

研究报告

# 聚苯乙烯凝胶色谱柱分离头孢呋辛钠聚合物杂质

倪静文<sup>1</sup>, 魏荣卿<sup>1</sup>, 刘晓宁<sup>1</sup>, 方 硕<sup>1</sup>, 袁耀佐<sup>2</sup>, 张 玫<sup>2</sup>

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院色谱中心, 江苏 南京 210009;

2. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008)

**摘 要:** 建立了聚苯乙烯基质的凝胶色谱柱系统对头孢呋辛钠中聚合物杂质(或称缩合物杂质)的分离分析方法。凝胶色谱柱为 MKF-GPC-100 柱(100 mm × 7.8 mm, 5 μm), 流动相为 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0) - 乙腈(70 : 30, 体积比), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm。头孢呋辛钠与其缩合物杂质实现了较好的分离, 分析周期耗时在 10 min 以内。该方法可以迅速、简便地用于头孢呋辛钠缩合物杂质的分离分析。

**关键词:** 聚苯乙烯凝胶; MKF-GPC-100; 头孢呋辛钠; 缩合物杂质

**中图分类号:** O657.62; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2011)01-0001-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.01.001

## Separation of Polymer Impurities in Cefuroxime Sodium by Polystyrene-based Gel Filtration Chromatography

NI Jing-wen<sup>1</sup>, WEI Rong-qing<sup>1</sup>, LIU Xiao-ning<sup>1</sup>, FANG Shuo<sup>1</sup>, YUAN Yao-zuo<sup>2</sup>, ZHANG Mei<sup>2</sup>

(1. The Center of Chromatography, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** A polystyrene-based gel filtration chromatographic method was established for the isolation and examination of condensation impurity in cefuroxime sodium. The sample was separated with MKF-GPC-100(100 mm × 7.8 mm, 5 μm) column using 0.01 mol/L phosphate buffer(pH 7.0) - acetonitrile(70 : 30, by volume) as mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL/min and the detecting wavelength was set at 254 nm. The result indicated that the cefuroxime sodium was successfully separated from condensation impurity in 10 min. The method showed the advantages of simplicity and rapidness.

**Key words:** polystyrene gel; MKF-GPC-100; cefuroxime sodium; condensation impurity

药物安全涉及到和谐社会的建立, 而药物的安全使用则涉及药物质量标准的判定, 因此, 快速准确地监测药物以及药物中会造成不良反应的相关物质具有重要意义。

$\beta$ -内酰胺抗生素主要包括青霉素和头孢菌素两大类, 已在临床中得到广泛使用。 $\beta$ -内酰胺抗生素在临床中的不良反应主要是速发型过敏反应。大量的实验以及临床实验已证明  $\beta$ -内酰胺抗生素本身只是半抗原, 而其中存在的各种聚合物或缩合物杂质(通常本领域中将该类杂质称为“聚合物”, 但从机理及结构分子量上分析应属二元或三元单体结构的缩合物, 本文在下文中均采用后者)才是引起速发型过敏反应的真正过敏原<sup>[1-3]</sup>, 因此检测并控制产品中缩合物杂质的含量是减少  $\beta$ -内酰胺抗生素过敏反应的根本途径。

国内外已有较多分离分析  $\beta$ -内酰胺抗生素中缩合物杂质的报道<sup>[2-6]</sup>, 其中色谱法主要的分离分析方法, 其分离模式有离子交换模式<sup>[4]</sup>、反相模式<sup>[5]</sup>、凝胶色谱模式<sup>[6]</sup>3 类。采用离子交换色谱法测定  $\beta$ -内酰胺抗生素中缩合物的报道不多, 且主要在缩合物的分离定性方面, 其分离时间长, 操作繁琐; 反相模式通常使用 C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub> 等色谱柱, 利用梯度洗脱的方法对其进行分离分析,  $\beta$ -内酰胺抗生素的缩合

