



使用 Poroshell 120 EC-C18 管柱快速分析 Cefepime 及相關雜質

應用備註

製藥

作者

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

緒論

頭孢菌素 (Cephalosporin) 為最常使用的抗生素類藥物，其結構及藥理性質類似於青黴素 (penicillin) 類抗生素。頭孢菌素與青黴素都具有 β 內醯胺環結構，可干擾細菌細胞壁的合成，進而殺死細菌。1948 年，義大利科學家 Giuseppe Brotzu，首先在頂頭孢菌 (Cephalosporium acremonium) 的培養基中，分離出頭孢菌素類化合物，而禮來大藥廠 (Eli Lilly) 首先研發出其製劑 Cephalothin，並於 1964 年上市。

頭孢菌素為殺菌劑，作用機轉與其他 β 內醯胺類抗生素 (如青黴素) 相同。細菌的細胞都有細胞壁保護，而頭孢菌素可阻斷細菌細胞壁肽聚醣層的合成，破壞細胞壁，造成細菌死亡。頭孢菌素為 β 內醯胺類化合物，其 β 內醯胺環融入 6 圓環的 dihydrothiazine 環中，形成 cephem 核心結構。修飾此環支鏈修飾基的結構，可改善制菌活性及藥物動力學活性。頭孢菌素可依其光學活性，大致分成 4 代。

第一代的頭孢菌素，主要對革蘭氏陽性菌具要活性，越新一代的頭孢菌素，則對革蘭氏陰性菌的活性越高，而對革蘭氏陽性菌的活性，通常會降低。革蘭氏陰性菌具有獨特的細胞外膜，許多藥物均無法穿透，因此革蘭氏陰性菌對抗生素的抗藥性，普遍高於革蘭氏陽性菌 [1]。



Agilent Technologies

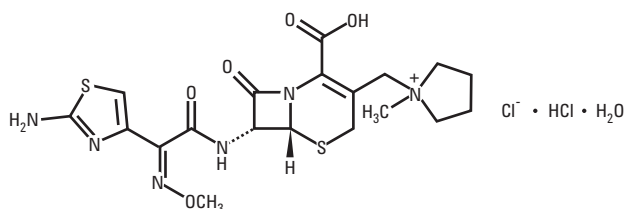


圖 1. Cefepime 的結構。

Cefepime 為第四代頭孢菌素類抗生素，抗菌譜廣，對革蘭氏陰性菌的活性也已改善，高於其他已上市的頭孢菌素類藥物。Cefepime 的結構如圖 1 所示。

雖然相關藥物已累積了大量研究，但其定量分析及純度試驗，仍是個難題 [2]。歐洲藥典 (EP) 及美國藥典 (USP)，刊載了 cefepime 及其相關化合物的測定方式 [3,4]，均以磷酸鹽/乙腈為沖提液，以 1.0 mL/分的流速，沖提 4.6 × 250 mm、5 μm 的管柱。其中將以 4.6 × 75 mm、5 μm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速分析 Cefepime 的相關化合物，並達到 USP 及 EP 分析法的要求。此種管柱加快了管柱的分析速度，也比較不需要經常製備沖提液，可節省時間與溶劑，相較於原本的 EP 與 USP 分析法，本分析法較不浪費。此外，使用較短的管柱，可以更快速的評估方法調整的可行性而能在較短的時間內，產生較佳的效能。

實驗

一個安捷倫 1200 系列快速分離 LC (RRLC) 系統，具有下列安捷倫裝置：

- G1312B 二元幫浦 SL，梯度沖提時間視管柱大小及流速而定，見表 1
- G1367C 自動液體注射器 (ALS) SL，注入量視特定分析法參數而定，見表 1
- G1316B 恆溫管柱室 (TCC) SL，溫度設定為 25 °C
- G1367C 光二極體陣列偵測器，設為 254 nm，如本分析法所述

