

分析质控与制剂

高效分子排阻色谱法测定头孢唑肟钠中聚合物的含量

袁林 王丽 邱海强

(江苏省无锡药品检验所, 无锡 214028)

摘要:目的 建立高效分子排阻色谱法(HPSEC)测定头孢唑肟钠中的聚合物等杂质。方法 采用球状蛋白亲水改性硅胶柱(Zenix SEC-150, 7.8mm×300mm, 3 μ m);流动相为磷酸盐缓冲液(pH7.0)[0.075mol/L磷酸氢二钠溶液-0.075mol/L磷酸二氢钠溶液(61:39)]-乙腈(90:10);流速为1.0mL/min;检测波长为254nm;进样量为10 μ L。结果 头孢唑肟的线性范围为1.15~57.40 μ g/mL($r=0.9999$);定量限为3.2ng、检出限为1.2ng;聚合物等杂质测定的线性范围为0.0500~4.998mg/mL($r=0.9995$);对照品溶液重复进样的精密度(RSD)为0.31%($n=6$),样品测定的重复性(RSD)为0.67%($n=6$)。结论 该方法适于测定头孢唑肟钠中聚合物等杂质,灵敏度高,重复性好,操作简便。

关键词: 头孢唑肟钠; 聚合物; 高效分子排阻色谱法

中图分类号: R978.1+1 文献标志码: A

DOI:10.13461/j.cnki.cja.005722

Determination of impurities including polymers in ceftizoxime sodium by HPSEC

Yuan Lin, Wang Li and Qiu Hai-qiang

(Wuxi Institute for Drug Control, Jiangsu Province, Wuxi 214028)

Abstract Objective To establish a high performance size exclusion chromatography (HPSEC) method for the determination of impurities including polymers in ceftizoxime sodium. **Methods** The analysis was performed on a Zenix SEC-150 column (7.8mm×300mm, 3 μ m) with the mobile phase consisting of phosphate buffer solution [0.075mol/L disodium hydrogen phosphate-0.075mol/L sodium dihydrogen phosphate (61:39), adjusted to a pH of 7.0]-acetonitrile (90:10) at a flow rate of 1.0mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm. The injection volume was 10 μ L. **Results** The impurities including polymers in ceftizoxime sodium were completely separated from ceftizoxime. The linear range of ceftizoxime was 1.15~57.40 μ g/mL ($r=0.9999$). The limit of quantitation of ceftizoxime was 3.2ng, and the detection limit was 1.2ng. The linear range of the total impurities was 0.0500~4.998mg/mL ($r=0.9995$). The RSD for replicate injection of reference solution was 0.31% ($n=6$), and the RSD for the measurement of total impurities was 0.67% ($n=6$). **Conclusion** This established method is accurate, rapid, reproducible, and suitable for the determination of impurities including polymers in ceftizoxime sodium.

Key words Ceftizoxime sodium; Polymer; High performance size exclusion chromatography

头孢唑肟为第三代头孢菌素,其抗菌谱较广,对革兰阳性菌的作用活性弱于第一代头孢菌素,但对革兰阴性菌的作用活性较强,对肾基本无毒。在临床上最常见的不良反应是速发型过敏反应。研究证明, β -内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应的过敏原并不是药物本身,而是与药物中存在的高分

子杂质有关^[1-2]。高分子杂质是对药品中相对分子质量大于药物本身的杂质总称。因此,如何更好地控制这类药物中高分子杂质的含量,将是目前此类药品质量控制研究的主流^[3]。

2010年版《中国药典》采用SephadexG-10凝胶柱分离测定注射用头孢唑肟钠中的高分子聚合物^[4],

收稿日期: 2015-09-24

作者简介: 袁林,男,硕士,主要从事药品检验工作, E-mail: cpu_y1@163.com

但该方法存在柱效低、峰形拖尾和分析时间长等劣势，而且测定中要求使用2种不同的流动相，使试验和计算过程均较为烦琐。近年来高效分子排阻色谱法(HPSEC)逐渐成熟，并用于分析抗生素中的高分子杂质，该方法更为准确、简单易行^[5]。本文建立了使用Zenix SEC-150高效凝胶色谱柱的分子排阻色谱-反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定注射用头孢唑肟钠中高分子聚合物含量的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695高效液相色谱系统，Infinity 1290超高效液相色谱仪/6530A Q-TOF联用质谱仪。

