·实验研究·

注射用头孢硫脒聚合物检测方法比较及聚合物杂质分析

崇小萌,田　冶,姚尚辰,尹利辉,刘　颖,许明哲
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要]　**目的**:本研究采用不同的方法对注射用头孢硫脒中聚合物杂质进行分析,比较不同方法专属性的优劣。**方法**:分别采用葡聚糖凝胶 G10 系统、高效凝胶色谱系统以及柱切换液质联用系统对 11 个厂家的注射用头孢硫脒中聚合物进行分析。**结果**:葡聚糖凝胶 G10 系统并未检出聚合物,高效凝胶色谱系统可检出聚合物,采用柱切换液质联用方法对高效凝胶色谱系统分离的组分进行了结构确认。**结论**:柱切换液质联用方法证明了注射用头孢硫脒中存在多种聚合物杂质,葡聚糖凝胶 G10 系统以及高效凝胶色谱系统专属性较差,无法将大分子聚合物和小分子杂质进行分离和定性,为进一步建立专属性更好的方法奠定了基础。

[关键词]　注射用头孢硫脒;聚合物;柱切换液质联用
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)14－1334－06

Comparison of different polymer detection methods and analysis of polymer impurities of cefathiamidine for injection

CHONG Xiao-meng, TIAN Ye, YAO Shang-chen, YIN Li-hui, LIU Ying, XU Ming-zhe
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To analyze polymer impurities in cefathiamidine for injection by different methods, and compare the advantages and disadvantages of the specificity of different methods. **Methods**: By using Sephadex G-10 System, high performance gel chromatography and column switching-LC-MS^n method, the polymers in cefathiamidine for injection from 11 manufacturers were analyzed. **Results**: No polymer was detected by Sephadex G10 System, high performance gel chromatography could detect polymer impurities, the structure of the components separated by high performance gel chromatography system was confirmed by the column switching-LC-MS^n method. **Conclusion**: It was proved that there were some polymer impurities in cefathiamidine for injection, the Sephadex G10 System and high performance gel chromatography had poor specificity, and macromolecular polymers and small molecular impurities could not be separated and qualitatively analyzed. This study laid the foundation to further establish a better specificity method.

[**Key words**]　cefathiamidine for injection; polymer; the column switching-LC-MS^n

β-内酰胺类抗生素由于具有杀菌活性强、毒性低、适应证广及临床疗效好等优点,目前已成为临床上应用最为广泛的一类抗生素。此类抗生素由于结构不稳定,在生产、运输、贮存过程中易发生聚合反应,生成聚合物杂质。研究表明,β-内酰胺类抗生素中聚合物杂质是引起过敏反应的主要原因[1-4]。不同品种中聚合物的种类和含量与其分子结构和生产

[作者简介]　崇小萌,女,副主任药师,主要从事抗生素药品质量控制及研究。联系电话:(010)53851538, E-mail: chongxm@nifdc.org.cn。共同第一作者:田冶,男,副研究员,主要从事抗生素对照品研究。联系电话:(010)53851533, E-mail: tianye@nifdc.org.cn。
[通讯作者]　刘颖,女,研究员,主要从事抗生素对照品研究。联系电话:(010)53851542, E-mail: liuyingly77@hotmail.com。许明哲,男,主任药师,主要从事化学药品研究。联系电话:(010)53852506, E-mail: xumzhe@nifdc.org.cn。

工艺有关[5-7]。故聚合物杂质不仅与产品安全性、有效性相关,还与工艺控制水平密切相关。严格控制制剂中的聚合物杂质对于产品的质量以及安全性均具有较大的意义[8]。

头孢硫脒是由我国自行研制并首先应用于临床的半合成头孢菌素[9],作为第1代头孢菌素,头孢硫脒对革兰阳性菌作用较强,尤其对葡萄球菌和肠球菌具有很强的抗菌活性,临床应用较为广泛[10-11]。本文分别采用葡聚糖凝胶G10系统以及高效凝胶色谱系统对注射用头孢硫脒中聚合物杂质进行分析,并采用柱切换液质联用方法对高效凝胶色谱系统中色谱峰进行了定性分析,确定了典型聚合态聚合物的结构,为下一步建立专属性较好的分析方法奠定了基础。

