

HPLC – 柱切换法归属青霉素钠有关物质中的聚合物分析

杨美琴, 金少鸿, 胡昌勤

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 在缺少杂质 β -内酰胺抗生素聚合物对照品的条件下, 定位青霉素钠在 RP-HPLC 系统中的聚合物色谱峰, 进而实现 β -内酰胺抗生素凝胶色谱系统 (GFC) 聚合物分析与 RP-HPLC 系统有关物质分析方法的统一。方法: 采用 6.0 版欧洲药典青霉素钠的 HPLC 分析方法, 利用各种专属性加速试验结合紫外特征吸收光谱及柱切换技术, 在 HPLC 色谱图中定位各类青霉素杂质。结果: 杂质 p 可以作为表征青霉素聚合物的指针性杂质, 实现凝胶色谱系统和 RP-HPLC 的统一。结论: 丰富了 β -内酰胺抗生素聚合物分析方法, 为对 β -内酰胺抗生素聚合物杂质的有效控制提供了新思路。

关键词: 青霉素有关物质; 聚合物杂质; RP-HPLC; 凝胶色谱; 柱切换

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1615-06

Analysis of polymer impurities in related substances of benzylpenicillin sodium by HPLC – column-switching

YANG Mei-qin, JIN Shao-hong, HU Chang-qin

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

Abstract Objective To identify the polymer impurities in RP-HPLC chromatogram of benzylpenicillin sodium without any references, thus to realize the β -lactam antibiotics analysis unification between the polymer impurity (gel filtration chromatography, GFC) and the related substances (RP-HPLC). **Methods** The 6.0 edition of European Pharmacopoeia HPLC method of benzylpenicillin sodium has been adopted. This issue also employs kinds of selectivity accelerated experiments, UV spectrum characteristics and the Dionex column-switching system to analyse the impurities in benzylpenicillin sodium RP-HPLC chromatogram. **Results** GFC and RP-HPLC are well unified to find p as the index of the polymer impurity. **Conclusion** The analysis of polymer impurities in β -lactam antibiotics become diverse. And it is helpful to realize more powerful control over polymer impurities in β -lactam antibiotics.

Key words related substances in benzylpenicillin sodium; polymer impurity; RP-HPLC; gel-filtration chromatography (GFC); column-switching

青霉素是临床中最早应用的 β -内酰胺抗生素, 青霉素引发的过敏反应长期以来一直困扰着其在临床中的广泛应用。青霉素由发酵生产, 且青霉素分子本身不稳定, 因此在生产、运输、贮存和使用过程中都可能产生杂质; 多年来的研究已经证明青霉素中的杂质, 特别是高分子杂质是导致青霉素过敏的重要原因^[1,2]。目前各国药典多采用 HPLC 方法控制青霉素中的有关物质; 中国药典还采用凝胶色谱法控制其中的聚合物杂质。

伴随着对 β -内酰胺抗生素的聚合反应机理、各种聚合物结构及聚合物与其他降解杂质的关系等

的不断深入了解, 促使人们不断地完善对 β -内酰胺抗生素聚合物的控制理念。在药品有关物质控制中, 采用 HPLC 梯度洗脱, 逐一控制各类杂质是药品有关物质控制的发展趋势; β -内酰胺抗生素如阿莫西林钠、氨苄西林钠中的各种聚合物, 在其 HPLC 质控方法中均能得到较好的检出^[3,4]。这也使人们思考在进行有关物质控制的同时, 利用指针性杂质控制 β -内酰胺抗生素的聚合物含量。由于通常很难得到 β -内酰胺抗生素聚合物对照品, 如何在特定的 HPLC 质控分析中定位聚合物杂质成为进行上述探索的制约因素。凝胶色谱 (gel filtration chromatog-

raphy GFC)分析主要基于待分离组分的分子大小实现
对混合组分的分离,一般无需聚合物对照品即可定
位聚合物色谱峰。本文以青霉素钠为例,利用柱切
换技术,将凝胶色谱中的聚合物色谱峰切换到其
HPLC质控色谱系统中,对 RP- HPLC 系统中的聚
合物杂质进行归属,实现了聚合物分析与有关物
质分析方法的统一。

