

LC-MS 分离鉴定头孢地嗪热降解的异构体杂质

马凤余¹, 吴强², 卫强¹

(1. 安徽新华学院药学院, 合肥 230088; 2. 合肥医工医药研究所, 合肥 230031)

摘要 目的: 建立应用高效液相色谱-串联质谱技术快速鉴定头孢地嗪中异构体杂质的方法。方法: 以 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-乙腈为流动相, 经 C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离, 通过串联 ESI 质谱在线检测, 获得相关的色谱和质谱信息。结果: 在所建立的条件下, 头孢地嗪及其异构体杂质获得有效分离, 头孢地嗪、反式异构体及 Δ₃ 异构体的保留时间分别为 11.38, 14.26, 10.95 min。通过质谱中特征碎片离子的差异可区分反式异构体及 Δ₃ 异构体。结论: 本法可快速、准确地分离鉴定头孢地嗪中的反式和 Δ₃ 异构体杂质, 进而可以对药品质量进行质量控制。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 头孢地嗪; 异构体; 杂质; 鉴定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)09-1833-04

LC-MS method for the isolation and identification of isomeric impurities by thermal degradation in cefodizime

MA Feng-yu¹, WU Qiang², WEI Qiang¹

(1. Anhui Xinhua University College of Pharmacy, Hefei 230088, China;

2. Hefei Industrial Pharmaceutical Institute, Hefei 230031, China)

Abstract Objective: To establish a sensitive and specific LC-MS method for the determination of isomeric impurities in cefodizime. **Methods:** The HPLC separation experiments were performed on a reversed phase C₁₈ column (200 mm×4.6 mm, 5 μm), with 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate-acetonitrile as mobile phase. The analytes were determined by ESI-MS in negative mode. The chromatograms and mass spectra of cefodizime and its isomeric impurities were obtained by LC-MS. **Results:** The method can be used for the separation and identification of cefodizime and its anti-form, Δ₃-cephem form, of which the retention times were 11.38, 14.26, 10.95 min, respectively. Based on the MS spectra of their molecular ion, the different fragmentation pathways of cefodizime and its isomeric impurities were compared and proposed. **Conclusion:** The method is rapid, sensitive and specific. It can be used for the identification of the isomeric impurities in cefodizime.

Key words: LC-MS; cefodizime; isomers; foreign matter; identification

随着药物构效关系研究的深入, 药物异构体的分离分析日益被人们所重视。高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术集液相色谱的高分离能力和质谱的高分辨力、高灵敏度于一体, 是进行微量杂质检查和降解产物分析鉴定的强有力分析工具之一^[1,2]。

头孢地嗪钠(cefodizime)作为第3代头孢菌素, 在国际上首先由德国 Hoechst Roussel 公司研制成功, 于1990年被批准在日本上市(商品名: Neucef), 1994年被批准进口国内, 国内外临床应用已有近20

年的历史。大量的药效学试验和临床应用结果表明, 头孢地嗪钠对大部分的革兰氏阳性菌和阴性菌、需氧菌及厌氧菌均有良效, 同时对多数β-内酰胺酶不敏感, 且对免疫系统有激活作用。与一般化学合成药物相比, 头孢类抗菌素其生产过程更加复杂, 产品纯度一般也低于化学合成药品。该类抗生素对热、水分和光的稳定性较差, 在该类抗生素的研究中, 需要重点关注原料药的合成以及质量控制, 特别是杂质研究。β-内酰胺类抗生素可能产生的异构体杂质包括构造异构体(主要为Δ₃异构体)、立体异

