

注射用头孢唑肟钠中有关物质的 HPLC 法测定

郭艳娟, 杨 倩, 曹晓云

天津市药品检验所, 天津 300070

摘 要: 目的 建立测定注射用头孢唑肟钠中有关物质的 HPLC 法。方法 采用 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 - pH 3.6 缓冲液 (取枸橼酸 1.42 g、磷酸氢二钠 2.31 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL) 为流动相, 进行梯度洗脱; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 体积流量: 0.8 mL/min; 进样量 20 μL。结果 头孢唑肟在 0.24~14.52 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=1.000\ 0$), 最低检出质量浓度 0.03 μg/mL。结论 采用的 HPLC 方法简单、专属性强, 可有效控制注射用头孢唑肟钠产品的质量。

关键词: 注射用头孢唑肟钠; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.11 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)08-0872-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.08.010

Determination of related substances in Ceftizoxime Sodium for injection by HPLC

GUO Yan-juan, YANG Qian, CAO Xiao-yun

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin300070, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of related substances in Ceftizoxime Sodium for injection by HPLC.

Methods The determination was carried out on Agilent Eclipse C₁₈ column (250 mm × 4.6mm, 5 μm) with the mobile phase containing acetonitrile-buffer solution (pH 3.6) (dissolve citric acid monohydrate 1.42 g and disodium hydrogen phosphate dodecahydrate 2.31 g in water and diluted to 1 000 mL) with gradient elution. The detective wavelength was set at 254 nm. The temperature of column was set 40 °C. The flow rate was 0.8 mL/min with injection volume of 20 μL. **Results** The linearity range of ceftizoxime sodium was 0.24 — 14.52 μg/mL ($r=1.000\ 0$), and LOD was 0.03 μg/mL. **Conclusion** The method is simple and selective to be used for the quality control of Ceftizoxime Sodium for injection products effectively.

Key words: Ceftizoxime Sodium for injection; related substance; HPLC

头孢唑肟钠是第 3 代头孢菌素, 具广谱抗菌作用, 该药通过抑制细菌壁粘肽的生物合成达到杀菌作用, 用于治疗多种对其敏感的感染性疾病, 如败血症、肺炎等, 有较高疗效, 不良反应发生率较低, 但是本品口服无效^[1]。注射用头孢唑肟钠为头孢唑肟钠无菌原料直接分装制得。《中国药典》2010 年版收载头孢唑肟钠原料及制剂。各国药典关于头孢唑肟钠中有关物质检查均采用 HPLC 法, C₁₈ 色谱柱, 枸橼酸的磷酸盐缓冲液 (pH 3.6) - 乙腈 (90:10) 为流动相。有文献报道显示^[2]采用枸橼酸的磷酸盐缓冲液 (pH 3.6) - 乙腈 (95:5) 为流动相, 由于有机相比比例较低, 等度洗脱很难在短时间内将

极性小的杂质出色谱柱。本实验建立了灵敏度更高、分离效能更好的 HPLC 梯度洗脱法测定注射用头孢唑肟钠中有关物质, 检出杂质的个数和总量均多于现行法定标准及其他文献报道^[3]的梯度洗脱方法, 较各国药典及现有报道文献采用的方法更能真实地反映供试品中有关物质的情况。

1 仪器与试药

Waters e2695 HPLC 液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 岛津 LC-20AD 液相色谱仪, Mettler Toledo XS 205 型电子分析天平 (瑞士梅特勒公司)。

注射用头孢唑肟钠, 规格分别为 0.5 g、1.0 g, 共 10 批, 国内抽样样品, 涉及 10 家生产企业。头

收稿日期: 2014-04-23

作者简介: 郭艳娟 (1977—), 女, 主管药师, 一直从事抗生素的检验科研及标准起草等工作。

Tel: (022) 23374075 E-mail: tjguoyanjuan@126.com

孢唑肟钠对照品由中国食品药品检定研究院提供，批号 130504-200702，质量分数为 98.2%。枸橼酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾均为分析纯，乙腈为色谱纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

在各国药典中，头孢唑肟钠中有关物质检查的枸橼酸的磷酸盐缓冲液 - 乙腈 (90 : 10) 等度洗脱中，由于有机相比例较低，等度洗脱很难在短时间内将极性小的杂质冲出色谱柱，采用梯度洗脱方式提高了有机相比例，经试验比较确定了梯度洗脱程序。在此条件下，检出杂质的个数和总量均较现行法定标准多，见图 1。

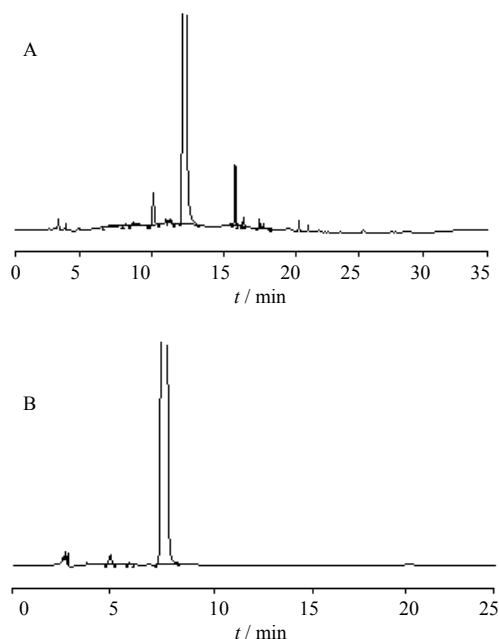


图 1 梯度 (A) 和等度 (B) 洗脱色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of test by gradient elution (A) and isocratic elution (B)

