

高效分子排阻色谱法测定丙二醇头孢曲嗪原料药中聚合物的含量

李喆宇^{1*}, 张静霞¹, 王宇驰¹, 张春然¹, 徐明琴¹, 王瑛瑛¹, 董宏波¹, 王婷², 唐克慧^{1#} (1. 成都大学四川抗菌素工业研究所/成都抗生素创制工程技术研究中心, 成都 610052; 2. 滇虹药业集团股份有限公司, 昆明 650106)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3434-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.38

摘要 目的: 建立测定丙二醇头孢曲嗪原料药中聚合物含量的方法。方法: 采用高效分子排阻色谱法。色谱柱为 Sephadex G-10, 流动相 A 为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 [0.01 mol/L 磷酸氢二钠溶液-0.01 mol/L 磷酸二氢钠溶液 (61:39, V/V)] (pH7.0), 流动相 B 为水, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 200 μl。结果: 丙二醇头孢曲嗪原料药中聚合物的检测质量浓度线性范围为 2.07~103.30 μg/ml ($r=0.9994$); 定量限为 10.4 ng, 检测限为 4.1 ng; 精密度、重复性试验的 RSD < 3%。结论: 该方法专属性强、灵敏度高、重复性好, 可用于丙二醇头孢曲嗪原料药中聚合物的含量测定。

关键词 丙二醇头孢曲嗪; 聚合物; 高效分子排阻色谱法

Content Determination of Polymer in Active Pharmaceutical Ingredient Cefatrizine Propylene Glycol by High Performance Size Exclusion Chromatography

LI Zheyu¹, ZHANG Jingxia¹, WANG Yuchi¹, ZHANG Chunran¹, XU Mingqin¹, WANG Yingying¹, DONG Hongbo¹, WANG Ting², TANG Kehui¹ (1. Chengdu University Sichuan Industrial Institute of Antibiotics/Chengdu Engineering Research Center of Innovative Antibiotics, Chengdu 610052, China; 2. Dihon Pharmaceutical Group Co., Ltd., Kunming 650106, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of polymer in cefatrizine propylene glycol. METHODS: High performance sephadex gel chromatography was performed on the column of Sephadex G-10 with mobile phase A of 0.01 mol/L phosphate buffer [0.01 mol/L Disodium hydrogen phosphate solution-0.01 mol/L Sodium dihydrogen phosphate solution (61:39, V/V)] (pH7.0) and mobile phase B of water at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃, and volume injection was 200 μl. RESULTS: The linear range of polymer was 2.07-103.30 mg/ml ($r=0.9994$); the limit of quantitation of 10.4 ng, limit of detection was 4.1 ng; RSDs of precision and reproducibility tests were lower than 3%. CONCLUSIONS: The method is specific with high sensitivity and good reproducibility, and can be used for the content determination of polymer in active pharmaceutical ingredient cefatrizine propylene glycol.

KEYWORDS Cefatrizine propylene glycol; Polymer; High performance size exclusion chromatography

丙二醇头孢曲嗪 (Cefatrizine propylene glycol) 为头孢曲嗪的原料药形式^[1], 是一种β-内酰胺类抗生素, 对β-内酰胺酶具有

很高的稳定性, 对革兰阳性菌、革兰阴性菌具有广谱抗菌活性, 主要用于治疗革兰阳性菌和革兰阴性菌引起的感染^[2-3]。其临床

- [6] Pal D, De T, Baral A, *et al.* Regorafenib (STIVARGA): a new option in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (CRC) [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2013, 5 (3):6.
- [7] Ji WP, Zhang QW, Hu LF. Development of a simple LC-MS assay for determination of regorafenib in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Lat Am J Pharm*, 2014, 33(4):607.
- [8] Hafner FT, Werner D, Kaiser M. Determination of regorafenib (BAY 73-4506) and its major human metabolites BAY 75-7495 (M-2) and BAY 81-8752 (M-5) in human

plasma by stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(14): 1923.

- [9] van Erp NP, de Wit D, Guchelaar HJ, *et al.* A validated assay for the simultaneous quantification of six tyrosine kinase inhibitors and two active metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 937:33.
- [10] Heinz WJ, Kahle K, Helle-Beyersdorf A, *et al.* High-performance liquid chromatographic method for the determination of sorafenib in human serum and peritoneal fluid [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011, 68(1):239.

