

分析质控与制剂

头孢地尼原料及制剂的聚合物杂质分析

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** 建立头孢地尼原料及制剂聚合物杂质的分析方法。**方法** 分别采用0.1mol/L磷酸盐溶液和氯仿-三乙胺为溶剂, 制备头孢地尼降解溶液; 采用高效凝胶色谱法(HPSEC, TSK G2000 SWxl)和柱切换-LC/MSⁿ法对头孢地尼降解溶液的弱保留杂质进行分离和结构鉴定, 并评估高效凝胶色谱法分析聚合物杂质的专属性; 采用Diamonsil, C₁₈型色谱柱, 以0.25%四甲基氢氧化铵溶液(pH5.5)-甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 建立头孢地尼聚合物的RP-HPLC分析方法, 采用二维色谱法和柱切换-LC/MSⁿ法对其专属性进行分析, 并进行方法学验证。**结果** 在头孢地尼降解物中鉴定出头孢地尼二聚体及其异构体, 以及若干小分子杂质; 高效凝胶色谱法分离头孢地尼聚合物杂质时, 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法分析头孢地尼聚合物杂质时, 能够检出头孢地尼二聚体及其异构体, 头孢地尼三聚体, 专属性好。**结论** 高效凝胶色谱法不能对头孢地尼的聚合物杂质进行有效质控, 建立的反相色谱法分析头孢地尼聚合物杂质的专属性良好, 可将头孢地尼降解溶液可作为聚合物杂质系统适用性溶液。

关键词: 头孢地尼; 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: R978.1, R917 **文献标志码:** A

Analysis of polymer impurities in cefdinir raw materials and preparations

Li Jin, Yao Shang-Chen, Yin Li-hui, Xu Ming-zhe and Hu Chang-qin
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629)

Abstract Objective To establish a method for the determination of polymer impurities in cefdinir raw materials and preparations. **Methods** Cefdinir raw materials were dissolved by a 0.1mol/L phosphate solution and the reagent chloroform-triethylamine respectively to prepare cefdinir degradation solutions. The High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC, TSK-gel G2000SWxl) method and the Column Switching-LC/MSⁿ method were applied to separate and identify the poor retention impurities in cefdinir degradation solutions and to evaluate the specificity of the HPSEC method. A new RP-HPLC method for polymer analysis was established with a Diamonsil C₁₈ column, using a gradient elution by 0.25% tetramethylammonium hydroxide (pH5.5)-acetonitrile-methanol. The specificity of the RP-HPLC method was assessed by the two dimensional chromatography method and the Column Switching-LC/MSⁿ method, and the RP-HPLC method was validated. **Results** Cefdinir dimer and isomers were identified in cefdinir degradation solutions, and some small molecular impurities were also detected. Polymer impurities were liable to co-elute with small molecular impurities by the HPSEC method, which made a poor quantification accuracy and specificity. Cefdinir dimer and isomers were detected by the RP-HPLC method with an effective specificity. **Conclusion** The HPSEC method is not suitable for the quality control of polymer impurities in cefdinir raw materials and productions, while the new established RP-HPLC method is specific, which can effectively

收稿日期: 2020-02-10

作者简介: 李进, 男, 生于1976年, 博士, 副主任药师, 主要研究方向为抗生素药物分析, E-mail: medjinli@126.com

*通讯作者, E-mail: xumz@nifdc.org.cn

control the polymer impurities. Cefdinir degradation solution can be used to identify polymer peaks as the system suitability solution.

Key words Cefdinir; Polymer; Impurity; Column Switch-LC/MSⁿ; HPSEC; 2D-HPLC; β -lactam antibiotics

β -内酰胺类抗生素是临床上广泛使用的抗感染类药物, 此类药物在生产、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, 造成药物安全隐患^[1-4]。因此应严格控制 β -内酰胺类抗生素中的聚合物类杂质。

头孢地尼为第三代半合成头孢菌素, 主要用于治疗敏感菌所致的皮肤及软组织感染、急性支气管炎、泌尿系统感染、生殖系统感染等。中国药典2015年版^[5]、美国药典41版^[6]、日本药局方XVII版^[7]收载了该品种, 但均未控制聚合物杂质。有文献报道采用葡聚糖凝胶G-10色谱法对头孢地尼的高分子杂质进行分析^[8], 以及采用TSK高效凝胶色谱法测定头孢地尼中的高分子杂质含量^[9]。

葡聚糖凝胶G-10色谱法和高效凝胶色谱(HPSEC)法目前广泛用于 β -内酰胺类抗生素的聚合物分析, 但是这两种方法对聚合物杂质的分离效果和方法专属性较差, 无法满足精确控制聚合物杂质的要求^[10]。采用反相高效液相色谱法(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^[11-14]。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)法对头孢地尼聚合物杂质进行结构鉴定, 评价高效凝胶色谱法分析聚合物杂质的专属性; 然后探索建立RP-HPLC法对头孢地尼原料和制剂中的指针式聚合物杂质进行精准质控。

1 材料与方法

1.1 仪器

二维色谱系统为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组成, 工作站为Chromeleon 7.2 SR5版(美国Dionex公司); 柱切-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Xcalibur1.0版; Buchi旋转蒸发仪R-215V。

1.2 样品与试剂

头孢地尼原料(批号R902EJ86SK)及头孢地尼片

(批号904204)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Fisher公司, 其它化学试剂(色谱纯), 均购自国药集团化学试剂公司, 水为屈臣氏纯净水。

1.3 HPSEC法

色谱柱: TSK-gel G2000SWxl(填料: 刚性、球形、亲水硅胶; 7.8mm×30cm, 5 μ m); 流动相A相: 0.005mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0)[0.005mol/L磷酸氢二钠溶液-0.005mol/L磷酸二氢钠溶液(61:39)(V/V)], B相: 乙腈, A:B=85:15(V/V), 等度洗脱; 流速: 0.7mL/min; 检测波长: 254nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L; 稀释溶剂: 0.1mol/L磷酸盐缓冲液[0.1mol/L磷酸氢二钠溶液-0.1mol/L磷酸二氢钾溶液(2:1)(V/V)]、0.005mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0); 样品浓度: 1.5mg/mL(以头孢地尼计)。用于分离头孢地尼原料与制剂中的弱保留值杂质。

1.4 RP-HPLC法

色谱柱: Diamonsil, C₁₈(4.6mm×150mm, 5 μ m)。流动相A相: 0.25%四甲基氢氧化铵溶液(pH 5.5)1000mL, 加入0.1mol/L的乙二胺四乙酸二钠溶液0.4mL, 流动相B为甲醇-乙腈(40:60)1000mL, 加入0.1mol/L的乙二胺四乙酸二钠溶液0.4mL, 进行线性梯度洗脱。洗脱梯度: 0~2.0min, 2.5% B; 2.0~25.0min, 2.5%~12.5% B; 25.0~42.0min, 12.5%~25% B; 42.0~57.0min, 25%~75% B; 57.0~58.0min, 75%~2.5% B; 58.0~75.0min, 2.5% B。流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 检测波长: 254nm。用于分析头孢地尼原料及制剂的指针性聚合物杂质。

1.5 2D-HPLC法

色谱系统I同HPSEC法; 色谱系统II同RP-HPLC法。工作流程^[11]: 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RP-C₁₈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二根色谱柱中, 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。

