

头孢他啶原料及制剂的聚合物杂质分析

李 进, 姚尚辰, 尹利辉, 许明哲*, 胡昌勤

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 建立头孢他啶原料及制剂中聚合物杂质的分析方法。通过强制聚合法制备富含聚合物杂质的头孢他啶降解溶液; 然后采用高效凝胶色谱法和柱切换-LC-MSⁿ法对降解溶液中的聚合物杂质进行分离和结构鉴定; 采用 Phenomenex Gemini-C18 型色谱柱, 以 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈为流动相, 进行梯度洗脱, 建立 RP-HPLC 法分析头孢他啶聚合物, 并进行方法学验证。结果表明高效凝胶排阻色谱法分离头孢他啶聚合物杂质时, 部分小分子杂质与聚合物共出峰, 方法专属性差、定量准确性差; RP-HPLC 法分析头孢他啶聚合物杂质时, 在 25~45 min 内检出头孢他啶二聚体及其衍生物、三聚体等 4 种聚合物杂质峰, 专属性好、灵敏度高、方法耐用性好, 因此 RP-HPLC 法可用于头孢他啶的聚合物杂质质控。头孢他啶降解溶液可作为分析头孢他啶聚合物的系统适用性溶液。

关键词: 头孢他啶; 聚合物; 杂质; 柱切换-LC-MSⁿ; 高效凝胶排阻色谱; β -内酰胺抗生素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1889-08

Analysis of polymer impurities in ceftazidime raw materials and preparations

LI Jin, YAO Shang-chen, YIN Li-hui, XU Ming-zhe*, HU Chang-qin

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: To establish a method for the determination of polymer impurities in ceftazidime raw materials and preparations, a ceftazidime degradation solution containing polymer impurities was prepared by forced polymerization. Polymer impurities in the degradation solution were separated and identified by high performance gel chromatography and the column switching-LC-MSⁿ method. A new RP-HPLC method for ceftazidime polymer was established and validated with a Phenomenex Gemini-C18 column using a mobile phase gradient elution of 0.02 mol·L⁻¹ phosphate buffer, methanol and acetonitrile. The results showed that when using this high performance gel chromatography method some small molecular weight impurities were co-eluted with the polymers, resulting in a poor specificity and poor quantitative accuracy. But when using the RP-HPLC method, four polymer impurities were detected in the 25–45 min time range with good specificity, sensitivity and robustness, including two ceftazidime dimers, trimers, and derivatives. Therefore, the described RP-HPLC method is suitable for the quality control of polymer impurities in ceftazidime, and ceftazidime degradation solution can be used as suitable solution for analysis of ceftazidime polymers.

Key words: ceftazidime; polymer; impurity; column-switch LC-MSⁿ; high performance size exclusion chromatography; β -lactam antibiotics

β -内酰胺类抗生素易发生自身聚合反应, 生成聚合物杂质从而诱发过敏反应, 威胁人民用药安全, 应进

行严格控制^[1-4]。聚合物杂质可在药品原料与制剂生产、运输、存储过程中产生, 目前已成为影响抗生素药品用药安全的重要因素之一。

目前, 聚合物的质控方法主要包括葡聚糖凝胶 G10 色谱法 (Sephadex G10)、高效凝胶色谱法 (HP-

收稿日期: 2020-02-04; 修回日期: 2020-04-17.

*通讯作者 Tel: 86-10-53852506, E-mail: xumzhe@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0084

SEC)、反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)、高效毛细管电泳法 (HPCE)、阴离子交换色谱法等^[5-8]。聚合物质控的理念由总量控制发展为对指针式聚合物杂质进行精准控制^[9]。为保证类药品的安全性, 中国药典从2005年版开始, 逐渐对 β -内酰胺类抗生素中的聚合物设定了质控项目。

头孢他啶为半合成第3代头孢菌素, 临床主要用于治疗下呼吸道感染、腹腔胆系感染及复杂性尿路感染和严重皮肤软组织感染等。中国药典2015年版仍然采用G10凝胶色谱系统进行聚合物的质控^[10]。EP9.0版和USP41版均未对头孢他啶原料及制剂进行聚合物质控^[11,12]。有文献^[13]报道对G10凝胶色谱法的流动相系统进行了优化, 以及采用HPSEC法分析注射用头孢他啶的聚合物杂质^[14]。但是, G10凝胶系统和高效凝胶色谱法 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC) 分析聚合物杂质时均存在较为明显的缺点, 聚合物色谱峰易受到药物中其他极性较大的小分子杂质的共出峰干扰, 从而影响聚合物杂质的定量准确性。前期研究已对部分 β -内酰胺类抗感染药物聚合物杂质做过研究工作, 证明RP-HPLC方法可对指针性聚合物杂质进行精准控制^[15-18], 本研究分别建立HPSEC法和RP-HPLC法, 对头孢他啶原料及制剂中的聚合物杂质进行研究, 建立头孢他啶聚合物的分析方法。

材料与方法

仪器 二维色谱系统为Summit 100型, 包括P680型双三元低压梯度泵、ACI-100型自动进样器、Tcc-100型柱温箱及PDA-100型二极管阵列检测器组成, 工作站为Chromleon 7.2 SR5版 (美国DIONEX公司); 柱切换-LC-MSⁿ系统由Thermo HPLC色谱系统 (包括U3000四元低压梯度泵、自动进样器、柱温箱、切换阀和四波长检测器) 和Q Exactive Focus型MS/MS质谱仪 (美国Thermo公司) 组成, 工作站为Xcalibur1.0版; BUCHI旋转蒸发器R-215V。