1.2 试剂

头孢唑肟对照品(批号：130504-200702，纯度98.2%，中国食品药品检定研究院)；注射用头孢唑肟钠(某药厂，批号：A14032071)；乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Zenix SEC-150(7.8mm × 300mm，3μm，150Å)；流动相：磷酸盐缓冲液(pH值7.0)[0.075mol/L磷酸氢二钠溶液-0.075mol/L磷酸二氢钠溶液(61:39)]-乙腈(90:10)；流速：1.0mL/min；检测波长：254nm；柱温：25；进样量：10μL。

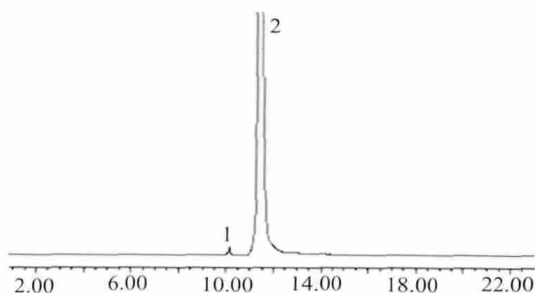
2.2 专属性考察

2.2.1 系统适应性试验

称取注射用头孢唑肟钠样品适量，加流动相溶解制成1mg/mL的溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，记录色谱图。供试品图谱见图1，根据分子排阻色谱法原理^[6]，头孢唑肟主峰前的杂质一般为聚合物峰等大分子杂质。结果显示聚合物等杂质与头孢唑肟峰达到基线分离，聚合物峰相对于头孢唑肟峰的相对保留时间为0.88。

2.2.2 加速破坏试验

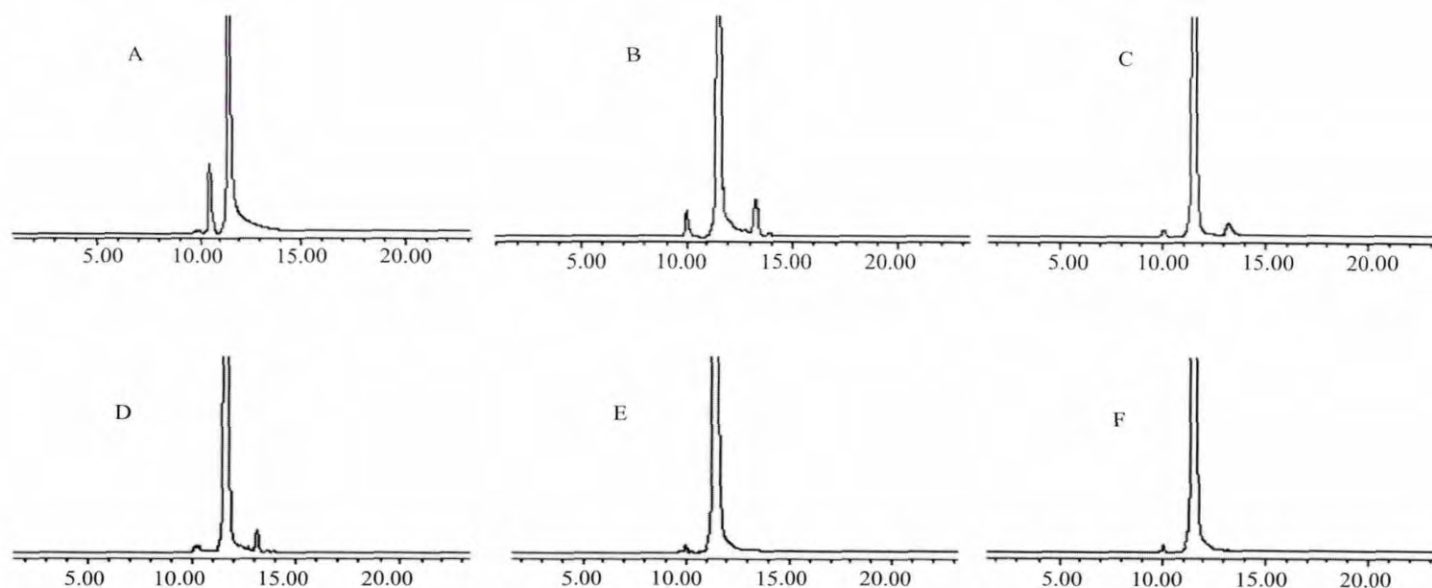
称取注射用头孢唑肟钠约100mg，置100mL量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度。精密量取5份，每份10mL，分别进行强光(暴露于254nm紫外光下6h)、高温(60℃水浴1h)、强酸(加0.1mol/L盐酸溶液1mL，室温放置7h，用0.1mol/L氢氧化钠溶液中和)、强碱(加0.1mol/L氢氧化钠溶液1mL，室温放置5min，用0.1mol/L盐酸溶液中和)及加强氧化剂(加



