

使用沃特世分析型馏分收集器和ACQUITY Arc系统对复杂药物制剂中的馏分进行小规模纯化

Fadi L. Alkhateeb, Ronan Cleary, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，我们将沃特世分析型馏分收集器(WFM-A)与ACQUITY Arc超高效液相色谱(UHPLC)系统联用，分离复杂药物制剂模型(DayQuil)中存在的多种组分。

优势

- 应用质谱引导的纯化可收集缺少发色团的化合物
 - 沃特世分析型馏分收集器(WFM-A)经过专门设计，在亚微升流速下准确、可重现地收集体积非常小的峰
 - ACQUITY QDa质谱检测器结合ACQUITY UPLC光电二极管阵列(PDA)检测器的双重检测功能使操作人员能够检测采用单一检测器技术通常无法检出的分析物
 - 使用快速简单的方法收集并分离普通感冒药和咳嗽药中的活性及非活性成分
-

简介

近年来，由于分析仪器不断进行技术改进，药物发现过程取得了长足的进步。分离、纯化和鉴定药物制剂中的活性药物成分是药物开发过程中非常重要的步骤。这些步骤可能充满了挑战，对于复杂药物制剂而言尤其如此。

质谱检测方法虽然会破坏样品，但如果配置得当，仍可用于触发馏分收集。在低流速下（通常用于分析级应用），每个液滴都很重要，必须使用经过全面优化且性能稳定的收集系统。本应用纪要将介绍并讨论两种馏分收集模式：质谱引导方法和基于时间的方法。

有时，组分分离并不是目的，真正要做的是鉴定。在这些情况下，通常使用在线多维色谱系统¹。虽然使用此类系统通常就能满足需求，但该设置可能并非始终可用或可行。在本应用纪要中，我们将沃特世分析型馏分收集器(WFM-A)与ACQUITY Arc超高效液相色谱(UHPLC)系统联用，分离复杂药物制剂模型(DayQuil)中存在的多种组分。还将讨论如何通过“离线多维”方法有效使用WFM-A，以帮助鉴定此类复杂混合物中的组分。



图1.配备ACQUITY Arc UHPLC系统和沃特世分析型馏分收集器(WFM-A)的分析型纯化系统

实验

样品前处理

DayQuil购自当地药店。用2 mL乙腈稀释相当于162.5 mg对乙酰氨基酚、5 mg氢溴酸右美沙芬和2.5 mg盐酸去氧肾上腺素的样品。取10 μL 所得溶液用1 mL乙腈进一步稀释，使三种化合物的最终浓度分别为812.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、25

$\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。取 $10 \mu\text{L}$ 最终溶液注入LC-MS系统进行分析。使用WFM-A鉴定并收集潜在的目标峰。然后在优化的梯度条件下重新分析收集到的馏分。

分离

所有分离均采用配备ACQUITY UPLC光电二极管阵列(PDA)检测器和ACQUITY QDa质谱检测器的ACQUITY Arc UHPLC系统进行。将该系统与WFM-A联用，并通过MassLynx软件和FractionLynx应用管理软件进行控制。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Arc
检测器:	ACQUITY UPLC光电二极管阵列(PDA)检测器
色谱柱:	SunFire C ₁₈ 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm (部件号 186002553)
柱温:	40 °C
进样体积:	10 μL
流速:	1.5 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	如图所示
ISM配置:	10:1分流器, 流速0.5 mL/min, 50%乙腈/水, 0.1%甲酸

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式：	ESI+
毛细管电压：	0.8 kV
锥孔电压：	10 V
离子源温度：	550 °C

