

表 7 含量测定结果

批号	阿魏酸	芦丁	大黄酸	大黄素	大黄酚
130404	0.267 1	0.142 1	0.211 2	0.178 9	0.653 1
130713	0.250 8	0.139 8	0.223 8	0.198 5	0.702 1
131201	0.271 3	0.150 2	0.254 1	0.188 1	0.678 9

3 讨论

本实验利用二极管阵列检测器对阿魏酸、芦丁、大黄酸、大黄素和大黄酚混合对照品溶液进行了全波长扫描,发现 280 nm 处各以上被测成分相对有较大吸收,且该处相应位置处杂志干扰较少,故选择此波长为检测波长。

在流动相的选择上比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-磷酸、乙腈-磷酸和甲醇-磷酸等系统,最终根据被测组分的保留时间、峰形、分离度等色谱条件确定甲醇-0.1%磷酸溶液(78:22)为本实验的流动相系统。

在样品前处理方法的选择上,本实验分别比较了 50%甲醇、95%甲醇、50%乙醇和 95%乙醇等提取效果,结果发现 50%乙醇提取效果最佳;又分别比较了冷浸 10 h、冷浸 2 h 后超声 30 min、温浸 10 h、温浸 2 h 后超声 30 min 等提取效果,发现温浸 2 h 后超声 30 min 效果最佳;又分别比较了提取 1 次、2 次、3 次的提取效果,发现虽然提取 2 次后,含量上升不明显,为了简化前处理程序,故提取次数选择 2 次。

虽然石椒草也为黄石感冒片的君药,但经查相关文献^[9],石椒草有效成分主要有伞型花内酯、

东莨菪素、芸香苦素、西瑞香素等,前三者中国食品药品检定研究院无相应对照品,经过实验摸索,西瑞香素在石椒草中含量较低,不易作为石椒草的控制指标,故未纳入本方法。

REFERENCES

- [1] QIN Q F. Determination of chlorogenic acid, forsythin, rhein, emodin and chrysophanol in Lianhuan Qingwen Capsules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 210-213.
- [2] 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第二十册) [S]. 1990: 339.
- [3] ZHANG L L, BAI Y L, SU S L, et al. Optimization of chromatographic conditions in the determination method of Mori Folium in Chinese Pharmacopoeia [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(4): 717-722.
- [4] 代雪平, 宋汉敏, 李振国. HPLC 测定不同产地芦根中阿魏酸的含量[J]. 中医研究, 2010, 23(9): 26-27.
- [5] XU Q L, MAO X J, SONG X N, et al. HPLC simultaneous determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Liuwei Anxiao capsules [J]. Chin J Pharm Ana(药物分析杂志), 2010, 30(10): 1841-1844.
- [6] XUE X P, LU Y M, WANG Q, et al. Determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and rheochrysidin in QING RE JIE DU FANG by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2009, 15(7): 6-8.
- [7] ZHANG H X, JIN Y, XU H Y, et al. Determination of rhein, emodin, chrysophanol and rheochrysidin in Weili tablet by HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2007, 24(7): 417-420.
- [8] MAO C F, SHI Z, LUO Y, et al. Simultaneous determination of 11 constituents in Rhei Radix et Rhizoma by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(16): 2400-2403.
- [9] HAO X J, ZHAO B T. The chemical constituents of *Boenninghausenia sessilicarpa* [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 1994, 16(3): 310-312.

收稿日期: 2015-02-06

国产注射用美洛西林钠质量评价

凌霄, 张冬梅, 王松, 李玉杰, 于明艳, 杨娜, 牛冲* (山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 通过对 20 个生产企业的 204 批注射用美洛西林钠的评价性抽验结果进行分析, 评价国产注射用美洛西林钠的质量现状。方法 采用水活度、水分、有关物质等方法测定不同工艺的样品; 通过加速试验、多因素相关分析, 探索性地考察样品胶塞中部分挥发性物质与药物的相容性, 综合评价产品质量。结果 冷冻干燥工艺生产的样品质量及稳定性均较无菌分装样品更好, 水分及温度与产品质量密切相关, 原料质量是影响制剂质量的关键。结论 国产注射用美洛西林钠总体质量较好, 现行质量标准有待提高。

关键词: 注射用美洛西林钠; 质量分析

作者简介: 凌霄, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0531)81216551
药师 Tel: (0531)81216551 E-mail: sdyjxzz@163.com

