

表征碳青霉烯类药物稳定性的指针性杂质的确定及其应用*

王楠^{1 2 3}, 胡昌勤^{1**}, 刘茜²

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016 3. 北京积水潭医院, 北京 100035)

摘要 目的: 采用自身降解物质作为定量指标, 表征碳青霉烯类药物的降解程度, 用以考察此类药物的稳定性和指针性杂质共性。方法: 以美罗培南、亚胺培南和比阿培南为例, 进行加速稳定性试验, 寻找具有代表性的指针性杂质, 并考察药物自身降解程度与指针性杂质之间的量值关系, 用以作为稳定性表征指标。结果: HPLC 法分析得到的美罗培南、亚胺培南和比阿培南主成分含量降低 1.0% 时的警戒线分别为: 187, 261, 84。通过 LC-MS 确证指针性杂质结构为开环水解物。结论: 通过对碳青霉烯类药物稳定性考察, 依据指针性杂质表征降解程度。

关键词: 碳青霉烯类药物; 指针性杂质; 稳定性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0090-05

Confirmation of the finger impurity to the stability of carbapenem and its application*

WANG Nan^{1 2 3}, HU Chang-qin^{1**}, LU Qian²

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050 China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China 3. Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035 China)

Abstract Objective Using degradation product as quantitative parameter represents the degree of degradation of carbapenem, which determine the stability and property of finger impurity of this kind of antibiotics. **Methods** This study used meropenem, imipenem and biapenem as example, performed accelerated stability test for searching specially finger impurity and investigation the relation between the degradation of carbapenem and the increase of finger impurity. **Results** Achieving the warning line of meropenem, imipenem and biapenem were 187, 261 and 84 respectively by HPLC. LC-MS confirm the structure of finger impurity was hydrolysate. **Conclusion** Determining the stability of carbapenem and using finger impurity represent the extent of degradation.

Key words carbapenem; finger impurity; stability

对照品量值的准确性、稳定性是量值传递的基础, 也是药品检验结果在不同时间、不同地域具有可比性和一致性的保证。如何及时发现对照品在贮存和使用过程中发生的降解作用, 一直是困扰对照品管理者和使用者的难题。通常利用 HPLC 法, 以活性成分的含量变化评价对照品的稳定性^[1], 但由于 HPLC 法本身的测定误差就可以达到 2%, 因此如果测得对照品的含量略有下降, 通过单次的实验很难分辨其是测量误差所致, 还是对照品已经降解。本文首次提出指针性杂质的概念, 通过考察对照品在放置过程中本身的降解与产生的各降解杂质的变化

关系, 找出对照品降解时, 最先出现或发生变化最明显的杂质, 定义其为指针性杂质, 并将其含量变化与主成分的含量变化相关联, 进而表征主成分的降解程度。采用此方法取得的试验结果受测定方法本身的影响小, 且简单易行, 为对照品储存过程中的稳定性考察提供了一个新的思路和方法。

碳青霉烯类药物是一类非经典 β -内酰胺抗生素, 基本母核为碳青霉烯环即 β -内酰胺环稠和 1-噻唑环^[2-3]。 β -内酰胺环的稳定性较差, 受热易开环降解。本文以碳青霉烯类药物美罗培南、比阿培南和亚胺培南为例, 说明指针性杂质的确定与应用。

* 国家科技重大专项课题—— β -内酰胺类抗生素微量杂质的监控和分析技术平台 (2009ZX09313-027)

** 通讯作者 Tel (010) 67095308 Fax (010) 65115148 E-mail hucq@nicpbp.org.cn

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 包括 Waters 2690 Separations Module, Waters 996 检测器, Millennium³² 工作站。Binder 恒温恒湿箱。LC-MS 系统: Surveyor LC 液相色谱泵, Surveyor 自动进样器, Surveyor MSQ 单四极杆质谱检测器。