1.6 柱切换-LC/MSⁿ-I法

色谱系统III: 同HPSEC法, 进样体积增加至

50 μ L, 用于分离头孢地尼的弱保留值杂质。

色谱系统IV: 色谱柱: Agilent, SB-C₁₈(4.6mm \times 150mm, 5 μ m)。流动相: A相: 含有0.5%冰醋酸的水溶液; B相: 含有0.5%冰醋酸的乙腈溶液; 梯度洗脱: 0~(t_R +7)min(t_R 为目标杂质在色谱系统III的保留时间), 0% B(脱盐处理); (t_R +7)min~(t_R +27)min, 90% B; (t_R +27)min~(t_R +37)min, 90% B; (t_R +37)min~(t_R +38)min, 0% B; (t_R +38)min~(t_R +40)min, 0% B。柱温: 室温; 流速: 0.7mL/min。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。

1.7 柱切换-LC/MSⁿ-II法

色谱系统V: 同RP-HPLC法, 进样体积增加至70 μ L, 用于指针性聚合物杂质的分离。

色谱系统VI: 同色谱系统IV, 其中 t_R 为目标杂质在色谱系统V的保留时间。用于对RP-HPLC法分离的聚合物杂质进行质谱分析。

1.8 质谱条件(“1.6”和“1.7”项的质谱方法)

调谐方法: 扫描电压(+)3000.00V, 毛细管温度(+)350.00 $^{\circ}$ C, 鞘气(+)35.00L/h, 辅助气(+)10.00L/h, 最大喷雾电流(+)100.00, 探针加热器温度(+)350.00 $^{\circ}$ C, 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70000, 扫描范围 m/z 200~2000; 二级质谱方法: 分辨率17500, 分离窗口 m/z 3.0, (N)CE: 13V, 缺省电荷状态1。

1.9 方法学验证

1.9.1 方法定量限与检测限

精密量取降解溶液(2), 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。采用头孢地尼对照品为外标, 以基线噪音的10倍为指标; 以基线噪音的3倍为指标, 计算得到方法的最低检测限和最低定量限。

1.9.2 溶液稳定性

取聚合物降解溶液(2)20 μ L, 分别在0、5、14和15h进样分析, 计算头孢地尼二聚体峰面积的变化情况。

1.9.3 耐用性

精密量取降解溶液(2)20 μ L, 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。

1.10 溶液配制

降解溶液(1): 取头孢地尼原料约100mg, 加0.1mol/L磷酸盐缓冲液4mL溶解并稀释成浓度约为10.0mg/mL的溶液(以头孢地尼计), 在室温下放置4d。精密量取上

述溶液1.5mL, 置于10.0mL量瓶中, 加入0.005mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0)稀释至刻度, 制成浓度约为1.5mg/mL的溶液, 作为头孢地尼降解溶液(1)。

降解溶液(2): 取头孢地尼原料约300mg, 加入氯仿5mL, 三乙胺1mL, 振摇3min, 密封, 室温避光放置2d。然后去除氯仿和三乙胺, 制成固体粉末。称取上述降解物粉末约15mg, 置于10mL量瓶中, 加0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0)约4.0mL溶解, 然后用0.005mol/L(pH7.0)溶液稀释至刻度, 制成浓度约为1.5mg/mL的溶液, 作为降解溶液(2)。

降解溶液(3): 取头孢地尼原料约37.5mg, 置25mL棕色量瓶中, 加0.1mol/L磷酸盐缓冲液4mL溶解后, 用0.005mol/L(pH7.0)溶液稀释至刻度, 摇匀, 在水浴中加热约35min, 放冷备用。

供试品溶液(1, 2): 称取头孢地尼原料和片剂适量, 分别置于25mL量瓶中, 加0.1mol/L磷酸盐缓冲液4mL溶解, 用“1.3”项流动相A稀释至刻度, 摇匀, 制成含头孢地尼浓度约为1.5mg/mL的溶液, 供HPSEC法分析。

供试品溶液(3, 4): 称取头孢地尼原料和片剂适量, 分别置于25mL量瓶中, 加0.1mol/L磷酸盐缓冲液4mL溶解, 用“1.4”项流动相A稀释至刻度, 摇匀, 制成头孢地尼浓度约为1.5mg/mL的溶液, 供RP-HPLC法分析。

2 结果与讨论

2.1 高效凝胶色谱(HPSEC)法分析头孢地尼弱保留值杂质

基于中国药典2015年版二部中头孢地素钠有关物质II的方法, 本研究对流动相的缓冲盐浓度、pH值、有机相比、检测波长、色谱柱等参数进行了筛选, 在此基础上建立了高效凝胶排阻色谱法, 见图1。头孢地尼降解溶液(1)的分析结果显示, 头孢地尼主峰前主要存在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。在头孢地尼降解溶液(2)中存在3个弱保留值杂质HPSEC-1'、2'、3'。用该方法对头孢地尼原料和制剂进行分析, 仅检出弱保留值杂质HPSEC-1、2、3。头孢地尼原料中弱保留值杂质峰含量为0.73%, 头孢地尼制剂中弱保留值杂质的含量为0.98%, 均超过了中国药典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, 说明高效凝胶色谱法分析聚合物杂质的专属性。

2.2 柱切换-LC/MSⁿ法推定弱保留值杂质的化学结构

以头孢地尼降解溶液(1)为供试品,采用高效凝胶色谱法分离得到弱保留值杂质HPSEC-1~5,见图1,然后采用柱切换-LC/MSⁿ-I法推定各组分的化学结构,鉴定的杂质结构,见图2。

2.2.1 HPSEC-1,4

在弱保留值杂质HPSEC-1,4中未检出明显的杂质峰。

2.2.2 HPSEC-2

在弱保留值杂质HPSEC-2中分离得到2个未知杂质,分别命名为HPSEC-2a和HPSEC-2b。二者的质谱TIC图见图3。

HPSEC-2a的一级质谱图(图3)显示 m/z 396.04的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,因此其相对分子质量为395.0Da,与头孢地尼的相对分子质量相同。初步推定为头孢地尼异构体,化学结构有待于进一步分

析。该杂质属于小分子杂质,不属于聚合物杂质。

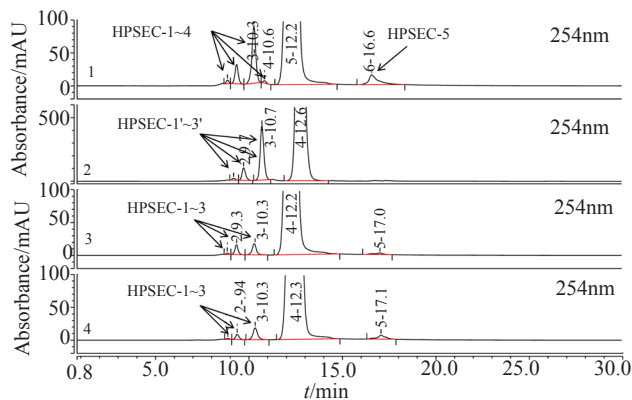
HPSEC-2b的一级质谱图(图3)显示 m/z 791.07的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,因此其相对分子质量为790.07Da,为头孢地尼相对分子质量的2倍,初步推定为头孢地尼二聚体。二级质谱图中存在 m/z 396的子离子,与头孢地尼的相对分子质量一致,进一步证明该杂质为头孢地尼二聚体,属于聚合物杂质。分析头孢地尼的化学结构,可知发生聚合的位点主要包括2个:(1)7位的氨噻肟氨基进攻四元内酰胺环;(2)7位的氨噻肟氨基进攻3位乙烯基的 α 位;在发生聚合反应过程中,还可能同时发生异构化反应,包括母核上的羧基进攻乙烯基形成 γ -五元内酯环等。因此,头孢地尼二聚体具有多种异构体,其可能的化学结构见图2。