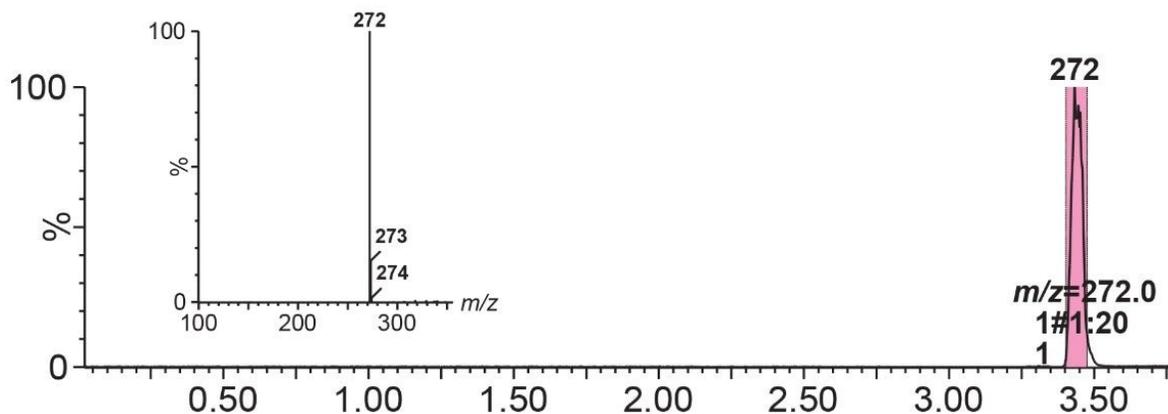
结果与讨论

WFM-A是一款经过优化的低流速馏分收集器，专门设计用于收集通常与分析级应用相关联的窄峰。使用该WFM-A可以执行多种模式的馏分收集²。本应用纪要探讨了一种全新的收集模式：质谱引导，还探讨了基于时间的馏分收集模式。

质谱引导的馏分收集

在质谱引导模式下，馏分收集在目标分子质量通过ACQUITY QDa质谱检测器时触发。该实验将按照前述方法制备的10 µL DayQuil样品注入色谱柱，并使用两个目标质量数进行馏分收集。从图2可以看出，两个目标质量数261 m/z 和272 m/z 被成功收集。FractionLynx按颜色标识所收集的馏分，在色谱图中实时显示出来。目标值和样品瓶位置也会实时记录于色谱图上。图2中的插图显示了所收集的馏分272 m/z 的质谱图，从中可以看出，已收集到目标质量数(272 m/z)的纯馏分。这表明，当目标质量数与其他峰完全分离时，该系统能够靶向收集纯化化合物。研究人员从实际收集的数据中就能获得质谱信息，而无需进行额外的馏分分析。

扫描ES⁺ 272



扫描ES⁺ TIC

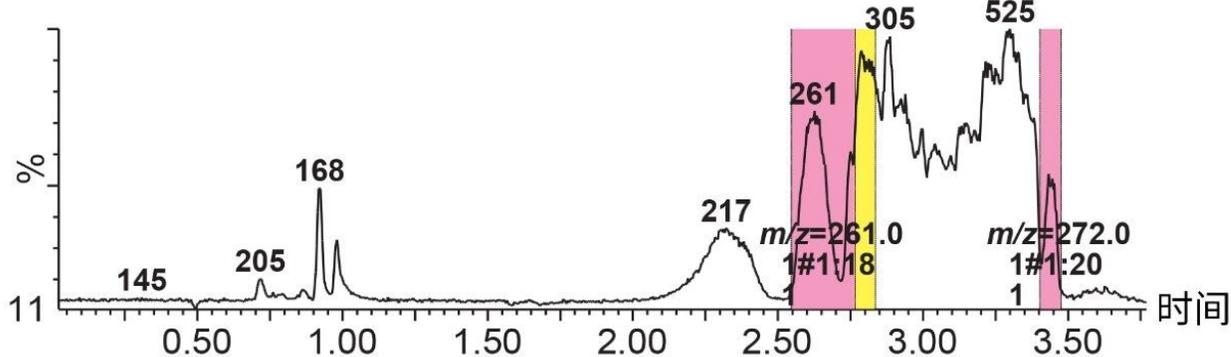


图2.采用基于质量数的收集方法得到的DayQuil样品的代表性分离结果。梯度：B在5 min内由1%增加至70%，收集质量数261 Da和272 Da。上图的插图区域显示了馏分272 m/z 的质谱图。

但是，如果分离方法无法完全分离各种组分，收集器将无法在收集过程中分离这些组分。该系统将收集样品列表中指示的质量数，总体成功的程度取决于色谱方法。例如，在图3中，即使目标质量数为261 m/z ，质谱分析也表明同时收集到217 m/z 和305 m/z 。当提取217 m/z 时，可以看到一小部分后流出的化合物与261 m/z 馏分收集开始处重叠，从而确认了污染物的来源。

