

# 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中有关物质的HPLC/MS定性研究

林梅

(福建省福抗药业股份有限公司,福建 福州 350002)

**摘要:** 本文建立了高效液相色谱串联质谱(HPLC/MS)定性分析7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中有关物质的研究方法。首次实现对7-氨基头孢烷酸(7-ACA)有关物质结构的质谱研究。实验结果表明,在7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中有7个有关物质,分别为去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)、去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)、头孢菌素(CPC)、去乙酰-7-氨基头孢烷酸内酯(D-7-ACA lactone)、去乙酰CPC脱OH的衍生物、CPC的开环衍生物和CPC-Na。

**关键词:** 7-氨基头孢烷酸;有关物质;高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:O657.63 文献标识码:A 文章编号:1009-8143(2011)06-0041-05

## Identification of Related Substances in 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA) by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Lin Mei

(Fujian Fukang Pharmaceutical Co. Ltd., Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** Related substances in 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA) were detected and identified by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. The structures of the related substances in 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA) were first studied by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Seven related substances in 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA) were observed. Based on the MS spectrometric data, the structures of the related substances were elucidated as deacetyl-7- aminocephalosporanic acid (D-7-ACA), deacetoxy-7- aminocephalosporanic acid (DO-7-ACA), cephalosporin (CPC), deacetyl 7- aminocephalosporanic acid lactone(D-7-ACA lactone), dehydroxy derivative of deacetyl CPC, open-loop derivative of CPC and CPC-Na.

**Keywords:** 7-Aminocephalosporanic Acid ; Related substance ; High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

头孢菌素类抗生素是一族 $\beta$ -内酰胺广谱抗生素,通过干扰细菌细胞壁的合成并加速细胞壁的破坏而起到杀菌作用,具有抗菌谱广、抗菌活性强、疗效高、毒性低等优点,近年来使用越来越广泛。7-氨基头孢烷酸(7-ACA)是合成许多半合成头孢菌素类抗生素的重要中间体,是当今国际抗生素的主要角色<sup>[1-2]</sup>,结构如图1所示。有关物质的研究一直是药物药理学研究和评价中的重点和难点,对有关物质的定性研究具有重要的意义,已成为有关物质研究技术要求的重要组成部分,受到广泛关注。7-氨基头孢烷酸(7-ACA)在生产过程中会引入少量有关物质。7-氨基头孢烷酸(7-ACA)有关物质的

HPLC研究已有报道<sup>[3-4]</sup>,表明7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中含有有关物质去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)、去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)和头孢菌素(CPC)等。然而其有关物质的质谱研究尚鲜见报道。本研究采用HPLC/MS法定性分析了7-氨基头孢烷酸(7-ACA)样品中的有关物质,通过质谱信息确证了7-氨基头孢烷酸(7-ACA)样品主要有关物质去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)、去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)和头孢菌素C(CPC),并推测了其余未知有关物质的化学结构。

收稿日期:2011-6-27

作者简介:林梅(1961~),女,高级工程师,从事药物分析及药品质量管理工作。Email: meilin61@126.com

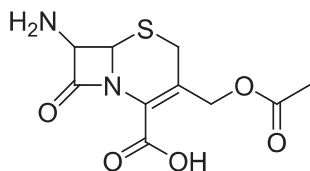


图1 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)分子结构

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Agilent 1200 Series HPLC System (美国 Agilent 公司); 高效液相质谱联用仪 Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (美国 Agilent 公司); 3510 pH Meter 型 pH 计 (英国 Jenway 公司); Thermo scientific Bamstead EASY pure II 型 Milli-Q 超纯水纯化系统 (美国 Thermo 公司); 混匀器 (金坛市新航仪器厂); XS 105 Dual Range 型分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯 (Merck 公司); 甲酸为色谱纯 (TED IA 公司); 醋酸均购自 Fisher 公司, 分别为痕量金属级和分析纯; 水为超纯水; 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 样品 (福建省福抗药业股份有限公司)