2.2.3 HPSEC-3

采用柱切换-LC/MSⁿ-I法在弱保留值杂质HPSEC-3中分离得到8个未知杂质,分别命名为HPSEC-3a~3h,其质谱TIC见图4。

HPSEC-3a,3b的全扫描质谱图(图4)均存在 m/z 414.0($z=1$)、 m/z 436.0($z=1$)的加合离子峰,分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 峰,因此HPSEC-3a,3b的相对分子质量为413Da,比头孢地尼二聚体的相对分子质量多18Da。二者互为同分异构体,初步推定为头孢地尼开环水解 γ 内酯,为小分子杂质,不属于聚合物杂质,其化学结构见图2。

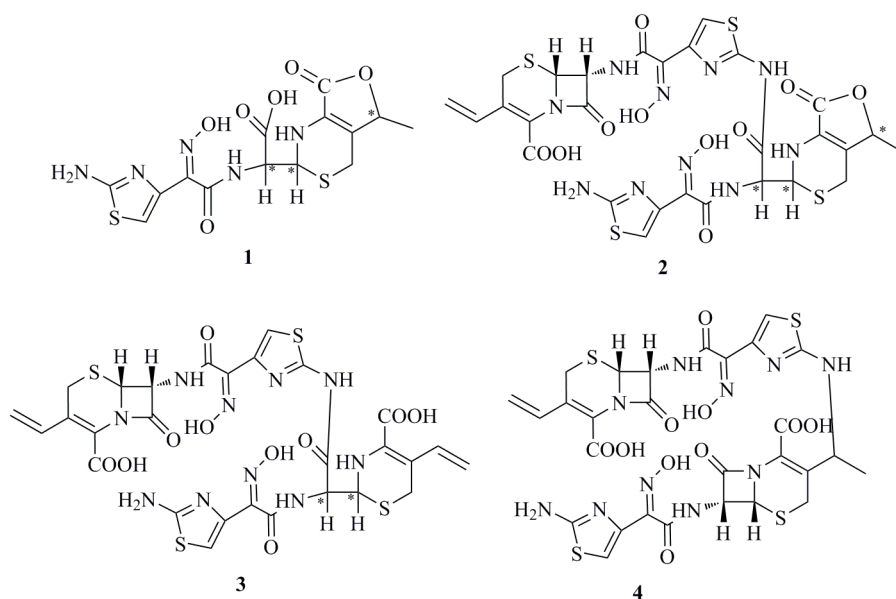
HPSEC-3c的全扫描质谱图(图4)中存在 m/z 396.1



1: 降解溶液(1); 2: 降解溶液(2); 3: 原料; 4: 制剂

图1 HPSEC法分析头孢地尼的典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of cefdinir by HPSEC method



1: 头孢地尼开环 γ 内酯(ring-opened Cefdinir γ lactone); 2,3,4: 头孢地尼二聚体(cefdinir dimers)

图2 降解溶液中聚合物及小分子杂质的推测化学结构

Fig 2 Chemical structures of polymer and small molecular impurities in degradation solution

的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,因此其相对分子质量为395.1Da,与头孢地尼的相对分子质量相同。二者互为同分异构体,具体化学结构尚需进一步研究,为小分子杂质,不属于聚合物杂质。

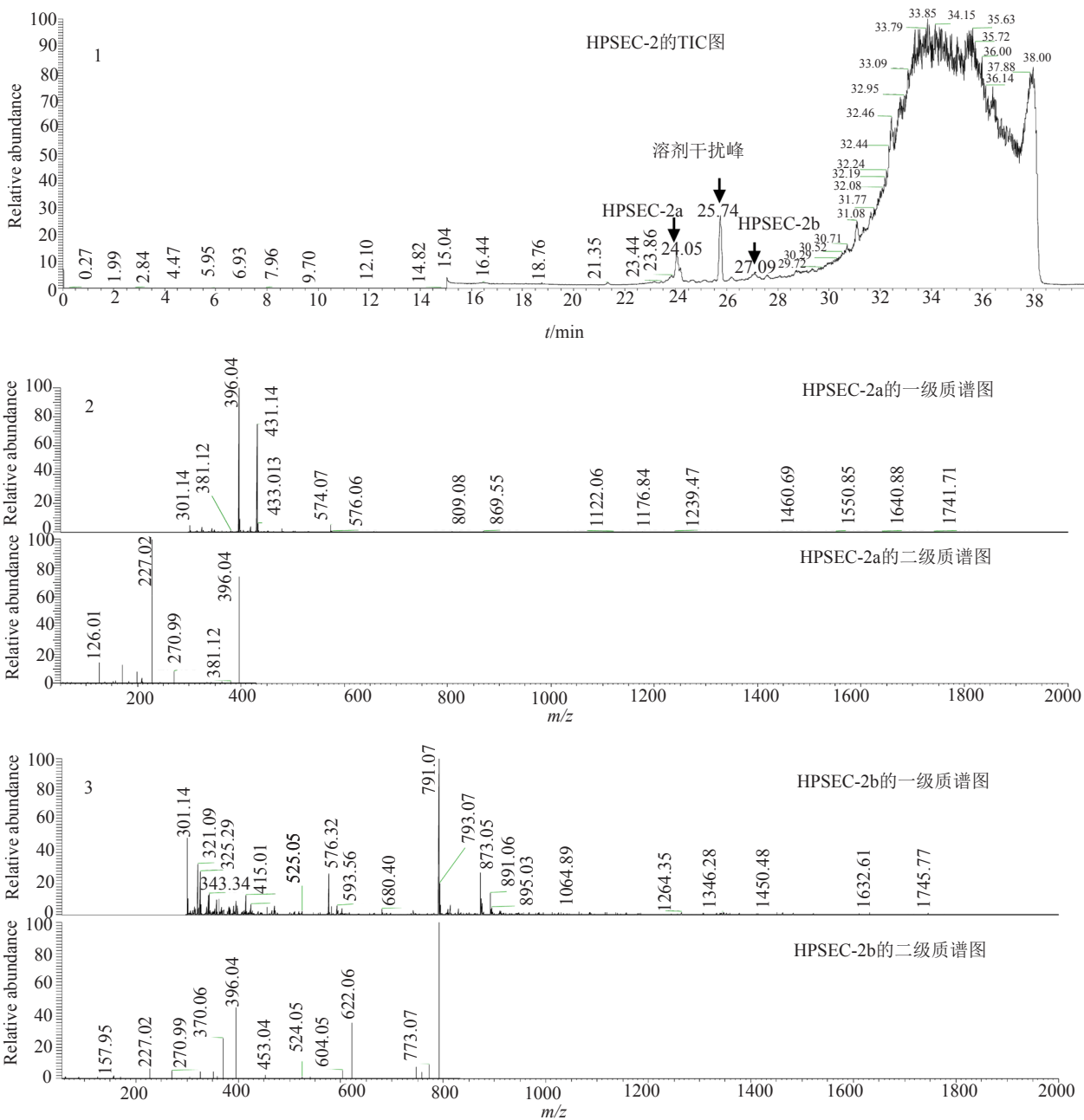
在HPSEC-3d的全扫描质谱图(图4)中存在 m/z 473.0($z=1$)的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,推测HPSEC-3d的相对分子质量为472Da,为溶剂干扰峰,可以忽略。