本分析使用 2 種安捷倫管柱：

- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱、4.6 × 250 mm、5 μm，p/n 959990-902
- 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱、4.6 × 75 mm、2.7 μm，p/n 697975-902

此外，也檢測 2 種 4.6 × 250 mm、5 μm 不同廠牌 C18 管柱，標記為 C1 與 C2。

乙腈購自 Honeywell 公司，已通過 Burdick & Jackson 試藥級 (ACS) HPLC 溶劑的認證；磷酸二氫鉀 (Monobasic Potassium Phosphate) 使用 USP/ACS 級，購自 VWR 公司；水則採用以密理博 Millipore Milli-Q 系統現場製造，以 18 M 過濾至 0.2 μm 的水。以 0.45 μm 的再生纖維過濾材質（安捷倫科技公司生產），過濾緩衝液。USP 級的 Cefepime Hydrochloride，及 USP 級的 Cefepime Hydrochloride 系統適合性分離標準品 (RS)，購自美國藥典編纂當局。樣品及移動相，均依照 USP 及 EP 的說明配製。[3,4]

移動相製備

本分析法將磷酸二氫鉀緩衝液，依照梯度混合一定量的乙腈後使用。將 0.68 克的磷酸二氫鉀溶於 1000 mL 的水中，製備緩衝液。緩衝液以氫氧化鉀或磷酸調整至 pH 5.0，並以 0.45 μm 的過濾材質（本實驗室使用再生纖維）過濾，再經超音波除氣。原本的 USP 分析法，使用緩衝液：乙腈為 9:1 的溶液做為移動相 A，且之後所有樣品均使用此移動相製備。調整分析法時，製備不同比例的「移動相 A」。移動相 B 以 1:1 的體積/體積 (v/v) 比例，混合磷酸二氫鉀緩衝液與乙腈製備而成。歐洲藥典 (EP) 分析法的移動相製備方式類似，但調整 pH 值 (0.05 M) 用的氫氧化鉀與磷酸，有明確指定其濃度，並明確指定移動相加入乙腈前的 pH 值。

試驗準備

精確稱取 70 mg 的 Cefepime Hydrochloride，倒入 50 mL 的容量瓶，溶於移動相中，並以移動相稀釋至足量，再以超音波震盪約 30 分鐘。測定系統適合性的樣品，以 7 mg/5 mL 的濃度溶於移動相 A 中。因雜質 B 為難溶性物質，務必使用超音波震盪。註：這些溶液均應立即使用，或儲存於冰箱，於 12 小時內注入使用。

結果及討論

遵循 USP 及 EP 明載的層析條件。兩分析例均指定使用 4.6 × 250 mm、5 µm 的 L1 (C18) 管柱。沖提梯度設定列於表 2。液相層析儀一開始以 100% 的移動相 A 等位沖提 10 分鐘，之後 20 分鐘內則逐漸降低比例至 50%。以 50% 的移動相 A 等位沖提持續 5 分鐘後，使溶劑再平衡至一開始的 100% 移動相 A 之組成。總分析時間為 36 分鐘。

一開始進行的 USP 及 EP 分析法，指定使用 4.6 × 250 mm、5 µm 的 L1 管柱。3 種不同的管柱列於圖 2。此分析法指定一個沖提梯度，每項樣品約需回復 45 分鐘。調整本分析法以加快分析速度，便能改善本分析法。

本分析法的層析及效能要求，請見 USP 分析法，摘要如下 [1]：

- 4.6 mm × 250 mm 的 L1 管柱 (C18)
- 分析物的理論板數 (N) 不得少於 4000 個
- Cefepime 與其相關化合物 A 的解析度 R，不得低於 5
- Cefepime 與其相關化合物 B 的解析度 R，不得低於 10
- Cefepime 的容量因子 k'，需高於 0.6
- 管柱的效率不得少於 4000 個理論板數
- 拖尾因子不得超過 1.5

