

Nexera LC-30A 方法开发系统在注射用头孢美唑钠分析上的应用

LC-121

摘要： 本文建立了一种使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统快速分析注射用头孢美唑钠药物的液相分析方法。参照文献提供的四种分析条件，使用同一根色谱柱，该方法开发系统可自动完成对四种流动相的优化，可以大为节省液相色谱分析方法开发的时间。根据各个峰的检出数和分离度，利用 Class-Agent 报告软件对各峰进行综合评价，以确定最佳的分析条件。在确定该方法条件下进行样品考察，2.5 μg/mL 的头孢美唑钠连续 6 针进样所得峰面积和保留时间的相对标准偏差分别为 3.46%、0.174%，表明系统具有较好的精密性。

关键词： 超高效液相色谱 方法开发系统 头孢美唑钠 药物分析

多头孢美唑钠近年来广泛应用于临床，对革兰阳性菌和阴性菌具有良好的抗菌效能，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、脆弱拟杆菌及厌氧菌，对 β-内酰胺酶也有很强的耐受性和稳定性，体内分布好，不良反应少。传统的 HPLC 方法分析耗时长，分离效果不佳，随着现代液相色谱技术的高速发展，开发超快速液相分析方法显得尤为重要。

岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统是基于其最新一代超高效液相色谱仪 LC-30A 建立的一套用于液相分析条件探索的自动化装置。它利用工作站控制自动进行色谱柱切换和流动相配比而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。该系统配备的 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形界面易于操作和理解。本文使用该套系统，建立了快速检测头孢美唑钠的 UHPLC 分析方法。

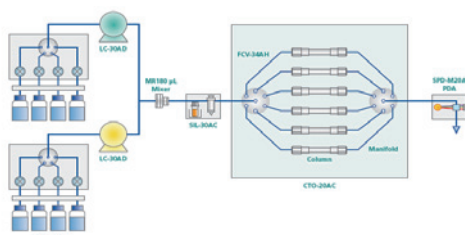


图1 方法开发系统示意图

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统，包括 LC-30AD×2（输液泵，配四元低压梯度比例阀）、CBM-20Alite（系统控制器）、CTO-30A（柱温箱）、SIL-30AC（自动进样器）、DGU-20A5（脱气机）、SPD-M20A（二极管阵列检测器）、Method Scouting Solution Ver. 1.00 SP2（方法开发系统工作站），

LabSolutions Ver. 5.53 SP2（色谱工作站）

1.2 分析条件

1.2.1 本实验方法建立的流程

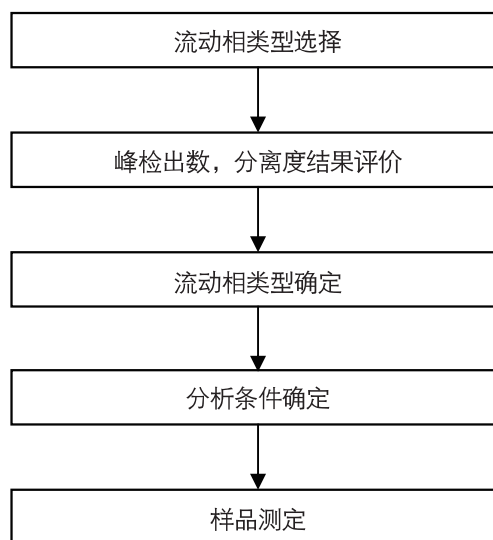


图2 本实验方法开发系统建立流程

1.2.2 液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II（2.0 mm I.D. × 100 mm L., 2.2 μm）

流动相：

水相：

MA- 磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 730 mL 使溶解，加 10% 四丁基氢氧化铵 19.2 mL）加 12.5 mL 四氢呋喃（用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

MB- 磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 700 mL 使溶解，加 10% 四丁基氢氧化铵 3.2 mL）加 25 mL 四氢呋喃（用磷酸调节 pH 值至 4.5）；

MC- 磷酸二氢铵溶液（取磷酸二氢铵 5.75 g，加水 700 mL 使溶解，加 10% 四丁基氢氧化铵 3.2

mL) 加 20 mL 四氢呋喃 (用磷酸调节 pH 值至 4.5) ;
MD- 含 0.1% 溶液四丁基氢氧化铵的磷酸二氢钾
溶液 (取磷酸二氢钾 1.36 g, 加水溶解并稀释至
1000 mL, 用磷酸调节 pH 值至 4.5) ;
有机相: 甲醇 (MeOH) 或乙腈 (ACN)
流 速: 0.4 mL/min
洗脱方式: 等度洗脱, MA : MeOH=9:1 (v/v);
MB : MeOH=9:1 (v/v); MC : MeOH=9:1 (v/v);
MD : ACN=7:3 (v/v)
进样体积: 5 μ L
柱 温: 35 $^{\circ}$ C
检测波长: 214、254、272 nm

