

## 研究简报

文章编号: 1001-8689 (2009) 12-0764-03

## Sephadex G-10凝胶色谱条件分析头孢磺啉钠的高分子杂质 Determination of the high molecular weight impurities in cefsulodin sodium by Sephadex G-10 gel chromatography

代丽萍<sup>1</sup> 谢娜<sup>2</sup> 张丹<sup>1,\*</sup>Dai Li-ping<sup>1</sup>, Xie Na<sup>2</sup> and Zhang Dan<sup>1</sup>

(1 四川大学华西药学院, 成都 610041;

2 成都英创科技发展有限公司, 成都 610041)

(1 West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041;

2 Chengdu Entry S&amp;T Development Co., Ltd., Chengdu 610041)

**摘要:** 目的 建立 Sephadex G-10凝胶色谱条件分析头孢磺啉钠高分子杂质的方法。方法 色谱柱为葡聚糖凝胶 G-10柱 (300×10mm), 流动相 A: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 流动相 B: 超纯水, 流速: 0.5 ml/min, 检测波长: 254nm, 进样量: 20μl。结果 头孢磺啉钠进样浓度在 0.709~14.18 g/L 范围与头孢磺啉钠高分子杂质的峰面积呈良好的线性关系 ( $r=0.9999$ )。结论 该方法简便准确; 灵敏度高; 重现性好。

**关键词:** R978.1<sup>+</sup>1 头孢磺啉钠; 高分子杂质; 凝胶色谱

**中图分类号:** 文献标识码: A

头孢类抗生素是临床较易发生不良反应的药物, 多年研究表明, 该类抗生素所致速发型过敏反应并非由药物本身所致, 而和药物中存在的高分子杂质有关<sup>[1]</sup>, 这类高分子杂质是一类化学结构不均一的混合物, 包括抗生素与蛋白质、多肽等形成的结合物及各种不同的高分子杂质<sup>[2,3]</sup>。因此, 利用凝胶色谱法是方便的有效的分离方法。《中国药典》2005年版对大部分常用注射用头孢类抗生素采用葡聚糖 G-10自身对照外标法<sup>[4]</sup>进行了高分子杂质的控制, 保障了药品的安全性。头孢磺啉钠 (cefsulodin sodium) 是第三代头孢菌素, 由日本武田药品公司开发研制的第一个抗铜绿假单胞菌注射用头孢类抗生素, 临床上已广泛使用, 对其所含高分子杂质形成机制已有报道<sup>[5]</sup>。我们参考有关文献<sup>[6,7]</sup>, 利用葡聚糖凝胶 G-10凝胶色谱条件实现了对注射用头孢磺啉钠中高分子杂质的分离分析, 为该药的质量控制提供了一个新的检测方法。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

SHMADZU LC-2010液相色谱仪及 LC-solution 色谱软件, 塞多利斯 BP211D 十万分之一电子天平,

METTLER 320-S pH 计。

#### 1.2 试剂与试剂

头孢磺啉钠样品 (四川抗菌素工业研究所提供, 批号 070911、070912、070913); 头孢磺啉钠工作对照品 (四川抗菌素工业研究所提供, 批号 070818); 蓝色葡聚糖 2000 为 pharmacia 公司产品, 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为国产分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: 葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 柱 (300mm × 10mm i.d.), 柱温: 25℃, 流动相 A: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 流动相 B: 超纯水, 流速: 0.5 ml/min, 检测波长: 254nm, 进样体积 20μl。以流动相 A 为流动相, 0.1 mg/ml 蓝色葡聚糖 2000 进行测定, 结果理论板数 1253, 拖尾因子 0.92。

