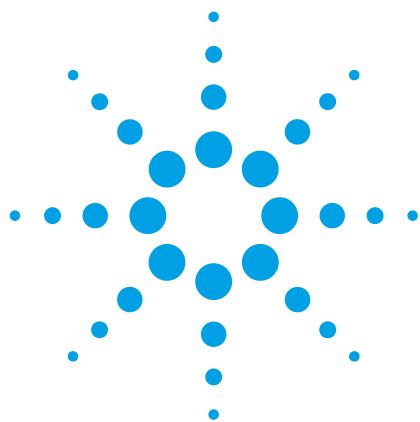




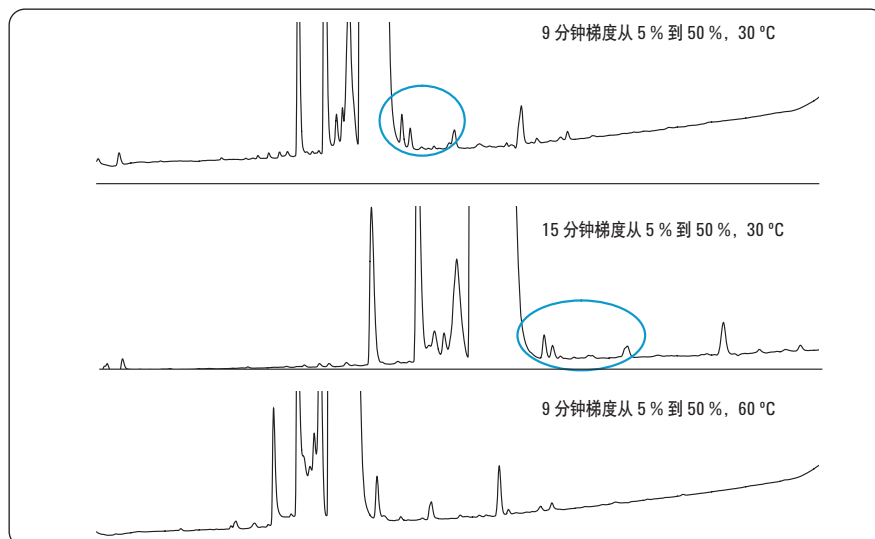
Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案在分析倍他乐克片降解产物中的应用

应用报告

药物研发

作者

Angelika Gratzfeld-Hüsken
安捷伦科技公司，
德国，Waldbronn



摘要

Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案具有最大的灵活性和高度自动化。本文将该系统用于寻找分析药物降解产物的最佳分离条件。以倍他乐克片为例，将其暴露在高温条件下，使其产生降解产物，在几根色谱柱上进行了如下分析：

- 用安捷伦化学工作站方法筛选向导自动设置方法和序列
- 不同选择性的 6 根 Agilent ZORBAX RRHT 色谱柱
- 不同流动相
- 不同温度和梯度



Agilent Technologies

前言

在进行新药开发时，分析活性药物的存放期限和稳定性非常重要，必须确保最终的片剂不会生成无法预期和潜在有害的降解产物。这些片剂要在不同条件下进行破坏试验，并分析其降解产物，一般采用 HPLC 法。为了保证没有其它异常化合物与主成分共洗脱，必须确定所用的分析方法可以分离样品中的所有化合物。因此，需要进行液相色谱分析方法开发。一般来说，为了实现快速筛选，并对方法最终微调获得良好的起始条件，开始要试验一系列色谱柱和溶剂。这种方法筛选过程有助于找到分离目标系列化合物的最适宜色谱柱和流动相。通常，由于整个过程不能自动进行，所以非常费时。

Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案提供了一个高度灵活的系统，最多可以使用 8 根 100 mm 长的色谱柱，或 6 根 300 mm 长色谱柱。另外，安捷伦化学工作站的方法筛选向导将自动设置方法和序列，以筛选各种色谱柱、溶剂、预设梯度和温度的组合。另外，为了进行全自动方法开发和优化，该系统还可以与复杂的方法开发软件相结合，如：

- 来自 ACD/Labs 用于化学工作站的 ACD/AutoChrom
- 来自 ChromSword Baltic 用于化学工作站的 ChromSword Auto

在本应用报告中，我们将报导：

- 以信他乐克片降解产物为例，如何用安捷伦化学工作站方法筛选向导设置序列
- 用 6 根不同色谱柱和两套不同流动相分析降解产物
- 用一根色谱柱和两种不同梯度，采用两种不同温度进行微调

实验

仪器

Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，组合了 Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案。该液相色谱系统由以下模块组成，固件版本 A.06.01 或更高：

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵，配置脱气机
- Agilent 1200 系列 SL plus 高效自动进样器
- 2 个 Agilent 1200 系列 SL plus 柱温箱 (G1316C)，已安装阀驱动
- 安捷伦方法开发阀工具包，高压
- 安捷伦方法开发毛细管工具包，低扩散，适用于短柱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器 (DAD)
- 几根 Agilent ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 色谱柱，1.8 μm 填料粒径
- 安捷伦化学工作站 B04.01，含安捷伦化学工作站方法筛选向导

