

## 分析质控与制剂

文章编号: 1001-8689(2019)04-0450-05

## 毛细管电泳法测定硫酸多黏菌素 B 中的有关物质

张含智 秦峰 徐晓曦 刘浩\*  
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 建立一种用毛细管电泳测定硫酸多黏菌素 B 中有关物质的分析方法。**方法** 以含 30mmol/L 羟丙基- $\beta$ -环糊精、5% 异丙醇的 130mmol/L 三乙醇胺溶液(用磷酸调节 pH 至 2.5)为运行缓冲液, 熔融石英毛细管总长 60cm, 有效长度 51.5cm, 内径 50 $\mu$ m, 分离电压 24kV, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进行了线性、检测限、精密度等方法学考察试验, 并将该方法应用于硫酸多黏菌素 B 原料药及制剂的检测中。**结果** 实现了多黏菌素 B 中主要组分 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>1-1</sub> 与相邻杂质的分离, 对比了不同来源硫酸多黏菌素 B 有关物质的差异。**结论** 本方法灵敏度较高、重复性较好, 为硫酸多黏菌素 B 的质量控制提供了一种可行的分析方法。

**关键词:** 硫酸多黏菌素 B; 有关物质; 毛细管电泳; 羟丙基- $\beta$ -环糊精

**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## Determination of related substances in polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis

Zhang Han-zhi, Qin Feng, Xu Xiao-xi and Liu Hao  
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203)

**Abstract Objective** A capillary electrophoresis method was established for the determination of related substances in polymyxin B sulfate. **Methods** To improve the separation selectivity, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) was necessary to be used as a buffer additive. The optimal separation conditions were as follows: the total length of the capillary was 60cm (the effective length was 51.5cm), 130mmol/L triethanolamine-phosphate buffer containing 30mmol/L HP- $\beta$ -CD and 5% IPA, the applied voltage was 24kV, and the column temperature was 25  $^{\circ}$ C. Further, the linearity, limits of detection quantification, and the repeatability were examined. The contents of the related substances in polymyxin B of commercial samples were analyzed quantitatively according to the area normalization method. **Results** The CE method successfully separated the main components (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>1-1</sub>) and the adjacent impurities in polymyxin B. The contents of the related substances among various sources of polymyxin B were compared. **Conclusion** The CE method was sensitive and reproducible to control the quality of polymyxin B sulfate.

**Key words** Polymyxin B sulfate; Related substances; Capillary electrophoresis; Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin

多黏菌素 B(polymyxin B sulfate, PMB, 结构通式如图 1 所示)是一类由多黏芽孢杆菌发酵产生的多肽类抗生素混合物, 其硫酸盐主要用于治疗多重耐药革兰阴性菌, 被称为“抗击超级细菌的最后一道防线”<sup>[1-4]</sup>。PMB 组分之间较为相似, 其主要结构为 N-端脂肪链(FA)、 $\alpha,\gamma$ -二氨基丁酸及氨基酸(亮氨酸、

异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸等)经酰胺键连接而成, 4 位及 5 位  $\alpha,\gamma$ -二氨基丁酸结合形成环七肽, 边链包括 FA 及三肽。已知的主要成分为 PMB<sub>1</sub>、PMB<sub>2</sub>、PMB<sub>3</sub> 及 PMB<sub>1-1</sub>, 差别在于 FA 取代基或氨基酸不同, 具体区别见表 1。

目前, 中国药典(ChP)2015 年版<sup>[5]</sup>、美国药典

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: 上海市科学技术委员会科研项目(No. 17DZ1910404)

作者简介: 张含智, 男, 生于 1987 年, 博士, 理化检验技术中级, 主要从事抗生素药品质量分析与控制研究, E-mail: zzzw-123@163.com

