·实验研究·

注射用头孢西丁钠的聚合物杂质分析

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] **目的**:建立注射用头孢西丁钠聚合物杂质的分析方法。**方法**:采用水为溶剂制备头孢西丁钠聚合物浓溶液;采用高效凝胶色谱法(HPSEC, TSK G2000 SWxl)和柱切换-LC/MSn 法对头孢西丁钠聚合物浓溶液的弱保留值杂质进行分离和结构鉴定,并评估 HPSEC 法分析聚合物杂质的专属性;采用 Shimadzu Inertsil Ph-3 型色谱柱,以磷酸盐缓冲液溶液(pH 3.2)-甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱,建立头孢西丁钠聚合物的反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析方法,并进行方法学验证。**结果**:在头孢西丁钠聚合物浓溶液中检出出头孢西丁钠聚合物杂质,以及 4 个小分子杂质;HPSEC 法分离头孢西丁钠聚合物杂质时,小分子杂质与聚合物杂质共出峰,方法专属性与定量准确性差;RP-HPLC 法分析头孢西丁钠聚合物杂质时,能够检出 2 种头孢西丁钠指针性聚合物杂质,专属性好。**结论**:HPSEC 法不能对头孢西丁钠的聚合物杂质进行有效质控,建立的 RP-HPLC 法分析头孢西丁钠聚合物杂质的专属性良好,可将头孢西丁钠聚合物浓溶液作为聚合物杂质系统适用性溶液。

[关键词] 头孢西丁钠;聚合物;杂质;柱切换-LC/MSn;高效凝胶色谱;二维色谱;β-内酰胺类抗生素
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)11－1038－10

Analysis of polymer impurities in cefoxitin sodium injection

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**] **Objective**: To establish a determination method of polymer impurities in cefoxitin sodium injection. **Methods**: Cefoxitin sodium was dissolved in water to prepare stock solution of cefoxitin sodium polymer. High performance size exclusion chromatography (HPSEC, TSK-gel G2000SWxl) and column switching-LC/MSn were applied to separate and deduce the poor retention impurities in the stock solution and to evaluate the specificity of HPSEC method. A new RP-HPLC method for polymer analysis was established with a Shimadzu Inertsil Ph-3 column, using a gradient elution by phosphate buffer solution (pH 3.2)-acetonitrile-methanol, and the method was validated. **Results**: Several cefoxitin sodium polymers were identified in stock solution of cefoxitin sodium polymer, 4 small molecular impurities were also detected. Polymer impurities were liable to co-elute with small molecular impurities by HPSEC method, making a poor quantification accuracy and specificity. Two indicative polymer impurities were detected by RP-HPLC method with an effective specificity. **Conclusion**: HPSEC method was not suitable for the quality control of polymer impurities in cefoxitin sodium injection, while the new established RP-HPLC method was specific, which could effectively control the polymer impurities. Cefoxitin sodium polymer stock solution could be used to identify polymer peaks as the system suitability solution.

[**Key words**] cefoxitin sodium; polymer; impurity; column switch-LC/MSn; HPSEC; 2D-HPLC; β-lactam antibiotics

[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] 许明哲,男,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)53852502,E-mail:xumzhe@nifdc.org.cn。

聚合物杂质是影响抗生素临床用药安全的关键因素之一。β-内酰胺类药物在生产、运输、存储过程中易发生聚合反应,产生聚合物杂质从而诱发过敏反应[1-4]。因此应严格控制此类抗生素中的聚合物类杂质。

β-内酰胺类抗生素分子中通常含有游离的氨基和结构不稳定的四元内酰胺环及 3 位侧链,容易发生氨基进攻四元内酰胺环的酰胺键以及 3 位侧链的亚甲基同时脱掉 3 位侧链取代基,产生聚合物杂质。除此以外,部分 β-内酰胺类抗生素药物虽然化学结构中没有特征性的游离氨基,例如头孢西丁钠、头孢噻吩等,也可能首先发生自身降解,降解产物再发生聚合,产生聚合物杂质。

头孢西丁钠为半合成第二代头孢菌素,其化学结构中 β-内酰胺环的 7 位含有 1 个甲氧基,使其能够耐受革兰阴性菌产生的 β-内酰胺酶的降解作用,临床上主要用于治疗敏感菌所致的呼吸道感染、泌尿生殖系统感染、腹内感染及骨/关节/皮肤软组织感染等。头孢西丁钠的化学结构中没有游离的伯氨取代基也没有氨噻肟基团,尚缺乏该药物的聚合物结构及形成机理研究。《中华人民共和国药典》2015 年版[5]、《美国药典》42 版[6]收载了该品种,但均未控制聚合物杂质。《欧洲药典》10.0 版在头孢西丁钠原料的有关物质项下,将头孢西丁二聚体(杂质 G)作为特定杂质进行了控制[7]。有文献报道采用 G10 凝胶色谱法测定了头孢西丁钠原料的聚合物杂质[8]和注射用头孢西丁钠复方制剂的聚合物杂质[9];也有采用高效凝胶色谱(HPSEC)法测定头孢西丁钠原料和注射用头孢西丁钠中的高分子杂质的报道[10-11]。

葡聚糖凝胶 G-10 色谱法和 HPSEC 法目前广泛用于聚合物分析,但是因其对聚合物杂质的分离效果和方法专属性较差,无法对聚合物杂质进行精确控制[12]。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法进行聚合物分析是目前聚合物研究的热点。在前期研究中,我们采用 RP-HPLC 法分析了多种 β-内酰胺类抗生素的聚合物杂质[13-16]。在本研究中,我们综合运用柱切换-LC/MSn 和二维液相色谱法(2D-HPLC)法,以文献报道的头孢西丁钠有关物质分析方法[17]为基础对注射用头孢西丁钠聚合物杂质进行结构推定,评价 HPSEC 法分析聚合物杂质的专属性;然后探索建立 RP-HPLC 法对注射用头孢西丁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 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 Xcalibur 4.0.27.19 版。

