

利用 LC-MS/MS法快速鉴定盐酸头孢吡肟中的同分异构体杂质

赵 玲, 郭继芬*, 张爱军, 赵毅民

(军事医学科学院 毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 建立应用 LC-MS/MS技术快速鉴定盐酸头孢吡肟原料药中的同分异构体杂质的方法。方法 以乙腈-10 mmol·L⁻¹乙酸铵(5:95)为流动相经 C₁₈柱分离,通过电喷雾串联质谱在线检测,获得相关的色谱和质谱信息。结果 在所建立的条件下,盐酸头孢吡肟及其同分异构体杂质获得有效分离,主成分和其同分异构体杂质的保留时间分别为 15.28 min和 9.18 min,同时它们的二级质谱产物离子信息及其裂解方式呈现明显的差异。结论 本法能快速、准确地分离鉴定盐酸头孢吡肟原料药中的同分异构体杂质,从而可以对其原料药进行质量控制。

关键词: 液相色谱 串联质谱法; 盐酸头孢吡肟; 杂质检查

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)04-0361-04

Rapid identification of the isomeric impurity in raw drug of cefepime dihydrochloride by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Ling, GUO Ji-fen*, ZHANG Ai-jun, ZHAO Yi-min

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: **Aim** To establish a sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of isomeric impurity in raw drug material of cefepime dihydrochloride. **Methods** The HPLC separation experiments were performed on a reversed phase C₁₈ column, with acetonitrile-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (5:95) as mobile phase (a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹). The analytes were determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry in positive mode. The chromatogram and mass spectra of cefepime dihydrochloride and its isomeric impurity were obtained by LC-MS/MS. **Results** The method can be used for the separation and identification of cefepime dihydrochloride and its isomeric impurity, of which the retention times were 15.28 min and 9.18 min, respectively. Based on the MS/MS spectra of the ir molecular ions, the different fragmentation pathways of cefepime dihydrochloride and its isomeric impurity were compared and proposed. **Conclusion** The method was rapid, sensitive and specific. It can be used for the identification of the isomeric purity in raw drug material of cefepime dihydrochloride.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; cefepime dihydrochloride; impurity determination

盐酸头孢吡肟(cefepime dihydrochloride)是 20 世纪 90 年代上市的第四代注射用头孢菌素(I),具有广谱高效的抗菌活性和对细菌 β-内酰胺酶的高度稳定性,目前在临床上用于防治多种细菌感染性疾病^[1]。在合成盐酸头孢吡肟的过程中,往往伴随

有其同分异构体杂质(II)的生成^[2,3],其结构式见图 1。有报道^[4]利用 NMR 技术测定盐酸头孢吡肟中的杂质,但该技术所需样品量较大;也有报道^[5]在利用 HPLC-UV 法测定盐酸头孢吡肟含量的同时检测出了有关物质,但并未做出进一步的鉴定;而利用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)鉴定盐酸头孢吡肟杂质目前尚未见报道。LC-MS/MS 联用技术是集液相色谱的高分离能力和质谱的高分辨力和高灵

收稿日期: 2004-08-18.

* 通讯作者 Tel: 86-10-66931614, Fax: 86-10-68211656,
E-mail: guojifen@sohu.com

敏度于一体,从而成为在微量杂质检查和降解产物的分析鉴定^[6-8]方面强有力的分析工具之一。通过 HPLC 可以有效地分离同分异构体,并结合 MS/MS 技术得到同分异构体更多的结构信息^[9]。为了进行质量控制,本文对盐酸头孢吡肟原料药中的同分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。

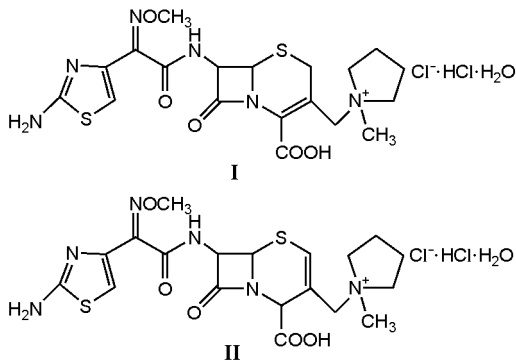


Figure 1 Structures of cefepime dihydrochloride (I) and isomeric impurity (II)

材料与amp;方法

仪器与试剂 美国应用生物系统公司 API 3000 型液相色谱-质谱-质谱联用仪,配有 Turbo Ionspray 离子源 (ESI) 及 Analyst 1.1 数据处理系统;美国安捷伦公司 Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器;美国 Finnigan 公司 DecaXP plus 离子阱质谱仪,配有 ESI 源及 Xcalibur 数据处理系统。盐酸头孢吡肟原料药和盐酸头孢吡肟对照品由北京海润泽公司提供;乙腈为色谱纯;水为去离子水;其他试剂均为分析纯。

