

注射用头孢孟多酯钠中有关物质的 HPLC 测定

张含智, 缪天瑶, 秦峰, 刘浩*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 建立了高效液相色谱法测定注射用头孢孟多酯钠中的有关物质。选择 BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱, 以 0.05 mol/L 甲酸铵溶液 (用甲酸调至 pH 4.5, A) : 乙腈 (B) 为流动相, 线性梯度洗脱, 检测波长 254 nm。结果主成分头孢孟多酯与相邻杂质, 以及各杂质之间均能分离完全, 并确定了已知有关物质 A、C、D、E 的相对保留时间。头孢孟多酯在 1 ~ 10 μg/ml 范围内线性关系良好。本方法重复性好、灵敏度高, 适用于注射用头孢孟多酯钠中有关物质的分析。同时本研究采用主成分自身对照法, 定性、定量测定了不同批次产品中的有关物质 A、C、D、E, 旨在更好地控制产品质量。

关键词: 注射用头孢孟多酯钠; 有关物质; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: TQ460.7⁺2; O657.7⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2018)05-0662-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.05.019

头孢孟多酯钠 (cefamandole nafate, **1**) 为头孢菌素类抗菌药, 容易在水溶液中发生降解反应, 脱去苄位上的甲酰基生成头孢孟多 (cefamandole, **2**) 而发挥药效。本品对多数革兰阳性球菌有较强的抗菌作用, 用于敏感菌所致的肺部感染、尿路感染、胆道感染等的治疗^[1]。国内不同厂家生产的注射用 **1** 的生产工艺、处方及临床使用方法不尽相同, 造成有关物质可能存在较大差异。中国药典 2015 年版 (ChP 2015) 二部仅规定了注射用 **1** 中的单个杂质及各杂质之和不得过 1.0% 和 3.0%, 欧洲药典 9.0 版 (EP 9.0) 纳入了 4 个已知杂质, 分别为 (*R*)-*O*-甲酰基扁桃酰基-3-去乙酰氧基头孢烷酸 (杂质 A, **3**)、(*R*)-*O*-乙酰基头孢孟多酯 (杂质 C, **4**)、5-巯基-1-甲基四唑 (杂质 D, **5**) 和 (*R*)-*O*-甲酰基扁桃酰基-3-乙酰氧基头孢烷酸 (杂质 E, **6**), 但并没有对各杂质进行定位, 也未规定其限度。据报道^[2-3], **1** 有关物质的分析方法有 HPLC、LC/MS 等。本研究将 **1** 的起始原料 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA, **7**)

和中间产物 3-[[(1-甲基-1*H*-四唑-5-基) 巯基]-甲基] 头孢烷酸 (7-ATCA, **8**) 与 **1** ~ **6** 组成系统适用性溶液, 经过色谱柱筛选、流动相组成优化等, 建立了新的 HPLC 法用于分析注射用 **1** 中的有关物质 (化合物结构见图 1)。本方法可以有效实现有关物质的分离及检测, 重复性及灵敏度均较好。通过对不同厂家制剂的分析, 为制定杂质限度提供了参考。

1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

1 对照品 (中国食品药品检定研究院, 质量分数 88.2%, 含 **2** 0.9%); **1** 原料药 (代号 S1)、**3** ~ **8** 均由 A 企业提供; 8 批注射用 **1**, 分别来自 8 家企业, 规格均为 1.0 g, 代号分别为 S2 ~ S9。甲酸铵、甲酸和乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

稀释剂: 即 0.05 mol/L 甲酸铵溶液 (用甲酸调至 pH 4.5) : 乙腈 (98 : 2)。

供试品溶液及自身对照溶液: 精密称取供试品 (制剂或原料药) 适量, 加稀释剂溶解并定量稀释, 制成 0.5 mg/ml 的供试品溶液, 临用新制; 精密量取供试品溶液 1 ml, 置 100 ml 量瓶中, 用稀释剂稀释定容, 摇匀, 作为自身对照溶液。

系统适用性溶液: 分别精密称取 **1** 对照品和有关物质 **3** ~ **6** 各适量, 加稀释剂溶解并稀释, 制成

收稿日期: 2017-11-19

作者简介: 张含智 (1987—), 男, 博士, 药师, 从事抗生素药品质量分析与控制研究。

Tel: 18001677326

E-mail: zzzw-123@163.com

通信联系人: 刘浩 (1968—), 男, 博士, 主任药师, 主要从事抗生素药品质量分析与控制研究。

Tel: 021-50798183

E-mail: liuhao1968@hotmail.com

2 mg/ml 的溶液；另分别精密称取有关物质 7 和 8 适量，加少量 DMSO 溶解，再加稀释剂稀释制成浓度为 1 和 0.5 mg/ml 的溶液。分别精密吸取 1 对照品溶液 100 μ l，3 ~ 6 溶液 10 μ l，7 溶液 20 μ l，以及 8 溶液 40 μ l，混匀。精密吸取上述溶液 20 μ l，加稀释剂 180 μ l，混匀，即得系统适用性溶液。

