

手性配体高效液相色谱拆分肌肽对映体

苏丹^{1,2}, 宋永贵^{1,2*} (1.中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2.江西中医学院, 南昌 330006)

摘要: 目的 建立手性配体高效液相色谱法对肌肽对映体进行拆分。方法 在 Phenomenex chirex 3126 手性色谱柱上, 以硫酸铜为手性配体流动相, 考察了进样量、流动相有机添加剂、流速、柱温、 Cu^{2+} 浓度等因素下肌肽色谱拆分行为和热力学特性, 并初步探讨了溶质在配体手性柱上的识别机制。结果 检测波长在 254 nm, 流动相为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ 水溶液-乙腈(96:4), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 可实现肌肽对映体的基线分离。其在色谱柱分离的焓变差值 $\Delta \Delta H^\circ$ 与熵变差值 $\Delta \Delta S^\circ$ 对手性识别都有贡献, 拆分过程为焓控过程。其中 L-肌肽与手性配体及 Cu^{2+} 形成的络合物呈现出不稳定性, 与典型的构像异构色谱行为一致。结论 肌肽对映体可采用手性配体色谱法实现基线分离, 其中 L-肌肽形成的配位体具不稳定性。
关键词: 手性配体; 肌肽; 对映体拆分

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0075-05

Enantioseparation of Carnosine by HPLC with Chiral Ligand-exchange Method

SU Dan^{1,2}, SONG Yonggui^{1,2*} (1.The National Pharmaceutical Engineering Center (NPEC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2.Jiangxi University of Chinese Traditional Medicine, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a chiral ligand-exchange method by HPLC for the separation of carnosine enantiomers. **METHODS** Chromatography was carried out by chiral column (Phenomenex chirex 3126) with mobile phase composed of copper sulfate as chiral mobile phase ligands. The effect of sample volume, organic-additives, flow rate of mobile phase, copper concentration, column temperature and thermodynamics character were investigated. Chiral identify principle of solute was researched preliminarily. **RESULTS** Carnosine enantiomers can be separated on baseline with a mixture of $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ -acetonitriles(96:4) as mobile phase at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and detected at 254 nm. Both enthalpy change ($\Delta \Delta H^\circ$) and entropy change ($\Delta \Delta S^\circ$) have contributed to the chiral recognition. The process of chiral separation is the enthalpy-controlled. The comoles compound of L-carnosine, chiral ligands and Cu^{2+} present the instability, in accordance with the typical chromatographic behaviour of conformation change. **CONCLUSOIN** Carnosine enantiomers can be separated on baseline by chiral ligand-exchange method. The chiral ligand of L-carnosine is unstable.

KEY WORDS: chiral ligand; carnosine; enantiomer separation

手性化合物对映体, 因其生物活性、毒性、代谢机制可能存在差异巨大, 因而其分离问题日益受到重视。肌肽为手性分子(Carnosine, Car), 有 L-肌肽(L-carnosine, L-Car)和 D-肌肽(D-carnosine, D-Car)2 种构型。L-肌肽是由 β -丙氨酸和 L-组氨酸构成的二肽(β -Ala-L-His), 是继 SOD 和维生素 E 后又一被发现的天然非酶促自由基清除剂和抗氧化剂, 被广泛地应用到神经系统疾病^[1], 心血管疾病^[2]及白内障^[3]的治疗中。D-肌肽具有更强的降压活性^[4], 并且 D-肌肽由于其可以对抗酶的消化, 在神经系统紊乱、糖尿病以及高血压方面有明显疗效^[5], 结构式见图 1。肌肽对映体的手性色谱分离分析及其分离过程的热力学研究尚未见报道。本实验以 Phenomenex chirex 3126 配体固定相和硫酸铜手性配体流动相, 考察了进样量、流动相组成、

流速、柱温、 Cu^{2+} 浓度等因素下肌肽色谱拆分行为和热力学特性, 并对其拆分机制及 L-肌肽出现的色谱峰异常进行探讨。

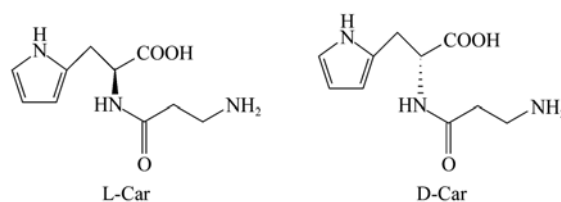


图 1 肌肽对映体结构式

Fig 1 Chemical structure of Carnosine enantiomers

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SPD-10A 型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司); LC-10AD 型高效液相输液泵(日本 Shimadzu 公

