Nexera UC 系统在原料药杂质分析中的应用

SFC-001

摘要：本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离，通过考察多种色谱柱和流动相组合，DAICEL DCpak SFC-A 和乙醇为流动相时可获得主药和杂质的最佳分离效果。在此基础上建立杂质 SFC 分析方法，结果显示杂质在 50~500 mg/L 线性良好，保留时间和峰面积重复性 RSD 在 0.2% 和 1.5% 以内。

关键词：Nexera UC SFC 药物杂质

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography ,SFC) 是以超临界流体为主要流动相，添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界 CO_2($scCO_2$) 以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFC 常用的主要流动相。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

本实验使用的岛津 Nexera UC SFC-UV 系统属于岛津最新的超临界流体色谱仪系列产品，具有系统耐压高、背压阀 (BPR) 内部体积小、灵敏度高、操作界面通用性好等特点。本实验对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离，通过考察多种色谱柱和流动相组合获得最优分析条件，并建立杂质 SFC 分析方法，结果显示线性和重复性等表现良好，可为进一步开展该类药物定性定量研究提供分离方法的参考。《中国药典 (2015 版)》首次收载超临界流体色谱法 (四部 0531 法) 作为药物分析的可选方法，岛津 Nexera UC 系统可为相关药物的 SFC 分析方法建立提供帮助。

实验部分

1.1 仪器

Nexera UC SFC-UV 系统

具体配置为：LC-30ADSF(CO_2 输液泵)，LC-20ADXR(输液泵，含 LPGU 低压梯度比例阀)，DGU-20A5(在线脱气机)，SIL-30AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，SFC-30A(背压调节单元)，SPD-20A(紫外检测器)，CBM-20A(系统控制器)，LabSolutions Ver5.8(色谱工作站)。

1.2 样品信息

二乙酰鸟嘌呤是重要的医药中间体，杂质检测是其质量控制的关键。该化合物在常用溶剂中溶解性差，并且遇水分解，使得常规的 RP-HPLC 分析不能实现。本实验中以少量 DMSO 溶解该样品后再以 DMSO-ACN (1:1,v/v) 稀释，经过滤后进样分析。

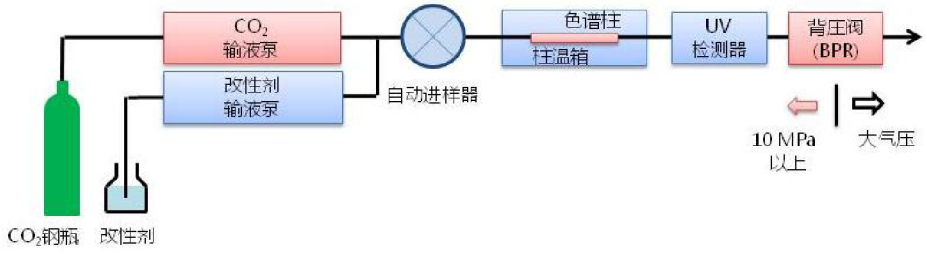


图1　Nexera UC SFC-UV系统

表1　化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	乙酰基鸟嘌呤	N2-Acetylguanine	19962-37-9	$C_7H_7N_5O_2$
2	二乙酰鸟嘌呤	N(2),9-Diacetylguanine	3056-33-5	$C_9H_9N_5O_3$