样品制备

2 片含药 50 mg 的信他乐克片，分别研磨，并 80 °C 加热 3 小时。残渣溶解于 4 mL 水中。用 2 支注射式过滤器去除不溶性颗粒 – 先用 Minisart 0.8 μm 过滤器，然后用安捷伦 0.45 μm 过滤器。进样 1 微升滤液至液相色谱系统。

结果和讨论

安捷伦化学工作站方法筛选向导

安捷伦化学工作站方法筛选向导是安捷伦化学工作站的附加软件。用于以简便而合理的方式生成方法和序列表，以筛选选定的色谱柱、溶剂、预设梯度和温度。

方法筛选实验的设置包括几步：

• 创建新的筛选实验（图 1）

这一步包括为实验和其根文件夹命名并加以说明，通常这是设置一个新实验的开端。或者也可以调用或修改预定义的筛选实验。当最初方法筛选的标准化步骤必须用新样品重复时，这种方式将非常有用。

• 确定筛选实验（图 2）

这一步包括选择主要方法和实验范围。在筛选过程中所有保持不变的参数（例如，检测器设置）均来自主要方法。

• 设置色谱柱筛选（图 3）

在这个屏幕上，选择了要评价的色谱柱。这里列出的色谱柱必须在仪器界面中的更多柱温箱组合>配置色谱柱屏幕中预先确定>，这样才能被安捷伦化学工作站方法筛选向导自动识别。

• 设置溶剂选择（图 4）

安捷伦化学工作站方法筛选向导识别系统中有哪种类型的泵（二元泵或四元泵）。还要确定是外部溶剂选择阀（G1160A）还是内部溶剂选择阀（只用于二元泵）。软件中显示的溶剂为其预先定义的名字。



图 1.
开始一个实验

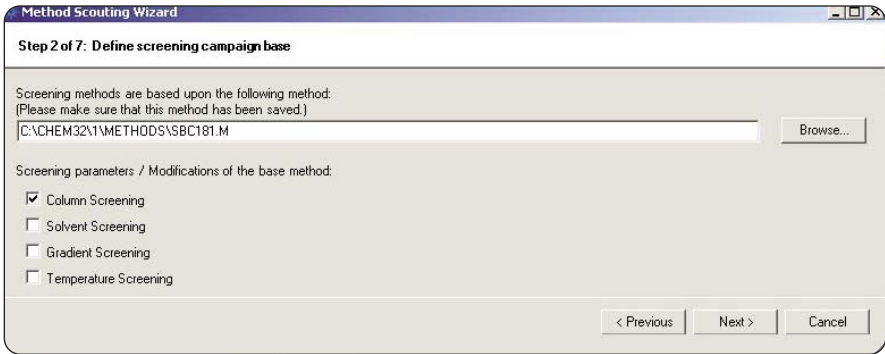


图 2.
定义实验范围并选择主要方法

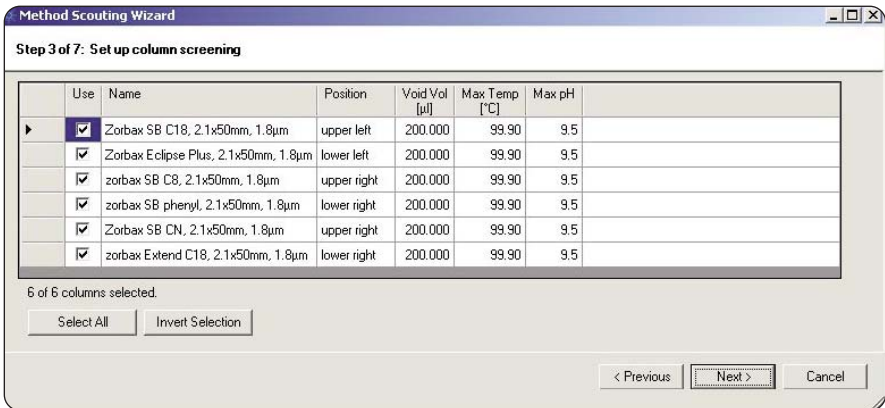


图 3.
选择色谱柱

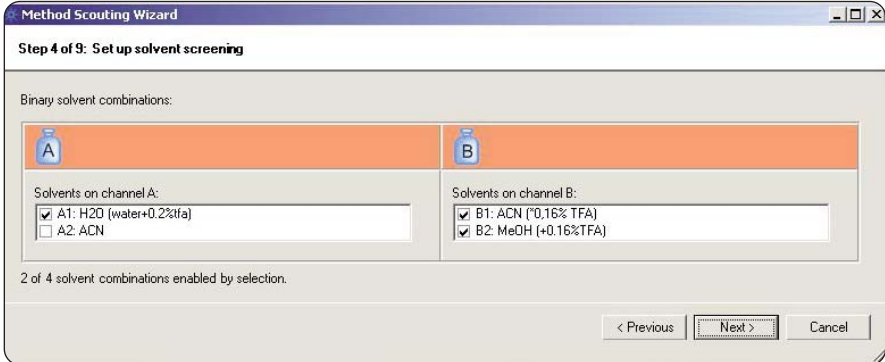


图 4.
选择溶剂组合

• 设置梯度选择 (图 5)

