

HPLC 测定注射用厄他培南的含量及有关物质

谢赞¹, 白敏¹, 王茉莉², 王婀娜¹, 郝卫华¹, 史颖^{1*} (1.石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035; 2.河北省药品检验所, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定注射用厄他培南含量及有关物质。方法 采用 Inertsil ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长为 230 nm。结果 厄他培南在 0.17~0.87 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好, $r=0.999\ 7$, 最低检测浓度为 17 ng·mL⁻¹, 噁嗪酮、Pro-maba、开环降解物和二聚物等有关物质在该色谱条件下均分离良好。结论 本法重现性好, 专属性强, 可用于测定注射用厄他培南的含量及有关物质。

关键词: 注射用厄他培南; 高效液相色谱法; 含量; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)05-0431-03

Determination of Ertapenem for Injection and its Related Substances by HPLC

XIE Zan¹, BAI Min¹, WANG Moli², WANG Enuo¹, HAO Weihua¹, SHI Ying^{1*} (1.Shijiazhuang Pharm Group Zhongqi Pharmaceutical Technology(Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China; 2.Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for determination of ertapenem for injection and its related substances. **METHODS** The column was Inertsil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Mobile phase A: 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution; mobile phase B: acetonitrile. The gradient elution was used with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 230 nm. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.17~0.87 mg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$). The limit of detection of ertapenem was 17 ng·mL⁻¹. The related substances in ertapenem sodium such as oxazinone, Pro-maba, ring-opened hydrolysis product and dimers were separated successfully. **CONCLUSION** This method with good reproducibility and specificity, is suitable for the determination of ertapenem for injection and its related substances.

KEY WORDS: ertapenem for injection; RP-HPLC; content; related substances

注射用厄他培南(ertapenem for injection)是美国默克公司研制生产的新型碳青霉烯类抗生素, 2001 年 11 月首先在美国批准上市, 商品名为 Invanz, 对革兰阳性菌、革兰阴性菌、需氧菌和厌氧菌均具有良好的抗菌活性, 已获准用于治疗成人复杂性腹腔感染、社会获得性肺炎、复杂性皮肤和皮肤软组织感染、复杂性尿路感染和妇科感染等, 并可用于≥3 个月的幼儿。本品性质不稳定, 杂质种类多且极性差别大, 主要杂质为噁嗪酮、Pro-maba、开环降解物及多种形式的二聚物(包括 I、II、III、V、水合 a、水合 b)等, 建立可有效分离分析厄他培南及其各杂质的色谱方法对本品的质量研究与控制至关重要。已有文献^[1-3]采用制

备液相色谱法进行原料反应母液回收和二聚物杂质制备, 但尚未见本品制剂含量测定和有关物质研究的报道。本实验建立了高效液相梯度洗脱法进行注射用厄他培南的含量测定和有关物质检查, 有效解决了主成分及其有关物质的分离问题, 方法简便快速、特异性好, 为本品的质量研究与质量控制提供了有效的分析手段。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司, 包括 G1310A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1379A 在线脱气机、G1316A 柱温箱和 G1314A 紫外检测器)。注射用厄他培南(批号: 090901, 090902, 090903, 规格: 1 g), 厄他培南

基金项目: 科技部“十一五”重大新药创制(2010ZX09401-402)

作者简介: 谢赞, 男, 硕士生, 工程师 Tel: (0311)67808963
Tel: (0311)67808996 E-mail: sybit@163.com

E-mail: ydxzluck@163.com *通信作者: 史颖, 女, 博士, 高级工程师

钠和杂质对照品(包括噁嗪酮, pro-maba, 开环降解物和供鉴别用二聚物杂质对照品。噁嗪酮批号: 090801, 纯度: 98.5%; pro-maba 批号: 090801, 纯度: 99.0%; 开环降解物批号: 090701, 纯度: 98.0%; 供鉴别用二聚物杂质批号: 090901, 纯度: 10.3%)等均由石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司制备。乙腈为色谱纯, 乙酸铵为分析纯, 试验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液, 流动相 B: 乙腈; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 检测波长为 230 nm; 线性梯度洗脱: 0~6 min, A: 98%; 6~20 min, A: 98%→75%; 20~30 min, A: 75%→65%, 进样量 10 μL。