1：头孢唑肟聚合物；2：头孢唑肟

图1 样品的HPSEC图

Fig. 1 HPSEC chromatogram of ceftizoxime polymers



A：氧化破坏；B：高温破坏；C：强光照破坏；D：碱破坏；E：酸破坏；F：供试品

图2 破坏试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms of destroyed test

30%过氧化氢溶液1mL, 室温放置0.5h)5种极端条件的加速破坏, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 见图2。结果表明, 经强制破坏后产生的杂质均能够与头孢唑肟峰分离, 方法具有专属性。在不同的破坏条件下, 氧化及高温破坏条件下产生的高分子杂质较多, 且高分子杂质峰均能与主峰充分分离。

2.2.3 LC/MS/MS确认

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

(2)质谱参数 电喷雾离子源(ESI), 负离子检测; 毛细管温度: 300 ; 喷雾电压: 3.5kV; 毛细管电压: 135V; 干燥气流速: 10L/min; 扫描范围: 50~2000; MS/MS分析时的碰撞能量: 20eV。

(3)测定结果 HPSEC法采用球状蛋白亲水硅胶为填充剂, 其分离基本原理与葡聚糖凝胶柱相同, 最先洗脱的是高分子聚合物。称取注射用头孢唑肟钠适量, 加水溶解制成20mg/mL的溶液, 立即进样, 得到样品中的聚合物的一级质谱图(图3)。质谱中丰度最强信号峰的质荷比 $m/z=765$, 对质荷比 $m/z=765$ 进行二级碎片扫描, 主要二级质谱碎片为 m/z 382和338, 推测为头孢唑肟(相对分子量为405)的二聚物, 其二级质谱图及裂解途径见图4~5。

2.3 测定法

精密称取头孢唑肟对照品约10 mg, 置100 mL量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取5mL, 置50mL量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(10 μ g/mL)。精密称取供试品约25mg, 置25mL量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

精密量取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算, 含头孢唑肟聚合物等杂质以头孢唑肟计。

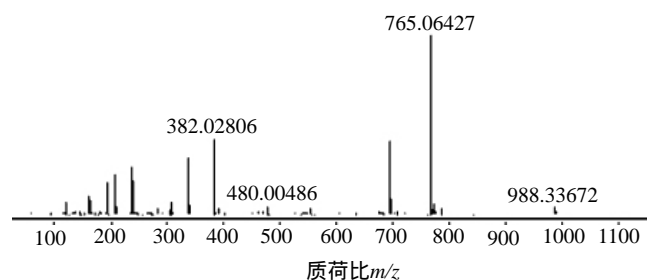


图3 头孢唑肟聚合物一级质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of ceftizoxime polymer

