·实验研究·

注射用盐酸头孢替安质量评价

王立新,崇小萌,姚尚辰,尹利辉,许明哲
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要] **目的**:探寻影响注射用盐酸头孢替安产品质量的内在因素。**方法**:对不同企业的注射用盐酸头孢替安常规质量进行分析,并对其加热稳定性进行了比较。采用柱切换 LC-MS 方法对降解杂质进行了定性分析,采用粉末 X 衍射方法对不同企业产品的晶型进行了比较,采用光散射法对产品粒度分布进行了测定,采用热重分析(TGA)结合近红外光谱法对水分结合方式进行了推测。**结果**:不同企业产品常规质量差异较小,但热稳定性及内在质量存在较大差异。**结论**:影响注射用盐酸头孢替安稳定性的内在因素主要为晶体粒径分布以及制剂中碳酸钠含量。评价产品的质量应从其内在质量入手,从而评价生产工艺的优劣。

[关键词] 注射用盐酸头孢替安;杂质谱;晶型;水分;质量评价
[中图分类号] R927.11 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)20-1896-10

Quality evaluation of cefotiam hydrochloride for injection

WANG Li-xin, CHONG Xiao-meng, YAO Shang-chen, YIN Li-hui, XU Ming-zhe
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the internal factors affecting the quality of cefotiam hydrochloride for injection. **Methods**: The routine quality items of cefotiam hydrochloride for injection products from different manufactures were evaluated, and the thermal stability was compared. The degradation impurities were analyzed using column switching LC-MS, the crystal forms of products with different manufactures were compared by powder X diffraction method, the particle size distribution of the products was determined by light scattering method, and TGA and near infrared spectroscopy were used to predict the binding mode of water. **Results**: The differences of the routine quality among the products from different manufacturers were small, but the thermal stability and internal quality showed significant differences. **Conclusion**: The main internal factors affecting the thermal stability of cefotiam hydrochloride for injection were crystal size distribution and sodium carbonate content. The evaluation of product quality should start with its internal quality, so as to evaluate the advantages and disadvantages of the production process.

[**Key words**] cefotiam hydrochloride for injection; impurity spectrum; crystal form; moisture; quality evaluation

盐酸头孢替安为日本武田药品工业株式会社和富山化学工业株式会社研制开发上市的药物[1-2],属于第二代头孢菌素类药物,对革兰阴性菌和阳性菌都有广泛的抗菌作用,用于治疗敏感菌所致的肺炎、支气管炎、胆道感染、手术和外伤所致的感染及败血症等[3-5]。临床疗效在一些特殊领域难以被其他药物代替,是国家基本医疗保险目录中的乙类药品。目前,该品种制剂有国产批文 39 个,共 13 家生产企业,进口批文 10 个,涉及 2 家生产企业。国内上市产品规格有 0.25,0.5,1.0 和 2.0 g[6]。此品种在《美国药典》43 版及《日本药局方》17 版中均有收录[7-8]。

目前国内注射用盐酸头孢替安的常规质量情况整体较好[9],但未见对不同生产工艺产品稳定性及

[作者简介] 王立新,男,主管药师,主要从事抗生素药品检验工作。联系电话:(010)53851541, E-mail: 13601138396@163.com。共同第一作者:崇小萌,女,副主任药师,主要从事抗生素药品质量控制及研究工作。联系电话:(010)53851538, E-mail: chongxm@nifdc.org.cn。
[通讯作者] 许明哲,男,主任药师,主要从事化学药品研究工作。联系电话:(010)53852506, E-mail: xumzhe@nifdc.org.cn。

内在质量比较分析的报道。本文通过比较3批不同生产企业的注射用盐酸头孢替安常规质量、稳定性以及内在质量，确定了头孢替安降解杂质的结构，总结出其降解途径，在此基础上对内在质量包括晶型、水分结合方式进行了分析，将内在质量与稳定性相关联，探寻影响产品稳定性的关键因素。

材料与方法

1 仪器

反相液相色谱系统：Dionex ultimate 3000，工作站：Chromeleon。

柱切换LC/MS系统：3201 S1－2双元泵，3202 S1－2真空脱气机，3014 S1－2柱温箱，3012 S1－2柱切换系统，3133 S1－2自动进样器，购自SHISEIDO（Tokyo，Japan）公司；Accela二极管阵列检测器（Thermo Fisher Scientific Inc.，USA）；3200Q TRAP质谱仪（Applied Biosystems Inc.，USA），工作站：Analyst®（version 1.6.2）。

BINDER VD53真空烘箱；METTLER TOLEDO DL－38水分滴定仪；TA instruments Hi-Res TGA 2950热重分析仪；D/MAX－2200X射线衍射仪（Rigaku公司）：Ni滤光片；D/teX Ultra 250一维阵列检测器，配RINT 2000 Series分析软件；MATRIX－F型近红外光谱仪（Bruker Optik GmbH公司）；半导体制冷铟镓砷（InGaAs）检测器；1.5 m漫反射光纤探头测量工作站：OPUS 6.5；YB－2型澄明度检查仪。

2 样品与试剂

注射用盐酸头孢替安，3个厂家各1批样品；无水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、硫酸铵、氢氧化铵均购自国药集团化学试剂有限公司，分析纯；乙腈（Fisher Chemical公司，分析纯）；氯化钠基准物质由国家标准物质研究中心提供。

3 方法

3.1 有关物质检测 色谱柱：Agela Venusil MP C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）。流动相：流动相A为磷酸盐缓冲溶液（取7.098 g无水磷酸氢二钠，加水溶解并稀释至1 000 mL，取800 mL该溶液，加入6.8 g磷酸二氢钾，用水稀释至1 000 mL，调节pH值为7.7）；流动相B为乙腈；进行梯度洗脱（0～19 min，97% A；20～49 min，90% A；50 min，75% A；51～55 min，97% A）；紫外检测器检测波长为254 nm；柱温为40 ℃；流速为1.0 mL·min^{-1}；进样体积10 μL。

