**《β-内酰胺类抗生素高分子聚合物测定-凝胶色谱法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会计划项目，项目编号为20180929-T-424。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。

二、背景、目的和意义

抗生素用量大，较易发生不良反应，其中，最常见的一类不良反应就是速发型过敏反应。多年来的研究已证明，抗生素本身并不引发过敏发应，引发抗生素速发型过敏反应的过敏原是抗生素中存在的高分子聚合物。因此，控制抗生素中高分子聚合物的含量具有重要意义，是抗生素质量控制的关键，是临床安全用药的保障。

研究已表明，引发抗生素速发型过敏反应的物质主要为抗生素中存在的高分子聚合物，这些高分子聚合物的相对分子质量一般在1000-5000，这些物质主要有两大类。一类是外源性杂质，主要是来源于发酵工艺，为蛋白、多肽、多糖等杂质，或抗生素与它们的结合物，如青霉素中的青霉噻唑蛋白、青霉噻唑多肽等。一类是内源性杂质，为抗生素的自身聚合产物，既可以来自生产过程，也可以在储存中形成，甚至在用药时也可以产生。随着生产工艺的不断改进和提高，目前抗生素产品中的外源性杂质已很少产生，因此，对内源性聚合物的控制是当前抗生素高分子聚合物杂质控制的重点。

鉴于抗生素中高分子聚合物控制的重要性，各国相关部门和一些企业都制定了相应标准对抗生素中的高分子聚合物进行控制。《英国药典》在各论中对阿莫西林、氨苄西林、头孢噻肟钠等品种的高分子杂质进行控制，《美国药典》（USP）23版也就曾对头孢他啶中的高聚物进行控制，《中国药典》自2000版也开始对头孢他啶等高分子杂质进行控制，一些国外生产企业对其产品中的高分子杂质也有内控标准或企业标准，如意大利Scherins药厂对其产品头孢布烯中相关物质的控制。并且，由于温度等条件影响抗生素中高分子聚合物的生成，各国药典都提出冷处保存的规定，同时在运输过程中也有一定的运输条件，以防止高分子聚合物的产生。甚至，在使用过程中，针对一些抗生素也有特殊的规定，如阿莫西林干糖浆只能用<60℃的水冲服，如果用100℃的水冲服，其高分子聚合物的含量增加一倍。

目前抗生素中高分子聚合物的检测方法有高效凝胶色谱法、高效液相色谱法、液质联用法、柱切换技术法、高效毛细管电泳法、离子交换色谱法等。《英国药典》中检测β-内酰胺类抗生素的检测方法为反相高效液相色谱法（RP-HPLC），使用的是C18柱等，用相对保留时间定位、主成分自身对照法测定二聚体和三聚体的含量。1995年，《美国药典》（USP）23版用外标法利用高效液相色谱对头孢他啶中的高聚物进行测定，但由于高聚物是一个聚合度不断变化的动态物质，无法制备出具有固定含量的对照品，因无法提供对照品而未执行，于1998年颁布的美国药典第23版第9增补本中宣布删除，且在USP24版中也未再提及。后来，我国金少鸿和胡昌勤率先在国际上建立了自身对照外标法定量测定β-内酰胺类抗生素中高聚物的检测方法，采用的是葡聚糖凝胶G-10为填充剂的凝胶色谱法，此方法收载到中国药典2000版，并沿用至今，并被国内外β-内酰胺类抗生素生厂厂家广泛使用。然而，随着葡聚糖凝胶G-10色谱的广泛使用，也暴露了该方法的不少缺点，如柱效低、分离效果差、锋形拖尾、分析时间长等。目前，关于抗生素中的高分子聚合物检测方法中，已有很多研究对凝胶色谱法进行了改进，其中使用高效凝胶色谱法，如采用SEC-120或TSK-Gel高效色谱柱代替普通的G-10色谱柱检测抗生素的高聚物，结果是更为准确、灵敏，简便。采用高效凝胶色谱柱法对抗生素的聚合物进行测定，色谱柱柱效高，可达上万；主峰和聚合物峰峰型对称，分离效果好，可分离出几个聚合物峰，且聚合物峰与主峰能完全基线分离。

高分子聚合物在抗生素致速发型过敏反应起着关键作用，而目前公众对抗生素使用安全越来越重视，但现实是目前我国抗生素高分子聚合物检测标准中所依赖的检测技术相对落后 因此，我们有必要制定新的抗生素高分子聚合物检测技术标准，以监督和规范抗生素的生产和使用。

三、标准制定原则

严格按照GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的要求，制定该项国家标准。

四、标准的内容框架

本标准主要内容包括范围、术语和定义、原理、仪器设备、试剂与材料、操作步骤、结果分析、结果重复性要求。

**五、主要工作过程**

主要起草单位中国计量大学开展的主要工作过程如下：

1.2017年1月，组成了标准起草工作组，安排了工作进度。

2.2017年1月至2017年3月，起草工作组查阅了国内和国外有关标准中关于此类方法的规定，调研了国内外有关β-内酰胺类抗生素中高分子聚合物检测技术的情况，起草了标准讨论稿。

3.2017年4月，标准起草工作组，对标准讨论稿进行了讨论，形成标准讨论稿第二稿。

4.2017年5月，征求相关专家对标准讨论稿的意见，形成第三稿。

5.2017年3月至2018年5月，对目前有较多报到的β-内酰胺类抗生素检测方法进行了方法学验证。

6.2017年8月，召开标准研制推进会，对标准研制过程中的问题进行讨论，商讨解决方案。

7.2017年12月，标准起草工作邀请中国标准化研究院专家对标准讨论稿提供意见，对标准撰写中的一些问题进行了修订，形成标准草案。

8.2018年5月，本标准经国家标准化管理委员会批准，获得立项。

9.2018年8月，完成标准征求意见稿和编制说明的初稿。

10.2019年1月，完成三方论证，召开专家征求意见会，根据专家意见修改和完善征求意见稿。

**六、主要技术内容说明**

在本标准制定过程中，截止目前根据研究的深入先后完成标准讨论稿第一稿、第二稿、第三稿、第四稿、标准草案以及标准征求意见稿，标准内容不断完善，并趋于科学合理。根据需要，本标准的主要技术内容确定为：

