

## · 论 著 ·

## HPLC 法测定头孢羟氨苄原料及其制剂中有关物质的研究

刘云, 朱建平, 韩彬(河北省药品检验所, 石家庄 050011)

**摘要** 目的: 建立新的头孢羟氨苄原料及制剂有关物质的 HPLC 分析方法。方法: 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 流动相 A 为  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 (pH 5.0), 流动相 B 为甲醇, 采用梯度洗脱, 流速为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长为 220 nm。结果: 头孢羟氨苄与其降解产物在此条件下能够有效分离。结论: 本方法简便、专属性强, 可用于头孢羟氨苄原料及其制剂有关物质的检查, 亦可以进行稳定性研究中降解产物的色谱检查。

**关键词:** 高效液相色谱法; 头孢羟氨苄; 有关物质

中图分类号: 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2011)-3-174-5

## Determination of Related Substances in Cefadroxil and Preparations by HPLC

Liu Yun, Zhu Jian-ping, Han Bin(Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011)

**Abstract Objective:** To establish a new method for determination of Cefadroxil and Preparations by HPLC. **Method:** The separation was achieved by using an ODS column with gradient eluent composed of  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  potassium dihydrogen phosphate (pH 5.0) - methanol. The flow rate was  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The UV detection wavelength was at 220 nm. **Results:** Cefadroxil and its related substances can be separated effectively by this method. **Conclusion:** This method is simple and reliable. It is suitable for determination of the related substances of Cefadroxil and Preparations and can also be used to analysis degradation products in the stability experiments.

**Key words:** HPLC; Cefadroxil; Related substance

头孢羟氨苄(Cefadroxil)为 $\beta$ -内酰胺类抗生素,为具有良好抗菌活性的口服半合成头孢菌素,临床上广泛用于治疗呼吸道、泌尿道、口腔和皮肤软组织等部位的敏感菌感染,其生产过程中可能存在 7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-AD-CA)和 $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸等杂质。《中国药典》2005 年版该品种原料及制剂采用 HPLC 等度洗脱法测定有关物质,但在执行过程中发现一些问题,方法的系统适用性试验要求较难达到,有些杂质不能得到有效分离,并且流动相中磷酸二氢钾溶液的浓度较高。因此,参考 USP33 版、EP6.0 版、BP2008 年版、日抗基 2000 年版等多国药典,在《中国药典》2010 年版修订工作中,对其有关物质检查方法进行了比较研究,采用梯度洗脱方法进行有关物质的检查,并通过多个厂家提供的样品对两种测定结果进行了比对。结果表明本实验方法能使其各杂质峰得到有效检出,更好的保障产品的质量。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1200 型-2487 高效液相色谱仪;岛津 LC-2010C 高效液相色谱仪;Waters2695 高效液相色谱仪;电子分析天平 Sartorius BP211D 型;Sartorius S 20 型 pH 计。

头孢羟氨苄原料及其制剂(国内多家药厂提供);头孢羟氨苄、7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸及 $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈均为色谱纯;磷酸二氢钾等为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

## 2.1 色谱条件

色谱柱为 SUPELCO  $C_{18}$  ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ );流动相 A 为  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液(取 2.72 g 磷酸二氢钾于 800 mL 水中,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液调节 pH 值为 5.0,用水稀释至 1000 mL 混匀),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱条件见表 1。检测波长 220 nm;流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 溶液的制备

作者简介:刘云,女,主任药师。学科及研究方向:抗生素类药物研究。联系电话:13831199653。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	98	2
1	98	2
25	70	30
28	98	2
40	98	2

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取  $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸对照品(杂质 A) 10 mg 置 10 mL 量瓶中,用流动相 A 溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液(a);精密称取 7-ADCA 对照品(杂质 B) 10 mg 置 10 mL 量瓶中,用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液(b)。精密量取上述对照品溶液(a)和(b)各 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相 A 稀释至刻度,作为杂质对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 分别取不同厂家样品适量,用流动相 A 制成每 1 mL 含头孢羟氨苄 1 mg 的溶液(超声溶解),作为供试品溶液。

**2.2.3 自身对照溶液** 精密量取供试品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中,用流动相 A 稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