如果要为筛选实验选择预先设置的梯度, 将出现图 5 所示的屏幕。在这里, 定义梯度既可以用图形也可以将相关条目输入梯度表中。同样, 也可以选择预先设置的温度, 并添加到筛选列表中 (未显示)。

• 浏览并选择方法 (图 6)

在下面的屏幕中, 可以创建需要的色谱柱和方法组合, 并进行浏览。如果不需要全部筛选列表, 用户可以只选择需要的组合。同样, 与选定色谱柱不匹配的温度和溶剂组合也将自动剔除。这对延长柱寿命非常有用。

• 设置平衡和冲洗 (图 7 和图 8)

在这里将确定“冲洗和色谱柱维护”参数和平衡时间。冲洗设置需要确定废液和/或旁路位置。该设置有许多不同的选择, 涵盖了各种不同情况, 如更换溶剂时混溶和不混溶溶剂, 脱气机不同的位置, 及使用后对色谱柱的各种处理过程。

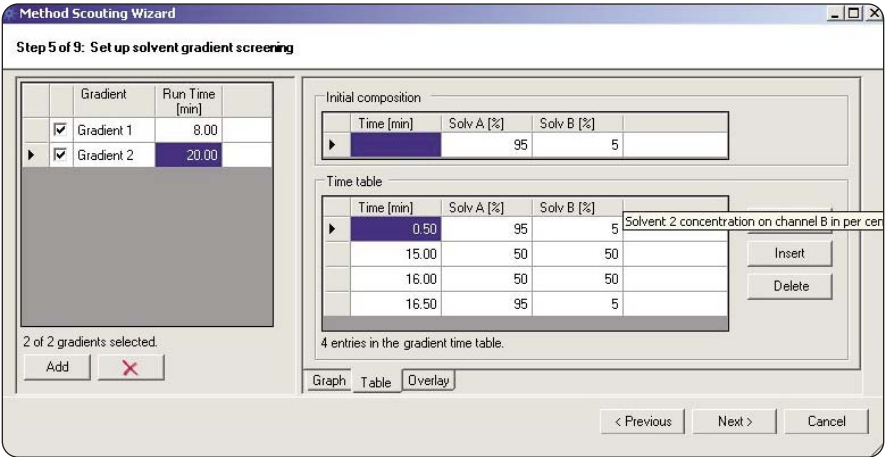


图 5.
设置不同梯度

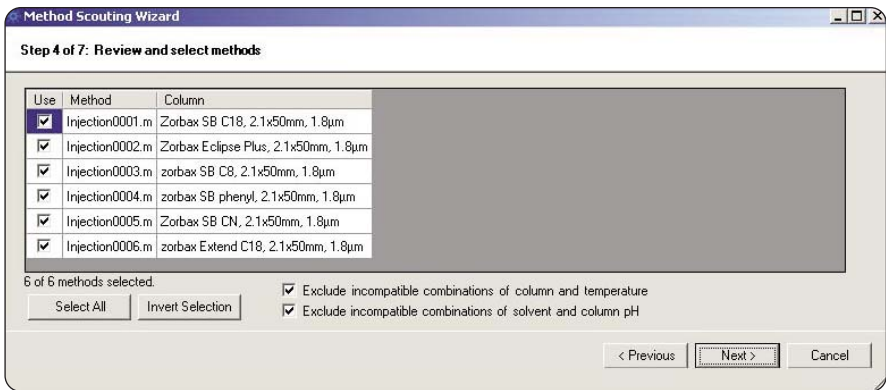


图 6.
浏览并选择方法

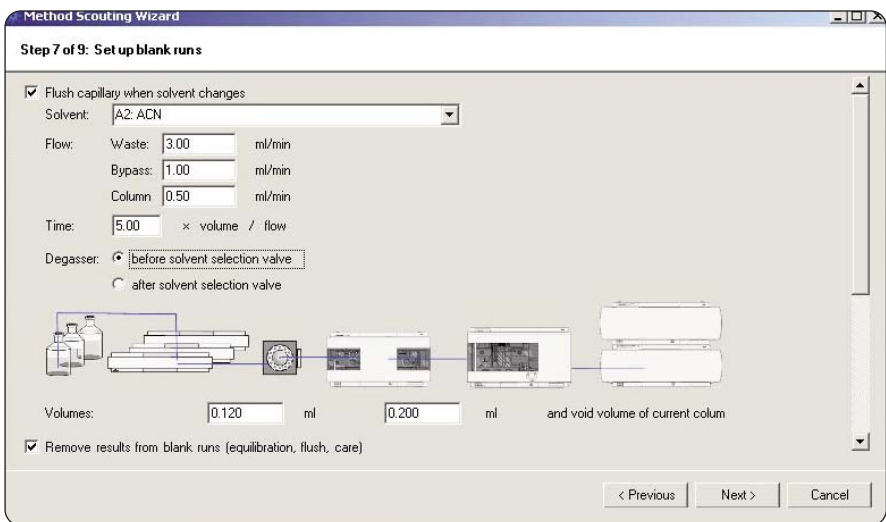


图 7.
溶剂更换时的冲洗条件

• 设置样品 (图 9)

