

头孢噻肟钠中7-ACA残留的测定

谷海泽^{1,3} 巩海雪^{*1,5} 李敏^{1,4} 王立忱^{1,2} 杨梦德^{1,2}

1. 华北制药河北华民药业有限责任公司 河北 石家庄 052165
2. 河北省头孢类药物制备技术创新中心 河北 石家庄 052165
3. 抗生素酶催化与结晶技术国家地方联合工程实验室 河北 石家庄 052165
4. 河北省企业技术中心 河北 石家庄 052165
5. 石家庄市企业技术中心 河北 石家庄 052165

摘要:目的:采用高效液相色谱法(HPLC)测定头孢噻肟钠合成过程中7-ACA的残留。经过验证:该方法的重复性(RSD)为0.58%,中间精密度(RSD)为0.9%,线性范围为定量限40%~150%浓度范围内,回归线的相关系数(R)为0.9999。此分析方法学的验证指标,包括专属性、精密度、线性和耐用性等,符合相关要求。故将此方法作为测定头孢噻肟钠中的7-ACA残留的专用方法。

关键词:头孢噻肟钠;7-ACA;高效液相色谱法;方法学验证

头孢噻肟钠(Cefotaxime sodium)为白色,类白色或淡黄白色结晶性粉末,属于第三代头孢菌素的衍生物,具有抗菌谱广,抗菌作用强,毒副作用小等优点,临床应用用于各种敏感菌感染的治疗中国专利《头孢噻肟酸的制备方法》(CN201810296174.5)^[1]中公开了一种头孢噻肟酸的合成方法,以7-ACA为原料,与AE活性酯在二氯甲烷、乙醇、三乙胺体系下反应得到头孢噻肟酸,再与乙酸钠经成盐反应得到头孢噻肟钠。

《ICH Q3A(R2) 新原料药中的杂质》^[2]中,对杂质进行了分类。其中有机杂质为可能会在新原料药的生产过程和或储存期间有所增加。我们通过分析原料药的合成路线,确定了头孢噻肟钠原料药中残留的7-ACA来自于起始物料。为避免有机杂质超标影响药品质量,根据2020版药典四部通则《9102药品杂质指导原则》^[3]进行了一系列的研究,选择通过HPLC法进行检测并进行了充分的方法学验证^[4-5]。该方法具有较好的专属性,操作简单,重复性好,符合方法学验证要求。

1 实验部分

(1)仪器

作者简介:谷海泽(1986—),女,河北石家庄人,工程师,研究方向:头孢类抗生素质量研究。(E-mail:907900069@qq.com)。

通讯作者:杨梦德,高级工程师,研究方向:头孢类抗生素合成,生产工艺研究。(E-mail:yangmd2005@163.com)。

巩海雪,助理工程师,研究方向:药物质量研究,(E-mail:gonghaixue123@163.com)

岛津高效液相色谱仪LC-20AB型、Agilent高效液相色谱仪1260型、梅特勒.托利多FE20pH计、梅特勒.托利多的百万分之一天平XPR26/A型以及十万分之一天平XS105DU型。

(2)试药与试剂

本次研究涉及的物质包括:头孢噻肟对照品、7-氨基头孢烷酸(7-ACA)对照品,对照品均由中国食品药品检定研究院提供,其中头孢噻肟对照品中头孢噻肟含量为92.2%,7-氨基头孢烷酸对照品中7-氨基头孢烷酸含量为96.9%。此外,还有磷酸氢二钠、磷酸二氢钾和磷酸(均为分析纯级别),甲醇(色谱纯级别),纯化水。

(3)色谱条件:

对液相色谱仪进行参数设置:紫外检测器,波长设定为254nm,进样量20 μ l,流速1.0ml/min,柱温25 $^{\circ}$ C。本次研究使用的色谱柱是Kromasil C18的,大小为4.6mm \times 150mm \times 5 μ m,方法指导原则为通则0512高效液相色谱法和通则9101药品质量标准分析方法验证指导原则(《中国药典》2020版-附录)。

(4)溶液配制:

磷酸盐缓冲液:使用Na₂HPO₄和KH₂PO₄配置缓冲液,用纯化水溶解、稀释上述试剂,最终配置成含有0.0213mol/L Na₂HPO₄和0.0004mol/L KH₂PO₄的溶液。

pH7.0磷酸盐缓冲液:使用Na₂HPO₄配置磷酸盐缓冲液,用纯化水溶解、稀释Na₂HPO₄,最终配置成含有0.24mol/L Na₂HPO₄的溶液,在用磷酸调pH至7.0。

