·实验研究·

注射用头孢他啶阿维巴坦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**:建立注射用头孢他啶阿维巴坦钠中聚合物杂质的分析方法。**方法**:采用水为溶剂制备头孢他啶阿维巴坦钠的聚合物浓溶液;采用高效凝胶色谱法(HPSEC)和柱切换-LC/MSn 法对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 C_{18} 型反相色谱柱,以磷酸盐缓冲液(pH 3.4)-甲醇-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**:在聚合物浓溶液中鉴定出 5 种头孢他啶的聚合物杂质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,方法专属性与定量准确性差;RP-HPLC 法分析能够检出 4 种头孢他啶指针性聚合物杂质,未检出与阿维巴坦钠相关的聚合物杂质。**结论**:HPSEC 法不能对注射用头孢他啶阿维巴坦钠的聚合物杂质进行有效质控,建立的 RP-HPLC 法分析注射用头孢他啶阿维巴坦钠聚合物杂质的专属性良好,样品中的聚合物杂质均来自头孢他啶,阿维巴坦钠不产生聚合物杂质。

[关键词]　注射用头孢他啶阿维巴坦钠;聚合物;杂质;柱切换-LC/MSn;高效凝胶色谱;二维液相色谱;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)12－1117－09

Analysis of polymer impurities in ceftazidime averbatan sodium for 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 method for determination of polymer impurities in ceftazidime averbatan sodium for injection. **Methods**: Ceftazidime averbatan sodium was dissolved by water to prepare polymer stock solution. High performance size exclusion chromatography method (HPSEC) and column switching-LC/MSn method were applied to separate and deduce the poor retention impurities in polymer stock solution, and the specificity of HPSEC method was evaluated. A RP-HPLC method for polymer analysis was established with C_{18} column, using gradient elution by phosphate buffer solution (pH 3.2)-acetonitrile-methanol, and the RP-HPLC method was validated. **Results**: Five polymers were identified in polymer stock solution, some small molecular impurities were also detected. Polymer impurities were liable to co-elute with small molecular impurities when using HPSEC method, which resulted in poor quantification accuracy and specificity. Four indicative polymer impurities were detected by RP-HPLC method with effective specificity, and no polymers related to averbatan sodium were detected. **Conclusion**: HPSEC method is not suitable for the quality control of polymer impurities in ceftazidime averbatan sodium for injection, while the newly established RP-HPLC method is specific, which can effectively control the polymer impurities. The polymer impurities in the samples were all from ceftazidime, and averbatan sodium did not produce polymer impurities.

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

[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]　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。

β-内酰胺类药物在生产、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]。《中华人民共和国药典》一直严格控制此类抗生素中的聚合物类杂质。

注射用头孢他啶阿维巴坦钠是一种 β-内酰胺类抗生素与 β-内酰胺类酶抑制剂的新型复方制剂,2015 年 2 月经美国 FDA 批准在美国上市。阿维巴坦钠是一种新型 β-内酰胺酶抑制剂,其化学结构中不含 β-内酰胺环,它与 β-内酰胺酶共价结合时发生的酰化反应可逆,生成产物不会发生水解,因此它对 β-内酰胺酶的抑制作用更广、更强、更长效[5]。《中华人民共和国药典》2015 年版、2020 年版以及欧洲药典 10.0 版和美国药典(USP)42 版均未收载注射用头孢他啶阿维巴坦钠制剂。据文献报道,陈宁等[6]对 G10 凝胶色谱法分析头孢他啶聚合物杂质的流动相系统进行了优化,刘映倩等[7]采用高效凝胶色谱(HPSEC)法测定了注射用头孢他啶的聚合物,王琰等[8]采用 HPLC-DAD 法同时测定了头孢他啶阿维巴坦钠复方制剂的含量。李进等[9]采用 RP-HPLC 法对头孢他啶原料及注射用头孢他啶制剂中的聚合物杂质进行了分析,但是未见关于注射用头孢他啶阿维巴坦钠制剂的聚合物研究报道。头孢他啶原料和注射用头孢他啶制剂中均有可能产生头孢他啶的聚合物杂质,但是在头孢他啶与阿维巴坦钠组成的复方制剂中,除了头孢他啶的聚合物杂质外是否会产生新的聚合物杂质,应该采用何种方法对其进行质控,目前仍缺乏系统的研究。

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[10-16]。在本研究中,我们综合运用柱切换-LC/MSn 法和二维液相色谱法(2D-HPLC),拟评价新型酶抑制剂阿维巴坦钠是否会与头孢他啶交叉聚合产生新型的聚合物杂质,并尝试建立 RP-HPLC 法对注射用头孢他啶阿维巴坦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

2D－HPLC 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),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

