文章编号：1001-8689(2020)03-0274-12

青霉素杂质谱分析方法的优化与转换

张夏[1]　张浩杰[2]　姚尚辰[1]　王悦[2]　胡昌勤[1,*]
(1 中国食品药品检定研究院，北京 100050；2 沃特世科技 (上海) 有限公司，上海 201206)

摘要：目的　建立青霉素杂质谱 HPLC 分析方法，并将其转换成 UPLC/UHPLC 方法。**方法**　以青霉素混合降解溶液为样品；首先分析《中国药典》(2010 年版，ChP2010) 方法甲醇 - 缓冲盐二元流动相色谱系统的缺陷；再利用实验设计理念，以响应曲面法 (response surface methodology，RSM) 的中心组合设计 (central composition design，CCD) 对色谱系统进行优化，满意度函数法确定最优色谱条件，并优化梯度洗脱条件；最后，利用软件对 HPLC 方法的流速、进样体积和梯度时间进行几何缩放，并通过色谱柱的选择，将其分别转换为 UPLC 方法和 UHPLC 方法。**结果**　新 HPLC 方法：色谱柱为 Capcell Pak C_{18} MGII(4.6mm×250mm，5μm)，流速：1.0mL/min，进样体积：20μL；UPLC 方法：色谱柱为 Cortecs C_{18}(2.1mm×100mm，1.6μm)，流速：0.35mL/min，进样体积：2.0μL；UHPLC 方法：Cortecs C_{18}(4.6mm×150mm，2.76μm)，流速：0.8mL/min，进样体积：10μL。3 种方法的检测波长均为 225nm，柱温均为 34℃；流动相 A 均为磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 10.6g，加水至 1000mL，用磷酸调 pH 至 3.4)- 甲醇 (72:14，*V/V*)，流动相 B 均为乙腈；均为梯度洗脱，但梯度洗脱表不同。**结论**　3 个色谱系统的分离效果 (出峰顺序和个数) 相似。新 HPLC 方法可以分离出更多的降解杂质，并明显改善了青霉素峰的拖尾，缩短了分析时间。

关键词：青霉素；杂质谱；实验设计；中心组合设计；HPLC；UPLC；方法优化；方法转换
中图分类号：R978.1，R917　　**文献标志码**：A

The optimization and transformation of analytical methods for the impurity profiling of penicillin

Zhang Xia[1], Zhang Hao-jie[2], Yao Shang-chen[1], Wang Yue[2] and Hu Chang-qin[1]
(1 National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050; 2 Waters Technology Co., Ltd, Shanghai 201206)

Abstract　**Objective**　To develop an HPLC method to analyze the related substances in penicillin and transfer the HPLC method into an UPLC/UHPLC method. **Methods**　The mixed degradation solution of penicillin was used as the analytical sample. Firstly, the shortages of the analytical method in Chinese Pharmacopoeia (ChP2010) were shown, which applies methanol and phosphate buffer as mobile phase. This chromatographic system was optimized

收稿日期：2019-12-06
基金项目：国家重大新药创制 (No. 2017ZX09101001-007)
作者简介：张夏，女，生于 1990 年，博士，助理研究员，主要从事化学药品杂质谱研究，E-mail: s791657998@126.com
* 通讯作者，E-mail: hucq@nifdc.org.cn



第一作者：张夏，本科毕业于四川大学华西药学院大药学专业，硕士毕业于中国食品药品检定研究院药物分析专业。2017 年于北京协和医学院微生物与生化药学专业获理学博士学位，并于同年进入中国食品药品检定研究院工作。主要研究方向为抗感染药物的杂质谱分析与控制。发表 SCI、国家核心期刊文章多篇。



通讯作者：胡昌勤，研究员，博士生导师，现任第十一届药典委员会执行委员，微生物专业委员会主任委员；北京药学会抗生素专业委员会主任委员；中国仪器仪表学会近红外光谱分会副理事长。曾认中国食品药品检定研究院化学药品检定首席专家，抗生素室主任兼任微生物检测室主任。获得国家科技进步二等奖、上海市科技进步二等奖、吴阶平 - 保罗杨森药学奖三等奖。出版专著 8 部，发表论文 500 余篇，其中 SCI 论文 80 余篇。授权国家发明专利 14 项。指导博士、硕士研究生 60 余人。

using the central composition design of response surface methodology with the concept of design of experiment (DoE). The best chromatographic condition was determined using the desirability function method. The gradient elution procedure was also optimized. Finally, the flow rate, the injection volume, and the gradient time of HPLC were geometrically scaled by software, and the HPLC method was transformed into UPLC and UHPLC methods through the selection of chromatographic column. **Results**　The condition of the new developed HPLC system was as follows: the column used was Capcell Pak C_{18} MGII (4.6mm×250mm, 5μm), the flow rate was 1.0mL/min and the injection volume was 20μL; the condition of the new developed UPLC system was as follows: the column used was Cortecs C_{18} (2.1mm×100mm, 1.6μm), the flow rate was 0.35mL/min and the injection volume was 2.0μL; the condition of the new developed UHPLC system was as follows: the column used was Cortecs C_{18} (4.6mm×150mm, 2.76μm), the flow rate was 0.8mL/min and the injection volume was 10μL. Other conditions of the three methods were all the same. The detection wavelength was 225nm, the column temperature was 34 ℃, the mobile phase A was phosphate buffer (take 10.6g of potassium dihydrogen phosphate, add water to 1000mL, and adjust the pH to 3.4 with phosphoric acid)-methanol (72:14, *V/V*) and the mobile phase B was acetonitrile. But the three gradient elution procedures were different. **Conclusion**　The separation performance (elution order and the number of peaks) of the three methods was similar. The new HPLC method can separate more degradation impurities, improve the trailing of penicillin and decrease the analytical time.

Key words　Penicillin; Impurity profiling; Design of experiments; Central composition design; HPLC; UPLC; Method optimization; Method transfer

药物杂质谱 (impurity profile) 控制是当前药品质量控制的热点[1]。药物中杂质按其来源通常分为工艺杂质和降解杂质，杂质谱可更好地表征各类有机杂质在药品中的数量及分布，进而追溯其产生的来源，评价药品生产工艺的优劣[2-3]。从风险管理的角度，用于药物杂质谱控制的分析方法应能对药物研发中可能出现的各类杂质进行有效的分析，并保证方法在整个药品生命周期都具有良好的专属性和敏感性[4]。从色谱技术发展的角度，利用实验设计 (DoE) 理念优化色谱条件[5]，采用各类联用技术在线对微量杂质进行快速确认[6]，采用 UPLC 技术提高分析方法效率是杂质谱分析发展的方向。

青霉素类抗生素是目前临床中仍广泛应用的一类抗感染药物。青霉素中的杂质谱几乎全部由降解产生。对青霉素类抗生素的降解反应机理已经有较清楚的认识[7-9]。青霉素侧链酰胺结构的断裂可生成 6-APA 和苯乙酸；在酸、碱、热和水溶液中青霉素均易被分解，产生各类小分子降解杂质，其终产物为青霉胺、青霉醛等；在 pH>7 的碱性水溶液中，β-内酰胺环开环生成青霉噻唑酸 (4 个非对映异构体)，进一步脱羧生成青霉脱羧噻唑酸 (2 个非对映异构体)。非对映异构体的光谱、色谱和质谱裂解特征相近；青霉噻唑酸在 pH2.0 的环境下重排成青霉酸，其在 240nm 处有特征吸收，在 pH4.0 的环境下重排生成青霉烯酸，其 320nm 处有特征吸收；在高温高湿条件下样品吸潮，青霉烯酸的含量增高导致颜色变黄；水浴条件可产生青霉酸和青霉烯酸。根据各国药典和相关文献，青霉素已知杂质的汇总见图 1。

