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. Camosine and taurine protect rat cerehellar 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 camosine [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-alamine [J]. Neurosci Lett, 1998, 242(2): 105-108.

[4] DUPIN A M, BEMANANDZARA M, STVOLINSKIĬ 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 temperaturee [J]. J Chromatogr A, 1996, 729(1/2): 155-171.

[8] OWENS P K, SVENSSON L A, VWSSMAN J. Direct seperation 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 Hao[1], CHEN Dandan[1], JIN Yinxiu[2], 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　E-mail: clare_ruan@163.com　***通信作者：**陈悦，男，主任药师　Tel: (0571)86459427　E-mail: 13868057010@163.com

quality control of cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection.

KEY WORDS: cefoperazone sodium and sulbactam sodium; high molecular polymers; molecular exclusion chromatography

注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠为头孢哌酮钠与舒巴坦钠的无菌注射用复合制剂。舒巴坦为广谱酶抑制剂，同时具有较弱的抗菌活性，对金黄色葡萄球菌及多数革兰氏阴性杆菌产生的β-内酰胺酶具有强大的不可逆抑制作用，但对某些革兰氏阴性杆菌染色体介导的 β-内酰胺酶无活性。头孢哌酮是第 3 代头孢菌素，对 β-内酰胺酶的稳定性较差。二者联合，不但对革兰氏阴性杆菌显示出明显的协同抗菌活性，而且联合后的抗菌作用是单独头孢哌酮的 4 倍。本品适用于对头孢哌酮耐药但对本品敏感的大肠埃希氏菌、柠檬酸杆菌属、克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、变形杆菌属等所致的感染[1]。

注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠在临床上所致的不良反应中，发生率高且最严重的为过敏性休克[2]。多年来的研究证明，在 β-内酰胺类抗菌药物所致的速发型过敏反应中，药物分子本身只是半抗原，药物中存在的高分子聚合物才是引发速发型过敏反应[3]的主要原因。因此严格控制抗菌药物中高分子聚合物的含量在临床安全性上有着重要的意义。中国药典采用 Sephadex G-10 凝胶色谱自身对照法检测高分子聚合物的含量，2010 年版采用的色谱柱内径为 1.0~1.4 cm，柱长为 30~40 cm，与旧版药典相比，柱床体积变小，减少了分析时长，而且样品测定时不用加大流速，在恒定流速下 1 h 内能完成样品分析。药典通过在样品中加入一定量的蓝色葡聚糖 2000，制成含一定浓度蓝色葡聚糖 2000 的样品混合溶液来进行分离度试验考察，并要求高分子聚合物与药物单体间的分离度达到要求，以保证分析结果的准确可靠[4]Appendix 37。在水中，头孢哌酮钠由于分子间的氢键、静电相互作用、疏水相互作用等可以形成缔合物[5]，与高分子聚合物具有相似的色谱行为，因此可以采用药物自身为对照品，按外标法计算注射用制剂中高分子聚合物相对于药品本身的百分含量。

1 仪器与试药

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安，配备可变波长紫外检测器)；色谱柱为 Sephadex G-10 填充柱(15.0 mm×300 mm，大连依利特分析仪器有限公司)。头孢哌酮对照品(中国食品药品检定研究院，批号：130420-200304，标示含量：96.5%)；注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠[大连辉瑞制药有限公司，规格：1.0 g(1∶1)，批号：1139120]；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、蓝色葡聚糖 2000 均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件

用 Sephadex G-10 预填装凝胶色谱柱，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。量取 0.2 mg·mL^{-1} 蓝色葡聚糖 2000 溶液 100 μL，注入液相色谱仪，分别以流动相 A、B 进行测定，理论板数按蓝色葡聚糖 2000 峰计算，在流动相 A 与 B 中理论板数及拖尾因子均符合要求(理论板数分别为 934，891，均>700；拖尾因子分别为 1.03，1.07，均<2.0)，结果见图 1 和图 2。

