

HPLC 测定头孢西酮钠有关物质

周刚^{1,2,3}, 李娅萍², 王伟³, 张斗胜², 胡昌勤^{2*}, 杭太俊¹

(1. 中国药科大学药分教研室, 南京 210009; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;

3. 内蒙古自治区食品药品检验所, 呼和浩特 010011)

摘要 目的: 建立高效液相色谱梯度洗脱法测定头孢西酮钠有关物质。方法: 采用反相高效液相色谱法, 固定相为十八烷基键合硅胶, 以流动相为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵缓冲液(用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至 5.0) - 乙腈梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm。结果: 头孢西酮钠杂质分离良好, 检出限 0.015 μg·mL⁻¹, 精密度试验 RSD = 0.62%。结论: 该方法简便、快速, 重复性好, 可一次性测定头孢西酮钠中的有关物质。

关键词: 头孢类抗生素; 头孢西酮钠; 有关物质; 高效液相色谱; 梯度洗脱; 工艺降升; 破坏性试验; 杂质检测

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)11-2135-04

HPLC determination on related substances of cefazedone sodium

ZHOU Gang^{1,2,3}, LI Ya-ping², WANG Wei³, ZHANG Dou-sheng²,
HU Chang-qin^{2*}, HANG Tai-jun¹

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

3. Inner Mongolia Institute of Food and Drug Control, Huhhot 010011, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC gradient elution method for the determination on the related substances of cefazedone sodium. **Method:** RP-HPLC was adopted. The stationary phase was C₁₈. The mobile phase was 0.02 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate buffer (the pH value adjusted by 0.1 mol·L⁻¹ sodium hydroxide solution to pH 5.0) - acetonitrile. The HPLC gradient elution was used. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 278 nm. **Results:** The impurities of cefazedone sodium were isolated well. The LOD was 0.015 μg·mL⁻¹. The RSD was 0.62%. **Conclusion:** This method is convenient, quick and has good repeatability. This method can be adopted to detect the related substances of cefazedone sodium one at a time.

Key words: cephalosprins; cefazedone sodium; related substances; HPLC; gradient elution; process degradation; destructive test; impurities test

头孢西酮钠是第 1 代半合成头孢类抗生素, 最早由德国 Merck KGaA 公司研制^[1]。目前国内尚没有相关标准, 虽有文献报道^[2]采用反相高效液相色谱等度洗脱来测定头孢西酮钠含量和有关物质, 但没有对杂质进行系统的分离, 为更好地控制该品种质量, 本文采用反相高效液相色谱梯度洗脱测定头孢西酮钠的有关物质, 较等度洗脱方法对杂质具有更好的分离效果, 同时对其杂质进行归属。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 戴安高效液相分析系统 (P680 泵, ASI-100 自动进样器, 柱温箱, PDA-100

二极管阵列检测器), Chromelemon 6.6 色谱工作站。

电子天平: Precisa XS 4250c (瑞士 Precisa 公司) 和 Sartorius R200D (德国 Sartorius 公司)。Mettler Toledo MA 235 pH 计 (梅特勒公司)。

头孢西酮钠样品由中国食品药品检定研究院提供。磷酸二氢铵、氢氧化钠、盐酸均为分析纯, 水为双蒸水, 乙腈、甲醇为色谱纯。

2 溶液的制备

供试品溶液: 取本品适量, 精密称定, 用流动相溶解并稀释成 1.0 mg·mL⁻¹ 的溶液。

对照溶液: 精密量取供试品溶液适量, 用流动相

* 通讯作者 Tel: (010) 67095308; E-mail: hucq@niebp.org.cn

稀释成 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3 色谱条件

色谱柱 1: Dikma Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 色谱柱 2: Capcell PAK C_{18} MG II (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵缓冲液(用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 pH 至 5.0), 流动相 B 为乙腈, 线性梯度洗脱(见表 1); 柱温为 25°C ; 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 278 nm; 进样体积为 20 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 The program of gradient elution