在HPSEC-3e,3f,3g,3h的全扫描质谱图(图4)中均

存在 m/z 791.07($z=1$)的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,因此这4个杂质峰的相对分子质量为790Da,为头孢地尼相对分子质量的2倍,推断为头孢地尼二聚体,与HPSEC-2b互为同分异构体,属于聚合物杂质,化学结构见图2。

2.2.4 HPSEC-5

在HPSEC-5的全扫描质谱图(图4)中存在 m/z 396.0($z=1$)的加合离子峰,为 $[M+H]^+$ 峰,推测HPSEC-5的相对分子质量为395Da,与头孢地尼的相



1: TIC图, 2: HPSEC-2a的质谱图, 3: HPSEC-2b的质谱图

图3 杂质HPSEC-2的典型质谱图

Fig. 3 Typical Mass spectra of impurity HPSEC-2

对分子质量相同。二者互为同分异构体,具体化学结构尚需进一步研究,为小分子杂质,不属于聚合物杂质。

2.3 HPSEC法的专属性分析

柱切换-LC/MSⁿ-I法分析头孢地尼降解溶液(1)的结果表明,降解溶液(1)中含有头孢地尼二聚体(HPSEC-2b,3e,3f,3g,3h)以及其它小分子杂质(HPSEC-2a,3a,3b,3c,5),未检出三聚体及更高聚合态的杂质。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

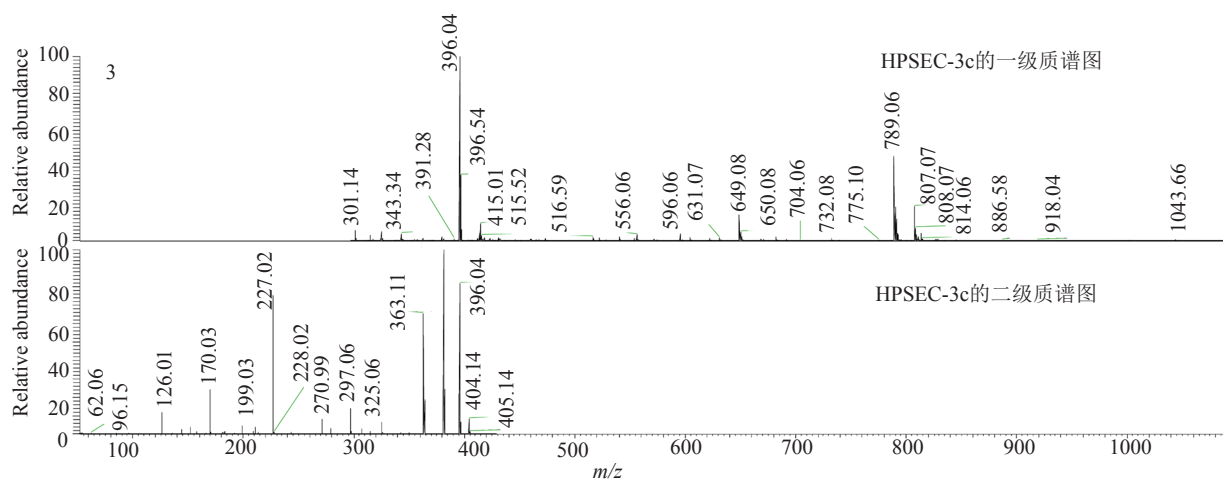
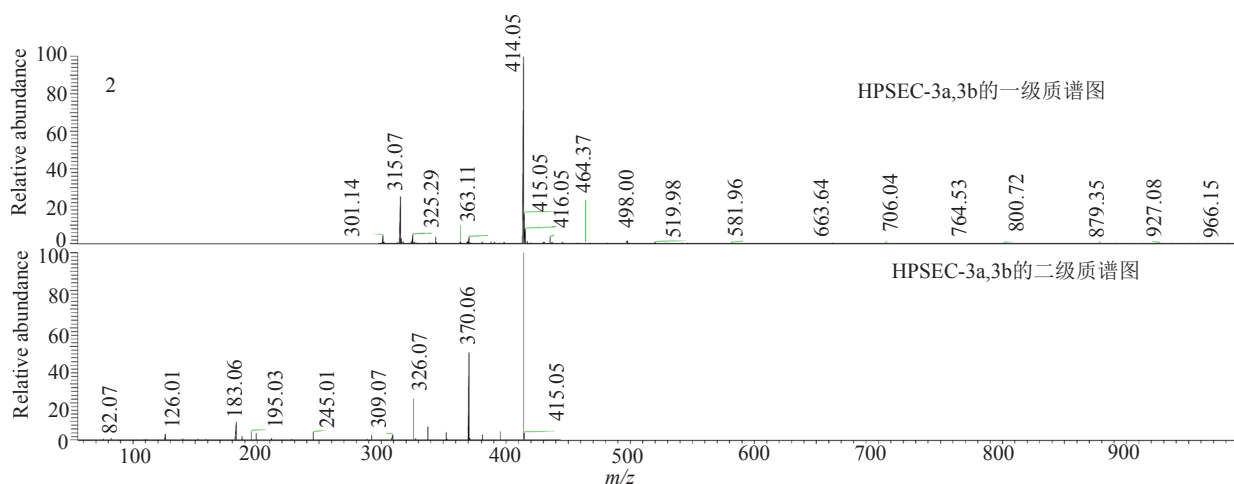
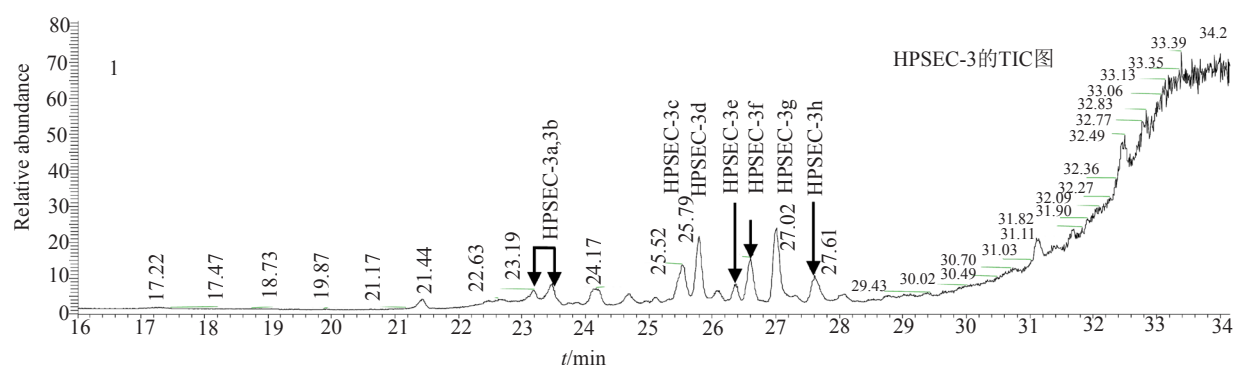
较差,定量不准确,因此不适合用于头孢地尼原料与制剂的聚物质控。