3.2 含量测定检测 色谱柱：Phenomenex C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：pH 6.5硫酸铵溶液（取13.1 g硫酸铵，加水850 mL溶解，用2 mol·L^{-1}氢氧化铵溶液调pH至6.5）-乙腈（85∶15）；紫外检测器检测波长为254 nm；流速为1.0 mL·min^{-1}；柱温为25 ℃；进样体积20 μL。

3.3 加速热稳定性实验 将样品分别置于60 ℃的恒温恒湿箱中，分别于5，10，15，20，25和30 d取样。

3.4 柱切换LC-MS分析 色谱柱：Shiseido CAPCELL C_{18}柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；切换阀：六通阀A和B；切换用定量环体积：500 μL。流动相：C相为含有1%甲酸的水溶液；D相为乙腈-1%甲酸溶液（90∶10）；梯度洗脱见表1。

表1 LC方法梯度洗脱程序

时间/min	流动相C/%	流动相D/%	注释
0	100	0	对目标杂质进行脱盐处理
5.5	100	0	
5.6	0	100	将脱盐后的目标杂质输送至MS中
50	0	100	

MS条件：+EMS和+EPI：扫描范围：10～500 Da；气帘气：20 psi；IS：+4 500 V；干燥气温度：500 ℃；喷雾气：60 psi；干燥气：65 psi；碰撞气：中等；去簇电压：+20 V；摄入电压：+6 V；碰撞池入口电压：+19 V；碰撞电压：+10 V；碰撞室射出电压：+0 V。

3.5 粉末X衍射法 取样品约50 mg，置玛瑙研钵中，研细，采用玻璃板正压法压片。采用CuKα1靶；电压40 KV；电流40 mA，狭缝宽度1/2 deg，0.15 mm，扫描速度2 deg·min^{-1}，扫描范围（2θ）2～50 deg。

3.6 粒度分布测定 光散射法，干法，背景/样品测试时间：10 s，颗粒折射率：1.52，颗粒吸收率：0.1，分散气压：2.5 bar。

3.7 热重分析（TGA） 高解析模式，升温速率为2 ℃·min^{-1}，温度范围20 ℃～120 ℃。

3.8 水活度测定 水活度稳定时间2 min，测量精度0.003，重现性0.002，分别在20 ℃，25 ℃，30 ℃，35 ℃和40 ℃这5个温度下测定供试品的水活度。

3.9 近红外方法 样品数据采集：固体光纤探头漫反射扫描法；分辨率：8 cm^{-1}；背景扫描次数：64次；样品扫描次数：64次；扫描范围：12 000～4 000 cm^{-1}，固体光纤探头顶在瓶底，测定3次。分别在30 ℃，

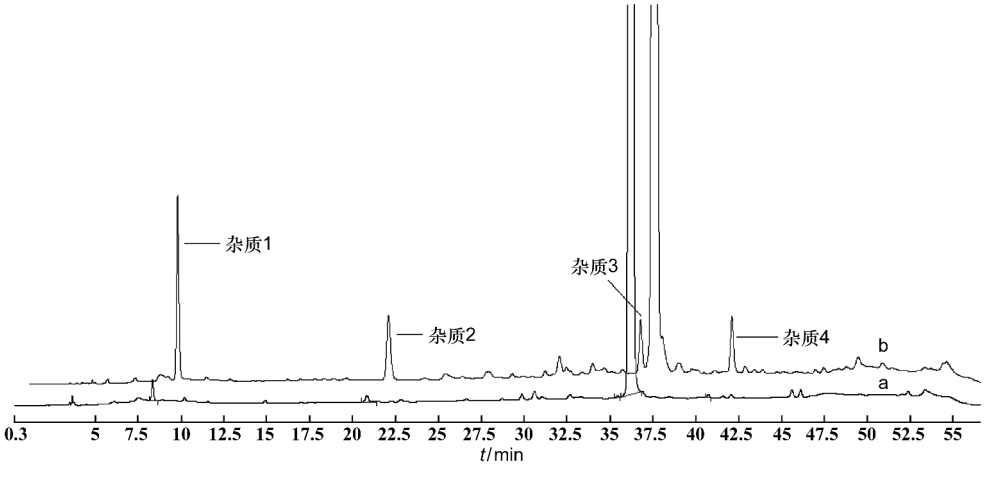
40 ℃,50 ℃,60 ℃,70 ℃,80 ℃和 90 ℃这 7 个温度点下测定。

3.10 碳酸钠测定 色谱条件:Acclacim Trinity 色谱柱(100 mm×3.0 mm,3 μm);流动相为乙腈-0.05 mol·L^{-1}乙酸铵(冰醋酸调 pH 至 5.0,60∶40);蒸发光检测器,Tube Tem 85 ℃,Gain 1.0,GasFlow:2.5 L·min^{-1};柱温:30 ℃,流速 0.5 mL·min^{-1},进样体积:10.0 μL。供试品溶液的制备:取供试品适量,加水制成浓度约为 1 mg·mL^{-1}的溶液。对照品标准曲线溶液的制备:精密称取氯化钠基准物质适量,加水制成浓度约为 6 mg·mL^{-1}的溶液。分别取上述溶液 0.3,0.6,1.0,1.3 和 1.6 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加水至刻度。

结 果

1 常规质量分析

对 3 批注射用盐酸头孢替安的性状、紫外鉴别、溶液澄清度和颜色、可见异物、酸度、干燥失重、有关物质及含量进行检测,各项检验结果均未见明显差异。有关物质典型色谱图见图 1,3 批供试品杂质种类基本一致,其中最大单个杂质均为杂质 1,有关物质结果见表 2。



a:0 d 样品;b:30 d 样品

图 1 注射用盐酸头孢替安有关物质典型色谱图

表 2 3 批注射用盐酸头孢替安有关物质检测结果

样品	取样时间/d	杂质 1 含量/%	杂质 2 含量/%	杂质 3 含量/%	杂质 4 含量/%	总杂质含量/%
1	0	0.1	0.1	0.01	0.04	0.8
	30	2.2	1.6	0.9	1.2	7.4
2	0	0.2	0.1	0.02	0.04	1.0
	30	3.4	1.8	1.0	1.2	10.3
3	0	0.2	0.1	0.04	0.06	0.9
	30	4.0	2.7	1.8	2.2	14.5

