

固定相优化液相色谱法对 候选新药雷公藤衍生物进行有关物质检查

陆 静 象丽丽 季 旻 陈东英*

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘 要 采用固定相优化液相色谱法(POPLC)建立了候选新药雷公藤衍生物(T8)中有关物质的检查方法。分别采用 5 种不同类型的固定相色谱短柱对含有 T8 和有关物质的混合溶液进行实验,流动相为乙腈-水(35:65, V/V),流速为 0.5 mL/min,柱温为 30 °C,检测波长为 219 nm,获得相应各柱死时间、各组分保留时间和理论板数。经专门软件进行计算拟合,得到优化的色谱柱组合为 20 mm 氰基柱+80 mm 氨基键合柱。结果表明,在上述优化色谱条件下,10 min 内可实现 T8 与有关物质之间的良好分离,并可用于考察 T8 的强制性破坏溶液。

关键词 固定相优化; 液相色谱; 药物; 有关物质; 雷公藤衍生物

1 引 言

固定相优化液相色谱法(POPLC)是基于 Nyiredy 提出的“PRISMA”原理,通过不同固定相色谱柱的组合实现液相色谱条件优化的技术^[1,2]。由于不同类型的固定相色谱柱对于待分离组分具有不同的保留机理,因此为液相色谱条件的优化提供了正交选择性,从而提高了液相色谱条件优化的有效性。目前商品化的 POP- LC 色谱柱和专门优化软件已经由德国 Bischoff 公司开发成功^[1],可提供不同长度的 C₁₈ 柱、C₃₀ 柱,氨基键合 C₁₈ 柱(EPS 柱),氰基键合硅胶柱(CN 柱)和苯基键合硅胶柱(Ph 柱)。目前有关 POPLC 的应用报道尚有限,主要涉及对 7 种黄酮类化合物的分离、12 种杀虫剂成分的分离^[2,3],对混合甾体化合物的分离^[4,5]、爆炸物的分离研究^[6],甲状腺激素中的杂质分析^[7]以及 13 种寡肽混合物的分离^[8]。

(5R)-5-羟基雷公藤内酯醇(T8)是雷公藤甲素 5-位羟基化的结构修饰产物,具有抗炎、免疫抑制的活性。作为治疗类风湿性关节炎的候选新药,目前正在临床试验阶段。为了保证 T8 临床疗效的安全性,开展 T8 中有关物质的检查是一项重要研究内容。有关物质来源于合成原料、反应中间体、副产物以及药物在货架存放期间可能出现的降解产物。有关物质不具有治疗作用,反而可能影响药物的疗效,甚至可能具有安全隐患,如毒副作用、致癌性或致畸性。在 T8 中可能涉及到的已知有关物质化学结构如图 1 所示,其中 Imp1 和 T8 为一对差向异构体,极性差别较小,这两者间的分离将是考验色谱分离能力的关键指标。本研究采用 POPLC 法对 T8 中可能存在的有关物质建立快速“普查”式的色谱分离,并初步评价 POPLC 技术在开发有关物质检查的方法学特点。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪,配备自动进样器、柱温箱、PDA-3000 检测器和 Chromeleon 色谱工作站(德国 Dionex 公司);纯水机为 Mill-Q integral 3(美国 Millipore 公司)。

甲醇与乙腈均为 HPLC 级(德国 Merck 公司),雷公藤甲素(Imp2,批号 200502)和尿嘧啶(批号 200401)均购自中国药品生物制品检定所(北京)。T8 和其它有关物质 Imp1、Imp3、Imp4、Imp5 和 Imp6 均由本所合成。实验用水经纯水机纯化。

POPLC 色谱柱套装包含 ProntoSIL Phenyl 柱(Ph 柱),ProntoSIL C₁₈ 柱(C₁₈ 柱),ProntoSIL C₃₀ 柱,ProntoSIL EPS 柱(EPS 柱)和 ProntoSIL CN 柱(CN 柱),长度分别为 20,40,60 和 80 mm(3 mm