E-mail: xiaol6551@126.com *通信作者: 牛冲, 男, 硕士, 主管

Quality Assessment of Mezlocillin Sodium for Injection

LING Xiao, ZHANG Dongmei, WANG Song, LI Yujie, YU Mingyan, YANG Na, NIU Chong* (*Institute for Food and Drug Control of Shandong Province, Jinan 250101, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the quality status of mezlocillin sodium for injection through 204 batches of samples from 20 producers. **METHODS** The samples and accelerated samples were analyzed by determining water activity, water, and related substances. The volatile substances of butyl rubber closures were studied on patibility between them and mezlocillin sodium for injection. The quality status of samples were evaluated by multi-factors correlation analysis of the determination results. **RESULTS** The quality and stability of the samples produced by freezing drying were better than those produced by sterilized shipment. The water and temperature were closely related to the quality of mezlocillin sodium for injection and the quality of raw material was the key to the quality of preparation. **CONCLUSION** The most products quality of mezlocillin sodium for injection meet current standards. The existing standard is in deficiencies' and need to be improved.

KEY WORDS: mezlocillin sodium for injection; quality assessment

美洛西林钠为第 3 代半合成青霉素类抗菌药物, 是一种不可逆的 β -内酰胺酶抑制剂, 由德国拜耳公司研发, 1977 年在德国首先上市, 1981 年美国 FDA 批准在美国上市, 20 世纪 80 年代以来先后在日本、意大利、荷兰、瑞士、中国等国家上市。山东瑞阳制药有限公司为该品种国内首家仿制企业。美洛西林钠及其制剂收载于中国药典 2010 年版二部^[1], USP37^[2]收载无水物及一水合物及其制剂。与中国药典 2010 年版二部相比, USP37 该品种项下未收载有关物质及美洛西林聚合物。

美洛西林钠原料药的合成工艺主要采用氨苄西林与甲磺咪唑啉经缩合反应制备美洛西林, 再与无机钠盐(碳酸氢钠或异辛酸钠)溶液一步成盐, 然后经脱色、滤过、冷冻干燥制得。其制剂为注射用美洛西林钠, 生产工艺主要分为原料药无菌分装及冷冻干燥。美洛西林钠于 2014 年首次被列为国家药品计划抽验项目, 本次评价共完成 204 批注射用美洛西林钠样品的法定检验任务, 并开展了一系列探索性研究工作, 采用统计学方法对检验结果进行了分析, 对该品种的质量进行评价^[3]。

1 仪器与试剂

BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配二极管阵列检测器); SHIMADZU LC-30AUFLC-LCMS8050(日本岛津公司, 三重四级杆质谱仪, 配超高效液相系统、二极管阵列检测器及电喷雾电离源); 温控水分活度仪(瑞士 NOVASINA 公司);

DL38 水分测定仪(美国 METTLER 公司); Agilent 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配 7694E 顶空进样器, FID 检测器); 2100AN 浊度仪(德国 HACH 公司); PB-10 pH 计(德国 Sartorius 公司)。

美洛西林对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 130419-200904, 含量: 93.5%); 注射用美洛西林钠 204 批, 其中采用无菌分装工艺生产的 155 批, 采用冷冻干燥工艺的 49 批, 涉及生产企业 20 家, 占该品种生产企业总数的 77%; 涉及生产文号 51 个, 占总文号数的 49%; 样品抽自全国 30 个省、自治区、直辖市。内包装材料均为西林瓶和卤化丁基胶塞。进口注射用美洛西林钠 1 批(法国 Carinopharm GmbH 公司, 批号: 1311002, 规格: 4.0 g)。甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 法定检验方法

注射用美洛西林钠收载于中国药典 2010 年版二部^[1], 质控项目主要包括性状(外观及比旋度)、鉴别(TLC、HPLC、钠盐火焰鉴别, 其中 TLC 与 HPLC 选做 1 项)、溶液的澄清度与颜色、不溶性微粒、酸碱度、有关物质、美洛西林聚合物、水分、细菌内毒素、无菌、装量、可见异物检查及含量测定。

2.2 探索性研究

通过开展美洛西林钠原料药及制剂生产厂家调研, 了解该品种的原料药合成及制剂生产工艺、掌握大量与本品质量相关的信息, 为探索性研究

的开展及质量分析奠定基础。探索性研究主要包括水分及水活度相关性研究、有关物质方法合理性研究及其修订及杂质谱分析、影响因素考察、胶塞中硅氧烷类物质及抗氧剂向药粉中的迁移及对澄清度的影响研究等。