2 加速热稳定性实验

由于头孢菌素类抗生素对热不稳定,故对注射用盐酸头孢替安进行加速稳定性实验,进一步比较产品质量。通过对杂质谱的分析进一步比较不同工艺产品的稳定性。稳定性实验 30 d 后的有关物质典型色谱图见图 1。稳定性实验后的样品杂质种类没有明显的改变,杂质 1 ~ 杂质 4 的含量明显增加,而其他杂质含量基本没有变化,提示此 4 种杂质为降解杂质。3 批供试品中 4 种主要杂质变化趋势图见图 2,供试品 1 和供试品 2 的杂质变化趋势相似,且供试品 1 的杂质含量变化趋势更为平缓,杂质含量更低;2 批供试品均与供试品 3 存在明显差异,供试品 3 在 30 d 加速稳定性实验中总杂质及 4 种主要降解杂质的增加均较快,且杂质 3 和杂质 4 的含量变化更为明显。此结果提示供试品 3 的稳定性易受温度影响,热稳定性较差,且产品的热降解反应途径与供试品 1 和供试品 2 可能不同。

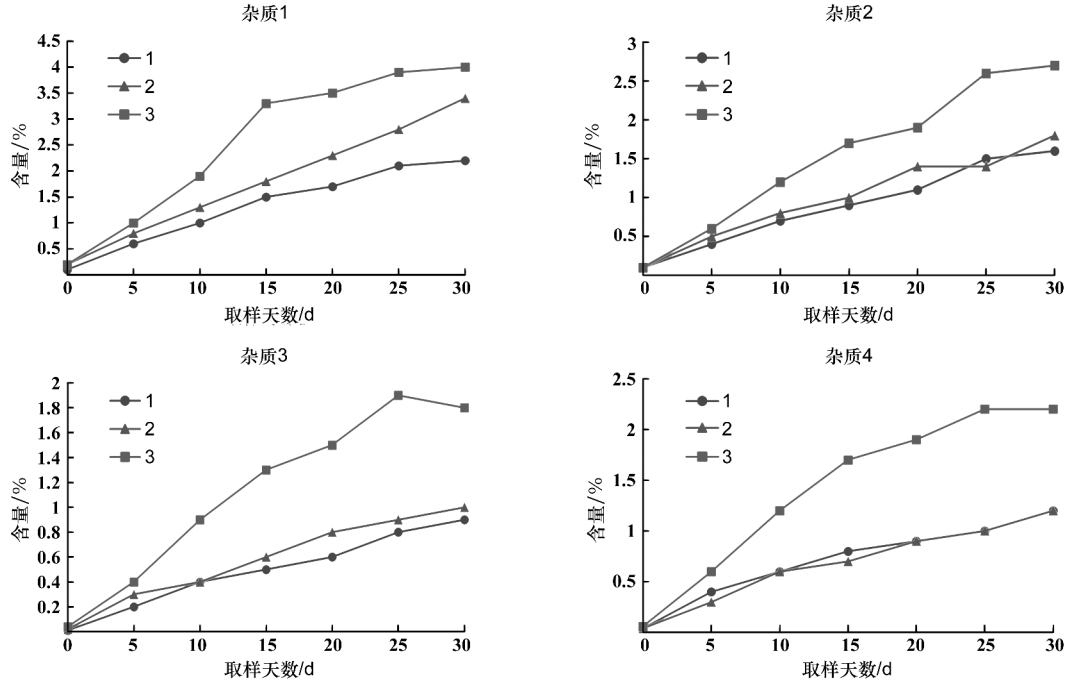


图 2　稳定性实验中 3 批供试品中 4 种主要杂质变化情况

3　降解杂质结构分析

为探讨加速实验中注射用盐酸头孢替安的降解反应机理,采用柱切换 LC-MS 方法分析盐酸头孢替安的降解杂质结构。

3.1　杂质 1 结构分析　对供试品中的杂质 1 色谱峰进行质谱分析。其 + EMS 及 *m/z* 174.2［M + H］的二级质谱图见图 3。

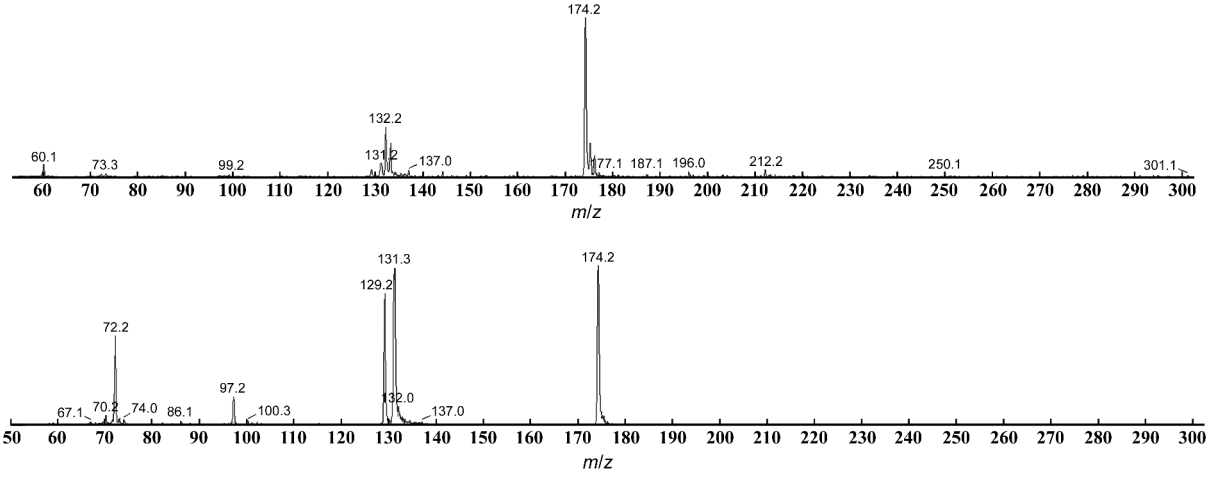
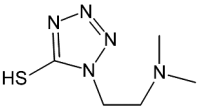
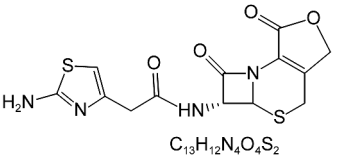
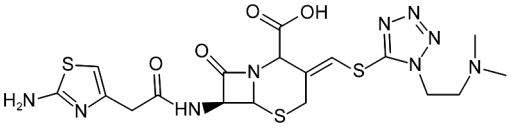
