

凝胶色谱法测定注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中高分子聚合物

张菁, 朱建平, 苑华(河北省药品检验所, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中哌拉西林聚合物的测定方法。方法 采用凝胶色谱法。色谱条件为: 色谱柱: 葡聚糖凝胶 G-10 为填充剂 RASIS 柱(Sephadex™ G-10, 40~120 μm , 400 mm $\times$ 13 mm); 流动相 A: pH 7.0 的 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, 流动相 B: 水; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长: 254 nm。结果 哌拉西林聚合物线性范围为 40.10~180.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 6$)。结论 方法简便易行, 可基本保证所有高分子杂质被排阻, 满足药品质量控制的需要。

关键词: 凝胶色谱法; 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠; 哌拉西林聚合物

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)05-0452-03

Sephadex Chromatographic System for Determination of Polymer in Piperacillin Sodium/Tazobactam Sodium for Injection

ZHANG Jing, ZHU Jianping, YUAN Hua(The Institute for Drug Control of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for determination of polymer in piperacillin sodium/tazobactam sodium for injection. **METHODS** Sephadex G-10 column was used with the mobile phase A of 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.0) and mobile phase B of water. The flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ and the wavelength was 254 nm. **RESULTS** The linear range of polymer in piperacillin sodium/tazobactam sodium for injection was 40.10~180.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 6$). **CONCLUSION** The method was convenient and accurate, and can meet the requirements of drug quality control.

KEY WORDS: sephadex G-10 chromatographic system; piperacillin sodium/tazobactam sodium for injection; piperacillin polymer

注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠为哌拉西林钠与他唑巴坦钠组成的复方制剂。哌拉西林为广谱 β -内酰胺类抗生素, 他唑巴坦为 β -内酰胺酶抑制剂。本品对哌拉西林敏感的细菌和产 β -内酰胺酶的细菌有抗菌作用。注射用哌拉西林钠在临床已广泛应用, 但对哌拉西林钠高分子聚合物测定方法未见报道。从抗生素的临床不良反应看, β -内酰胺类抗生素中的高分子杂质是引发临床速发型过敏反应的过敏原。随着现代生产工艺的不断改进和提高, 目前产品中的外源性杂质日趋减少, 故对内源性聚合物的控制是当前抗生素高分子杂质质量控制的重点, 高分子杂质是 β -内酰胺类抗生素质量评价的重要指标, 可评价药品质量和稳定性, 并可借此进一步评价其生产工艺。笔者参考中国药典 2005 年版^[1] 高分子杂质的测定方法, 建立了凝胶色谱法测定注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中高分子聚合物。

1 仪器与试剂

Waters 515 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 蓝色葡聚糖 2000(中国药品检验所); 哌拉西林对照品(中国药品检验所, 批号: 130419-200103, 含量: 90.5%); 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠(河北

某药厂提供, 批号: 060301、060302、060303, 规格 1.25 g, 含哌拉西林钠 1.0 g 与他唑巴坦钠 0.25 g; 其他药厂提供, 批号: 0904001、09022064、09012014); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯), 超纯水。

2 方法与结果

2.1 方法的选择

利用凝胶色谱的分子筛机制, 让药物分子自由进入凝胶颗粒内部, 而所有的高分子杂质被排阻, 进而让所有高分子杂质具有相同的保留时间。由于药物分子和凝胶介质间存在多种次级相互作用, 药物分子可被吸附于凝胶介质的表面。药物分子在凝胶颗粒内部较凝胶外部更易与凝胶接触, 有目的地利用药物分子和凝胶间的次级相互作用, 使药物分子吸附于凝胶颗粒内表面。使得色谱过程中凝胶对药物分子的吸附作用大于对高分子杂质的吸附作用, 进而改善高分子杂质和药物分子之间的分离度, 从而达到药物分子和高分子杂质的有效分离。

2.2 流动相的选择

参考中国药典 2005 年版二部中 β -内酰胺类抗生素聚合物的检查方法, 采用水为流动相 B, 并选用 5 种流动相系统对流动相 A 进行考察, 分别为 pH

作者简介: 张菁, 女, 副主任药师 Tel: (0311)85212008-8029

E-mail: jingz0326@sohu.com

7.0 的 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.0 的 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.0 的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 8.0 的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 8.0 的 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液。因为流动相的种类与浓度可以改变溶质的色谱行为, 不同浓度的磷酸盐缓冲液对哌拉西林在葡聚糖凝胶色谱柱中的分离效果有明显差别, 缓冲液不合适时, 哌拉西林与其聚合物分离不完全或峰形较差。采用 pH 7.0 的 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液作为流动相 A 时, 哌拉西林与其聚合物能较好分离, 且聚合物的峰形较对称, 见图 1, 所以选择其作为流动相 A。