LC-MS/MS 条件 色谱柱为 C₁₈ 柱 (25 cm × 4.6 mm ID, 5 μm, 大连依利特公司);流动相为乙腈-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵 (5:95);流速为 0.8 mL·min⁻¹ (柱后分流 50%)。离子源为 ESI 源,喷射电压 4 kV,离子源温度 250 °C, NEB 7 Units, CUR 11 Units,正离子检测方式。注塞泵直接进样,多级全扫描质谱 MSⁿ (n = 1 - 5),正离子检测方式:溶液流速 3 μL·min⁻¹,离子源喷雾电压 3.4 kV,加热毛细管温度 170 °C,毛细管电压 44 V,鞘气 (N₂) 流速 12 流量单位。

样品溶液的配制 称取盐酸头孢吡肟对照品 0.074 2 g,配制成含头孢吡肟 1.25 g·L⁻¹ 的甲醇溶液,再用流动相稀释成浓度分别为 25 mg·L⁻¹ 和 1 mg·L⁻¹ 的头孢吡肟对照品溶液。原料药溶液的配

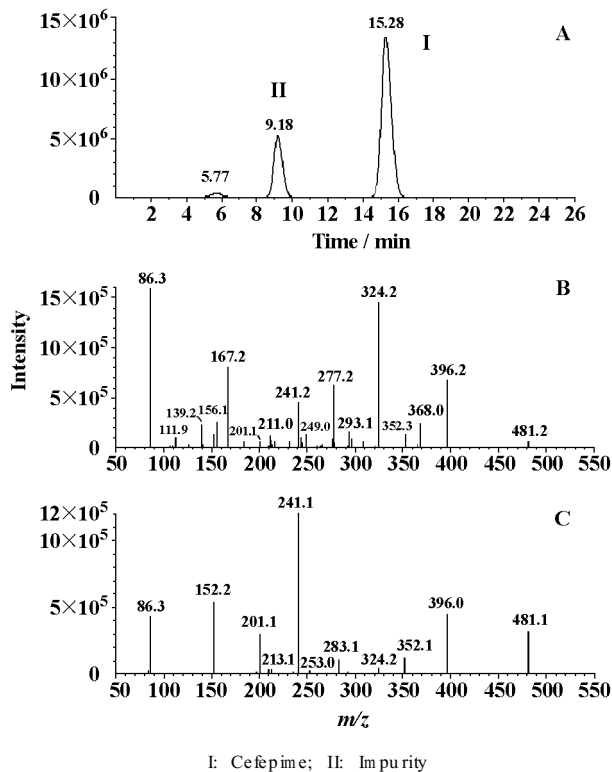
制方法同对照品溶液。

结果与amp;讨论

1 LC-MS/MS

在建立的色谱条件下盐酸头孢吡肟对照品的保留时间 t_r 为 15.28 min,在电喷雾离子源正离子检测方式下,头孢吡肟产生分子离子峰 [M]⁺ m/z 481,对其进行二级质谱分析,产生 m/z 86, 167, 241, 277, 324, 352, 368 和 396 等一系列产物离子。

如图 2 所示,在相同条件下,对盐酸头孢吡肟原料药进行液相色谱一级质谱分析,在其 LC-MS 谱上发现,除在 t_r 15.28 min 有一主峰外,在 t_r 9.18 min 处还有一含量约为 24% 的杂质峰,该杂质的 [M]⁺ 峰也为 m/z 481,说明与主成分是同分异构体。为进一步获得该杂质的结构信息,对主成分与杂质分别进行 MS/MS 谱分析,发现二者产生的主要子离子都有 m/z 86, 241, 324, 352, 396 峰,但强度和谱型有显著的差异;并且主成分产生 m/z 167, 277 和 368 的子离子而在杂质的二级质谱中未出现。



I: Cefepime; II: Impurity
Figure 2 Product ion chromatogram (A) and corresponding spectra of [M]⁺ of cefepime raw drug material (B) and impurity (C)