流动相的制备:磷酸盐缓冲液:甲醇=80:20。

7-ACA对照品贮备液:用pH7.0磷酸盐缓冲液溶解7-ACA对照品,使溶液中含有0.3007mg/mL 7-ACA对照

品,精密量取5mL于50mL容量瓶中,用流动相进行稀释。

7-ACA对照品溶液:使用7-ACA对照品贮备液进行配置,最终配置成含有0.03007mg/mL 7-ACA对照品的溶液。

头孢噻肟对照品溶液:使用头孢噻肟对照品进行配置,最终配置成含有0.3003mg/mL头孢噻肟对照品的溶液。

供试品溶液:加入反应液(1滴)前,先在50mL容量瓶中加入20mL流动相,振摇溶解,用流动相溶解稀释至刻度,过滤。

加标供试品溶液:按照供试品溶液的配置方法,加入反应液(1滴)后振摇溶解,再精密量取5mL 7-ACA对照品贮备液置该容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤。

2 结果与讨论

(1) 专属性试验

使用1.4项下配置的空白溶液、7-ACA对照品溶液、头孢噻肟对照品溶液、供试品溶液和加标供试品溶液,进行色谱分析并记录色谱图。结果见表1。

表1 专属性试验结果

名称	保留时间 (min)	峰面积	纯度因子	分离度	
7-ACA对照品溶液	2.478	91.10641	999.988	/	/
头孢噻肟对照品溶液	10.245	11444.1	999.994	/	/
供试品溶液	2.478	9.91962	999.991	R ₁ = 2.56	R ₂ = 3.88
加标供试品溶液	2.477	98.0807	999.959	R ₁ = 2.54	R ₂ = 3.84

备注: R₁表示7-ACA峰与前相邻峰的分度度; R₂表示7-ACA峰与后相邻峰的分度度

结论: 空白溶液内未检出任何干扰7-ACA残留测定的物质,检测出的7-ACA纯度因子均大于990,且各溶液中7-ACA峰的保留时间均一致,分别为2.478min、2.477min和2.478min。7-ACA峰与前后相邻峰中的分离度均满足要求,其中供试品溶液分离度分别为为2.56和3.88,加标供试品溶液分离度分别为 2.54和3.84。以上数据表明此7-ACA残留测定方法专属性良好。

(2) 检测限、定量限

定量限: 在10mL容量瓶中加入1.4项下配置的7-ACA对照品溶液1mL,加入流动相定容并摇匀,即得定量限溶液。液相色谱仪进样20μl,记录色谱图。结果如下:

表2 定量限试验结果

名称	定量限浓度 (ng/mL)	定量限 (ng)	信噪比 (≥ 10)	相当于供试品浓度的百分比 (%)	重复性6次	
					T(RSD ≤ 2.0%)	A(RSD ≤ 5.0%)
7-ACA对照品溶液	0.3007	0.006014	234.62	0.3007	0.12	0.22

检测限: 在10mL容量瓶中加入定量限溶液3mL,加入流动相定容并摇匀,即得检测限溶液。液相色谱仪进样20μl,记录色谱图。结果如下:

表3 检测限试验结果

名称	检测限浓度 (ng/mL)	检测限 (ng)	信噪比 (≥ 10)	相当于供试品浓度的百分比 (%)
7-ACA对照品溶液	0.09042	0.0018084	64.19	0.09042

(3) 线性与范围

使用7-ACA对照品贮备液配置线性溶液,液相色谱仪进样20μl,记录色谱图。结果如下:

表4 7-ACA线性试验结果

	7-ACA对照品贮备液体积 (mL)				
	2	3	4	5	7.5
相对浓度 (%)	40	60	80	100	150
实际浓度 (μg/mL)	1.236	1.854	2.472	3.09	4.635
峰面积	37511	55628	74136	94391	139250
回归方程	y = 30004.4747 x + 490.3603				
R相关系数 (不小于0.998)	0.9999				
100%浓度响应值的25%	23597.75				
Y轴截距	490.3603 < 23597.75				
结论	峰面积与浓度呈良好线性关系				

