

葡聚糖凝胶色谱法测定盐酸头孢替安中聚合物

郭 红, 王成港, 刘 欢

天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘 要: 目的 建立葡聚糖凝胶色谱法测定盐酸头孢替安的聚合物。方法 色谱柱为葡聚糖凝胶 Sephadex G10 柱 (400 mm×10 mm); 流动相 A 为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 流动相 B 为水; 检测波长 254 nm, 进样量 200 μ L, 体积流量 1.5 mL/min。结果 盐酸头孢替安样品溶液的质量浓度在 11.99~40.01 mg/mL 与聚合物峰面积之间的线性关系良好 ($r=0.999\ 5$), 盐酸头孢替安中聚合物质量分数小于 0.5%。结论 该方法简便、准确、灵敏度高, 适用于盐酸头孢替安聚合物的控制。

关键词: 盐酸头孢替安; 聚合物; 头孢替唑钠; 葡聚糖凝胶色谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)06-0575-04

Determination of polymer in cefotiam hydrochloride by Sephadex gel chromatography

GUO Hong, WANG Cheng-gang, LIU Huan

State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a method of Sephadex gel chromatography for the determination of polymer in cefotiam hydrochloride. **Methods** The analysis was performed on Sephadex G10 column (400 mm×10 mm), 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) served as mobile phase A, and pure water as mobile phase B. The detection wavelength was 254 nm with the injection volume of 200 μ L at a flow rate of 1.5 mL/min. **Results** The calibration curves were linear in the range of 11.99—40.01 mg/mL between concentration and peak area ($r=0.9995$), and the content of polymer in cefotiam hydrochloride was below 0.5%. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and reproducible, and could be used to determine polymer in cefotiam hydrochloride.

Key words: cefotiam hydrochloride; polymer; ceftazidime sodium; Sephadex gel chromatography

盐酸头孢替安为 β -内酰胺类抗生素中的第二代头孢菌素类抗生素。 β -内酰胺类抗生素在临床使用中常出现与聚合物相关的过敏性休克反应, 严重威胁患者的安全。《中国药典》2005 年版对 11 个头孢菌素类抗生素的 21 个品种高分子聚合物进行了检查和限定, 较《中国药典》2000 年版的 4 个品种有了明显的提高, 而《中国药典》2010 年版中除对十余个头孢菌素类抗生素品种增订了聚合物的检查, 还对原有需要检查聚合物含量品种的质量标准进行了修订^[1]。由于结构不同的高分子杂质通常具有相似的生物学特性 (过敏性), 因此在药品质量控制中一般只需控制药品中高分子杂质的总量即可。根据

样品相对分子质量的差异进行分离的凝胶色谱法具有明显的优势。《中国药典》2010 年版中并没有盐酸头孢替安聚合物的检查方法。因此本实验对盐酸头孢替安聚合物的凝胶色谱法测定进行了研究, 为该药物的质量控制和生产工艺评价提供检测方法。

1 仪器和试剂

Model 500 高效液相色谱仪, Lab Allcance 检测器。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 (分析纯), 蓝色葡聚糖 2000 (Dextran blue 2000, Pharmacia 公司, 批号 156.7), 头孢替唑钠对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 130508-200301, 质量分数为 99.8%), 盐酸头孢替安样品 (自制, 批号分别为 20100801、

收稿日期: 2012-08-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2012CB724000, 2012CB724002)

作者简介: 郭 红 (1982—), 女, 天津人, 助理研究员, 硕士, 2006 年毕业于天津中医药大学, 主要从事口服固体新制剂开发研究工作。

Tel: (022) 23006879 E-mail: guoh@tjipr.com

20100802、20100803), 实验用水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备

取头孢替唑钠对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解, 并稀释至刻度, 混匀, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取盐酸头孢替安样品约 200 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解, 并稀释至刻度, 混匀, 即用现配。

