

利用亲水作用液相色谱法分析和定量药物配对离子

Brianna R Clements, Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

亲水作用液相色谱法(HILIC)与蒸发光散射检测器(ELSD)相结合可用于阴离子和阳离子药物配对离子的分离、检测和定量。此法进一步展示了一种可用于分离活性药物成分(API)游离碱与盐配对离子的单一方法。

优势

原料药中阴离子和阳离子药物配对离子的单一HILIC分析方法

简介

据报道,大约50%的药物都能与某种形式的盐结合¹。许多API缺乏治疗性生物利用度所需的溶解度^{2,3}。因此,将不溶性API与可溶性盐结合,可以提高生物利用度并减少达到治疗效果所需的API用量。鉴定并定量游离碱和盐配对离子是制药行业非常重要的质控环节⁴。由于API及其盐类之间的化学差异,最终药品的鉴定和定量需要使用反相色谱和离子交换色谱等多种方法。使用HILIC可以解决这一挑战,这项技术的工作原理与传统反相色谱法的工作原理相反。在HILIC中,水性流动相为强溶剂,有机溶剂流动相为弱溶剂。水性-有机溶剂混合流动相在极性固定相周围形成水层,使分析物根据不同极性在水层和有机溶剂层之间分配。

HILIC固定相也可以用不同的官能团修饰，从而提高该技术的选择性。本研究使用的两性离子型HILIC固定相含有一个磺基甜菜碱官能团，该官能团有一个带负电的磺酸盐基团和一个带正电的季铵盐基团⁵。这种特性使阳离子和阴离子的保留和分离能够在同一方法中完成。药品分析的另一项挑战是某些成分可能缺少发色团，通用型检测器可以应对这种问题。因此，本研究使用ELSD。ELSD技术的工作原理是通过雾化流动相使分析物离开色谱柱，挥发性流动相蒸发后留下干燥的溶质颗粒。这些干颗粒流入ELSD检测器并散射光束，散射光的量可以测量出来，并且与洗脱物质的浓度有关⁶。HILIC与ELSD结合为分离和定量游离碱API中的药物配对离子提供了一种战略方法。

实验

分离方法的样品描述

本研究中使用的盐为氯化钾、硫酸钠、硝酸钙、磷酸钾和氯化镁，均购自Sigma Aldrich（宾夕法尼亚州艾伦镇）。用50%乙腈为这些不同的盐配制1 mg/mL浓度的单独储备液。然后合并这些盐的储备溶液，使用60%乙腈稀释至0.1 mg/mL浓度，制备溶解的配对离子标准溶液。在2 °C–8 °C下储存溶液，临分析前平衡至室温。

线性样品描述

本研究的线性部分使用的盐为硫酸钠、氯化镁和磷酸钾，均购自Sigma-Aldrich（宾夕法尼亚州艾伦镇）。用60%乙腈为这些不同的盐配制100 mM浓度的单独储备液。然后用60%乙腈将这些盐的储备溶液分别稀释，制成浓度范围为1~100 mM的各种校准标准溶液，由此绘制三条不同的线性曲线。在2 °C–8 °C下储存溶液，在稀释或进样前平衡至室温。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ Arc™ Premier液相色谱系统
检测器：	Waters™ 2424蒸发光散射检测器
色谱柱：	Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC, 4.6 x 100 mm, 2.5 μm

柱温： 40 °C

样品温度： 室温

进样体积： 10 µL

流速： 1.4 mL/min

流动相A： 乙腈

流动相B： 去离子水（DI水）

流动相C： 200 mM甲酸铵

流动相D： 2%甲酸

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
初始	1.4	80.0	10.0	5.0	5.0	初始
10.00	1.4	10.0	80.0	5.0	5.0	6
12.00	1.4	10.0	80.0	5.0	5.0	6
12.10	1.4	80.0	10.0	5.0	5.0	6
16.00	1.4	80.0	10.0	5.0	5.0	6

数据管理

色谱软件： Waters Empower™ 3软件Build 3471

结果与讨论

分离方法的结果

使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱开发的方法可以分离各种不同的配对离子，具有良好的保留性、分离度和重现性。选择ELS检测器是因为配对离子结构中缺少发色团。