### 1.2 溶液配制

0.1% 醋酸水溶液: 准确量取 1L 超纯水, 准确加入 1mL 醋酸, 混合均匀, 待用; 0.02M 醋酸铵水溶液: 准确称取 1.5416g 醋酸铵, 将其溶解在 1L 超纯

水中, 用玻璃棒搅拌使其溶解, 用醋酸调节 pH 至 5.5, 过滤, 待用; 0.1% 甲酸水溶液: 准确量取 1L 超纯水, 准确加入 1mL 甲酸, 混合均匀, 待用。

样品配制: 准确称取 10mg 7-氨基头孢烷酸, 将其置于 10mL 容量瓶中, 加入适量 0.02M 醋酸铵水溶液, 使其溶解, 用 0.02M 醋酸铵水溶液定容至刻度线, 待用。

表1 流动相梯度洗脱程序

Time, min	0.1% formic acid aqueous solution, %	ACN, %
3	95	5
3.1	90	10
10	70	30
20	70	30
20.1	95	5

后运行 2m in

### 1.3 液相色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 analytical column (4.6 × 250mm, 5 μm) (美国 Agilent 公司); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 35°C; 进样量: 50 μL; 检测波长: 263nm。

### 1.4 质谱分析条件

电喷雾离子源, 正离子扫描模式; 载气前压: 50psi; 干燥气流速: 10L/min; 干燥气温度: 350°C; 质

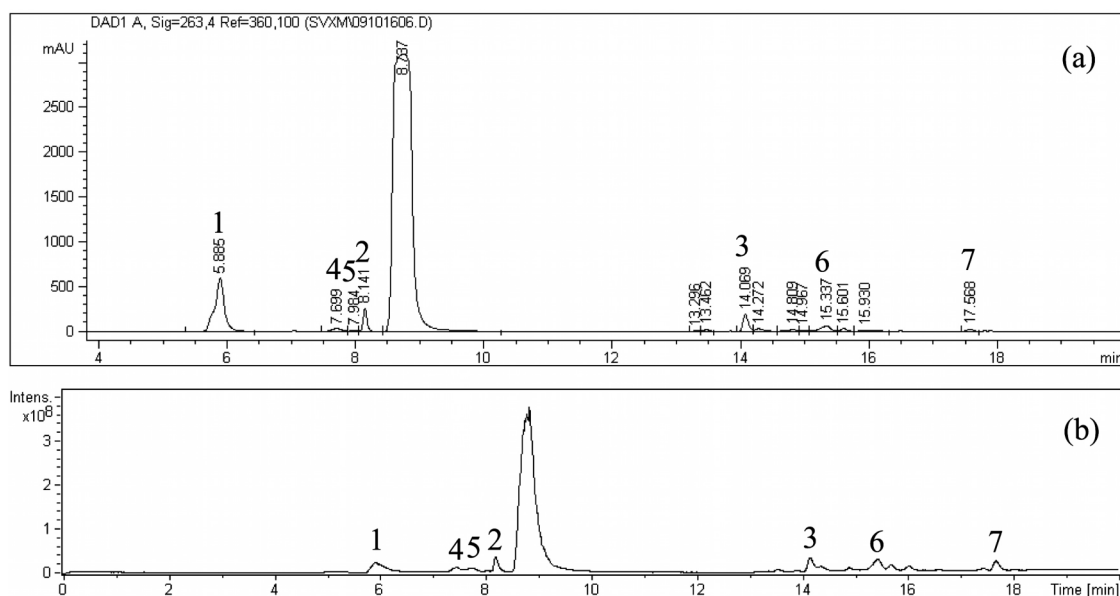


图2(a) 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的HPLC-UV谱图

(b) 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的HPLC MS总离子流图

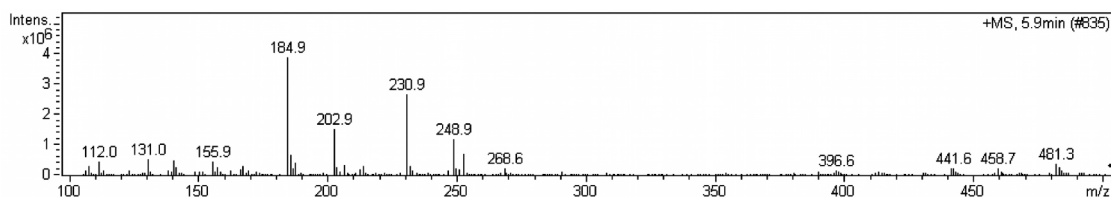
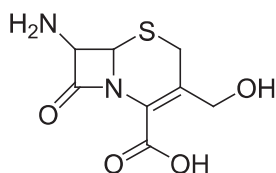
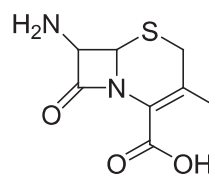


图3 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)在5.59min处的一级质谱图



1 (D-7-ACA)  
 $C_8H_{10}N_2O_4S$   
 Exact Mass: 230.04

图4 有关物质1(D-7-ACA)的结构



2 (DO-7-ACA)  
 $C_8H_{10}N_2O_3S$   
 Exact Mass: 214.04

图6 有关物质2(DO-7-ACA)的结构

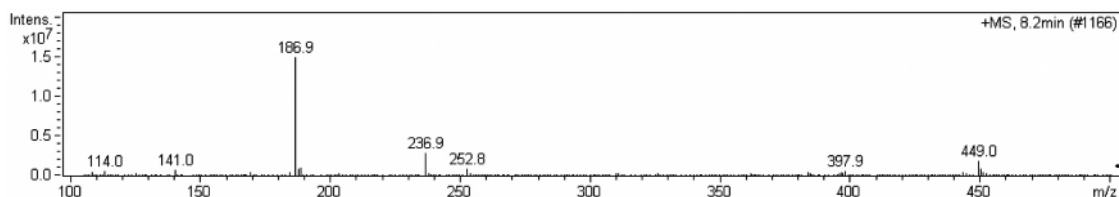


图5 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)在8.2min处的一级质谱图

量扫描范围:100-800。