1.3 样品制备

取头孢美唑钠标准品 25 mg (精确到 0.1 mg), 置
于 25 mL 容量瓶中, 加 6% 过氧化氢溶液 1 mL, 放置 5
min, 加水 20 mL, 加每 1 mL 中含 5- 巯基 -1- 甲基四
氮唑杂质对照品 0.5 mg 的溶液 1 mL, 用水稀释至刻度,
摇匀, 作为系统适用性溶液①, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后
进样分析。

用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液溶解标准品, 配制成浓
度为 1 mg/mL 的溶液, 在 95 $^{\circ}$ C 水浴中加热 10 min, 取
1 mL 该溶液与 2 mL 标准储备液于 20 mL 容量瓶中, 纯
水定容, 作为系统适用性溶液②, 经 0.22 μ m 滤膜过滤
后进样分析。

结果与讨论

2.1 采集波长优化

考察不同采集波长 214、254、272 nm 对目标物采集信号的影响, 由图 3 可知 254 nm 和 272 nm 具有比 214 nm 更强的信号响应, 考虑到在 254 nm 和 272 nm 采集波长下, 两者的信号响应相当, 最终选择 272 nm 为最大吸收波长, 同时可以减少低波长杂质吸收带来的干扰。

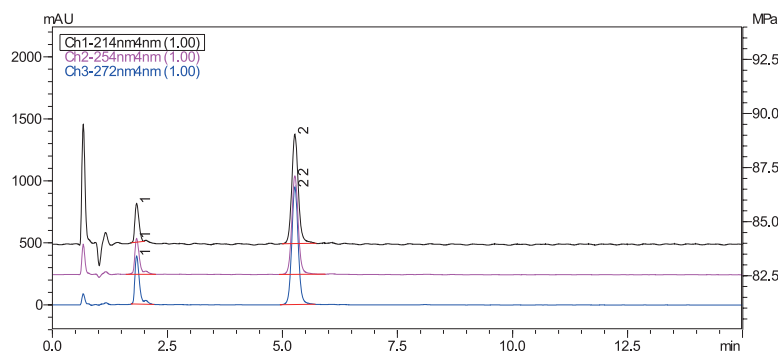


图3 不同采集波长下的信号响应强度比较

峰型归属 (同下) : 1: 5- 巯基 -1- 甲基四氮唑 (杂质) ; 2: 头孢美唑钠 (目标物)

2.2 方法开发系统优化

按照文献提供的四种分析方法, 使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统进行自动优化, 优化结果的色谱图如图 4 至图 7, 四种分析方法中目标物和杂质的出峰时间、峰面积、分离度、理论塔板数、拖尾因子、信噪比结果见表 1。