注射用头孢他啶阿维巴坦钠(批号:010A94)、头孢他啶原料(批号:DJ81JD)、头孢他啶对照品(批号:130484-201806,85.8%)、阿维巴坦钠对照品(批号:G293224MR-1)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈、甲醇(色谱纯)购自美国 Thermo Fisher 公司;无水磷酸氢二钠(批号:20181025,分析纯)、无水磷酸二氢钠(批号:20181105,分析纯)、磷酸(批号:20180902,分析纯)由国药集团化学试剂公司提供;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 相为 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 相为乙腈;A∶B=85∶15。等度洗脱,流速为 0.7 mL·min^{-1},检测波长为 254 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 20 μL;稀释溶剂为水;样品浓度为 6.0 mg·mL^{-1}(以头孢他啶计)。用于分离注射用头孢他啶阿维巴坦钠的弱保留值杂质。

4 RP-HPLC 法

色谱柱为 phenomenex Gemini C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流速:0.8 mL·min^{-1};检测波长:254 nm;柱温:30 ℃。流动相 A 相:磷酸盐缓冲液(取 1.4 g 无水磷酸氢二钠,1.4 g 无水磷酸二氢钾加水 1 000 mL 溶解,用磷酸调节 pH 至 3.4,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:0~4.0 min,4%~11% B;4.0~11.0 min,11%~13% B;11.0~15.0 min,13%~16% B;15.0~30.0 min,16%~20% B;30.0~45.0 min,20%~50% B;45.0~46.0 min,50%~4% B;46.0~60.0 min,4% B。用于分析注射用头孢他啶阿维巴坦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 C_{18}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 60 μL，用于分离供试品中的弱保留值杂质。色谱系统Ⅳ：色谱柱为 Agilent SB-C_{18}柱（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：0.0～5.0 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。柱温为室温；流速为 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 kV，毛细管温度（+）350 ℃，鞘气（+）35，辅助气（+）10，最大喷雾电流（+）100.00，探针加热器温度（+）350 ℃，S-棱镜 RF 水平 50，离子源为可加热电喷雾离子源（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：13 V，缺省电荷状态 1。

9 方法学验证

9.1 方法专属性

精密量取聚合物浓溶液、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降解小分子杂质的干扰。

9.2 方法定量限与检测限

精密量取聚合物浓溶液，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。采用头孢他啶对照品为外标，分别以基线噪音的 10 和 3 倍为指标，计算方法的检测限（LOD）和定量限（LOQ）。

9.3 溶液稳定性

取聚合物浓溶液 20 μL，分别在 0，3，6，10，15，30 h 进样分析，计算注射用头孢他啶阿维巴坦钠中指针性聚合物峰面积的变化情况。

9.4 重复性实验

取聚合物浓溶液，冷冻干燥，然后分别称取 5 份冻干粉，每份约 75 mg（以头孢他啶计约 60 mg），置于 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，制成头孢他啶浓度约为 6 mg·mL^{-1}的溶液，作为重复性测定溶液。以 4 种聚合物杂质的含量为指标，计算分析方法的重复性。

9.5 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

聚合物浓溶液：称取注射用头孢他啶阿维巴坦钠供试品适量（以头孢他啶计约 120 mg），置于 10 mL 量瓶中，加水 2 mL 溶解，室温静置 4 d，作为注射用头孢他啶阿维巴坦钠聚合物储备溶液。量取 1 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（以头孢他啶计约 6 mg·mL^{-1}）。

酸降解溶液：称取注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入 7.0 mL 水溶解，然后加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}的盐酸溶液，在 70 ℃水浴中放置 15 min，取出冷却到室温，加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}的氢氧化钠溶液，然后加水稀释到刻度，备用。

碱降解溶液：称取注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入 9.0 mL 水溶解，然后加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}的氢氧化钠溶液，在 70 ℃水浴中放置 15 min，取出冷却到室温，加入 1.0 mL 的 0.2 mol·L^{-1}的盐酸溶液，然后加水稀释到刻度，备用。

水浴降解溶液：取注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，在 70 ℃水浴中加热 60 min，取出冷却到室温，备用。

氧化降解溶液：取注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水约 5.0 mL 溶解，然后加入 1.0 mL 的 10% 双氧水，在室温下放置 10 min，用水稀释到刻度，摇匀，备用。

UV 降解溶液：取注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，将其转移到表面皿中，在 254 nm 波长紫外灯下照射 18 h 后，取出备用。

高温降解溶液：取注射用头孢他啶阿维巴坦钠 1 瓶，置于 105 ℃烘箱中，加热 8 h 后取出冷却。取上述注射用头孢他啶阿维巴坦钠约 75 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀备用。

阿维巴坦钠对照品溶液：称取阿维巴坦钠对照

品约 20 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制成浓度约为 2 mg·mL^{-1}的溶液。

