

头孢雷特含量测定和有关物质检查的HPLC法

宋艳霞 李波 任凤英

(中国医药集团四川抗菌素工业研究所有限公司, 成都 610052)

摘要: 目的 建立头孢雷特HPLC含量测定和有关物质检查方法。方法 使用Welchrom-C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相为0.02mol/L磷酸二氢钠缓冲液(用磷酸调节pH至2.50)-乙腈(88:12), 检测波长254nm。结果 头孢雷特在0.0102~715.4μg/ml浓度范围内有良好的线性关系($n=9$), $y=20230x+51110$, 相关系数 $r=0.9999$, 定量限为6.7ng, 最低检出限为2.0ng。

结论 该方法为头孢雷特含量测定和有关物质检查提供了方便、灵敏、精确、可靠的方法。

关键词: 高效液相色谱法; 头孢雷特; 含量; 有关物质

中图分类号: R927.2 文献标识码: A

Determination of ceforanide and its related substances by HPLC

Song Yan-xia, Li Bo and Ren Feng-ying

(Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, China Pharmaceutical Group, Chengdu 610052)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of ceforanide and its related substances. **Methods** A C₁₈ column (Welchrom-C₁₈, 250mm×4.6mm, 5μm) was used. The mobile phase, 0.02mol/L sodium dihydrogen phosphate buffered solution (adjusting with phosphate to pH2.50) : acetonitrile (88:12). The detection wavelength was 254 nm. **Results** The standard curve of ceforanide was linear in the range of 0.0102~715.4μg/ml ($r=0.9999$). The LOQ was 6.7ng, and the LOD was 2.0ng. **Conclusions** The method was convenient, sensitive, accurate, and reliable for the determination of ceforanide and its related substances.

Key words HPLC; Ceforanide; Assay; Related substances

头孢雷特是美国Bristol研究所研发的第二代头孢类半合成抗生素, 1984年10月首批上市销售。头孢雷特是用于非肠道的半合成广谱抗生素, 对部分β-内酰胺酶具有高稳定性。本品体外对革兰阴性菌具有较强的活性; 对革兰阳性菌和厌氧菌均有一定抗菌性, 可用于治疗由敏感菌引起的蜂窝组织炎、尿路感染、后天传染细菌性肺炎和菌血症, 也可用于预防阴道子宫切除术、心脏手术感染等。美国药典32版(USP32)记载了其含量测定方法^[1], 其他文献未见报道。USP32测定头孢雷特含量采用反相离子对HPLC法, 离子对试剂为氢氧化四丁基铵, 其色谱系统容易导致柱压升高, 损坏柱子, 且重复性

差, 主峰保留时间过长等。本文建立了头孢雷特含量测定和有关物质检查的非离子对HPLC法。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10ATVP 液相色谱仪, Shimadzu SPD-10AVP检测器, HT-230A柱温箱, N-2000双通道色谱工作站。头孢雷特工作对照品(纯度为96.56%), 头孢雷特精制品(批号为: 080707-1、080707-2、080707-3, 由四川抗菌素工业研究所有限公司化学事业部提供); 蒸馏水; 乙腈、甲醇为色谱纯; 磷酸、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氢氧化钾为国产分析纯。

2 色谱条件

收稿日期: 2008-11-14

作者简介: 宋艳霞, 女, 生于1982年, 在读硕士研究生。通讯作者, E-mail:songyanxia07@163.com

色谱柱: Welchrom-C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相为0.02mol/L磷酸二氢钠缓冲液(用磷酸调节pH至2.50)-乙腈(88:12), 流速为1ml/min, 检测波长为254nm, 柱温35℃, 进样体积为20μl。

3 测定方法

3.1 含量测定

取头孢雷特工作对照品约12.5mg, 精密称定, 置25ml容量瓶中, 用0.5% NaHCO₃溶液溶解, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。取头孢雷特精制品约12.5mg, 精密称定, 置25ml容量瓶中, 用0.5% NaHCO₃溶液溶解, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。照选定色谱条件, 取20μl注入液相色谱仪, 记录色谱图(图1), 按外标法计算, 即得。

