

文章编号: 1001-8689(2019)02-0224-04

HPLC 法测定头孢氨苄原料及胶囊中的有关物质

钟莹 陈红英 王健松*

(广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广州 510515)

摘要: **目的** 建立头孢氨苄原料及胶囊有关物质的 HPLC 分析方法。**方法** 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱; 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用氢氧化钠试液调节 pH 值至 5.0) 为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱; 检测波长为 220nm; 流速为 1mL/min。**结果** 与中国药典有关物质检测方法比较, 本方法具有更强的分析杂质的能力, 样品中各成分的分离度及检出灵敏度均满足有关物质限度的测定要求。**结论** 本方法可用于头孢氨苄原料及胶囊有关物质的检查, 有助于发现产品中的质量问题, 促使产品质量的提高。

关键词: 头孢氨苄; 有关物质; 高效液相色谱法**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

Determination of related substances of cephalexin bulk powder and cephalexin capsules by HPLC

Zhong Ying, Chen Hong-ying and Wang Jian-song

(Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co.Ltd., Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou 510515)

Abstract Objective To establish a method for the determination of related substances of cephalexin and cephalexin capsules by HPLC. **Methods** An ODS column was used. The mobile phase consisted of 0.05mol/L sodium dihydrogen phosphate buffer (pH5.0) was used as the mobile phase A and methanol as the mobile phase B. Gradient elution was used. The detection wavelength was 220nm. The flow rate was 1.0mL/min. **Results** In contrary to the Chinese Pharmacopoeia related substances determination method, this method was more applicable on the separation of the related substances. The damaged degradation products could also be effectively separated from the main peak under this chromatographic condition. The resolution and sensitivity of related substances were acceptable. **Conclusion** The method is suitable for the determination of the related substances of cephalexin and cephalexin capsules, which helps the discovery of quality problems and promotes the quality of the products.

Key words Cephalexin; Related substances; HPLC

头孢氨苄为 β -内酰胺类抗生素, 耐酸, 口服吸收良好^[1]。临床上用于敏感菌所致的急性扁桃体炎、咽喉炎、中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、肺炎等呼吸道感染、尿路感染及皮肤软组织感染等, 其生产过程中可能存在 α -苯甘氨酸 (杂质 A)、7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸 (杂质 B) 和 Δ -2-头孢氨苄 (杂质 F)

等^[2]杂质。2015 年版中国药典中该品种原料和胶囊有关物质测定方法采用高效液相色谱法^[3], 但发现使用该法头孢氨苄与其同分异构体 Δ -2-头孢氨苄难达到有效分离, 并且流动相中磷酸二氢钾溶液的浓度较高。本文对方法进行了研究和改进, 可使各杂质峰得到有效分离和检出, 更好保障产品质量。

收稿日期: 2018-01-24**基金项目:** 广州市科技计划项目 (No. 201604046024); 广州市科技计划项目 (No. 201704020087)**作者简介:** 钟莹, 女, 生于 1985 年, 硕士, 工程师, 主要从事药物质量研究, E-mail: zdyiy2003@163.com

* 通讯作者, E-mail: giantson@126.com

1 仪器与试药

1200 高效液相色谱仪 (DAD 检测器, Agilent 公司), 1260 高效液相色谱仪 (DAD 检测器, Agilent 公司), CPA225D 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

头孢氨苄 (厂家 A, 批号: 00167), 头孢氨苄胶囊 (厂家 B, 规格 0.125g, 批号: 2170501、2170601、2170602), 头孢氨苄对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 130408-201410, 89.0%), 杂质对照品: 杂质 A(α -苯甘氨酸, 中国食品药品检定研究院, 批号: 130415-200904, 98.5%)。杂质 B(7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸, 中国食品药品检定研究院, 批号: 130416-201006, 94.4%), 杂质 F(Δ -2-头孢氨苄, TRC, 批号: 6-RNP-168-2, 95%), 甲醇 (色谱纯, 美国 Merck 公司), 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