在此屏幕上定义样品。另外，还要指定每个样品瓶的进样次数、进样量和样品瓶体积。为方便用户，计算了整个序列所需要的样品量。点击“添加”即可加入更多的样品行。

• 总结 (图 10)

最后，总结屏将为用户提供整个筛选实验的信息，包括实验说明、序列总结和预计溶剂用量和产生的废液量。点击“完成”按钮，生成所有方法并保存在项目文件夹中，保存序列，保存筛选实验说明。

实验设置完成后，加载序列并启动。

实例

在下面的实例中，我们选择了一个含主要化合物倍他乐克和降解产物的样品。

选择如下工作流程：

- 在 C18 柱上得到第一张分析色谱图
- 用两套流动相在 6 根不同色谱柱上进行测试
- 选择色谱峰最多的色谱柱和流动相组合
- 对选定的色谱柱改变梯度和温度
- 选择最终条件

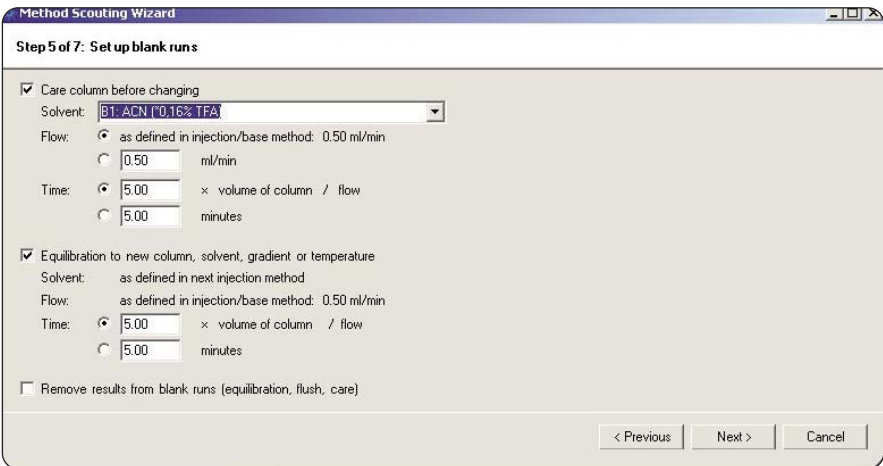


图 8.
设定色谱柱保养和平衡运行方法

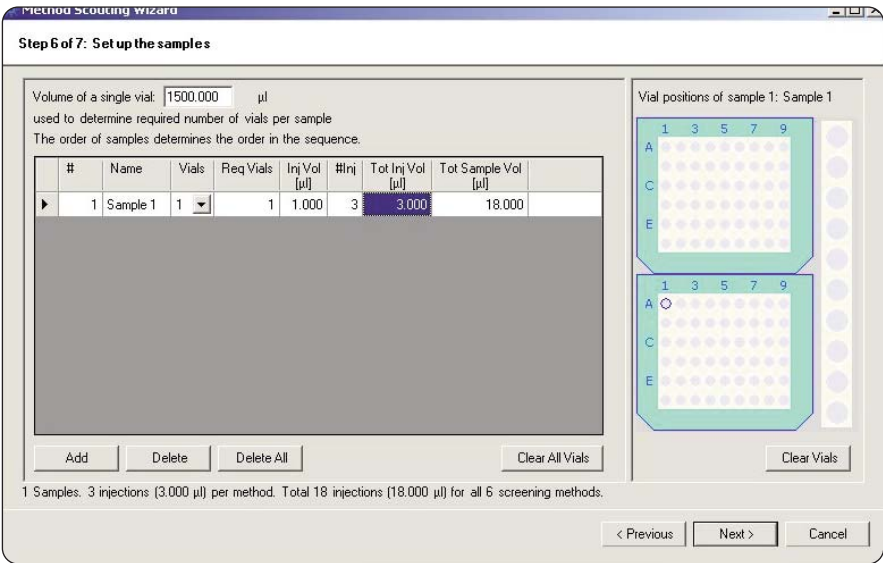


图 9.
设置样品

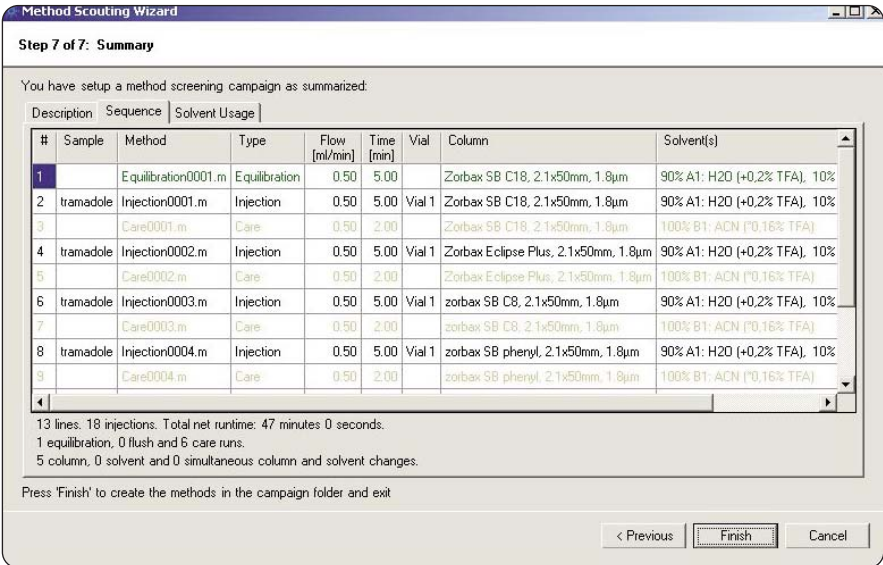


图 10.
自动生成的序列

样品: 倍他乐克 + 分解产物
色谱柱: 2.1 x 50 mm 色谱柱, 填料粒径 1.8 μ m
流动相: 水 + 0.2 % TFA / ACN + 0.16 % TFA
流速: 0.5 mL/min
