

注射用头孢噻肟钠有关物质测定法中色谱参数转化的探讨

李 婕¹, 陈丽莉², 徐子航², 徐永威³, 曹媛媛³, 黄海伟^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102269

2. 上海上药新亚药业有限公司, 上海 201209

3. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201206

摘要: 目的 将《中国药典》项下注射用头孢噻肟钠有关物质测定法的色谱参数进行转化, 缩短液相分析时间, 提高检测效率。方法 采用 Waters Xselect HSS T3 C₁₈柱(100 mm×3 mm, 2.5 μm)色谱柱, 流动相 A 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.25)-甲醇(86:14), 流动相 B 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.25)-甲醇(60:40), 先以流动相 A-流动相 B(95:5)等度洗脱, 待头孢噻肟钠洗脱完毕后, 立即进行线性梯度洗脱(0~0.7 min 95%→75% A, 0.7~2.7 min 75% A, 2.7~7.8 min 75%→0 A, 7.8~9.5 min 100% B, 9.5~11.2 min 0→95% A, 11.2~14.6 min 95% A), 体积流量为 0.5 mL·min⁻¹, 进样体积为 2 μL, 检测波长为 235 nm。结果 色谱参数转化后运行时间从 80 min 缩短至 26 min, 方法专属性、稳定性、色谱柱耐用性均良好。结论 色谱参数转化后的方法专属、节能环保, 可用于注射用头孢噻肟钠的有关物质检测。

关键词: 注射用头孢噻肟钠; 有关物质; 高效液相色谱; 色谱参数; 转化

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)07-1350-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.016

Discussion on transformation of chromatographic parameters in determination of related substances of Cefotaxime Sodium for Injection

LI Jie¹, CHEN Lili², XU Zihang², XU Yongwei³, CAO Yuanyuan³, HUANG Haiwei¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102269, China

2. Shanghai Xinya Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201209, China

3. Waters Technology (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201206, China

Abstract: Objective Transformation of chromatographic parameters in determination of related substances of Cefotaxime Sodium for Injection in Chinese Pharmacopoeia to shorten the analysis time and improve the efficiency. **Methods** Waters Xselect HSS T3 C₁₈ (100 mm × 3 mm, 2.5 μm) was adopted with 0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.25) -methanol (86 : 14) as mobile phase A, 0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.25) -methanol (60 : 40) as mobile phase B. The mobile phase A and B (95 : 5) were used for constant elution. After the elution of cefotaxime sodium, linear gradient elution was performed immediately (0—0.7 min 95%→75% A, 0.7—2.7 min 75% A, 2.7—7.8 min 75%→0 A, 7.8—9.5 min 100% B, 9.5—11.2 min 0 A→95% A, 11.2—14.6 min 95% A), the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, the injection volume was 2 μL, and the detection wavelength was 235 nm. **Results** After the conversion of chromatographic parameters, the running time was reduced from 80 min to 26 min, and the specificity, stability and durability of chromatographic column were good. **Conclusion** The method after the transformation of chromatographic parameters is rapid, exclusive, energy saving and environmental protection. It can be used for the determination of related substances of Cefotaxime Sodium for Injection.

Key words: Cefotaxime Sodium for Injection; related substances; HPLC; chromatographic parameters; transformation

注射用头孢噻肟钠为第3代半合成的头孢菌素类抗生素,对革兰阴性菌有强大的抗菌活性,对大肠杆菌、流感杆菌、肺炎杆菌、奇异变形杆菌、沙门

菌属的抗菌作用也较强,临床应用广泛^[1-3]。《中国药典》采用高效液相色谱(HPLC)法测定头孢噻肟钠的有关物质,等度加梯度洗脱模式,测定时

收稿日期: 2022-01-21

第一作者: 李 婕, 副主任药师, 研究方向为化学药物质量控制。Tel: (010)53851577 E-mail: lijie@nifdc.org.cn

*通信作者: 黄海伟, 副主任药师, 研究方向为化学药物质量控制。Tel: (010)53851607 E-mail: huanghw@nifdc.org.cn

间约 80 min^[4]。注射用头孢噻肟钠在《美国药典》^[5]也有收载,有关物质测定方法与《中国药典》基本一致。有文献报道注射用头孢噻肟钠有关物质的 HPLC 测定方法,但测定时间也很长^[6-7]。由于头孢噻肟钠较不稳定^[8],有关物质检测过程中需要临用新制。如果能够缩短液相分析时间,将能显著提高工作效率,节省人力物力。