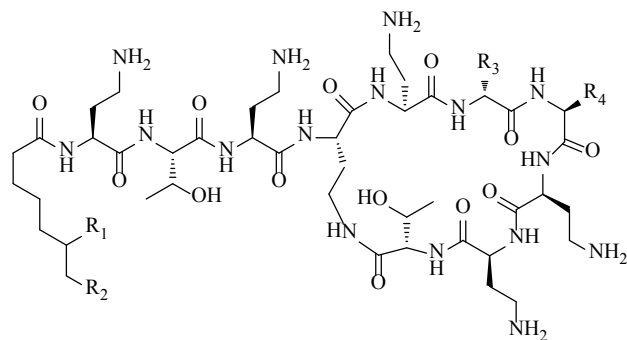


图 1 多黏菌素 B 结构通式  
Fig. 1 Structure of polymyxin B

表 1 多黏菌素 B 组分信息表

Tab. 1 The characteristics of known components in Polymyxin B

Polymyxin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
B <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	D-Phe	L-Leu
B <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	D-Phe	L-Leu
B <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	D-Phe	L-Leu
B <sub>1-1</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	D-Phe	L-Ile

(USP)40 版<sup>[6]</sup>、欧洲药典 (EP)9.0 版<sup>[7]</sup>均采用液相色谱法分析 PMB 中的组分及有关物质,通过相对保留时间对主要组分进行定性分析。对于 PMB 中的微量组分, Govaerts 等<sup>[8-10]</sup>通过制备色谱及液质联用方法推断了约 30 种有关物质的结构。张含智等<sup>[11]</sup>根据 HPLC-MS/MS 推断了 PMB 中一种具有双键结构的组分,其结构需进一步鉴定。崔阿龙等<sup>[12-13]</sup>通过化学合成 PMB 中的单一组分,为构效关系研究及单一组分对照品制备奠定了基础,并揭示出某些单一组分的抗菌活性较总组分要高,且毒性要低。毛细管电泳 (CE) 方法对于复杂体系具有较好的分离效果,是液相色谱良好的正交补充方法。Kristensen 等<sup>[14]</sup>将两性离子表面活性剂 PAPS 作为假固定相加入到缓冲液中,对 PMB 组分的分离选择性较好,但组分之间出峰时间较集中且主峰有明显的拖尾现象。Kang 等<sup>[15]</sup>选择甲基-β-环糊精作为添加剂,建立了 PMB 的 CE 定性定量方法,该方法柱效高、稳健性好;本文采用该方法分析国产注射用硫酸 PMB 时,发现 PMB<sub>1</sub> 与相邻杂质的分离度较差。

为建立适用于国产硫酸 PMB 有关物质分析的 CE 方法,避免杂质对 PMB 定量产生影响,建立了羟丙基-β-环糊精 (HP-β-CD)、异丙醇作为分离添加剂、三乙醇胺 (TEA)-磷酸缓冲液的 CE 方法。通过优化 HP-β-CD 及异丙醇的含量,开展线性、检测限、精密度等方法学考察,确立了最优的分析方法,最终应用于硫酸 PMB 原料药及制剂有关物质的检测

中,为国产样品的质量控制提供了一种可供借鉴的检测方法。

1 仪器与试药

Agilent G1600AX 型高效毛细管电泳仪 (美国 Agilent Technologies 公司),熔融石英毛细管 (60cm, 50μm, 河北永年光导纤维厂)。

ChP 2015 年版多黏菌素 B (批号: 130313-201310) 标准品购自中国食品药品检定研究院 (中检院, ZJY), USP 硫酸多黏菌素对照品 (批号: N1M425), 硫酸多黏菌素 B 原料药 (批号: A1411105)、注射用硫酸多黏菌素 B (批号: 1512801、1512802、1512803) 均由上海第一生化药业有限公司提供。乙腈为色谱纯,三乙醇胺、磷酸和异丙醇均为分析纯,水为超纯水。α-CD、β-CD、甲基-β-CD、HP-β-CD 均购自 Sigma-Aldrich。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