1 药品和试剂

青霉素钠原料、苯乙酸由华北制药有限公司提供;
甲醇为色谱纯 (Fisher); 其他各种试剂为国产分
析纯。

2 方法

2.1 HPLC 分析^[5] 采用 D inex HPLC 色谱系统
(P680 泵, ASI- 100 自动进样器, TCC - 100 柱温
箱, PDA - 100 二极管阵列检测器, Chromelon 6. 6
色谱工作站); 色谱柱为 Thermo ODS- 2Hypersil C₁₈
柱 (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm); 梯度洗脱 (表 1), 流
动相 A 为 0. 5 mol· L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 3. 5) -
水 - 甲醇 (10: 60: 30), 流动相 B 为 0. 5 mol· L⁻¹
磷酸盐缓冲液 (pH 3. 5) - 水 - 甲醇 (10: 40: 50); 检
测波长: 225 nm; 流速: 1. 0 mL· m in⁻¹; 供试品制成
约 4 mg· mL⁻¹ 的溶液, 进样 20 μL; 并记录每一个色
谱峰在 190~ 400 nm 波长范围的紫外光谱图。青霉
素主峰出峰后, 参考表 1 进行梯度洗脱。

2.2 凝胶色谱分析^[6] 参照文献。采用 AKTA
Prime 中压色谱分析系统, Prime Evaluation 色谱工
作站; 色谱柱为 Sephadex G 10(300 mm × 10 mm, 40

表 1 青霉素钠 HPLC 系统梯度洗脱程序

Tab 1 The HPLC elution process of
benzylpenicilin sodium

时间 (time) / m in	流动相 A (mobile phase A) %	流动相 B (mobile phase B) %
0~ 20	70→ 0	30→ 100
20~ 35	0	100
35~ 50	70	30

~ 120 μm) (Phamacia); 流动相为不同浓度
(0. 1, 0. 05, 0. 02, 0. 01 mol· L⁻¹) 的磷酸盐缓冲液
(pH 7. 0); 检测波长 254 nm; 流速 1. 5 mL· m in⁻¹;
供试品用水溶解制成 80 mg· mL⁻¹ 的溶液, 进样量
为 100 μL。

2.3 柱切换分析 利用 D ionex 双四元高效液相色
谱仪, MSV 2Position- 10Port 切换阀 (图 1): 左泵接
分析 HPLC 分析系统, 右泵接凝胶色谱系统, 1 号和
4 号之间为 500 μL bop 环相连。2 个不同的色谱系
统首先分别由左右双泵流出的不同流动相平衡; 当
切换阀在位置 A 时, 样品经右泵流入凝胶柱, 聚合
物组分流入凝胶柱进入 bop 环时, 切换到位置 B; 此
时, loop 环中的组分由 HPLC 系统流动相反冲带入
C₁₈ 柱。分析结束时, 系统恢复到初始状态 (Position
A)。检测器在切换到 B 位置后开始采集信号, 因此
色谱图中只保留了聚合物组经 2 根色谱柱分离后的
信号。将青霉素钠从 Sephadex G 10 凝胶色谱系统
K_{av} = 0 处流出的聚合物组分 (500 μL) 切换到反相
色谱系统进行第 2 次分离, 以获得聚合物组分在反
相色谱系统的准确定位。

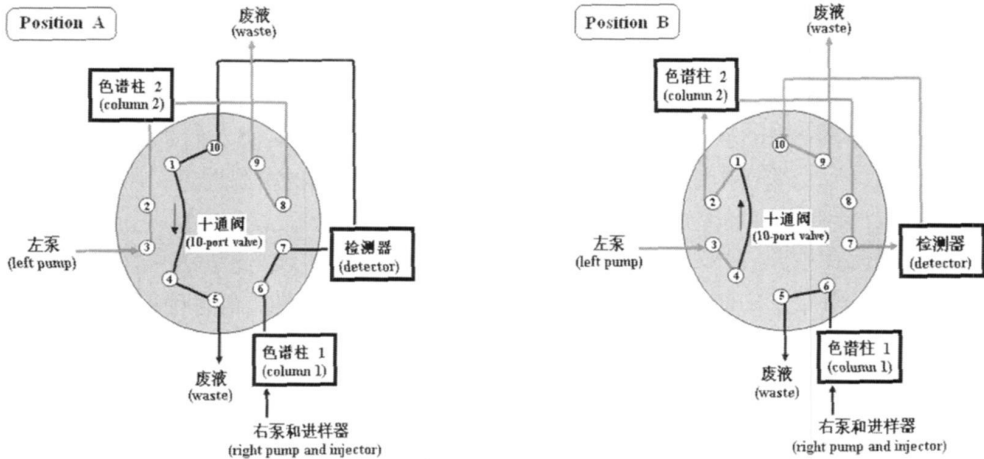


图 1 MSV 2Position- 10Port 切换阀工作原理示意图
Fig 1 The sketches of the MSV 2Position- 10Port valve working principle