各国药典均采用 HPLC 方法控制青霉素中的杂质。现行版欧洲药典 (EP10.6)[10] 和美国药典 (USP41)[11] 均采用甲醇为强溶剂的二元流动相系统，EP10.6 采用梯度洗脱，USP41 采用等度洗脱。中国药典 2010 年版 (ChP2010) 的色谱方法[12] 同 EP10.6，但在中国药典 2015 年版 (ChP2015) 中修订成三元流动相系统[13]。本文介绍在色谱系统修订过程中的思考，并探讨将其转换成具有相似分离能力的 UPLC/UHPLC 方法，为建立其它品种的杂质谱控制方法提供借鉴。

1　材料与方法

1.1　样品

青霉素钠对照品 (中国食品药品检定研究院，批号：130437-201005，含量：93.3%)，磷酸二氢钾为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司，批号：20101019)，乙腈、甲醇为色谱纯，重蒸水。

1.2　青霉素混合降解溶液

通过预试验，以青霉素降解 10%~15% 为标准，确定各强制降解条件。取 4mg/mL 青霉素钠对照品溶液 2mL：①加 1mL 0.01mol/L 盐酸溶液，室温放置 20min，用 0.01mol/L 氢氧化钠溶液调 pH7~8，为强酸降解溶液；②加 1mL 0.01mol/L 氢氧化钠溶液，室温放置 10min，用 0.01mol/L 盐酸溶液调 pH7~8，为强碱降解溶液；③加 pH4.6 的醋酸 - 醋酸钠缓冲盐溶液 1mL，室温放置 30min，用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH7~8，为弱酸降解溶液；④取青霉素钠对照品适量，加水溶解并稀释成 4mg/mL 的溶液，60℃水浴加

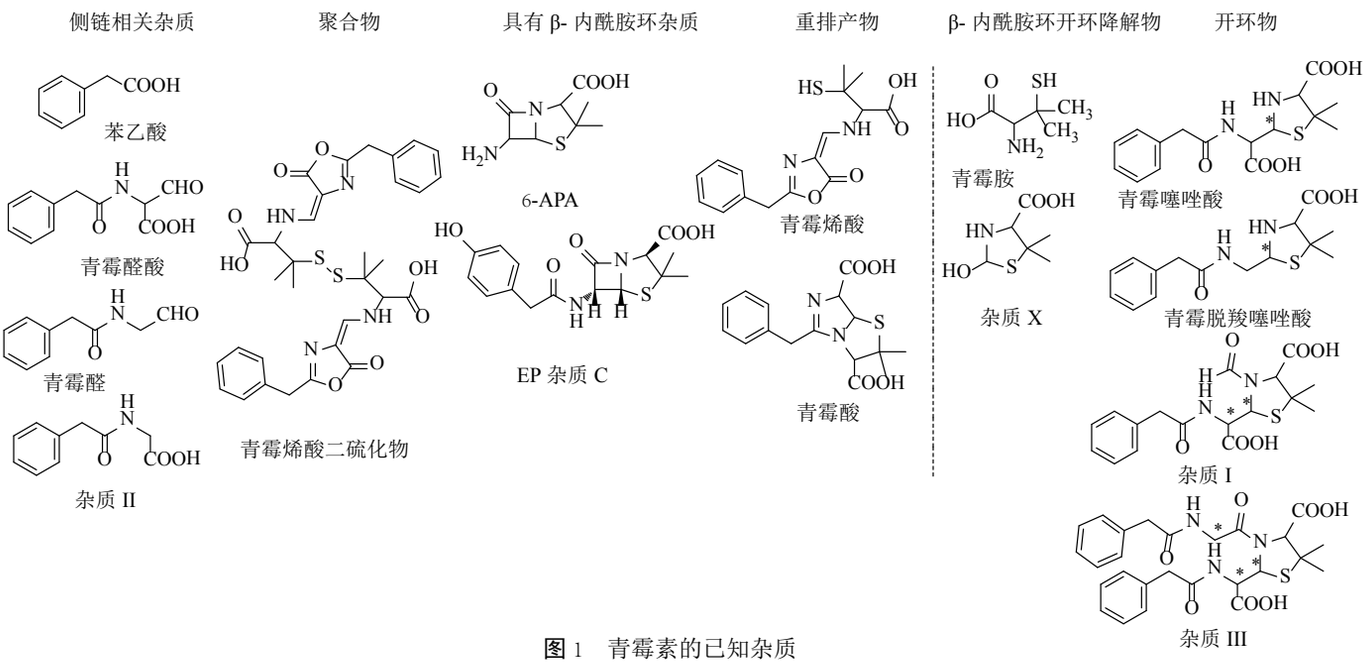


图 1　青霉素的已知杂质

Fig. 1　The known impurities of penicillin

热 50min，为水解溶液。诸降解溶液均置 -20℃保存。将上述强酸、强碱、弱酸和水解溶液按 2:1:1:2 的比例混匀，即得青霉素混合降解溶液，-20℃保存。

1.3　ChP 2010 青霉素有关物质分析方法 [12]

色谱柱为 Capcell Pak C_{18} MGII(4.6mm×250mm，5μm)；检测波长：225nm；流速：1.0mL/min；进样量：20μL。流动相 A：0.5mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 至 3.5)- 甲醇 - 水 (10:30:60, *V/V/V*)，流动相 B：0.5mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 至 3.5)- 甲醇 - 水 (10:50:40, *V/V/V*)；先以流动相 A- 流动相 B(70:30, *V/V*) 等度洗脱，待青霉素峰洗脱后 (t_G)，按表 1 进行梯度洗脱。

1.4　利用实验设计理念优化色谱系统

利用响应曲面法的中心组合设计进行色谱系统的优化 [5]。将青霉素主峰保留时间 (R_t)、青霉烯酸与相邻峰的分离度 (R_s)、主峰不对称因子 (A_s) 和分离出的杂质个数 (N_{imp}) 作为优化目标 (因变量)。根据预实验确定影响因子 (自变量)，4 个影响因子和其变化范围分别为 F_1(流动相中乙腈和甲醇的体积比，A/B)，范围为 0.6~1.2，F_2(流动相中有机相的比例，B%)，范围为 18%~32%，F_3(柱温，Temp)，范围为 25~45℃和 F_4(流速，Speed)，范围为 0.8~1.4mL/min。利用 Design Expert Version8.0.5b 软件设计试验运行表，根据实验结果分别对 4 个优化目标进行拟合，拟合方程即为优化模型。

表 1　中国药典 2010 版青霉素有关物质分析梯度洗脱表

Tab. 1　The gradient elution procedure of the HPLC method to analyze related substances in penicillin in ChP2010

