Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Alliance反相液相色谱法测定阿奇霉素及其相关化合物

赵淑军
沃特世科技（上海）有限公司

前言

阿奇霉素（Azityromycin）是由红霉素衍生的氮杂广谱抗生素，具有优于母体化合物的生物和药理特性[1]，“非典”时期曾作为首选抗生素药物，与克拉霉素并称为新型红霉素的两个最具代表性的药物[2]。

目前已经存在几种检测阿奇霉素含量的方法，其中Patricia等[3]采用常规仪器的分析方法，但流动相的组成5种化合物，配制过程繁琐，操作不便；美国药典中阿奇霉素含量测定是采用带有双玻璃碳电极的安培电化学检测器，一般药物分析实验室不易配备检测器设备；2005版中国药典对阿奇霉素相关物质的测定采用薄层色谱法（TLC），对含量的测定是采用微生物检定法，方法的专属性不好；而国家药监局对于阿奇霉素两种注射液有关物质检查项进行了修订[4]，修订后的检验方法采用液相色谱法，流动相pH值为8.2；欧洲药典方法[5]也同样采用液相色谱方法二极管矩阵检测器检测，流动相pH值为8.9。沃特世（Waters®）公司于2005年推出基于BEH Technology™填料基体的XBridge™系列色谱柱，具有高柱效及前所未有的超宽pH应用能力，在高pH条件下柱寿命比硅胶基体反相柱提高十倍以上，可以满足欧洲药典和药监局公告中要求的方法测定。

本文利用沃特世公司Alliance® 2795配2996 PDA检测器的HPLC系统，采用XBridge Shield RP18色谱柱，以乙腈-甲醇-缓冲盐流动相体系，建立了测定阿奇霉素及其相关化合物的HPLC分析方法，达到阿奇霉素和21种相关物质的较好分离效果。

实验部分

实验标准物质及处理

阿奇霉素粉末状混合杂质对照品，由北京某客户提供。

对于阿奇霉素样品用1:1乙腈/水可以溶解，但溶解存在一定的难度，本实验采用1:1的乙腈：$(NH_4)_2HPO_4$ -NH_4OH（pH=10）水溶解样品，配制成10mg/ml浓度溶液，用于整个实验的测定。

在实验中发现溶解阿奇霉素后的样品溶液放置1-2天后会发生成分的变化，因此本实验样品都是现用现配，并包括流动相使用不超过48小时。

LC条件

LC系统：Waters Alliance 2795系统，配2996 PDA二极管矩阵检测器
色谱柱：XBridge Shield RP18，5μm 4.6 x150mm
柱温：60 ℃
流动相A：CH_3OH
流动相B：ACN
流动相C：Na_2HPO_4 - H_3PO_4（pH=8.9）
流速：1.0 mL/min
进样体积：50μL
Gradient梯度表：

W2790/5 梯度表

	时间	流量	%A	%B	%C	%D	曲线
1		1.00	11.3	33.7	55.0	0.0	
2	5.00	1.00	12.5	37.5	50.0	0.0	6
3	20.00	1.00	13.8	41.2	45.0	0.0	6
4	25.00	1.00	15.0	45.0	40.0	0.0	6
5	35.00	1.00	15.0	45.0	40.0	0.0	6
6	35.10	1.00	11.3	33.7	55.0	0.0	6
7	45.00	1.00	11.3	33.7	55.0	0.0	6

PDA条件

检测器：　2996 PDA
检测波长：　210nm

结果与讨论

流动相的影响

流动相是影响分离度的重要参数。实验首先选择乙腈和缓冲盐为流动相，考察了乙腈/缓冲盐比例分别为45:55、50:50、55:45和乙腈比例从45到55逐渐增加的梯度分离的情况，随着乙腈比例的提高，阿奇霉素主峰保留时间缩短，但其相关化合物保留时间亦大大缩短，而其相关化合物基本上都在其前面出峰，出峰太快不利于其杂质的分离；而且发现四种情况下多个杂质没有有效分离，如图1所示。