* 研究实习生, 硕士。研究方向: 药物的质量控制和杂质。电话: 028-84216044。E-mail: lizheyubm@163.com

通信作者: 研究员。研究方向: 药物的质量控制和杂质。E-mail: 765239091@qq.com

(收稿日期: 2015-08-31 修回日期: 2016-07-13)

(编辑: 周 箐)

中较常见的不良反应是药物所致的过敏性休克,且经研究证实^[4-7],此类药物所致的过敏性休克与药物中存在的聚合物有关。 β -内酰胺类抗生素中的各种聚合物虽然结构不同,但通常具有相似的生物学特性(如致过敏性),故在质量控制中一般只需控制聚合物总量^[8]。由于丙二醇头孢曲唑原料药并未载入《中国药典》,且其聚合物检查也未载入任何国家药典,也尚未见文献报道。因此,建立测定丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物含量的方法,对控制该药中聚合物含量,预防过敏反应的发生具有重要意义。近年来,高效分子排阻色谱(HPSEC)法逐渐成熟,并广泛用于分析抗生素中的高分子杂质^[9-11]。本试验参考2015年版《中国药典》(二部)同类品种中聚合物的测定方法,采用HPSEC法建立适合测定丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括LC-20AT泵、SPD-20A型紫外检测器、CTO-20A柱温箱(日本Shimadzu公司);XS205型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

丙二醇头孢曲唑原料药(四川抗菌素工业研究所化学研究部自制,编号:S1、S2、S3);丙二醇头孢曲唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140680-201303,纯度:95.3%);蓝色葡聚糖2000(美国Pharmacia公司,批号:17-0043-01,纯度:100%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Sephadex G-10(300 mm×10.0 mm,40~120 μ m);流动相A:0.01 mol/L磷酸盐缓冲液[0.01 mol/L磷酸氢二钠溶液-0.01 mol/L磷酸二氢钠溶液(61:39, V/V)](pH7.0),流动相B:水;流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:200 μ l。

2.2 溶液的制备

2.2.1 稀释液 取磷酸二氢钠约1.19 g,精密称定,置于1 000 ml量瓶中,加水溶解并定容,用磷酸调pH至4.0,即为磷酸二氢钠缓冲液,取该缓冲液和乙腈适量,混合摇匀,制成浓度为0.01 mol/L的磷酸二氢钠缓冲液-乙腈(8:2, V/V)混合溶液,即为稀释液。

2.2.2 对照品溶液 取丙二醇头孢曲唑对照品适量,精密称定,加稀释液溶解,制成丙二醇头孢曲唑质量浓度为40 μ g/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取样品约0.1g,精密称定,置于10 ml量瓶中,加稀释液溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.4 蓝色葡聚糖2000溶液 取蓝色葡聚糖2000适量,加水溶解并稀释,制成蓝色葡聚糖质量浓度为0.1 mg/ml的溶液。

2.2.5 系统适用性试验用溶液 取样品约0.1 g,精密称定,置于10 ml量瓶中,加2 ml乙腈溶解,再加蓝色葡聚糖2000溶液定容,摇匀,作为系统适用性试验用溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2.5”项下系统适用性试验用溶液200 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,供试品溶液中聚合物峰保留时间(7.640 min)和对照品溶液丙二醇头孢曲唑峰的保留时间(7.661 min)与相应色谱系统(流动相A、流动相B)中蓝色葡聚糖2000峰的保留时间(7.511、7.291 min)的比值分别为1.017、1.051,两种流动相系统

中蓝色葡聚糖2000峰保留时间比值为1.030,系统适用性试验用溶液中聚合物的峰高与单体和高聚体之间的谷高比>2.0[均符合2015年版《中国药典》(二部)的要求]。