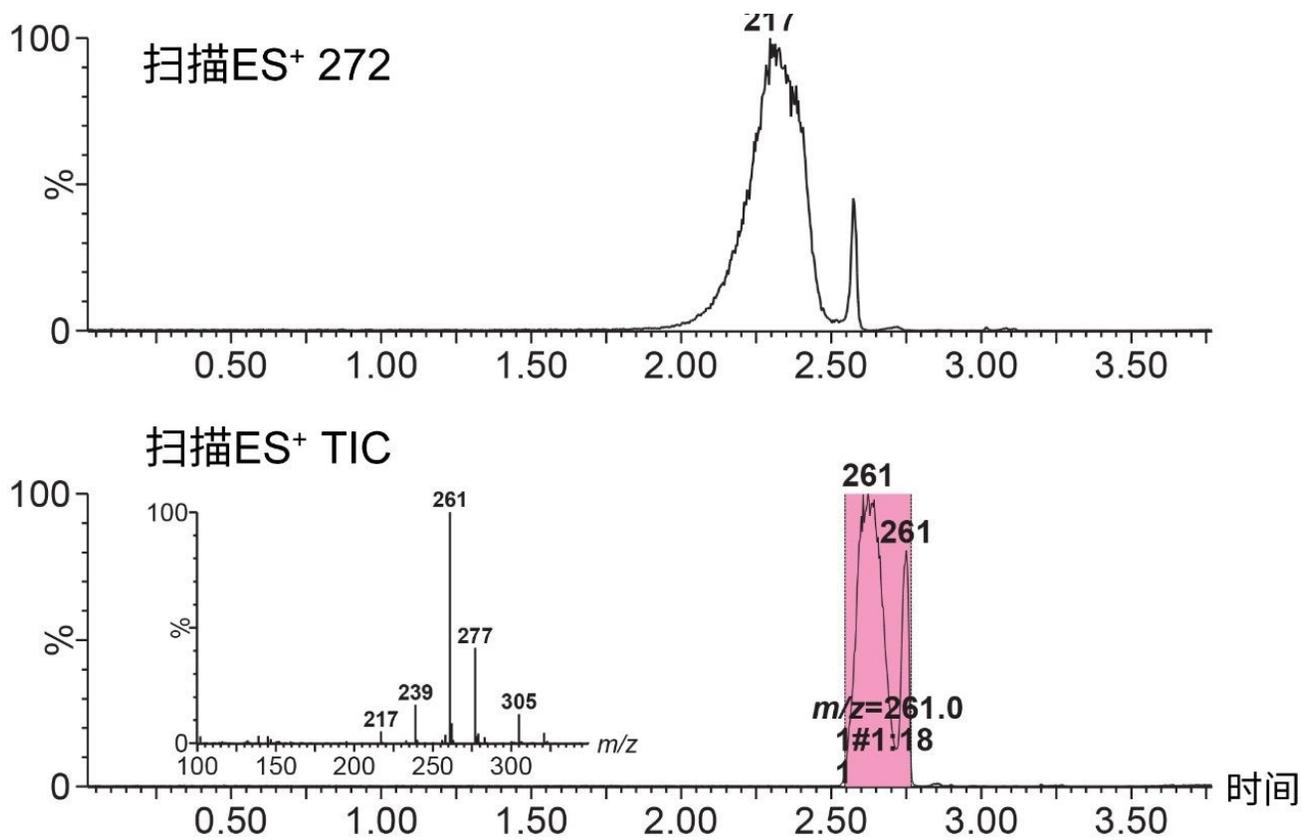


图3.采用基于质量数的收集方法得到的DayQuil样品的代表性分离结果。梯度：B在5 min内由1%增加至70%，收集质量数261 Da和272 Da。下图的插图区域显示了馏分261 m/z的质谱图。

馏分分析

对收集到的261 m/z馏分进行纯化后分析确认了这一共流出现象，表明纯化谱图中报告的三种组分得到确认，杂质水平达到9.6%（图4）。在该馏分的前部和尾部收集到杂质。

在这种情况下，我们故意使色谱柱过载，并且预计会出现这种情况。借助这些信息，在后续收集中即可利用其他软件工具来避免这种情况，例如布尔逻辑NOT函数。使用此函数仅收集目标质量数，而不收集其他共流出的质量数。

