

注射用盐酸头孢甲肟的杂质谱研究

夏佳¹, 陈红娟², 席时东¹(1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210046)

摘要: 目的 建立UHPLC-TOF-MS法对注射用盐酸头孢甲肟的杂质结构进行研究。方法 采用UHPLC-TOF-MS联用, Waters UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相A为0.1%甲酸, 流动相B为乙腈, 梯度洗脱, 柱温40℃, 流速为0.3 mL·min⁻¹。结果 注射用盐酸头孢甲肟中检出15个有关物质, 并对各杂质的结构进行了推测。结论 本实验建立的UHPLC-TOF-MS方法可用于注射用盐酸头孢甲肟的杂质谱研究。

关键词: 注射用盐酸头孢甲肟; 有关物质; 杂质谱; 飞行时间质谱

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)05-0654-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.204690

引用本文: 夏佳, 陈红娟, 席时东. 注射用盐酸头孢甲肟的杂质谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 654-663.

Impurity Profile Study of Cefmenoxime Hydrochloride for Injection

XIA Jia¹, CHEN Hongjuan², XI Shidong¹(1.Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2.Nanjing University State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an UHPLC-TOF-MS method for the research of the impurity profile of cefmenoxime hydrochloride for injection. **METHODS** UHPLC-TOF-MS was used with Waters UPLC HSS T3 column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid(A) and acetonitrile(B) with gradient program. The column temperature was 40 °C. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. **RESULTS** There were 15 related substances detected in the sample, all of which were identified. **CONCLUSION** The UHPLC-TOF-MS method can be used for the related substances study of cefmenoxime hydrochloride for injection.

KEYWORDS: cefmenoxime hydrochloride for injection; related substance; impurity profile; TOF-MS

头孢甲肟为半合成第3代头孢菌素抗菌药物, 通过抑制细菌细胞壁的合成而发挥抗菌作用。临床上主要用于治疗敏感菌引起的败血症、脑膜炎、呼吸道感染、尿路感染、腹膜炎、脓胸、肝及胆道感染等^[1-2]。注射用盐酸头孢甲肟最早由日本武田药品株式会社研制开发, 1983年首次在日本上市, 商品名BESTCALL; 1987年在美国上市, 商品名CEFMAX, 现已撤市。原研药品曾于1999年获准进口, 商品名倍司特克(Bestcall), 规格为1.0 g。目前, 国内已有多家企业的原料药与粉针剂(规格为0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g, 均按C₁₆H₁₇N₉O₅S₃计)获准上市, 原料药有效批准文号8个, 粉针剂有效批准文号28个。盐酸头孢甲肟和注射用盐酸头孢甲肟收载于中国药典2020年版二部^[3]和美国药典第43版。

药品中的杂质种类和含量被称为杂质谱。随着液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术的进步, 杂质谱的研究越来越广泛^[4-6]。采用LC-MS技术对产品中的工艺杂质和降解产物等微量成分的结构特征进行

分析, 可实现在线对含量在0.1%水平的杂质进行快速分析, 是目前识别杂质结构的主要方法^[7]。

本实验采用超高效液相色谱-质谱联用法对注射用盐酸头孢甲肟进行杂质谱分析, 结合文献报道^[8-10]确定了15个杂质, 建立了注射用盐酸头孢甲肟的杂质谱。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC30AD 超高效液相色谱仪(日本岛津); Sciex Triple TOF 4600 质谱仪(美国 AB 公司); SB-5200DTN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); CP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

对照品: 头孢甲肟(批号: 130525-201001; 纯度: 94.6%)、头孢噻肟(批号: 130483-201505; 纯度: 92.2%)均购自中国食品药品检定研究院; 2-巯基苯并噻唑(国药集团试剂有限公司, 批号: 20180703; 纯度: 99.0%)、1-甲基-5-巯基四氮唑