作者简介: 苏丹, 女, 博士, 副教授 Tel: (0791)7119652 E-mail: sudan_nj@163.com

(0791)7119632 E-mail: songkang9925@163.com

*通信作者: 宋永贵, 男, 硕士, 讲师 Tel:

司); N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息研究所); Phenomenex chirex 3126 手性色谱柱(250 mm × 4.6 mm)(美国菲罗门公司); BP-210S 电子分析天平(北京 Sartorius 仪器系统有限公司); AB135-S 十万分之一天平(METTLER TOLEDO)。

L-肌肽(美国 Sigma 公司, 批号: 1228600, 纯度>99.2%); D-肌肽(沈阳某制药有限公司, 批号: 20070912, 纯度>99.1%); L-肌肽原料药(沈阳某药厂提供, 批号: 070601, 纯度>99.0%); 试验用无水硫酸铜(天津市大茂化学试剂厂); 甲醇、乙腈、异丙醇(色谱纯, 山东禹王实业总公司); 水(二次蒸馏, 0.45 μm 微膜过滤)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 检测波长 254 nm 下, 考察不同进样量、流动相组成、流速、柱温、Cu²⁺浓度对肌肽色谱拆分行为和热力学特性的影响。

1.2.2 对照品溶液配制 分别取 L-肌肽、D-肌肽对照品 25 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 作为 L-肌肽和 D-肌肽储备溶液。精密吸取各自储备液 0.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 得浓度为 5.0 μg·mL⁻¹ 的 L-肌肽和 D-肌肽对照品溶液。

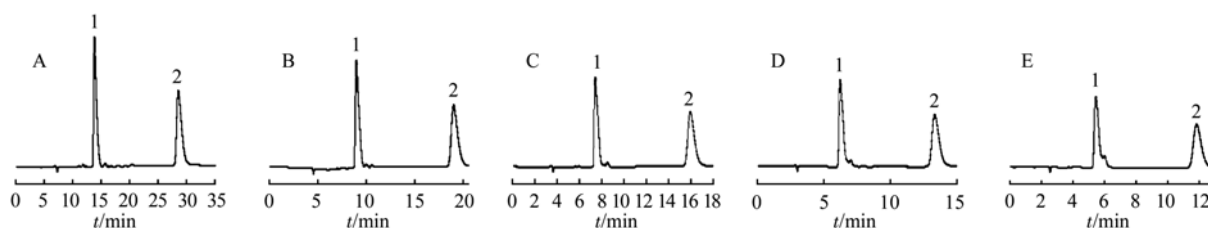


图 2 不同流速下 L-肌肽、D-肌肽拆分色谱图

A-0.5 mL·min⁻¹; B-0.8 mL·min⁻¹; C-1.0 mL·min⁻¹; D-1.2 mL·min⁻¹; E-1.4 mL·min⁻¹; 1-L-肌肽; 2-D-肌肽

Fig 2 Chromatograms of enantiomer resolution of L-Car, D-Car under different flow

A-0.5 mL·min⁻¹; B-0.8 mL·min⁻¹; C-1.0 mL·min⁻¹; D-1.2 mL·min⁻¹; E-1.4 mL·min⁻¹; 1-L-Car; 2-D-Car

2.3 不同进样量对拆分效果的影响

将浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的 L-肌肽、D-肌肽以 5, 10, 15, 20 μL 的不同进样量进样, 在不过载的情况下, 进样量与分离度及色谱峰峰形具有良好的重复性。

2.4 Cu²⁺浓度对肌肽对映体拆分的影响

柱温: 35 °C, 检测波长: 254 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 20 μL, 随着流动相中 CuSO₄ 浓度的增加, 肌肽 2 个异构体的 k 增加, 而对映体选择性 α 和分离度 R_s 变化不大, 结果见表 1。值得注意的是, 随着 Cu²⁺浓度的增加, 所测 L-肌肽

1.2.3 供试品溶液配制 取 L-肌肽样品 25 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 得浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 L-肌肽、D-肌肽的拆分

在配体交换色谱实验中, 样品在固定相上的保留主要依赖于疏水作用和配体交换。本实验中, D-肌肽的保留值都>L-肌肽。用 Phenomenex chirex 3126 手性配体固定相, 拆分肌肽异构体时, D-肌肽和 L-肌肽与键合相上的 D-青霉胺配体及 Cu²⁺形成 2 种非对映的三元络合物。