美罗培南钠对照品 (批号 130506-200401, 含量 87.2%; 批号 130506-200701, 含量 87.0%), 比阿培南对照品 (批号 130578-200701, 含量 99.1%) 由中国药品生物制品检定所提供。西司他丁对照品 (批号 L-642957-009W012) 由美国国家食品药品监督管理局提供。注射用美罗培南: 批号 186964Q 兰伯西实验室有限公司; 批号 1097303 台湾政德制药有限公司。注射用亚胺培南、西司他丁钠为信东生计股份有限公司产品。

乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 测定方法

2.1 指针性杂质的确定 根据对照品在放置过程中可能发生的降解反应, 找出对照品降解时, 最先出现或发生变化最明显的杂质, 确定指针性杂质。碳青霉烯类药物对温度非常敏感^[1,2], 将样品放置在 60℃ 的恒温恒湿箱中进行加速实验, 采用 HPLC 测定分析主成分和诸杂质的变化, 确定主要降解杂质为指针性杂质。

2.2 常规 HPLC 分析色谱条件

2.2.1 美罗培南分析^[3] 色谱柱: CAPCELL PAK MG C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 三乙胺 (用 10% 磷酸调节至 pH 5.0) - 甲醇 (86:14); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 220 nm。

2.2.2 亚胺培南分析^[4,5] 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 磷酸盐缓冲液 (取己烷磺酸钠 2.0 g, 磷酸二氢钠 0.15 g 加水至 1000 mL, 用 0.5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 6.8) (3:97); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 254 nm。

2.2.3 比阿培南分析^[6] 色谱柱: DKMA Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 三乙胺 (用 10% 磷酸调节至 pH 5.0) - 乙腈 (99:1); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 220 nm。

2.3 LC-MS 分析条件 色谱柱为 DKMA Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 三乙胺 (用 10% 磷酸调节 pH 为 5.0) - 乙腈 (99:1); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 254 nm (亚胺培南), 220 nm (美罗培南、比阿培南)。ESI 正离子检测, 氮气流速 10 mL · min⁻¹, 加热管温度 200℃, 喷雾针电压

3.5 kV, 锥孔电压为 40 V, 扫描范围 m/z 100~900

3 结果与讨论

3.1 美罗培南指针性杂质的分析

美罗培南对照品密封置于 60℃ 恒温恒湿箱中, 色谱中主峰前明显产生杂质峰 1 (图 1), 将此杂质峰定为美罗培南的指针性杂质。

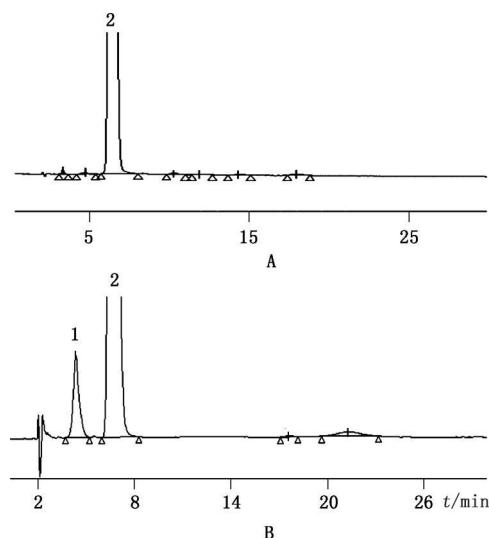


图 1 美罗培南 60℃ 密闭放置不同时间的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of meropenem at different times under 60℃

A. 0 时 (at zero time) B. 放置 15 d (left for fifteen days)

1. 指针性杂质 (finger impurity) 2. 美罗培南 (meropenem)

对美罗培南对照品进行热解、水解和氧化加速试验。可见美罗培南在受热及水解条件下易产生指针性杂质。通过 LC-MS 试验进一步考察指针性杂质裂解途径及结构。指针性杂质的 m/z 为 358 可能的裂解途径为美罗培南开环水解后脱羧基而成, 质谱图及裂解途径见图 2 图 3。