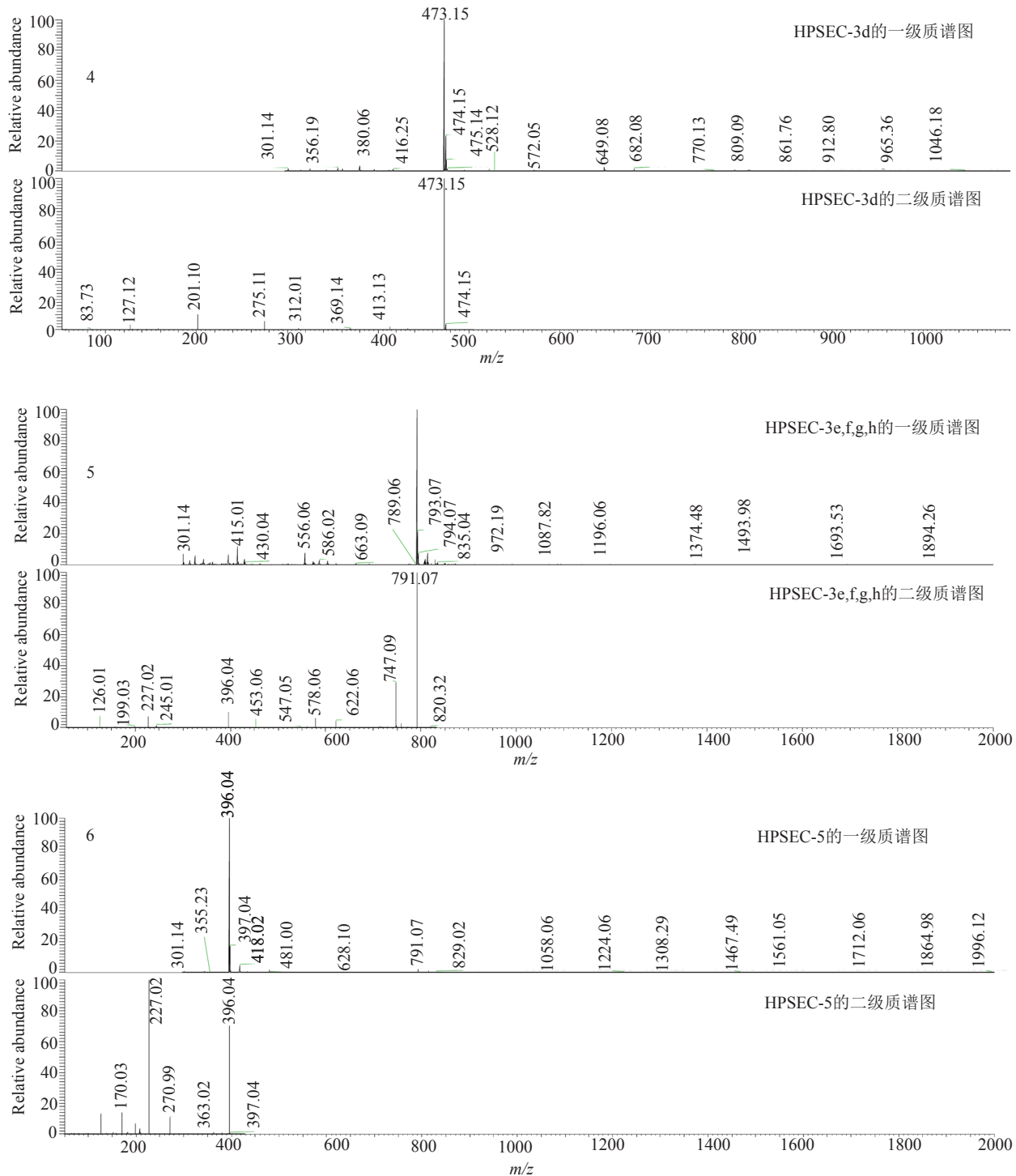
2.4 RP-HPLC法分析头孢地尼的聚合物杂质

HPSEC法分析头孢地尼聚合物杂质的方法专属性较差,因此尝试建立RP-HPLC法,并采用2D-HPLC法和柱切换-LC/MSⁿ法对RP-HPLC的专属性进行研究。

2.4.1 建立RP-HPLC法分离聚合物杂质

在中国药典2015年版头孢地尼有关物质测定方法的基础上,通过增加有机相比比例、延长洗脱时间





1: TIC图, 2: HPSEC-3a,3b的质谱图, 3: HPSEC-3c的质谱图, 4: HPSEC-3d的质谱图, 5: HPSEC-3e,3f,3g,3h的质谱图; 6: HPSEC-5的质谱图

图4 弱保留值杂质HPSEC-3,5的典型质谱图

Fig. 4 Typical mass spectra of impurity HPSEC-3,5

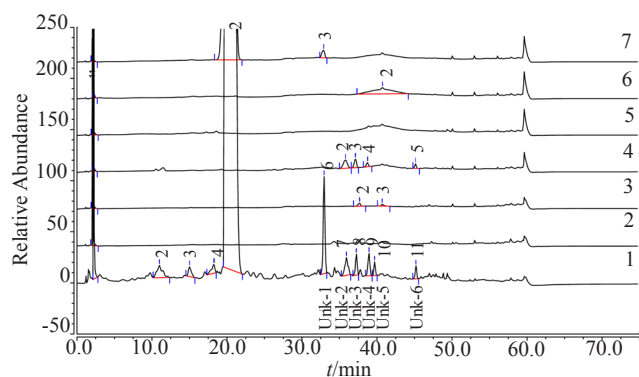
的方法, 优化建立了聚合物分析的RP-HPLC法。

2.4.2 2D-HPLC法归属RP-HPLC中的聚合物杂质

采用2D-HPLC法, 对降解溶液(1)中的弱保留值杂质HPSEC-1~5进行分析, 并与降解溶液(1)的典型RP-HPLC色谱图进行比较, 见图5。结果显示,

HPSEC-1,4,5中未检出明显的杂质峰, 在HPSEC-2和3中检出了Unk-2,3,4,6等杂质峰; 在头孢地尼主峰中检出了杂质Unk-1。因为在HPSEC-2,3中含有聚合物杂质, 所以初步推测Unk-2,3,4,6中含有聚合物杂质。

实验过程中发现, 降解溶液(1)产生的聚合物含



1: 降解溶液(1); 2: HPSEC-1; 3: HPSEC-2; 4: HPSEC-3; 5: HPSEC-4; 6: HPSEC-5; 7: 头孢地尼主峰