2.2 HPLC 条件

色谱柱 BDS Hypersil C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)；流动相 0.05 mol/L 甲酸铵溶液 (用甲酸调至 pH 4.5, A)：乙腈 (B)，线性梯度洗脱 (见表 1)；流速 1.0 ml/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；样品室温度 4 $^{\circ}$ C；检测波长 254 nm；进样量 20 μ l。

取系统适用性溶液进样测定，典型色谱图见图 2A。1 与相邻杂质 4、6 均可实现基线分离。3 ~ 8 的相对保留时间 (RRT) 分别为 0.92、1.03、0.16、0.97、0.34 和 0.56，可以通过 RRT 对制剂中的已知有关物质进行定位及限度分析。

2.3 专属性试验

精密称取 1 原料药 5 mg，置 10 ml 量瓶中，加稀释剂 2 ml 使溶解，分别进行酸、碱、加热、氧化

表 1 梯度洗脱表

Tab.1 Gradient Elution Conditions

t/min	A/%	B/%
0	98	2
8	98	2
10	95	5
30	60	40
50	40	60
52	98	2
60	98	2

破坏，酸、碱破坏样品须中和，然后用稀释剂定容，摇匀，分别进样。结果见图 3。可见，降解产生的杂质在本色谱条件下均可实现有效分离，且不影响 1 及已知杂质的检测。

2.4 线性试验

精密称取 1 对照品适量，加稀释剂溶解并定容，制备成 100 μ g/ml 的贮备液。精密吸取贮备液适量，分别稀释制成 1、2.5、5、7.5 和 10 μ g/ml 的系列浓度溶液，分别进样测定。以溶液浓度 c 为横坐标，峰面积 A 为纵坐标，进行线性回归，得回归方程： $A=23.757c+0.9294$ ， $r^2=0.9998$ 。1 在 1 ~ 10 μ g/ml 范围内线性关系良好。1 的检测限 (LOD) 和定量限

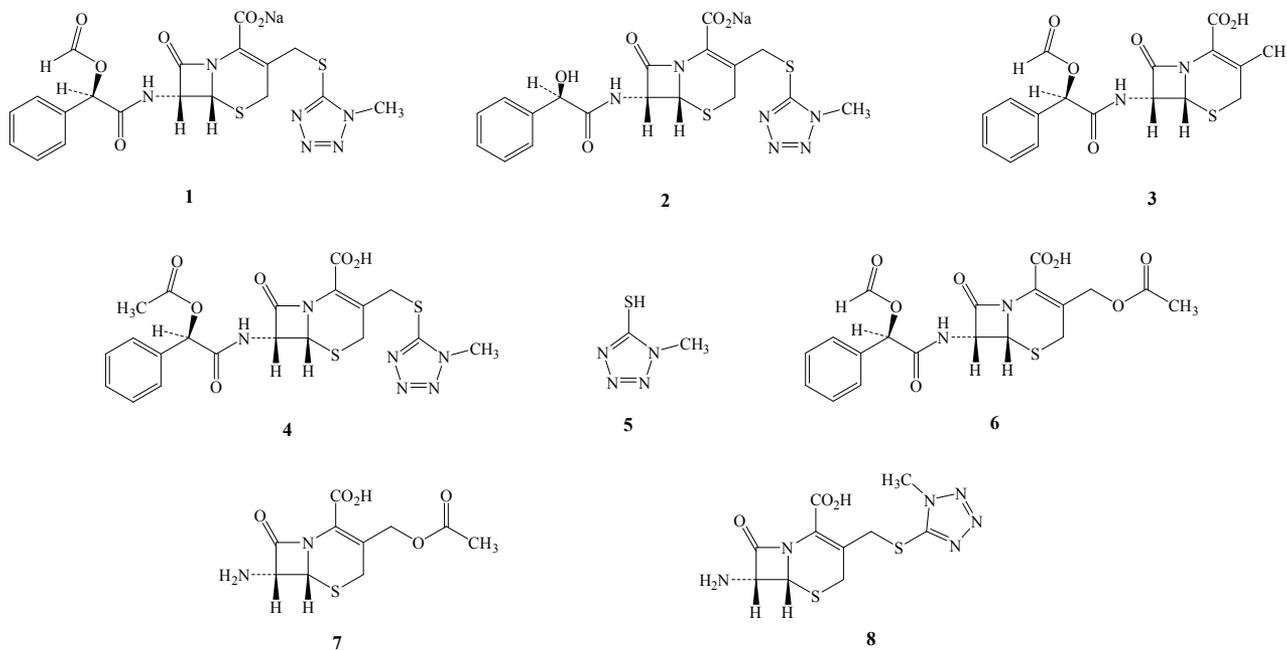
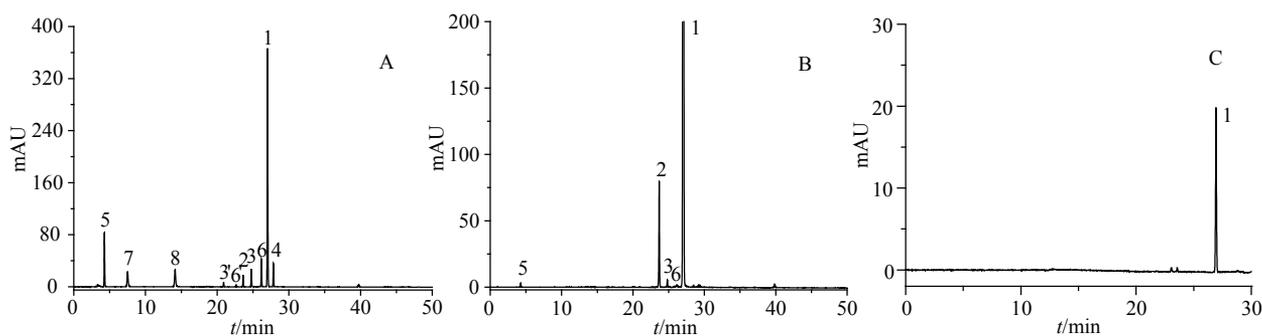