样品与试剂 头孢他啶原料 (含碳酸钠) (批号802LJ81JD2) 和注射用头孢他啶 (批号: 18112231) 由中国食品药品检定研究院提供。乙腈 (色谱纯) 购自美国Fisher公司, 其他化学试剂 (分析纯), 均购自国药集团化学试剂公司, 水为实验室自制双蒸水。

高效凝胶排阻色谱 (HPSEC) 法 色谱柱TSK-gel G2000SWxl (填料, 刚性、球形、亲水硅胶; 7.8 mm×30 cm, 5 μ m); 流动相, A相为磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) [0.005 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液-0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (61:39)]; B相为乙腈; A:B=85:15。流速,

0.7 mL·min⁻¹; 检测波长, 254 nm; 柱温, 30 °C; 进样量, 20 μ L (色谱系统I)。稀释溶剂, 水; 样品浓度, 1.0 mg·mL⁻¹。用于HPSEC法分析聚合物杂质。

RP-HPLC 法 色谱柱, Phenomenex Gemini-C18 (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μ m); 流动相, 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐溶液 (取无水磷酸氢二钠 1.4 g 和无水磷酸二氢钾 1.4 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL, 用磷酸调至 pH 3.4) (A)-甲醇-乙腈 (1:1) (B)。梯度洗脱, 0~4.0 min, 4.0%~11.0% B; 4.0~5.0 min, 11.0% B; 5.0~11.0 min, 11.0%~13.0% B; 11.0~15.0 min, 13.0%~16.0% B; 15.0~30.0 min, 16.0%~20.0% B; 30.0~45.0 min, 20.0%~50.0% B; 45.0~46.0 min, 50.0%~4.0% B; 46.0~60.0 min, 4.0% B。流速, 1.0 mL·min⁻¹; 柱温, 30 °C; 检测波长, 254 nm (色谱系统II)。用于分析头孢他啶原料及制剂的指针性聚合物杂质。

柱切换-LC-MS-I 法 一维色谱系统, 同色谱系统 I, 进样体积增加至 100 μ L, 用于弱保留值杂质的分离。二维色谱系统, 色谱柱, Agilent, SB-C18 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μ m)。流动相, 0.5% 冰醋酸水溶液 (A)-0.5% 冰醋酸的乙腈溶液 (B); 梯度洗脱, 0~7 min, 100% A (脱盐处理); 7~27 min, 0~90.0% B; 27~37 min, 90.0% B; 37~38 min, 90.0%~0 B; 38~40 min, 100% A。柱温, 室温; 流速, 0.7 mL·min⁻¹。切换阀, 六通阀 A 和 B; 用于对 HPSEC 法分离的聚合物杂质进行脱盐处理、质谱定性研究。

柱切换-LC-MS-II 法 一维色谱系统, 同色谱系统 II, 进样体积增加至 40 μ L, 用于杂质的分离。二维色谱系统, 同柱切换-LC-MS-I 的二维色谱系统。用于对 RP-HPLC 色谱系统分离的聚合物杂质进行质谱研究。

质谱条件 (柱切换-LC-MS-I, II 的质谱方法) 扫描电压 (+) 3 000.0 V, 毛细管温度 (+) 350.0 °C, 鞘气 (+) 35 L·h⁻¹, 辅助气 (+) 10.00 L·h⁻¹, 最大喷雾电流 (+) 100.00, 探针加热器温度 (+) 350.00 °C, S-棱镜 RF 水平 50.00, 离子源为 HESI; 一级质谱方法, 正离子模式, 分辨率 70 000, 扫描范围 m/z 200~2 000; 二级质谱方法, 分辨率 17 500, 分离窗口 m/z 3.0, (N) CE 13 V, 缺省电荷状态 1。

溶液配制

头孢他啶降解浓溶液 取头孢他啶原料适量, 加蒸馏水溶解并稀释成浓度约为 10.0 mg·mL⁻¹ 的溶液 (以头孢他啶计), 在室温下放置 4 天后, 作为降解浓溶液储备液。然后量取 1.0 mL 上述溶液置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制成浓度约为 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。

头孢他啶原料溶液 取头孢他啶原料适量, 置于

10 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度约为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液(以头孢他啶计)。

注射用头孢他啶溶液 取注射用头孢他啶适量,置于10 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度约为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液(以头孢他啶计)。

方法学验证用溶液 同头孢他啶降解浓溶液。

方法学验证

检测限与定量限 精密量取方法学验证溶液,用水进行倍比稀释,得到不同浓度的系列溶液,量取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪。以头孢他啶对照品为外标,得到方法的最低定量限(LOQ)和最低检测限(LOD)。

重复性 精密量取方法学验证溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,连续进样3针,计算主要二聚体杂质的峰面积,以相对标准偏差RSD%表示。

耐用性 精密量取方法学验证溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,考察在不同柱温、流动相pH值和不同色谱柱条件下,聚合物杂质的分离情况。

结果与讨论

1 HPSEC法分析头孢他啶弱保留值杂质

本研究首先参照《中国药典》2015年版二部中头孢地嗪有关物质II的方法,对流动相的pH、缓冲盐的浓度、强溶剂比例与检测波长等因素进行了优化,最后建立了HPSEC法。然后采用该方法对头孢他啶降解浓溶液、头孢他啶原料和注射用头孢他啶进行了分析。结果显示,在头孢他啶降解浓溶液中检出5个弱保留值杂质HPSEC-1~5,其中弱保留值杂质HPSEC-1~4在头孢他啶主峰之前,HPSEC-5在主峰之后。按主成分自身对照法计算,在头孢他啶原料检出HPSEC-2~4,