3 结果与分析

3.1 法定检验结果分析

按照法定标准检验,204批样品中203批合格,合格率为99.5%,不合格批次1批,不合格项目为细菌内毒素。本品为无辅料制剂,制剂质量与原料质量直接相关,该批次产品原料亦由制剂生产厂家生产,非外购,经实地调研及分析,不合格原因为原料污染引起。

3.2 探索性研究结果

3.2.1 水分及水活度测定 水分活度是指样品中水分存在的状态,即水分与样品结合程度(游离程度)。水分活度值越高,结合程度越低;水分活度值越低,结合程度越高。水分活度数值用 A_w 表示,含有水分的样品由于其水分活度不同,其储藏期的稳定性也不同。利用水分活度的测试,反映物质的保质期,已逐渐成为食品、医药、生物制品等行业中检验的重要指标。

美洛西林钠原料具有引湿性,为考察水分与水活度的相关性、二者对含量、有关物质等的影响及水分限度的合理性,选择冷冻干燥及无菌分装2种工艺生产的样品各2批次,开盖置于相对湿度75%的环境中,24h内,每间隔2h取样测定水分含量和水分活度,考察湿度对水活度的影响;在20~50℃的温度范围内,每间隔5℃测定1次水活度,分析温度对样品水分活度的影响;在相对湿度75%的干燥器中放置1,2d,测定水分、水活度、含量及有关物质,考察水分、水活度对含量及有关物质的影响。

结果显示,2种工艺的产品在24h内水活度和水分均明显上升,但2种工艺上升水平存在一定差异;样品在高湿条件下,水分和水活度显著增加,国内制剂随着水分的增加,单个杂质及杂质总和均显著增加,含量显著降低;进口参比制剂单个杂质增加不明显,总杂质显著增加。

3.2.2 有关物质方法合理性研究及其修订及杂质谱分析 在按标准检验中发现,现行质量标准有关物质检查方法存在较大缺陷:分析时间不充分,在规定的“主成分保留时间的1.5倍”分析时间之

后各企业样品均仍有杂质检出,因此需对现行方法进行验证、修订。结合专属性研究结果,将现有方法由等度洗脱修订为梯度洗脱,按照修订后的方法对204批次样品再次进行检验,结果最大单个杂质、总杂质及检出杂质个数均有显著增加:按照中国药典2010年版二部标准检验,各企业单个杂质为0.19%~1.27%,均值为0.49%,总杂质为0.44~2.53%,均值为1.01%,检出杂质个数为6~17个,平均10个;按照修订后的有关物质检查方法检验,各企业单个杂质为0.18%~1.45%,平均0.60%,杂质总和为0.79%~3.35%,平均1.98%,杂质个数为17~43,平均30个,其中各企业产品中均有杂质12个,见图1。

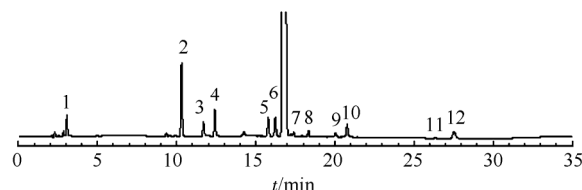


图1 注射用美洛西林钠 HPLC 杂质谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mezlocillin sodium for injection

结果说明,修订后的有关物质检查方法,最大单个杂质量、总杂质量及杂质个数检出量均高于现行质量标准,较现行标准能更好地控制产品质量、更真实反映样品杂质谱情况。

204批样品中,不同原料来源企业杂质谱有差异,其中2号、10号、12号杂质均为各企业样品中较大杂质,是反映产品质量的重要指标,应给予控制。

虽然国内外药典均收载注射用美洛西林钠,但均未控制其杂质谱,亦未见相关文献报道,通过比对原料、中间体及酸、碱、氧化、光照、热破坏等专属性试验结果,结合质谱分析,推测2、12号杂质为美洛西林钠水解开环产物、10号杂质为合成原料引入。

进口样品杂质谱与国内样品有差距,表现为单个杂质、总杂质量及杂质个数均低于国内样品,提示原料不同水合物形式,其稳定性不同。

目前有关美洛西林钠杂质谱的分析及相关毒理学研究工作仍在进行中。

3.2.3 影响因素考察 为掌握不同温度条件对不同工艺(无菌分装及冷冻干燥)样品质量的影响情况,分别将2种工艺样品进行加速试验,在40℃

及 60 °C 条件下分别放置 5, 10 d, 按中国药典 2010 年版标准测定了性状、溶液的澄清度与颜色、水分、聚合物及含量, 按修订后的有关物质方法测定有关物质。