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
t_G-t_G+20	70 → 0	30 → 100
t_G+20-t_G+35	0	100
t_G+35-t_G+50	0 → 70	100 → 30

利用软件中的满意度函数法确定最优色谱条件。即将每一个优化目标的响应值 y_i 转换为满意度函数 d_i，$0 \leqslant d_i \leqslant 1$。如果目标值 (*T*) 位于下限 (*L*) 和上限 (*U*) 之间，则

$$d=\begin{cases}0, y<L\\ \left(\dfrac{y-L}{T-L}\right)^{r1}, L\le y\le T\\ \left(\dfrac{U-y}{U-T}\right)^{r2}, T\le y\le U\\ 0, y>U\end{cases} \quad (1)$$

式中，*r* 为权重。本文中 *r*=1，即满意度函数呈线性。

当 *T* 是最大值时，*L* 则

$$d=\begin{cases}0, y<L\\ \left(\dfrac{y-L}{T-L}\right)^{r}, L\le y\le T\\ 1, y>T\end{cases} \quad (2)$$

当 T 是最小值时，则

$$d=\begin{cases}1, y<T\\ \left(\dfrac{U-y}{U-T}\right)^{r}, T\le y\le U\\ 0, y>U\end{cases} \tag{3}$$

然后选择设计变量，使 m 个优化目标响应值的总满意度最大，即

$$D=\left(d_1\times d_2\times\ldots d_m\right)^{1/m} \tag{4}$$

本文中，优化目标 R_s 和 N_{imp} 的目标值为最大值。求解上述优化目标的总满意度函数，绘制满意度响应面，再以 R_s ＞ 1.5，N_{imp} 不少于 12 为限定条件，得到最优色谱条件。

1.5　青霉素有关物质新分析方法

Waters e2695 高效液相色谱仪，紫外检测器，Empower 软件，色谱柱为 Capcell Pak C_{18} MGII(4.6mm×250mm，5μm)。检测波长：225nm，流速：1.0mL/min，柱温：34℃，进样体积：20μL。流动相 A：磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 10.6g，加水至 1000mL，用磷酸调 pH 至 3.4)- 甲醇 (72:14)，流动相 B：乙腈；梯度洗脱 (表 2)。

1.6　UPLC/UHPLC 方法的建立

利用 Waters Empower 3 软件中的液相方法转换器，对 HPLC 方法的流速、进样体积和梯度时间进行几何缩放，将原方法转换为 Waters UPLC H-class(亚 2 微米粒径的色谱柱) 方法和 Acquity Arc UHPLC(亚 3 微米粒径的色谱柱) 方法。

分别对 5 根 UPLC 色谱柱 (柱 1：HSS C_{18}(2.1mm×100mm，1.8μm)，柱 2：HSS T3(2.1mm×100mm，1.8μm)，柱 3：CSH C_{18}(2.1mm×100mm，1.7μm)，柱 4：BEH C_{18}(2.1mm×100mm，1.7μm)，柱 5：Cortecs C_{18}(2.1mm×100mm，1.6μm) 进行转换，得到 UPLC 系统的梯度洗脱表，比较分离结果 (出峰顺序和色谱峰数)，选择与 HPLC 分离结果相似的色谱柱用于 UPLC 分析。再选择填料与筛选出的 UPLC 色谱柱相同的 UHPLC 色谱柱，利用软件得到 UHPLC 系统的梯度洗脱表。

表 2　HPLC 色谱系统梯度洗脱表

Tab. 2　The gradient elution procedure of optimized HPLC chromatographic system

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	86.5	13.5
t_G+2	86.5	13.5
t_G +26	64	36
t_G +38	64	36
t_G +55	86.5	13.5

t_G=10min，为青霉素混合降解溶液中青霉脱羧噻唑酸 (色谱峰 3) 的保留时间

1.6.1　UPLC 方法

Waters UPLC H-class 液相色谱仪，紫外检测器，Empower 软件，色谱柱为 Cortecs C_{18}(2.1mm×100mm，1.6μm)。检测波长：225nm，流速：0.35mL/min，柱温：34℃，进样体积：2.0μL。流动相 A：磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 10.6g，加水至 1000mL，用磷酸调 pH 至 3.4)- 甲醇 (72:14)，流动相 B：乙腈；梯度洗脱 (表 3)。

1.6.2　UHPLC 方法

Waters UHPLC Arc 液相色谱仪，紫外检测器，Empower 软件，色谱柱为 Cortecs C_{18}(4.6mm×150mm，2.76μm)。检测波长：225nm，流速：0.8mL/min，柱温：34℃，进样体积：10μL。流动相 A：磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 10.6g，加水至 1000mL，用磷酸调 pH 至 3.4)- 甲醇 (72:14)，流动相 B：乙腈；梯度洗脱 (表 4)。

2　结果与讨论

2.1　ChP 2010 分析方法的缺陷

采用 ChP2010 青霉素有关物质 HPLC 方法分析青霉素混合降解溶液 (图 2)，可见，杂质主要集中

表 3　UPLC 色谱系统梯度洗脱表

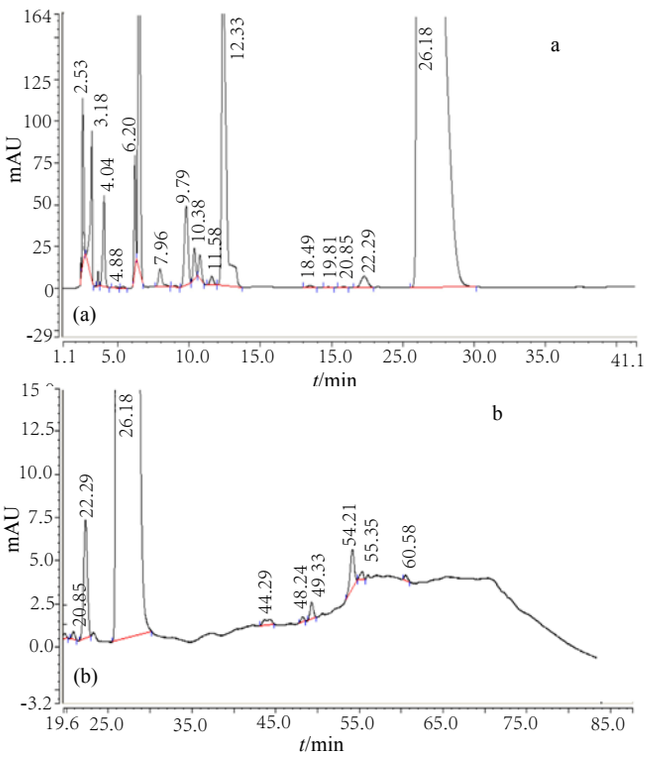
Tab. 3　The gradient elution procedure of UPLC chromatographic system

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	86.5	13.5
1.40(t_G)	86.5	13.5
8.46	64	36
11.31	64	36
15.36	86.5	13.5

表 4　UHPLC 色谱系统梯度洗脱表

Tab. 4　The gradient elution procedure of UHPLC chromatographic system

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	86.5	13.5
3.9(t_G)	86.5	13.5
23.4	64	36
32.4	64	36
45	86.5	13.5



a：等度洗脱部分(R_t=1.1~41.4min)；b：梯度洗脱部分(t_R=19.6~82min)；柱温：30 ℃，色谱柱：Capcell Pak C_{18} MGII，(4.6mm×250mm，5μm)