构体(如对映异构体、顺反异构体)等。这些异构体可能由起始原料引入,在合成过程中生成,或者在保存过程中产生,需要结合具体情况分别进行研究和控制。 β -内酰胺类抗生素在碱性条件下 C7 位侧链甲氧亚胺键也可能发生顺反异构现象^[3],如头孢地尼、头孢克肟、头孢他啶等,头孢噻肟顺式结构(*Z*型)的抗菌活性要比反式结构(*E*型)强 40~100 倍,头孢噻肟钠水溶液经紫外光照射 45 min 有 50% 降解,光降解产物主要是反式异构体^[4]; β -内酰胺类抗生素因起始原料^[5]、合成工艺^[6]以及贮存条件^[7]等因素,产品中均可反映出 Δ_3 异构体,由构效关系知道, Δ_3 头孢烯类头孢菌素是无活性的;同时文献^[3,8]显示头孢菌素在贮藏过程中在 6 位、7 位碳上可发生差向异构化,生成 6*R*, 7*S*-异构体而失去抗菌活性,该反应在碱性条件下更容易发生。

在头孢地嗪钠的合成及贮存过程中,往往伴随其异构体的生成,结构式见图 1。本文对头孢地嗪钠中的反式及 Δ_3 异构体杂质进行测定,获得了主成分和其同分异构体杂质的色谱和质谱信息,可据此对杂质进行快速的定性鉴别和半定量分析。

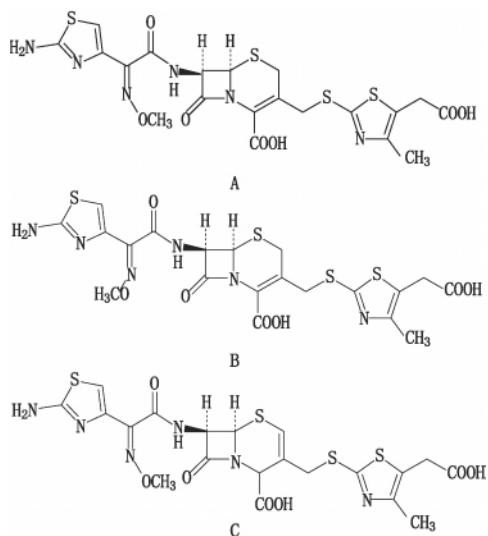


图 1 头孢地嗪(A)及其反式(B)、 Δ_3 异构体(C)的化学结构式

Fig 1 The chemical structure of cefodizime (A) and its anti-form (B), Δ_3 -cephem form (C)

1 仪器与试剂

Varian1200L LC-MS/MS 液相色谱/三级四级杆串联质谱联用仪(美国瓦里安公司),包括 Varian ProStar 210 高压泵、Varian ProStar 410 自动进样器、Varian 1200L Quadrupole MS/MS 仪和 Varian MS 6.3 数据处理系统;顺式头孢地嗪钠对照品(中国药品生物制品检定所,批号 130520-200501);乙腈为色

谱纯,醋酸铵为分析纯,超纯水。

2 液相色谱-质谱条件

采用北京迪马科技有限公司 Diamonsil C_{18} (200 mm \times 4.6 mm 5 μ m) 色谱柱,流动相 A 为 5 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵溶液,流动相 B 为乙腈,进行线性梯度洗脱(表 1),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,柱后分流 3:1,进样量 50 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间(time) / min	流动相(mobile phase) A - B
0	95:5
15	70:30
20	70:30
22	95:5
30	95:5

采用电喷雾(ESI)离子源,负离子检测,Scan 模式,扫描区间:350~650;喷嘴电压 -3.5 kV;毛细管电压 -25 V;雾化气为空气,温度 50 $^{\circ}$ C、压力 345 kPa;干燥气为氮气,温度 280 $^{\circ}$ C、压力 145 kPa;检测器电压 1.6 kV。

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 精密称取顺式头孢地嗪钠对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释制成约 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的溶液。

3.2 供试品溶液 精密称取顺式头孢地嗪钠对照品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释制成约 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的溶液,100 $^{\circ}$ C 水浴加热 2 h。

