

- [8] ZHU M Y, ZHENG Y Y, ZHOU Y M, et al. Synthesis of related substances of dabigatran etexilate [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(12): 1108-1112.
- [9] GU H L, WU T Z, JIN L Y, et al. Synthesis of related substances of dabigatran etexilate mesylate [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46(4): 336-342.
- [10] GANG H, ZONG X J, CHEN H H, et al. Synthesis of the impurities of dabigatran etexilate mesylate [J]. Chin J Synthetic Chem(合成化学), 2015, 23(11): 1068-1073.
- [11] HU L N, ZHANG Y, GU J, et al. Determination of the content of impurity D in atorvastatin calcium with the correction factor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(12): 1476-1480.
- [12] ZHU J X, ZHUANG B Y, ZENG F X, et al. Determination of the related substances of cinacalcet hydrochloride by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(2): 185-189.
- [13] LI J, SHI S L, YANG J B. Determination of related substances of pramipexole hydrochloride by correction factor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(11): 1366-1370.

收稿日期: 2016-02-28

注射用美洛西林钠高分子杂质的研究

张冬梅, 凌霄, 赵海云, 于明艳, 牛冲^{*}(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 建立 TSK 凝胶测定注射用美洛西林钠高分子杂质的方法, 探讨高分子杂质与有关物质及聚合物的关系。方法 选用 TSKgel G2000SWxl 色谱柱, 流动相为 pH 7.0 的 0.005 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, 检测波长为 210 nm。对 204 批次样品进行检测, 检测结果与 Sephadex G-10、有关物质结果进行相关性分析。结果 所建立的方法能有效检出注射用美洛西林钠中的高分子杂质。相关性分析表明, TSK 系统检出的杂质包括聚合物以及分子量高于美洛西林的已知杂质。结论 TSK 方法不能取代 G-10 方法, 采用 TSK 色谱系统测定 β-内酰胺类抗菌药物聚合物时, 需进行充分的研究, 以排除高分子杂质(非聚合物)对于聚合物测定的影响。

关键词: 美洛西林; TSK; G-10; 高分子聚合物; 高分子杂质

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)09-1170-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.018

Study on the High Molecular Impurity for the Injection of Mezlocillin Sodium

ZHANG Dongmei, LING Xiao, ZHAO Haiyun, YU Mingyan, NIU Chong^{*} (Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a method for the assay of high molecular impurities in Mezlocillin Sodium for injection by TSK gel, and to discuss the internal relationships of the results with those of related compounds and polymers. **METHODS** The analysis was carried on a TSKgel G2000SWxl column with a mobile phase of 0.005 mol·L⁻¹ phosphate buffer with the pH value of 7.0. The detection wavelength was 210 nm. 204 batches of samples were determined, correlative analysis was performed to the results. **RESULTS** The established method could determine the high molecular impurities in Mezlocillin Sodium for injection. The correlative analysis showed that the determined impurities include the polymers and the known impurities whose molecular were higher than Mezlocillin. **CONCLUSION** For the polymer analysis of β-lactams, TSK gel method can not replace Sephadex G-10 method. Further studies were required to identity peaks of known high molecular impurities and those of polymers during the analysis.

KEY WORDS: mezlocillin; TSK; G-10; high molecular polymer; high molecular impurity

β-内酰胺类抗菌药物临床常见不良反应为过敏反应。文献报道, 过敏反应与其存在的高分子聚合物有关^[1-3]。由于结构不同的高分子聚合物通常具有相似的生物学特性, 故在药品质量控制中

只需控制高分子聚合物的总量, 就能达到控制致敏物质的目的。根据分子量差异进行分离的凝胶色谱模式是简便易行的分离模式, 填料主要有 Sephadex G-10 和 TSK gel 等。中国药典 2015 年版

作者简介: 张冬梅, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0531)81216550
主任药师 Tel: (0531)81216550 E-mail: ncmilan@126.com