材料与方法

1 仪器

反相液相色谱系统为Agilent1200 infinity Series,工作站为Agilent OpenLab 2.3。柱切换LC/MS系统:3201 S1-2双元泵,3202 S1-2真空脱气机,3014 S1-2柱温箱,3012 S1-2柱切换系统,3133 S1-2自动进样器,以上均购自日本SHISEIDO公司。Accela二极管阵列检测器(美国Thermo Fisher Scientific Inc.);3200Q TRAP质谱仪(美国Applied Biosystems Inc.),工作站为Analyst®软件(version 1.6.2)。

2 样品与试剂

来自11个厂家各1批注射用头孢硫脒;无水磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20181105,纯度:≥99.0%);无水磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20181025,纯度:≥99.0%);一水合柠檬酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:20160108,纯度:≥99.8%);乙腈(Fisher Chemical公司,批号:LOT 190262;纯度:99.99%)。

3 实验方法

3.1 HPLC法测定有关物质 色谱柱为Kromasil 100-5 C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为磷酸盐缓冲液(取无水磷酸氢二钠2.76 g,枸橼酸1.29 g,加水溶解并稀释成1 000 mL)-乙腈(86∶14);流速为1.0 mL·min^{-1};检测器为紫外PDA;检测波长为254 nm;柱温为30 ℃;进样器温度为4 ℃;进样体积为10 μL。

3.2 葡聚糖凝胶G10系统 用球状亲水硅胶(分子量范围1 000~10 000 Da)为填充剂;以磷酸盐缓冲液(pH 7.0)[0.005 mol·L^{-1}磷酸氢二钠溶液-0.005磷酸二氢钠溶液(61∶39)]-乙腈(95∶5)为流动相;流速为0.8 mL·min^{-1};检测波长为254 nm。

3.3 高效凝胶色谱法(HPSEC) 色谱柱为TSKgel G2000SWXL;流动相为0.005 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液-乙腈(95∶5);流速为0.8 mL·min^{-1};检测器为紫外PDA;检测波长为254 nm;柱温为30 ℃;进样器温度为4 ℃。

3.4 柱切换HPLC-MS法 色谱柱为Capcell Pak MG Ⅱ C_{18}柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);切换阀为六通阀A和B;切换用定量环体积为500 μL。流动相:C相为含有1%甲酸的水溶液;D相为乙腈-1%甲酸溶液;梯度洗脱[0 min(100% C~0% B),5.5 min(100% C~0% D),25 min(0% C~100% D),30 min(0% C~100% D)]。MS参数为ESI离子源,二级质谱扫描,扫描范围为100~1 000 Da;气帘气为20 L·h^{-1},电离电压为+5 000 V;离子源温度为400 ℃;吹扫气1为60 L·h^{-1};吹扫气2为60 L·h^{-1};碰撞诱导解离为中等;解簇电压为+30.0 V;入口电压为+6.0 V;碰撞电源为+62.0 V;碰撞电压为35 V;出口电压为+3.0 V。

结 果

1 葡聚糖凝胶G10色谱法分析注射用头孢硫脒聚合物

2019年我科室承担了注射用头孢硫脒的国家评价性抽验工作,不同的生产厂家所依据的检验标准也不相同,所依据的检验标准分别为《中华人民共和国药典》2015年版、部颁标准以及局颁标准。

对于聚合物检查项,《中华人民共和国药典》2015年版并未规定对注射用头孢硫脒进行聚合物检查,但在现行部颁标准及局颁标准中均规定了对注射用头孢硫脒进行聚合物检查,其中包括2种方法,分别为葡聚糖凝胶G10色谱法及高效凝胶色谱法。

我们首先采用葡聚糖凝胶G10色谱法对全部11个厂家样品的聚合物进行检测,结果均未检出聚合物杂质。

2 高效凝胶色谱法分析注射用头孢硫脒聚合物

采用高效凝胶色谱法对注射用头孢硫脒聚合物进行分析,所得典型色谱图如图1所示,标准中规定保留时间小于头孢硫脒保留时间的色谱峰为需要控制的聚合物杂质,从图中可以看出,聚合物色谱峰虽与头孢硫脒可以进行有效分离,但彼此间的分离度较差。由于高效凝胶色谱法分离机制比较复杂,受

