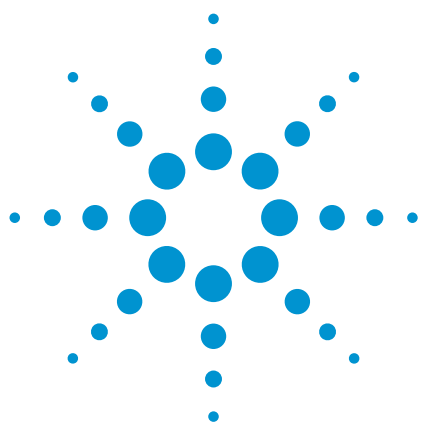




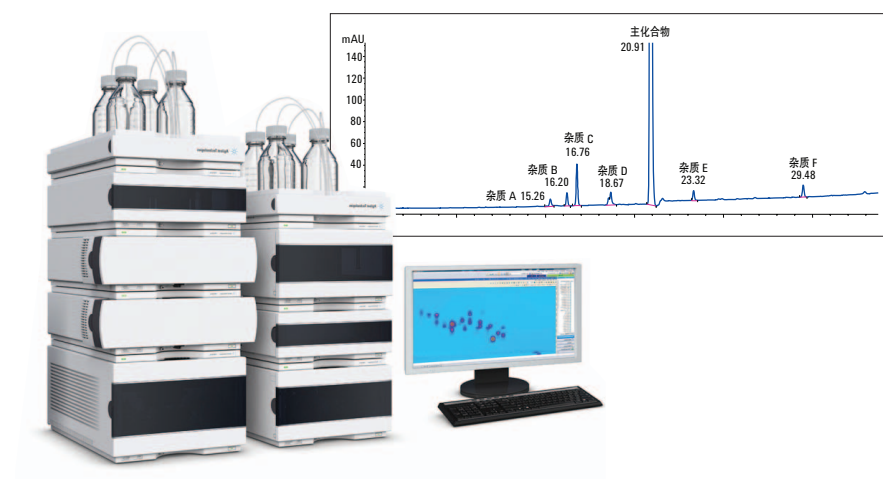
采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案通过中心切割法对杂质进行检测

应用简报

医药化工

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔德布隆



摘要

本文论证了 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱 (2D-LC) 解决方案用于中心切割应用的能力。例如，中心切割能够将低含量杂质从共流出的主化合物中分离出来。中心切割后在二维色谱柱中得到分离的低含量杂质通过额外加标和分离性能的统计评估进行了确证。



Agilent Technologies

前言

药物化合物和精细化学品中的杂质分析是医药化工行业产品开发和生产过程中的重要组成部分。由于大多数杂质在结构上与主化合物类似，因此很难实现色谱分离。多种杂质可能会相互之间共流出或与主化合物共流出。最坏的情况是，采用选择的固定相-流动相组合无法将它们分离。

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 解决方案可以提供应对该挑战的手段，这套解决方案不仅具有全二维 2D-LC (LC×LC) 功能，还有中心切割 2D-LC (LC-LC) 功能。在中心切割实验中，一维色谱柱中设定量的流出物被洗脱到毛细管定量环中，然后再通过一个切换阀在线转移到二维色谱柱中。在第

二维色谱柱中，有可能分离来自一维色谱柱的共流出化合物，因为它可以使用不同选择性的固定相-流动相组合以及更长、更合适的梯度洗脱程序。

本文论证了 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 解决方案用于中心切割应用的能力。例如，中心切割能够将低含量杂质从共流出的主化合物中分离出来。中心切割后在二维色谱柱中得到分离的低含量杂质通过额外加标和分离性能的统计评估进行了验证。

实验部分

仪器设备

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 解决方案包括以下模块：

- 两个 Agilent 1290 Infinity 泵 (G4220A)
- 带有恒温器 (G1330A) 的 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (TCC) (G1316C)，配备用于 2D-LC 的 2 位/4 通双切换阀 (G4236A)
- 分别配备 10 mm 最大光强流通池 (G4212-60008) 和 60 mm 最大光强流通池 (G4212-60007) 的两个 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD) (G4212A)。第一个 DAD 采集从一维色谱柱流出进入毛细管定量环之前的洗脱液的色谱图。第二个 DAD 采集二维色谱柱中流出的洗脱液的色谱图，该色谱图展示了一维洗脱液切割部分内分离的化合物。图 1 展示了用于中心切割应用的 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 解决方案的仪器配置