配对离子标准品的分析表现出良好的重现性，十次进样中峰面积和保留时间的RSD均为5%（图1a、表1和表2）。钾离子、磷酸根离子和镁离子的保留时间RSD在5%以内，峰面积RSD在6%以内（表1）。当使用ELSD等基于喷雾器的检测方法时，这样的%RSD水平符合预期。

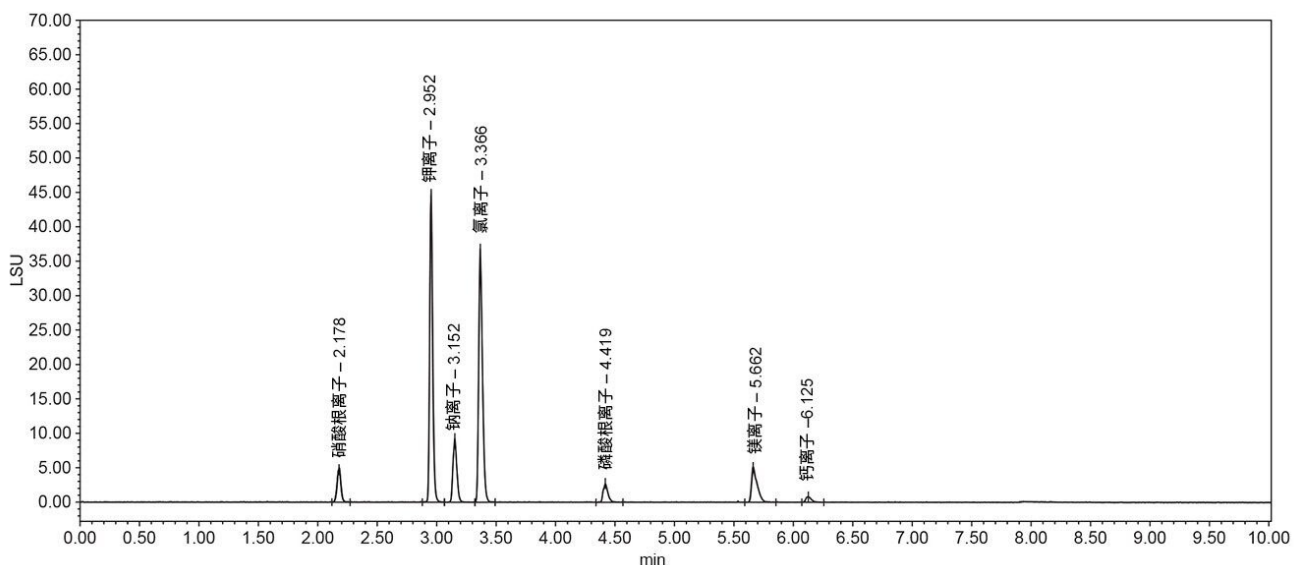


图1a. 配对离子混标十次进样的叠加色谱图

峰面积 (按名称汇总)

	硝酸根离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	钾离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	钠离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	氯离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	磷酸根离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	镁离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	钙离子 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	11202	66827	22044	81075	5895	15130	1985
2	11596	73040	21399	76746	6615	14313	2099
3	12158	74254	22011	85090	6898	16927	2200
4	11703	76019	21548	77038	6357	17129	2228
5	11062	79606	21567	84985	6127	16963	2163
6	10593	75686	21432	76238	6513	16483	2150
7	10534	70677	21753	82166	6344	16920	1921
8	11511	76823	22204	84018	6708	16258	2024
9	11278	76390	21523	85719	5567	16070	1987
10	10687	80723	22545	81766	6110	16745	2099
平均值	11232.5	75004.5	21802.6	81481.2	6313.4	16293.8	2085.7
标准偏差	528.8	4090.8	382.1	3652.7	399.8	913.5	102.5
% RSD	4.7	5.5	1.8	4.5	6.3	5.6	4.9

表1. 配对离子混标的峰面积计数及其%RSD

保留时间 (按名称汇总)

