

注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠的聚合物杂质分析

李进, 张培培, 姚尚辰, 胡昌勤*

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 **目的:** 建立注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中聚合物杂质的分析方法。**方法:** 采用降解法制备哌拉西林钠他唑巴坦钠强制降解溶液; 建立高效凝胶色谱法, 采用 TSK G2000 SWxl 凝胶柱, 对强制降解溶液中的聚合物杂质进行分离; 采用柱切换-LC/MS 法鉴定聚合物杂质的结构, 并评估高效凝胶色谱法分离聚合物杂质的专属性; 采用 CAPCELL MGII C₁₈ 色谱柱, 以磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相, 进行梯度洗脱, 建立哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物的 RP-HPLC 分析方法; 采用二维色谱法和柱切换-LC/MSⁿ 法对 RP-HPLC 分析聚合物杂质的专属性进行验证。**结果:** 在哌拉西林钠他唑巴坦钠强制降解溶液中鉴定出哌拉西林二聚体及其衍生物、三聚体; 高效凝胶色谱法分离哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物杂质时, 易受到哌拉西林水解杂质的共出峰干扰, 方法专属性差; RP-HPLC 法分析哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物杂质时, 可对多种指针性聚合物杂质进行精准质控, 专属性好。**结论:** 高效凝胶色谱法不能对哌拉西林钠他唑巴坦钠的聚合物杂质进行有效质控, 建立的 RP-HPLC 法可用于哌拉西林钠他唑巴坦钠原料及制剂的聚合物杂质质控; 哌拉西林钠他唑巴坦钠强制降解溶液可作为聚合物杂质定位用系统适用性溶液。

关键词: 哌拉西林钠; 他唑巴坦钠; 青霉素类药物; β -内酰胺抗生素; 聚合物杂质; 内源性杂质; 柱切换-液质联用; 高效凝胶色谱; 二维色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)07-1279-16

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.07.16

Analysis of polymer impurities in piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection

LI Jin, ZHANG Pei-pei, YAO Shang-chen, 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 piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection. **Methods:** Degradation method was used to prepare the degradation stock solution of piperacillin sodium and tazobactam sodium; high performance size exclusion chromatography method (HPSEC, using TSK-gel G2000 SWxl column) and column switching-LC/MSⁿ method were applied to separate and identify the polymer impurities in degradation stock solution and the specification of HPSEC method was evaluated together; a RP-HPLC method for piperacillin sodium and tazobactam sodium polymers was established with a CAPCELL MGII C₁₈ column,

* 通信作者 Tel: (010) 53851532; E-mail: bjhcq@263.net

第一作者 Tel: (010) 53851560; E-mail: medjinli@126.com

using a mobile phase of phosphate buffer and methanol by gradient elution. The specification of RP-HPLC method was assessed by two dimensional chromatography method and column switching-LC/MSⁿ method. **Results:** A series of polymer impurities in degradation stock solution were identified including piperacillin dimers, and its derivative, and trimers. Polymer impurities were co-eluted with small molecular degradation impurities in HPSEC with a poor quantification accuracy. A series of characteristic polymer impurities were detected and accurately quantified when RP-HPLC method was used to analyze degradation stock solution. **Conclusion:** HPSEC method is not suitable for the quality control of polymer impurities in piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection, while the established RP-HPLC method is specific, which can effectively control the polymer impurities. The degradation stock solution of piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection can be used to identify polymer peaks as the system suitability solution.

Keywords piperacillin sodium; tazobactam sodium; penicillins; β -lactam antibiotics; polymer impurity; endogenous impurities; column switch-LC/MS; HPSEC; 2D-HPLC

青霉素类抗生素的聚合物杂质容易诱发过敏反应,是影响药物安全性的潜在风险因素之一^[1-4]。聚合物杂质属于内源性杂质,在药品原料与制剂的生产、运输、存储过程中均可能产生。为保证药品的安全性,应对青霉素类药物的聚合物杂质进行严格控制。

聚合物杂质控制的理念逐渐由控制聚合物的总量向精准控制指针性聚合物杂质的方向发展^[5]。目前已报道的注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物分析方法包括葡聚糖凝胶 G10 色谱法 (Sephadex G10 色谱法)^[6]、高效凝胶色谱法 (HPSEC 法)^[7]。美国药典 (USP) 41 版采用 RP-HPLC 法对注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中的二聚体及其衍生物进行了质控^[8]。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 2015 年版、欧洲药典 (EP) 9.2 版、英国药典 (BP) 2018 版、日本药局方 (JP) X VI 版均未对该复方制剂的聚合物杂质进行专门质控。

据报道, Sephadex G10 色谱系统存在柱效低, 分离效果差等缺点; HPSEC 法同时具备分子排阻和反相吸附 2 种分离机理, 对聚合物杂质具有较好的分离能力, 但是聚合物色谱峰易受到药物中其他极性较大的小分子杂质的共出峰干扰, 从而影响聚合物杂质的定量分析^[9]; 采用 RP-HPLC 法对聚合物指针式杂质进行分析是近年来研究的热点, 但是该类方法能否检出更高聚合态的聚合物杂质缺乏方法专属性研究。在前期研究中, 已对青霉素类抗感染药物聚合物杂质做过研究工作, 证明采用《中国药典》2015 年版的 RP-HPLC 有关物质测定方法可对指针性聚合物杂质进行精准控制^[10-11]。

本研究系统地比较了 HPSEC 法和 RP-HPLC 法对该复方制剂的分离检测能力。首先人工制备了哌拉西林钠他唑巴坦钠降解浓溶液为参考溶液, 然后建立 HPSEC 法分析样品中的聚合物杂质, 并采用二维高效液相色谱法 (2D-HPLC 法)、柱切换 -LC/MSⁿ 法对降解浓溶液中的聚合物杂质结构进行鉴定, 对 HPSEC 法分析聚合物杂质的方法专属性进行验证; 接下来对 USP 41 版收载的有关物质方法进行方法优化, 建立用于聚合物分析的 RP-HPLC 法, 考察并验证 RP-HPLC 法分析更高聚合态杂质的方法专属性。在此基础上, 建立适用于注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠制剂的聚合物杂质分析方法。

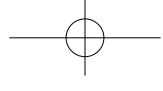
1 仪器、样品与试剂

1.1 仪器

Dionex 公司 Summit 100 型二维色谱系统, 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 6.8 版; 柱切换 LC-MS 系统 I 由资生堂 HPLC 色谱系统 (包括 NanoSpace S1-2 二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、切换阀和 PDA 检测器) 和 ABSciex 公司 Qtrap 3200 型 MS/MS 质谱仪组成, 工作站为 Analyst 1.6 版; 柱切换 LC-MS 系统 II 由 Dionex 公司 U3000 液相色谱仪 (包括双三元低压梯度泵、自动进样器、柱温箱、切换阀和 UV 检测器) 和 Thermal 公司 Q Exactive Focus 高分辨质谱仪组成, 工作站为 Xcalibur 4.0 版。

1.2 样品与试剂

注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠样品 (批号



AKHJ/11) 由中国食品药品检定研究院提供。乙腈(色谱纯)购自美国 Fisher 公司,其他化学试剂(分析纯)均购自国药集团化学试剂公司,水为实验室自制双蒸水。

2 实验方法

2.1 HPSEC 法

色谱柱: TSK-gel G2000 SWxl(填料:刚性、球形、亲水硅胶; 7.8 mm × 30 cm); 流动相: pH 7.0 磷酸盐缓冲液[0.01 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 - 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(61:39)]; 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。稀释溶剂: 水; 样品浓度: 2.0 mg · mL⁻¹。用于 HPSEC 法分析聚合物杂质。

2.2 RP-HPLC 法

色谱柱: CAPCELL MGII C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 3.12 g · L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲液(用磷酸调节 pH 至 3.5), B 相为甲醇, 梯度洗脱(0~5.0 min, 90%A → 85%A; 5.0~10.0 min, 85%A → 65%A;

10.0~35.0 min, 65%A → 55%A; 35.0~60.0 min, 55%A → 35%A; 60.0~85.0 min, 35%A → 15%A; 85.0~86.0 min, 15%A → 90%A; 86.0~100.0 min, 90%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 220 nm。用于分析注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠的指针性聚合物杂质。

2.3 2D-HPLC 法

色谱系统 I 同“2.1”项色谱系统; 色谱系统 II 同“2.2”项色谱系统。切换阀的连接方式如图 1 所示, 切换程序: ①将切换阀设为 A 位置, 采用右泵, 以 TSK 凝胶色谱系统(色谱系统 I)对供试品进行分离, 同时采用色谱系统 II 对 RP C₁₈ 色谱柱进行平衡。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。用于对 HPSEC 色谱系统分离的弱保留值杂质在 RP-HPLC 色谱系统中进行定位。

