

高效液相色谱法测定头孢他啶的含量及杂质

姜恩铸^{1,2}, 胡昌勤¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050;

2. 中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 采用高效液相色谱法测定了头孢他啶的含量及杂质。以 Alltima C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)为分离柱,以乙腈和磷酸盐缓冲溶液(pH 3.9)分别为流动相 A 和流动相 B 进行梯度洗脱,流速 1.3 mL/min,柱温 35 °C,紫外检测波长 255 nm。从头孢他啶药物中共分出 14 个杂质,且 14 个杂质间具有良好的分离度。头孢他啶在 0.267 ~ 1 069 μg/mL 范围内与峰面积具有良好的线性关系($r = 1.000 0$);其定量限($S/N = 10$)和最低检出限($S/N = 3$)分别为 3.1 ng 和 0.93 ng。3 个浓度的日内测定值的相对标准偏差(RSD)为 0.72% ($n = 3$),日间测定值的 RSD 为 0.91% ($n = 3$)。头孢他啶溶液在 4 °C 避光条件下放置 24 h 保持稳定。本方法与欧洲/英国药典和日本药局方的方法比较,具有分离杂质数量多、分离度好的优点。

关键词 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 头孢他啶; 杂质

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)01-0075-05 栏目类别: 研究论文

Determination of ceftazidime and impurities using high performance liquid chromatography

JIANG Enzhu^{1,2}, HU Changqin¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract : A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of ceftazidime and impurities in ceftazidime drug was developed and verified. An Alltima C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the analysis column. Acetonitrile and phosphate buffer (22.6 g/L aqueous solution of ammonium dihydrogen phosphate, adjusted to pH 3.9 with 10% (v/v) phosphoric acid) were used as mobile phases with gradient elution at a flow rate of 1.3 mL/min. The column temperature was kept at 35 °C, and the detection wavelength was set at 255 nm. Fourteen impurities could be well separated. The assay exhibited a good linearity in the ceftazidime concentration range of 0.267 – 1 069 μg/mL with a correlation coefficient of 1.000 0. The limits of the quantitation and qualification of ceftazidime were 3.1 ng and 0.93 ng, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of the interday and intraday ($n = 3$) determinations at three concentration levels were 0.72% and 0.91%, respectively. At 4 °C and under darkness, ceftazidime solution was stable for 24 h. The developed method is superior to the counterparts in British and Japanese pharmacopeias in the number of the impurities separated and detected.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); gradient elution; ceftazidime; impurities

头孢他啶(ceftazidime, CAZ)是第三代头孢菌素(结构式见图1),其抗菌谱广,抗菌活性强,但结构不稳定。在酸、碱和酶的作用下,其β-内酰胺环易开环形成开环物,并可进一步发生脱羧反应;在较

高的 pH 或加热时,氢化噻嗪环的双键可异构化(Δ-异构)产生 Δ-3 异构体等^[1];在储存过程中,头孢他啶侧链上的杂环取代基脱落后可形成吡啶^[2],并在一定条件下可以聚合形成聚合物^[3];在光照条件

下,头孢他啶的甲氧亚氨键会产生 *E*-异构体^[4]。其在生产和储存的过程中形成的各类降解物和聚合物,使原有的抗菌活性降低甚至消失,并可能引发毒副反应。

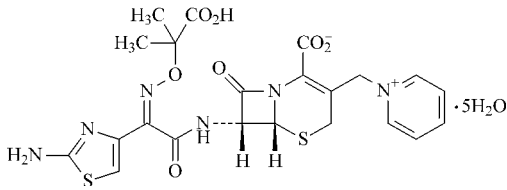


图 1 头孢他啶结构式
Fig. 1 Structure of ceftazidime

目前各国药典中均采用高效液相色谱法(HPLC)测定头孢他啶的含量。欧洲/英国药典从2000年起分别采用2种不同的HPLC方法和1种薄层色谱(TLC)方法控制头孢他啶中不同的杂质^[5,6],并沿用至今;日本药局方从14修正版起开始收载头孢他啶及杂质的检查方法^[7],其策略、方法与欧洲/英国药典相似;但美国药典至USP30-NF25都没有对头孢他啶中的杂质进行控制^[8];中国药典虽然目前也未对头孢他啶中的杂质进行控制,但从2000版起采用凝胶色谱法控制头孢他啶中的聚合物杂质^[9]。其他关于头孢他啶杂质的分离分析方法仅见几篇较为简略的文献^[10-14]。随着人们对药物安全性问题的日益重视和检测手段的不断发展,对药品中杂质的控制已越来越重视。本文拟在对各国药典中头孢他啶及杂质的分析方法进行系统评价的基础上,建立中国药典可收载的相关方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