2.2 手性流动相流速对拆分效果的影响

流动相: 2 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 水溶液-乙腈(96:4), 柱温: 35 °C, 检测波长: 254 nm, 进样量: 20 μL, 随着手性流动相流速的增大, 保留时间相应变小, 峰展宽, 峰面积逐渐变小, 当流速为 1.4 mL·min⁻¹ 时, L-肌肽峰裂分现象严重, 峰面积仅约为流速 0.5 mL·min⁻¹ 时峰面积的 25%。这种现象随着流动相流速的升高, 对映体在柱上的保留时间会降低, 肌肽与手性配体无法充分实现配位交换, 峰面积减少。L-肌肽随着流速升高出现了峰的明显分叉, 说明 L-肌肽所形成的三元络合物不稳定。结果见图 2。

和 D-肌肽峰面积显著增加, 峰形较好, 同时, 基线噪音变大。这可能是随 Cu²⁺浓度的增大, 三元配合物会增多, 使得肌肽的保留增强, 峰面积变大。但是由于流动相中 Cu²⁺浓度的增大, 使得所形成的配合物颜色加深, 导致基线噪音也增大, 结果见图 3。

表 1 Cu²⁺浓度对拆分的影响

Tab 1 Effect of Cu²⁺ concentration

Cu ²⁺ 浓度/mmol·L ⁻¹	K _L '	K _D '	α	R _s
1.0	1.707	4.534	2.656	7.573
1.5	2.117	5.173	2.443	8.595
2.0	2.170	5.245	2.417	9.279

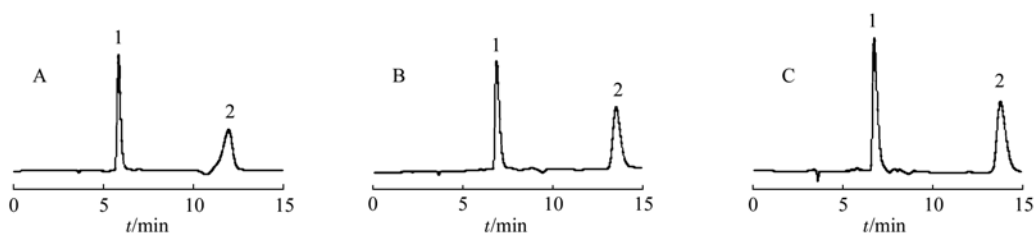


图3 不同 Cu^{2+} 浓度下 L-肌肽、D-肌肽拆分色谱图

A-1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 水溶液-乙腈(96:4); B-1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 水溶液-乙腈(96:4); C-2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 水溶液-乙腈(96:4); 1-L-肌肽; 2-D-肌肽

Fig 3 Chromatograms of enantiomer resolution of L-Car, D-Car under different Cu^{2+} concentration

A-1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 aqueous solution: ACN(96:4); B-1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 aqueous solution: ACN(96:4); C-2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 aqueous solution: ACN(96:4); 1-L-Car; 2-D-Car

2.5 有机添加剂对肌肽对映体拆分的影响

在柱温为 35°C , 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 水相为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液的条件下, 考察了以不同比例甲醇、乙腈、异丙醇作为流动相的有机改性剂, 对肌肽对映体拆分色谱行为的影响。随着有机添加剂甲醇比例由 1% 上升为 20%, L-肌肽和 D-肌肽的保留时间分别由 18.598, 47.132 min 缩短为 5.215, 8.482 min。乙腈比例由 1% 上升为 12%, L-肌肽和 D-肌肽的保留时间分别由 15.565, 38.982 min 缩短为 3.312, 3.950 min。异丙醇比例由 1% 上升为 10%, L-肌肽和 D-肌肽的保留时间分别由 10.403, 24.092 min 缩短为 2.965, 3.432 min。这说明流动相添加法的色谱行为完全符合 RP-HPLC 的规律。有机添加剂对肌肽对映体保留时间影响较大。

有机添加剂对肌肽对映体拆分影响的总体趋势是: 肌肽的保留值随流动相中有机溶剂百分含

量的增加而减小。说明肌肽的保留除了通过其氨基和羧基与金属离子的络合作用外, 还涉及侧链与固定相的相互疏水作用。同时随着有机相的增加, 肌肽色谱峰面积减少, 峰前沿或分叉, 容量因子降低, 分离度下降, 这与有机相增加, 流动相洗脱能力增强, 对映体在柱上无法充分实现配位交换有关。

