

HPLC法测定注射用拉氧头孢钠有关物质

张文婷¹, 罗晓茹², 王庆全¹

(1. 江西省食品药品检验所, 南昌 330029; 2. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071)

摘要 目的: 建立用高效液相色谱方法测定注射用拉氧头孢钠的有关物质。方法: 采用 Dimonsil C₁₈柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 - 甲醇 (19:1) 为流动相, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 以自身对照法测定, 检测波长为 254 nm。结果: 线性范围为 26.52~1065.8 ng, r = 0.9999, 最低检测限为 0.02 ng。结论: 该方法准确、简便, 可以用于注射用拉氧头孢钠的有关物质测定。

关键词: 注射用拉氧头孢钠; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1621-03

HPLC determination of related substances in latamoxef sodium for injection

ZHANG Wen-ting¹, LUO Xiao-ru², WANG Qing-quan¹

(1. Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control Nanchang 330029, China

2. PLA Analysis and Check Institute of Medicine and Equipment Beijing 100071, China)

Abstract Objective To determine the related substances in latamoxef sodium for injection by HPLC. **Method** Column was Dimonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate and methanol in the ratio of 19:1. The detection wavelength was 254 nm and the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. **Results** Excellent linear relation in the range of 26.52–1065.8 ng (r = 0.9999) was observed in latamoxef. The limit of detection was 0.02 ng. **Conclusion** The method is accurate and simple and it can be used for determination of the related substances in latamoxef sodium for injection.

Key words latamoxef sodium for injection; related substances; HPLC

注射用拉氧头孢钠收载于《国家药品标准》新药转正标准第 32 册, 根据国家食品药品监督管理局食药监办 [2006] 621 号文要求, 对“注射用拉氧头孢钠”进行质量标准提高研究工作。由于注射用粉针在生产、运输、贮藏过程中所产生的一些杂质很可能造成人体的毒副作用, 而统计显示多数粉针检查项下有关物质不合格率相对较高。该品种质量标准中没有有关物质检查项, 而原料药质量标准中“有关物质”的检查方法为高效液相色谱法, 那么就有必要对“注射用拉氧头孢钠”进行有关物质研究工作。参照原料药标准采用高效液相色谱方法。在有关物质标准起草说明中我们进行了高效液相色谱条件的选择、空白辅料干扰试验、强力破坏试验、检测限测定、线性关系的考察、供试品进样精密度考察、重复性试验、自身对照溶液稳定性试验、9 批样品的有关

物质测定。结果表明该方法准确、简便, 可以用于注射用拉氧头孢钠的有关物质测定。

1 仪器与试剂

LC-2010C 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 色谱数据通过 Class-vp 工作站采集获得。

醋酸铵为分析纯, 甲醇为色谱纯。水为娃哈哈纯净水。

2 溶液配制

2.1 供试品溶液 精密量取本品适量, 用水溶解成每 1 mL 中约含拉氧头孢 2.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

3 方法学的研究

3.1 色谱条件的选择 原料药质量标准的色谱条

件为用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液 - 甲醇 (19:1) 为流动相;流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长为 254 nm。精密量取“2.1”项下配制的供试品溶液,利用上述色谱条件在波长 195, 210, 254, 310, 365 nm 处对供试品溶液进行测定。结果表明在 195, 210 nm 波长处有些杂质峰未能检测到,且溶剂峰明显。310, 365 nm 波长处有些杂质峰未能检测到,并且样品的吸收峰也太小,不能有效测定样品和杂质。在 254 nm 波长处能测定到更多杂质峰,故测定波长确定为 254 nm。在上述色谱条件下,对流动相 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液 - 甲醇的比例进行适当改变 (94:3, 95:5, 92:8), 结果表明以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液 - 甲醇 (95:5) 为流动相分离效果较好。

3.2 空白辅料干扰试验 根据生产企业提供的处方,对已有的空白辅料甘露醇按上述色谱条件进行测定。结果表明,在选定的液相色谱条件下,辅料无干扰。

3.3 强力破坏试验

取注射用拉氧头孢钠样品 (海南海灵化学制药有限公司,批号 0511121),按下述方法进行破坏。

3.3.1 高温破坏试验 称取本品约 150 mg 置 50 mL 量瓶中,于 100°C 加热 1 h 用水稀释至刻度,摇匀,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明在上述条件下,样品被完全破坏,主峰消失,各杂质峰之间能有效分离,见图 1。

