

## HPLC法测定头孢地嗪钠清洁残留物

刘浩, 薛瑾\*, 郭金丽

(华北制药凯瑞特药业有限公司, 石家庄 052165)

**摘要** 目的: 建立一种快速检测头孢地嗪钠清洁残留的方法, 有效地控制产品的交叉污染。方法: 采用 DIONEX summit 液相色谱系统, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 0.87 g 与无水磷酸氢二钠 0.22 g 加水溶解并稀释至 1000 mL, 摇匀) - 乙腈 (920: 80); 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长: 262 nm, 棉签擦拭取样。结果: 头孢地嗪的浓度在 4.18~52.28 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好 ( $r = 0.9998$ ), 检测限和定量限分别为 0.11 ng 和 0.32 ng, 取样回收率平均为 83.3%。结论: 用 HPLC 法测定头孢地嗪的残留灵敏度高, 是一种快速可靠的质量控制手段。

**关键词:** 头孢地嗪钠; 清洁残留; 棉签擦拭; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1213-03

## HPLC determination of cefodizime sodium cleaning residue

LIU Hao, XUE Jin\*, GUO Jin-li

(NCPCCreate Pharma Co., Ltd., Shijiazhuang 052165 China)

**Abstract Objective** To establish a rapid method for determination of cefodizime sodium cleaning residue so as to control the effectively across contamination between different products. **Method** A DIONEX summit HPLC system was adopted with a Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of phosphate buffer solution (0.87 g of potassium dihydrogen phosphate and 0.22 g of disodium hydrogen phosphate, dissolve and dilute to 1000 mL with water) - acetonitrile (920: 80) at the flow rate of 1 mL · min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 262 nm. Sampling with cotton swab. **Result** The result showed good linearity ( $r = 0.9998$ ) in the range of 4.18~52.28 μg · mL<sup>-1</sup>. The average recovery of swabbing was 83.3%. The limit of test and the limit of detection are 0.11 ng and 0.32 ng respectively. **Conclusion** The method is sensitive, rapid. It can be used for determination of cefodizime sodium cleaning residue.

**Key words** cefodizime sodium; cleaning residue; cotton swabbing; HPLC

设备清洁验证是通过在与产品直接接触的内表面取样并对样品进行检验, 以确保设备按照一定的清洁程序清洗后, 残留物指标达到清洁要求所规定的标准。制药企业对生产设备的清洁要求非常严格, 尤其是在不同产品轮换生产时, 彻底清除设备表面的上一批产品的残留物, 对产品质量以及用药安全具有重要意义。为保证整个生产过程严格达到要求, 避免产品交叉污染, 应对其清洁效果进行验证。本文通过对模拟与产品直接接触的设备表面进行棉签擦拭取样, 对头孢地嗪的化学残留检测进行了方法学的研究, 并建立了用 HPLC 法检测头孢地嗪残留的方法, 为残留物的测定提供了快速可靠的分析手段。

## 1 仪器与试剂

DIONEX summit 高效液相色谱系统, 包括四元泵、紫外检测器、自动进样器、柱温箱及 Chromleon 工作站。Millipore 纯水机, METTLER TOLEDO AG 135

分析天平。

头孢地嗪对照品, 批号 130520-200501, 中国药品生物制品检定所提供, 含量为 88.6%。乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾和无水磷酸氢二钠为分析纯, 水为高纯水。棉签: CleanTip<sup>TM</sup> Swabs 九州方圆公司提供

## 2 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: 磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 0.87 g 与无水磷酸氢二钠 0.22 g 加水溶解并稀释至 1000 mL, 摇匀) - 乙腈 (920: 80)。流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 自动进样器和柱温均为室温, 进样量为 20 μL; 紫外检测波长为 262 nm。

## 3 方法

## 3.1 强力破坏试验

取头孢地嗪对照品约 20 mg 分别在酸 (加 1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 1 mL, 放置 10 min, 加 1 mol ·