时间(time) / min	流动相 A(mobile phase A) / %	流动相 B(mobile phase B) / %
0	90	10
3	90	10
33	60	40
38	60	40
43	90	10
55	90	10

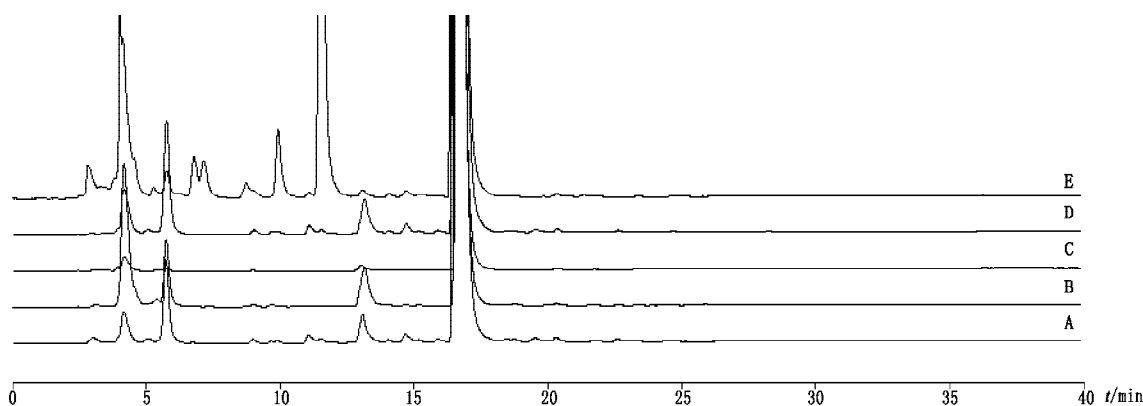


图 1 专属性试验图谱

Fig 1 Chromatograms of specificity tests

A. 碱破坏(destroyed by base) B. 热破坏(destroyed by high temperature) C. 紫外破坏(destroyed by UV light) D. 酸破坏(destroyed by acid)
E. 氧化破坏(destroyed by oxidation)

4.3 检测限和定量限 将供试品溶液稀释至 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,测得响应值约为噪音的 3 倍,故本品的检出限为 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将供试品溶液稀释至 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,测得的响应值约为噪音的 10 倍,故本品的定量限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.4 线性与范围 精密称取头孢西酮钠 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。

4 方法与结果

4.1 专属性试验

酸破坏: 取供试品溶液 10 mL,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸溶液 0.1 mL,放置 1 h,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 pH 至中性,按上述色谱条件测定。

碱破坏: 取供试品溶液 10 mL,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.1 mL,放置 1 h,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸溶液调 pH 至中性,按上述色谱条件测定。

氧化破坏: 取供试品溶液 10 mL,加入 30% 双氧水溶液 0.1 mL,放置 1 h,按上述色谱条件测定。

加热破坏: 取供试品溶液 10 mL,置 70°C 水浴加热 2 h,按上述色谱条件测定。

光照破坏: 取供试品粉末,放置在紫外灯(UV 254 nm) 下照射 2 d,精密称取粉末约 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加水稀释溶解并定容,摇匀,按上述色谱条件测定。

4.2 结果 各破坏条件中降解物与主峰分离良好,见图 1。

再精密量取 1, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 25 mL, 分别置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。分别取上述溶液 20 μL 进样记录色谱图,计算峰面积对浓度的一元回归方程。结果表明: 其回归方程为:

$$Y = 0.9531X + 0.0164 \quad r = 0.9999$$

头孢西酮钠在浓度为 $1 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内线性良好。

4.5 精密度试验 取对照溶液,精密量取 20 μ L,连续进样 6 次,峰面积 RSD 为 0.62%。

4.6 耐用性试验 分别用色谱柱 1 和 2 来测定 3 批供试品的有关物质,结果发现杂质数目、出峰顺序、分离效果和峰面积无明显变化。

4.7 有关物质测定结果 按照测定方法分别对 3 批样品进行有关物质测定,3 批样品的总杂质含量均在 1.0% 之内,单个最大杂质含量均在 0.5% 之内,见图 2。