图 2　中国药典 2010 版条件下青霉素有关物质分析色谱图

Fig. 2　The chromatogram of the method to analyze the related substances in ChP 2010

在青霉素峰之前，部分杂质未能完全分离；青霉烯酸二硫化物峰 (54.21min) 与梯度基线漂移重合，难以辨认；主峰拖尾较严重 (峰不对称因子 A_s 为 4.39)，分析时间较长 (82mim)；提示该方法有必要进行优化。

结合强制降解试验对青霉素混合降解溶液中的杂质峰进行归属 (表 5)，其可能结构及特征见表 6，与图 1 中的杂质比较，提示该色谱系统对部分青霉素降解产物可能无法检出。

2.2　ChP2010 色谱系统的优化

2.2.1　建立优化模型

色谱柱与分析方法的选择性密切相关。选用柱参数 A 不同的 5 根色谱柱，柱 1：Capcell Pak C_{18} MGII(A=0.047)、柱 2：Kromasil 100-5-C_{18}(A=-0.07) 和柱 3：Alltima HP C_{18}(A=-0.04) 的柱参数 A 在 -0.1~0.1 范围，柱 4：XTerra C_{18} RP(A=-0.483) 和柱 5：Inertsil ODS-EP(A=-1.52) 的柱参数 A 不在上述范围，采用 ChP2010 方法分别分析青霉素混合降解溶液，柱 1 可分离出 12 个杂质，柱 2 和柱 3 可分离出 12 个杂质，柱 4 和柱 5 仅分离出 7 个杂质。色谱柱参数 A 在 -0.1~0.1 范围的色谱柱适宜于分析青霉素类抗生素杂质 [14]。故选择色谱柱 1 用于青霉素杂质的分析。

进一步分析强溶剂比例和强溶剂种类对分离效果的影响。由图 2 可知，难分离杂质对集中在青霉素主峰前的等度洗脱部分。改变等度洗脱条件 (表 7)：①将甲醇 - 缓冲盐流动相中的甲醇比例降低至 30%，虽然青霉素峰的保留时间大大增加，但难分离杂质对仍未达到基线分离，且主峰拖尾更严重；②维持

表 5　青霉素有关物质分析色谱图中杂质的归属

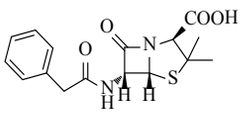
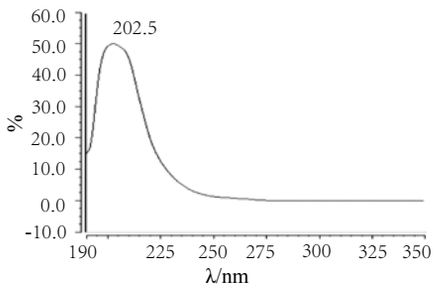
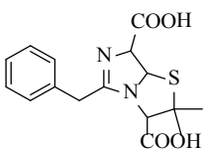
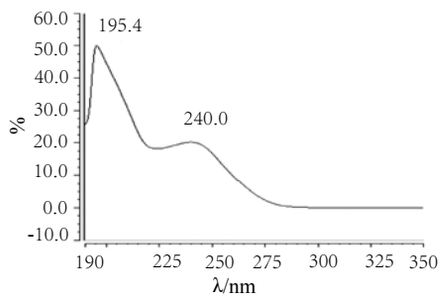
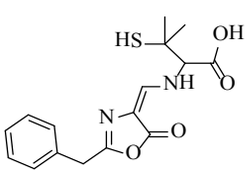
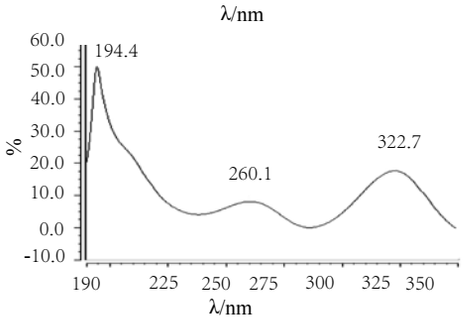
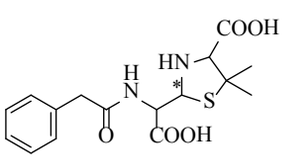
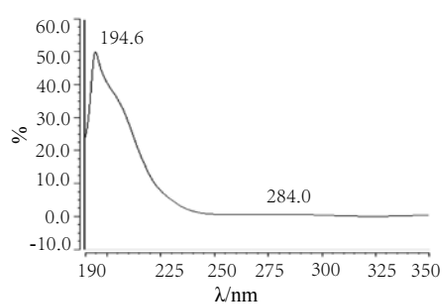
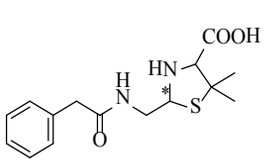
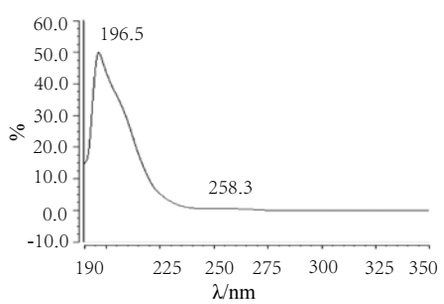
Tab. 5　The identification of impurities in penicillin

编号	名称	特征	来源					保留时间 /min	
			强酸	强碱	弱酸	水浴	高温高湿	ChP 2010 方法	新方法
1	6-APA	弱保留			++			3.18	3.32
2	未知杂质 1	240nm 有吸收	+			+	+	3.61	4.07
3	未知杂质 2	240nm 有吸收	+			+	+	4.04	2.9
4	未知杂质 3	/				+	+	6.2	7.4
5	青霉酸	240nm 有吸收	++			++	+	6.48	5.39
6	未知杂质 5	234nm 有吸收	+			+	+	/	6.46
7	未知杂质 4	277nm 有吸收	++		+	+	+	7.96	6.92
8	青霉烯酸	320nm 有吸收	+		+	++	+	9.79	12.32
9	噻唑酸峰组 1	结构相似，光谱、色谱行为相近，呈现峰组而非单一色谱峰。	+	++		+	+	10.38	8.63
10	噻唑酸峰组 2		+	++		+	+	10.76	9.38
11	噻唑酸峰组 3		+	++		+	+	11.58	10.22
12	噻唑酸峰组 4		+	++		+	+	12.38	11.36
13	未知杂质 6	280nm 有吸收				+		/	13.03
14	高聚物 A2	/	+	++	+	+	+	22.29	22.11
15	聚合物	/				+	++	＞ 22.29	＞ 24.92

