



使用 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析头孢吡肟及其相关杂质

应用报告

医药

作者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

前言

头孢菌素是一类最常见的处方类抗生素。其结构和药理活性与青霉素相似。与青霉素一样，头孢菌素也具有 β -内酰胺环状结构，通过干扰细菌细胞壁的合成杀死细菌。1948 年，意大利科学家 Giuseppe Brotzu 首次从顶头孢霉菌的培养物中分离出头孢菌素化合物。1964 年，礼来公司首次推出了头孢噻吩商品。

头孢菌素类杀菌剂与其它 β -内酰胺类抗生素（如青霉素）具有相同的抗菌方式。所有细菌都有细胞壁保护。头孢菌素破坏细菌细胞壁肽聚糖层的合成，从而导致细胞壁分解，最终使细菌死亡。头孢菌素类抗生素属于 β -内酰胺类化合物，其 β -内酰胺环由一个六元双氢噻嗪环组成，形成头孢烯母核结构。通过对其环状结构的侧链进行修饰，可以改善其抗菌活性和药代动力学行为。根据抗菌谱，头孢菌素类药物可大致分为四代。

第一代头孢菌素主要对革兰氏阳性菌有效，后续几代增加了对革兰氏阴性菌的抗菌作用（常常伴随抗革兰氏阳性菌作用减弱）。革兰氏阴性菌有一个独特的外膜，能够阻止许多药物进入。因此，与革兰氏阳性菌相比，革兰氏阴性菌有更强的抗药性 [1]。



Agilent Technologies

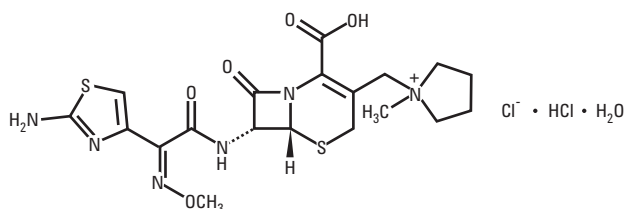


图 1. 头孢吡肟的结构

头孢吡肟属第四代头孢菌素，是一种广谱抗菌药，比其它市售头孢类药物具有更强的抗革兰氏阴性菌作用。结构如图 1 所示。

尽管对此类药物已有广泛研究，但其定量分析及纯度检测仍存在问题 [2]。欧洲药典和美国药典已公布了头孢吡肟及相关物质的测定方法 [3,4]。这些方法使用磷酸/乙腈作为流动相、在流速 1.0 mL/min 的条件下，使用 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱。本实验使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6×75 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱，快速分析头孢吡肟相关物质，同时满足欧洲药典和美国药典方法的要求。由于色谱柱更短，从而减少了流动相的频繁配制，因此与原欧洲药典和美国药典方法相比节省了试剂并减少了废液的产生。此外，更短的色谱柱能够更快地评估方法调整的效果，从而在较短的时间内获得更佳的分析性能。

实验部分

安捷伦 1200 系列快速分离高分辨液相色谱系统，配备如下安捷伦组件：

- G1312B SL 型二元泵，梯度程序设置取决于色谱柱规格和流速，见表 1
- G1367C SL 型自动液体进样器 (ALS)，进样量取决于具体的方法参数，见表 1
- G1316B SL 型柱温箱 (TCC)，温度设置为 25°C
- G1367C 二极管阵列检测器，检测波长设置为 254 nm

本实验选用两种安捷伦色谱柱：

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$, 部件号 959990-902
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6×75 mm, $2.7 \mu\text{m}$, 部件号 697975-902

此外，对两根来自竞争对手的 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ C18 色谱柱的使用也进行了测试，命名为 C1 和 C2。

乙腈具有 Burdick and Jackson ACS/HPLC 认证，购自 Honeywell 公司。ACS/USP 级磷酸二氢钾购自 VWR 公司。所用水用 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备， $18 \text{ M}\Omega$, $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。 $0.45 \mu\text{m}$ 可再生纤维素膜（安捷伦科技）过滤缓冲液。盐酸头孢吡肟和盐酸头孢吡肟系统适用性试验对照品均购自美国药典。样品及流动相依据美国药典和欧洲药典说明配制。