图 1 用于中心切割 2D-LC 应用 (LC-LC) 的仪器配置。该配置中，一维和二维的泵是完全相同的。通常来说，二维泵必须是 1290 Infinity 泵，以实现二维色谱柱的快速梯度洗脱。而一维泵的选择就比较灵活，也可以是 1260/1290 Infinity 四元泵或 1260 Infinity 二元泵

软件

带有 2D-LC 插件的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件 (C01.03 版)。

色谱柱

一维: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus, C18, 2.1×150 mm, $1.8 \mu\text{m}$ (部件号 959759-902)

二维: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus, Phenyl-Hexyl, 3.0×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ (部件号 959757-312)

方法

一维泵

溶剂 A: 水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B: 乙腈 + 0.1% 甲酸
流速: 0.2 mL/min
梯度程序: 0 min 5% B – 30 min 95% B
停止时间: 35 min
后运行时间: 15 min

二维泵

溶剂 A: 水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B: 甲醇 + 0.1% 甲酸
流速: 3 mL/min
梯度程序: 0 min 5% B – 10 min 15% B

柱温箱

- 一维色谱柱在左侧, 柱温 25°C
- 二维色谱柱在右侧, 柱温 60°C
- 2 位/4 通双切换阀上连有一个 $80 \mu\text{L}$ 定量环和一段短接毛细管。在应该将主要色谱流出部分从一维色谱柱切割到二维色谱柱的时间点, 切换阀会自动转换。达到设定的时间间隔后, 为了分析毛细管定量环中的内容物, 毛细管定量环会切换回二维色谱柱前面 (图 2)

自动进样器

进样体积: $3 \mu\text{L}$
样品温度: 8°C
进样针冲洗: 在甲醇中冲洗 6 s

一维 DAD

波长: $254/4 \text{ nm}$, 参比波长 $360/16 \text{ nm}$
狭缝: 4 nm
数据采集速率: 20 Hz
流通池: 10 mm 最大光强流通池

二维 DAD

波长: $254/4 \text{ nm}$, 参比波长 $360/16 \text{ nm}$
狭缝: 4 nm
数据采集速率: 20 Hz
流通池: 60 mm 最大光强流通池

化学品

所有试剂均为液相色谱分析级。乙腈和甲醇购自德国默克公司。新鲜超纯水来自 Milli-Q Integral 系统, 该系统配备有一个带 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜的终端过滤器 (Millipak 公司)。

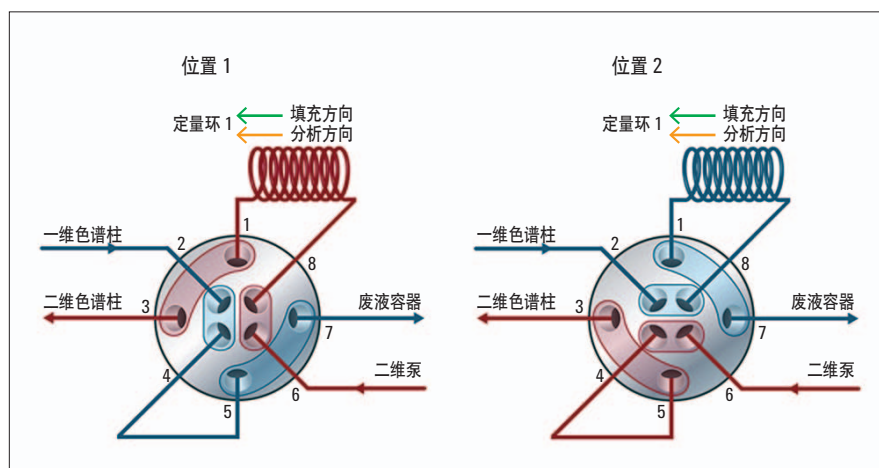


图 2

用于中心切割的 2 位/4 通双切换阀的管路示意图

位置 1: 在一维色谱柱中实现主要分离。洗脱液流向第一个 DAD, 再通过短接毛细管 (端口 4 和 5 之间) 流向废液容器, 直至目标流出液区段出现

位置 2: 将定量环切换到一维色谱柱和一维 DAD 之后, 并被一维洗脱液的目标部分充满。接着, 在设定的时间间隔后, 切换回位置 1, 使毛细管定量环的内容物进入二维色谱柱进行分析

