

# 梯度洗脱HPLC法检查头孢他啶原料药中的有关物质

苑 华<sup>1\*</sup>,张 冬<sup>2</sup>,黄亚龙<sup>2</sup>,常 旻<sup>3</sup>(1.石家庄市食品药品检验所,石家庄 050031;2.河北省食品药品检验院,石家庄 050011;3.河北医科大学第四医院,石家庄 050011)

中图分类号 R927.2;R978.1\*1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4286-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.22

**摘要** 目的:建立检查头孢他啶原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Apollo C<sub>18</sub>,以磷酸盐缓冲溶液(pH 3.4)和乙腈分别为流动相A和流动相B,梯度洗脱,检测波长为254 nm,流速为1.1 ml/min,柱温为45 ℃;同时与《中国药典》方法比较检查结果。结果:本方法可分离出头孢他啶的11个相关杂质,分析时间约为30 min,出峰均匀且各峰间分离度良好,检测限为0.4 ng;《中国药典》方法可分离出10个杂质,主峰前各杂质分离度不好,分析时间为55 min左右。结论:与《中国药典》方法比较,本方法具有分离杂质多、分离度好、分析时间短的优点,可作为头孢他啶原料药中有关物质的分析方法。

**关键词** 高效液相色谱法;头孢他啶原料药;梯度洗脱;有关物质

## Determination of Related Substances in Ceftazidime Raw Material Using Gradient Elution of HPLC

YUAN Hua<sup>1</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>, HUANG Ya-long<sup>2</sup>, CHANG Yang<sup>3</sup>(1. Shijiazhuang Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050031, China; 2. Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in ceftazidime raw material. METHODS: HPLC method was adopted. Apollo C<sub>18</sub> column was used with phosphate buffer (pH 3.4) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B (gradient elution) at the flow rate of 1.1 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was kept at 45 ℃. It was compared with that stated in *Chinese Pharmacopiea*. RESULTS: By this method, 11 related impurities could be well separated, the analysis lasted for 30 min and the peaks appeared uniform and were well-separated. The limit of the detection was 0.4 ng. 10 impurities were isolated by the method stated in *Chinese Pharmacopiea*. The impurities were poor separated before main peaks appeared. The analysis lasted for 55 min. CONCLUSIONS: The method is superior than that stated in *Chinese Pharmacopiea* in the number of the impurities, well-separated and short analysis term, which can be used for quality control method of ceftazidime raw material.

**KEY WORDS** HPLC; Ceftazidime raw material; Gradient elution; Related substances

程<sup>[5]</sup>,同时采用崩解性能优良的PVPP作为崩解剂,极大地提高了分散片的崩解性能。在稀释剂的使用上,选用具有一定崩解性能的MCC和水溶性较好的乳糖相结合的方式,很好地改善了分散片的崩解溶出性能。因此,对于难溶性药物制备的分散片,辅料的选择对于分散片的质量控制起到了关键作用<sup>[6]</sup>。

在处方初步筛选过程中,分别对PVPP内加法、外加法以及部分内加部分外加法进行了考察。结果表明,内外加结合方式所制分散片崩解效果较好。通过正交试验进一步对内加PVPP质量比进行筛选,保证了片剂崩解后颗粒的分散性。对所制分散片在40 ℃、相对湿度75%的条件下考察30 d,片剂外观基本没有变化,有关物质略微增加,含量基本保持不变。

本研究中优选的处方以100片投料量计算,地拉罗司原料药用量为12.5 g,乳糖用量为11.0 g, MCC用量为5.0 g, PVP-K30用量为0.7 g,内加PVPP质量比为7.2 g, SDS用量为0.4 g,纯化水用量为10.86 g,外加PVPP用量为2.8 g, MS用量为0.4 g。