流动相的配制

本方法的梯度洗脱液采用一定比例的磷酸二氢钾缓冲液与乙腈。将 0.68 g 磷酸二氢钾溶于 1000 ml 水中配成缓冲液。用 KOH 或磷酸调缓冲液 pH 值为 5.0，过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜（再生纤维素膜），超声脱气。按原美国药典方法，流动相 A 的缓冲溶液与乙腈比例为 9:1。所有样品均用此流动相配制。方法调整过程中，配制不同比例的“流动相 A”。流动相 B 由磷酸二氢钾缓冲液和乙腈配制成 1:1 的溶液。欧洲药典 (EP) 方法与上述方法类似，但它规定了调缓冲液 pH 值的 KOH 和磷酸溶液的浓度 (0.05 M)，并专门规定了在加入乙腈之前调 pH 值。

待测样品的制备

精密称取盐酸头孢吡肟约 70 mg，转移至 50 mL 容量瓶中，用流动相 A 溶解并稀释至刻度。超声约 30 min 使溶解。用流动相 A 溶解样品，浓度为 7 mg/5 mL。由于杂质 B 难溶，因此必须使用超声溶解。注：这些配好的溶液应立刻使用，或存放至冰箱中并在 12 小时内使用。

结果与讨论

美国药典和欧洲药典使用的色谱条件如下。两种药典都规定使用 L1 (C18 色谱柱) 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱。表 2 为梯度洗脱程序。液相色谱先等度运行 100% A 10 min, 随后在 20 min 内 A 逐渐变化至 50%, 保持这一浓度运行 5 min, 然后重新平衡至初始的 100% A。总运行时间 36 min。

原美国药典和欧洲药典方法规定使用 4.6 × 250 mm, 5 μm L1 色谱柱。图 2 中列出了 3 种不同的色谱柱。该方法运行样品梯度及系统再平衡的总时间约为 45 min。我们通过调整, 改进了方法, 提高了分析速度。

美国药典方法中列出的色谱分析方法及性能参数要求如下:

- L1 色谱柱 (C18), 4.6 mm × 250 mm
- 分析物的理论塔板数不小于 4000
- 头孢吡肟和头孢吡肟相关物质 A 的分离度 R 不小于 5
- 头孢吡肟和头孢吡肟有关物质 B 的分离度 R 不小于 10
- 头孢吡肟的容量因子 k' 大于 0.6
- 柱效不小于 4000 理论塔板数
- 拖尾因子不大于 1.5

为便于鉴别, 头孢吡肟的相对保留时间为 1.0, 头孢吡肟相关物质 A 的相对保留时间为 2.7, 头孢吡肟相关物质 B 的相对保留时间约为 4.3。

最新的美国药典第 621 章, 对于方法的哪些方面可以更改以进行方法调整提出了建议 [5]。表1总结了这些调整。先前工作已证明调整色谱柱填料粒径大小和柱规格是可行的 [6.7]。此外, 这些药典方法的新变化表明, 允许线速度保持恒定而减小小填料粒径, 从而流速的增加超出了当前流速 ± 50% 的调整范围要求 [8]。在这种情况下, 我们也会看到在更小规格的色谱柱上改变流动相组成的优势。

表 1. 美国药典第 621 章允许的方法调整

柱长	± 70%
柱内径	± 25%
柱填料粒径	最多可减小 50%, 无增加
流速	± 50%
进样量	满足系统适应性试验 (SST) 条件下的变化
柱温	± 10%
流动相 pH	± 0.2
UV 波长	严格按照厂商性能指标, 不允许更改
缓冲液中的盐浓度	± 10%
流动相组成 (低比例组分允许调整 ± 30%, 或任何低比例组分允许调整 ± 10% 绝对量, 详见美国药典)	

