

## 使用MaxPeak Premier技术改进抗病毒药物稳定性方法的色谱性能

---

Catharine Layton, Paul D. Rainville

Waters Corporation

---

### 摘要

为分析药物化合物开发的色谱方法必须能区分警告水平/行动水平以下的低浓度杂质。为达到此目的，保留性、峰形和灵敏度等参数至关重要<sup>1,2</sup>。

MaxPeak Premier技术可减少由于分析物与液相色谱仪器和色谱柱中的金属离子发生非特异性结合而导致的样品损失。使用这项新技术可以显著提升我们准确检测和定量低水平分析物的能力，例如具有基因毒性或药物活性的物质。

### 优势

- MaxPeak Premier技术无需使用强流动相添加剂、螯合剂或冗长的钝化方案即可提升色谱性能
- 基于MaxPeak Premier技术的色谱柱和/或仪器可以明显改善某些低水平分析物（例如反应性药物杂质）的响应和峰轮廓

### 简介

---

高压液相色谱(HPLC)在药物开发和生产的整个过程中被广泛应用于监测活性药物成分(API)中的杂质。美国食品药品监督管理局(FDA)的原料药指南规定,含量 $\geq 0.1\%$ (阈值)的杂质必须上报,且任何疑似具有异常效力或毒性的杂质,无论其浓度如何,也都必须报告<sup>3,4</sup>。痕量浓度水平的回收率受一系列化学和机械方面的色谱影响。

传统HPLC仪器和色谱柱由不锈钢部件和配件组成。选择这种材料的根据是它的可获得性和机械强度良好,但它在暴露于酸性和/或含卤化物的流动相等刺激性液体时很容易受影响。腐蚀产生的金属离子会不一致或不可逆地结合到色谱柱固定相上,在这里通过络合、氧化和差向异构化的方式与对金属离子敏感的分析物发生相互作用。其后果是有时色谱峰形较差、不符合预期,有时甚至可能完全损失目标分析物(尤其是在痕量浓度下)<sup>1,2</sup>。

前药是为改善活性药物成分吸收、分布和代谢而施用的API。富马酸丙酚替诺福韦(TAF)这种前药通过掩蔽靶分子(替诺福韦)的反应性游离羟基来增加替诺福韦的生物利用度。经过一系列水解反应后,带负电荷的替诺福韦分子被暴露出来,活性成分得以释放<sup>5</sup>。尽管在药理学方面很有助益,但由于这两种物质都带负电荷,会导致金属离子相互作用的敏感性增大,进而可能给色谱分析带来更大挑战。本研究应用MaxPeak Premier技术来监测替诺福韦这种痕量反应性杂质,由此证明该技术对色谱性能的改进。

---

## 实验

### 材料与amp;方法

液相色谱系统1:	ACQUITY Arc系统, 配备四元溶剂管理器(rQSM)、 样品管理器(rFTN)、ACQUITY Arc色谱柱管理器( rCM)、 Empower 3色谱数据软件
LC系统2:	Arc Premier系统, 配备四元溶剂管理器(rQSM)、 Arc Premier样品管理器(rFTN)、 Empower 3色谱数据软件
检测条件:	ACQUITY光电二极管阵列检测器(PDA), UV 260 nm

色谱柱:	XBridge XP, BEH C <sub>18</sub> , 2.5 μm 色谱柱, 4.6 x 150 mm, 部件号: 186006711
	XBridge Premier, BEH C <sub>18</sub> , 2.5 μm 色谱柱, 4.6 x 150 mm, 部件号: 186009849
柱温:	43 °C
样品温度:	20 °C
进样体积:	5 μL
流速:	1.3 mL/min
稀释剂:	(50/50) 甲醇/水
流动相A:	10 mM 甲酸铵, pH 4.0
流动相B:	乙腈
条件:	2% 流动相B 保持 2 min, 然后运行梯度, 乙腈浓度在 8.5 min 内从 2% 增加至 90%

替诺福韦 (CAS号206184-49-8, 美国马里兰州罗克维尔, USP) 用稀释剂配制为大约0.1 mg/mL的溶液, 用作色谱保留时间参比标准品 (图1)。富马酸丙酚替诺福韦 (CAS号379270-38-9, Selleckchem, 美国得克萨斯州休斯顿) 用稀释剂配制为0.5 mg/mL的储备液。将储备液分成多份强制降解研究样品并暴露于各种条件下(6)。采用表1所列的仪器/色谱柱条件分析加热对照样品和氧化强制降解样品。为避免之前的钝化处理的影响, 本研究使用新色谱柱, 并依次用100% IPA和HPLC级水彻底冲洗仪器。为支持本应用纪要的概念验证目的, 回收率结果以峰面积百分比报告, 而不以质量百分比报告。未采用MaxPeak Premier技术的ACQUITY Arc系统和/或XBridge XP色谱柱都以“常规”一词指代。