鑑定的目標為：cefepime 的滯留時間約為 1.0，cefepime 相關的化合物 A 為 2.7，cefepime 相關的化合物 B 為 4.3。

USP 修訂後的第 621 章，對於分析法的「調整」範圍，提出建議：[5] 這些調整摘要於表 1。先前的分析，調整了充填顆粒的大小及管柱尺寸。[6,7] 此外，也有人提議針對相關概要分析法予以重新改變，以在直線速度保持恆定的前提下，縮小充填顆粒，將目前的流速提高 ± 50% [8]。這種情況下，我們也期望於調整較小型管柱的移動相組成，所能帶來的好處。

表 1. USP 第 621 章容許的分析法調整範圍

管柱長度	± 70%
管柱內徑	± 25%
管柱充填顆粒大小	至多縮小 50%，不得增大
流速	± 50%
注入量	只要符合系統適合性測試 (SST) 的標準，便能改變注入量
管柱溫度	± 10%
移動相 pH 值	± 0.2
紫外光 (UV) 波長	不得改變成製造商規格以外的數據
緩衝液的鹽類濃度	± 10%
移動相的組成 (次要組成的比例，可調整成 ± 30% 或 ± 10% 的絕對值，以較小者為準，(如 USP 所述))	

USP 與 EP 分析 Cefepime 雜質的方法，適用於多種管柱，但每項樣品需分析 45 分鐘，含平衡時間。

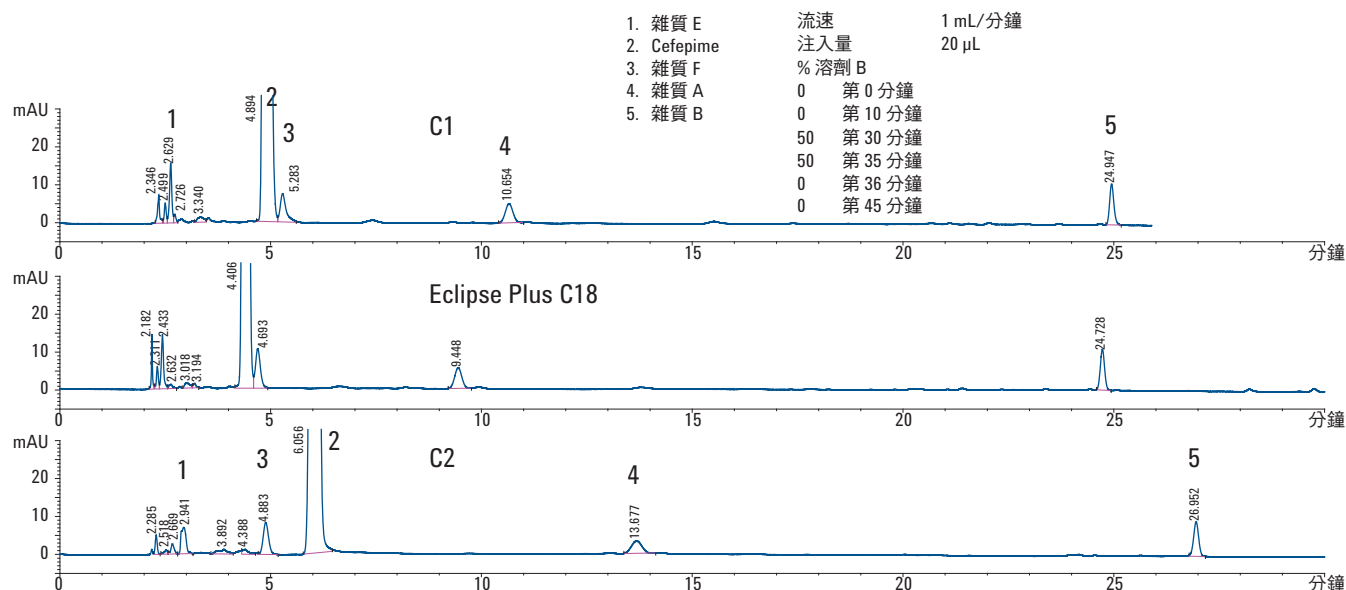


圖 2. 3 種不同管柱以原先方法分析的結果，每次分析約費時 45 分鐘

依下列方程式調整沖提梯度：

若需保持 k' 值恆定，則上述方程式可精簡為下列方程式，計算新的梯度沖提時間：

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

