

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.24.009

注射用头孢美唑钠高分子杂质鉴定方法研究

韩 彬, 庞文哲, 高燕霞[△]

(河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 建立高效分子排阻色谱法检测头孢美唑钠中的聚合物的方法,并应用在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(2D-LC-IT-TOF/MS)法对其聚合物进行鉴定。方法 色谱柱为 WT-Cef-SEC 柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm),流动相为 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈(95:5, V/V),流速为 0.6 mL/min,检测波长为 254 nm,柱温为 25℃,进样量为 20 μL,电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式;按不加校正因子的主成分自身对照法计算聚合物的含量。结果 头孢美唑钠峰与聚合物峰分离良好。头孢美唑钠质量浓度线性范围为 0.5~2.5 μg/mL($r=0.999\ 9$, $n=5$),定量限为 3 ng,检测限为 1 ng。通过 2D-LC-IT-TOF/MS 推测出聚合物 3 为头孢美唑钠二聚体,聚合物 2 为头孢美唑钠三聚体。结论 该方法适用于注射用头孢美唑钠高分子杂质的检测,为 β-内酰胺类抗菌药物中聚合物的分离、分析及产品质量提高提供了依据。

关键词:头孢美唑钠;高分子杂质;高效分子排阻色谱法;在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱

中图分类号:R917;R978.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)24-0031-04

Identification of Polymer Impurities in Cefmetazole Sodium for Injection

HAN Bin, PANG Wenzhe, GAO Yanxia

(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050011)

Abstract: Objective To establish a high performance size exclusion chromatography(HPSEC) method for the content determination of the polymers in cefmetazole sodium, and to identify the polymers by on-line desalting-HPLC-ion trap time of flight-mass spectrometry(2D-LC-IT-TOF/MS). **Methods** The chromatographic column was WT-Cef-SEC column(300 mm×7.8 mm, 5 μm), the mobile phase was 5 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile(95:5, V/V), the flow rate was 0.6 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 25℃, the sample size was 20 μL. The ion source was ESI ionization source, the scan pattern was positive and the content of polymers was determined by main component selfcompare without calibration factor. **Results** The peak of cefmetazole sodium was well separated from the peak of polymers. The linear range of cefmetazole sodium concentration was 0.5~2.5 μg/mL($r=0.999\ 9$, $n=5$). The LOQ of cefmetazole sodium was 3 ng, and the LOD of cefmetazole sodium was 1 ng. Polymer 3 was conjectured to be the dimer of cefmetazole sodium and Polymer 2 was conjectured to be the trimer of cefmetazole sodium by 2D-LC-IT-TOF/MS. **Conclusion** The method is suitable for the determination of polymer impurities in Cefmetazole Sodium for Injection, which provides a basis for the separation and analysis of polymers in β-lactam antibiotics and the improvement of products' quality.

Key words: cefmetazole sodium; polymer impurities; high performance size exclusion chromatography; on-line desalting-HPLC-ion trap time of flight-mass spectrometry

头孢美唑钠是第 2 代头孢菌素类半合成抗菌药物^[1], 用于临床^[2-5], 对多种 β-内酰胺酶稳定, 体内分布好、对革兰阳性菌和革兰阴性菌的抗菌效能均良好, 广泛应 不良反应少^[6]。研究表明, β-内酰胺类抗菌药物引发的

第一作者:韩彬,女,大学本科,主管药师,研究方向为抗菌药物质量控制,(电子信箱)13933853331@139.com。

[△]通信作者:高燕霞,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为抗菌药物质量控制,(电话)0311-89892084。

- [10] 杨方良,张 晶,孙国祥,等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱,2016,34(7):715-725.
- [11] 刘彩君,朱 芹. 参苓白术散高效液相色谱特征指纹图谱研究及 5 个指标性成分的含量测定[J]. 中国药业,2018,27(15):106-110.
- [12] 王春雷,姜建伟,侯桂兰. 钴 60 射线辐照对白术药材中 4 种有效成分的影响研究[J]. 中国药师,2018,21(8):38-42.
- [13] 冯少俊,伍振锋,王雅琪,等. 中药灭菌工艺研究现状及问题[J]. 中草药,2015,46(18):2667-2673.
- [14] 黄晓婧,周晓英. 成都地区中药钴 60 辐照情况调研报告[J]. 中国药物评价,2017,34(1):33-35.
- [15] 禹 琦. 高效液相色谱法同时测定六君子丸中 7 种成分的含量[J]. 中国医院药学杂志,2018,38(11):1162-1165.
- [16] 谢丽静,高秋芳,杨昊钰. 不同方法炮制后白术功效指标含量变化比较[J]. 中国药业,2019,28(2):7-10.
- [17] 邹 静,陈 慧,彭 懿,等. HPLC 法同时测定加味二妙颗粒中 7 种成分及指纹图谱建立[J]. 中成药,2018,40(2):341-346.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:140-144.
- (收稿日期:2019-04-08;修回日期:2019-07-20)