《中国药典》2020 版四部通则[0512 高效液相色谱法]首次对色谱参数转化提出了具体的指导细则。通则指出:“品种正文项下规定的色谱条件(参数),除填充剂种类、流动相组分、检测器类型不得改变外,其余如色谱柱内径与长度、填充剂粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等均可适当调整”。此外,通则还规定了色谱参数允许调整范围及转化公式。药典中这些新的规定,为检验工作中色谱参数的转化提供了依据^[9]。

本研究以注射用头孢噻肟钠为例,成功将《中国药典》项下注射用头孢噻肟钠有关物质检测的 HPLC 法中的色谱参数进行转化,采用了较小颗粒填料色谱柱,头孢噻肟峰与各杂质峰分离良好,缩短了 2/3 的分析时间,提高了检测效率,同时大大减少了溶剂消耗,节能环保。本实验不仅提出了色谱参数转化的具体过程、方法评价过程,还解决了较小颗粒填料色谱柱方法耐用性较差的问题,可为其他药品标准方法中色谱参数的转化调整提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters Arc 液相色谱仪,SHISEIDO Capcell MG II C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Waters Xselect HSS T3 C₁₈ 柱(100 mm×3 mm, 2.5 μm); Mettler Toledo XP205 电子天平;昆山禾创 KH-500 型超声波;Milli-Q 超纯水机。

1.2 主要试剂

注射用头孢噻肟钠(批号 P4201907004W, 上海药新亚药业有限公司, 1.0 g); 头孢噻肟对照品(批号 130483-201505, 质量分数 92.2%, 中国食品药品检定研究院); 头孢噻肟系统适用性对照品(批号 130619-201803, 中国食品药品检定研究院); 磷酸氢二钠、磷酸(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯), 赛默飞世尔科技公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液 取头孢噻肟对照品适量,精密称定,加流动相 A 溶解并定量稀释制成 10 μg·mL⁻¹

的溶液,即得。

2.1.2 系统适用性溶液 取头孢噻肟系统适用性对照品适量,精密称定,加流动相 A 溶解并定量稀释制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液(临用新制) 取本品适量,精密称定,加流动相 A 溶解并定量稀释制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。

2.1.4 磷酸盐缓冲液 取 7.1 g 无水磷酸氢二钠至 1 000 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,用磷酸调节 pH 值至 6.25。

2.2 运行原液相色谱方法

按照《中国药典》2020 年版二部中头孢噻肟钠项下有关物质的规定,采用 Capcell MG II C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相 A 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.25)-甲醇(86:14),流动相 B 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.25)-甲醇(60:40),先以流动相 A-流动相 B(95:5) 等度洗脱,待头孢噻肟钠洗脱完毕后,立即进行线性梯度洗脱(表 1);体积流量为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 235 nm;进样体积 10 μL。

表 1 线性梯度洗脱程序(中国药典)

Table 1 Linear gradient elution program (Chinese Pharmacopoeia)

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95.0	5.0
2.0	75.0	25.0
8.0	75.0	25.0
23.0	0.0	100.0
28.0	0.0	100.0
33.0	95.0	5.0
43.0	95.0	5.0

2.3 将原 HPLC 方法进行色谱参数转化

2.3.1 色谱柱的转化 准确选择填料性能相当的色谱柱,才能维持原分离方法的选择性。参照《中国药典》2020 年版中的要求,转化后色谱柱的 L/dp 值(或 N 值)应在原有数值的 -25%~+50% 内。原方法色谱柱采用 Capcell MGII C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),新方法尝试选择 Waters Xselect HSS T3 C₁₈ 柱(100 mm×3 mm, 2.5 μm), L/dp 的变化率为 -20%,满足《中国药典》规定的要求,具体计算过程如下:

$$\text{原色谱柱: } L_1/dp_1 = 250 \text{ mm}/5 \text{ } \mu\text{m} = 50 \text{ } 000$$

$$\text{转化后色谱柱: } L_2/dp_2 = 100 \text{ mm}/2.5 \text{ } \mu\text{m} = 40 \text{ } 000$$

转化前后色谱柱 L/dp 的变化率: $(40\ 000 - 50\ 000) / 50\ 000 = -20\%$

L_1 : 原方法中色谱柱柱长; L_2 : 转化后新方法中色谱柱柱长; dp_1 : 原方法中色谱柱的粒径; dp_2 : 转化后新方法中色谱柱的粒径

2.3.2 体流量的转化 参考体流量转化公式, 代入相关已知参数, 可计算出转化后新方法的体流量, 在此基础上可根据实际使用时系统压力和保留时间调整, 但应在 $\pm 50\%$ 的范围内, 具体计算过程如下:

$$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)] = 1.0 \times [(3^2 \times 5.0) / (4.6^2 \times 2.5)] = 0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$$