头孢磺啉钠以超纯水洗脱时对称性良好, 理论板数 1244, 拖尾因子 0.90。

#### 2.2 缔合物峰的线性关系

精密称取头孢磺啉钠工作对照品适量, 配制成浓度为 20mg/L 的供试品溶液, 以 B 相超纯水为流动

收稿日期: 2008-11-14 修回日期: 2009-03-23

作者简介: 代丽萍, 女, 生于 1976 年, 在读硕士研究生。

\* 通讯作者, E-mail: zdan321@126.com

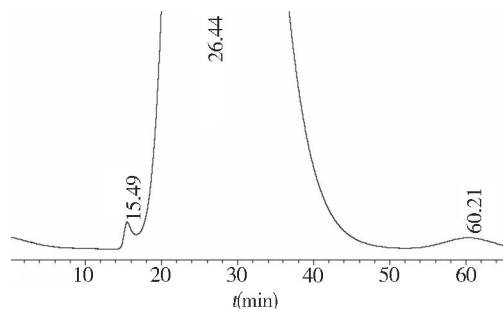


图1 头孢磺啉钠高分子杂质色谱图

相,分别进样 5, 10, 20, 40, 50  $\mu$ l, 缔合峰面积分别为 243051, 463474, 903037, 1800355, 2364227。以头孢磺啉钠的进样量为横坐标 ( $X$ ), 以缔合物峰的峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 求得回归方程:  $Y = 2235764.6 \times X - 8215.9$ , ( $r = 0.9999$ )。可见头孢磺啉钠进样浓度在 5.20 ~ 52.02  $\mu$ g/L 的范围与缔合物峰面积呈良好的线性关系。可满足试验的要求。

### 2.3 缔合物峰的重复性试验

**2.3.1 进样精密度** 精密称取头孢磺啉钠工作对照品 12.5mg, 用超纯水稀释至浓度为 10mg/L, 连续进样 5 次, 缔合峰面积分别是 486081, 487879, 475798, 491110, 489563; 计算得相对标准偏差  $RSD = 1.24\%$ 。重复性良好, 可满足检验要求。

**2.3.2 日内精密度** 在同日内精密称取头孢磺啉钠工作对照品 12.5mg 5 份, 用超纯水稀释至 10mg/L, 分别进样, 对照品的峰面积 ( $A$ ) 与取样量 ( $W$ ) 的比值 (校正因子  $F$ ) 有良好的重复性, 见表 1。

表1 头孢磺啉钠日内精密度

W (mg)	A	F(A/W)	RSD (%)
13.56	424314	31292	1.92
12.61	405773	32179	
12.40	388265	31312	
12.71	410033	32261	
12.96	423282	32661	

**2.3.3 日间精密度** 分别在不同的 5d 精密称取头孢磺啉钠工作对照品 12.5mg, 用超纯水稀释至 10mg/L, 分别进样。对照品的峰面积 ( $A$ ) 与取样量 ( $W$ ) 的比值 (校正因子  $F$ ) 有良好的重复性, 见表 2。

### 2.4 高分子杂质的专属性试验

取头孢磺啉钠样品约 50mg, 分别加入 0.1mol/L 的盐酸溶液 1ml, 室温放置 2h; 加入 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 1ml, 室温放置 1min; 溶解后, 于 60  $^{\circ}$ C 加热

表2 头孢磺啉钠日间精密度

时间	W (mg)	A	F(A/W)	RSD (%)
d1	12.19	507590	41640	2.6
d2	18.59	778940	41901	
d3	18.43	812523	44087	
d4	14.25	593636	41659	
d5	17.13	713822	41671	

2h; 溶解后, 于照度为 4500Lx 的光照箱中放置 2h, 对样品进行破坏后考察。结果表明酸、碱、热、光均会导致高分子杂质的增加, 其中加碱的影响最明显。

### 2.5 高分子杂质的线性试验

精密称取头孢磺啉钠工作对照品 (070818) 75mg, 溶于 10ml 水中, 以 A 相缓冲液为流动相, 分别进样 2, 8, 15, 30, 40  $\mu$ l, 高分子杂质的峰面积分别为 136123, 566036, 1044417, 2094790, 2811142。以头孢磺啉钠的进样量为横坐标 ( $X$ ), 以头孢磺啉钠高分子杂质的峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 求得回归方程:  $Y = 9323.1 \times X - 3316$ , ( $r = 0.9999$ )。结果表明, 头孢磺啉钠进样浓度在 0.709 ~ 14.28g/L 的范围内与高分子杂质的峰面积呈良好的线性关系。可满足试验要求。

### 2.6 高分子杂质的稳定性

精密称取头孢磺啉钠工作对照品适量, 照高分子杂质检查方法配制供试品溶液, 以流动相 A 相为流动相, 分别于 0, 2, 4, 6, 8h 进样测定, 比较头孢磺啉钠高分子杂质峰的峰面积及分离度情况。结果表明, 高聚物峰面积及分离度随着放置时间的增加有下降的趋势, 故建议配制样品后应立即进样。