t_{g1} 為原本的梯度沖提時間， t_{g2} 為新的梯度沖提時間

d_1 為原本的管柱內徑， d_2 為新的管柱內徑

L_1 為原本的管柱長度， L_2 為新的管柱長度

F_1 為原本的流速， F_2 為新的流速

本分析在容許範圍內，進行多項調整。首先將 5 μm 的充填顆粒大小，調整為 2.7 μm ，以提升效率，但也升高了背壓，不過管柱縮短 70%，因此增加的背壓很小。安捷倫 Poroshell 120 管柱的優勢，為其粒徑分佈較窄，因此需使用 2 μm 的濾片，與 5 μm 及 3.5 μm 管柱的濾片相同，如此一來，製備樣品時，不需太過小心，而原本的分析方法，則需非常小心地製備樣品。以 3、2.5、小於 2 μm 顆粒充填的管柱，使用較小型的濾片，將充填材料留在管柱內，但卻容易發生堵塞 [9]。

再來將 250 mm 的管柱長度，縮減 70%，成為 75 mm，仍在調整的容許範圍內，且若管柱的效能禁得起此變化，則可輕易提高樣品處理量。

表 2. 沖提梯度表

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

移動相的次要組成為 10% 的乙腈，USP 規定可調整成 $\pm 30\%$ 或 $\pm 10\%$ 的絕對值，以較小者為準，即可降低為 7% 或提高至 13%；根據 EP 的規定，仍是改變成 7-13%。本分析可使用此大幅縮短的管柱，快速計算幾種乙腈的濃度。務必注意，本層析使用多種溶劑，但不影響樣品製備。執行本分析時，發現雜質 B 的溶解度低於其他成分，若未遵照本分析法的說明，以超音波充分震盪，此成分將不會溶解。