运行缓冲液: 130mmol/L 三乙醇胺溶液用磷酸调节 pH 值至 2.5, 加入 5%(V/V) 异丙醇与 30mmol/L HP-β-CD, 出口缓冲液瓶中不含 HP-β-CD。

对照品溶液: 精密称取硫酸 PMB 标准品 (USP, PMB<sub>1</sub> 含量 69.7%)20mg, 加 2mL 溶剂 (水: 乙腈=80:20) 溶解, 作为对照品储备液 S<sub>1</sub>, 浓度为 10mg/mL, 其中 PMB<sub>1</sub> 浓度为 6.97mg/mL。

供试品溶液: 精密称取硫酸 PMB 原料药及制剂 50mg 置于 10mL 量瓶中, 加溶剂溶解, 定容, 摇匀, 作为原料药供试品溶液, 临用现制。制剂中含有 50mg 硫酸 PMB, 加溶剂溶解并全部转移至 10mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 作为制剂供试品溶液。

2.2 实验条件

工作电压 24kV; 柱温 25℃; 检测波长 215nm; 进样压力 50mbar, 进样时间 3s。毛细管初次使用时, 依次用 1mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 20min, 蒸馏水冲洗 5min, 再用运行缓冲液冲洗 20min。每次分析后用运行缓冲液冲洗 3min。

在上述实验条件下, 分别取对照品及供试品溶液进样分析。

2.3 线性及精密度试验

取对照品储备液 S<sub>1</sub> 经溶剂逐级稀释至 PMB<sub>1</sub> 的浓度为 3.485(S<sub>2</sub>)、1.394(S<sub>3</sub>)、0.697(S<sub>4</sub>)、0.3485(S<sub>5</sub>)、0.0697(S<sub>6</sub>)、0.03485(S<sub>7</sub>) 和 0.01394mg/mL(S<sub>8</sub>), 分别进样测定并记录电泳图, 以 PMB<sub>1</sub> 峰面积 A 对

浓度  $c(S_6-S_1)$  进行线性回归, 得回归方程为:  
 $A=103.2c+4.3062$ ,  $R^2=0.9999$ 。

精密度试验中,  $PMB_1$  峰面积及迁移时间的天内重复性的 RSD 值分别为 0.53% 和 0.60%( $n=6$ ), 天间的 RSD 值分别为 0.65% 和 0.69%( $n=3$ ), 说明本方法的重复性较好。LOD( $S/N=3$ ) 为  $13.94\mu\text{g/mL}$ , LOQ( $S/N=10$ ) 为  $34.85\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.4 样品测定

取中检院标准品、USP 对照品、企业原料药及 3 批制剂进行测定, 并对结果进行比较分析。

## 3 结果与讨论

由于 PMB 属于发酵产品, 不同的菌种及生产环境导致组分之间的差异较大, 已有方法可能不适用于不同企业的 PMB 的分析。如采用文献 [14] 中的 CE 方法检测上海第一生化药业有限公司的硫酸 PMB 时, 组分出峰时间较为集中, 且  $B_1$  与相邻峰的分并不理想, 见图 2A; 采用文献 [15] 的方法,  $B_1$ 、 $B_{1-1}$  分别与相邻杂质未实现基线分离, 改变其中的三乙醇

胺、甲基- $\beta$ -CD 及异丙醇的含量, 未有明显的改善效果, 见图 2B, 且两种方法均存在主峰拖尾的情况。本研究在此基础上, 通过筛选其他不同的环糊精 (如  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、HP- $\beta$ -CD), 发现 HP- $\beta$ -CD 较适合于 PMB 各组分的分离, 并考察了三乙醇胺、HP- $\beta$ -CD 及异丙醇对分离的影响, 筛选出最优的缓冲液条件。