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 流动相 A 的选择 分别采用 0.01、0.02、0.05、0.10 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0) 作为流动相 A 进行试验, 考察流动相离子强度对测定样品图谱中分离度 (高聚体的峰高与单体、高聚体之间谷高的比值) 的影响, 结果见表 1。可见随着流动相离子

强度的增加, 分离度不断减小。使用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液时分离度大于 2.0, 满足测定要求。

表 1 流动相 A 中磷酸盐缓冲液浓度对聚合物测定的影响

Table 1 Effects of concentration of buffer phosphate in mobile phase A on determination of polymer

磷酸盐缓冲液/(mol·L ⁻¹)	分离度
0.01	2.34
0.02	1.95
0.05	1.58
0.10	1.49

2.3.2 聚合物对照的选择 分别选择水、0.01% SDS 溶液、0.05% SDS 溶液、5%葡萄糖溶液为流动相 B, 配制 100 μg/mL 盐酸头孢替安对照溶液, 进样测定。结果见图 1。可见头孢替安在这 4 种流动相色谱条件下均不能完全缔合成单一色谱峰。

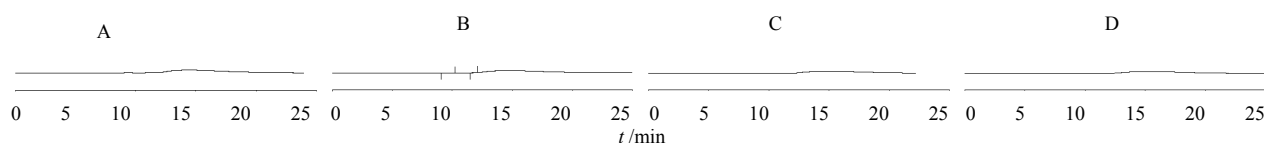


图 1 盐酸头孢替安在水 (A)、0.01%SDS 溶液 (B)、0.05%SDS 溶液 (C)、5%葡萄糖溶液 (D) 4 种流动相 B 条件下的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of cefotiam hydrochloride in water (A), in 0.01% SDS solution (B), in 0.05% SDS solution (C), and in 5% glucose solution (D)

分别配制 20 μg/mL 盐酸头孢替安、头孢替唑钠水溶液, 于 200~400 nm 波长进行扫描, 结果见图 2。检查样品在 254 nm 处的紫外吸光度值分别为 0.522、0.524。

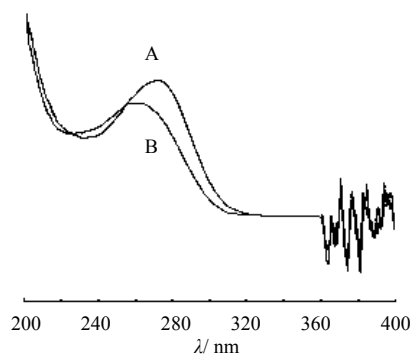


图 2 头孢替唑钠 (A) 和盐酸头孢替安 (B) 的紫外扫描图
Fig. 2 UV Chromatogram of ceftezole sodium (A) and cefotiam hydrochloride (B)

参照《中国药典》2010 年版阿莫西林聚合物的

测定方法^[2], 选择结构与盐酸头孢替安类似且易缔合的头孢替唑钠作为对照品。

2.3.3 流动相 B 的选择 配制质量浓度为 100 μg/mL 头孢替唑钠溶液, 精密量取该溶液, 以水为流动相按照相关条件进行测定, 结果在色谱图中呈单一色谱峰, 说明头孢替唑在水中能完全缔合, 峰形良好, 出峰时间为 12.141 min, 与盐酸头孢替安样品在流动相 A 中聚合物出峰时间 (12.010 min) 的比值为 0.989, 在 0.93~1.07, 见图 3。因此选择水为流动相 B。