分子排阻和吸附作用的共同影响,故其出峰顺序不一定是按照化合物分子量大小的顺序。为此需要对此方法中所得色谱峰进行进一步确认,以保证此方法的可行性。

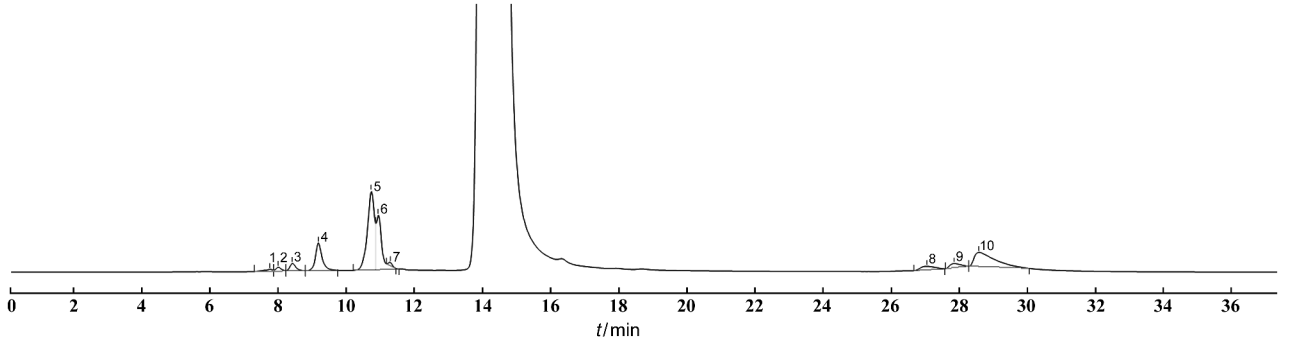


图 1 高效凝胶色谱法测定头孢硫脒聚合物典型色谱图

3 柱切换 LC-MS 法分析高效凝胶色谱系统中分离的组分

采用柱切换 LC-MS 法对 1 个厂家生产的注射用头孢硫脒样品中含量较高的聚合物色谱峰进行分析,因为高效凝胶色谱法分离机制的复杂性,故对头孢硫脒色谱峰后的色谱峰也进行了 LC-MS 分析,即对图 1 中 4,5,6,7,8,9 和 10 号色谱峰进行了分析。

3.1 4 号色谱峰 LC-MS 分析 4 号色谱峰其 + EMS 图及 + EPI 二级质谱图如图 2 所示,由图中可以初步判断此化合物[M + H]$^+$峰为 604.6,其二级质谱图为一系列丢掉 *m/z* 为 130 碎片离子的离子,且没有头孢硫脒及其杂质的特征碎片离子,初步判断此化合物为与头孢硫脒本身结构无关的弱保留化合物。