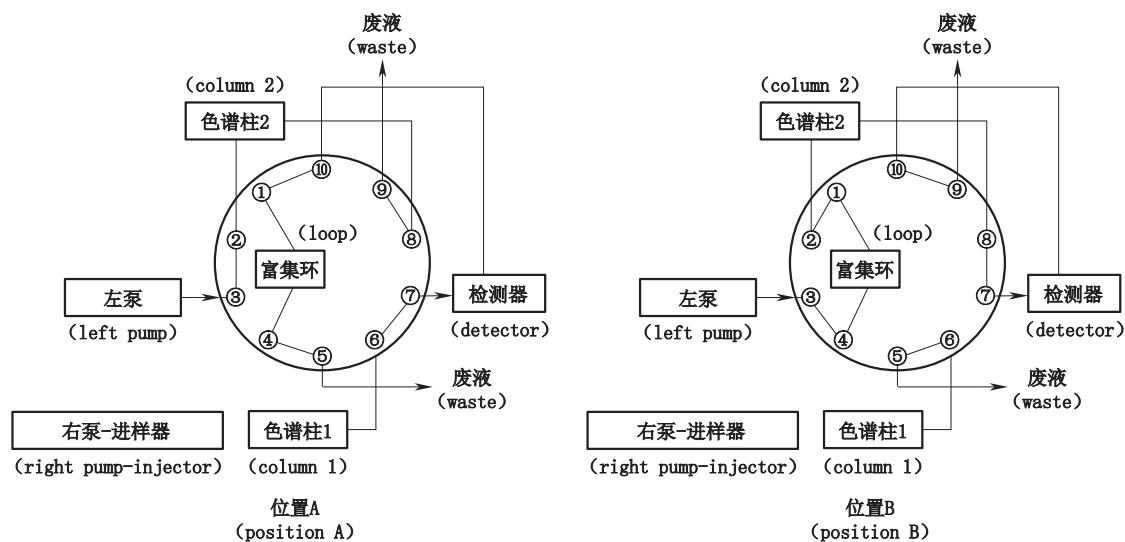


图 1 2D-HPLC 中 10 孔切换阀示意图

Fig. 1 Schemes of the Dimensional HPLC system

2.3.1 柱切换 -LC/MS- I 法

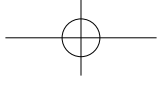
用于分析 TSK 凝胶色谱系统中的聚合物。

2.3.1.1 色谱系统 III 同“2.1”项色谱系统, 进样量增加至 50 μL, 用于杂质的分离。

2.3.1.2 色谱系统 IV 色谱柱: CAPCELL C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: A 相为水 - 冰醋酸(100:1.7), B 相为乙腈 - 冰醋酸(100:1.7), 梯度洗脱[0~(t_R+5) min(t_R为目标杂质在色谱系统 III 的

保留时间), 100%A 相(脱盐处理); (t_R+5)~(t_R+20) min, 100%A → 10%A; (t_R+20)~(t_R+25) min, 10%A; (t_R+25)~(t_R+26) min, 10%A → 100%A; (t_R+26)~(t_R+40) min, 100%A]; 柱温: 室温; 流速: 0.7 mL · min⁻¹; 切换阀: 六通阀 A 和 B, 切换用定量环体积 500 μL。用于对 HPSEC 系统分离的聚合物杂质进行脱盐处理、质谱定性研究。

2.3.1.3 质谱条件(Qtrap 3200) +EMS 和 +EPI 扫



描范围: m/z 50~1700; 气帘气: $20\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 离子源电压: +5 000V; 离子源温度: $500.00\text{ }^{\circ}\text{C}$; 气路 1: $65\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 气路 2: $60\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 碰撞气强度: 强; 解簇电压: +50.0 V; 入口电压: +10.0 V; 碰撞室入口电压: +10.00 V; 碰撞能: +30.00 V; 碰撞室出口电压: +0.00 V。

2.3.2 柱切换 -LC/MS- II 法

用于对 RP-HPLC 中聚合物色谱峰的确认

2.3.2.1 色谱系统 V 同“2.2”项色谱系统, 进样体积增加至 $50\text{ }\mu\text{L}$, 用于杂质的分离。

2.3.2.2 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 色谱系统分离的聚合物杂质进行脱盐处理及质谱定性研究。

2.3.2.3 质谱条件 (Q Exactive Focus) 调谐方法: 扫描电压 (+) $3\ 000.00\text{ V}$, 毛细管温度 (+) $350.00\text{ }^{\circ}\text{C}$, 鞘气 (+) $35.00\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 辅助气 (+) $10.00\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 最大喷雾电流 (+) 100.00 A , 探针加热器温度 (+) $350.00\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $70\ 000$, 扫描范围 m/z $200\sim 2\ 000$, AGC 目标 1e^6 ; 二级质谱方法: 分辨率 $17\ 500$, 分离窗口 m/z 3.0 , (N) CE 25 V , 缺省电荷状态 1, AGC 目标 5e^4 。

3 溶液配制

3.1 降解浓溶液 (1)

取注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠样品 1 瓶 (内含哌拉西林钠 4.0 g , 他唑巴坦钠 0.5 g), 加入纯净水 40.0 mL , 溶解后在室温下放置 3 d, 备用。

3.2 降解浓溶液 (2)

取样品 1 瓶 (内含哌拉西林钠 4.0 g , 他唑巴坦钠 0.5 g), 加入纯净水 40.0 mL , 溶解后在室温下放置 26 d, 备用。

4 结果与讨论

4.1 HPSEC 分析注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物

本研究首先参照《中国药典》2015 年版二部中头孢地嗪有关物质 II 的方法, 对流动相的 pH、缓冲盐的浓度、强溶剂比例与检测波长等因素进行了优化, 最后建立了 HPSEC 法, 见“2.1”项。

4.1.1 流动相的 pH

因为哌拉西林钠和他唑巴坦钠均为离子型化合物, 在 HPSEC 系统中的色谱保留行为易随着流动相 pH 的改变而发生变化, 所以首先对流动相系统的 pH

进行优化筛选。分别选用 4 个 pH (pH 4.0、5.0、6.0、7.0) 的磷酸盐缓冲液 [$0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液 - $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 (61:39)] 分别与乙腈比例为 95:5 的 4 种流动相分离降解溶液 (1) 中的弱保留值杂质。结果显示, 随缓冲盐 pH 由 4.0 升高到 7.0, 哌拉西林钠和他唑巴坦钠逐渐由 2 个色谱峰合并为 1 个峰, 同时弱保留值杂质的峰形由多个分离度较差的小峰合并为 1 个对称的单峰, 说明 pH 7.0 的缓冲溶液更有利于弱保留值杂质的分离, 结果见图 2-a。

4.1.2 流动相的缓冲盐浓度

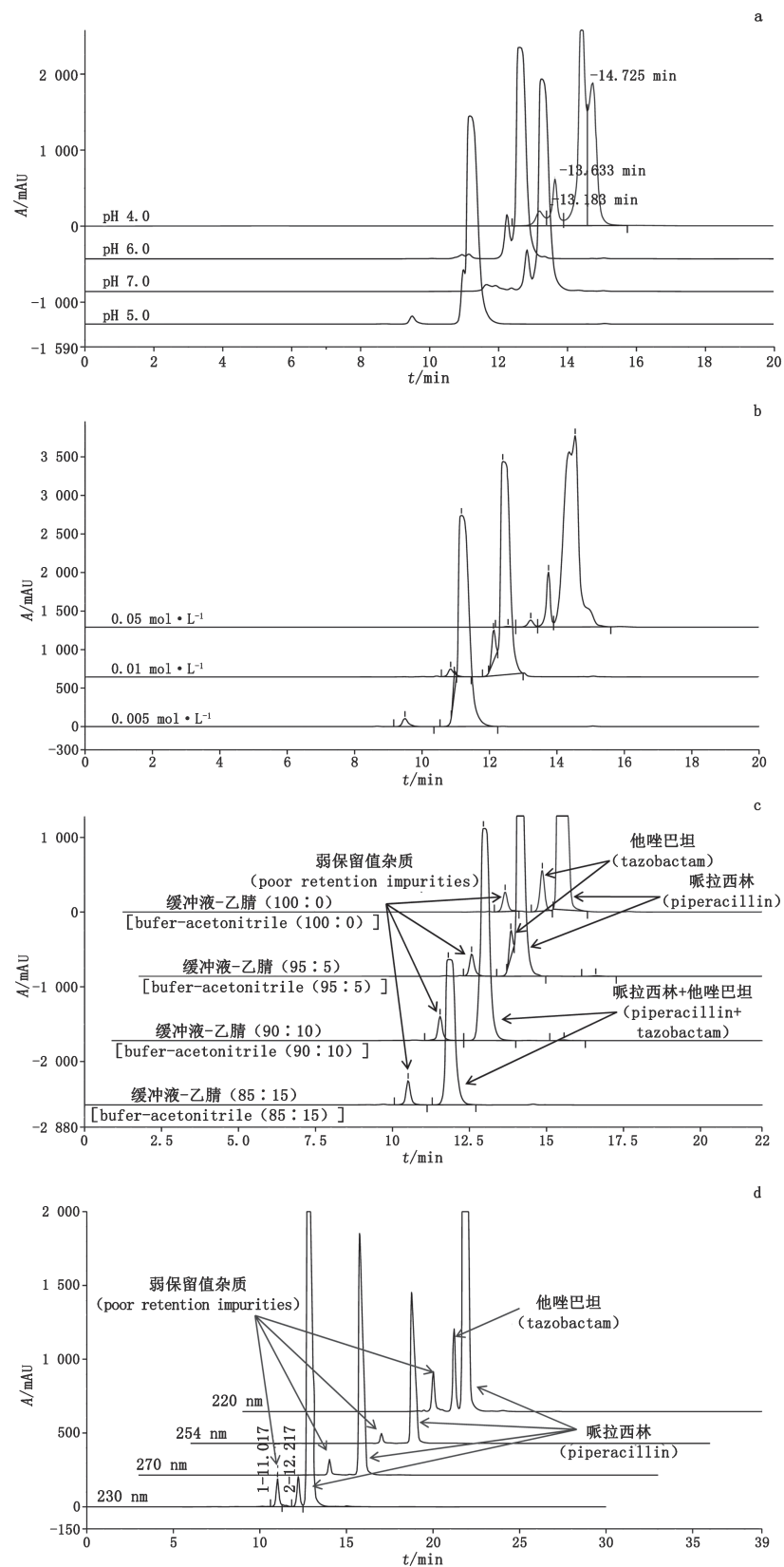
流动相的洗脱能力会因为缓冲盐的离子强度不同而发生改变, 因此本研究对磷酸盐缓冲液的离子浓度 (0.005 、 0.01 、 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行了筛选。结果表明, 当缓冲盐的离子浓度为 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 主峰发生裂分, 不适合作为流动相; 0.005 和 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的缓冲盐均能较好地分离弱保留值杂质峰和主峰; 但是与 $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的缓冲液相比, $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的缓冲液对哌拉西林和他唑巴坦 2 个主峰也有一定的分离能力; 因此, 选择了 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作为流动相, 结果见图 2-b。