结果表明, 在考察条件下, 溶液的澄清度与颜色无明显变化, 单个杂质及杂质总和均随温度的升高及时间的延长而明显增加, 且无菌分装样品杂质的增长高于冷冻干燥工艺生产样品, 聚合物亦有增加、含量呈下降趋势。说明温度是影响产品稳定性的重要因素之一, 且冷冻干燥工艺产品的稳定性要优于无菌分装样品。

3.2.4 胶塞中硅氧烷类物质及抗氧化剂向药粉中的迁移及对澄清度的影响研究 根据文献报道^[4-5], 胶塞中的某些挥发性物质可能迁移至药品中, 从而影响药品, 尤其是某些抗菌药物的澄清度, 并最终影响其质量。分别建立 HPLC 及 GC 测定胶塞及药粉中 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)等 12 种抗氧化剂及六甲基环三硅氧烷等 5 种硅氧烷类化合物, 结合加速试验及浊度仪定量测定样品浊度, 考察包材中上述物质向药物中的迁移及对质量的影响。

表 1 主要项目检测结果多因素相关分析

Tab. 1 Multi-factors correlation analysis of the major items determination results

		pH	比旋度	水分	单质	总杂	杂质个数	聚合物	含量
pH	Pearson 相关性	1	-0.358 ²⁾	-0.354 ²⁾	-0.163 ¹⁾	-0.130	-0.128	0.087	-0.036
	显著性(双侧)		0.000	0.000	0.019	0.062	0.066	0.216	0.606
	N	206	204	204	206	206	206	205	204
比旋度	Pearson 相关性	-0.358 ²⁾	1	0.236 ²⁾	0.031	0.011	-0.025	-0.014	0.237 ²⁾
	显著性(双侧)	0.000		0.001	0.659	0.877	0.727	0.844	0.001
	N	204	206	206	204	204	204	206	204
水分	Pearson 相关性	-0.354 ²⁾	0.236 ²⁾	1	0.033	0.088	0.137	0.262 ²⁾	-0.205 ²⁾
	显著性(双侧)	0.000	0.001		0.642	0.211	0.051	0.000	0.003
	N	204	206	206	204	204	204	206	204
单个杂质	Pearson 相关性	-0.163 ¹⁾	0.031	0.033	1	0.838 ²⁾	0.460 ²⁾	-0.031	-0.024
	显著性(双侧)	0.019	0.659	0.642		0.000	0.000	0.659	0.734
	N	206	204	204	207	207	207	205	204
总杂质	Pearson 相关性	-0.130	0.011	0.088	0.838 ²⁾	1	0.454 ²⁾	-0.016	0.011
	显著性(双侧)	0.062	0.877	0.211	0.000		0.000	0.815	0.881
	N	206	204	204	207	207	207	205	204
杂质个数	Pearson 相关性	-0.128	-0.025	0.137	0.460 ²⁾	0.454 ²⁾	1	0.043	-0.034
	显著性(双侧)	0.066	0.727	0.051	0.000	0.000		0.541	0.628
	N	206	204	204	207	207	207	205	204
聚合物	Pearson 相关性	0.087	-0.014	0.262 ²⁾	-0.031	-0.016	0.043	1	-0.156 ¹⁾
	显著性(双侧)	0.216	0.844	0.000	0.659	0.815	0.541		0.026
	N	205	206	206	205	205	205	207	204
含量	Pearson 相关性	-0.036	0.237 ²⁾	-0.205 ²⁾	-0.024	0.011	-0.034	-0.156 ¹⁾	1
	显著性(双侧)	0.606	0.001	0.003	0.734	0.881	0.628	0.026	
	N	204	204	204	204	204	204	204	204

注: ¹⁾在 0.05 水平(双侧)上显著相关; ²⁾在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

Note: ¹⁾Significant correlation at the 0.05 level (bilateral); ²⁾significant correlation at the 0.01 level (bilateral).

结果显示, 样品和胶塞中检出六甲基环三硅氧烷、十甲基环四硅氧烷、十甲基环五硅氧烷, 均未检出四甲基环四硅氧烷及十二甲基环六硅氧烷类化合物; 17 家企业 84 批样品中抗氧化剂 BHT、1076[β-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)丙酸正十八碳醇酯]不同程度检出。根据《药品包装材料与药物相容性试验指导原则》^[6], 倒置、60 °C 加速试验结果显示, 胶塞中上述成分具有随放置延长向胶塞中迁移的现象及趋势。利用哈希 2100AN 浊度仪测定溶液的澄清度, 随着放置天数的增加, 浊度值增加, 说明胶塞中的成分向美洛西林钠的迁移会对澄清度产生影响, 但由于这是个较缓慢过程, 因此, 虽然样品澄清度仍符合规定, 但提示应重视包材与药品的相容性研究, 并加强包材管理。