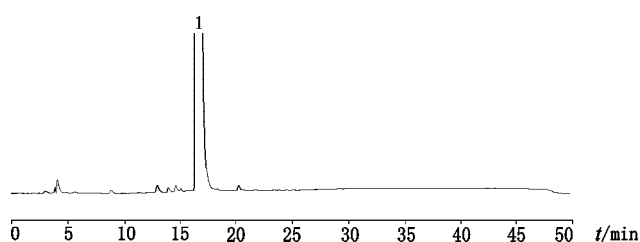


图 2 头孢西酮钠有关物质测定的典型色谱图

Fig 2 Chromatogram of analysis of related substances in cefazedone sodium

1. 头孢西酮钠(cefazedone sodium)

5 讨论

5.1 波长的选择 多数杂质色谱峰的紫外光谱图在 210 nm 和 278 nm 处有最大吸收,由于 210 nm 干扰比较多,因此将 278 nm 选择为检测波长。

5.2 流动相的选择 通过流动相改变,发现头孢西酮钠对乙腈的变化非常敏感,乙腈比例按照 30%,

15%,12%,10% 改变,其主峰保留时间分别为 3.450 min、13.750 min、30.817 min、62.000 min,发现乙腈比例为 10% 时,对主峰前杂质分离效果好,但是主峰保留时间太长且 $k > 20$,主峰后杂质由于峰展宽未能检出;当乙腈比例为 15% 时,对主峰前杂质分离效果不好,主峰后杂质出峰时间太长;当乙腈比例为 30% 时,对主峰前杂质与主峰未分开,杂质数目减少,主峰后杂质分离度好且峰宽较小。因此我们采用梯度洗脱方法^[9]来优化色谱条件,结果发现梯度洗脱方法明显优于等度洗脱。

5.3 有关物质的计算 分别采用主成分自身对照法和峰面积归一化法来计算杂质含量,结果发现主成分自身对照法比峰面积归一化法计算杂质更准确。

5.4 杂质归属

将正常样品中含有但降解产物中含量变化不明显增加的杂质定义为工艺杂质(简称“工艺”);将正常样品中含有但降解产物中含量明显增加的杂质定义为工艺杂质和降解杂质(简称“工艺 & 降解”);将正常样品中不含有但降解产物中新产生且含量明显增加的杂质定义为降解杂质(简称“降解”)。分析不同企业、工艺的样品、溶液强制降解样品和高湿高湿稳定性实验样品中的杂质,以相对保留时间为表征,根据杂质含量在降解中的变化,将头孢西酮钠中可能含有的杂质进行归属,结果见表 2。

表 2 头孢西酮钠及强制降解溶液中杂质的含量*

Tab 2 Content of related substances in cefazedone sodium and specificity tests

有关物质峰 RRT (peak of related substances on adjusted retention time)	杂质峰归属 (attribution of related substances)	杂质含量(content of related substances) /%					
		CFZD - T1(test 1 of cefazedone sodium)	CFZD - T2(test 2 of cefazedone sodium)	CFZD - T3(test 3 of cefazedone sodium)	碱降解 (destroyed by base)	酸降解 (destroyed by acid)	氧化降解 (destroyed by oxidation)
0.186	工艺 & 降解	0.03	0.04	0.03	0.86	0.04	0.10
0.225	降解	/	/	/	0.91	/	/
0.244	降解	/	/	/	9.27	/	/
0.253	工艺 & 降解	0.07	0.07	0.09	/	0.29	0.07
0.270	降解	/	/	/	/	/	0.15
0.326	降解	/	/	/	/	0.42	/
0.334	降解	0.00	0.01	/	/	/	0.09
0.508	工艺 & 降解	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04	0.13
0.572	降解	/	/	/	/	/	1.75
0.672	降解	/	/	/	/	/	6.27
0.712	工艺 & 降解	0.05	0.06	0.06	/	0.31	/
0.725	降解	/	/	/	4.15	/	/
0.860	工艺	0.06	0.05	0.04		0.04	0.05
0.896	工艺	0.04	0.09	0.08	0.14	0.08	0.08