2 裂解途径推测

采用注塞泵直接进样方式,分别对 m/z 481, 396, 368, 352 和 324 离子进行 MS/MS 分析,发现只

有 m/z 481 离子产生 m/z 86 离子,为了进一步确证,本文又对 m/z 86 离子进行了子离子找母离子分析,发现 m/z 86 离子也只由 m/z 481 离子产生。根据盐酸头孢吡肟的结构式推测 m/z 86 离子为 1-甲基吡咯烷离子,而在主成分和杂质中其强度有显著差别,可能是由于环内双键位置不同,电子密度不同,从而导致了同分异构体在产生 m/z 86 离子强度上的差异。 m/z 396 离子为头孢吡肟失去 1-甲基吡咯烷后形成的离子; m/z 396 离子进一步丢失一分子 CO 生成 m/z 368 离子,这一裂解反应只发生在主成分的 MS/MS 谱中,在杂质的 MS/MS 谱中未出现,可能因为环内双键位置不同所致。 m/z 324 离子由 m/z 396 离子先丢失一分子 CO_2 生成 m/z 352 离子后再丢失一分子 CO 形成,或先丢失一分子 CO 生成 m/z 368 离子后再丢失一分子 CO_2 形成,这可能是发生了内酰胺环的开环反应导致,该离子在头孢吡肟主成分的二级质谱分析中为主要离子,而在杂质中相对较弱;选择性地分别对 m/z 396, 368, 352, 324 离子进行二级质谱分析,发现它们均产生 m/z 167 和 m/z 277 子离子,而 m/z 167 离子初步推测可能是由 m/z 324 离子中与酰胺键相连的 C-C 键断裂生成的, m/z 277 离子可能是由 m/z 324 离子丢失 47 Da 基团生成。为了证实推断,进行离子阱多级串联质谱分析,发现 m/z 167 和 m/z 277 离子均是由 m/z 481 \rightarrow 396 \rightarrow 352 \rightarrow 324 过程产生的,对以上的推测做了进一步的证明(图 3)。 m/z 167 和 m/z 277 离子在杂质的 MS/MS 谱中均未出现,推测其为环内双键位置不同所致。在杂质的 MS/MS 谱中 m/z 396 离子丢失一分子 CO_2 生成 m/z 352 离子进一步发生 McLafferty 重排生成 m/z 201 和 m/z 152 离子; m/z 396 离子丢失 155 Da 基团生成基峰离子 m/z 241,推测其为 m/z 396 中与酰胺键相连的 C-C 键断裂所致。

上述结果表明,头孢吡肟主成分与其杂质由于环内双键位置的不同,环内电子密度不同,而使其在 ESI 正离子检测方式下的二级质谱裂解方式不同,二者的裂解途径示意图见图 4 和图 5,可依据此特征将二者加以区分。为本研究提供样品的药品研发公司已成功合成该杂质,确证了其结构,证实了本文的推断。

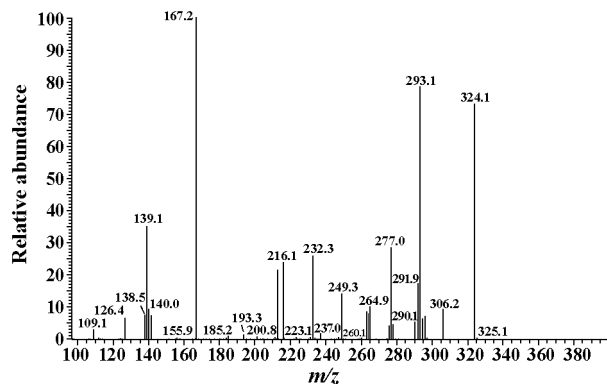


Figure 3 MS⁵ mass spectrum of m/z 481 \rightarrow 396 \rightarrow 352 \rightarrow 324 of cefepime in positive ion mode