2.4 加速试验

2.4.1 酸降解 精密称取供试品适量,加水使溶解,加入 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1 mL , 0.5 h 后用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和至 $\text{pH} 7$,加水稀释成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4.2 碱降解 精密称取供试品适量,加水使溶解,加入 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL , 0.5 h 后用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中和至 $\text{pH} 7$,加水稀释成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4.3 弱酸水解 精密称取供试品适量,用 $\text{pH} 3.7$ 的醋酸盐缓冲液^[6] 溶解,静置 0.5 h 后,加水稀释成约 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4.4 弱碱水解 精密称取供试品适量,用硼砂-碳酸钠缓冲液^[6] ($\text{pH} 10.8 \sim 11.2$) 溶解,静置 0.5 h 后,加水稀释成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4.5 水解 精密称取供试品适量,加水使溶解,置 60°C 水浴 0.5 h 后,加水稀释成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的

溶液。

2.4.6 固体加速试验 将供试品置 60°C , $\text{RH} 60\%$ 的条件下,分别于 $24, 48, 72 \text{ h}$ 取样,用水溶解并稀释成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4.7 添加苯乙酸试验 精密称取苯乙酸适量,用含 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的青霉素钠供试品水溶液溶解并稀释成含苯乙酸 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3 结果与讨论

3.1 对反相色谱中青霉素钠降解杂质的归属

考察青霉素钠在不同温湿度条件及其溶液不同酸碱条件下的降解产物^[7,8],结合降解杂质的紫外光谱图,对反相 HPLC 色谱图中的降解杂质进行归属。诸加速样品的 HPLC 色谱图如图 2 所示。参考杂质的特征紫外光谱,结合英国药典 2007 版、欧洲药典 6.0 版收载的部分青霉素钠有关物质的分子结构^[9],可对加速试验中产生的部分杂质结构做出初步的判断(表 2)。