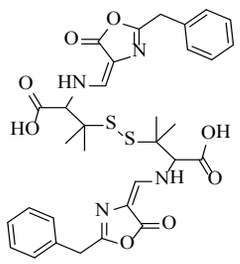
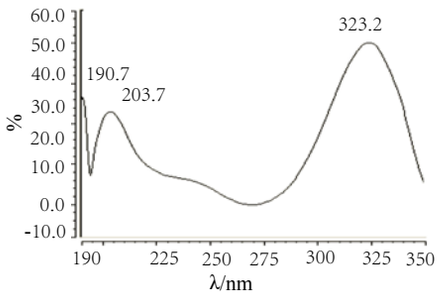
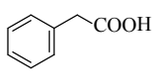
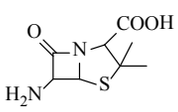
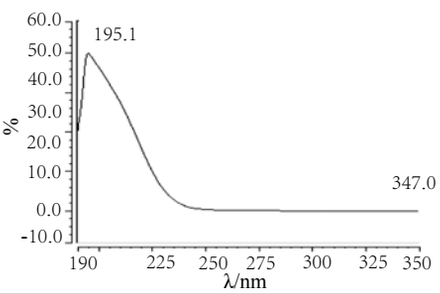
注：“/”代表未检测到该杂质；“+”代表该破坏条件下能够产生相应杂质，“++”代表该破坏条件下能够产生较多的相应杂质

表 6　青霉素及其有关物质的性质

Tab. 6　The properties of penicillin and its related substances

名称	结构式	pKa	UV 光谱图	MS 特征碎片离子
青霉素		2.73		335/289/243/176/160/128/91
青霉酸		3.00[a]		335/289/203/185/159
青霉烯酸		3.11、4.93[a]		335/317/307/289/271/217/189
青霉噻唑酸		5.19		353/335/309/263/217/174/160/146/128
青霉脱羧噻唑酸		2.02、7.69[a]		307/289/261/189

续表 6

名称	结构式	pKa	UV 光谱图	MS 特征碎片离子
青霉烯酸二硫化物		3.01、3.84[a]		/
苯乙酸		4.30		/
6-APA		3.98		217/189/172/160/143/115/97/69

"a"：表示使用 ACD 软件计算得到，其它为文献值

表 7　不同流动相组成对青霉素混合降解溶液的分离效果

Tab. 7　The separation result of penicillin mixed degradation solution of different compositions of mobile phase

流动相组成	杂质个数	主峰保留时间 /min	主峰不对称因子
缓冲盐[a]- 甲醇 (64:36)[b]	12	26.74	3.35
缓冲盐 - 甲醇 (70:30)	12	47.53	3.23
缓冲盐 - 乙腈 (80:20)	10	25.13	1.14
缓冲盐 - 乙腈 (85:15)	11	71.69	2.5
缓冲盐 - 甲醇 - 乙腈 (70:15:15)	13	20.27	2.12

[a] 缓冲盐溶液为 0.5mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 至 3.5)100mL 与 540mL 水均匀混合；[b] 中国药典 2010 版方法

溶剂强度和其它色谱条件不变，采用乙腈 - 缓冲盐体系作为流动相，并改变乙腈在流动相中的比例，依然无法实现对难分离杂质的完全分离，但主峰拖尾得到明显改善。上述结果提示，二元流动相体系不能实现对所有杂质的满意分离。

采用甲醇 - 乙腈 - 缓冲盐三元流动相改善色谱系统的选择性。利用 CCD 对流动相中甲醇和乙腈的比例进行优化。根据实验结果 (表 8)，分别对四个优化目标 (因变量) 进行拟合，得到拟合方程 (5~8)，拟合方程即为优化模型。

2.2.2　模型验证

利用 ANOVA 对中心组合设计实验结果 (表 8) 进行分析。当 P 值＜ α(α=0.05) 时，因变量 - 自变量拟合方程 (模型) 有意义。对于方程的失拟性 (Lack of Fit) 检验，当 P ＞ α 时，失拟性不显著。经检验，4 个模型均有意义，但方程 R_t、R_s、A_s 失拟显著，应采用更高阶方程进行表征。由于 Design Expert Version8.0.5b 不能进行高阶拟合，故忽略方程的失拟性，认为所有模型均有效。对模型进行进一步的评价。

$$\sqrt{R_t+0.50}=55.05-9.42F_1-1.73F_2-0.34F_3-15.19F_4+0.13F_1F_2+0.04F_1F_3+0.01F_2F_3+0.19F_2F_4+0.05F_3F_4+1.69F_1^2+0.02F_2^2+0.0007F_3^2+2.59F_4^2 \quad (5)$$

$$\log_{10} R_s=0.144+0.201F_1-0.006F_3 \quad (6)$$

$$\log_{10} A_s=1.045-0.109F_1-0.014F_2-0.004F_3-0.153F_4 \quad (7)$$

$$N_{imp}=4.140+5.878F_1+0.595F_2+0.071F_3-0.694F_4+0.104F_1F_3-6.448F_1^2-0.014F_2^2-0.002F_3^2 \quad (8)$$

表 8　CCD 实验运行表及试验结果
Tab. 8　The results of CCD operation table

Runs	Factors and levels				Responses			
	F_1(A/B)	F_2(B%)	F_3(temp)	F_4(speed)	R_t/min	R_s	A_s	N_{imp}[a]
1	1.2	32	25	0.8	20.27	2.9	1.49	9
2	1.5	25	35	1.1	24.89	1.22	1.83	10
3	0.6	18	25	1.4	109.93	1.78	2.54	12
4	0.6	18	25	0.8	192.73	0.69	3	13
5	1.2	32	45	1.4	8.94	1.74	1.36	9
6	0.6	32	25	1.4	16.43	1.36	2	11
7	0.6	32	45	1.4	11.97	0.92	1.42	11
8	1.2	18	25	0.8	134.23	1.67	2.87	10
9	0.9	25	35	1.1	32.73	1.31	1.86	13
10	0.9	11	35	1.1	212	2.14	3.5	12
11	0.9	25	35	1.7	22.86	1.02	1.6	12
12	0.9	25	55	1.1	22.83	0.89	1.72	12
13	0.9	25	35	1.1	32.93	1.27	1.87	13
14	0.6	18	45	0.8	116.08	0.85	2.62	13
15	0.9	25	35	1.1	33.12	1.28	1.87	13
16	0.9	25	35	1.1	33.23	1.34	1.84	13
17	1.2	32	45	0.8	15.03	0.96	1.52	10
18	1.2	32	25	1.4	11.88	2.59	1.4	9
19	1.2	18	45	0.8	86.7	1.81	2.22	12
20	0.3	25	35	1.1	57.42	1.06	2.33	11
21	1.2	18	25	1.4	77.41	1.63	2.45	10
22	0.6	32	45	0.8	19.5	1.38	1.87	11
23	0.9	39	35	1.1	8.3	1.78	1.08	8
24	0.9	25	35	1.1	33.91	1.15	1.77	12
25	0.6	32	25	0.8	28.18	1.42	2.18	11
26	0.9	25	15	1.1	50.77	1.39	2.45	12
27	1.2	18	45	1.4	53.18	1.21	1.62	12
28	0.6	18	45	1.4	71.48	1.39	1.78	12
29	0.9	25	35	0.5	71.09	1.35	2.61	13
30	0.9	25	35	1.1	34	1.11	1.75	12