### 2.3 测定方法

精密量取供试品溶液、对照溶液与杂质对照品

溶液各 20  $\mu$ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。 $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸与 7-ADCA 的分离度应不小于 5.0。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,含  $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸与 7-ADCA 按外标法以峰面积计算,均不得过 1.0%;其他单个杂质的峰面积不得大于对照溶液主峰面积(1.0%),其他各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的 3 倍(3.0%)。

### 2.4 线性关系考察

精密称取头孢羟氨苄对照品,用流动相 A 制成浓度为 1.208 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。精密量取对照品储备液适量,用流动相 A 稀释制成 0.050 8  $\mu$ 、0.101 5  $\mu$ 、0.304 5  $\mu$ 、0.604 2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的相应对照品溶液。按上述方法进行测定。以对照品溶液浓度(C)为横坐标,色谱峰面积 A 为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为:

$$A = 2 \times 10^7 C + 199\ 034 \quad r = 0.999\ 8 (n = 5)$$

结果表明,头孢羟氨苄在 0.050 8 ~ 1.208 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性关系良好。

### 2.5 专属性考察

**2.5.1 空白干扰试验** 按照各药厂提供的处方称取每种辅料的量(相当于 250 mg 规格一粒的量),加流动相 A 250 mL 超声溶解后,过滤,精密量取 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪,结果见图 1~3。

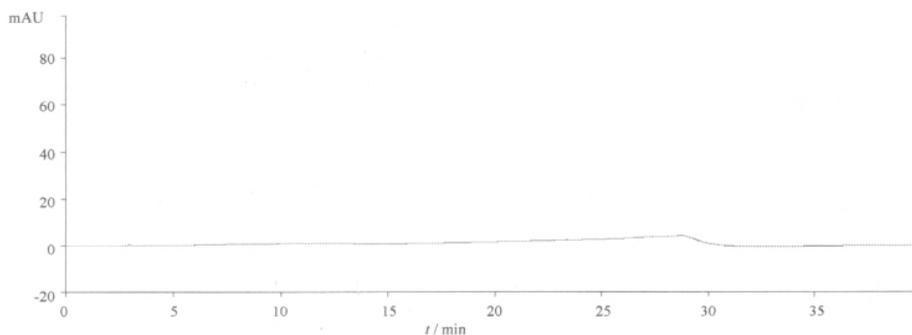


图 1 空白干扰试验色谱图

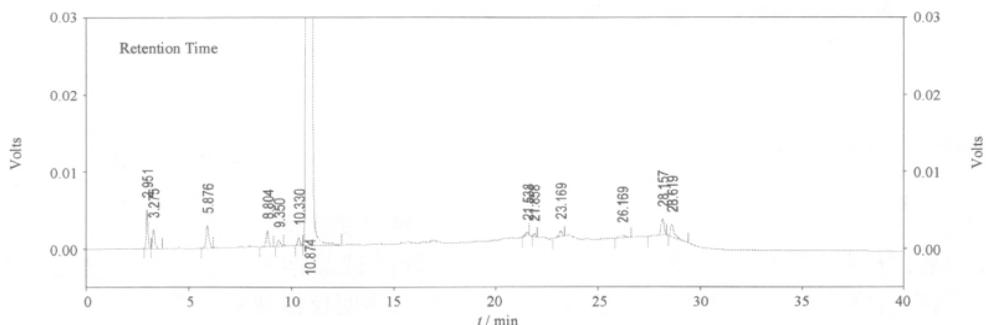


图 2 头孢羟氨苄色谱图(新方法)