2.1.1 色谱条件

色谱柱 Thermo Hypersil GOLD, C_{18} (4.6mm \times 100mm, 3 μ m); 流动相: 流动相 A 为 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用氢氧化钠试液调节 pH 值至 5.0), 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱 (0~20min, A: 95% \rightarrow 55%; 20~37min, A: 55% \rightarrow 95%; 37~40min, A 保持 95%); 检测波长 220nm; 流速为 1mL/min; 进样量 20 μ L。

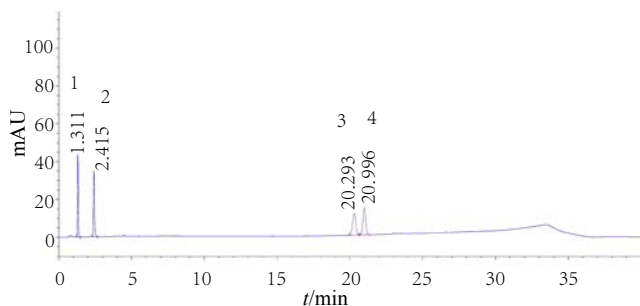
2.1.2 系统适用性

取头孢氨苄, 杂质 A、B 和 F 对照品适量加 pH7.0 磷酸盐缓冲液适量超声使溶解, 加流动相 A 稀释制成各含 10 μ g/mL 的混合溶液, 作为系统适用性溶液。记录色谱图, 见图 1, 头孢氨苄峰理论塔板数为 55968, 杂质 A 与杂质 B 的分离度为 1.8, 头孢氨苄与杂质 F 的分离度为 10.4。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

取杂质 A、杂质 B 和杂质 F 对照品各约 10mg, 精密称定, 置于同一 100mL 量瓶中, 加 pH7.0 磷酸



1: 杂质 A; 2: 杂质 B; 3: 杂质 F; 4: 头孢氨苄

图 1 系统适用性 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of system suitability

盐缓冲液约 20mL 超声使溶解, 再用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2mL, 置于 20mL 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

分别取样品适量, 精密称定, 用流动相 A 溶解并稀释制成含头孢氨苄 1.0mg/mL 的溶液, 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 1mL, 置于 100mL 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.3 测定法

精密量取供试品溶液、对照溶液与杂质对照品溶液各 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 杂质 A、B 和 F 按外标法以峰面积计算; 其他单个杂质按自身对照

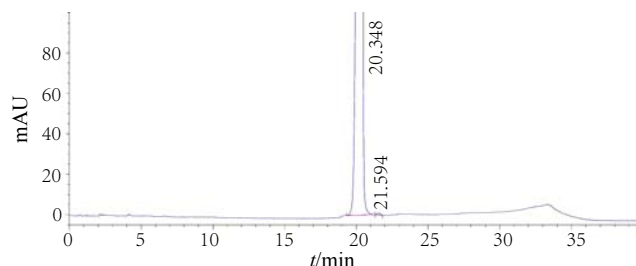


图 2 供试品溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample

法计算 (图 2)。

2.4 与中国药典 2015 年版方法比较

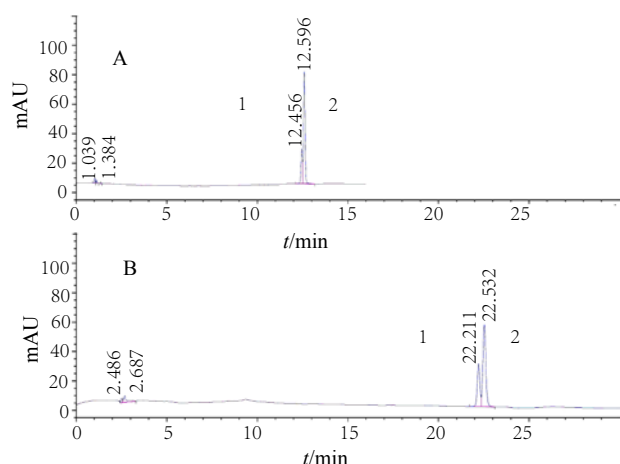
2.4.1 色谱条件

采用欧洲药典和中国药典方法, 结果头孢氨苄和杂质 F 分离度分别为 0.87 和 1.15, 均未达到基本分离 (图 3)。为提高头孢氨苄和杂质 F 的分离度, 流动相组成选择浓度低的盐溶剂 (0.05mol/L pH5.0 磷酸二氢钠溶液 - 甲醇), 选用粒径小的色谱柱, 并优化了流动相梯度洗脱条件。结果各峰分离效果好, 分析时间合适 (图 1)。