USP/EP 中头孢吡肟的杂质分析方法可使用很多色谱柱, 但每个样品的分析和系统再平衡时间共需 45 min

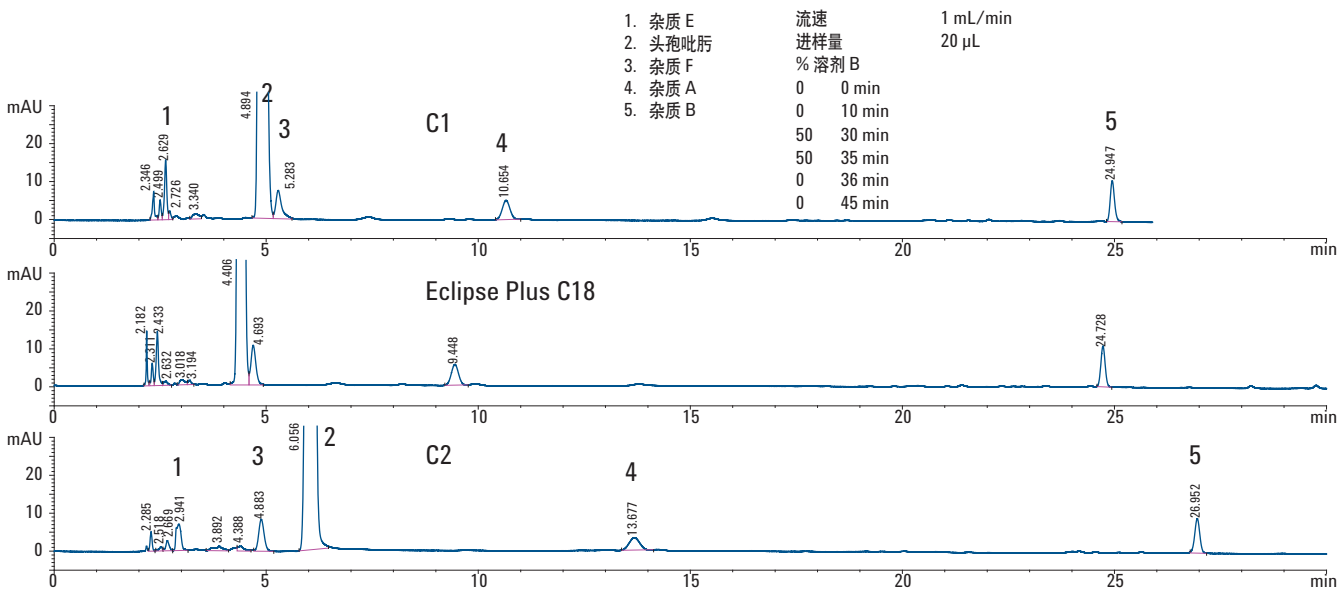


图 2. 原方法在三种不同色谱柱上运行, 每次分析约需 45 min

按照下列公式按比例调整梯度洗脱程序

保持常量 k^* 不变时，上述公式可简化为下列公式，计算新的梯度程序时间：

$$t_{g2} = (t_{g1} d_2^2 L_2 F_1) / (d_1^2 L_1 F_2)$$

t_{g1} 和 t_{g2} ：原梯度和新梯度时间

d_1 和 d_2 ：原柱内径和新柱内径

L_1 和 L_2 ：原柱长和新柱长

F_1 和 F_2 ：原流速和新流速

本文中，实验条件可在允许范围内进行若干变动。首先填料粒径从 $5\ \mu\text{m}$ 变为 $2.7\ \mu\text{m}$ 。此变化提高了柱效，同时也增加了柱压。但由于色谱柱缩短了 70%，柱压的增加可以忽略。Agilent Poroshell 120 色谱柱的优点之一是粒径分布窄，因此可使用与 $5\ \mu\text{m}$ 和 $3.5\ \mu\text{m}$ 色谱柱上相同的 $2\ \mu\text{m}$ 筛板。这意味着与原方法相比，样品的制备无须额外步骤。粒径为 3, 2.5 及小于 $2\ \mu\text{m}$ 的常规色谱柱须使用更小孔径的筛板以保护柱填料，但这容易引起堵塞 [9]。

第二个变动是柱长由 250 mm 减至 75 mm。若柱效不变，柱长可以减少 70%，并且可轻易实现更高通量的样品分析。

表 2 梯度脱洗程序表

	4.6 × 250 mm 5 μm , 1 mL/min, 20 μL	4.6 × 75 mm 2.7 μm , 1 mL/min, 6 μL	4.6 × 75 mm 2.7 μm , 1.5 mL/min, 6 μL	4.6 × 75 mm 2.7 μm , 2 mL/min, 6 μL
进样体积				
% 溶剂 B				
0	0 min	0.0 min	0.0 min	0.0 min
0	10 min	3.0 min	2.0 min	1.5 min
50	30 min	10.0 min	6.67 min	5.0 min
50	35 min	10.5 min	7.0 min	5.25 min
0	36 min	10.8 min	7.2 min	5.4 min
0	45 min	13.5 min	10 min	6.75 min

