

高效分子排阻色谱法分析头孢噻肟钠中的聚合物

王成刚, 曹轶, 张喆, 周立春*

(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立高效分子排阻色谱 (HPSEC) 法测定头孢噻肟聚合物, 与 2005 年版中国药典方法比较, 并用 LC-MS 对二聚物进行初步研究。**方法:** 采用凝胶色谱柱 (TSK G2000 SW, 60 cm × 7.5 mm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 [(0.01 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (61:39), 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸调节 pH 至 7.0]; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm。**结果:** HPSEC 法, 头孢噻肟和二聚物的线性范围分别为 $2.57 \times 10^{-4} \sim 0.0205 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 1.000$) 和 $7.39 \times 10^{-4} \sim 0.0987 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9997$); 二聚物的平均回收率为 99.7% ($n = 9$), 检测限为 5 ng 对照品溶液重复进样的精密度 (RSD) 为 0.20% ($n = 6$), 样品测定的重复性 (RSD) 为 0.94% ($n = 6$)。药典方法, 二聚物的检测限为 2 μg 对照品溶液重复进样的精密度 (RSD) 为 0.92% ($n = 6$), 样品测定的重复性 (RSD) 为 5.7% ($n = 6$)。结论: HPSEC 法适于测定头孢噻肟聚合物, 比药典方法专属性强, 灵敏度高, 重复性好, 操作简便。

关键词: 头孢噻肟; 头孢噻肟聚合物; 头孢噻肟二聚物; 高效分子排阻色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0814-05

HPSEC determination of the polymers in cefotaxime sodium

WANG Cheng-gang CAO Yi ZHANG Zhe ZHOU Li-chun*

(Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035, China)

Abstract Objective To establish a high performance size exclusion chromatography (HPSEC) method for the determination of cefotaxime polymer, compare with the method in ChP 2005, and make primary study on the dimer by LC-MS **Methods** A TSK G2000 SW column (60 cm × 7.5 mm) was used with the mobile phase consisting of phosphate buffer solution [0.01 mol·L⁻¹ disodium hydrogen phosphate - 0.01 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (61:39), adjust to a pH of 7.0 with 0.1 mol·L⁻¹ phosphoric acid] at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was at 254 nm. **Results** For HPSEC method, the calibration curves were linear in the range of $2.57 \times 10^{-4} - 0.0205 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ for cefotaxime ($r = 1.000$) and $7.39 \times 10^{-4} - 0.0987 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ for dimer ($r = 0.9997$), the average recovery of dimer was 99.7% ($n = 9$), and the detection limit of dimer was 5 ng, the RSD for replicate injections of reference solution was 0.20% ($n = 6$), and the repeatability for 6 measurement results was 0.94%. For the method in ChP 2005, the detection limit of dimer was 2 μg, the RSD for replicate injections of reference solution was 0.92% ($n = 6$), and the repeatability for 6 measurement results was 5.7%. **Conclusion** The HPSEC method is suitable for determination of cefotaxime polymer and has better specification, sensitivity, precision and simpler procedure than the method in ChP 2005.

Key words cefotaxime; cefotaxime polymer; cefotaxime dimer; high performance size exclusion chromatography

β-内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应并非药物本身所致, 而与药物中存在的高分子杂质有关^[1,2], 因此控制其含量非常必要。凝胶色谱技术是 20 世纪 60 年代初发展起来的一种分离方法, 对高分子物质具有很好的分离效果。据文献报道, β-内酰胺类抗生素中高分子聚合物的分析, 最初采用

以葡聚糖凝胶 G-10 为填料的凝胶色谱法^[3,4], 随后出现了离子对凝胶色谱技术^[5,6], 填补了国内抗生素聚合物测定的空白, 并被中国药典收录。近年来高效分子排阻色谱 (HPSEC) 法逐渐成熟, 并用于分析抗生素中的高分子杂质^[7,8], 该方法更为准确、灵敏, 简便易行, 是凝胶色谱发展的必然趋势。本文

* 通讯作者 Tel: (010) 83284447 E-mail: zhoulc61@yahoo.com.cn

建立了使用凝胶色谱柱 (TSK G2000 SW) 的 HPSEC 法分析头孢噻肟聚合物, 比 2005 年版中国药典方法^[9] 专属性更强, 重复性更好。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统, 安玛西亚 ÄKTA LC 高分子杂质分析仪和伍豪色谱工作站, 菲尼根 LCQ Advantage 液质联用仪。