	硝酸根离子 (min)	钾离子 (min)	钠离子 (min)	氯离子 (min)	磷酸根离子 (min)	镁离子 (min)	钙离子 (min)
1	2.175	2.947	3.150	3.360	4.406	5.656	6.128
2	2.175	2.952	3.152	3.362	4.418	5.664	6.130
3	2.176	2.953	3.154	3.365	4.427	5.661	6.129
4	2.176	2.950	3.151	3.366	4.426	5.662	6.126
5	2.176	2.953	3.150	3.363	4.417	5.662	6.122
6	2.177	2.951	3.149	3.365	4.422	5.658	6.122
7	2.177	2.953	3.152	3.362	4.415	5.660	6.128
8	2.178	2.950	3.152	3.365	4.422	5.659	6.127
9	2.178	2.952	3.154	3.365	4.425	5.661	6.120
10	2.180	2.952	3.152	3.364	4.421	5.665	6.125
平均值	2.2	3.0	3.2	3.4	4.4	5.7	6.1
标准偏差	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% RSD	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1

表2. 配对离子标准品十次进样的保留时间及其%RSD

此外，该方法已被证明能够分离配对离子，还可以分离API游离碱及其盐类，并对盐类进行定量。用60%乙腈配制不同浓度的萘普生钠、盐酸二甲双胍和氯沙坦钾溶液。将这些溶液所得的峰与配对离子标准品的峰对齐，以鉴定从药物盐的游离碱中分离的离子（图2a-2d）。

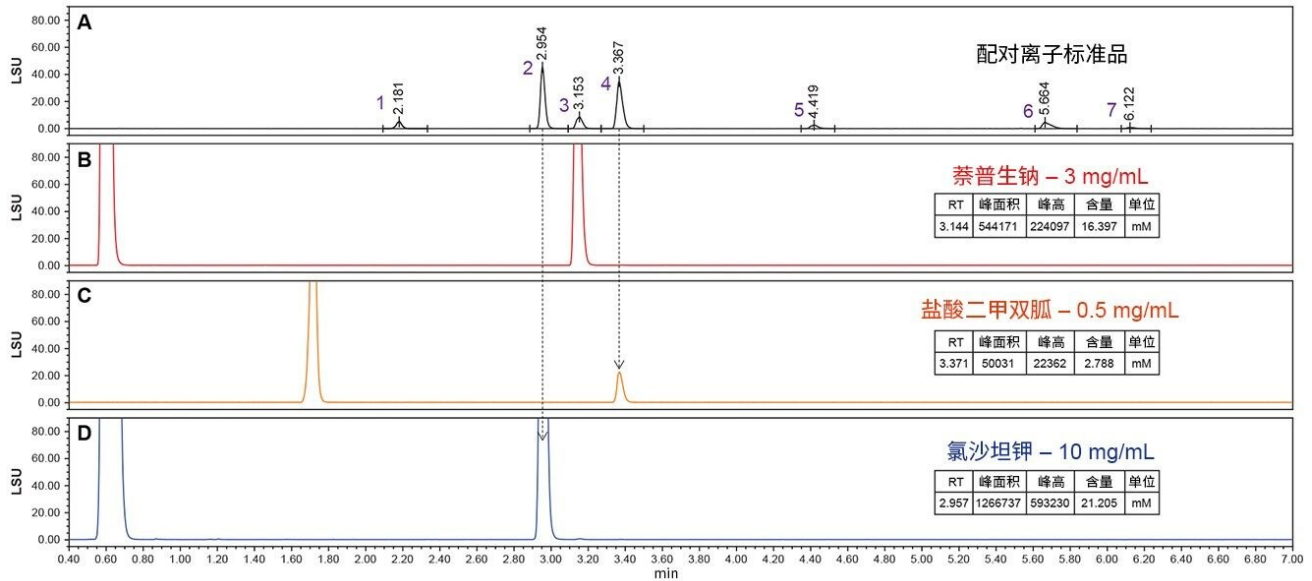


图2a. 配对离子标准品的ELSD色谱图（黑色）。图中各峰具体为：硝酸根离子(1)、钾离子(2)、钠离子(3)、氯离子(4)、磷酸根离子(5)、镁离子(6)、钙离子(7)。将这些已知的配对离子作为参比，与图2b、2c和2d中的药物样品进行比较。用箭头将图2a中已知的配对离子与药物样品中的相应离子（图2b、2c和2d）对应起来。