流动相中的低比例组分是乙腈，占 10%。根据美国药典调整规则对于小比例组成的溶剂，可允许调整 $\pm 30\%$ 或 $\pm 10\%$ 绝对量的调整，即乙腈可降至 7% 或升至 13%。欧洲药典调整规则与此相同，也为 7%-13%。使用这种短的多的色谱柱，可快速计算出本实验中乙腈在流动相中的几种不同浓度。但请注意，本方法中虽然色谱溶剂是不同的，但是样品制备过程无变化。还需注意本实验中杂质 B 比其它组分难溶，若没有按此方法规定充分超声溶解，此化合物是不溶的。

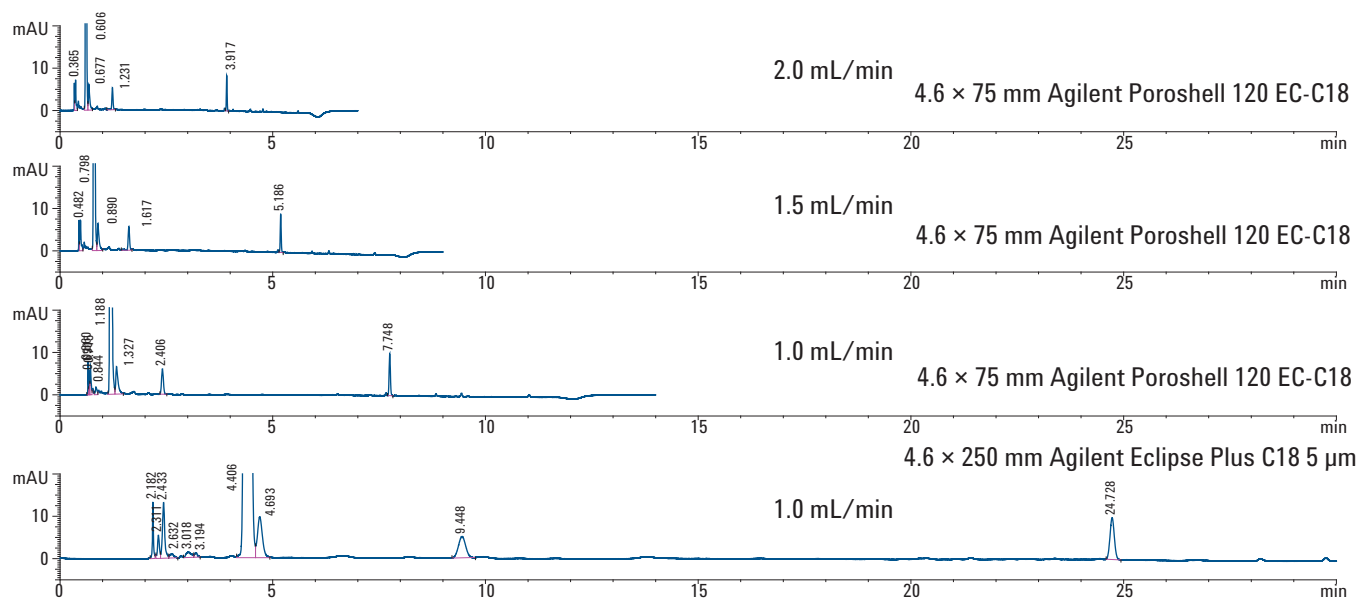


图 3. 全多孔 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱

如图 4 所示，流速增至 2 mL/min，可实现更快速的方法评估。

如图所示，调整乙腈起始浓度由 11% 到 8% 不等，符合药典规定调整范围。乙腈浓度为 10% 时，头孢吡肟与杂质 B 的分离度

为 2。而当乙腈起始浓度降到 8% 时，二者的分离度增至 4.9。可以推测，如果乙腈起始浓度降至 7% 以下时，分离度还会进一步增加。但若起始浓度的调整超过了规定范围，则需要重新进行方法验证。