E-mail: zhangdm1000@163.com *通信作者: 牛冲, 男, 博士, 副

采用 G-10 凝胶色谱法对 36 个抗菌药物品种的高聚物进行控制^[4], 相关文献也对 G-10 凝胶色谱法测定 β -内酰胺类抗菌药物聚合物进行了广泛的研究^[5-6]。美国药典(USP)22 版和 23 版收载了 TSK PW 凝胶柱(乙烯共聚物)-对照品法测定头孢他定的高聚物, 但由于高聚物标准品不易满足, USP 24 版已不收录。中国药典 2015 年版中采用 TSK 凝胶对头孢地嗪的聚合物进行控制^[4]。

美洛西林钠属于第三代半合成青霉素类抗菌药物, 是一种不可逆的 β -内酰胺酶抑制剂。中国药典 2015 年版中采用 G-10 凝胶色谱法对其聚合物进行控制。此方法分析速度偏慢, 出峰时间很长, 且检测效率偏低。有文献采用 SRT 和 SRT-C 体积排阻色谱柱对美洛西林钠的聚合物进行测定^[7]。本研究参考头孢地嗪聚合物的测定方法, 采用 TSKgel 凝胶色谱柱对其高分子杂质进行考察, 并对 TSK 凝胶、Sephadex G-10 凝胶、有关物质测定结果进行对比研究, 为高聚物的合理控制提供参考。

1 仪器与试剂

LC-MS 8050 三重四级杆质谱仪(岛津公司); LC-30A UFLC 带 PDA-30A 二极管阵列检测器, Agilent1260 高效液相色谱仪(半制备型)。

美洛西林对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 130519-200802, 含量: 85.9%); 注射用美洛西林钠(瑞阳制药, 批号: 14032305, 规格: 1.0 g); 磷酸氢二钠(国药集团, 批号: 20150126); 磷酸二氢钠(科密欧, 批号: 20130221)。

2 TSK 系统方法的建立与验证

Sephadex G-10 系统按照中国药典 2015 年版二部美洛西林钠项下聚合物方法。

TSK 系统: TSKgel G2000SWxl 凝胶色谱柱(7.8 mm $\times$ 300 mm), 流动相: pH 7.0 的 0.005 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐缓冲液[0.005 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液-0.005 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(61:39)], 流速: 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长: 210 nm, 进样量: 10 μ L。供试品溶液: 含美洛西林 1.0 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的水溶液。

2.1 检测波长

美洛西林钠含量测定检测波长为 210 nm, 其聚合物基本结构未变, 其检测波长应不变。药典中 G-10 凝胶色谱法用 254 nm 为检测波长, 经考察, 杂质在 210 nm 波长处的响应>254 nm, 故采用 210 nm 为检测波长。

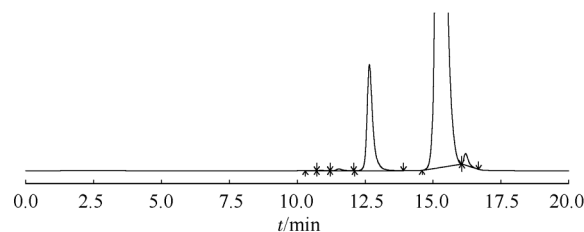


图 1 美洛西林钠 TSK 柱测定色谱图

Fig. 1 TSK chromatogram of mezlocillin

2.2 流动相

考察了不同浓度(0.05, 0.005 mol $\cdot$ L⁻¹)、不同 pH 值(pH 7.0、pH 8.0)的磷酸盐缓冲液。结果表明以 pH 7.0 的 0.005 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐缓冲液作为流动相时, 主峰与杂质峰的分离情况较好。

2.3 流速

分别选择 0.5, 0.6, 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹ 进行试验, 结果表明, 流速为 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹ 时, 主峰与杂质峰的分离情况较好, 且分析时间适宜, 因此拟定流速为 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹。