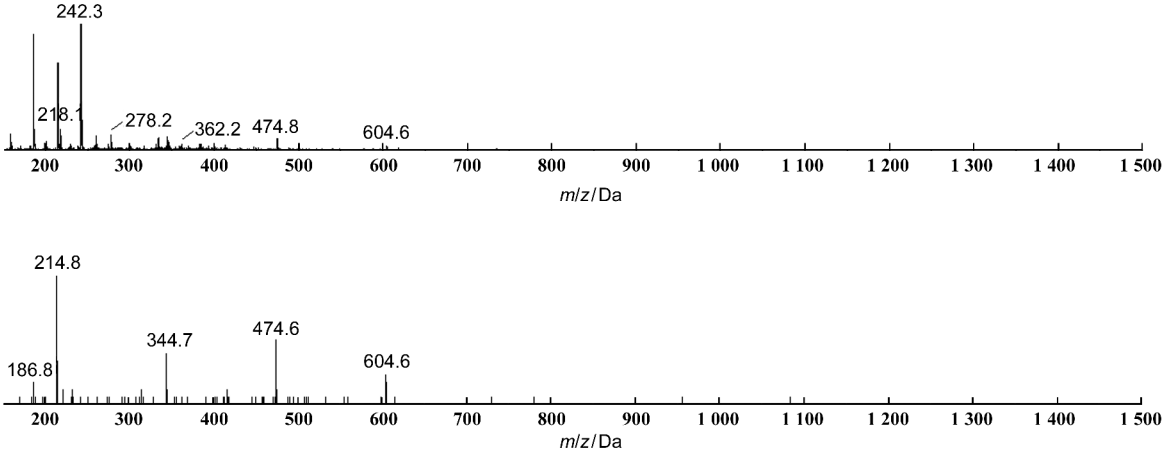


图 2 4 号色谱峰 + EMS 图及 + EPI 二级质谱图

3.2 5,6,7 号色谱峰 LC-MS 分析 5,6,7 号色谱峰在高效凝胶色谱法中并未完全分离,分别对此 3 个色谱峰进行柱切换 LC-MS 分析,考察 + EMS 图中 26 ~ 35 min 所得质谱图,可知 5,6,7 号色谱峰中含有多种化合物,[M + H]$^+$峰分别为 431.0,489.0,727.4,885.5 以及 939.2 等,其中[M + H]$^+$峰为 431.0 和 489.0 的化合物分别为去乙酰头孢硫脒和头孢硫脒亚砜异构体。

[M + H]$^+$峰为 885.2 的化合物的 + EMS 图及 + EPI 二级质谱图如图 3 所示,初步推测其结构及质谱裂解途径如图 4 所示。此聚合物为典型聚合态的聚合物,为头孢硫脒二聚体或其立体异构体(包括 Δ-3 异构体、7S 异构体或 7 位侧链双键的顺反异构体等)。而其他的大分子化合物初步推测为头孢硫脒及其杂质与另一小分子工艺杂质聚合所得的产物。