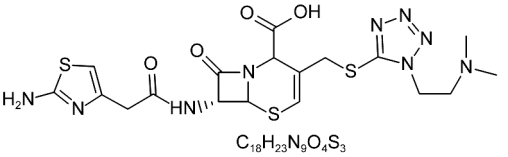


图 3　杂质 1 的 EMS 与 EPI@ 174.2 的质谱图

杂质 1 的 + EMS 图中,给出了 *m/z* 174.2［M + H］峰以及 *m/z* 196.0［M + Na］峰,由此推测杂质 1 的相对分子量为 173.2。二级质谱分析表明,存在 *m/z* 131.0［M + H-$(CH_3)_2NH$］的碎片峰,推断该杂质分子为头孢替安的 3 位侧链四氮唑。杂质结构见表 3。

表 3 盐酸头孢替安 4 种主要降解杂质结构

编号	杂质名称	杂质结构
杂质 1	四氮唑	 $C_5H_{11}N_5S$ *m/z*: 173.1
杂质 2	头孢替安内酯	 $C_{13}H_{12}N_4O_4S_2$ *m/z*: 352.0
杂质 3	头孢替安同分异构体	 $C_{18}H_{23}N_9O_4S_3$ *m/z*: 525.10
杂质 4	头孢替安同分异构体	 $C_{18}H_{23}N_9O_4S_3$ *m/z*: 525.1

3.2 杂质 2 结构分析 对供试品中的杂质 2 进行质谱分析。其 + EMS 及 *m/z* 353.2[M + H]的二级质谱图见图 4。

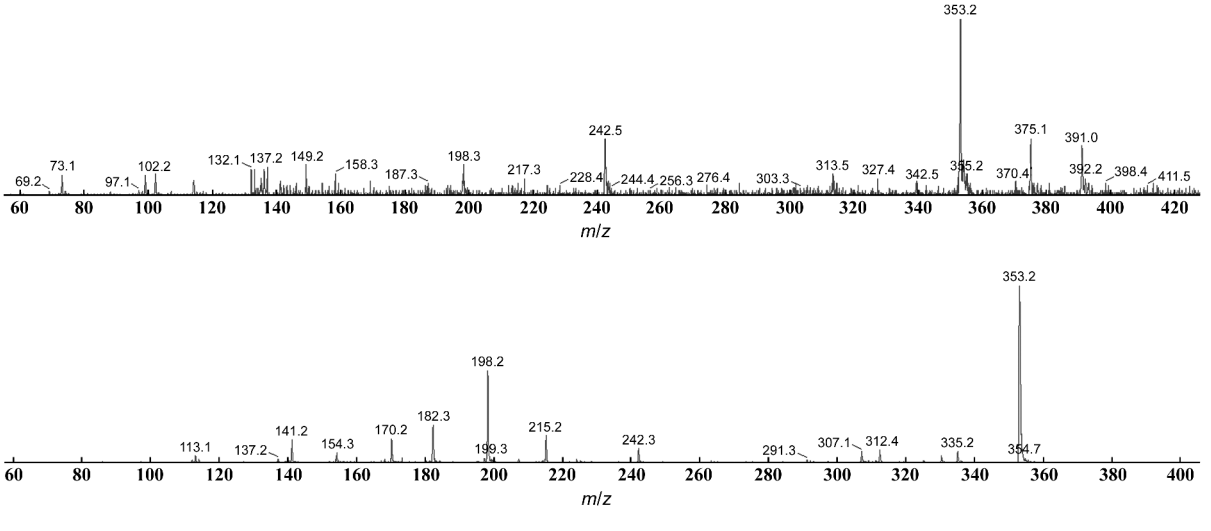


图 4 杂质 2 的 EMS 与 EPI@353.2 的质谱图

杂质 2 的 + EMS 图中给出了 *m/z* 353.2,375.1 和 391.0 的离子,分别推测为[M + H],[M + Na]以及[M + K]峰,即杂质 2 的相对分子量为 352.2。根据二级质谱图,推测其裂解规律,见图 5,推断杂质 2 为头孢替安内酯,见表 3。