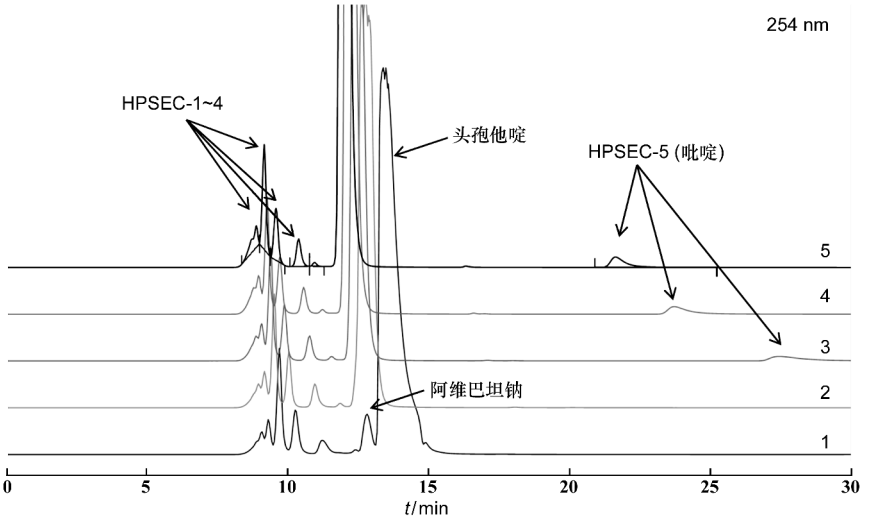
吡啶对照品溶液:称取吡啶对照品约 10 mg,置于 100 mL 的量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。精密量取上述溶液 100 μL 置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,制成浓度约为 0.1 μg·mL^{-1}的溶液。

供试品溶液:称取注射用头孢他啶阿维巴坦钠适量,置于 10 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含头孢他啶浓度约为 6 mg·mL^{-1}的溶液。

结　果

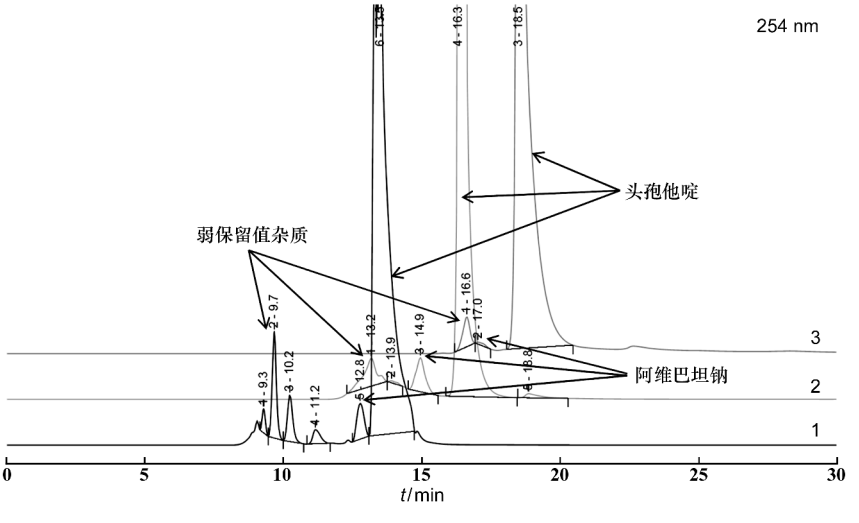
1　HPSEC 法分析弱保留值杂质

注射用头孢他啶阿维巴坦钠制剂中含有头孢他啶和阿维巴坦钠 2 种组分,其中头孢他啶为分子内盐类化合物,阿维巴坦钠为离子型化合物,因此在 HPSCE 系统中二者的色谱保留行为易随着流动相强溶剂的比例、缓冲液的 pH、缓冲盐的浓度改变而发生变化。前期研究中,我们发现 0.005 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-乙腈(85∶15)能够对头孢他啶及其聚合物杂质进行良好的分离,但是该方法对头孢他啶、阿维巴坦钠以及二者的聚合物杂质的分离能力还需要进一步分析。为此,本研究对流动相系统中有机相乙腈的比例(0%,5%,10%,15%,20%)、磷酸盐缓冲液的 pH 值(5.0,6.0,7.0)、缓冲盐浓度(0.005,0.01,0.02 mol·L^{-1})等色谱参数进行了优化,见图 1 ~ 图 3。



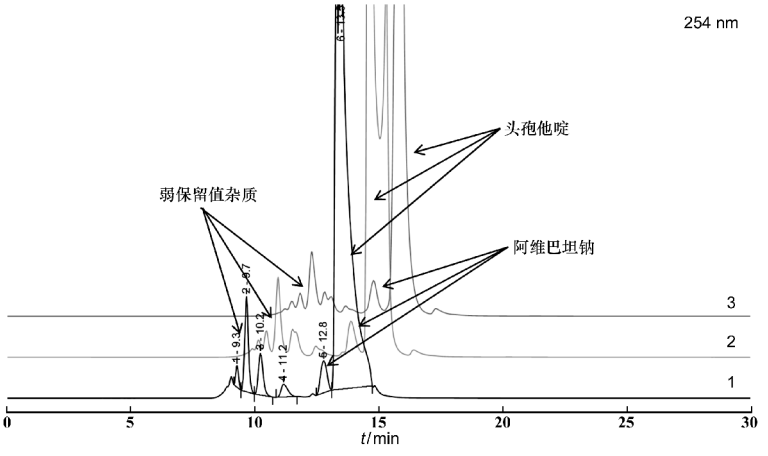
1:A∶B = 100∶0;2:A∶B = 90∶10;3:A∶B = 95∶5;4:A∶B = 85∶15;5:A∶B = 80∶20