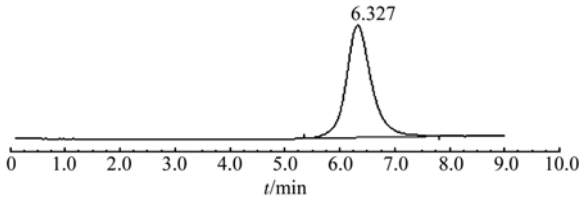

图 1 蓝色葡聚糖 2000 在流动相 A 中的色谱图

Fig 1 Chromatogram of dextran blue 2000 in mobile phase A

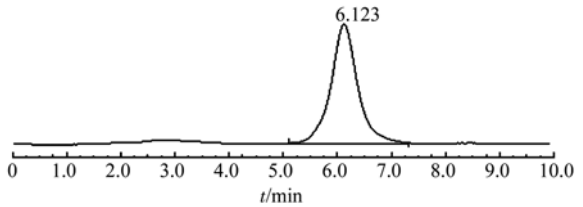

图 2 蓝色葡聚糖 2000 在流动相 B 中的色谱图

Fig 2 Chromatogram of dextran blue 2000 in mobile phase B

2.2 分离度试验

根据中国药典[4]二部附录ⅤH 分子排阻色谱法规定，检查高分子聚合物时，某些药物分子单体与其聚合体不能达到基线分离时，其分离度计算公式为 R=高聚体的峰高/单体与高聚体之间的谷高。由于高分子聚合物的对照品不易获得，而样品中的高聚物又极少，故在配制分离度溶液时，适当加入蓝色葡聚糖 2000，使聚合物峰增大，一

般蓝色葡聚糖 2000 的加入量是使聚合物峰面积达到规定限度的 1~2 倍。

称取本品适量(相当于头孢哌酮约 0.1 g)，置 10 mL 量瓶中，用 0.2 mg·mL^{-1} 的蓝色葡聚糖溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，进样 100 μL，用流动相 A 进行测定，对记录的色谱图进行分析，结果分离度为 2，结果见图 3。

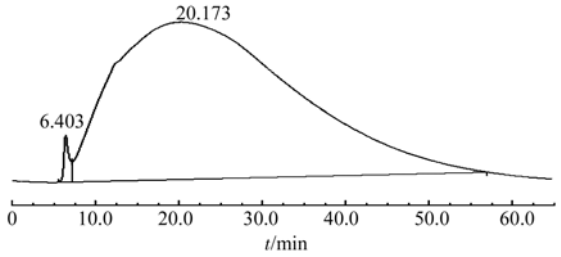

图 3 分离度试验色谱图

Fig 3 Chromatogram of resolution test

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液 取头孢哌酮钠对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含头孢哌酮 25 μg 的溶液，以流动相 B 进样测定，见图 4。

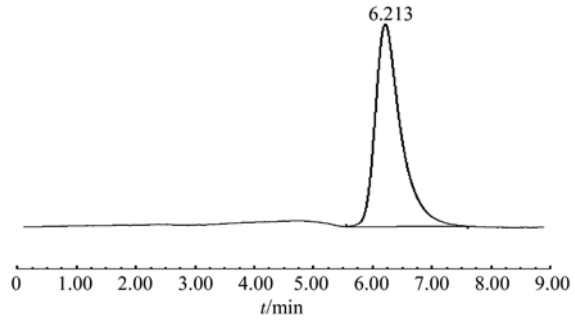

图 4 头孢哌酮钠对照品在流动相 B 中的色谱图

Fig 4 Chromatogram of reference standard of cefoperazone sodium in mobile phase B

2.3.2 供试品溶液 取本品适量(相当于头孢哌酮约 0.1 g)，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加水适量振摇使溶解后，用水稀释至刻度，摇匀，以流动相 A 立即进样测定，见图 5。在流动相 A 中测得的高聚物峰面积除以在流动相 B 中测得的头孢哌酮钠对照溶液峰面积，再乘以对照品浓度，即得供试品溶液中高分子聚合物的浓度。

2.4 专属性试验

由图 1 可知蓝色葡聚糖 2000 溶液试验的流出时间，其 Kav=0。在上述规定的色谱条件下，在 Kav=0 时，样品中有一峰流出(t_R 为 6.5 min)，至 8 min 后药物单体开始流出(图 5)，且分离度符合

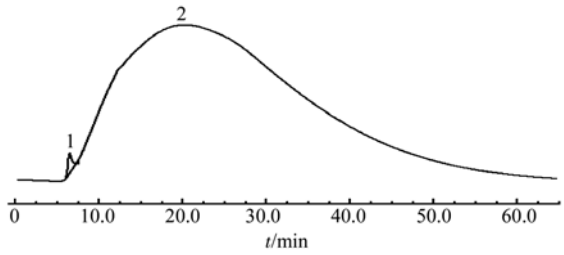

图 5 供试品聚合物检查的色谱图(流动相 A)

