

他唑巴坦杂质 A 国家标准物质的研制

肖 亭¹, 王 晨¹, 田 冶¹, 张 夏¹, 刘 颖¹, 马步芳¹, 刘书好², 姚尚辰^{1*}, 冯艳春^{1**}(¹中国食品药品检定研究院, 北京 102629; ²上海工程技术大学, 上海 201620)

摘 要 研制他唑巴坦杂质 A 国家标准物质, 为提高国内他唑巴坦的质量控制标准提供依据。对他唑巴坦杂质 A 进行合成, 利用红外、质谱、核磁共振波谱技术进行结构确认, 并对杂质 A 进行含量均匀性检查和短期稳定性考察, 再测定其水分和炽灼残渣含量, 并以 10 mmol/L 醋酸铵溶液-乙腈(98:2)为流动相的高相液相色谱法测定杂质 A 的纯度, 应用质量平衡法确定首批他唑巴坦杂质 A 国家标准物质的含量, 同时采用核磁共振波谱定量法测定其含量, 与质量平衡法结果相互验证。结果发现, 本研究所研制的他唑巴坦杂质 A 标准物质与《中华人民共和国药典: 二部》(2015 年版)他唑巴坦系统适用性溶液中最大降解杂质和 USP41 中收载的他唑巴坦有关物质 A 标准物质结构一致; 在 95% 置信范围内, 分装后杂质 A 的瓶间和瓶内方差之比为 0.61 (小于 $F_{0.05(11, 12)}$), 均匀性良好; 杂质 A 中有机杂质含量为 0.90%, 水分含量为 1.24%, 无机杂质含量为 0.25%, 以质量平衡法确定杂质 A 含量为 97.6%, 与核磁共振波谱定量法结果 97.1% 基本一致; 在 25 °C 条件下, 杂质 A 面积归一化纯度在 0、3、5 和 10 d 的均值均为 99.1%, 证明样品在室温下 10 d 内稳定。本研究首次制备了他唑巴坦杂质 A 国家标准物质。

关键词 他唑巴坦; 他唑巴坦杂质 A; 杂质标准物质; 结构确证; 质量平衡法; 赋值

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0060-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210108

引用本文 肖亭, 王晨, 田冶, 等. 他唑巴坦杂质 A 国家标准物质的研制[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 60–65.

Cite this article as: XIAO Ting, WANG Chen, TIAN Ye, et al. Establishment of national reference standard of tazobactam impurity A[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(1): 60–65.

Establishment of national reference standard of tazobactam impurity A

XIAO Ting¹, WANG Chen¹, TIAN Ye¹, ZHANG Xia¹, LIU Ying¹, MA Bufang¹, LIU Shuyu², YAO Shangchen^{1*}, FENG Yanchun^{1**}

¹National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629;

²Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China

Abstract To improve the standard of quality control of tazobactam and its preparations in China, national reference standard of tazobactam impurity A was developed. After tazobactam impurity A was synthesized, its structure was validated by infrared (IR), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR), and its content uniformity and short-term stability were measured and investigated. Then, water content and residue on ignition of impurity A were determined, and its purity was determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with 10 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (98:2) as the mobile phase. Mass balance method was used to determine the content of the first batch of tazobactam impurity A national standard substance. Meanwhile, nuclear magnetic quantitative method was used to calculate the content, which was mutually verified with the mass balance method. The developed reference material of tazobactam impurity A is consistent with the maximum degradation impurity in tazobactam system applicability solution and the reference material of tazobactam related substance A contained in USP41. Within the 95% confidence range, the ratio of inter- and

收稿日期 2020-09-29 通信作者 *Tel: 010-53851532 E-mail: yaoshangchen@nifdc.org.cn

**Tel: 010-53851539 E-mail: fyc@nifdc.org.cn

基金项目 国家科技支撑计划资助项目(No. 2015BAK45B01)

intra-bottle variance of impurity A after separation was 0.61 ($< F_{0.05(11,12)}$), proving that the uniformity was satisfying. The contents of organic impurity, water content and inorganic impurity in impurity A were 0.90%, 1.24% and 0.25%, respectively. The content of impurity A was determined to be 97.6% by mass balance method, which was basically consistent with the result of nuclear magnetic quantitative method (97.1%). Under the condition of 25 °C, the area normalized purity of impurity A was 99.1% at 0, 3, 5 and 10 days, proving that the sample was stable at room temperature for 10 days. Finally the first batch of national standard substance of tazobactam impurity A was established successfully.

Key words tazobactam; tazobactam impurity A; national impurity reference standard; structural identification; mass balance method; content assignment

This study was supported by National Science and Technology Support Program(2015BAK45B01)

国家药品标准物质系指供国家法定药品标准中药品的物理、化学及生物学等测试用,具有确定的特性或量值,用于校准设备、评价测量方法、给供试药品赋值或鉴别用的物质,应具备稳定性、均匀性和准确性^[1]。标准物质的制备是药品质量研究中最重要的一环。近年来,随着公众健康安全意识和分析技术手段的不断提高,标准中对于杂质的定向控制也越来越细化。使用杂质标准物质对质量标准中要求的杂质进行定性和定量的控制是最理想的杂质控制方法。因此无论从监管理念的转变、药品质量的提升还是市场需求等多个角度,杂质标准物质的研制逐渐成为标准物质研制的发展方向^[2]。

目前在各国药典中,仍有很多采用原位降解技术^[3]或利用相对保留时间定位来进行某些杂质的控制或用于检查方法的系统适用性。但原位降解技术过程繁琐、产生杂质有限且重现性较差,不同实验室由于实验条件的差异可能造成色谱峰相对保留时间的改变^[4],使得许多药典方法在执行过程中遇到困难。因此,在条件许可的情况下逐渐将原位降解技术产生的杂质逐一研制成杂质标准物质或者进行混合杂质标准物质的研制^[5]成为药典标准修订中一项重要的工作。

他唑巴坦(tazobactam)是从舒巴坦的衍生物中筛选出来的一种 β -内酰胺酶抑制剂。它可以与数种 β -内酰胺类抗生素产生协同作用,增加了 β -内酰胺类抗生素的抗菌活性并扩大了其抗菌谱^[6]。因此《中华人民共和国药典》(以下简称“中国药典”)自 2010 版收录了该品种原料的质量标准,其中有关物质检查项和含量测定项都使用了他唑巴坦的氢氧化钠降解溶液作为系统适用性溶液,使

用降解产生的杂质来判断系统的分离效果,该方法一直沿用至今。本研究以中国药典(2015 年版)二部中他唑巴坦原料药质量标准为例,介绍如何鉴定其含量测定和有关物质检查方法中通过原位降解技术获得的系统适用性试验溶液中的主要杂质,并按照杂质标准物质研制的一般流程^[7],将其合成并研制成为国家杂质标准物质。

1 材 料

1.1 样品与试剂

他唑巴坦杂质 A 原料(100 g, 色谱纯度 98%, 河北桑迪亚医药技术有限责任公司);他唑巴坦对照品(99.5%, 批号 130511-201904, 中国食品药品检定研究院);他唑巴坦杂质 A 对照品(定性使用, R089H0, 美国药典委员会);乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司),其他试剂均为市售分析纯,水为超纯水。

1.2 仪 器

Waters 2695 Alliance 液相色谱仪(美国 Waters 公司);QTrap6500 质谱仪(美国 Sciex 公司);FT-IR EQUINOX 55 型红外光谱仪、Ascend 500 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);V20 型水分测定仪(美国 Mettler 公司);FO410C 型马弗炉(日本 Yamato 公司)。

2 方 法

2.1 中国药典(2015 年版)他唑巴坦原料药有关物质检查方法系统适用性试验溶液中最大杂质的鉴别

根据中国药典(2015 年版)二部中他唑巴坦原料药有关物质检查方法所描述的原位降解方法制

备系统适用性溶液:取他唑巴坦对照品约25 mg至25 mL量瓶中,加0.01 mol/L氢氧化钠溶液10 mL,30℃放置30 min,用0.01 mol/L盐酸溶液中和后,加流动相稀释至刻度,摇匀,用磷酸调节pH至4.0,按照含量测定色谱条件要求[色谱柱:Dikma, Inertsil ODS-2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); C/N 5020-01128; S/N 8AS11013; 流动相:乙腈-0.03 mol/L磷酸二氢钾溶液-10%四丁基氢氧化铵溶液(190:795:15)(用磷酸调节pH至4.0);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm,进样20 μL,进行HPLC色谱分析,观察产生的主要杂质。

根据产生的主要杂质,采用液相质谱联用技术测定杂质的相对分子质量,推测其可能的结构。25 mL量瓶内他唑巴坦的碱降解溶液用盐酸溶液中和后,用乙腈-水(1:5)的溶液稀释至刻度。设计的色谱条件如下。色谱柱:Capcell PAK C₁₈ TYPE MG II (4.6 mm×150 mm, 5 μm);检测波长:230 nm;流动相A相:0.1%甲酸水溶液,B相:乙腈;流速:0.5 mL/min;梯度洗脱:0~0.01 min(95:5);0.01~5.00 min(95:5);5.00~17.00 min(38:62);17.00~17.10 min(95:5);17.10~22.00 min(95:5)。

质谱仪型号为6500QTrap;工作站为Analyst®软件(Ver. 1.6.2)。离子源:ESI,正离子模式。一级质谱图(Q1 scan)扫描的质量范围是50~500。对准分子离子母离子进行Enhanced Product Ion (EPI)扫描,得到二级质谱图。

2.2 杂质的合成

根据确定的结构式,设计合成路线进行主要杂质的合成。

2.3 杂质标准物质的研制

2.3.1 结构分析

(1)质谱分析 取他唑巴坦杂质A原料适量,以乙腈-水(1:5)为溶剂溶解并稀释成约0.5 mg/mL的溶液,用于质谱分析。质谱仪型号为6500QTrap;工作站为Analyst®软件。离子源:ESI,正离子模式。一级质谱图(Q1 scan)扫描的质量范围是50~500。对准分子离子母离子进行EPI扫描,得到二级质谱图。根据准分子离子峰[M+H]⁺判断相对分子质量。

(2)红外分析 取他唑巴坦杂质A原料约1 mg,置玛瑙研钵中与约干燥KBr 200 mg混合,缓缓研磨至细,压片。采用红外光谱仪测定各杂质

的红外光谱,工作站为OPUS光谱分析软件(Ver. 5.5)。

(3)核磁共振波谱分析 取他唑巴坦杂质A约10 mg置于石英核磁管中,用D₂O 0.5 mL为溶剂溶解,作为供试品溶液。采用配有CryoProbe Prodigy探头的核磁共振仪对杂质原料分别做¹H NMR谱、¹³C NMR谱、DEPT 90°谱、DEPT 135°谱、¹H-¹H COSY谱、HSQC谱和HMBC谱。

2.3.2 均匀性分析 从制备的2 900瓶样品中随机抽取12瓶样品,每瓶称取2份,每份质量约为10 mg,采用纯度分析的液相色谱条件,以峰面积与对应称样量之比为评价指标,通过瓶间方差和瓶内方差的比较以判断样品的均匀性。如果两者之比小于95%置信水平对应F检验的临界值,则认为样品是均匀的。

2.3.3 稳定性分析 考察样品在实验色谱条件下溶液的稳定性,为确定样品的具体实验方案提供依据。目前标准物质原料短期稳定性考察主要是为样品选择合适的运输条件提供依据,为节约运输成本,首先考察了样品在常温(25℃)条件下0、3、5和10 d的稳定性,每个实验条件考察3支独立样品。

2.3.4 对照品赋值分析

(1)纯度分析 目前美国药典(USP41-NF36)、中国药典二部(2015年版)和日本药典(JP17)均收录了他唑巴坦原料的质量标准,USP与JP色谱条件基本一致。实验中发现他唑巴坦杂质A在酸性溶液中不稳定,容易降解,而中国药典和美国药典他唑巴坦有关物质检查方法中流动相和样品溶剂均偏酸性,因此在其纯度分析时未采用上述药典方法,而是参考文献[8],最终采用10 mmol/L醋酸铵水溶液-乙腈(98:2)为流动相和溶剂,色谱柱采用DIKMA, Inertsil ODS-2 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。采用Waters 2695 Alliance液相色谱仪。

(2)水分分析 精密称取杂质原料约30 mg,采用滴定仪,按中国药典四部(2015年版)通则0832水分测定法第一法(费休氏法)测定杂质的水分含量,溶剂为甲醇。

(3)无机杂质分析 炽灼残渣含量反映样品中无机杂质的量,采用中国药典四部(2015年版)通则0841炽灼残渣检查法测定。

(4)对照品赋值 采用质量平衡法对对照品

进行赋值。质量平衡法,即测得的活性成分的含量加上有机杂质、水分、残留溶剂、无机杂质的含量之和应为 100%。计算公式:含量(%)=(1-有机杂质的质量分数)×(1-水的质量分数-挥发性物质的质量分数-无机杂质的质量分数)×100。

采用 zg30 脉冲序列测定样品溶液的 ^1H NMR 图谱,测定温度 298 K,观测频率 400.13 MHz,90°脉冲宽度 11.07 μs ,扫描次数 16 次,延迟时间 10 s。以样品化学位移 $\delta=7.794$ 的信号峰为定量峰,顺丁烯二酸为内标($\delta=5.907$),测定待测物的含量,对质量平衡法测定结果进行确证。

3 结果

3.1 中国药典(2015 年版)他唑巴坦原料药有关物质检查方法系统适用性试验溶液中最大杂质的鉴别

按照中国药典二部中他唑巴坦原料药有关物质检查方法规定的原位降解要求,制备系统适用性试验溶液,其色谱图如图 1 所示。在相对他唑巴坦峰保留时间 0.4 左右的位置出现一个较大杂质,目前中国药典标准要求他唑巴坦峰与其之间的分离度应不小于 10。文献[9]记载他唑巴坦在体内会部分代谢为一种没有活性的产物,结构如图 2,该代谢产物也可以通过 NaOH 水溶液降解产生,另外他唑巴坦粉末或者冻干粉末也会热降解产生该杂质^[10]。经检索,USP41 已经收录了该杂质,命名为他唑巴坦有关物质 A(tazobactam related compound A,分子式: $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$; CAS: 118175-11-4)。由此推测,中国药典(2015 年版)中他唑巴坦有关物质系统适用性试验溶液所产生的最大杂质可能为 USP41 收录的他唑巴坦有关物质 A。于是购买 USP 该对照品进行确认,经比对发现最大杂质与他唑巴坦有关物质 A 有相同的紫外末端吸收、HPLC 保留时间基本一致,质谱数据显示两者均出现 249 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰,初步确认两者为同一物质。

3.2 最大杂质原料的合成

根据文献[8]记载的方法,按路线 1 合成他唑巴坦杂质 A 原料 100 g,纯度大于 98%。

3.3 他唑巴坦杂质 A 结构确证

分别采用红外、质谱和核磁共振波谱对合成的他唑巴坦杂质 A 的结构进行了确证。

3.3.1 质谱推断 合成的他唑巴坦杂质 A 原料

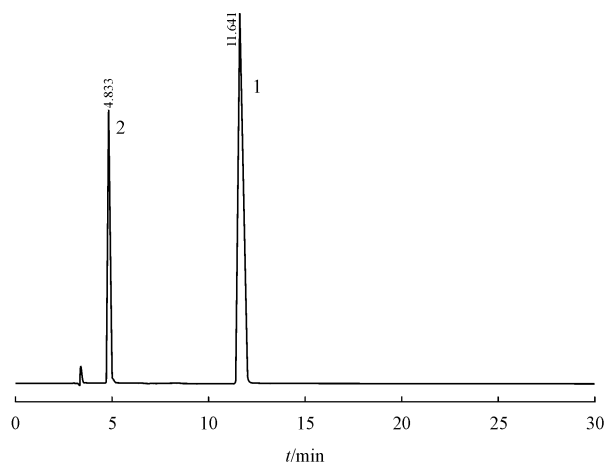


Figure 1 Chromatogram of the system applicability solution under the inspection item of tazobactam API related substances in Part 2 of Chinese Pharmacopoeia 2015

1:Tazobactam; 2: Maximum impurity produced by degradation

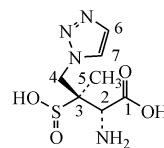
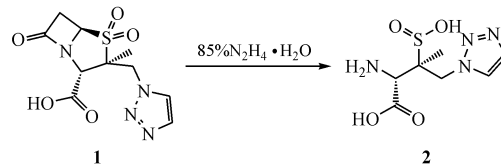


Figure 2 Structure of tazobactam impurity A



Scheme 1 Synthetic route of tazobactam impurity A

电喷雾电离质谱(ESI-MS)显示他唑巴坦杂质 A 与 H^+ 形成准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$,质荷比(m/z)为 249.0,与其理论相对分子质量 248.1 相符合。

3.3.2 红外确证 红外光谱(图 3)显示,合成的他唑巴坦杂质 A 原料与 USP 他唑巴坦有关物质 A 标准物质红外图谱基本一致。

3.3.3 核磁共振波谱确证 通过核磁共振波谱进一步确证合成的他唑巴坦杂质 A 原料的结构。他唑巴坦杂质 A 原料的氢谱、 ^1H - ^1H COSY 谱、碳谱、DEPT(90°/135°)谱和 HMBC 谱数据及解析详见表 1 和表 2。他唑巴坦杂质 A 原料氢谱数据与文献[11]报道基本一致。通过解析可知,他唑巴坦杂质 A 原料 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱中各峰的化学位移值与其化学结构式:(2S,3S)-2-氨基-3-甲基-3-亚磺酸基-4-(1H-1,2,3-三氮唑-1-基)-丁酸相吻合,所有峰均能在结构式中找到明确合理

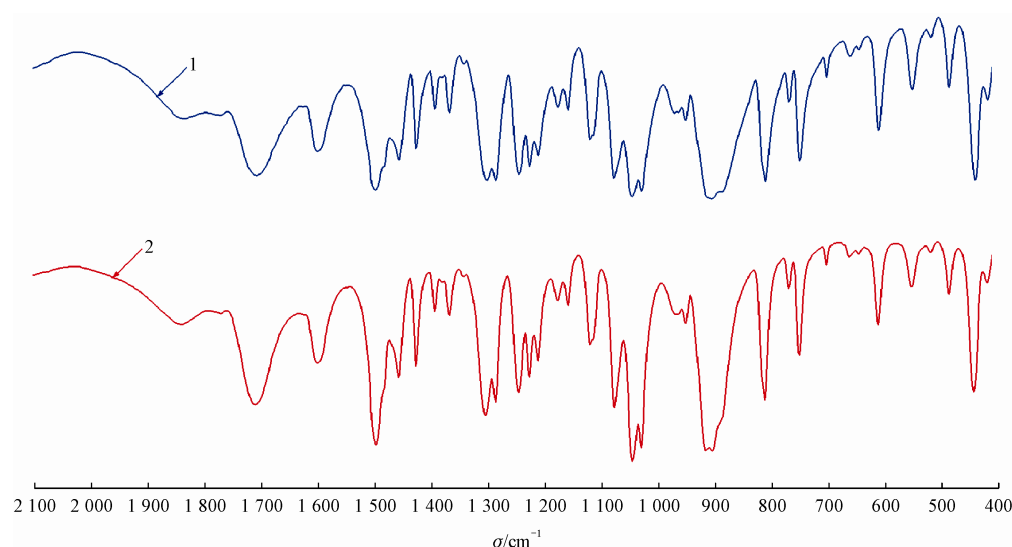


Figure 3 Infrared absorption spectrum of tazobactam impurity A and tazobactam related compound A contained in USP

1:Tazobactam impurity A;2:Tazobactam related compound A

的指认,与 USP 他唑巴坦有关物质 A 对照品基本一致。

Table 1 ^1H NMR (D_2O) data analysis for tazobactam impurity A

Chemical shift/ δ	Proton number	Multiplicity	Related proton ^1H - ^1H COSY	Resonance assignment
0.970	3	s	—	5- CH_3
3.531	1	s	—	2-CH
4.708	2	s	—	4- CH_2
7.781	1	s	2-H	6-H
8.062	1	s	1-H	7-H

Table 2 ^{13}C NMR (D_2O) data analysis for tazobactam impurity A

Chemical shift/ δ	Resonance assignment	DEPT ($90^\circ/135^\circ$)	HMBC (H to C)
11.94	5	CH_3	C-1, 2, 4
50.04	4	CH_2	C-7, 5, 2, 1
58.47	2	CH	C-4, 5, 3, 1
61.03	1	C	
127.71	7	CH	C-4, 6
133.35	6	CH	C-7
178.52	3	C	

3.4 他唑巴坦杂质 A 原料均匀性和稳定性分析

对均匀性评价指标——24 份峰面积与对应称样量之比做 F 检验,在 95% 置信范围内,瓶间和瓶内 F 为 0.61,小于 $F_{0.05(11,12)}(2.79)$,证明瓶间与瓶内不存在显著性差异,该原料的均匀性良好。

实验中发现,采用中国药典二部(2015 年版)

他唑巴坦原料有关物质检查的色谱条件,平行实验 5 份样品,他唑巴坦杂质 A 面积归一化纯度均值仅为 88.1% (RSD=1.96%),与合成公司交付色谱纯度(>98%)存在较大差异,怀疑样品发生降解。于是结合文献[8]重新摸索样品色谱纯度测定条件,最终采用 10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈(98:2)为流动相和溶剂,等度洗脱,230 nm 为检测波长,测定不同稳定性考察的样品。以他唑巴坦杂质 A 面积归一化纯度为评价指标,观察不同时间结果的变化趋势。结果显示同一样品溶液在 8 h 内的 5 次进样,230 nm 处结果面积归一化纯度均值为 99.1% (RSD=0.14%),且在紫外全波长范围内 210~400 nm 未检出明显杂质峰,证明样品在该溶液中稳定。短期稳定性实验结果显示他唑巴坦杂质 A 面积归一化纯度在 0、3、5 和 10 d 的均值均为 99.1%,未发现降解趋势,证明样品在室温下 10 d 内稳定。对于样品的长期稳定性数据需要根据保存时间逐步考察并补充完善。

3.5 他唑巴坦杂质 A 原料赋值

采用质量平衡法计算他唑巴坦杂质 A 原料的含量。首先需要进行纯度分析,确定所含有机杂质的多少。另外还需要分别确定水分、残留溶剂和无机杂质。根据原料的合成路线排除了残留有机溶剂的可能,因此仅使用残留溶剂数据库^[11]对未知有机溶剂进行初筛,未检测到任何影响定量的有机溶剂峰。最后由有机杂质 0.90%、水分

1.24% 和无机杂质(炽灼残渣)0.25%,计算出他唑巴坦杂质 A 原料的含量为 97.6%,与核磁共振波谱定量结果 97.1% 基本一致。

4 结 论

本研究对中国药典(2015 年版)他唑巴坦质量标准中含量和有关物质检查项使用的原位降解方法得到的系统适用性溶液进行成分分析,确定了其中主要杂质的结构,并根据结构合成制备了该杂质标准物质,若使用该标准物质与他唑巴坦直接配置系统适用性溶液将使得标准操作更加简便易行,同时文献也检索到该杂质为他唑巴坦的降解产物,实验证明其在酸性环境下不稳定,则该标准物质的研制也为下一步提高他唑巴坦质量标准奠定了基础。

References

- [1] National Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia part four(中华人民共和国药典:四部)[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 34-35.
- [2] Singh DK, Sahu A, Kumar S, *et al.* Critical review on establishment and availability of impurity and degradation product reference standards, challenges faced by the users, recent developments, and trends[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, **101**: 85-107.
- [3] Rose U. *In situ* degradation: a new concept for system suitability tests in monographs of the *European Pharmacopoeia* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, **18**(1/2): 1-14.
- [4] Zhang WQ, Hu CQ. Theory of selectivity of RP-LC C₁₈ column and its application[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, **45**(5): 555-559.
- [5] Li W, Zhang WQ, Li Q, *et al.* Development and application of reference materials containing mixed degradation products of amoxicillin and ampicillin[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2014, **49**(9): 1310-1314.
- [6] Bai GY, Ma GQ, Hou ML, *et al.* Development of β -lactamase inhibitors[J]. *Chem Ind Eng* (化学工业与工程), 2001, **18**(6): 395-400.
- [7] Feng YC, Wang C, Tian Y, *et al.* Establishment of national reference standard of fluconazole impurity H[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2018, **53**(17): 1516-1522.
- [8] Lee VJ, Lenhard R, Cesark FF, *et al.* An efficient degradation of tazobactam, a beta-lactamase inhibitor, to metabolite M-1[J]. *Synth Commun*, 1994, **24**(11): 1597-1601.
- [9] Marunaka T, Maniwa M, Matsushima E, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of a new beta-lactamase inhibitor and its metabolite in combination therapy with piperacillin in biological materials[J]. *J Chromatogr*, 1988, **431**(1): 87-101.
- [10] Marunaka T, Matsushima E, Minami Y, *et al.* Degradation of beta-lactamase inhibitor, (2S, 3R, 5S)-3-methyl-7-oxo-3-(1H-1, 2, 3-triazol-1-yl-methyl)-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylic acid 4, 4-dioxide (YTR-830H), in aqueous solutions and alkaline methanol solution: pathway and structural elucidation of products [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1988, **36**(11): 4478-4487.
- [11] Liu Y, Hu CQ. Fundamental research and application of the knowledge base for residual solvent determination in pharmaceuticals[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, **27**(12): 1938-1943.