物杂质按照其极性顺序可分离出一系列峰,在判定缩合物杂质位置以及含量时需制备一系列的杂质标准品,但因其杂质具有高度的不均一性且不易获得,因而该方法的应用受到限制;凝胶色谱模式以分子筛为原理检测缩合物杂质<sup>[7-8]</sup>,该方法不需专门的杂质标准品进行对照,方法简单、通用。国外对 $\beta$ -内酰胺类抗生素缩合物杂质检测的报道主要集中在 70、80 年代<sup>[4,9-11]</sup>,近年来的相关文献较少,而目前国外药典中仅英国药典 1998 版中使用反相模式对阿莫西林的缩合物杂质进行检测<sup>[5]</sup>;国内对于 $\beta$ -内酰胺类抗生素缩合物杂质检测的文献较多,并以分子筛凝胶色谱模式为主<sup>[12-15]</sup>,中国药典 2000<sup>[6]</sup>以及 2005 版<sup>[16]</sup>也增加了用此方法对缩合物的检查项,但凝胶色谱所用的 Sephadex G-10 填料是一种亲水凝胶<sup>[17]</sup>,其机械强度差,抗压能力弱,检测时需使用低压型色谱,且该凝胶粒径为 40~120  $\mu\text{m}$ ,导致该方法存在柱效低、分析周期长等缺点。

麦科菲公司的 MKF-GPC-100 型凝胶是一种刚性疏水性交联聚苯乙烯凝胶,机械强度高、抗压能力强,适用于非极性有机相及水相体系<sup>[18-19]</sup>,同时溶胀性小,且具有稳定的孔径,为 $\beta$ -内酰胺类抗生素与其缩合物杂质的分离提供了前提条件;并且该凝胶的粒径仅为 5  $\mu\text{m}$ ,因此相对于葡聚糖凝胶可实现更高的柱效和更快的分析速度。本文使用 MKF-GPC-100 凝胶柱,对 $\beta$ -内酰胺类抗生素头孢呋辛钠(分子结构式见图 1)及其缩合物杂质进行分离,并考察了流动相中不同因素对分离分析的影响,为该凝胶填料在头孢类抗生素缩合物杂质检测方面的广泛应用提供了参考。

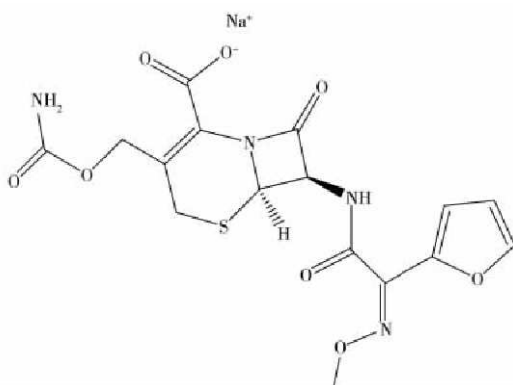


图 1 头孢呋辛钠的分子结构式  
Fig. 1 Molecular structure formula of cefuroxime sodium

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

戴安 Summit 型高效液相色谱(HPLC)系统(美国戴安公司), AKTA explorer 100 制备型色谱系统(通用电器医疗集团); API2000 型质谱仪(美国应用生物系统公司); MKF-GPC-100 型色谱柱(100 mm  $\times$  7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 南京麦科菲高效分离载体有限公司); Sephadex G-10 葡聚糖凝胶(通用电器医疗集团)。

头孢呋辛钠(江苏恒瑞制药股份有限公司); 蛋白 marker(分子量 14.4 ku~116.0 ku, Fermenters 公司); 胸腺素  $\alpha$ -1(28 肽)(分子量 3 108 u, 美国多肽公司); 苯丙氨酸(分子量 165 u, Amreso 公司); 四氢呋喃(THF)、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠均为分析纯(广东汕头西陇化工厂); 磷酸(分析纯, 国营化学试剂一厂); 碳酸钠(分析纯, 上海化学试剂有限公司); 高效液相去离子水(自制)。

### 1.2 溶液的配制

0.01 mol/L(或 0.02 mol/L)磷酸盐缓冲液: 取磷酸氢二钠 3.58 g 和磷酸二氢钠 1.56 g, 加 1 000 mL(或 500 mL)水溶解, 调节至 pH 7.0。

胸腺素  $\alpha$ -1 以及苯丙氨酸溶液的配制: 精密称定胸腺素  $\alpha$ -1 样品约 1 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至刻度, 待测; 苯丙氨酸溶液同上。