图 1　聚合物浓溶液在不同强溶剂比例条件下的典型 HPSEC 色谱图



1:pH 7.0;2:pH 6.0;3:pH 5.0

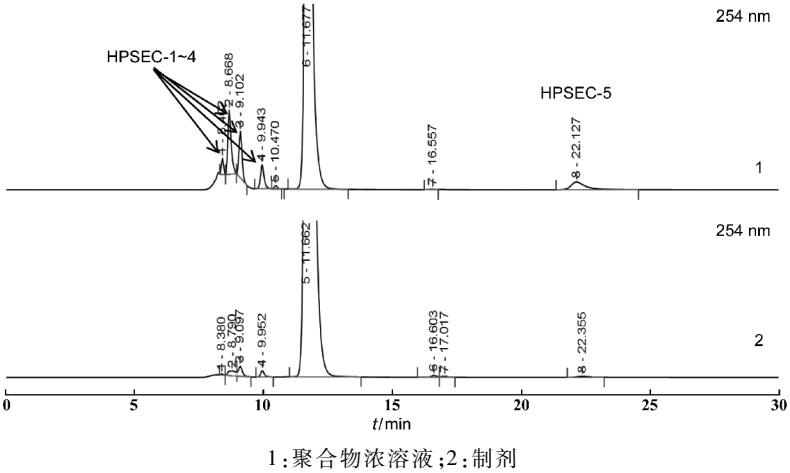
图 2　不同缓冲液 pH 值条件下的典型 HPSEC 色谱图



1:0.005 mol·L^{-1}; 2:0.01 mol·L^{-1}; 3: 0.02 mol·L^{-1}

图 3 聚合物浓溶液在不同缓冲液 pH 值条件下的典型 HPSEC 色谱图

研究表明,当强溶剂乙腈的比例为由 20.0% 降低至 5.0% 的过程中,头孢他啶主峰与阿维巴坦钠主峰均共出峰,无法分离;当强溶剂乙腈的比例降低为 0.0% 时,阿维巴坦钠主峰与头孢他啶主峰实现分离,分离度为 0.72,未达到基线分离,但是造成头孢他啶主峰的柱效显著下降,色谱峰严重展宽,主峰后的一个较大的杂质峰(吡啶杂质峰)无法检出等问题。在乙腈比例为 0.0% 的基础上,调节磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0,6.0 和 5.0,随着 pH 值的降低,头孢他啶和阿维巴坦钠主峰前 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;调节缓冲盐的浓度由 0.005 mol·L^{-1}升高至 0.02 mol·L^{-1},阿维巴坦钠与头孢他啶的分离度分别为 1.1,1.4 和 2.0,分离度明显增大,但是当缓冲盐的离子浓度为 0.01 mol·L^{-1}时,头孢他啶主峰发生裂分,不适合作为流动相;当缓冲盐的离子浓度增加到 0.02 mol·L^{-1}时,弱保留值杂质裂分为多个小杂质峰,分离度变差。总之,当 0.005 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液(pH 7.0)与强溶剂乙腈的比例为 100∶0时,虽然能将头孢他啶与阿维巴坦钠进行初步分离,但是弱保留值杂质的分离效果较差,其他色谱参数的调整未能解决上述问题。为了保证弱保留值杂质得到有效分离,我们认为无需将头孢他啶与阿维巴坦钠 2 个主峰进行分离,为了排除阿维巴坦钠对弱保留值杂质定量结果的干扰,可在定量分析时采用头孢他啶外标法进行定量。因此,最终选择 0.005 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液-乙腈(85∶15)作为注射用头孢他啶阿维巴坦钠的 HPSEC 法流动相系统。聚合物浓溶液的分析结果显示,头孢他啶与阿维巴坦钠主峰前主要存在 4 个弱保留值杂质峰 HPSEC-1 ~4,在主峰后存在 1 个杂质峰 HPSEC-5。用该方法对注射用头孢他啶阿维巴坦钠进行分析,检出弱保留值杂质 HPSEC-2 ~4,其弱保留值杂质峰总含量为 0.43%,见图 4。