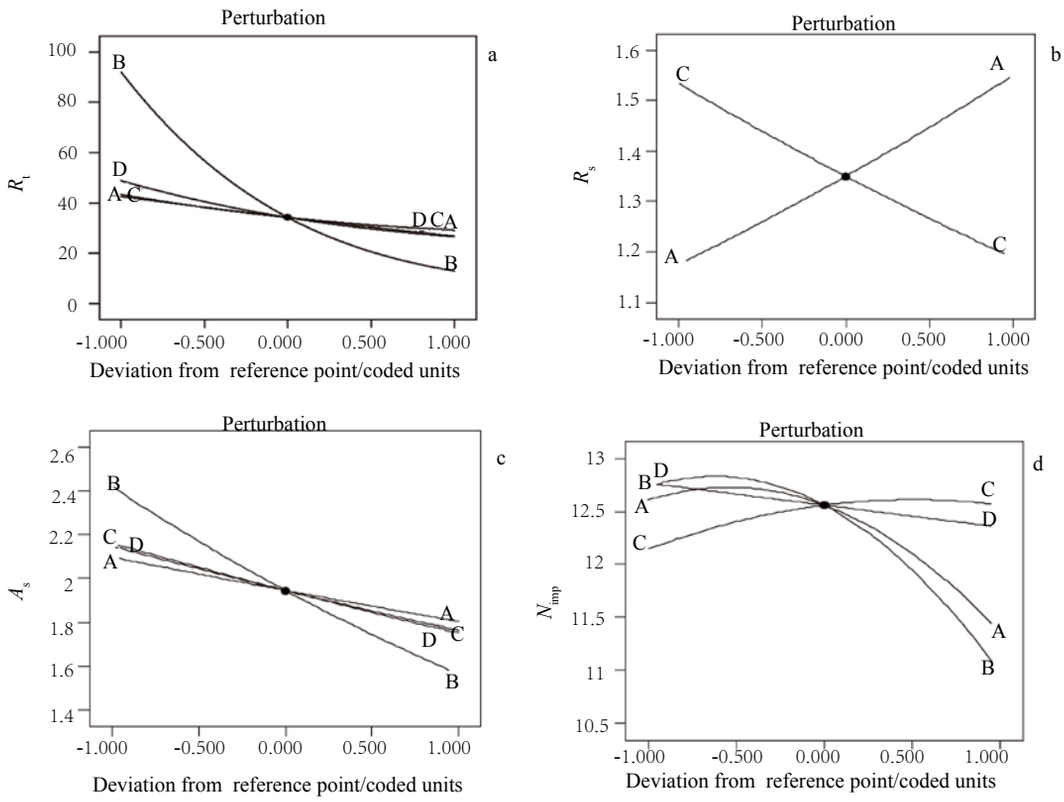
"a"：N_{imp} 仅包含光谱特征明显、峰面积大于 0.1% 的色谱峰。

用修正 R^2(Adj R-Squared) 和预测 R^2(Pred R-Squared) 表征模型预测结果的准确性，其值越小，预测结果越准确；模型 R_t 的修正 R^2 和预测 R^2 均为 0.99，模型 R_s 分别为 0.24 和 0.10，模型 A_s 分别为 0.85 和 0.81，模型 N_{imp} 分别为 0.84 和 0.68。用信噪比 (Adeq Precision) 表征模型的灵敏度，其值越大，模型越敏感；上述 4 个模型的信噪比分别为 88、6.3、24.1 和 16.2。上述结果提示，预测模型可以满足色谱系统优化的需要。

2.2.3　因素 - 响应关系分析

根据预测模型绘制因素 - 响应扰动图 (perturbation plots)(图 3)，图中的曲线斜率表示因素对响应的灵敏度。由图 3a 可见，F_2(有机相比例) 对 R_t 的影响显著；由图 3b 可见，F_1(乙腈和甲醇的体积比)、F_3(柱温) 对 R_s 影响显著；由图 3c 可见，F_2 对 A_s 影响显著；由图 3d 可见，F_1、F_2 对 N_{imp} 影响显著；而 F_4(流速) 对诸因素的影响均不显著。

进一步通过响应面 (response surfaces) 揭示因素间的交互作用，曲面的曲率越大，说明两因素间的交互作用越大。图 4 为 F_1 和 F_2 对色谱系统 4 个因变量的响应面。图 4a 显示，F_1 和 F_2 增大，R_t 曲面升高；图 4b 显示，F_1 增大，R_s 曲面升高，F_2 对曲面无影响；图 4c 显示，F_1 和 F_2 增大，A_s 曲面降低；图 4d 显示，F_1 和 F_2 增大，N_{imp} 曲面先升高后下降，F_1 和 F_2 交



图中的 A、B、C、D 分别为 F_1-F_4

图 3　因素 - 响应关系扰动图

Fig. 3　The perturbation plots between factors and responses

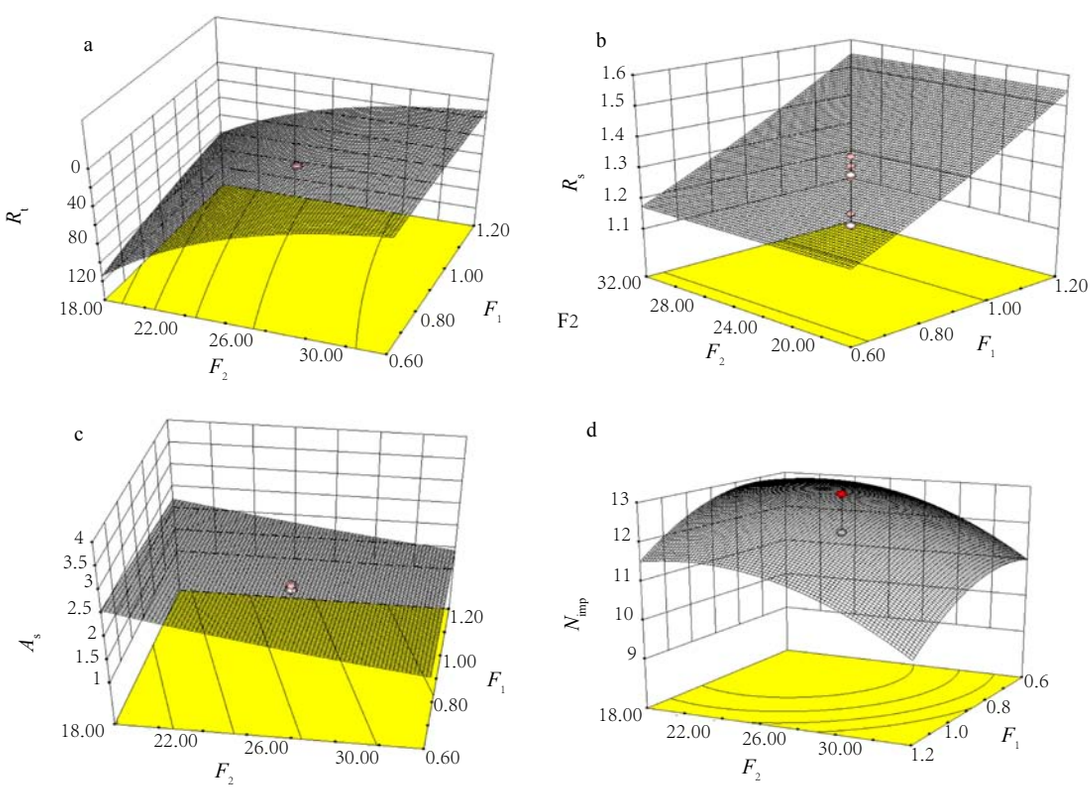


图 4　F_1(乙腈和甲醇的体积比) 和 F_2(有机相比例) 对各优化目标的响应面

Fig. 4　The response surfaces of different optimization targets from F_1 and F_2

互作用显著；即流动相中乙腈 / 甲醇的比例是影响色谱分离的最关键因素。

2.2.4　确定最优色谱条件

利用满意度函数法求解青霉素杂质分析方法的最优色谱条件，共得到 38 个解 (结果略)，满意度响应面见图 5。对 38 个解进行筛选，确定最优值为乙腈 / 甲醇体积比为 1.0，有机相比例为 25.6%，柱温为 30.3℃，流速为 0.95mL/min。