结果讨论

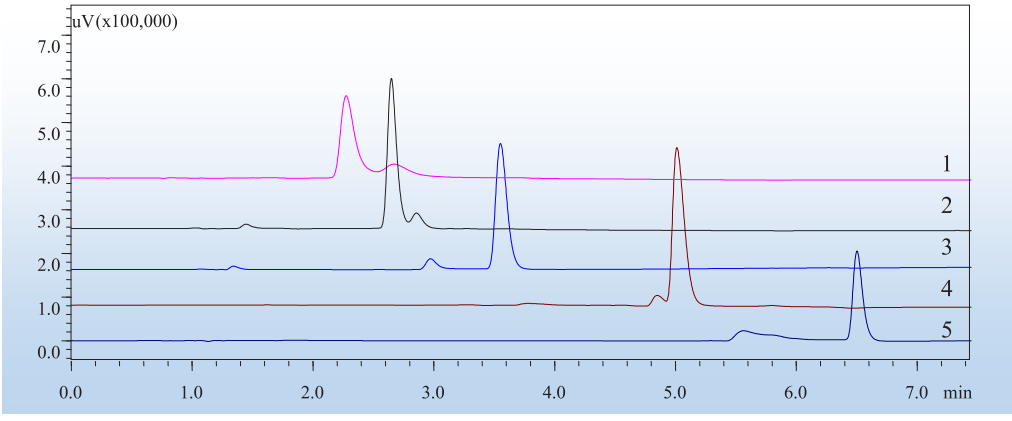


图2　Nexera UC SFC-UV甲醇为改性剂时不同色谱柱分离效果对比（检测波长：264mm）
1.ODS-P, 2.ODS-4, 3.OD-H, 4.SIL, 5.SFC-A

2.1 色谱柱填料对分离的影响

实验考察了 GL science ODS-P、ODS-4、SIL 及 Daisel 的 OD-H 和 SFC-A 五款色谱柱，所用规格均为 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm。在 $scCO_2$–MeOH 体系中对样品进行分析，结果显示 ODS-P、ODS-4 和 SIL 对样品中主成分和杂质分离度不佳，OD-H，SFC-A 对该样品中两种成分的分离效果较前三款色谱柱好，如图 2 所示。对比 OD-H，SFC-A 发现，SFC-A 虽然对主成分前的杂质峰形表现较差，但对该杂质的响应优于其在 OD-H 色谱柱上的表现。

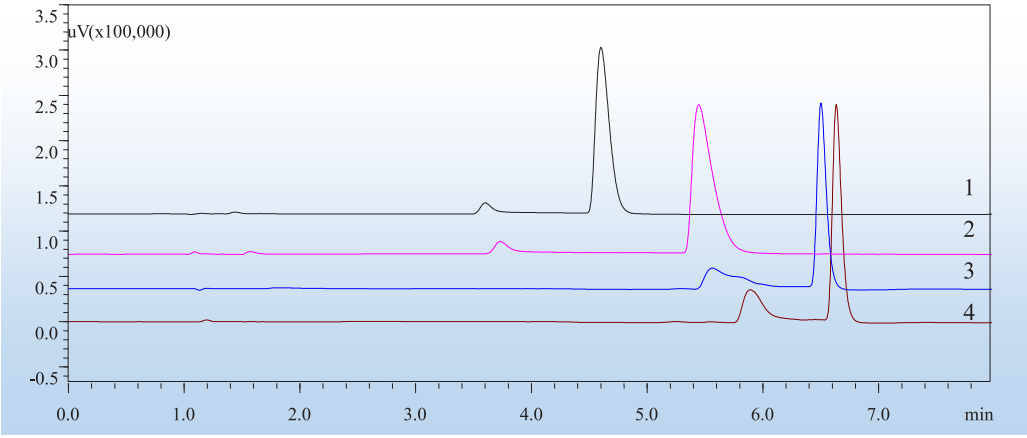


图3　甲醇和乙醇作为改性剂时分离效果对比（检测波长：264nm）
1.OD-H-甲醇，2.OD-H-乙醇，3.SFC-A-甲醇，4.SFC-A-乙醇

2.2 流动相对分离的影响

SFC 分析中，scCO2 和少量改性剂构成的混合流体对化合物的色谱保留行为具有显著影响，因此在色谱柱筛选的基础上对流动相进行优化，分别选择 scCO2-MeOH 和 scCO2-EtOH 在 OD-H 和 SFC-A 色谱柱上进行分析。结果显示在 SFC-A 色谱柱上以 scCO2-EtOH 进行分离时，无论是分离度还是杂质响应均为最佳，因此选择该条件为二乙酰鸟嘌呤样品的分析条件。