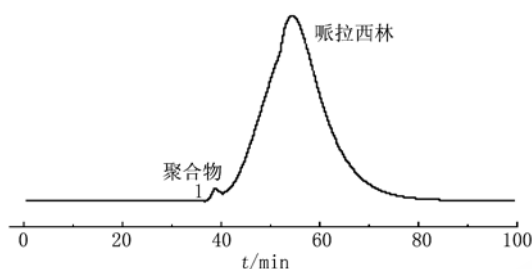


图 1 哌拉西林聚合物色谱图

注: 哌拉西林聚合保留时间为 36.92 min

Fig 1 The chromatogram of piperacillin polymer

Note: The retention time of Piperacillin polymer was 36.92 min

2.3 检测波长的选择

由于目前的高分子测定仪均为固定波长 (254 nm), 为了保证方法的通用性, 参照中国药典 2005 年版 β -内酰胺类抗生素高分子聚合物测定方法选择检测波长为 254 nm。

2.4 色谱条件与系统适用性试验

用葡聚糖凝胶 G-10 为填充剂 RASIS 柱 (SephadexTM G-10, 40~120 μm 400 mm $\times$ 13 mm)。以 pH 7.0 的 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 [$0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液- $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 (61:39)] 为流动相 A, 以水为流动相 B, 流速为 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 254 nm。分别以流动相 A、B 为流动相, 取 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蓝色葡聚糖 2000 溶液 200 μL , 注入液相色谱仪, 理论板数按蓝色葡聚糖 2000 峰计算不低于 700, 拖尾因子均应小于 2.0, 见图 2。在 2 种流动相系统中蓝色葡聚糖 2000 峰保留时间的比值应在 0.93~1.07 之间, 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应在 0.93~1.07 之间。另以流动相 B 为流动相, 精密量取对照溶液 200 μL , 连续进样 5 次, 峰面积的 RSD 应不大于 5.0%, 见图 3。

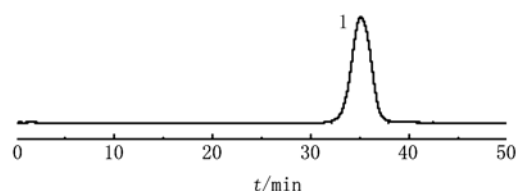


图 2A 流动相 B 中蓝色葡聚糖 2000 色谱图(保留时间为 35.12 min)

Fig 2A The chromatogram of dextran blue 2000 in mobile phase B (retention time was 35.12 min)

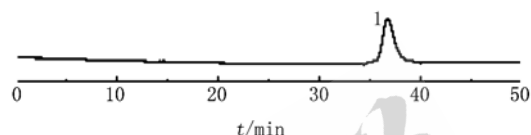


图 2B 流动相 A 中蓝色葡聚糖 2000 色谱图(保留时间为 36.75 min)

Fig 2B The chromatogram of dextran blue 2000 in mobile phase A (retention time was 36.75 min)

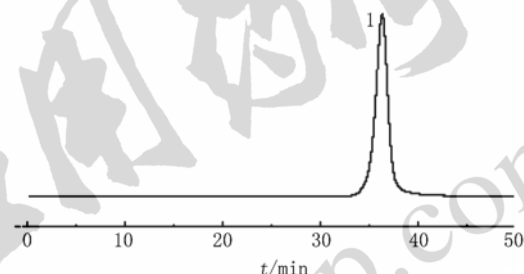


图 3 对照溶液色谱图(保留时间为 36.34 min)

Fig 3 The chromatogram of standard solution (retention time was 36.34 min)

2.5 测定方法

2.5.1 对照溶液的制备 取哌拉西林对照品约 20 mg, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 100 μg 的溶液。

2.5.2 测定法 取装量差异项下的内容物, 精密称取适量 (约相当于哌拉西林钠 200 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 立即精密量取 200 μL 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。另精密量取对照溶液 200 μL 注入液相色谱仪, 以流动相 B 为流动相, 同法测定。