F_1 : 原方法中的体流量; F_2 : 转化后新方法中的体流量; dc_1 : 原方法中色谱柱的内径; dc_2 : 转化后新方法中色谱柱的内径

为调节仪器系统压力, F_2 最终调整至 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 并以此带入梯度转化公式。

2.3.3 进样体积的转化 参考进样体积转化公式, 带入相关已知参数, 可计算出转化后的进样体积, 并根据灵敏度的需求进行调整, 具体计算过程如下:

$$V_2 = V_1 \times (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2) = 10 \times (100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2) = 2 \mu\text{L}$$

V_1 : 原方法中的进样体积; V_2 : 转化后新方法中的进样体积

2.3.4 梯度洗脱时间的转化 参考梯度转化公式, 代入相关已知参数, 可计算出转化后的梯度。可适当调整流动相组分比例, 以保证系统适用性符合要求, 并且最终流动相洗脱强度不得弱于原梯度的洗脱强度。以下计算公式中的右下角标为对应 HPLC 方法不同时间段的标记。

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$$

$$t_{G2-1} = 2 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 0.7 \text{ min}$$

$$t_{G2-2} = 8 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 2.7 \text{ min}$$

$$t_{G2-3} = 23 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 7.8 \text{ min}$$

$$t_{G2-4} = 28 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 9.5 \text{ min}$$

$$t_{G2-5} = 33 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 11.2 \text{ min}$$

$$t_{G2-6} = 43 \times (1.0 / 0.5) \times [(100 \times 3^2) / (250 \times 4.6^2)] = 14.6 \text{ min}$$

t_{G1} : 原方法中梯度段的洗脱时间; t_{G2} : 转化后新方法中梯度段的洗脱时间

2.4 运行色谱参数转化后的液相色谱方法

按照药典中的规定进行色谱参数转化后, 可以得到新方法的色谱条件如下: 采用 Waters Xselect HSS T3 C_{18} 柱 ($100 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$) 色谱柱; 流动相组成和检测波长与《中国药典》2020 年版二部中头孢噻肟钠项下有关物质的规定一致, 线性梯度洗脱见表 2, 体流量为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积

为 $2 \mu\text{L}$ 。试验结果表明, 色谱参数转化后运行时间从 80 min 缩短至 26 min (图 1)。色谱参数转化的整个过程略显繁琐, 也可通过相关软件计算附表中体流量、进样体积和梯度洗脱程序的调整范围, 并根据色谱峰分离情况进行微调。

表 2 线性梯度洗脱程序 (方法转化后)

Table 2 Linear gradient elution program (after method transformation)

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	95.0	5.0
0.7	75.0	25.0
2.7	75.0	25.0
7.8	0.0	100.0
9.5	0.0	100.0
11.2	95.0	5.0
14.6	95.0	5.0

2.5 色谱参数转化后的方法评价

2.5.1 专属性 系统适用性试验表明, 色谱参数转化前后的分析方法色谱图中, 头孢噻肟和 4 个主要杂质^[4] 的分离度、相对保留时间、拖尾因子、含量等分析结果基本一致, 说明转化前后的分析方法具有等效的分离结果 (图 1、表 3)。

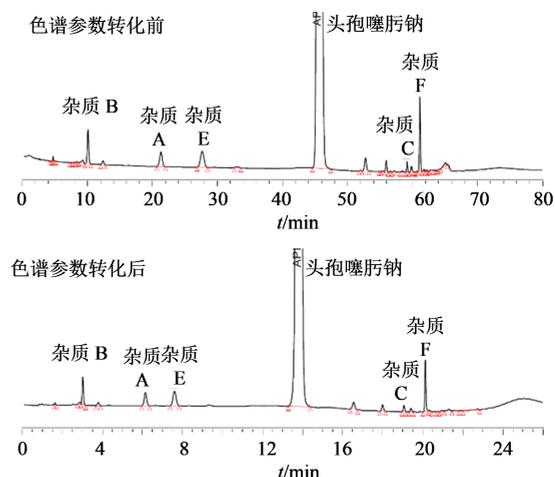


图 1 头孢噻肟钠系统适用性试验色谱图

Fig. 1 Chromatogram of cefotaxime sodium system suitability test

2.5.2 稳定性 取供试品溶液, 连续进样 24 次, 考察在整个分析时间内头孢噻肟钠中有关物质的变化, 见表 4。试验结果表明, 供试品溶液中的杂质 B 和杂质 F 水平随放置时间变长而增加, 供试品溶液应临用新制。