### 3.1 缓冲液组成对分离效果的影响

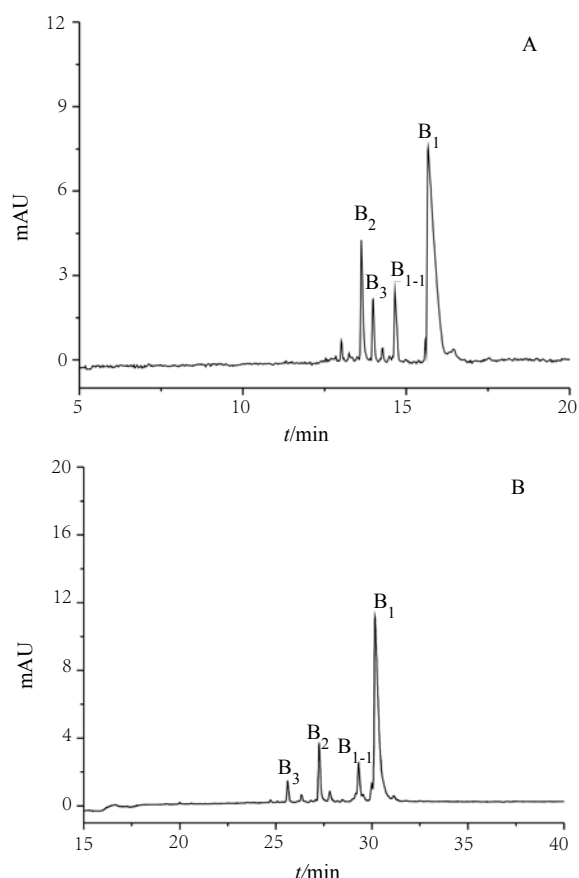
三乙醇胺缓冲液经  $H_3PO_4$  调节 pH 至 2.5 后, 熔融石英毛细管管壁的硅羟基在该条件下几乎不解离, 避免了电渗流对分离的影响。PMB 各组分根据各自不同的电泳淌度进行分离, 同时由于降低了正电性多肽在管壁的吸附, 提高分析重复性。

固定三乙醇胺 (130mmol/L) 及 HP- $\beta$ -CD (30mmol/L) 的含量, 考察缓冲液中异丙醇的含量对分离选择性的影响。缓冲液中无异丙醇时,  $PMB_2$ 、Ile- $PMB_1$  与  $PMB_1$  在较集中的时间内迁移出峰, 掩盖了较多的微量杂质。随着异丙醇含量的增加, PMB 各组分之间的分离度增大, 说明该有机溶剂对分离有明显地改善效果; 但分析时间延长, 如异丙醇为 10% 时,  $PMB_1$  迁移时间为 38min。最终确定缓冲液中异丙醇的含量为 5%。

当固定三乙醇胺 (130mmol/L) 及异丙醇 (5%) 的含量时, 发现 HP- $\beta$ -CD 的含量对 PMB 的分离选择性具有明显的影响。调整 HP- $\beta$ -CD 含量从 10、20 和 30mmol/L 变为 40mmol/L, 随着 HP- $\beta$ -CD 浓度的增加, PMB 各组分的迁移时间逐渐增大, 见图 3, 说明 PMB 与 HP- $\beta$ -CD 之间的相互作用增强, 导致组分之间的分离选择性增大。 $PMB_1$  与  $PMB_{1-1}$  逐渐分离开, 两者之间的微量杂质峰被检测到; 但  $PMB_2$  与  $PMB_{1-1}$  之间的分析时间缩短, 导致 HP- $\beta$ -CD 在 40mmol/L 时, 有较多的微量杂质被包埋在  $PMB_{1-1}$  峰中。综合考虑以上因素, 确定 HP- $\beta$ -CD 浓度为 30mmol/L。

