

LC-MS/MS 法对法罗培南钠中有关物质的研究

秦芳, 丁娅*, 杭太俊**, 宋敏

(中国药科大学药物分析学教研室, 南京 210009)

摘要 采用 LC-MS/MS 法对法罗培南钠中有关物质进行鉴定研究。采用 Lichrospher ODS-3 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.2% 醋酸铵-0.5% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 线性梯度洗脱, 对法罗培南钠有关物质进行分离; LC-PDA 测定各有关物质的紫外吸收, 柱后添加乙腈辅助 LC-MS/MS 测定各有关物质的二级质谱, 并进行解析。在所建立条件下, 法罗培南钠及其各有关物质分离良好, 检测出 5 个有关物质, 对其进行结构解析。结果显示, 法罗培南钠原料药中的有关物质为其降解产物和聚合物。制剂中有关物质的种类和含量较原料药均有所增加, 加热处理样品后有关物质含量显著增加。建立的 LC-MS/MS 法有效地分离分析了法罗培南钠及有关物质, 为其质量控制和工艺优化提供参考。

关键词 法罗培南钠; 有关物质; LC-MS/MS

中图分类号 R917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)04-0342-06

Identification of the related substances in faropenem sodium by LC-MS/MS

QIN Fang, DING Ya*, HANG Tai-jun**, SONG Min

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract An LC-MS/MS method was established for the identification of the related substances in faropenem sodium. HPLC separation was carried out on Lichrospher ODS-3 column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with a mobile phase consisting of 0.2% ammonium acetate and 0.5% formic acid aqueous solution and pure acetonitrile. The results were obtained by PDA and post-column acetonitrile aided positive ESI-MS and tandem mass spectrometry. Good resolution of faropenem sodium and its main related substances was achieved. Five related substances in faropenem sodium were detected by LC-MS/MS. Compared with the bulk pharmaceutical, the number and contents of the impurities in the preparations increased, especially after stress test in solutions with an elevated temperature. The established method is effective in the separation and identification of the related substances in faropenem sodium and the results are useful for its quality control.

Key words faropenem sodium; related substances; LC-MS/MS

法罗培南钠(faropenem sodium), 化学名为(5*R*, 6*S*)-6-[(1*R*)-1-羟乙基]-7-羧基-3-[(2*R*)-4-氢-2-呋喃基]-4-硫杂-1-氮杂双环[β.2.0]庚-2-烯-2-羧酸钠, 是第 1 个青霉烯类抗生素, 既可口服使用又可注射使用。对多种 β-内酰胺酶稳定, 药效强、抗菌谱广, 临床使用安全有效。

青霉烯类抗生素作为新型 β-内酰胺类抗生素已越来越多地应用于临床。同其他 β-内酰胺类抗生素一样, 其常见不良反应是速发型过敏反应。研究表明, 该类抗生素导致过敏反应的真正原因是在

其生产、贮存、使用过程中产生的降解产物及高分子聚合物等^[1]。因此, 对法罗培南钠中的有关物质进行控制十分必要。目前法罗培南钠有关物质的研究报道^[2-3]较少, 且均采用 HPLC-UV 方法测定, 仅对有关物质总量或单个有关物质含量限度进行控制, 未见其有关物质结构的系统鉴定研究报道。

本文建立了适用于法罗培南钠有关物质研究的 LC-PDA 分析法, 并通过柱后添加乙腈的 LC-MS/MS 法对法罗培南钠有关物质进行了质谱测定

* 收稿日期 2011-03-31 通讯作者 * Tel/Fax: 025-83271090 E-mail: ayanju@163.com

** Tel/Fax: 025-83271090 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

与解析,推测它们的可能结构,可为其质量控制和工艺优化提供参考。

1 材 料

1.1 药品与试剂

法罗培南钠(原料药和片剂,深圳致君制药有限公司,批号 20090901);乙腈(色谱纯,美国 ROE 公司);甲酸、醋酸铵均为市售分析纯,实验用水为自制纯净水。

1.2 仪 器

TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪(美国 Thermo Finnigan 公司);LC-2010C HT 高效液相色谱系统(日本岛津公司)。

