

高效分子排阻色谱法测定头孢克肟颗粒中聚合物的含量

黄艳, 黄燕婷, 周向荣*, 钟佳胜, 陈振阳, 曾环想[国药集团致君(深圳)制药有限公司, 广东 深圳 518110]

摘要: 目的 建立高效分子排阻色谱法(HPSEC)测定头孢克肟颗粒中高分子聚合物的方法。方法 采用 HPLC, 色谱柱为 TSKgel G2000 SW_{XL}(7.8 mm×300 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液-乙腈(95:5)为流动相, 流速为 0.6 mL·min⁻¹, 柱温为 20 ℃, 检测波长为 254 nm, 进样体积为 20 μL。结果 高分子聚合物峰与头孢克肟峰能有效分离, 辅料无干扰, 头孢克肟主峰的线性范围为 0.153~20.635 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), 检测限为 0.05 μg·mL⁻¹, 定量限为 0.15 μg·mL⁻¹; 方法中样品测定的重复性(RSD=0.5%)与精密度(RSD=1.4%)良好; 供试品溶液和对照品溶液, 25 ℃条件下 24 h 保持稳定。微调方法中的流速、柱温和流动相比比例, 对检测结果无影响。结论 此方法简便, 耐用性好, 灵敏度高, 重复性好, 可用于头孢克肟颗粒中高分子聚合物的含量检测。

关键词: 头孢克肟颗粒; 聚合物; 高效分子排阻色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)03-0326-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.013

引用本文: 黄艳, 黄燕婷, 周向荣, 等. 高效分子排阻色谱法测定头孢克肟颗粒中聚合物的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 326-329.

Determination of the Polymers in Cefixime Granules by HPSEC

HUANG Yan, HUANG Yanting, ZHOU Xiangrong*, ZHONG Jiasheng, CHEN Zhenyang, ZENG Huanxiang (Sinopharm Zhijun Shenzhen Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high performance size exclusion chromatography(HPSEC) method for the determination of the polymers in cefixime granules. **METHODS** HPLC was used by using TSKgel G2000 SW_{XL}(7.8 mm×300 mm, 5 μm). The mobile phase was phosphate buffer-acetonitrile(95:5). The flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, the column temperature was 20 ℃, the detection wavelength was 254 nm, the injection volume was 20 μL. **RESULTS** The polymers could be separated from cefixime well. The accessories made no interference. The linear of cefixime was within 0.153~20.635 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The limit of detection was 0.05 μg·mL⁻¹, and the limit of quantification was 0.15 μg·mL⁻¹. The repeatability(RSD=0.5%) and intermediate precision(RSD=1.4%) were fine. The sample solution and reference solution were stable at 25 ℃ within 24 h. The robustness was well, when the flow rate, column temperature and mobile phase ratio were adjusted slightly, the result would not be affected. **CONCLUSION** This method is simple, robust, sensitive and repeatable. It can be used for quality control of the polymers in cefixime granules.

KEYWORDS: cefixime granules; polymers; high performance size exclusion chromatography(HPSEC)

头孢克肟为首个第三代口服头孢菌素, 对部分革兰氏阳性菌及阴性菌均具有活性, 为广谱抗菌药物。临床上适用于革兰氏阳性菌中的链球菌(肠球菌除外)、肺炎球菌, 革兰氏阴性菌中的淋球菌、布兰汉氏菌、大肠杆菌、克雷伯氏菌、沙雷氏菌、变形杆菌属、流感杆菌等引起的细菌感染性疾病^[1]。头孢克肟对各种细菌产生的β-内酰胺酶具有极强的稳定性, 对产生β-内酰胺酶细菌显示优越的抗菌力。其作用机制为阻止细菌细胞壁的合成, 作用点因菌种而异, 与青霉素结合蛋白中的1(1a, 1b, 1c)以及3有较高亲和性^[2]。

头孢克肟于1987年由日本藤泽药品工业株式会社首先研发成功, 上市产品剂型包括胶囊剂(Cefspan® Capsules 50 mg 和 100 mg)和细粒剂(Cefspan® Fine Granules 50mg)。其中细粒剂于1987年6月在日本首次获批上市。

大量研究表明, 头孢类抗菌药物所产生的速发型过敏反应与药物的聚合物含量有关, 而非药物本身^[3]。头孢克肟颗粒临床使用方式为冲服, 且用药人群中包括儿童, 所以关注其过敏反应相关的安全性风险非常重要。目前中国药典、欧洲药典、美国药典等均有收载头孢克肟及其相关剂型

作者简介: 黄艳, 女, 硕士, 正高级工程师 Tel: (0755)82055948
工程师 Tel: (0755)82433388 E-mail: zhouxiangrong@szzhijun.com