通过以上试验结果分析可以得出,地拉罗司分散片崩解

迅速、溶出性能优良、分散均匀性良好,符合分散片制剂要求;且其处方合理、制备工艺稳定,具有较高的开发应用价值。但其体内生物利用度情况还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 李玉珍,徐玉红,李成,等.伐昔洛韦分散片的处方筛选研究[J].中国药房,2006,17(23):1 772.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录 I A.
- [3] Kaja RK, Surendranath KV, Radhakrishnanand P, et al. A stability indicating LC method for deferasirox in bulk drugs and pharmaceutical dosage forms[J]. *Chromatographia*, 2010, 72 (9):441.
- [4] 陈秀.阿奇霉素分散片的处方工艺研究及质量考察[J].中国抗生素杂志,2010,35(9):675.
- [5] 程渝.头孢泊肟酯分散片的处方筛选及稳定性研究[J].中国药房,2006,17(21):1 613.
- [6] 朱立俏,盛华刚.昆分分散片处方工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):34.

(收稿日期:2013-09-23 修回日期:2013-11-08)

\* 副主任药师。研究方向:药品检验与质量标准研究。电话:0311-67803326。E-mail: yuanhua\_sj@163.com

头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)系第3代头孢菌素,为英国 Glaxo公司首创。因其分子结构中含有 $\beta$ -内酰胺环,化学稳定性较差,易产生降解产物<sup>[1]</sup>。《英国药典》(BP) 2011年版<sup>[2]</sup>、《日本药局方》十五版改正版<sup>[3]</sup>均收录了该品种有关物质的检查方法。《中国药典》2010年版<sup>[4]</sup>与2005年版比较也增加了其有关物质的检查,但《中国药典》方法的分析时间长达55 min左右。为此,笔者参考BP2011年版该品种有关物质检查方法,建立了梯度洗脱测定头孢他啶有关物质的高效液相色谱(HPLC)法,建立的方法在流动相组成和梯度洗脱程序上与《中国药典》2010年版方法均有不同。结果表明,本方法具有分离杂质多、分离度好、分析时间短(30 min左右)的优点,建议可作为头孢他啶有关物质的分析方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AT HPLC仪(日本岛津公司)。

### 1.2 药品与试剂

头孢他啶对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130484-200803,纯度:84.8%);头孢他啶原料药(A厂,批号:0630GJ82J-D、0631GJ82J-D、0632GJ82J-D,纯度:84.2%、84.4%、84.2%;B厂,批号:100631018、100631019、100631020,纯度:84.4%、84.0%、84.5%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Apollo C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相:流动相A为磷酸盐缓冲溶液(取磷酸氢二钠3.6 g、磷酸二氢钾1.4 g,加水溶解并稀释至1 000 ml,用10%磷酸调节pH至3.4),流动相B为乙腈,线性梯度洗脱,流速:1.1 ml/min;柱温:45  $^{\circ}$ C;检测波长:254 nm;进样量:10  $\mu$ l。梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	95	5
4	89	11
5	89	11
8	84	16
11	80	20
15	50	50
18	20	80
22	20	80

### 2.2 系统适用性试验

取头孢他啶对照品溶液[用流动相A-B(95:5)溶解配制成质量浓度为1.5 mg/ml]于80  $^{\circ}$ C水浴中放置2 h,取出,放冷至室温;过滤,取续滤液作为系统适用性溶液,取10  $\mu$ l注入色谱仪,头孢他啶峰与其前相邻杂质峰的分度应不小于4.0。结果,理论板数按头孢他啶计为76 507,头孢他啶与其前杂质峰的分度为6.9,各杂质峰间基本实现基线分离,分度大多在2.0以上。头孢他啶的出峰时间为10.5 min,位于色谱图的中部,杂质峰均匀分布于主峰两侧。

### 2.3 溶液的制备

供试品溶液:取头孢他啶原料药适量(约相当于头孢他啶

150 mg),精密称定,置于100 ml量瓶中,加适量水溶解后,加乙腈5 ml,再用水稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