作者简介: 夏佳, 女, 硕士, 副主任药师 E-mail: xiajia880@hotmail.com

(MMTZ, Sigma-alorich, 批号: STBG40962; 纯度: 99.0%)、杂质 B(去乙酰头孢噻肟, 批号: 160801; 纯度: 95.2%)和头孢甲肟反式异构体(批号: 110218-201001; 纯度: 96.8%)均购自辽宁海思科制药有限公司; 乙腈、甲酸均为质谱级; 水为超纯水; 注射用盐酸头孢甲肟(桂林澳林制药有限公司, 批号: G180101)。

2 方法

2.1 UHPLC-TOF-MS 测定

液相色谱条件: 色谱柱为 Waters UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)。流动相 A 为 0.1%甲酸, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱(0~2 min, 95%A; 2~5 min, 95%→85%A; 5~13 min, 85%A; 13~18 min, 85%→65%A; 18~23 min, 65%→50%A; 23~24 min, 50%→10%A; 24~29 min, 10%A; 29~30 min, 10%→95%A; 30~35 min, 95%A); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温为 40 °C; 进样量为 5 μL。

质谱条件: 采用 ESI 离子源, 正离子全扫描方式; 扫描范围为一级质谱 *m/z* 50~1 500, 二级质谱 *m/z* 100~1 200; 离子源温度为 550 °C; 气帘气(CUR)为 35 psi; 雾化气(GS1)为 55 psi; 辅助气(GS2)为 55 psi; 雾化电压 5 500 V; 雾化温度 500 °C; 去簇电压(DP)为+80 V; 碰撞能量(CE)为 30 eV。

2.2 供试品溶液的制备

取供试品约 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加溶剂(乙腈:0.1%甲酸=70:30)溶解并稀释至刻度。

强制降解溶液: 取供试品适量进行降解试验, 考察供试品在高温、氧化、紫外、强酸、强碱等条件下产生的降解产物。①碱破坏试验: 取供试

品约 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.25 mL, 放置 30 min, 加酸中和, 加溶剂溶解并稀释至刻度。②酸破坏试验: 取供试品约 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.25 mL, 60 °C 加热 30 min, 加碱中和, 加溶剂溶解并稀释至刻度。③高温破坏试验: 取供试品, 在 105 °C 条件下, 放置 2 h 后, 取约 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度。④氧化降解溶液: 取供试品溶液约 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加 10% 的双氧水 0.4 mL 混匀, 溶剂稀释至刻度, 静置 20 min。⑤紫外照射降解: 将供试品适量置于光照箱中, 照度(4 500±500)lx, 取出后用溶剂溶解并稀释成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。

3 结果

3.1 注射用盐酸头孢甲肟的主要杂质

取注射用盐酸头孢甲肟, 按“2.1”项下条件测定有关物质。总离子流图见图 1。

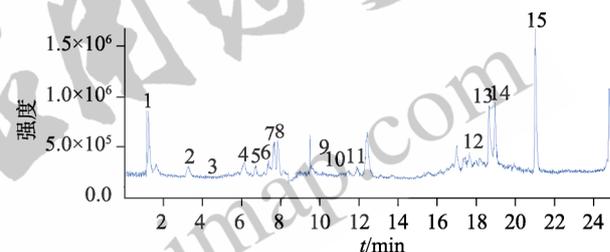


图 1 注射用盐酸头孢甲肟总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of cefmenoxime hydrochloride for injection