供试品-1 的配制: 精密称定头孢呋辛钠样品约 500 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至刻度, 待测(现用现配)。

供试品-2 的配制: 精密称定头孢呋辛钠样品约 500 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加 0.01 mol/L 碳酸钠溶液定容至刻度, 室温下(放置)破坏 12 h<sup>[20]</sup>, 待测。

供试品-3 的配制: 精密称定头孢呋辛钠样品约 10 mg, 以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至 10 mL, 待测(现用现配)。

### 1.3 MKF-GPC-100 色谱柱对不同分子量样品分离的初步评价

色谱条件: 戴安 Summit 型高效液相色谱系统; 色谱柱: MKF-GPC-100(100 mm  $\times$  7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。

流动相: pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 - 乙腈(70 : 30, 体积比)溶液; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20  $\mu$ L; 进样样品为不同分子量的蛋白及胸腺素  $\alpha$ -1 和苯丙氨酸溶液。

#### 1.4 头孢呋辛钠缩合物的制备

色谱条件: 检测机器(制备仪): AKTA explorer 100; 色谱柱: 以 Sephadex G-10(40 ~ 120  $\mu$ m) 为填充剂; 玻璃柱内径 1.3 ~ 1.5 cm, 床体积 50 ~ 60 mL。流动相: 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液; 流速: 1.5 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 500  $\mu$ L; 进样物质: 供试品-1 和 2。收集缩合物样品峰, 作为供试品-4。

#### 1.5 头孢呋辛钠在 MKF-GPC-100 柱中的色谱行为

色谱条件: 流动相为不同浓度的磷酸盐缓冲液 - 乙腈溶液, 其中条件同 “1.3”; 进样物质: 供试品-3。

#### 1.6 质谱条件

ESI 电离源, 负(或正)离子模式, 极化电压 -4 200 V, 进样速率 5  $\mu$ L/min, 采样频率 1 s, 质量范围 500 ~ 1 500 u, 谱图叠加 128 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MKF-GPC-100 色谱柱对不同分子量样品分离的初步评价

由于凝胶填料在不同溶剂中的孔径分布不同<sup>[17]</sup>, 考虑到分离头孢呋辛钠时流动相需用磷酸盐缓冲液(PBS)体系, 因此考察了在 PBS 流动相体系下 MKF-GPC-100 色谱柱对不同分子量样品的分离, 结果见图 2。

由图 2 可知, MKF-GPC-100 凝胶在 PBS 体系中的分子量渗透极限约为  $2 \times 10^4$  u, 分子量的分离范围约为  $1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^4$  u。由于头孢呋辛钠 ( $M = 446$  u) 及其缩合物杂质 ( $M > 800$  u) 在 MKF-GPC-100 凝胶的分离范围内, 因此该凝胶对这两者的分离存在可能。

### 2.2 头孢呋辛钠缩合物的制备

图 3A 为供试品-1 的 AKTA 制备色谱图, 由图可见, 20 mL 处杂质峰 1 不明显, 难以确定, 且不利于缩合物杂质的测定。为确定色谱图中头孢呋辛钠缩合物的归属, 根据文献[17]“头孢呋辛钠在碱性溶液能加剧缩合物杂质的生成”的结论, 参照文献[21]中所述方法, 制备了供试品-2, 并经 AKTA 制备色谱进样获得图 3B, 由图 3B 可见, 20 mL 处的杂质 1 含量明显增加, 依文献[19]判定此为缩合物杂质。收集图 3B 中 20 ~ 30 mL 处流出液, 作为头孢呋辛钠缩合物杂质对照品(供试品-4), 待后直接进样经 MKF-GPC-100 柱检测。

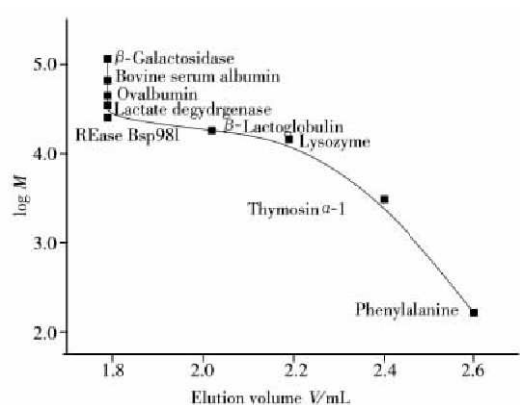


图 2 MKF-GPC-100 凝胶柱对不同分子量样品的分离  
Fig. 2 Separation of different molecular weight samples on MKF-GPC-100 gel column