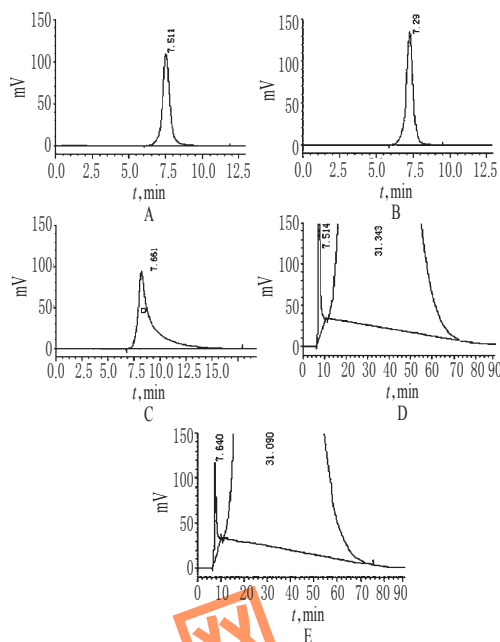


图1 系统适用性试验色谱图

A.在流动相A中的蓝色葡聚糖2000;B.在流动相B中的蓝色葡聚糖2000;C.在流动相B中的对照品溶液;D.在流动相A中的系统适用性试验用溶液;E.在流动相A中的供试品溶液

Fig 1 Chromatogram of system suitability test

A. blue dextran 2000 in mobile phase A; B. blue dextran 2000 in mobile phase B; C. reference substance solution in mobile phase B; D. system suitability solution in mobile phase A; E. test solution in mobile phase A

2.4 线性关系考察

取丙二醇头孢曲唑对照品适量,精密称定,用稀释液溶解并稀释制成质量浓度分别为1.01、2.02、4.04、6.06、8.08、10.10、11.11、12.12 mg/ml的系列线性溶液,此时聚合物质量浓度分别为2.70、5.40、10.77、16.17、21.57、26.97、29.84、32.43 μ g/ml,以流动相B为流动相,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物的质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、聚合物峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物的回归方程为 $y=2 \times 10^6 x - 39 541$ ($r=0.999 4$)。结果表明,丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物的检测质量浓度线性范围为2.07~103.30 μ g/ml。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限为10.4 ng;当信噪比为3:1时,得检测限为4.1 ng。

2.6 精密密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液200 μ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次(以流动相B为流动相),记录峰面积,详见表1。由表1可知,丙二醇头孢曲唑原料药中聚合物峰面积的RSD=2.99%(n=6),表明仪器精密密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、0.5、1.5、3.5、5 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,详见表2。由表2可知,在0.5 h内,丙二醇头孢曲唑原料药中聚

合物的峰面积基本不变,但随着溶液放置时间的增加,聚合物峰面积显著增加,因此为保证测定结果的准确性,供试品溶液应在制备后立即测定。

表1 精密度的试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of precision test($n=6$)

| 进样次数 | 聚合物峰面积 | RSD, % |
|------|-----------|--------|
| 1 | 9 797 768 | 2.99 |
| 2 | 9 670 616 | |
| 3 | 9 506 248 | |
| 4 | 9 308 292 | |
| 5 | 9 127 112 | |
| 6 | 9 125 561 | |

表2 稳定性试验结果($n=5$)

Tab 2 Results of stability test($n=5$)

| 时间, h | 聚合物峰面积 | RSD, % |
|-------|-----------|--------|
| 0 | 5 987 071 | 7.94 |
| 0.5 | 6 039 072 | |
| 2.0 | 6 465 010 | |
| 3.5 | 6 806 321 | |
| 5.0 | 7 203 256 | |

2.8 重复性试验

取样品适量(编号:S1),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并以聚合物峰面积与样品称样量的比值来考察方法的重复性,详见表3。由表3可知,本方法重复性良好。

表3 重复性试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of reproducibility test($n=6$)

| 称样量, mg | 聚合物峰面积 | 聚合物峰面积/称样量 | RSD, % |
|---------|-----------|------------|--------|
| 99.86 | 6 339 734 | 63 486 | 0.71 |
| 99.76 | 6 308 968 | 63 241 | |
| 99.47 | 6 281 932 | 63 154 | |
| 100.22 | 6 455 648 | 64 415 | |
| 99.98 | 6 352 345 | 63 536 | |
| 98.48 | 6 278 967 | 63 759 | |

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算聚合物的含量,结果3批样品(编号:S1、S2、S3)中聚合物的含量分别为0.18%、0.27%、0.37%。