2.4 专属性试验

供试品以水为溶剂, 进样测定, 溶剂无干扰, 专属性良好。

取供试品, 分别进行以下降解试验: ①酸破坏: 取供试品溶液 10 mL, 加入 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 放置 30 min, 加入 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和; ②碱破坏: 取供试品溶液 10 mL, 加入 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 放置 30 min, 加入 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 中和; ③氧化破坏: 取供试品溶液 10 mL, 加入 30% 双氧水 1 mL, 放置 10 min; ④光照破坏: 取供试品, 光照(4 500 $\pm$ 500)Lx 条件下放置 24 h, 依法配制供试品溶液; ⑤高温破坏: 取供试品, 80 $^{\circ}$ C 下放置 6 h, 依法配制供试品溶液。分别进样测定, 记录色谱图。降解试验显示, 各杂质峰与主峰分离度良好, 结果见图 2。

2.5 仪器精密度试验

取美洛西林对照品适量, 精密称定, 加纯水溶解并定量稀释制成 10 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液, 连续进样 5 次, 对照品峰面积值的 RSD 为 0.09%。

2.6 对照品溶液的线性和范围

取对照品溶液, 分别进样 2, 5, 10, 15, 20 μ L, 记录色谱图, 以对照品的量(W , μ g)对峰面积(A)进行线性回归, 得线性方程 $A=5\,207.1W-535.3$ ($r^2=0.999\,9$)。结果表明, 美洛西林在 19.95~199.46 ng 内与峰面积线性关系良好。

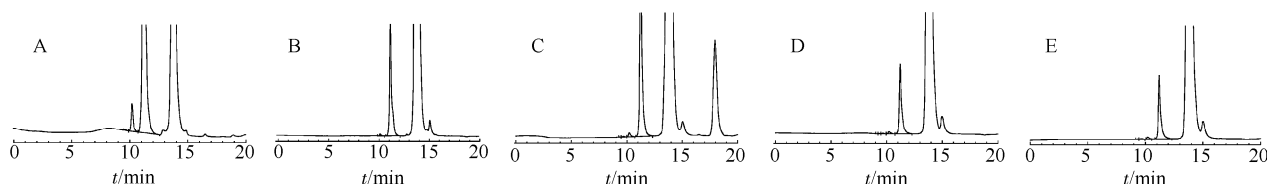


图2 强制降解试验色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-光照破坏; E-高温破坏。

Fig. 2 Chromatogram of stress testing

A-sample destroyed by acid; B-sample destroyed by base; C-sample destroyed by H_2O_2 ; D-sample destroyed by light; E-sample destroyed by high temperature.

2.7 重复性考察

精密称取6份样品, 每份3.0 g, 加纯水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。立即进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 计算其平均含量, 此次测定平均值为2.25%, RSD为1.4%, 结果表明该方法重复性良好。

2.8 样品溶液的稳定性

取样品适量, 精密称定, 用水溶解并定量, 稀释成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为供试品溶液, 分别在0, 1, 2, 3, 4, 6, 22 h进样测定, 峰面积分别为65 447, 690 088, 708 750, 753 215, 795 654, 850 286, 1 220 912, 结果表明在室温条件下, 供试品溶液中高聚物随放置时间延长而增加, 故供试品溶液应临用新制。

2.9 定量限及检出限

取对照品溶液 0.2 mL , 用水稀释至 100 mL , 进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 美洛西林峰高为噪音的10倍, 定量限为 0.2 ng , 取定量限溶液进样 $3\text{ }\mu\text{L}$, 美洛西林峰高为噪音的3倍, 检测限为 0.07 ng 。

2.10 供试品含量的测定

204批次样品依法测定。TSK系统测定结果为0.91%~3.35%, 均值为1.59%; G-10系统测定结果为0.02%~0.34%, 均值为0.12%。

3 高分子杂质及有关物质相关性考察

有关物质检测方法: Thermo BDS C_{18} 色谱柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 检测波长: 210 nm , 流速: $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$, 柱温: $35\text{ }^\circ\text{C}$; 流动相: 磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾 4.9 g 和磷酸氢二钾 0.45 g , 加水溶解并稀释至 1 000 mL)-乙腈, 梯度洗脱: $0\sim 18\text{ min}$, $90\%\text{ A}\rightarrow 65\%\text{ A}$; $18\sim 27\text{ min}$, $65\%\text{ A}$; $27\sim 28\text{ min}$, $65\%\text{ A}\rightarrow 90\%\text{ A}$ 。