速发型过敏反应与药物中存在的高分子聚合物杂质有关^[7-8]。头孢美唑钠聚合物测定方法收载于2015年版《中国药典(二部)》^[9],采用分子排阻色谱法(Cef-SEC)对其高分子聚合物进行测定,但实际试验结果表明,葡聚糖凝胶G-10色谱柱的柱效较低,分离效果较差,峰形拖尾较严重,且测定分析时间较长。本研究中建立了以WT-Cef-SEC为色谱柱的高效分子排阻色谱法测定头孢美唑钠中的聚合物,该法分离效能高、分析时间短、专属性强、灵敏度高,并通过在线脱盐质谱联用法证明了其结果准确可靠。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效分子排阻色谱(2D LC/LCMS-IT-TOF)系统,包括LC-20AD型输液泵(4个),SIL-20AC型自动进样器,CTO-20AC型柱温箱,CBM-20A型系统控制器,DGU-20A5型在线脱气机,SPD-M20A型二极管阵列检测器(DAD),SPD-20A型紫外检测器,FCV-12AH型流路选择阀(3个),FCV-14AH型色谱柱切换阀(2个),离子阱-飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)仪和LC MS solution Ver. 3.80色谱工作站(日本岛津公司)。

1.2 试药

注射用头孢美唑钠(河北某药厂,批号分别为18101701,18101702,18101703,规格为按 $G_5H_{17}N_7O_5S_3$ 计每次0.5g);头孢美唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号为130580-201301,含量为86.9%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 检测条件

二维液相系统色谱条件:通路1,色谱柱为WT-Cef-SEC柱(300 mm × 7.8 mm, 5 μ m),流动相为5 mmol/L乙酸铵溶液-乙腈(95:5, V/V),流速为0.6 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为20 μ L。通路2,色谱柱为InertSustainTM C₁₈柱(50 mm × 2.1 mm, 2 μ m),流动相为水-乙腈(70:30, V/V),检测波长为254 nm,柱温为30 $^{\circ}$ C,流速为0.3 mL/min,进样量为20 μ L。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),接口电压4.5 kV,扫描范围一级质谱为 m/z 200~1500;自动多级质谱为 m/z 100~1000;雾化气为氮气(流速为1.5 L/min),干燥气为氮气(流速为10 L/min),碰撞气为氩气,脱溶剂管及加热模块温度均为200 $^{\circ}$ C,检测器电压1.65 kV,校准方法为自动调谐优化电压,外标法校准质量数。

2.2 溶液配制

称取样品50 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加

水溶解并定容,摇匀,滤过,作为供试品溶液(临用新制);另取头孢美唑对照品适量,精密称定,加水制成每1 mL中约含5 μ g的对照品溶液。

2.3 系统适用性试验

取供试品溶液适量,按2.1项下通路1液相色谱条件进样分析,色谱图见图1。高效分子排阻色谱法检测时,大分子量的化合物先出峰,因此,主峰前的峰为聚合物峰。其中聚合物1含量低于0.05%,聚合物2和聚合物3为头孢美唑钠主要高分子杂质。

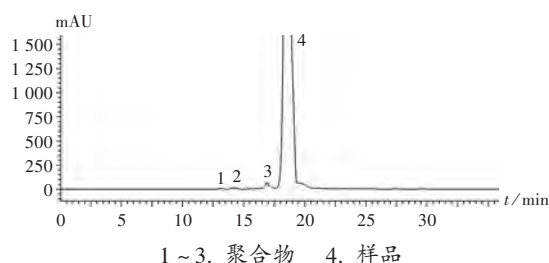


图1 头孢美唑钠高效液相色谱图

2.4 聚合物结构鉴定

在2D-LC-IT-TOF/MS系统中,将头孢美唑钠主峰切换到LOOP环1中,经通路2液相色谱条件进样分析,得MS色谱图和多级质谱图,详见图2和图3。头孢美唑钠相对分子质量493.0273,一级质谱图中 $[M+H]^+$ 为 m/z 494.0329,与软件计算理论值 m/z 494.0346一致。