3.2 主要杂质结构的 LC-MS 解析

注射用盐酸头孢甲肟按“2.1”项下方法处理后, 进样测试, 杂质特征离子等信息见表 1。

表 1 主要杂质高分辨质谱检测结果

Tab. 1 High resolution mass spectrometric detection of main impurities

杂质编号	保留时间/min	分子离子 <i>m/z</i>	分子式	主要碎片离子 <i>m/z</i>
1	1.15	243.056 0	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	156.023 7, 126.012 3
2	3.29	117.023 5	C ₂ H ₄ N ₄ S	74.006 7
3	5.31	414.054 9	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S ₂	285.012 0, 241.040 1, 227.006 8, 126.012 2
4	6.03	414.054 0	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S ₂	396.044 2, 241.040 4, 156.023 1, 126.012 6
5	6.70	396.044 5	C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₅ S ₂	227.006 7, 199.995 9, 183.034 3, 126.012 5
6	7.65	512.060 4	C ₁₆ H ₁₇ N ₉ O ₅ S ₃	396.045 0, 352.054 5, 241.040 2, 201.044 9, 152.017 2
7	7.86	398.059 4	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₅ S ₂	285.011 7, 241.039 6, 227.007 0, 126.012 6
8	8.13	456.065 5	C ₁₆ H ₁₇ N ₉ O ₇ S ₂	396.045 4, 324.059 4, 227.006 6, 167.028 3
9	10.87	530.070 7	C ₁₆ H ₁₉ N ₉ O ₆ S ₃	414.054 2, 370.064 1, 201.043 4, 126.013 7
10	11.66	512.060 3	C ₁₆ H ₁₇ N ₉ O ₅ S ₃	396.044 2, 324.059 4, 241.040 0, 167.028 0
11	12.15	512.060 3	C ₁₆ H ₁₇ N ₉ O ₅ S ₃	396.044 2, 324.059 0, 293.041 2, 182.026 0, 112.022 1
12	18.02	907.098 9	C ₃₁ H ₃₀ N ₁₂ O ₁₃ S ₄	477.061 2, 360.052 0, 26.006 8, 167.028 8
13	18.66	695.072 4	C ₂₂ H ₂₂ N ₁₂ O ₇ S ₄	579.055 3, 424.051 1, 350.038 8, 167.028 3
14	18.95	167.994 5	C ₇ H ₅ NS ₂	135.013 9, 109.010 8, 77.039 2
15	21.05	563.031 6	C ₂₁ H ₁₈ N ₆ O ₅ S ₄	396.044 2, 324.058 9, 167.027 7

对有关物质中含量相对较高的 15 种杂质进行结构解析。

杂质 1 为氨噻肟酸。

杂质 2 为 1-甲基-5-巯基-四氮唑，是一个合成中间体。

杂质 3 和 4 为同分异构体。杂质 3 有 m/z 285 的碎片离子，而杂质 4 没有，推测是由于双键的位置发生了改变，使得内酰胺环上的 S 原子与其右侧相邻的碳原子之间的键不易断裂。

杂质 5 由杂质 4 六元环上的羧基和羟基脱水缩合而成。

杂质 6、10 和 11 均为头孢甲肟的同分异构体。杂质 6 为 Δ^3 异构体，保留时间相对较短，推测其氢化噻嗪环内双键位置发生了变化。它的特征离子为 m/z 201 和 m/z 152。推测是由 m/z 352 发生重排产生。杂质 10 为 7-位差向异构体。多数头孢菌素存在 6R, 7S 构型的差向异构体，且该杂质的二级质谱碎片离子与主成分极为相似。杂质 11 的主要碎片离子中未发现头孢甲肟主峰的 m/z 277 的碎片离子。特征碎片离子有 293, 182, 112。推测其为 E 型头孢甲肟。 m/z 293 的离子可能由 m/z 324