### 2.7 高分子杂质的重复性试验

精密称取头孢磺啉钠工作对照品 50mg 共 5 份, 分别置于 10ml 容量瓶中, 用流动相 A 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 进样 20  $\mu$ l 测定, 校正因子  $F$  分别为: 16585, 16923, 16662, 16991, 16861, 计算得相对标准偏差为  $RSD = 1.1\%$ 。

### 2.8 定量限

以信噪比 10:1 为指标, 测得定量限为 0.21mg/L。

### 2.9 样品高分子杂质含量的测定

精密称取样品约 50mg, 置于 10ml 的容量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 立即取 20  $\mu$ l 注入色谱仪, 以流动相 A 为流动相, 记录色谱图; 另取对照品溶液 20  $\mu$ l 注入色谱仪, 以流动相 B 为流动相, 记录色谱图, 按自身对照外标法进行计算, 测定结果。三批样品 (070911、070912、070913) 高分子杂质含量分别为 0.26%、0.28%、0.26%。

### 3 讨论

#### 3.1 流动相 A 中磷酸盐浓度

流动相的种类和浓度是改善溶质的色谱行为和分离效果<sup>[8]</sup>的关键,试验中分别采用了不同浓度的磷酸盐缓冲液(0.01、0.05、0.1mol/L),结果表明磷酸盐缓冲液浓度为0.05mol/L时,高分子杂质峰能达到与主峰很好的分离。流动相 B 采用超纯水就能达到很好的效果。

#### 3.2 流动相 A 中磷酸盐 pH 值

流动相的 pH 对溶质的保留行为也有影响,通常情况下, pH 和  $K_{av}$  间基本呈线性关系。碱性和偏碱性及酸性条件下,头孢菌素极易发生聚合反应,其测得的高分子杂质难以反应样品本身的实际含量,分别选用 pH6.0、pH7.0、pH8.03 种为流动相,发现高分子杂质的峰形及分离效果以磷酸盐缓冲液 pH7.0(0.05mol/L)时较好。

#### 3.3 流速的选择

通常头孢菌素和其高分子杂质间的分离度不必选择太大,否则不利于分析速度的提高。通过试验不同的流速(1.0、0.8、0.6、0.5ml/min)结果显示,当流速为0.5ml/min时,高分子杂质能与主峰达到基线分离。

#### 3.4 对照外标法

根据在特定条件下(如纯水),内酰胺类抗生素由于分子间的氢键、静电相互作用、疏水相互作用等次级相互作用,可以形成缔合物,导致其表观分子量增

大。此时缔合物在 Phamadox G-10 凝胶色谱系统中和高分子杂质具有相似的色谱行为,即都在  $K_{av}=0$  处表现为单一的色谱峰。利用此原理,本文用自身对照外标法对高分子杂质峰进行定量。

致谢:本试验中所用样品均蒙四川抗菌工业研究所刘家健老师惠赠!

### 参 考 文 献

- [1] 胡昌勤,金少鸿. 内酰胺抗生素中的高分子杂质及其分析技术研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1996, 17(5): 336~342.
- [2] 金少鸿,胡昌勤,孙学兰. 头孢菌素结构及其聚合物反应关系的探讨[J]. 中国抗生素杂志, 1991, 16: 25~34.
- [3] 金少鸿,经洁. 氨苄青霉素聚合物的研究. 氨苄青霉素聚合物的分离分析[J]. 抗生素, 1987; 16: 106.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典(2005年版)二部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [5] Itakura K, Aoki I, Kasahara F, et al[J]. J Chem Pharm Bull, 1980, 6: 1655~1661.
- [6] 蔡姍英,胡昌勤,冯芳,等. 内酰胺类抗生素在 Superdex pepid 凝胶过滤色谱柱上的色谱行为[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(3): 157~161.
- [7] 俞泽明,陈宁,杨世铮,等. 头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶中高分子的含量测定[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(5): 348~352.
- [8] 胡昌勤. 高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用(下册). [M]. 北京:气象出版社, 2001: 176~204.
- [2] 易爱纯,张顺芝,陈蒂芳. 反相高效液相色谱法测定头孢唑肟钠的含量[J]. 中国药房, 2003, 14(11): 687.
- [3] 黄美英,夏星等. 头孢唑肟钠生产工艺及条件研究[J]. 中国药房, 2007, 18(22): 1695~1697.
- [4] United States Pharmacopeial Convention USP[S]. Washington D. C: TheBoardofTrustees, 1990: XX 255~256.
- [5] 国家药典委员会编. 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:附录 20~89.

(上接第 729页)