4 结果与讨论

4.1 LC-MS/MS

取“3”项下制备的溶液按“2”项下条件进行 LC-MS/MS 分析,通过对样品进行全扫描,获得样品的总离子流图,见图 2、图 3。

从对照品溶液的总离子流图可以看出,在建立的色谱条件下,顺式头孢地嗪主峰的保留时间 t_R 为 11.38 min,在电喷雾离子源负离子检测方式下,头孢地嗪产生准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 583。

供试品溶液的总离子流图可以看出,除顺式头孢地嗪主峰外,前后均出现一系列杂质峰,经与相关对照品的比对,主要杂质为硫醚键断裂后的碎片,如 2-巯基-4-甲基-5-噻唑乙酸(MMTA)。抽提 583 离子后,出现 3 个峰,保留时间分别是 1A 11.38 min (顺式头孢地嗪),2A 14.26 min,3A 10.95 min,表明后两者为头孢地嗪的同分异构体。为进一步获得相关杂质的结构信息,对 2A、3A 的碎片离子进行分析,发现在相同条件下,2A、3A 产生的主要离子都有 m/z 412 峰,但 2A 相对 3A 产生了额外的 m/z 368 峰。

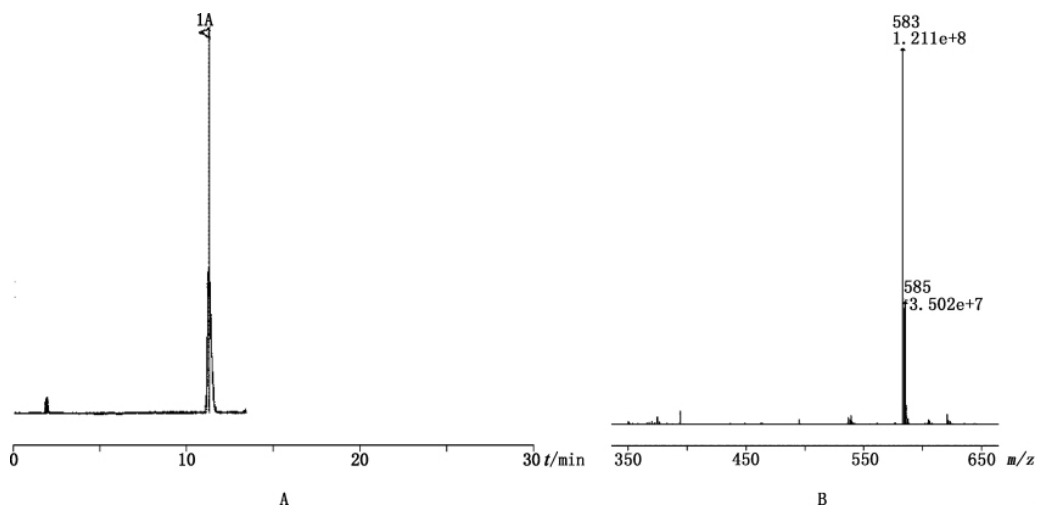


图2 头孢地嗪对照品溶液的 LC-MS 图
Fig 2 The LC-MS chromatograms of cefodizime reference solution

