

多中心切割二维液相色谱在杂质分析方法开发中的应用

Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案

应用简报

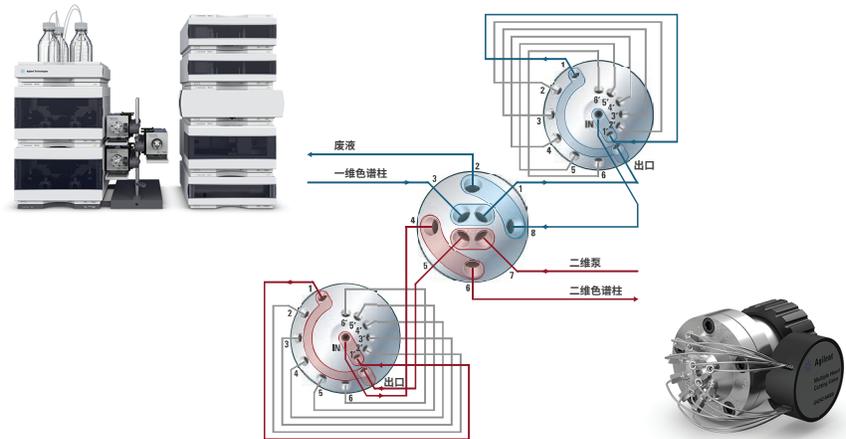
小分子药物与仿制药

作者

Sonja Krieger
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

在药物和精细化学品的开发和生产过程中，杂质分析非常重要。本应用简报表明多中心切割二维液相色谱非常适用于药物和精细化学品杂质分析的方法开发。使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案，经第一维分离后所检测到的每一个峰都被中心切割并转移到具有不同选择性的第二维进行进一步分离。此方法能发现可能存在的共洗脱化合物。此外，通过向样品添加疑似杂质还可确证对杂质的鉴别。



Agilent Technologies

前言

在制药和化工行业中，药物和精细化学品的杂质分析具有重要意义。对于新原料药，ICH 指南 Q3A (R2) 规定含量大于或等于 0.05% 的杂质必须报告，含量大于或等于 0.1% 的杂质必须鉴定¹。

药物和精细化学品的杂质分析可通过液相色谱分析该物质的浓缩溶液来实现。药物或精细化学品中的杂质通常与主要化合物结构相似，且相互间结构也相似。因此，使用具有给定选择性的系统（色谱柱-溶剂组合）可能无法实现分离。该问题的一个解决方案是将共洗脱化合物中心切割并转移到具有不同选择性的分离系统，从而实现分离。使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案的多中心切割二维液相色谱，对与主要化合物共洗脱的杂质的分离分析能力如之前的应用简报² 所述。

在杂质分析方法开发期间，必须检测所有杂质，不能有任何杂质因与主要化合物或其他杂质共洗脱而被隐藏。采用中心切割二维液相色谱可确保做到这一点。1290 Infinity 二维液相色谱解决方案可实现第一维分离的多个峰的中心切割，然后将这些中心切割储存在定量环中并对储存的中心切割依次进行第二维分析。

本应用简报展示了一个代表药物化合物的样品的多中心切割二维液相色谱分析。对第一维分离后所测到的每一个峰均进行中心切割，然后在具有不同选择性的第二维中进行分离分析，从而发现第一维分离中可能存在的共洗脱物。

实验部分

二维液相色谱方法

第一维泵	
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	0 min 时 B 为 5% 20 min 时 B 为 95% 25 min 时 B 为 95%
后运行时间	10 分钟
第二维泵	
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	甲醇 + 0.1% 甲酸
流速	2.0 mL/min
梯度和梯度调制	0.00 min 10% B 到 22.00 min 50% B 1.50 min 70% B 到 22.00 min 95% B
第二维梯度停止时间	1.50 分钟
第二维分析周期	2.00 分钟
自动进样器	
进样量	2 µL
样品温度	6 °C
进样针清洗	用甲醇/水 (50/50, v/v) 溶液清洗 10 秒
柱温箱	
第一维色谱柱	右侧 30 °C
第二维色谱柱	左侧 30 °C
多中心切割	
运行模式	<ul style="list-style-type: none">根据第一维保留时间设置的中心切割（二维时间段）进行基于时间的多中心切割在采样时间为 0.40 min（200% 的定量环充填）的条件下对杂质进行中心切割使用 0.10 min 的采样时间（50% 的定量环充填）对主要化合物的整个峰进行三次间隔紧密的连续中心切割
二极管阵列检测器	
第一维	波长 254 nm/4 nm，参比 360 nm/100 nm 20 Hz 数据采集速率
第二维	波长 254 nm/4 nm，参比 360 nm/100 nm 80 Hz 数据采集速率