2.4.2 系统适用性试验

中国药典系统适用性要求为: 供试品溶液 80 $^{\circ}$ C 破坏 60min 后, 头孢氨苄与相邻峰分离度应大于 1.5。但破坏程度超过 20%, 产生的杂质峰较多, 采用中国药典 2015 年版色谱条件, 头孢氨苄与前后相邻杂质峰的分离度为 3.04 和 1.66, 但其他降解杂质峰之间分离度较差 (图 4)。采用优化后方法, 头孢氨苄与前后相邻杂质峰的分离度为 2.55 和 2.09, 其他降解杂质峰之间分离度良好, 说明方法可使降解杂质峰得到有效分离和检出 (图 5)。因破坏条件过于剧烈, 系统适用性试验改为考察杂质 A 和 B, 头孢氨苄和杂质 F 的分离度更为合理, 具体见 “2.1.2” 项。

2.4.3 样品测定



1: 杂质 F; 2: 头孢氨苄; A: 欧洲药典方法; B: 中国药典方法
图 3 杂质 F 和头孢氨苄 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of impurity F and cephalaxin

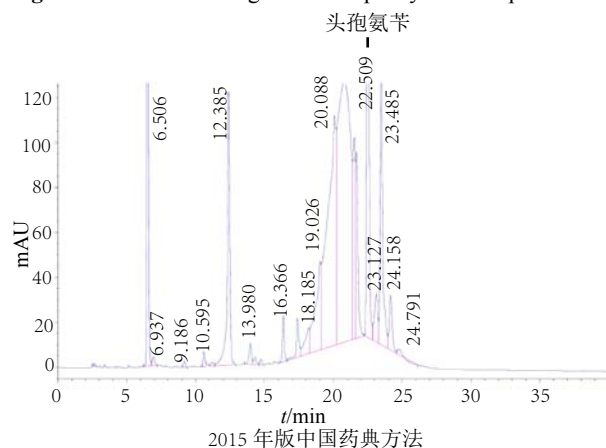


图 4 供试品溶液 80°C 破坏 60min HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of sample placed under 80°C for 60min

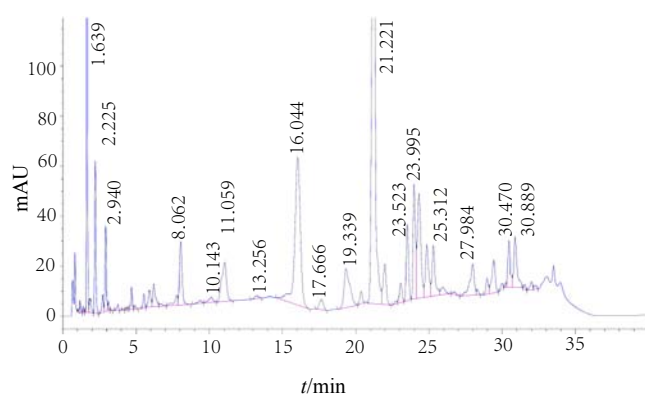


图 5 供试品溶液 80°C 破坏 60min HPLC 色谱图—优化后方法
Fig. 5 HPLC chromatogram of sample placed under 80°C for 60min—optimized method

分别采用本实验方法和中国药典 2015 年版方法, 对原料、胶囊以及在 25°C /75% 相对湿度 (RH) 条件下放置 10d 的原料进行对比检测, 结果见表 1~2。结果本实验方法能有效检出杂质 F, 且检出的杂质个数更多, 见图 6~7, 有助于发现产品中的质量问题, 促使产品质量的提高。