2010-12-16 收稿;2011-04-28 接受

本文系国家科技重大专项重大新药创制课题综合性大平台项目(No. 2009ZX0931-001)和中德科学中心复杂样品的分离分析项目(No. GZ364)资助

* E-mail: dychen@mail.shenc.ac.cn

i. d $\times 5 \mu\text{m}$)及优化软件(德国 Bischoff Chromatography 公司)。

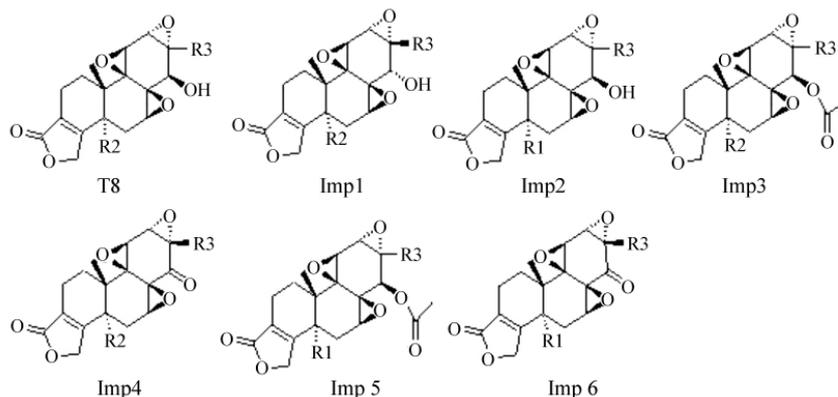


图 1 T8 及 6 个已知有关物质的化学结构

Fig.1 Chemical structures of (5R)-5-hydroxytriptolide(T8) and its six known related substances

2.2 实验方法

流动相为乙腈-水(35:65,V/V);流速为 0.5 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 219 nm;进样量为 10 μL 。

分别称取 T8 与有关物质(Imp1, Imp2, Imp3, Imp4, Imp5 和 Imp6),按一定比例制成混合溶液用于系统适用性实验。另取适量 T8 分别在强酸(0.1 mol/L HCl,室温放置 1 h)、强碱(0.1mol/L NaOH,室温放置 1 h)、强氧化(30% H_2O_2 ,室温放置 1 h)、强光照射(4500 \pm 500) Lux,25 °C 条件下放置 10 d)、高湿(RH 92%,25 °C 条件下放置 10 d)、高温(60 °C,放置 10 d)、加速实验(40 °C,75% RH,放置 6 个月)等条件下进行破坏性实验,制备成破坏性样品溶液。称取尿嘧啶适量,加水溶解,制成 0.05%(m/V)尿嘧啶溶液用于测定色谱系统与柱死时间。

3 结果与讨论

3.1 POPLC 优化色谱条件的建立

与常规的液相色谱条件优化流程不同,POPLC 的优化流程是在选择一个适宜的流动相基础上,然后进行以下三步优化步骤:(1)选用 3~5 种不同固定相类型的色谱短柱开展基础实验,获得相应色谱柱的柱死时间和组分的保留特性(保留时间和理论板数);(2)通过优化软件进行计算,拟合得出最佳的柱组合方式,同时可对分离图谱做出预测;(3)根据软件提供的拟合色谱柱组合方式进行实际的分离运行。

为了有效检测候选新药 T8 中的有关物质,首先根据 T8 和各已知有关物质的紫外吸收特性,确认了紫外检测波长为 219 nm。在流速为 0.5 mL/min 和 30 °C 柱温下,选用 20 mm C_{18} 柱,根据最后流出组分的保留因子 κ (式 1),对 T8 混合溶液的流动相分离条件进行选择:

$$\kappa = (t_R - t_0) / (t_0 - t_{0EC}) \quad (1)$$

式中, κ 为组分的保留因子, t_R 为峰的保留时间, t_0 为色谱柱死时间, t_{0EC} 为色谱系统死时间。

分别采用 0.05%尿嘧啶溶液测定色谱系统的死时间和色谱柱的死时间。根据 POPLC 优化软件要求^[1],当最后出峰组分的保留因子 κ 介于 5~15 之间,即可满足 POPLC 对流动相选择的要求。通过上述方法快速筛选出流动相的组成为乙腈-水(35:65, V/V)。分别选用 120 mm Phenyl 柱,100 mm C_{18} 柱,100 mm C_{30} 柱,100 mm EPS 柱和 100 mm CN 柱,通过注入 0.05%尿嘧啶溶液,获得各分离柱的柱死时间。进一步分别注入由 T8 与有关物质组成的混合溶液,运行时间设为 30 min。T8 和各有关物质在上述不同类型固定相色谱柱上的分离情况如图 2 所示,其中各个组分在不同固定相色谱柱的定位是分别通过单个组分的保留时间和紫外吸收特性进行确认的。实验发现,各组分在 CN 柱上的保留时间最短,同时能够检出的峰个数最少,表明某些组分间没有实现足够的分离;各组分在 EPS 柱上检出的峰个数最多,相互间也获得了较好的分离效果。尤其体现在 T8 与 Imp1 得到了一定的分离,但是同时还存在分离时间较长的缺点。将柱死时间,各个组分的保留时间和理论板数分别输入到 POPLC 优化软件中,兼顾快速“普查”有关物质的分离目的,在输入中设定了如下要求:总柱长不超过 150 mm,色谱运行分析时间不超过 10 min 以