图2b. 药物萘普生钠（浓度为3 mg/mL）的ELSD色谱图（红色）。萘普生游离碱在大约0.6分钟时出现，钠离子在大约3.1分钟时出现。此图中的钠离子峰与图2a中已知的钠离子峰一致。钠离子定量为16.397 mM。

图2c. 药物盐酸二甲双胍（浓度为0.5 mg/mL）的ELSD色谱图（橙色）。二甲双胍游离碱在大约1.7分钟时出现，氯离子在大约3.4分钟时出现。此图中的氯离子峰与图2a中已知的氯离子峰一致。氯离子定量为2.788 mM。

图2d. 药物氯沙坦钾（浓度为10 mg/mL）的ELSD色谱图（蓝色）。氯沙坦钾游离碱在大约0.7分钟时出现，钾离子在大约3.0分钟时出现。此图中的钾离子峰与图2a中已知的钾离子峰一致。钾离子定量为21.205 mM。

线性结果

将各种盐制成100 mM的储备液，然后在2.5 mM~100 mM范围内筛查所有盐。根据盐的溶解度和检测器容量，分别重新计算每种盐的线性范围。每种配对离子的具体线性范围见下面的表3：

表3

配对离子	线性范围 (mM)	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
钾离子	8 ~ 40	312.6 ~ 1562.9
钠离子	4 ~ 60	92.4 ~ 1385.8
氯离子	2 ~ 20	71.5 ~ 715.0

根据ELSD操作员指南中的建议，使用线性log/log拟合计算每种配对离子的线性⁶。在Empower 3中生成曲线（图3a-3c）。这些线性曲线可用于定量图2所示药物样品中的离子。

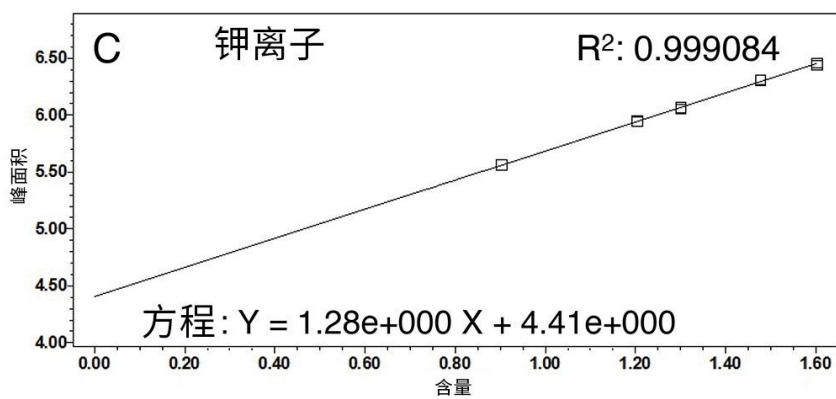
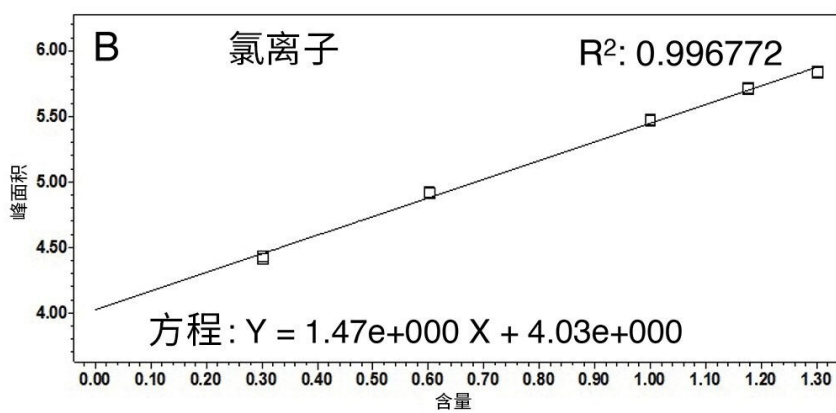
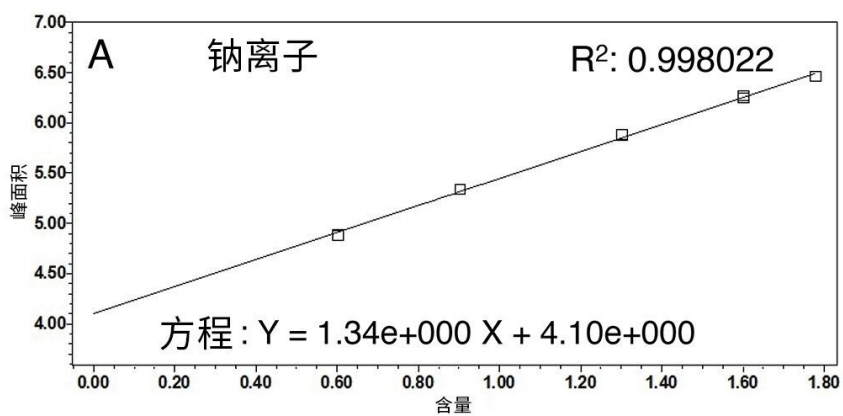