2 方 法

2.1 液相色谱条件

色谱柱: Lichrospher ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温: 25 ℃;0.2% 醋酸铵-0.5% 甲酸水溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,线性梯度洗脱: 0 min (93% A ~ 7% B)→20 min(70% A ~ 30% B)→30 min (30% A ~ 70% B)→32 min(30% A ~ 70% B)→33 min(93% A ~ 7% B);流速: 1.0 mL/min;进样量: 20 μL。HPLC 以 7:3 分流,分别进行 PDA 和 MS 检测,PDA 检测波长范围 200~400 nm。

2.2 质谱条件

喷雾电压: 5 000 V;雾化气压: 275.8 kPa;辅助气压力: 68.9 kPa;毛细管温度: 200 ℃;扫描范围: m/z 200~700;二级质谱扫描碰撞气氦气压力: 0.10 Pa;碰撞能量: 20 eV。

2.3 供试品溶液的制备

取法罗培南钠原料药或片剂适量(约相当于法罗培南钠 5 mg),置 10 mL 量瓶中,加入流动相 A 超声使溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液;取其适量,置 80 ℃ 水浴中加热 5 min,冷却后作为加热破坏溶液。

3 结 果

法罗培南钠属 β -内酰胺类抗生素,在制剂制备、贮藏和运输过程中,可能发生 β -内酰胺的开环水解或聚合,从而形成多种有关物质^[4]。

按“2.1”和“2.2”项下色谱和质谱条件,通过联用技术测定,得到其 LC-PDA 和 LC-MS 图谱。结果(图 1)表明,法罗培南钠原料药中可以检测到 5 个有关物质峰。再根据所测得各有关物质的二级质谱进行解析,推测其合理结构(表 1)。

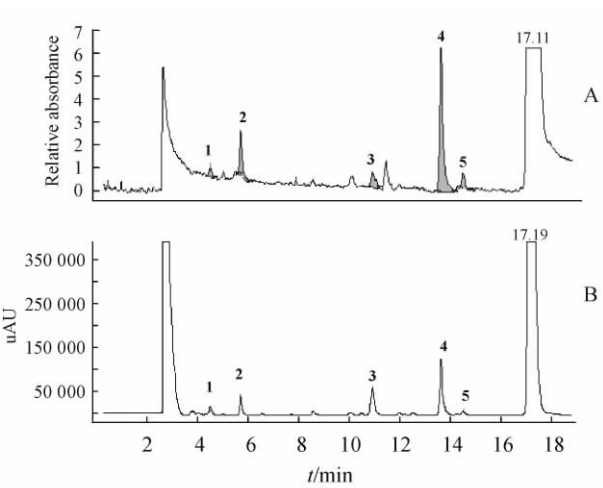


Figure 1 Total ion (A) and PDA (B) chromatograms of faropenem and the related substances. Peaks 1-5 refer to Table 1

Table 1 Related substances of faropenem identified by LC-MS/MS

Peak No.	Parent ion(m/z)	t_R /min	Formula	Product ions (m/z)
1	304	4.4	$[C_{12}H_{18}NO_6S]^+$	260,242,224,200,182,178,152
2	304	5.6	$[C_{12}H_{18}NO_6S]^+$	260,242,224,200,182,178,152
3	302	10.8	$[C_{12}H_{16}NO_6S]^+$	258,240,222,204,198
4	332	13.6	$[C_{14}H_{22}NO_6S]^+$	260,242,224,200,182,178,152
5	571	14.4	$[C_{24}H_{31}N_2O_{10}S_2]^+$	467,439,397,260,224
Faropenem	286	17.1	$[C_{12}H_{16}NO_5S]^+$	200,182,164,154,136

3.1 有关物质峰 1 和 2

ESI⁺-MS 测得有关物质峰 1 和 2 均含有 m/z 为 304 和 326 的加合离子峰,分别与 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 相应,故它们的相对分子质量均为 303,与法罗培南相对分子质量 285 相比多 18,与一个水