4.1.3 流动相的强溶剂比例

流动相中强溶剂的比例也是影响方法洗脱能力的关键因素之一, 因此本研究对 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 与强溶剂乙腈的比例 (100:0、95:5、90:10、85:15) 进行了筛选。当强溶剂比例由 0% 增加至 15% 的过程中, 他唑巴坦和哌拉西林 2 个主峰逐渐融合为 1 个色谱峰。当不采用强溶剂时, 他唑巴坦与哌拉西林 2 个主峰能够实现基线分离。因此最终选择流动相中不使用强溶剂, 见图 2-c。

4.1.4 检测波长的选择

为了提高聚合物杂质的检测灵敏度, 本文设定了 220、230、254、270 nm 4 个检测波长, 对样品进行测定, 如图 2-d 所示。在 220 nm 和 230 nm 波长处主峰前杂质峰和他唑巴坦峰的响应最强, 在 254 nm 和 270 nm 波长处他唑巴坦无响应, 由于体现哌拉西林结构的最大特征吸收波长为 220 nm 和 275 nm, 同时参考 USP 41 版注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠制剂有关物质的检测波长 (220 nm), 最终选定 220 nm 为检测波长。



a. pH b. 缓冲盐浓度 (buffer concentration) c. 强溶剂比例 (strong solvent proportion) d. 检测波长 (detection wavelength)

图2 HPSEC 法优化的典型色谱图

Fig. 2 Typical chromatograms of HPSEC method optimized

4.2 柱切换 -LC/MSⁿ 法鉴别哌拉西林钠他唑巴坦聚合物的化学结构

以哌拉西林钠他唑巴坦强制降解溶液(2)为供试品,采用“2.1”项下条件进行分析,在哌拉

西林钠他唑巴坦主峰前分离得到弱保留值杂质 HPSEC-1~4, 见图 3, 然后采用“2.3.1”项的柱切换 -LC/MS- I 法鉴别各组分的化学结构。分离得到的杂质结构见图 4, 杂质归属见表 1。

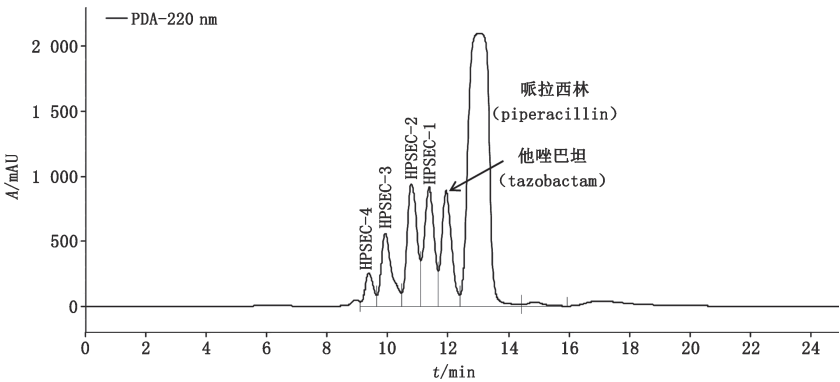


图 3 HPSEC 法分析降解浓溶液(2)的典型色谱图
Fig. 3 Typical chromatogram of degradation stock solution (2) by HPSEC method

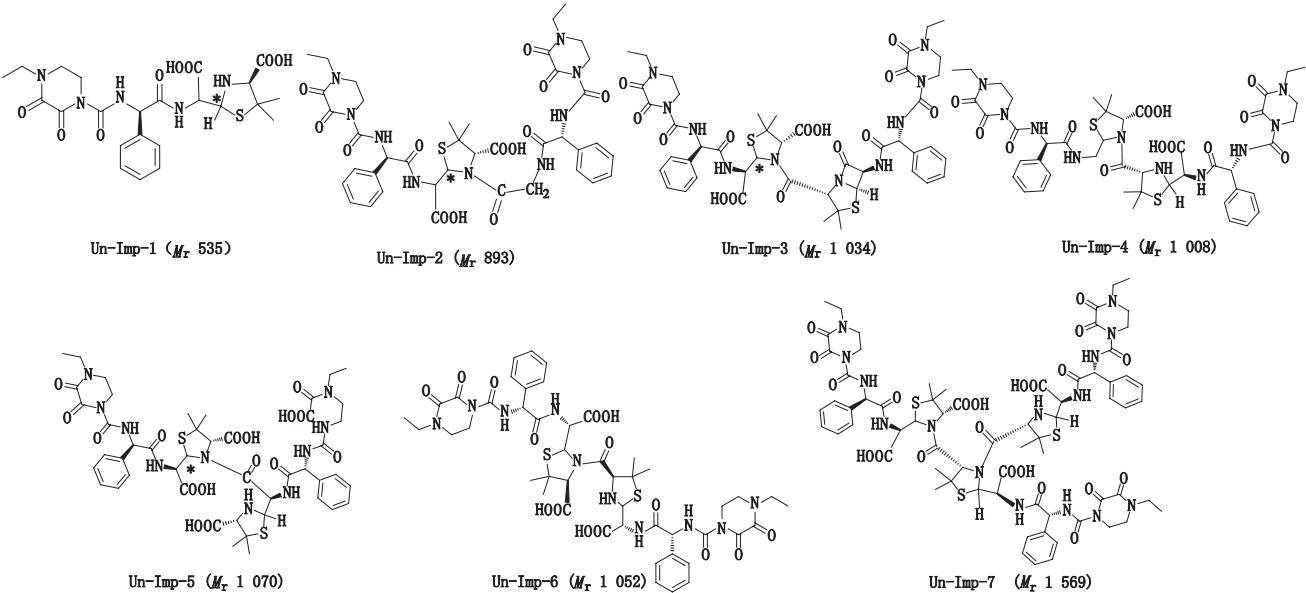


图 4 降解浓溶液(2)中弱保留值杂质的化学结构
Fig. 4 Chemical structures of poor retention impurities in degradation stock solution (2)

表 1 降解浓溶液(2)中相关杂质汇总表

Tab. 1 List of impurities in degraded stock solution (2)

编号 (No.)	杂质名称 (impurity name)	相对分子质量 (relative molecular mass)	来源 (source)	归属 (specification)
1	Un-Imp-1	535	HPSEC-1	哌拉西林水解开环物 (ring opened piperacillin)
2	Un-Imp-2	893	HPSEC-1	哌拉西林开环二聚体脱羧酸物 (dethiazolic ring-opened piperacillin dimer)
3	Un-Imp-3	1 034	HPSEC-1	哌拉西林闭环二聚体 (ring-opened piperacillin dimer)
4	Un-Imp-4	1 008	HPSEC-1	哌拉西林开环二聚体脱羧物 (ring-opened piperacillin dimer decarboxylate)
5	Un-Imp-5	1 070	HPSEC-2	哌拉西林二聚体哌嗪开环物 (piperazine ring-opened piperacillin dimer)
6	Un-Imp-6	1 052	HPSEC-3	哌拉西林开环二聚体 (ring-opened piperacillin dimer)
7	Un-Imp-7	1 569	HPSEC-4	哌拉西林开环三聚体 (ring-opened piperacillin trimer)

4.2.1 弱保留值杂质 HPSEC-1

在 HPSEC-1 的质谱 TIC 图中共分离得到 3 个色谱峰, 色谱保留时间分别为 HPSEC-1a(28.25

min), HPSEC-1b(29.0 min), HPSEC-1c(29.75 min)。弱保留值杂质 HPSEC-1 的 TIC 图、+EMS 及 +EPI 质谱图见图 5。