采用优化的色谱条件分析青霉素混合降解溶液 (图 6)，与图 2a 比较，可见分离效果明显提高。

色谱条件：色谱柱，Capcell Pak C_{18} MGII；流动相为磷酸盐缓冲液：有机相 (*V*/*V*)(乙腈 : 甲醇 =1:1)=75:25；柱温：30℃；流速：1.0mL/min。

2.2.5　建立梯度方法

在色谱图 (图 6) 中，青霉素主峰前至 14min 仅有少数色谱峰，主峰的对称性 (A_s=2.07) 也不十分理想，因此，希望保持对 14min 前杂质的分离能力不变，利用梯度洗脱，通过增加流动相中乙腈的比例，改善主峰的拖尾并缩短分析时间。

以磷酸盐缓冲液：有机相 (*V*/*V*)(乙腈 : 甲醇 =1:1)=74:25 为流动相 A，乙腈为流动相 B；0~12min 为等度洗脱 (至青霉素脱羧噻唑酸被洗脱)；12~22mim 为梯度洗脱 1，流动相 B 在流动相中的比例逐渐增加至 10%，并等度维持至主峰被洗脱 (约 4min)；再启动梯度洗脱 2，流动相 B 在流动相中

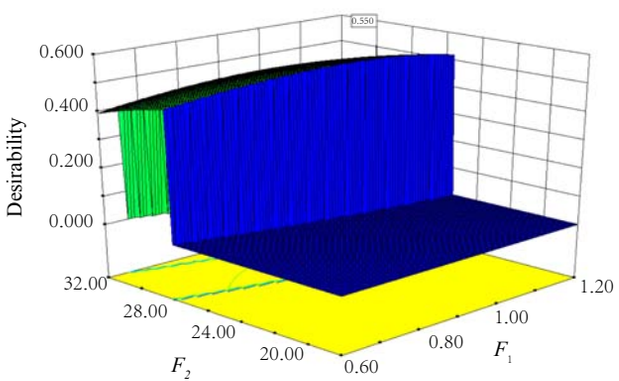


图 5　青霉素杂质分析色谱条件的满意度响应面

Fig. 5　The response surface of desirability of penicillin impurity analysis

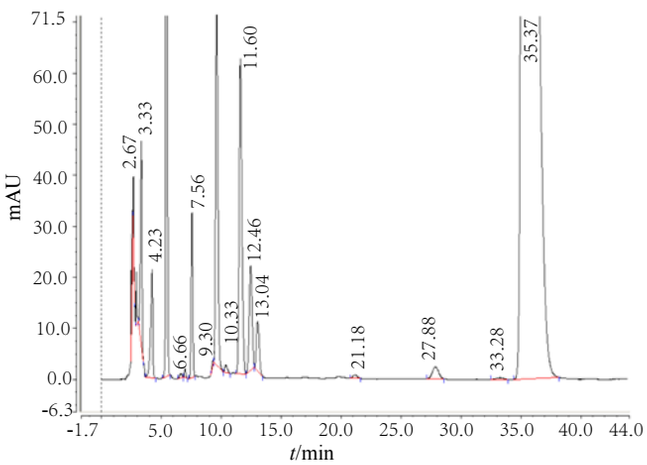
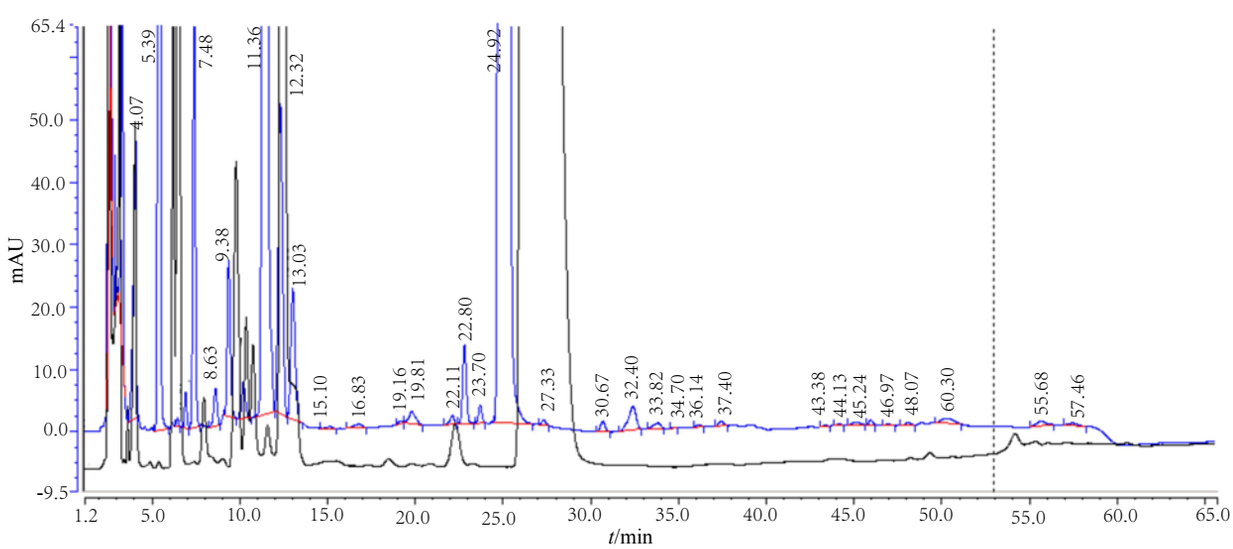


图 6　CCD 优化色谱条件下的青霉素混合降解溶液色谱图

Fig. 6　The chromatogram of penicillin mixed degradation solution under the chromatographic system after the CCD optimization



蓝图为优化后的梯度方法，黑图为中国药典方法

图 7　青霉素混合降解溶液色谱图

Fig. 7　The chromatogram of penicillin mixed degradation solution

的比例由 15min 内逐渐再增加至 22%，并等度维持 4min；平衡色谱柱。比较新方法与中国药典 2010 方法对青霉素混合降解溶液的分析结果 (图 7)，可见，青霉素主峰提前至约 12min、拖尾明显改善 ($A_s \leqslant 1.5$)，且新方法可分离出 40 个杂质明显多于 ChP2010 方法的 28 个，杂质峰在色谱图中的分布更均匀，分析时间缩短。青霉素混合降解溶液色谱峰在新方法中的归属见表 5。