采用 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 - pH 3.6 缓冲液 (取枸橼酸 1.42 g、磷酸氢二钠 2.31 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL) 为流动相，梯度洗脱，见表 1; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 体积流量: 0.8 mL/min; 进样量 20 μL。

2.2 溶液的配制

取注射用头孢唑肟钠适量，精密称定，加 pH 7.0 磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 3.63 g、磷酸氢二钠 14.33 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL) 溶解并稀释

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

t / min	乙腈/%	pH 3.6 缓冲液/%
0	3	97
10	15	85
20	60	40
25	60	40
26	3	97
35	3	97

制成含头孢唑肟 1.5 mg/mL 的溶液，作为供试品溶液。

精密量取供试品溶液适量，用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液定量稀释制成含头孢唑肟 3 μg/mL 的溶液，作为 0.2% 自身对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取注射用头孢唑肟钠 15 mg，置 10 mL 量瓶中，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，放置 0.5 h，用溶剂稀释至刻度，摇匀，取 20 μL 注入高效液相色谱仪，记录色谱图，结果头孢唑肟峰的保留时间约为 12 min，各杂质峰之间以及主峰与各杂质峰之间的分离度均符合要求 (图 2)。

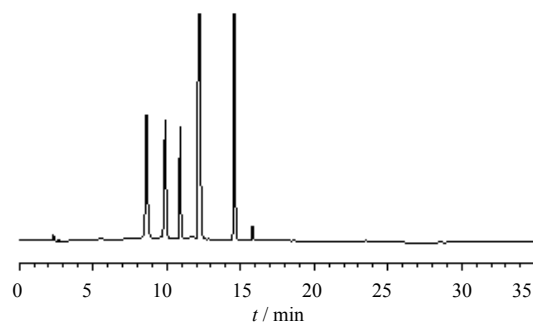


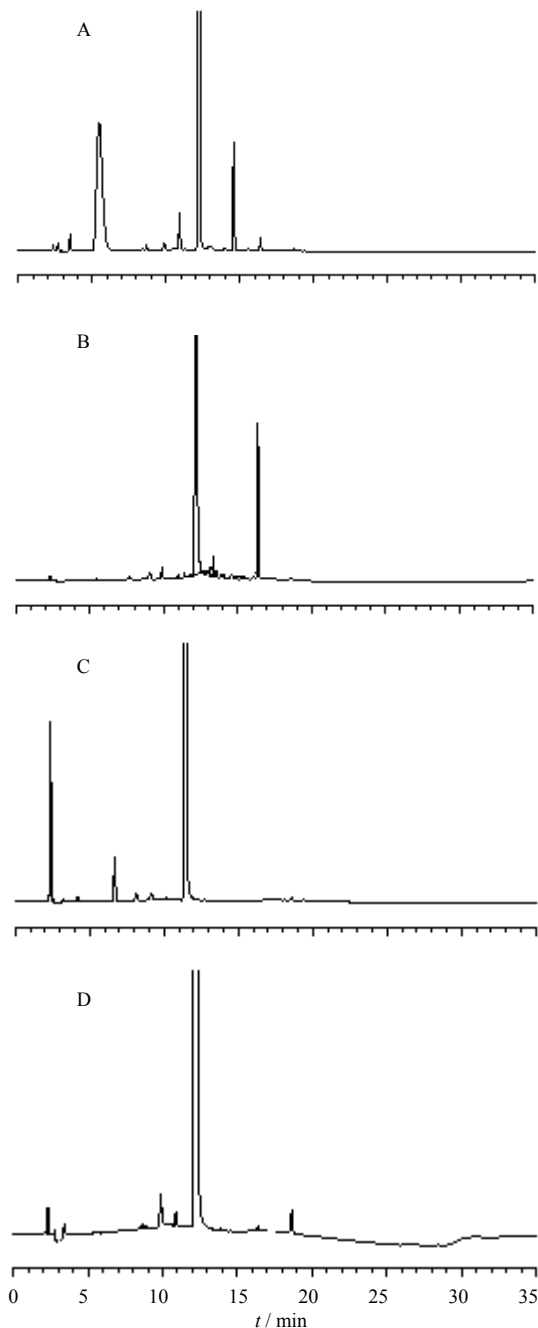
图 2 系统适用性试验色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of systematic applicability

2.4 专属性试验

取注射用头孢唑肟钠 15 mg，置 10 mL 量瓶中，用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，置 85 °C 水浴加热 15 min，放置至室温，即得。取注射用头孢唑肟钠 15 mg，置 10 mL 量瓶中，用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，摇匀，置 254 nm 紫外灯下光照 1 h，即得。取注射用头孢唑肟钠 15 mg，置 10 mL 量瓶中，加 1% 过氧化氢溶液 1 mL，室温放置 1 min 后，用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，摇匀，即