梯度: 5 分钟 5 % 到 50 %
进样量: 1 μ L
柱温: 30 $^{\circ}$ C
DAD: 210, 230, 254, 280/10 nm, 参比
360/100 nm, 3 mm 检测池, 20 Hz
配置: 低延迟体积配置, 0.12 mm 毛细管和低
扩散热交换器

方法筛选实验选择了 6 根不同的色谱柱，如图 12 所示。用安捷伦化学工作站方法筛选向导设置序列。选择的溶剂组合是乙腈 (ACN) 和水，以及甲醇和水。都用 TFA 作改性剂。主要方法设置后，启动安捷伦化学工作站方法筛选向导，设置相应的序列。6 根色谱柱用乙腈和水作为流动相得到的色谱图如图 12 所示。甲醇和水组合没有得到更好的结果。

样品: 倍他乐克分解产物
色谱柱: 2.1 x 50 mm 色谱柱, 填料粒径 1.8 μ m
流动相: 水 + 0.2 % TFA / ACN + 0.16 % TFA 或
水 + 0.2 % TFA / 甲醇 + 0.16 % TFA
流速: 0.5 mL/min
梯度: 5 分钟 5 % 到 50 %
进样量: 1 μ L
柱温: 均为 30 $^{\circ}$ C
DAD: 210, 230, 254, 280/10 nm, 参比
360/100 nm, 3 mm 检测池, 20 Hz
配置: 低延迟体积配置, 0.12 mm 毛细管和
1.6 μ l 热交换器

