

国产注射用阿莫西林钠中主要杂质分析

殷果^{1,2}, 王铁杰², 秦斌², 邓颖², 李军², 郭兴杰^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 深圳市药品检验所, 深圳 518029)

摘要 目的:对国产注射用阿莫西林钠中的主要杂质进行分析。方法:采用高效液相色谱法,以 Waters Nova-pak C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm)为色谱柱,检测波长为 254 nm,梯度洗脱检查 105 批样品的有关物质。结果:在国产注射用阿莫西林钠中共检出 19 个杂质,其中主要杂质为阿莫西林青霉酸、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林二聚体和阿莫西林三聚体,单个杂质含量均小于 3%,总杂质含量均小于 6%。结论:本研究结果对进一步指导该品种生产有重大意义。

关键词:注射剂;阿莫西林钠;杂质;阿莫西林青霉酸;二酮哌嗪阿莫西林;阿莫西林二聚体;阿莫西林三聚体

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)10-1887-04

Study on impurities of China produced amoxicillin sodium for injection

YIN Guo^{1,2}, WANG Tie-jie², QIN Bin², DENG Ying², LI Jun², GUO Xing-jie^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518029, China)

Abstract Objective: To analyze the main impurities of amoxicillin sodium for injection made in China. **Methods:** The related substances of amoxicillin sodium for injection were determined by high performance liquid chromatography with gradient elution. Waters Nova-pak C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm 5 μm) was used, and the detecting wavelength was set at 254 nm. **Results:** 19 impurities were observed in most of the 105 batches of amoxicillin sodium for injection. The major impurities were penicilloic acids of amoxicillin sodium salt, amoxicillin diketopiperazines, amoxicillin dimer and amoxicillin trimer. The contents of single impurity were all less than 3% and the total contents of impurities were all less than 6%. **Conclusion:** The result had a great significance in optimizing the production process.

Key words: injection; amoxicillin sodium; impurities; penicilloic acids of amoxicillin sodium salt; amoxicillin diketopiperazines; amoxicillin dimer; amoxicillin trimer

注射用阿莫西林钠(amoxicillin sodium for injection)是采用无菌阿莫西林钠原料直接无菌分装制得的注射用无菌粉针剂,目前在国内市场已全部国产化,是治疗细菌性感染的常用药物,因此分析研究注射用阿莫西林钠中的杂质对于加强其质量控制有着重要的技术指导意义。本实验参照中国药典 2010 年版收载的方法,并优化色谱条件,对在全国范围生产企业和市场上抽取的 11 个厂家生产的 105 批注射用阿莫西林钠的有关物质进行考察,利用中国食品药品检定研究院新研制的阿莫西林系统适用性对照品和国外杂质对照品对含量较高的杂质峰进行定位,归纳总结得到杂质谱的同时找出国产

注射用阿莫西林钠的主要杂质的种类和含量。

1 仪器与试剂

色谱仪:德国戴安公司 Summit P680A 液相色谱仪,包括 P680 泵,ASI-100 自动进样器,PDA-100 二极管阵列检测器,Chromelon 色谱工作站。

阿莫西林杂质对照品:6-氨基青霉烷酸(购自 Sigma,批号:14518DR);阿莫西林系统适用性对照品(来源:中国食品药品检定研究院,试用装);二酮哌嗪阿莫西林(批号:0232.03)、阿莫西林青霉酸(批号:0232.04)、阿莫西林青霉噻唑酸(批号:0232.05)、3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇(批号:0232.06)、(2R)-2-[(2,2-二甲基异丙醇)氮

* 通讯作者 Tel: (024) 23986285; E-mail: gxjhzy@yahoo.com.cn

基]-2-(4-羟基苯基)乙酸(批号: 0232.08)、(2R)-2-氨基-2-(4-羟基苯基)乙酸(批号: 0232.09)均购自 LGC GmbH; 注射用阿莫西林钠样品 105 批; 乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钾为分析纯。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 取 105 批样品适量, 精密称定, 临用前用流动相 A 溶解并定量稀释成每 1 mL 中含 2 mg 的溶液, 即得。