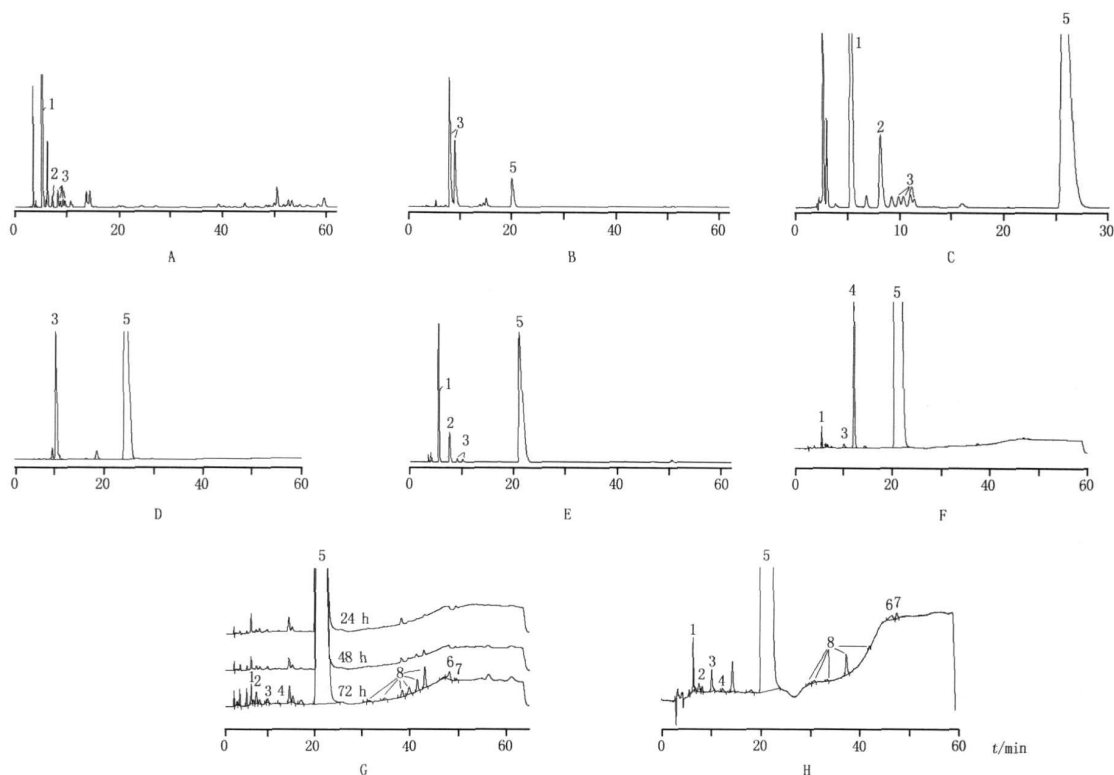


图 2 加速试验结果图

Fig 2 Chromatograms of accelerated test

A. 酸降解 (acid degradation) B. 碱降解 (alkaline degradation) C. 弱酸降解 (subacidity degradation) D. 弱碱降解 (subalkaline degradation)

E. 水浴破坏 (boiling water bath) F. 添加苯乙酸 (phenylacetic acid additive) G. 高温高湿 (heat and humidity degradation) H. 青霉素钠样品 (sample of benzylpenicillin sodium)

1. 青霉酸 (penillic acid) 2. 青霉烯酸 (penicillenic acid) 3. 青霉噻唑酸和青霉脱羧噻唑酸 (penicilloic acids and penilloic acids)

4. 苯乙酸 (phenylacetic acid) 5. 青霉素 (benzylpenicillin) 6. 青霉烯酸二硫化物 (penicillenic acid disulfide) 7. 杂质 p (impurity p)

8. 梯度杂质 (impurities eluted through the gradient)

青霉素钠溶液与酸 ($0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸) 或碱 ($0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液) 作用可被完全分解; 但在弱酸性环境 ($\text{pH } 3.8$) 中重排可以得到青霉酸 (240 nm 处有特征吸收) 和青霉烯酸 (320 nm 处有特征吸收); 在弱碱性 ($\text{pH } 11$) 条件下 β -内酰胺环开环生成青霉噻唑酸, 并可进一步脱羧得到青霉脱羧噻唑酸; 由于添加苯乙酸, 青霉素溶液显酸性, 因此可产生青霉酸; 水浴条件下可产生青霉酸和青

霉烯酸。青霉噻唑酸和青霉脱羧噻唑酸结构相似, 色谱行为也相近, 因此在色谱图中青霉噻唑酸峰附近常呈现峰组而非单一色谱峰。青霉素钠固体在高温、高湿条件下放置 72 h 后, 变成较坚硬的黄色结晶物, 且多种杂质的含量增高。由于聚合物类杂质的分子极性通常较小, 而反相 HPLC 系统中分子极性越小保留时间越长, 因此认为在梯度洗脱时流出的杂质可能为聚合物类杂质 (梯度杂质)。

表 2 青霉素样品中典型杂质光谱图

Tab 2 Spectra of typical impurities in penicillin

编号 (No.)	名称 (name)	分子结构 (molecular structure)	紫外光谱图 (UV spectrum)
1	青霉酸 (penillic acid)	 亚胺结构, 240 nm 特征吸收。 (imine, characteristic absorption at 240 nm.)	 193.6 239.5 200 250 300 350 400 λ/nm
2	青霉烯酸 (penicillenic acid)	 噁唑酮结构, 320 nm 特征吸收。 (oxazolidinone, characteristic absorption at 320 nm.)	 259.7 322.2 200 250 300 350 400 λ/nm
3	青霉噻唑酸 (penicilloic acids)	 青霉脱羧噻唑酸 (penilloic acids)	 258.1 200 250 300 350 400 λ/nm
4	苯乙酸 (phenylacetic acid)		 263.2 200 250 300 350 400 λ/nm
5	青霉素 (benzylpenicillin)		 323.0 200 250 300 350 400 λ/nm
6	青霉烯酸二硫化物 (penicillenic acid disulfide)		 256.3 200 250 300 350 400 λ/nm
7	杂质 p 和其他梯度杂质 (impurity p and impurities eluted through the gradient)	/	 256.3 200 250 300 350 400 λ/nm