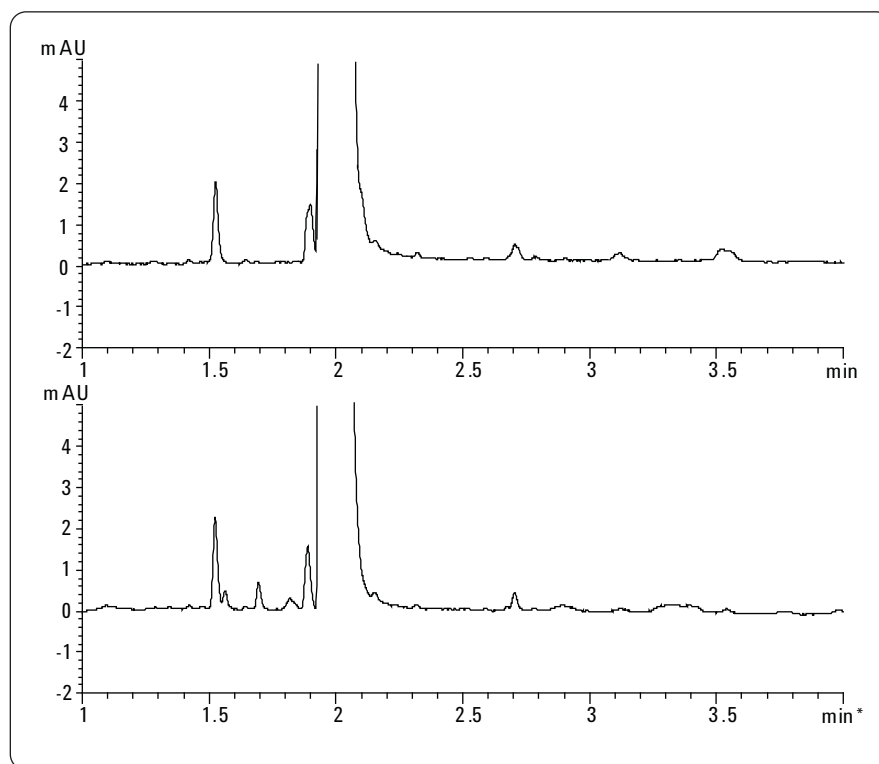


图 11.
第一次测试的色谱图, 上图: 新片剂, 下图: 加热降解的片剂

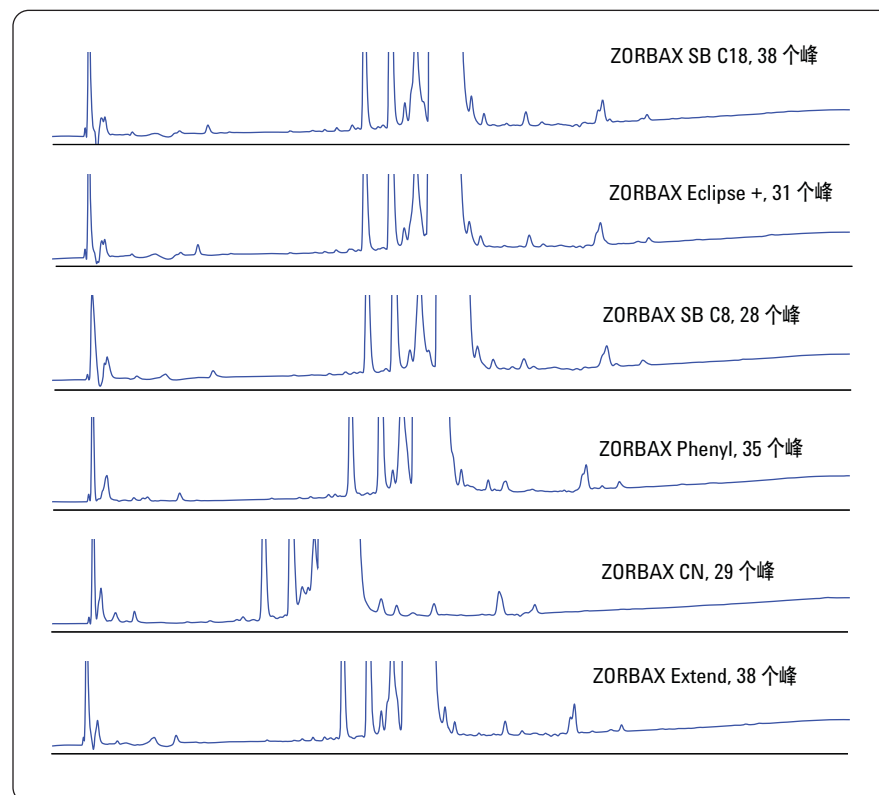


图 12.
方法筛选实验结果

选择了性能最佳的 Agilent ZORBAX SB-C18 柱。实验表明要看到最多的色谱峰需要用两个波长检测（图 13）。

整个色谱柱筛选过程使用了 6 根色谱柱和 2 套流动相，在特定的色谱条件下，耗时 6 小时——而且是在完全无人照管的情况下完成的。

在接下来的实验中，用选定的色谱柱试验了 2 种不同的乙腈梯度和 2 个温度，见图 14 和 15。显然在 30 °C 条件下运行变化较缓的梯度能得到最佳分离，尤其是对于那些在主峰后洗脱的色谱峰。

微调过程用选定的色谱条件用时 2.5 小时，完成对 2 个不同温度的 2 个梯度的评估。

最终的方法选定了下列条件（见图 14 和 15 中间的色谱图）：

- 色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m 粒径
- 流动相：水 + 0.2 % TFA / ACN + 0.16 % TFA
- 流速：0.5 mL/min
- 梯度：15 分钟 5 % 到 50 %
- 进样量：1 μ L
- 柱温：30 °C
- DAD：210, 280/10 nm, 参比 360/100 nm, 3 mm 检测池, 20 Hz
- 配置：低延迟体积配置, 0.12 mm 毛细管和低扩散热交换器

在图 16 中，比较了倍他乐克及其降解产物的色谱图。某些光谱与主化合物的色谱图非常相似。要进一步解析结构，可以将方法转移到相应的 LC/MS 系统上，如 Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间液相色谱质谱系统。

