

## 葡聚糖凝胶色谱法分析注射用阿洛西林钠中的高聚物

张福成<sup>1</sup>, 安静<sup>2</sup>, 卢彦芳<sup>2</sup>, 孙婷<sup>2</sup>, 蒋晔<sup>2\*</sup> (1.空军总医院药学部, 北京 100036; 2.河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

**摘要:** 目的 建立一个简单分析阿洛西林钠中高聚物的方法。方法 采用 Sephadex<sup>TM</sup> G-10 色谱柱, 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(氢氧化钠调 pH 6.8)为流动相 A, 水为流动相 B, 流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 254 nm。结果 阿洛西林钠中高聚物在 0.001~4.08 mg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好, 检测限为 0.5 μg·mL<sup>-1</sup>。当供试品溶解量为 200 mg·mL<sup>-1</sup> 时, 本法的高聚物检出能力达到百万分之三。结论 所用方法简便, 结果可靠, 可用于阿洛西林钠中高聚物的检测。

**关键词:** 阿洛西林钠; 高聚物; 葡聚糖凝胶色谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)03-0257-04

### Determination of High Polymers in Azlocillin Sodium for Injection by Sephadex G-10 Gel Chromatography

ZHANG Fucheng<sup>1</sup>, AN Jing<sup>2</sup>, LU Yanfang<sup>2</sup>, SUN Ting<sup>2</sup>, JIANG Ye<sup>2\*</sup> (1.Department of Pharmacy, General Hospital of Air Force, Beijing 100036, China; 2.School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a simple method for the determination of high polymers in azlocillin sodium for injection. **METHODS** A Sephadex<sup>TM</sup> G-10 column was used with the mobile phase A of 0.10 mol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer (adjust to pH 6.8 with NaOH) at a flow rate of 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. And the mobile phase B was pure water, the detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.001–4.08 mg·mL<sup>-1</sup> and the detection limit of high polymers was 0.5 μg·mL<sup>-1</sup>. The detection potential of high polymers achieved 3 ppm by the method when the dissolved load of azlocillin sodium was 200 mg·mL<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The proposed method is simple and reliable. It is applicable for the quality control of azlocillin sodium.

**KEY WORDS:** azlocillin sodium; high polymers; Sephadex G-10 gel chromatograph

阿洛西林钠是β-内酰胺类抗生素, 注射用阿洛西林钠为无菌冻干粉针剂, 因其抗菌谱广、抗菌活力强而在临床上广泛使用。但在临床上时常引发过敏性休克, 严重威胁着患者的生命安全。多年来的研究<sup>[1-2]</sup>已证明, 在β-内酰胺类抗生素所致的速发型过敏反应中, 药物分子本身只是半抗原, 药物中存在的高聚物才是引发速发型过敏反应的真正过敏原, 因此严格控制抗生素中高聚物的含量具有重要的意义。

目前国内外对β-内酰胺类抗生素中高聚物的分析研究主要有离子交换色谱法<sup>[3]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、凝胶过滤色谱法。离子交换色谱法用于β-内酰胺类抗生素中高聚物的分离测定, 分离时间长, 操作繁琐。反相高效液相色谱梯度洗脱可分

离出包括高聚物峰在内的一系列峰, 不易确定高聚物峰的准确位置且高聚物含量低而难以准确测定其含量。凝胶色谱法常用标准对照法, 美国药典22版和23版收载了TSK PW凝胶柱(乙烯共聚物)-对照品对照法测定头孢他啶中的高聚物<sup>[5]</sup>, 但由于高聚物具有高度不均一性和不确定性<sup>[6]</sup>、高聚物标准品较难制备、不同批制备的标准品很难完全同质等原因, 应用推广十分困难, 现版美国药典已不收录此法。

β-内酰胺类抗生素中的各种高聚物虽然结构不同, 但通常具有相似的生物学特性(如过敏性), 故在质量控制中一般不需要对不同结构的聚合物进行逐一控制, 而只需控制其总量<sup>[7]</sup>。本试验利用在特定情况(水为流动相)β-内酰胺抗生素可以筛

作者简介: 张福成, 男, 主任药师 Tel: (0311)66928505  
Tel: (0311)86266069 E-mail: jiangye@hebm.edu.cn

E-mail: ZFC59511@suhu.com

\*通信作者: 蒋晔, 男, 博士, 教授

合形成表观分子量较大的缔合物，缔合物在 Sephadex G-10凝胶色谱系统中色谱行为和高聚物一样， $K_{av}=0$ 处表现为单一色谱峰这一特点，采用了自身对照外标法对高聚物进行精确定量，解决了无高聚物对照品的问题，成功地应用于阿洛西林钠中高聚物的检测。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