分子单元相应。推测,有关物质峰 1 和 2 均与法罗培南的 β -内酰胺开环水解产物($C_{12}H_{17}NO_6S$, $Mr=303$)相应,并因内酰胺羰基 α 碳的手性不同而互为对映异构体。所以,它们的一级、二级质谱图及主要碎片完全相同(图 2)。裂解过程如图 3 所示。

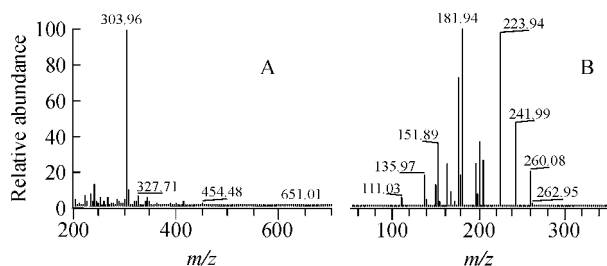


Figure 2 MS fullscan (A) and product ion scan (B) of m/z 304 ion of impurity peak 2

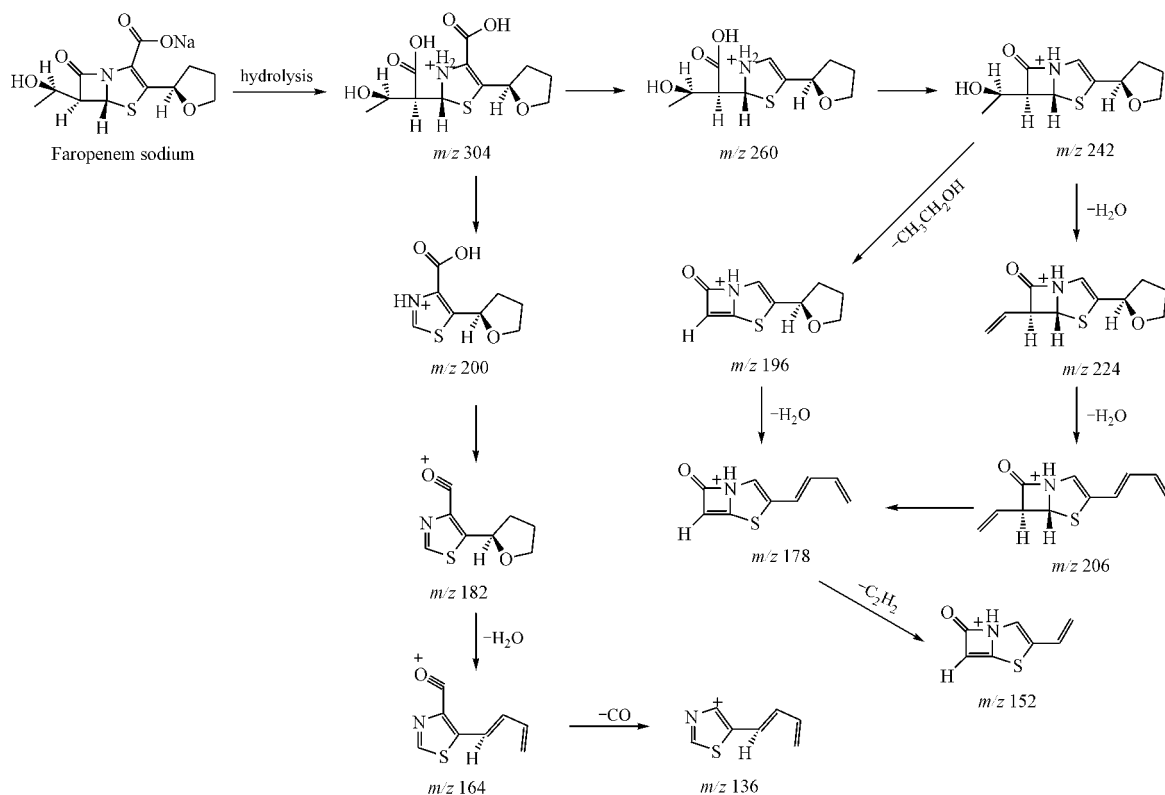


Figure 3 Proposed fragmentation pathways of impurity peaks 1 and 2

3.2 有关物质峰 3

ESI⁺-MS 测得有关物质峰 3 的主要加合离子峰 m/z 为 302 和 319, 分别与 $[M+H]^+$ 和 $[M+NH_4]^+$ 相应, 故其相对分子质量为 301, 比法罗培南的相对分子质量多 16。有文献报道^[4], 头孢地尼(与法罗培南结构相近)有 5 位硫氧化物, 结合 $[M+H]^+$ 离子的一级、二级质谱信息(图 4), 推测有关物质峰 3 与法罗培南的 4 位硫氧化物 ($C_{12}H_{15}NO_6S$, $Mr = 301$) 相应。裂解过程如图 5 所示。