（一）前言部分。给出了标准的起草原则、归口单位、起草单位及主要起草人。

（二）范围。给出了本标准的适用范围。

（三）规范性引用文件。本标准引用了国家标准《分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682-2008）》。

（四）术语和定义。对本标准中“高分子聚合物”这一术语进行了解释。

（五）原理。本标准是根据分子量的大小，利用高效凝胶色谱柱对抗生素及其高分子聚合物进行分离，经紫外检测器在254 nm测定，以色谱峰保留时间定性，以峰面积定量待测物的量。

（六）仪器和设备。给出了本标准所需的主要仪器和设备。

（七）试剂和材料。给出了本标准所需的化学试剂和缓冲液。

（八）主要技术内容的说明。

1. 色谱柱的选择

由于高效凝胶色谱柱相比G-10葡聚糖色谱柱有更高的柱效，塔板数通常10000以上，对抗生素与杂质的分离度好。本标准采用的粒径为5μm、孔径为120 A的硅胶基质的高效凝胶色谱柱，可以有效实现对β-内酰胺类抗生素主成分与其高分子聚合物、以及不同高分子聚合物的分离。保存用100%乙醇即可，无需使用叠氮化钠这一剧毒试剂。

2. 色谱条件

色谱仪为高效液相色谱仪，色谱柱为高效凝胶色谱柱，流动相A为10 mM磷酸缓冲液，流动相B为乙腈，A：B体积比为90：10，流速为0.8 mL/min，柱温为25 ℃，检测波长为254 nm。在此条件下，β-内酰胺类抗生素主成分出峰时间在10分钟之内，主成分能与高分子聚合物等杂质有效分离。

3. 对照物标准曲线浓度范围

根据实验结果，在进样10μL条件下，多数β-内酰胺类抗生素主成分在0.005-5 mg/mL浓度范围内可以找到与峰面积具有良好线性关系的浓度范围，但考虑到5 mg/mL浓度以上的抗生素可能导致色谱柱过载，而多数β-内酰胺类抗生素的检测限达到0.05 mg/mL以下，因此在建立对照品标准曲线时，浓度范围可在0.0005-5 mg/mL内寻找。

4. 部分β-内酰胺类抗生素的检测情况

（1）苯唑西林。用高效凝胶色谱柱对苯唑西林进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为11002。在0.0016-5 mg/mL浓度范围内，回归曲线的 *R2*为1。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图1苯唑西林的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（2）青霉素V钾。用高效凝胶色谱柱对青霉素V钾进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为17504。在0.04-5 mg/mL浓度范围内，回归曲线的 *R2*为1。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图2青霉素V钾的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（3）头孢曲松。用高效凝胶色谱柱对头孢曲松进行HPLC测定,进样5μL，主峰理论塔板数为12847。在0.005-5 mg/mL范围内，回归曲线的*R2*为0.9941。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图3 头孢曲松的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（4）头孢噻吩。利用高效凝胶色谱柱对头孢噻吩进行HPLC测定,进样5μL，主峰理论塔板数为10083，在0.008-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为0.9998（图2）。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图4 头孢噻吩的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

**八、第三方单位的验证结果**

本标准邀请杭州师范大学、浙江工商大学、浙江理工大学进行了第三方验证，分别对盐酸普鲁卡因和头孢拉定、头孢呋辛和头孢哌酮、头孢唑林和头孢替唑进行了测定，结果表明，借助高效凝胶色谱柱进行液相色谱分析，抗生素主成分的色谱峰塔板数都可达到10000以上，与杂质可以达到有效分离。

（1）盐酸普鲁卡因。利用高效凝胶色谱柱对盐酸普鲁卡因进行HPLC测定,进样5μL，主峰理论塔板数为14709，在0.04-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为0.9996。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图5盐酸普鲁卡因的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（2）头孢拉定。利用高效凝胶色谱柱对头孢拉定进行HPLC测定,进样5μL，主峰理论塔板数为18076，在0.04-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为0.9999。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图6头孢拉定的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（3）头孢呋辛。利用高效凝胶色谱柱对头孢呋辛进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为15706，在0.0016-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为0.9987。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图7头孢呋辛的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（4）头孢哌酮。利用高效凝胶色谱柱对头孢哌酮进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为20568，在0.0016-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为1。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图8头孢哌酮的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（5）头孢唑林。利用高效凝胶色谱柱对头孢唑林进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为19096，在0.0016-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为1。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图9头孢唑林的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

（6）头孢替唑。利用高效凝胶色谱柱对头孢替唑进行HPLC测定,进样10μL，主峰理论塔板数为10087，在0.0016-5 mg/mL范围内，回归曲线的的 *R2*为1。



（A）色谱图 （B）峰面积与浓度的线性回归

**图10头孢替唑的HPLC色谱图（A）及其不同浓度的回归曲线分析（B）**

八、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。

九、标准属性的建议

本标准属于检测方法标准，建议作为推荐性标准批准发布。

十、贯彻国家标准的要求和措施建议

为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后，在国家及地方药品监督管理局、抗生素生产企业和有关机构进行宣传和贯彻，并组织有关部门成员进行学习和培训。

十一、其他应予说明的事项

无