图 1 1 及其有关物质的结构

Fig.1 Structures of 1 and Its Related Substances



A: 系统适用性溶液, B: 供试品溶液, C: 自身对照溶液
1-1; 2-2; 3-3; 4-4; 5-5; 6-6; 7-7; 8-8; 3'-6'脱去苯位上甲酰基后的产物

图 2 典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatograms

(LOQ) 为 0.10 和 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 重复性试验

分别称取注射用 1 (S2) 适量, 共 6 份, 加稀释剂制成 0.5 mg/ml 的供试品溶液 (临用新制), 连续进样, 记录色谱图。因 1 在溶液环境下易脱去苯位甲酰基生成 2, 同时降解产生 3 和 5, 因此选择 1、2、3 与 5 考察峰面积随时间的变化情况, 结果计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.4%、1.2%、1.4% 和 1.9%。

2.6 稳定性试验

取“2.5”项下供试品溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别放置 0、1、2、3、4 和 5 h 后进样测定, 记录色谱图。计算得 1、2、3 和 5 峰面积的 RSD 分别为 0.39%、18.54%、2.18% 和 17.14%。根据试验结果, 供试品溶液放置 1 h, 2 与 5 峰面积即发生较大变化, 建议临用新制。

2.7 回收率试验

精密称取 1 原料药适量, 分别精密加入 1 对照品适量, 加稀释剂制成 80%、100% 和 120% 浓度水平的回收率溶液, 各 3 份, 分别进样测定, 记录色谱图。结果 1 的平均回收率为 100.3%, RSD 为 2.0% ($n=9$)。

2.8 样品测定

采用以上有关物质分析方法, 对不同企业生产的注射用 1 进行检测。由于不同企业的生产工艺不尽相同, 各有关物质的含量存在差异, 其中 S2 及其自身对照溶液的典型色谱图见图 2。按主成分自身对照法进行计算, S2 ~ S9 中的 3、4、5、6、其

他单个未知杂质及各杂质之和结果见表 2, 各批供试品中未检出 7 和 8。通过本研究结果可以初步拟定各有关物质的控制限度。

表 2 注射用 1 中有关物质的检测结果 /%
Tab.2 Results of the Related Substances in 1 for Injections/%