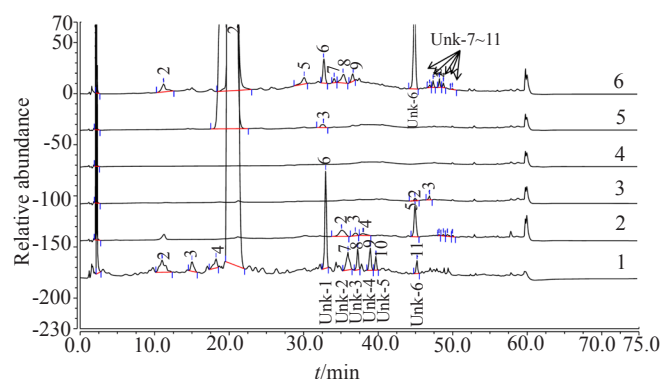
图5 降解溶液(1)的典型二维色谱图

Fig. 5 Typical 2D-HPLC chromatograms of degradation solution (1)

量较低, 聚合物色谱峰不够显著。为了便于在常规检验中定位聚合物杂质, 我们参考头孢拉定的聚合物研究方法^[10], 采用非水环境尝试制备头孢地尼降解溶液(2)。HPSEC法分析降解溶液(2)的结果显示, 降解溶液(2)中仅含有3个弱保留值杂质HPSEC-1', 2', 3', 见图1。采用2D-HPLC法对降解溶液(2)进行分析, 见图6。HPSEC-1', 2'中未检出明显的杂质峰, 在HPSEC-3'中检出了Unk-6以及Unk-7~11; 在头孢地尼主峰中检出了Unk-1。通过与降解溶液(1)的切换色谱图比较可见, 降解溶液(2)中Unk-6的含量明显提高, 而且在Unk-6色谱峰后存在5个杂质峰, 降解溶液(1)不含有这5个杂质峰, 初步推测为头孢地尼的聚合物杂质; 降解溶液(1)中的Unk-1~5归属为降解产生的小分子杂质。

2.4.3 柱切换-LC/MSⁿ法验证RP-HPLC法分析聚合物杂质的专属性

RP-HPLC法分离降解溶液(1)时检出了未知杂质Unk-1~6, 分离降解溶液(2)时检出了未知杂质Unk-



1: 降解溶液(1); 2: HPSEC-3'; 3: HPSEC-2'; 4: HPSEC-1'; 5: 头孢地尼主峰; 6: 降解溶液(2)

图6 降解溶液(2)的典型二维色谱图

Fig. 6 Typical 2D-HPLC chromatograms of degradation solution (2)

6~11。Unk-6为两种降解溶液共有的杂质, 本研究采用柱切换-LC/MSⁿ-II法首先对两种降解溶液中的杂质Unk-6分别进行结构分析, 然后对降解溶液(2)中的未知杂质Unk-7~11进行了结构鉴定, 寻找聚合物杂质。

(1) 杂质Unk-6

降解溶液(1)和降解溶液(2)中的杂质Unk-6的一级和二级质谱图完全一致, 均存在 m/z 791.1 $[M+H]^+$ 的加合离子峰, 表明该杂质的相对分子质量为790 Da, 为头孢地尼相对分子质量的2倍, 推测为头孢地尼二聚体。二者的质谱图见图7。

(2) 杂质Unk-7~10

将降解溶液(2)中的杂质Unk-7~10的色谱峰切换至质谱仪中进行分析。降解溶液(2)的局部放大色谱图及质谱图见图8。4种杂质的一级和二级质谱图完全一致, 均存在 m/z 791.1 $[M+H]^+$ 的加合离子峰, 表明该杂质的相对分子质量为790Da, 为头孢地尼相对分子质量的2倍, 推测为头孢地尼二聚体异构体。

(3) 杂质Unk-11

杂质Unk-11因含量较低, 仅获取了全扫描质谱图, 见图8。图中显示 m/z 1186.1的加合离子峰, 因此其相对分子质量为1185Da, 为头孢地尼相对分子质量的3倍, 因此初步推定杂质Unk-11为头孢地尼三聚体。

以上质谱分析表明, 降解溶液(1)和(2)中Unk-6为头孢地尼二聚体; Unk-7~10等4个杂质均为头孢地尼二聚体异构体, Unk-11为头孢地尼三聚体。聚合物杂质Unk-6的含量明显高于其它聚合物杂质, 可作为质量控制的指针性聚合物杂质。上述聚合物杂质的化学结构为初步推测结构, 因为存在多个聚合位点和取代位点, 导致聚合物杂质存在多种异构体, 仅通过质谱法无法确证其化学结构, 需要进一步通过NMR法加以确证, 但是质谱法提供的相对分子质量信息能够确定这些杂质均是头孢地尼聚合物杂质。总之, RP-HPLC法能够检出头孢地尼的二聚体、二聚体异构体, 头孢地尼三聚体, 各个杂质分离度良好, 证明反相色谱法分析头孢地尼的聚合物杂质的专属性良好。

2.4.4 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, 见图9~10。

(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, 本研究对头孢地尼强制降解溶液进行了分析, 见图10。结果在40~60min范围内未发现

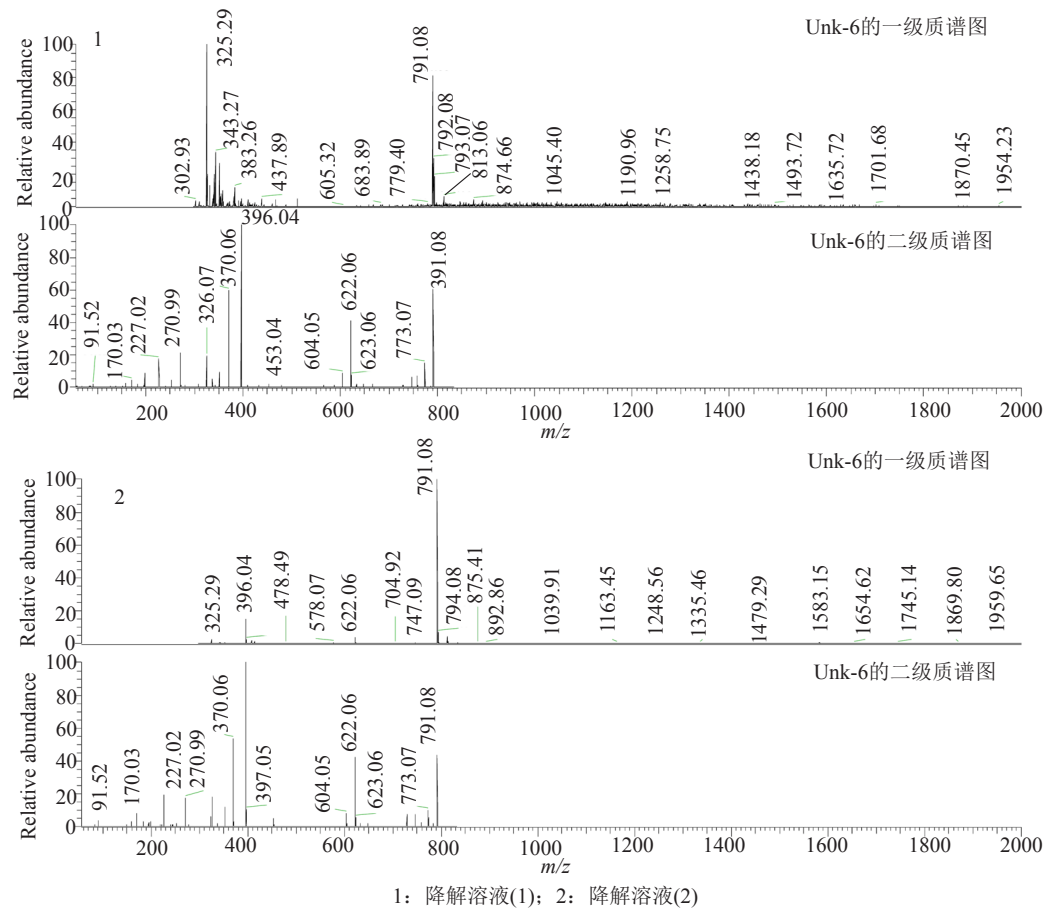


图7 降解溶液(1)与(2)中杂质Unk-6的典型质谱图

Fig. 7 Typical MS spectra of impurity Unk-6 in degradation solution (1) and (2)