2 样品与试剂

注射用头孢西丁钠(中国食品药品检定研究院,批号:18050531);乙腈、甲醇(美国 Thermo Fisher 公司,色谱纯);其他化学试剂(色谱纯),均购自国药集团化学试剂公司;水为屈臣氏纯净水。

3 HPSEC 法

色谱柱:TSK-gel G2000SWxl(填料:刚性、球形、亲水硅胶;30 cm × 7.8 mm,5 μm);流动相 A 相:0.005 mol·L^{-1}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:乙腈,A∶B = 95∶5,等度洗脱;流速:0.7 mL·min^{-1};检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL;稀释溶剂:0.005 mol^{-1}磷酸盐缓冲液(pH 7.0);样品浓度:2.0 mg·mL^{-1}(以头孢西丁钠计)。用于分离注射用头孢西丁钠的弱保留值杂质。

4 RP-HPLC 法

色谱柱:Shimadzu Inertsil Ph-3 苯基柱(250 mm × 4.6 mm,3 μm);流速:1.0 mL·min^{-1};检测波长:235 nm;柱温:30 ℃。流动相 A 相:磷酸盐缓冲液(取 4.0 g 二水合磷酸二氢钠加水 1 000 mL 溶解,用磷酸调节 pH 至 3.2),流动相 B 为甲醇-乙腈(50∶50),进行线性梯度洗脱。洗脱梯度程序:0 ~ 15.0 min,20% B;15.0 ~ 30.0 min,20% ~ 45% B;30.0 ~ 40.0 min,45% ~ 65% B;40.0 ~ 41.0 min,65% ~ 20% B;41.0 ~ 50.0 min,20% B。用于分析注射用头孢西丁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对苯基色谱柱进行预平衡。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进行分析。用于在 RP-HPLC 色谱系统中定位弱保留值杂质。

6 柱切换-LC/MSn-Ⅰ法

色谱系统Ⅲ:同 HPSEC 法,进样体积增加至 50 μL,用于分离头孢西丁钠的弱保留值杂质。

色谱系统Ⅳ:色谱柱为 Agilent, SB-C_{18}(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。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。梯度洗脱程序:0 ~ 7 min,0% B(脱盐处理);7 ~ 27 min,90% B;27 ~ 37 min,90% B;37 ~ 38 min,0% B;38 ~ 40 min,0% B。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。

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 μL,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 部分的质谱方法)

调谐方法:扫描电压(+)3 000.00 V,毛细管温度(+)350.00 ℃,鞘气(+)35.00 L·h^{-1},辅助气(+)10.00 L·h^{-1},最大喷雾电流(+)100.00,离子源探针加热器温度(+)350.00 ℃,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 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:18 V,缺省电荷状态 1。

9 溶液配制

聚合物浓溶液:称取 1.0 g 注射用头孢西丁钠供试品,置于 10 mL 量瓶中,加水 5 mL 溶解,制成浓度约为 200 mg·mL^{-1}的溶液,室温静置 4 d,于 4 ℃条件下保存,作为头孢西丁钠聚合物杂质降解储备溶液。量取 0.4 mL 上述储备溶液,置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为聚合物浓溶液(约 8 mg·mL^{-1})。

酸降解溶液:称取注射用头孢西丁钠供试品约 80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入 9 mL 的 RP-HPLC 法的流动相 A 溶解,然后加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}盐酸溶液,在 70 ℃水浴中放置 15 min,取出放冷至室温,备用。

碱降解溶液:称取注射用头孢西丁钠供试品约 80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入 9 mL 的 RP-HPLC 法的流动相 A 溶解,然后加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}盐酸溶液,在 70 ℃水浴中放置 15 min,取出放冷至室温,备用。

水浴降解溶液:取注射用头孢西丁钠原料约 80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 RP-HPLC 法的流动相 A 溶解并稀释至刻度,摇匀,在 70 ℃水浴中加热 60 min,取出放冷至室温,备用。

氧化降解溶液:取注射用头孢西丁钠原料约 80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 RP-HPLC 法的流动相 A 约 5 mL 溶解,然后加入 2 mL 30% 双氧水,在室温下放置 20 min,用流动相 A 稀释到刻度,摇匀,备用。

UV 降解溶液:取注射用头孢西丁钠原料约 80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 RP-HPLC 法的流动相 A 溶解并稀释至刻度,将其转移到表面皿中,在 254 nm 波长紫外灯下照射 12 h。

供试品溶液:称取注射用头孢西丁钠适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用 RP-HPLC 法的流动相 A 溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含头孢西丁钠浓度约为 8 mg·mL^{-1}的溶液。

10 方法学验证

10.1 方法定量限与检测限

精密量取聚合物浓溶液,用流动相 A 进行倍比稀释,得到不同浓度的系列溶液,注入液相色谱仪。采用头孢西丁钠对照品为外标,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(LOD)和最低定量限(LOQ)。