E-mail: huangyan@szzhijun.com *通信作者: 周向荣, 女, 硕士,

的质量标准,但其中皆未建立聚合物的检查方法,也未见相关文献报道。本研究参考相关产品的聚合物研究方法^[4-7],采用高效分子排阻色谱法,建立头孢克肟颗粒中聚合物的检查分析方法,进一步完善该品种的质量控制。

1 仪器与材料

1260 型高效液相色谱仪(配有紫外检测器,美国 Agilent 公司); AL204 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

头孢克肟对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130503-201706;含量:89.2%);头孢克肟颗粒[国药集团致君(深圳)制药有限公司,批号:180301,180302,180303,180501,180502,180503];头孢克肟原料药(浙江普洛得邦制药有限公司,批号:PL0301,PL0302,PL0303,PL0501,PL0502,PL0503);甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯,各种溶液配制用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 采用 TSKgel G2000 SW_{XL} (7.8 mm×300 mm, 5 μm)为色谱柱;以磷酸盐缓冲液(取 0.25 g 无水磷酸氢二钠和 0.51 g 二水合磷酸二氢钠,加水 1 000 mL 溶解,摇匀)-乙腈(95:5)为流动相;流速为 0.6 mL·min⁻¹;柱温为 20 ℃;检测波长为 254 nm;进样体积为 20 μL。

2.1.2 系统适用性试验 精密称取头孢克肟对照品适量(约相当于头孢克肟,按 C₁₆H₁₅N₅O₇S₂ 计 25 mg),置 50 mL 量瓶中。加 2 mL 甲醇溶解,并用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,作为系统适用性溶液。精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,头孢克肟主峰与其前相邻聚合物峰间的分离度应≥1.5。另取系统适用性溶液 1 mL,用磷酸盐缓冲液定量稀释制成每 1 mL 中约含 5 μg 的溶液,作为对照品溶液,精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,连续进样 5 次,记录色谱图,主峰峰面积的 RSD≤2.0%。实验结果显示 5 针对照品溶液头孢克肟峰面积分别为 5 718 287, 5 716 662, 5 704 389, 5 700 959, 5 700 837, RSD 为 0.2%,符合系统适用性要求。

2.1.3 供试品溶液的制备 将头孢克肟颗粒内容物倾出,研细,精密称取细粉适量(约相当于头孢克肟,按 C₁₆H₁₅N₅O₇S₂ 计 50 mg),置 100 mL 量瓶中。加 5 mL 甲醇溶解,并用磷酸盐缓冲液稀释至

刻度,滤过,取续滤液。

2.1.4 样品测定及计算方法 精密量取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。将头孢克肟峰前的杂质峰计为聚合物峰,按外标法计算其百分含量。聚合物含量(%)=对照品溶液校正因子×(聚合物峰面积/头孢克肟浓度)×100%。

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性试验

2.2.1.1 溶剂及辅料的干扰试验 取供试品溶液、空白辅料溶液和稀释剂(磷酸盐缓冲液),分别按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,见图 1。结果表明,聚合物峰与头孢克肟主峰能有效分离,稀释剂与辅料对头孢克肟颗粒的聚合物测定无干扰影响。

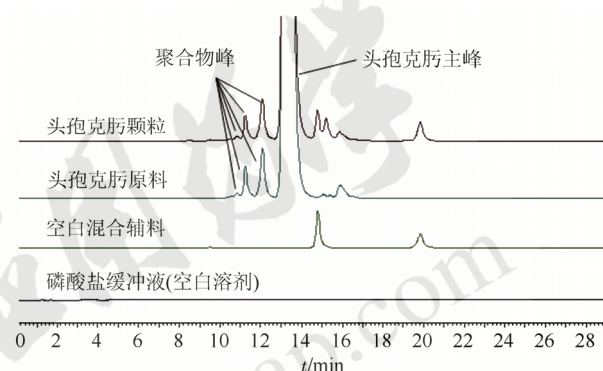


图 1 专属性高效液相色谱图

Fig. 1 Specificity HPLC chromatograms

2.2.1.2 强制降解试验 取头孢克肟颗粒样品(批号:180502)进行酸、碱、热和氧化等强降解试验,结果表明头孢克肟聚合物对碱、热、氧化、强光和高湿等条件比较敏感。

①供试品溶液强制降解试验

酸破坏试验:取本品溶液,加 5 mol·L⁻¹的盐酸溶液 1 mL 室温放置 15 min,用 5 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液中和后进行聚合物检测。结果显示,头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分离度为 1.7,聚合物含量为 0.7%。

碱破坏试验:取本品溶液,加 5 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 0.5 mL 室温放置 10 min,用 5 mol·L⁻¹盐酸液中和后进行聚合物检测。结果显示,头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分离度为 2.0,聚合物含量为 2.7%。

