

MaxPeak HPS技术分析抗病毒化合物可提高色谱性能

Catharine Layton, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

抗病毒药物化合物是目前的研究重点，可用于治疗轻度、中度和重度严重疾病，例如新型冠状病毒病(COVID-19)¹。因此，迫切需要开发常规色谱方法来分析这些药物化合物，明确区分微量杂质和降解产物，避免这些物质达到警戒/作用水平。对于方法开发而言，保留性、峰形和灵敏度是至关重要的色谱参数。

MaxPeak高性能表面(HPS)是一种创新的有机-无机杂化表面技术，可降低因分析物与色谱仪器和色谱柱表面金属离子的非特异性结合而导致的样品损失^{2,3}。在本应用纪要中，我们通过反相HPLC分离了一组抗病毒化合物，比较了搭载MaxPeak HPS技术的XBridge Premier色谱柱与常规不锈钢色谱柱的色谱性能。

优势

使用XBridge Premier色谱柱分离的抗病毒治疗化合物表现出更高的峰高响应、更佳的信噪比(S/N)，以及更窄的色谱峰，无需使用强离子对试剂、螯合剂或漫长的钝化方案。

简介

药物研发实验室对于开发更快、更灵敏、更稳健的色谱方法从未停止追求。高压液相色谱(HPLC)通常是监测质量和稳定性的首选分析方法，具有较高的定量和定性精密度。

HPLC色谱柱表面和仪器组件由不锈钢构成，因为该材料的可用性和机械强度较高。然而，不锈钢材料在暴露于刺激性液体时易遭腐蚀，例如色谱分析中常用的含有酸和/或卤化物的流动相。腐蚀产生的金属离子可以与色谱柱固定相结合，通过络合、氧化和差向异构化反应与分析物相互作用，导致峰形变差、不可接受，尤其是在低浓度水平下可能导致目标分析物完全损失²。

对此，通常采用流动相添加剂，如离子对试剂（例如三氟乙酸(TFA)）或螯合剂（例如亚甲基二膦酸），来减轻仪器和色谱柱内的分析物-金属结合。是否使用这些试剂可以成为衡量成功的指标，这些试剂可能导致仪器污染、色谱柱填料发生不可逆的改性、LC-MS应用中发生离子抑制效应²。钝化是指进样一系列分析物，通过分析物使仪器和色谱柱“老化”的一种常用技术，该技术可能降低每日精密度的总体可信度³。

使用钛和镍钴合金等替代金属制成的色谱柱具有耐腐蚀性，已在多种应用中采用，但这些金属在某些条件下也可能劣化。除过渡金属外，还可以采用聚醚醚酮(PEEK)制成的色谱柱，但此类色谱柱存在溶剂兼容性和柱压方面的限制²。

在本应用纪要中，我们比较了XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱和常规XBridge BEH C₁₈不锈钢色谱柱分离12种代表性抗病毒药物化合物的色谱性能。抗病毒药物化合物的研发目前处于飞速进展阶段，这些化合物可治疗多种严重疾病⁴。

实验

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Arc，配备四元溶剂管理器(rQSM)、样品管理器(rFTN)、色谱柱管理器(rCM)、Empower 3色谱数据软件
检测器：	ACQUITY光电二极管阵列检测器(PDA)，UV 245 nm

色谱柱:	XBridge Premier BEH C ₁₈ , 2.5 μm, 4.6 x 150 mm, 部件号: 186009849 XBridge BEH C ₁₈ XP, 2.5 μm, 4.6 x 150 mm, 部件号: 186006711
柱温:	50 °C
样品温度:	20 °C
进样体积:	1 μL
流速:	1.5 mL/min
流动相A:	10 mM甲酸铵, pH 4.0
流动相B:	乙腈
梯度:	2%流动相B, 保持4min, 在15min内线性增加至95%, 随后保持1min, 然后返回到初始条件2%