将聚合物3切换到LOOP环2中,经通路2液相色谱条件进样分析,得MS色谱图和多级质谱图,详见图4和图5。一级质谱图中 $[M+H]^+$ 为 m/z 987.7052,是头孢美唑钠相对分子质量的2倍,二级质谱图中 m/z 495.8256碎片为聚合位点的酰胺键断裂形成的头孢美唑钠单体碎片。

将聚合物2切换到LOOP环3中,经通路2液相色谱条件进样分析,得MS色谱图和多级质谱图如图6和图7。一级质谱图中 $[M+H]^+$ 为 m/z 1480.1387,是头孢美唑钠相对分子质量的3倍。在二级质谱图中 m/z 986.6865碎片为聚合位点的酰胺键断裂形成的头孢美唑钠二聚体碎片。

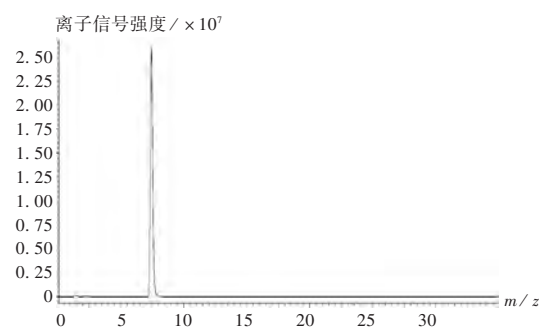
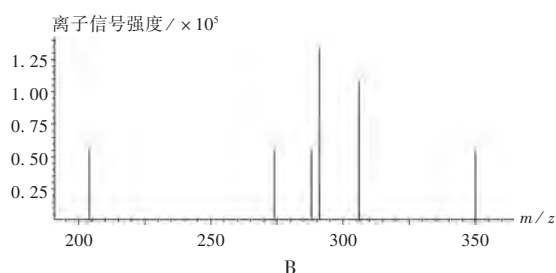
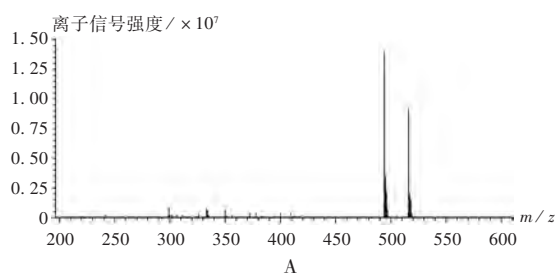


图2 头孢美唑钠离子流图



A. 一级质谱 B. 二级质谱

图3 头孢美唑钠主峰多级质谱图

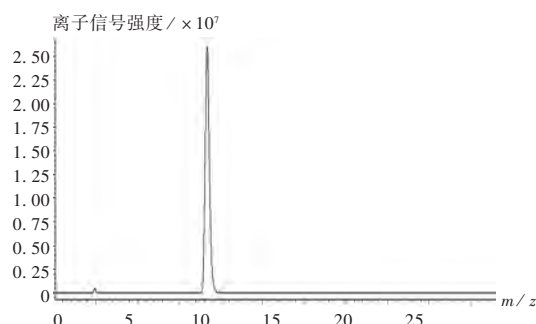
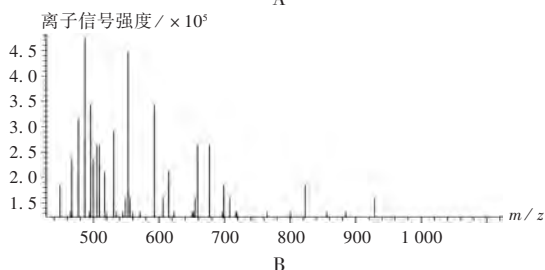
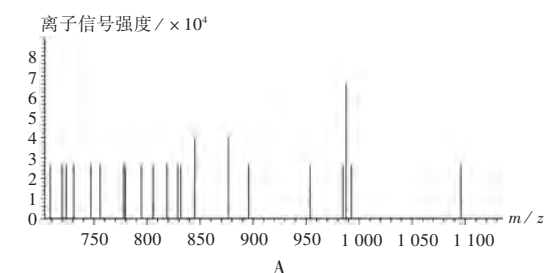


图4 聚合物3离子流图



A. 一级质谱 B. 二级质谱

图5 聚合物3多级质谱图

2.5 方法学考察

专属性试验:称取注射用头孢美唑样品 50 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 平行 5 份, 分别进行高温(60 °C 下放置 10 min)、酸破坏(0.1 mol/L HCl 1 mL, 放置 1 min, 取 0.1 mol/L NaOH 溶液 1 mL 中和)、碱破坏(0.1 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 放置 1 min, 取 0.1 mol/L HCl 溶液