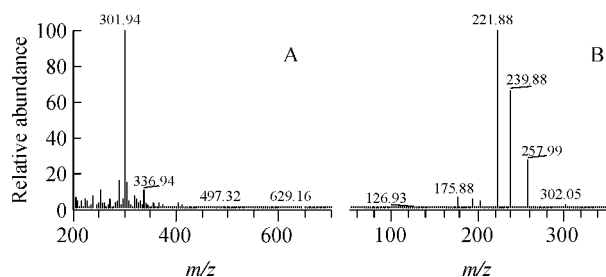


Figure 4 MS fullscan (A) and product ion scan (B) of m/z 302 ion of impurity peak 3

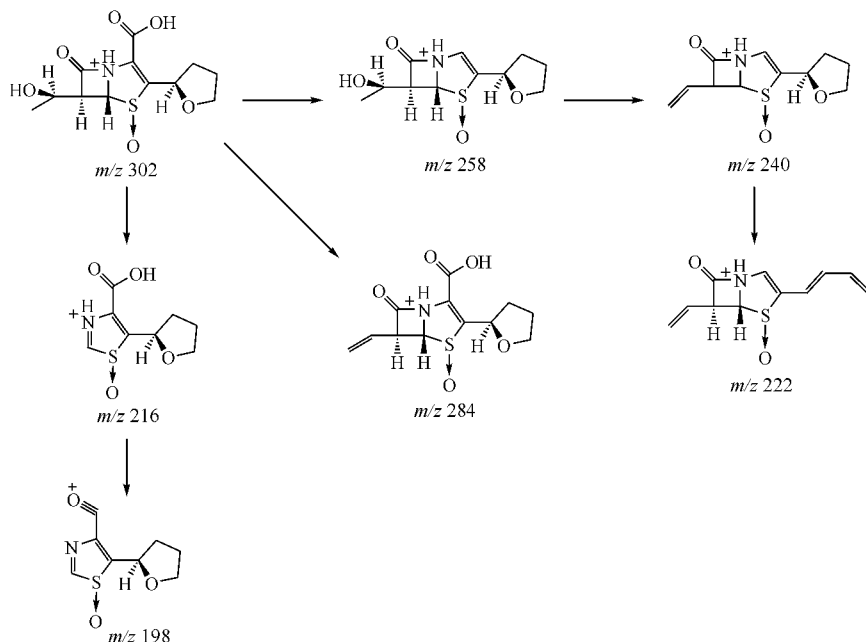


Figure 5 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 3

3.3 有关物质峰 4

ESI⁺-MS 测得有关物质峰 4 的主要加合离子峰 m/z 为 332、349 和 354, 分别与 $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 相应, 故其相对分子质量为 331。且 $[M+H]^+$ 离子的二级质谱的碎片离子信息(图 6B) 与有关物质峰 1 和 2 的较为相近, 故推测有关物质峰 4 与法罗培南乙酯化物的 β -内酰胺开环水解物($C_{14}H_{21}NO_6S$, $Mr = 331$) 相应。裂解过程如图 7 所示。