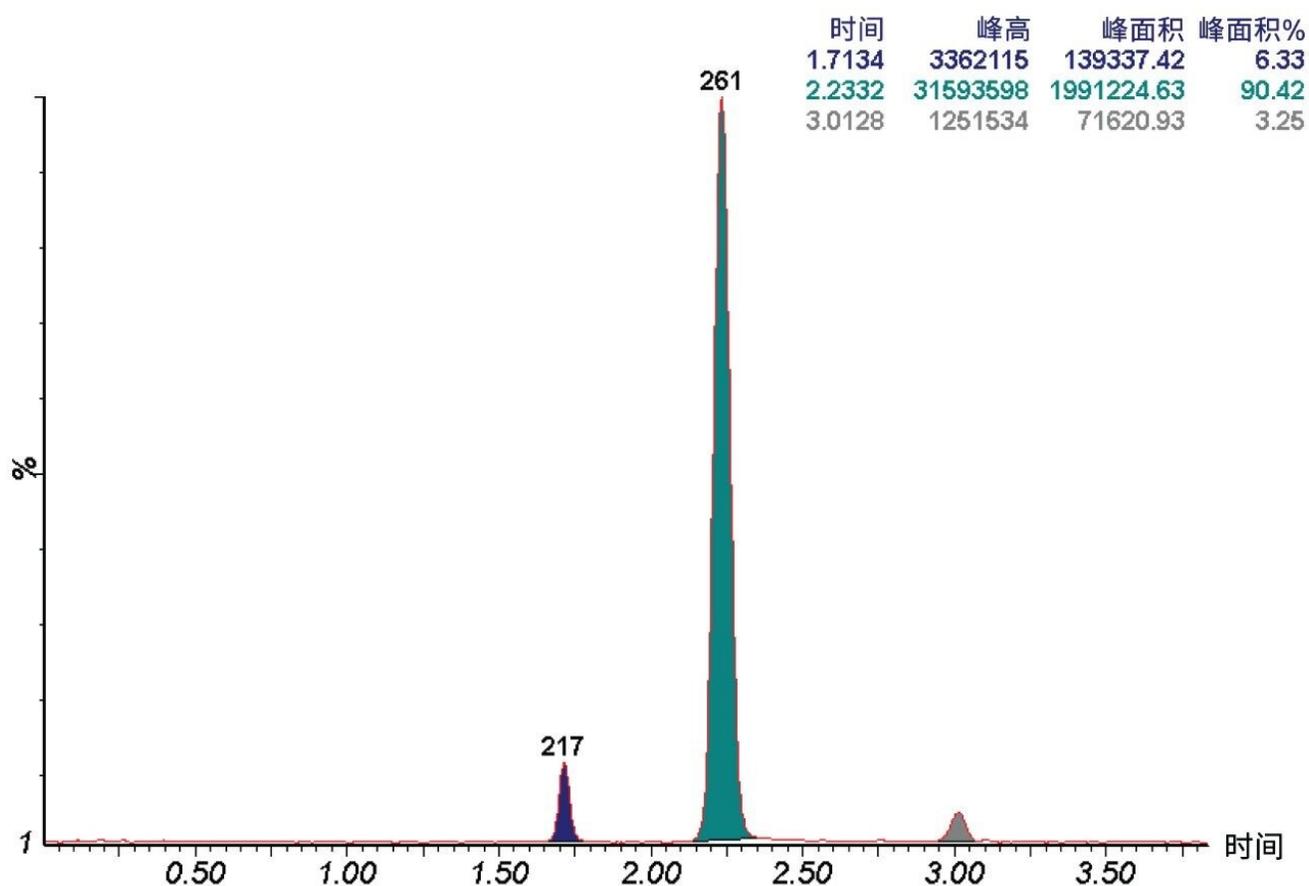


图4.对图2中所收集的261 m/z 馏分进行纯化后分析得到的代表性分离结果。梯度： B 在5 min内由10%增加至30%

基于时间的馏分收集

该实验的目的是分离并鉴定复杂药物样品中存在的多种组分。这种样品相当复杂，使用单一分离方法分离所有组分可能十分困难并且非常耗时。因此采用一种两步方法：进行基于时间的馏分收集（图5），然后对收集的馏分进行重新分析。在该方法中，复杂样品被分成更小、更易于管理的馏分，然后收集并再次分析。