1–高分子聚合物；2–头孢哌酮钠(或和舒巴坦钠)药物单体

Fig 5 Chromatogram of high molecular polymers in cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection in mobile phase A

1–high molecular polymers; 2–cefoperazone sodium or / and sulbactam sodium

要求。故确认 t_R 为 6.5 min 时的峰即为聚合物峰。取头孢哌酮钠原料药和舒巴坦钠原料药各约 0.1 g，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度。以流动相 A 为流动相，各取 100 μL 注入液相色谱仪，结果见图 6。可知注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中聚合物主要由头孢哌酮钠产生，舒巴坦钠无干扰，故计算聚合物含量时以复方制剂中含头孢哌酮钠量计算。

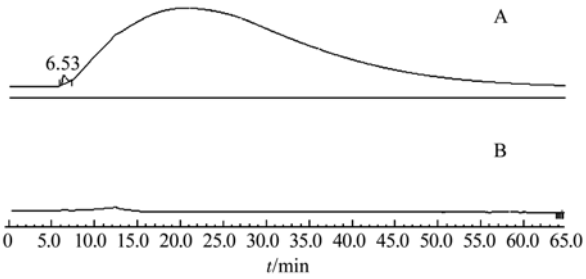

图 6 头孢哌酮钠(A)和舒巴坦钠(B)在流动相 A 中的色谱图

Fig 6 Chromatogram of cefoperazone sodium (A) and sulbactam sodium (B) in mobile phase A

2.5 对照溶液的线性关系

精密称取头孢哌酮对照品 12.99 mg，置 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。用水逐步定量稀释制成头孢哌酮浓度为 5.01，12.54，25.07，50.14，125.35 和 250.71 μg·mL^{-1} 的溶液，分别按“2.1”项下色谱条件以流动相 B 进行测定。以对照品浓度 C(μg·mL^{-1})为横坐标，峰面积 A 为纵坐标，进行线性回归，得回归方程 A=1.778 2C+3.378 8，r=0.999 9，表明在 5.01~250.71 μg·mL^{-1} 内(进样 100 μL)，对照溶液浓度与测得的峰面积呈良好的线性关系。

2.6 定量限与检测限

精密量取“2.5”项下 5.014 μg·mL^{-1} 的溶液

3 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，按“2.1”项下色谱条件以流动相 B 进行测定，进样 100 μL，记录色谱图，并对色谱系统基线噪音进行检测，结果测得本法的检测限为 0.043 μg(S/N=3)，定量限为 0.14 μg(S/N=10)。

2.7 精密度试验

精密称取头孢哌酮对照品 26.99 mg，置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，再精密稀释 10 倍后，精密量取 100 μL 注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件，以流动相 B 为流动相进行测定。连续进样 5 次，记录色谱图，结果峰面积的 RSD 为 0.50%，<5.0%，表明精密度良好。

2.8 重复性试验

取大连辉瑞制药有限公司 1139120 批次注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(1∶1)样品，精密称取 5 份，各约 0.2 g，分别置 10 mL 量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液；另取精密度试验溶液作为对照溶液。按“2.1”项下色谱条件测定，分别精密量取 100 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。样品所含头孢哌酮聚合物以头孢哌酮计，分别为 0.237%，0.241%，0.241%，0.238%，0.240%，RSD=0.82%(n=5)，表明本法重复性良好。

2.9 重现性试验

取大连辉瑞 1139120 批次样品，在不同试验日按“2.8”项下方法共测定 3 次，结果分别为 0.228%，0.239%，0.244%，RSD=3.4%(n=3)，表明本法重现性良好。

2.10 样品取样量对聚合物测定结果的相关性考察

取大连辉瑞 1139120 批样品，分别取样 450，300，150 mg，置 3 只 15 mL 量瓶中，按“2.1”项下色谱条件以流动相 A 进行测定。以供试品浓度 C(mg·mL^{-1})为横坐标，高分子聚合物峰面积 A 为纵坐标，进行线性回归，回归方程 A=2.1921C+0.364，r=0.999 9，表明供试品溶液浓度在 10.13~30.24 mg·mL^{-1} 内(进样 100 μL)与测得的高分子聚合物峰面积呈良好的线性关系。