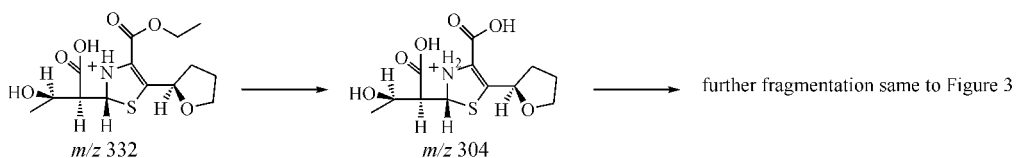


Figure 7 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 4

3.4 有关物质峰 5

ESI⁺-MS 测得有关物质峰 5 的主要加合离子峰 m/z 为 571 和 588, 分别与 $[M+H]^+$ 和 $[M+NH_4]^+$ 相应, 故其相对分子质量为 570, 是法罗培南相对相对分子质量的两倍。由一级质谱的提取离子流图可知, 保留时间为 14.4 min 和 17.1 min 的加合离子峰均为 m/z 588, 但后者的信号强度极

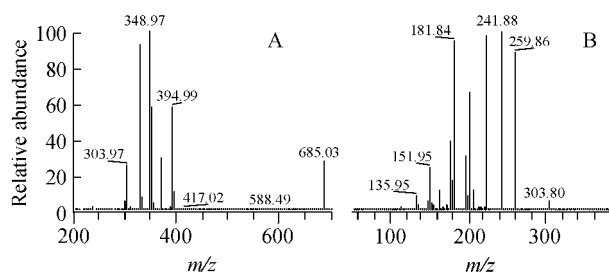


Figure 6 MS fullscan (A) and product ion scan (B) of m/z 332 ion of impurity peak 4

低。由 $[M+H]^+$ 离子的二级质谱信息可知, m/z 571 为母离子时产生 m/z 260、 m/z 224 等子离子, 其中 m/z 260 碎片离子为法罗培南分子脱羧后的 β -内酰胺开环水解物, 且法罗培南二聚物的极性弱于开环二聚物, 故推测有关物质峰 5 与法罗培南的开环二聚物($C_{24}H_{30}N_2O_{10}S_2$, $Mr = 570$) 相应。其裂解过程如图 8 所示。