\* 通讯作者 Tel: 13180099596 E-mail: xuej@nccpcreate.com

$L^{-1}$  氢氧化钠溶液 1 mL 中和)、碱 ( $1\text{ mol} \cdot L^{-1}$  氢氧化钠溶液 1 mL, 放置 10 min, 加  $1\text{ mol} \cdot L^{-1}$  盐酸溶液 1 mL 中和)、氧化剂 (3% 过氧化氢溶液 1 mL, 放置 10 min)、高温 ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 h)、光照 (太阳下 2 h) 的极端条件下进行适时的加速破坏, 再加流动相溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀。分别取  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件测定, 记录色谱图。测定结果表明, 与未经破坏的本品色谱图比较, 在强力破坏试验条件下降解产物峰与主峰在现行色谱条件下都得到较好分离, 该色谱条件能满足本品测定。

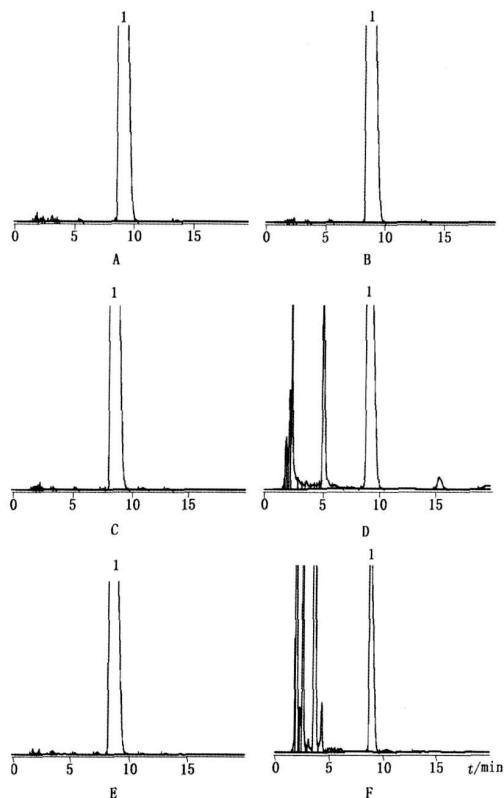


图 1 强力破坏试验色谱图

Fig 1 Chromatograms of stress conditions test

A. 对照品 (reference substance) B. 酸 (acid hydrolysis) C. 碱 (base hydrolysis) D. 氧化 (oxidation) E. 高温 (heat) F. 光 (light)  
1 头孢地嗪 (cefodizime)

**3.2 最低检测限和最小定量限** 在上述色谱条件下, 取头孢地嗪对照品适量, 加流动相溶解并定量稀释, 按信噪比  $S/N = 3$  测定, 得本品最低检测限为  $0.11\text{ ng}$  按信噪比  $S/N = 10$  测定, 得本品最小定量限为  $0.32\text{ ng}$ 。

**3.3 精密度** 精密称量头孢地嗪对照品约  $20\text{ mg}$  用流动相溶解并定容至  $100\text{ mL}$ , 精密量取  $1\text{ mL}$ , 用流动相稀释至  $10\text{ mL}$ , 配成浓度为  $20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在测定条件下分别进样  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算精密度 RSD 为  $0.09\%$ 。

**3.4 线性范围** 准确称量头孢地嗪对照品约  $20\text{ mg}$  加流动相溶解并定容于  $100\text{ mL}$  量瓶中, 摇匀。分

别精密量取此溶液  $2.5\text{ } 7.5\text{ } 10\text{ } 15\text{ } 25\text{ mL}$ , 置  $100\text{ mL}$  量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 在测定条件下分别进样  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 根据测得的峰面积对应头孢地嗪的浓度进行线性回归, 结果表明在  $4.18\sim 52.28\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内具有良好的线性关系。回归方程为:

$$Y = 13.2X + 34.8 \quad r = 0.9998$$

### 3.5 取样回收率 (取样效率)

通过计算头孢地嗪残留限度标准为  $0.37\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ , 因此确定了以下的回收试验浓度: 精确称量  $20\text{ mg}$  头孢地嗪对照品, 用流动相溶解并稀释至  $100\text{ mL}$ , 精密量取此溶液  $1\text{ mL}$ , 用流动相稀释至  $100\text{ mL}$  作为溶液 A。精密量取溶液 A  $0.5\text{ mL}$ , 用流动相稀释至  $10\text{ mL}$ , 得浓度为  $0.1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 1。精密量取溶液 A  $1\text{ mL}$ , 用流动相稀释至  $10\text{ mL}$ , 得浓度为  $0.2\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 2。精密量取溶液 A  $2\text{ mL}$ , 用流动相稀释至  $10\text{ mL}$ , 得浓度为  $0.4\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 3。取面积为  $100\text{ cm}^2$  洁净不锈钢片 9 片, 分别精密量取溶液 1 2 3 各  $1\text{ mL}$ , 均匀涂布于不锈钢片上, 3 个浓度  $\times$  3 个不锈钢片, 晾干。

放足够量的擦拭介质纯水于洁净的玻璃瓶中, 在容器中润湿两支棉签, 在瓶壁上按压使棉签去掉多余的液体, 将棉签头按在取样表面上, 用力使其稍弯曲, 平稳而缓慢的擦拭。在向前移动的同时将其从一边移到另一边, 擦拭应覆盖整个表面。翻转棉签用另一面擦拭, 但与上次擦拭移动方向垂直, 每一取样面积 (两支棉签) 表示  $100\text{ cm}^2$  表面积。擦拭方法见图 2。

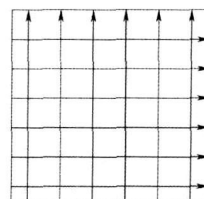


图 2 擦拭方法

Fig 2 The swabbing method

每个擦拭样品放入盛有  $2\text{ mL}$  流动相中的试管中, 用棉签轻轻搅动流动相并在管壁上挤压, 放置  $5\text{ min}$ , 以使物质溶出, 在测定条件下进样  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 记录色谱图, 用外标法进行定量测定。计算回收率, 结果见表 1。

### 4 清洁残留物测定

我厂设备为无菌粉针剂的分装设备, 已根据设备和产品的特点制定了一套完善的清洁程序, 并对取样位置的选择进行了充分的评估, 这里不再赘述, 根据以上验证方法对我厂清洁后的设备进行擦拭取样, 共 12 个取样点, 每个取样点取样面积  $100\text{ cm}^2$ , 测试结果均符合限度标准。

表 1 取样回收率结果

Tab 1 The results of sampling recovery

| 加入量<br>(added) / $\mu\text{g}$ | 测定值<br>(measured)<br>/ $\mu\text{g}$ | 回收率<br>(recovery)<br>/% | 平均回收率<br>(average<br>recovery) % | RSD % |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------|
| 10.02                          | 7.80                                 | 77.8                    | 81.8                             | 8.4   |
|                                | 7.67                                 | 76.6                    |                                  |       |
|                                | 8.90                                 | 88.9                    |                                  |       |
| 20.04                          | 15.09                                | 75.3                    | 80.6                             | 8.5   |
|                                | 17.71                                | 88.4                    |                                  |       |
|                                | 15.63                                | 78.0                    |                                  |       |
| 40.08                          | 35.60                                | 88.8                    | 88.2                             | 0.7   |
|                                | 35.21                                | 87.8                    |                                  |       |
|                                | 35.25                                | 88.0                    |                                  |       |

## 5 讨论

5.1 近年来,由于 GMP 在制药企业的不断深入贯彻和实施,设备的清洁验证工作越来越受到人们的重视。找到一种快速可靠的检测方法可有效地避免交叉污染,减少药害事件的发生,对提升质量控制水平、提高生产率具有重要意义。