### 3.2 CE 对不同硫酸 PMB 的检测结果

采用“3.1”项中筛选到的最优的分离条件, 即缓冲液中含有 30mmol/L HP- $\beta$ -CD、5% 异丙醇的 130mmol/L 三乙醇胺溶液 (用磷酸调节 pH 至 2.5), 对中检院标准品、USP 对照品、硫酸 PMB 原料药及制剂进行检测。按照 ChP 2015 年版中硫酸多黏菌素 B 有关物质项下规定, 单个杂质不得过 3.0%, 杂质总量不得过 17.0%, 根据峰面积归一化计算以上样品中单个杂质及杂质总量, 见表 2。经对比发现, 企业



A: 文献 [14] 中的方法; B: 文献 [15] 中的方法

图 2 PMB 分离的典型色谱图

Fig. 2 The typical chromatogram of PMB

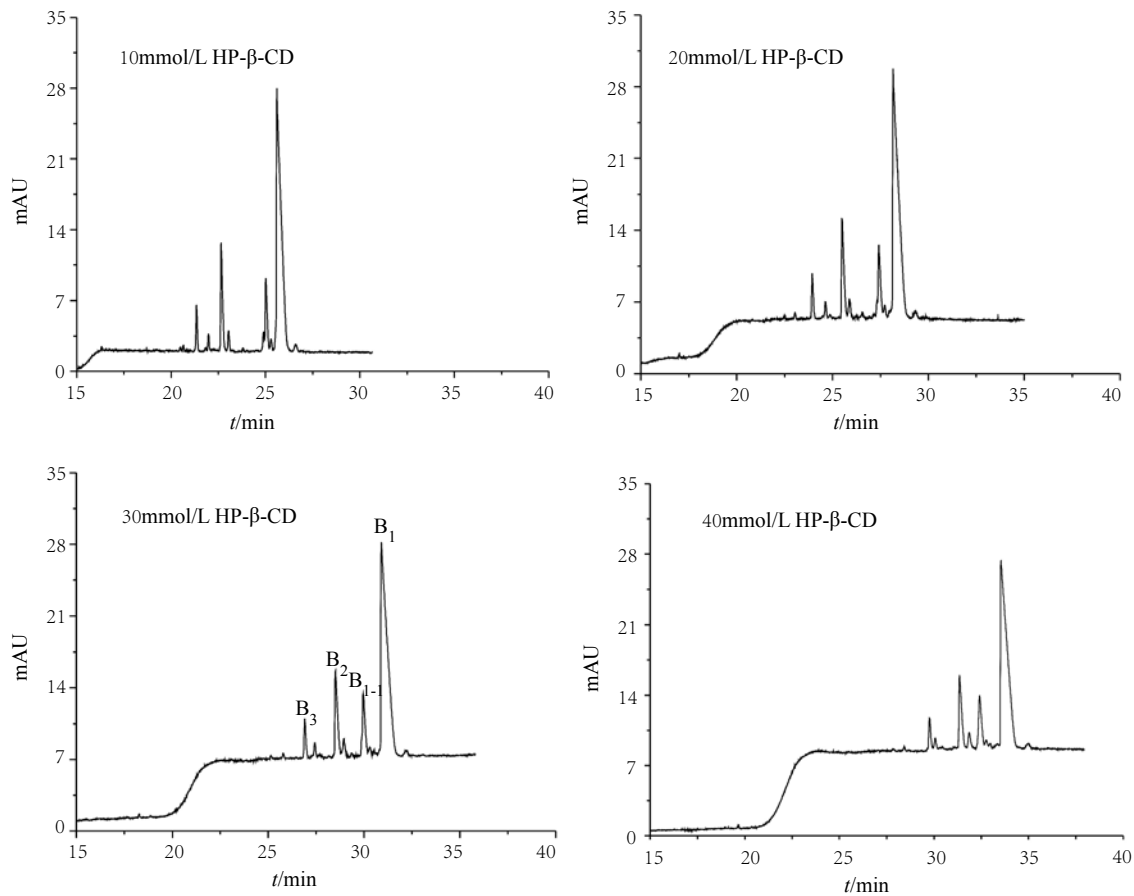


图 3 HP-β-CD 对 PMB 分离选择性的影响  
Fig. 3 The effect of HP-β-CD on the separation selectivity of PMB

