

葡聚糖凝胶色谱法测定注射用头孢美唑钠中聚合物

刘欢¹, 郭红¹, 王悦², 王成港¹

1. 天津药物研究院 天津市药物制剂工程技术研究中心, 天津 300193

2. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300193

摘要: **目的** 建立凝胶色谱法测定注射用头孢美唑钠中聚合物。**方法** 色谱柱为玻璃柱(内径1.3 cm, 柱长40 cm), 葡聚糖凝胶 G-10(40~120 μm)为填充剂; 流动相 A 为 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 流动相 B 为水; 体积流量为 1.5 mL/min; 检测波长为 254 nm; 蓝色葡聚糖 2000 溶液的质量浓度为 0.1 mg/mL; 进样量 200 μL 。**结果** A 相中头孢美唑钠进样质量浓度在 10~40 mg/L 与头孢美唑钠高分子聚合物峰面积呈良好的线性关系($r=0.998\ 6$)。B 相中头孢美唑酸进样质量浓度在 3.994~79.88 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好($r=0.999\ 9$)。3 批样品中高分子聚合物质量分数为 0.02%~0.03%。**结论** 该方法的精密度和准确度均能满足注射用头孢美唑钠中高分子聚合物质量控制的要求。

关键词: 注射用头孢美唑钠; 高分子聚合物; Sephadex G-10 凝胶; 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(2013)02-0185-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.020

Determination of polymers in Cefmetazole Sodium for injection by Sephadex chromatography

LIU Huan¹, GUO Hong¹, WANG Yue², WANG Cheng-gang¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. TIPR Pharmaceutical Responsible Co., Ltd, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish a Sephadex chromatographic method for the determination of polymers in Cefmetazole Sodium for injection. **Methods** The analytical column (1.3 cm $\times$ 40 cm, 40—120 μm) takes Sephadex G-10 as filler; The mobile phase A was 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and mobile phase B was pure water; The flow rate was 1.5 mL/min; The detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 200 μL . **Results** The calibration curve of polymers was linear in the concentration range of 10—40 mg/L ($r = 0.998\ 6$), and another calibration curve was linear in the concentration range of 3.994—79.88 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$). The content of polymer in Cefmetazole Sodium for injection was 0.02%—0.03%. **Conclusion** The method with satisfied accuracy and precision is suitable for the quality control of polymers in Cefmetazole Sodium for injection.

Key words: Cefmetazole Sodium for injection; polymer; Sephadex G-10; Sephadex chromatography

头孢美唑钠又称先锋美他醇, 系第二代头霉素类半合成抗生素, 性能与第二代头孢菌素相近。近年来头孢美唑钠广泛应用于临床, 对革兰阳性菌和阴性菌均具有良好的抗菌效能^[1], 尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、脆弱拟杆菌及厌氧菌, 对各种 β -内酰胺酶也有很强的耐受性和稳定性, 体内分布好、不良反应少^[2-3]。多年来的研究已证明, β -内酰胺类抗生素所致的速发型过敏反应并非由药物本身所致, 而是与药物中存在的聚合物有关。此外, 某些头孢菌素中的聚合物还与药物的毒性反应有

关。因此, 对头孢菌素中聚合物的控制具有重要意义^[4-5]。本实验采用凝胶色谱法测定注射用头孢美唑钠中高分子聚合物。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATVP 型高效液相色谱仪。

蓝色葡聚糖 2000 (Pharmacia, 批号 156.7), 头孢美唑钠对照品(自制, 批号 090901, 质量分数 99.8%), 头孢美唑酸对照品(自制, 批号 090903, 质量分数 99.9%), 头孢美唑钠原料(自制, 批号 091101、091102、091103), 注射用头孢美唑钠(自

收稿日期: 2012-11-08

作者简介: 刘欢(1976—), 女, 湖南人, 理学硕士, 副研究员, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: (022)23006879 E-mail: liuh@tjipr.com

制, 批号 091104、091105、091106, 规格 0.5 g/支), 注射用头孢美唑钠 (意大利 Farmabios 制药公司, 批号 0230870, 规格 0.5 g/支), 纯水 (屈臣氏)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测波长的确定 参考《中国药典》2010 年版中头孢类品种高分子聚合物的测定波长^[6], 并根据试验结果选择 254 nm 作为测定波长。