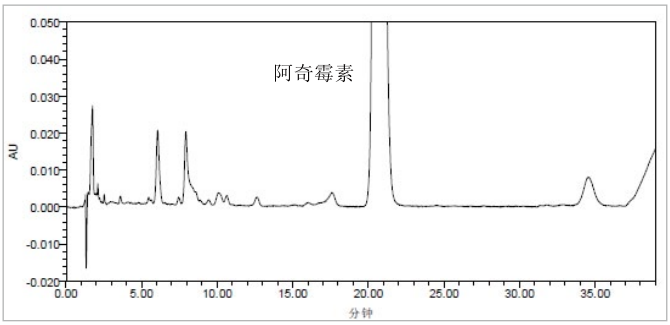

图1　乙腈/缓冲盐=45/55配比下阿奇霉素及其相关物质分离色谱图

我们采用甲醇/乙腈/缓冲盐流动相体系进行分离，得到较好效果。

柱温的影响

实验以35℃、40℃和60℃考察柱温对阿奇霉素及其相关物质分离度的影响。随着柱温的升高，柱压降低，保留时间缩短，但是随着柱温的升高阿奇霉素各种相关物质的分离度及峰形得到很大改善，在柱温60℃时我们分离得到阿奇霉素的21种相关物质，并均具有较好的分离效果和对称性（见图2-4所示）。其中阿奇霉素主峰由于浓度较大，所以对称性较差，如果想单独得到较佳的主峰峰形，可以稀释样品进样。

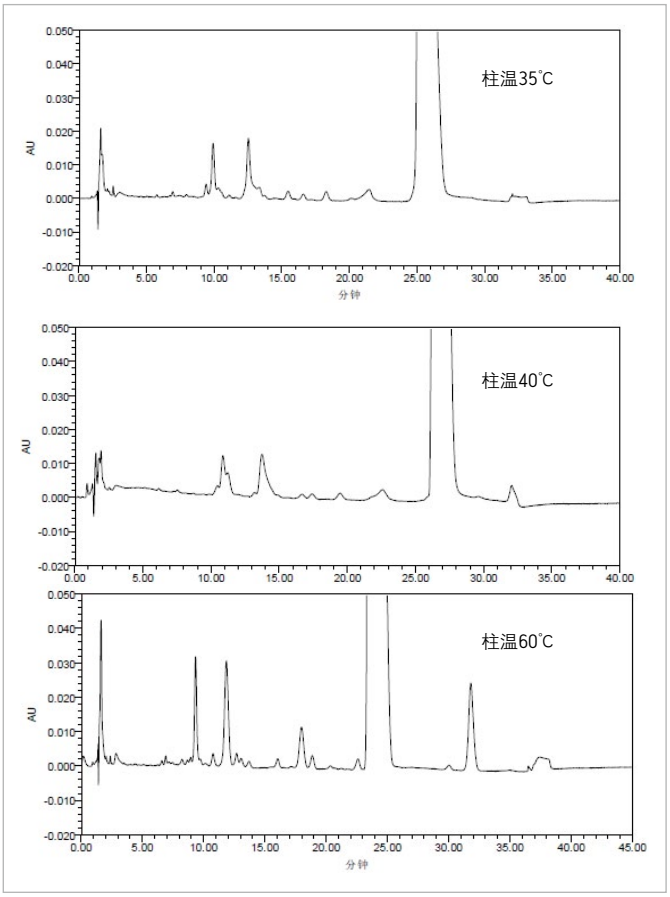

图2-4　自上而下三种不同色谱柱温度对阿奇霉素相关化合物分离的影响

阿奇霉素样品分离色谱图

在我们优化的色谱条件下，我们分离得到样品中阿奇霉素和其21种相关化合物，各种物质之间基本实现有效分离，并具有较好的峰对称性。优化条件下的分离色谱图如图5所示，并以溶剂空白进样进行比较，排除由于系统污染所引入的成分误判。表1是22种成分的分离数据。