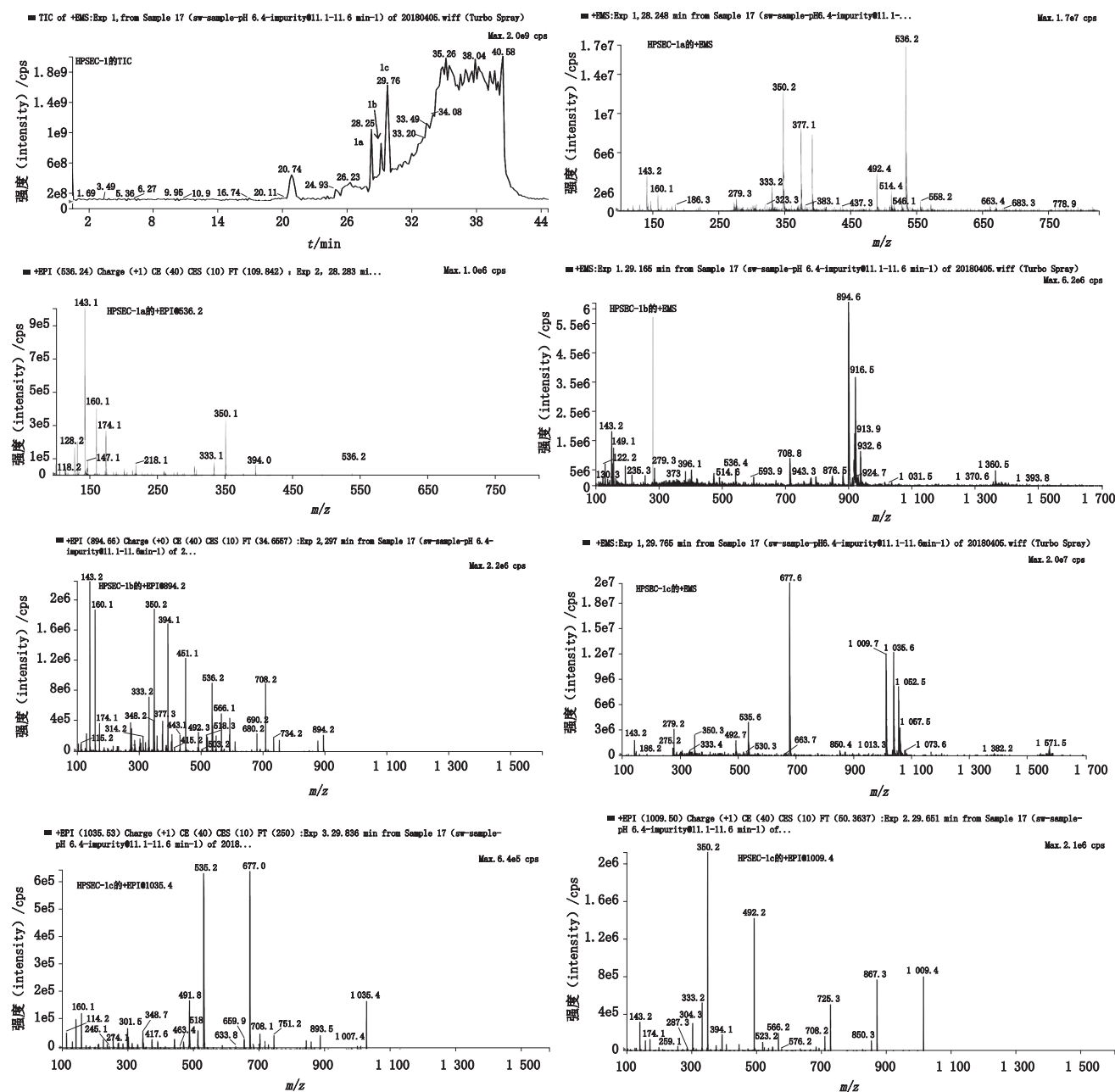
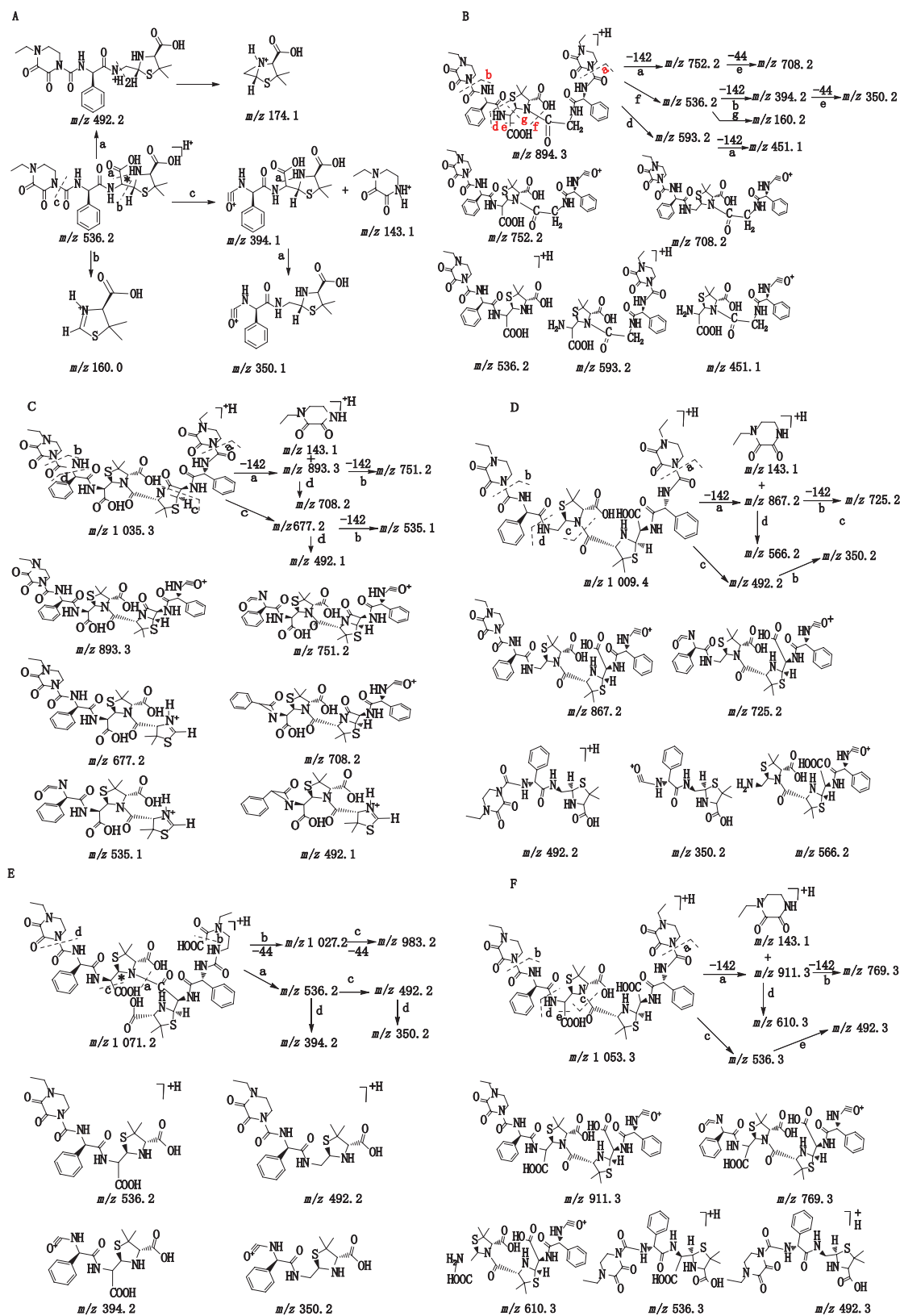


图 5 弱保留值杂质 HPSEC-1 的 TIC 图、典型 +EMS 与 +EPI 质谱图

Fig. 5 TIC, typical +EMS and +EPI mass spectra of poor retention impurity HPSEC-1

在 HPSEC-1a(28.25 min) 的一级质谱图中存在 m/z 536.2、 m/z 558.2、 m/z 574.2 的系列加合离子峰, 分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 峰, 说明其相对分子质量为 535.2, 比哌拉西林的相对分子质量 517.3 多 18, 命名为 Un-Imp-1。二级质谱图中存在 m/z 492.2 $[M+H-44]^+$ 的碎片离

子, 是典型的脱羧基的碎片离子, 说明杂质结构中多了一分子的活泼羧基。因为青霉素类抗生素在水溶液中易发生四元内酰胺环的开环反应, 生成水解产物, 所以推测杂质 Un-Imp-1 为哌拉西林水解开环物, 化学结构见图 4, 质谱裂解途径见图 6-A。



A. Un-Imp-1 B. Un-Imp-2 C. Un-Imp-3 D. Un-Imp-4 E. Un-Imp-5 F. Un-Imp-6

图6 弱保留值杂质的典型质谱裂解途径

Fig. 6 Typical mass fragmentation pathway of poor retention impurities

在 HPSEC-1b (29.0 min) 的一级质谱图中存在 m/z 894.6、 m/z 916.5、 m/z 932.6 的系列加合离子峰, 分别为 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 峰, 说明其相对分子质量为 893, 根据氮规则可知分子中含有奇数个氮。在二级质谱图中存在 m/z 536 (哌拉西林开环物)、 m/z 160 (五元噻唑环) 的碎片离子, 说明其哌拉西林结构有关, 命名为 Un-Imp-2。经二级质谱数据归属, 推测其结构为哌拉西林开环二聚体脱噻唑酸物, 具体结构见图 4, 质谱裂解途径见图 6-B。在 HPSEC-1c (29.75 min) 的一级质谱图中存在 m/z 1 035.4 和 m/z 1 009.4 的加合离子峰, 说明存在 2 种不同的聚合物杂质, 分别命名为 Un-Imp-3 和 Un-Imp-4。参考 USP 41 收录的杂质结构, 可知 m/z 1 035.4

的杂质 Un-Imp-3 为哌拉西林闭环二聚体, 结构见图 4, 质谱裂解途径参见图 6-C。杂质 Un-Imp-4 (m/z 1 009.4) 相对分子质量比哌拉西林闭环二聚体少 26, 推测为哌拉西林开环二聚体脱羧物, 结构参见图 4, 质谱裂解途径参见图 6-D。

4.2.2 弱保留值杂质 HPSEC-2

弱保留值杂质 HPSEC-2 的 +EMS 图及 +EPI 质谱如图 7 所示。质谱数据显示, 在一级质谱图中, 存在 m/z 1 071.4 的加合离子峰, 为 $[M+H]^+$ 峰, 说明其相对分子质量为 1 070.4, 为哌拉西林相对分子质量的 2 倍。根据二级质谱数据, 推测为哌拉西林二聚体的开环水解物, 命名为 Un-Imp-5, 其化学结构参见图 4, 质谱裂解途径参见图 6-E。