3.2 反相色谱中青霉素聚合物杂质归属

通过柱切换系统,在线转移 500 μ L(图 3- A 中 5.5 min到 6 min部分)聚合物溶液到反相 HPLC 系统。HPLC的梯度部分出现 1个色谱峰,称之为杂质 p(图 3- B),进一步证明反相 HPLC 系统梯度洗脱时流出的杂质为聚合物类杂质。

降低凝胶色谱系统流动相中磷酸盐缓冲液的浓度,凝胶色谱系统中聚合物峰的峰面积增大(表 3),柱切换结果显示杂质 p的面积也逐渐增加,且在青霉素唑啉酸组峰附近逐渐出现多个色谱峰(图 3- B)。蔡珊英等的研究表明^[10],凝胶色谱除主要依据分子排阻机理分离外,吸附作用也是重要的分离因素;在凝胶色谱的有效分离范围内不完全按照相对分子质量大小进行分离,分子尺寸也影响分子在凝胶介质中的色谱行为。因此,杂质 p随缓冲液浓度的降低而逐渐增大;在低浓度的磷酸盐缓冲液流动相中,凝胶色谱聚合物峰中含有更多的梯度杂质组分和极性相对较强的小分子组分。Sephadex G10凝胶色谱中,理论上认为杂质 p相对分子质量大于 700 参考阿莫西林凝胶色谱分析中对不同聚合物峰的归属情况^[11],杂质 p可能为青霉素的多聚体。

表 3 不同浓度条件下青霉素聚合物测定结果

Tab 3 Polymer assay of benzylpenicillin in mobile phases of different concentration

批号 (Lot No)	凝胶色谱 (GFC) %		RP- HPLC	
	0.10 mol·L ⁻¹ 磷酸盐缓冲液	0.01 mol·L ⁻¹ 磷酸盐缓冲液	杂质 p含量	梯度杂质个数
	(0.10 mol·L ⁻¹ phosphate buffer)	(0.01 mol·L ⁻¹ phosphate buffer)	% (content of the impurity p)	(number of the impurities through the gradient)
1	0.04	0.10	0.0073	8
2	0.03	0.11	0.0087	7
3	0.03	0.08	0.0069	7
4	0.04	0.10	0.0066	7
5	0.02	0.07	0.0044	6
6	0.03	0.09	0.0082	7
7	0.02	0.10	0.0046	7
8	0.03	0.10	0.0103	5
9	0.03	0.14	0.0159	6
10	0.02	0.04	0.0000	3
11	0.02	0.05	0.0000	5

3.3 反相 HPLC 分析与凝胶色谱分析的相关性分析

周晓溪等^[12]发现在阿莫西林 克拉维酸钾口服制剂中,阿莫西林闭环二聚体为最大杂质;可以用阿莫西林闭环二聚体作为指针性杂质,间接表征制剂

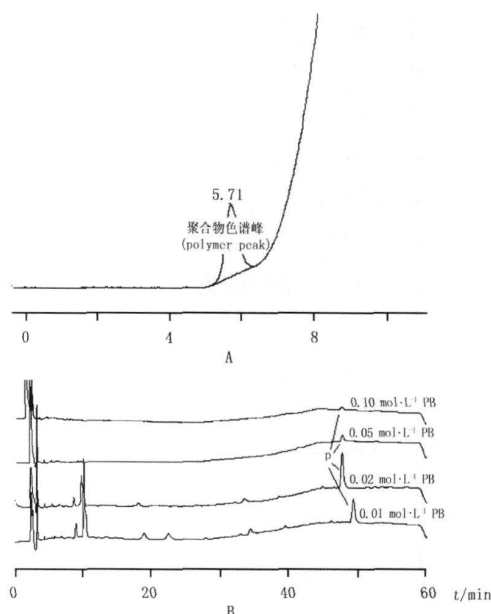


图 3 凝胶色谱聚合物峰切换结果

Fig 3 The HPLC behavior of the polymer peak in gel filtration chromatogram

A. 凝胶色谱图 (GFC chromatogram) B 不同浓度磷酸盐流动相的聚合物色谱峰切换结果 (the column-switching results of different concentration phosphate buffer (PB) as GFC mobile phase)