2.6 柱温对拆分效果的影响

流动相: $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 水溶液-乙腈(96:4), 流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长: 254 nm, 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$; 在温度 $25\sim 45^\circ\text{C}$ (25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 45°C) 内考察了肌肽在 Phenomenex chirex 3126 柱上色谱拆分的热力学性质。在实验的温度范围内, 用 $\ln k$ 和 $\ln \alpha$ 对 $1/T$ 作图得到的 Van't Hoff 实验曲线均呈现良好的线性关系, 结果见图 4。相关系数 >0.99 , 说明在本实验条件下, 肌肽对映体的拆分机理不随温度变化。热力学参数见表 2。

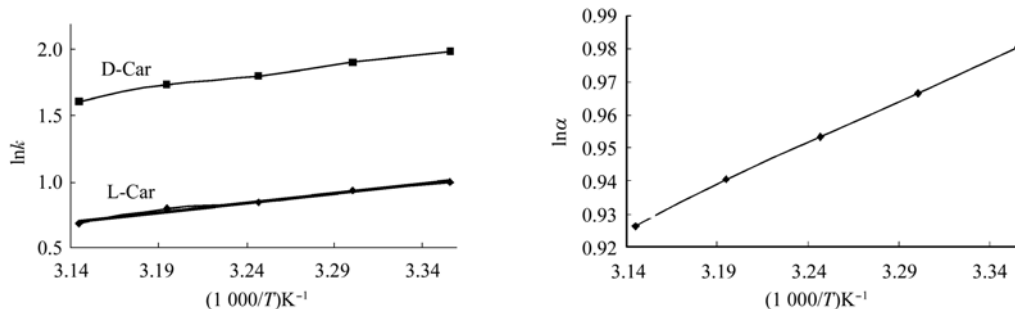


图4 L-肌肽、D-肌肽在不同温度($25\sim 45^\circ\text{C}$)下 $\ln k$ 和 $\ln \alpha$ 对 $1/T$ 曲线

Fig 4 Plots of $\ln k$ and $\ln \alpha$ versus $1/T$ for carnosine on Phenomenex chirex 3126

表2 肌肽对映体的 ΔH° 、 ΔS° 、 $\Delta \Delta H^\circ$ 和 $\Delta \Delta S^\circ$ 的值

Tab 2 ΔH° , ΔS° , $\Delta \Delta H$ and $\Delta \Delta S$ values for carnosine enantiomers

Enantiomers	$\Delta H^\circ/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta \Delta H^\circ/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta \Delta S^\circ/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
L-carnosine	-12 158.4	-5.651 23	-2.115	1.056
D-carnosine	-14 273.5	-4.595 35		

由结果可知, $\Delta \Delta H^\circ$ 为负值, $\Delta \Delta S^\circ$ 为正值, 两者对手性识别都有贡献。 $|\Delta \Delta H^\circ| > |T \Delta \Delta S^\circ|$, 故手性拆分过程为焓控过程。 $\Delta S^\circ_{\text{L}}$ 与 $\Delta S^\circ_{\text{D}}$ 均为负值, 说明溶质吸附过程自由度降低, 且 $|\Delta S^\circ_{\text{L}}| > |\Delta S^\circ_{\text{D}}|$, 表明(L)-肌肽吸附过程构象变化大。 $\Delta H^\circ_{\text{L}}$ 与 $\Delta H^\circ_{\text{D}}$ 均为负值, 说明肌肽对映体在固定相上的

吸附是放热过程,与固定相的结合在能量上更有利,且 $|\Delta H^{\circ}_D| > |\Delta H^{\circ}_L|$,表明(D)-肌肽与 Cu^{2+} 、(D)-青霉胺配体之间的作用强,这与实验所得肌肽 D-构型比 L-构型更难洗脱的结果一致。

2.7 检测限及 L-肌肽样品测定

以 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CuSO}_4$ 水溶液:乙腈(96:4)为流动相;流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长: 254 nm ;柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;进行检测限及 L-肌肽样品测定。

将 D-肌肽对照品溶液逐级稀释进样,以 3 倍信噪比计算 D-肌肽的检测限为 $1.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

分别取 L-肌肽样品、D-肌肽对照品各约 25 mg ,精密称定,按“1.2”项下方法配制供试品溶液和对照品溶液,各进样 $20\text{ }\mu\text{L}$,按上述色谱条件进行测定,供试品色谱图中如检测到 D-肌肽,则峰面积不得大于对照品峰面积(相当于 D-肌肽的限度为 0.5%)。对 3 批 L-肌肽样品(批号:090302, 090304, 090306)进行测定, D-肌肽均未检出。