2.3.4 柱温的选择 分别选择 15、20、25、30 °C 4 个温度条件, 以流动相 A 为流动相对盐酸头孢替安样品溶液进行检查, 结果 4 种温度条件下样品的分离度分别为 1.24、1.95、2.24、2.31。结果表明分离度随着测定温度的升高而增加, 增加幅度逐步变缓。

2.3.5 色谱条件 色谱柱为葡聚糖凝胶 Sephadex G10 柱 (400 mm×10 mm); 流动相 A 为 0.01 mol/L

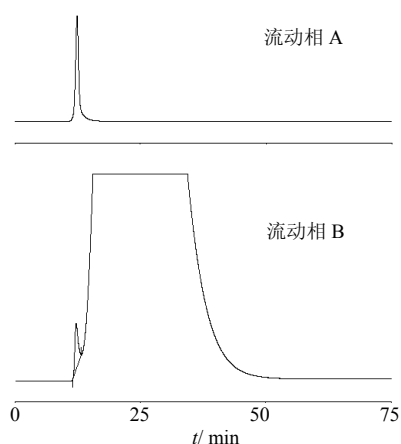


图 3 在流动相 A、B 条件下聚合物的出峰时间

Fig. 3 Peaking time of polymer in mobile phases A and B

磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 流动相 B 为水; 检测波长 254 nm, 进样量 200 μ L, 体积流量 1.5 mL/min。

2.4 线性关系考察

精密称取头孢替唑钠对照品适量, 用水溶解, 稀释成 10.05、50.24、100.48、125.60、150.70、301.40 μ g/mL 对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 用流动相 B 进行测定, 记录色谱图。以吸收峰面积对质量浓度进行线性回归, 得标准曲线方程 $A=113\ 451\ C-35\ 684$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明头孢替唑钠质量浓度在 10.05~301.40 μ g/mL 时与聚合物峰面积之间线性关系良好。

分别精密称取盐酸头孢替安样品适量, 用水溶解稀释, 制成 11.99、15.02、20.01、30.02、40.01 mg/mL 样品溶液, 分别注入液相色谱仪, 以流动相 A 为流动相进行测定, 记录色谱图。以吸收峰面积对样品质量浓度进行线性回归, 得线性方程 $A=21\ 706\ C-1\times 10^6$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明盐酸头孢替安样品溶液的质量浓度在 11.99~40.01 mg/mL 与聚合物峰面积之间线性关系良好。

2.5 最小检出限、最小定量限的测定

配制一系列质量浓度的头孢替唑钠对照品溶液, 以流动相 B 为流动相, 注入液相色谱仪测定, 结果最小检出限为 5 ng/mL, 最小定量限为 10 ng/mL。

2.6 重复性试验

精密吸取头孢替唑钠对照品溶液, 注入液相色谱仪, 以流动相 B 为流动相连续进样 5 次, 记录色谱图, 计算得头孢替唑峰面积的 RSD 值为 1.23%。

精密称取盐酸头孢替安样品适量, 共 6 份, 分

别加水溶解, 定容制成含盐酸头孢替安 20 mg/mL 的溶液。分别注入液相色谱仪, 以流动相 A 为流动相进行测定, 记录图谱, 得高聚物峰积分面积; 另取头孢替唑钠对照品适量, 加水溶解, 定容制成 100 μ g/mL 的溶液。精密量取对照溶液注入液相色谱仪, 以流动相 B 为流动相, 测定。用外标法计算样品中聚合物质量分数, 6 次测定结果的 RSD 值为 4.21%。

2.7 稳定性试验

精密称取盐酸头孢替安样品 0.2 g, 置 10 mL 量瓶中, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 分别于 0、2、5、7 h 进样, 以流动相 A 为流动相, 考察样品溶液的稳定性。结果发现经过放置后的样品溶液聚合物质量分数增加很快, 7 h 时的质量分数已达 0 时的 1.4 倍。因此样品溶液应现用现配。