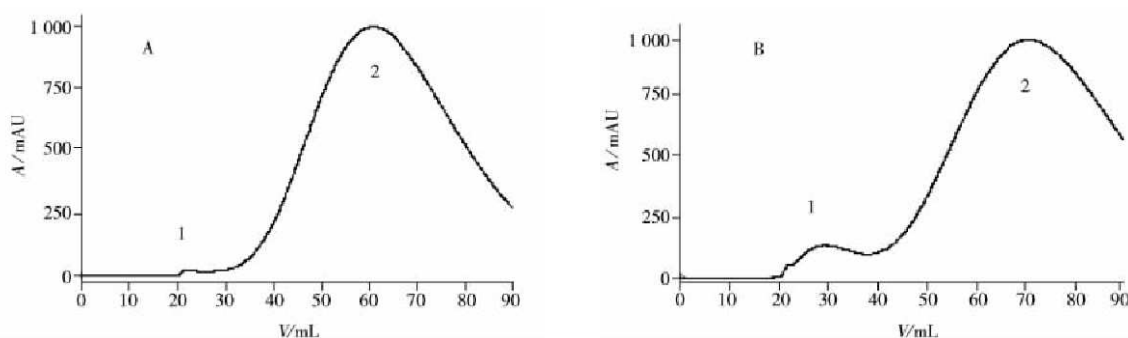


图 3 头孢呋辛钠的葡聚糖 G-10 凝胶色谱图

Fig. 3 Chromatograms of cefuroxime sodium in sephadex G-10 gel  
A. sample 1, B. sample 2; 1. condensation impurity, 2. cefuroxime sodium

## 2.3 头孢呋辛钠及其缩合物杂质在 MKF-GPC-100 柱中的色谱行为

**2.3.1 流动相 pH 值的确定** 由图 3 及文献[20]可知,  $\beta$ -内酰胺类抗生素在弱碱和酸性条件下不稳定, 易导致检测结果偏高, 因此采用 pH = 7.0 的流动相。

**2.3.2 流动相乙腈浓度的确定** 凝胶渗透色谱方法(GPC)的分离是基于待分离物分子在凝胶固定相孔径中的体积排阻(或分子筛)作用, 因此应尽量减少除分子筛以外的次级干扰作用<sup>[17]</sup>。为降低分离过程中待分离物与 MKF-GPC-100 凝胶间存在的疏水等次级作用, 提高其体积排阻分离的效果, 可通过调节流动相中的乙腈比例减少该疏水作用力, 突出待分离物头孢呋辛钠及其缩合物杂质的分子筛色谱行为, 结果见图 4。

由图 4 可知, 随着流动相中乙腈比例的提高, 分离度变差, 色谱峰个数变少, 而分子筛的作用逐渐明显, 缩合物杂质因分子量较大, 出峰时间提前。当乙腈比例为 30% 时, 头孢呋辛钠与其缩合物杂质可在聚苯乙烯凝胶色谱柱中分离, 且分子量大的缩合物杂质表现为单一的色谱峰, 这对计算并控制缩合物杂质的总量更为有利。且保留时间缩短, 10 min 内即可完成检测, 较文献[20]的方法大为提前。但乙腈比例进一步加大, 会使其分离度下降, 因此选择 30% 乙腈为最佳流动相。

**2.3.3 离子浓度对分离的影响** 考虑到流动相中的离子浓度会对柱效以及分离造成一定的影响, 因此考察了头孢呋辛钠及其缩合物杂质在几种不同离子浓度缓冲液中的色谱行为。结果表明, 磷酸盐缓冲液中的离子浓度对头孢呋辛钠及其缩合物杂质的出峰时间基本无影响, 而缩合物杂质的柱效及峰形随着离子浓度的降低而得到改善。但当离子浓度为 0 时, 出峰时间提前, 峰形发生变化, 可能是由于头孢呋辛钠及其缩合物杂质发生了缔合反应<sup>[22]</sup>, 增加了其表现分子量所致。因此, 选择磷酸盐缓冲液的最佳离子浓度为 0.01 mol/L。

