

改进常见 β -2肾上腺素受体激动剂的HPLC-UV分离

Brianna R Clements, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

β -2肾上腺素受体激动剂(BA)是治疗慢性呼吸系统疾病(CRD)的常用处方药。多年来,BA一直是十大处方药之一。本研究开发了一种在14 min内可重现地分离多种类型的BA和BA杂质的方法。我们考察了pH值对分析的影响。此外,我们还证明了MaxPeak™高性能表面(HPS)技术的高pH值稳定性和批次一致性。

优势

- 使用一种方法即可对多种BA及其杂质实现基线分离
- 该方法所用的碱性条件可使峰拖尾减少多达65%
- 通过该方法证明了MaxPeak™ HPS技术色谱柱和系统在高pH条件下的可靠性和重现性

简介

有数据表明,全球有4100万人死于非传染性疾病。在这4100万患者中,有10%的患者死因是慢性呼吸系统疾病(CRD)¹。哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)属于CRD²。虽然CRD无法治愈,但患者可以使用维持性药物(例如 β -2肾上腺素受体激动剂(BA))来帮助缓解症状³。BA可以进一步分为三类:短效B2激动剂(SABA)、长效B2激动剂(

LABA)和超长效B2激动剂(ULABA)。鉴于CRD的患病率较高,舒喘宁等BA类药物多年来一直位居处方药排行榜前10位也就不足为奇了⁴。

目前针对BA的一些LC方法在酸性反相条件下分析这些化合物时会出现明显的拖尾^{5,6}。但是,有证据表明高pH条件可以改善BA的整体色谱分析⁷。另一个问题是,缺乏可涵盖多种BA的全面方法。因此,我们开发了一种高pH反相方法用于分离BA组。该方法可在14分钟内完成6种BA及其部分杂质的分析,并获得可重现、线性 and 灵敏的结果。此外,我们使用该方法比较了不同批次的色谱柱吸附剂,证明采用MaxPeak™高性能表面(HPS)技术的Premier色谱柱和系统具有可靠且稳定的性能,尤其是在高pH条件下。

实验

分离方法的样品描述

购买各种BA以建立包含SABA、LABA和ULABA的完整BA组。左沙丁胺醇购自Sigma Aldrich (宾夕法尼亚州阿伦敦)。吡布特罗购自Toronto Research Chemicals (安大略省多伦多)。福莫特罗、茚达特罗、奥达特罗和维兰特罗购自Cayman Chemical (密歇根州安阿伯)。特布他林购自Santa Cruz Biotechnology (得克萨斯州达拉斯)。

称取各标准品放入20 mL闪烁瓶,并用去离子水:乙腈(95:5)稀释。考虑了含盐度校正和纯度。储备液浓度范围为0.5 mg/mL~1 mg/mL,具体取决于标准品溶解度。储备液储存于2 °C~8 °C下,并且可以在分析之前平衡至室温。

稀释储备液并混合,制得BA混合物样品。每种分析物的浓度均为100 µg/mL。

线性和杂质样品说明

线性和杂质标准品购自欧洲药品质量管理局(EDQM) (法国斯特拉斯堡)。购买的标准品如下:福莫特罗、福莫特罗杂质I、沙丁胺醇、沙丁胺醇杂质B、沙丁胺醇杂质D、沙丁胺醇杂质F、沙丁胺醇杂质G、特布他林和特布他林杂质C。

称取各标准品放入20 mL闪烁瓶,并用去离子水:乙腈(95:5)稀释。考虑了含盐度校正和纯度。储备液浓度范围为0.1 mg/mL~1 mg/mL,具体取决于标准品溶解度。储备液储存于2 °C~8 °C下,并且可以在分析之前平衡至室温。稀释储备液并合并,为每种主要分析物绘制不同的曲线点。进行杂质分析时,将分析物及其各自的杂质合并。每种杂质的浓度为10 µg/mL,分析物的浓度为100 µg/mL。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Arc™ Premier液相色谱系统
检测：	Waters™ 2998光电二极管阵列检测器，276 nm
色谱柱：	XBridge™ Premier BEH™ C ₁₈ , 130 Å, 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：	1.0 mL/min
流动相A：	含10 mM甲酸铵的去离子水，用氢氧化铵将pH值调节至10
流动相B：	乙腈