采用岛津HPLC系统:LC-20 AT泵,SPD-M20 A二极管阵列检测器(DAD),操作软件为LCsolution(Ver. 1.11 sp1)。

所有的试剂都为分析纯试剂。乙腈和甲醇购自Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)。头孢他啶对照品由中国药物生物制品检定所提供,批号为130484-200502,主成分含量为84.2%; Δ -3异构体由美国药典委员会(USP INC. Rockville, MD)提供。2批注射用头孢他啶分别为Eli Lilly Do Brasil Ltd.(批号:100593C)和海南海灵制药厂有限公司(批号:040226)的产品。

1.2 色谱条件

色谱柱:Alltima C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm 5 μ m)(Alltech Associate, Inc.);乙腈和磷酸盐缓冲液(22.6 g 磷酸二氢铵加水溶解并稀释至

1 000 mL,用10%磷酸调节pH至3.9)分别为流动相A和流动相B,按表1的程序进行梯度洗脱,流速为1.3 mL/min,检测波长为255 nm,柱温为35 $^{\circ}$ C;进样20 μ L。理论塔板数按头孢他啶计算不低于5 000块塔板/m,头孢他啶和其相邻降解物的分离度应符合规定。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

Time/min	φ (Acetonitrile)/%	φ (Phosphate buffer)/%
0-14	7	93
14-29*	7 \rightarrow 14	93 \rightarrow 86
29-45	14	86
45-65**	14 \rightarrow 7	86 \rightarrow 93

* Gradient Curve -1 was applied. ** Gradient Curve 0 (default) was applied.

1.3 样品溶液的配制

标准溶液 精密称取头孢他啶对照品适量,用流动相(乙腈-磷酸盐缓冲液(体积比为7:93))配制成0.85 mg/mL的溶液。

供试品溶液 精密称取头孢他啶样品适量,用流动相(乙腈-磷酸盐缓冲液(体积比为7:93))配制成0.85 mg/mL的溶液。

储备液 精密称取头孢他啶对照品适量,用流动相(乙腈-磷酸盐缓冲液(体积比为7:93))配制成1.0 mg/mL的溶液。

1.4 加速降解溶液的制备

酸降解溶液 取头孢他啶对照品60 mg,置于50 mL量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液5 mL,加水稀释到刻度,摇匀。在沸水浴中放置20 min,即得。

碱降解溶液 取头孢他啶对照品60 mg,置于50 mL量瓶中,加0.01 mol/L氢氧化钠溶液5 mL,加水稀释到刻度,摇匀。在沸水浴中放置4 min,即得。

湿热降解溶液 取头孢他啶对照品60 mg,在温度60 $^{\circ}$ C、相对湿度为60%的恒温恒湿箱中放置5 h后取出,置于50 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释到刻度,摇匀,即得。

1.5 方法学评价

根据中国药典2005版附录XIX A^[9]的相关规定,对所建立方法的选择性、线性、定量限、检出限、精密度、粗放性和溶液的稳定性进行评价。

2 结果与讨论

2.1 最佳分离条件的确定

欧洲/英国药典方法分析头孢他啶中的杂质时均采用等度洗脱^[5,6]。实验发现该色谱系统对主峰出峰前的杂质可较好地分离,但主峰出峰后检测不到杂质;但加大流动相中强溶剂(乙腈)的比例,发

现有多个杂质峰出现。这表明在该色谱条件下,部分杂质吸附在色谱柱上不能洗脱。日本药局方收载的头孢他啶中杂质的检测方法的色谱条件同欧洲/英国药典方法相似,但流动相中的盐浓度仅为英国药典的 1/5。实验发现,在该色谱条件下头孢他啶主峰的出峰时间偏早,造成主峰前杂质峰相对较密集,且杂质峰的数量较少。可见,目前各国药典收载的头孢他啶及杂质的分析方法均存在一定的缺陷。