A. 总离子流图(TIC) B. 质谱图(MS spectrum)

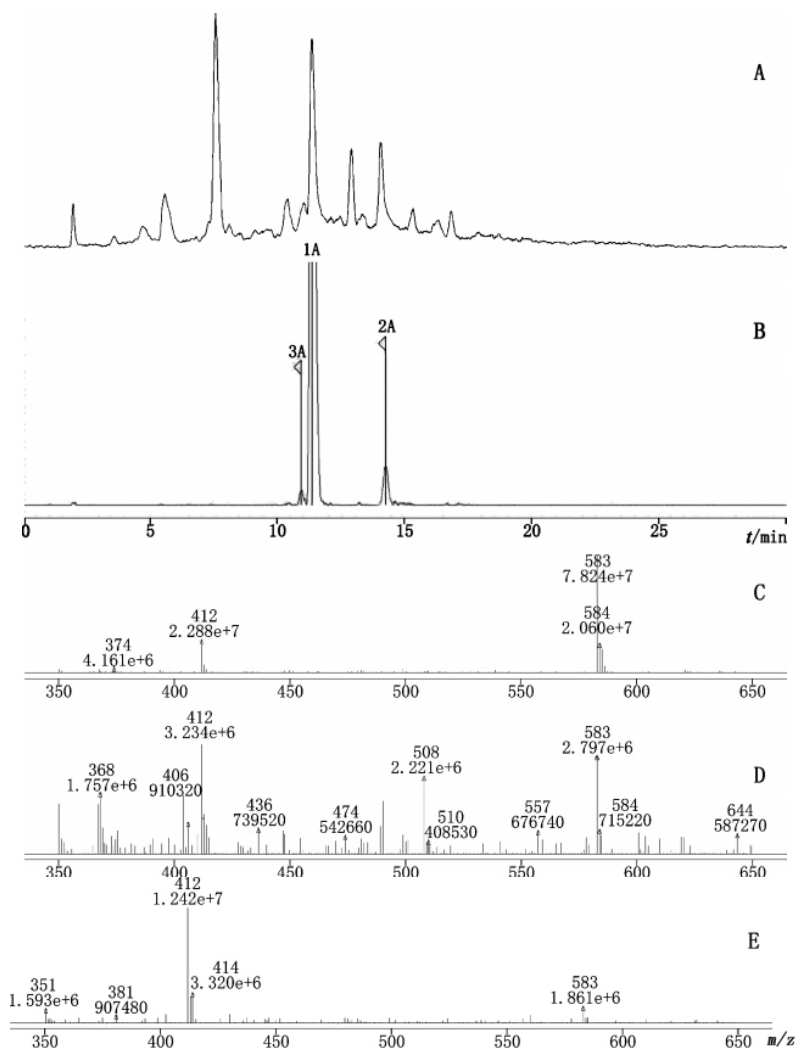


图3 供试品溶液的 LC-MS 图
Fig 3 The LC-MS chromatograms of cefodizime sample solution
A. 总离子流图(TIC) B. 选择性离子检测色谱图(SIM chromatogram) C. 1A 二级质谱图(MS² spectra of 1A) D. 2A 二级质谱图(MS² spectra of 2A) E. 3A 二级质谱图(MS² spectra of 3A)

4.2 裂解途径推测

根据头孢地嗪的分子结构推测, 2A 碎片离子 (m/z 368) 为头孢地嗪 3 位巯基杂环脱去后 β -内酰胺环开环脱羧产物。由于 Δ_2 型头孢地嗪的 2 位取代羧基与环内双键形成共轭, 因诱导效应, 供电取代基使碳碳双键电子云密度增加, 羧基上的羟基受