## 2 结果与讨论

以优化后的 HPLC 方法对 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)样品进行研究,所得色谱图如图 2(a)所示,主成分 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的保留时间为 8.737min,可观察到 7 个有关物质,保留时间分别为 5.885min、7.699min、7.984min、8.141min、14.069min、15.337min 和 17.568min,在图 2 中分别用 1、4、5、2、3、6 和 7 表示(如图 2 所示)。在正离子检测方式下,7-氨基头孢烷酸(7-ACA)样品的总离子流图如图 2(b)所示,与色谱图显示一致,可观察到 7 个有关物质。

### 2.1 有关物质 1 (去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA))的确定

有关物质 1 的质谱图如图 3 所示,可观察到该物质的  $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$  和  $[M+K]^+$  峰  $m/z$  230.9、252.9 和 268.6,判断该物质的分子量为 230,与去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)的分子量相同。该分

子量与 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)相比分子量少 42,而乙酰基的分子量为 42,因此判断该有关物质为 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)去乙酰产物。根据其二级质谱碎片的  $m/z$ (131.0、142.0、185.0、187.9、203.0 和 213.9)可以进一步确证该有关物质即为去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA),结构如图 4 所示。

### 2.2 有关物质 2 (去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA))的确定

有关物质 2 的质谱如图 5 显示。可观察到该物质的  $[M+Na]^+$  和  $[M+K]^+$  峰  $m/z$  236.9 和 252.8,判断该物质 2 的分子量为 214。该分子量与去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)的分子量一致,比去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)少一个氧原子的分子量 16,因此判断为比去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)脱掉一个氧形成。根据其二级质谱碎片的  $m/z$ (184.9)可以进一步确证该有关物质即为去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA),结构如图 6 所示。