头孢噻肟钠 (Sandoz Industrial Products GmbH, 批号 40809508, 40810501-1, 40810502-2); 注射用头孢噻肟钠 (悦康药业集团有限公司, 批号 0607013, 070608 北京清华紫光制药厂, 批号 0602055, 0604252); 头孢噻肟对照品, 购自中国药品生物制品检定所; 头孢噻肟二聚物对照品, 由 Sandoz Industrial Products GmbH 提供; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 HPSEC 法的建立

2.1 色谱条件 色谱柱: TSK G2000 SW (60 cm × 7.5 mm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 [(0.01 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (61:39), 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸调节 pH 至 7.0]; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 进样量 20 μL; 柱温: 室温。

2.2 检测波长的选择 药典方法的检测波长为 254 nm, 经紫外光谱扫描, 二聚物在 235 nm 的波长处有最大吸收, 但峰形比较平缓, 测定同一份二聚物对照品溶液在 235 nm 与 254 nm 的吸收度相差不大, 因此参照药典方法确定检测波长为 254 nm。

2.3 流动相的选择 参照药典方法, 用磷酸盐缓冲液进行试验, 经考察不同的浓度、pH, 最终选择分离效果最好的 pH 7.0 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液作为流动相。

2.4 专属性考察

2.4.1 系统适用性试验 称取头孢噻肟钠样品和头孢噻肟二聚物对照品各适量, 分别用水溶解制成 1 mg·mL⁻¹ 和 0.01 mg·mL⁻¹ 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图 (图 1), 结果二聚物与头孢噻肟峰之间达到基线分离, 二聚物相对于头孢噻肟的相对保留时间为 0.90。根据分子排阻色谱法原理^[10], 在二聚物之前洗脱出的组分为其他相对分子质量更大的头孢噻肟高分子聚合物, 相对保留时间为 0.85。

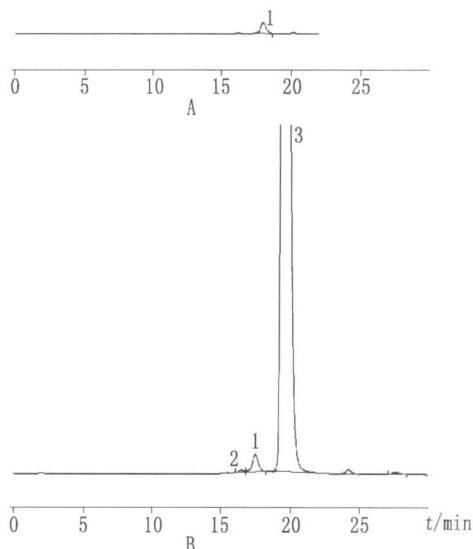


图 1 头孢噻肟二聚物对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPSEC 法色谱图
Fig 1 HPSEC chromatograms of cefotaxime dimer (A) and sample (B)
1. 头孢噻肟二聚物 (cefotaxime dimer) 2. 其他高分子聚合物 (other high molecular polymer) 3. 头孢噻肟 (cefotaxime)

2.4.2 加速破坏试验 称取头孢噻肟钠样品约 100 mg 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。精密量取 5 份, 每份 10 mL, 分别进行强光 (暴露于 254 nm 紫外光下 6 h)、高温 (60 °C 水浴 1 h)、强酸 (加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 室温放置 7 h 加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和)、强碱 (加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 5 min 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 中和) 及加强氧化剂 (加 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 室温放置 0.5 h) 5 种极端条件的加速破坏, 按“2.1”项下色谱条件分别进样分析, 记录色谱图。结果各破坏条件下产生的小分子降解产物峰均能与主成分峰充分分离, 不干扰聚合物测定; 而产生的高分子杂质中最邻近主成分的杂质峰的保留时间与二聚物对照品峰的保留时间一致, 其他均在此之前洗脱出, 表明为本文可测定的高分子聚合物。

2.4.3 LC-MS 验证

2.4.3.1 色谱条件 流动相: 醋酸铵溶液 (取醋酸铵 1.0 g 加水 980 mL 溶解) - 乙腈 (98:2); 进样量: 10 μL; 其他条件同“2.1”项。

2.4.3.2 质谱参数 电喷雾离子源 (ESI); 毛细管温度: 270 °C; 源电压: 4.5 kV; 毛细管电压: 20 V; 鞘气流速: 10 L·min⁻¹; 负离子检测; 扫描方式: 全扫描一级质谱; m/z 范围: 200~2000。

2.4.3.3 测定结果 称取头孢噻肟钠样品和头孢噻肟二聚物对照品各适量, 分别加水溶解制成 20 mg·mL⁻¹ 和 1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 立即进样测