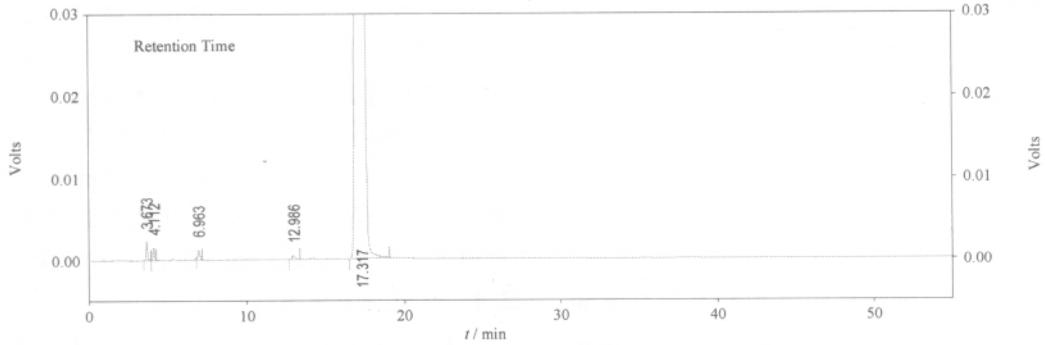


图 3 头孢羟氨苄色谱图(2005 年版药典方法)

2.5.2 破坏性试验 采用有关物质检查方法分别对原料及制剂进行高温(100 °C 水浴中放置 30 min)、强酸(5 mol · L<sup>-1</sup> HCL)、强碱(0.5 mol · L<sup>-1</sup> NaOH)、氧化(30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、光照(照度约 1 500 Lx 的灯箱内,放置 15 d 左右)等破坏试验,试验表明氧

化、酸和碱破坏的样品能产生较多降解物,其主要杂质峰位于主峰之前。在此条件下,能保证主要杂质的检出及最大量的检出杂质,且色谱峰信息较多,各峰分离良好。氧化破坏试验后杂质测定的典型色谱图见图 4~6。

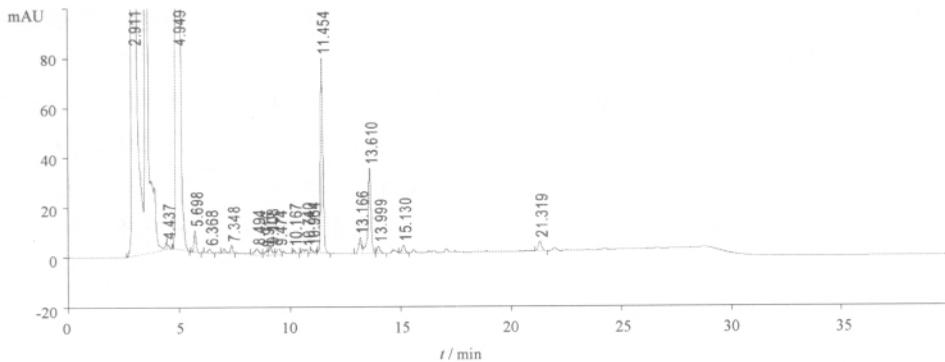


图 4 头孢羟氨苄氧化破坏色谱图

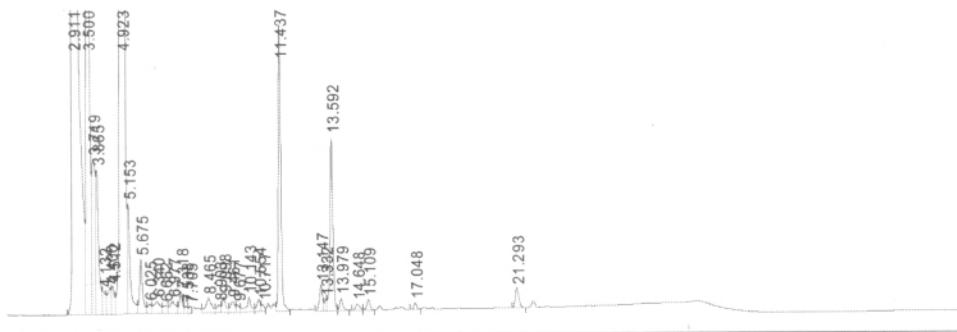


图 5 头孢羟氨苄胶囊氧化破坏色谱图

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,分别于 0,1,2,6,12,24 h 依法测定,有关物质测得结果基本一致,表明供试品溶液稳定性良好。