2.2 测定方法

2.2.1 含量测定 取注射用厄他培南适量, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 mg 的溶液, 摇匀, 作为供试品溶液(临用现制), 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取厄他培南对照品适量, 同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中厄他培南的含量, 即得。

2.2.2 有关物质含量测定 取“2.2.1”项下的供试品溶液, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按主成分自身对照法计算, 即得。

2.3 系统适用性

分别取噁嗪酮、Pro-maba、开环降解物和二聚物杂质对照品适量, 配制各组分的混合溶液, 精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1, 噁嗪酮、Pro-maba、开环降解物、厄他培南及二聚物峰均分离良好, 最邻近厄他培南的二聚物峰与厄他培南钠峰之间的分离度为 7.0, 理论板数按厄他培南峰计算为 46 120, 各组分色谱峰均分离良好, 符合要求。

2.4 破坏性试验

取本品约 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 共 6 份, 分别按以下条件操作: ①未破坏; ②空白辅料; ③酸破坏: 加入 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 2 mL, 溶解, 放置 30 min, 加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调

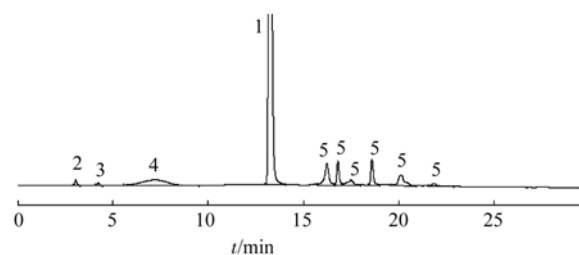


图 1 高效液相色谱图

1-厄他培南钠; 2-噁嗪酮; 3-Pro-maba; 4-开环降解物; 5-二聚物

Fig 1 HPLC chromatogram

1-ertapenem sodium; 2-oxazinone; 3-Pro-maba; 4-ring-opened hydrolysis product; 5-dimers

pH 值至中性; ④碱破坏: 加入 0.1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 2 mL, 溶解, 立即加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调 pH 值至中性; ⑤氧化破坏: 加入 3% 双氧水 2 mL, 溶解, 放置 1 h; ⑥高温破坏: 沸水浴 15 min; ⑦光照破坏: (4 500±500)Lx 条件下照射 10 d。取上述样品依法操作, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 2。

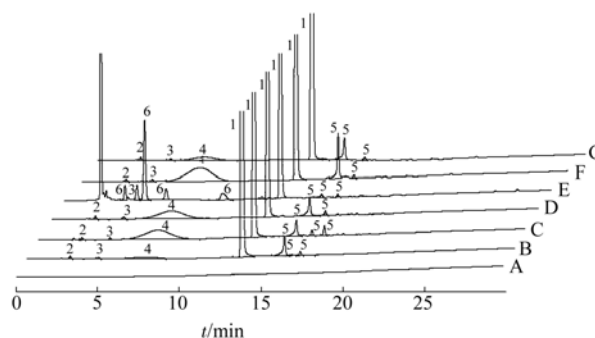


图 2 注射用厄他培南专属性试验色谱图

A-空白辅料; B-厄他培南钠原料; C-酸破坏; D-碱破坏; E-氧化破坏; F-热破坏; G-光照破坏; 1-厄他培南钠; 2-噁嗪酮; 3-Pro-maba; 4-开环降解物; 5-二聚物; 6-未知杂质

Fig 2 Chromatograms of specificity of ertapenem for injection

A-blank excipients; B-bulk material; C-destroyed by acid; D-destroyed by alkali; E-destroyed by oxidation; F-destroyed by heat; G-destroyed by light; 1-ertapenem sodium; 2-oxazinone; 3-Pro-maba; 4-ring-opened hydrolysis product; 5-dimers; 6-unknown impurities