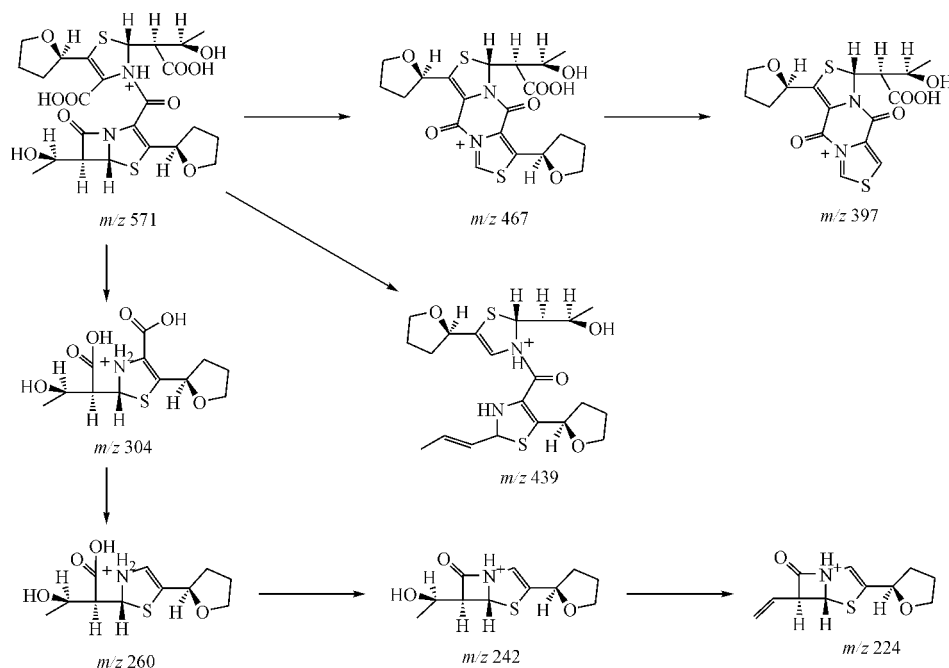


Figure 8 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 5

4 讨论

4.1 色谱条件的选择与优化

闫小燕等^[8]建立 HPLC-UV 法测定法罗培南钠含量及有关物质,采用磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相。赵霞等^[9]建立 HPLC-UV 法测定法罗培南钠的有关物质,采用三乙胺三氟醋酸缓冲液-乙腈为流动相。二者均不适合电喷雾离子化的质谱分析。因此采用乙酸铵溶液(用甲酸或乙酸溶液调节 pH)-乙腈为流动相梯度洗脱,观察到法罗培南钠的保留时间较长。经过一系列筛选试验,最终选定 0.2% 醋酸铵-0.5% 甲酸的混合溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,线性梯度洗脱。在上述条件下,法罗培南钠与各有关物质分离良好。

法罗培南钠的最大吸收波长是 318 nm,但在此波长下不能有效地检出杂质^[8]。通过比较各波长下法罗培南钠及其有关物质的测定结果,选择主要杂质有较大紫外吸收的 247 nm 作为有关物质的检测波长。

参考人血浆中法罗培南钠含量测定文献^[8],选择柱温 25 ℃,确保主成分及有关物质在检测过程中尽量稳定。

本文建立了适合 LC-MS/MS 分析的挥发性流动相梯度洗脱体系。在该条件下,法罗培南钠及其

有关物质能有效分离。

4.2 离子化效率的提高

待测样品及其部分有关物质的极性相对较大,因此采用高比例水相为流动相以达到良好分离。但高比例水相的流动相在进入质谱后不易雾化蒸发,不利于样品离子化。另外有关物质本身含量较少,灵敏度低,影响测定。为此,本实验采用柱后添加乙腈的方法,以增强 LC-MS/MS 检测的灵敏度。样品经色谱柱有效分离并分流后,添加 0.2 mL/min 乙腈作为 ESI 鞘液一并进入质谱检测。该方法能有效提高有关物质的离子化效率,利于检测鉴定。

4.3 钠制剂中的有关物质

鉴定出的 5 个有关物质与法罗培南钠相比,有关物质 1、2 和 4 为 β -内酰胺开环产物,有关物质 3 为硫化物,有关物质 5 为法罗培南的开环二聚物,主要变化发生在 β -内酰胺环上。所以测得各有关物质的二级质谱裂解特征相似,据此推测出它们可能的结构。

通过对比法罗培南原料与片剂中的液相色谱图(图 9),可知片剂中的有关物质的种类和含量高于原料药,且有关物质 2 和 4 在片剂中含量较高,说明 β -内酰胺类在制剂制备及贮存过程中易开环水解,提示在今后的制备中应注意工艺条件对法罗培南钠的化学稳定性的影响。

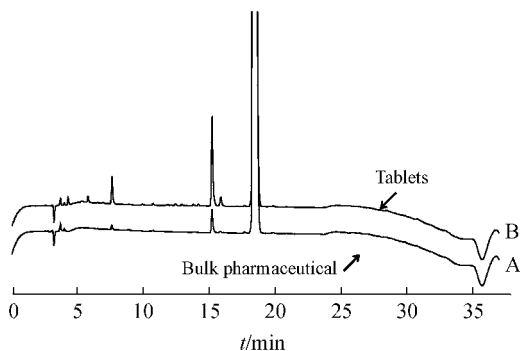


Figure 9 HPLC profiles of faropenem bulk pharmaceutical (A) and tablets (B)

参考文献

[1] 金少鸿(Jin SH), 经 洁(Jing J), 郑昌亮(Zheng CL). 头孢

噻肟中高分子杂质和过敏反应关系的研究 I: 头孢噻肟中高分子过敏性杂质的分离和免疫学研究 [J]. 抗生素(Antibiotics), 1986, 11(5): 409 - 413.