在上述优化的色谱条件下进样, 结果如图 5。由图 5 中的线 2 可以基本判定线 1 于 2.5 min 处为缩合物杂质的色谱峰。收集线 1 中 2.5 min 所出峰的溶液, 做质谱进行进一步的精确判定(见图 6)。

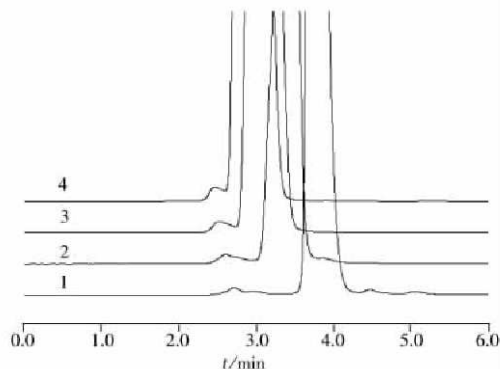


图 4 不同乙腈比例下头孢呋辛钠的色谱图  
Fig. 4 Chromatograms of cefuroxime sodium in different proportions of acetonitrile  
 $\varphi_{\text{acetonitrile}}$  (1-4): 20%, 25%, 30%, 35%; mobile phase: 0.02 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) - acetonitrile (70 : 30); other conditions are the same as "1.5"

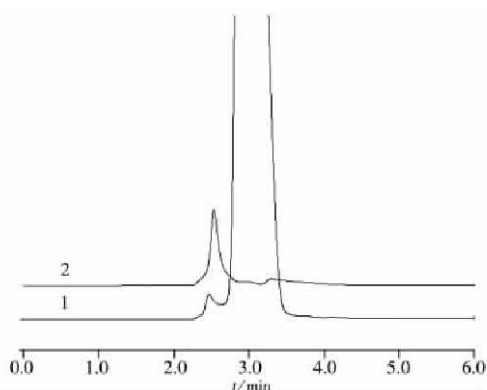


图 5 头孢呋辛钠及自制缩合物杂质的色谱图  
Fig. 5 Chromatograms of cefuroxime sodium and the self-made polycondensation impurity  
1. sample 3; 2. sample 4

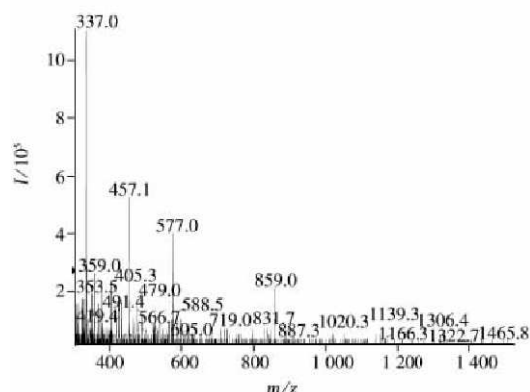


图 6 收集液的质谱图  
Fig. 6 Mass chromatogram of collected solution

## 2.4 头孢呋辛钠缩合物的质谱分析及结构鉴定

由图 6 可知, 质谱图中含有  $m/z$  859、577 等碎片离子峰, 大于头孢呋辛钠分子离子峰( $m/z$  为

446), 可以判定该收集液中含有缩合物杂质, 因此可进一步确定图5线1中2.5 min处的峰为头孢呋辛钠的缩合物杂质。

### 3 结论

MKF-GPC-100型凝胶基质具有很高的机械强度和抗压能力, 以及5  $\mu\text{m}$ 的单分散粒径和10 nm的孔径, 在水相中具有 $1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^4$  u的分子量分离范围, 因此适用于头孢呋辛钠中缩合物的分离。该方法较葡聚糖凝胶法可大大缩短分析时间(分析时间少于10 min); 其次, 在分析仪器方面, MKF-GPC-100型凝胶可用于HPLC系统, 较葡聚糖的低压色谱系统具有更好的普及性, 从而降低分析成本。本文尝试利用聚苯乙烯凝胶基质分离 $\beta$ -内酰胺类抗生素中缩合物杂质, 得到较好的结果, 可作为进一步的研究依据。