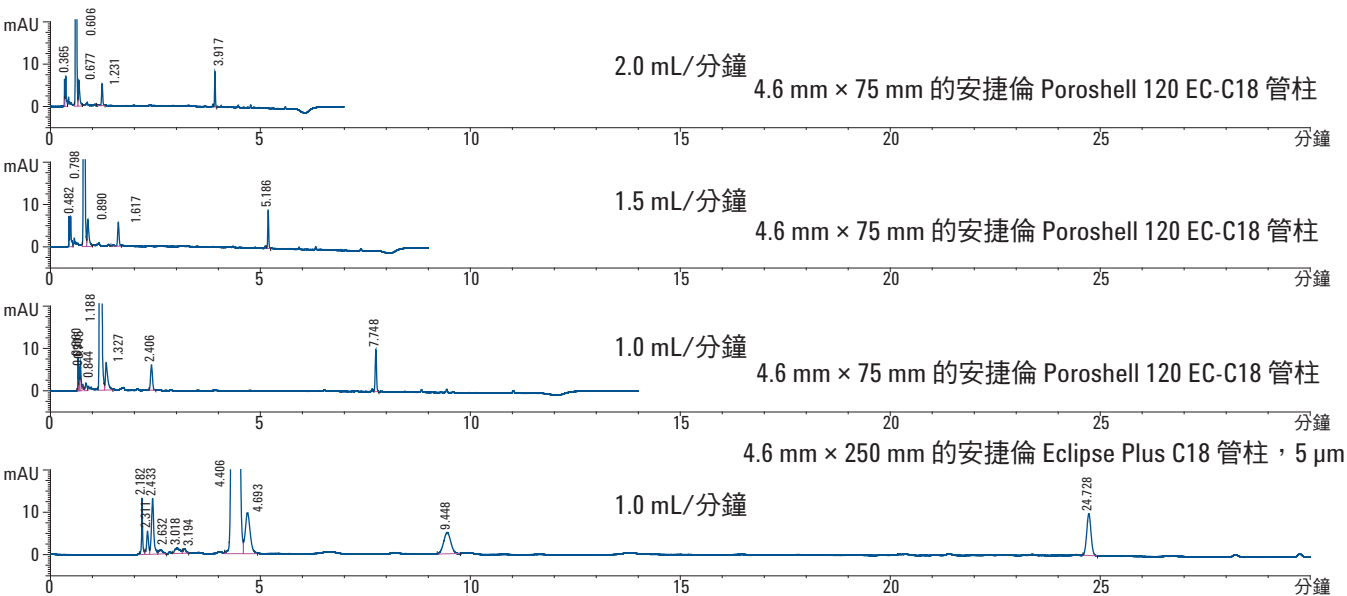


圖 3. 全多孔性顆粒充填的安捷倫 Eclipse Plus C18 管柱，及安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱

圖 4 顯示，流速提高至 2 mL/分鐘，以更快速評估分析法。

如圖所示，一開始乙腈的比例為 11% - 8%，在藥典規定的調整範圍內。乙腈的比例為 10% 時，cefepime 與雜質 B 的解析度為 2，但將一開始的有機修飾劑比例，降低至 8% 時，兩成分的波峰解