采用 HPLC 法测定指针性杂质归一化含量与活性成分归一化含量的变化, 以两者的比值表征主成分的降解程度; 计算活性成分含量降低至对照品标示值的 99% 时, 指针性杂质与活性成分的比值, 以此作为对照品降解的警戒限。

以指针性杂质含量 (X) 为横坐标, 美罗培南的含量 (Y) 为纵坐标, 分析美罗培南和指针性杂质含量变化的相关性, 可见两者间呈良好的线性关系, 其回归方程为:

$$Y = -0.0206X + 1.001 \quad r^2 = 0.9925$$

根据其线性方程, 求出当主成分含量降低 1.0% 时, 指针性杂质的含量增加 0.53%; 其比值为 $99.0\% / 0.53\% = 187$, 置信区间为 $\bar{x} \pm t_{0.05, 5} S / \sqrt{n} = 268 \sim 143 (n = 6)$, 即为美罗培南主成分含量降低 1.0% 时的警戒限。

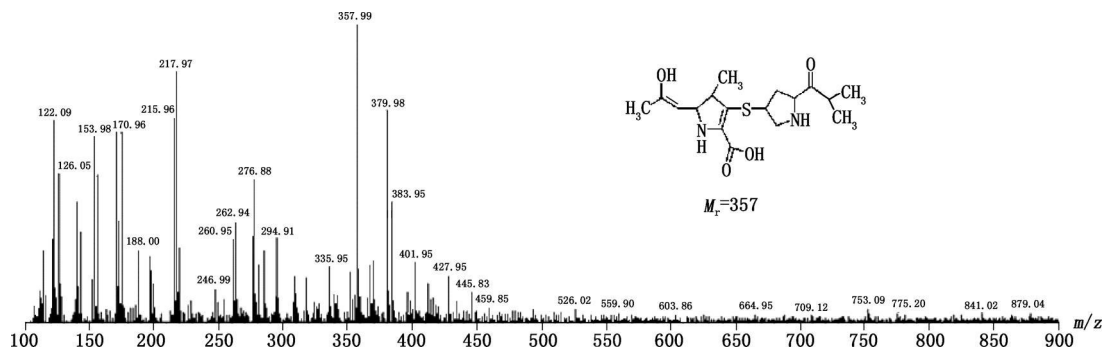


图 2 美罗培南指针性杂质的质谱图及结构

Fig 2 Mass spectrum and structure of finger impurity in meropenem

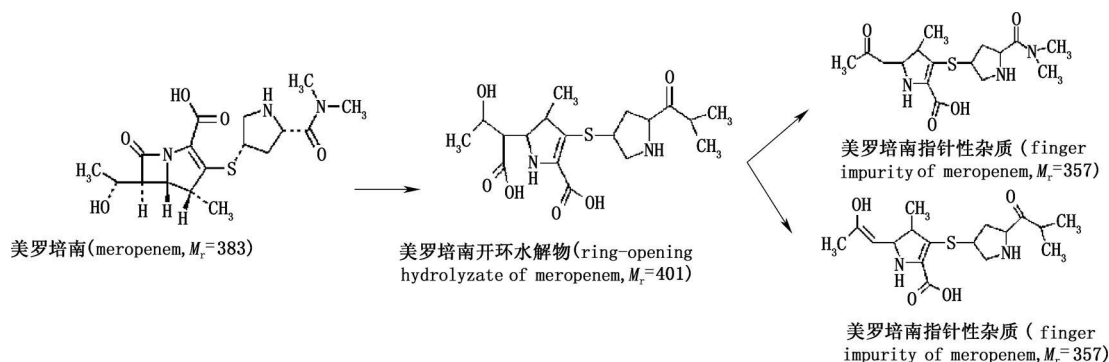
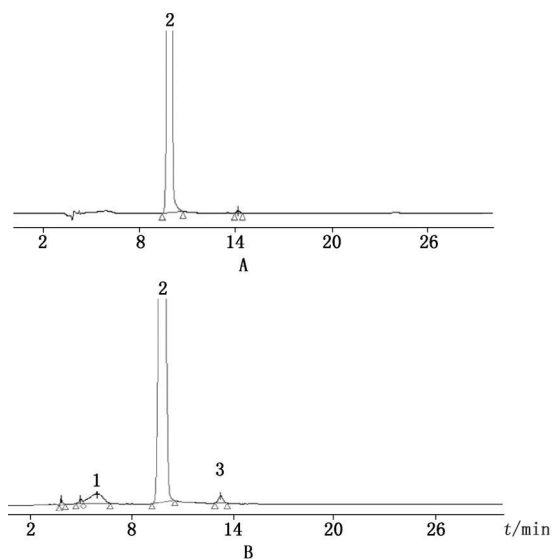