2.8 拆分机制的探讨

手性配体交换色谱固定相拆分机制是基于固定相手性配体、金属离子与被分离溶质对映体形成一对非对映的配合物,两者的热力学稳定性差异导致了色谱分离。

不同构象的肌肽对映体与手性配体形成不同

构型的配体络合物。反式构象的空间位阻大于顺式构象的空间位阻,因此,顺式构象比反式构象热力学稳定。表现在色谱保留上,即为 D-肌肽保留能力强, L-肌肽先被洗脱, D-肌肽后被洗脱。

本实验中, L-肌肽与手性配体及 Cu^{2+} 形成的络合物呈现出不稳定性,当流动相的流速增加时, L-肌肽色谱峰裂分。当柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, L-肌肽色谱峰严重裂分。与此同时, D-肌肽一直呈现很稳定的峰形。

L-肌肽络合物呈现出不稳定的构象,可能是与其立体结构有关。图 5 为 D-青霉胺手性配体和 D/L-肌肽、 Cu^{2+} 形成的顺式和反式三元络合物的模型。D-肌肽与手性配体 Cu^{2+} 形成的优势构象如图所示,即 $\text{R}(\text{C}(\text{O})\text{NH}_2)$ 基团位于平面上方时,空间位阻小(图 5 D-肌肽)。L-肌肽具有 2 种构象, $\text{R}(\text{C}(\text{O})\text{NH}_2)$ 基团可以位于平面上方或下方时,两侧都有空间位阻(图 5 L-肌肽 A、B 式)。因此, L-肌肽络合物存在这两种构象。它们能从周围环境吸收能量,相互间迅速转化,处于动态平衡,故较难分离,但对于能垒较高者,在环境温度较低时,其转化的速率降低,此时所采用的分离技术对构象异构体具有识别能力,导致 2 者保留时间出现差异,峰裂分。这与典型的构象异构体色谱行为一致^[6-9]。

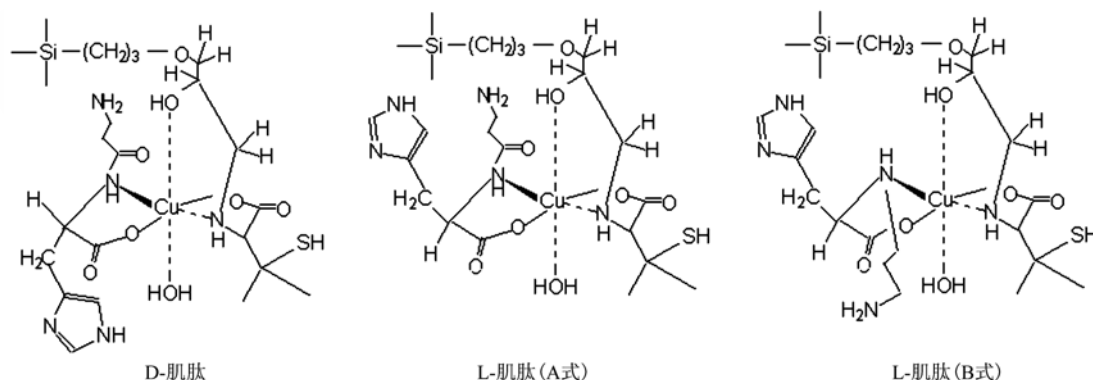


图 5 D/L-肌肽、 Cu^{2+} 和 D-青霉胺三元结合模型

Fig 5 The model of the D/L-Car, Cu^{2+} and D-bellacilline complex

3 结论

在反相体系下,以 D-青霉胺为手性配体键合的 Phenomenex chirex 3126 手性色谱柱上成功分离了 D/L-肌肽。肌肽对映体的色谱行为,在不过载的情况下,不受进样量影响。流速的降低有利于肌肽对映体在色谱柱上的保留。流动相中 Cu^{2+} 浓度的增加,所测 L-肌肽和 D-肌肽峰面积显著增

