UPLC 测定盐酸头孢甲肟原料药及注射剂的有关物质

夏佳，席时东(宁波市药品检验所，浙江 宁波 315048)

摘要：目的 建立 UPLC 测定盐酸头孢甲肟原料药及注射剂中有关物质的方法。**方法** 采用 Zorbax XDB C_{18} 柱(2.1 mm×100 mm，3 μm)，流动相 A 为水-冰醋酸-乙腈(85∶1.7∶15)，流动相 B 为水-冰醋酸-乙腈(50∶1.7∶50)，梯度洗脱，柱温 30 ℃，流速为 0.6 mL·min^{-1}，检测波长为 254 nm。**结果** 盐酸头孢甲肟与中间体、副产物完全分离。有关物质重复性 RSD 为 2.5%，检测限为 0.001~0.08 μg·mL^{-1}。**结论** 该方法快速、简便、灵敏度高、重复性好，优于现行标准方法。

关键词：超高效液相色谱法；盐酸头孢甲肟；有关物质
中图分类号：R927.11 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2019)22-2769-04
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.004
引用本文：夏佳，席时东. UPLC 测定盐酸头孢甲肟原料药及注射剂的有关物质[J]. 中国现代应用药学，2019，36(22)：2769-2772.

Determination of Related Substances of Cefmenoxime Hydrochloride Drug Substance and Injection by UPLC

XIA Jia, XI Shidong(*Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish UPLC for the determination of related substances of cefmenoxime hydrochloride drug substance and injection. **METHODS** The column was Zorbax XDB C_{18}(2.1 mm×100 mm, 3μm). The mobile phase consisted of water-acetic acid-acetonitrile(85∶1.7∶15)(A) and water-acetic acid-acetonitrile(50∶1.7∶50)(B) with gradient program. The column temperature was 30 ℃. The flow rate was 0.6 mL·min^{-1} and the detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** Cefmenoxime hydrochloride could be completely separated from its intermediates and by-products. The RSD of related substances precision was 2.5%, the detection limit was 0.001–0.08 μg·mL^{-1}. **CONCLUTION** The method is rapid, simple, sensitive, reproducible and better than the current standard method.
KEYWORDS: UPLC; cefmenoxime hydrochloride; related substances

注射用盐酸头孢甲肟是半合成的第三代头孢类抗菌药物，通过抑制细菌细胞壁的合成发挥作用。临床用于敏感菌所致呼吸道感染、泌尿道感染、女性生殖器官感染、胆道感染、腹膜炎、外科、妇科和五官科疾病感染等[1-3]。目前该品种注射剂和原料收载于中国药典 2015 年版二部、USP40，原料在 JP17 中也有收载。其中，中国药典 2015 年版二部采用 HPLC 梯度洗脱对该品种的有关物质进行检查[4]，其他药典方法采用等度洗脱法。前者能检出更多极性小的杂质，缺点是分析时间长，而且抗菌药物性质不太稳定，需要临用新配，所以在分析大量样品的时候，效率比较低。

本研究旨在建立检测盐酸头孢甲肟及注射剂中有关物质的 UPLC-UV，从而缩短分析时间，减少有机溶剂的使用。

1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC(DAD 检测器，美国 Waters 公司)；Zorbax XDB-C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm，3 μm)；SB-5200DTN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)；CP225D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

乙腈、冰醋酸均为色谱纯；试验用水为超纯水。头孢甲肟(批号：130525-201001；纯度：94.6%)、7-氨基头孢烷酸(7-ACA，批号：130538-200902；纯度：96.9%)、头孢噻肟(批号：130483-201505；纯度：92.2%)均购自中国食品药品检定研究院；2-巯基苯并噻唑(国药集团试剂有限公司，批号：20180703；纯度：99.0%)；1-甲基-5-巯基-四氮唑(MMTZ，Sigma-aldrich，批号：STBG40962；纯度：98.0%)；氨噻肟酸(批号：16924EOV；纯度：

基金项目：2018 年国家药品抽样评价
作者简介：夏佳，女，硕士，主管药师 Tel: (0574)87830394 E-mail: xiajia880@hotmail.com