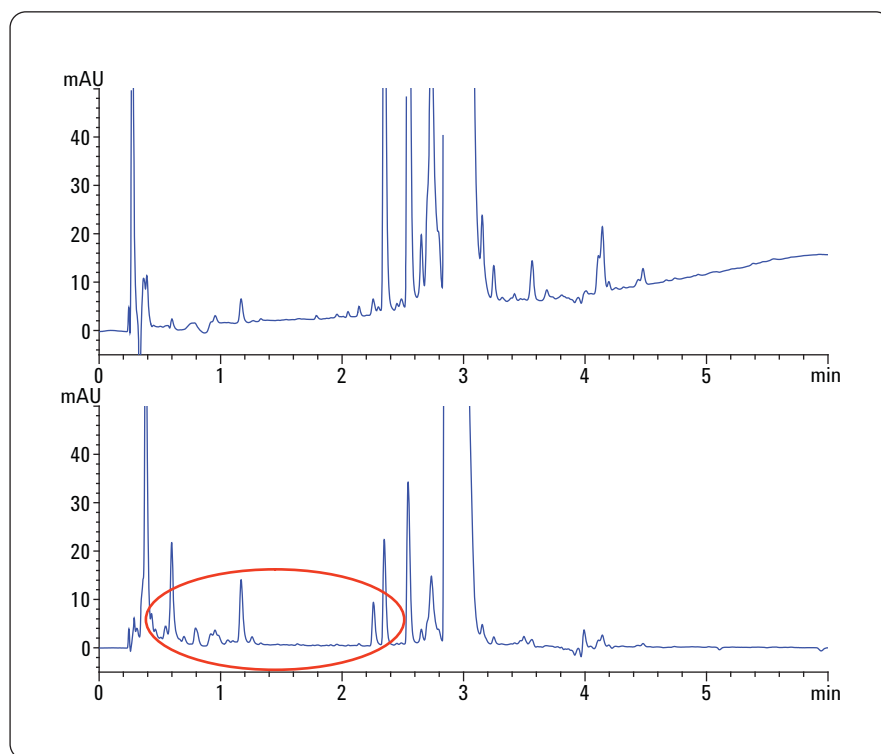


图 13.
用两个波长检测到更多的色谱峰

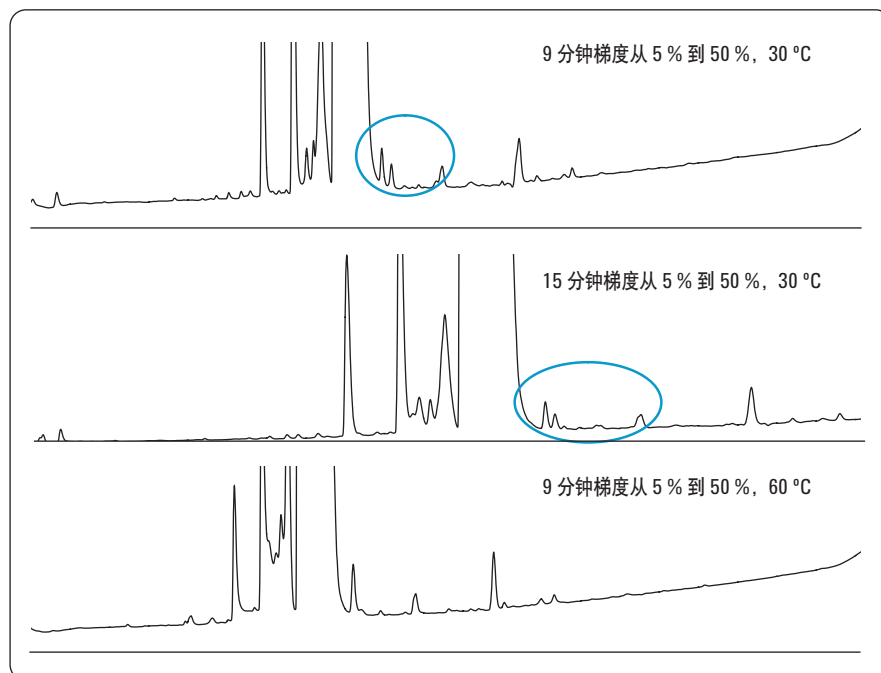


图 14.
在 230 nm 检测波长下进行方法微调

结论

Agilent 1200 系列方法开发解决方案提供了最大的灵活性, 并具备最高性能。筛选实验设置采用安捷伦化学工作站方法筛选向导, 非常简便而合理。即时是几根色谱柱和几套流动相的复杂序列也可实现自动设置, 不需要手动创建方法。另外, 只要点击几下, 即可自动设置色谱柱维护、冲洗和平衡方法。

将安捷伦化学工作站方法筛选向导用于开发倍他乐克片降解产物的分离方法。在不到一个工作日内, 筛查了 6 根色谱柱和 2 套溶剂的所有组合, 并用 2 种不同梯度和 2 个不同温度进行了微调。在大多数情况下系统在无人照管下运行, 操作者可以从事其它工作。