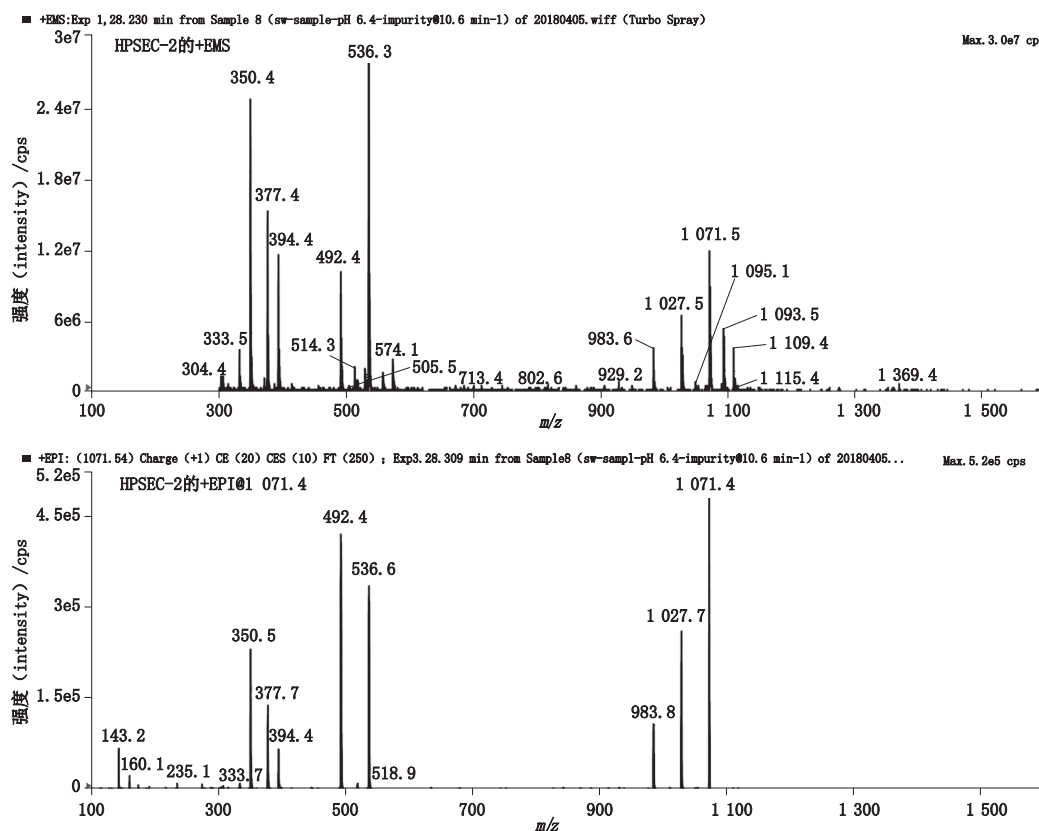


图 7 弱保留值杂质 HPSEC-2 的典型 +EMS 与 +EPI 质谱图

Fig. 7 Typical +EMS and +EPI mass spectra of poor retention impurity HPSEC-2

4.2.3 弱保留值杂质 HPSEC-3

弱保留值杂质 HPSEC-3 的 +EMS 及 +EPI 质谱图如图 8 所示。一级质谱图中存在 m/z 1 053、 m/z 1 075.4 的加合离子峰, 分别为 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰, 说明其相对分子质量为 1 052, 命名为 Un-Imp-6。该杂质的相对分子质量与 USP 41 版的杂质 n

一致, 推测该杂质为哌拉西林二聚体开环水解物。其化学结构参见图 4, 质谱裂解途径参见图 6-F。

4.2.4 弱保留值杂质 HPSEC-4

弱保留值杂质 HPSEC-4 的 +EMS 及 +EPI 质谱图如图 9 所示。该杂质的质谱图中存在 m/z 1 570.6、 m/z 1 592.5 的加合离子峰, 分别为 $[M+H]^+$ 和

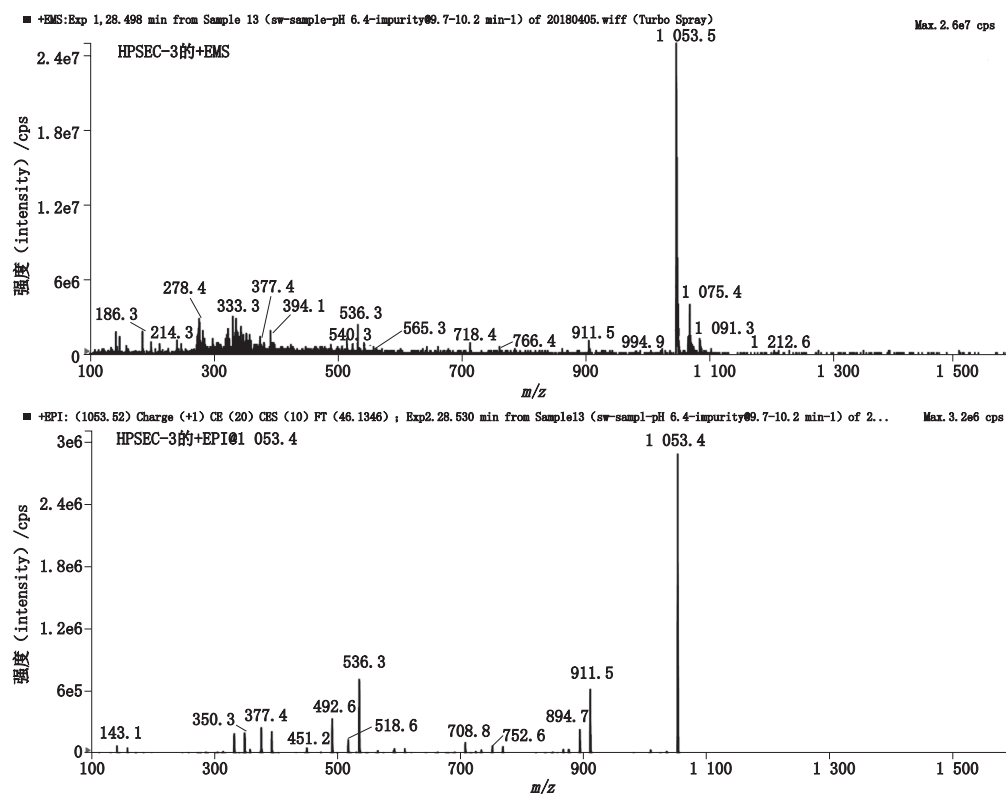


图 8 弱保留值杂质 HPSEC-3 的典型 +EMS 与 +EPI 质谱图

Fig. 8 Typical +EMS and +EPI mass spectra of poor retention impurity HPSEC-3

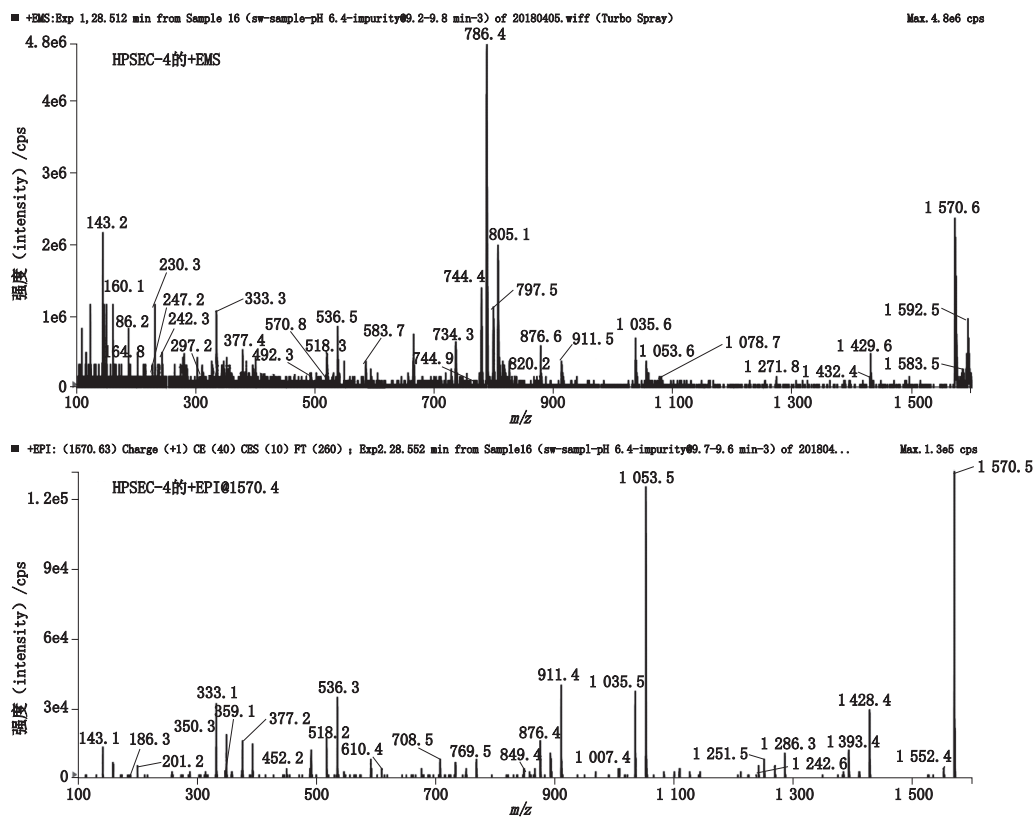
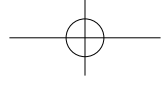


图 9 弱保留值杂质 HPSEC-4 的典型 +EMS 与 +EPI 质谱图

Fig. 9 Typical +EMS and +EPI mass spectra of poor retention impurity HPSEC-4



$[M+Na]^+$ 峰,说明其相对分子质量为 1 569.6,命名为 Un-Imp-7。该杂质的相对分子质量比哌拉西林闭环二聚体(相对分子质量 1 034)多 535,推测该杂质为哌拉西林三聚体开环水解物。其化学结构参见图 4。

4.2.5 哌拉西林聚合物

HPSEC 结合 MS 分析,在哌拉西林钠他唑巴坦钠降解溶液中共发现有哌拉西林开环三聚体(Un-Imp-7)、哌拉西林闭环二聚体(Un-Imp-3)、哌拉西林开环二聚体(Un-Imp-5、Un-Imp-6)、哌拉西林开环二聚体脱羧物(Un-Imp-4)。在阿莫西林克拉维酸钾的聚合物研究中^[10]未发现与克拉维酸相关的聚合物杂质,与此类似,本研究同样未发现与他唑巴坦相关的聚合物杂质,具体原因有待于进一步研究。