使用更集中的梯度对馏分进行分析（图6），从而使这些收集的馏分得到快速高效的分离。值得一提的是，馏分3受到聚乙二醇(PEG)干扰。在底部迹线中可以看到这一干扰，图中显示出典型的PEG质量数分布，相邻峰之间相差44 Da，对应于重复单元环氧乙烷的质量数。

在这种情况下，馏分重新分析使用的色谱柱与纯化色谱柱相同。但是，为获得更高的分离效率，也可以使用正交填料或正交色谱技术（例如超临界流体色谱(SFC)或气相色谱(GC)）。

扫描ES⁺ TIC

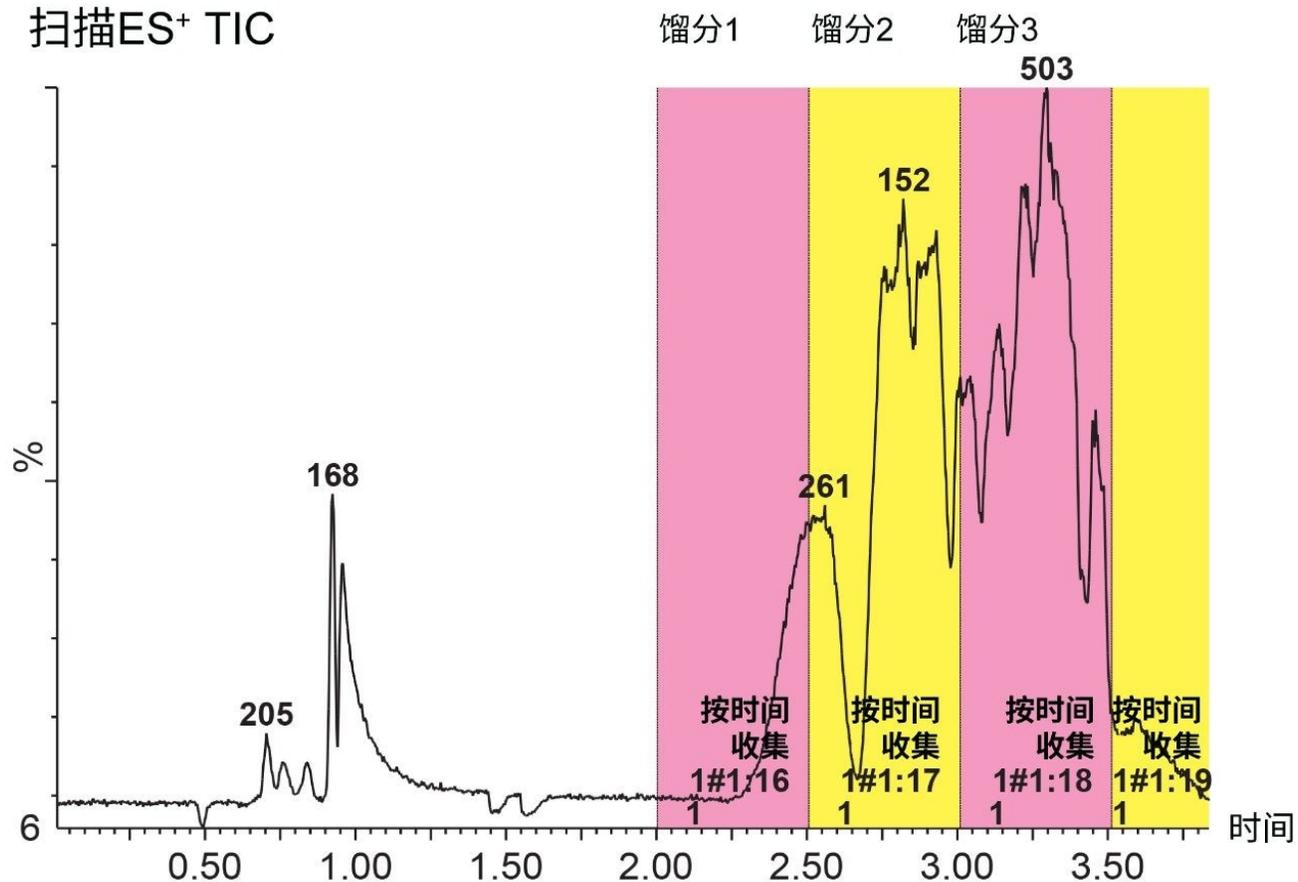


图5.采用基于时间的收集方法得到的DayQuil粗制样品的代表性分离结果。梯度：B在5 min内由1%增加至70%

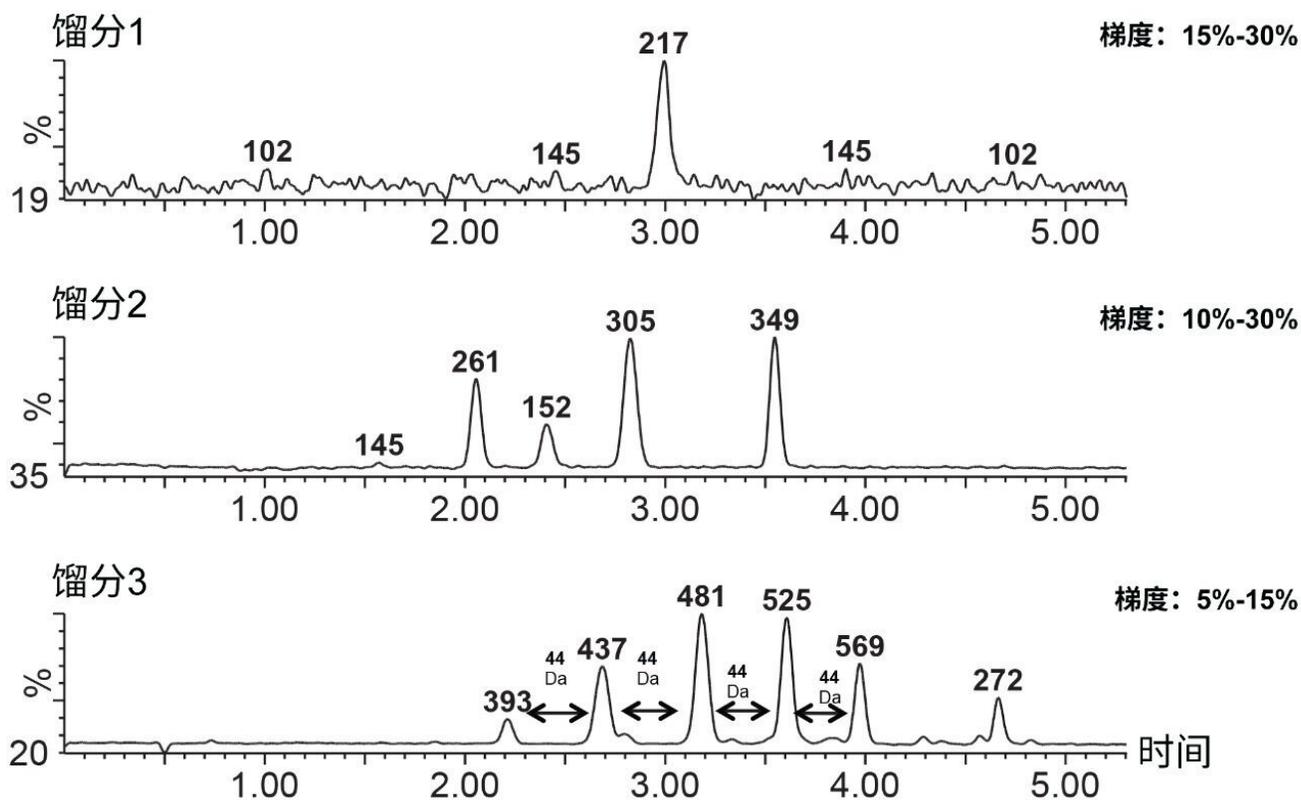


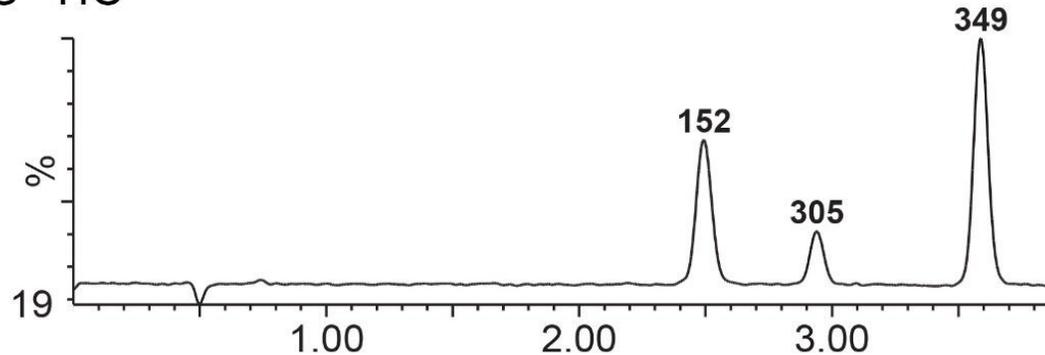
图6.对基于时间从DayQuil样品中收集的馏分进行重新分析的结果

双重检测器功能

本应用纪要中所用设置的另一项重要优势是具有双重检测功能。如前文所述，该系统采用两种单独的检测模式：ACQUITY QDa和ACQUITY PDA。