结果与讨论

取每种抗病毒化合物约0.5 mg溶解于10 mL水中, 制备抗病毒化合物溶于水性溶剂的混合物 (替诺福韦、法匹拉韦、恩曲他滨、利巴韦林、阿巴卡韦和奥司他韦)。取每种抗病毒化合物约0.5 mg溶解于10 mL甲醇中, 制备抗病毒化合物溶于有机溶剂的混合物 (马赛替尼、达芦那韦、瑞德西韦、阿扎那韦、利托那韦和洛匹那韦) (图1)。每种混合物进样之前分别用具有溶剂兼容性的0.2 μm针式过滤器 (沃特世部件号 [WAT200806 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html) 或沃特世部件号 [WAT200822 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200822-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-organic-100-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200822-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-organic-100-pk.html)) 过滤。

[syringe-filter-ptfe-25-mm-02--m-non-polar-1000-case.html](#)>) 过滤。依次使用100%异丙醇、水和流动相冲洗LC仪器。使用库存里未曾用于进样的新色谱柱。每种抗病毒化合物混合物在同一色谱柱上共进样5次，随后使用色谱柱管理器的切换阀更换色谱柱，连续进样，从而尽可能减少分析物引起的仪器钝化所导致的潜在偏差。

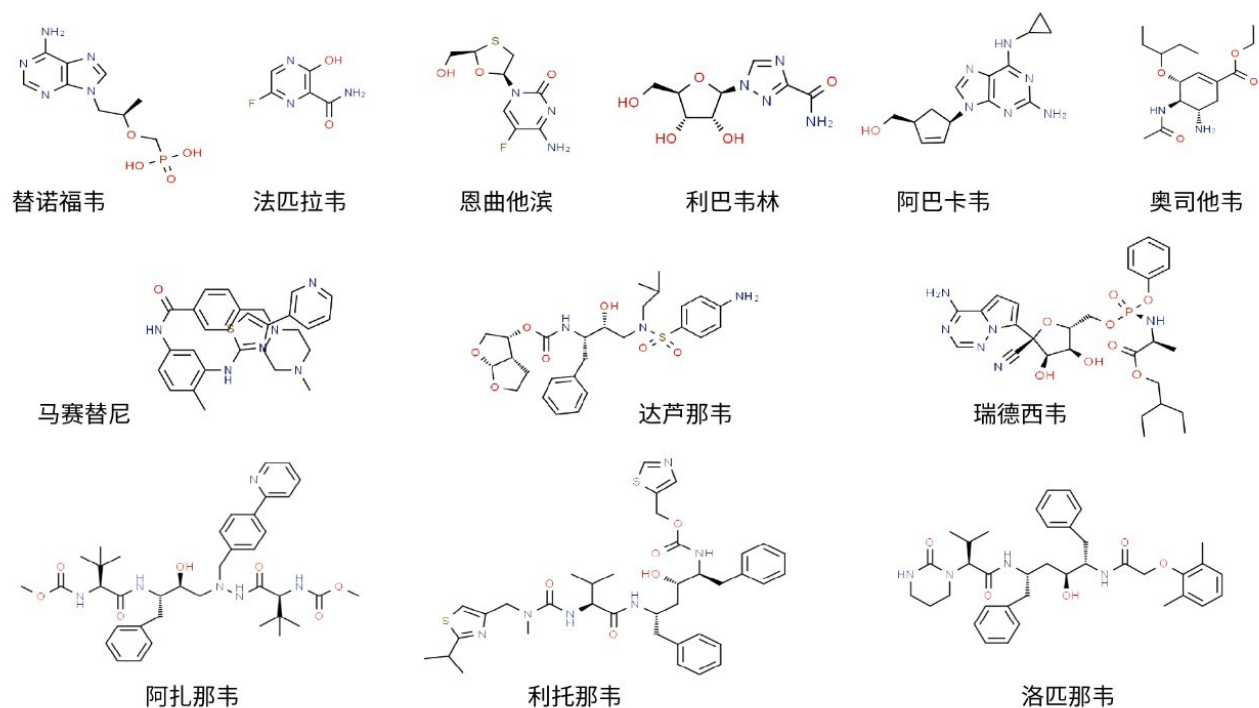


图1.反相色谱法分离的抗病毒化合物组合

该色谱法成功分离了12种抗病毒化合物，其中，溶于水的化合物保留时间小于9分钟，而溶于甲醇的化合物保留时间大于9分钟（图2）。

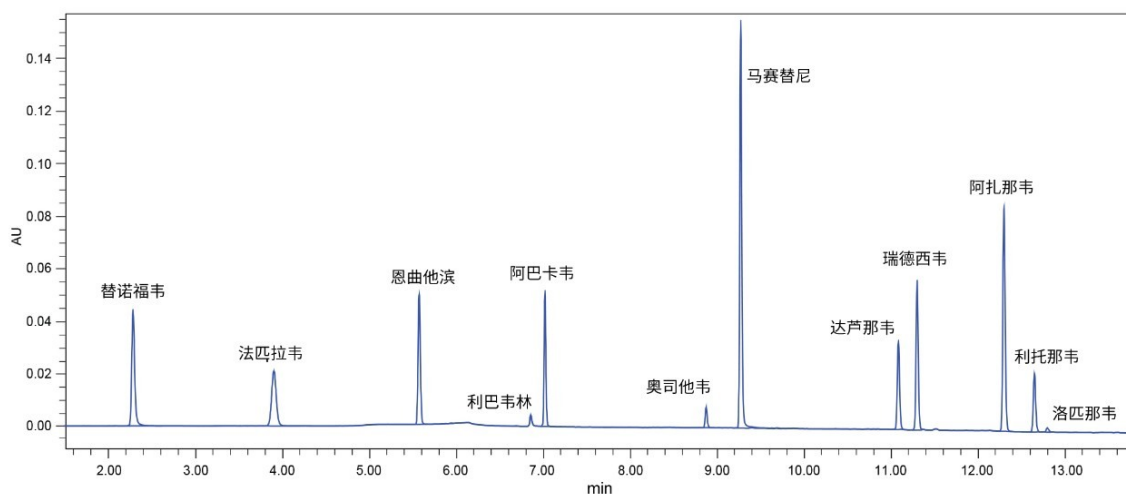


图2.反相色谱法分离抗病毒化合物

使用XBridge Premier色谱柱时，分析组合中的每种抗病毒化合物都表现出更高的峰高响应，因此S/N值更高。此外，在通过使用杂化表面技术尽量减少分析物与金属离子的相互作用后，分析组合中的多种化合物峰形都得到改善（即，对称性更好，拖尾减少）（图3）。5 σ 处峰宽是一项反映峰纯度和分析物-色谱柱相互作用的严格指标，在很大程度上受到峰不对称性的影响⁶。在本研究中，我们观察到在使用MaxPeak HPS技术时，12种化合物的5 σ 处峰宽均有显著降低，表明色谱柱性能提升（表1）。