2.8 样品测定

取 3 批样品, 制备供试品溶液, 按上述测定条件进样测定, 按照以下计算公式计算盐酸头孢替安聚合物的质量分数^[3], 结果见表 2。

$$\text{聚合物的质量分数} = (A_u \times W_s \times V_u) / (A_s \times W_u \times V_s) \times 1.082 \times 100\%$$

式中 W_s 为对照品称样质量, W_u 为供试品称样质量, A_s 为对照溶液峰面积, A_u 为供试品溶液峰面积, V_s 为对照品稀释体积, V_u 为供试品稀释体积。1.082 为相对分子质量的折算系数, 即 $[\text{Mr}(\text{头孢替唑}) \times \text{Mr}(\text{盐酸头孢替安})] / [\text{Mr}(\text{头孢替唑钠}) \times \text{Mr}(\text{头孢替安})]$

表 2 盐酸头孢替安样品中聚合物测定结果

Table 2 Determination of polymer in cefotiam hydrochloride

批 号	聚合物/%
20100801	0.17
20100802	0.16
20100803	0.17

3 讨论

对 β -内酰胺类抗生素中聚合物含量测定所采用的分析方法主要有离子交换色谱法、凝胶色谱法、反相高效液相色谱法等, 其中凝胶色谱法最为简便应用也最为广泛。凝胶色谱法是根据分子大小进行分离的一种液相色谱技术, 除部分寡聚物外, β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质在色谱过程中均不保留, 表现为单一的色谱峰^[4]。

3.1 流动相 A 的 pH 值及离子强度对分离度的影响

碱性和偏碱性及酸性条件下, 头孢菌素极易发生聚合反应而影响聚合物的测定结果; 同时在 pH

7.0 条件下, β -内酰胺类抗生素可以与离子 HPO_4^{2-} 、 Cl^- 等结合, 消除体积排阻色谱法中不希望存在的吸附作用和基体的疏水作用。因此选择 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液作为流动相 A。

实验研究比较了离子强度对测定分离度的影响, 最终选择了分离度最大的, 浓度为 0.01 mol/L (0.01 mol/L 磷酸氢二钠溶液 - 0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液) 的磷酸缓冲液为流动相 A。

3.2 温度对分离度的影响

研究了温度对分离度的影响, 发现温度升高有利于改善分离度, 当温度由 15 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 25 $^{\circ}\text{C}$ 过程中分离度的改善尤为明显, 当测定温度高于 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 升高温度对分离度的影响变小。葡聚糖凝胶属于软质凝胶, 自身的溶胀和收缩会导致渗透率和分离效率改变; 另外流动相的黏度亦会影响柱效, 当温度由 15 $^{\circ}\text{C}$ 升高至 30 $^{\circ}\text{C}$, 溶液黏度由 1.14×10^{-3} Pa·s 降低至 8.9×10^{-4} Pa·s。应尽可能采用对样品具

有较高溶解性能和低黏度的溶剂。温度升高有利于凝胶的溶胀, 改善溶质的溶解, 提高渗透效率, 最终改善分离效果。因此当采用凝胶色谱法对样品进行分离时, 升高温度可以提高柱效; 考虑到温度升高会加快微生物的滋生影响样品的稳定性, 实验温度控制在 25~30 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

参考文献

- [1] 张 昕. 《中国药典》2010 年版高分子聚合物修订情况和探讨 [J]. 今日药学, 2010, 20(9): 57-59.
- [2] 李哲媛, 李玉凤, 范 兵, 等. 阿莫西林中高分子杂质的测定与质量分析 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(4): 326-327.
- [3] 王德刚, 马 萍, 程玉宝, 等. 分子排阻色谱法测定硫酸头孢匹罗中聚合物杂质 [J]. 今日药学, 2010, 20(12): 38-41.
- [4] 张兴艳, 王 霆, 李茺清, 等. 青霉素类抗生素高分子聚合物的研究进展 [J]. 中南药学, 2011, 9(7): 520-524.