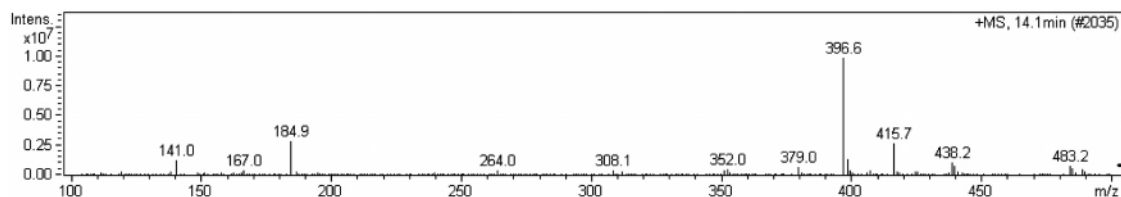
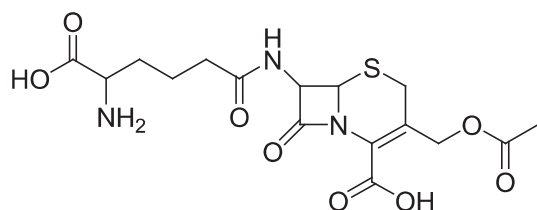


图7 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)在14.1 min处的一级质谱图

### 2.3 有关物质3(头孢菌素C(CPC))的确定

有关物质3的一级质谱图如图7所示,可观察到该物质的  $[M+H]^+$  和  $[M+Na]^+$  峰  $m/z$  415.7 和 438.2,判断该物质的分子量为 415。该分子量与头孢菌素 C(CPC)的分子量一致,根据其它碎片  $m/z$  进一步确证了该有关物质即为头孢菌素 C(CPC),结构如图8所示。



3 (CPC)  
C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S  
Exact Mass: 415.1

图8 有关物质3(CPC)的结构

### 2.4 有关物质4、5、6和7研究

在7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的色谱中,除观测到存在去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)、去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)和头孢菌素(CPC)外,还观察到4个未知的有关物质(以4、5、6和7表示)。从有关物质1、2和3的质谱图中含有  $m/z$  为 184.9 和 186.9 的碎片峰,因此判断  $m/z$  为 184.9 和 186.9 的碎片峰为头孢类物质的特征碎片

峰,对应于头孢类的特征结构 8-氧代-5-硫杂-1-氮杂二环[4.2.0]-2-烯-2-甲醛。从4个未知的有关物质的一级质谱所得与各有关物质对应的  $m/z$  信息总结于表2,  $m/z$  为 184.9 的碎片峰同样出现在有关物质4、5和7的质谱信息中。结果表明 212.9、234.9 和 250.8 分别为有关物质4的  $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$  和  $[M+K]^+$  峰,判断该物质分子量为 212,与去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)比少一个中性水分子的分子量 18,推测该有关物质为去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)脱水分子形成的去乙酰-7-氨基头孢烷酸内酯(deacetyl-7-ACA lactone, D-7-ACA lactone), 361.8 和 383.9 分别为有关物质5的  $[M+H]^+$  和  $[M+Na]^+$ ,判断该物质为去乙酰CPC脱羟基的衍生物;由于有关物质6的相关  $m/z$  未出现  $m/z$  为 184.9 等头孢类物质的特征碎片峰,因此判断头孢类物质的特征结构 8-氧代-5-硫杂-1-氮杂二环在该物质结构中已被破坏,该有关物质的分子量为 406,判断为CPC的开环衍生物;从有关物质7的碎片  $m/z$  可判断该物质的分子量为 437,与CPC的Na盐(CPC-Na)的分子量一致,根据各碎片与CPC-Na间可能的断裂关系,推测有关物质7即为CPC-Na。推测所得有关物质4、5、6和7的可能结构如图9所示。

表2 有关物质4、5、6和7在一级质谱中的  $m/z$

ID	RT, time	$m/z$
4	7.699	184.9, 212.9, 234.9, 250.8
5	7.984	184.9, 230.9, 326.9, 361.8, 383.9
6	15.337	378.8, 406.6
7	17.568	184.9, 299.0, 326.8, 386.2, 403.0, 403.9, 408.4, 425.0, 438.0

## 3 结论

本文建立了高效液相色谱串联质谱(HPLC-ion trap-MS)定性分析7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中有