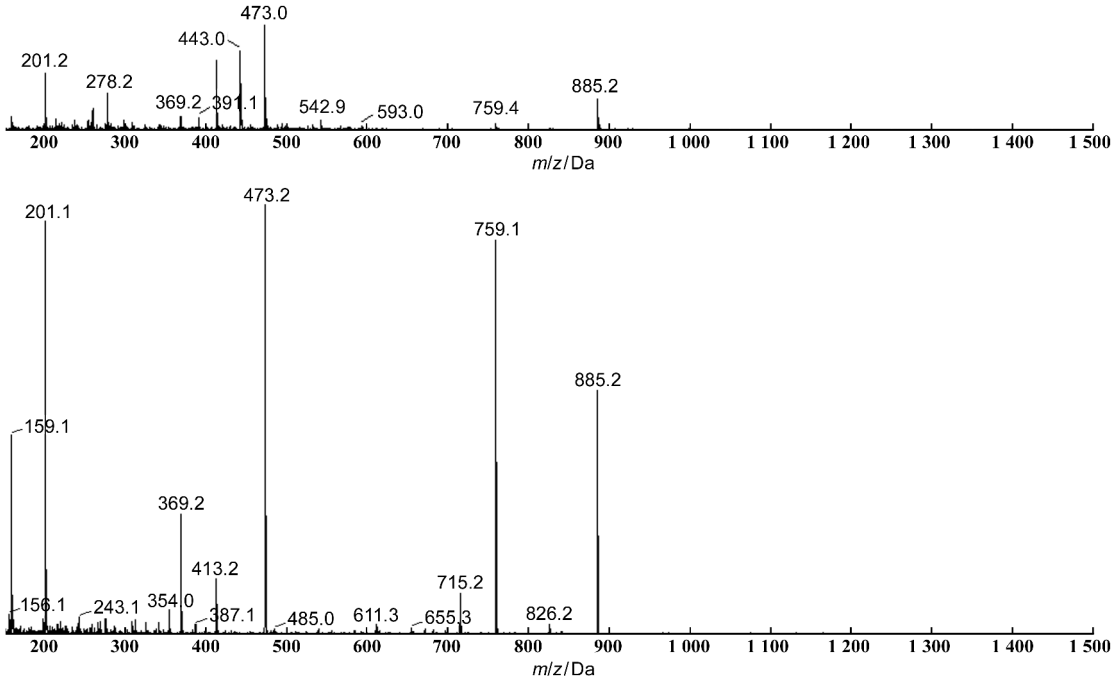


图 3 ［M + H］$^+$峰为 885.2 的 + EMS 图及 + EPI 二级质谱图

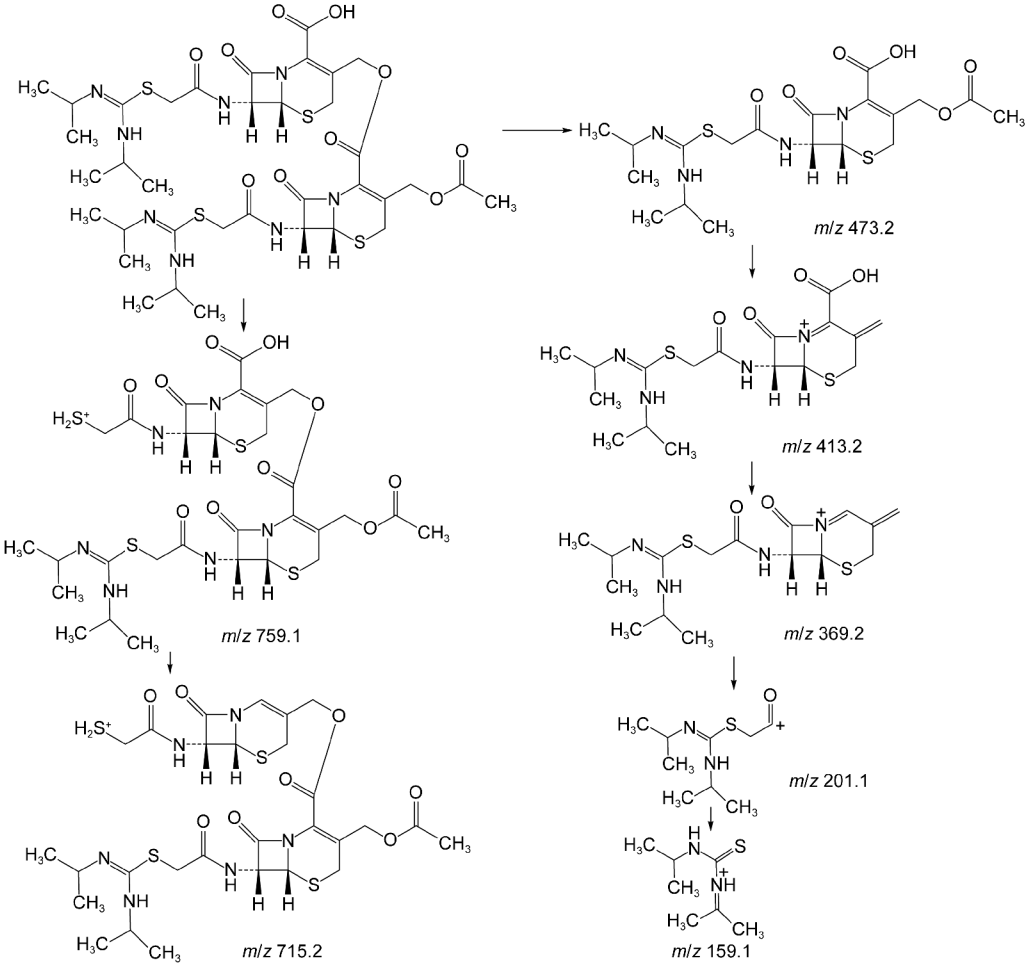


图 4 ［M + H］$^+$为 885.2 的化合物质谱裂解途径

由此可见,在高效凝胶色谱系统中,头孢硫脒主峰前的色谱峰既包括了小分子杂质,如去乙酰头孢硫脒、头孢硫脒亚砜异构体,又包括了一些大分子聚合物,这些大分子聚合物既有典型的聚合物,如头孢硫脒二聚体,又有非典型的聚合物,即并不是头孢硫脒自身的二聚体或多聚体,而是由降解杂质或工艺杂质采取不同的聚合方式聚合而成的化合物,在结构上没有共同的特点,也没有规律的聚合方式,故这些聚合物的结构需要进一步的研究。