1:聚合物浓溶液;2:制剂

图 4 HPSEC 法分析注射用头孢他啶阿维巴坦钠的典型色谱图

2 柱切换-LC/MSn 法推定弱保留值杂质的化学结构

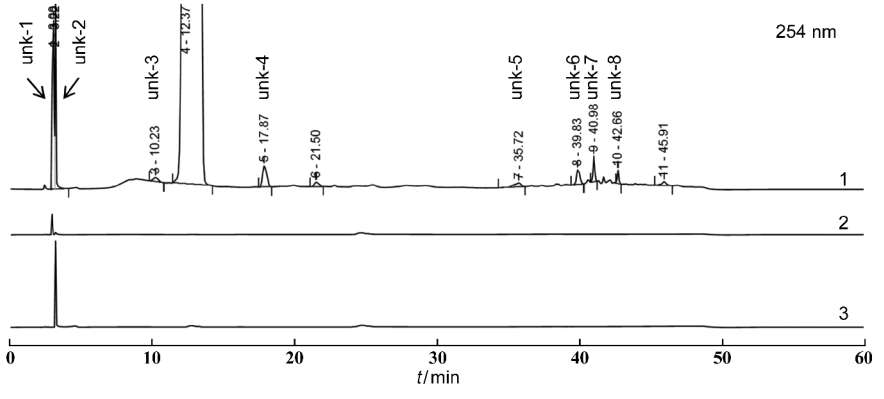
以注射用头孢他啶阿维巴坦钠聚合物浓溶液为供试品，采用 HPSEC 法分离得到弱保留值杂质 HPSEC-1 ~ 4，见图 4。然后采用柱切换-LC/MSn-I 法推定各组分的化学结构，分析结果表明，注射用头孢他啶阿维巴坦钠聚合物浓溶液的弱保留值杂质与我们前期研究的头孢他啶原料聚合物浓溶液的杂质种类和结构一致[9]，在此不再赘述，未检出与阿维巴坦钠相关的聚合物杂质。上述研究表明，HPSEC 法分析注射用头孢他啶阿维巴坦钠的聚合物杂质时，头孢他啶的聚合物杂质与小分子杂质共出峰，不能反映聚合物杂质的实际含量，方法专属性不足。

3 建立 RP-HPLC 法分离聚合物杂质

由于各国药典尚未收载注射用头孢他啶阿维巴坦钠的有关物质质控方法，所以本研究基于前期进行的头孢他啶原料的聚合物质控方法，优化建立了该复方制剂的聚合物分析用 RP-HPLC 方法。

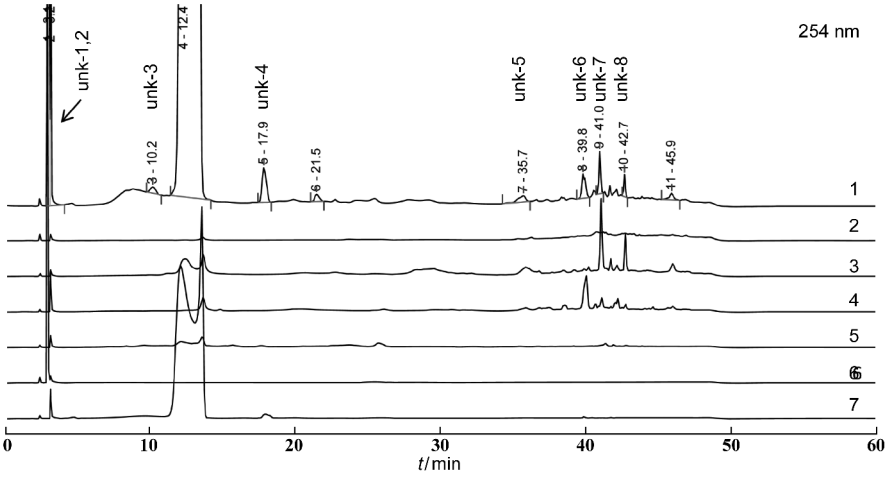
3.1 2D-HPLC 法归属 RP-HPLC 中的聚合物杂质

采用 2D-HPLC 法，将聚合物浓溶液中的弱保留值杂质 HPSEC-1 ~ 5 切换至 C_{18} 色谱柱中进行分析，并与聚合物浓溶液、阿维巴坦钠对照品溶液、吡啶对照品溶液的典型 RP-HPLC 色谱图进行比较，见图 5 和图 6。



1：聚合物浓溶液；2：吡啶；3：阿维巴坦钠

图 5 聚合物浓溶液与吡啶、阿维巴坦钠的典型 2D-HPLC 色谱图



1：聚合物浓溶液；2：HPSEC-1；3：HPSEC-2；4：HPSEC-3；5：HPSEC-4；6：HPSEC-5；7：主峰

图 6 聚合物浓溶液的典型 2D-HPLC 图

结果显示，头孢他啶主峰在 12.37 min 出峰；在主峰前检出 3 个杂质 unk-1 ~ 3（t_R = 3.08，3.22，10.23 min）；在头孢他啶主峰后检出 6 个主要杂质，分别命名为 unk-4 ~ 8（t_R = 17.87，35.72，39.83，40.98，42.66 min），所有杂质均在 50 min 前出峰完毕。经过与吡啶、阿维巴坦钠对照品进行保留时间比对可知，unk-1 为吡啶，unk-2 为阿维巴坦钠。在 HPSEC 系统检出的 5 个弱保留值杂质峰 HPSEC-