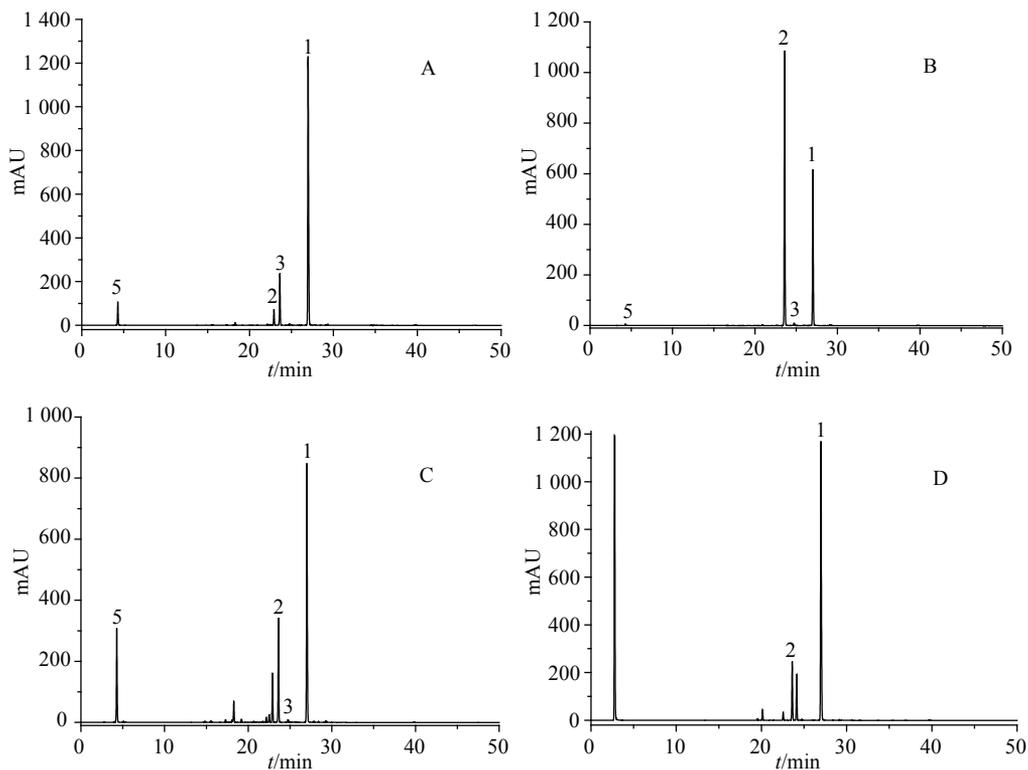
样品	3	4	5	6	其他单个未知杂质	各杂质之和
S2	0.3	—	0.1	0.1	0.3	1.5
S3	0.3	0.1	0.1	—	0.2	1.0
S4	0.3	—	0.1	0.1	0.2	1.1
S5	0.2	—	0.1	0.1	0.1	1.0
S6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.8
S7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0
S8	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	1.7
S9	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	1.0

注：“—”表示低于 LOD

3 讨论

3.1 液相条件优化

ChP 2015 中采用三乙胺溶液：乙腈的流动相体系分析 1 中的有关物质, 并要求 1 与 2 的分离度大于 7.0, 按照该方法对系统适用性溶液进行分析时, 3 与 6、7 与 8 均未实现基线分离。本研究尝试了 3 种挥发性流动相体系：甲酸溶液：乙腈、乙酸铵溶液：乙腈及甲酸铵溶液：乙腈, 最终确定使用甲酸铵溶液：乙腈为流动相。通过改变甲酸铵溶液的 pH 值 (用甲酸调至 pH 2.5、3.5、4.5、5.5) 及流动相比例, 确定了表 1 的梯度洗脱条件。研究发现, 随着甲酸铵溶液 pH 值的升高, 可以提高系统适用



A: 酸破坏, B: 碱破坏, C: 加热破坏, D: 氧化破坏
1-1; 2-2; 3-3; 5-5

图3 专属性试验典型色谱图

Fig.3 Typical Chromatograms for Specificity Test

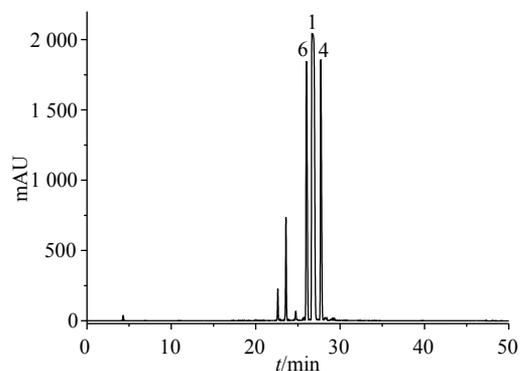
性溶液中各组分的分离度, 在 pH 4.5 时, 不仅有关物质 3 与 6、7 与 8 实现了较好的分离, 同时 3、6 中含有的杂质 3'、6' (即 3、6 脱去苄基上甲酰基生成的杂质, 与 1 脱去甲酰基生成 2 的情况相同) 也与相邻组分分离较好。1 与 2 的分离度达到 20 以上, 且 1 的理论板数超过 5×10^5 , 柱效高。