质谱检测条件: 流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 $35\text{ }^\circ\text{C}$, 进样体积为 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。流动相为 $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵-乙腈; 梯度洗脱: $0\sim 15\text{ min}$, $90\%\text{ A}\rightarrow 65\%\text{ A}$;

$15\sim 20\text{ min}$, $65\%\text{ A}$; $20\sim 25\text{ min}$, $65\%\text{ A}\rightarrow 90\%\text{ A}$ 。

柱后串联PDA检测器与电喷雾离子化MS测定, PDA检测波长为 210 nm , ESI离子源, 源电压为 $\pm 4.5\text{ kV}$; 源温度为 $300\text{ }^\circ\text{C}$; 雾化气为 $3.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气为 $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 加热气为 $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; CID气为 270 kPa 。质谱扫描模式为全扫描及产物离子扫描; 全扫描范围: $m/z\ 100\sim 2\text{ 000}$ 。

TSK G2000SWxl凝胶色谱系统主峰前检出的4个杂质峰, 分别对其进行制备, 制备液浓缩后按有关物质色谱条件检测, 结果显示, TSK凝胶色谱系统检出的1、2、3号峰在有关物质图谱中均在美洛西林主峰保留时间处检出色谱峰, 4号峰的有关物质图谱显示, 检出的色谱峰均为有关物质中已有的杂质峰, 由质谱数据可知, 4号峰检出的杂质分子量均大于美洛西林分子量(539), 同时主峰保留时间处未见色谱峰, 图谱见3。

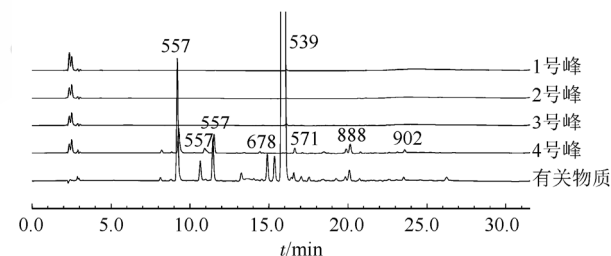


图3 TSK系统杂质在有关物质系统中的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of TSK impurities in related compounds system

TSK检测结果与有关物质的最大单个杂质质量和杂质总量的相关分析表明, 高分子杂质检测结果与二者均显著相关。

由以上结果分析表明, 1、2、3号峰应为美洛西林的聚合物(二聚物、三聚物及多聚物)峰, 由于其单体间结合键较弱, 制备后在有关物质系统中表现为美洛西林单体峰。4号峰未在美洛西林主峰保留时间处检出色谱峰, 故4号峰不是美洛西林

聚合物峰, 其主要由分子量高于美洛西林的高分子杂质组成, 这些杂质均为有关物质中已有杂质。

4 葡聚糖 G-10 系统与有关物质相关性考察

对 G-10 凝胶色谱系统的聚合物峰进行制备, 在有关物质系统进行测定, 结果显示, G-10 聚合物峰在美洛西林主峰处有色谱峰出现, 未见其他杂质峰。见图 4A。提示 G-10 聚合物峰为美洛西林的多聚体, 不含有关物质中的已知杂质。由于其单体间结合键较弱, 制备后在有关物质系统中表现为美洛西林单体峰。相关性分析表明, 聚合物与单个杂质及杂质总和均不相关。