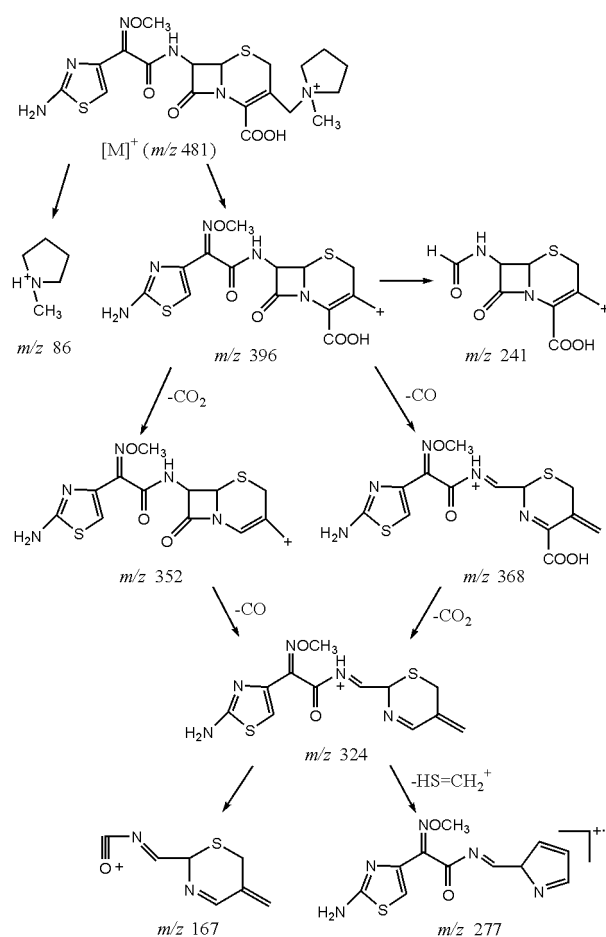


Figure 4 Proposed fragmentation pathway of the molecular ion $[M]^+$ m/z 481, of cefepime in positive ion ESI/MS/MS

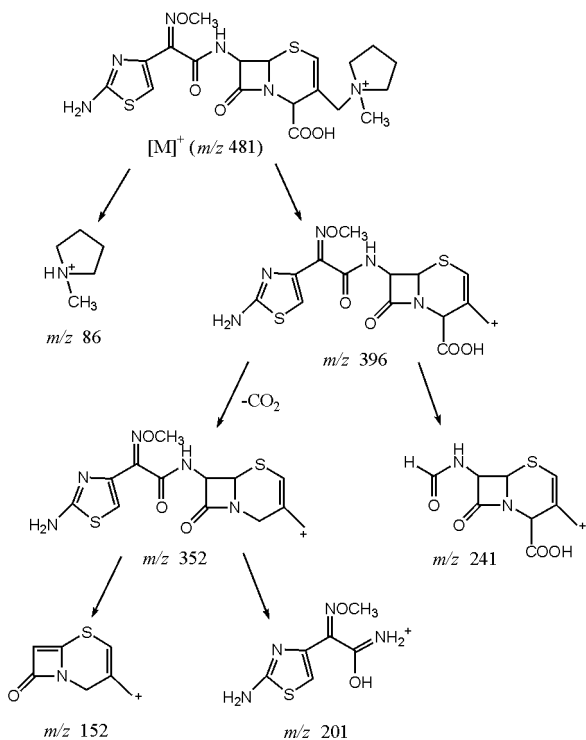


Figure 5 Proposed fragmentation pathway of the molecule ion $[M]^+$ m/z 481, of isomeric impurity of cefepime in positive ion ESI/MS/MS

结论

在本实验中,由于杂质与主成分为同分异构体,适宜流动相的选择很重要。因此为使二者具有良好的色谱分离,曾尝试使用过多种流动相,最后在本文所用条件下,使杂质与主成分获得了良好的分离。应用本文中所建立的分离及 LC-MS/MS法能使盐酸头孢吡肟原料药中的同分异构体杂质准确、快速地得到鉴定。

References

[1] Lei J, Wang YS. Cefepime [J]. *World Notes Antibiot* (国外医药抗生素分册), 1996, **17**(5): 354 - 358.

[2] Naito T, Aburaki S, Kamachi H, *et al*. Synthesis and structure-activity relationships of a new series of cephalosporins, BMY-28142 and related compounds [J]. *J Antibiot*, 1986, **39**(8): 1092 - 1107.

[3] Walker DG, Brodnueher PR, Brundidge SP, *et al*. Use of bistrimethylsilylated intermediates in the preparation of semisynthetic 7-amino-3-substituted-cephem-3s. Expedient synthesis of a new 3-[(1-methyl-1-pyrrolidino) methyl] cephalosporin [J]. *J Org Chem*, 1988, **53**(5): 983 - 991.

[4] Shi YH, Liu SB, Song GQ. Measurement of the percentage of impurity in cefepime dihydrochloride by NMR [J]. *Chin J Magnetic Resonance* (波谱学杂志), 2003, **20**(3): 259 - 264.

[5] Yan XY, Hu X, Cao GY, *et al*. Simultaneous determination of cefepime HCl and its related substances by RP-HPLC [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, **13**(1): 47 - 49.

[6] Emer J, Vogel M. Application of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2000, **14**(6): 373 - 383.

[7] Wu YH. The use of liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of drug degradation products in pharmaceutical formulations [J]. *Biomed Chromatogr*, 2000, **14**(6): 384 - 396.

[8] Zhou HH, Gao SM, Wang EH, *et al*. Impurity analysis and their structure determination of gatifloxacin [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, **37**(6): 462 - 464.

[9] Chang Y, Abliz Z, Wang MZ. New techniques of tandem mass spectrometry and its application in the study of drug metabolism [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2000, **35**(1): 73 - 78.