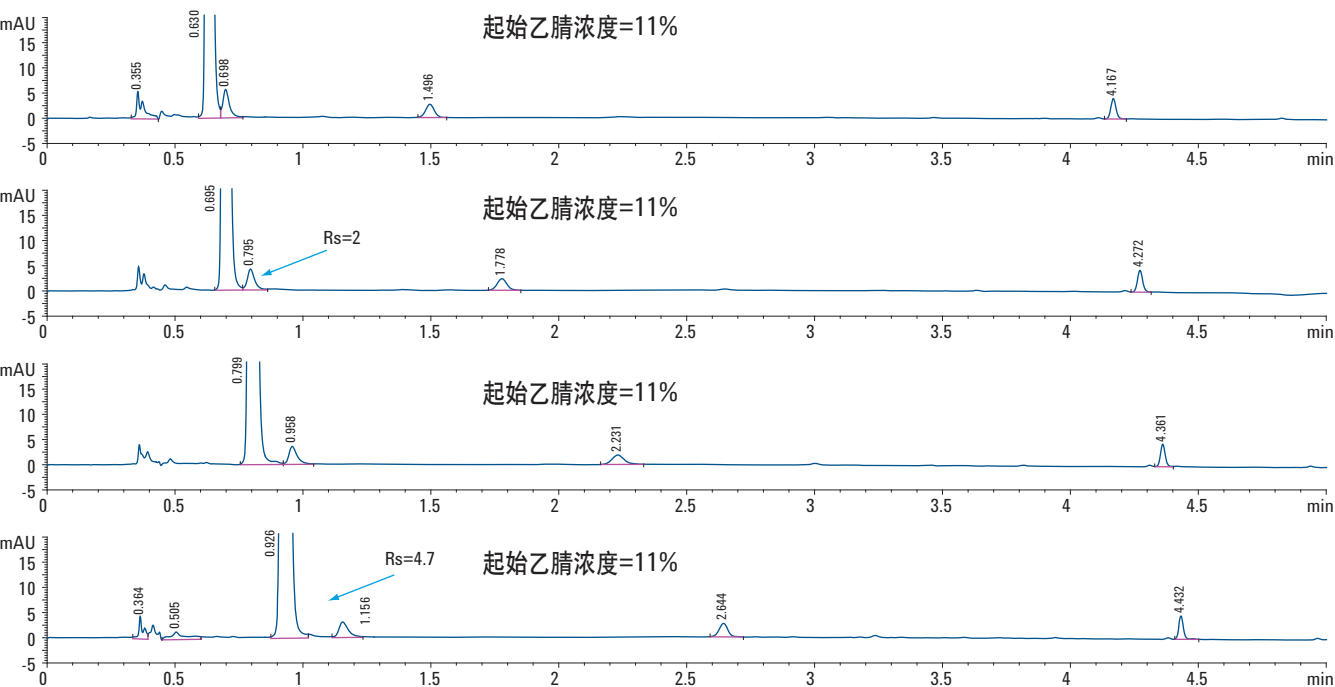


图 4. 调整有机相浓度以提高分离度。使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱进行快速分析方法开发