图 3 美罗培南指针性杂质的裂解途径

Fig 3 Decomposition route of finger impurity in meropenem

3.2 比阿培南的指针性杂质分析

比阿培南对照品密封置于 60°C 恒温恒湿箱中, 主峰前后均明显出现新增加的杂质 (图 4)。分别以两杂质的含量 (X) 为横坐标, 比阿培南的含量 (Y) 为纵坐标 (图 5), 进一步分析比阿培南和两杂质含

图 4 比阿培南 60°C 密闭放置不同时间的色谱图Fig 4 HPLC chromatograms of biperiden at different times under 60°C

A. 0 时 (at zero time) B 放置 15 d (for fifteen days)

1 杂质 1 (impurity 1) 2 比阿培南 (biperiden) 3 杂质 2 (impurity 2)

量变化的相关性, 可见两者间均呈良好的线性关系, 但由于杂质 2 的增加量较缓慢, 故确定杂质 1 为指针性杂质。比阿培南与杂质 1 的回归方程为:

$$Y = -0.1878X + 1.2113 \quad r^2 = 0.9967$$

根据其线性方程, 求出当主成分含量降低 1.0% 时, 指针性杂质的含量增加 1.18%; 其比值为 $99.0\% / 1.18\% = 84$ 置信区间为 $\bar{x} \pm t_{0.05, 5} S / \sqrt{n} = 83 \sim 85 (n = 6)$, 即为比阿培南这成分含量降低 1.0% 时的警戒限。