离子丢失一个 CH_3O 生成。而 Z 型头孢甲肟中 CH_3O 的氧原子和邻近胺上的氢原子易形成氢键，比较难脱去^[10]。

杂质 7 仅比杂质 3 多了一个羟基，两者主要碎片离子基本一致。

杂质 8 为头孢噻肟，其结构和头孢甲肟非常相似，仅氢化噻嗪环上的一个侧链不同。两者有共同的碎片离子 m/z 396, 324, 167。

杂质 9 为水解头孢甲肟，由头孢甲肟四元环上的酰胺键水解而成^[11]。

杂质 12 为聚合物，推测为杂质 5 与头孢甲肟以酰胺键结合而成的二聚物。

杂质 13~15 均为头孢甲肟合成过程中产生的副产物。其中，杂质 14 为 2-巯基苯并噻唑，属于 2A 类致癌物。

以上部分杂质裂解途径及二级质谱图见图 2~14。杂质 12 可能的结构式见图 15。

3.3 强制降解试验结果分析

对强制降解试验的主要杂质进行分析，从而推测出制剂中杂质的来源。其中，明显增加的杂质如下：高温破坏有杂质 2、杂质 5；碱破坏有杂

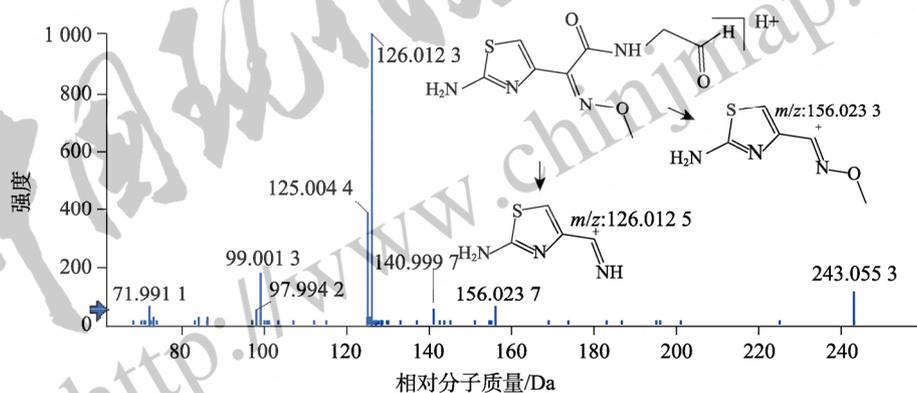


图 2 杂质 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 1

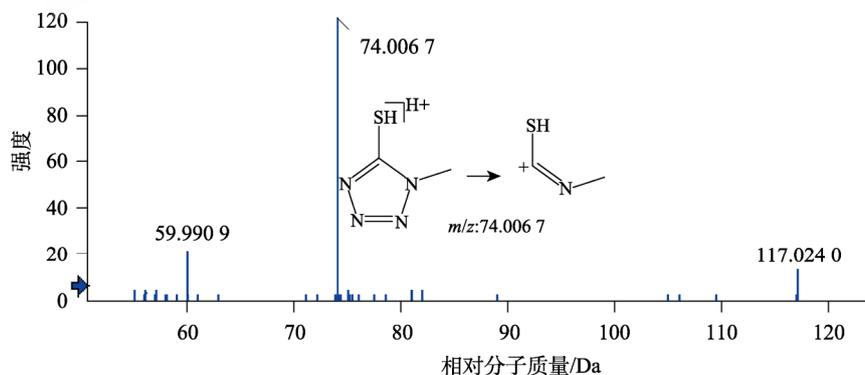


图 3 杂质 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 2

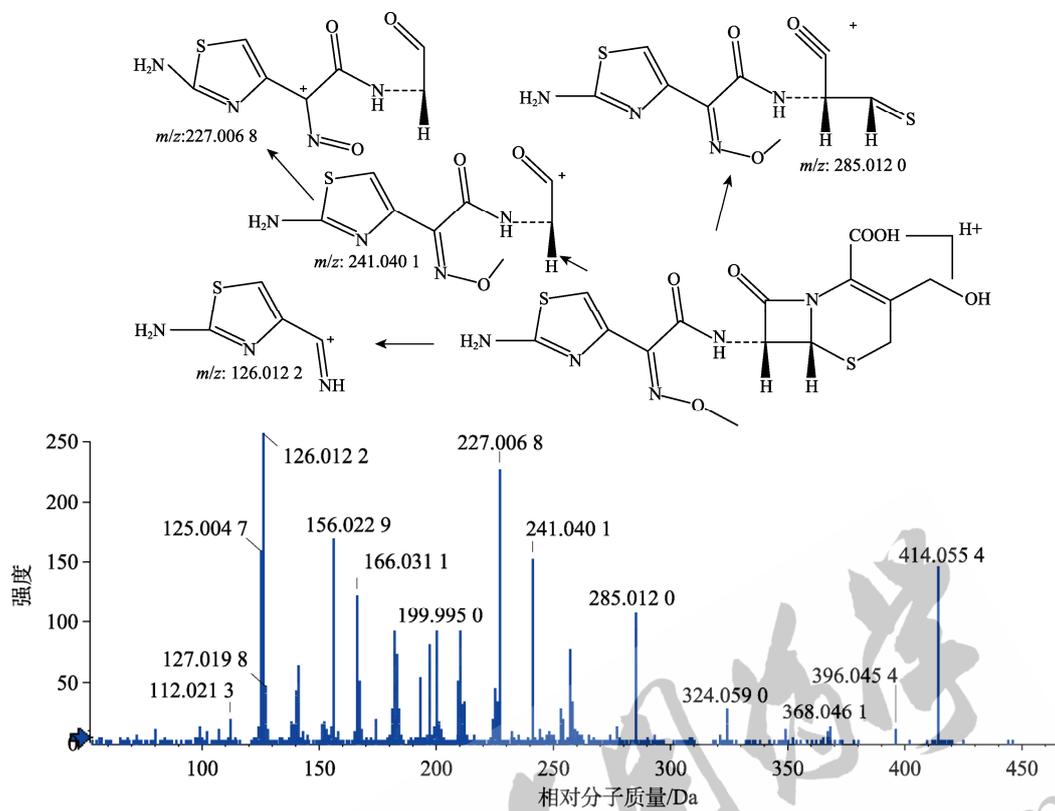


图 4 杂质 3[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 4 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 3