5.2 现介绍一下残留物限度的计算方法。依据药物的生物学活性数据——最低日治疗剂量 (minimum treatment daily dosage, MTDD) 确定残留物限度是制药企业普遍采用的方法。从确保安全的角度出发,一般取最低日治疗剂量的 1/1000 位残留物限度的计算出发点。其依据是任何药物上市前都必须通过临床实验取得使用剂量的数据,上市后也必须不断跟踪其使用效果和临床副作用,从而确定对大多数适用的发挥预期治疗作用的剂量范围。在该剂量范围的下限 (即最低日治疗剂量) 以下,也还会产生一些生理活性。特别是对某些特别敏感的病人,产生活性或副作用的剂量可能低于 MTDD 很多倍。不同药物,不同人群的个体差异是不同的。根据临床药理学、毒理学和临床应用的观察统计,极少或基本未见药物个体差异达到 1000 倍的报道,也就是说,对于非常敏感的病人,如果服用了 MTDD 的 1/1000 也不会由此产生生理反应。这样就符合了 GMP 足够安全的理念。因此高生物活性药物宜采用本法来确定残留物限度。根据注射用头孢地嗪钠的使用说明书,可计算出头孢地嗪 MTDD

$$\text{MTDD (mg)} = \frac{\text{每次给药}}{\text{支数}} \times \frac{\text{每支有效成分含量}}{\text{成分含量}} \times \frac{\text{每日最少给药次数}}{\text{给药次数}} \\ = 250 \text{ mg}$$

后续产品最小批量数  $B = 2 \text{ kg}$  根据后续产品的使用说明书可计算出后续产品的最大日治疗剂量  $D_m = 12 \text{ g}$ 。对于确定的设备,内总表面积是一个定值,

我们设备的内总表面积  $S_A = 11167 \text{ cm}^2$ ,因此头孢地嗪表面残留物限度 ( $L_d$ ) 计算如下:

$$L_d = \frac{\text{最大允许残留物总量}}{\text{设备内总表面积}} \\ \text{允许残留物总量} = \text{MTDD} / 1000 \times 1000B / D_m \\ = 250 / 1000 \times 1000 \times 2 / 12 \\ = 41.67 (\text{mg})$$

为了确保安全,一般情况下再除以安全因子  $F$ ,通常情况注射剂安全因子  $F = 10$  因此:

$$\text{最大允许残留物总量} = 41.67 / 10 \\ = 4.17 (\text{mg})$$

$$\text{据此计算 } L_d = \text{MTDD} / 1000 \times 1000B / D_m \times 1 / F \times 1000 \times 1 / S_A \\ = 4.17 \times 1000 / 11167 \\ = 0.37 (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2)$$

5.3 本文利用 HPLC 法对头孢地嗪的检测进行了方法学研究,结果令人满意。并对棉签擦拭取样进行回收试验,结果回收率在 75.3% ~ 88.9%,平均回收率为 83.3%,这个结果也是很理想的。取样回收率实验表明了每次擦拭从取样表面能回收的样品的比例,受取样人员的影响较大,因此在我们实际计算棉签取样可接受限度 ( $L$ ) 时,为了更安全起见,取样效率我们取 50%,计算公式如下:

$$L = L_d \times \text{棉签取样面积} \times \text{取样效率} \times \text{回收溶剂量} \\ \text{我们对清洁后的设备进行棉签擦拭取样,每个取样点的面积为 } 100 \text{ cm}^2, \text{每个样品的回收溶剂量为 } 2 \text{ mL, 因此:}$$

$$L = 0.37 \times 100 \times 50\% / 2 \\ = 9.25 (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$$

计算棉签取样可接受限度 ( $L$ ) 的目的是为了在实际测定清洁残留物的实验过程中简单明了的判断一个取样点的残留物是否符合规定。因此,本试验所建立的测定方法,灵敏度高,重复性好,快速简便,可作为头孢地嗪清洁残留测定的一种有效检测手段。

5.4 清洁残留物的验证实验在我国的制药行业起步较晚,残留物限度的确定又是一个相当复杂的问题,没有一个法定的通用方法和标准。本文只是根据国内外的一些指南性文件以及我们的实践经验,确定了头孢地嗪的残留限度,希望能起到一个抛砖引玉的作用,其中存在的不足之处,非常愿意和同行们交流合作。

## 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部): Appendix(附录) XI E
- 2 Guideline of Drug Manufacturing Validation(药品生产验证指南) 2003 Beijing(北京): Chemistry Industry Press(化学工业出版社), 2003 191

(本文于 2009 年 1 月 23 日收到)