在欧洲/英国药典方法的基础上,本文采取当头孢他啶出峰后,进行梯度洗脱,使吸附在色谱柱上的杂质被洗脱。通过在梯度洗脱过程中调节流动相中乙腈的比例,在主峰出峰后可分离出 6 个左右的杂质峰,控制乙腈的变化速率,使得主成分出峰后的诸

杂质峰达到最佳分离,其典型的色谱图如图 2-a 所示。由此确定了头孢他啶杂质的最佳分离条件(见“1.2”节)。

2.2 方法评价

2.2.1 专属性

在“1.2”节所述的色谱条件下测定供试品溶液和加速降解溶液,通过 HPLC-DAD 对头孢他啶主峰的峰纯度进行分析,其峰纯度指数(peak purity index)为 1.000 000,即主峰为单一组分峰;头孢他啶的主要杂质如 Δ -3 异构体、7-ACA(头孢类母核)及头孢他啶溶液的酸、碱降解物及其固体在湿热条件下的降解物均不干扰主成分的测定,且诸杂质间可以得到较好的分离(见图 2)。

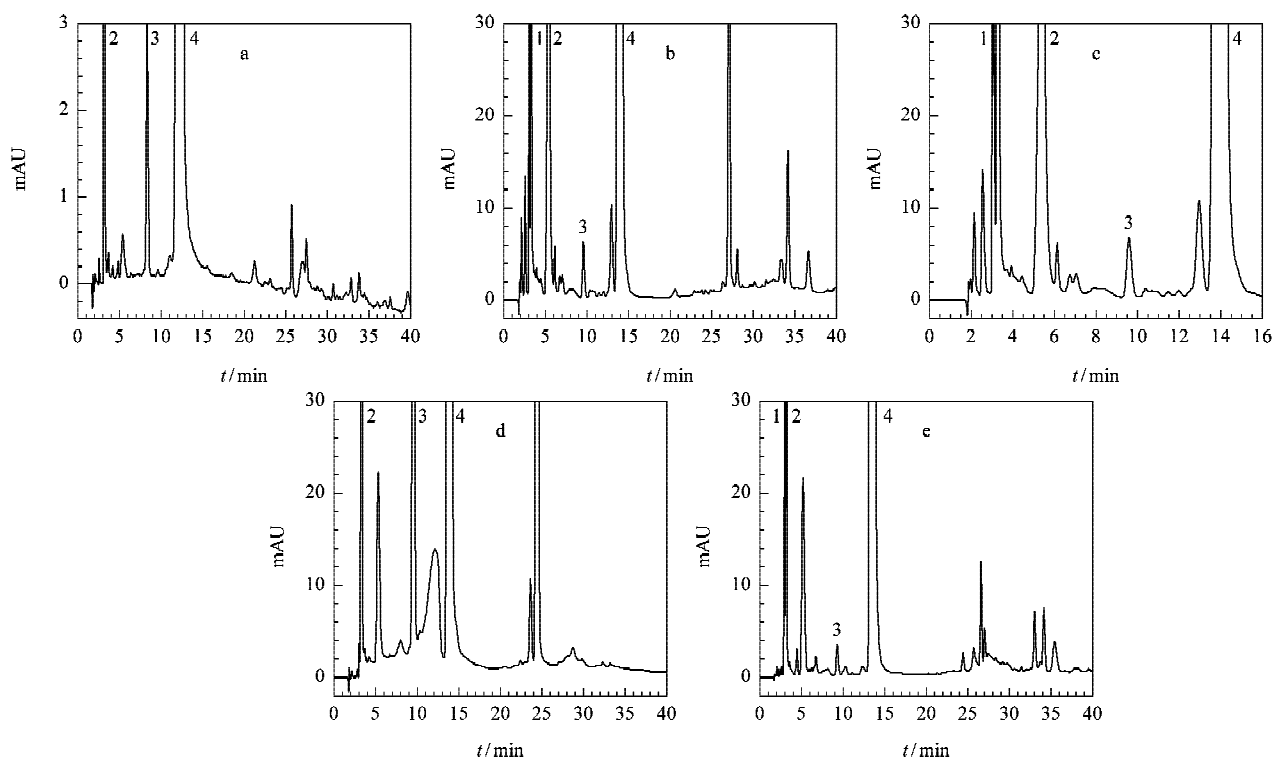


图 2 (a)头孢他啶对照品、(b)酸降解溶液及其(c)局部放大的色谱图、(d)碱降解溶液和(e)湿热降解溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) ceftazidime control, (b) the acid degradation solution and (c) the enlarged part of chromatogram (b), (d) base degradation solution, (e) heat and humidity degradation solution