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。

(2) 检测限与定量限

头孢地尼二聚体(Unk-6)的最低定量限为0.09 μg ; 最低检测限为0.03 μg 。

(3) 溶液稳定性实验

头孢地尼二聚体在5h内稳定, 建议实际样品定时, 临用前配置溶液, 即溶即进。

(4) 耐用性实验

当柱温、流速改变时, RP-HPLC法均可有效分离样品中的头孢地尼聚合物杂质, 见图9。不同型号的色谱柱对聚合物杂质的分离能力不尽相同, Diamonsil色谱柱的分离效果较好。流动相pH值变化对聚合物杂质影响不大, 但是对头孢地尼主峰的影响较为明显, 因此需要控制流动相的pH在(5.5 \pm 0.1)范围内。

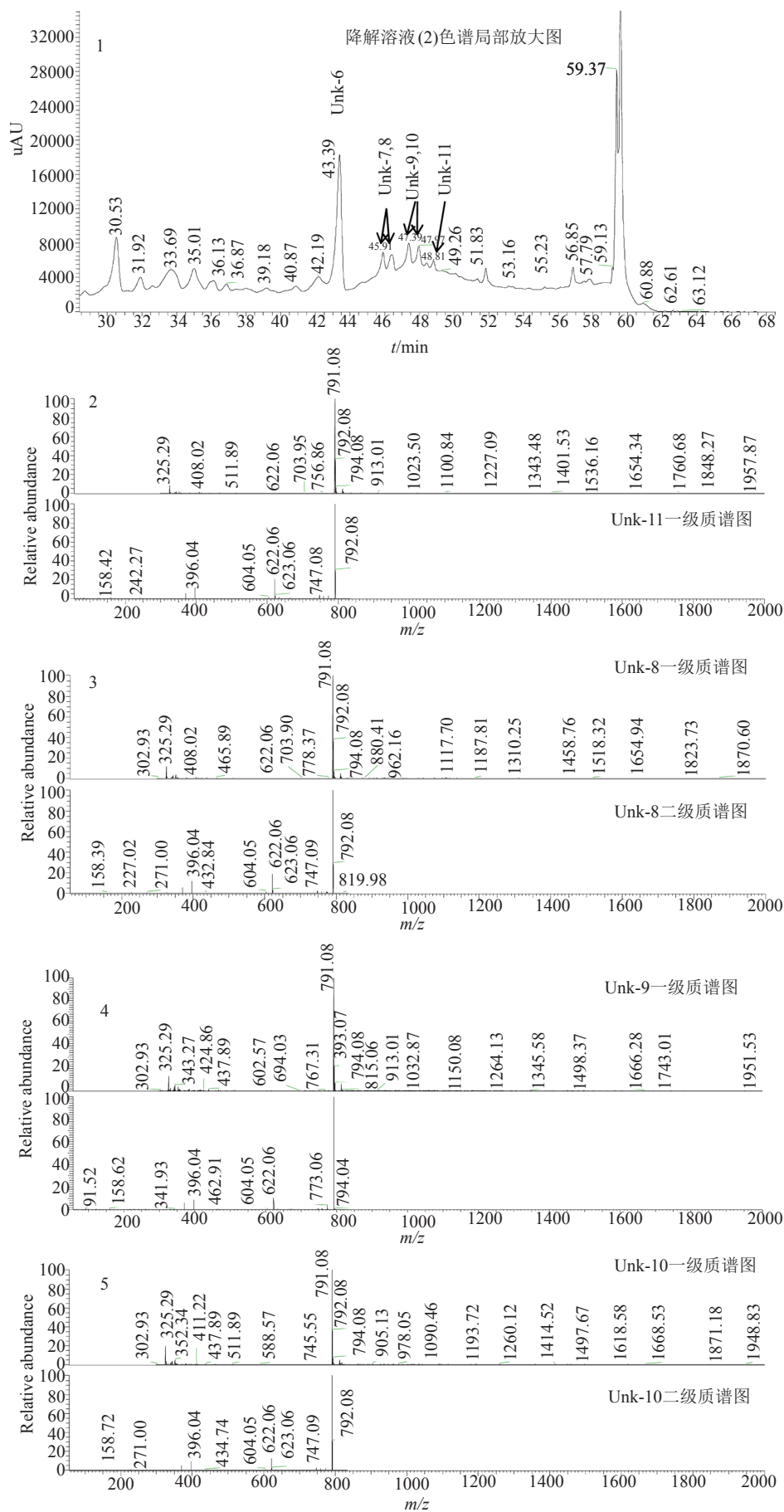
2.5 RP-HPLC法分析供试品的聚合物含量

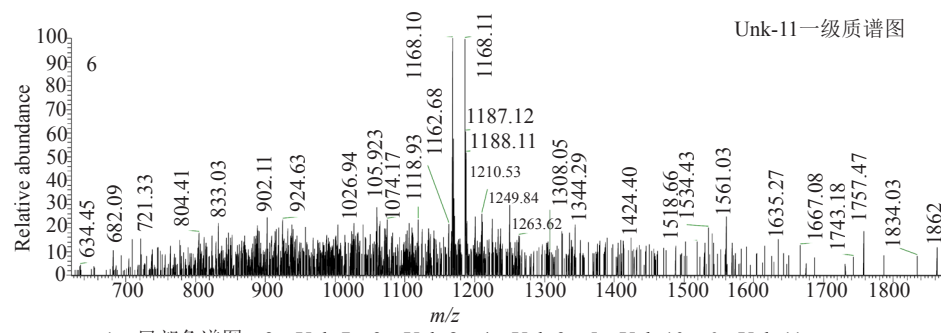
采用RP-HPLC法分析头孢地尼原料及头孢地尼制剂的聚合物, 以头孢地尼二聚体为指针性聚合物

杂质, 按主成分自身对照法计算聚合物的含量, 结果显示, 在头孢地尼原料和制剂中均未检测到明显的头孢地尼聚合物杂质峰, 即头孢地尼二聚体含量低于检出限。二者的差异主要是由高效凝胶色谱法分离的弱保留值杂质中含有小分子杂质引起的, 进一步证明了RP-HPLC法分析聚合物杂质的专属性和准确性。RP-HPLC法分析降解溶液、原料、制剂的典型色谱图见图10。

3 结论

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法分析头孢地尼原料及制剂的聚合物杂质的方法专属性差, RP-HPLC法分析头孢地尼聚合物杂质专属性好、方法准确、耐用性好, 适用于头孢地尼原料及制剂的聚合物质控; 头孢地尼降解溶液(2)可作为头孢地尼聚合物分析的定位溶液, 并以头孢地尼二聚体为指针性聚合物杂质进行聚合物质控。