析度，升高至 4.9。結果很明顯，將一開始的濃度降低至 7% 以上時，可額外提高波峰的解析度，但在超出這些範圍的調整，將改變分析法，需再行確效。

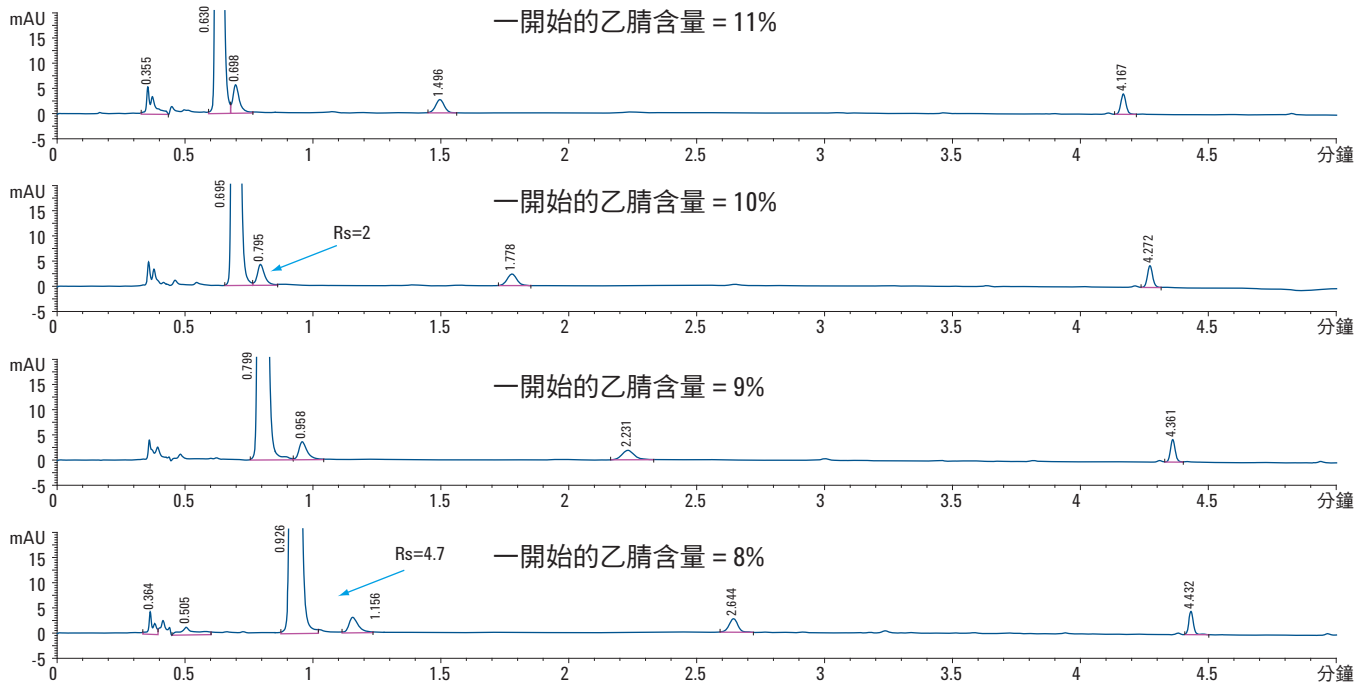


圖 4. 調整有機修飾劑含量，以改善解析度。使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速開發分析方法

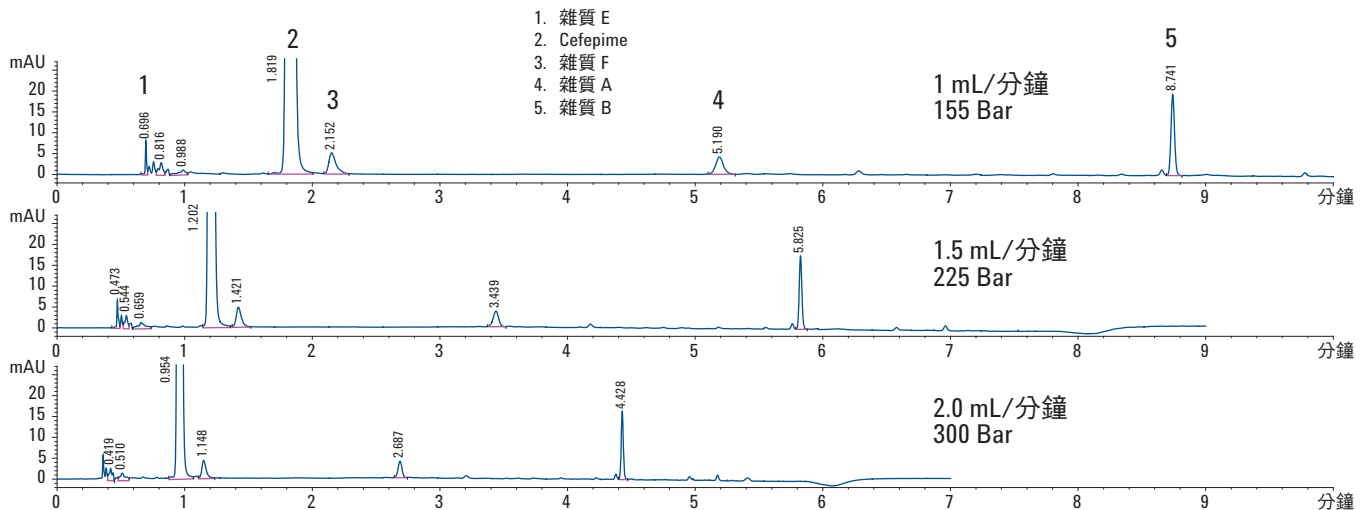


圖 5. 使用 $4.6 \times 75 \text{ mm}$ 的安捷倫 USP Poroshell 120 EC-C18 管柱，進行 cefepime 雜質分析法的最終改善，利用一開始 8% 的乙腈，以各種流速進行沖提

表 3.