[2] 闫小燕(Yan XY), 胡 欣(Hu X), 何笑荣(He XR), 等. HPLC 法测定法罗培南钠含量及有关物质 [J]. 药物分析杂志(Chin J Pharm Anal), 2006, 26(7): 965 - 967.

[3] 赵 霞(Zhao X), 胡昌勤(Hu CQ), 金少鸿(Jin SH). 法罗培南钠中有关物质测定方法的建立 [J]. 中国药理学杂志(Chin Pharm J), 2005, 40(5): 385 - 387.

[4] Rao P, Rani A, Reddy R, et al. Isolation, structural elucidation and characterization of impurities in Cefdinir [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(4): 1 476 - 1 482.

[5] 赵平鸽(Zhao PG), 宋俊英(Song JY), 苏梦翔(Su MX), 等. 法罗培南钠颗粒的人体药理学研究 [J]. 临床药理学(Chin J Clin Pharmacol Ther), 2010, 15(5): 535 - 540.

· 新 信 息 ·

世界在研糖尿病新药

在最近召开的美国糖尿病协会(ADA) 年会上, 大型制药公司发布了进入Ⅲ期临床试验的糖尿病新药的研究结果, 包括百时美施贵宝和阿斯利康的 Dapagliflozin、勃林格殷格翰和礼来的 Linagliptin 以及诺和诺德的新一代超长效胰岛素类似物 Degludec。

1 Dapagliflozin 是第 1 种钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(SGLT2) 抑制剂类药物, 作为治疗成人 2 型糖尿病患者的 一日一次口服药物, 目前正处于 3 期临床试验阶段。SGLT2 抑制剂的作用机制不同于胰岛素机制, 可促进尿液中葡萄糖及相关热量的排泄, 从而降低血糖浓度。Dapagliflozin 联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的Ⅲ期临床研究结果显示, 与磺酰脲类联合二甲双胍相比, 从治疗的 52 ~ 104 周, Dapagliflozin 联合二甲双胍可使糖化血红蛋白(HbA1c) 水平持续下降。研究结果还显示, Dapagliflozin 联合二甲双胍治疗组患者发生低血糖的概率是格列吡嗪联合二甲双胍组的 1/10。另外, 从治疗的 52 ~ 104 周, Dapagliflozin 联合二甲双胍治疗组患者还出现了体重持续下降, 而格列吡嗪联合二甲双胍组患者体重持续增加。

2 Linagliptin(商品名为 Trajenta) 联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的Ⅲ期临床研究结果显示, Linagliptin 联合二甲双胍组与格列美脲联合二甲双胍组在 2 年多的时间降低糖化血红蛋白水平的疗效相当, 不过低血糖发生率明显下降, 而且心血管事件相对危险性下降了 54%。Linagliptin 联合二甲双胍组患者治疗 2 年后体重也出现了下降, 而格列美脲联合二甲双胍组患者的体重是增加的。

另外, 分析显示 Linagliptin 联合二甲双胍组患者糖化血红蛋白水平降低的同时对肾功能没有影响, 对于具有严重肾脏损伤而血糖水平不能很好控制的患者, Linagliptin 治疗的 12 周后具有明显的降低糖化血红蛋白的临床疗效。

3 新一代超长效胰岛素类似物 Degludec 该品的适应证为 1 型和 2 型糖尿病。两项为期 52 周的Ⅲ期临床试验结果显示, Degludec 可使 1 型糖尿病患者 HbA1c 下降 0.4%, 2 型糖尿病患者下降 1.2%。而且 Degludec 可使 2 型糖尿病患者低血糖发生频率明显下降, 平均每年每名患者发生 11.1 次, 而甘精胰岛素组患者为 13.6 次。

Degludec 组与甘精胰岛素组相比, 可使 1 型和 2 型糖尿病患者夜间低血糖发生率降低 25%。而且与甘精胰岛素相比, Degludec 每天不同时间给药不影响 2 型糖尿病患者的整体血糖控制和低血糖风险。

(医药经济报, 本刊有删节)