1～5 中，HPSEC-1 在 RP-HPLC 系统中未检出明显的杂质峰，这可能是聚合物浓溶液中杂质 HPSEC-1 的含量过低造成的；HPSEC-2 中主要检出了 3 个杂质峰（unk-5，7，8），基于前期质谱分析的结果，初步推断为头孢他啶二聚体衍生物 I 与头孢他啶二聚体及其水解物、头孢他啶三聚体；HPSEC-3 中主要检出了 2 个杂质峰（unk-6，7），初步推断为头孢他啶二聚体以及三聚体脱水物；HPSEC-4 中主要检出了多个含量较低的杂质峰，初步推测为头孢他啶降解物以及结构未知的小分子杂质。主峰中检出了头孢他啶和阿维巴坦主峰。HPSEC-5 中主要检出了一个杂质（unk-1），推断为小分子杂质吡啶。2D-HPLC 法研究表明，在 HPSEC 法系统中，头孢他啶主峰前的 4 个弱保留值杂质中，含有多种小分子杂质，与前面质谱法的分析结果基本吻合。因此，进一步验证了 HPSEC 法分析注射用头孢他啶阿维巴坦钠中的聚合物杂质的方法专属性不足。

3.2 RP-HPLC 法分离的杂质结构研究

采用 RP-HPLC 法对聚合物浓溶液进行分析，检出了 8 个明显的杂质峰，其中 unk-1 和 unk-2 分别为吡啶和阿维巴坦钠；unk-3 和 unk-4 因与主峰共流出，推测为小分子杂质；unk-5～8 为疑似聚合物杂质。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 方法 2 对分离的疑似聚合物杂质（unk-5～8）进行结构鉴定，unk 5～8 的推测化学结构式见图 7，典型色谱图见图 8，结构归属见表 1。