3 方法学验证

3.1 专属性

3.1.1 空白干扰试验

称取空白辅料 (相当于 0.125g 规格一粒的量) 置 100mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取 20μL 注入液相色谱仪, 结果空白辅料无干扰。

3.1.2 强制破坏性试验 (表 3)

取原料及胶囊分别用 1mol/L 盐酸溶液、1mol/L 氢氧化钠溶液、3% 过氧化氢和高温 60°C、光照等苛刻条件进行破坏试验后, 按上述色谱条件进行检测。

结果表明空白溶剂对测定无干扰, 在各种破坏条件下所得的降解产物峰与主成分峰分离良好, 降解产物峰之间也具有良好的分离度, 各条件下主峰纯度因子均大于 990。通过比较试验前后总峰面积的变化, 物料平衡 ($A_{\text{破坏后总峰面积}}/A_{\text{破坏前总峰面积}} \times 100\%$) 在 90%~110%, 方法具有专属性。杂质 A 和杂质 B 在各条件下均较稳定, 杂质 F 在碱性条件下稍增加。

3.2 其他验证项目

对本实验方法的定量限、检测限、准确度、重复性和溶液稳定性等进行了研究, 见表 4, 结果方法的灵敏度、精密度和准确度等都较好, 方法科学、合理、可行, 适用于头孢氨苄原料及胶囊有关物质检测。

4 讨论

中国药典 2015 年版头孢氨苄原料及胶囊有关物质测定方法中流动相组成为 0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液 (pH5.0)- 甲醇, 在此条件下头孢氨苄与杂质 F 分离度为 1.15, 未能达到基本分离, 且流动相中磷酸二氢钠的浓度较高, 易析出晶体, 阻塞色谱柱, 系统适用性试验对供试品溶液破坏程度过于剧烈。本法参考欧洲药典 9.4^[2] 头孢氨苄原料有关物质测定方法, 降低磷酸二氢钠溶液的浓度, 筛选了合适的色谱柱, 并优化了梯度洗脱条件, 不但主峰及杂质峰出峰时间适宜, 并能有效地分离各个杂质峰。经破坏后的降解产物在此色谱条件下也能有效地与主峰完全分离, 具良好的专属性。

杂质 A 和杂质 B 稳定, 在强制降解试验和稳定性中均未见增长。杂质 F 为头孢氨苄的同分异构体, 在碱性条件下稍增加, 在稳定性放置过程中会增加。方法中以杂质对照品外标法检测这 3 个特定杂质的量, 能较好地分析各杂质在稳定性放置过程中的变化趋势, 有助于发现产品中的质量问题, 促使产品质量的提高。

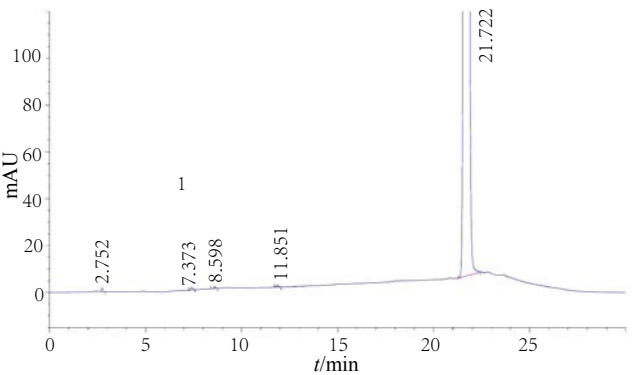
采用本方法分别对头孢氨苄原料及胶囊进行有关物质检测, 方法的适用性良好, 并将结果与中国药典 2015 年版测定结果比较, 具有更强的分析杂质

表 1 头孢氨苄及胶囊有关物质测定结果—2015 年版中国药典方法
Tab. 1 The determination results of the related substances of samples—ChP 2015