仪器

用于多中心切割的 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案包括以下模块：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A, 2 台)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A), 配备 Agilent 1290 Infinity 恒温器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A), 配备 2 位/4 通双向阀 (二维液相色谱阀头, G4236A)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A, 2 个), 配备带 40 μL 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000, 2 个)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A, 2 个), 配备 10 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60008)

软件

Agilent OpenLab CDS ChemStation 版软件, 版本 C.01.07 [27] 以及 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱采集软件, 版本 A.01.02 [24]

色谱柱

- 第一维: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μm (部件号 959759-902)
- 第二维: Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 4.6 \times 50 mm, 2.7 μm (部件号 699968-901)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈和甲醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸来自安捷伦 (部件号 G2453-85060)。

样品

使用添加了几种杂质的 N,N-二乙基间甲苯酰胺 (DEET) 的甲醇/水 (50/50, v/v) 溶液作为样品, 代表含有一系列杂质的药物。

结果与讨论

在药物或精细化学品的杂质分析方法开发过程中出现的一个重要问题是, 使用给定的方法是否能将所有杂质与主要化合物分离以及彼此分离, 或者是否发生共洗脱。图 1 展示了使用 C18 柱以及水-乙腈梯度 (均含 0.1% 甲酸) 的一维杂质分析。在放大的色谱图中, 可以观察到主要化合物与两种杂质发生了部分共洗脱。为了对该部分共洗脱进行分离分析并检查每个峰可能出现的共洗脱, 将峰进行中心切割并转移到具有不同选择性的第二维进行分离。