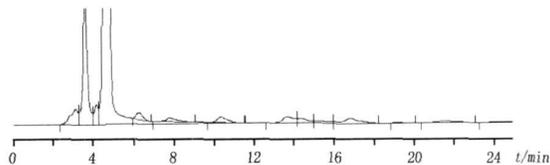


图 1 注射用拉氧头孢钠热破坏图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of latanoxef sodium for injection after heat destruction

3.3.2 强酸破坏试验 称取本品约 150 mg 置 50 mL 量瓶中,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1.0 mL,室温放置 1 h 然后加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1.0 mL,用水稀释至刻度,摇匀,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明在上述条件下,样品有破坏,约产生 9 个杂质峰,有关物质与主峰有效分离,各杂质峰之间也能有效分离,见图 2。

3.3.3 强碱破坏试验 称取本品约 150 mg 置 50 mL 量瓶中,加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1.0 mL,室温放置 1 h 然后加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1.0 mL 用

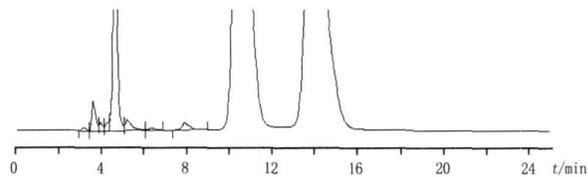


图 2 注射用拉氧头孢钠酸破坏图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of latanoxef sodium for injection after acid destruction

流动相稀释至刻度,摇匀,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明在上述条件下,样品有很大破坏,主成分中 1 个异构体被破坏,约产生 15 个杂质峰,有关物质与主峰有效分离,各杂质峰有部分峰之间不能完全分离。

3.3.4 光照破坏试验 称取本品约 150 mg 置 50 mL 量瓶中,于 4500 k 光强度照射 24 h 用水稀释至刻度,摇匀,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明光照对本品的杂质测定没有明显的影响,约产生 6 个小峰,杂质峰与主峰能有效分离。

3.3.5 强氧化破坏试验 称取本品约 150 mg 置 50 mL 量瓶中,加 30% 的过氧化氢溶液 1 mL,室温放置 1 h 用水稀释至刻度,摇匀,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明在上述色谱条件下,样品有较大破坏,有较明显的降解物质产生,约产生 8 个杂质峰,有关物质与主峰有效分离,各杂质峰之间也能有效分离。

3.4 检测限测定 取注射用拉氧头孢钠适量,加流动相制成每 1 mL 中约含拉氧头孢 $0.01 \mu\text{g}$ 的溶液,按上述有关物质的测定方法,进样 $2 \mu\text{L}$,其信噪比约为 3:1,最低检测限为 0.02 ng 。

3.5 线性关系考察 精密称取注射用拉氧头孢钠 0.1559 g (相当于拉氧头孢 0.1326 g),置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,再精密量取 2 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以进样量 (μg) 为横坐标,峰面积为纵坐标作线性回归,结果线性范围为 $26.52 \sim 1065.8 \text{ ng}$ 拉氧头孢回归方程为:

$$Y = 1.631 \times 10^3 X + 2.000 \times 10^6 \quad r = 0.9999$$

3.6 进样精密度考察 取注射用拉氧头孢钠样品按“2.1”项下方法,制得供试品溶液,取 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,连续进样 6 针,记录色谱图,结果单个杂质平均含量为 1.5%,RSD 为 0.9%;总杂质平均含量为 2.5%,RSD 为 1.6%。表明精密度良好。

3.7 重复性试验 取注射用拉氧头孢钠样品,按

“2.1”项下方法,分别平行制得5份供试品溶液和自身对照溶液,取5 μL注入液相色谱仪,记录色谱图,采用自身对照法计算杂质含量,结果单个杂质平均含量为1.5%,RSD为0.5%,总杂质平均含量为2.5%,RSD为0.5%。结果表明该法测定有关物质的杂质含量,重复性良好。

3.8 自身对照溶液稳定性试验 取上述重复性试验项下的1份自身对照溶液,按“2.1”项下方法,分别于0、2、4、6、8 h进样,记录色谱图,结果平均峰面积为264299,RSD为1.6%,表明供试品对照溶液在8 h内稳定。

3.9 9批样品的有关物质测定 取9批注射用拉氧头孢钠样品,按“2.1”项下方法,分别制得供试品溶液和自身对照溶液,取5 μL注入液相色谱仪,记录色谱图,采用自身对照法计算杂质含量,共在不同时间进行了3次试验。结果见表1和图3。