定,得到样品中二聚物的一级质谱图(图2),与对照品的质谱图相同。质谱图中丰度最强信号峰的质荷比 $m/z = 849$ 根据头孢噻肟二聚物的结构式(图3)^[11],相对分子质量为954推测为失去2个钠离子和其中1个单体失去3位的乙酰氧基裂解得到的碎片。

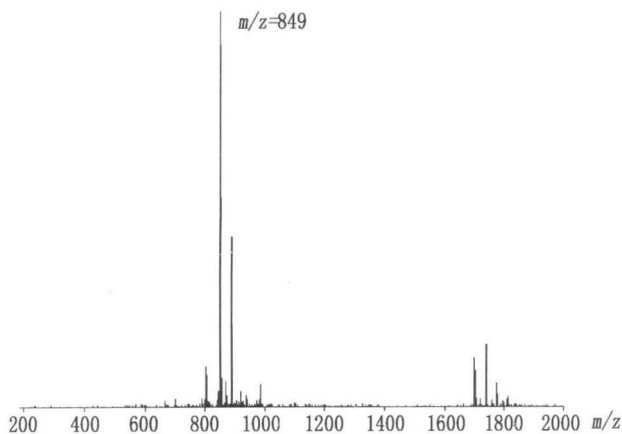


图2 头孢噻肟二聚物质谱图

Fig 2 Mass spectrum of cefotaxime dimer

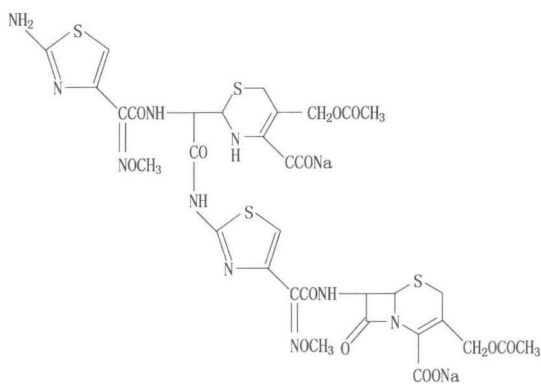


图3 头孢噻肟二聚物的结构式

Fig 3 Structure of cefotaxime dimer

2.5 线性关系试验

2.5.1 头孢噻肟 精密称取头孢噻肟对照品 11.50 mg 置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 0.25, 1, 2.5, 10, 15, 20 mL 分别置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,绘制标准曲线,结果表明在 $2.57 \times 10^{-4} \sim 0.0205 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内线性关系良好,回归方程为:

$$Y = 4.30 \times 10^4 X - 3.37 \quad r = 1.000$$

2.5.2 二聚物 精密称取二聚物对照品 7 份,分别用水溶解并稀释制成浓度为 7.39×10^{-4} , $2.46 \times$

10^{-3} , 9.82×10^{-3} , 0.0197 , 0.0296 , 0.0496 , $0.0987 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.1”项下色谱条件分别立即进样测定。以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,绘制标准曲线,结果表明上述浓度范围内线性关系良好,回归方程为:

$$Y = 2.05 \times 10^4 X - 21.5 \quad r = 0.9997$$

2.6 检测限和定量限 按信噪比为 3:1 测定头孢噻肟二聚物的检测限为 5 ng 按信噪比为 10:1 测定其定量限为 20 ng

2.7 重复进样的精密度 精密量取“2.5.1”项下的对照品储备液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,测得主峰面积的 RSD 为 0.20%。

2.8 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,均加水溶解制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.11”项下方法平行测定,结果聚合物的平均含量为 1.2%, RSD 为 0.94%。

2.9 稳定性试验 称取头孢噻肟钠样品适量,加水溶解制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.1”项下色谱条件分别于 0, 1, 2 h 进样测定,结果溶液中聚合物峰面积和按时间顺序分别依次为 535.9, 539.7, 560.2 表明溶液不稳定,应溶解后立即进样测定。

2.10 回收率试验 精密称取头孢噻肟二聚物对照品 2 份,均用水溶解制成浓度为 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.11”项下方法平行测定,计算以头孢噻肟计的聚合物含量,平均值为 43.71%。精密称取已知聚合物含量的样品(批号 40810502-2 HPSEC 法含量 0.50%) 9 份,每份 100 mg 分别置 100 mL 量瓶中,加入精密称定的二聚物对照品 1.25, 2.50, 3.75 mg 各 3 份,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,按“2.11”项下方法测定,结果低、中、高 3 种浓度的二聚物回收率 ($n=3$) 分别为 99.6%, 99.6%, 99.8%; RSD 分别为 0.85%, 0.82%, 0.61%; 平均回收率 ($n=9$) 为 99.7%。