1. 7-ACA; 2. pyridine; 3. Δ -3 isomer; 4. ceftazidime.

2.2.2 线性关系

取头孢他啶储备液适量,用流动相配制成 13 个不同浓度(0.267 ~ 1 069 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的溶液,在“1.2”节的色谱条件下进行测定,以各自的峰面积 y 和质量浓度 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$)作线性回归,得到的线性方程为 $y = 35\,709x$, $r = 1.000$ 。

2.2.3 精密度

按“1.3”节所述方法配制 3 个浓度(0.69, 0.86, 1.0 mg/mL)的头孢他啶对照品溶液,进样 20 μL ,每个浓度样品重复测定 3 次;连续 3 d 测定,结果为 3 个浓度下的日内测定值的相对标准偏差

(RSD)为 0.72%,日间测定值的 RSD 为 0.91%。

2.2.4 最低定量限和检出限

取头孢他啶储备液逐步稀释到 0.133 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“1.2”节的色谱条件测得头孢他啶的定量限(以信噪比(S/N)=10 计)和检出限(以 $S/N=3$ 计)分别为 3.1 ng 和 0.93 ng。

2.2.5 溶液的稳定性

按“1.3”节方法配制头孢他啶标准溶液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 且避光的条件下放置 0, 1.5, 3.5, 4.5, 6, 24 h 后分别取样测定,得主峰峰面积的 RSD 为 0.18%,说明头孢他啶溶液在此条件下 24 h 内保持稳定。

2.2.6 粗放性

对数个色谱条件进行微小的变动,以考察方法的耐受能力。

(1) 色谱柱

根据对 ODS 色谱柱的分类^[15],在不改变流动相及洗脱条件的情况下,分别采用 A、B 和 E 型色谱柱评价不同类型的色谱柱对本方法的适用性,结果见表 2。

根据表 2 中的各项数据,综合分析所分离出的杂质数目(忽略峰面积小于主峰面积 0.1% 以下的色谱峰)、各个杂质间的分离度和主峰的理论塔板数等指标,发现 B 型色谱柱中 Alltima C18 色谱柱最适合本方法;采用其他 3 根 B 型色谱柱分离时,主成分的保留时间均比较短,使得保留因子 k' (以硝酸钾甲醇溶液测定系统死时间为 1.79 min) 在 0.12 ~ 2.36 范围的杂质峰(包括 7-ACA、吡啶等)重叠或者无法很好地分离,且主成分峰均不同程度地前伸。B 型色谱柱使用的填料是高纯度的球形硅胶,重金属含量相对较低,键合密度及碳载量均较高,且采用了非极性基团封尾技术(短碳链烷基)或其他技术,使硅羟基活性降低,从而改善了碱性(含 N 原子)化合物和酸性化合物的分离。

采用 A 型的 Hypersil BDS C18 色谱柱时,头孢

他啶的出峰时间较快,分离出的杂质数量仅有 5 种,且主峰前伸现象严重(拖尾因子为 0.877);调节流动相也无法达到 B 型色谱柱的分离效果。与 B 型色谱柱相比,A 型色谱柱的填料多为无定形或球形硅胶,硅胶的纯度较低,重金属含量较高,键合密度及碳载量较低,且未采用封尾技术或采用不完全封尾技术,使得硅羟基的活性较高,残留的硅羟基导致的“第二效应”较强,易与碱性(含 N 原子)化合物及酸性化合物发生氢键和离子交换作用,造成色谱峰拖尾。头孢他啶本身的极性较大,在酸性条件下呈碱性,可以和硅羟基发生较强的相互作用。这可能是 A 型色谱柱对本方法不适宜的原因。