2.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品混合溶液 取各阿莫西林杂质对照品各约 5 mg, 置 5 mL 量瓶中, 用流动相 A 定容, 摇匀, 即得。

2.4 酸破坏供试品溶液 取样品 40 mg, 加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL, 放置 20 min 后, 加水制成 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.5 碱破坏供试品溶液 取样品 40 mg, 加 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.5 mL, 放置 20 min 后, 加水制成 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.6 氧化破坏供试品溶液 取样品 40 mg, 加 0.05% 过氧化氢溶液 0.5 mL, 放置 30 min 后, 加水制成 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.7 光照破坏供试品溶液 取样品, 置 254 nm 光照 24 h 后, 加水制成 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.8 高温破坏供试品溶液 取样品 80 °C 下加热 1 h, 加水制成 2 mg · mL⁻¹ 的溶液, 即得。

3 色谱条件^[1-5]

色谱柱 1: Chromarex ODS(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 色谱柱 2: Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 色谱柱 3: Waters Nova-pak C₁₈(300 mm × 3.9 mm 4 μm); 色谱柱 4: Shim-pack VP-ODS(150 mm × 4.6 mm 5 μm); 色谱柱 5: Synergi 4u Fusion-RP80A(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相 A: 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(取 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液, 用 2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.0) - 乙腈(99:1); 流动相 B: 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 5.0) - 乙腈(80:20), 洗脱阿莫西林峰的保留时间为 6 min, 按表 1 梯度程序洗脱。

柱温: 30 °C; 检测波长: 254 nm; 检测器: DAD; 流速: 1.0 mL · min⁻¹。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间(time)/min	流动相 A(mobile A) - 流动相 B(mobile B)
0	92:8
6	92:8
28	16:84
38	0:100
48	0:100
49	92:8
57	92:8

使用色谱柱 1, 取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 图谱见图 1。试验结果显示阿莫西林钠对酸、碱、氧化、光、热均不稳定, 主要生成的杂质有: 二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林二聚体和阿莫西林三聚体。各降解产物峰对阿莫西林峰均无干扰, 分离效果良好。

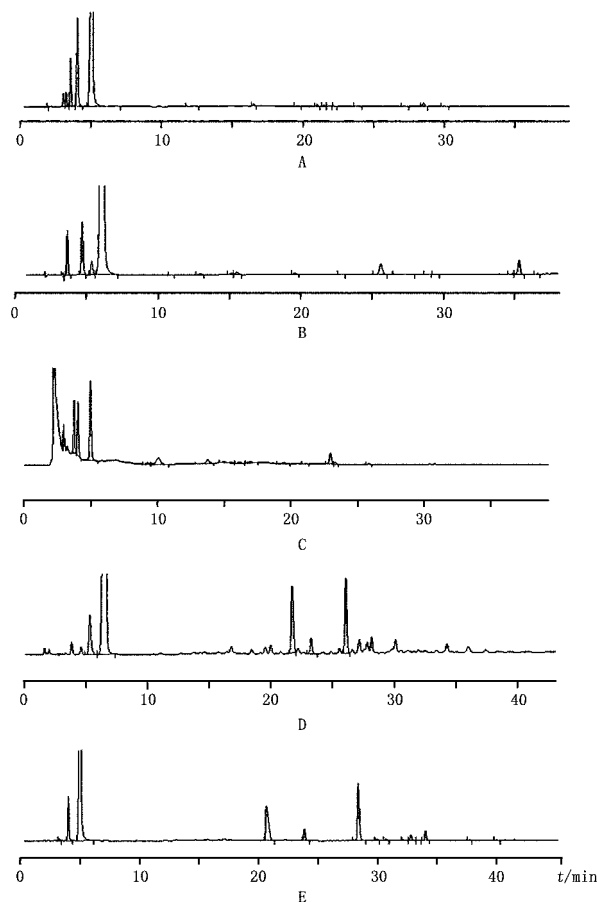


图 1 方法专属性考察图谱

Fig 1 The exclusion inspection of detective method

A. 酸破坏溶液(destroyed by hydrochloric acid) B. 碱破坏溶液(destroyed by sodium hydroxide) C. 氧化破坏溶液(destroyed by hydrogen peroxide solution) D. 高温破坏溶液(destroyed by heating) E. 光破坏溶液(destroyed by light)