含量为0.40%;注射用头孢他啶制剂中检出HPSEC-2~4,含量为0.45%。

2 柱切换-LC-MS法推定头孢他啶聚合物的化学结构

以头孢他啶降解浓溶液为供试品,采用柱切换-LC-MS-I法推定弱保留值杂质HPSEC-1~5的化学结构,杂质结构式见图1。

2.1 弱保留值杂质HPSEC-4

在弱保留值杂质HPSEC-4中检出了3个共流出杂质峰,按照色谱出峰顺序,分别命名为HPSEC-4a, 4b, 4c,质谱数据见表1。

在HPSEC-4a, 4b的全扫描质谱图中均存在 m/z 693.11 ($z=1$)、 m/z 347.06 ($z=2$)的加合离子峰,为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰和 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$ 峰,因此HPSEC-4a, 4b的分子质量为692 Da,比头孢他啶的分子质量多146 Da,初步推定为头孢他啶分子上取代了一个146 Da的取代基,上述两个杂质不属于聚合物杂质。二级质谱显示中性丢失吡啶的子离子 m/z 614 (m/z 693-79 Da)、中性丢失 CO_2 的子离子 m/z 570 (m/z 614-44 Da)、中性丢失CO的子离子 m/z 586 (m/z 614-28 Da),说明该两个杂质的3位侧链、四元内酰胺环、2位羧基未发生取代,因此推定取代位点在7位侧链上,确切化学结构还需要采用NMR等技术进行进一步研究。HPSEC-4a,4b的化学结构式见图1。

在HPSEC-4c的全扫描质谱图中存在 m/z 473.15 ($z=1$)的准分子离子,为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰,因此HPSEC-4c的分子质量为472 Da,比头孢他啶分子质量少74 Da,化学结构杂质有待于进一步研究,该杂质属于小分子杂质,不属于聚合物杂质。

Table 1 Mass spectra data of polymer impurities in ceftazidime degradation solution

Name HPSEC	Experimental M_f	Theoretical M_f	Error (ppm)	Formula	Full scan mass spectrum	Product ion (m/z)
4a, 4b	692.105 83	692.120 66	-14.8	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$	693.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 347.06 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	614.07, 586.07, 570.07, 542.08, 511.03, 423.02, 195.03, 167.03, 141.05
4c	472.149 87	-	-	-	473.15 $[\text{M}+\text{H}]^+$	413.13, 312.01, 275.11, 201.10, 161.11, 127.12
3a	546.106 26	5 46.099 14	13.0	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$	547.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$	468.06, 396.08, 277.02, 167.03
3b	1 031.173 83	1 031.166 64	7.0	$\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}_4$	1 032.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 516.59 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	953.13, 909.14, 892.12, 865.15, 848.13, 821.17, 804.14, 777.18, 486.07
3c, 3f	1 115.177 25	1 115.187 77	-9.4	$\text{C}_{43}\text{H}_{45}\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{S}_4$	1 116.18 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 558.59 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	1037.14, 993.15, 976.12, 965.15, 787.07
3d, 3e	1 013.163 15	1 013.156 08	7.0	$\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{S}_4$	1 014.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 507.59 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	935.12, 891.13, 874.11, 830.12, 780.12, 459.04
3g, 3h	1 541.255 49	1 541.244 65	7.0	$\text{C}_{61}\text{H}_{59}\text{N}_{17}\text{O}_{20}\text{S}_6$	1 542.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 771.63 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	1419.22, 1340.18, 1296.19, 1279.16, 1252.18, 1185.17, 847.14, 736.13
2a, 2c	1 159.167 60	1 159.177 60	-8.6	$\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{N}_{11}\text{O}_{19}\text{S}_4$	1 160.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 580.59 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	1081.13, 1037.14, 1020.11, 993.15, 614.07, 570.06, 424.07
2b	1 559.263 18	1 559.255 22	5.1	$\text{C}_{61}\text{H}_{61}\text{N}_{17}\text{O}_{21}\text{S}_6$	1 560.26 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 780.64 $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$	1481.22, 1437.23, 1358.19, 1314.20, 1297.18, 935.12, 891.13, 847.14, 830.12