4.3 HPSEC 法的专属性分析

HPSEC 法分析降解溶液(2)的结果表明,聚合物杂质均在他唑巴坦和哌拉西林主峰前出峰,不同聚合态的杂质基本上按照相对分子质量由大到小的顺序依次出峰,说明 HPSEC 法对聚合物杂质具有一定的分离能力,但是降解浓溶液(2)的质谱分析结果证明,在 HPSEC-1 中存在小分子杂质哌拉西林开环水解物,该小分子杂质为降解杂质,极易产生,含量较高;在 HPSEC 色谱系统中无法与其他聚合物杂质有效分离,严重影响了聚合物杂质的含量测定准确性。因此,HPSEC 法分析聚合物杂质的方法专属性较差,不适合用于注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠制剂的聚合物质控。

4.4 RP-HPLC 法分析哌拉西林钠他唑巴坦钠的聚合物杂质

HPSEC 法分析哌拉西林钠他唑巴坦钠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/MS 法对 RP-HPLC 的专属性进行研究。

4.4.1 建立 RP-HPLC 法分离聚合物杂质

在 USP 41 版注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠有关物质测定方法的基础上,通过增大有机相的比例,延长洗脱时间的方法,优化建立了聚合物分析的 RP-HPLC 法,见“2.2”项。

4.4.2 2D-HPLC 法验证 RP-HPLC 法分离聚合物杂质的专属性

为了考察 RP-HPLC 法分离聚合物杂质的专属性,本文采用 2D-HPLC 法(“2.3”项方法),将 HPSEC 法分离的聚合物杂质 HPSEC-1~4,转移至 RP-HPLC 系统中进行分析,归属各种聚合物杂质的出峰位置,

如图 10 所示。降解溶液(2)的典型切换色谱图中在哌拉西林主峰后检出多个杂质峰,参见图 10-a;虽然 HPSEC-1 的质谱 TIC 图中可见 3 个色谱峰,但在其二维色谱图中主要为保留值小于哌拉西林色谱峰的 2 个杂质峰 Rs-1($t_R=23.21$ min)、Rs-2($t_R=24.41$ min),见图 10-e,推测其可能为 Un-Imp-1,即哌拉西林开环物;在 HPSEC-2 的二维色谱图中,除检出了他唑巴坦峰外,还发现多个保留值大于哌拉西林的杂质峰,最主要的杂质峰为 Rs-4($t_R=53.98$ min),见图 10-b,推测其可能为哌拉西林二聚体;在 HPSEC-3 的二维色谱图中,检出了保留值大于哌拉西林的 3 个杂质峰 Rs-5~7($t_R=44.6$ min, $t_R=46.26$ min, $t_R=48.66$ min),见图 10-c,推测其中含有哌拉西林开环二聚体;在 HPSEC-4 的二维色谱图中,检出了保留值大于哌拉西林的 4 个主要杂质峰,最主要的杂质峰为 Rs-8,参见图 10-d,推测其中含有哌拉西林三聚体。

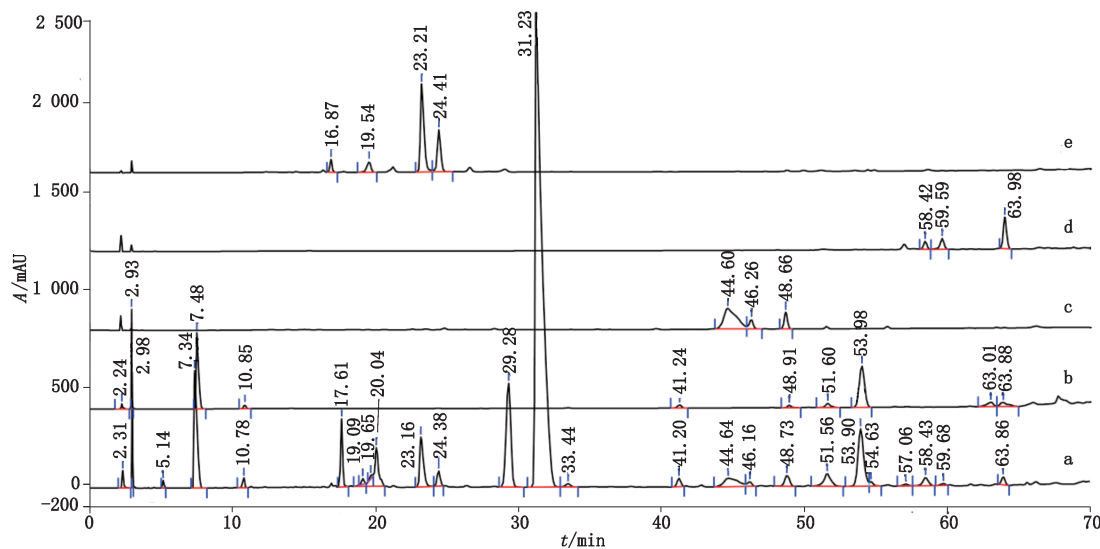
上述 2D-HPLC 研究表明,HPSEC 中的诸杂质不仅均能在 RP-HPLC 法中检出,且 RP-HPLC 具有更好的专属性,并初步证明优化后的 RP-HPLC 法适用于聚合物的分析。

4.4.3 柱切换-LC/MS 法验证 RP-HPLC 法分离聚合物杂质的专属性

为了确认 RP-HPLC 法检出的聚合物杂质结构,根据 2D-HPLC 法的归属结果,采用柱切换-LC/MSⁿ法-II 对 RP-HPLC 法分离的部分杂质进行定性分析,从而在 RP-HPLC 系统对聚合物杂质进行精确定位。分别对图 10-a 中与 HPSEC-1~4 相对应的 8 个杂质进行了质谱鉴别。

结果表明,与 HPSEC-1 相对应的 2 个杂质 Rs-1、2($t_R=23.16$ min, $t_R=24.38$ min)的一级质谱图如图 11-a、b 所示,2 个杂质的准分子离子峰均为 m/z 536.17 $[M+H]^+$,表明 2 个杂质的相对分子质量为 535,与 Un-Imp-1 的相对分子质量一致,因此证明二者为哌拉西林开环物,不是聚合物杂质。

与 HPSEC-2 相关联的 2 个杂质 Rs-3、4($t_R=51.60$ min, $t_R=53.98$ min)的质谱图如图 12-a、b 所示,2 个杂质的准分子离子峰分别为 m/z 1 009.35 $[M+H]^+$ 和 m/z 1 035.32 $[M+H]^+$,表明 2 个杂质的相对分子质量为 1 008 和 1 034,与 Un-Imp-4、3 的相对分子质量一致,证明二者为哌拉西林开环二聚体脱羧物和哌拉西林闭环二聚体,其他几个杂质的质谱数据需要进一步解析,目前无法得出合理的化学结构。



a. 降解溶液(2) [degradation stock solution (2)] b. HPSEC-2 c. HPSEC-3 d. HPSEC-4 e. HPSEC-1

图 10 2D-HPLC 法分离的相关杂质汇总色谱图

Fig. 10 Typical pool chromatograms of poor retention impurities by 2D-HPLC

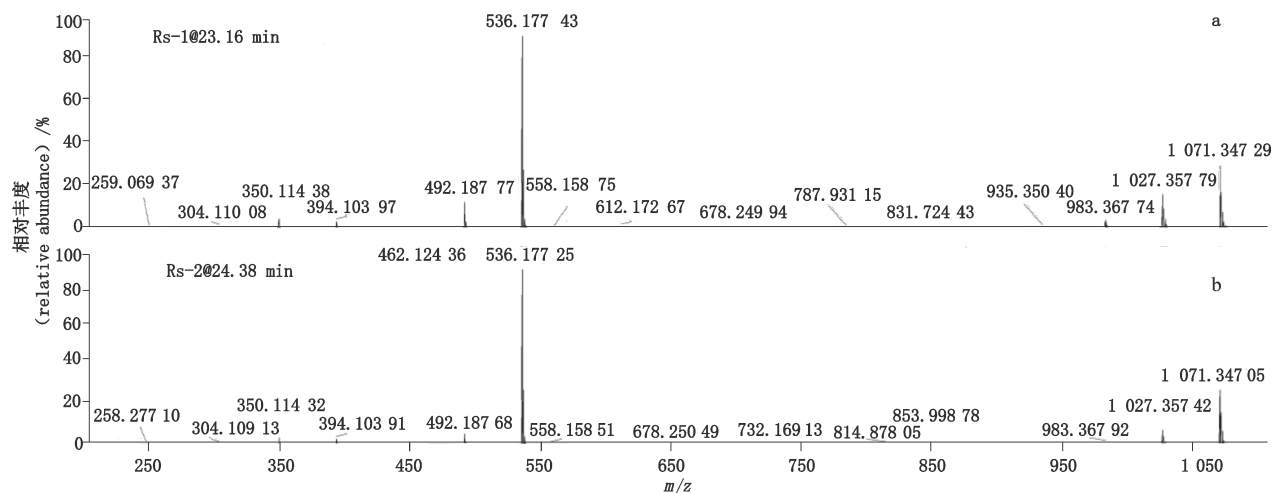


图 11 RP-HPLC 法分析降解浓溶液(2)中杂质 Rs-1(a)和 Rs-2(b)的典型 +EMS 质谱图

Fig. 11 Typical +EMS mass spectra of impurities Rs-1(a) and Rs-2(b) in stress degradation solution (2) by RP-HPLC