4 方法与结果

4.1 线性关系及检出限、定量限的考察 称取购得的7个杂质对照品适量,配制成100,50,10,5,0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,依次注入液相色谱仪,以进样浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,相应的杂质峰面积(Y)为纵坐标,进行线性分析。6-氨基青霉烷酸、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林青霉氧酸、阿莫西林青霉噻唑酸峰1、阿莫西林青霉噻唑酸峰2、3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇、(2*R*)-2-[(2,2-二甲基异丙醇)氨基]-2-(4-羟基苯基)乙酸、(2*R*)-2-氨基-2-(4-羟基苯基)乙酸回归方程分别为:

$$Y = 14.0X + 2.31 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 6.1X + 5.10 \quad r = 1.000$$

$$Y = 8.2X + 5.17 \quad r = 1.000$$

$$Y = 10.1X + 2.74 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 8.6X + 3.03 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 11.0X + 1.08 \quad r = 1.000$$

$$Y = 4.8X + 5.51 \quad r = 1.000$$

$$Y = 5.9X + 4.79 \quad r = 0.9998$$

线性范围均为100~0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,检出限($S/N = 3$)分别为0.06,0.08,0.03,0.14,0.10,0.01,0.05,0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;定量限($S/N = 10$)分别为0.20,0.28,0.10,0.45,0.34,0.03,0.16,0.17 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.2 精密度 取各杂质对照品,加流动相A制成50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,注入液相色谱仪,重复6次,结果6-氨基青霉烷酸、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林青霉氧酸、阿莫西林青霉噻唑酸、3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇、(2*R*)-2-[(2,2-二甲基异丙醇)氨基]-2-(4-羟基苯基)乙酸、(2*R*)-2-氨基-2-(4-羟基苯基)乙酸峰面积的RSD分别为0.23%,0.31%,0.32%,0.24%,0.15%,0.39%。取供试品溶液注入液相色谱仪,重复6次,结果阿莫西林二聚体(相对于主峰的保留时间为4.1)和阿莫西林三聚体(相对于主峰的保留时间为4.6)峰面积的RSD分别为0.18%,0.10%。可见方法精密度良好。

4.3 测定结果 取105批样品适量,精密称定,临用前用流动相A溶解并定量稀释成每1 mL中含2 mg的溶液,立即进样,共检出19个杂质,归纳其杂质谱并统计分析各杂质的含量变化。6-氨基青霉烷酸、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林青霉氧酸、阿莫西林青霉噻唑酸、3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇、(2*R*)-2-[(2,2-二甲基异丙醇)氨基]-2-(4-羟基苯基)乙酸、(2*R*)-2-氨基-2-(4-羟基苯基)乙酸这7个杂质的量用杂质对照品按外标法以峰面积计算,其他杂质均采用主成分自身对照法计算,结果见图2,其中,柱状图表示105批各杂质的平均含量;偏差线表示105批次中该杂质的2倍标准偏差(2SD)。

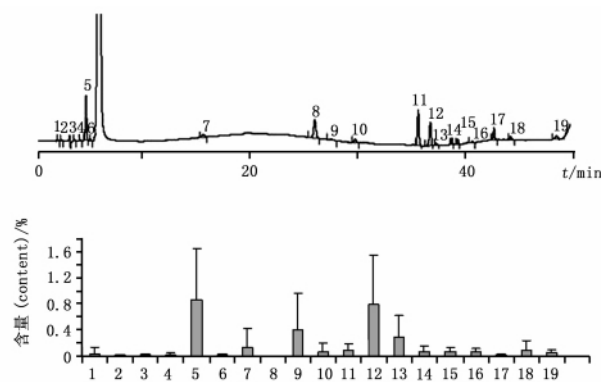


图2 供试品溶液的典型HPLC色谱图及杂质含量

Fig 2 Typical HPLC chromatograms of sample solution and the contents of impurities