2.7 精密度试验

取供试品溶液,依法连续测定 6 次,RSD 为 0.02% 表明仪器精密度良好。

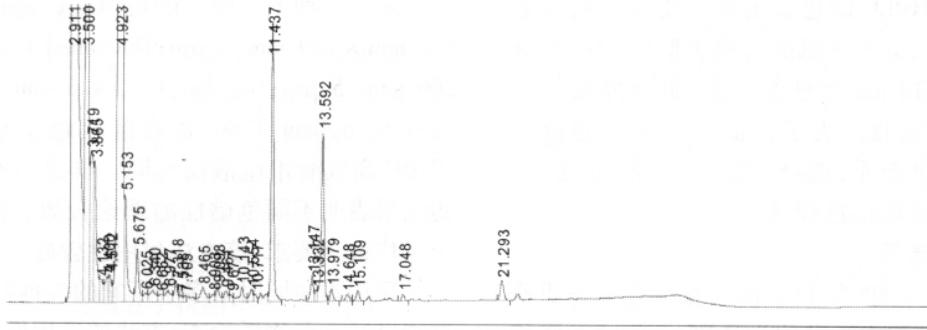


图 6 头孢羟氨苄颗粒氧化破坏色谱图

## 2.8 检出限和定量限

以信噪比  $S/N \approx 3$ , 测得最低检出限为 0.61 ng; 以信噪比  $S/N \approx 10$  测得最低定量限为 3.03 ng。

## 2.9 供试品中有关物质的测定

采用本实验方法和《中国药典》2005 年版方法, 对不同厂家的原料及制剂有关物质进行测定, 其中因为颗粒的生产厂家较少, 因此只比对了两个厂家, 结果见表 1~3。

表 1 头孢羟氨苄有关物质测定结果比对(%)

	有关物质	厂家 1	厂家 2	厂家 3	厂家 4	厂家 5
新方法	7-ADCA	0.027 7	0.066 1	0.072 1	0.061 4	0.054 2
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.009 0	0.105 8	0.110 9	0.072 1	0.106 17
	单一杂质	0.059 7	0.061 6	0.058 7	0.045 7	0.058 7
	其他杂质总和	0.347 7	0.224 3	0.193 6	0.184 7	0.232 0
2005 年版药典方法	7-ADCA	0.016 5	0.102 3	0.074 8	0.092 0	0.089 3
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.008 5	0.046 9	0.037 7	0.044 1	0.061 3
	单一杂质	0.082 7	0.067 0	0.056 3	0.045 7	0.056 8
	其他杂质总和	0.159 9	0.139 9	0.102 5	0.084 5	0.093 8

表 2 头孢羟氨苄胶囊有关物质测定结果比对(%)

	有关物质	厂家 1	厂家 2	厂家 3	厂家 4	
新方法	7-ADCA	0.050 7	0.056 4	0.056 4	0.100 1	0.055 8
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.075 3	0.097 2	0.097 2	0.060 7	0.086 4
	单一杂质	0.055 9	0.047 2	0.047 2	0.094 3	0.046 0
	其他杂质总和	0.329 2	0.133 8	0.133 8	0.272 8	0.192 5
2005 年版药典方法	7-ADCA	0.016 5	0.102 3	0.102 3	0.092 0	0.089 3
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.009 5	0.047 9	0.047 9	0.044 1	0.061 3
	单一杂质	0.083 7	0.067 3	0.067 3	0.045 7	0.056 8
	其他杂质总和	0.157 9	0.138 9	0.138 9	0.084 5	0.093 8

表 3 头孢羟氨苄颗粒有关物质测定结果比对(%)

	有关物质	厂家 1	厂家 2
新方法	7-ADCA	0.068 2	0.135 8
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.097 8	0.062 8
	单一杂质	0.085 9	0.044 9
	其他杂质总和	0.288 2	0.202 1
2005 年版药典方法	7-ADCA	0.095 0	0.059 7
	$\alpha$ -对羟基苯甘氨酸	0.069 0	0.048 6
	单一杂质	0.046 6	0.068 6
	其他杂质总和	0.089 0	0.121 6

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的确定

《中国药典》2005 年版头孢羟氨苄有关物质测定波长为 230 nm, 对样品进行热、酸、碱、光以及氧化强制破坏试验研究表明, 氧化、酸和碱破坏的样品能产生较多降解物, 其主要杂质峰位于主峰之前。同时利用 DAD 检测器的全波长扫描, 在 215~254 nm 波长范围内选取不同波长,