得。取注射用头孢唑肟钠 15 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 室温放置 1 h 后, 用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 即得。取经加热、光照、氧化和酸破坏后样品进样测定, 结果见图 3。杂质峰之间、杂质与主峰之间均能良好分离, 方法专属性好。



A-加热破坏 B-光照破坏 C-氧化破坏 D-酸破坏
A-destroyed by heat B-destroyed by UV radiation C-destroyed by oxidation D-destroyed by acid

图 3 专属性试验色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of specificity test

2.5 线性关系考察

取头孢唑肟对照品适量, 置量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 再分别精密量取适量用溶剂定量稀释制成 0.24、0.48、0.96、2.42、4.84、14.52 $\mu\text{g/mL}$ 系列溶液, 摇匀, 进样测定。结果表明, 头孢唑肟在 0.24~14.52 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=46\,781X+668.42$, $r=1.000\,0$ 。

2.6 最低检出限

精密量取头孢唑肟对照品溶液适量, 用溶剂稀释至一定质量浓度, 以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 计算得头孢唑肟最低检出质量浓度为 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 最低检出限为 0.006%。

2.7 重复性试验

取批号 130712 注射用头孢唑肟钠样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样分析, 计算得最大单一杂质峰面积的 RSD 值为 1.7%, 总杂质峰面积的 RSD 值为 1.4%。

2.8 稳定性试验

取批号 130712 注射用头孢唑肟钠样品, 配制供试品溶液, 分别于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置一段时间后进样测定, 结果供试品溶液中最大单一杂质质量分数的 RSD 值为 3.8%, 总杂质质量分数的 RSD 值为 4.1%。随着放置时间的延长, 杂质质量分数略有增加, 因此供试品溶液配制后应于低温保存并尽快分析。

2.9 耐用性试验

分别采用 Agilent Eclipse C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 和 Unitary C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 测定, 结果批号 130712 注射用头孢唑肟钠样品中有关物质基本一致, 表明本方法耐用性良好。

2.10 测定结果

依据《中国药典》2010 年版二部及各批样品的测定结果, 限度定为: 单个杂质不得大于 0.5%, 各杂质总和不得大于 1.0%。选择国内 10 个厂家生产的各 1 批注射用头孢唑肟钠样品进行有关物质检查, 样品的原料分别来源于不同的企业, 测定结果均符合规定, 见表 2。

3 讨论

文献报道头孢菌素在贮藏过程中在 6,7 位碳上可发生差向异构化, 生成 6*R*,7*S*-异构体而失去抗菌活性, 该反应在碱性条件下更易发生^[4]; 研究表明^[5], 具有顺式甲氧亚氨基或类似结构的第 3,4 代头孢菌素对紫外光敏感, 254 nm 紫外光照射时, 光降解产

表 2 不同来源注射用头孢唑肟钠中有关物质的测定结果
Table 2 Determination of related substances in Cefprozime Sodium for injection samples from different manufactories

批 号	规格	标示量/%	单一最大杂质/%	总杂质/%
130712	1.0 g	95.4	0.24	0.57
11230801	1.0 g	97.8	0.22	0.55
130408	1.0 g	94.8	0.27	0.70
20130901	1.0 g	100.4	0.13	0.28
20130701	1.0 g	100.1	0.21	0.45
1306209	0.5 g	97.9	0.17	0.52
130303	1.0 g	98.2	0.10	0.25
130309	0.5 g	97.1	0.21	0.60
130505	0.5 g	96.4	0.26	0.65
410121001	0.5 g	97.1	0.26	0.62

物主要是反式异构体,在碱性条件下 C₇ 位侧链甲氧亚胺键也可发生顺反异构现象^[6],而反式异构体的抗菌活性明显降低。注射用头孢唑肟钠中杂质在原

料药生产、无菌分装、贮藏运输过程中均可产生,因此,应注意头孢唑肟酸成盐过程中 pH 值的控制、样品干燥的温度并严格按照药典规定的条件贮藏运输。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典. 临床用药须知 [S]. 化学药品和生物制品卷. 2010: 670-672.
- [2] 于华生. HPLC 法测定注射用头孢唑肟钠的含量和有关物质 [J]. 中国药事, 2008, 22(4): 335-337.
- [3] 林 玲. 梯度洗脱 HPLC 法测定头孢唑肟钠的有关物质 [J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(6): 341-343.
- [4] 胡 敏, 胡昌勤, 刘文英. LC/MS 鉴定头孢菌素降解物结构[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 369-373.
- [5] Okamoto Y, Kiriya K, Namiki Y, *et al.* Degradation Kinetics and isomerization of cefdinir, a new oral cephalosporin, in aqueous solution [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(9): 976-983.
- [6] 蒋 煜, 张哲峰, 王 虹. β -内酰胺类抗生素异构体杂质研究和质控进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(8): 561-566.