2.11 样品的聚合物测定

按“2.3.1”和“2.3.2”项下方法及“2.1”项下色谱条件，取国内 54 个生产厂家各 1 批样品进行聚合物测定，其中 1∶1 配比有 46 批，2∶1 配比有 8 批，见表 1。

表 1 样品中高分子聚合物测定结果

Tab 1 Results of high molecular polymers in cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection

生产厂家	规格	批号	聚合物含量/%
1	1.0 g(1∶1)	12110023	0.27
2	1.0 g(1∶1)	158101209	0.24
3	1.0 g(1∶1)	100801	0.20
4	1.0 g(1∶1)	101202	0.34
5	2.0 g(1∶1)	1101003	0.32
6	2.0 g(1∶1)	1101281	0.23
7	1.0 g(1∶1)	0060327BO	0.49
8	1.0 g(1∶1)	12101104	0.19
9	1.0 g(1∶1)	100610025	0.25
10	1.5 g(2∶1)	F20110203	0.34
11	1.0 g(1∶1)	101009	0.31
12	1.0 g(1∶1)	100902	0.23
13	3.0 g(1∶1)	100701	0.21
14	1.5 g(1∶1)	2010053301	0.25
15	2.0 g(1∶1)	11022024	0.27
16	1.0 g(1∶1)	110101	0.37
17	1.0 g(1∶1)	B100100417	0.29
18	1.0 g (1∶1)	10093002	0.38
19	1.0 g(1∶1)	411003	0.19
20	1.5 g(2∶1)	CJ6110401	0.19
21	1.0 g(1∶1)	20100402	0.28
22	1.0 g(1∶1)	101201	0.26
23	3.0 g(1∶1)	101209	0.24
24	1.0 g(1∶1)	1010032	0.32
25	1.0 g(1∶1)	20110301	0.31
26	1.0 g(1∶1)	C011007121	0.18
27	1.5 g(2∶1)	201101006	0.18
28	1.5 g(2∶1)	10022601	0.26
29	1.0 g(1∶1)	110204-1	0.32
30	0.75 g(2∶1)	1006011	0.45
31	1.5 g(2∶1)	20110302	0.22
32	1.0 g(1∶1)	110101	0.23
33	1.0 g(1∶1)	812101104	0.24
34	1.0 g(1∶1)	110102	0.34
35	1.5 g(2∶1)	110107	0.37
36	1.0 g(1∶1)	1011006	0.42
37	1.0 g(1∶1)	LE110403	0.32
38	1.5 g(2∶1)	1101061	0.34
39	1.0 g(1∶1)	101212	0.27
40	2.0 g(1∶1)	110501	0.39
41	2.0 g(1∶1)	20110201	0.33
42	1.0 g(1∶1)	110301	0.34
43	1.0 g(1∶1)	E1104033	0.24
44	1.0 g(1∶1)	110123012	0.21
45	1.0 g(1∶1)	1101183	0.27
46	1.0 g(1∶1)	1101115	0.36
47	2.0 g(1∶1)	11011504	0.25
48	1.0 g(1∶1)	10121621	0.20
49	1.0 g(1∶1)	110504	0.31
50	2.0 g(1∶1)	20100707	0.28
51	1.0 g(1∶1)	110502	0.27
52	2.0 g(1∶1)	110401	0.22
53	2.0 g(1∶1)	20110604	0.19
54	1.0 g(1∶1)	1139120	0.24

http://www.chinajmap.com

3 讨论

3.1 色谱条件优化

采用 15.0 mm×400 mm 和 15.0 mm×300 mm 的 Sephadex G-10 凝胶色谱柱分离，结果在 2 种长度的色谱柱上都能获得良好分离，但因 400 mm 长度柱分析时间长，流速高时柱压高、易冲塌柱内空间结构，故选择 300 mm 短柱。流动相的种类和浓度可以改变溶质的色谱行为和分离效果[6]，故分别采用 pH 7.0 的 0.1，0.05，0.025 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液为流动相 A(流速为 1.2 mL·min^{-1} 和 1.0 mL·min^{-1})，结果发现采用 pH 7.0 的 0.05 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液作为流动相 A(流速为 1.2 mL·min^{-1})可在较短分析时间内获得良好分离。

