

# 反相高效液相色谱法分析注射用氨苄西林钠有关物质

冯秀珍 王臣芳 赵士冶 谢辉

**【摘要】** 目的 采用反相高效液相色谱法测定注射用氨苄西林钠有关物质,并对有关物质进行分析。方法 采用 Ultimate™ XB C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱,流动相 A 为 12% 醋酸溶液-0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈-水 (0.5:50:50:900); 流动相 B 为 12% 醋酸溶液-0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈-水 (0.5:50:400:550); 柱温: 35℃; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm。结果 氨苄西林与有关物质可完全分离, L-氨苄西林、氨苄西林开环二聚物、氨苄西林闭环二聚物分别在相对主峰保留时间为 0.7、2.8、3.5 倍处出峰。结论 定位注射用氨苄西林钠三种杂质峰位。

**【关键词】** 反相高效液相色谱法; 注射用氨苄西林钠; 有关物质

**Analysis of related substances in ampicillin sodium for injection by RP-HPLC** FENG Xiu-zhen, WANG Chen-fang, ZHAO Shi-ye, Xie Hui Huan Province Changde Institute for Drug Control, Changde, Hunan 415000, China

**【Abstract】 Objective** To use an RP-HPLC method for determination of related substances in ampicillin sodium for injection, and analyse the impurity types of ampicillin sodium for injection. **Methods** The RP-HPLC method was performed on Ultimate™ XB C<sub>18</sub> column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), the mobile phase A was 12% N acetic acid-0.02 mol/L monobasic potassium-acetonitrile-water (0.5:50:50:900), the mobile phase B was 12% N acetic acid-0.02 mol/L monobasic potassium-acetonitrile-water (0.5:50:400:550), the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35℃, The flow rate was 1.0 ml/min. **Results** The related substances in ampicillin sodium and the impurity were separated successfully. The relative retention times are about 0.7 for L-ampicillin, ampicillin, 2.8 for ring-opening ampicillin dimers and 3.5 for ring-closing ampicillin dimers. **Conclusion** The peak potential of three impurities in an HPLC chromatogram are determined.

**【Key words】** RP-HPLC; Ampicillin sodium for injection; Related substances

氨苄西林是临床上广泛使用的 β-内酰胺类抗生素; 水溶液及贮存过程中均不稳定; 临床上产生免疫反应主要由生产、贮藏及使用过程产生聚合物等高分子杂质引起<sup>[1]</sup>; 对聚合物杂质进行定位及限量检测具有重要意义。《中国药典》2005年版二部采用梯度洗脱方法测定其有关物质, 但实验中在其规定的 2.8 倍主成分保留时间处二聚物杂质峰不明显。本实验参考其他文献<sup>[2,3]</sup>, 完善梯度洗脱方法; 采用三根不同品牌色谱柱定位杂质峰; 确定注射用氨苄西林钠放置后产生的主要杂质及峰位; 为更科学评价该产品质量提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

SHIMADZU 高效液相色谱仪 (日本岛津), 包括 SPD-20A 工作泵、SPD-M20A DAD 检测器、Le-solution 工作站; 氨苄西林对照品 (购自中国药品生物制品检定所, 批号: 130410-200405, 含量: 86.5%); 乙腈 (色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

注射用氨苄西林钠: I、厂家甲, 批号: A080400414 规格: 1.0 g II、厂家甲, 批号: A080510713 规格: 1.0 g III、厂家乙, 批号: L080211 规格: 1.0 g IV、厂家乙, 批号: A06094809 规格:

0.5 g V、厂家乙, 批号: L080315 规格: 1.0 g VI、厂家丙, 批号: X071021Q 规格: 1.0 g

**2 方法与结果** **2.1 色谱条件** 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相 A 为 12% 醋酸溶液-0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈-水 (0.5:50:50:900); 流动相 B 为 12% 醋酸溶液-0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈-水 (0.5:50:400:550); 流速为 1.0 ml/min 检测波长为 254 nm, 进样量为 20 μl。梯度洗脱方法见表 1, t<sub>R</sub> 为氨苄西林出峰时间。

表 1 梯度洗脱表

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~ t <sub>R</sub>	85	15
t <sub>R</sub> ~ t <sub>R</sub> + 30	85→0	0→100
t <sub>R</sub> + 30~ t <sub>R</sub> + 45	0	100
t <sub>R</sub> + 45~ t <sub>R</sub> + 60	0→85	100→15
t <sub>R</sub> + 60~ t <sub>R</sub> + 80	85	15

**2.2 溶液配制** 有关物质供试品溶液的配制: 取本品, 用流动相 A 溶解并稀释制成含氨苄西林约 3 mg/ml 的溶液。

有关物质对照品溶液的配制: 精密量取有关物质供试品溶液 1 ml 置 100 ml 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度。

空白辅料溶液的配制: 根据处方比例用流动相 A 配制不含主药的空白辅料溶液。

二聚物样品溶液的配制: 取本品约 0.2 g 加水 1.0 ml 使

溶解,于 60℃水浴中加热 1 h,取 0.5 ml 置 50 ml 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度。