2.11 样品测定 精密称取本品适量,加水溶解制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,摇匀,按“2.1”项下色谱条件,立即精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图;另精密称取头孢噻肟对照品适量,加水溶解制成 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,同法测定。按外标法以峰面积计算各头孢噻肟聚合物以头孢噻肟计的总量。

3 HPSEC法与药典方法^[9]的比较

3.1 二聚物相对于头孢噻肟的相对响应因子比较

3.1.1 相对响应因子测定

3.1.1.1 HPSEC 法 精密称取对照品头孢噻肟和

二聚物适量,各 3 份,分别用水溶解制成浓度均为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.1”项下色谱条件立即进样分析,测定峰面积对浓度的响应因子,结果头孢噻肟和二聚物的平均响应因子分别为 4.265×10^4 和 1.632×10^4 ,二聚物相对于头孢噻肟的相对响应因子为 0.38。

3.1.1.2 药典方法 精密称取对照品头孢噻肟和二聚物适量,各 3 份,分别用水溶解制成浓度均为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按药典方法立即进样分析,测定峰面积对浓度的响应因子,结果头孢噻肟和二聚物的平均响应因子分别为 6.546×10^7 和 3.694×10^6 ,二聚物相对于头孢噻肟的相对响应因子为 0.056。

3.1.2 相对响应因子结果比较 HPSEC 法测定的相对响应因子比药典方法高,表明对样品中二聚物的测定结果,HPSEC 法高于药典方法。

3.2 药典方法的部分验证试验

3.2.1 专属性试验 称取头孢噻肟钠样品适量,用水溶解制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按药典方法进样分析,记录色谱图(图 4)。

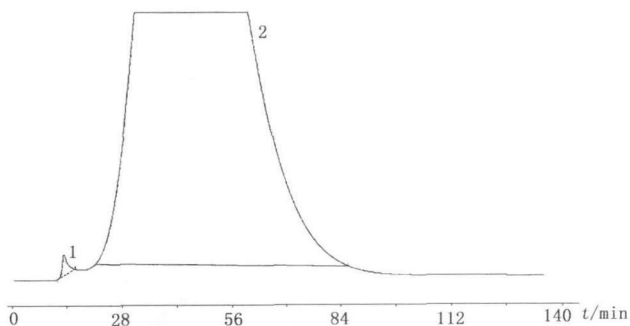


图 4 样品的药典方法色谱图

Fig 4 Chromatogram of sample using the method in ChP 2005

1 头孢噻肟聚合物 (cefotaxime polymer) 2 头孢噻肟 (cefotaxime)

3.2.2 检测限 按药典方法,以信噪比为 3:1 测定头孢噻肟二聚物的检测限为 $2 \mu\text{g}$ 。

3.2.3 重复进样的精密度 精密称取头孢噻肟对照品适量,加水溶解制成浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按药典方法重复进样 6 次,测得主峰面积的 RSD 为 0.92%。

3.2.4 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,均加水溶解制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按药典方法平行测定,结果聚合物的平均含量为 0.16%, RSD 为 5.7%。

3.3 HPSEC 法与药典方法的部分验证试验结果比较 由图 1 和图 4 可以看出,HPSEC 法的专属性比药典方法更好,其余结果详见表 1。

表 1 HPSEC 法与药典方法的部分验证试验结果比较

Tab 1 Comparison of validation experiment results for HPSEC method and ChP method

试验项目 (test)	HPSEC 法 (HPSEC method)	药典方法 (ChP method)
检测限 (detection limit)	5 ng	2 μg
重复进样的精密度 (precision of replicate injections) %	0.20	0.92
重复性 (repeatability) %	0.94	5.7

3.4 HPSEC 法与药典方法的样品测定结果比较

用 HPSEC 法和药典方法分别测定 7 批样品,结果见表 2。

表 2 HPSEC 法与药典方法的样品测定结果比较

Tab 2 Comparison of analytical results of samples by HPSEC method and ChP method

生产厂家 (manufactures)	批号 (Lot No.)	聚合物总量 (total amount of polymers) %	
		HPSEC 法 (HPSEC method)	药典方法 (ChP method)
Sandoz Industrial Products GmbH	40809508	0.77	0.093
	40810501-1	0.72	0.082
	40810502-2	0.50	0.056
悦康药业集团有限公司 (Youcare Pharmaceutical Group Co., Ltd.)	0607013	2.0	0.50
	070608	1.2	0.16
北京清华紫光制药厂 (Beijing Tsinghua Unispindour Pharmaceutical Factory)	0602055	1.1	0.20
	0604252	1.5	0.38