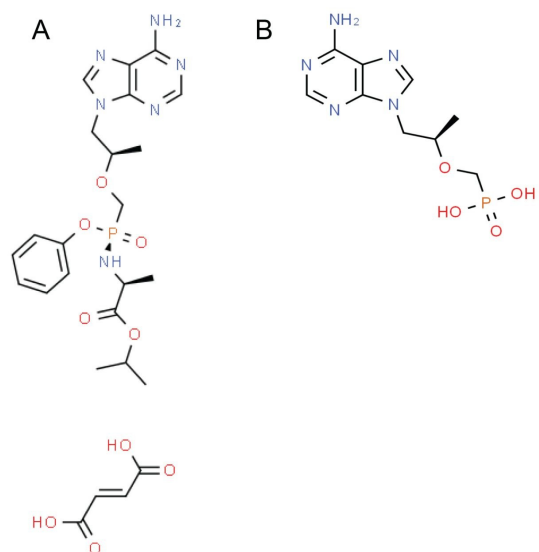


图1.(A)前药富马酸丙酚替诺福韦和(B)替诺福韦(7)的结构。

设置	仪器	色谱柱类型
1	ACQUITY Arc系统	XBridge XP
2	ACQUITY Arc系统	XBridge Premier
3	Arc Premier系统	XBridge Premier

表1.常规仪器和/或色谱柱以及MaxPeak Premier仪器和/或色谱柱的系统设置。

## 结果与讨论

分别使用三种设置分析替诺福韦参比标准品时，观察到了显著的色谱性能差异。采用常规设置运行分析时，不仅峰高较低，而且由于峰拖尾效应比较明显，难以对峰面积进行积分。与之相比，采用MaxPeak Premier技术运行分析时，峰面积、峰高和USP信噪比(s/n)性能均明显改善，且5 $\sigma$  (8)处的峰宽和USP拖尾减少，可以直接积分（图

2, 表2)。

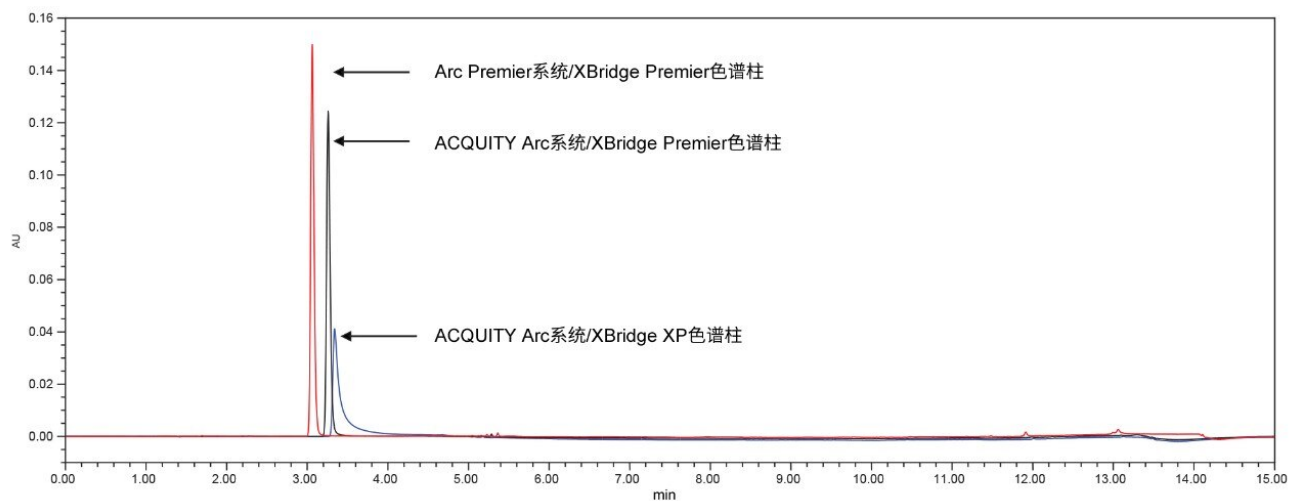


图2.替诺福韦参比标准品在不同系统设置下的峰性能的叠加图。

系统	峰面积	峰高	USP s/n	USP拖尾因子	5 $\sigma$ 处峰宽(8)
1	300882	41179	2612	3.85	0.40
2	391311	124377	7027	1.28	0.11
3	437073	149826	10050	1.25	0.10