对照溶液:精密量取供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加乙腈5 ml,用水稀释至刻度。

### 2.4 专属性试验

精密称取头孢他啶对照品约15 mg各5份,分别置于10 ml量瓶中,再进行以下操作:(1)酸破坏:加0.1 mol/L HCl溶液2 ml溶解,放置6 h,加0.1 mol/L NaOH溶液2 ml,加水稀释至刻度。(2)碱破坏:加0.1 mol/L NaOH溶液1 ml溶解,放置4 min,加0.1 mol/L HCl溶液1 ml,用水稀释至刻度。(3)氧化破坏:加10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液1 ml溶解,放置5 min,水稀释至刻度。(4)高温破坏:加水溶解并稀释至刻度,于80  $^{\circ}$ C水浴中放置2 h,取出,放冷至室温。(5)光照破坏:加水溶解并稀释至刻度,摇匀,于5 800 lx照度下放置9 h。上述各溶液滤过后取续滤液作为供试液。

结果显示,氧化、碱、高温破坏对样品的影响较大,各杂质峰总量均达到10%以上,但基本可实现基线分离;主峰纯度均已达到99.99%以上,提示方法专属性较强。色谱图详见图1(其余图略)。

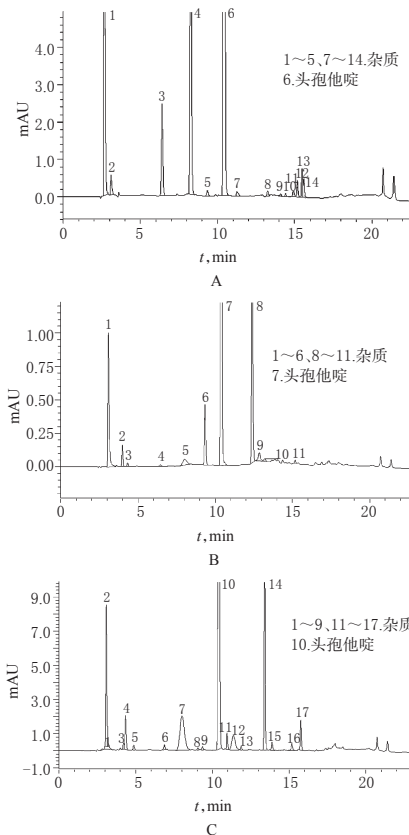


图1 破坏性试验高效液相色谱图

A.氧化破坏后对照品;B.碱破坏后对照品;C.高温破坏后对照品

Fig 1 HPLC chromatograms of destructive tests

A. control destroyed by oxidation; B. control destroyed by alkali; C. control destroyed by high temperature

### 2.5 检测限试验

精密称取头孢他啶对照品约10 mg,置于10 ml量瓶中,用流动相[A-B(95:5)]溶解并稀释至刻度;精密吸取该溶液,用流动相稀释10 000倍。分别取该液10、5、3  $\mu$ l注入色谱仪,根据

色谱峰高以信噪比为3,确定头孢他啶的检测限为0.4 ng。

## 2.6 精密度试验

取头孢他啶对照品溶液(约1.5 mg/ml),重复进样测定6次,结果主成分峰面积的RSD=0.36% (n=6),表明本方法精密度良好。

## 2.7 重复性试验

取同一份样品(批号:0630GJ82J-D)共6份,制备成供试品溶液后进样测定,结果单一杂质的RSD=0.9%,杂质总量的RSD=1.2% (n=6),表明本方法重复性良好。

## 2.8 稳定性试验

取头孢他啶供试品(批号:0630GJ82J-D)溶液,在室温下放置0、1.5、2.5、4.5、7.5、9.5 h后分别测定,记录色谱图,结果溶液在放置过程中,杂质量渐多,主成分峰面积渐低。建议溶液临用新配。

## 2.9 耐用性试验

分别选用3种不同的色谱柱对同一批供试品溶液进行测定, I : Gemini C<sub>18</sub> 110A (250 mm×4.6 mm, 3 μm), II : Apollo C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); III : Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2)100A (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果均达到满意的分离效果,最大单一杂质和杂质总和的RSD均小于1.5%。