2.3.1 头孢唑肟对照品溶液线性关系考察

(1)头孢唑肟 精密称取头孢唑肟对照品11.71mg, 置100mL量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液。精密量取储备液, 定量稀释成含头孢唑肟浓度为1.15、2.30、5.74、11.48、22.96和57.40 μ g/mL的对照品溶液。分别精密吸取上述溶液10 μ L, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积。以头孢唑肟对照品的浓度为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y), 求得回归方程: $Y=47055.18X-1223.06$ ($r=0.9999$)。表明头孢唑肟浓度在1.15~57.40 μ g/mL范围内与峰面积呈良好的线性关系。

(2)聚合物等杂质 由于无高分子杂质对照品, 因此精密称取同一批注射用头孢唑肟钠样品7份, 分别用水溶解并稀释制成浓度为0.0500、0.100、0.250、0.500、1.000、1.999和4.998mg/mL的溶液(含相应的一定质量浓度的系列高分子杂质), 按“2.1”项下色谱

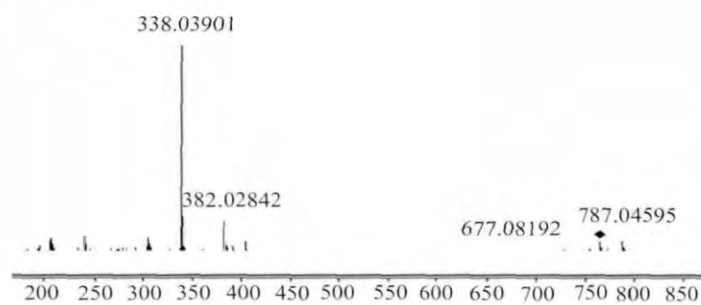


图4 头孢唑肟二聚物 $m/z=765$ 的二级质谱图

Fig. 4 Secondary mass spectrum of ceftizoxime dimer

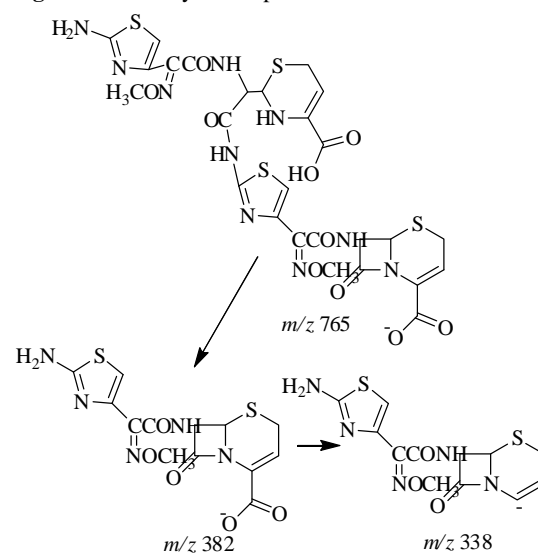


图5 头孢唑肟二聚物 $m/z=765$ 可能的裂解途径

Fig. 5 Possible fragmentation pathway of ceftizoxime dimer ($m/z=765$)

条件分别立即进样测定。以头孢唑肟的浓度 $X(\text{mg/mL})$ 为横坐标,各高分子杂质的峰面积的和 (Y) 分别为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程分别为: $Y=99955.24X-3745.84$, $r=0.9995$,表明头孢唑肟浓度在 $0.0500\sim 4.998\text{mg/mL}$ 范围内与聚合物等杂质的峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验

精密量取“2.3”项下的头孢唑肟对照品溶液 $10\mu\text{L}$,重复进样6次,按“2.1”项下色谱条件测定,测得主峰面积的RSD为 0.31% ($n=6$)。