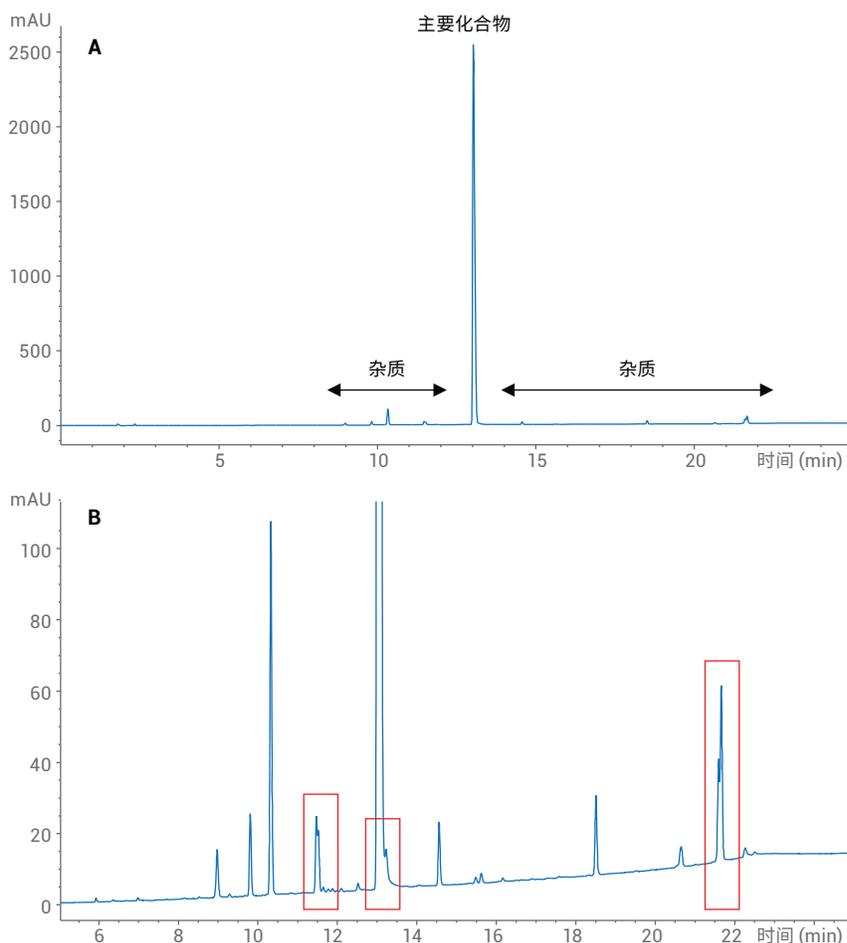


图 1. 根据所述的二维液相色谱方法中的第一维条件获得的一维杂质分析; 已标记部分共洗脱; (A) 全图; (B) 放大图

图 2 中的图 A 展示了采用中央二维液相色谱阀并流配置以及两个多中心切割阀的多中心切割管道图。图 2 中的图 B 展示了多中心切割阀，其预先安装了经过压力测试的 40 μL 定量环。

多中心切割算法可确保最大限度减少阀切换，并尽可能快地在第二维中分析从第一维流出物中取出的中心切割。对于每一次多中心切割二维液相色谱分析，获得的第一个中心切割在峰驻留组件 A（图 2A 右侧的多中心切割阀）的定量环 1 中保存。然后，中央二维液相色谱阀切换，在第二维中对第一个中心切割进行分析。在第一个中心切割的第二维分析期间，可获得多达 5 个中心切割并在峰驻留组件 B（图 2A 左侧的多中心切割阀）的定量环 1 到 5 中保存，直到它们进入第二维分析。在每个峰驻留组件（多中心切割阀）中，始终需要一个定量环分别用于第一维流出物和第二维溶剂的流通。当第一个中心切割完成第二维分析后，中央二维液相色谱阀再次切换，多达 5 个中心切割可在峰驻留组件 A 的定量环 1 到 5 中驻留，而驻留在峰驻留组件 B 中的中心切割在第二维中进行分析。当中心切割在峰驻留组件中驻留时，在分析该驻留组件中的中心切割之前将执行冲洗梯度，所驻留中心切割的第二维分析将以反向驻留顺序进行。

多中心切割算法可使在第一维分析运行的同时，开始进行中心切割的第二维分析。这种方法意味着在同一分析过程中可以重复使用定量环来进行中心切割，并且可以进行比安装的定量环数量更多的中心切割。有关中心切割算法、操作例程和软件功能的更多详细说明，请参阅技术概述³。