3.2 有关物质检查

精密称取本品适量, 用0.5% NaHCO₃溶液溶解, 加流动相稀释成0.5 mg/ml, 取20 μl注入液相色谱仪, 记录色谱图(图1), 按峰面积归一化法计算, 即得。

4 方法与结果

4.1 色谱条件的选择与优化

4.1.1 流动相pH值的选择 以0.02mol/L磷酸二氢钠水溶液(用磷酸调节其系列pH值)-乙腈(88:12)为流动相, 考察pH值对头孢雷特色谱行为的影响。结果表明, pH值对主峰与相邻杂质峰间的分离度、保留时间、对称性均有影响。流动相的pH值越低, 头孢雷特在色谱柱中的保留时间越短, 主峰与相邻杂质峰间的分离度越低。而pH值为2.50时主峰与相邻杂质峰间的分离度、保留时间、拖尾因子均较好, 因此确定流动相的最佳pH值为2.50。

4.1.2 缓冲盐的选择 上述流动相的其他条件不变, 改变流动相中磷酸二氢钠溶液的浓度, 考察头孢雷特的色谱行为变化。结果表明, 盐离子浓度变

化对主峰与相邻杂质峰间的分离度、保留时间基本不变, 对主峰的对称性略有影响, 随盐离子浓度的增加, 主峰的对称性增大, 综合考虑, 确定缓冲盐磷酸二氢钠溶液浓度为0.02mol/L。

4.1.3 有机相中乙腈浓度的选择 上述流动相的其他条件不变, 改变流动相中乙腈的浓度, 考察头孢雷特的色谱行为变化。试验结果表明, 乙腈浓度对头孢雷特主峰与相邻的杂质峰间的分离度、保留时间均有显著的影响。随着乙腈浓度的增加, 主峰与相邻的杂质峰间的分离度减小, 保留时间缩短。乙腈浓度对主峰对称性影响较小。因此, 确定流动相中乙腈浓度为12%。

4.2 方法的验证

4.2.1 专属性 分别制备酸、碱、高温、氧化及光照破坏的样品溶液, 制成0.5mg/ml溶液, 分别进样20 μl, 记录色谱图, 试验结果显示, 在确定的色谱条件下, 头孢雷特与各种破坏条件下产生的降解物质均能较好的分离。

4.2.2 线性关系考察及定量限、最低检出限 取头孢雷特精制品, 用流动相配制系列浓度溶液, 按上述色谱条件和测定法进行分析, 试验结果表明(图2)头孢雷特在0.0102~715.4μg/ml浓度范围内有很好的线性关系, $y=20230x+51110$, 相关系数 $R=0.9999$, 定量限为6.7 ng, 最低检出限为2.0ng。

4.2.3 精密度试验 取同一本品溶液进行数次测定, 记录色谱图, 按外标法和峰面积归一化法计算含量测定和有关物质检查进样精密度(重复性), 试验结果表明, 本品含量测定和有关物质检查的进样精密度RSD分别为0.02%、1.03%; 同一样品当日取数份测定, 记录色谱图, 按外标法和峰面积归一化法计算含量测定和有关物质检查的日内精密度, 试验结果表明, 本品含量测定和有关物质检查的日内精

