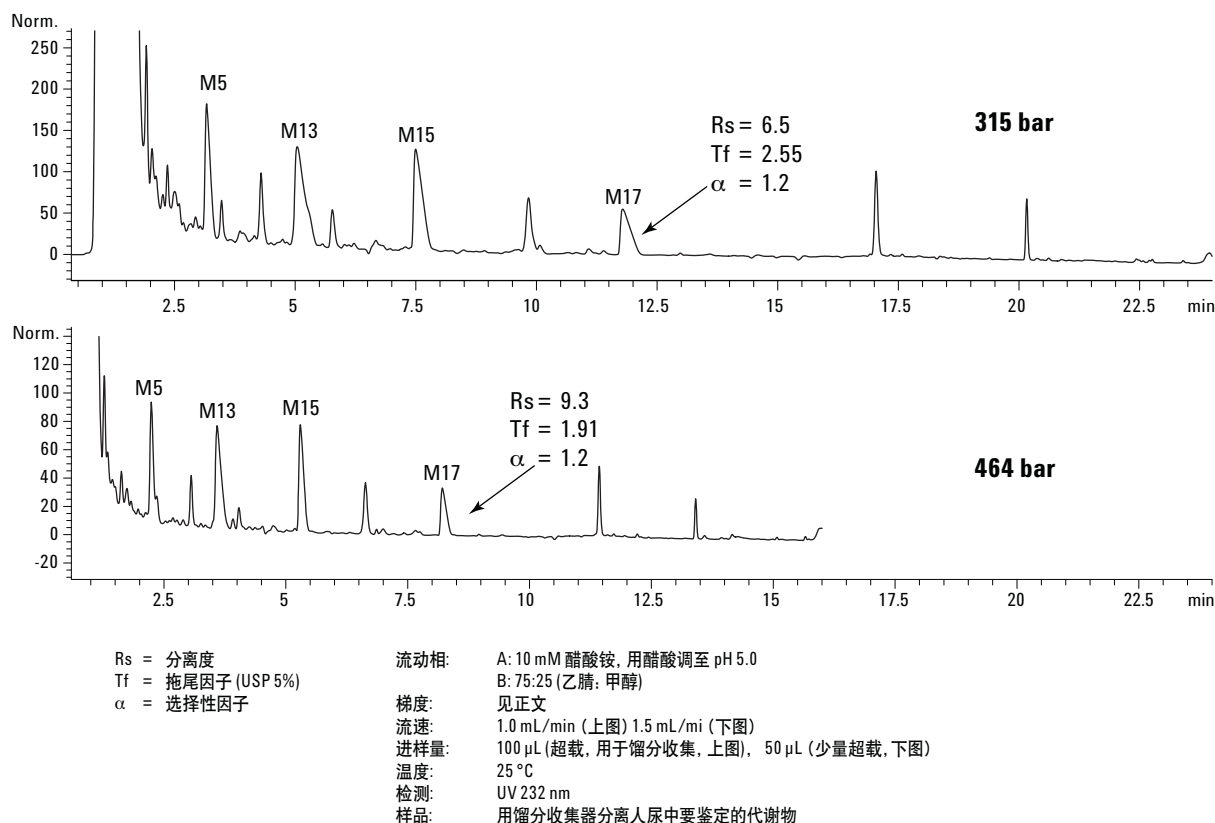


图 3. 在 RRHT 分析中提高流速和减少进样量的结果

每次进样加载物质的量部分地决定了所用的柱内径。通常, 感兴趣的代谢物以每毫升纳克到微克水平存在于基质中, 大量内源性物质占样品中的绝大部分。为了从内源性物质中获得最大量的代谢产物, 经常要使色谱柱超载。大量内源性物质加载到色谱柱上, 导致超载, 影响色谱分离的完整性。要减少内源性物质与感兴趣代谢物的共洗脱, 必须采取少量多次进样。对这种长达 1 小时的分析, 多次进样只分离非常少量的物质, 显得相当浪费时间。

虽然我们实验室不要求高通量, 但提高通量还是很重。这里显示的是用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱快速分离柱得到的结果。代谢研究中经常要

用 ^{14}C 同位素标记化合物, 将其作为一种有效方法, 鉴定被内源性化合物背景掩盖下的药物相关物质。用亚 2 微米色谱柱进行的这类研究将在以后的论文中发表。这里分析的是第一次从人体实验得到的样品, 药物没有标记 ^{14}C 同位素标记。为了分离制备, 只监测和报告了 UV 响应。