采用 E 型的 Inertsil DIKMA ODS-Ep 色谱柱分离时,分离出的杂质数量仅有 7 种,主峰拖尾(拖尾因子为 1.422)。此外, k' 为 0.4 ~ 1.2 的峰非常密集,无法分开;主峰理论塔板数为 1867 块塔板/m。E 型色谱柱因其在十八烷基中嵌入了极性基团(embedded polar groups,如甲酰胺基、二醇基等),使填料亲水性增加,并使其具有独特的选择性。虽然头孢他啶的极性较大,在所使用的 E 型柱中表现出峰展宽,使得柱效大大降低,但不同嵌入基团的作用并不完全相同,因此 E 型色谱柱对本方法是否适宜有待于对具体的色谱柱进行考察。

表 2 6 种色谱柱对头孢他啶样品的色谱分离结果

Table 2 Chromatographic results of 6 columns for the determination of a ceftazidime sample

Parameter	Type A	Type B1	Type B2	Type B3	Type B4	Type E
Retention time of main peak/min	5.453	15.432	9.429	4.022	6.939	7.982
Tailing factor of main peak	0.877	1.163	0.696	0.878	0.823	1.422
Theoretical plate number/m ⁻¹	8602	6494	2998	4721	6476	1867
Resolution between main peak and nearest peak	2.449	7.148	9.093	5.321	2.545	2.746
Number of separated peaks	5	13	9	12	12	7
Resolution between 7-ACA and nearest peak	-	1.536	0.391	2.867	0.583	-
Resolution between Δ -3-isomer and nearest peak	-	7.148	3.613	4.383	-	-
Resolution between two nearest peaks	0.593	1.182	0.591	0.589	0.583	-

Columns: Type A, Hypersil BDS C18, 200 mm × 4.6 mm, 5 μ m; Type B1, Alltima C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m; Type B2, Puro-spher STAR RP-18e, 250 mm × 4.0 mm, 5 μ m; Type B3, UHC-746 PRONTOSIL 120-3-C18H 75 mm × 4.6 mm, 3 μ m; Type B4, Lichrospher 100 PR-18e, 250 mm × 4.0 mm, 5 μ m; Type E, Inertsil DIKMA ODS-Ep, 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m.

(2) 流动相的 pH 值

本方法中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 3.9。将其 pH 调节到 3.67,发现色谱图总体上没有太大变化,仅 k' 为 17.5 ~ 19.1 范围的 3 个色谱峰的理论塔板数降低,分离度下降;将 pH 调节到 4.08,发现色谱图中 k' 为 0.7 左右的杂质峰分别前伸和拖尾,此外, k' 为 16.3 左右的两个色谱峰的分离度由 1.458 降

到 0.254。

(3) 流动相比例

将 0 ~ 14 min 等度洗脱段的乙腈比例由 7% 调到 6%,发现主峰前各杂质峰的保留时间均不同程度地延长; k' 在 0.7 左右的 3 个杂质峰合并成一个较大的色谱峰; k' 为 15.8 ~ 16.9(保留时间为 32 ~ 34 min)的 3 个色谱峰的分离度也降低。如果将此段

的乙腈比例由 7% 调到 8% ,发现主峰前各杂质峰的保留时间均不同程度地缩短, k 为 0.7 左右的杂质峰的分离度降低, k 为 15.8 ~ 16.9 的 3 个色谱峰的分离度也降低。

2.2.7 系统适应性实验

对方法的粗放性考察结果显示,本文所建立的方法对实验条件要求较高,较小的参数改变都可能影响到最终的分析结果,因此应建立严格的系统适应性实验来保证每一次分析结果的有效性。根据对方法的专属性评价结果,选用酸降解溶液为系统适应性测试溶液。具体要求为:主峰 k 达到 5.0 以上;柱效按头孢他啶计算不低于 5 000 块理论塔板/m;头孢他啶和其相邻降解物的分离度应符合规定;梯度洗脱在基本不改变梯度变化率($\Delta C_B/\Delta t_R$)^[16]的情况下,头孢他啶主峰后的 3 个主要酸降解杂质和其相邻杂质的分离度应符合规定。其典型的系统适应性实验色谱图见图 2-b。各国药典收录的系统适应性实验要求见表 3。虽然利用酸降解溶液进行系