2.2.6　UPLC/UHPLC 方法的建立

为进一步提高分析效率，将上述优化后得到的 HPLC 青霉素杂质分析方法转化成 UPLC 及 UHPLC 分离方法。

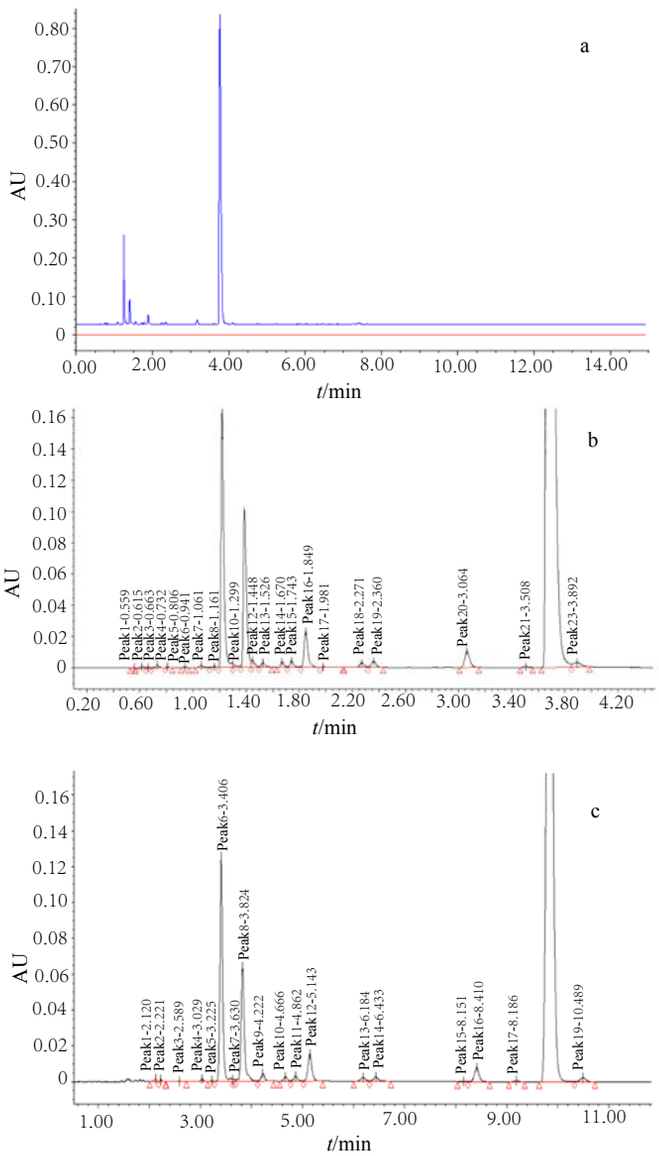
在 ACQUITY UPLC H-Class(亚二微米色谱柱) 色谱系统，通过对 5 根 UPLC 色谱柱的筛选，发现采用 Cortecs C_{18}(2.1mm×100mm，1.6μm) 色谱柱与原 HPLC 色谱系统的分离效果 (出峰顺序和个数) 最接近 (图 8b)。但分析时间从原方法的 62.7min 缩短至 15min，溶剂消耗量约减少 92%。连续 6 针进样青霉素混合降解溶液，青霉素峰保留时间的 RSD 为 0.11%，峰面积的 RSD 为 0.04%，色谱峰 10 的峰面积误差最大 (RSD 为 1.47%)；即 UPLC 方法重现性良好。

在 ACQUITY UHPLC Arc 色谱系统中，选择与 UPLC 色谱柱填料相同的 Cortecs C_{18}(4.6mm×100mm，2.7μm) 色谱柱进行试验，可得到与 UPLC 方法相似的色谱图 (图 8c)；但分析时间从 HPLC 方法的 62.7min 缩短至 45min，溶剂消耗量约减少 43%。连续 6 针进样青霉素混合降解溶液，青霉素峰保留时间的 RSD 为 0.06%，峰面积的 RSD 为 0.36%，色谱峰 8 的峰面积误差最大 (RSD 为 2.09%)；即 UHPLC 方法的重现性良好。

3　结论

采用甲醇 - 乙腈 - 缓冲盐三元流动相，利用 CCD 对流动相中甲醇和乙腈的比例等色谱参数进行优化，可明显改善甲醇 - 缓冲盐二元流动相色谱系统对青霉素降解杂质的分析效果；优化后的色谱系统，不仅可以分离出更多的降解杂质，且明显改善了青霉素峰的拖尾，缩短了分析时间。该方法在中国药典 2015 版已被收载。

利用软件对 HPLC 方法的流速、进样体积和梯度时间进行几何缩放，选择适宜的色谱柱，将新建立的 HPLC 方法成功地转换为 UPLC 方法和 UHPLC 方法，转换后的方法与原方法的分离效果、色谱峰出峰顺序相似，但分析时间大大缩短。



a：UPLC 色谱图，色谱柱：Cortecs C_{18}(2.1mm×100mm，1.6μm)；b：图 a 局部放大图；c：UHPLC 色谱图局部放大图，色谱柱：Cortecs C_{18}(4.6mm×100mm，2.7μm)

图 8　UPLC/UHPLC 方法分析青霉素混合降解溶液色谱图

Fig. 8　The chromatograms of penicillin mixed degradation solution of UPLC/UHPLC methods

参考文献

[1] 胡昌勤 , 张夏 . 化学药品杂质谱控制的现状与展望 [J/OL]. 药学学报 , 1-41[2019-12-01].http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20190920.1320.002.html.

[2] 崇小萌 , 李进 , 王琰 , 等 . 阿莫西林克拉维酸钾片剂的关键质量属性与控制 [J]. 药学学报 , 2016, 51 (7): 1121-1124.

[3] 崇小萌 , 王立新 , 王晨 , 等 . 头孢拉定颗粒有关物质分析

及关键质量控制 [J]. 中国新药杂志 , 2018, 27(22): 74-82.

[4] Deidda R, Orlandini S, Hubert P, *et al*. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 161: 110-121.

[5] Sahu P K, Ramisetti N R, Cecchi T, *et al*. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 590-611.

[6] Singh S, Handa T, Narayanam M, *et al*. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 69: 148-173.

[7] Hou J P, Poole J W. β-lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure[J]. *J Pharm Sci*, 1971, 60(4): 503-532.

[8] Deshpande A D, Baheti K G, Chatterjee N R. Degradation of beta-lactam antibiotics[J]. *Curr Sci*, 2004, 87(12): 1684-1695.

[9] Raj T J, Bharati C H, Rao K R, *et al*. Identification and characterization of degradation products of dicloxacillin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4): 1470-1475.

[10] Europeon Pharmacopeia 9.0[S]. Strasbourg: European directorate for the quality of medicines, 2019.

[11] The United States Pharmacopeia 41ed[S]. Roehville MD: the United States Pharmacopeial Convention Inc, 2018.

[12] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 [S]. (2010 年版二部). 北京 : 中国医药科技出版社 , 2010.

[13] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 [S]. (2015 年版二部). 北京 : 化学工业出版社 , 2015.

[14] Zhang W Q, Hu Q X, Zhang X, *et al*. The selection of suitable columns for a reversed-phase liquid chromatographic separation of beta-lactam antibiotics and related substances via chromatographic column parameters[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1323(1): 87-96.