该设置的好处在于ACQUITY QDa能够检测不含发色团的分析物。此优势对于提高WFM-A的收集功能特别重要。例如，如图7所示，如果仅使用ACQUITY PDA检测，收集时可能会遗漏多种组分。

扫描ES⁺ TIC



PDA TAC

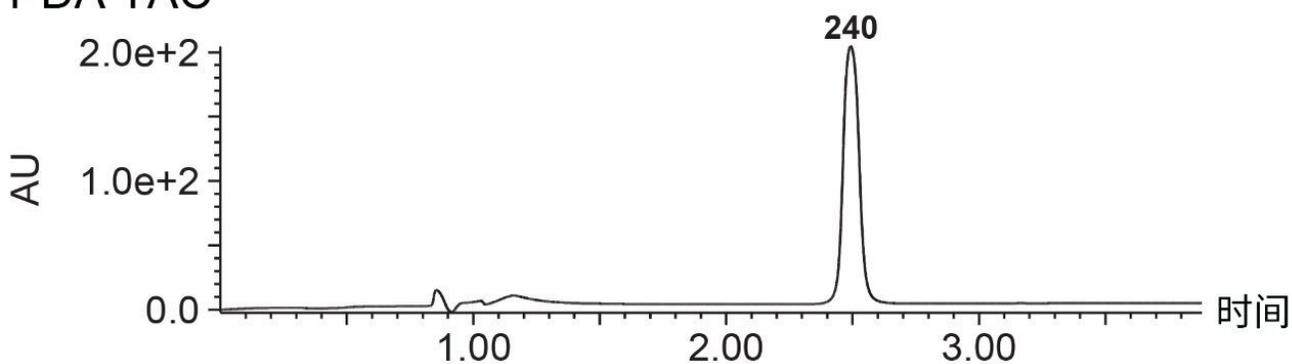


图7.图2中含有152 m/z 的馏分的ACQUITY QDa (上图)和ACQUITY PDA (下图)响应。梯度:在5 min内由10%增加至30%

结论

- 本文成功展示了使用WFM-A进行质谱引导收集的技术以及其他收集技术（基于时间和基于质量数）。
- 双重检测功能表现出非常有利的结果，特别是在需要收集缺乏生色团的分析物时。
- 将ACQUITY Arc UHPLC系统与WFM-A联用的两步方法已成功用于分离和鉴定复杂药物制剂中存在的多种组分。
- 使用WFM-A成功收集了目标质量数的样品用于后续分析。
- 收集效率与分离效率密切相关，如果化合物在色谱柱上未得到分离，馏分的纯度将受到影响。

参考文献

1. Dwight SR., Maloney TD., Recent Advances in Two-Dimensional Liquid Chromatography for Pharmaceutical and Biopharmaceutical Analysis. *LCGC North America* 2017, Volume 35 (9): 680–687.
2. Aubin, A., Jablonski, J. Small Scale Peptide and Impurity Isolation Using the ACQUITY UPLC H-Class and Waters Fraction Manager – Analytical Systems. 720005500EN. 2015.

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

FractionLynx <<https://www.waters.com/513795>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

720006287ZH, 2018年6月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号