

HPTLC—化学原料药（API's）分析中的问题解决技术

本文首次发表于2008年6月在芬兰赫尔辛基举办的国际HPTLC报告会



Clare McKinlay

Clare McKinlay是一位在坐落于伦敦近郊的葛兰素史克药厂化学开发部（GSK, Stevenage）工作的分析化学家。在从事新的化学单体的研发过程中，她一直采用平面色谱法来对不同项目开发阶段所遇到的大量新情况进行研究，包括从候选化合物的筛选直至新药的申报和上市阶段。鉴于McKinlay女士所取得的一些成绩，该部门现在开始逐步意识到采用该项技术所带来的好处。

介绍

在葛兰素史克的研发部门，HPLC和GC通常是在分析起始原料，过程中间体和原料药（API's）时常用的色谱方法。虽然该部门也拥有HPTLC设备，但并未纳入常规分析之列。然而该技术被证明是对于各种问题的理想解决方案，并且能够与其他色谱方法互为有益的补充。

在几个新药开发项目中浮现的一些问题使得原本惯用的HPLC和GC方法无法使得研发团队对该问题获得透彻的理解。HPTLC被用来对这些问题进行调查并证明为非常出色的工具。本文着重展示薄层色谱的问题解决能力方面的2个例子，并对其为何得以适用的原因加以阐述。

实例1：某化学原料药样品由于光降解造成的质量损失的调查

在一次药物的稳定性考察中，发现了样品由于光照降解造成的含量的不一致现象。HPLC检测发现了含量测定的结果偏低，但将所有不纯物质的含量测定结果相加的总和仍然低于损失量。因此采用HPTLC以分析是否能检测到新的相关物质，从而解释所观测到的结果。

薄层板

商品HPTLC 硅胶G60 F₂₅₄薄层板（Merck），20 x 10 cm。以甲醇展开一次进行预洗并在80 °C干燥15 min。

供试品溶液的制备

在样品中加入乙酸乙酯溶解，制成15 mg/mL的浓度。

点样

采用CAMAG ATS4仪器进行条带状点样，点样体积为2 μ L。

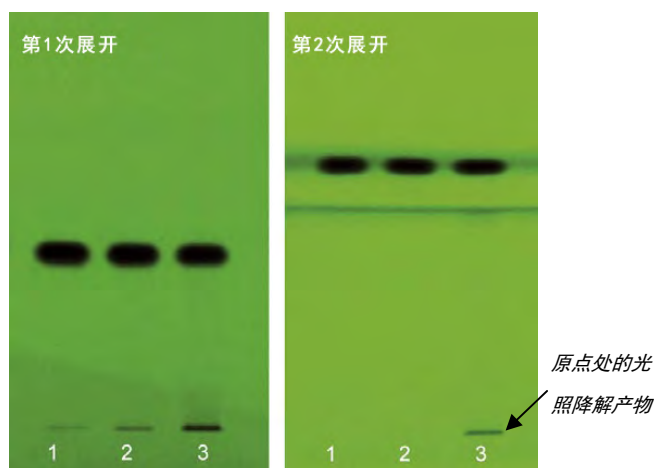
色谱条件

展开在CAMAG水平展开仪中进行，展开剂为乙酸乙酯-庚烷（9：1）。展开距离自底边起50 mm。展开后的薄层板在CAMAG TLC加热器上进行干燥。再使用四氢呋喃展开第2遍，以便将合成的低聚物推离点样原点位置。第2次展开后，只有新的光降解产物仍停留在原点。

结果和讨论

薄层板在CAMAG TLC Scanner 3上以240 nm薄层波长进行扫描，并在254 nm下采用成像系统进行拍照，以显示稳定性样品和对照样品之间的区别。

由于HPTLC具有使样品中所有成分都可能在薄层板上得到检测的能力，因此此处清晰地显示出一个在对照样品中不存在的新的不纯物质出现在降解的样品中。



第1次展开 (左) 和第2次展开后的HPTLC 薄层图谱局部; 1) 对照样品轨道, 2) 保存72小时后的样品; 3) 经过21天光照的样品

本方法测得结果中该相关物质的含量为2%, 为项目组提供了非常有价值的信息。更进一步的不纯物质的调查通过制备薄层和质谱仪联用完成。

编者注: 薄层板点提取接口的升级版本, 已由CAMAG公司在2009年推出。该接口可直接连接高分辨率质谱, 每次可鉴别一个未知成分斑点 (通过直接将未知物从薄层板上洗脱)。

实例2: 某化学原料药样品颜色差异的研究

在另一个新药项目的开发过程中, 观察到不同批次的某化学原料药样品存在色泽差异。但在HPLC相关物质指纹图谱中并未观察到图谱的区别, 其他分析方法也都给出了一致性的结论。因此HPTLC技术被用来对偏黄色的羊皮中可能存在的新物质进行检测。HPTLC技术所具有的可检测所有板上所分离成分的优势被再次利用。

薄层板

商品HPTLC NH₂ F₂₅₄薄层板 (Merck), 10 x 10 cm。以甲醇展开一次进行预洗并在80 °C干燥15 min。

供试品溶液的制备

样品溶解于甲醇中, 制成2 mg/mL的浓度, 即得。

点样

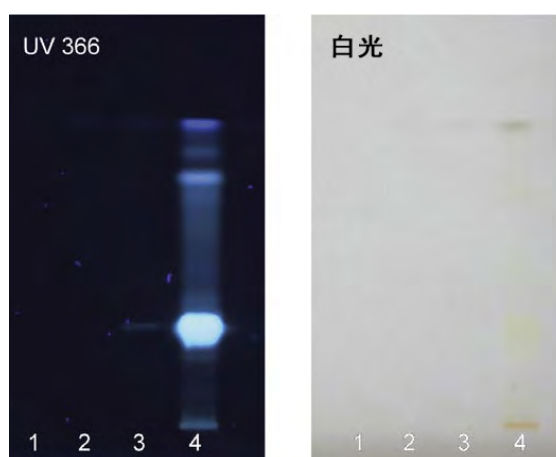
采用CAMAG ATS4仪器进行条带状点样, 点样体积为4 µL。

色谱条件

展开在CAMAG水平展开仪中进行, 展开剂为甲醇。展开距离自底边起60 mm。

结果和讨论

具有色泽差异的不同样品以及一个发生高度颜色反应的样品被一起分析。HPTLC清楚地显示一个黄色条带出现在有色的原料药样品中, 而对应位置的无色样品不存在该条带。这解释了颜色的差异并找出了所感兴趣的新的相关物质。该成分在366 nm下显示暗蓝色荧光。



空白轨道 (1)、白色API(2)、黄色API(3)以及有色杂质提取物的HPTLC薄层图谱局部

该新的不纯物质被进一步从薄层板上萃取下来以进行质谱结构解析。该HPTLC洗脱方法也迁移到了以制备不纯物质为目的的固相萃取方法中。

结论

上述所展示的实例说明HPTLC能够用做问题解决的工具, 并可在分析特定化合物时成为HPLC和GC方法的有效补充。采用HPTLC技术所获得的信息对于新药研发的某些环节是相当关键的。HPTLC技术再次被证明在现代药物分析实验室中拥有当之无愧的一席之地。

更多资料可向作者联系获取:

*Clare McKinlay, Analytical Sciences, GlaxoSmithKline, Medicines Research Park, Gunnells Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, UK, SG1 1WZ, Clare.2.mckinlay@gsk.com