10.2 溶液稳定性

取聚合物降解溶液 20 μL,分别在 0,3,6,10 和 15 h 进样分析,计算头孢西丁钠指针性聚合物峰面积的变化情况。

10.3 耐用性

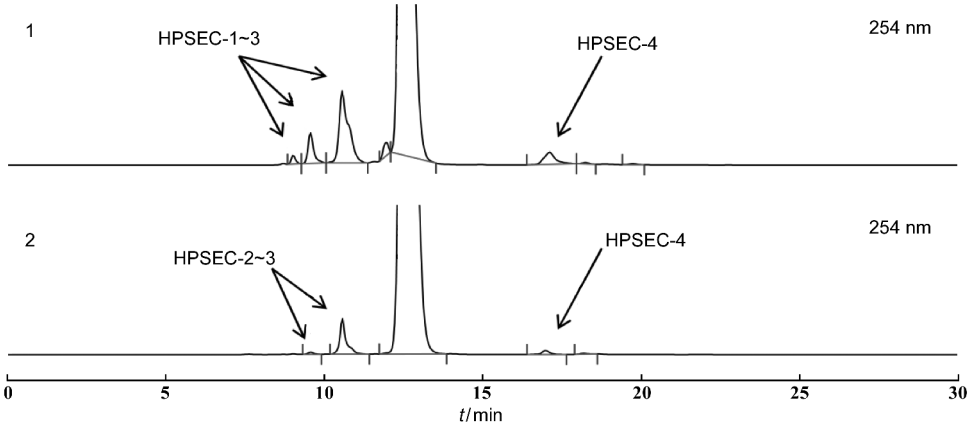
精密量取聚合物浓溶液 20 μL,注入液相色谱仪,考察在不同柱温、流动相 pH 值及色谱柱条件下,聚合物杂质的分离情况。

结 果

1 HPSEC 法分析注射用头孢西丁钠弱保留值杂质

基于《中华人民共和国药典》2015 年版二部中头孢米诺钠有关物质Ⅱ的方法,本研究建立了 HPSEC 法,见图 1。头孢西丁钠聚合物浓溶液的分析结果显示,头孢西丁钠主峰前主要存在 3 个弱保

留值杂质峰 HPSEC-1 ~3,在主峰后存在 1 个杂质峰 HPSEC-4。用该方法对注射用头孢西丁钠进行分析,检出弱保留值杂质 HPSEC-2 ~4,其弱保留值杂质峰总含量为 0.64%,超过了《中华人民共和国药典》2015 年版对聚合物杂质的限度要求(不得过 0.5%)。因此需要对这些弱保留值杂质进行结构鉴定,进一步分析 HPSEC 法分析聚合物杂质的专属性。



1:聚合物浓溶液(polymer stock solution);2:制剂(product)

图 1 HPSEC 法分析注射用头孢西丁钠的典型色谱图

2 柱切换-LC/MSn 法推定弱保留值杂质的化学结构

以头孢西丁钠聚合物浓溶液为供试品,采用 HPSEC 法分离得到弱保留值杂质 HPSEC-1 ~4,见图 1,然后采用柱切换-LC/MSn-Ⅰ法推定各组分的化学结构,推定的杂质结构见图 2,具体的质谱数据见表 1。

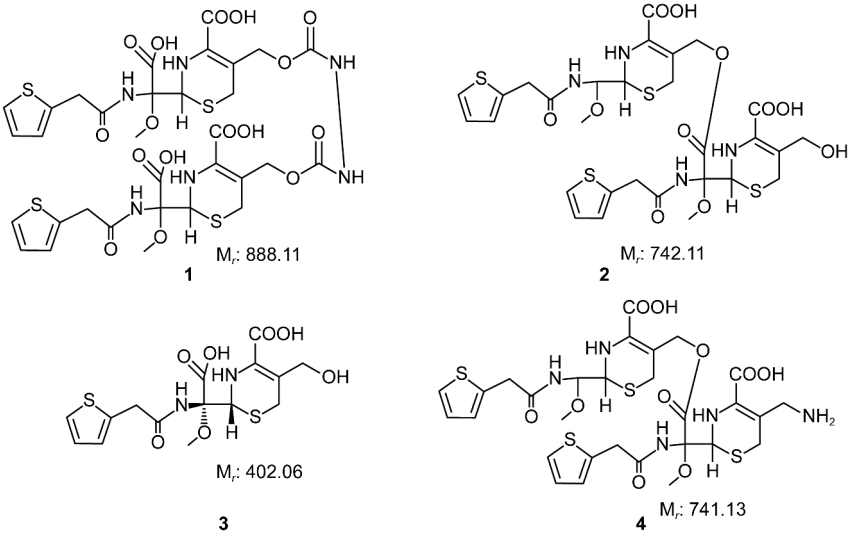


图 2 聚合物浓溶液中聚合物及小分子杂质的推测化学结构

表 1 头孢西丁钠弱保留值杂质的质谱数据列表

杂质名称	相对分子量	分子式	加合离子	结构归属	典型子离子
HPSEC-1a	888.1	$C_{32}H_{36}N_6O_{16}S_4$	889.1[M+H]$^+$, 911.0[M+Na]$^+$	聚合物杂质	857.1,813.1,769.1,725.1,325.1,157.9
HPSEC-2a	742.1	$C_{29}H_{34}N_4O_{11}S_4$	743.1[M+H]$^+$	聚合物杂质	668.1,623.1,563.1,359.1,265.1 157.9
HPSEC-3a	420.1	—	421.1[M+H]$^+$	小分子未知杂质	345.1,327.1,299.1,204.0,162.0
HPSEC-3b	402.1	$C_{15}H_{18}N_2O_7S_2$	403.1[M+H]$^+$	头孢西丁水解物	328.1,283.1,254.0,203.1,130.0