3.3 8 号色谱峰 LC-MS 分析 对 8 号色谱峰进行柱切换 LC-MS 分析,通过所得总离子流图及 + EMS 图可知,8 号色谱峰为单一化合物,其[M + H]$^+$峰也是 885.2,推测其为头孢硫脒二聚体或其立体异构体(包括 Δ-3 异构体、7S 异构体或 7 位侧链双键的顺反异构体等)。

3.4 9 号色谱峰 LC-MS 分析 对 9 号色谱峰进行柱切换 LC-MS 分析,所得 + EMS 图以及 + EPI 二级质谱图如图 5 所示,从质谱图中可以看出,9 号色谱峰为单一化合物,其[M + H]$^+$峰为 573.1,根据其 + EPI 二级质谱图中碎片离子,初步推断其结构及质谱裂解途径如图 6 所示。此聚合物为头孢硫脒合成过程中起始原料 *N*,*N*'-二异丙基硫脲的聚合物。

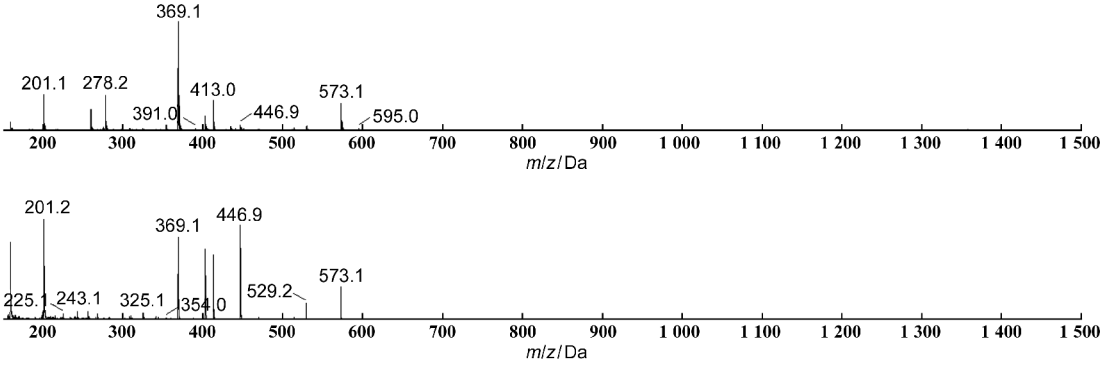


图 5 9 号色谱峰 + EMS 以及 + EPI 二级质谱图

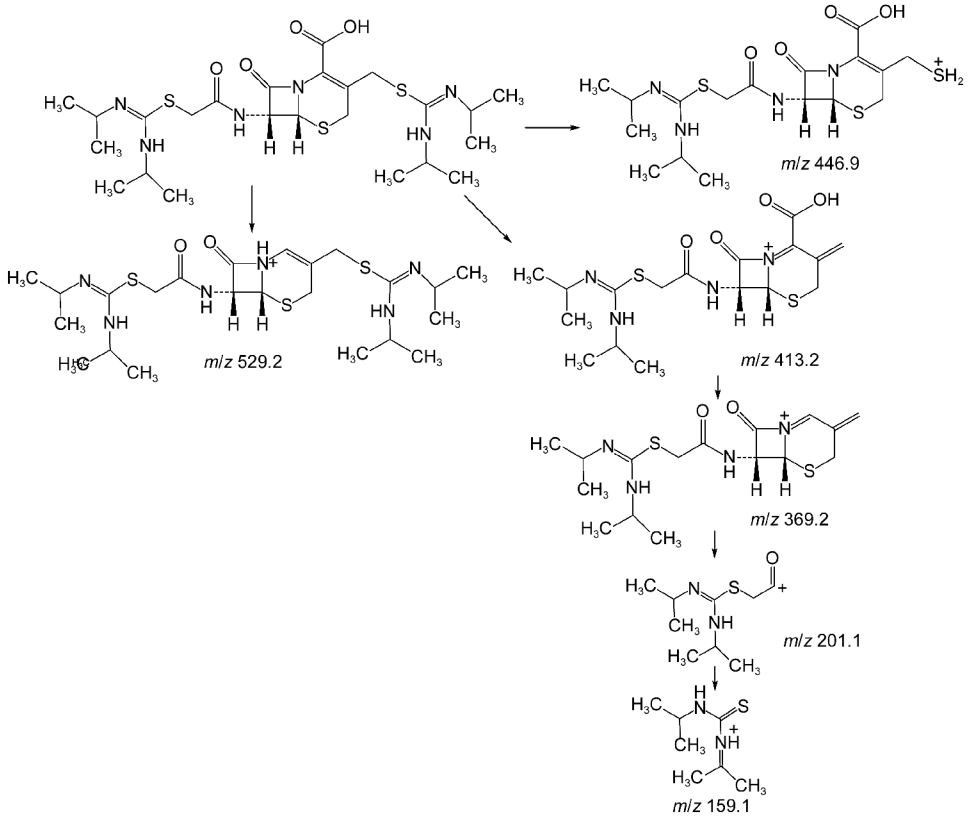


图 6 [M + H]$^+$为 573.1 的化合物质谱裂解途径

3.5 10 号色谱峰 LC-MS 分析 对 10 号色谱峰进行柱切换 LC-MS 分析，所得 + EMS 图中化合物[M + H]$^+$峰为 412.9，根据其 + EPI 图中碎片离子，可判断此化合物为头孢硫脒内酯。

综上所述，在高效凝胶色谱法中，头孢硫脒主峰后的 3 个色谱峰中有 2 个色谱峰为聚合物色谱峰，故标准中对聚合物的控制只要求控制头孢硫脒主峰前色谱峰面积是不全面的。由此可见，高效凝胶色谱法对头孢硫脒聚合物的控制专属性较差，小分子杂质与聚合物不能达到有效的分离，且在此色谱系统中化合物的出峰顺序并不是按照分子量大小的顺序，头孢硫脒主峰前后均有聚合物，故需要建立一个专属性更好的方法对头孢硫脒聚合物进行控制。

讨 论