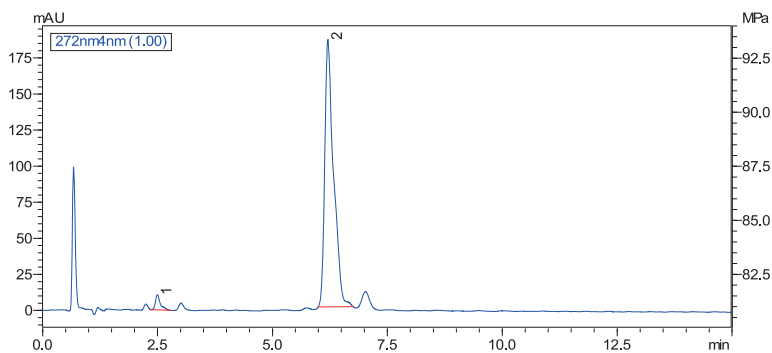


图4 系统适用性溶液1在MA : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

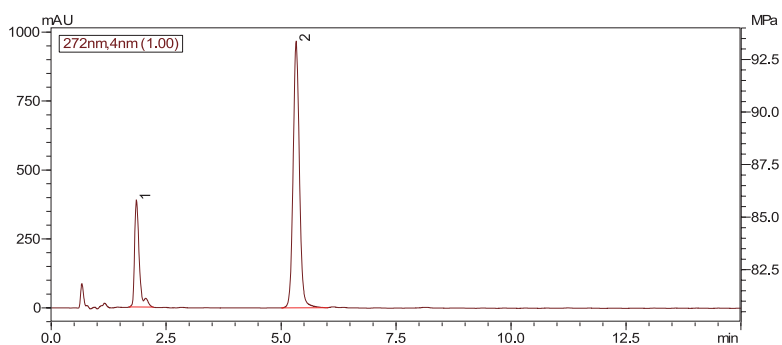


图5 系统适用性溶液1在MB : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

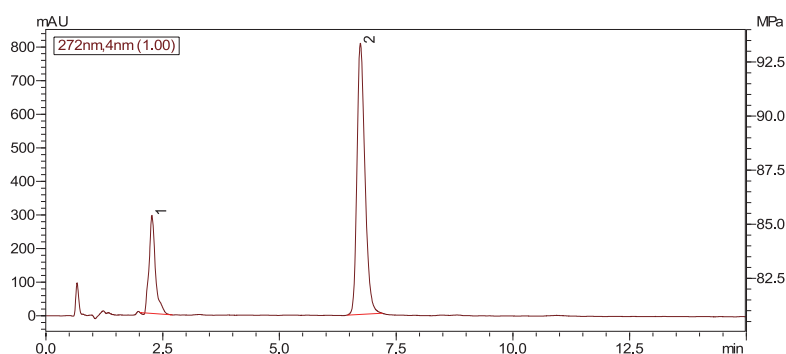


图6 系统适用性溶液1在MC : MeOH=9:1 (v/v)分析条件下的色谱图

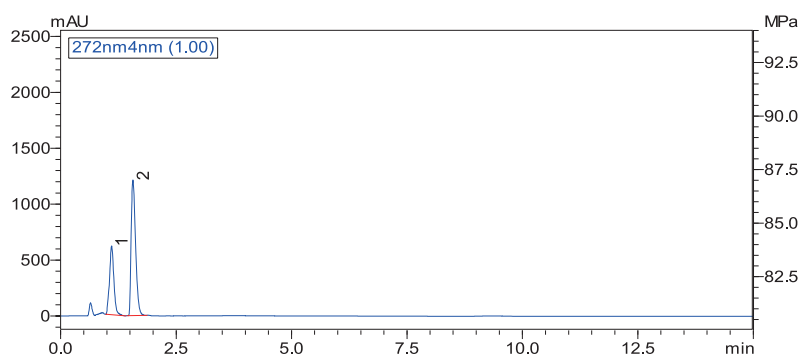


图7 系统适用性溶液1在MD : ACN=7:3 (v/v)分析条件下的色谱图

表1 四种分析方法中杂质和目标物的测定信息

分析方法	化合物名称	保留时间	峰面积	分离度	理论塔板数	拖尾因子	信噪比
MA-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	2.496	78761	--	3372	1.664	48.6
	头孢美唑钠	6.207	2510777	15.3	6259	1.521	865.1
MB-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	1.854	2814355	--	1804	2.062	1226.8
	头孢美唑钠	5.329	9133180	16.6	7608	1.071	3038.4
MC-MeOH (9:1, v/v)	5-巯基-1 甲基四氮唑	2.253	2494181	--	1703	1.332	1003.6

	头孢美唑钠	6.724	8586967	17.0	7629	1.264	2706.6
MD-ACN (7:3, v/v)	5-巯基-1 甲基四 氮唑	1.103	4005406	--	691	1.100	1013.1
	头孢美唑钠	1.564	8097964	2.677	1247	1.476	2004.9

2.3 Class-Agent 软件评价

采用 Class-Agent 软件进行评价，该软件是基于峰检出数、分离度进行评价（以分离度低于 3.0 按照实际值进行结果报出，等于或高于 3.0 全部按照 3.0 进行计算，将所有峰的分离度总和乘以峰的检出个数作为最终得分进行评价，得分最高者则视为最佳优化方法）。由上面表 1 可知，目标物在前三者方法的分析中，获得的分离度数值均大于 3.0（分别为 15.3、16.6、17.0），只有最后一种方法分析获得的分离度数值为 2.677，依据峰的容量检出个数为 2 个，Class-Agent 软件进行自动计算，最后一种分析方法得分为 5.354，其余前三种方法得分均为 6，如图 8 所示。考虑到分析效率和信噪比等信息，最终选择分析方法为 MB-MeOH (9:1, v/v) 作为流动相，Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D. × 100 mmL, 2.2 μm) 作为分析用色谱柱进行后续实验。

No.	Data File	Analytical Condition	Resolution										Peak	Score	
			1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11			
1	20130816_1_MD	20130816_1_MD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2	5.354
2	20130816_1_MC	20130816_1_MC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2	6.000
3	20130816_1_MB	20130816_1_MB	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2	6.000
4	20130816_1_MA	20130816_1_MA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2	6.000