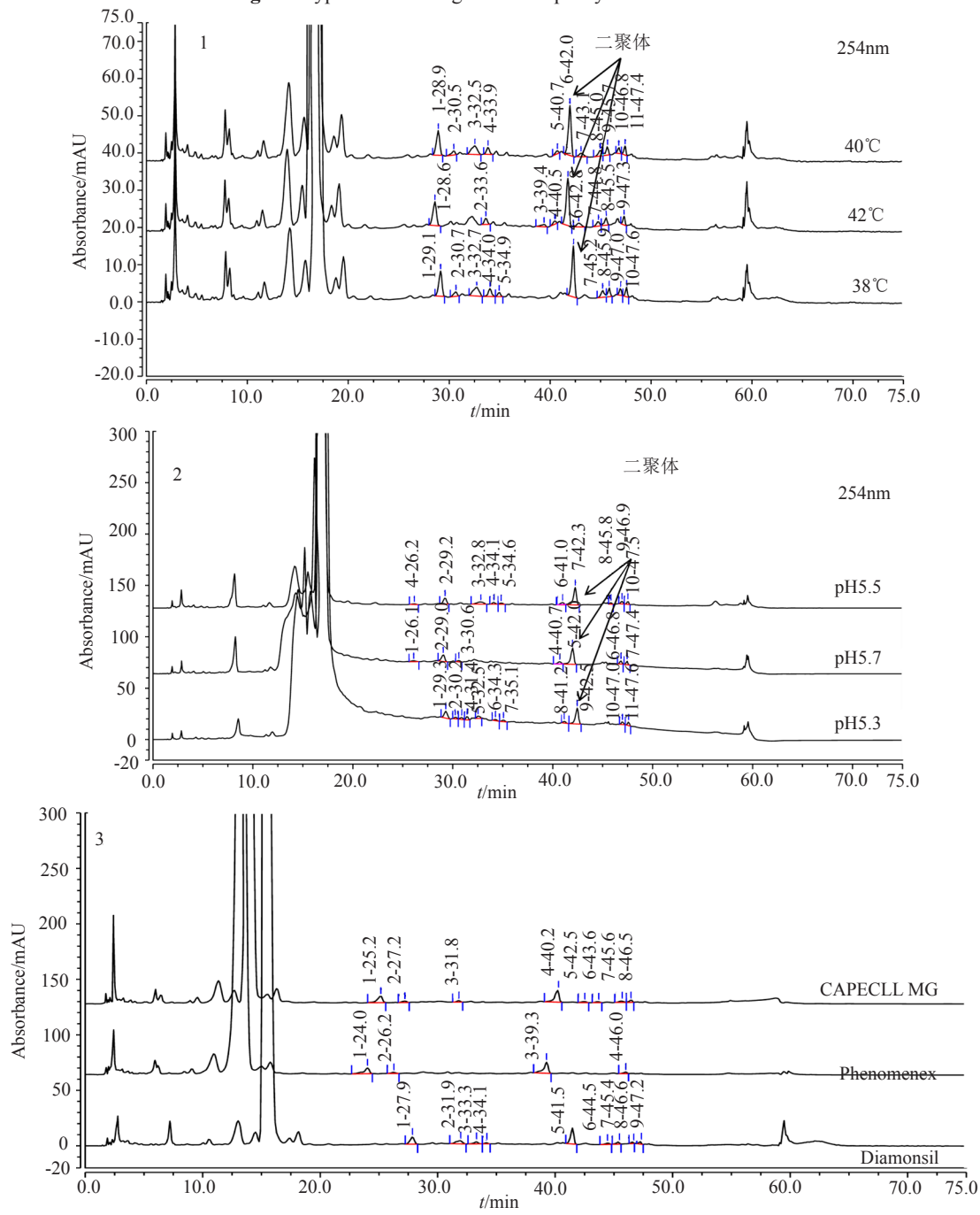




1: 局部色谱图; 2: Unk-7; 3: Unk-8; 4: Unk-9; 5: Unk-10; 6: Unk-11

图8 杂质Unk-7~11的典型质谱图

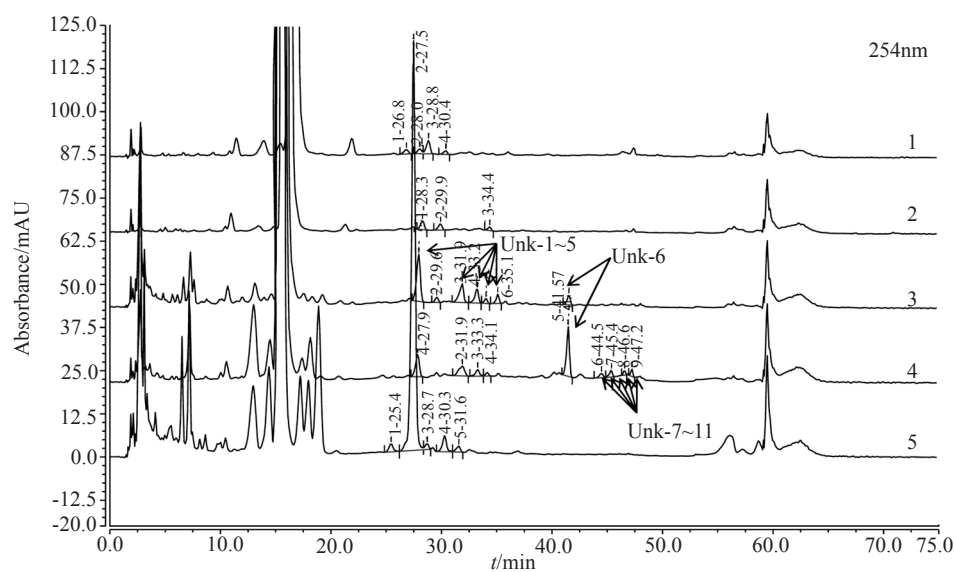
Fig. 8 Typical chromatograms of impurity Unk-7~11



1: 温度; 2: pH; 3: 色谱柱

图9 RP-HPLC法的方法学验证典型色谱图

Fig. 9 Typical RP-HPLC Chromatograms for method validation



1: 原料; 2: 制剂; 3: 降解溶液(1); 4: 降解溶液(2); 5: 降解溶液(3)

图10 头孢地尼供试品及降解溶液的典型RP-HPLC图

Fig. 10 Typical chromatograms of cefdinir samples and degradation solutions by RP-HPLC

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] 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: 244-249.
- [6] The United States Pharmacopeia 41 ed[S]. Roehville MD: the United States Pharmacopeial Convention Inc. 2018, 763-764.
- [7] Japanese Pharmacopeia XVII[S]. Japanese Pharmacopeia committee, 2016: 615-617.
- [8] 全丹, 李庆明, 葛楠. 分子排阻色谱法测定头孢地尼胶囊中的高分子杂质[J]. 中国药房, 2012, 23(41): 3912-3913.
- [9] 朱美容, 张莉, 刘俊华, 等. TSK凝胶色谱法测定头孢地尼中高分子杂质含量[J]. 今日药学, 2011, 21(4): 213-216.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.