3 讨论

3.1 流速的选择

低流速可使供试品溶液中所含样品与色谱柱填料凝胶基质充分平衡,从而达到理想的分离效果,但流速过低会造成凝胶床内的横向扩散增大、缝宽变宽、分辨率降低,此外还延长了样品洗脱时间,降低了工作效率。高流速易引起聚合物峰与样品峰重叠,使原本可以分开的组分重合,无法有效分离,并且柱压增大,缩短色谱柱的使用寿命。故流速不宜过低也不宜过高。预试验结果表明,在流动相A中,当流速为1.0 ml/min时,供试品溶液中丙二醇头孢曲霉峰与聚合物峰分离度良好,且出峰时间适宜。因此,本试验的流速选择1.0 ml/min。

3.2 流动相A的pH选择

流动相的pH影响聚合物与主峰的分离度,故对流动相A的pH进行考察。分别以pH7.0(A₁)、pH8.0(A₂)的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液作为流动相进行预试验,两种流动相系统均能测得丙二醇头孢曲霉原料药中聚合物。但在流动相A₁系统中,聚合物峰呈现良好峰形,与主峰分离良好,有利于聚合物的准确测定;在流动相A₂系统中,主峰前呈现两个聚合物峰,不利于聚合物

含量的测定。因此,以pH7.0磷酸盐缓冲液作为流动相A。

3.3 流动相A缓冲盐浓度的选择

一定浓度的盐溶液能防止样品与凝胶之间的相互作用,改善拖尾等情况,预试验分别选择0.005、0.010、0.025、0.075、0.100 mol/L磷酸盐缓冲液作为流动相A进行考察。结果表明,盐浓度过低时,聚合物达不到有效分离;盐浓度过高时,基线波动剧烈;而缓冲盐浓度为0.010 mol/L时,基线平稳,峰形良好,符合2015年版《中国药典》(二部)的相关要求。因此,选择0.010 mol/L为本试验缓冲盐浓度。

3.4 流动相B的选择

分别以超纯水、0.5%葡萄糖溶液、0.01 mol/L十二烷基硫酸钠溶液3种洗脱液进行流动相B的筛选。结果表明,丙二醇头孢曲霉对照品在0.5%葡萄糖溶液、0.01 mol/L十二烷基硫酸钠溶液作为流动相B的条件下进行测定,聚合物峰对称性较差、色谱柱柱效低;而超纯水为流动相B时,各色谱峰峰形良好,色谱柱柱效高,可达到检测要求。因此,本试验选择超纯水为流动相B。

3.5 回收率的考察

由于聚合物是一类由千百个原子彼此以共价键结合形成相对分子质量特别大、具有重复结构单元的化合物的统称。故无法获得丙二醇头孢曲霉聚合物的对照品,因此无法进行加样回收率试验,且本品为原料药,无任何辅料干扰,也无需进行回收率试验。

综上所述,本方法专属性强、灵敏度高、重复性好,可用于测定丙二醇头孢曲霉原料药中聚合物的含量。

参考文献

- [1] 孙冬梅,高玉秋,刘方新.HPLC法测定丙二醇头孢曲霉的有关物质[J].齐鲁药事,2008,27(8):467.
- [2] 陈林,石克金,曹胜华,等.丙二醇头孢曲霉的合成[J].中国抗生素杂志,2014,39(6):429.
- [3] 张静霞,徐明琴,唐克慧,等.丙二醇头孢曲霉的二个杂质结构确证[J].中国药学杂志,2014,49(23):2112.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 乔海灵,赵永星,马统勋,等.青霉素类抗生素过敏反应机制及诊断的新近研究进展[J].国外医药:抗生素分册,2002,23(5):197.
- [7] 邓增潮.关于头孢菌素类药物用药前做皮试的探讨[J].现代医药卫生,2005,21(11):1449.
- [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,2001:181.
- [9] 王成刚,曹轶,张喆,等.高效分子排阻色谱法分析头孢噻肟钠中的聚合物[J].药物分析杂志,2009,29(5):814.
- [10] 苑华,张冬,宋家雄,等.高效分子排阻色谱法测定注射用头孢西丁钠聚合物[J].中国医院药学杂志,2013,33(19):89.
- [11] 杨立伟,肖树雄,谢海燕,等.凝胶色谱法测定参芪扶正注射液中的高分子物质[J].中国药房,2011,22(15):1400.

(收稿日期:2016-01-06 修回日期:2016-06-03)

(编辑:刘柳)