续表 1

杂质名称	相对分子量	分子式	加合离子	结构归属	典型子离子
HPSEC-3c,3d,3e	741.1	$C_{29}H_{35}N_5O_{10}S_4$	742.1[M+H]$^+$	聚合物及其异构体	710.1,698.1,616.1,514.1,384.1,359.1,340.1,306.1,57.8
HPSEC-3f	656.1	—	657.1[M+H]$^+$,679.1[M+Na]$^+$	小分子未知杂质	582.1,419.0,385.1,309.0,257.1,213.1,181.0
HPSEC-3g	736.1	—	737.1[M+H]$^+$	未知聚合物杂质	720.0,694.1,386.0,352.0,335.0,309.0,228.0
HPSEC-4a,4b	622.1	—	623.1[M+H]$^+$	小分子未知杂质	323.1,157.8

2.1 HPSEC-1

在弱保留值杂质 HPSEC-1 中分离得到 1 个主要杂质和若干个小杂质,将其响应最高的杂质峰命名为 HPSEC-1a。其一级质谱图中存在 *m/z* 889.12 (*z* = 1)、*m/z* 911.01 (*z* = 1)的加合离子峰,为[M+H]$^+$和[M+Na]$^+$峰,因此推测 HPSEC-1a 的相对分子量为 888.12 Da。在二级质谱中存在中性丢失 32 Da 的子离子 *m/z* 857.10,以及中性丢失 44 Da 的子离子 *m/z* 813.11,*m/z* 769.12,因此从相对分子量和二级质谱数据分析可以初步推定 HPSEC-1a 为一种头孢西丁的聚合物杂质,推定的化学结构见图 2。

2.2 HPSEC-2

采用柱切换-LC/MSn-Ⅰ法在弱保留值杂质 HPSEC-2 中分离得到 1 个主要的未知杂质和若干个小杂质峰,命名其中的主要杂质为 HPSEC-2a。HPSEC-2a 的一级质谱图中存在 *m/z* 743.12 (*z* = 1)的加合离子峰,为[M+H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-2a 的相对分子量为 742.12 Da。在二级质谱中存在中性丢失 32 Da 的子离子 *m/z* 711.10,以及丢失 44 Da 的子离子 *m/z* 667.10 以及 *m/z* 359.07 等子离子,因此推定为另一种头孢西丁的聚合物杂质,推定的化学结构见图 2。

2.3 HPSEC-3

采用在线柱切换-LC/Msn-Ⅰ法分析弱保留值杂质峰 HPSEC-3。在 HPSEC-3 中检出了 7 个主要杂质峰 HPSEC-3a ~ 3g,以及若干个小杂质峰,其质谱总质子流(TIC)图见图 3。

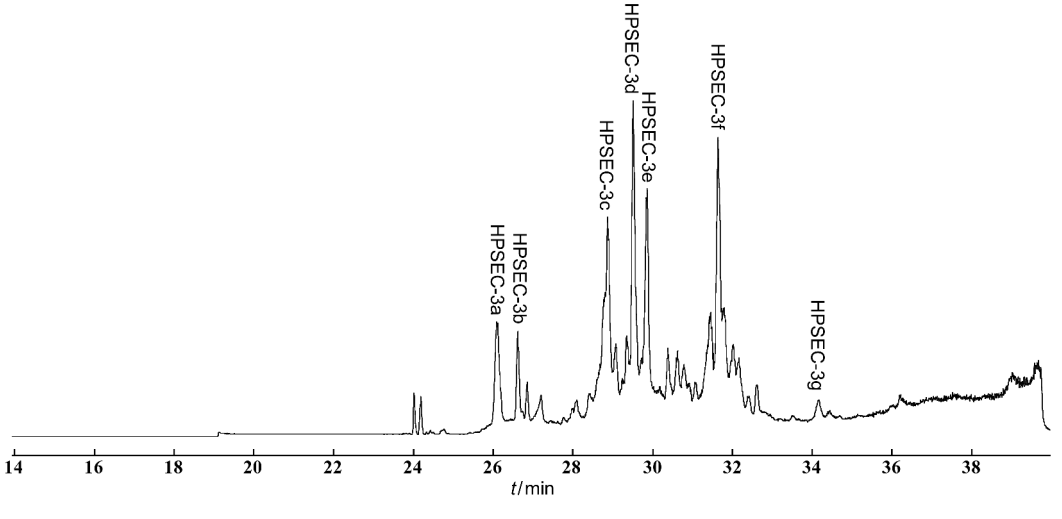


图 3 弱保留值杂质 HPSEC-3 的典型质谱 TIC 图

2.3.1 HPSEC-3a HPSEC-3a 的一级质谱图中存在 *m/z* 421.07 (*z* = 1)的加合离子峰,为[M+H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-3a 的相对分子量为 420 Da,分子量比头孢西丁的相对分子量少,为小分子杂质,不属于聚合物杂质。化学结构需要进一步研究。

2.3.2 HPSEC-3b HPSEC-3b 的一级质谱图中存在 *m/z* 403.07 (*z* = 1)的加合离子峰,为[M+H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-3b 的相对分子量为 402 Da,分子量比头孢西丁的相对分子量少 15 Da,为小分子杂质,不属于聚合物杂质。其化学结见图 2。

2.3.3 HPSEC-3c HPSEC-3c 的一级质谱图中存在 *m/z* 742.13 (*z* = 1)的加合离子峰,为[M+H]$^+$

峰,因此推测 HPSEC-3c 的相对分子量为 741 Da,分子量比头孢西丁的相对分子量多 314 Da,属于聚合物杂质。在二级质谱中存在中性丢失 32 Da 的子离子 *m/z* 710.11,以及丢失 44 Da 的子离子 *m/z* 698 和 *m/z* 359 的子离子。该聚合物杂质初步推定的化学结构见图 2。

2.3.4 HPSEC-3d,3e HPSEC-3d 和 3e 的一级质谱图中存在 *m/z* 742.13(*z* = 1)的加合离子峰,为[M + H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-3d 的相对分子量为 741 Da,二者均与 HPSEC-3c 互为同分异构体。其化学结构见图 2。