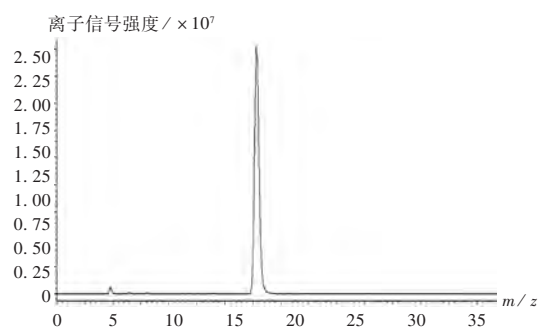
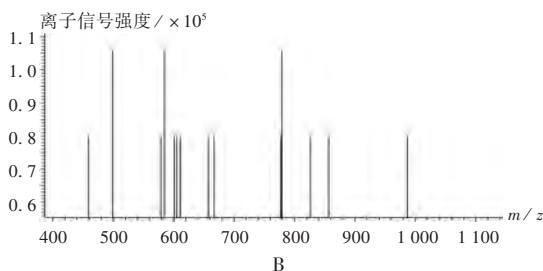
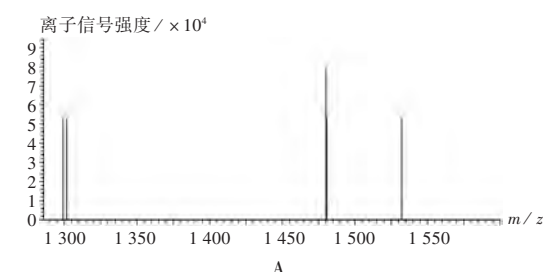


图6 聚合物2离子流图



A. 一级质谱 B. 二级质谱

图7 聚合物2二级质谱图

1 mL 中和)、强光(3 500 lx 强光照射 12 h)、氧化破坏(30% H₂O₂ 1 mL, 放置 1 min)加速破坏操作, 按 2.1 项下通路 1 液相色谱条件进样分析, 记录色谱图。主峰与以上破坏产生的降解物峰均能获得良好分离, 不干扰聚合物的测定。

线性关系考察:取头孢美唑对照品适量, 精密称定, 用水溶解并制成质量浓度分别为 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg/mL 的系列溶液, 取 20 μL, 按 2.1 项下检测条件进样测定。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(C)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 185.55C - 13.213$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$)。结果表明, 头孢美唑质量浓度在 0.5 ~ 20.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限检测:取对照品溶液, 加水倍比稀释, 按 2.1 项下检测条件进样测定。以信噪比(S/N)为 10 计, 头孢美唑的定量限为 3 ng, 以 S/N 为 3 计, 头孢美唑的检测限为 1 ng。

精密度试验:取对照品溶液, 按 2.1 项下检测条件进样测定, 重复进样 5 次。结果的 RSD 为 0.16% ($n = 5$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 18101701) 50 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容, 平行操作 6 份, 按

2.1 项下检测条件进样测定。结果聚合物 2 和聚合物 3 平均含量分别为 0.2% 和 0.1%, *RSD* 分别为 0.1% 和 0.3% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.6 测定方法

因头孢类聚合物对照品不稳定较难获得^[10-11], 但其聚合物为自身聚合而成, 紫外吸收官能团一致, 在各种浓度下, 聚合物峰与主峰的紫外吸收一致, 故聚合物含量的测定均按不加校正因子的主成分自身对照法计算。取 3 批样品, 分别按 2.1 项下通路 1 液相色谱条件及 2015 年版《中国药典(二部)》记载的聚合物检测方法测定。结果见表 2。按外标法以峰面积计算, 含头孢美唑钠聚合物以头孢美唑计, 规定限度为多聚物不得超过 0.3%, 二聚物不得超过 0.5%。

表 2 样品含量测定结果(% , $n=3$)

批号	聚合物 2	聚合物 3	药典方法结果
18101701	0.190	0.069	0.052
18101702	0.176	0.070	0.051
18101703	0.182	0.072	0.052