#### 参考文献:

- [1] 金少鸿, 胡昌勤.  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏反应进展[J]. 中国新药杂志, 1994, 3(4): 38-41.
- [2] 金少鸿. 头孢菌素过敏反应的研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 1984, 3: 191-197.
- [3] 胡昌勤, 赵建西, 金少鸿, 孙学兰. 头孢菌素和青霉素交叉过敏反应的结构基础探讨[J]. 中国抗生素杂志, 1991, 16(4): 270-275.
- [4] ROETS E, DE POURCQ P, TOPPET S. Isolation and structure elucidation of ampicillin and amoxicillin oligomers[J]. J Chromatogr: A, 1984, 303: 117-129.
- [5] British Pharmacopoeia Commission. British pharmacopoeia (Volume II)[M]. 1998: 90.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 187.
- [7] 蔡姍英, 胡昌勤.  $\beta$ -内酰胺类抗生素中高分子聚合物的分离分析方法研究进展[J]. 广东药学院学报, 2002, 18(2): 138-142.
- [8] 霍秀敏.  $\beta$ -内酰胺类抗生素高分子杂质的研究[J]. 药品评价, 2005, 2(5): 324-326.
- [9] BUNDGAARD H, LARSEN C. Polymerization of penicillins: IV. Separation, isolation and characterization of ampicillin polymers formed in aqueous solution[J]. J Chromatogr: A, 1977, 132: 51-59.
- [10] GIRONA V, ESTELRICH J, PUJOL M, BOLOS J. Ampicillin polymers: identification by gel-filtration chromatography[J]. Int J Pharm, 1988, 41(3): 241-244.
- [11] UENO H, NISHIKAWA M, SUZUKI S, MURANAKA M. Chromatographic separation and chemical analysis of polymers formed by penicilling[J]. J Chromatogr: A, 1984, 288: 117-126.
- [12] 姚蕾, 胡昌勤. 注射用头孢唑肟钠的高分子聚合物检查方法的建立与验证[J]. 药品评价, 2007, 4(6): 428-431.
- [13] 胡昌勤, 金少鸿, 孙学兰. 离子对凝胶色谱法分离头孢菌素中高分子杂质[J]. 中国抗生素杂志, 1990, 15(5): 357-362.
- [14] 胡昌勤, 孙学兰, 金少鸿. 离子对凝胶色谱分离头孢菌素中高分子杂质实验条件的选择[J]. 中国抗生素杂志, 1991, 16(4): 276-280.
- [15] 艾则孜·木哈买提, 马晓康. 高效液相色谱法测定头孢唑林钠德聚合物[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(7): 397-398.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 141.
- [17] 成跃祖. 凝胶渗透色谱法的进展以及应用[M]. 北京: 中国石化出版社, 1993: 163-165.
- [18] 邵承伟, 魏荣卿, 张婷婷, 刘晓宁. 聚(苯乙烯-二乙烯基苯)反相高效液相色谱填料在胸腺素 $\alpha 1$ 分离中的应用[J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1491-1494.
- [19] 魏荣卿, 张婷婷, 邵勇军, 刘晓宁. 聚合物基质高效液相色谱填料在白细胞介素-2分离中的应用[J]. 分析化学, 2007, 35(4): 505-510.
- [20] 胡昌勤, 金少鸿, 孙学兰, 任美端. 头孢菌素结构和其聚合反应关系的探讨 II. 结构对反应速度的影响[J]. 中国抗生素杂志, 1991, 16(1): 30-34.
- [21] 胡昌勤, 丁宏, 赵嘉才, 金少鸿. 氨苄青霉素、羧苄青霉素中寡聚物的分离分析[J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(3): 210-214.
- [22] 胡昌勤, 金少鸿. 自身对照外标法定量测定 $\beta$ -内酰胺类抗生素中的高分子杂质[J]. 中国抗生素杂志, 1997, 22(1): 23-27.