及分离度至少为 1.2。据此,经 POPLC 软件计算拟合给出了优化色谱柱的拼接组合方式为 20 mm CN+80 mm EPS,相应拟合预测分离图谱如 3A 所示。经运行验证,其实际运行分离图谱 3B 中各组分的分离行为与预测图谱图 3A 基本一致,而且可以看到来自实际样品中的杂质峰。

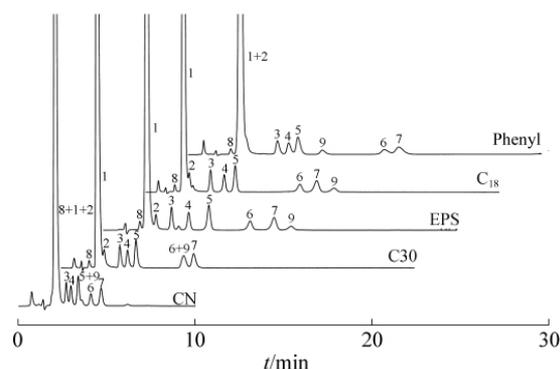


图 2 T8 混合溶液在 5 种 POPLC 色谱柱上的分离图
Fig. 2 Chromatograms of basic measurements for mixture solution of T8 and its related substances on five different stationary phases

色谱柱(Columns):120 mm Phenyl, 100 mm C₁₈, 100 mm EPS, 100mm C₃₀, 100mm CN(3 mm i. d × 5 μm);流动相(Mobile phase):乙腈-水(Acetonitrile-water 35:65, V/V);流速(Flow rate):0.5 mL/min;柱温(Column temperature):30 °C;检测波长(Detection wavelength):219 nm. 峰的归属(Peak identification): 1, T8; 2, Imp1; 3, Imp2; 4, Imp3; 5, Imp4; 6, Imp5; 7, Imp6; 8, 9, unknown impurities.

3.2 采用 POPLC 法进行强制性破坏样品的分离

在有关物质检查中,通过对主药成分经强制破坏

后的样品溶液进行色谱分离,不仅有助于研究主药的降解机理,同时还有助于考察色谱条件的专属性。在本研究中根据 ICH 指导原则^[9]和中国药典^[10]规定,将 T8 分别置于高温,高湿,强光,强酸,强碱和强氧化以及 6 个月的加速实验等条件下进行强制降解。从图 4 可见,上述 POPLC 色谱条件对于 T8 与降解物之间以及降解产物之间都具有良好的分离能力,而且总分离时间少于 10 min,实现了对 T8 中有关物质检查进行快速分离的目的。图谱中的降解产物的分布显示该候选药物在高温、高湿、光照等实验条件下基本上未发生降解,而且 6 个月的加速实验图谱也表明该候选药物具有较好的稳定性。但是这

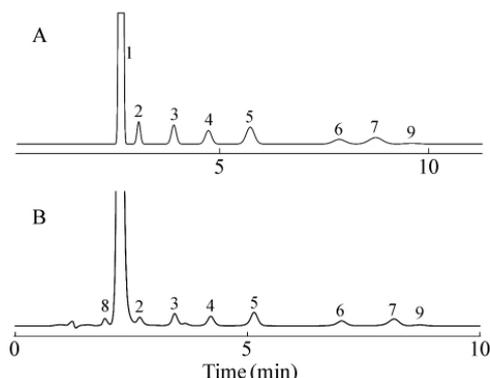


图 3 通过软件预测与实际运行的 T8 混合溶液分离图谱比较

Fig. 3 Comparison chromatograms between predicted and experimental separation for mixture solution of T8 and its related substances

A:软件预测图谱;B:实际运行图谱。色谱柱组合为 20 mm CN+80 mm EPS,其余色谱运行条件及峰归属同图 2。A: Predicted chromatogram; B: Experimental chromatogram. Segment column connection was 20 mm CN+80 mm EPS, the other chromatographic conditions and the peak identification were the same as in Fig. 2.

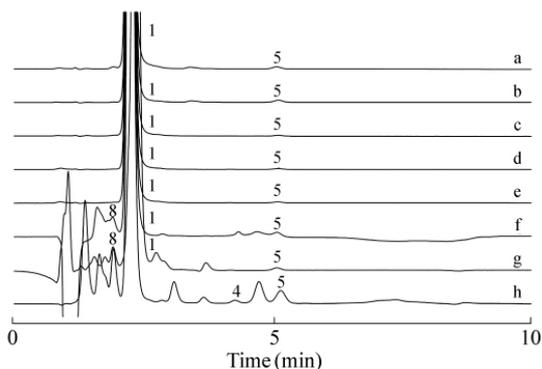


图 4 在强制降解条件下 T8 的 POPLC 分离图谱

Fig. 4 Phase optimized liquid chromatographic (POPLC) chromatograms for forced degradation of T8 samples