续表 2

有关物质峰 RRT (peak of related substances on adjusted retention time)	杂质峰归属 (attribution of related substances)	杂质含量(content of related substances) /%					
		CFZD - T1(test 1 of cefazedone sodium)	CFZD - T2(test 2 of cefazedone sodium)	CFZD - T3(test 3 of cefazedone sodium)	碱降解 (destroyed by base)	酸降解 (destroyed by acid)	氧化降解 (destroyed by oxidation)
0.913	降解	/	/	/	1.01	0.04	/
0.975	降解	/	/	/	/	/	0.10
1.095	降解	0.03	0.03	0.03	/	0.03	0.04
1.133	降解	/	/	/	/	0.08	/
1.172	降解	/	/	/	10.07	0.12	0.04
1.279	工艺	0.08	0.05	0.08	/	/	/
1.501	工艺	0.09	/	/	/	/	/
1.612	工艺	0.01	/	/	/	/	/

* 以头孢西酮计(calculated by cefazedone)

头孢西酮钠碱降解产物主要有 1 个工艺 & 降解杂质和 5 个降解杂质,其 RRT 分别为 0.186, 0.225, 0.244, 0.725, 0.913, 1.172。酸降解产物主要有 2 个工艺 & 降解杂质和 3 个降解杂质,其 RRT 分别为 0.253, 0.712, 0.326, 1.113, 1.172。氧化降解产物主要有 2 个工艺 & 降解杂质和 4 个降解杂质,其 RRT 分别为 0.186, 0.508, 0.270, 0.572, 0.672, 0.975。

头孢西酮钠样品中杂质含有 5 个工艺杂质(RRT 分别为 0.860, 0.896, 1.279, 1.501, 1.612)、4 个工艺 & 降解杂质(RRT 分别为 0.186, 0.253, 0.508, 0.712) 和 2 个降解杂质(RRT 分别为 0.334, 1.095)。4 个工艺 & 降解杂质中 RRT 为 0.186 既是碱降解产物又是氧化降解产物, RRT 为 1.172 既

是碱降解产物又是酸降解产物。RRT 为 0.253 是酸降解产物, RRT 为 0.508 是氧化降解产物。其中 2 个降解杂质来源于氧化降解产物,但不是主要氧化降解产物。

参考文献

- 1 Merck Index 13th, Merck and Co., Inc. 2001; CAS No. 63521 - 15 - 3
- 2 WANG Kang - jun(王康俊). Determination of content of cefazedone sodium relevant substances by RP - LPLC(反相高效液相色谱法测定头孢西酮钠原料药的含量及有关物质). *China Trop Med* (中国热带医学), 2007, 7(10): 1881
- 3 Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland. *Practical HPLC Method Development*. 2nd Ed. Wiley, 1997

(本文于 2011 年 9 月 7 日修改回)

《金少鸿论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《金少鸿论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所) 迎来了她 60 华诞。在中检所 60 华诞之际, 编辑出版老一代中检人的论著文集, 让人们了解中国药检人的奋斗历程, 从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业, 前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富, 系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作, 以体现专业特性为主线, 反映团队成就为宗旨, 并以年代代表人物冠以书名编辑成册。《金少鸿论文集》以金少鸿研究员为核心, 收集了金少鸿研究员本人及与其他作者合著论文 228 篇。论文以全文收载, 著作收载前言或序、著者、目录或摘要等。对论文有贡献的中检所老专家还有郑昌亮、赵建西、汪开敏、吴铨、毕汝仁、张治钺、周玉、吴秉琴、张雪梅、朱燕、伍仪洵、王素兰、唐秋瑾、胡昌勤、马越等, 以及西安药检所的付燕芳、邹熔魁、南博汉、徐帼倩等。本论著集的编辑出版更蕴涵了对老一代专家们为中检所发展所作贡献的由衷敬重。

本书定价 288.00 元。联系人: 刘小帅; 电话: 010 - 67095201; 地址: 100050 北京市东城区天坛西里 2 号 中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部