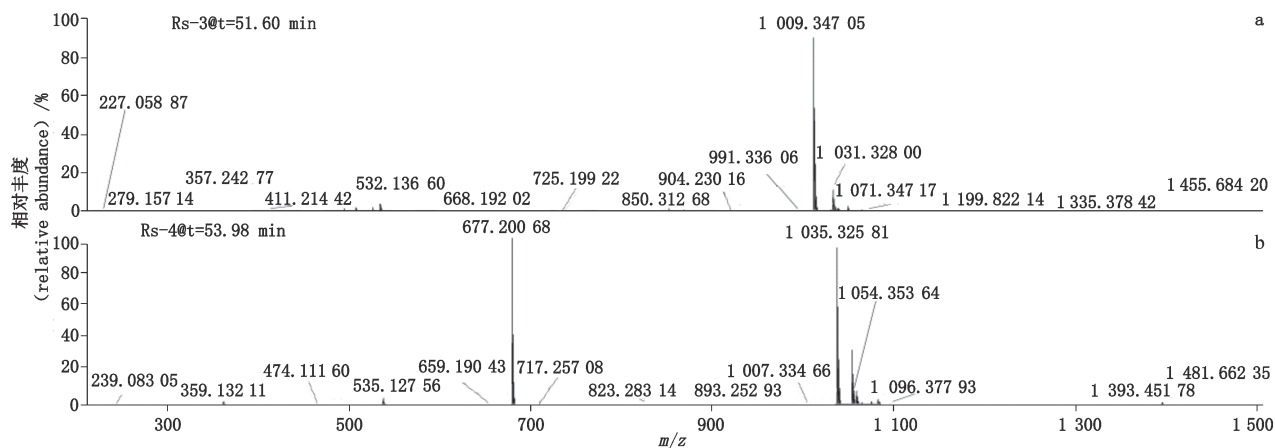
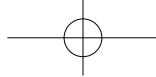


图 12 RP-HPLC 法分析降解浓溶液(2)中杂质 Rs-3(a)和 Rs-4(b)的典型 +EMS 质谱图

Fig. 12 Typical +EMS mass spectra of impurities Rs-3(a) and Rs-4(b) in stress degradation solution (2) by RP-HPLC



与 HPSEC-3 相关联的 3 个杂质 Rs-5~7 ($t_R=44.60$ min, $t_R=46.26$ min, $t_R=48.66$ min) 的质谱图如图 13-a~c 所示, 3 个杂质的准分子离子峰均为 m/z 1 053.35 $[M+H]^+$ 、 m/z 1 053.32 $[M+H]^+$ 以及 m/z 1 009.35 $[M+H]^+$, 表明 3 个杂质的相对分子质量为 1 052、1 052 以及 1 008, 与 Un-Imp-6、4 的相对分子质量一致, 因此证明三者分别为哌拉西林开环二聚体和哌拉西林开环二聚体脱羧物异构体。

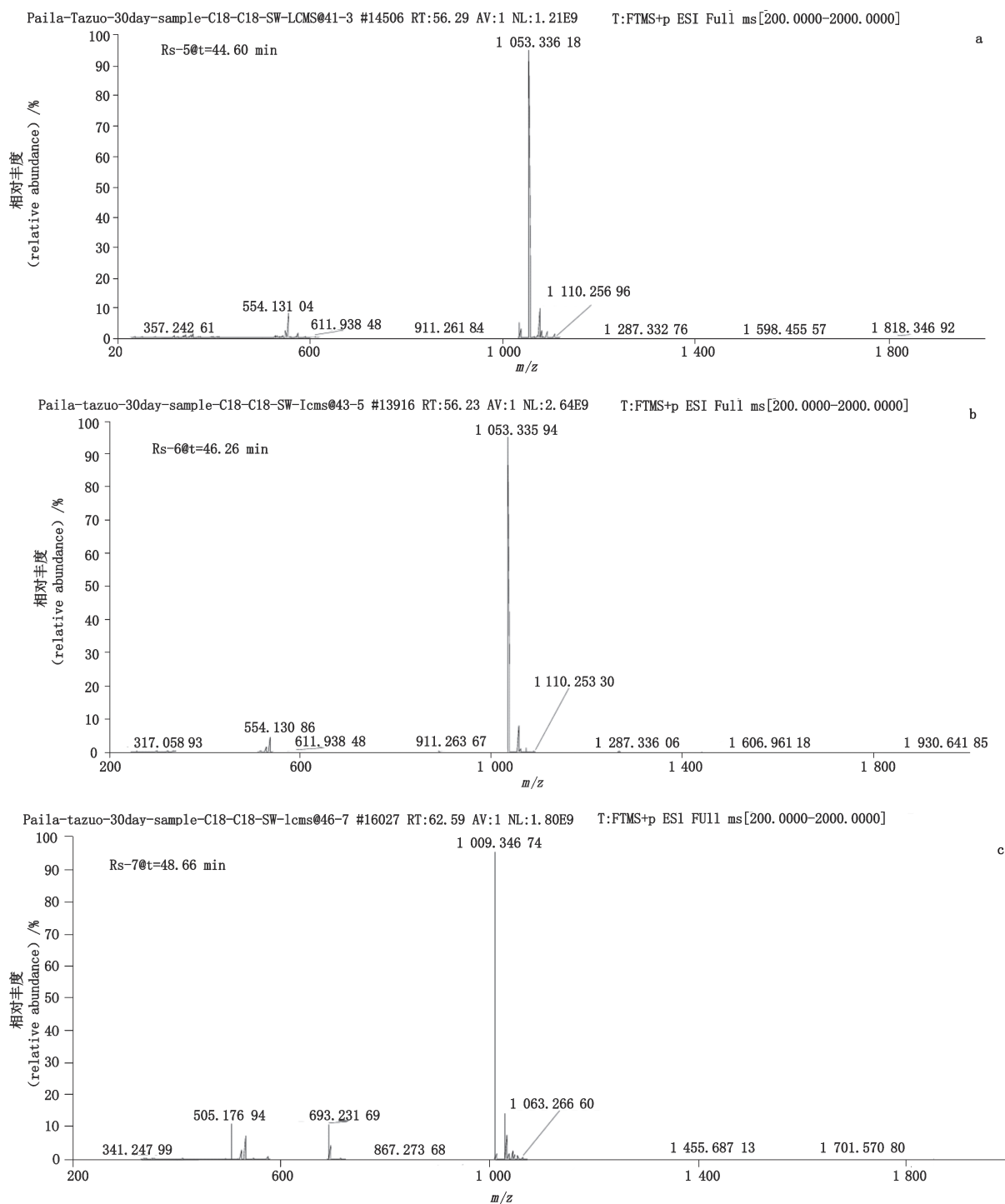


图 13 RP-HPLC 法分析降解浓溶液 (2) 中杂质 Rs-5 (a)、Rs-6 (b) 及 Rs-7 (c) 的典型 +EMS 质谱图

Fig. 13 Typical +EMS mass spectra of impurities Rs-5 (a), Rs-6 (b) and Rs-7 (c) in stress degradation solution (2) by RP-HPLC

与 HPSEC-4 相关联的杂质 Rs-8 ($t_R=63.98$ min) 的质谱图如图 14 所示, 该杂质的加合离子峰均为 m/z 1 570.49 [$M+H$] $^+$, 表明该杂质的相对分子质量为

1 569, 与 Un-Imp-7 的相对分子质量一致, 因此证明该杂质为哌拉西林开环三聚体。

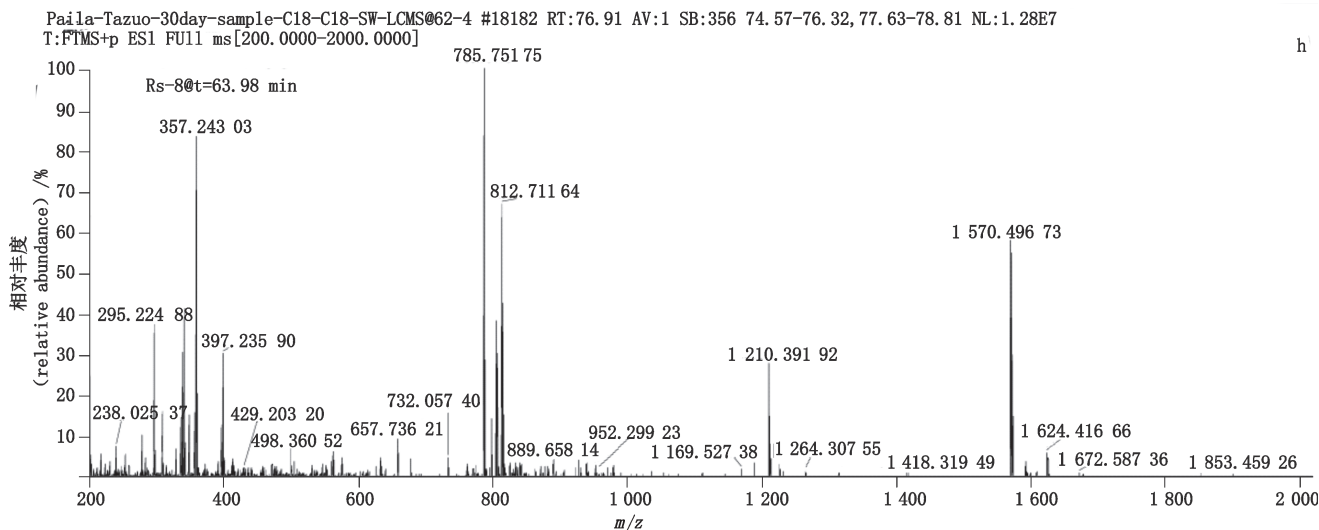


图 14 RP-HPLC 法分析降解浓溶液 (2) 中杂质 Rs-8 的典型 +EMS 质谱图

Fig. 14 Typical +EMS mass spectrum of impurity Rs-8 in stress degradation solution (2) by RP-HPLC

4.4.4 RP-HPLC 色谱图中聚合物杂质的归属

本文通过上述的质谱分析, 将 HPSEC 法分离的聚合物杂质精确定位至 RP-HPLC 的色谱图中。在 5 种聚合物杂质中, 哌拉西林二聚体的含量最高, 而且

其他的聚合物杂质均由哌拉西林闭环二聚体生成, 因此可将哌拉西林闭环二聚体作为聚合物控制的指针性杂质, 聚合物杂质的具体归属结果参见图 15, 哌拉西林的推测聚合及降解反应途径参见图 16。