5 葡聚糖 G-10 系统与 TSK 系统相关性考察

对 G-10 凝胶色谱系统的聚合物峰进行制备, 在 TSK 凝胶系统中进行测定。测结果显示, 聚合物峰不是 TSK 系统中主峰前杂质峰, 见图 4B。

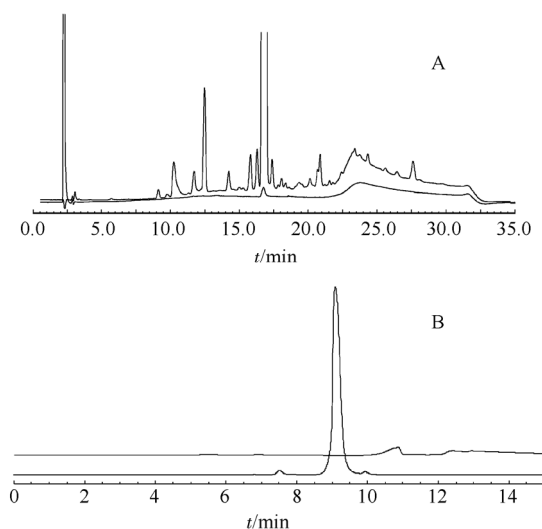


图 4 葡聚糖 G-10 在不同系统中的色谱图

A-有关物质系统; B-TSK 系统。

Fig. 4 Chromatograms of G-10 impurity in different systems

A-related compounds system; B-TSK system.

6 讨论

本研究建立了 TSKgel G2000SWxl 凝胶色谱柱测定注射用美洛西林钠中聚合物的方法, 供试品测定结果显示, TSK 系统测定结果显著高于 G-10 系统。

为分析 2 种测定方法的结果差异, 对 TSK 系统、G-10 系统及有关物质进行了相关性考察。

研究表明, TSK 系统中, 主峰前的杂质峰包括聚合物峰以及分子量高于美洛西林的高分子杂质峰(为有关物质中的已知杂质), 且以高分子杂质为主。而 G-10 系统聚合物峰只是聚合物峰, 并未包含有关物质中已有的高分子杂质。因此, TSK 测定的结果显著高于 G-10 系统结果。

TSK 系统与葡聚糖 G-10 系统相关性考察表明, G-10 系统聚合物不是 TSK 系统中主峰前的高分子杂质峰, 也不是主峰前的聚合物峰。可能是由于 2 种不同填料的分子排阻范围不同, 导致检测的聚合物的范围也不一致。故 TSK 凝胶测定方法不能取代葡聚糖 G-10 系统。

本研究表明, 采用 TSK 色谱系统分离 β -内酰胺类抗菌药物聚合物时, 主峰前的色谱峰除包括主成分的聚合物峰外, 还可能含有分子量大于主成分的已知杂质峰。因此, 在方法制定过程中需结合有关物质检测进行充分研究, 以排除分子量大于主成分的已知杂质对聚合物测定结果的影响。

REFERENCES

- [1] JIN S H, JING J. Studies on ampicillin polymers I . isolation and characterization of ampicillin polymers [J]. Anti-Biotics (抗生素), 1987, 12(4): 241-245.
- [2] JIN S H, JING J. Studies on ampicillin polymers II . determination of ampicillin polymers in ampicillin preparations [J]. Antibiotics(抗生素), 1987, 12(4): 245-249.
- [3] XIA M, HANG T J, LI X M, et al. A review on the test methods for high molecular weight polymer impurities in β -lactam antibiotics [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2007, 31(11): 501- 507.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2015.
- [5] LIU S H, HONG L Y. Determination of high molecular polymers in cefozopran hydrochloride [J]. Chin J Health Lab Tec(中国卫生检验杂志), 2014, 24 (3): 321-323.
- [6] YAO L, GU L S, HU C Q. Development and validation for determination of high molecular polymer s concentr ation in ceftizoxime sodium injection [J]. Drug Eval(药品评价), 2007, 4(6): 428-431.
- [7] KANG X. SRT and SRT-C comparison and separation of meziocillin sodium polymer [J]. Fujian Med J(福建医药杂志), 2013, 35(2): 69-72.

收稿日期: 2016-02-23