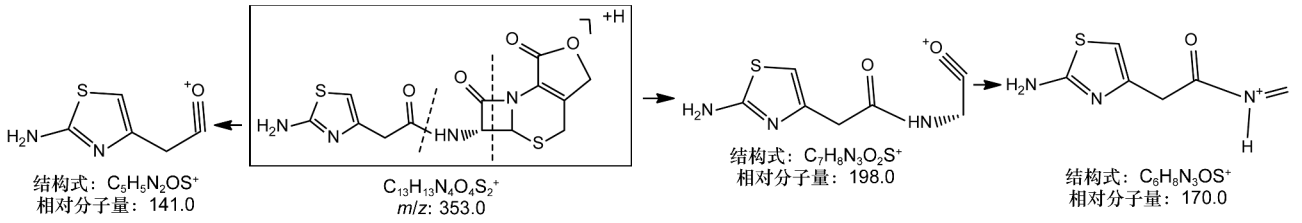


图 5　杂质 2 的质谱裂解途径

3.3　杂质 3 结构分析　对供试品中杂质 3 进行质谱分析。其 +EMS 及 *m/z* 526.1[M + H]的二级质谱图见图 6。

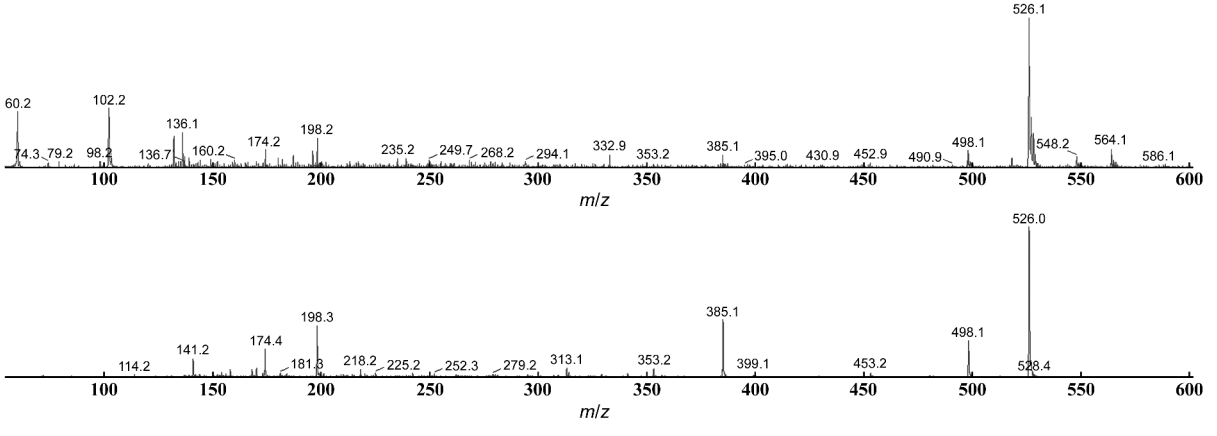


图 6　杂质 3 的 EMS 与 EPI@526.1 的质谱图

杂质 3 的 +EMS 图中，给出了 *m/z* 526.0[M + H]峰、*m/z* 548.2[M + Na]峰以及 *m/z* 564.1[M + K]峰。因此推断该杂质的相对分子量为 525.0，与头孢替安的相对分子量一致，为其同分异构体。

在其二级质谱图中，存在 *m/z* 174.4 的碎片峰，推断该杂质分子中含有 3 位侧链四氮唑。同时，分子中存在 *m/z* 198.3 的碎片离子，推断该杂质分子中含有与头孢替安相同的 7 位侧链。因此推断，3 号杂质与头孢替安的结构差异主要在母核部分。推测杂质 3 的裂解途径见图 7。