2.3.3 定量限、检出限

取“2.3”项下的头孢唑肟对照品溶液,用水逐步稀释,以信噪比 $10:1$ 计,定量限为 3.2ng ;以信噪比 $3:1$ 计,检出限为 1.2ng 。

2.3.4 聚合物等杂质

取“2.3”项下的供试品溶液,用水逐步稀释,至响应值最大高分子杂质峰的信噪比为 $10:1$,测定其峰面积,以头孢唑肟为外标计算定量限为 25ng 。

2.3.5 重复性试验

平行制备供试品溶液6份,按“2.1”项下色谱条件分别进样分析,测定聚合物等杂质的总量,平均结果为 0.04% ,RSD为 0.67% 。

2.3.6 供试品溶液稳定性试验

称取注射用头孢唑肟钠适量,加流动相溶解制成 1mg/mL 的溶液,在室温 25°C 放置,按“2.1”项下色谱条件分别于 $0、1、2、4$ 和 8h 进样测定,结果见表1。由试验结果可知,随进样时间的延长,高分子杂质的峰面积逐渐变大,说明供试品溶液在水中稳定性较差,配制后应立即进样。

2.4 样品测定

按“2.3”项下的方法测定,按外标法以峰面积计算样品中头孢唑肟聚合物等杂质的含量,结果为 0.04% 。

3 讨论

笔者考察了不同的浓度和pH的磷酸盐缓冲液,调整乙腈比例以改善分离,最终选择分离效果最好的磷酸盐缓冲液($\text{pH}7.0$)[0.075mol/L 磷酸氢二钠溶液- 0.075mol/L 磷酸二氢钠溶液($61:39$)]-乙腈($90:10$)为流动相。

由于高分子杂质对照品难以制备,因此参照《中国药典》2010年版中 β -内酰胺类抗菌素的聚合物测定方法,选择用自身对照外标法进行定量。

表1 稳定性试验结果
Tab. 1 Results of stability test

放置时间/h	高分子杂质峰面积	峰面积变化率/%
0	86278	0
1	118050	36.8
2	158777	84.0
4	176067	104.1
8	210536	144.0

LC-MS定性检测验证了图1中的峰1为二聚物,进一步证明本方法可用于测定头孢唑肟聚合物。

HPSEC法采用球状蛋白亲水硅胶为填充剂,但其分离基本原理与葡聚糖凝胶柱相同,其表面通过共价键化学键合上亲水基团,综合运用了分子筛效应和凝胶过滤效应,吸附及分子筛效应强于Sephadex G-10葡聚糖凝胶颗粒,分离能力显著提高,分析时间明显缩短,可以更真实地反映样品聚合物存在状况并避免检测过程中发生新的降解与聚合^[7]。

试验结果表明,本文建立的HPSEC法,能够较好地分离头孢唑肟钠和聚合物等杂质,准确度符合质量分析的要求,可用于头孢唑肟钠中聚合物等杂质的检测。但仍有一些细节有待进一步考察与改进。应尽可能将有关物质检查HPLC法与聚合物检查HPLC法检出的各色谱峰逐一鉴定,避免重复控制。由于 β -内酰胺类抗生素在溶液状态下不稳定,分离分析过程中极有可能继续降解与聚合,那么如何制备这些降解物或聚合物并使其保持稳定,是初步测定头孢唑肟聚合物的化学结构的关键所在。

参考文献

- [1] 石爱平. 头孢唑肟的不良反应[J]. 黑龙江医药, 2010, 2: 269-270.
- [2] 金少鸿, 胡昌勤. 内酰胺类抗生素过敏反应的研究进展[J]. 中国新药杂志, 1994, 4(3): 38-38.
- [3] 顾立素, 胡昌勤, 金少鸿. 安美汀中高分子杂质的分离分析与质量控制[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1): 13.
- [4] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 二部, 2010年版, 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 204-205.
- [5] 夏鸣, 杭太俊, 李小敏. β -内酰胺类抗生素中高分子聚合物杂质检查方法的研究综述[J]. 药学进展, 2007, 31(11): 501-506.
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 二部, 2010年版, 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 H.
- [7] 王健松, 周卫军, 刘敏. 高效分子排阻色谱法测定头孢西丁钠中高分子杂质的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(11): 842-845.