2.3.5 HPSEC-3f HPSEC-3f 的一级质谱图中存在 *m/z* 657.08(*z* = 1)、*m/z* 679.06 的加合离子峰,为[M + H]$^+$和[M + Na]$^+$峰,因此推测 HPSEC-3f 的相对分子量为 656 Da,分子量比头孢西丁的相对分子量多 229 Da,不属于聚合物杂质。在二级质谱中存在中性丢失 32 Da 的子离子 *m/z* 625,以及丢失 44 Da 的子离子 *m/z* 581 等,该杂质的化学结构需要进一步研究。

2.3.6 HPSEC-3g HPSEC-3g 的一级质谱图中存在 *m/z* 737.06(*z* = 1)的加合离子峰,为[M + H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-3g 的相对分子量为 736 Da,分子量比头孢西丁的相对分子量多 309 Da,属于聚合物杂质。在二级质谱中存在中性丢失 17 Da 的子离子 *m/z* 720.04,以及丢失 43 Da 的子离子 *m/z* 694 等,该聚合物杂质的化学结构需要进一步研究。

2.4 HPSEC-4

采用在线柱切换-LC/Msn-Ⅰ法将弱保留值杂质峰 HPSEC-4(t_R = 16.95 min)进行分析。在 HPSEC-5 中检出了 2 个主要杂质峰 HPSEC-4a,4b。

HPSEC-4a,4b 的一级质谱图中均存在 *m/z* 623.14(*z* = 1)的加合离子峰,为[M + H]$^+$峰,因此推测 HPSEC-4a,4b 的相对分子量为 622 Da,二者互为同分异构体。其分子量比头孢西丁的相对分子量多 195 Da,不属于聚合物杂质。在二级质谱中均存在 *m/z* 323 的子离子等,该杂质的化学结构需要进一步研究。

3 HPSEC 法的专属性分析

柱切换-LC/MSn-Ⅰ法分析头孢西丁钠聚合物浓溶液的结果表明,聚合物浓溶液中含有头孢西丁聚合物(HPSEC-1a,2a,3c,3d,3e,3g)以及其他小分子杂质(HPSEC-3a,3b,3f,4a,4b),未检出三聚体及更高聚合态的杂质。因为头孢西丁钠独特的化学结构,使其发生聚合反应的机理不同于分子中 7 位侧链含有氨噻肟及游离氨基的头孢菌素类,根据其化学结构特点,初步推断其聚合反应的机理如图 4 所示。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,因此不适合用于注射用头孢西丁钠的聚合物质控。