2.5.3 色谱柱耐用性 连续运行样品, 期间监控系

表3 色谱参数转化前后系统适应性试验结果比较
Table 3 Comparison of system suitability test results before and after chromatographic parameter transformation

化合物	相对保留时间		分离度		拖尾因子		杂质含量/%	
	原方	新方	原方	新方	原方	新方	原方	新方
	法	法	法	法	法	法	法	法
杂质B	0.22	0.22	1.77	1.28	1.02	1.14	0.52	0.47
杂质A	0.47	0.45	14.07	12.3	1.01	1.01	0.44	0.43
杂质E	0.61	0.56	7.22	5.94	1.02	1.02	0.60	0.58
头孢噻肟	1.00	1.00	13.11	20.96	1.95	1.27	96.58	96.98
杂质F	1.35	1.44	1.91	6.02	0.98	1.05	0.81	0.79

表4 供试品溶液稳定性考察的结果
Table 4 Results of stability investigation of test solution

进样次序	杂质B/%	杂质A/%	杂质E/%	杂质C/%	杂质F/%
1	0.075	0.076	0.045	0.016	0.132
2	0.077	0.075	0.046	0.016	0.133
3	0.079	0.075	0.046	0.015	0.134
4	0.081	0.076	0.045	0.014	0.134
5	0.083	0.076	0.047	0.018	0.135
6	0.085	0.077	0.045	0.015	0.136
7	0.088	0.076	0.045	0.017	0.137
8	0.090	0.075	0.045	0.015	0.137
9	0.092	0.076	0.045	0.015	0.138
10	0.094	0.075	0.045	0.016	0.140
11	0.096	0.074	0.046	0.017	0.140
12	0.098	0.075	0.045	0.015	0.139
13	0.100	0.074	0.046	0.014	0.142
14	0.102	0.075	0.042	0.015	0.142
15	0.104	0.075	0.046	0.014	0.142
16	0.106	0.074	0.045	0.014	0.144
17	0.108	0.074	0.045	0.015	0.145
18	0.110	0.075	0.046	0.017	0.144
19	0.112	0.074	0.045	0.015	0.146
20	0.114	0.073	0.045	0.014	0.146
21	0.116	0.074	0.044	0.015	0.147
22	0.119	0.071	0.044	0.016	0.149
23	0.120	0.072	0.044	0.014	0.148
24	0.123	0.071	0.044	0.016	0.149

统压力参数,在连续进样的100次时,系统压力与初始进样比较增加了1.38 MPa,考虑到该分析方法中有机相的最高比例仅为40%甲醇,因此在序列结束后进行色谱柱的较高比例甲醇清洗,清洗后继续序

列进样,发现压力恢复正常状态,系统压力45.02~44.13 MPa。

继续运行序列的过程中,当运行到235~320次期间,压力突然增加至48.26 MPa,并在这个序列进样期间压力持续增加到51.71 MPa。分析原因,可能是由于磷酸盐流动相体系在长时间放置过程中有盐析出或者有微量菌落产生,导致系统压力的突然并持续升高。待样品序列结束后,进行色谱柱的清洗,更换新配制的流动相体系,色谱柱压力恢复正常并运行稳定,此时压力较之前增加了1.03~1.72 MPa,色谱柱的整体耐用性良好。

3 讨论

3.1 应用亚2 μm 粒径色谱柱的色谱参数转化

尝试使用药典中的转化公式,将色谱参数转化为超高效液相色谱(UPLC)方法:采用Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,流动相组成和检测波长与《中国药典》2020年版二部中头孢噻肟钠项下有关物质的规定一致,线性梯度洗脱见表5,体积流量为0.6 mL·min⁻¹,进样体积为1 μL,运行时间可缩短至10 min内。由于注射用头孢噻肟钠有关物质检查用的供试品溶液需要临用新制,考虑到分析人员样品前处理时间,所以最终没有采用该方法。

表5 线性梯度洗脱程序(UPLC)

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0.0	95.0	5.0
0.3	75.0	25.0
1.2	75.0	25.0
3.3	0.0	100.0
4.0	0.0	100.0
4.8	95.0	5.0
6.2	95.0	5.0