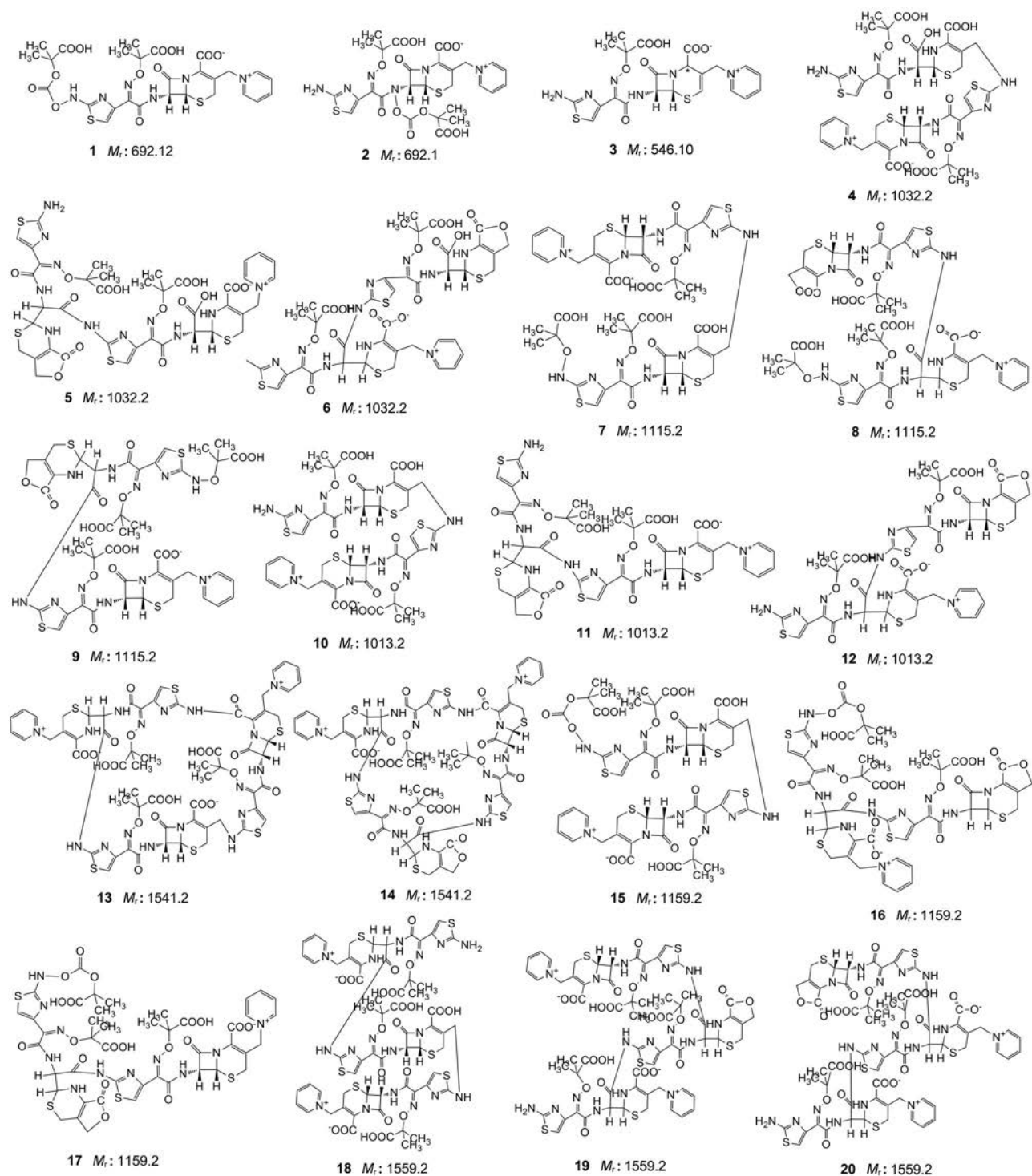


Figure 1 Chemical structures of poor retention impurities in degradation solution. 1, 2: HPSEC-4a, 4b; 3: HPSEC-3a; 4–6: HPSEC-3b; 7–9: HPSEC-3c, 3f; 10–12: HPSEC-3d, 3e; 13, 14: HPSEC-3g, 3h; 15–17: HPSEC-2a, 2c; 18–20: HPSEC-2b

2.2 弱保留值杂质 HPSEC-3

在弱保留值杂质 HPSEC-3 中检出了 8 个共流出杂质峰, 按照色谱出峰顺序, 分别命名为 HPSEC-3a~3h, 质谱数据见表 1。

在 HPSEC-3a 的全扫描质谱图中存在 m/z 547.11 ($z=1$) 的加合离子峰, 为 $[M+H]^+$ 峰, 因此 HPSEC-3a 的

分子质量为 546 Da, 与头孢他啶的分子质量相同, 初步推断为头孢他啶同分异构体, 参照 EP9.0 中记载的异构体杂质, 推定为头孢他啶 $\Delta 2$ 异构体, 化学结构式见图 1, 为小分子杂质, 不属于聚合物杂质。

在 HPSEC-3b 的全扫描质谱图中存在 m/z 1032.17 ($z=1$)、 m/z 516.6 ($z=2$) 的加合离子峰, 分别为 $[M+H]^+$ 、

[M+2H]⁺⁺峰, 因此 HPSEC-3b 的分子质量为 1 031 Da, 比头孢他啶二聚体的分子质量 1 013 Da 多 18 Da, 初步推定为头孢他啶二聚体水解物, 属于聚合物杂质。在 HPSEC-3b 的二级质谱图中, 存在中性丢失吡啶的子离子 m/z 953 ([M+H]⁺-79 Da), m/z 909 (m/z 953.1-44 Da)、 m/z 865 (m/z 909-44 Da)、 m/z 821 (m/z 865-44 Da)、 m/z 777 (m/z 821-44 Da) 等 4 个中性丢失 CO₂ 的子离子, 说明分子中存在一个吡啶取代基、多个游离羧基, m/z 892 (m/z 909-17 Da)、 m/z 848 (m/z 865-17 Da)、804 (m/z 821-17 Da) 等中性丢失 NH₃ 的子离子说明聚合物分子中存在一个伯氨基。基于头孢他啶二聚体的结构研究, 结合头孢菌素类抗生素的一般水解规律, 推定水解位点为四元内酰胺环, HPSEC-3b 的化学结构式见图 1。

在 HPSEC-3c, 3f 的全扫描质谱图中存在 m/z 1 116.18 ($z=1$)、 m/z 558.59 ($z=2$) 的加合离子峰, 分别为 [M+H]⁺、[M+2H]⁺⁺峰, 因此推测 HPSEC-3c, 3f 的相对分子质量为 1 115 Da, 比头孢他啶二聚体的分子质量 1 013 Da 多 102 Da, 二者互为同分异构体。二级质谱图中存在中性丢失吡啶的子离子 m/z 1 037 (m/z 1 116-79 Da), 中性丢失 CO₂ 的子离子 m/z 993 (m/z 1 037-44 Da), 中性丢失 NH₃ 的子离子 m/z 976 (m/z 993-17 Da)。初步推定为头孢他啶二聚体的 α 羟基异丁酸取代产物, 属于聚合物杂质, 命名为头孢他啶二聚体衍生物 II。化学结构式见图 1。

在 HPSEC-3d, 3e 的全扫描质谱图中存在 m/z 1 014.16 ($z=1$)、 m/z 507.59 ($z=2$) 的加合离子峰, 分别为 [M+H]⁺、[M+2H]⁺⁺峰, 因此 HPSEC-3d, 3e 的分子质量为 1 013 Da, 比头孢他啶的分子质量 2 倍少 79 Da, 初步推断为头孢他啶脱三位侧链形成的二聚体杂质, 二者互为同分异构体。在二级质谱图中可见, 中性丢失吡啶的子离子 m/z 935 (m/z 1 014-79 Da)、中性丢失 CO₂ 的子离子 m/z 891 (m/z 935-44 Da)、中性丢失 NH₃ 的子离子 m/z 874 (m/z 891-17 Da), 说明该杂质为头孢他啶聚合物, 分子中含有 1 个吡啶取代基、多个游离羧基和 1 个游离伯氨基。根据头孢菌素类抗生素发生聚合反应的机制, 初步推测聚合位点包括两种可能, ① 7 位的氨噻肟氨基进攻另一分子的三位侧链, 脱掉一分子吡啶取代基, 产生聚合; ② 7 位的氨噻肟氨基进攻另一分子的四元内酰胺环, 产生聚合, 然后脱掉一分子吡啶取代基。该杂质的化学结构式见图 1。

在 HPSEC-3g, 3h 的全扫描质谱图中存在 m/z 1 542.25 ($z=1$)、 m/z 771.63 ($z=2$) 的加合离子峰, 分别为 [M+H]⁺、[M+2H]⁺⁺峰, 因此 HPSEC-3g, 3h 的分子质量为 1 541 Da, 比头孢他啶三聚体的分子质量 (1 559 Da)

少 18 Da, 二者互为同分异构体。二级质谱图中存在两个中性丢失吡啶子离子 m/z 1 463 (m/z 1 542-79 Da) 和 m/z 1 340 (m/z 1 419-79 Da), 存在 m/z 1 296 等多个中性丢失 CO₂ 的子离子以及 m/z 1 279 等中性丢失 NH₃ 的子离子, 说明杂质分子中含有两个吡啶取代基, 含有游离羧基和氨基。基于头孢他啶二聚体化学结构, 推定 HPSEC-3g, 3h 为头孢他啶三聚体脱水物, 化学结构式见图 1。

2.3 弱保留值杂质 HPSEC-2

在弱保留值杂质 HPSEC-2 中检出了 3 个杂质峰, 按照色谱出峰顺序, 分别命名为 HPSEC-2a~2c, 质谱数据见表 1。

在 HPSEC-2a, 2c 的全扫描质谱图中存在 m/z 1 160.17 ($z=1$)、 m/z 580.59 ($z=2$) 的加合离子峰, 分别为 [M+H]⁺峰和 [M+2H]⁺⁺峰, 因此 HPSEC-2a 和 HPSEC-2c 的分子质量为 1 159 Da, 比头孢他啶二聚体 (1 013 Da) 的分子质量多 146 Da, 初步推定为头孢他啶二聚体分子上取代了一个 146 Da 的取代基, 命名为头孢他啶二聚体衍生物 I。这两个杂质的二级质谱图中均存在中性丢失吡啶的子离子 m/z 1 081 (m/z 1 160-79 Da)、中性丢失 CO₂ 的子离子 m/z 1 037 (m/z 1 081-44 Da)、中性丢失 NH₃ 的子离子 m/z 1 020 (m/z 1 037-17 Da), m/z 1 009 (m/z 1 037-28 Da) 说明该两个杂质的 3 位侧链、四元内酰胺环、2 位羧基未发生取代, 因此 146 Da 取代基的取代位点在 7 位侧链上, 聚合位点可能在三位侧链上, 或者在 4 元内酰胺环上。确切化学结构还需要采用 NMR 等技术进行进一步研究。HPSEC-2a 和 2c 的化学结构式见图 1。

在 HPSEC-2b 的全扫描质谱图中存在 m/z 1 560.26 ($z=1$)、 m/z 780.64 ($z=2$)、 m/z 520.8 ($z=3$) 的加合离子峰, 分别为 [M+H]⁺峰、[M+2H]⁺⁺峰、[M+3H]⁺⁺⁺峰, 因此 HPSEC-2b 的分子质量为 1 559 Da, 比头孢他啶二聚体 (1 013 Da) 的分子质量多 546 Da, 初步推定为头孢他啶三聚体。二级质谱图中存在中性丢失吡啶的子离子 m/z 1 481 (m/z 1 560-79 Da)、 m/z 1 358 (m/z 1 437-79 Da); 中性丢失 CO₂ 的子离子 m/z 1 437 (m/z 1 481-44 Da)、中性丢失 NH₃ 的子离子 m/z 1 297 (m/z 1 314-17 Da), 说明该杂质分子中含有两个吡啶取代基, 多个羧基。基于头孢他啶二聚体的化学结构, 推定出该杂质的化学结构式, 见图 1, 确切化学结构还需要采用 NMR 等技术进行进一步研究。

2.4 弱保留值杂质 HPSEC-1

在 HPSEC-1 中检出了 1 个杂质峰, 质谱数据显示该杂质的分子质量为 472 Da, 属于小分子杂质, 不属于聚合物杂质, 具体化学结构暂无法确定。

2.5 弱保留值杂质 HPSEC-5

该杂质经质谱分析, 未得到明显的质谱峰, 说明不是聚合物杂质, 推测为头孢他啶自身降解产生的小分子杂质吡啶。

3 HPSEC法分析聚合物杂质专属性分析

在头孢他啶主峰前的4个弱保留值杂质峰HPSEC-2,3中, 检出了头孢他啶二聚体、三聚体以及相关的降解产物。在HPSEC-1,4中检出其他小分子杂质。HPSEC法分析聚合物时, 能够检出聚合物杂质, 但是受到小分子杂质的共出峰干扰, 导致方法专属性较差, 定量不准确, 因此不适合用于头孢他啶原料与制剂的聚合物质控。HPSEC分析头孢他啶聚合物杂质的方法专属性较差, 因此本文建立了RP-HPLC法, 并采用柱切换-LC-MS-II法对RP-HPLC的专属性进行研究。

3.1 RP-HPLC法分析头孢他啶的聚合物杂质

在EP9.0年版头孢他啶有关物质测定方法的基础上, 将有机相由100%乙腈优化为乙腈-甲醇(1:1), 并通过调整梯度洗脱梯度的方法, 增强对聚合物杂质的

洗脱和分离能力, 在此基础上建立了分析聚合物的RP-HPLC法, 见RP-HPLC法, 优化后的RP-HPLC法分析头孢他啶降解浓溶液的典型色谱图见图2, 采用优化后方法可以分离出UNK-1~6等6个未知杂质峰。

3.2 RP-HPLC法分离聚合物杂质的方法学验证

3.2.1 专属性 采用柱切换-LC-MS-II法对优化后RP-HPLC系统分离的UNK-1~6等6个疑似聚合物杂质进行了质谱分析, 从而实现了对聚合物杂质进行精确定位, 见表2。结果表明, 6个杂质均为头孢他啶聚合物杂质及其衍生物, 其中杂质UNK-1、2、3、6的含量较高, 分别为头孢他啶二聚体衍生物I、二聚体、二聚体衍生物I异构体和头孢他啶三聚体, 可作为质量控制的指针性聚合物杂质, 杂质UNK-5、6含量较低, 为头孢他啶二聚体衍生物II及其异构体。上述聚合物杂质的化学结构为初步推测结构, 因为存在多个聚合位点和取代位点, 导致聚合物杂质存在多种异构体, 仅通过质谱法无法确证其化学结构, 需要进一步通过NMR法加以确证, 但是质谱法提供的分子质量信息能够确定这些杂质均是头孢他啶聚合物杂质。在头孢他啶原料与

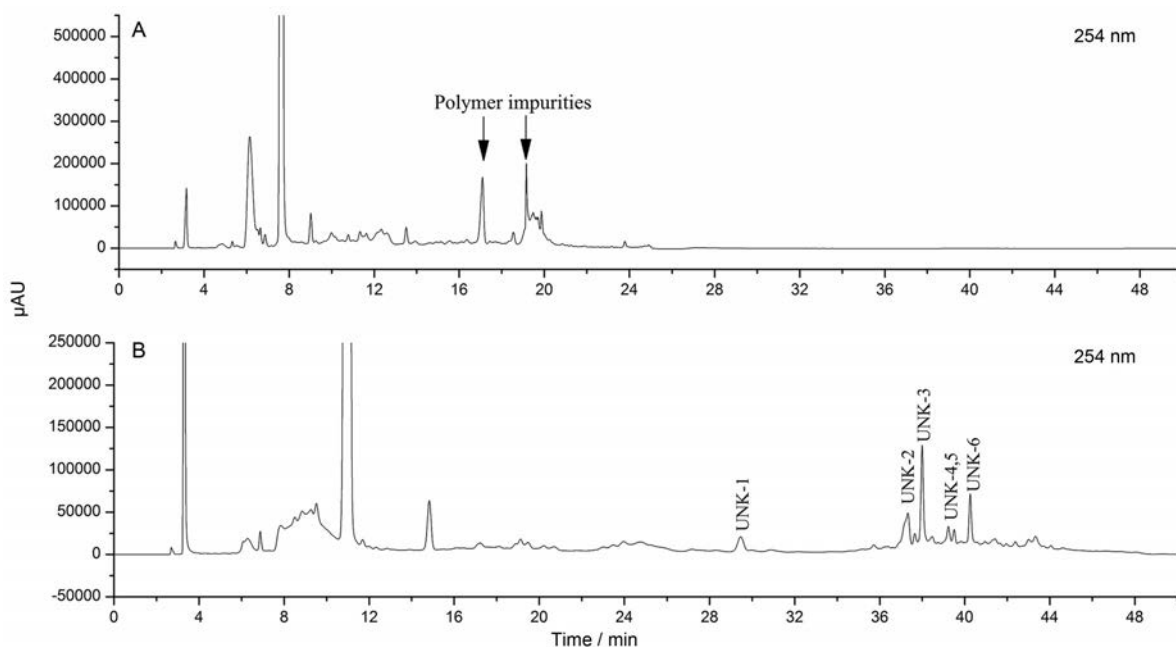


Figure 2 Typical Chromatograms of ceftazidime degradation solution by EP9.0 and optimized method. A: EP9.0 method; B: Optimized method

Table 2 Polymer impurities separated by RP-HPLC

No.	t_R /min	HPSEC identification	Experimental M_r	Theoretical M_r	Error (ppm)	Formula	Chemical structure
UNK-1	29.47	HPSEC-2	1 159.165 65	1 159.177 60	-9.8	$C_{44}H_{45}N_{11}O_{19}S_4$	Dimer derivative I (Figure 2: 15-17)
UNK-2	37.33	HPSEC-3	1 013.162 84	1 013.163 09	-0.5	$C_{39}H_{39}N_{11}O_{14}S_4$	Dimer (Figure 2: 10-12)
UNK-3	37.99	HPSEC-2	1 159.167 11	1 159.177 60	-8.9	$C_{44}H_{45}N_{11}O_{19}S_4$	Dimer derivative I isomer (Figure 2: 15-17)
UNK-4	39.23	HPSEC-3	1 115.177 61	1 115.187 77	-9.0	$C_{43}H_{43}N_{11}O_{17}S_4$	Dimer derivative II (Figure 2: 7-9)
UNK-5	39.49	HPSEC-3	1 115.176 51	1 115.187 77	-10.0	$C_{43}H_{43}N_{11}O_{17}S_4$	Dimer derivative II isomer (Figure 2: 7-9)
UNK-6	40.25	HPSEC-2	1 559.262 33	1 559.255 22	4.6	$C_{61}H_{61}N_{17}O_{21}S_6$	Trimer (Figure 2: 18-20)

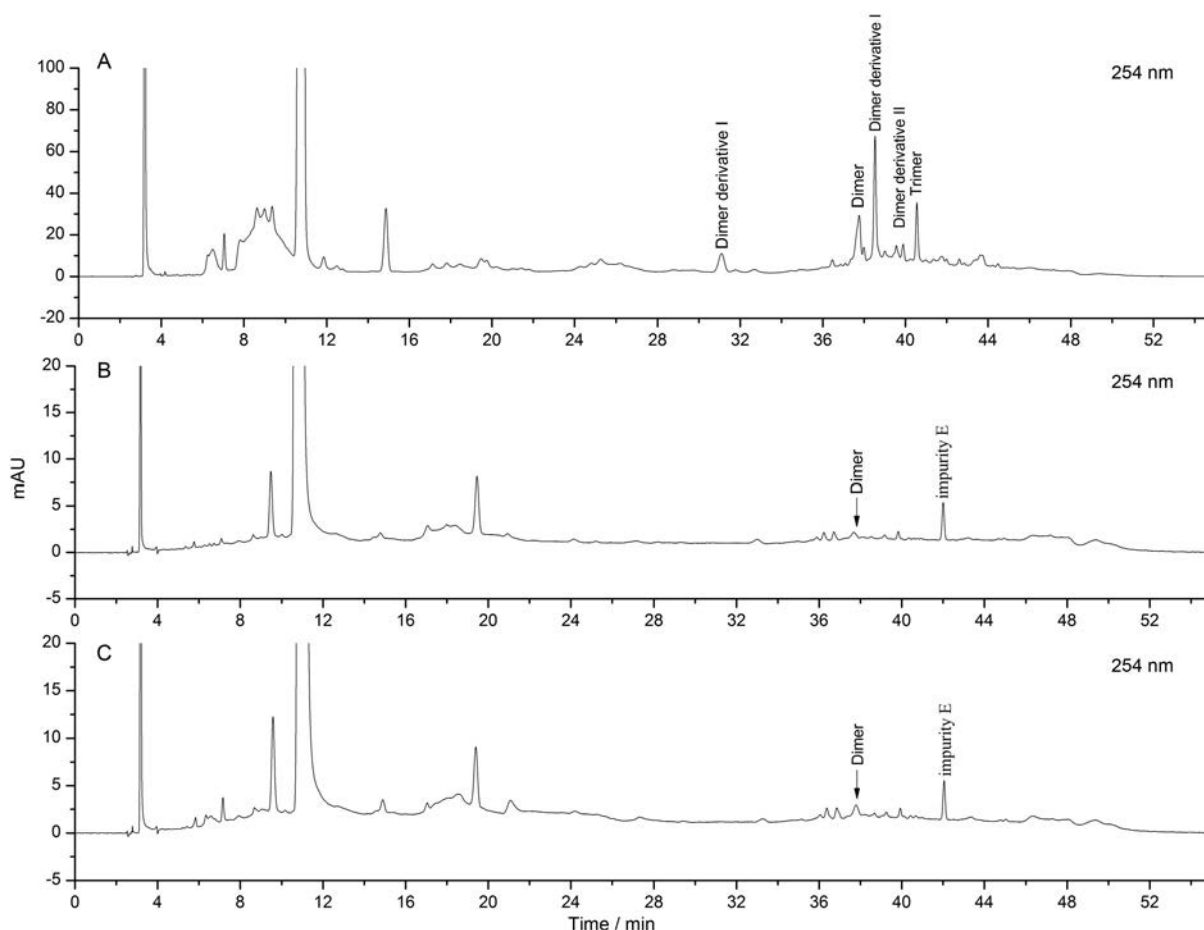


Figure 3 Typical Chromatograms of ceftazidime degradation solution, raw material and product by RP-HPLC. A: Degradation solution; B: Raw material; C: Product