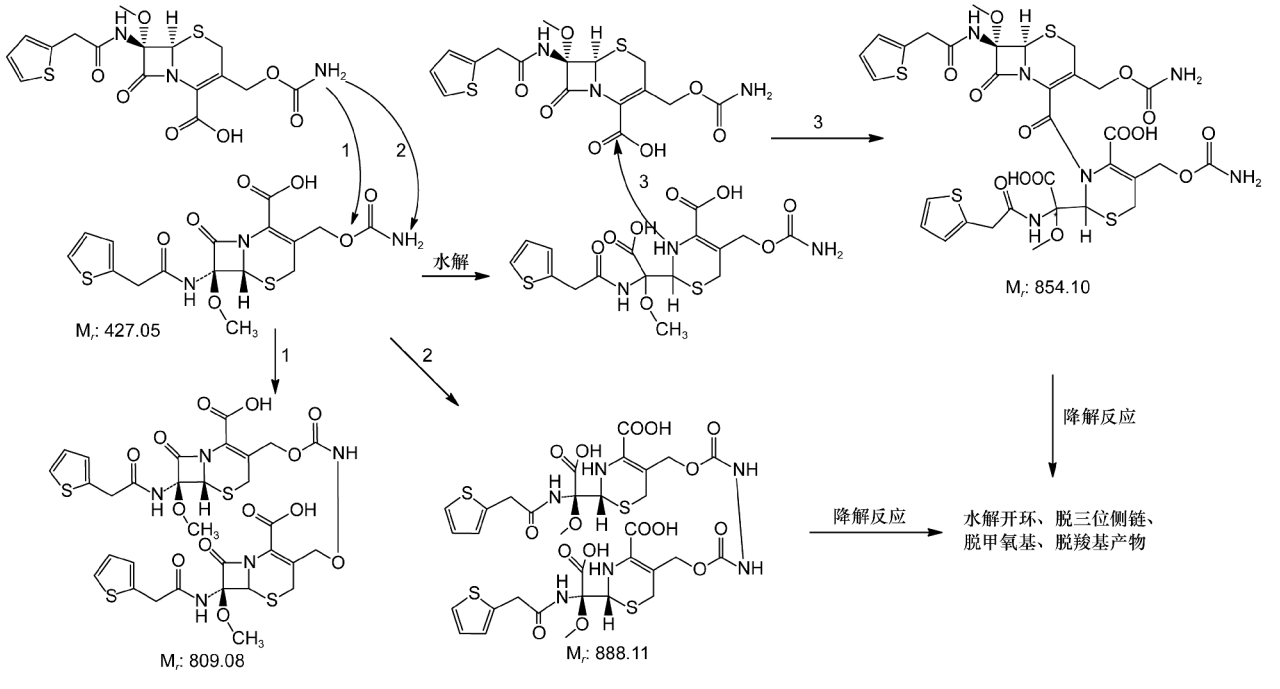


图 4 头孢西丁钠的推测聚合反应途径

4 RP-HPLC 法分析头孢西丁钠的聚合物杂质

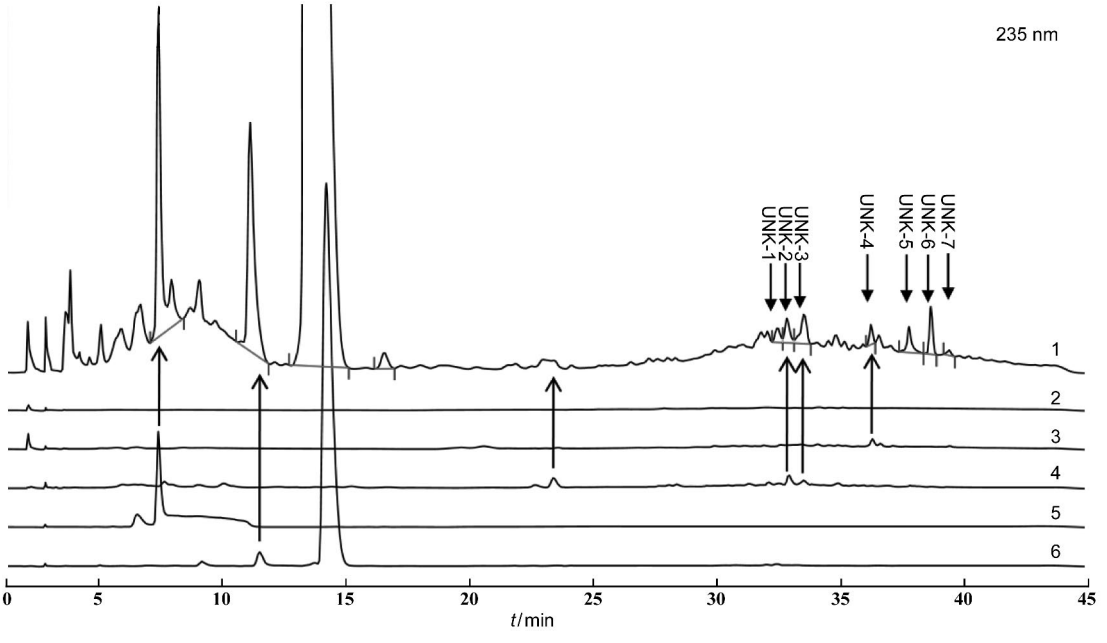
上述研究表明 HPSEC 法分析注射用头孢西丁钠聚合物杂质时，聚合物杂质与小分子杂质共出峰，不能反映聚合物杂质的实际含量，使其方法专属性不足。因此尝试建立 RP-HPLC 法，并采用 2D-HPLC 法和柱切换-LC/Msn-Ⅱ法对 RP-HPLC 的专属性进行研究。

4.1 建立 RP-HPLC 法分离聚合物杂质

本研究首先比较了《中华人民共和国药典》2015 年版、EP 10.0 版收载的注射用头孢西丁钠的有关物质分析方法（USP42 版未收载有关物质分析方法），《中华人民共和国药典》2015 年版采用水（用甲酸调节 pH 至 2.7）-乙腈系统、EP 10.0 采用甲酸铵（pH 2.7）-乙腈系统作为流动相进行有关物质分析，另外，Kumar 等[17]采用磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈系统进行头孢西丁钠的杂质分析。经过综合比较，我们发现文献报道的磷酸盐-甲醇-乙腈系统对聚合物杂质的分离效果较好，检出的聚合物杂质较多，因此最终选择该色谱系统作为聚合物分析的初始方法，并在此基础上进行方法优化。

4.2 2D-HPLC 法归属 RP-HPLC 中的聚合物杂质

采用 2D-HPLC 法，对聚合物浓溶液中的弱保留值杂质 HPSEC-1 ~ 4 进行分析，并与聚合物浓溶液的典型 RP-HPLC 色谱图进行比较，见图 5。



1：聚合物浓溶液；2：HPSEC-1；3：HPSEC-2；4：HPSEC-3；5：HPSEC-4；5：HPSEC-5；6：头孢西丁钠主峰

图 5 聚合物浓溶液的典型二维色谱图

HPSEC-1 在 RP-HPLC 系统中未检出明显的杂质峰，这可能与聚合物杂质定位溶液中杂质峰 HPSEC-1 为混合物峰且含量过低造成的；HPSEC-2 中主要检出了 1 个杂质峰 Unk-4；HPSEC-3 中主要检出了 2 个含量较低的杂质峰 Unk-2 和 Unk-3。头孢西丁钠主峰中除了检出了主峰外，还检出了 1 个小分子杂质峰，结构未知。HPSEC-4 中主要检出了 1 个小分子杂质峰。另外，在 2D-HPLC 系统中未检出杂质 Unk-5 ~ 7，可能与 HPSEC 色谱峰的半峰宽较大，未能切换到定量环中有关。总之，在 HPSEC 系统中的杂质峰在 RP-HPLC 系统中均应该能够检出。二维色谱法研究表明，在 HPSEC 法系统中，头孢西丁钠的 4 个弱保留值杂质中，含有多种小分子杂质。因此，进一步佐证了 HPSEC 法分析注射用头孢西丁钠中的聚合物杂质的方法专属性不足。

4.3 RP-HPLC 法分离的杂质结构研究

采用 RP-HPLC 色谱系统对聚合物浓溶液进行分析，在头孢西丁钠主峰前检出 2 个小分子杂质，在主峰后主要检出 7 种杂质 UNK-1 ~ 7，推测其中可能含有聚合物杂质，为了进一步在 RP-HPLC 色谱系统中的出峰位置。本研究采用柱切换-LC/MSn-Ⅱ法对主峰后 7 种杂质进行了定性分析，聚合物浓溶液的典型液相色谱图见图 6，具体的质谱数据见表 2。