a. 未经破坏的 T8 分离图;b. 经 6 个月加速实验(40 °C, 75% RH);c. 经强光照射(5000 Lux, 25 °C 条件下放置 10 d);d. 经高温(60 °C, 放置 10 d);e. 经高湿(RH 92.5%, 25 °C 放置 10 d);f. 在 30% H₂O₂ 中室温放置 1 h;g. 在 0.1 mol/L NaOH 中室温放置 1 h;h. 在 0.1 mol/L HCl 中室温放置 1 h. 色谱分离条件与峰归属同 Fig. 3. a. Original T8 sample; b. Accelerated testing for 6 months under 40 °C and RH 75%; c. Strong light under 5000 Lux at 25 °C for 10 d; d. High temperature under 60 °C for 10 d; e. High humidity under RH 92.5% at 25 °C for 10 d; f. In 30% H₂O₂ at room temperature for 1 h; g. In 0.1 mol/L NaOH hydrolysis at room temperature for 1 h; h. 0.1 mol/L HCl hydrolysis at room temperature for 1 h. Chromatographic separation and peak identification are the same as in Fig. 3.

候选药物在 H_2O_2 , 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 等破坏条件下,发生较大降解,而且降解程度依次加深。通过比较降解产物的分布,推测 T8 在酸性或者碱性条件下发生降解的路径比较相似。

研究结果表明,与传统的液相色谱优化过程相比,POPLC 优化法大大简化了流动相的选择工作,更加注重于不同固定相类型的选择性对色谱分离优化的影响。基础实验可以快速反映具有不同极性差异各组分的色谱分布特征,同时通过对运行时间和色谱总长度的选择,提高了对药物中微量有关物质检查能力和对总分离时间的控制。POPLC 专用软件对色谱分离行为有良好的预测能力,实际运行图谱与预测图谱基本一致,由此可以在色谱方法开发早期,通过这种软件预测功能适当减少实际运行的次数。

References

- 1 Operation Handbook of POPLC, Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany
- 2 Nyiredy S, Szucs Z, Szepesy L. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1157(1-2): 122~130
- 3 Nyiredy S, Szucs Z, Szepesy L. *Chromatographia*, **2006**, 63 (Suppl.): S3~S9
- 4 Kuehnle M, Rehbein J, Holtin K, Dietrich B, Gradl M, Albert K. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(10): 1655~1661
- 5 Beer M D, Lynen F, Hanna-Brown M, Sandra P, *Chromatographia*, **2009**, 68(7-8): 609~614
- 6 Matysik F, Schumann U, Engewald W. *Electroanalysis*, **2008**, 20(1): 98~101
- 7 Gostomski I, Braun R, Huber C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(1): 279~288
- 8 Lu J, Ji M, Ludewig R, Scriba G K E, Chen DY. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51(3): 764~767
- 9 International Conference on Harmonisation (ICH) Guidelines, Q3A (R2): Impurities in New Drug Products, [http://private.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q3A\(R\)](http://private.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q3A(R)), **2006**
- 10 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员). *Pharmacopoeia of Peoples Republic of China 2010 Edition 2* (中华人民共和国药典 2010 年版二部). Beijing(北京): China Medical Science and Technology Press (中国医药科技出版社), **2010**: Appendix(附录) XIX C: 199~201

Application of Phase Optimized Liquid Chromatography for Related Substances Detection in New Drug Candidate of Tripterygiumforrestii Derivative

LU Jing, XIANG Li-Li, JI Min, CHEN Dong-Ying*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

Abstract Phase optimized liquid chromatography (POPLC) was applied for the related substance detection in new drug candidate of T8, one of tripterygiumforrestii derivative. Five column segments with different kind of stationary phases were individually employed to perform basic measurements for mixture solutions of T8 and its related substances. The mobile phase was composed of acetonitrile and water (35:65, V/V) with the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set at 30 °C and the detection was performed at 219 nm. The dead time of the segment columns was determined using a 0.05% (m/V) solution of uracil. The retention times and the theoretical plate numbers of T8 and its six known related substances were obtained from the basic measurements. An optimal stationary phase composition of 100 mm total length with 20 mm cyanopropyl silica (CN column) coupled to 80 mm embedded polar octadecyl silica (EPS column) was calculated by the optimizer software. Good separation was obtained in 10 min for the related substance detection in T8 and its forced degraded solutions, as well.

Keywords Phase optimization; Liquid chromatography; Pharmaceutical; Related substances; Tripterygiumforrestii derivative

(Received 16 December 2010; accepted 28 April 2011)