超临界流体色谱中，分离系统背压和柱温通常也是考察的关键。增高背压和提高温度可以改变超临界体的密度和粘度，进而改变洗脱能力和洗脱效果。本实验中，背压和柱温对实验结果影响并不显著，故在此未列出。

2.3 SFC 色谱条件

色谱柱：DAICEL DCpak SFC-A 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm
流动相：A-scCO$_2$；B- 乙醇
流速：3 mL/min
柱温：40℃
检测波长：264 nm
背压：10 MPa
进样量：1 μL
洗脱方式：梯度洗脱，起始比例 5%B，时间程序见表 2 所示

表2　梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
3	Pump	Pump B Con.	12
6	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	5
10	Controller	Stop	

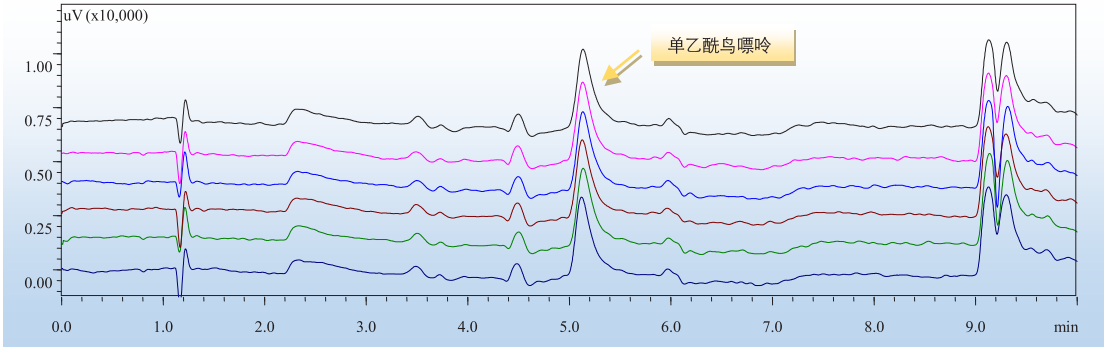
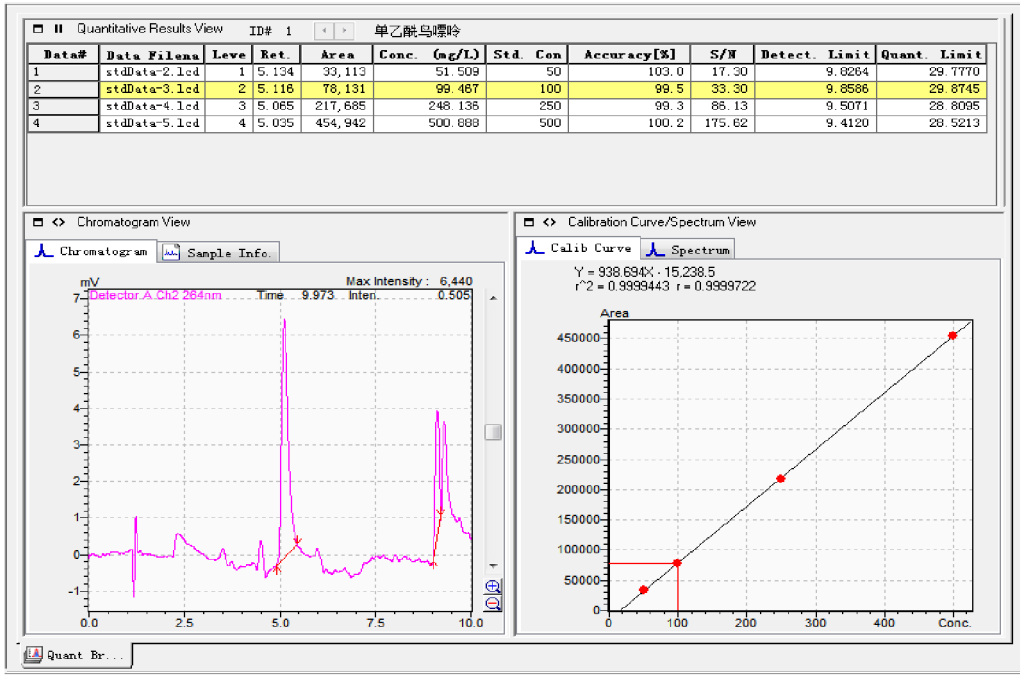