98.1%)、杂质 B(去乙酰头孢噻肟，批号：160801；纯度：95.2%)、头孢甲肟反式异构体(批号：110218；纯度：96.8%)均购自辽宁海思科制药有限公司；7-氨基-3-[(1-甲基-1H-四唑-5-基)硫甲基]头孢烷酸(7-ATCA，批号：20171128；纯度：99.0%)和 AE 活性酯(批号：171108；纯度：97.0%)均购自浙江尖峰药业有限公司。注射用盐酸头孢甲肟样品为 2018 年国家药品计划抽验样品。盐酸头孢甲肟原料药分别来自桂林澳林制药有限责任公司(企业 A，批号：G180101)、浙江尖峰药业有限公司(企业 B，批号：171104)、南京海辰药业股份有限公司(企业 C，批号：10718005)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

流动相：水-冰醋酸-乙腈(85∶1.7∶15)(A)-水-冰醋酸-乙腈(50∶1.7∶50)(B)；梯度洗脱(0~6 min，0%B，24~30 min，100%B，31~36 min，0%B)；流速：0.6 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长为 254 nm；进样量：10 μL。

2.2 溶液的制备

供试品溶液：取盐酸头孢甲肟原料药及注射粉末适量，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液适量使溶解(注射粉末加水适量使溶解)，加流动相 A 稀释制成约 0.2 mg·mL^{-1} 的供试品溶液。

对照溶液：精密量取供试品溶液适量，加流动相 A 定量稀释制成 0.2 μg·mL^{-1} 的溶液。按“2.1”项下色谱条件测定，量取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL，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，按自身对照外标法计算。盐酸头孢甲肟的色谱图见图 1。

2.3 专属性试验

2.3.1 与合成中间体及部分副产物的分离 分别取盐酸头孢甲肟合成的中间体 7-ACA、7-ATCA、MMTZ、AE 活性酯各适量，取氨噻肟酸、头孢甲肟、头孢噻肟、杂质 B、头孢甲肟反式异构体、2-巯基苯并噻唑各适量，加甲醇制成 0.1~0.2 mg·mL^{-1} 的溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，确定盐酸头孢甲肟和中间体及部分副产物色谱峰的保留时间，考察各成分峰之间的分离度，结果见图 2。结果表明，盐酸头孢甲肟与合成的中间体及部分副产物完全分离。

2.3.2 与降解产物的分离 取企业 A 原料药(批号：G180101)，进行强力破坏试验研究。酸破坏：取原料药适量，加 1 mol·L^{-1} 盐酸溶液 0.5 mL，60 ℃加热 30 min，加碱中和；碱破坏：取原料药适量，加 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液 0.5 mL，放置 30 min，加酸中和；高温破坏：取原料药，在 105 ℃条件下，放置 2 h；强光照射破坏：取原料药，于

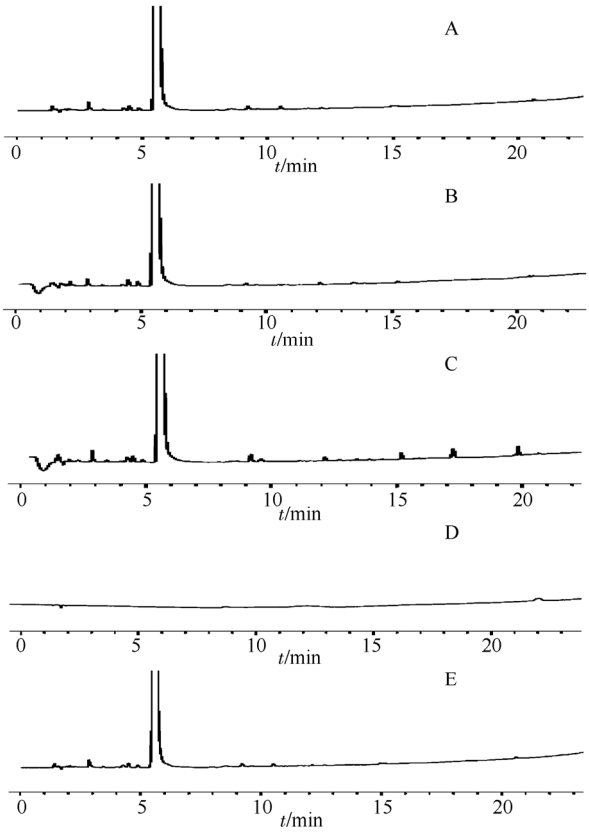

图 1 盐酸头孢甲肟高效液相色谱图

A–企业 C；B–企业 B；C–企业 A；D–空白辅料；E–头孢甲肟对照品溶液。

Fig. 1 HPLC chromatograms of cefmenoxime hydrochloride

A–Enterprise C; B–Enterprise B; C–Enterprise A; D–blank excipient; E–cefmenoxime control solution.

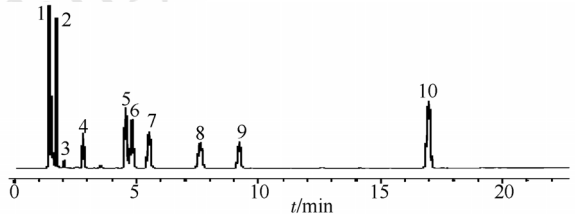

图 2 盐酸头孢甲肟与合成中间体及部分副产物色谱图

1–氨噻肟酸；2–7-氨基头孢烷酸；3–7-氨基-3-[(1-甲基-1H-四唑-5-基)硫甲基]头孢烷酸；4–1-甲基-5-巯基-四氮唑；5–杂质 B；6–头孢噻肟；7–头孢甲肟；8–AE 活性酯；9–头孢甲肟反式异构体；10–2-巯基苯并噻唑。

Fig. 2 HPLC chromatograms of cefmenoxime hydrochloride, intermediate and partial by-products

1–2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-methoxyimino; 2–7-ACA; 3–7-ATCA; 4–MMTZ; 5–impurity B; 6–cefotaxime; 7–cefmenoxime; 8–thiobenzothiazole ester; 9–trans-isomer cefmenoxime; 10–2-mercaptobenzothiazole.

强光(4 500 lx)下照射 2 d；氧化破坏：取原料药适量，加 3%过氧化氢溶液 0.2 mL，60 ℃加热 30 min。分别取以上样品适量，加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液适量使溶解，加流动相稀释制成约 0.2 mg·mL^{-1} 的溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果在主峰前有分解产物产生。盐酸头孢甲肟在酸、碱、高温、强光、氧化破坏下均有对应的降解产物生成，各峰之间分离度良好，结果见图 3。在碱破坏条件下，样品最不稳定，杂质增加最多；强光照射下，样品中的头孢甲肟反式异构体会增加。3 家企业原料的杂质情况见表 1。

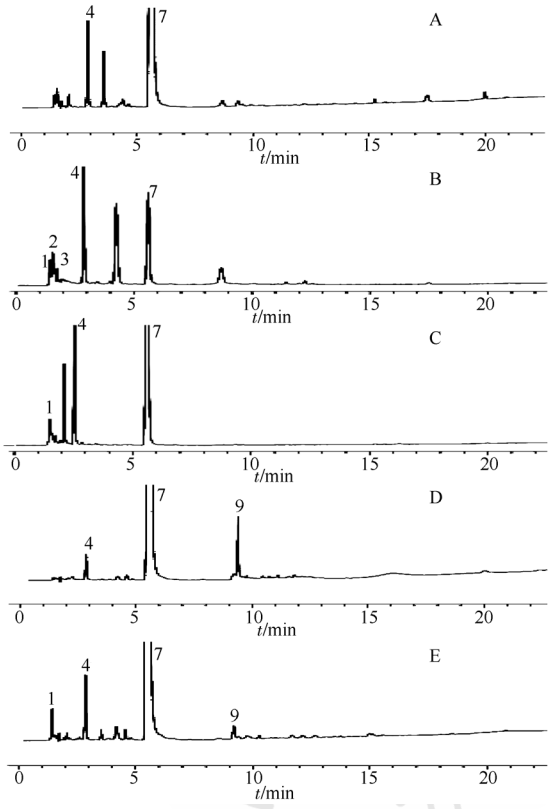

图 3 盐酸头孢甲肟破坏试验高效液相色谱图

A–酸破坏；B–碱破坏；C–氧化破坏；D–光照破坏；E–高温破坏。

Fig. 3 HPLC chromatograms of cefmenoxime hydrochloride

A–acid destruction; B–base destruction; C–oxidation destruction; D–illumination destruction; E–heat destruction.