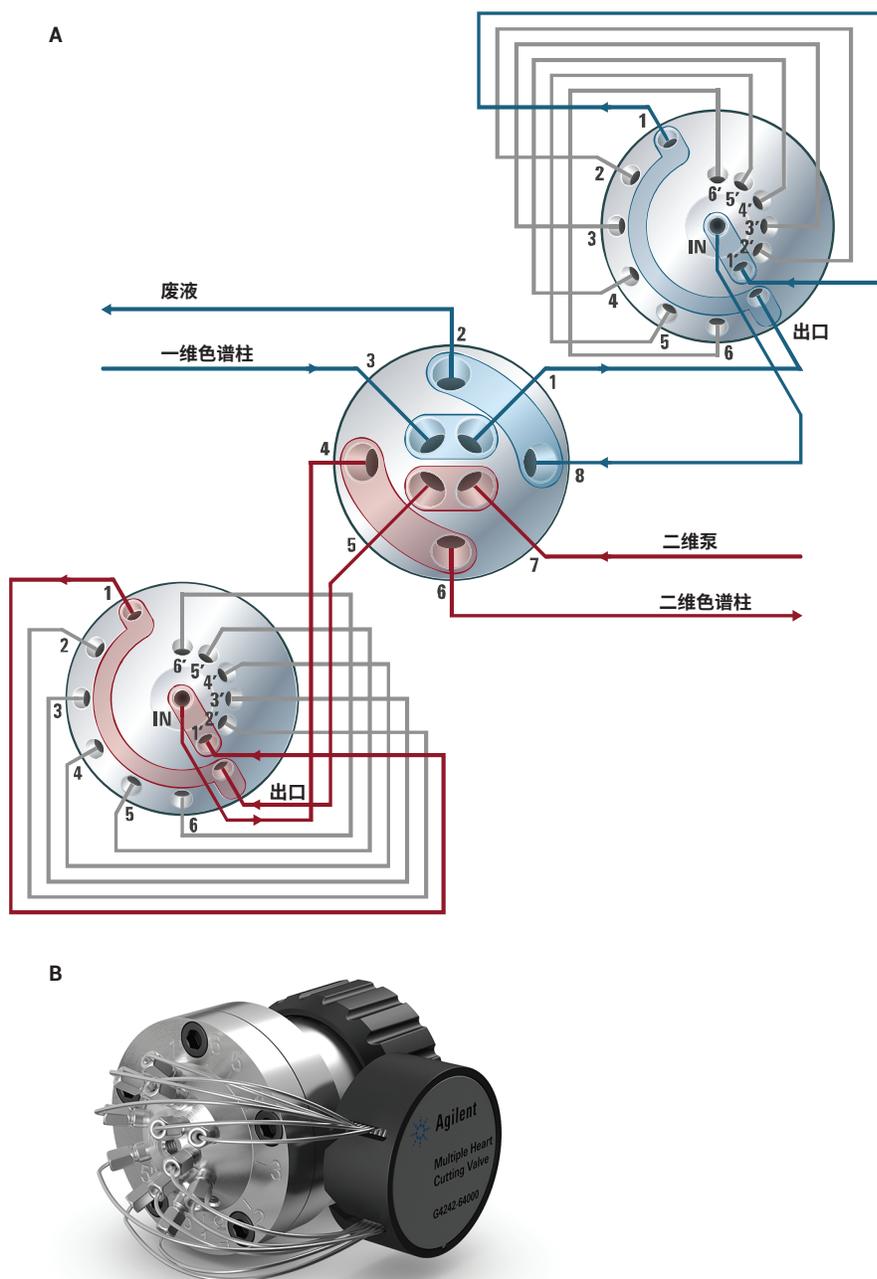


图 2. A) 采用中央二维液相色谱阀并流配置以及两个多中心切割阀的多中心切割管道图。B) 预先安装有定量环毛细管的多中心切割阀

多中心切割可基于时间（指定中心切割时间，例如，已知的第一维分离）或基于峰（通过检测第一维峰触发中心切割，例如，未知样品）执行。图 1 为使用基于时间的多中心切割的杂质分析。为了能发现共洗脱的样品组分，每种杂质都进行中心切割并在第二维中进行分析。此外，对主要化合物的整个峰进行三次间隔紧密的连续中心切割。

图 3 展示了多中心切割的方法设置。在梯度预览部分，可加载第一维参比色谱图，且可自动生成用于中心切割的时间段。生成的时间段可以在第二维时间段表中进行编辑，并且可以手动添加其他中心切割以更详细地研究目标区域。对于杂质的中心切割，选择的采样时间为 0.40 分钟，该时间相当于 200% 的定量环填充（40 μ L 定量环体积，0.20 mL/min 第一维流速）。由于定量环满溢，定量环中已全部填充为第一维流出物。梯度预览部分的放大视图显示了前四种杂质的切割时间段。橙色区域表示采样时间，较暗的阴影区域预测第一维流出物中转移到第二维的部分。为了对主要化合物的整个峰进行三次间隔紧密的连续中心切割，选择的采样时间为 0.10 分钟（50% 的定量环填充）。这样，含有主要化合物峰的第一维流出物被全部采集而没有任何损失。