为考察样品在高浓度情况下, 1 与 4、6 的分离情况, 配制了下述 1 浓度为 5 mg/ml, 4、6 浓度为 1 mg/ml 的样品溶液, 进样测定, 色谱图见图 4。其中 1 色谱峰已超载, 与 6 的分离度为 1.4, 与 4 的分离度为 2.3, 结果表明本方法在样品高浓度情况下, 也可以实现主峰与相邻杂质之间较好的分离。

3.2 色谱柱筛选

本试验尝试了其他色谱柱, 如 Kromasil C₁₈ 和 Luna C₁₈ 柱, 规格均为 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 结果显示本法耐用性较好。

本研究建立的 HPLC 分析系统可以实现 1 中有



1-1; 4-4; 6-6

图4 高浓度供试品溶液色谱图
Fig.4 Chromatogram of Test Solution with High Concentration

关物质的有效分离, 重复性及灵敏度均较好, 能够提高对 1 原料药及制剂的质量控制。HPLC-MS 可以直接采用本色谱系统, 对 1 中的未知杂质进行定性、定量研究。

参考文献:

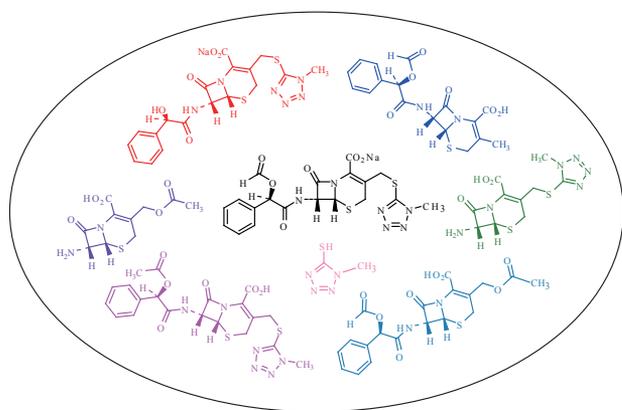
- [1] 胡敏, 胡昌勤. ¹H-NMR法分析头孢孟多酯钠对照品[J]. 中国抗菌药杂志, 2004, 29(9): 534-538.
- [2] 杜淑朋, 周天舒, 宋维锋, 等. HPLC法测定注射用头孢孟多酯钠中有关物质[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1204-1207.
- [3] 祝仕清, 牛长群. 头孢孟多酯钠的LC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2007, 26: 53-54.

Determination of Related Substances in Cefamandole Nafate for Injections by HPLC

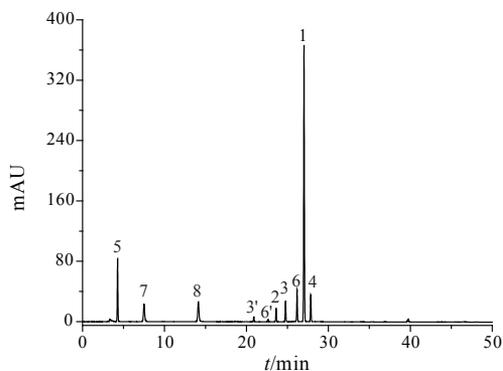
ZHANG Hanzhi, MIAO Tianyao, QIN Feng, LIU Hao*
(Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of the related substances in cefamandole nafate for injection. A BDS Hypersil C₁₈ column was used, with the mobile phase of ammonium formate solution (adjusted to pH 4.5 by formic acid, A) : acetonitrile (B), at the detection wavelength of 254 nm. The resolutions between cefamandole nafate and the neighbouring peaks as well as the resolutions between the impurities all met the requirements. The relative retention time of the known related substances A, C, D and E were determined. It was linear for cefamandole nafate in the range of 1-10 μg/ml. The established method, which was proved to be suitable and sensitive, can be applied to analyze the related substances including A, C, D and E by principal component self-control method in cefamandole nafate of different batches and to provide a better control of the product quality.

Key Words: cefamandole nafate for injection; related substance; HPLC; content determination



Cefamandole Nafate and the Known Related Substances



1-cefamandole nafate; 2-cefamandole; 3-impurity A; 4-impurity C; 5-impurity D; 6-impurity E; 7-7-ACA; 8-7-ATCA; 3', 6'-degradation products of impurity A and E