液相色谱仪系统包括：Spectra-Physics 8810 泵，Applied Biosystems 785A检测器；HW色谱工作站(南京千谱软件有限公司)。

### 1.2 试剂

注射用阿洛西林钠[石药集团中诺药业(石家庄)有限公司，批号为：07031001，08121404，09051096，规格： $2\text{ g}\cdot(\text{瓶})^{-1}$ ]；蓝色葡聚糖2000(西安沃尔森生物技术有限公司，批号：20080410)磷酸二氢钾为分析纯；水为重蒸水。

## 2 方法和结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 蓝色葡聚糖 2000 溶液的制备** 精密称取蓝色葡聚糖 2000 约 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度为  $1.00\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  蓝色葡聚糖 2000 的溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密称取阿洛西林钠样品约 1.000 g，置 5 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 精密称取阿洛西林钠样品 10.01 mg，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

### 2.2 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱：Sephadex<sup>TM</sup> G-10 (300 mm×13 mm)；流动相 A： $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾(用氢氧化钠调 pH 至 6.8)，流动相 B：水；检测波长：254 nm；流速： $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温：室温。

用蓝色葡聚糖 2000 的溶液( $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )作为参比溶液，取 20  $\mu\text{L}$  注入色谱系统，蓝色葡聚糖 2000 的溶液在流动相 A、B 中的理论板数分别为 1 236，1 476，拖尾因子分别为 0.99，1.27。在两种流动相系统 A 和 B 中蓝色葡聚糖 2000 峰的保留时间比值为 0.96，对照溶液主峰和供试品溶液中高聚物峰与相应色谱系统中蓝色葡聚糖 2000 峰的保留时间的

比值都在 0.93~1.07 之间，均符合药典对该类抗生素中高分子聚合物的测定要求。色谱图见图 1。

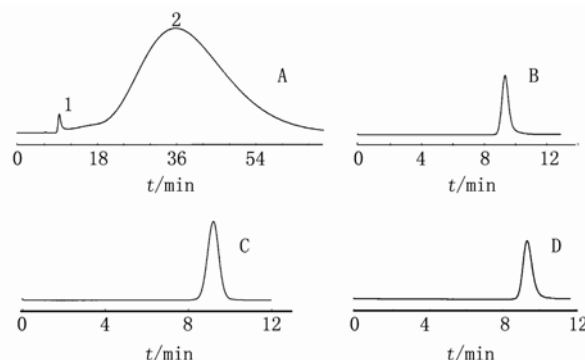


图 1 高效液相色谱图

A-供试品溶液在流动相A中；B-对照品溶液在流动相B中；C-蓝色葡聚糖2000在流动相B中；D-蓝色葡聚糖2000在流动相A中；1-高聚物峰；2-阿洛西林钠的单体峰

Fig 1 HPLC chromatograms

A-sample in mobile phase A; B-control in mobile phase B; C-blue dextran 2000 in mobile phase B; D-blue dextran 2000 in mobile phase A; 1-high polymers; 2-azlocillin sodium monomer

### 2.3 对照品的标准曲线和线性范围

精密称定 40.80 mg 阿洛西林钠，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度。取适量上述溶液用水稀释成浓度分别为 4.08，2.04，1.02，0.408，0.204，0.102，0.051，0.010，0.001  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液，进样 20  $\mu\text{L}$ ，以 B 为流动相，记录峰面积，以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归，得线性方程： $A=6.02\times 10^3+8.87\times 10^5 C$  ( $r=0.999\ 6$ )。

### 2.4 检测限和定量限

取阿洛西林钠溶液进行稀释，在流动相B下进样分析，阿洛西林钠中高聚物的检测限( $S/N=3$ )为  $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，定量限( $S/N=10$ )为  $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=5$ ， $RSD=2.9\%$ )。当供试品溶解量为  $200\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时，本法的高聚物检出能力达到百万分之三。

### 2.5 供试品溶液的浓度与高聚物测定结果的相关性考察

精密称定阿洛西林钠 1，2，3 g，分别置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度分别为 100.0，200.4，300.3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液(相当于规定浓度的 50%，100%，150%)。在流动相B下进样测定，以测得的高聚物峰面积对溶液浓度进行线性回归，回归方程为  $A=3.61\times 10^3 C-1.01\times 10^5$  ( $r=1.000$ )。

## 2.6 仪器精密度试验

在流动相 A 下, 取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  进样, 重复测定 6 次, 阿洛西林钠中高聚物峰面积的 RSD 为 2.5%, 表明仪器精密度良好。

## 2.7 $F$ 值测定的重复性考察

在流动相 B 下, 计算线性溶液(2.04, 1.02, 0.408  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )15 次进样的响应因子  $F$ (阿洛西林钠对照品取样量与其峰面积的比值)的平均值为  $1.19\times 10^{-6}$ , RSD 为 1.3%。在流动相 B 下, 分别计算线性溶液(2.04, 1.02, 0.408  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )在 7 d 内的响应因子  $F$  的平均值为  $1.17\times 10^{-6}$ , RSD 为 1.6%。