对主要杂质的 HPLC 的色谱图进行比较。扫描结果在 220 nm 时,  $\alpha$ -苯甘氨酸有最大吸收, 7-ADCA 在 220 nm 和 230 nm 无显著区别, 头孢羟氨苄在 230 nm 有最大吸收。为了保证主要杂质的检出及最大的检出杂质, 选择 220 nm 为测定波长, 在此波长处色谱峰信息较多。

### 3.2 流动相的选择

《中国药典》2005 年版头孢羟氨苄有关物质检查及含量测定方法中流动相为 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液-乙腈(96:4), 系统适用性试验要求 7-ADCA 和头孢羟氨苄的保留时间比值不小于 2.0, 实验中发现此要求较难达到, 且流动相中磷酸二氢钾溶液的浓度较高, 易析出晶体, 堵塞色谱柱乃至损伤柱塞泵的密封性。本实验方法有关物质检查采用梯度洗脱方法, 流动相中磷酸二氢钾溶液的浓度得到降低, 且各峰分离良好。

### 3.3 方法的耐用性

采用 3 种不同牌号的色谱柱( Capcell Pak, C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm; Diamonsil C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 200 mm, 5 μm; Supelco, C<sub>18</sub>, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 及 Agilent 1200 高效液相色谱仪、岛津 LC-2010C 高效液相色谱仪对同一样品进行了测定, 实验结果表明不同色谱柱的理论板数、分离度及拖尾因子均符合要求, 该方法耐用性较好。

采用本法同时对多个厂家的头孢羟氨苄原料及制剂进行有关物质检查, 方法的适用性良好, 并将结果与《中国药典》2005 年版方法测定结果比较, 有关物质较之更能得到有效分离, 该方法适用于头孢羟氨苄及其制剂的质量控制。

### 参考文献

- [1] 中国药典. 2005 年版. 二部[S]. 2005: 153-155.
- [2] 欧洲药典. 第六版[S]. 6. 0: 1436.
- [3] 英国药典. 2008 年版[S]. 2008: 416.
- [4] 美国药典. 33 版[M]. 33: 1646.

## 凝胶色谱法测定普鲁卡因青霉素中的高分子聚合物

殷果<sup>1</sup>, 秦斌<sup>1</sup>, 邓颖<sup>1</sup>, 仇士林<sup>2</sup> (1. 深圳市药品检验所, 深圳 518029; 2. 上海市食品药品监督管理局, 上海 200030)

**摘要** 目的: 建立普鲁卡因青霉素中高分子聚合物测定方法。方法: 采用凝胶色谱法。色谱柱为 Sephadex G-40(40~120 μm) 凝胶柱, 流动相 A 为 0.03 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 流动相 B 为超纯水, 流速 1.5 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm。结果: 普鲁卡因青霉素的进样浓度在 10~50 mg · mL<sup>-1</sup> 的范围内与青霉素聚合物的峰面积呈良好线性关系( $r = 0.9996$ )。结论: 该方法灵敏、准确、简便, 可用于本品的质量控制。

**关键词:** 凝胶色谱法; 普鲁卡因青霉素; 高分子杂质

中图分类号: 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2011)-3-178-4

## Determination of the High Molecular Weight Impurities in Procaine Benzylpenicillin by Gel Filtration Chromatography

Yin Guo<sup>1</sup>, Qin Bin<sup>1</sup>, Deng Ying<sup>1</sup>, Qiu Shi-lin<sup>2</sup> (1. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518029; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 200030)

**Abstract Objective:** To establish a method for determination of high molecular impurities in Procaine Benzylpenicillin. **Method:** Gel filtration chromatography was adopted. The analytical column was Sephadex G-40 gel column; mobile phase A: 0.03 mol · L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.0); mobile phase B: pure water; the flow rate: 1.5 ml · min; the wavelength: 254nm. **Results:** The calibration curve was linear in the concentration range of 10~50 mg · mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9996$ ). **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, simple, and control of Procaine Benzylpenicillin.

**Key Words:** Gel filtration chromatography; Procaine Benzylpenicillin; High-molecular weight impurity

作者简介: 殷果, 女, 主管药师。学科及研究方向: 药物分析。联系电话: 13926503730。