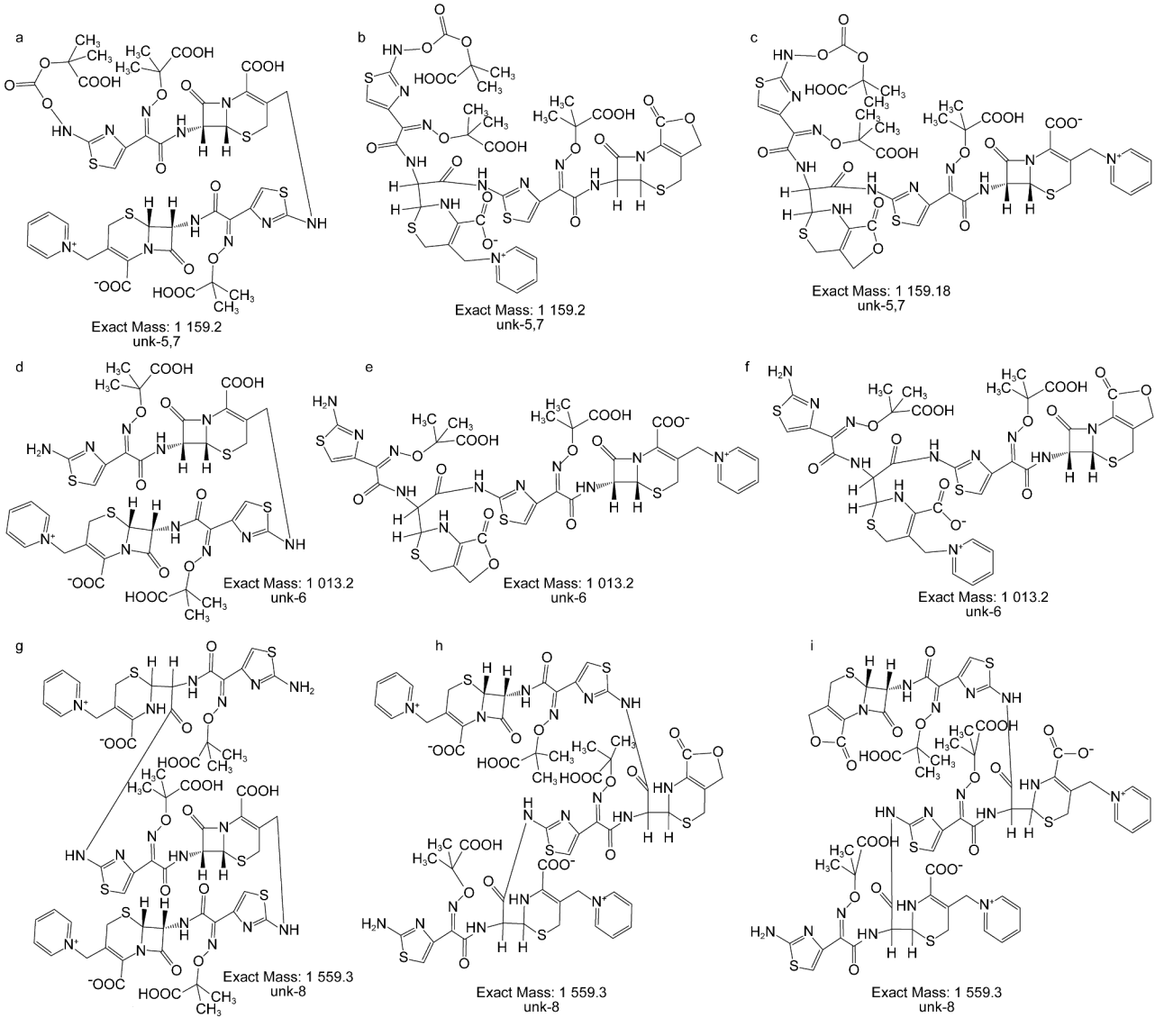


图 7 RP-HPLC 法分离的聚合物杂质结构式

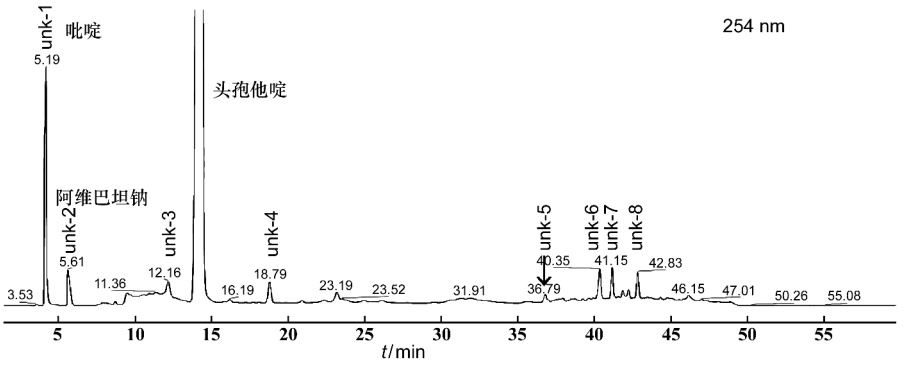


图 8 RP-HPLC 法分析聚合物浓溶液的典型色谱图

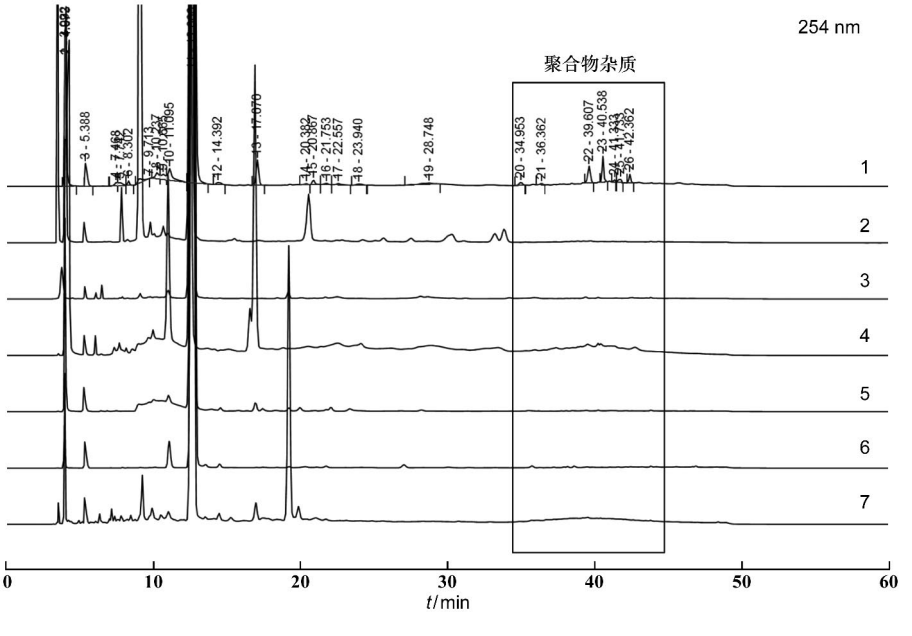
表 1 RP-HPLC 法分离的聚合物杂质一览表

杂质编号	保留时间/min	相对分子质量	部分子离子数据	化学结构归属
unk-5	36.79	1 159	1 081, 1 037, 1 020	头孢他啶二聚体衍生物 i
unk-6	40.35	1 013	935, 891, 874, 847	头孢他啶二聚体
unk-7	41.15	1 159	1 081, 1 037, 1 020, 976	头孢他啶二聚体衍生物 i 异构体
unk-8	42.83	1 559	1 481, 1 437, 1 358, 1 314, 935, 891,547	头孢他啶三聚体