3.2 结果统计分析

3.2.1 直观分析　将“2.11”项下测得的 54 个数值分布作成散点图，见图 7。可见 2 种配比产品的数值分布无明显差异。其中，测定值最高的为厂家 7 的 0.49%，最低的为厂家 26 和厂家 27 的 0.18%，均明显低于中国药典 2010 年版中注射用头孢哌酮钠标准的限度 0.8%[4]203，但有 3 个厂家的测定值高于头孢哌酮钠原料药质控限度 0.4%[4]202，分别为 0.42%，0.45%和 0.49%。

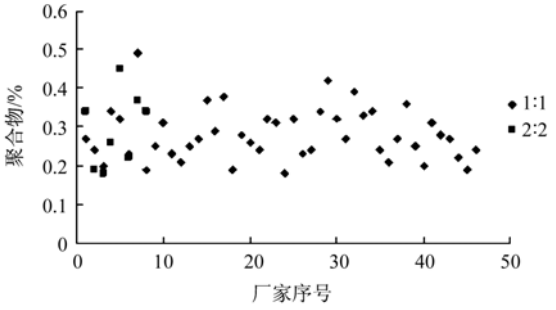

图 7　54 批次样品聚合物测定结果的散点分布图

Fig 7　Scatter diagram of the content of high molecular polymers of the 54 batches of samples

将其数值分布作成直方图，见图 8。可基本判断本品 2 个配比共 54 批次样品的测定结果基本呈正态分布，均值为 0.28%。

3.2.2 相关性分析　为临床应用安全计，有必要着重关注聚合物测定结果和其他因素的相关性。通过将 54 批次样品的水分、规格、复方配比、杂质 A、杂质 C、杂质总量检查结果和聚合物测定结果进行多因素相关分析，此 54 批数据仅表明聚合物与水分、规格、配比及杂质总量均无显著性相关，仅与杂质 C 的量在 0.05 水平上存在相关性，表明样品中聚合物的产生可能与杂质 C 的产生有关联性，但水分、规格及配比的组成并不会影响本品中聚合物量。

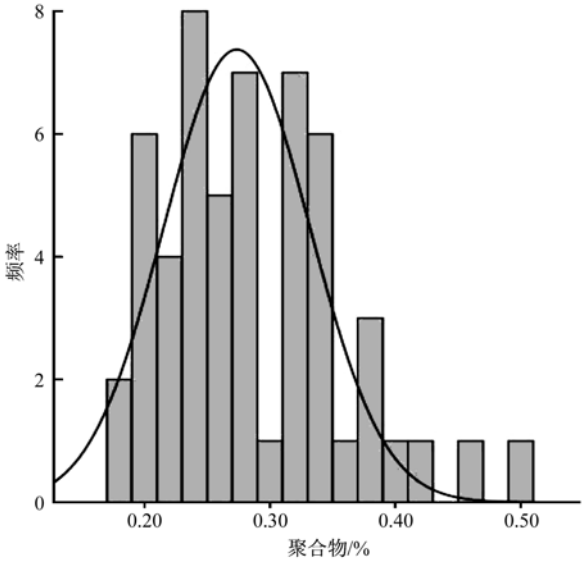

图 8　54 批次样品聚合物测得值的直方图

Fig 8　Histogram of high molecular polymers content in 54 batches samples

4 结论

本实验建立的注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠高分子聚合物检测方法快速、准确、重现性好，对于保证药品质量和用药安全均具有重要意义。

REFERENCES

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Drug Information for the Health Care Professional(临床用药须知) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 691.

[2] ZHOU Q. Literature analysis of adverse drug reactions caused by cefoperazone sodium/sulbactam sodium for injection [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(22): 2093-2095.

[3] JIN S H, HU C Q. Research progress of β-lactams on allergic reactions [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 1994, 3(4): 38-41.

[4] Ch.P(2010)Vol Ⅱ(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 202, 203, Appendix 37.

[5] HU C, JIN S, WANG K. The chromatographic behaviour of cephalosporins in gel filtration chromatography, a novel method to separate high molecular weight impurities [J]. J Pharm Biomed Anal, 1994, 12(4): 533-541.

[6] CAI S Y, HU C Q, FENG F. Chromatographic behavior of β-lactam antibiotics in superdex peptid gel filtration chromatography [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2002, 27(3): 157-161, 192.

收稿日期：2012-03-01