4 讨论

4.1 对于相对响应因子测定,本文并未详细考察,上面结果仅作为证明 HPSEC 法比药典方法的样品测定结果高的依据。因样品中除二聚物外可能还存在其他高分子聚合物,且考虑到二聚物对照品较难获得,所以仍参照药典方法选用头孢噻肟单体对照品为外标。此外,其他高分子聚合物的相对响应因子未知,故不能用上面二聚物与单体的相对响应因子测定结果换算药典限度,应考察不同厂家的多批样品并与药典方法比较后再行制定。

4.2 通过 LC-MS 定性检测,再次验证了图 1 中的峰 1 为二聚物,因此进一步证明本方法可用于测定头孢噻肟聚合物。

4.3 试验结果表明,本文建立的 HPSEC 法,准确度符合定量分析的要求,专属性、灵敏度和精密度均优于药典方法。

参考文献

1 JIANG Xiao-ling(江晓玲), LU Kun(刘昆), DENG Jun-feng(邓俊丰), *et al* Research progress in the high molecular weight impurities of cephalosporins(头孢菌素类抗生素中高分子杂质的研究进展). *World Notes Antibiot*(国外医药抗生素分册), 2007, 28(6): 264

2 YUAN Wen-wei(袁雯玮). High-molecular polymers content in β -lactam antibiotics and their revision of procedures described in the Chinese Pharmacopoeia 2005(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). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 2005, 30(12): 727

3 HU Chang-qin(胡昌勤), SUN Xue-lan(孙学兰), JIN Shao-hong(金少鸿), *et al* Gel filtration-UV method for detection of the content of high molecular weight allergenic impurities in penicillin preparation(凝胶-紫外法测定青霉素中致敏性高分子杂质的含量). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1989, 14(6): 399

4 HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿), SUN Xue-lan(孙学兰). Comparative analysis of allergenic impurities in ampicillin and establishment of a method for evaluation of allergenicity of ampicillin preparations(氨苄青霉素中致敏性杂质的比较分析及产品致敏性评价方法的建立). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1990, 15(2): 102

5 HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿), SUN Xue-

lan(孙学兰). Isolation of high molecular weight impurities in cephalosporins by ion-pair gel filtration chromatography(离子对凝胶色谱法分离头孢菌素中高分子杂质). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1990, 15(5): 357

6 HU Chang-qin(胡昌勤), SUN Xue-lan(孙学兰), JIN Shao-hong(金少鸿). Selection of experimental factors of ion-pair gel filtration chromatography in the assay of high molecular weight impurities from cephalosporins(离子对凝胶色谱法分离头孢菌素中高分子杂质实验条件的选择). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1991, 16(4): 276

7 GU Li-su(顾立素), HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿). Studies on the separation and quality control of high molecular weight impurities in augmentin(安美汀中高分子杂质的分离分析与质量控制). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2001, 21(1): 13

9 JAMR(日本抗生物物质医药品基准解说). 2000 1- 185

10 ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部): 159

10 ChP(中国药典). 2005. Vol III (二部): Appendix(附录) V H

10 ZHANG Qiang(张强), Yamamoto M agobei Aki Hatsum i Studies on polymerization properties of cefotaxime(头孢噻肟聚合特性的研究). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1992, 17(6): 428

(本文于 2008年 5月 13日收到)

全国医疗器械检测机构比对实验工作会议在沈阳召开

国家食品药品监督管理局(以下简称“国家局”)会同中国药品生物制品检定所(以下简称“中检所”)主办的全国医疗器械检测机构比对实验工作会议于 2009年 4月 2日至 3日在沈阳召开。本次会议由国家局沈阳医疗器械质量监督检验中心承办。参加会议的有来自国家局医疗器械监管司和中检所以及全国 49 个医疗器械检测机构负责人及医疗器械比对实验专家组成员, 共计 71人。

会议分组讨论了由中检所起草的《医疗器械检测机构实验室间比对管理规定(讨论稿)》和纠正措施的大致流程, 由医疗器械监管司起草的《医疗器械检测机构监管法规体系建设的思路(讨论稿)》。另外, 专家组成员对 2009年比对实验(球压试验)方案进行了专题讨论。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>