采用柱切换液质联用方法对高效凝胶色谱法中分离的成分进行定性分析，证明了注射用头孢硫脒中存在多种类型的聚合物，既有典型聚合态的聚合物，又有由杂质形成的聚合物。葡聚糖凝胶 G10 方法专属性及灵敏度较差，无法检出聚合物。而高效凝胶色谱法虽可检出聚合物杂质，但无法将大分子聚合物和小分子杂质进行全面地分离和准确定性，故需要在以后的研究中建立专属性更强的既可分析小分子杂质又可分析大分子聚合物的方法。

[参 考 文 献]

[1] 金少鸿. 头孢菌素过敏反应的研究进展[J]. 国外医药·抗生素分册，1984，(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. β-内酰胺类抗生素过敏反应的研究[J]. 医学研究杂志，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]. 中国抗生素杂志，1988，13(1)：65 - 71.
[5] 陈启立. 头孢菌素类仿制药的杂质谱研究[D]. 北京：北京协和医学院，2016.
[6] 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.
[7] 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.
[8] 胡昌勤. β-内酰胺类抗生素聚合物杂质控制策略的形成与发展[J]. 中国新药杂志，2020，29(11)：1231 - 1244.
[9] 黄每裕. 走出深闺人方识-广州白云山制药总厂开发独家产品头孢硫脒纪实[J]. 中国药业，2003，12(11)：17 - 19.
[10] 陈红英，张静，胡海容，等. 快速 HPLC 法测定头孢硫脒有关物质[J]. 中国新药杂志，2016，25(15)：1784 - 1787.
[11] 王文梅，我国自行研制的头孢菌素——头孢硫脒[J]. 世界临床药物，2003，24(3)：179 - 181.

编辑：刘卓越/接受日期：2021 - 01 - 14