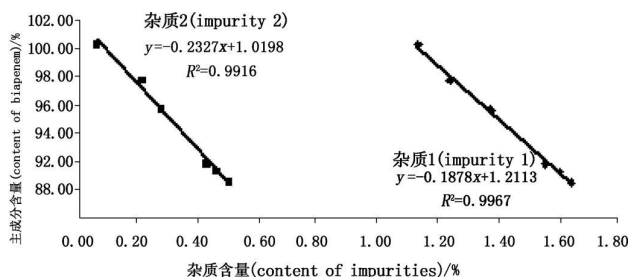


图 5 比阿培南杂质和主成分的线性

Fig 5 Linearity of content of biperiden and impurities

进一步分析指针性杂质的结构。LC-MS 结果 (图 6) 表明, 该指针性杂质 m/z 为 369, 为比阿培南的开环水解物^[6]。

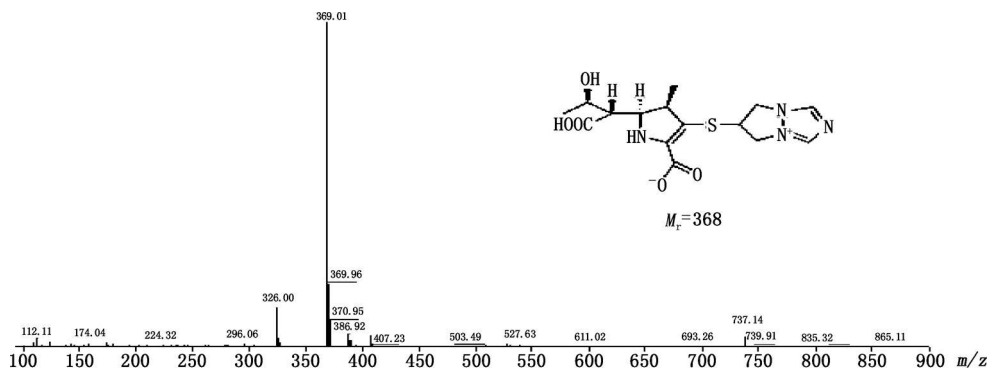


图 6 比阿培南指针性杂质的质谱图及结构

Fig 6 The mass spectrum and structure of finger impurity in biphenyl

3.3 亚胺培南的指针性杂质分析

亚胺培南西司他丁样品密封置于 60 ℃ 恒温恒湿箱中进行加速试验, 分析亚胺培南降解的指针性杂质。由图 7-B 可见, 亚胺培南主峰前出现明显的杂质峰 1; 对亚胺培南西司他丁样品进行热解、水

解和氧化加速破坏试验, 可见在水解条件下易产生杂质 1, 故将杂质 1 确定为亚胺培南的指针性杂质。但杂质 1 由于微量增加, 质谱试验结果尚不明确, 需要进一步实验解析。

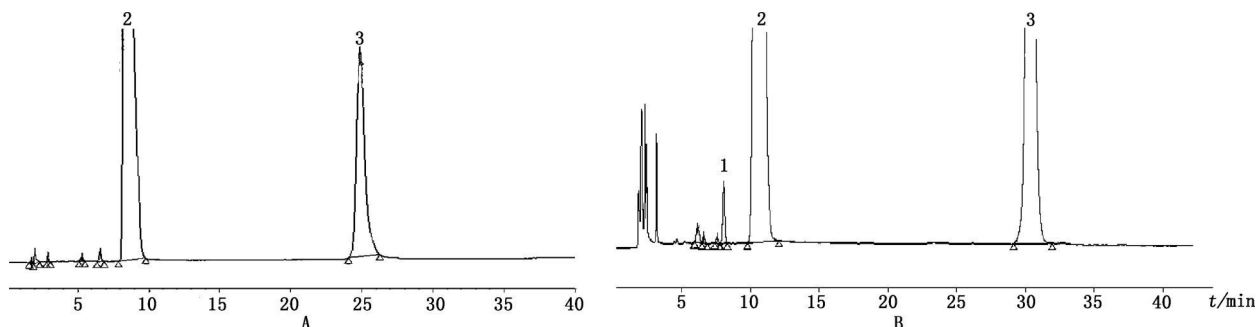


图 7 亚胺培南、西司他丁 60 ℃ 密闭放置不同时间的色谱图

Fig 7 HPLC chromatograms of imipenem and ciprofloxacin at different times under 60 °C

A. 0 时 (at zero time) B 放置 10 d (hold for ten days)

1 指针性杂质 (finger impurity) 2 亚胺培南 (imipenem) 3. 西司他丁 (ciprofloxacin)

以指针性杂质含量 (X) 为横坐标, 亚胺培南的含量 (Y) 为纵坐标, 进一步分析亚胺培南和指针性杂质含量变化的相关性, 可见两者呈良好的线性关系, 其回归方程为:

$$Y = -1.0497X + 1.3899 \quad r^2 = 0.994$$

根据其线性关系, 求出当主成分含量降低 1.0% 时, 指针性杂质的含量增加 0.38%。比值为 $99.0\% / 0.38\% = 261$, 置信区间为 $\bar{x} \pm t_{0.05, 5} S / \sqrt{n} = 309 \sim 225 (n = 5)$, 即为亚胺培南主成分含量降低 1.0% 时的警戒限。