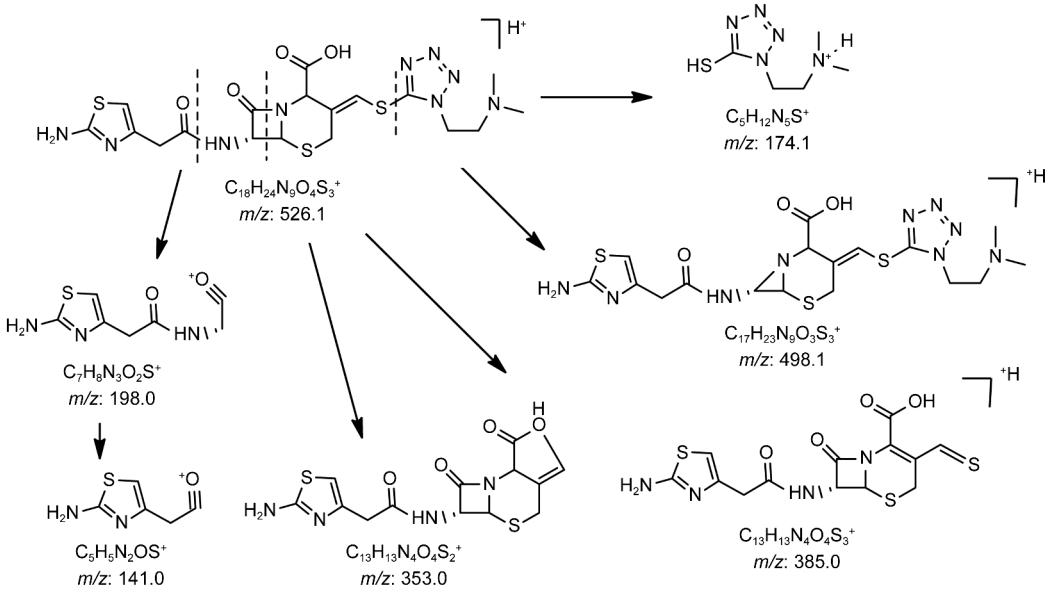


图 7　杂质 3 的质谱裂解途径

3.4 杂质 4 结构分析 对供试品中的 4 号杂质进行质谱分析。其 + EMS 及 *m/z* 526.1[M + H]的二级质谱图见图 8。

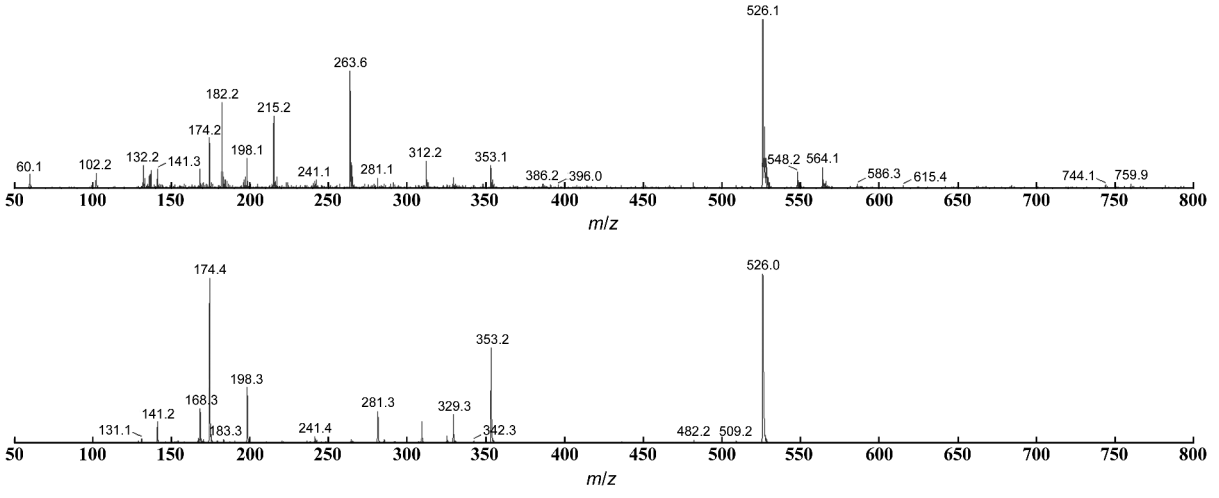


图 8 杂质 4 的 EMS 与 EPI@526.1 的质谱图

在杂质 4 的 + EMS 图中,给出了 *m/z* 526.1[M + H]峰以及 *m/z* 548.2[M + Na]峰以及 *m/z* 564.1[M + K]峰。因此推断该杂质的相对分子量为 525.0,与头孢替安的相对分子量一致,为其同分异构体。

在其二级质谱图中,存在 *m/z* 174.4 的碎片峰,推断该杂质分子中含有 3 位侧链四氮唑。同时,分子中存在 *m/z* 198.3 的碎片离子,推断该杂质分子中含有与头孢替安相同的 7 位侧链。因此初步推断,4 号杂质与头孢替安的结构差异主要在母核部分。推测杂质 4 的裂解途径见图 9。

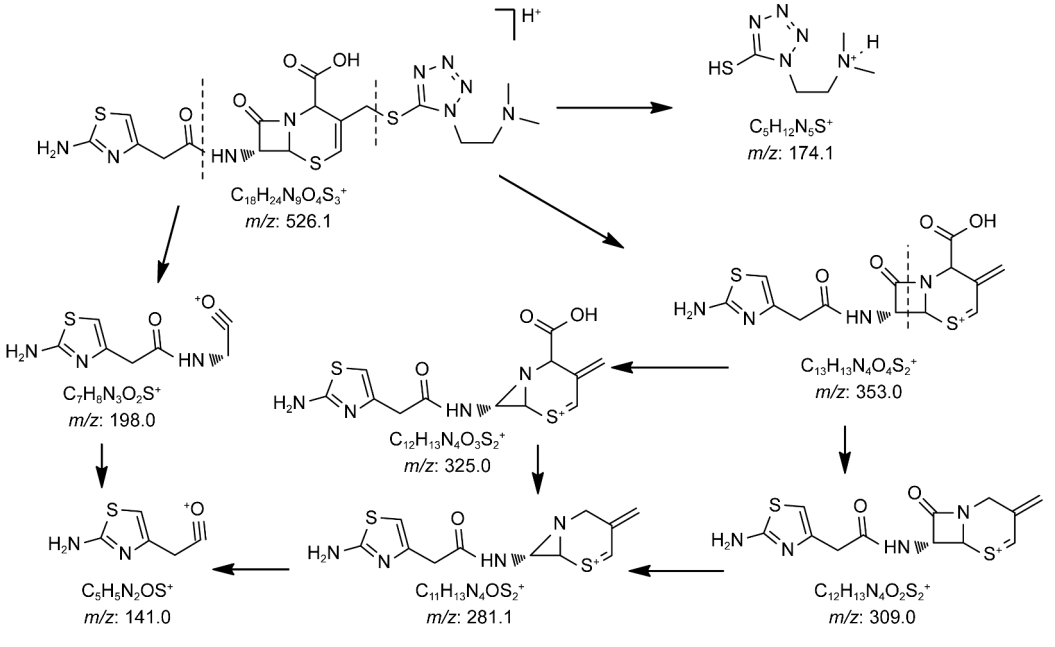


图 9 杂质 4 的质谱裂解途径

3.5 稳定性实验主要降解途经分析 在加速稳定性实验中,3 批供试品中最大单一杂质均为杂质 1,即四氮唑。另一含量较大的杂质为杂质 2,即头孢替安内酯;提示头孢替安在加热条件下主要的降解反应为水解反应,水解产物去四氮唑头孢替安进一步脱水形成头孢替安内酯。头孢替安主要降解反应见图 10。