(4) 精密度

① 重复性

使用1.4项下配置的供试品溶液,设置进样量为20μL,6次连续进样并记录色谱图,计算6个数据中7-ACA残留的RSD值,RSD值为0.58%,小于2.0%。

表5 7-ACA重复性试验结果

编号	1	2	3	4	5	6	平均值 (%)	RSD (%)
7-ACA残留 (%)	0.343	0.343	0.343	0.346	0.340	0.344	0.343	0.58

② 中间精密度

本测试在同一天由非同一操作者在不同的仪器上设置不同的色谱条件,利用2.4.1项下的供试品溶液,6次连续进样并记录色谱图。计算6个数据中7-ACA残留的RSD值为1.19%,小于2.0%。对上述全部数据进行计算比较,12份结果的RSD = 0.9% (< 10%)。中间精密度良好。

表6 中间精密度试验结果

试验人员	1	2	3	4	5	6	平均值 (%)	RSD (%)	
1 (%)	0.343	0.343	0.343	0.346	0.340	0.344	0.344	0.58	0.9
2 (%)	0.339	0.346	0.345	0.343	0.340	0.350		1.19	

(5) 溶液稳定性

使用2.1专属性项下的7-ACA对照品溶液和2.4.1重复性项下的供试品溶液进行溶液稳定性试验；液相色谱仪进样20 μ L，并记录色谱图。结果显示，在4 $^{\circ}$ C条件下，7-ACA对照品溶液保留时间的RSD值为0.26%，7-ACA对照品溶液稳定；供试品溶液峰面积的RSD值为0.46%，溶液稳定。

表7 溶液稳定性试验结果

	时间 (h)	7-ACA对照溶液	供试品溶液	
		保留时间 (min)	峰面积	7-ACA残留 (%)
4 $^{\circ}$ C条件	0	2.596	11562	0.343
	2	2.592	11657	0.346
	4	2.587	11507	0.342
	6	2.586	11638	0.346
	8	2.587	11573	0.344
	10	2.575	11600	0.344
	12	2.588	11545	0.343
RSD(%)	/	0.26	0.46	0.45

(6) 耐用性

通过使用不同厂家（品牌）的色谱柱、改变流动相中磷酸盐缓冲液与甲醇比例、改变流速来考察分析方法的耐用性。要求：7-ACA峰与前后相邻峰的分度符合规定。

结果表明，通过调节流速0.9ml/min ~ 1.1ml/min，调节磷酸盐缓冲液比例79% ~ 81%，或者使用不同品牌C18的色谱柱，测定的7-ACA峰与其前后相邻峰的分度均不小于1.5，耐用性良好。

3 讨论

目前，在检测头孢噻肟钠中7-ACA（7-氨基头孢烷酸）的残留时，高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）和紫外分光光度法^[6]都是常用的分析方法，且各有其优势。而本次研究之所以选择了高效液相色谱法，是因为相比其他两种检测方式，这种检测方式具有更高

的分离能力、更高的灵敏度、更广泛的适用性，还可以与其他检测技术（如质谱）联用，进一步提高检测的特异性和灵敏度。这些优势使得高效液相色谱法成为这一领域的首选分析方法。

综上所述，本实验建立了可用于评价头孢噻肟钠中7-ACA残留测定的高效液相色谱法，该方法具有较好的专属性，操作简单，重复性好，定量限、检测限、线性与范围、精密度、稳定性、耐用性符合方法学验证要求，可以为检测头孢噻肟钠中的7-ACA残留提供可靠的实验依据和评价方法。

本论文出资项目：头孢噻肟大宗抗生素微通道反应技术研究及产业化。

参考文献

- [1]. 张立明, 尹纪松, 周红艳. 《头孢噻肟酸的制备方法》: 中国, CN201810296174.5 [P], 公开日期: 2018.09.28.
- [2]. 国际人用药注册技术要求协会. ICH协调指导原则 Q3A(R2)杂质: 新原料药中的杂质[S].
- [3]. 赵玉娟, 魏宝军, 贾金焕等. HPLC法测定反应液中7-氨基头孢烷酸的残留 [J]. 当代化工研究, 2023 (22): 71-73.
- [4]. 表亚因, 于晓娜, 孙玉双等. 头孢噻肟钠中2-巯基苯并噻唑和二硫化二苯并噻测定 [J]. 化工与医药工程, 2022 (43): 25-28.
- [5]. 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020版四部) 通则9102药品杂质指导原则[S].
- [6]. 肖荔人. 7-ACA的质量对头孢噻肟钠(HR-756)色泽影响的探讨 [J]. 2000(12): 116-117.