3.4 指针性杂质的应用

取不同批次的美罗培南样品, 在不同的放置条件下, 模拟储藏过程中对照品的变化 (表 1), 将 0 时对照品的含量看作 100.00%, 比较对照品及杂质含

量的变化。可见, 不同批次的美罗培南样品稳定性差异较大, 在 60 ℃ 条件下放置 1~2 d 注射用美罗培南样品均超出警戒线, 出现较明显降解现象; 而美罗培南对照品较稳定。

4 结论

采用已建立的色谱方法, 通过加速稳定性试验考察碳青霉烯类药物的稳定性。通过指针性杂质与主成分的量值关系来表征药物的降解程度较单纯利用主成分含量或杂质含量的变化表征对照品的降解程度更方便、明了。美罗培南和比阿培南对照品储藏中的主要降解产物均为内酰胺环开环物, 存在明显规律; 运用此规律可为选择碳青霉烯类药物的指针性杂质提供依据。

表 1 主成分与指针性杂质含量变化
Tab 1 The content of samples of meropenem and finger in purity

样品 (samples)	放置时间 (time)	美罗培南含量 (content of meropenem) %	指针性杂质含量 (content of finger in purity) %	主成分与指针性杂质含量 变化比值 (the ratio of principal component and finger in purity)
注射用美罗培南, 企业 1 (meropenem for injection company 1)	40℃放置 1 d (40℃ laid for 1 d)	99.74	0.17	572
	40℃放置 2 d (40℃ laid for 2 d)	99.66	0.21	470
	60℃放置 1 d (60℃ laid for 1 d)	99.09	0.49	203
	60℃放置 2 d (60℃ laid for 2 d)	98.52	0.77	128*
	40℃放置 1 d (40℃ laid for 1 d)	99.69	0.20	504
	40℃放置 2 d (40℃ laid for 2 d)	97.98	1.03	95*
注射用美罗培南, 企业 2 (meropenem for injection company 2)	60℃放置 1 d (60℃ laid for 1 d)	97.28	1.37	71
	60℃放置 2 d (60℃ laid for 2 d)	96.45	1.77	54
美罗培南对照品, 批号 130506-200401 (meropenem reference substance, Lot No.: 130506-200401)	40℃放置 1 d (40℃ laid for 1 d)	99.92	0.09	1161
	40℃放置 2 d (40℃ laid for 2 d)	99.89	0.10	993
	60℃放置 1 d (60℃ laid for 1 d)	99.79	0.15	670
	60℃放置 2 d (60℃ laid for 2 d)	99.59	0.25	400

* 超过美罗培南含量为 99% 时的警戒限为 187, 置信区间为 268~143 (the limit line of meropenem is 187 which the content beyond 99%; the confidence interval between 268~143)

参考文献

1 Nageswara Rao R, Nagaraju V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs *J Pharm Biomed Anal* 2003, 33(3): 335
2 LILai- cai(李来才), MAO Shuang(毛双). A theoretical study on the activity- structure relationship of β -monocyclic lactams (β -单环内酰胺结构与活性关系的理论研究). *J Sichuan Norm Univ* (四川师范大学学报), 1998, 21(6): 648
3 ChP(中国药典). 2005 VolII (二部): 446
4 WU Xiao- hong(吴小红), WANG Ming- juan(王明娟), HU Chang- qin(胡昌勤). Content determination and content uniform of

meropenem and cilastatin sodium for injection by HPLC (高效液相色谱法测定注射用亚胺培南-西司他丁钠含量及含量均匀度). *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2005, 30(10): 591
5 KAN Jia- yǐ(阚家义), XU Wei(许威). Improvement of determination method of content of meropenem and cilastatin sodium for injection and its related substances (注射用亚胺培南-西司他丁钠含量和有关物质测定方法的改进). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(3): 390
6 XIA M, HANG T, JIANG F, et al. The stability of meropenem and structural identification of impurities in aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal* 2009, 49(4): 937

(本文于 2010 年 3 月 4 日收到)