邻位效应影响更易离去而脱水生成 m/z 368 碎片离子, 同时双键的存在, 甲氧基与羧基形成顺式邻位而取代, 空间位阻更小, 更有利于内酯结构的形成。

故推测 3A 应为 Δ_3 异构体, 2A 为反式异构体。结果见图 4。

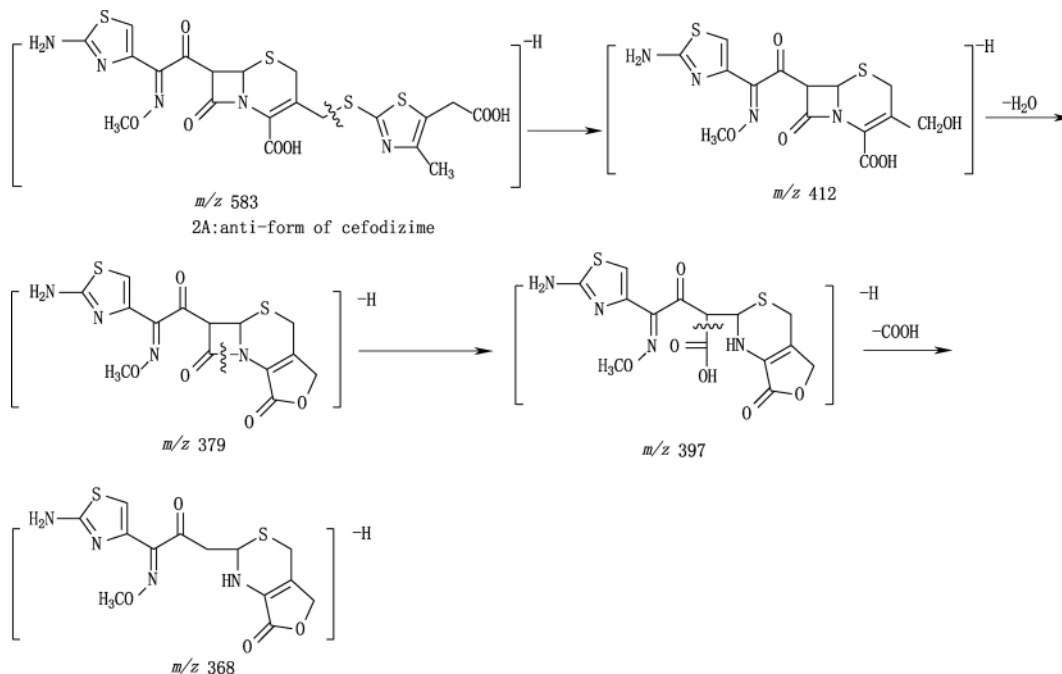


图 4 头孢地嗪 m/z 368 离子的可能裂解机理

Fig 4 Proposed fragmentation pathway of the molecular ion $[M]^-$ m/z 368

4.3 结论 上述研究结果表明, 头孢地嗪存在的反式、 Δ_3 异构体由于空间结构的不同, 导致其裂解方式的不同, 通过特征碎片离子可以将两者加以区分。应用本研究所建立的 HPLC-MS 方法能使反式、 Δ_3 异构体准确快速的分离和鉴定。

参考文献

- Ermer J, Vogel M. Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis. *Biomed Chromatogr* 2000, 14(6): 373
- Wu YH. The use of liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of drug degradation products in pharmaceutical formulations. *Biomed Chromatogr* 2000, 14(6): 384
- CHEN Zhao-kun(陈兆坤), HU Chang-qin(胡昌勤). Degradation mechanism of cephalosporin antibiotics(头孢菌素类抗生素的降解机制). *World Notes Antibiot*(国外医药抗生素分册) 2004, 25(6): 249

- Lerner DA, Bonnefond G, Fabre H *et al.* Photodegradation paths of cefotaxime. *J Pharm Sci* 1988, 77(8): 699
- ZHANG Fang-li(张方丽). Studies on synthetic technics of 7-ADCA as an intermediate of cephalosporin antibiotics(头孢菌素类抗生素中间体 7-ADCA 合成工艺研究): [Thesis(学位论文)]. Tianjin(天津): Tianjin University(天津大学) 2003
- Walker DG, Brodfuerher PR. Use of bistrimethylsilylated intermediates in the preparation of semisynthetic 7-amino-3-substituted-cephems. Expedient Synthesis of a new 3-[[1-Methyl-1-pyrrolidino]methyl] cephalosporin. *J Org Chem* 1988, 53(5): 983
- Richter WF, Chong YH, Stealla VJ. On the mechanism of isomerization of cephalosporin esters. *J Pharm Sci* 1990, 79(2): 185
- HU Min(胡敏), HU Chang-qin(胡昌勤), LIU Wen-ying(刘文英). Identification of degradation compounds of cephalosporins by LC/MS(LC/MS 鉴定头孢菌素降解物结构). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005, 25(3): 369

(本文于 2011 年 1 月 13 日收到)