图8 Class-Agent软件对四种分析方法的评价得分情况

2.4 样品分析考察

1.2 分选择上述分析条件 MB-MeOH (9:1, v/v) 作为流动相进行样品分析考察，色谱图如图 9 和图 10 所示，可以看到 1 号样品系统适用性溶液②和 2 号样品系统适用性溶液②的两份样品因为添加氢氧化钠溶液，与 1 号系统适用性溶液①和 2 号系统适用性溶液①进行比较，具有较低的信号响应（纵坐标读数），表明氢氧化钠的加入具有破坏作用。

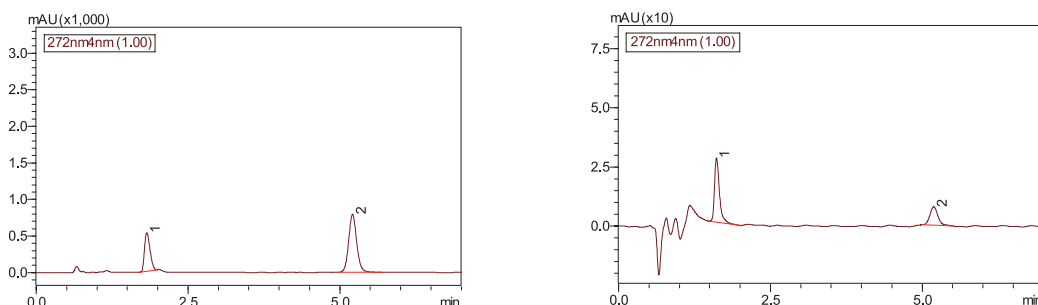


图9 1号样品系统适用性溶液①（左图）和系统适用性溶液②色谱图（右图）

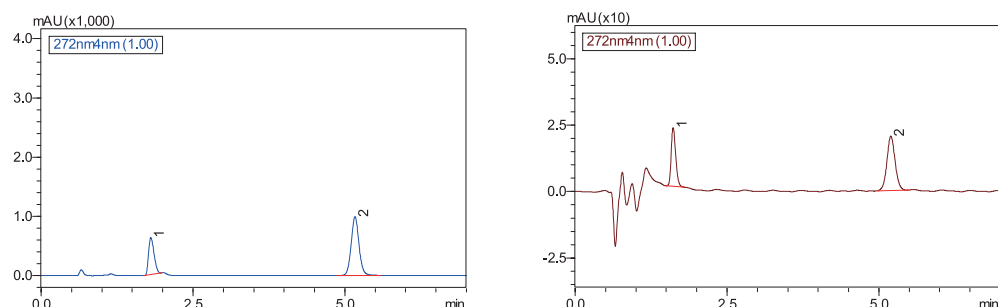


图10 2号样品系统适用性溶液①（左图）和系统适用性溶液②色谱图（右图）

2.5 系统精密度考察

气选择上述优化分析条件 MB-MeOH (9:1, v/v) 作为流动相进行实验, 图 11 为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的头孢美唑钠的色谱图, 该浓度下连续 6 针进样所得峰面积和保留时间相对标准偏差 (RSD%) 结果见表 2, 所得峰面积 RSD% 为 3.46%, 保留时间 RSD% 为 0.174%。

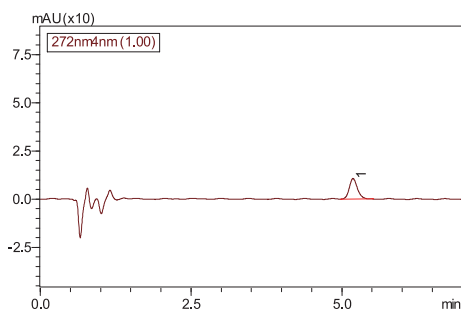


图11 头孢美唑钠2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的色谱图

表2 系统精密度考察 (n=6)

编号	保留时间 (min)	峰面积
1	5.185	95898
2	5.173	93399
3	5.168	95248
4	5.167	95726
5	5.160	88668
6	5.162	89525
RSD%	0.174	3.46

结论

本实验使用岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统, 按照文献提供的四种分析测试条件, 利用 Method Scouting Solution 工作站控制来自动实现条件优化, 通过 Class-Agent 报告生成软件自动进行峰检出数和分离度综合评估从而筛选最优条件, 最终确立分析方法为 MB-MeOH(9:1, v/v) 作为流动相, Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D. \times 100 mmL., 2.2 μm) 作为分析用色谱柱。在确定该方法条件下进行样品考察, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的头孢美唑钠连续 6 针进样所得峰面积和保留时间的相对标准偏差分别为 3.46%、0.174%, 表明系统具有较好的精密度。岛津 Nexera UHPLC LC-30A 方法开发系统为液相分析方法的快速开发提供了一种有效的手段。