样品	批号	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 F/%	其他最大单一杂质 /%	总杂质 /%
原料	00167	未检出	未检出	在主峰中	未检出	未检出
胶囊	2170501	未检出	未检出	在主峰中	未检出	未检出
	2170601	未检出	未检出	在主峰中	0.06	0.06
	2170602	未检出	未检出	在主峰中	0.08	0.08
25℃ /75%RH 放置 10d 原料	00617	未检出	0.03	在主峰中	0.02	0.07

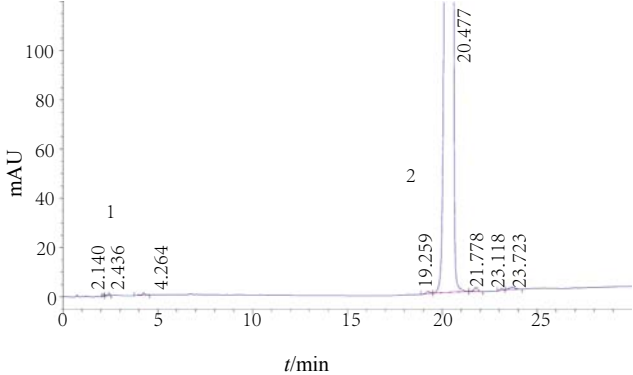
表 2 头孢氨苄及胶囊有关物质测定结果—优化后方法
Tab. 2 The determination results of the related substances of samples—optimized method

样品	批号	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 F/%	其他最大单一杂质 /%	总杂质 /%
原料	00167	未检出	未检出	0.08	未检出	0.08
胶囊	2170501	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	2170601	未检出	未检出	未检出	0.05	0.05
	2170602	未检出	未检出	0.05	0.05	0.10
25℃ /75%RH 放置 10d 原料	00617	未检出	0.03	0.04	0.11	0.31



2015 年版中国药典方法；1：杂质 B
图 6 25℃ /75%RH 放置 10d 样品 HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatogram of sample placed under 25℃ /75%RH for 10d



优化后方法；1：杂质 B；2：杂质 F
图 7 25℃ /75%RH 放置 10d 样品 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatogram of sample placed under 25℃ /75%RH for 10d

表 3 强制破坏性试验测定结果
Tab. 3 The determination results of the destructive tests

破坏方式	原料		胶囊	
	主峰纯度因子	物料平衡 /%	主峰纯度因子	物料平衡 /%
酸破坏	999.799	103.8	999.836	98.3
碱破坏	991.584	98.4	999.092	100.2
氧化破坏	999.876	99.9	998.181	98.8
高温破坏	999.788	93.7	999.796	98.2
光照破坏	998.347	98.7	999.307	93.9

的能力。本方法简单、灵敏，适用于头孢氨苄原料及胶囊有关物质的检测。

参考文献

[1] Gower P E, Dash C H. Cephalixin: human studies of absorption and excretion of a new cephalosporin antibiotic[J]. *Br J Pharmacol*, 1969, 37(3): 738-747.
[2] European Pharmacopoeia 9.0[S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2017: 1788-1789.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. (2015 年版二

表 4 其他验证项目测定结果
Tab. 4 The determination results of other verification items

项目	测定结果
杂质的相对响应因子	杂质 A、B 和 F 的相对响应因子分别为 1.4、1.2 和 0.8，故杂质 A、B 和 F 的计算采用外标法
定量限、检测限	头孢氨苄、杂质 A、B 和 F 定量限分别为 0.23、0.08、0.10 和 0.44 $\mu\text{g/mL}$ ；检测限分别为 0.07、0.02、0.03 和 0.13 $\mu\text{g/mL}$
准确度	头孢氨苄、杂质 A、B 和 F 平均回收率 ($n=9$) 分别为 99.3%、98.5%、97.5% 和 95.9%， $RSD(n=9)$ 分别为 0.55%、1.0%、1.1% 和 2.0%，准确度良好
重复性	6 份供试品溶液单杂和总杂 RSD 均小于 4%，重复性良好
溶液稳定性	供试品溶液在低温 4℃，于 12h 内有关物质测得结果基本一致