要求：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，4.6 × 75 mm，2.7 µm

	1 mL/分鐘 156 bar	1.5 mL/分鐘 221 bar	2 mL/分鐘 300 bar
不對稱因子 (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

超出上述範圍的調整，將「改變」分析法，需再行確效。若選用較短的管柱，如 4.6 mm × 50 mm 的管柱，同樣的分析可在原本的 20% 時間內完成，溶劑也只需使用原本的 20%，但是必須再次進行完整的確效。在這種情形下，執行此等試驗方法的確效，可能較容易，至於雜質的分析法，則不那麼常執行。表 2 及表 3 顯示，本分析可將 36 分鐘的分析時間，輕易縮短至 7.2 分鐘；分析時間縮減 80%，卻不須使用新的設備。因此實驗室便能在點收原料後 2 小時內，完成檢驗，不須等到 24 小時。

結論

使用 250 mm 長、以全多孔性顆粒充填的 LC 管柱，進行藥典分析法的實驗室人員，可改用表面多孔性顆粒充填的 Poroshell 120 管柱，完全不需更換現有的儀器，便享有分析速度、解析度及靈敏度均提升等好處。75 mm 長的管柱，仍在 USP 及 EP 指引容許的調整範圍內。使用 Poroshell 120 管柱，加快了分析速度，提高處理量及產能。適度調整各種藥典分析法，改用較短的管柱，及以較小的 2.7 µm 顆粒充填，所獲得的結果便大幅改善。

參考資料

1. D. Yahav、M. Paul、A. Fraser、N. Sarid、L. Leibovici。《Cefepime 的效與安全性：系統回顧及統合分析》(Efficacy and Safety of Cefepime: A Systematic Review and Meta-Analysis)。刺絡針感染性疾病期刊 (Lancet Infect Dis)。2007, 7, 338–348。
2. S. R. El-Shaboury、G. A. Saleh、F. A Mohamed、A. H. Rageh。《頭孢菌素類抗生素的分析》(Analysis of Cephalosporin Antibiotics)。藥劑暨生物藥劑分析期刊 (J. Pharm. Biomed. Anal)，第 45 卷，1–19 頁。2007 年。
3. 美國藥典 Cefepime 雜質分析法。《美國藥典 31 版，美國國家處方集 26 版》(United States Pharmacopeia 31 NF 26)。麻里蘭州羅克維爾 (Rockville)。2008 年。

4. Cefepime 雜質分析法。《歐洲藥典》(The European Pharmacopeia) 第七版。歐洲理事會。2011 年。
5. 美國藥典分析法確效指引。《美國藥典 30 版增補 2：系統適合性測試》(United States Pharmacopeia 30 Supplement 2: System Suitability Testing) 第 621 章。麻里蘭州羅克維爾。2007 年。
6. William Long、Anne Mack 和 Yun Zou。《以 5 µm、3.5 µm 及 1.8 µm 的 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，改善分析 Simvastatin 的方法》(Improved Simvastatin Analysis Using ZORBAX Eclipse Plus C18 5 µm, 3.5 µm, and 1.8 µm Columns)。5990-3883EN。
7. William J. Long。《快速分析 Naproxen 錠劑，改善美國藥典的分析法》(Faster analysis of Naproxen Tablets, Improvements on the USP Method)。LC-GC 雜誌。安捷倫科技出版。2010 年 6 月。
8. Uwe D. Neue、Doug McCabe、Vijaya Ramesh、Horacio Pappa、Jim DeMuthc。《將高效液相層析程序，移轉至尺寸較小及充填顆粒較小的適當管柱》(Transfer of HPLC Procedures to Suitable Columns of Reduced Dimensions and Particle Sizes)。藥劑論壇 (Pharmaceutical Forum)，第 35 冊，第 6 卷。2009 年 11 月至 12 月。
9. Dorothy J. Phillips、Mark Capparella、Uwe D. Neue、Zoubair El Fallah。《新型小顆粒充填管柱，可加快分析速度，且解析度高》(A new small particle packing for faster analysis with high resolution)。藥劑暨生物藥劑分析期刊 (J. Pharm. Biomed. Anal)，第 15 期，1389-1395 頁。1997 年。

詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：
www.agilent.com/chem。

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2011 年
於美國印製
2011 年 3 月 18 日
5990-7492CHTW



Agilent Technologies