加,基线噪音变大。在实验所研究的温度范围内, $\ln kD' \sim 1/T$ 、 $\ln kL' \sim 1/T$ 和 $\ln \alpha \sim 1/T$ 均呈良好的线性关系,肌肽对映体的拆分机制不随温度变化。 $\Delta \Delta H^{\circ}$ 为负值, $\Delta \Delta S^{\circ}$ 为正值,2 者对手性识别都有贡献。 $|\Delta \Delta H^{\circ}| > |T \Delta \Delta S^{\circ}|$,故手性拆分过程为焓控过程。L-肌肽在流速增加和 $<35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 柱温下,出峰裂分,其所形成的络合物表现出的不稳定性,

与典型的构象异构色谱行为一致。

REFERENCES

- [1] BOLDYREV A A, JOHNSON P, WEI Y, et al. Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 263(2/3): 169-172.
- [2] RIRIE D G, ROBERTS P R, SHOUSE M N, et al. Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine [J]. *Nutr*, 2000, 16(3): 168-172.
- [3] HIPKISS A, PRESTON J E, HIMSWORTH D T, et al. Toxic effects of beta-amyloid(25-35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 242(2): 105-108.
- [4] DUPIN A M, BEMANANDZARA M, STVOLINSKIĀ S L, et al. Muscle dipeptides-natural inhibitors of lipid peroxidation [J]. *Biokhimiia*, 1987, 52(5): 782-787.
- [5] KAWAHARA M, KONOHA K, NAGATA T, et al. Protective substances against zinc-induced neuronal death after ischemia:

carnosine as a target for drug of vascular type of dementia [J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2007, 2(5): 145-149.

- [6] MELANDER R W, JACOBSON J, HORVATH C. Effect of molecular structure and conformational change of proline-containing dipeptides in reversed-phase chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1982, 234(2): 269-276.
- [7] KALMAN A, THUNECKE F, SCHMIDT R, et al. Isolation and identification of peptide conformers by reversed-phase high-performance liquid chromatography and NMR at low temperature [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 729(1/2): 155-171.
- [8] OWENS P K, SVENSSON L A, VWSSMAN J. Direct separation of captopril diastereoisomers including their rotational isomers by RP-LC using a teicoplanin column [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25(3/4): 453-464.
- [9] GUSTAFSSON S, ERIKSSON B M, NILSSON I. Multiple peak formation in reversed-phase liquid chromatography of ramipril and ramiprilat [J]. *J Chromatogr*, 1990, 506(11): 75-83.

收稿日期: 2012-01-05

分子排阻色谱法测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的高分子聚合物

阮昊¹, 陈丹丹¹, 金银秀², 陈悦^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.台州职业技术学院, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 建立注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中高分子聚合物的测定方法。方法 采用 Sephadex G-10 凝胶色谱柱(15.0 mm×300 mm), 以 pH 7.0 的 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液[0.05 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液-0.05 mol·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 1.2 mL·min⁻¹, 检测波长为 254 nm。结果 头孢哌酮高分子聚合物与头孢哌酮药物单体能较好分离, 头孢哌酮自身对照的线性范围为 5.01~250.71 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$); 在 10.13~30.24 mg·mL⁻¹ 内, 供试品溶液浓度与聚合物峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9$); 定量限为 0.14 μg; 方法精密度良好(RSD=0.50%, $n=5$); 样品测定重复性与重现性好(RSD=0.82%, $n=5$; RSD=3.4%, $n=3$)。结论 所建方法操作简便、结果可靠, 可用于注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中高分子聚合物的检测。

关键词: 头孢哌酮钠舒巴坦钠; 高分子聚合物; 分子排阻色谱法

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0079-05

Determination of High Molecular Polymers in Cefoperazone Sodium and Sulbactam Sodium for Injection by Molecular Exclusion Chromatography

RUAN Hao¹, CHEN Dandan¹, JIN Yinxiu², CHEN Yue^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2.Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of high molecular polymers in cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection. **METHODS** Chromatographic analysis was performed on Sephadex G-10 column(15.0 mm×300 mm), 0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) as the mobile phase A, and super pure water as the mobile phase B. The flow rate was 1.2 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** High molecular polymers in cefoperazone was separated completely from cefoperazone. The linear range of cefoperazone was 5.01–250.71 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The linear range of the substances examined was 10.13–30.24 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The limit of quantification was 0.14 μg. The RSD for replicate injections of reference solution was 0.50%($n=5$), the repetitiveness and the reproducibility were fine, the RSDs were 0.82%($n=5$) and 3.4%($n=3$), respectively. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and reliable. It is applicable for the

作者简介: 阮昊, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86459427
(0571)86459427 E-mail: 13868057010@163.com

E-mail: clare_ruan@163.com

*通信作者: 陈悦, 男, 主任药师

Tel: