

注射用青霉素钠的聚合物杂质分析

李 进,姚尚辰,胡昌勤

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要] **目的:**建立注射用青霉素钠中聚合物杂质的分析方法。**方法:**采用水为溶剂制备青霉素钠的聚合物杂质溶液;采用高效分子排阻色谱法(HPSEC)和柱切换-LC/MSn法对聚合物杂质溶液的弱保留值杂质进行分离和结构鉴定,并评估高效凝胶色谱法分析聚合物杂质的专属性;采用C₁₈型反相色谱柱,以[磷酸盐缓冲液溶液(pH 3.4)-甲醇(72:14)]-乙腈为流动相进行梯度洗脱,建立RP-HPLC分析方法,并进行方法学验证。**结果:**在聚合物杂质溶液中鉴定出4种青霉素聚合物及其异构体,1种二聚体降解物以及若干小分子杂质;HPSEC法分离聚合物杂质时,小分子杂质与聚合物杂质共出峰,定量准确性与方法专属性差;RP-HPLC法分析能够检出3个指针性青霉素钠聚合物杂质峰,其中包含2种不同聚合方式形成的二聚体杂质。**结论:**HPSEC法不能对注射用青霉素钠的聚合物杂质进行有效质控,建立的RP-HPLC法分析注射用青霉素钠聚合物杂质的专属性良好、灵敏度高。

[关键词] 注射用青霉素钠;聚合物;杂质;柱切换-LC/MSn;高效凝胶色谱;二维色谱; β -内酰胺抗生素
[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)06-0629-09

Analysis of polymer impurities in penicillin sodium for injection

LI Jin, YAO Shang-chen, HU Chang-qin

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

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of polymer impurities in penicillin sodium for injection. **Methods:** Penicillin sodium was dissolved by water to prepare penicillin polymer stock solution. High performance size exclusion chromatography method (HPSEC) and column switching-LC/MSn method were used to separate and deduce the weak retention impurities in polymer impurity solution and the specificity of HPSEC method was evaluated. A RP-HPLC method for polymer analysis was established with a C₁₈ column, using gradient elution by the mixed solution [phosphate buffer solution (pH 3.4)-methanol (72:14)] and acetonitrile, and the RP-HPLC method was validated. **Results:** 4 polymers, their isomers, one dimer degradation and some small molecular impurities were identified in the polymer impurity solution. Polymer impurities were liable to be co-eluted with small molecular impurities by HPSEC method, which resulted in poor quantification accuracy and specificity. 3 indicative polymer impurities were detected by RP-HPLC method with effective specificity, including 2 dimers produced by different polymerized patterns. **Conclusion:** HPSEC cannot effectively control the polymer impurities of penicillin sodium for injection. The established RP-HPLC method has good specificity and high sensitivity for the determination of impurities in penicillin sodium polymer for injection.

[Key words] penicillin sodium for injection; polymer; impurity; column switch-LC/MSn; high performance size exclusion chromatography method; 2D-HPLC; β -lactam antibiotics

β -内酰胺类抗生素在生产、运输、存储过程中易产生聚合物杂质,从而诱发过敏反应,影响抗生素药物的临床用药安全^[1-4]。 β -内酰胺类抗生素按化学结构骨架可分为青霉素类和头孢菌素类,其中青霉

[基金项目] 中国食品药品检定研究院化药所重点实验室课题资助项目“抗生素药物杂质分析技术平台的建立与应用”(1030050090129)

[作者简介] 李进,男,主任药师,主要从事抗生素药物的杂质谱研究。联系电话:(010)53851560,E-mail:medjinli@126.com。

[通讯作者] 姚尚辰,女,主任药师,主要从事抗生素药物的质量控制研究。联系电话:(010)53851535,E-mail:yaoshangchen@nifdc.org.cn。

素类抗生素分子中的四元内酰胺环不稳定,容易受到临近药物分子的亲核进攻,发生分子间的聚合反应,生成聚合物杂质。

注射用青霉素钠是一种临床用药广泛的抗感染药物,化学结构见图 1。《中华人民共和国药典》自 2015 年版以来采用 G10 凝胶色谱法对其进行聚合

物质控^[5]。据文献报道,杨美琴等^[6]采用 HPLC-柱切换色谱法归属了注射用青霉素钠中的聚合物杂质。《中华人民共和国药典》2020 年版在青霉素钠有关物质项下对 1 种青霉素二聚体进行了质控^[7],但目前仍然缺乏采用 RP-HPLC 法分析注射用青霉素钠的聚合物的系统研究。

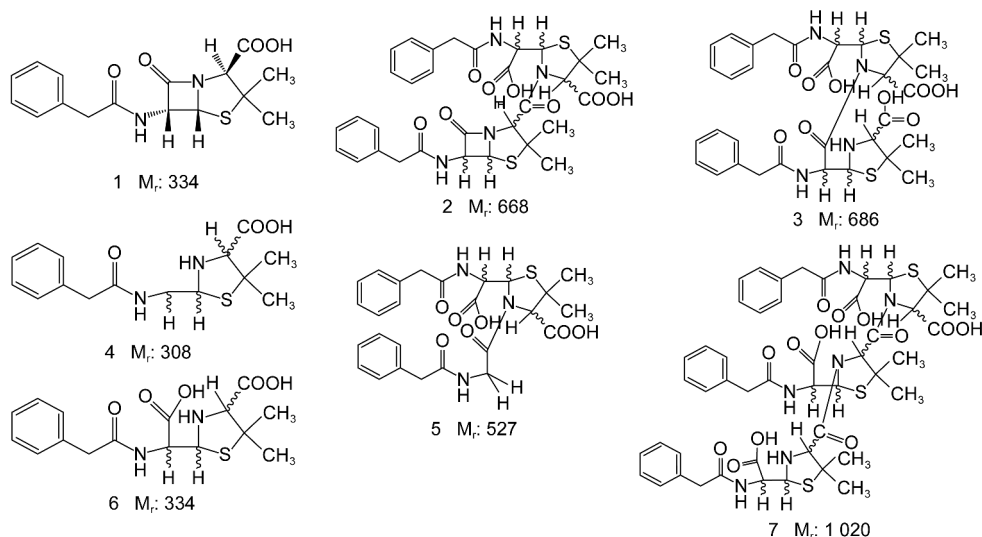


图 1 聚合物杂质溶液中聚合物及小分子杂质的推测化学结构

在前期研究中,课题组采用 RP-HPLC 法分析了多种 β -内酰胺类抗生素的聚合物杂质^[8-17]。本研究首先建立高效分子排阻色谱法 (HPSEC),然后综合运用柱切换-LC/MSn 技术和 2D-HPLC 技术对 HPSEC 法分析聚合物杂质的专属性进行研究;最后以《中华人民共和国药典》2020 年版收录的青霉素钠有关物质分析方法为基础,以降解产生的聚合物浓溶液作为聚合物杂质溶液,建立 RP-HPLC 法对注射用青霉素钠中的指针式聚合物杂质进行精准质控。

材料与方法

1 仪器

Summit 100 型 2D-HPLC 色谱系统,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,工作站为 Chromeleon 7.2 SR5 版(美国 Thermo 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 Xcalibur 2.3 版。

2 样品与试剂

注射用青霉素钠(中国食品药品检定研究院提供,批号:F1062107);乙腈、甲醇(美国 Thermo Fisher 公司,色谱纯);无水磷酸氢二钠(国药集团化学试剂公司提供,批号:20181025,分析纯);磷酸(国药集团化学试剂公司提供,批号:20180902,分析纯);水为屈臣氏纯净水。

3 HPSEC 法

色谱柱:TSK-gel G2000SWxl 柱(填料:刚性、球形、亲水硅胶,30 cm × 7.8 mm,5 μ m);流动相 A 相:0.02 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 7.0,0.02 mol·L⁻¹磷酸氢二钠溶液,用磷酸调节 pH 至 7.0),B 相:乙腈,A:B = 85:15,等度洗脱;流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:225 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L;稀释溶剂:水;样品浓度:4.0 mg·mL⁻¹(以青霉素钠计)。用于分离注射用青霉素钠的弱保留值杂质。

4 RP-HPLC 法

色谱柱:CAPCELL MGII C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μ m);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:225 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相 A 相:磷酸盐缓冲液(取 10.6 g 无

水磷酸二氢钾,加水 1 000 mL 溶解,用磷酸调节 pH 至 3.4)-甲醇(72:14),流动相 B 为乙腈,进行线性梯度洗脱(0~17.0 min,13.5% B;17.0~41.0 min,13.5%~36% B;41.0~47.0 min,36% B;47.0~52.0 min,36%~50% B;52.0~57.0 min,50%~55% B;57.0~58.0 min,55%~13.5% B;58.0~70.0 min,13.5% B)。用于分析注射用青霉素钠的指针性聚合物杂质。

5 2D-HPLC 法

色谱系统 I 同 HPSEC 法;色谱系统 II 同 RP-HPLC 法。工作流程:① 将切换阀设为 A 位置,采用色谱系统 I 分离供试品中的弱保留值杂质,同时采用色谱系统 II 对 C₁₈ 色谱柱进行预平衡。② 当采用色谱系统 I 分离的目标杂质出峰后,将切换阀设为 B 位置。③ 采用色谱系统 II 将柱后定量环中的目标杂质洗脱至第 2 根色谱柱中,并采用色谱系统 II 进行分离分析。用于在 RP-HPLC 色谱系统中定位聚合物杂质。

6 柱切换-LC/MSn-I 法

色谱系统 III:同 HPSEC 法,进样体积增加至 50 μ L,用于分离供试品中的弱保留值杂质。

色谱系统 IV:色谱柱采用 Agilent SB-C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。流动相:A 相为含有 0.5% 甲酸的水溶液;B 相为含有 0.5% 甲酸的乙腈溶液。梯度洗脱:0.0~5.0 min,0% B(脱盐处理);5.0~27.0 min,80% B;27.0~37.0 min,80% B;37.0~38.0 min,0% B;38.0~40.0 min,0% B。柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:0.7 mL \cdot 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及质谱定性研究。

7 柱切换-LC/MSn-II 法

色谱系统 V:同 RP-HPLC 法,进样体积增加至 70 μ L,用于指针性聚合物杂质的分离。

色谱系统 VI:同色谱系统 IV。用于对 RP-HPLC 法分离的聚合物杂质进行质谱分析。

8 质谱条件(“6”和“7”项的质谱方法)

调谐方法:扫描电压(+) 3 kV,毛细管温度(+) 350 $^{\circ}$ C,鞘气(+) 35,辅助气(+) 10,最大喷雾电流(+) 100.00,探针加热器温度(+) 350 $^{\circ}$ C,S-棱镜 RF 水平 50,离子源为 HESI。一级质谱方法:正离子模式,分辨率 17 500,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:10 V,缺省电荷状态 1。

9 方法学验证

9.1 方法专属性

精密量取聚合物杂质溶液、酸降解溶液、碱降解溶液、水浴降解溶液、氧化降解溶液、UV 降解溶液、高温降解溶液进样分析,在色谱图中聚合物杂质应不受其他小分子降解杂质的干扰。

9.2 方法定量限与检测限

精密量取聚合物杂质溶液,用水进行倍比稀释,得到不同浓度的系列溶液,注入液相色谱仪。采用青霉素钠对照品为外标,分别以基线噪音的 10 和 3 倍为指标,计算方法的最低检测限(LLOD)和最低定量限(LLOQ)。

9.3 溶液稳定性实验

取聚合物杂质溶液 20 μ L,分别在 0,1,2,3,6,10 h 进样分析,计算注射用青霉素钠中指针性聚合物峰面积的变化情况。

9.4 重复性实验

取聚合物杂质溶液,冷冻干燥,然后分别称取 3 份冻干粉,每份约 40 mg(以青霉素钠计),置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制成浓度约为 4 mg \cdot mL⁻¹的溶液,作为重复性测定溶液。以 3 种聚合物杂质峰的峰面积百分比为指标,评价分析方法的重复性。

9.5 耐用性实验

精密量取聚合物杂质溶液 20 μ L,注入液相色谱仪,考察在不同柱温、流速和不同色谱柱条件下,聚合物杂质的分离情况。

10 溶液配制

聚合物杂质溶液:取注射用青霉素钠约 1 000 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 5 mL 水溶解,制成浓度约为 200 mg \cdot mL⁻¹的溶液(以青霉素钠计),在室温下(30 \pm 2) $^{\circ}$ C 遮光放置 16 h 后,在 -70 $^{\circ}$ C 条件下冷冻干燥 24 h,将冻干后的粉末作为聚合物杂质对照品。然后称取上述对照品约 20 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水 5 mL 溶解,制成浓度约为 4 mg \cdot mL⁻¹的溶液,作为聚合物杂质溶液。

强制降解实验储备液:称取注射用青霉素钠供试品约 200 mg,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释到刻度,摇匀备用。

酸降解溶液:量取强制降解实验储备液 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,然后加入 1.0 mL 的 0.01 mol \cdot L⁻¹的盐酸溶液,在室温放置 20 min 后,加入 0.01 mol \cdot L⁻¹的氢氧化钠溶液,摇匀备用。

碱降解溶液:量取强制降解实验储备液 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,然后加入 1.0 mL 的 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液,在室温放置 10 min 后,加入 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液,摇匀备用。

水浴降解溶液:量取强制降解实验储备液 10 mL,置于 10 mL 量瓶中,在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 50 min,取出放冷到室温,备用。

氧化降解溶液:量取强制降解实验储备液 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,然后加入 1 mL 的 10% 双氧水,在室温下放置 10 min,摇匀,备用。

UV 降解溶液:量取强制降解实验储备液 10 mL,将其转移到表面皿中,在 254 nm 波长紫外灯下照射 18 h。

高温降解溶液:取注射用青霉素钠样品 1 瓶,置于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,加热 18 h 后取出,放冷。称取高温降解样品约 40 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为高温降解溶液。

供试品溶液:称取注射用青霉素钠适量,置于 10 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度约为 $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液(以青霉素钠计)。

结 果

1 HPSEC 法分析弱保留值杂质

青霉素钠为离子型化合物,在 HPSCE 法中的色谱保留行为易随着流动相强溶剂的比例、缓冲液的 pH 值、缓冲盐的浓度改变而发生变化。所以本研究对流动相系统中有机相乙腈的比例(5%, 10%, 15%)、缓冲盐的 pH 值(5.0, 6.0, 7.0)、缓冲盐浓度($0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)等色谱参数进行了优化,见图 2~图 4。

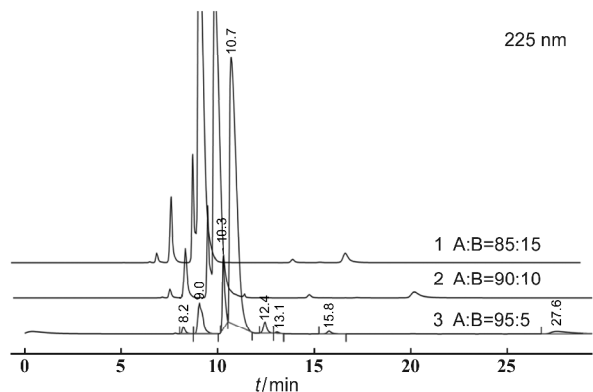


图 2 聚合物杂质溶液在不同强溶剂比例条件下的典型 HPSEC 图

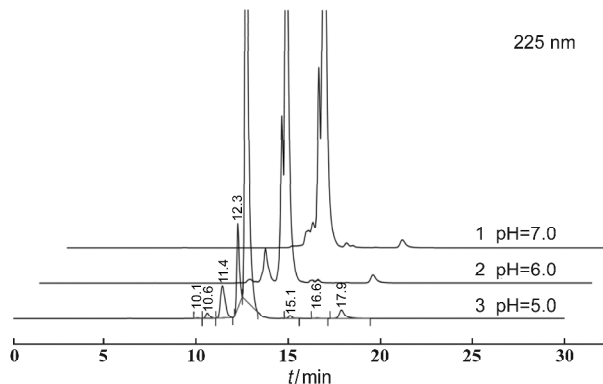


图 3 不同缓冲液 pH 值条件下的典型 HPSEC 图

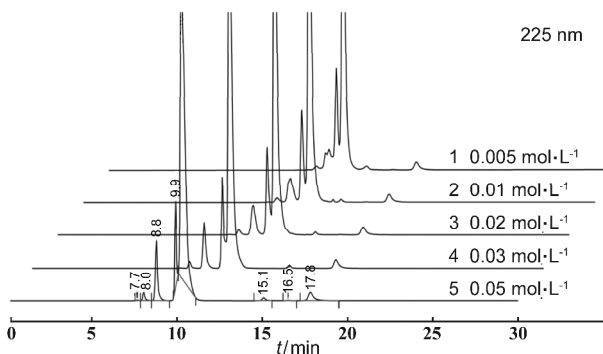


图 4 聚合物杂质溶液在不同缓冲液浓度条件下的典型 HPSEC 图

研究表明,当强溶剂乙腈的比例由 5% 增加至 15% 时,青霉素钠主峰与邻近杂质 HPSEC-4 的分离度由 0.95 增加到 0.98,弱保留值杂质的色谱峰对称性明显改善;当缓冲盐的浓度由 $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高至 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,青霉素钠主峰与邻近杂质的分离度由 0.98 增加至 1.40,继续升高缓冲盐浓度至 0.03 和 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,弱保留值杂质的峰型出现肩峰,分离效果变差;随着磷酸盐缓冲液的 pH 值由 7.0 变化到 5.0,青霉素钠主峰前的 4 个弱保留值杂质峰的分离度逐渐降低,逐渐融合为一个多重肩峰,说明缓冲液的 pH 值降低不利于弱保留值杂质的分离;当 pH 增加到 8.0 时,青霉素钠易发生降解反应,不适合作为流动相。因此,最终选择 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-乙腈(85:15)作为注射用青霉素钠的 HPSEC 法流动相系统。聚合物杂质溶液的分析结果显示,青霉素钠主峰前主要存在 4 个弱保留值杂质峰 HPSEC-1~HPSEC-4($t_{\text{R}} = 10.1, 10.6, 11.4, 12.3 \text{ min}$)。用该方法对注射用青霉素钠进行分析,检出弱保留值杂质 HPSEC-1,

HPSEC-2 和 HPSEC-3, 杂质峰总含量为 0.1%, 见图 5。

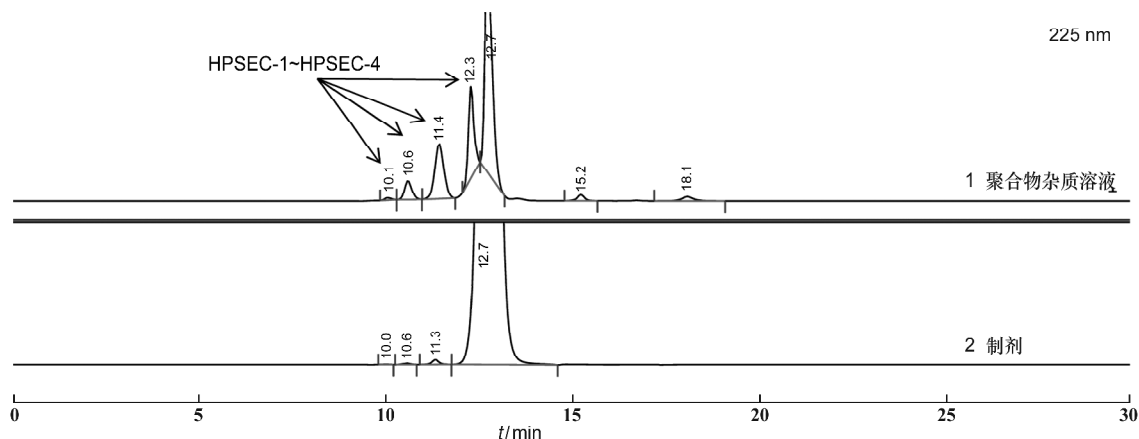


图 5 HPSEC 法分析注射用青霉素钠的典型色谱图

2 柱切换-LC/MSn 法推定弱保留值杂质的化学结构

以注射用青霉素钠聚合物杂质溶液为供试品, 采用 HPSEC 法分离得到弱保留值杂质 HPSEC-1 ~ HPSEC-4, 见图 5, 然后采用柱切换-LC/MSn-I 法推定各组分的化学结构, 结果见表 1, 推定的化学结构见图 1。上述研究表明, 注射用青霉素钠聚合物杂

质溶液的弱保留值杂质中含有青霉素三聚体、二聚体 I 及其异构体、二聚体 II 及其降解物, 同时也含有小分子降解杂质青霉素开环水解物、青霉素开环水解脱羧物、青霉素同分异构体; HPSEC 法分析注射用青霉素钠的聚合物杂质时, 聚合物杂质与小分子杂质共出峰, 不能反映聚合物杂质的实际含量, 方法专属性不足。

表 1 HPSEC 法分离的主要杂质列表

杂质名称	相对分子量 (M_r)	分子式	加合离子	特征子离子	归属	化学结构
HPSEC-1a	1 020	$C_{48}H_{56}N_6O_{13}S_3$	$1\ 021.1[M+H]^+$	844, 687, 669, 510, 353, 160	三聚体	图 1(No. 7)
HPSEC-2a	668	$C_{32}H_{36}N_4O_8S_2$	$669.1[M+H]^+$	640, 632, 335, 289, 158	二聚体 I	图 1(No. 2)
HPSEC-2b	686	$C_{32}H_{38}N_4O_9S_2$	$687.2[M+H]^+$	643, 633, 528, 353, 335, 309, 160	二聚体 II	图 1(No. 3)
HPSEC-3a	308	$C_{15}H_{20}N_2O_3S$	$309.1[M+H]^+$	286, 263, 174, 128, 100	脱羧物	图 1(No. 4)
HPSEC-3b	353	$C_{16}H_{20}N_2O_5S$	$354.1[M+H]^+$	263, 217, 174, 160, 128	开环水解物	图 1(No. 6)
HPSEC-3c	512	—	$513.1[M+H]^+$	433, 390, 335, 217, 176, 158	未知杂质	—
HPSEC-3d	668	$C_{32}H_{36}N_4O_8S_2$	$669.2[M+H]^+$	633, 494, 433, 173, 158	二聚体 I 异构体	图 1(No. 2)
HPSEC-4a	334	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	$335.1[M+H]^+$	301, 289, 203, 159	青霉素同分异构体	—
HPSEC-4b	334	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	$335.1[M+H]^+$	289, 176, 160, 128, 100	青霉素	图 1(No. 1)

3 建立 RP-HPLC 法分离聚合物杂质

本研究在《中华人民共和国药典》2020 年版收载的注射用青霉素钠的有关物质分析方法的基础上, 通过增加强溶剂比例、延长洗脱时间对方法进行局部优化, 建立了聚合物分析 RP-HPLC 法。

3.1 2D-HPLC 法归属 RP-HPLC 法分离的聚合物

杂质

采用 2D-HPLC 法, 将聚合物杂质溶液中的弱保留值杂质 HPSEC-1 ~ HPSEC-4 切换至 C_{18} 色谱柱中进行分析, 并与聚合物杂质溶液的典型 RP-HPLC 色谱图进行比较, 见图 6。

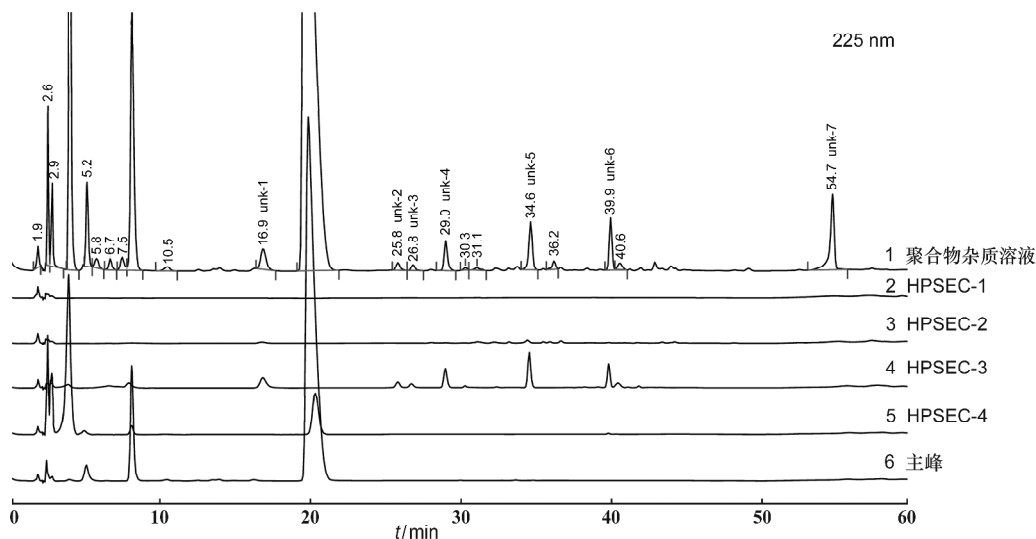


图6 聚合物杂质溶液的典型2D-HPLC图

聚合物杂质溶液的色谱图显示,青霉素主峰在19.7 min出峰;青霉素主峰前0~10 min区间检出6个杂质峰($t_R = 2.6, 2.9, 5.2, 8.1, 16.9$ min);在青霉素主峰后检出6个主要杂质峰($t_R = 25.8, 26.8, 29.0, 34.6, 39.9, 54.7$ min),参考《中华人民共和国药典》2020年版青霉素有关物质系统适用性图谱,初步推测 unk-1~unk-7 可能含有聚合物杂质。

弱保留值杂质峰 HPSEC-1 在 RP-HPLC 系统中未检出明显的杂质峰,这可能是因为在 HPSEC-1 在聚合物杂质溶液中的含量过低造成的;HPSEC-2 中主要检出了若干个不明显的杂质峰,其中包括 unk-1, unk-4 和 unk-5 之间的若干个小杂质峰;HPSEC-3 中检出了6个主要杂质峰,包括 unk-1~unk-6。HPSEC-4 中检出了3个小分子杂质峰($t_R = 2.6, 4.4, 9.1$ min)。青霉素钠主峰中除了主组分青霉素

外,还检出了2个小分子杂质($t_R = 5.1, 8.1$ min)。

2D-HPLC 法研究表明,在 HPSEC 系统分离的青霉素钠的4个弱保留值杂质中,含有多种小分子杂质,进一步佐证了 HPSEC 法分析注射用青霉素钠中聚合物杂质的方法专属性不足,并且提示 unk-1~unk-7 中可能含有聚合物杂质。

3.2 RP-HPLC 法分离的杂质结构研究

采用 RP-HPLC 法对聚合物杂质溶液进行分析,在主峰前后检出了7个明显的杂质峰,推测其中可能含有聚合物杂质。为了进一步归属这些聚合物杂质并且指定指针性聚合物杂质,本研究采用柱切换-LC/MSn-II 对分离的疑似聚合物杂质(unk-1~unk-7)进行结构推定,典型色谱图见图7,特征性聚合物杂质的二级质谱图见图8。unk-1~unk-7 的推测化学结构式见图1,杂质化学结构归属见表2。