表 2 PMB 中有关物质的含量  
Tab. 2 The contents of relative substances in PMB

PMB	最大单个未知杂质 (% , ≤ 3.0)		杂质总量 (% , ≤ 17.0)	
	CE 结果	HPLC 结果	CE 结果	HPLC 结果
ZJY S	2.4	2	9.3	13.7
USP S	1.4	2.3	5.6	6
A1411105	2.2	2	9.7	13.2
1512801	2.3	2.1	8	14
1512802	2.2	2.1	8	13.6
1512803	2.2	2.1	8.5	13.3

样品中的单个杂质及杂质总量均在规定限度之内。与液相方法 (按照 ChP 2015 年版硫酸多黏菌素 B 有关物质项下的分析方法) 结果进行比较, 最大单个未知杂质之间的差别较小, 但总杂质含量差别较大, 可能原因是在毛细管电泳中进样体积较液相进样体积小, 造成某些微量杂质未被检测到, 应需要增加进样体积。

#### 4 结论

本研究开发了一种 CE 方法用于 PMB 中的有关物质分析, 采用 HP-β-CD 作为缓冲液改性剂可以提

高分离的选择性。本法灵敏度较高、重复性较好, 可以作为药典中液相方法的补充方法对 PMB 中的有关物质进行定量分析, 为国产药品的质量控制提供了一种可供选择的方法。

#### 参考文献

- [1] Ainsworth G C, Brown A M, Brownlee G. 'Aerosporin', an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer[J]. *Nature*, 1947, 159(4060): 263.
- [2] 梁浩, 滕峰, 吉爱国. 革兰阴性多药耐药菌和多黏菌素研究介绍 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(24): 2049-2051.
- [3] Velkov T, Robert K D, Nation R L, *et al.* Pharmacology of polymyxin: new insights into an 'old' class of antibiotics[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(6): 711-724.
- [4] Yuan Z, Tam V H. Polymyxin B: A new strategy for multidrug-resistance Gram-negative organisms[J]. *Expert Opin Invest Drugs*, 2008, 17(5): 661-668.
- [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: 化学工业出版社, 2015: 1323-1324.
- [6] 美国药典委员会. 美国药典 40 版 [S]. 2017: 5750-5752.
- [7] 欧洲药典委员会. 欧洲药典 9.0 版 [S]. 2017: 3366-3367.

- [8] Govaerts C, Orwa J A, Van S A, *et al.* Characterization of polypeptide antibiotics of the polymyxin series by liquid chromatography electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry[J]. *J Pep Sci*, 2002, 8(2): 45-55.
- [9] Govaerts C, Adams E, Schepdael A V, *et al.* Hyphenation of liquid chromatography to ion trap mass spectrometry to identify minor components in polypeptide antibiotics[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377(5): 909-921.
- [10] Bossche L V D, Schepdael A V, Chopra S, *et al.* Identification of impurities in polymyxin B and colistin bulk sample using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2011, 83(5): 1521-1529.
- [11] 张含智, 秦峰, 刘浩. 高效液相色谱质谱联用分析硫酸多黏菌素 B 中的未知杂质 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(11): 918-924.
- [12] 崔阿龙, 胡辛欣, 高岩, 等. 化学合成多黏菌素 B 和 E 单一组分及其抗菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(3): 198-202.
- [13] Cui A L, Hu X X, Gao Y, *et al.* Synthesis and bioactivity investigation of the individual components of cyclic lipopeptide antibiotics[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(5): 1845-1857.
- [14] Kristensen H K, Hansen S H. Separation of polymyxins by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1993, 628(2): 309-315.
- [15] Kang J W, Van S A, Orwa J A, *et al.* Analysis of polymyxin B sulfate by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin as additive method development and validation[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 879(2): 211-218.