含量测定溶液的配制:用流动相 A 配制含氨苄西林 1 mg/ml 的溶液作为供试品溶液,同法配制对照品溶液。

2.3 专属性试验 分别取 2.2 项下空白辅料溶液、有关物质供试品溶液及含量测定溶液按 2.1 项下色谱条件实验,进

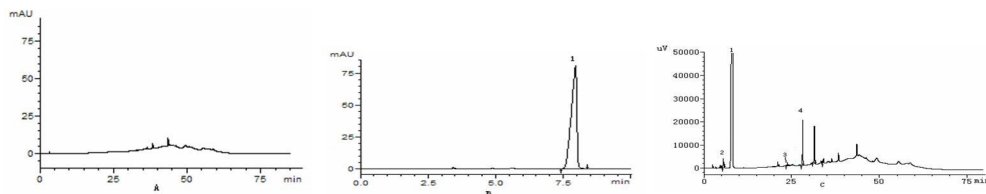


图 1 空白辅料 (A)、对照品 (B) 和有关物质供试品 (C) 色谱图

1. 氨苄西林; 2. L-氨苄西林; 3. 开环氨苄西林二聚物; 4. 闭环氨苄西林二聚物

表 2 各杂质与主成分相对保留时间比值

杂质名称	杂质峰保留时间 / 氨苄西林峰保留时间			
	文献	Phenomenex 色谱柱	Ultimate XB-C <sub>18</sub> 色谱柱	Agela 色谱柱
L-氨苄西林	0.70	0.69	0.70	0.70
开环氨苄西林二聚物	2.84	2.82	2.85	2.76
闭环氨苄西林二聚物	3.53	3.50	3.46	3.52

2.5 进样精密度的取氨苄西林对照品溶液 (约 1 mg/ml), 连续进样 6 次, 峰面积的 RSD 为 0.92%。

2.6 稳定性考察 取氨苄西林对照品溶液 (约 1 mg/ml), 分别在配制后 0.2, 4, 6, 8 h 进样测定, 5 次测定峰面积的 RSD 为 1.02%, 表明氨苄西林溶液在 8 h 内稳定。

2.7 含量及有关物质测定 取 2.2 项下有关物质供试品溶液、有关物质对照品溶液及含量测定溶液分别进样, 在 2.1 项下色谱条件测定并计算含量及有关物质, 测定结果见表 3。

表 3 样品含量及有关物质测定结果表

样品	含量 (%)	有关物质 (%)
I	97.96	4.4
II	96.10	3.5
III	96.62	3.7
IV	93.61	4.7
V	97.64	3.5
VI	95.18	4.6

### 3 讨论

3.1 杂质峰定位 Yongxin Zhua 等<sup>[2]</sup>对氨苄西林中可能存在的 22 种杂质分别定位, 本实验与文献在相同色谱条件下操作, 测定不同厂家多批样品, 采用与文献比较相对保留时间的方法, 确定三种杂质峰位: L-氨苄西林、氨苄西林开环二聚物、氨苄西林闭环二聚物分别在相对主峰保留时间 0.7, 2.8, 3.5 倍处出峰。

3.2 聚合物结构分析 氨苄西林钠聚合物 (二聚物及多聚物) 有两种结构<sup>[2]</sup>, 见图 2。

一种为开环二聚物, 另一种为闭环二聚物。《中国药典 2005 年版》规定 2.8 倍氨苄西林保留时间处为二聚物峰<sup>[3]</sup>, 而未注明是开环还是闭环二聚物。本实验测定 6 批样品加

样, 分别记录色谱图 (见 1), 结果表明, 空白辅料对主药和有关物质检测无干扰。

2.4 杂质峰的定位 分别取有关物质供试品溶液、二聚物样品溶液在 2.1 色谱条件下进样, 采用三根不同品牌色谱柱进行试验, 测定结果见表 2。

热后均在 3.5 倍处峰面积明显增加, 而在 2.8 倍处二聚物峰不明显, 表明加热后主要形成闭环二聚物。

3.3 实验方法 参考《中国药典》及其他文献基础上<sup>[4]</sup>, 改进实验方法, 洗脱结束后设置在初始比例平衡 20 min, 基线更平稳, 主峰保留时间漂移少。本实验方法能洗脱并良好分离生产及贮存所产生的有关物质, 但测定费时较长。

3.4 注射用氨苄西林钠杂质比例分析 对本实验 6 批样品中各单个杂质占总杂质比例进行分析, 其中聚合物占总杂质约 73%, L-氨苄西林占总杂质 8% 左右。生产中可针对性减少聚合物及 L-氨苄西林杂质产生, 能较好提高产品质量。

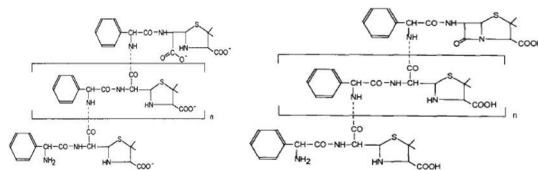


图 2 氨苄西林聚合物结构图

### 参考文献

[1] 郑文钦. 减少青霉素的不良反应. 海峡药学, 2005, 17 (6): 195-196.

[2] Yongxin Zhua E Roets a Zhigang NP, et al Evaluation of liquid chromatography methods for the separation of ampicillin and its related substances. Journal of Pharma and Biome Anal 1996 14 631-639.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 版二部 [S], 2005 613-614

[4] 周明灵, 胡楚楚. 反相高液相梯度洗脱法测定注射用氨苄西林钠舒巴坦钠有关物质. 中国抗生素杂志, 2009, 34 (3): 158-162