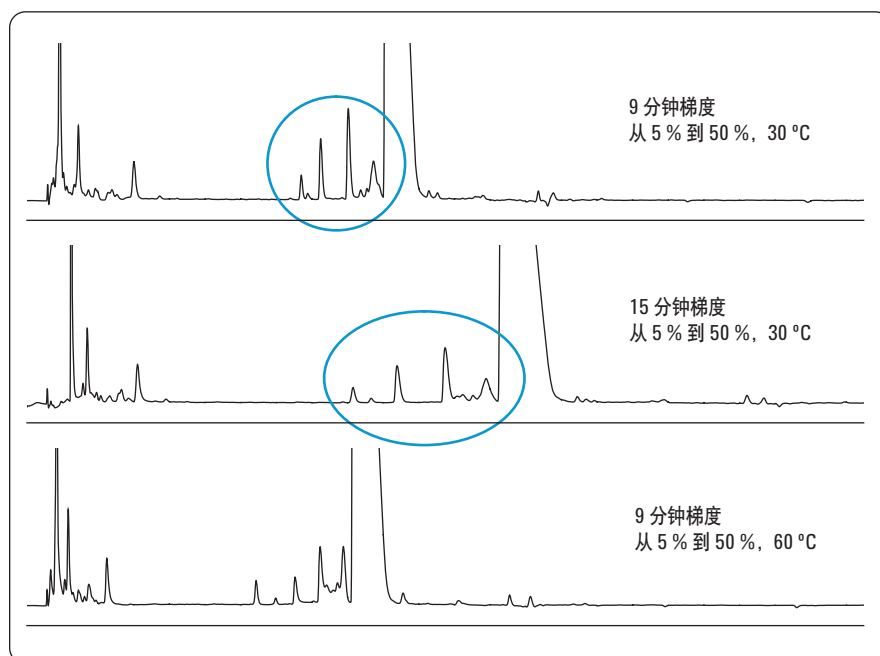


图 15.
280 nm 检测波长下的微调

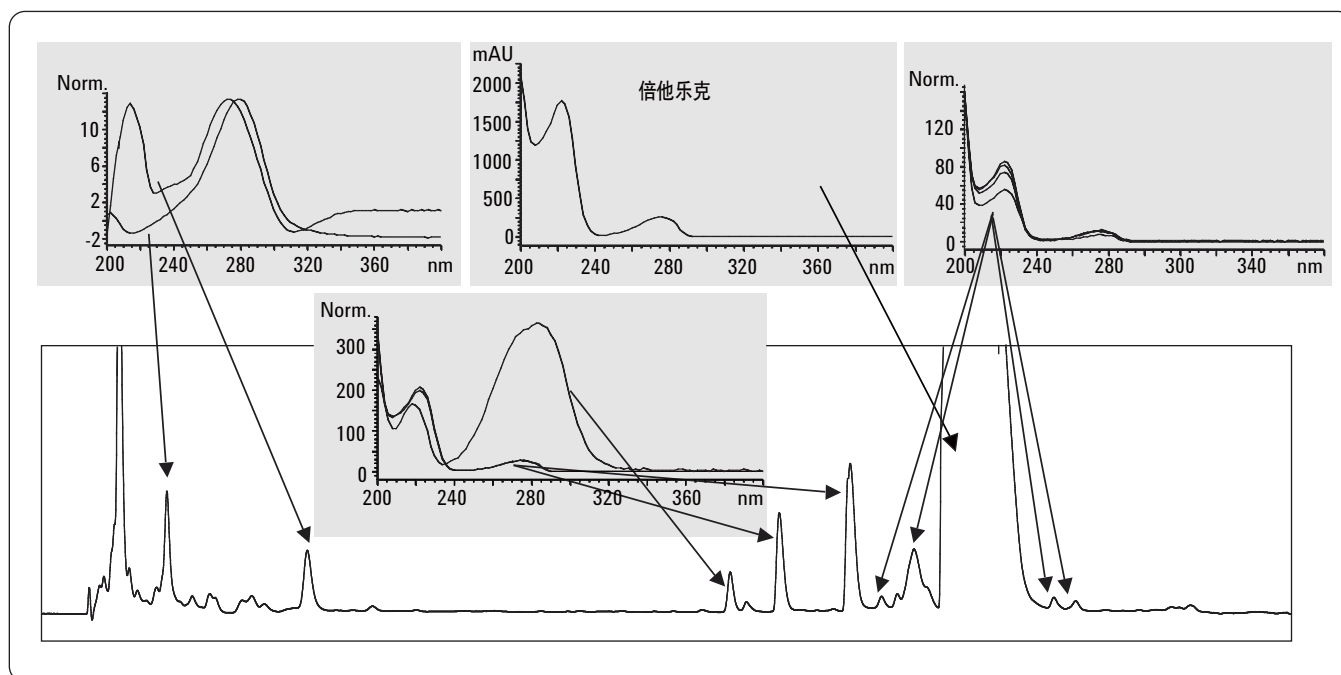


图 16.
倍他乐克及其降解产物的色谱图

www.agilent.com/chem/1200mds

© 安捷伦科技公司版权所有, 2008 年
2008 年 10 月 1 日印刷
出版号 5989-9339CHCN



Agilent Technologies