2.3.3 与辅料的分离 按样品处方模拟制备不含盐酸头孢甲肟的空白辅料溶液(即碳酸钠溶液)，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，无辅料峰出现，结果见图 1D。

2.4 其他方法学相关试验

2.4.1 线性关系考察 精密称取盐酸头孢甲肟、7-ACA、7-ATCA、MMTZ、氨噻肟酸、AE 活性酯、头孢噻肟、杂质 B、反式异构体、2-巯基苯并噻唑对照品各适量，加流动相溶解并稀释，制成一系列浓度的杂质对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果见表 2，色谱峰面积与浓度呈良好的线性关系。

表 1 3 家企业盐酸头孢甲肟原料药杂质结果

Tab. 1 Result of impurities for cefmenoxime hydrochloride drug substances of three companies

序号	相对保留时间	杂质峰归属	杂质名称	杂质含量/%		
				企业 A	企业 B	企业 C
1	0.26	降解	氨噻肟酸	0.03	0.03	0.12
2	0.27	降解	7-ACA	0.14	0.01	0.01
3	0.41	工艺&降解	7-ATCA	0.03	0.04	0.02
4	0.52	降解	MMTZ	0.19	0.13	0.20
5	0.62	降解		0.03	0.02	0.02
6	0.72	工艺		0.02	–	–
7	0.77	工艺&降解		0.14	0.05	0.09
8	0.81	降解	杂质 B	0.11	0.12	0.12
9	0.88	工艺	头孢噻肟	0.05	0.11	0.08
10	1.65	降解	反式异构体	0.18	0.06	0.12
11	1.72	工艺		0.07	–	0.03
12	2.18	工艺		0.08	0.04	0.03
13	2.28	工艺		0.02	–	–
14	2.41	工艺		0.03	0.01	–
15	2.50	工艺		0.02	–	–
16	2.73	工艺		0.11	0.04	–
17	2.83	工艺		0.01	–	–
18	3.10	工艺	2-巯基苯并噻唑	0.27	–	–
19	3.56	工艺		0.18	–	–

表 2 线性关系结果

Tab. 2 Results of linear relationship

杂质	线性范围/μg·mL^{-1}	线性方程	r	检出限/μg·mL^{-1}
头孢甲肟	0.1~9.1	Y=35 985X–236.8	1	0.03
氨噻肟酸	0.1~10.5	Y=63 887X+1 279.8	1	0.001
7-ACA	0.1~9.5	Y=28 415X+384.72	1	0.02
7-ATCA	0.1~10.2	Y=26 299X–14.98	0.999 9	0.01
MMTZ	0.1~11.8	Y=54 985X–1 652	1	0.007
AE 活性酯	0.1~11.5	Y=17 124X–333.91	1	0.08
杂质 B	0.1~9.7	Y=41 887X+340.09	1	0.02
头孢噻肟	0.1~10.4	Y=39 478X–3 323	0.997 7	0.04
反式异构体	0.1~7.0	Y=32 786X–195.94	1	0.02
2-巯基苯并噻唑	0.1~14.3	Y=32 361X–2 518.2	0.999 9	0.04

2.4.2 加样回收率试验 精密称取已测定有关物质含量的样品(企业 A，批号：10717028)9 份(7-ACA、7-ATCA、MMTZ 含量分别为 0.14%，0.03%，0.19%)，分别精密加入 3 个不同浓度的 7-ACA、7-ATCA、MMTZ 对照品溶液，其中，高、中、低浓度对照品加入量与样品中各待测杂质含量之比分别为 1.2∶1，1∶1，0.8∶1，平行 3 份，

按“2.1”项下方法测定，计算回收率，结果见表3。平均回收率均在 80%~120%，RSD%分别为3.1%，3.0%，0.9%，符合有关物质测定回收率的要求。

表 3 回收率测定结果

Tab. 3 Results of recovery

杂质	回收率/%									平均回收率/%
7-ACA	105.4	104.2	103.5	98.7	108.5	103.7	108.2	105.3	104.9	104.2
7-ATCA	107.1	103.9	96.8	104.7	104.2	102.0	105.9	102.1	106.2	103.9
MMTZ	101.4	102.0	101.7	102.6	102.1	103.9	102.4	101.8	100.9	102.0