结果与讨论

在药物化合物或精细化学品的生产工艺开发中，大量的精力都花费在杂质的分析和定性上，以便在随后的大规模生产中能够轻松鉴别出它们。为了检测到低含量的杂质，需要进样大量的样品进行色谱分离。可以看到主化合物的主峰旁边存在小峰（图 3）。如本例中所示，我们进样了浓缩溶液中的药物/化学化合物样品 (2.5 mg/mL)。可能的杂质是 A 至 F，但也可能还有其它杂质与主化合物共流出。

对于这类共流出杂质的检测，最好的方式是采用中心切割法进行二维分离。因此，我们将主峰的一部分捕获到毛细管定量环内，并转移到二维色谱柱中，该色谱柱具有与一维色谱柱不同的选择性。此外，我们还可以使用一个较缓和的梯度程序实现该特定分离（图 4）。从一维色谱柱中切割的第一段介于 20.75–21.00 min 之间。这是主化合物峰的第一部分。在二维分离中，我们可以发现主化合物和另一个微量杂质的信号。

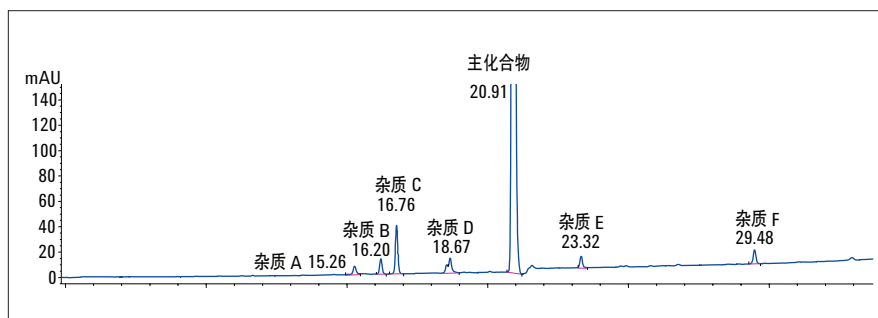


图 3
主化合物和检测到的杂质 A - F

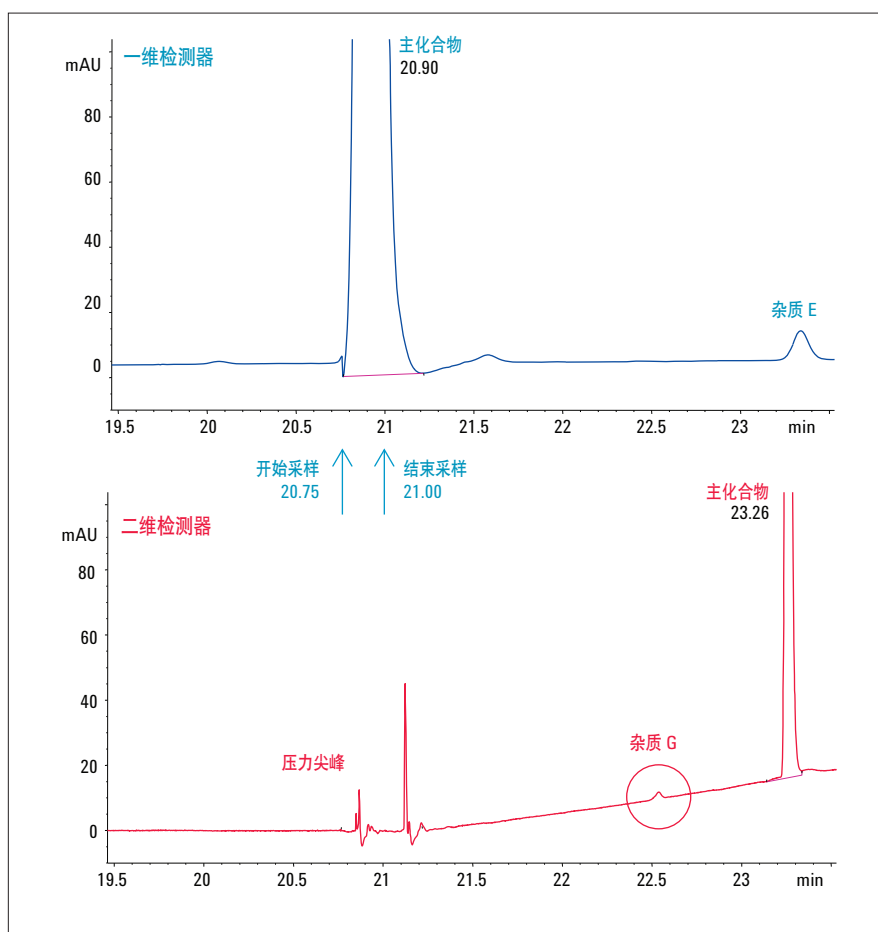


图 4