热破坏试验:取本品溶液,置 90 ℃水浴中加热 2 h,取出冷却后进行聚合物检测。结果显示,头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分离度为 3.1,聚

合物含量为1.2%。

氧化破坏试验：取本品溶液，加30%过氧化氢溶液2 mL室温放置4 h，进行聚合物测定。结果显示，头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分度为2.8，聚合物含量为1.5%。

强光照射破坏：取本品溶液，置照度(4 500±500)lx的条件下放置24 h后进行聚合物测定。结果显示，头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分度为3.2，聚合物含量为1.2%。

②供试品固体强制降解试验

高温破坏试验：取本品置表面皿中，摊成≤5 mm厚的薄层，在60℃条件下放置10 d进行聚合物检测。结果显示，头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分度为3.2，聚合物含量为1.7%。

高湿破坏试验：取本品置表面皿中，摊成≤5 mm厚的薄层，在92.5%相对湿度条件下放置10 d进行聚合物检测。结果显示，头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分度为3.2，聚合物含量为3.5%。

强光照射破坏试验：取本品置表面皿中，摊成≤5 mm厚的薄层，在照度(4 500±500)lx的条件下放置10 d进行聚合物检测。结果显示，头孢克肟主峰与相邻聚合物峰的分度为3.1，聚合物含量为1.2%。

2.2.2 线性关系 精密称取头孢克肟对照品适量，加少量甲醇溶解后，用磷酸盐缓冲液溶解并稀释制成每1 mL中约含头孢克肟分别为0.15, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg的系列溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定。以头孢克肟的峰面积(y)为纵坐标，对照品溶液浓度(x, μg·mL⁻¹)为横坐标，进行线性回归，得线性方程为 $y=138\ 013x-82$ ，相关系数 $r=0.999\ 9$ 。结果表明，本方法线性关系良好。

2.2.3 检测限、定量限 精密称取头孢克肟对照品适量，加少量甲醇溶解后，用磷酸盐缓冲液逐级稀释，采用信噪比法，以信噪比≥3:1相应的浓度确定为检测限浓度；以信噪比≥10:1相应的浓度确定为定量限浓度。结果测得检测限为0.05 μg·mL⁻¹，定量限为0.15 μg·mL⁻¹。

2.2.4 重复性试验 取头孢克肟颗粒样品(批号:180502)，按“2.1.3”项下方法配制6份供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进行聚合物含量测定。聚合物含量分别为0.96%，0.97%，0.97%，0.96%，0.96%，0.97%，RSD为0.5%(n=6)。结果表明本方法的重复性良好。

2.2.5 精密度试验 由不同的试验人员，使用不同液相色谱仪，于不同日期，按“2.1.3”项下方法配制6份供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进行聚合物含量测定。聚合物含量分别为0.96%，0.97%，0.96%，1.00%，0.99%，0.97%。

“2.2.4”与“2.2.5”中，12份样品的聚合物含量RSD(n=12)为1.4%。结果表明本方法的精密度良好。

2.2.6 溶液稳定性试验 按“2.1”项下方法分别配制供试品溶液和对照品溶液，在25℃下放置24 h。分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 h进样，考察供试品溶液中聚合物峰面积和对照品溶液中主峰面积的变化情况。结果表明，供试品溶液聚合物峰面积基本无变化，即供试品溶液该条件下保持稳定；对照品溶液主峰面积基本无变化，即对照品溶液该条件下保持稳定。

2.2.7 耐用性试验 分别对样品研磨时间和色谱条件中流速、柱温、流动相比比例进行微小调整，考察本方法的耐用性。结果表明，上述样品研磨时间及色谱条件的微小调整，不影响系统适用性和聚合物检测结果，本方法的耐用性良好。

2.2.7.1 样品研磨时间耐用性 分别对头孢克肟颗粒不研磨、研磨1 min、研磨3 min、研磨5 min、研磨10 min的样品进行聚合物含量测定，考察样品研磨时间耐用性。样品聚合物检测结果分别为0.87%，0.84%，0.81%，0.85%，0.84%，结果表明研磨10 min内对聚合物结果无影响。

2.2.7.2 色谱条件耐用性 流速考察：分别采用0.5, 0.6, 0.7 mL·min⁻¹的流速，对头孢克肟颗粒样品进行聚合物含量测定，考察流速的耐用性。系统适用性中主峰与聚合物间的分离度分别为3.0, 2.9, 2.8；对照品溶液连续进样峰面积的RSD分别为0.5%，0.1%，0.4%；样品聚合物检测结果分别为0.94%，0.97%，0.96%，RSD为1.6%(n=3)。