数据管理

色谱软件：	Empower™ 3.7.0
-------	----------------

结果与讨论

分离方法的结果

该方法在BA的保留和分离方面具有良好的重现性。在BA混合物样品的12次进样过程中，每种分析物的峰面积、保留时间和拖尾因子%RSD均 $\leq 1\%$ （表1、2和3）。下面的12次进样的叠加色谱图清楚地展示了方法性能（图1）。

峰面积	吡布特罗	特布他林	左沙丁胺醇	福莫特罗	奥达特罗	维兰特罗
平均值	95294.445	273621.326	148624.581	113654.921	202025.069	463010.139
标准偏差	451.838	1024.773	582.086	437.674	759.486	2185.978
% RSD	0.474	0.375	0.392	0.385	0.376	0.472

表1.BA混合物样品12次进样的峰面积数据表。

USP拖尾因子	吡布特罗	特布他林	左沙丁胺醇	福莫特罗	奥达特罗	维兰特罗
平均值	1.312	1.293	1.357	1.146	1.248	1.537
标准偏差	0.016	0.001	0.001	0.002	0.001	0.009
% RSD	1.190	0.076	0.085	0.149	0.045	0.618

表3.BA混合物样品12次进样的峰拖尾数据表。

pH 值的影响

众所周知，pH对大多数反相应用都有显著影响^{7,8}。为研究其对BA的影响，我们使用碱性和酸性流动相A分析了相同的BA混合物样品。所用的碱性流动相为含有10 mM甲酸铵的去离子水，使用氢氧化铵将pH值调节为10。酸性流动相为含10 mM甲酸铵的去离子水，使用甲酸将pH值调节为3。

在碱性条件下，分析物的拖尾现象改善，并且对酸性条件下的关键分析物对 — 左沙丁胺醇和特布他林实现了基线分离。切换到碱性方法后，拖尾现象减少多达65%。下面是代表两种方法性能的数据表和色谱图（图2a和2b，表4和5）。

USP拖尾因子	吡布特罗	特布他林	左沙丁胺醇	福莫特罗	奥达特罗	维兰特罗
碱性	1.312	1.293	1.357	1.146	1.248	1.537
酸性	1.389	共洗脱		1.308	1.500	2.331

表4.反映两种方法之间拖尾因子改善的详细数据。

线性结果

我们还研究了每种EDQM分析物的线性。利用Empower 3中的校准功能进行线性拟合，计算每种分析物的线性。下图可以清楚地看出该方法的定量性能，表明该方法可用于质量控制检测（图3a-3c）。

杂质分析结果

此外，还考察了该方法对杂质分析的适用性。合并EDQM分析物及其各自的杂质，使杂质占主要分析物浓度的10%。下图展示了该方法分离分析物与杂质的能力，如图所示实现了基线分离和良好的灵敏度（图4a和4b）。