主色谱图（蓝色）和中心切割色谱图（红色）。对 20.75–21.00 min 间的主峰进行中心切割。主化合物在 23.26 min 时从二维色谱柱流出。压力尖峰是采样开始和结束时切换阀转换造成的。延迟是由延迟体积和色谱柱死体积导致的

在随后的进样中，主峰切割的第二部分介于 20.95–21.20 min 之间，然后被转移到二维色谱柱中。此时，另一杂质 H 从主峰中被分离出来，其保留时间是 23.24 min (图 5)。为了确证杂质 H，将合成的杂质 H 以依次增加的量加到样品溶液中（样品中杂质 H 初始量的两倍、三倍和四倍）。接下来的中心切割实验表明，杂质化合物 H 的峰面积随加入量呈比例增加，从而证明了所分离的色谱峰是杂质 H (图 6)。

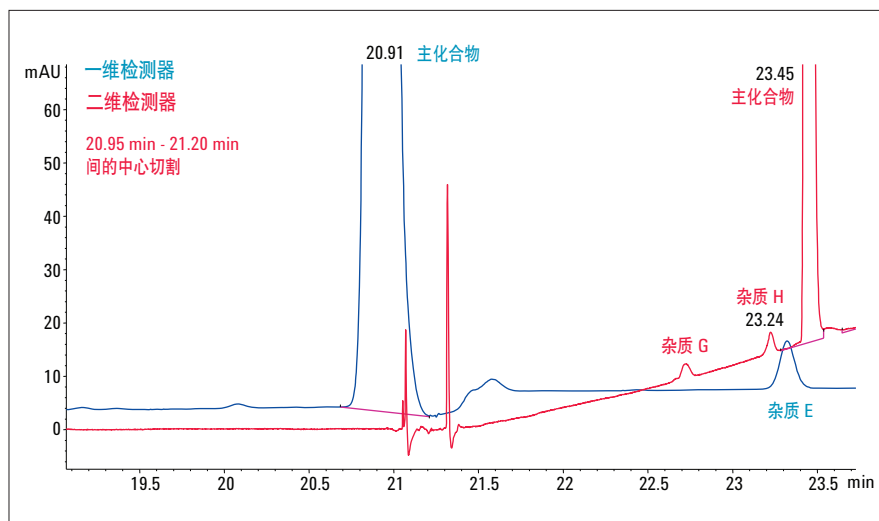


图 5

主色谱图（蓝色）与中心切割色谱图（红色）的重叠图。对 20.95–21.20 min 间的主峰进行中心切割。杂质 H 在二维色谱中实现分离，保留时间 23.24 min，主化合物峰流出的保留时间是 23.45 min（与图 4 相比不同的保留时间是由于较迟的中心切割造成的）