图4　杂质单乙酰鸟嘌呤(50 mg/L)重复性分析色谱图(n=6)

表3　单乙酰鸟嘌呤(50 mg/L)重复性分析结果(n=6)

	保留时间(min)	峰面积
1	5.135	34,567
2	5.132	33,970
3	5.134	34,476
4	5.128	34,480
5	5.137	33,973
6	5.121	35,047
平均值	5.131	34,419
RSD%	0.11	1.18



Data#	Data Filena	Leve	Ret.	Area	Conc. (mg/L)	Std. Con	Accuracy[%]	S/N	Detect. Limit	Quant. Limit
1	stdData-2.lcd	1	5.134	33,113	51.509	50	103.0	17.30	9.8264	29.7770
2	stdData-3.lcd	2	5.116	78,131	99.467	100	99.5	33.30	9.8586	29.8745
3	stdData-4.lcd	3	5.065	217,685	248.136	250	99.3	86.13	9.5071	28.8095
4	stdData-5.lcd	4	5.035	454,942	500.888	500	100.2	175.62	9.4120	28.5213

图5　单乙酰鸟嘌呤标准曲线及参数

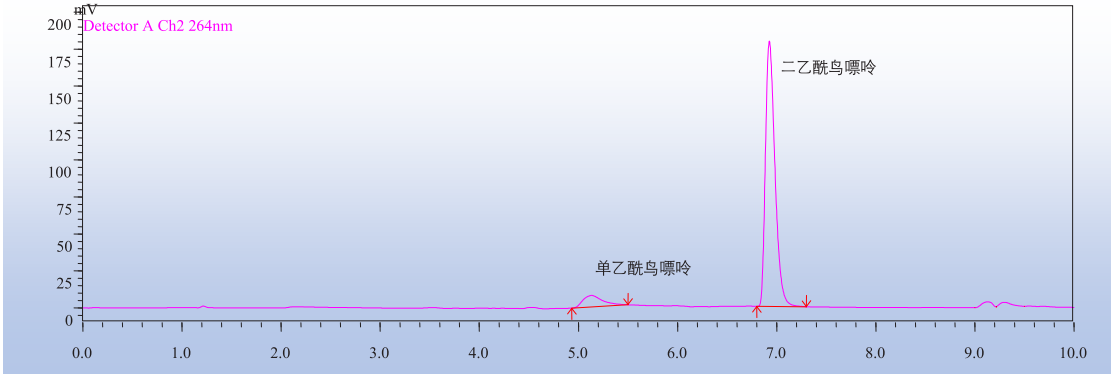


图6　二乙酰鸟嘌呤样品分析结果

结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对药物中间体二乙酰鸟嘌呤中的杂质进行分析，有效避免使用反相色谱分析中该药物不稳定遇水分解的可能，并且 SFC 系统分析速度快、重现性好、灵敏度高、溶剂消耗少并且安全环保，另外使用 $scCO_2$、甲醇、乙醇、乙腈等做流动相时和质谱联用也不存在任何障碍，方便 SFC 方法直接移植成为 SFC-MS 方法，可进一步提升检测灵敏度和扩展应用领域。