制剂的典型色谱图中发现在头孢他啶三聚体后出现1个未知杂质峰($t_R=42.05$ min), 见图3。经质谱分析其分子质量为602 Da, 为小分子工艺杂质, 归属为EP 9.0的杂质E。因此, RP-HPLC法能够检出头孢他啶二聚体、二聚体衍生物, 头孢他啶三聚体, 各个杂质分离度良好, 方法专属性良好。

3.2.2 检测限与定量限 头孢他啶二聚体的LOQ为 3.0×10^{-3} μg ; LOD为 1.2×10^{-3} μg 。

3.2.3 重复性 头孢他啶二聚体衍生物I、二聚体、二聚体衍生物I异构体、三聚体的3次重复进样的RSD分别为0.97%、0.57%、0.74%、0.84%。

3.2.4 耐用性 当柱温、流动相pH值改变时, RP-HPLC法均可有效分离样品中的头孢他啶聚合物杂质。不同型号的色谱柱对聚合物杂质的分离能力不尽相同, Phenomenex Gemini色谱柱的分离效果较好。

3.3 聚合物分析结果比较

采用RP-HPLC法对头孢他啶原料和注射用头孢他啶进行聚合物分析, 见图3。结果显示, 头孢他啶原料和制剂中仅检出头孢他啶二聚体, 含量均为0.01%。

RP-HPLC法测得的聚合物含量明显低于HPSEC法, 进一步说明RP-HPLC法准确和专属性良好。

结论

本文综合运用高效凝胶色谱法(HPSEC)、柱切换-LC-MSⁿ法等现代色谱分析技术, 证明了HPSEC法分析头孢他啶原料聚合物杂质的方法专属性差, 新建立的RP-HPLC法分析头孢他啶聚合物杂质灵敏度高、专属性强, 可用于头孢他啶原料和制剂的聚合物杂质分析; 头孢他啶降解溶液可作为头孢他啶聚合物分析的系统适用性溶液。

作者贡献: 李进完成本文的实验和论文撰写; 姚尚辰和尹利辉协助完成本文实验; 许明哲对本文进行了修改, 并为本文的通讯人; 胡昌勤提出并指导本文实验思路与理念。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Jin SH. Research progress on cephalosporin allergic reaction [J]. World Notes Antibiot (国外药学·抗生素分册), 1984,5: 191-

- 197.
- [2] Jin SH. Allergic reaction of antibiotics-I allergic reaction of beta-lactam antibiotics [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 1986, 2: 251-257.
- [3] Jin SH, Hu CQ. Study on allergic reactions to beta-lactam antibiotics [J]. Bull Med Res (医学研究杂志), 2002, 31: 22-23.
- [4] Jin SH. A review on relationship between quality of β -lactam antibiotics and allergic reactions [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 1988, 13: 65-71.
- [5] Hu CQ, Jin SH. Research progress of polymer impurities in β -lactam antibiotics and their analytical technology [J]. World Notes Antibiot (国外药学: 抗生素分册), 1996, 17: 336-343.
- [6] Wang YY, Chen Y, Hong LY. Review on progresses of isolation and test methods for high-molecular weight polymer impurities in β -lactam antibiotics [J]. Chin Pharm Aff (中国药事), 2015, 29: 608-612.
- [7] Zhang Q, Yama MB, Aki HM, et al. Polymerization of cephalosporins in aqueous solution [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1996, 31: 306-312.
- [8] Niu CQ, Zhu SQ. Separation and determination of ampicillin polymers by high performance capillary electrophoresis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1997, 32: 207-209.
- [9] Hu CQ. Developments on analysis of polymers of β -lactam antibiotics [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2008, 17: 2098-2102.
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 Ed. Vol 2. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 240-242.
- [11] The United States Pharmacopeia [S]. 41 Ed. Roehville MD: the United States Pharmacopeial Convention Inc, 2018: 808-811.
- [12] European Pharmacopeia 9.0 [S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2017: 1996-1998.
- [13] Chen N, Cai HD, Yu ZM. Improvement of mobile phase in determining high molecular weight impurities of ceftazidime [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2002, 27: 63-64.
- [14] Liu YQ, Wu Q, Luo LJ. Determination of ceftazidime for injection by HPLC [J]. Her Med (医药导报), 2015, 6: 106-108.
- [15] Li J, Zhang PP, Chong XM, et al. Analysis of polymer impurities in co-amoxicillin and potassium clavulanate preparations [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2017, 37: 1430-1440.
- [16] Yang MQ, Jin SH, Hu CQ. Analysis of polymer impurities in related substances of benzylpenicillin sodium by HPLC-column-switching [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2009, 29: 1615-1620.
- [17] Li J, Zhang PP, Yao SC, et al. Analysis of polymer impurities in cefradine raw materials and preparations [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2019, 44: 362-369.
- [18] Li J, Zhang PP, Yao SC, et al. Analysis of polymer impurities in piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2019, 39: 1279-1294.