关物质的研究方法。研究首次确定了在7-氨基头孢烷酸(7-ACA)中的主要有关物质为去乙酰-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)、去乙酰氧-7-氨基头孢烷酸(DO-7-ACA)和头孢菌素(CPC),并推测出4个未知有关物质的结构,分别为去乙酰-7-氨基头

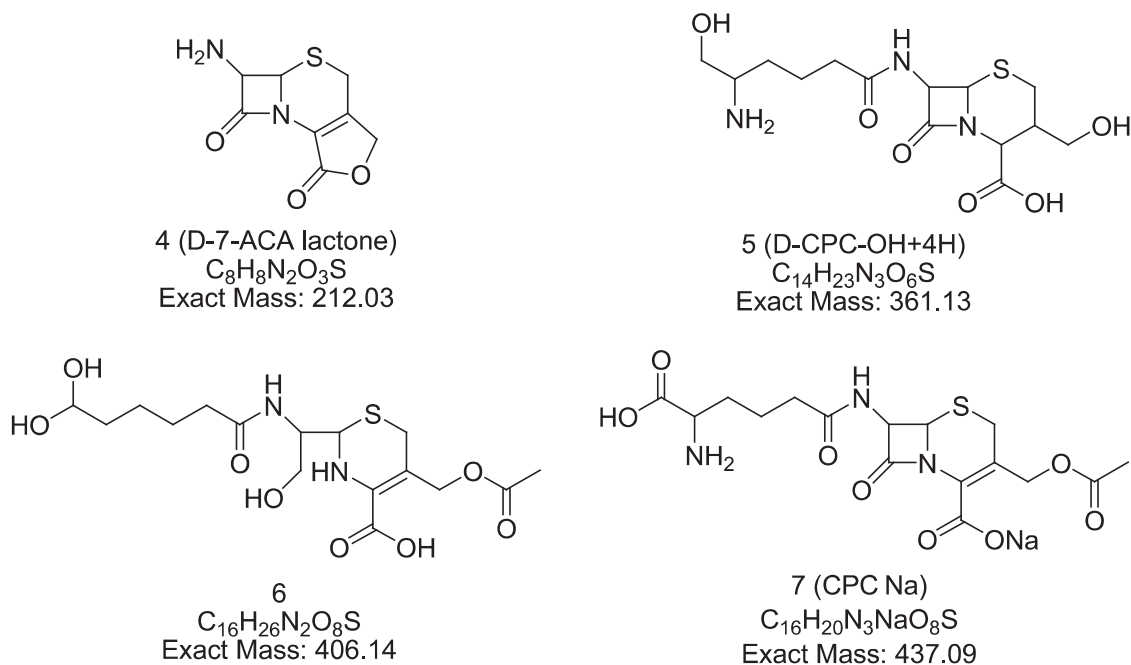


图9 有关物质4、5、6和7的结构

孢烷酸内酯(D-7-ACA lactone)、去乙酰CPC脱OH的衍生物、CPC的开环衍生物和CPC-Na, 为7-氨基头孢烷酸(7-ACA)生产过程的质控提供重要的依据。

本文得到博分(厦门)医药研发有限公司林珊、江秋菊的帮助, 在此表示感谢!

### 参考文献

- [1] A. A. Alwarthan, S. Abdelfattah and N. M. Zahran. Spectrophotometric Determination of 7-Aminocephalosporanic Acid with Imidazole Reagent [J]. Anal. Lett., 1911, 24(2): 249.
- [2] Nadenik et al. Precipitation process of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) [P]. United States: 6518420, 2003-2-11.
- [3] C. V. Shabadi, B. A. Shelar and A. R. Shelar. Simultaneous determination of 7-amidoxycarbonylcephalosporanic acid (7-ADCA) and 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) by reverse-phase HPLC [J]. Indian Drugs, 1997, 34(9): 508.
- [4] 曾晓军. 高效液相色谱法测定7-氨基头孢烷酸含量及其有关物质 [J]. 海峡药学, 2003, 15(3): 16.
- [1] A. A. Alwarthan, S. Abdelfattah and N. M. Zahran. Spec-