1. (2*R*)-2-氨基-2-(4-羟基苯基)乙酸 [(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid] 5. 阿莫西林青霉氧酸 (penicilloic acids of amoxicillin sodium salt) 6. 6-氨基青霉烷酸 (6-aminopenicillanic) 9. 二酮哌嗪阿莫西林 (amoxicillin diketopiperazines) 10. (2*R*)-2-[(2,2-二甲基异丙醇)氨基]-2-(4-羟基苯基)乙酸 [(2*R*)-2-[(2,2-dimethylpropanoyl)amino]-2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid] 11. 3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇 [3-(4-hydroxyphenyl)pyrazin-2-ol] 12. 阿莫西林二聚体 (amoxicillin dimer) 13. 阿莫西林三聚体 (amoxicillin trimer)

4.4 结论 105批样品中含量较大的主要杂质为阿莫西林青霉氧酸、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林二聚体和阿莫西林三聚体,单个杂质含量均小于3%,总杂质含量均小于6%。

表 2 有关物质测定结果
Tab 2 The determination results of related substances

峰编号 (peak No.)	杂质 (impurity)	最小值 (minimum) / %	最大值 (maximum) / %	平均值 (average) / %	RSD (n = 105) / %
6	阿莫西林青霉氧酸(penicilloic acids of amoxicillin sodium salt)	0.05	1.87	0.86	0.46
9	二酮哌嗪阿莫西林(amoxicillin diketopiperazines)	0.07	1.32	0.40	0.69
12	阿莫西林二聚体(amoxicillin dimer)	0.37	1.88	0.79	0.49
13	阿莫西林三聚体(amoxicillin trimer)	0.19	0.81	0.28	0.60
	总杂质(total impurities)	0.99	5.45	2.82	0.39

5 讨论

5.1 中国药典 2010 年版收载的有关物质检查法其色谱条件与英国药典 2011 年版的相同,本实验参照该色谱条件对样品和杂质对照品进行分离、分析,发现 3-(4-羟基苯基)吡嗪-2-醇与阿莫西林二聚体这 2 个杂质峰部分重叠,经对色谱条件进行优化,这 2 个杂质峰能得到基线分离,且其他各杂质间分离良好,能准确定量。

5.2 考虑到杂质对照品昂贵且难以获得,使用 5 根长度、品牌不同的色谱柱按“3”项下色谱条件实验,总结得到阿莫西林青霉氧酸、阿莫西林、二酮哌嗪阿莫西林、阿莫西林二聚体、阿莫西林三聚体的相对保留时间分别为 0.7, 1.0, 3.5, 4.1, 4.6,可作为杂质峰定位的依据。

5.3 阿莫西林钠对热不稳定,而中国药典未强调注射用阿莫西林钠需控温保存,因此不同地域的生产经营单位所采用的运输、储存条件可能会引起注射用阿莫西林钠中杂质的种类和含量发生变化。本实验旨在客观、全面地分析研究国产注射用阿莫西林钠中的杂质,因此以从生产企业及省、市、县、乡级经营单位和医疗单位抽取的 105 批注射用阿莫西林钠为考察对象,抽样点涉及全国 23 个省(区、直辖

市),储存时间为 0 ~ 18 个月。实验结果表明不同生产厂家、不同地点抽取的样品杂质种类和含量均存在一定的差异,这可能是不同生产厂家原料生产工艺、包装、运输、储存条件有差异等原因引起的,本研究结果对进一步指导注射用阿莫西林钠的生产有重大意义。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol II (二部): 405
- 2 BP. 2011. 1387
- 3 WANG Yan(王琰), WANG Ming-juan(王明娟), HU Chang-qin(胡昌勤). Comparison and optimization of RP-HPLC methods for analysis of fosfluconazole and its related(磷氟康唑有关物质分析方法的筛选与优化). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(5): 883
- 4 HONG Jian-wen(洪建文), LI Qu-chang(李趣嫦), WANG Yan-die(王彦蝶). Quality control of amoxicillin granules by HPLC (HPLC 法测定阿莫西林颗粒剂的含量及有关物质). *Acad J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报) 2009, 25(1): 42
- 5 DU Xu(杜旭), CAO Xiao-yun(曹晓云). Determination of enoxacin and its related substances by HPLC (HPLC 法测定依诺沙星及其制剂的有关物质). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志) 2011, 36(4): 282

(本文于 2011 年 7 月 28 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告