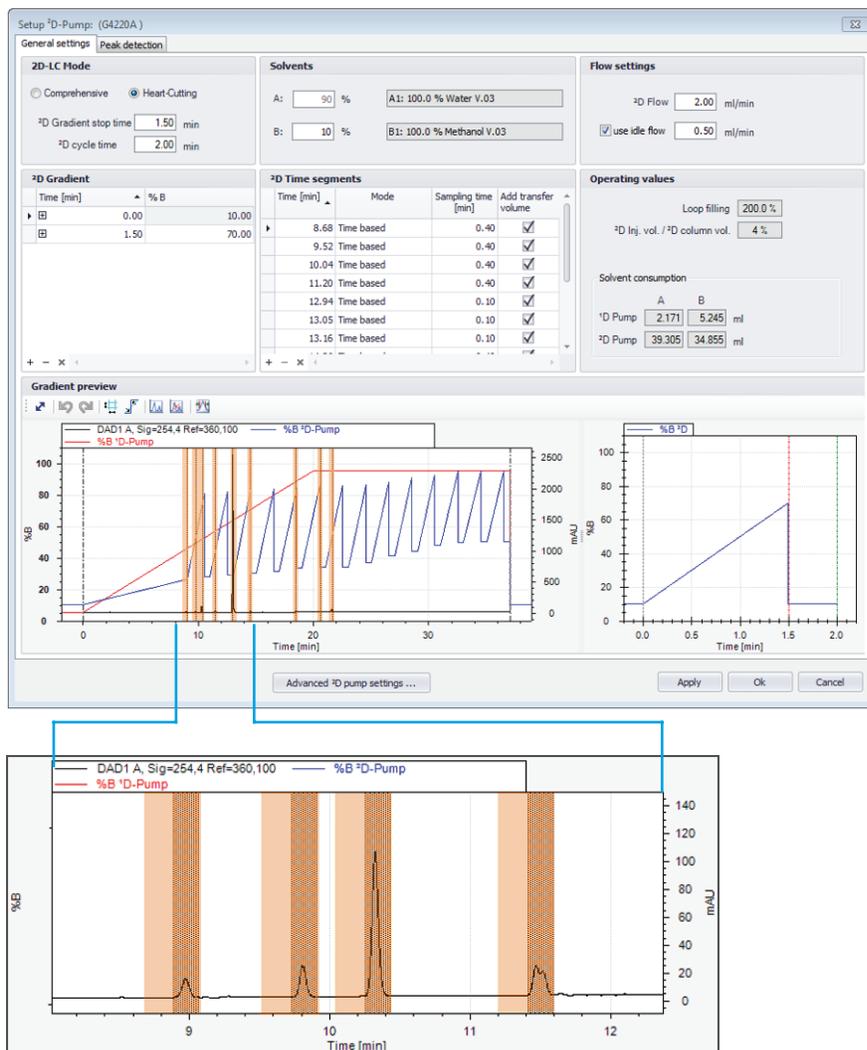


图 3. 多中心切割的方法设置

图 4 展示了二维液相色谱中心切割查看器中的多中心切割二维液相色谱分析结果。上面的两张图为标记有中心切割的第一维色谱图（左）和中心切割表（右）。底部的左侧展示了由第二维检测器记录的第二维色谱图。此处，可以追溯采用反向驻留顺序和冲洗梯度 (F) 分析的中心切割的第二维