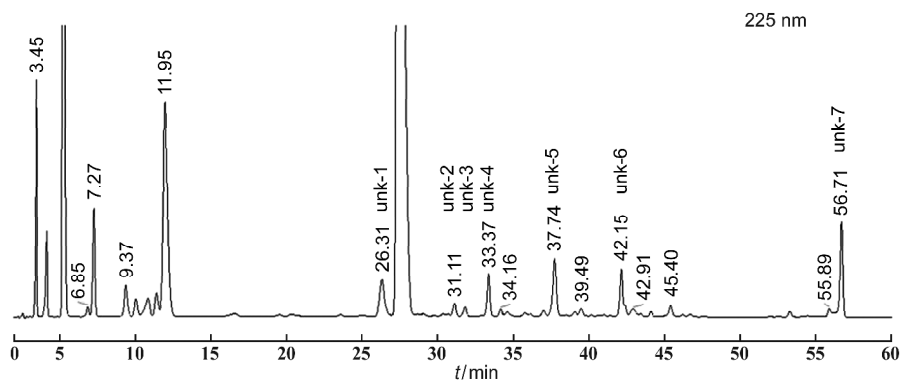


图7 RP-HPLC 法分析聚合物杂质溶液的典型色谱图

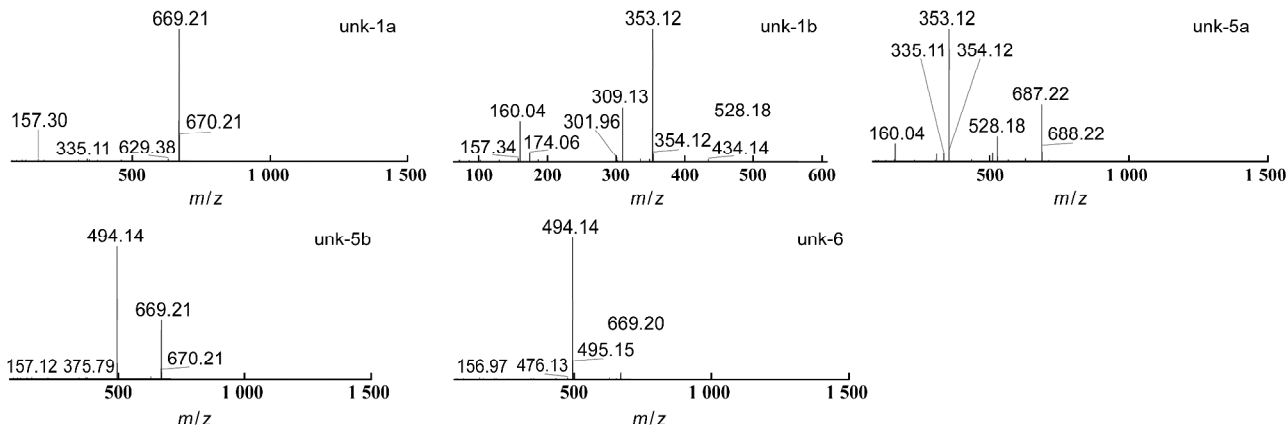


图 8 RP-HPLC 法分离的聚合物杂质二级质谱图

表 2 RP-HPLC 法分离的杂质一览表

杂质名称	相对分子量 (M_r)	分子式	加合离子	特征子离子	归属	化学结构
unk-1a	668	$C_{32}H_{36}N_4O_8S_2$	$669.2[M+H]^+$	629,335,157	二聚体 I	图 1 (No. 2)
unk-1b	527	$C_{26}H_{29}N_3O_7S$	$528.2[M+H]^+$	353,309,174,160	二聚体 II 降解物	图 1 (NO.5)
unk-2	527	$C_{26}H_{29}N_3O_7S$	$528.2[M+H]^+$	510,353,309,160	二聚体 II 降解物	图 1 (NO.5)
unk-3	527	$C_{26}H_{29}N_3O_7S$	$528.1[M+H]^+$	353,309,174,160	二聚体 II 降解物	图 1 (NO.5)
unk-4	527	$C_{26}H_{29}N_3O_7S$	$528.1[M+H]^+$	392,353,160	二聚体 II 降解物	图 1 (NO.5)
unk-5a	686	$C_{32}H_{38}N_4O_9S_2$	$687.2[M+H]^+$	528,353,335,160	二聚体 II	图 1 (No. 3)
unk-5b	668	$C_{32}H_{36}N_4O_8S_2$	$669.2[M+H]^+$	494,157	二聚体 I 异构体	图 1 (No. 2)
unk-6	668	$C_{32}H_{36}N_4O_8S_2$	$669.1[M+H]^+$	494,157	二聚体 I 异构体	图 1 (No. 2)
unk-7	316	—	$316.1[M+H]^+$	289,257,239,215,171	青霉素降解物	—

3.3 RP-HPLC 法分离聚合物杂质的方法学验证

为了保证建立的方法灵敏、准确、耐用,本研究对 RP-HPLC 法进行了方法学验证。

3.3.1 专属性实验 为了进一步验证聚合物杂质

的出峰位置不受小分子杂质干扰,本研究对注射用青霉素钠的 6 种强制降解溶液进行了分析,见图 9。结果在 3 个指针性聚合物杂质的出峰位置未发现小分子干扰峰,以上分析进一步证明了方法的专属性。

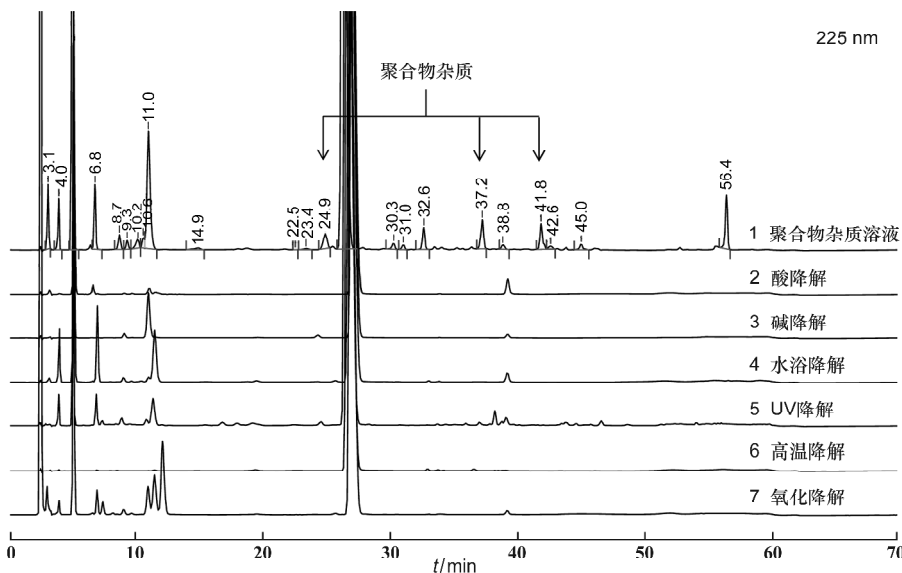


图 9 RP-HPLC 法分析聚合物杂质溶液和强制降解溶液的典型色谱图



3.3.2 LLOD 与 LLOQ 结果表明,青霉素二聚体 I + 二聚体降解物(unk-1)、青霉素二聚体 I 异构体 + 二聚体 II (unk-5)、青霉素二聚体 I 异构体(unk-6)等 3 个聚合物杂质峰的 LLOQ 和 LLOD 基本一致, LLOQ 分别为 7.78×10^{-3} , 1.11×10^{-2} , $7.43 \times 10^{-3} \mu\text{g}$; LLOD 分别为 4.47×10^{-4} , 1.43×10^{-3} , $1.34 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。

3.3.3 溶液稳定性实验 青霉素聚合物在 3 h 内稳定,建议实际样品测定时,临用前配制溶液,即溶即进。

3.3.4 重复性实验 按峰面积归一化法计算,3 次平行取样测定得到的二聚体 I + 二聚体降解物的峰面积百分比为 1.18% (RSD = 0.49%)、二聚体 I 异构体 + 二聚体 II 的峰面积百分比为 1.66% (RSD =