柱温考察：分别采用18, 20, 22℃的柱温，对头孢克肟颗粒样品进行聚合物含量测定，考察柱温的耐用性。系统适用性中主峰与聚合物间的分离度分别为3.2, 2.9, 3.1；对照品溶液连续进样峰面积的RSD分别为1.0%，0.1%，0.8%；样品聚合物检测结果分别为0.92%，0.97%，0.94%，RSD为2.7%(n=3)。

流动相比比例考察：分别采用94:6、95:5、96:4的磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相，对头孢克肟颗粒样品进行聚合物含量测定，考察流动相比

例的耐用性。系统适用性中主峰与聚合物间的分离度分别为 3.3, 2.9, 2.9; 对照品溶液连续进样峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.1%, 0.1%; 样品聚合物检测结果分别为 0.99%, 0.97%, 0.97%, RSD 为 1.2%($n=3$)。

2.3 测定结果

按“2.1”项下方法对 6 批头孢克肟原料药样品和 6 批头孢克肟颗粒样品进行了聚合物含量测定。头孢克肟原料聚合物含量测定结果分别为 0.33%, 0.89%, 0.43%, 0.79%, 0.92%, 0.42%。头孢克肟颗粒聚合物含量测定结果分别为 0.45%, 0.88%, 0.47%, 0.90%, 0.97%, 0.45%。

3 讨论

头孢克肟的聚合物来源可分为外源性和内源性^[8]。外源性聚合物源于发酵工艺, 头孢克肟由半合成获得, 起始原料通常为 7-AVNA, 通过有机合成反应, 并经侧链修饰而得^[9]。7-AVNA 一般通过发酵产生, 发酵过程引入的蛋白、多肽、多糖及其与头孢克肟结合形成的杂质, 均为高分子聚合物。内源性聚合物系指头孢克肟自身或其杂质聚合而产生的杂质。内源性聚合物在原料合成、贮藏过程中均有可能形成。头孢克肟颗粒的聚合物主要来源于头孢克肟原料药, 在贮存和使用过程中如受较高温度的影响也有可能产生聚合物。

本研究建立了头孢克肟颗粒的聚合物含量测定方法, 采用高效分子排阻色谱法, 使用 TSKgel G2000 SW_{XL}(7.8 mm×300 mm, 5 μm)为色谱柱, 能够有效地分离和测定聚合物含量。聚合物是主峰以不同聚合方式形成, 在结构上与主峰相似, 因此以主峰替代聚合物进行方法学验证。由于头孢克肟聚合物对碱、热和氧化均不稳定, 样品应

在 25 ℃条件下保存, 并在 24 h 内完成检测, 以保证试验结果的准确性。

本研究所建立方法适用于头孢克肟颗粒的聚合物含量测定, 操作简便, 耐用性好, 灵敏度高, 重复性好。另外, 对头孢类相关药物的质量控制也有借鉴和参考价值。

REFERENCES

- [1] DENG M, CHEN N Z, LI H, et al. Studies on impurities in domestic oral solid preparation of cefexime [J]. Chin J Antibio(中国抗菌药物杂志), 2016, 41(7): 541-546.
- [2] SU S T, MAO D D, XU S W, et al. Research progress in penicillin binding proteins and their mediated bacterial resistance [J]. Microbiol China(微生物学通报), 2017, 44(4): 902-910.
- [3] 马晓彬, 许立君. 高效分子排阻法对几种头孢类抗菌药物聚合物的研究探讨[J]. 中国医药指南, 2017, 15(12): 49-50.
- [4] PENG J, ZHENG C Q, CHEN D N, et al. Determination of small-molecule related substances and polymer in cefuroxime axetil and its preparation by HPLC [J]. Chin J Antibio(中国抗菌药物杂志), 2018, 43(2): 96-100.
- [5] WANG J, WANG D D, HONG L Y. HPLC simultaneous determination of related substances and polymers in cefetamet pivoxil hydrochloride [J]. Chin J Pharmaceut Anal(药物分析杂志), 2015, 35(2): 259-300.
- [6] CAO J, KAN J Y, XU W, et al. Determination of the Polymer in Cefaclor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1466-1470.
- [7] ZHANG D M, LING X, ZHAO H Y, et al. Study on the high molecular impurity for the injection of mezlocillin sodium [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(9): 1170-1173.
- [8] 崔广青, 王浩江, 齐鼎铭, 等. 注射用哌拉西林钠舒巴坦钠中高分子聚合物加速实验考察[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(1): 68-69.
- [9] DENG G F. Discussion of key starting materials quality control in cephalosporin antibiotics [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 251-255.

收稿日期: 2019-02-13

(本文责编: 沈倩)