在图 2 中, 显示了对尿样分析的比较, 样品中需要分离的代谢物水平非常低。原来在 ZORBAX SB-C18 4.6 mm x 250 mm, 5 μm 柱上建立的方法, 分析时间为 60 分钟。本样品在用于比较的 4.6 mm x 100 mm, 1.8 μm 柱和 4.6 mm x 150 mm, 1.8 μm 及 3.5 μm 柱上分离。梯度曲线按柱长比例更改。

正如所期望的，随着粒径和柱长的减少，分离度和 UV 响应都有了增加。对每根色谱柱每种代谢物 UV 响应和峰宽的比较见表 1。每种代谢物的峰形都有明显改善，可以看到理论塔板数的增加。请注意，如果用更小的 2.1 μm 内径柱，柱效还有可能进一步改善。

图 2 还显示了方法的耐用性和用 SB-C18 的可缩放性。不同的柱子配置，包括粒径和长度，对选择性的影响很小。从四种分离都具有相同的洗脱曲线就可以看出这一点。由于为了每次分析纯化出大量的代谢物，有意识地让色谱柱超载，所以感兴趣的峰有拖尾现象。

结论

结果表明 RRHT 技术提高了实验室的效率。用 RRHT 柱取代常规色谱柱，在不影响分离度的情况下，提高了通量。最大的收获是用更小粒径(1.8 或 3.5 μm)色谱柱，分离度的提高最大。用 RRHT 柱取代了常规尺寸色谱柱后，峰高和峰宽都有了改善。另外，分析时间与柱长成比例地缩短。这些优点将带来实验室效率的提高。本方法在对复杂基质进行分析时（例如，尿和血浆）很容易在不同配置的 SB-C18 柱（包括不同的粒径）之间放大和缩小，最大限度地简化了样品制备。

表 1. 用各种柱配置得到的峰高和峰宽

	M5	M13	M15	M17
4.6 x 250 mm, 5 μm	105 mAU	75 mAU	75 mAU	25 mAU
60 分钟	30 秒	48 秒	48 秒	60 秒
4.6 x 150 mm, 3.5 μm	145 mAU	100 mAU	100 mAU	40 mAU
36 分钟	22 秒	34 秒	33 秒	48 秒
4.6 x 150 mm, 1.8 μm	165 mAU	105 mAU	105 mAU	45 mAU
36 分钟	18 秒	34 秒	30 秒	36 秒
4.6 x 100 mm, 1.8 μm	180 mAU	135 mAU	130 mAU	55 mAU
24 分钟	17 秒	33 秒	24 秒	30 秒

用 RRHT 4.6 x 100 mm 柱取代常规的 4.6 x 250 mm, 5 μm 柱时，同样的进样量，峰高平均增加了 46%，峰宽变窄了 44%。从而最大限度地减少了分离制备时峰的重叠，不再需要合并馏分。另外，分析时间也缩短了一半。这一优势使实验室效率有所提高。

将流速从 1 mL/min 增加到 1.5 mL/min，进样量从 100 μL 减少到 50 μL ，将进一步提高柱效。图 3 是将图 2 中的 RRHT 方法稍微进行了优化，重叠现象有所改善。分析速度快了 3.8 倍，峰形也有所改善。1.5 mL/min 分析时的系统反压（最大）为 464 bar，1 mL/min 分析时为 315 bar，两者都在 Agilent 1200 RRLC 的操作范围内(600 bar)。ZORBAX 1.8- μm 填料的粒径分布经过了专门设计，压力比其它亚 2 微米填料更低。

参考文献

1. M. Rouhi, *Chemical and Engineering News*, June 19 (2006) pp. 26-28.
2. D. Dalvie, *Current Pharmaceutical Design*, 6 (2000) pp. 1009-1028.
3. J. G. Dain, J. M. Collins, and W. T. Robinson, *Pharmaceutical Research*, Vol. 11 No. 6 (1994) pp. 925-928.
4. A. D. Broske, R. D. Ricker, et. al. The Influence of Sub-Two-Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies publication, 5988-9251EN.
5. W. E. Barber, M. Joseph, and A. D. Broske, Increasing Sample Throughput Using ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT Columns, Agilent Technologies publication, 5988-9997EN.

致谢

作者希望感谢 GlaxoSmithKline 的 Stephen Castellino, 和安捷伦科技公司 (Little Falls Site, Wilmington, DE) 的 John W. Henderson Jr., 感谢他们对本文的有益贡献。

更多信息

如果需要进一步了解我们的产品和服务, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误, 以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2007 年
2008 年 1 月中国印刷
5989-6668CHCN



Agilent Technologies