结果表明, 本品在酸、碱、氧化、高温、光照等条件下均不稳定, 主要降解产物为开环降解物, 各杂质峰与厄他培南色谱峰均有良好分离, 空白辅料不出峰, 方法专属性良好。

2.5 线性曲线和检测限考察

精密称取对照品适量, 加水溶解并稀释至刻度, 分别制成浓度为 0.87, 0.69, 0.52, 0.35, 0.17 mg·mL⁻¹ 的厄他培南系列标准溶液, 各取 10 μL 注

入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归, 回归方程为 $A=26\ 017C-285.4$, $r=0.999\ 7$, 厄他培南在 $0.87\sim0.17\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。取上述最低浓度的标准溶液逐级稀释, 以 $S/N=3$ 计, 检测限为 $17\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 仪器精密度试验

取本品 6 份, 按“2.2”项下配制供试品溶液, 依法操作, 主成分峰面积 RSD 为 0.2%。

2.7 稳定性试验

取本品, 照“2.2”项下配制供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 取样测定, 结果表明, 随放置时间的增加, 开环降解物和聚合物等杂质含量明显增加, 主成分含量明显降低, 溶液不稳定, 需临用现配。

2.8 含量和有关物质测定

注射用厄他培南 3 批样品的含量和有关物质测定结果见表 1。

表 1 注射用厄他培南含量和有关物质测定结果(n=3)
Tab 1 Results of content and related substances of ertapenem for injection(n=3)

批号	含量/%	有关物质/%				
		噁嗪酮	Pro-maba	开环	二聚物	杂质总量
090901	107.6	0.21	0.23	2.71	3.20	6.35
090902	108.2	0.23	0.21	2.83	3.08	6.35
090903	107.5	0.21	0.20	2.92	3.14	6.47

3 讨论

厄他培南虽在 295 nm 处有最大吸收, 但 HPLC-二极管阵列检测器测试结果显示, 本品杂质峰多在 220~230 nm 处有较强吸收, 经比较, 230 nm 和 295 nm 波长处的有关物质检查结果差异很大, 在 295 nm 处有多个杂质不能检出, 故选择 230 nm 作为检测波长。

选用可挥发的乙酸铵-乙腈体系进行了的色谱条件的考察, 建立了高效液相色谱梯度洗脱方法, 该法能够与质谱仪联用, 可对无法制备的不同形式的二聚物进行定性鉴别, 且可有效分离极性差异较大的主成分及其有关物质(包括噁嗪酮、Pro-maba、开环降解物和二聚物等), 为特异、准确的对各杂质进行监测提供了可靠的方法。

Pro-maba 与开环降解物二者极性相近, 分离困难, 本实验采用的方法可有效保证二者的分离度, 但开环降解物色谱峰有展宽现象, 调节洗脱强度、柱温、pH 值等条件均无法同时保证二者的分离度与色谱峰形。经考察, 开环降解物检测限为 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相当于供试品浓度的 0.1%, 故可保证其准确检出。

本品引湿性强, 水溶液不稳定^[4], 随浓度增大和放置时间延长, 杂质含量均明显增加, 操作过程中应注意控制称量环境的湿度, 操作应尽快速, 样品需临用现配且浓度不宜过大。

REFERENCES

[1] PETER S, NATISHAN T K, WU Y, et al. Preparation, isolation, and characterization of dimeric degradation products of the 1 β -methylcarbapenem antibiotic, ertapenem [J]. J Liq Chrom Rel Technol, 2001, 24(19): 2999-3015.
[2] ANANT V, SAJONZ P, OSAMA S, et al. Exploiting pH mismatch in preparative high-performance liquid chromatographic recovery of ertapenem from mother liquor streams [J]. J Chromatogr A, 2005, 1079(1/2): 80-91.
[3] PETER S, ANANT V, OSAMA S, et al. Development of a gradient elution preparative high performance liquid chromatography method for the recovery of the antibiotic ertapenem from crystallization process streams [J]. J Chromatogr A, 2006, 1126 (1/2): 365-372.
[4] ZAJAC M, CIELECKA-PIONTEK J, JELIŃSKA A. Stability of ertapenem in aqueous solutions [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(2): 445-449.