表2.使用常规系统和使用MaxPeak Premier技术分析替诺福韦参比标准品的峰性能。

使用稳定性方法分析强制降解样品时，母体分子（即前药）富马酸丙酚替诺福韦在色谱柱中保留至8.4 min，而作为降解产物的替诺福韦大约在3.1min处洗脱（图3）。使用常规技术运行分析时，由于峰拖尾效应较为明显，对照样品中的替诺福韦峰很难与基线噪音区分。在叠加空白进样后对这个非常宽的峰进行手动积分，结果显示回收率刚好高于0.1%的杂质报告阈值。使用MaxPeak Premier技术运行分析时，强制降解样品中替诺福韦的峰性能明显改善，回收率是传统技术回收率的近4.5倍，远超过0.1%的杂质报告阈值（图4）。采用常规技术分析氧化强制降解样品的结果显示出类似趋势，回收率为1.38%。使用MaxPeak Premier技术时，回收率提高到了3%以上。

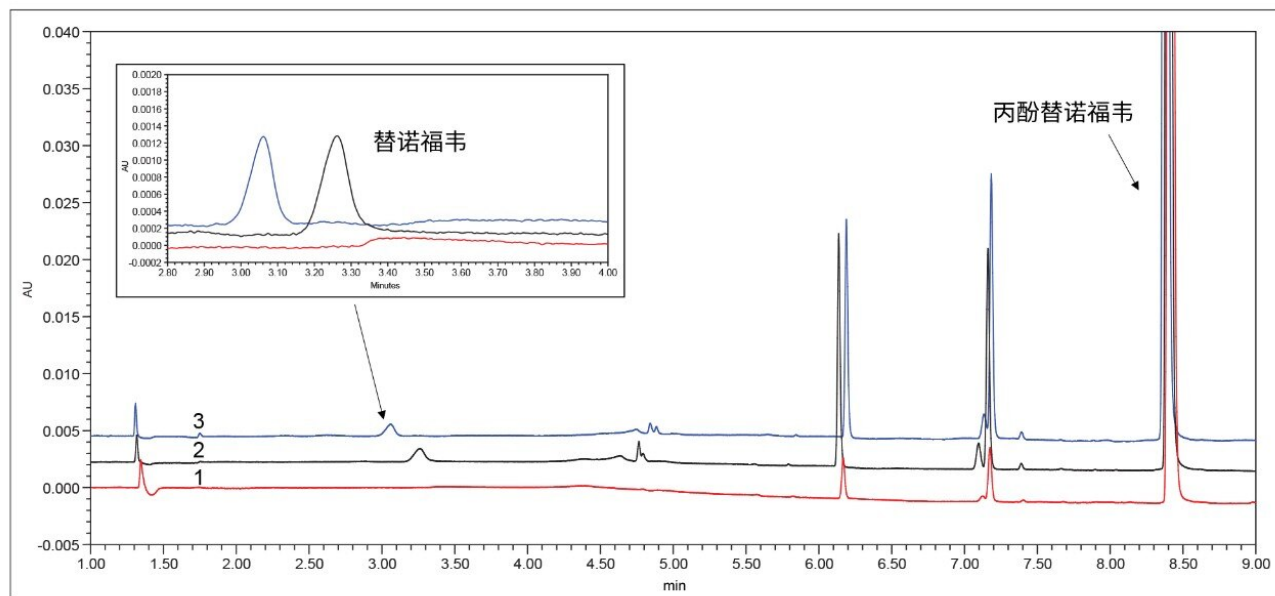


图3.采用三种系统设置分析强制降解对照样品的色谱性能比较：(1) ACQUITY Arc系统/XBridge XP色谱柱，(2) ACQUITY Arc系统/XBridge Premier色谱柱，和(3) Arc Premier系统/XBridge Premier色谱柱。插图显示了被鉴别为替诺福韦的低水平降解产物的回收率。