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,我们对 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,本研究对注射用头孢他啶阿维巴坦钠的强制降解溶液进行了分析,见图 9。结果在 35 ~ 405 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;2:氧化降解;3:酸降解;4:碱降解;5:水浴降解;6:uv 降解;7:高温降解

图 9 RP-HPLC 法分析聚合物浓溶液和强制降解溶液的典型色谱图

3.3.2 检测限与定量限 头孢他啶二聚体的最低定量限约为 3.3×10^{-3} μg,最低检测限约为 2.2×10^{-3} μg。二聚体衍生物 I 异构体的最低定量限约为 1.75×10^{-3} μg,最低检测限约为 1.16×10^{-3} μg。

3.3.3 溶液稳定性实验 头孢他啶聚合物在 30 h 内稳定,建议实际样品测定时,临用前配置溶液,即

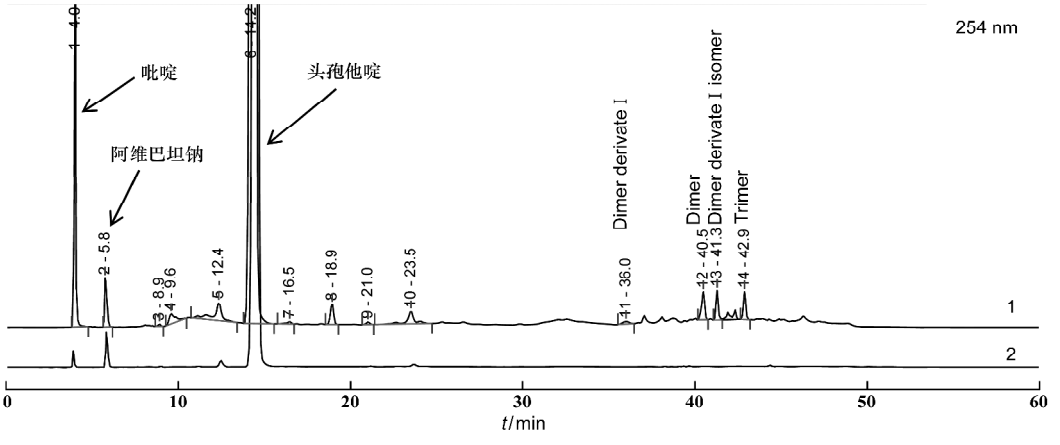
溶即进。

3.3.4 重复性实验 经过 5 次平行测定,头孢他啶二聚体的含量为 0.44%(RSD = 1.20%)、头孢他啶二聚体衍生物 I 的含量为 0.09%(RSD = 1.50%)、头孢他啶二聚体衍生物 I 异构体的含量为 0.32%(RSD = 1.32%)、头孢他啶三聚体的含量为 0.33%(RSD = 1.45%),重复性良好。

3.3.5 耐用性实验 当柱温(38 ℃,40 ℃,42 ℃)、pH 值(3.0,3.2,3.4)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,Phenomenex Gemini 色谱柱可以较好地分离样品中的头孢他啶聚合物杂质。

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。以头孢他啶二聚体、二聚体衍生物 I 及其异构体、头孢他啶三聚体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,在注射用头孢他啶阿维巴坦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。



1:聚合物浓溶液;2: 制剂

图 10 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 法分析注射用头孢他啶阿维巴坦钠聚合物杂质的方法专属性差,RP-HPLC 法分析头孢他啶阿维巴坦钠聚合物杂质专属性好、方法准确、耐用性好,能够检出 4 种指针性头孢他啶的聚合物杂质,未检出阿维巴坦钠自身聚合产物以及头孢他啶与阿维巴坦钠之间的聚合产物,这与阿维巴坦钠化学结构较为稳定相吻合;聚合物浓溶液可用作聚合物杂质的定位溶液。

[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, (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] 黄天敏,杨映霞,姜赛平,等. 头孢他啶阿维巴坦的临床应用进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38(3): 129 - 134.

[6] 陈宁,蔡恒东,余泽民. 头孢他啶高分子杂质含量测定中流动相的改进[J]. 中国抗生素杂志,2002,27(1):63 - 64.

[7] 刘映倩, 吴群, 罗立骏, 等. 高效液相色谱法测定注射用头孢他啶聚合物[J]. 医药导报, 2015(6):106 - 108.

[8] 王琰, 姚尚辰, 张培培,等. HPLC-DAD 法同时测定注射用头孢他啶阿维巴坦钠复方制剂的含量[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(5):33 - 38.

[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] 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.

[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(4): 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 - 1295.

[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. 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.

[16] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢克肟原料与制剂的聚合物杂质分析[J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2442 - 2448.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 02 - 06