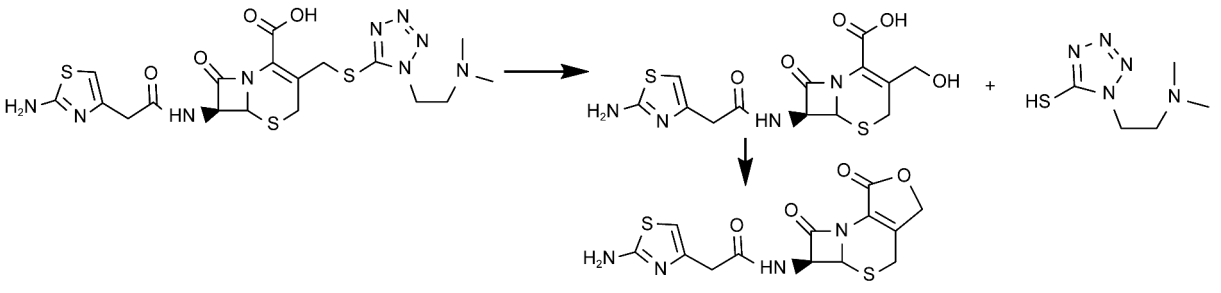


图 10 头孢替安主要降解反应

4 内在质量差异分析

药品物理、化学性质的差异是由其内在质量差异导致的,通过对产品的晶体特性和水分特性等的进一步分析,比较不同工艺产品的内在质量差异,探索形成产品质量差异的原因。

4.1 晶体特性比较 由粉末 X 衍射结果可知,3 批供试品均主要呈现无定型特征。

采用光散射法对 3 批供试品的粒度分布进行测定,见图 11,体积平均粒径见表 4。说明供试品 1 的晶体粒径较大且分布均匀,其结晶工艺较好。

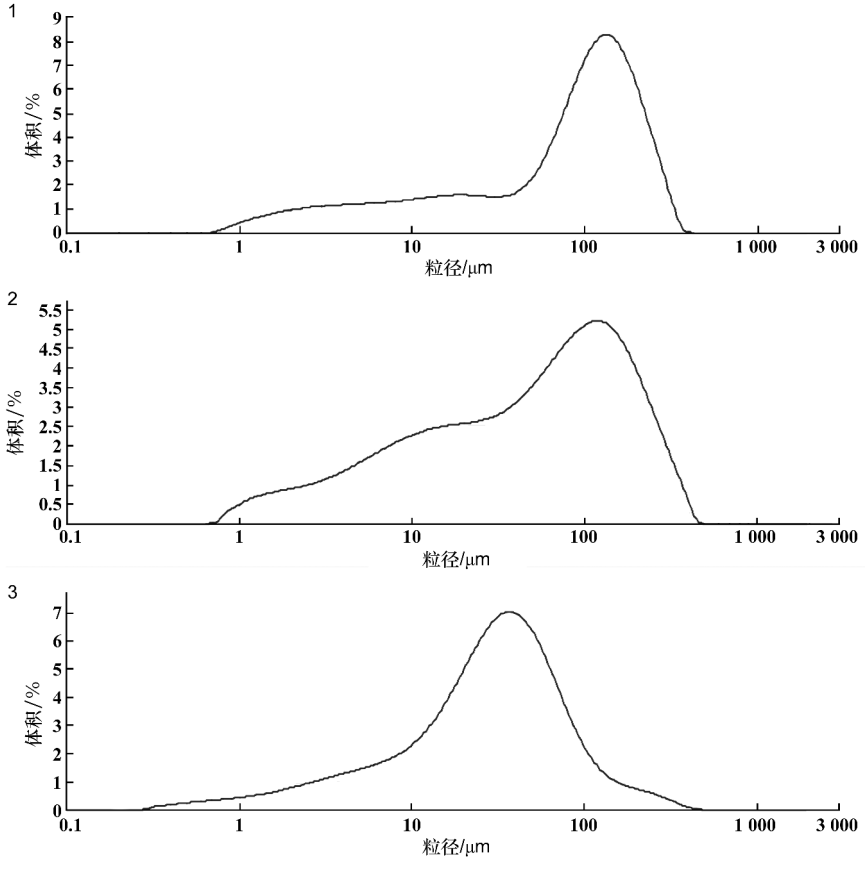


图 11 3 批供试品的粒度分布图

表 4 3 批供试品的体积平均粒径比较

项目	供试品 1	供试品 2	供试品 3
体积平均粒径/μm	101.568	82.868	42.296

4.2 水分特性分析 常规检验中,3 批样品的干燥失重结果见表 5,供试品 1 的水分含量最高,供试品 3 的水分含量最低。3 批供试品 TGA 图如图 12 所示。从图中可以看出,3 批供试品的 TGA 图基本一

致,在 20 ℃ ~ 120 ℃ 的温度范围内逐渐释放水分,80 ℃时水分基本释放完全,提示 3 批供试品中可能均不含有结晶水,水分在样品中是以自由水的形式存在。且 3 批供试品热重失水量的顺序与干燥失重基本一致,见表 5。

表 5 3 批供试品干燥失重、TGA、水活度结果

批次	干燥失重/%	TGA/%	水活度				
			20 ℃	25 ℃	30 ℃	35 ℃	40 ℃
供试品 1	5.5	6.6	0.047	0.058	0.072	0.078	0.086
供试品 2	4.0	4.7	0.046	0.050	0.068	0.073	0.081
供试品 3	3.8	4.9	0.035	0.039	0.048	0.058	0.065

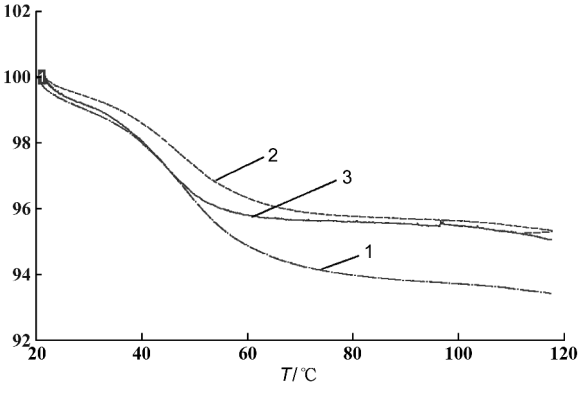


图 12 3 批供试品 TGA 比较

对 3 批供试品水活度进行测定,结果显示 3 批供试品水活度均较小,均是随着温度的升高,供试品水活度略有增加,说明温度对 3 批供试品水分变化的作用是相似的,即 3 批供试品中的水分与样品的结合力基本相同。