0.35%)、二聚体 I 异构体的峰面积百分比为 1.41% (RSD = 0.01%),说明该方法的重复性良好。

3.3.5 耐用性实验 当柱温(32 °C, 34 °C, 36 °C)、流速(0.9, 1.0, 1.1 mL·min⁻¹)改变时,RP-HPLC 法均可有效分离样品中的聚合物杂质。不同型号的色谱柱对聚合物杂质的分离能力差异较大,CAPCELL MGII C₁₈ 和 Kromasil C₁₈ 色谱柱可以较好地分离样品中的青霉素聚合物杂质。

3.4 RP-HPLC 法分析供试品的聚合物含量

采用 RP-HPLC 法分析供试品的聚合物杂质,见图 10。以已定位的 3 个二聚体色谱峰为指针性聚合物杂质,按主成分自身对照法计算聚合物的含量,结果显示,在注射用青霉素钠制剂中未检测到明显的聚合物杂质峰,即聚合物杂质的含量低于检出限。

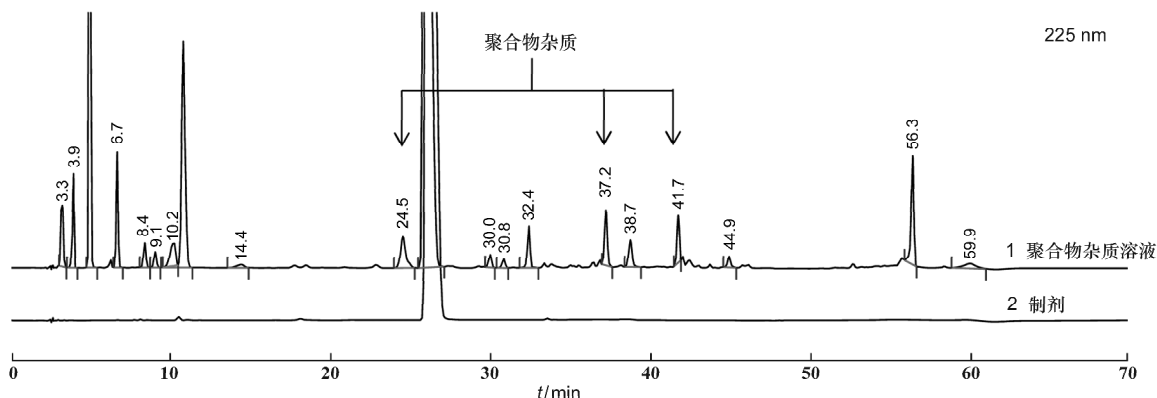


图 10 RP-HPLC 法分析聚合物杂质溶液和制剂的典型色谱图

讨 论

本文综合运用 HPSEC 法、RP-HPLC 法、2D-HPLC 法、柱切换-LC/MSn 法等分析技术,证明了 HPSEC 法分析注射用青霉素钠聚合物杂质的方法专属性差,易受到小分子杂质的共出峰干扰;RP-HPLC 法分析青霉素钠聚合物杂质专属性好、方法准确、耐用性好,借助 3 种指针性青霉素二聚体杂质可对注射用青霉素钠样品中的聚合物杂质进行精准质控。

[参 考 文 献]

- [1] 金少鸿. 头孢菌素过敏反应的研究进展[J]. 国外药学(抗生素分册), 1984, 5(3): 191-197.
- [2] 金少鸿. 抗生素的过敏反应: I. β -内酰胺类抗生素的过敏反应[J]. 中国临床药理学杂志, 1986, 2(4): 251-257.

- [3] 金少鸿, 胡昌勤, 仇士林, 等. β 内酰胺类抗生素过敏反应的研究[J]. 医学研究通讯, 2002, 31(4): 22-23.
- [4] 金少鸿. β -内酰胺类抗生素的质量和过敏反应关系的评述[J]. 抗生素, 1988, 13(1): 65-71.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 596-599.
- [6] 杨美琴, 金少鸿, 胡昌勤. HPLC-柱切换法归属青霉素钠有关物质中的聚合物分析[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1615-1620.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 732-736.
- [8] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢克肟原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2442-2448.
- [9] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢他啶原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 药学学报, 2020, 55(8): 1889-1896.
- [10] 李进, 张培培, 崇小萌, 等. 阿莫西林克拉维酸钾复方制剂中聚合物杂质的分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1430-1440.
- [11] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢噻肟钠原料的聚合物杂质

- 分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(9): 883 - 892.
- [12] 李进, 张培培, 姚尚辰, 等. 头孢拉定原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(3): 362 - 369.
- [13] 李进, 张培培, 姚尚辰, 等. 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠的聚合物杂质分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1279 - 1294.
- [14] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢地尼原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(10): 1005 - 1016.
- [15] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 盐酸头孢甲肟原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(1): 169 - 179.
- [16] 杜玮炜, 赖焯才. 头孢丙烯制剂中聚合物杂质分析方法的探索[J]. 今日药学, 2021, 31(12): 922 - 926, 931.
- [17] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 注射用头孢西丁钠的聚合物杂质分析[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(11): 1038 - 1047.
- [18] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 注射用头孢他啶阿维巴坦钠的聚合物杂质分析[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(12): 1117 - 1125.
- [19] 崇小萌, 田冶, 姚尚辰, 等. 注射用头孢硫脒聚合物杂质分析[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(24): 2008 - 2016.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-09-03