替诺福韦峰面积%

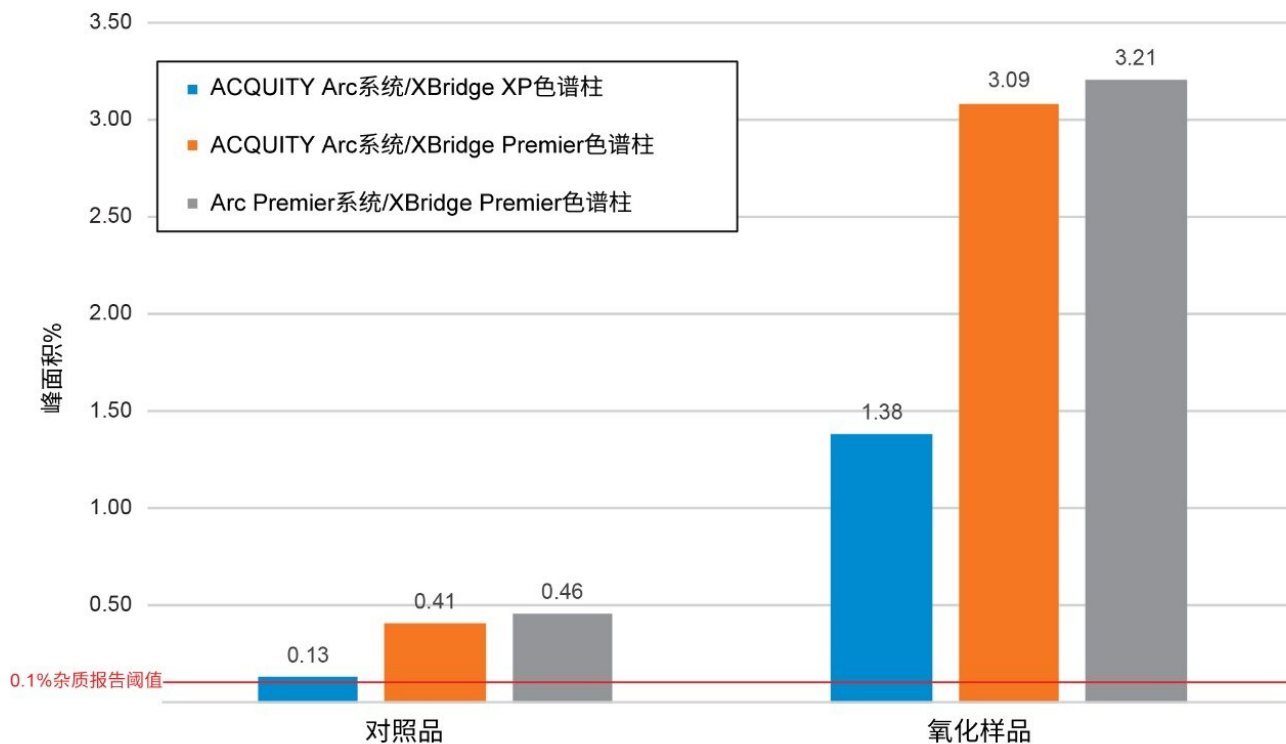


图4.对照样品和氧化强制降解样品的替诺福韦回收率。

## 结论

MaxPeak Premier技术在检测和回收金属敏感分析物方面具有明显的优势。如果没有这项新技术，替诺福韦这种高反应性的抗病毒药物几乎无法检测，而且由于峰形不佳，强制降解样品中的替诺福韦峰需要手动积分。采用MaxPeak Premier仪器和/或色谱柱技术可以减少金属-表面相互作用，使得痕量分析物很容易就被检测到，并且远远超过FDA杂质阈值报告限。

## 参考资料

1. Plumb R. and Wilson I., “Metal-Analyte Interactions – An Unwanted Distraction” , *The Column*.Vol 17 (8), 2021.
2. Mathew DeLano, Thomas H. Walter, Matthew A. Lauber, Martin Gilar, Moon Chul Jung, Jennifer M. Nguyen, Cheryl Boissel, Amit V. Patel, Andrew Bates-Harrison, and Kevin D. Wyndham.*Analytical Chemistry Vol 93* (14), 2021.
3. ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference on Harmonization, 2003.
4. “Guidance for Industry #5, Drug Stability Guidelines” , FDA Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 4 (21CFR211), accessed 11/16/21.
5. Vijaya Madhyanapu Golla, Moolchand Kurmi, Karimullah Shaik, Saranjit Singh. “Characterization of Degradation Products of Tenofovir Alafenamide Fumarate and Comparison of Its Degradation and Stability Behaviour with Tenofovir Disoproxil Fumarate” .*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 131 (2016) 146–155.
6. Catharine E. Layton, Paul D. Rainville. 使用"分析方法质量源于设计"自动开发稳定性方法, 沃特世应用纪要 , [720007480EN](#), 2021.
7. 2D Structure Database, [www.ChemSpider.com](http://www.chemspider.com) <<http://www.chemspider.com/>> , accessed 12/02/21.
8. Joseph C. Arsenault and Patrick McDonald. “Beginners Guide to Liquid Chromatography” , Waters Corporation Primer.[715001531](#) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919>> , 2007.

---

## 特色产品

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

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>



720007487ZH, 2022年1月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.