表1 9批样品的有关物质测定结果(%)

Tab 1 Related substances results of 9 samples

	批号 (LotNo.)	规格 (strength)	来源(source)		
			1	2	3
最大单峰 (max peak)	0401041	0.5	3.0	3.5	3.3
	0401141	1.0	3.4	2.9	3.1
	0403313	0.25	3.2	3.7	3.2
	0511121	1.0	1.5	1.9	2.2
	0511163	0.25	1.7	2.7	2.8
	0512061	0.5	1.9	2.0	2.3
	0612171	0.25	1.4	2.5	2.2
	0701051	0.5	1.3	2.4	2.5
	0611161	1.0	1.6	2.2	2.2
总峰(total peaks)	0401041	0.5	6.4	6.4	7.3
	0401141	1.0	8.9	5.1	6.6
	0403313	0.25	8.1	6.4	7.0
	0511121	1.0	2.5	3.2	4.7
	0511163	0.25	3.6	4.3	5.5
	0512061	0.5	3.2	3.4	4.7
	0612171	0.25	2.7	4.1	4.9
	0701051	0.5	2.6	4.0	5.0
	0611161	1.0	3.4	4.0	4.4

注(note): 1 江西所(2007年5月)[Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control(May 2007)]; 2 总后卫(2008年1月)[PLA Analysis and Check Institute of Medicine and Equipment(January 2008)]; 3 江西所(2008年9月)[Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control(September 2008)]

4 讨论

4.1 经过试验发现注射用拉氧头孢钠经过强酸、强碱、氧化和高温破坏后均有很大破坏,而经过光照后没有产生很大的杂质峰。由于各种条件限制,不能

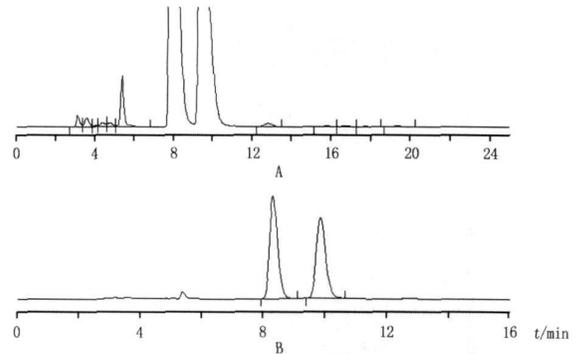


图3 注射用拉氧头孢钠样品(A)和自身对照(B)图谱

Fig 3 HPLC chromatograms of latamoxef sodium for injection samples(A) and its selfreference(B)

确定经过破坏后产生了什么降解产物,有待用更精密的能够进行结构分析的仪器进行进一步研究。

4.2 关于标准限度的规定,原料药的标准为单个杂质的含量不得过2.0%,总杂质含量不得过5.0%。根据厂家建议及参照我所实验结果在标准草案中暂定为单个杂质的含量不得过3.0%,总杂质含量不得过6.0%。对表1的实验数据进行比较表明:第1次实验前3批过期样品的单个杂质含量在3.0%~3.5%之间,均超过了3.0%;总杂质含量在6.0%~9.0%之间,均超过了6.0%。另外6批未过期样品的单个杂质含量在1.0%~2.0%之间,总杂质含量在2.0%~4.0%之间。第2次实验,前6批样品均已过期,单个杂质含量前3批有2批超过3.0%,后3批(刚过效期)有2批超过2.0%,总杂质含量4~6批接近4.0%。第3次实验最后3批样品只差3~5个月过期,单个杂质峰含量前6批中4批在3.0%左右,而最后3批均超过了2.0%;总杂质含量前3批均超过了6.0%,4~6批有2批为4.7%,1批为5.5%,已接近6.0%,最后3批有1批为5.0%,1批为4.9%。综上所述,我们认为根据试验结果比较标准草案中的有关物质限度定为单个杂质的含量不得过3.0%,总杂质含量不得过6.0%,不够严格,而采用原料药的标准单个杂质的含量不得过2.0%,总杂质含量不得过5.0%,更能有效控制制剂中杂质含量。

参考文献

- 1 ChP(中国药典).2005 Vol III (二部), Appendix(附录) 28
- 2 State Drug Standard, New Form al Standard Vol 132(国家药品标准,新药转正标准第32册). WS₁-(X-006)-2003Z 104

(本文于2009年1月20日收到)