3.2 色谱参数转化的注意事项

3.2.1 色谱柱品牌的选择 色谱柱涉及填料基质颗粒的类型、比表面积、孔径和键合相密度等多个参数,不同品牌或者同一品牌不同型号的色谱柱,采用的合成技术不同。这就会导致同为C₁₈色谱柱,选择性和保留能力却可能有明显的差异。因此,药典对色谱参数转化的要求中,选择等效的色谱柱成为首要条件,这也是转化的最大难点。一般需要进行色谱柱的筛选实验,以便选出一款符合方法要求的色谱柱。为提高工作效率,也可以借助比较成熟

的色谱柱筛选软件。

3.2.2 去除颗粒物质和其他污染物 当使用亚3 μm 粒径色谱柱时,不能使用0.45 μm 的滤膜滤过缓冲液,最好使用0.2 μm 的滤膜,否则会造成缓冲液中的固体颗粒物堵塞色谱柱的情况,从而导致色谱柱压力显著升高。

色谱柱耐用性试验表明,头孢噻肟钠有关物质采用低比例有机相的分析方法,适当在序列完成的间隔中加入高比例有机相的色谱柱冲洗方法,可以保证色谱柱避免样品残留而导致持续的柱压升高;另外,对于磷酸盐的缓冲液体系,建议在配制48 h 内使用,如果一次性配制过多,长时间室温放置,可能会有微量盐析出,导致色谱柱压力的显著升高。

4 结论

色谱参数转化在药品质控、药品研发等工作中均有应用,例如需要提高分析速度时、变更色谱柱时、色谱方法需要与质谱串联时等。《中国药典》2020版四部通则[0512 高效液相色谱法]首次对色谱参数转化提出了具体的指导细则,但目前文献中还鲜有应用实例报道。注射用头孢噻肟钠溶液稳定性较差,杂质谱清晰,是液相色谱研究的典型案例。本研究将《中国药典》项下注射用头孢噻肟钠有关物质检测的色谱参数进行转化,并成功通过方法评价,可为其他药品标准中色谱参数转化提供研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王春玲. 中国药典、欧洲药典和美国药典中头孢噻肟钠原料质量控制标准与方法的比较 [J]. 广东化工, 2013, 40(14): 72-73, 66.
Wang C L. Comparison of standards and methods for the quality control of cefotaxime sodium in Chinese pharmacopoeia, European pharmacopoeia and United

States pharmacopoeia [J]. Guangdong Chem Ind, 2013, 40(14): 72-73, 66.
[2] 朱建平, 高燕霞, 梁立革, 等. 关于头孢噻肟钠测定方法的商榷 [J]. 中国药事, 2005, 19(1): 40-41.
Zhu J P, Gao Y X, Liang L G, et al. Discussion on the determination method of cefotaxime sodium [J]. Chin Pharm Aff, 2005, 19(1): 40-41.
[3] 姚蕾, 王立新, 王红梅, 等. 229批国产注射用头孢噻肟钠的质量评价 [J]. 药品评价, 2012, 9(11): 22-27.
Yao L, Wang L X, Wang H M, et al. Quality assessment for 229 batches of domestic cefotaxime sodium injection samples [J]. Drug Eval, 2012, 9(11): 22-27.
[4] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 360-362.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020: 360-362.
[5] The United States Pharmacopoeia [S]. 43th Edition. Volume I. 2020.
[6] 表亚囡, 李敏, 张锁庆, 等. 注射用头孢噻肟钠杂质谱研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(10): 1027-1033.
Biao Y N, Li M, Zhang S Q, et al. Mass spectrometry study of the impurities profile of cefotaxime sodium for injection [J]. Chin J Antibiot, 2020, 45(10): 1027-1033.
[7] 赵霞, 胡昌勤. HPLC法测定注射用头孢噻肟钠的有关物质 [J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(12): 746-749, 752.
Zhao X, Hu C Q. An HPLC method for determination of related substances of cefotaxime sodium for injection [J]. Chin J Antibiot, 2008, 33(12): 746-749, 752.
[8] 刘宝树, 崔雪君, 张军立, 等. 头孢噻肟钠酸碱稳定性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(8): 680-685.
Liu B S, Cui X J, Zhang J L, et al. Study on the stability of cefotaxime sodium under acidic and basic conditions [J]. Chin J Antibiot, 2017, 42(8): 680-685.
[9] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 61-65.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020: 61-65.

[责任编辑 兰新新]