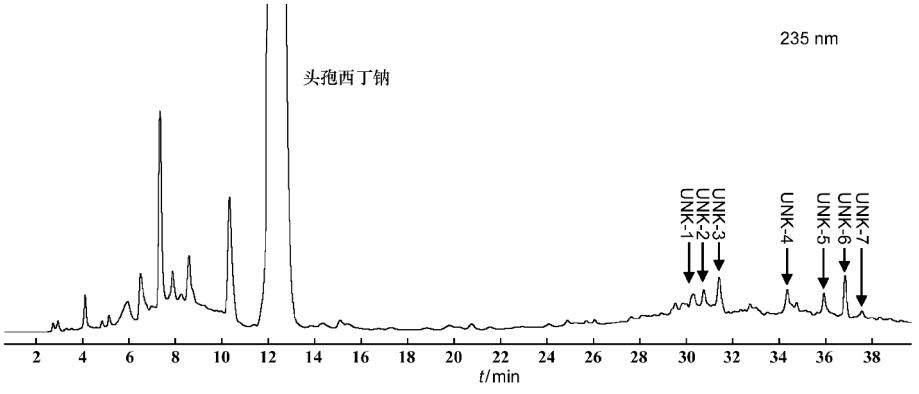


图 6 RP-HPLC 法分析聚合物浓溶液的典型色谱图

表 2 RP-HPLC 法分离聚合物浓溶液的杂质一览表

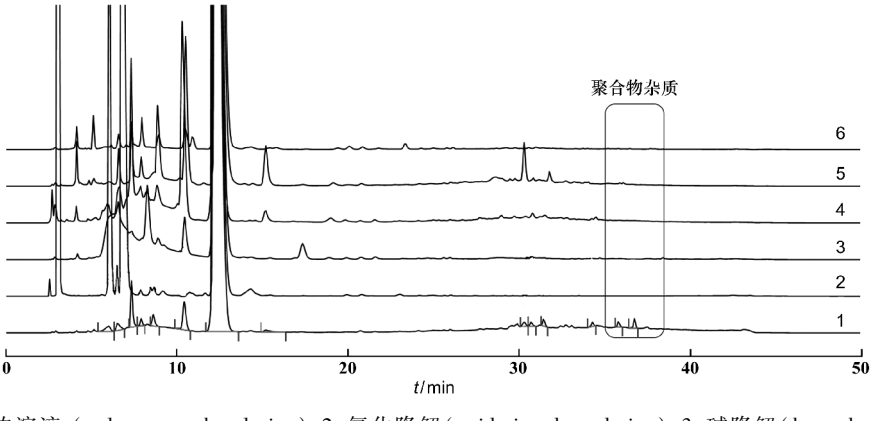
杂质编号	保留时间/min	相对分子量	离子数据	化学结构归属
UNK-1	30.3	519	456,438,347,314,303,205,158	小分子降解杂质
UNK-2	30.7	519	456,412,347,314,303,205,158	小分子降解杂质
UNK-3a	31.4	519	456,412,347,314,303,223,205,158	小分子降解杂质
UNK-3b	31.4	656	591,419,385,343,309,257,213,181	小分子降解杂质
UNK-4	34.4	621	589,557,539,465,374,158	小分子降解杂质
UNK-5	35.0	731	714,700,682,668,638,623,527,456,213	头孢西丁聚合物杂质Ⅰ
UNK-6	36.8	736	720,694,631,386,352,335,309,226,158	头孢西丁聚合物杂质Ⅱ
UNK-7	37.5	747	704,672,640,606,581,460,406,376,319,252	头孢西丁聚合物杂质Ⅲ

结果表明,杂质 UNK-5 ~7 属于头孢西丁钠聚合物杂质,杂质 UNK-1 ~4 为聚合物产物降解产生的小分子杂质。聚合物杂质 UNK-5,6 的含量较高,可作为质量控制的指针性聚合物杂质。头孢西丁钠的 7 位侧链不含有游离伯氨基,也不含有氨噻肟基团,而是在 3 位侧链上含有 1 个氧代甲酰胺,导致其发生聚合反应的机理与 7 位侧链含有氨基的化合物存在明显的差异,给聚合物杂质的结构解析带来了困难,仅通过质谱数据无法推断出指针性聚合物杂质的化学结构,有待于通过 NMR 法进一步研究加以确证,但是质谱法提供的相对分子量信息能够确定这些杂质均是头孢西丁钠的聚合物杂质。

4.4 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,我们对 RP-HPLC 法进行了方法学验证。

4.4.1 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,本研究对头孢西丁钠强制降解溶液进行了分析,见图 7。结果在 35 ~40 min 范围内未发现小分子干扰峰。以上分析进一步证明了本研究建立方法的专属性。



1:聚合物浓溶液 (polymer stock solution);2:氧化降解(oxidative degradation);3:碱降解(base degradation);4:水浴降解(water bath degradation);5:酸降解(acid degradation);6:UV 降解(UV degradation)