3 批供试品在不同温度点下的近红外光谱图见图 13,供试品 3 在各温度下的近红外图谱基本一致,而供试品 1 和供试品 2 在 90 ℃下的近红外图谱在 7 000 和 5 000 cm^{-1} 左右,与其他温度下略有不同,这 2 个波数范围分别为水的一级倍频和合频所在的范围,说明温度的变化只是对水分有影响,而水分的变化并未涉及化学键的变化,水分并未与头孢替安形成有化学键的结晶水,只是以游离水的形式存在,进一步说明样品中不存在结晶水。

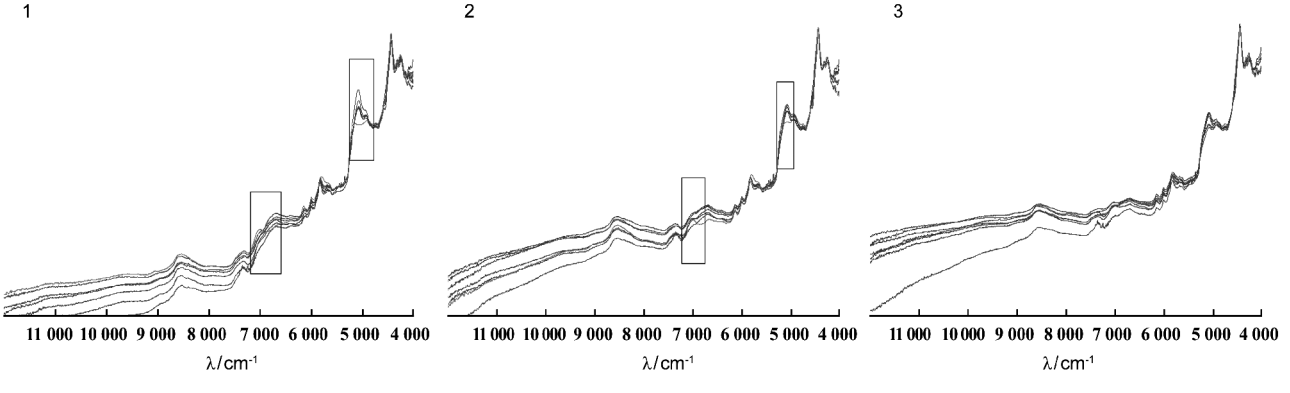


图 13 3 批供试品不同温度下近红外光谱图

综上所述,3 批供试品的晶体形态基本相同,均为无定型产品,供试品 1 晶体粒径较大,结晶工艺较好。3 批供试品中水分均以自由水的形式存在,不存在与头孢替安有化学键的结晶水,3 批供试品的水分含量虽然不同,但是水分与头孢替安的结合力基本相同。供试品的结晶工艺是导致不同产品稳定性差异的因素之一。

4.3 制剂分析 注射用盐酸头孢替安均为盐酸头孢替安原料加适量缓冲剂碳酸钠制成的无菌粉末,在对主成分盐酸头孢替安分析的基础上,也应对碳酸钠的含量进行分析比较。

3 批供试品碳酸钠的含量分别为 9.3%,14.7% 和 18.9%,存在明显差异。由于碳酸钠含量高的供试品其热稳定性较差,提示缓冲剂碳酸钠的量是导

致不同产品稳定性差异的另一个因素，生产企业应对碳酸钠的加入量进行关注和论证。

结　论

通过对 3 批不同生产企业的注射用盐酸头孢替安常规质量、稳定性以及内在质量分析可知，虽然 3 批产品在各项常规检查项中未表现出显著差异，但在热稳定性实验中，供试品 1 的稳定性明显优于供试品 2 及供试品 3，说明不同生产工艺的产品其内在质量是存在差异的。

通过对 3 批供试品晶型、水分结合方式以及制剂的分析发现，3 批供试品虽然均主要表现为无定型特征，但其粒度及其分布具有明显差异，粒度分布均匀且粒径较大的供试品，其结晶工艺较理想，稳定性较好，提示样品的结晶工艺是影响其稳定性的主要因素之一。3 批供试品中的水分均为游离水，其与头孢替安的结合力基本相同，由于水分含量相对较高的供试品并没有表现出较高的不稳定性，提示水分不是影响供试品稳定性的主要因素。此外，制剂中碳酸钠含量的合理性也可能影响制剂的稳定性。

综上所述，对产品质量进行评价不仅要对其外在的常规质量进行分析，还应探寻其内在质量差异，进而可对生产工艺的优劣进行评价。

[参 考 文 献]

[1] 日本制药团体联合会，再评价委员会. 医疗用医药品在评价结果〈No. 56〉抗生物质制剂抗菌物质制剂[R]. 平成 16 年 10 月：38 - 39.

[2] 日本厚生劳动省医药生活卫生局. 平成 27 年度仿制药品品质确保对策事业检查结果报告书[R]. 平成 29 年 3 月：14 - 15.

[3] CARBON C, CHALELIN A, BINGEN E, *et al*. A double-blind-randomized trial comparing the efficacy and safety of a 5-daycourse of cefotiam hexetil with that of a 10-day course of penicillinv in adult patients with pharyngitis caused by group a β-haemolytic-streptococci[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1995, 35(6): 843 - 854.

[4] 刘玉清. 头孢替安临床的合理利用[J]. 中国医药导报，2012，9(8)：112 - 113.

[5] 龙敏，詹倩，陈蓉. 头孢替安致不良反应分析[J]. 中国药房，2014，25(26)：2449 - 2451.

[6] 彭洁，洪建文. 注射用盐酸头孢替安国内外质量现状分析[J]. 国外医药抗生素分册，2020，41(6)：430 - 433.

[7] 美国药典委员会. 美国药典[S]. 43. 2020，NF38.

[8] 本药局方编辑委员会. 日本药典[S]. 17 版. 2016.

[9] 彭洁，李雪，武建卓，等. 注射用盐酸头孢替安质量分析[J]. 中国抗生素杂志，2020，45(3)：218 - 223.

编辑：刘卓越/接受日期：2021 - 07 - 13