2.6 溶剂干扰实验

取蒸馏水, 分别以流动相 A、B 为流动相进行测定, 记录色谱图, 与聚合物相同的保留时间处, 未显示色谱峰, 溶剂无干扰。

2.7 他唑巴坦钠干扰实验

精密称取他唑巴坦钠约 0.25 g, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 立即精密量取 200 μL 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,与聚合物相同的保留时间处,未显示色谱峰,他唑巴坦无干扰。

2.8 对照溶液的线性关系

精密称取哌拉西林对照品适量,置量瓶中,用水制成浓度为 40.10, 60.15, 100.25, 140.35, 180.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 一系列浓度的溶液,以流动相 B 为流动相,分别进样,记录各个浓度的色谱峰面积,以浓度为自变量(X),峰面积为因变量(Y),进行直线回归,回归方程为: $Y=1\,405\,X+8\,759.8$, $r=0.999\,6$ 。结果表明在 40.10~180.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,对照品浓度与其峰面积呈良好的线性关系。

2.9 最低检测限与定量限

精密称取哌拉西林对照品适量,加水溶解并稀释成一系列溶液,取 200 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算信噪比 $S/N=3$,最低检测限为 74.04 ng;计算信噪比 $S/N=10$,最低定量限为 246.8 ng, $RSD=2.1\%$, $n=5$ 。

2.10 F 值测定的重复性考察

2.10.1 日内 F 值测定 精密称取哌拉西林对照品 6 份,分别制成药 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,在选定的条件下分别进样 5 次,计算对照品取样量(W)与峰面积(A)的比值(校正因子 F),结果见表 1。

2.10.2 日间 F 值测定 在不同日期、不同分析人员对 F 值进行测定,结果见表 1。F 有良好的重复性。

表 1 F 值重复性考察(n=5)

Tab 1 F value reproducibility study(n=5)

	$F\times 10^{-5}$	RSD/%
日内	9.464 4	1.2
	9.457 7	1.8
	9.462 4	0.8
	9.484 4	0.7
日间	9.512 1	0.9
	9.503 2	1.7
	9.502 5	0.5
	9.460 1	0.5

2.11 供试品溶液的浓度与聚合物测定结果的相关性考察

取注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠供试品适量,分别制成一系列浓度的溶液,在选定的条件下,测定哌拉西林聚合物,记录色谱图。以样品浓度为横坐标,聚合物峰面积为纵坐标,进行线性回归,线性方程为 $Y=3\,777.9X-45\,629$, $r=0.972\,5$ 。

2.12 聚合物测定结果的重复性

2.12.1 重复性 精密称取注射用哌拉西林钠他唑

巴坦钠供试品 6 份,各约 0.25 g 置于 10 mL 的量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,在选定的条件下,测定哌拉西林聚合物,测定平均值为 0.17%, $RSD=5.84\%$ 。

2.12.2 中间精密度 在不同日期、不同分析人员对注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠供试品聚合物进行测定,平均值为 0.17%, RSD 为 5.88%。

2.13 样品测定

按上述供试品溶液制备方法制得样品,依法测定。结果见表 2。

表 2 样品测定结果(n=2)

Tab 2 The results of samples (n=2)

批 号	聚合物测定结果/%
060301	0.16
060302	0.16
060303	0.16
0904001	0.09
09022064	0.11
09012014	0.14

3 讨论

3.1 定量方法的选择(自身对照外标法)

由于哌拉西林聚合物对照品较难制备,因此利用特定条件下 β -内酰胺抗生素可以自身缔合,导致其表观分子量增大,此时在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中和高分子杂质具有相似的色谱行为,即在 $K_{av}=0$ 处表现为单一的色谱峰。在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中,首先测定药物分子的缔合峰,再测定样品中分离出的高分子杂质峰,然后按外标法,以缔合峰为标准,计算高分子杂质相当于药物本身的含量。

3.2 蓝色葡聚糖 2000 色谱行为的特殊意义

由图 2 可知,在两种流动相系统中蓝色葡聚糖 2000 的保留时间基本一致。其保留时间表示流动相流速确定条件下的 $K_{av}=0$ 的洗脱时间,即相当于被排阻的聚合物洗脱的保留时间;同时该保留时间与柱效及拖尾因子等参数共同代表色谱柱的性能特征。

3.3 限度的确定

根据样品测定结果,并参照中国药典 2005 年版二部 β -内酰胺抗生素限度规定,暂定限度为含哌拉西林聚合物以哌拉西林计,不得过 0.5%。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 35.

收稿日期: 2009-03-03