分析顺序。在底部的右侧，单个第二维色谱图可进行显示和叠加。

杂质中心切割的第二维分析结果如图 5 所示。对于中心切割 4 和 11，在第一维中部分共洗脱的化合物，可以在第二维中得到分离。

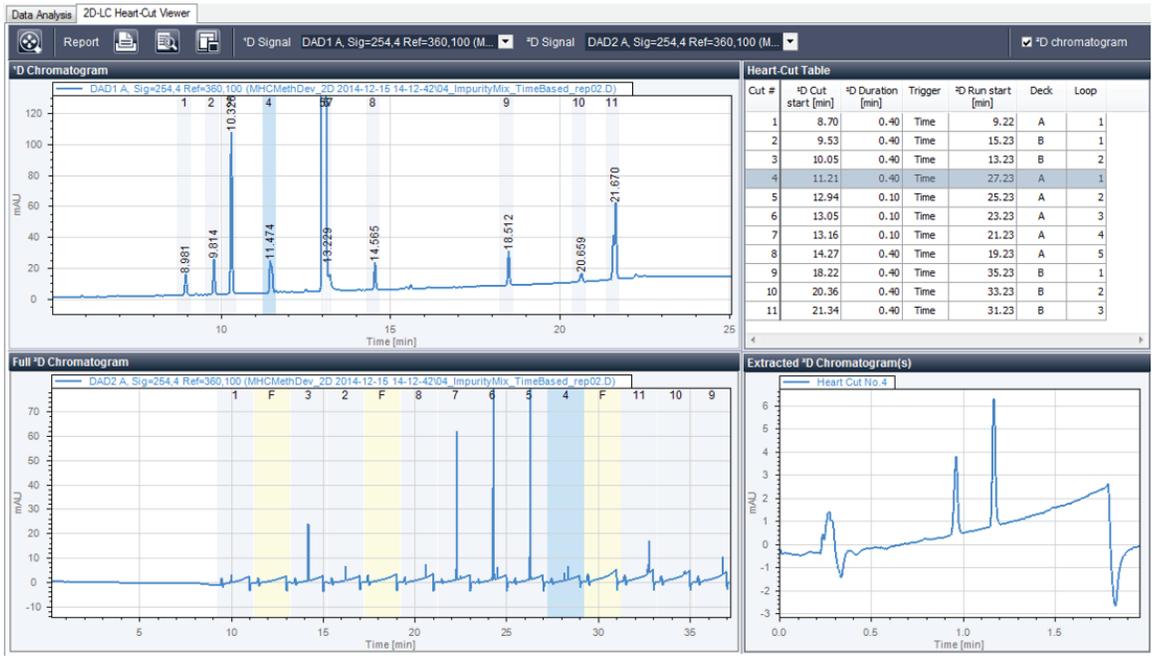


图 4. 二维液相色谱中心切割查看器中的多中心切割二维液相色谱分析结果

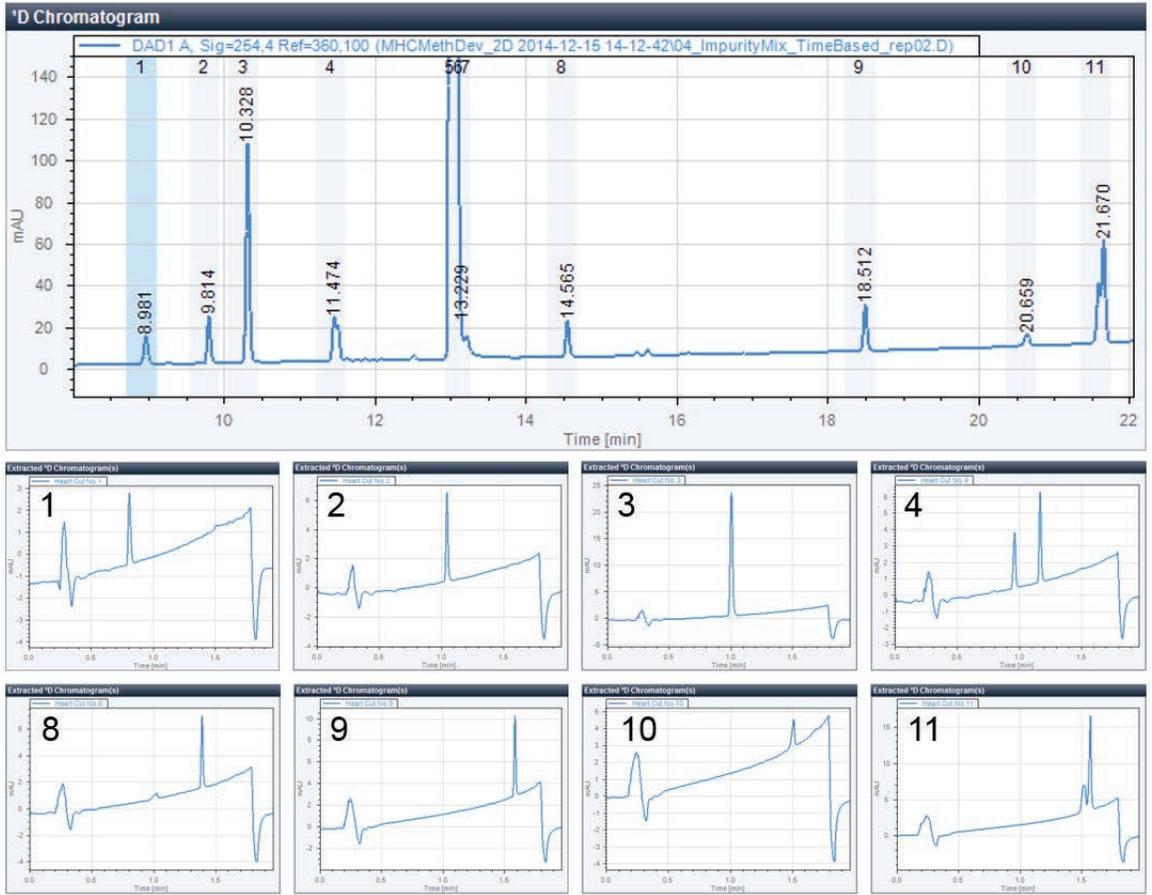


图 5. 杂质的第二维分析结果。上图：标记有中心切割的第一维色谱图。下图：第二维色谱图

图 6 展示了主要化合物整个峰的三个间隔紧密的连续中心切割的第二维分析结果。总体而言，第二维分析显示有三种杂质与主要化合物共洗脱。一种杂质可在主要化合物的整个峰范围内检测到（存在于中心切割 5 到 7 中）。第二种杂质出现在中心切割 6 和 7 中，第三种杂质在第一维中与主要化合物部分共洗脱并在中心切割 7 中被分离。

为了确定杂质身份，可以合成疑似化合物并在杂质分析过程中将其添加到样品中。例如，在样品溶液中加入杂质，该杂质在第一维中与主要化合物共洗脱，然后在第二维中与主要化合物分离。图 7 展示了样品中添加的杂质含量不断增加时，样品的分析结果。中心切割后，可在第二维分析中检测到杂质的含量不断增加。多中心切割二维液相色谱可提供可靠定量所需的线性和重现性，如技术概述³所述。