2.1.2 流动相 A 相中磷酸盐缓冲液浓度的确定 以高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值为考察指标, 考察了流动相 A 相中磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02、0.06、0.1、0.2 mol/L 时对头孢美唑钠高分子聚合物的测定影响。结果表明随着磷酸盐缓冲液浓度的增加, 高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值也不断增大, 最终选择磷酸盐缓冲液浓度为 0.1 mol/L, 高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值为 2.08, 符合《中国药典》2010 年版的要求。

2.1.3 蓝色葡聚糖 2000 溶液浓度的选择 分别采用 0.1、0.4 mg/mL 蓝色葡聚糖 2000 溶液配制 20 mg/mL 头孢美唑钠溶液。量取 200 μ L 注入液相色谱仪, 用流动相 A 进行测定, 计算高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值。结果随着蓝色葡聚糖 2000 溶液质量浓度的增加, 高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值也随之增大, 参考《中国药典》2010 年版中高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值的要求, 确定蓝色葡聚糖 2000 溶液质量浓度为 0.1 mg/mL。

2.1.4 色谱条件 色谱柱为玻璃柱 (内径 1.3 cm, 柱长 40 cm), 葡聚糖凝胶 G-10 (40~120 μ m) 为填充剂; 流动相 A 为 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 [0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 - 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (61:39)], 流动相 B 为水; 体积流量为 1.5 mL/min; 检测波长为 254 nm; 蓝色葡聚糖 2000 溶液的质量浓度为 0.1 mg/mL; 进样量 200 μ L。

2.2 系统适应性试验

2.2.1 蓝色葡聚糖 2000 的保留时间比 将 0.1 mg/mL 蓝色葡聚糖 2000 分别在流动相 A 和流动相 B 系统中测定保留时间。依据《中国药典》2010 年版中规定, 在两种流动相中蓝色葡聚糖 2000 的保留时间比值应在 0.93~1.07。实验测得为 12.20/11.69=1.04 ($n=3$), 均符合要求。

2.2.2 对照品溶液主峰和供试品溶液中聚合物峰的保留时间比 在流动相 A 中测定供试品溶液中聚合

物峰的保留时间, 在流动相 B 中测定头孢美唑酸的保留时间。依据《中国药典》2010 年版中规定, 与相应色谱系统中蓝色葡聚糖 2000 的保留时间比值应为 0.93~1.07。实验测得值分别为 12.30/12.20=1.01 ($n=3$)、11.93/11.69=1.02 ($n=3$), 均符合要求。

2.2.3 高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值 精密称取头孢美唑钠 0.2 g, 置 10 mL 量瓶中, 用 0.1 mol/L 蓝色葡聚糖 2000 溶液溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 立刻进样, 用流动相 A 进行测定。高聚体的峰高与单体、高聚体之间的谷高比值应大于 2.0。实验测得峰高/谷高=10/2.8=3.57。

2.2.4 F 值的测定 分别精密称取 6 份头孢美唑酸 20 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。立即进样, 用流动相 B 进行测定, 考察头孢美唑酸称样质量与峰面积的比值 (即 F 值), 结果见表 1。计算得均值为 1.017 2, RSD 值为 1.48%。

表 1 F 值的测定结果

Table 1 Results of F value

称样量/mg	峰面积	比值
20.12	2 016 510	0.997 8
20.00	1 922 775	1.040 2
18.03	1 776 287	1.015 0
20.06	1 963 185	1.021 8
18.44	1 835 524	1.004 6
20.01	1 954 175	1.024 0

2.3 线性关系考察

精密称取头孢美唑酸对照品 20 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 用流动相 B 进行测定。结果头孢美唑酸在 3.994~79.88 μ g/mL 时线性关系良好, 线性方程为 $A=99\,293\,C+28\,952$ ($r=0.999\,9$)。

分别精密称取头孢美唑钠原料 (批号 091101) 0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 g 置 10 mL 量瓶中, 用水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。量取 200 μ L 注入液相色谱仪, 用流动相 A 进行测定, 计算样品质量浓度与聚合物峰面积之间的关系, 结果头孢美唑钠在 10~40 mg/mL 时, 质量浓度与聚合物峰面积之间线性关系良好。线性方程为 $A=30\,844\,C-95\,529$ ($r=0.998\,6$)。

2.4 最小检出限和最小定量限测定

将头孢美唑酸溶液 8 ng/mL 倍倍稀释后,用流动相 B 进行测定,量取 200 μ L 进样,得到信噪比约为 3:1 的色谱峰,头孢美唑酸最小检出限为 0.16 ng。在最小检出限的基础上,配制信噪比约为 10:1 色谱峰的样品质量浓度,即得最小定量限的样品,用流动相 B 进行测定,头孢美唑酸最小定量限为 0.8 ng。