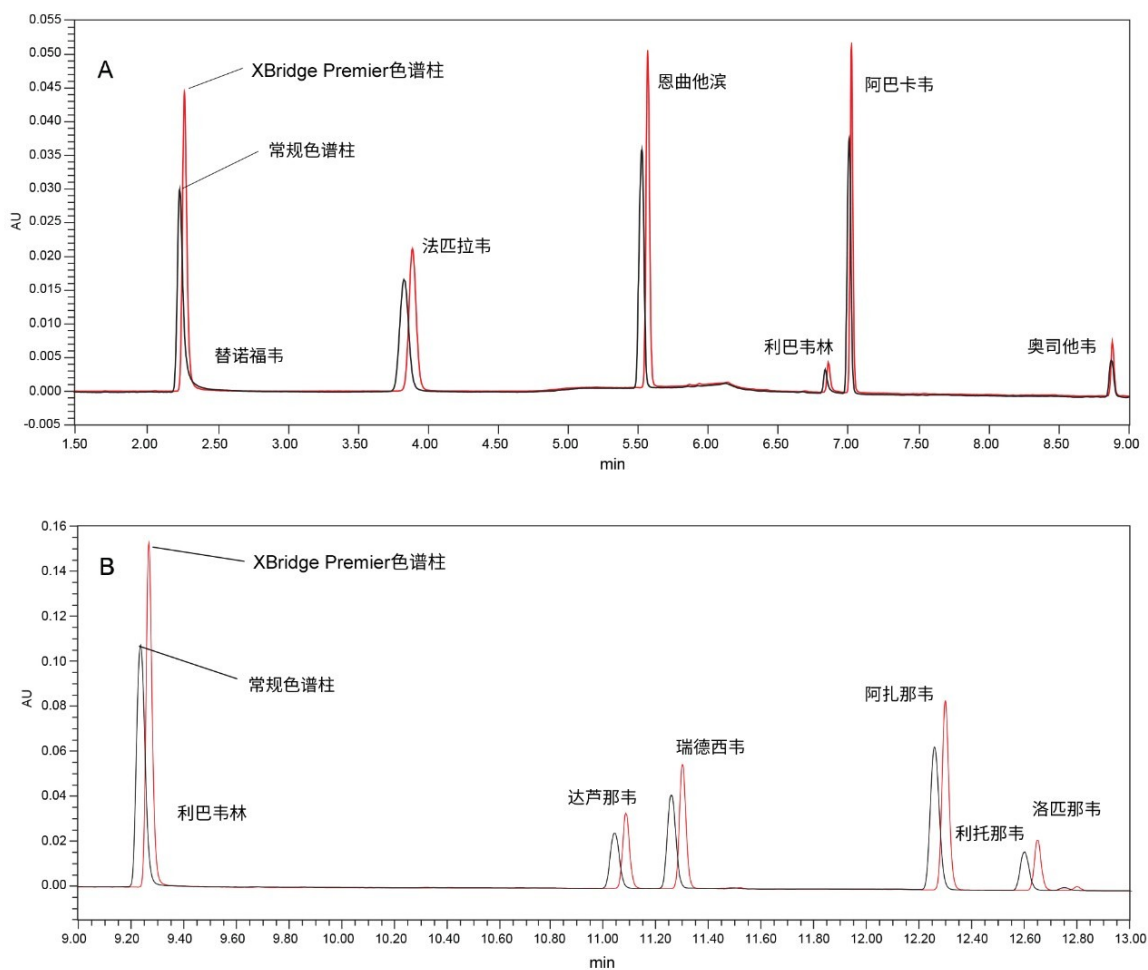


图3.XBridge Premier色谱柱（红色）和常规色谱柱（黑色）分析抗病毒化合物A) 水性溶剂溶液和B) 有机溶剂溶液的叠加色谱图

	XBridge Premier色谱柱	XBridge Premier色谱柱
	峰高响应值和S/N的增加倍数	5 σ 处峰宽的减少百分比
替诺福韦	1.6	43
法匹拉韦	1.4	13
恩曲他滨	1.5	94
利巴韦林	1.4	27
阿巴卡韦	1.5	17
奥司他韦	1.5	14
马赛替尼	1.4	14
达芦那韦	1.3	25
瑞德西韦	1.3	14
阿扎那韦	1.3	25
利托尼韦	1.3	25
洛匹那韦	1.3	45

表1.使用XBridge Premier色谱柱分离抗病毒化合物时，观察到峰高响应和S/N成倍增加，5 σ 处峰宽百分比降低。

结论

本研究表明，使用反相色谱法分析低水平抗病毒化合物时，搭载MaxPeak高性能表面技术的液相色谱柱（XBridge Premier色谱柱）的性能优于常规色谱柱。XBridge Premier色谱柱实现了峰高响应增加，信噪比(S/N)和峰形($w_{5\sigma}$)也随之升高和改善，无需使用离子对/螯合剂流动相添加剂或色谱柱钝化进样。

参考资料

1. Antiviral Therapies, NIH COVID Treatment Guidelines, www.nih.gov, accessed 9/20/21.
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, Kevin D. Wyndham. *Analytical Chemistry*, Vol 93 (14), 2021.
3. Plumb R. and Wilson I., “Metal-Analyte Interactions – An Unwanted Distraction” , *The Column*.Vol 17 (8), 2021.
4. Shamaila Kausar, Fahad Said Khan, Muhammad Ishaq Mujeeb Ur Rehman, Muhammad Akram, Muhammad Riaz, Ghulam Rasool, Abdul Hamid Khan, Iqra Saleem, Saba Shamim, Arif Malik.” A review: Mechanism of Action of Antiviral Drugs” , *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, Volume 35: 1–12, 2021.
5. 2D Structure Database, www.ChemSpider.com <<http://www.chemspider.com/>> , accessed 9/20/21.
6. Joseph C. Arsenault and Patrick McDonald. “Beginners Guide to Liquid Chromatography” , Waters Corporation Primer.715001531, 2007.

特色产品

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

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

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

720007398ZH, 2021年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.