图 7 RP-HPLC 法分析聚合物浓溶液和强制降解溶液的典型色谱图

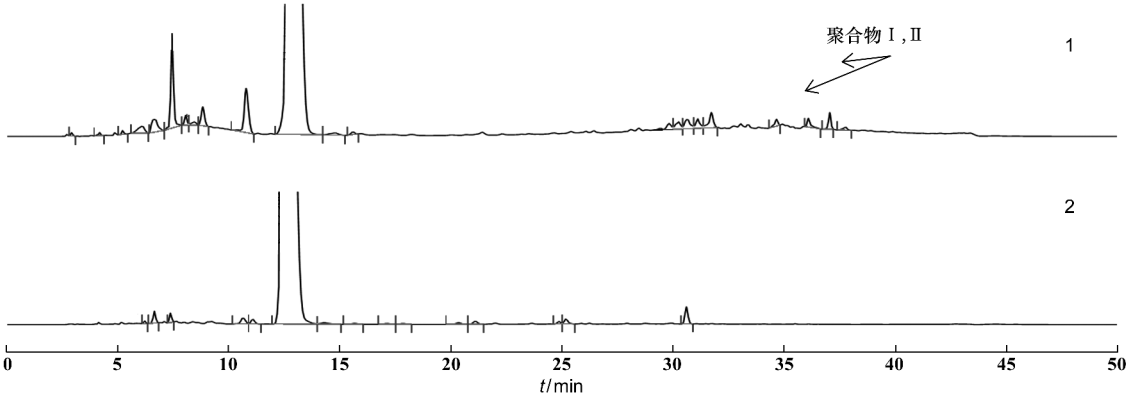
4.4.2 检测限与定量限 结果表明,头孢西丁钠聚合物Ⅰ的最低定量限为 3.78×10^{-3} μg;最低检测限为 1.89×10^{-3} μg。头孢西丁钠聚合物Ⅱ的最低定量限为 6.68×10^{-3} μg;最低检测限为 3.34×10^{-3} μg。

4.4.3 溶液稳定性实验 头孢西丁钠二聚体在 10 h 内稳定,建议实际样品测定时,临用前配置溶液,即溶即进。

4.4.4 耐用性实验 当柱温(28 ℃,30 ℃,32 ℃)、流速(0.9,1.0,1.1 mL·min^{-1})、pH 值(3.0,3.2,3.4)改变时,RP-HPLC 法均可有效分离样品中的头孢西丁钠聚合物杂质。不同型号的色谱柱对聚合物杂质的分离能力不尽相同,Shimadzu Inertsil Ph-3 色谱柱可以较好地分离样品中的头孢西丁钠聚合物,因此建议选择该色谱柱或性能与之类似的色谱柱。

5 RP-HPLC 法分析供试品的聚合物含量

采用 RP-HPLC 法分析注射用头孢西丁钠制剂的聚合物杂质,见图 8。以头孢西丁钠聚合物 I 和 II 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,在注射用头孢西丁钠制剂中未检测到明显的头孢西丁钠聚合物杂质峰,即头孢西丁钠聚合物杂质的含量低于检出限。



1:聚合物浓溶液(polymer stock solution);2:制剂(product)

图 8 RP-HPLC 法分析聚合物浓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 法分析注射用头孢西丁钠的聚合物杂质的方法专属性差,RP-HPLC 法分析头孢西丁钠聚合物杂质专属性好、方法准确、耐用性好,适用于注射用头孢西丁钠聚合物的质量控制;头孢西丁钠聚合物浓溶液可作为头孢西丁钠聚合物分析的定位溶液,并以头孢西丁钠聚合物杂质Ⅰ和Ⅱ为指针性聚合物杂质进行聚合物质控。HPSEC 中检出的相对分子量为 888,742 和 741 Da 等头孢西丁聚合物杂质(HPSEC-1a,2a,3c,3d,3e),推测 RP-HPLC 法的保留时间应该在 UNK-3 和 UNK-4 之间,这些聚合物杂质虽然在 HPSEC 法中可以用质谱检出,但是因其在 RP-HPLC 法中的 UV 响应值过低,无法将其作为指针性聚合物杂质在 RP-HPLC 法中进行质量控制。本研究在聚合物浓溶液和实际样品中均未发现《欧洲药典》10.0 报道的二聚体杂质 G,推测该聚合物杂质为非特征性的聚合物杂质,而且在有关物质检查项下作为特定杂质可以有效控制,因此本文建立的 RP-HPLC 法主要对水溶液静置产生的聚合物杂质及其结构类似物进行了质量控制。由于质谱法自身技术特点的限制以及头孢西丁钠发生的非特征性聚合反应,我们未能推定出 RP-HPLC 法检出的 2 种指针性聚合物杂质的化学结构,需要采用 NMR 法等进一步开展研究。

[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 年版. 二部. 北京:中国医药科技出版社, 2015:250-252.
[6] US PHARMACOPEIA CONVENTION. The United States Pharmacopeia 42 edi [S]. Roehville MD:the United States Pharmacopeial Convention Inc., 2019: 839-841.

[7] EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. Europeon Pharmacopeia 10.0[S]. Strasbourg: European directorate for the quality of medicines, 2020: 2124 – 2125.
[8] 刘云, 高燕霞, 姜建国. Sephadex G-10 凝胶色谱系统测定头孢西丁钠中高分子聚合物[J]. 中国药品标准, 2009, 10(2): 130 – 132.
[9] 陈霞, 王淼, 申长慧, 等. 葡聚糖凝胶色谱法测定注射用复方头孢西丁钠中的高聚物[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4): 265 – 267.
[10] 王健松, 周卫军, 刘敏, 等. 高效分子排阻色谱法测定头孢西丁钠中高分子杂质的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(11): 842 – 845.
[11] 苑华, 张冬, 宋家雄. 高效分子排阻色谱法测定注射用头孢西丁钠聚合物[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1651 – 1652.
[12] 胡昌勤. β-内酰胺抗生素聚合物分析技术的展望[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(24): 2098 – 2102.
[13] 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.
[14] 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.
[15] 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.
[16] 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.
[17] KUMAR VJ, BADARINADH GUPTA P, MUKKANTI K, *et al*. Identification, isolation and characterization of a new impurity in cefoxitindrug substance resulting from stress stability studies[J]. *Anal Methods*, 2011,3(1): 181 – 185.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 10 – 17