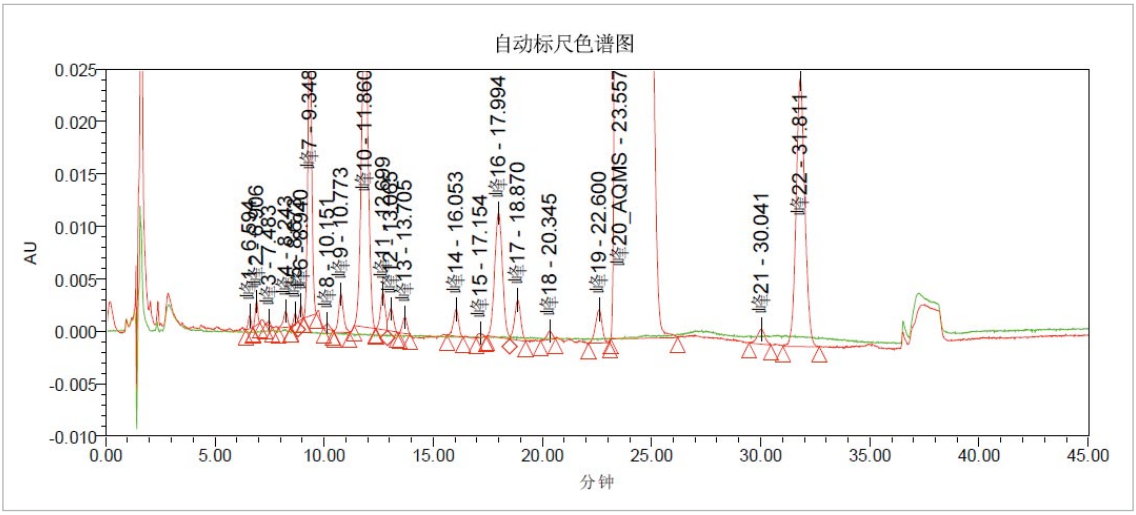

图5　优化色谱条件下的阿奇霉素样品分离色谱图及和溶剂空白的比较

表1　阿奇霉素及其相关物质的分离结果表

	峰名	保留时间(分钟)	% 面积	面积	峰高	分离度	USP 拖尾	s/n
1	峰 1	6.594	0.04	11178	1257		0.9	5.2
2	峰 2	6.906	0.06	18476	2303	1.3	1.0	9.6
3	峰 3	7.483	0.01	4026	458	2.5	1.0	1.9
4	峰 4	8.243	0.07	20206	1525	2.7	0.8	6.3
5	峰 5	8.673	0.03	8867	972	1.5		4.0
6	峰 6	8.940	0.04	11188	1345	1.2		5.6
7	峰 7	9.348	1.24	357416	30308	1.5	1.0	125.7
8	峰 8	10.151	0.03	7435	535	2.3	1.2	2.2
9	峰 9	10.773	0.20	57388	3663	1.6	1.1	15.2
10	峰 10	11.860	2.24	647405	30103	2.3	1.0	124.9
11	峰 11	12.699	0.18	52872	3487	1.7		14.5
12	峰 12	13.065	0.11	32012	2132	0.8		8.8
13	峰 13	13.705	0.08	22335	1512	1.5	0.9	6.3
14	峰 14	16.053	0.15	42233	2565	5.6	0.9	10.6
15	峰 15	17.154	0.02	6543	409	2.5	1.2	1.7
16	峰 16	17.994	1.02	294765	11855	1.5	1.0	49.2
17	峰 17	18.870	0.26	75643	3840	1.5		15.9
18	峰 18	20.345	0.05	13990	810	2.9	0.8	3.4
19	峰 19	22.600	0.23	67578	3148	4.3	0.9	13.1
20	峰 20_AQMS	23.557	91.38	26451372	464713	0.9	3.3	1927.5
21	峰 21	30.041	0.12	35249	1434	5.8	0.8	5.9
22	峰 22	31.811	2.45	709541	25551	2.6	1.1	106.0

结论

本文采用Waters Alliance液相色谱配PDA检测器普通液相方法和沃特世公司XBridge Shield RP18色谱柱，用于检测阿奇霉素及其杂质，有效分离了样品中的21个杂质， 其中11个杂质峰的百分含量超过0.1%，19个杂质峰的信噪比均在3以上，其中有4个主要杂质百分含量在1%以上。

此方法采用的XBridge Shield RP18，5μm，4.6 x 150mm色谱柱pH使用范围为2-11，可以耐受本实验pH=8.9的碱性环境而不损伤柱寿命，适用于阿奇霉素的常规方法测定。

参考文献

[1] Bright GM, Nagel A A,Bordnr J. J. Antibiot.,1998,41:1029.

[2] ShiYing, YaoGuowei. Chinese Journal of Analytical Chemistry.2005,4:512

[3] Patricia Z, Ceresole R, Rosasco M.A. Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 27: 833-836

[4] 关于修订阿奇霉素氯化钠注射液和阿奇霉素葡萄糖注射液药品标准有关事宜的公告（国食药监办[2007]334号）

[5] European pharmacopoeia 5.6,01/2007:1649

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

©2012 年沃特世公司。于中国印制
2012 年9 月

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com