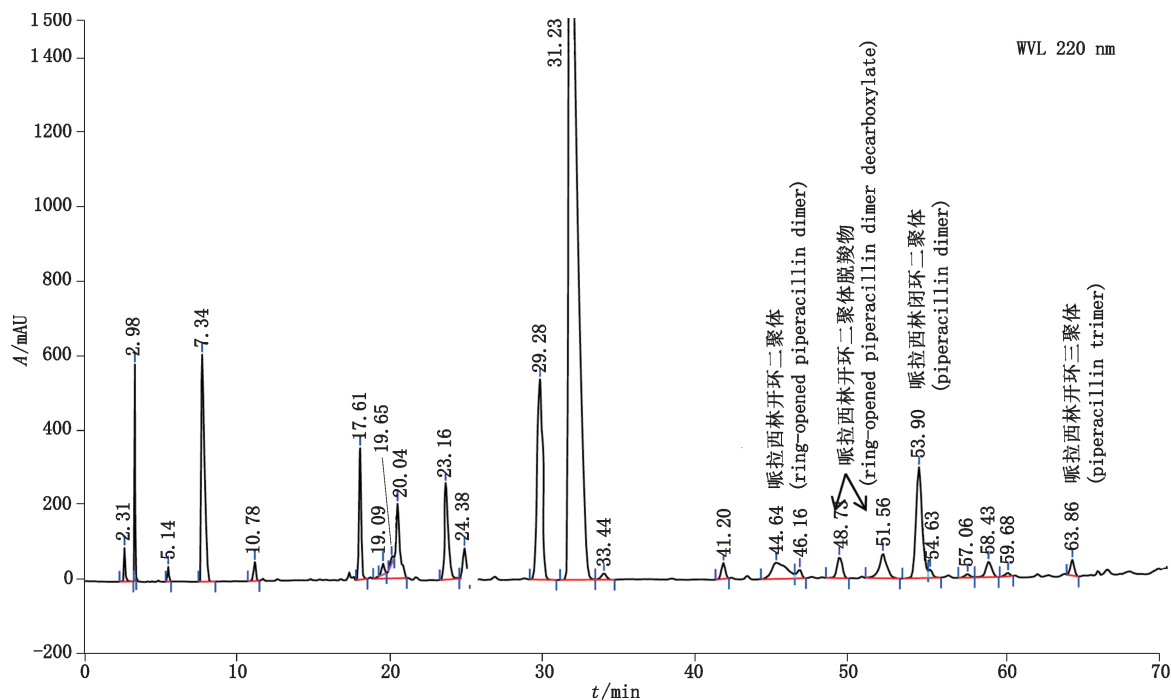


图 15 降解溶液 (2) 聚合物杂质的典型色谱图

Fig. 15 Typical chromatogram of polymer impurities in degradation stock solution (2) by RP-HPLC

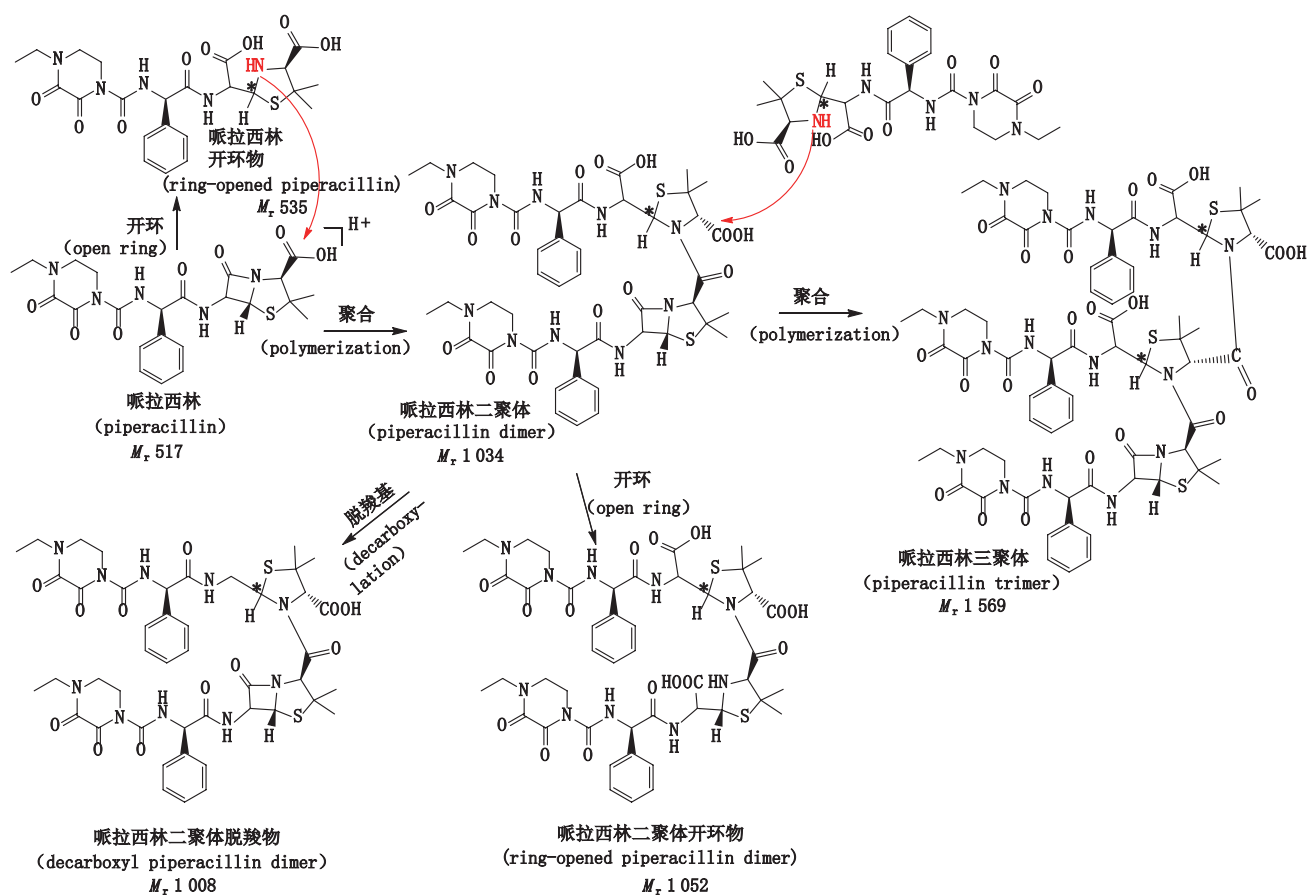


图 16 哌拉西林的推测聚合及降解反应途径

Fig. 16 Schemes of predictive polymerization and degradation pathway of piperacillin

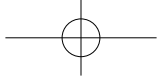
5 结论

本文综合运用 HPSEC 法、2D-HPLC、柱切换- LC/MS^n 法等现代色谱分析技术,证明了基于 TSK2000 SWxl 型高效凝胶柱系统的 HPSEC 法分析哌拉西林钠他唑巴坦钠原料及制剂的聚合物杂质的方法专属性差,新建立的 RP-HPLC 法分析哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物杂质灵敏度高,耐用性好,专属性强,适用于注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠的聚合物杂质;研究发现,哌拉西林钠他唑巴坦钠原料中的聚合物杂质主要包括哌拉西林二聚体、二聚体降解物和三聚体,其中二聚体的含量最高,是主要的聚合物杂质,可以用该杂质作为指针性聚合物杂质,控制产品中的聚合物限度;未发现他唑巴坦自身聚合杂质以及哌拉西林与他唑巴坦之间聚合产生的聚合物杂质。哌拉西林钠他唑巴坦钠强制降解溶液可作为

哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物分析的系统适用性溶液。

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
JIN SH. Research progress on cephalosporin allergic reaction[J]. World Notes Antibiot, 1984(3): 191
- [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
JIN SH. Allergic reaction of antibiotics— I Allergic reaction of β -lactam antibiotics[J]. Chin J Clin Pharmacol, 1986, 2(4): 251
- [3] 金少鸿, 胡昌勤. β -内酰胺类抗生素过敏反应的研究[J]. 医学研究通讯, 2002, 31(4): 22
JIN SH, HU CQ. Study on allergic reactions to β -lactam antibiotics[J]. Bull Med Res, 2002, 31(4): 22



- [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
JIN SH. A review on relationship between quality of β -lactam antibiotics and allergic reactions[J]. Chin J Antibiot, 1988, 13(1): 65
- [5] 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
HU CQ. Developments on analysis of polymers of β -lactam antibiotics[J]. Chin J New Drugs, 2008, 17(24): 2098
- [6] 张菁, 朱建平, 苑华. 凝胶色谱法测定注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠中高分子聚合物[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(5): 452
ZHANG J, ZHU JP, YUAN H. Sephadex chromatographic system for determination of polymer in piperacillin sodium/tazobactam sodium for injection[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2010, 27(5): 452
- [7] 许前辉. 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠聚合物研究[J]. 医药前沿, 2016, 6(8): 22
XU QH. Research of piperacillin sodium for injection tazobactam sodium polymer[J]. Med Front, 2016, 6(8): 22
- [8] USP 41-NF 36[S]. 2018: 5728
- [9] 王勇跃, 陈悦, 洪丽娅. β -内酰胺类抗生素中高分子杂质的分离与检测方法进展[J]. 中国药事, 2015, 29(6): 608
WANG YY, CHEN Y, HONG LY. Review on progresses of isolation and test methods for high-molecular weight polymer impurities in β -lactam antibiotics[J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(6): 608
- [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
LI J, ZHANG PP, CHONG XM, *et al.* Analysis of polymer impurities in co-amoxicillin and potassium clavulanate preparations[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(8): 1430
- [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
YANG MQ, JIN SH, HU CQ. Analysis of polymer impurities in related substances of benzylpenicillin sodium by HPLC-column-switching[J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29(10): 1615

(本文于 2018 年 12 月 14 日收到)