统适应性实验较为复杂,但能更好地体现出色谱系统的实际分离情况,此策略在新修订的药典方法中已被逐渐采用。因此,可以认为我们确定的系统适应性实验方法,较目前各国药典收载的方法更为有效。

表 3 一些国家药典中收载的系统适应性要求

Table 3 System suitability requirements in the pharmacopoeias

Pharmacopoeia	Controlled objects	Required resolution
British/European Pharmacopoeia ^[5,6]	ceftazidime and ceftazidime Δ -3 isomer	No less than 5.9
Japanese Pharmacopoeia ^[7]	ceftazidime and acetanilide	No less than 10
US Pharmacopoeia ^[8]	ceftazidime and ceftazidime Δ -3 isomer	No less than 2.0

2.3 样品测定

按确定的色谱方法,对 2 批头孢他啶制剂进行了测定,结果见表 4,表明所建立方法可以满足实际分析的需要。

表 4 头孢他啶注射液中头孢他啶的含量及杂质

Table 4 Content and impurity of the two batches of ceftazidime injections

Manufacturer	Batch No.	Content/%	Content of largest single peak/%	Content of total impurities/%	Number of impurities with content above 0.1% / number of total impurities
Eli Lilly Do Brasil Ltd.	100593C	76.8	0.15	0.25	2/12
Hainan Hailing Pharmaceutical Co., Ltd.	040226	75.5	0.27	0.40	2/14

3 结论

在采用严格的系统适应性实验的基础上,所建立的头孢他啶药物中头孢他啶及杂质的 HPLC 分析方法较目前各国药典收载的方法,可更方便、有效地控制头孢他啶药物中的各种杂质。该方法为中国药典收载头孢他啶药物中有关杂质的检测方法奠定了基础。

参考文献:

[1] Fabre H, Ibork H, Lerner D A. J Pharm Sci, 1997, 83(5): 462
 [2] Wen Y L. World Notes on Antibiotics (温玉麟. 国外医药抗生素分册), 1990, 11(5): 341
 [3] Jin S H, Hu C Q. Chinese Journal of New Drugs (金少鸿, 胡昌勤. 中国新药杂志), 1994, 3(4): 38
 [4] Porra R, Farina A, Cotichini V, et al. J Pharm Biomed Anal, 1998, 18: 241
 [5] Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia 5.0. Volume 2. Nördlingen, Germany: Drucherei C H Beck, 2004: 1 218
 [6] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. Volume I. London: The Stationary Office, 2005: 420
 [7] Society of Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia: English Version. 14th ed. Tokyo: Yakuji Nippo Ltd,

2000: 342
 [8] The United States Pharmacopoeial Convention Inc. The United States Pharmacopoeia: Asian Edition. Volume 2. 30th ed. Baltimore: Port City Press, 2007: 342
 [9] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part 2. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部. 北京: 化学工业出版社), 2005: 134, Appendix XIX A
 [10] Shi Y, Niu Y, Wu M H. Guangdong Pharmaceutical Journal (石瑛, 牛彦, 吴美红. 广东药学), 2001, 11(6): 21
 [11] Tu J, Yan Z G, Lou Q X, et al. Journal of China Pharmaceutical University (屠洁, 闫志刚, 楼秋霞, 等. 中国药科大学学报), 2002, 33(2): 113
 [12] Wang X Q, Wang G Y. West China Journal of Pharmaceutical Sciences (王雪芹, 王国勇. 华西药学杂志), 2005, 20(3): 277
 [13] Huang L. Chinese Journal of Antibiotics (黄莉. 中国抗生素杂志), 2005, 30(10): 588
 [14] Liu H, Qiu S L. Chinese Journal of Antibiotics (刘浩, 仇士林. 中国抗生素杂志), 1996, 21: 270
 [15] National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products. Chinese standard operation program for pharmaceutical analysis. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press (中国药品生物制品检定所编. 中国药品检验标准操作规范. 北京: 中国医药科技出版社), 2005: 92
 [16] Tan J, Zhong X W, Hu C Q, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (田洁, 仲宣惟, 胡昌勤, 等. 药物分析杂志), 2006, 26(9): 1 233