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批号盐酸头孢甲肟原料药(企业 A，批号：G180101)6 份，按“2.1”项下方法测定，总杂质和的 RSD 为 2.5%。

2.4.4 溶液的稳定性试验 按“2.1”项下方法测定 0，1，2，8 h 的盐酸头孢甲肟对照品溶液，结果有关物质随时间增加，总杂质分别为 2.4%，2.6%，2.8%，3.6%，表明溶液不稳定，需临用现配。

2.4.5 检测限 取盐酸头孢甲肟、7-ACA、7-ATCA、MMTZ、AE 活性酯、头孢噻肟、杂质 B、反式异构体、2-巯基苯并噻唑对照品适量，用流动相稀释，通过逐级降低浓度，进样测定，可确定检测限(S/N>3)，结果见表 2，均可满足有关物质检测的要求。

2.4.6 方法耐用性考察 采用以下 3 种色谱柱：Zorbax XDB-C_{18}(2.1 mm×100 mm，3 μm)、Waters UPLC HSS T_3(2.1 mm×100 mm，1.8 μm)、Waters BEH (2.1 mm×100 mm，1.7 μm)，按“2.1”项下方法进行耐用性考察，结果各杂质间的分离均良好。

2.5 样品中有关物质的测定

取注射用盐酸头孢甲肟样品 10 批，按“2.1”项下方法测定，结果见表 4。

3 讨论

本次研究采用 UPLC 测定盐酸头孢甲肟及注射用盐酸头孢甲肟的有关物质，与 HPLC 相比[5-8]，分离度优于后者，分析时间几乎缩短了 40%，流动相消耗量约为后者的 36%，且分析结果基本一致，分析效率大幅提高。该方法同样适用于盐酸头孢甲肟及注射用盐酸头孢甲肟的含量测定，可替代现行标准方法。

表 4 注射用盐酸头孢甲肟有关物质测定结果(n=2)

Tab. 4 Results of related substance determination for cefmenoxime hydrochloride for injection(n=2)

批号	单个最大杂质/%	杂质总和/%
10717028	0.2	1.1
171206	0.2	1.7
171108	0.2	0.8
20171202	0.2	0.8
20171203	0.2	0.8
20180101	0.2	0.7
171204	0.3	1.0
171209	0.2	0.8
170903	0.4	2.1
170102	0.4	1.6

REFERENCES

[1] CHEN S Q, TAO X X, GAO H Y. Clinical evaluation of injectable cefmenoxime hydrochloride in the treatment of acute bacterial infection [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2008, 32(12): 559-562.

[2] WANG H L, WANG Z S, HUO L, et al. Randomized controlled clinical trial on injective cefmenoxime hydrochloride versus cefoperazone in the treatment of acute bacterial infection [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2005, 21(5): 323-327.

[3] OKONOGI K, KUNO M, KIDA M, et al. β-lactamase stability and antibacterial activity of cefmenoxime(SCE-1365), a novel cephalosporin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1981, 20(2): 171-175.

[4] 中国药典. 二部[S]. 2015: 909-911.

[5] RUAN D, WANG H B, WANG J. Gradient HPLC determination of related substances of cefmenoxime hydrochloride drug substance and its sterilized powder of injection [J]. J Chin Antibiotics(中国抗菌药物杂志), 2012, 37(11): 843-847.

[6] LI X L, LIU Y Q, TANG Q. Determination of the content of cefmenoxime hydrochloride and related substance by HPLC [J]. J Ped Pharm(儿科药学杂志), 2014, 20(8): 45-47.

[7] LI Q L, LIU J J, HUANG J L, et al. Determination of cefmenoxime hydrochloride for injection and it's related substances by HPLC [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2006, 31(12): 755-757.

[8] WANG H Y, SUN C H. Effect of the ^{60}Co-γ ray irradiation sterilization on the content of notoginsenoside R1 in Sanqi powder [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 875-877.

收稿日期：2019-01-24

(本文责编：沈倩)