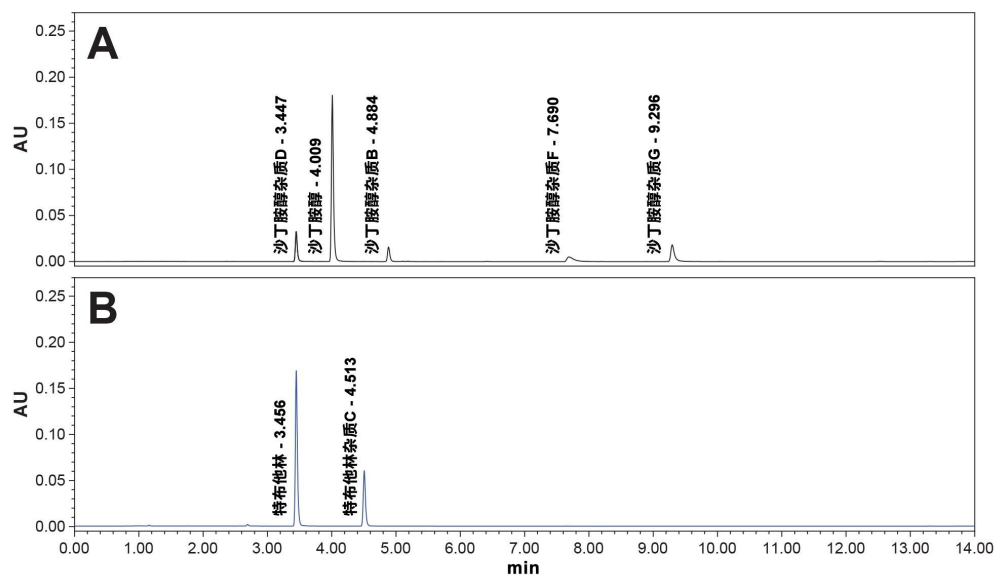


图4a.沙丁胺醇(100 µg/mL)及其相关杂质(10 µg/mL)分离的代表性色谱图。

图4b.特布他林(100 µg/mL)及其相关杂质(10 µg/mL)分离的代表性色谱图。

色谱柱批次重现性

为证明用于XBridge™ Premier BEH C₁₈色谱柱的色谱柱批次的一致性，考察了三个不同的生产批次。进样12次BA混合物样品，对每根色谱柱进行检测。毫无疑问，不同批次的性能相当（图5a至5c，表6和表7）。这些数据清楚地展示了XBridge™ Premier BEH C₁₈色谱柱的可靠性。

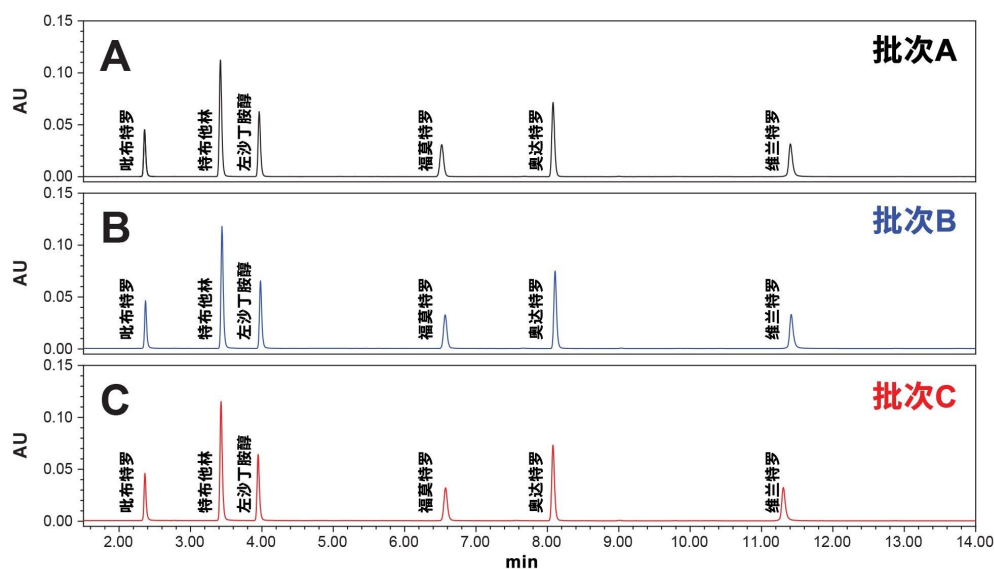


图5a. 色谱柱批次A分离BA混合物的代表性色谱图

图5b. 色谱柱批次B分离BA混合物的代表性色谱图

图5c. 色谱柱批次C分离BA混合物的代表性色谱图

平均拖尾因子	吡布特罗	特布他林	左沙丁胺醇	福莫特罗	奥达特罗	维兰特罗
批次A	1.249	1.237	1.243	1.088	1.193	1.236
批次B	1.277	1.258	1.271	1.119	1.202	1.274
批次C	1.315	1.255	1.277	1.144	1.205	1.281