## 2.10 样品中有关物质的检查

取2个厂家6批样品的对照溶液10 μl注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分的色谱峰高约为满量程的10%。精密量取供试品溶液和对照溶液各10 μl注入色谱仪,记录色谱图,以主成分自身对照法计算杂质质量;同时采用《中国药典》方法进行检查。结果表明两种方法的检查结果基本一致,详见表2、图2(图2为批号0630GJ82J-D的样品)。

表2 两种方法检查样品中有关物质的结果比较(%)

Tab 2 Comparison of the determination results of related substance in samples by 2 methods(%)

生产厂家	批号	本方法		《中国药典》方法	
		单一杂质	杂质总量	单一杂质	杂质总量
A厂家	0630Gj82J-D	0.3	0.9	0.3	1.0
	0631Gj82J-D	0.3	1.0	0.3	1.1
	0632Gj82J-D	0.3	1.0	0.3	1.0
B厂家	100631018	0.3	0.6	0.3	0.6
	100631019	0.3	0.7	0.3	0.7
	100631020	0.3	0.7	0.3	0.5

由图2A可见,本方法检出杂质11个,主峰前有5个杂质,后面有6个杂质,各个杂质的分离度较好,基本达到2.0以上;《中国药典》方法检出杂质10个,主峰前有7个杂质,后面有3个杂质,但主峰前杂质分离度不高。

## 2.11 限度的确定

根据样品测定结果,并考虑到样品在有效期内的变化,将限度制订为单一杂质不得过0.5%、杂质总量不得过2.0%。

## 3 讨论

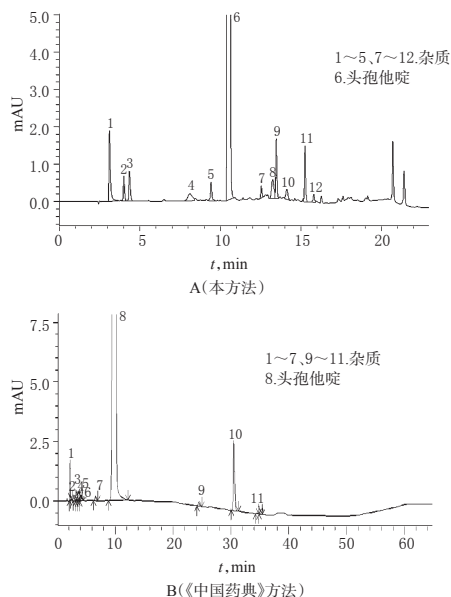


图2 两种方法检查有关物质的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of related substance by 2 methods

当初初始流动相比例为A-B(95:5)时,各杂质峰基本可达到基线分离,但头孢他啶主峰的出峰时间在12 min左右;当调整流动相比例为A-B(93:7)时,主峰保留时间在9 min左右,但主峰前的各杂质峰无法达到基线分离。为此,在维持原流动相比例[A-B(95:5)]条件下,将柱温升高为45℃。结果主峰与杂质峰间可实现基线分离,头孢他啶与其前杂质峰的分离度较好,各杂质峰间基本可实现基线分离;主峰出峰时间合适,位于色谱图的中部,杂质峰均匀分布于主峰两侧,结果满意。

从本方法的梯度洗脱程序来看,本方法梯度调整比较细,最长的保持4 min,从而使各个杂质能均匀洗脱;而《中国药典》方法的梯度变化较粗略,前14 min流动相没有变化,出峰较密集。且本方法测定有关物质样品的分析时间比《中国药典》方法大大缩短。因此,笔者认为本方法可作为头孢他啶有关物质的分析方法。

## 参考文献

- [1] 屠洁,同志刚.头孢他啶稳定性及其制剂的有关物质分析及稳定性研究[J].中国药科大学学报,2002,33(2):113.
- [2] British Pharmacopoeia. *British Pharmacopoeia Commission*[S]. 2011ed. Norwich: The Stationery Office, 2011: 434-436.
- [3] 日本药局方编辑委员会.日本药局方[S].第十五版改正版.东京:日本厚生省,2006:666-668.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:174-176.

(收稿日期:2013-02-18 修回日期:2013-06-05)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