3 讨论

3.1 在线脱盐液质联用技术

本试验中采用 2D-LC-IT-TOF/MS 法对注射用头孢美唑钠聚合物进行鉴定^[12]。该方法基于一组共用的馏分收集环的二维液相质谱联用系统建立, 对目标峰快速分析的同时可完成流动相转换即脱盐过程, 在不改变原流动相条件的基础上, 实现了液质联用分析目标杂质, 其中通路 1 液相色谱条件通过时间程序控制自动对分离过程中的目标杂质进行捕集; 通路 1 液相色谱条件分析结束后, 批处理自动执行通路 2 液相色谱条件分析, 此时捕集在 1 个或多个馏分收集环中的杂质组分分批依次通过适合质谱分析的流动相注入通路 2 液相色谱柱中, 可在准确推定检出杂质结构的同时, 又能实现对一维液相色谱条件下色谱图中各杂质的准确定位。

3.2 色谱柱选择

文献资料键合球状蛋白色谱用亲水硅胶柱, 聚合物峰与主峰之间的分离度有很大改善, 但聚合物峰检出数量少^[13-14]。本研究选择的 WT-Cef-SEC 色谱柱(Sepax 公司)采用专利的表面修饰技术, 独有的化学修饰技术可精确控制亲水涂层的厚度, 聚合物峰与主峰之间的分离度有很大改善, 同时具有更宽的耐用性和更强的分离效果, 可更好地控制产品质量, 为企业改善生产工艺提供了技术支持。

3.3 聚合物峰分析

方法学考察过程中发现, 样品对酸碱极不稳定, 对

高温和氧化不稳定, 聚合物峰检出数量明显增多, 提示产品结构容易发生断裂的位点较多^[15], 高分子杂质检查有助于建立更适宜头孢美唑钠生产和储存的条件。

3.4 与《中国药典》方法对比

按 2015 年版《中国药典(二部)》记载的注射用头孢美唑钠聚合物检查方法进行对比试验, 本方法的进样量更少, 分析时间更短, 灵敏度更高, 分离度更好, 检出的聚合物更多, 能快速、有效、高灵敏地检出头孢美唑钠中的聚合物, 同时为 β -内酰胺类其他抗菌药物品种中聚合物的分离、分析及产品质量提高提供了依据。

参考文献:

- [1] 边原, 何林, 夏祺悦. 反相高效液相色谱法测定注射用头孢美唑钠的含量[J]. 中国药业, 2010, 19(5): 26-27.
- [2] 刘蔚, 吴珂, 陈琨, 等. 64 例肺部感染住院患者抗菌药物临床应用分析[J]. 中国药业, 2014, 23(6): 54-56.
- [3] 杨红英, 贾孟良, 陈振德, 等. 某三甲医院抗菌药物临床应用调查[J]. 中国药业, 2010, 19(5): 40-41.
- [4] 肖黎明, 周京伊, 李心蕾, 等. 180 例剖宫产并子宫肌瘤切除围术期抗菌药物分析[J]. 中国药业, 2013, 22(8): 77-78.
- [5] 沈学坤, 姚毅强. 278 例阑尾炎手术抗菌药物合理使用分析[J]. 中国药业, 2012, 21(18): 82-84.
- [6] 王璐璐, 沈雁蓉. 注射用头孢美唑钠致声音嘶哑 1 例[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 48.
- [7] 袁雯玮. 高分子聚合物研究与中国药典 2005 年版 β -内酰胺类抗生素高分子聚合物修订情况及操作要点[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(12): 727-730.
- [8] 江晓玲, 刘昆, 邓俊丰, 等. 头孢菌素类抗生素中高分子杂质的研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2007, 28(6): 264-269.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 280-282.
- [10] 邓思思, 唐克慧, 徐明琴, 等. HPLC 法测定头孢美唑钠中的聚合物及其结构验证[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(3): 227-231.
- [11] 刘云飞, 周浩, 于佳, 等. UPLC/TOF MS 用于头孢美唑钠系统适用性对照品的结构解析[J]. 化学工程师, 2017, 31(8): 74-80.
- [12] 韩彬, 高燕霞, 庞文哲, 等. 2D-LC-IT-TOF/MS 法鉴定注射用头孢替唑钠未知杂质 3 的结构[J]. 中国药师, 2019, 22(2): 358-360.
- [13] 徐明琴, 张静霞, 张春然, 等. 高效分子排阻色谱法测定头孢美唑钠聚合物含量[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(5): 399-401.
- [14] 丁玉莲, 杜文革, 蔡蓉, 等. 凝胶色谱柱法测定注射用头孢美唑钠的聚合物[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(5): 526-528.
- [15] 孔兴欣, 沈文斌, 王丽云, 等. LC-MS/MS 法研究头孢美唑钠中有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(2): 170-176.

(收稿日期: 20019-04-02; 修回日期: 2019-06-03)