表7. 用于反映色谱柱批次重现性的BA混合物样品12次进样平均拖尾因子数据表

高pH条件下系统和色谱柱的重现性

为证明采用MaxPeak™ HPS技术的Premier色谱柱和系统在高pH条件下的适用性，我们在Arc™ Premier LC系统上安装了新的XBridge™ Premier BEH C₁₈色谱柱。该色谱柱可进样300次BA混合物样品，相当于运行时间超过100小时。300次进样的平均保留时间和标准偏差详细信息如下（表8）。

保留时间	吡布特罗	特布他林	左沙丁胺醇	福莫特罗	奥达特罗	维兰特罗
平均值	2.355	3.451	3.955	6.652	8.134	11.387
标准偏差	0.006	0.003	0.015	0.024	0.005	0.078
% RSD	0.243	0.098	0.388	0.358	0.056	0.688

表8.用于反映色谱柱和系统在高pH稳定性的BA混合物样品300次进样平均数据表

结论

由于CRD的患病率和致死率较高，因此维持药物（例如BA）的质量和疗效至关重要。为支持这一点，我们开发了一种可以分离各种BA及其杂质的方法。结果具有良好的重现性和线性。在该方法的碱性条件下，峰拖尾减少多达65%，一些关键分析物对的基线分离也有所改善。此外，我们通过该方法证明MaxPeak™ HPS技术在碱性pH条件下长时间运行时具有良好的可靠性和重现性。最后，结果表明XBridge™ Premier BEH C₁₈色谱柱在不同的吸附剂批次中具有可靠的性能。

参考资料

1. WHO.Noncommunicable diseases [Internet].www.who.int.World Health Organization: WHO; 2022.Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases#:~:text=Cardiovascular%20diseases%20account%20for%20most%20of%20the%20burden%20of%20disease,https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases#:~:text=Cardiovascular%20diseases%20account%20for%20most%20of%20the%20burden%20of%20disease>
2. WHO.Chronic respiratory diseases.Who.int.World Health Organization: WHO; 2019.Available from: https://www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases#tab=tab_1 <
https://www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases#tab=tab_1>
3. Abosamak NR, Shahin MH.Beta 2 Receptor Agonists/Antagonists.PubMed.*Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2023.Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559069/?report=classic> <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559069/?report=classic>

4. Wirth J. The 50 most-filled prescriptions of 2022. The Checkup. SingleCare Administrators; 2022. Available from: <https://www.singlecare.com/blog/most-prescribed-drugs-2022/#:~:text=Prescription%20drug%20use%20in%202022%20vs.%20previous%20years> <<https://www.singlecare.com/blog/most-prescribed-drugs-2022/#:~:text=Prescription%20drug%20use%20in%202022%20vs.%20previous%20years>>
5. Zhang L, Jia Q, Liao G, Qian Y, Qiu J. A Fast Method for the Simultaneous Analysis of 26 Beta-Agonists in Swine Muscle with a Multi-Functional Filter by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Separations*. 2022 May 1;9(5):121. Available from: <https://www.mdpi.com/2297-8739/9/5/121> <<https://www.mdpi.com/2297-8739/9/5/121>>
6. Yan K, Zhang H, Hui W, Zhu H, Li X, Zhong F, *et al*. Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamine, and clenbuterol in pork sample by high-performance liquid chromatography—UV method. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016 Apr 1;24(2):277–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816000107?via%3Dihub> <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816000107?via%3Dihub>>
7. Alkhateeb FL, Wilson I, Maziarz M, Rainville P. Ultra high-performance liquid chromatography method development for separation of formoterol, budesonide, and related substances using an analytical quality by design approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021 Jan 30;193:113729. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520316150?viewFullText=true> <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520316150?viewFullText=true>>
8. Dolan J. Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity. *Chromatography Online*. LCGC; 2017. Available from: <https://www.chromatographyonline.com/view/back-basics-role-ph-retention-and-selectivity> <<https://www.chromatographyonline.com/view/back-basics-role-ph-retention-and-selectivity>>

特色产品

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>>

720007945ZH, 2023年7月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)