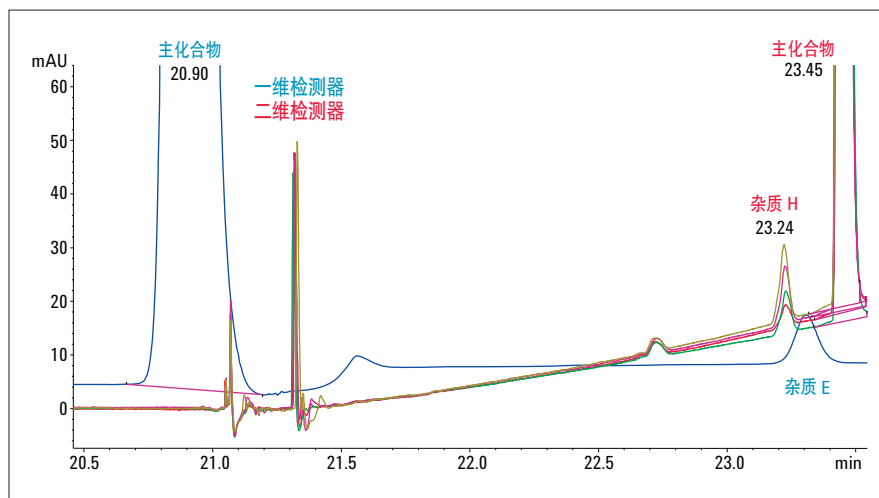


图 6

主色谱图（蓝色）与中心切割色谱图（红色）的重叠图。对 20.95–21.20 min 间的主峰进行中心切割。将额外的浓度依次升高的标准杂质 H 加到样品中

为了判断中心切割过程的可靠性，我们测定了转移量的线性并对此进行了统计评估。实验结果显示，峰面积随着杂质 H 加入量的上升而上升，我们计算了其线性相关系数（图 7）。显示的曲线图和线性相关系数表明，中心切割过程高重现性地转移了一维分离洗脱液的相同部分，其中杂质 H 的浓度不断升高。10 次重复测定中，保留时间的 RSD 为 0.015%，峰面积的 RSD 为 3.53%，表明方法的精度良好，可靠性高（表 1）。

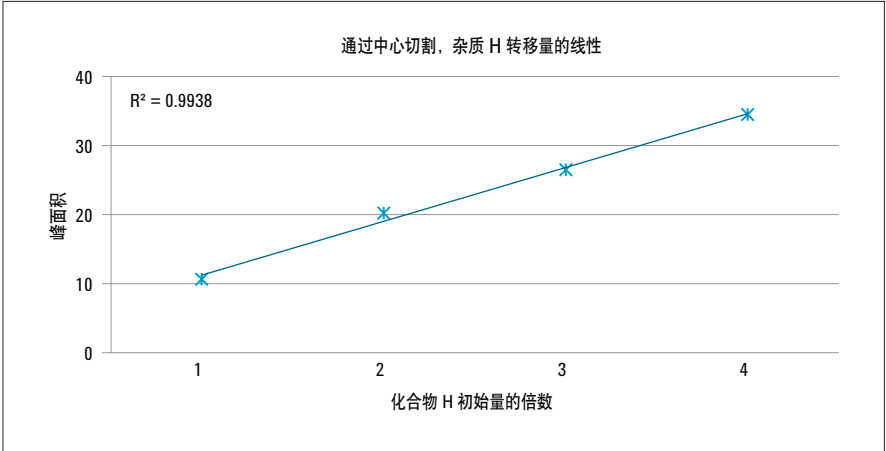


图 7
中心切割实验中，从一维转移到二维色谱柱的杂质 H 的线性，通过进样加标量依次升高的样品进行分析

	保留时间 (min)	峰面积
均值	23.22	11.13
S.D.	0.0037	0.3933
RSD [%]	0.015	3.53

表 1
杂质 H 中心切割峰的统计评估 (n = 10)

结论

本文论证了 Agilent 1290 Infinity 2D-LC 解决方案用于中心切割应用的能力。实现了与主化合物共流出的微量杂质的分离和确证。为了确证，我们将多个数倍于共流出杂质初始浓度的合成杂质加到样品中并进行分离。测定了杂质峰峰面积增加的线性，结果表明，系列峰面积的线性关系良好，中心切割过程可靠性高。通过对原样品的多次进样分析，测定了所分离杂质保留时间和峰面积的精度，结果表明二者均良好。

**[www.agilent.com/chem/
infinity-2d-lc](http://www.agilent.com/chem/infinity-2d-lc)**

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
中国印刷，2012 年 8 月 1 日
5991-0834CHCN



Agilent Technologies