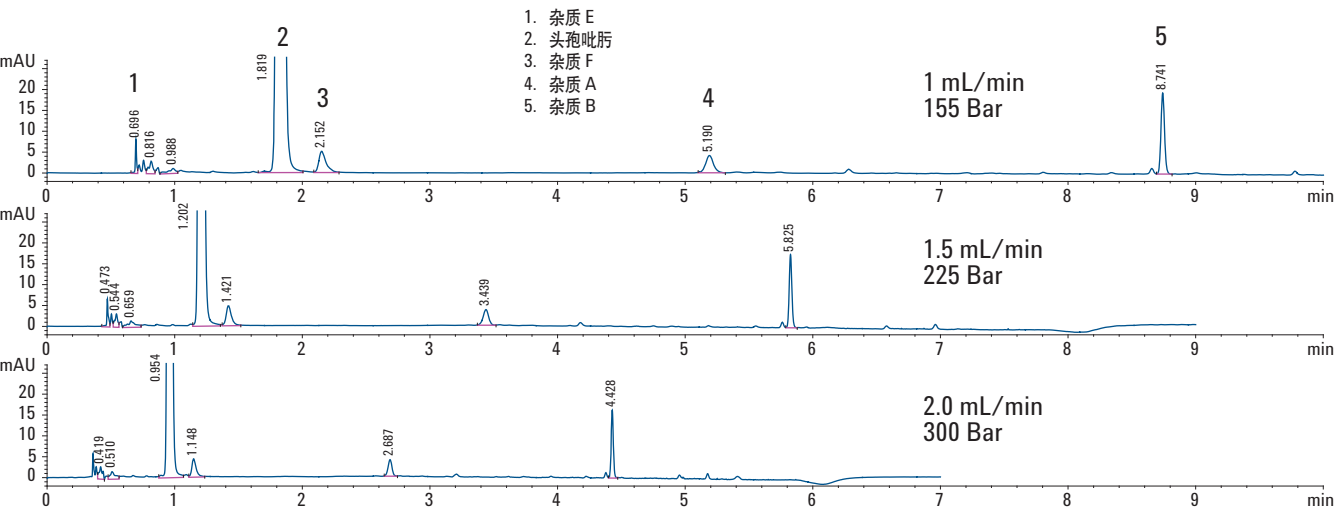


图 5. 美国药典头孢吡肟杂质分析的最终优化方法，使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 75 mm 色谱柱，起始乙腈浓度为 8%，不同流速下进行分析

表 3

要求: Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6×75 mm, 2.7 µm

	1 mL/min 156 bar	1.5 mL/min 221 bar	2 mL/min 300 bar
Tf<1.5	1.28	1.28	1.30
N>4000	18288	11993	7250
k'>0.6	1.4	1.4	1.4
Rs C/a	5.9	5.9	5.9
Rs C/b	10.7	10.7	10.7

超过这个范围的调整被认为是方法改变, 需重新进行分析方法验证。若分析人员使用更短的色谱柱, 如 4.6 mm × 50 mm, 相同的分析可在原方法 20% 的时间内完成, 并只消耗 20% 的溶剂。当然, 此方法需重新进行完整的方法学验证。有些分析方法可容易判断是否需要重新验证方法的可行性, 但是杂质分析方法则不经常验证。表 2 和表 3 数据表明, 无须新设备, 分析时间可轻易地从 36 min 减至 7.2 min, 即分析时间减少了 80%。这可以使实验室在收到原料的 2 h 内完成分析, 而不是原来的 24 h。

结论

在不改变现有仪器的情况下, 使用表面多孔 Poroshell 120 色谱柱, 能够提高分析速度、分离度和灵敏度, 使用 250 mm 全多孔液相色谱柱进行药典分析的实验室将从中获益。美国药典和欧洲药典的指导原则允许使用 75 mm 色谱柱。使用 Poroshell 120 色谱柱可获得更快的分析速度, 从而实现高通量和更高的分析效率。使用较短的、粒径较小的 2.7 µm 色谱柱, 方法调整后改进实验结果。

参考文献

1. D. Yahav, M. Paul, A. Fraser, N. Sarid, L. Leibovici, "Efficacy and Safety of Cefepime: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Lancet Infect Dis.* 2007, 7, 338–348.
2. S. R. El-Shaboury, G. A. Saleh, F. A Mohamed, A. H. Rageh, "Analysis of Cephalosporin Antibiotics". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 1–19.
3. USP Cefepime Impurity Method, "United States Pharmacopeia 31 NF 26" Rockville, MD. 2008.
4. Cefepime Impurity Method "The European Pharmacopeia", seventh ed., Council of Europe, 2011.

5. USP Method Validation Guidance. "United States Pharmacopeia 30 Supplement 2: System Suitability Testing, Rockville, MD. 2007, Chapter <621>.
6. William Long, Anne Mack and Yun Zou, "使用安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 5 µm、3.5 µm 和 1.8 µm 色谱柱改进辛伐他汀的分析", 5990-3883chcn.
7. William J. Long, "Faster analysis of Naproxen Tablets, Improvements on the USP Method", *Agilent Technologies, LC GC Magazine*, June 2010.
8. Uwe D. Neue, Doug McCabe, Vijaya Ramesh, Horacio Pappa, Jim DeMuthc, "Transfer of HPLC Procedures to Suitable Columns of Reduced Dimensions and Particle Sizes", *Pharmaceutical Forum*, Vol. 35(6) [Nov.–Dec. 2009].
9. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe D. Neue, Zoubair El Fallah, "A new small particle packing for faster analysis with high resolution", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15 (1997) 1389-1395.

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误, 或由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物所含信息、说明和性能指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011

2011 年 3 月 18 日 中国印刷

5990-7492CHCN



Agilent Technologies