## 2.8 样品的测定

另取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 以 A 为流动相进行测定, 记录色谱图, 见图 1A, 取阿洛西林钠对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 以 B 为流动相进行测定, 记录色谱图, 见图 1B。按标准曲线法计算, 结果见表 1。

表 1 注射用阿洛西林钠聚合物测定结果( $n=3$ )

Tab 1 The results of assay in high polymers in azlocillin sodium for injection( $n=3$ )

批号	聚合物含量/%
07031001	0.37
08121404	0.35
09051096	0.35

## 3 讨论

### 3.1 检测依据及原理的探讨

药典等质量标准中对高聚物的控制一般为限度控制, 即并非一定要求出高聚物的绝对含量。通常面积归一化法既能准确求出高聚物的相对含量, 又可省去利用高聚物标准品所带来的种种不便。但由于高聚物一般含量较低, 测定时为保证高聚物被检出, 一般进样量较大, 故使得药品本身的峰十分宽大, 一般积分仪无法准确积分, 限制了面积归一化法的应用。本试验采用的自身对照外标法集外标法和面积归一法的优点为一体, 既不需专门的标准品, 又可像外标法一样准确地对高聚物进行定量。

在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中, 由于 Sephadex G-10 的排阻分子量仅为 700 Da, 因此, 除部分寡聚物外,  $\beta$ -内酰胺类抗生素中的高分子聚

合物在色谱过程中均不保留; 即其  $K_{av}=0$ 。在特定条件下(如以纯水为流动相),  $\beta$ -内酰胺类抗生素由于分子间的氢键、静电相互作用、疏水相互作用等次级相互作用, 可以形成缔合物, 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聚物具有相似的色谱行为, 即在  $K_{av}=0$  处表现为单一的色谱峰。利用此原理, 在 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中, 以药物自身为对照品, 测定其在特定条件下缔合时的峰响应指标; 再改变色谱条件, 测定样品中的高聚物和药物分离后在  $K_{av}=0$  处的峰响应指标; 按外标法计算, 即得药品中的高聚物相当于药品本身的相对含量。

### 3.2 流动相 A 的选择

药物分子和凝胶间的相互作用受色谱条件如流动相的组成、浓度等因素的影响, 故通过改变色谱条件可调节药物分子和凝胶介质间的相互作用, 进而调节高聚物和药物分子间的分离度。考察了流动相 A 中磷酸盐的浓度, 分别采用 0.05, 0.10, 0.20  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸二氢钾水溶液作为流动相 A。当磷酸二氢钾浓度为 0.05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 高聚物峰与阿洛西林钠峰不能完全分离; 浓度为 0.10  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 高聚物峰与阿洛西林钠峰分离度大于 1.5; 当磷酸二氢钾浓度为 0.20  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 高聚物峰与阿洛西林钠峰虽然分离良好, 但分析时间长达 2 h, 综合考虑, 最终选择磷酸二氢钾的浓度为 0.10  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 3.3 葡聚糖凝胶的非特异性吸附问题

葡聚糖凝胶和  $\beta$ -内酰胺类抗生素存在一定的相互作用, 本试验发现在进样 70 针后, 样品溶液中高聚物峰峰形异常, 可能是 Sephadex G-10 对阿洛西林钠等的吸附作用使高聚物产生 2 次保留, 从而使高聚物的检测受到干扰。在使用含 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠和 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钠的溶液 20~50 倍柱体积冲洗凝胶柱后, 用水冲洗至中性, 可改善上述 2 次保留的情况。

按本法对阿洛西林钠中高聚物进行分析, 试验结果满足中国药典对高聚物检测的有关要求, 方法灵敏、准确、简便, 可用于注射用阿洛西林钠的质量控制。

## REFERENCES

[1] JING S H, HU C Q. Advancement of allergic responses on

Chin JMAP, 2011 March, Vol.28 No.3

· 259 ·

- $\beta$ -lactam antibiotics [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 1994, 3(4): 38-41.
- [2] ZHANG J, ZHU J P. Sephadex chromatographic system for determination of polymer in piperacillin sodium/tazobactam sodium for injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27 (5): 452-454.
- [3] ROETS E, DE POURCO P, TOPPET S, et al. Isolation and structure elucidation of ampicillin and amoxicillin oligomers [J]. J Chromatogr A, 1984, 303(1): 117-129.
- [4] BP(1998) [S]. 1998: 90.
- [5] USP(22) [S]. 1985: 254.
- [6] HU C Q, JING S H. Developments of polymer developments of high polymers with analysis technique in  $\beta$ -lactam antibiotics [J]. World Note of Antibiotics(国外医药抗生素分册), 1996, 17(5): 336-343.
- [7] HU C Q. The Application of HPLC Methods in Quality Control Analysis of Antibiotics(Last Book)[液相色谱法在抗生素质控分析中的应用(下册)] [M]. Beijing: Meteorology Press, 2001: 181.

收稿日期: 2010-04-19