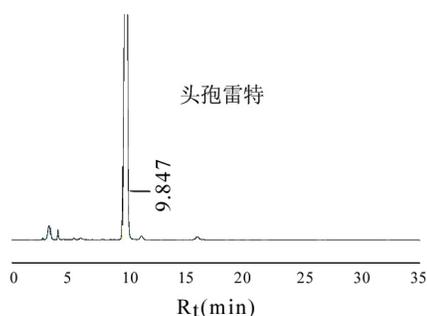


图1 头孢雷特含量及有关物质测定色谱图

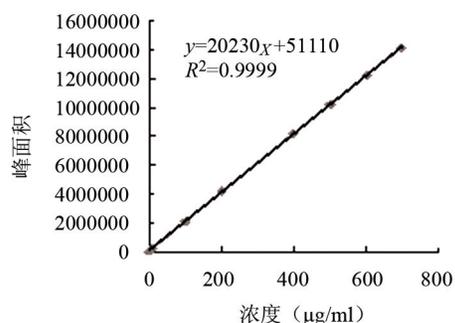


图2 头孢雷特线性关系图

密度RSD分别为0.55%、1.46%。

4.2.4 溶液稳定性 取同一份供试品溶液，在不同时间进样分析，六次试验结果均表明，4 h内其主峰和杂质峰面积的变化率分别为0.02%、1.03%，表明供试品在流动相中的稳定性较好。

4.3 结果

头孢雷特的含量和有关物质测定结果见表1。

表1 头孢雷特的含量和有关物质测定结果

批号	含量 (%)	有关物质 (%)
080707-1	96.22	2.28
080707-2	96.16	2.29
080707-3	96.17	2.34

5 讨论

5.1 检测波长的选择

根据上述含量测定和有关物质检查方法，对样品进行二极管阵列检测，由DAD光谱图可知，大多

数杂质的最大吸收峰在254 nm左右，故选择254 nm为检测波长。

5.2 流动相的选择

上述流动相的其他条件不变，只改变流动相中缓冲盐的种类，即把0.02mol/L磷酸二氢钠换成0.02 mol/L磷酸二氢钾，试验结果显示，主峰与相邻的杂质峰不能达到基线分离的效果。

5.3 离子对试剂的选择

美国药典31版（2008 USP31/NF26）收载的方法容易导致柱压升高，根据本文作者推测可能为流动相中的四丁基铵离子易使色谱柱填料变脆，粉碎溶解，而且填料吸附的离子对试剂不能完全清除，因此对柱子的损害特别严重^[2]。

参 考 文 献

- [1] The Authority of the United States Pharmacopeial Convention Inc. USP31/NF26 [S]. Washington, DC: the Board of Trustees, 2008: 1678 ~ 1679.
- [2] 刘浩, 仇士林. 头孢曲松钠HPLC法含量测定[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(5): 273 ~ 276.

(上接第15页)

参 考 文 献

- [1] 方纲主编. 抗菌素生物理化特性[M]. 第二分册. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 427~431.
- [2] 库力努尔·托肯, 格尔勒·陶, 张金沙. 多黏菌素B对绿脓杆菌性角膜溃疡的治疗[J]. 新疆医科大学学报, 2004, 27(5): 527.
- [3] 刘强, 李国辉. 多黏菌素B霜与磺胺嘧啶银霜对烧伤创面绿脓杆菌感染的疗效比较[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(6): 369.
- [4] 曾惠清, 张雪玲. 住院患者呼吸道鲍曼不动杆菌的耐药性分析[J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(6): 798~799.
- [5] 明镇寰, 潘建伟, 朱睦元. 非核糖体多肽合成酶研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 667~669.
- [6] 张学成, 张惠, 杨官品. 多肽类生物活性物质的非核糖体合成机理[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(3): 389~394.
- [7] Webet T, Marahiel M A. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases [J]. *Structure*, 2001, 9(1): R3~R9.
- [8] Yoshitomo I, Hisao O, Junko H, et al. Total structures of colistin minor components[J]. *J Antibiot*, 1998, 51(5): 492~498.
- [9] Orwa J A, Govaerts C, Busson R, et al. Isolation and structural characterization of polymyxin B components[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912: 369~373.
- [10] 邢维玲, 周希贵, 王贺祥, 等. 多黏菌素E高产菌株的选育[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(6): 326~327.
- [11] 邢维玲, 周希贵, 王贺祥. 离子交换层析法提取黏杆菌素的研究[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(11): 44~46.
- [12] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[S]. V5.3: 3595~3597, 3480~3481.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2005年版二部). 北京: 化学工业出版社, 2005: 729~730.
- [14] 陈陶声. 近代工业微生物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 124~127.