4 相关分析

通过将样品的酸度、溶液的颜色、水分、单个杂质、杂质总和、聚合物、纯度的检验结果进行多因素相关分析, 结果显示: 水分与聚合物呈显著正相关, 与含量呈显著负相关, 揭示水分是影响样品质量变化的主要原因。结果见表 1。

5 讨论

本次评价性抽验采取法定检验结合探索性研究的模式对注射用美洛西林钠从标准到质量现状、质量影响因素各方面进行了较全面的分析和评价。由法定检验可知,目前绝大部分国产注射用美洛西林钠均符合现行质量标准要求,合格率为99.5%,个别企业由于内部管理疏漏造成1批次样品的细菌内毒素不符合规定;现行质量标准基本可控制产品质量,但有关物质检查方法存在缺陷,造成杂质漏检且无法真正控制产品杂质变化,需进一步修订;综合探索性研究结果,国产样品杂质谱较国外样品复杂,因此应结合工艺,对杂质谱进行重点研究。

水分及水活度研究及相关分析均显示,水分与水活度明显正相关,与含量明显负相关。说明水分含量与本品质量密切相关,目前限度参照国外样品(含一分子结晶水)制订,但国内样品均不含结晶水,因此限度应趋于严格。

不同生产工艺样品的质量存在差异。同一原

料来源,冷冻干燥工艺水分、有关物质(单个杂质、杂质总和、杂质个数)、溶液的颜色、聚合物等均低于无菌分装工艺,提示冷冻干燥工艺优于无菌分装工艺。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 608-610.
- [2] USP 37 [S]. 2014: 3828-3829.
- [3] SUN C Y, DING T M, CHEN N L, et al. Quality evaluation and discussion on the current quality standard of Vitamin C injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(7): 853-857.
- [4] ZHAO X, HU C Q, JIN S H. The analysis of volatile substances of butyl rubber closures [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(3): 315-318.
- [5] ZHAO X, HU C Q, JIN S H. An HPLC method for determination of butylated hydroxytoluene in ceftriaxone sodium for injection [J]. *Chin J Antibiotic*(中国抗生素杂志), 2007, 9(32): 543-545.
- [6] Drug packaging materials and the guiding principles of drug compatibility test(药品包装材料与药物相容性试验指导原则) [S]. 2006-10-23.

收稿日期: 2015-02-05

HPLC-MS/MS 测定人血浆中盐酸左旋多巴甲酯浓度的不确定度评价

谢少斐, 邹珊, 黄俊芝, 张含春, 李纬, 黄海燕(南京长澳医药科技有限公司, 南京 210038)

摘要: 目的 评价液-质联用法测定人血浆中左旋多巴甲酯浓度的不确定度。方法 选用 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 2.4 μm) 色谱柱; 流动相由甲醇-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, pH=5.0) 梯度洗脱; 流速: 0.4 mL·min⁻¹。质谱条件: 选用电喷雾(ESI) 离子源, 在正离子电离模式下, 采用多反应监测(MRM) 的质谱扫描方式, 测定左旋多巴甲酯和内标的检测离子分别为: m/z 212.4→152.3、 m/z 166.4→148.3。测定左旋多巴甲酯含量后, 建立数学模型, 分析过程中各分量引起的不确定度, 包括测定精密度、称量、标准溶液的配制、含药血浆的配制、血浆提取、仪器、标准曲线拟合等, 计算各变量的不确定度和合成不确定度, 最终计算扩展不确定度。结果 置信概率 P 为 95% 时, 血浆低、中、高(0.4, 4, 32 ng·mL⁻¹) 浓度左旋多巴甲酯的扩展不确定度分别为 0.10, 0.23, 1.62 ng·mL⁻¹。结论 该方法适用于 LC-MS/MS 测定人血浆中左旋多巴甲酯浓度的不确定度评价, 为复杂生物基质分析过程的不确定度评价提供了参考依据。

关键词: 左旋多巴甲酯; 不确定度; 液-质联用法; 血浆

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0994-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.024

Uncertainty Evaluation for the Determination of Levodopa Methyl Ester Hydrochloride Concentration in Human Plasma by HPLC-MS/MS

XIE Shaofei, ZOU Shan, HUANG Junzhi, ZHANG Hanchun, LI Wei, HUANG Haiyan(Nanjing Chang'ao Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

作者简介: 谢少斐, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (025)86912180

E-mail: xieshaofei@changao.com