2.5 重复性试验

精密吸取 20 μ g/mL 头孢美唑酸对照品溶液 200 μ L 注入液相色谱仪,用流动相 B 连续进样 5 次,计算得峰面积的 RSD 值为 0.48%。

分别精密称取 6 份头孢美唑钠原料(批号 091101) 0.2 g,置 10 mL 量瓶中,用水溶解,并稀释至刻度,摇匀,立即进样,测定高分子聚合物的峰面积,计算得其 RSD 值为 1.10%。

2.6 稳定性试验

精密称取头孢美唑钠原料(批号 091101) 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 量取 200 μ L 注入液相色谱仪,用流动相 A 进行测定,结果头孢美唑钠溶液的稳定性较差。放置 2 h 时聚合物的峰面积约是 0 h 的 1.5 倍,聚合物质量分数增加较快,2~7 h 聚合物峰面积的增长速度低于 0~2 h。因此,测定头孢美唑钠聚合物的溶液需要临用时新配制。

2.7 样品中聚合物的测定

取样品约 0.2 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加水溶解,并稀释至刻度,摇匀。立即进样,以流动相 A 为流动相进行测定,记录色谱图。另取 20 μ g/mL 头孢美唑酸对照品溶液,以流动相 B 为流动相,注入液相色谱仪,进行测定,记录色谱图。按外标法以峰面积计算头孢美唑钠中聚合物的质量分数(以头孢美唑酸计),结果见表 2。

表 2 注射用头孢美唑钠中聚合物的测定结果

Table 2 Determination of polymers in Cefmetazole Sodium for injection

样品	批号	聚合物/%
原料	091101	0.026
	091102	0.025
	091103	0.027
制剂	091104	0.028
	091105	0.027
	091106	0.025
	0230870	0.028

3 讨论

3.1 对照品的选择

β -内酰胺抗生素的高分子杂质具有高度的不均一性和不确定性,高聚物本身不稳定,对照品不易制备,用外标法定量有一定的难度;另外高分子杂质含量较低,进样量一般相对较大,故使药物本身色谱峰十分宽大,致使主峰的峰面积积分值的误差也较大,限制了面积归一化法的应用^[7]。头孢美唑酸与头孢美唑钠结构式类似,在蒸馏水中头孢美唑酸缔合较好,在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中色谱行为与高分子杂质一样,都在 $K_{av}=0$ 处表现为单一色谱峰,并且对照溶液主峰和供试品溶液中聚合物峰与相应色谱系统中蓝色葡聚糖 2000 峰的保留时间的比值均在 0.93~1.07,因此选择头孢美唑酸作为对照品,采用自身对照外标法定量头孢美唑钠中高分子聚合物的含量。

3.2 流动相 B 的选择

测定 β -内酰胺抗生素高分子聚合物的流动相 B 通常可以选择十二烷基硫酸钠水溶液和纯水。但是如果缔合峰严重拖尾,可以在流动相中加入适当的抑制剂来改善缔合峰的拖尾。如在流动相中加入 0.5% 的葡萄糖溶液或 0.01 mol/L 甘氨酸溶液替代纯水作为流动相,可以明显改善缔合峰的拖尾现象^[8]。头孢美唑酸在纯水中缔合较好,因此选择纯水作为流动相 B。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光,等.新编药理学[M].第16版.北京:人民卫生出版社,2007:62.
- [2] 黄北好,谢翠刁.先锋美他醇的药理与临床应用[J].广东药学,2000,10(2):39-40.
- [3] 徐英春,王辉.头孢美唑及其他抗生素的抗菌活性分析[J].中华内科杂志,1997,36(8):540-542.
- [4] 胡昌勤,金少鸿. β -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):336-343.
- [5] 张春然,唐克慧.头孢美唑钠的质量与稳定性研究[J].国外医药:抗生素分册,2005,26(1):5-8.
- [6] 中国药典[S].二部.2010.
- [7] 袁雯玮.高分子聚合物研究与中国药典2005年版 β -内酰胺类抗生素高分子聚合物修订情况及操作要点[J].中国抗生素杂志,2005,30(12):727-729.
- [8] 胡昌勤,金少鸿.自身对照外标法定量测定 β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质[J].中国抗生素杂志,1997,22(1):23-27.