图3a.4 mM~60 mM浓度之间钠离子的校准曲线。

图3b.2 mM~20 mM浓度之间氯离子的校准曲线。

图3c.8 mM~40 mM浓度之间钾离子的校准曲线。

配对离子曲线的 R^2 值 ≥ 0.997 。这表明将ELSD和HILIC结合使用可以准确计算配对离子的浓度，为药物配对离子的定量分析提供了解决方案。

在整个研究过程中，为保持系统数据的重现性，我们采取了一些推荐的措施。在大约100次进样后，按照ELSD操作员手册中的详细说明，通过超声处理喷雾器和冲洗漂移管来清洁ELSD⁶。因为大多数常见的配对离子是非挥发性盐，可能会在ELSD中累积和沉淀。

此外，水性流动相应每周新制，并建议进行空白进样试验，确保进样前基线平稳。

结论

在制药行业，方法的质量和效率非常重要。本研究将Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与ELSD结合使用，经证明可以成功保留和分离盐中的各种配对离子，以及分离配对离子与相应的API游离碱。此外，该方法的动态线性有助于准确定量配对离子。分析结果的重现性良好，能够应对原料药中配对离子分析的挑战。

参考资料

1. Saal C, Becker A. Pharmaceutical salts: A Summary on Doses of Salt Formers From the Orange Book. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2013 Jul 16 [cited 2022 Jan 5];49(4):614–623. 参考网站：
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098713002170?viewFullText=true#b0010>.
<
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098713002170?viewFullText=true#b0010>
>
2. Staiger Pharm D. B. What Are “Salt Forms” Of Drugs And Why Are They Different? [Internet]. Walrus. *Walrus Health*; 2018 [cited 2022 Jan 5]. 参考网站：<https://walrus.com/questions/what-are-salt-forms-of-drugs-and-why-are-they-different> <<https://walrus.com/questions/what-are-salt-forms-of-drugs-and-why-are-they-different>> .

3. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *International Scholarly Research Notices Pharmaceutics* [Internet]. 2012;2012:1–10. 参考网站: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399483/> <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399483/>> .
4. Dotzel M. Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: *Chemical Substances* [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2000 [2022年1月5日引用].参考网站: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q6a-specifications-test-procedures-and-acceptance-criteria-new-drug-substances-and-new-drug-products> <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q6a-specifications-test-procedures-and-acceptance-criteria-new-drug-substances-and-new-drug-products>> .
5. Walter T, Berthelette K, Patel A, Alden B, McLaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Atlantis™ BEH Z-HILIC简介: 一种基于有机/无机杂化颗粒的两性离子固定相 [Internet]. www.waters.com. 沃特世公司; 沃特世应用纪要: 720007311ZH 2021.
6. 沃特世公司.2424蒸发光散射检测器操作员指南 71500121802ZH <
<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500121802rb.pdf>> 修订版B. 2006.

特色产品

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

2424蒸发光散射(ELS)检测器 <<https://www.waters.com/514428>>

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

720007564ZH, 2022年3月

© 2022 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