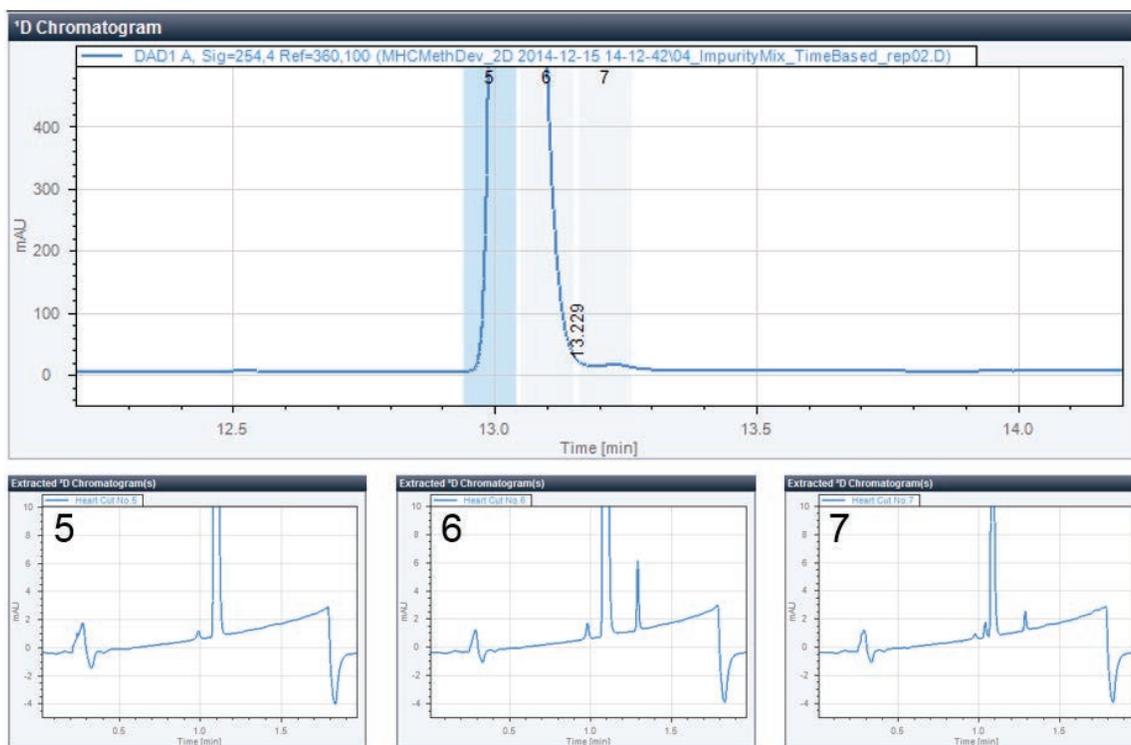


图 6. 主要化合物的第二维分析结果。上图：标记有中心切割的第一维色谱图。下图：第二维色谱图

结论

具有多中心切割的 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案可实现第一维分离的多个峰的中心切割，并将这些切割转移到具有不同选择性的第二维中进行分离。本应用简报表明多中心切割二维液相色谱非常适用于药物、精细化学品或药物和化学品制剂的杂质分析方法开发。将第一维分离后检测到的峰转移到第二维中进行分离，可以发现可能存在的共洗脱物。

参考文献

1. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Impurities in new drug substances (Q3A(R2)), October 25, 2006
2. Naegele, E., 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, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-0834CHCN, 2012
3. Buckenmaier, S., Agilent 1290 Infinity 多中心切割二维液相色谱解决方案, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-5615CHCN, 2015

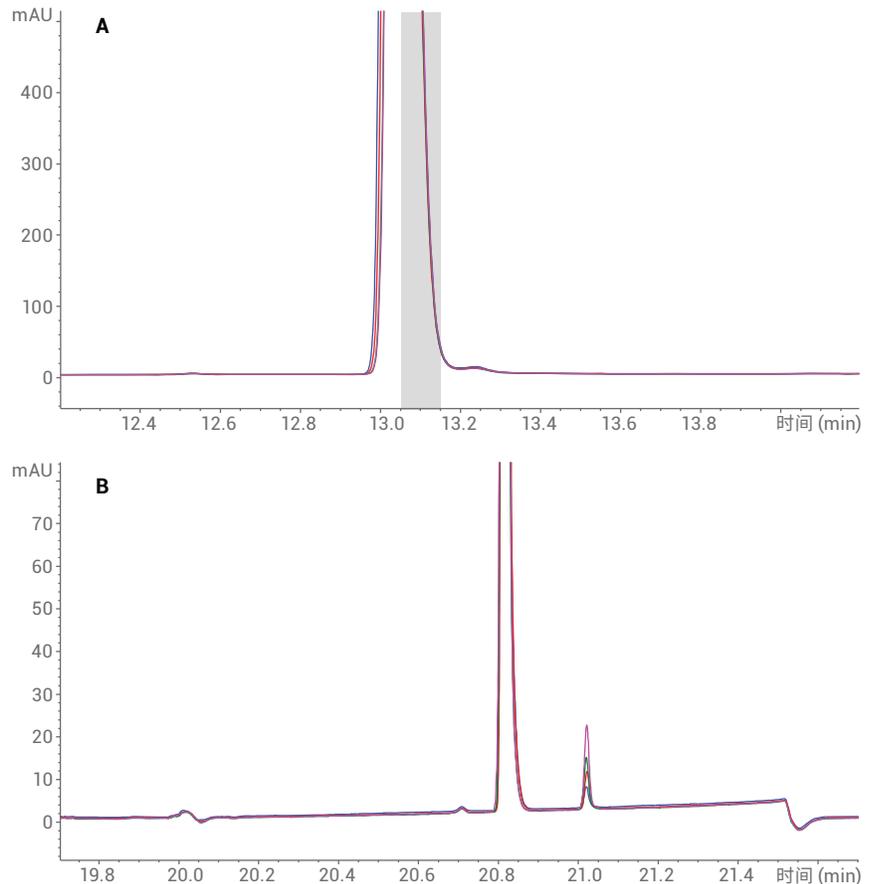


图 7. 杂质添加量不断增加（起始量的两倍、三倍、四倍）时样品的分析结果。A) 标记有中心切割的第一维叠加色谱图。B) 第二维叠加色谱图

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015
2015年6月1日，中国出版
5991-5643ZHCN



Agilent Technologies