中阿莫西林的杂质总量。基于凝胶色谱的粗分离机制,图 3- A 中聚合物色谱峰由混合组分组成;随着凝胶色谱系统流动相浓度降低,杂质 p增加,由此证明高浓度的流动相确保在 $K_{av}=0$ 处仅有相对分子质量大于 700 的组分流,但是高浓度流动相条件下并未采集到所有聚合物杂质的信息,仅包含部分聚合物杂质。与凝胶色谱系统分析总体分析聚合物的方式不同,RP- HPLC 系统将聚合物的混合体系分散,以致微量的单个杂质检出难度增大。采用 RP- HPLC 法分析青霉素钠中的杂质 p 尽管其含量较低但发现其含量在不同的样品中不同,少数青霉素钠产品中不含有杂质 p 而且与 Sephadex G10 凝胶色谱分析结果比较,杂质 p 的含量明显较凝胶色谱法测定的聚合物含量低(表 3),但从表中可以看出杂质 p 和凝胶色谱聚合物含量测定结果两者具有明显相关性。该结果也进一步提示杂质 p 仅是凝胶色谱分析聚合物峰中的 1 个组分,也提示杂质 p 是可以作为表征青霉素聚合物的指针性杂质。

本文结果提示,可以用杂质 p 为指针性杂质表征青霉素钠中的聚合物含量,进而实现凝胶色谱分析与 RP- HPLC 相关物质分析的统一。

4 结论

利用加速试验,杂质特征性光谱及柱切换技术

对青霉素钠相关物质 RP-HPLC 系统中的部分降解杂质和聚合物杂质进行了归属, 并在此基础上实现了凝胶色谱分析与 RP-HPLC 相关物质分析的统一。同时, 这也丰富了 β -内酰胺抗生素聚合物分析方法, 克服目前 Shephadex G10 凝胶色谱分析 β -内酰胺抗生素聚合物杂质的不足, 进而对 β -内酰胺抗生素聚合物杂质的更有效控制提供了新的思路。

参考文献

- 1 JIN Shao-hong(金少鸿), HU Chang-qin(胡昌勤). Advances in allergy study of β -lactam antibiotics(β -内酰胺类抗生素过敏反应研究进展). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 1994, 3(4): 38
- 2 Y N Yan-jie(尹燕杰), GU Ju-e-fen(顾觉奋). Advances in the analysis of special impurities in β -lactam antibiotics(β -内酰胺类抗生素中特殊杂质的分析研究进展). *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2003, 11(4): 8
- 3 BP 2002 124
- 4 BP 2002 133
- 5 EP 6.0. 1285

- 6 ChP(中国药典). 2005 Vol II (二部): Appendix(附录)X V D
- 7 LIU Wen-ying(刘文英). *Pharmaceutical Analysis*(药物分析). 5th Ed(第五版). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2003. 268
- 8 GU Ju-e-fen(顾觉奋). *Antibiotic*(抗生素). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 2001. 180
- 9 BP 2007 249
- 10 CA I Shan-ying(蔡珊英), HU Chang-qin(胡昌勤), FENG Fang(冯芳). Chromatographic behavior of β -lactam antibiotics in Superdex peptide gel filtration chromatography(β -内酰胺抗生素在 Superdex peptide 凝胶过滤色谱柱上的保留行为). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 2002, 27(3): 157
- 11 CA I Shan-ying HU Chang-qin XU Ming-zhe Chromatographic determination of high-molecular weight impurities in amoxicillin. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31: 589
- 12 ZHOU Xiao-xi(周晓溪), GU Li-su(顾立素), HU Chang-qin(胡昌勤). The changes in the impurity profile of amoxicillin and clavulanate potassium compound preparations (阿莫西林克拉维酸钾复方制剂杂质谱的变化). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), (in press)

(本文于 2008 年 12 月 29 日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起, 凡投稿本刊, 请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后, 可在线了解稿件情况: 编辑-送审-专家已审-待编辑处理稿件-退修-编辑加工完成-已刊出等。

580 号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后, 登录此系统。

读者可在线查看本刊目录, 了解本刊编委及其他信息, 并可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题, 请与技术支持联系: 010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部