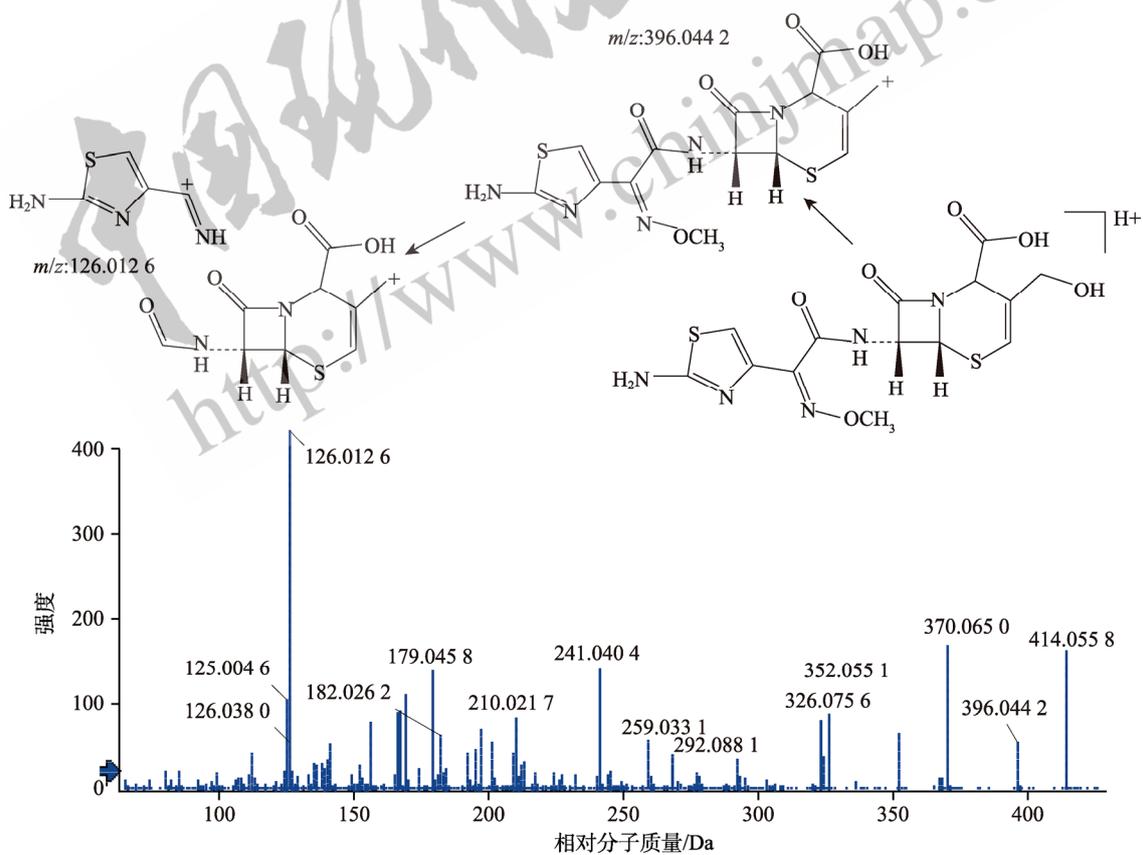


图 5 杂质 4[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 5 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 4

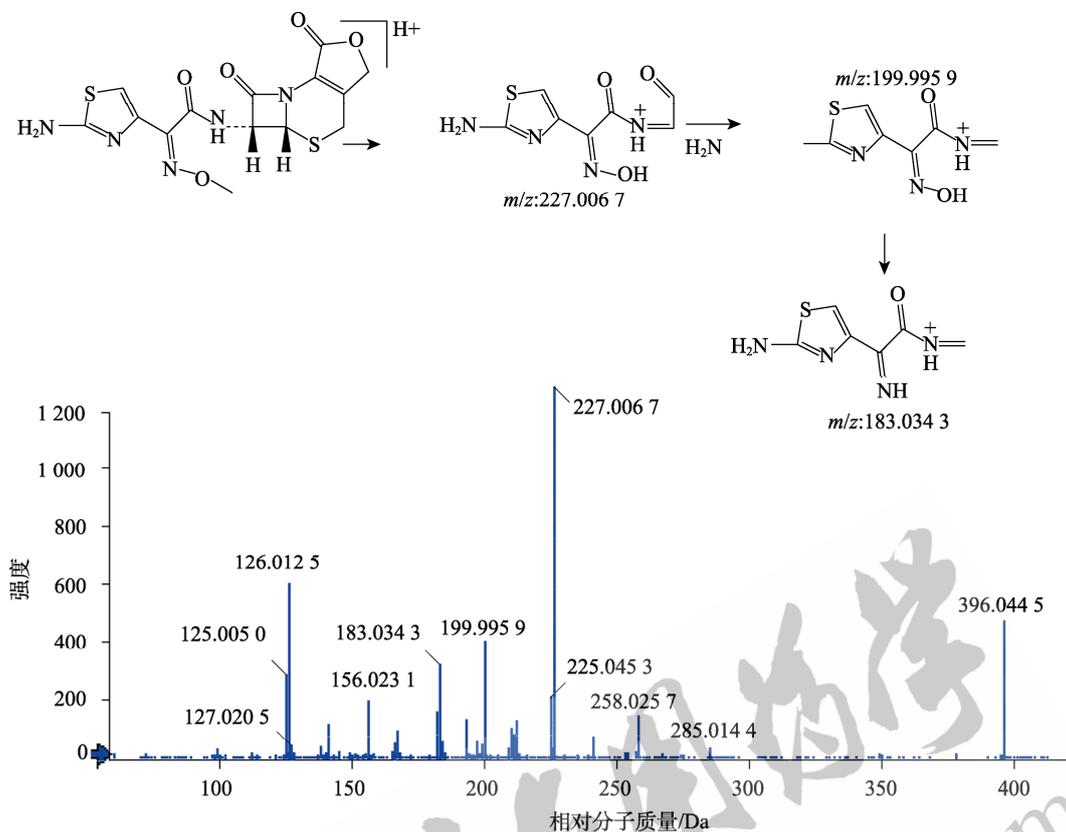


图 6 杂质 5[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 6 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 5

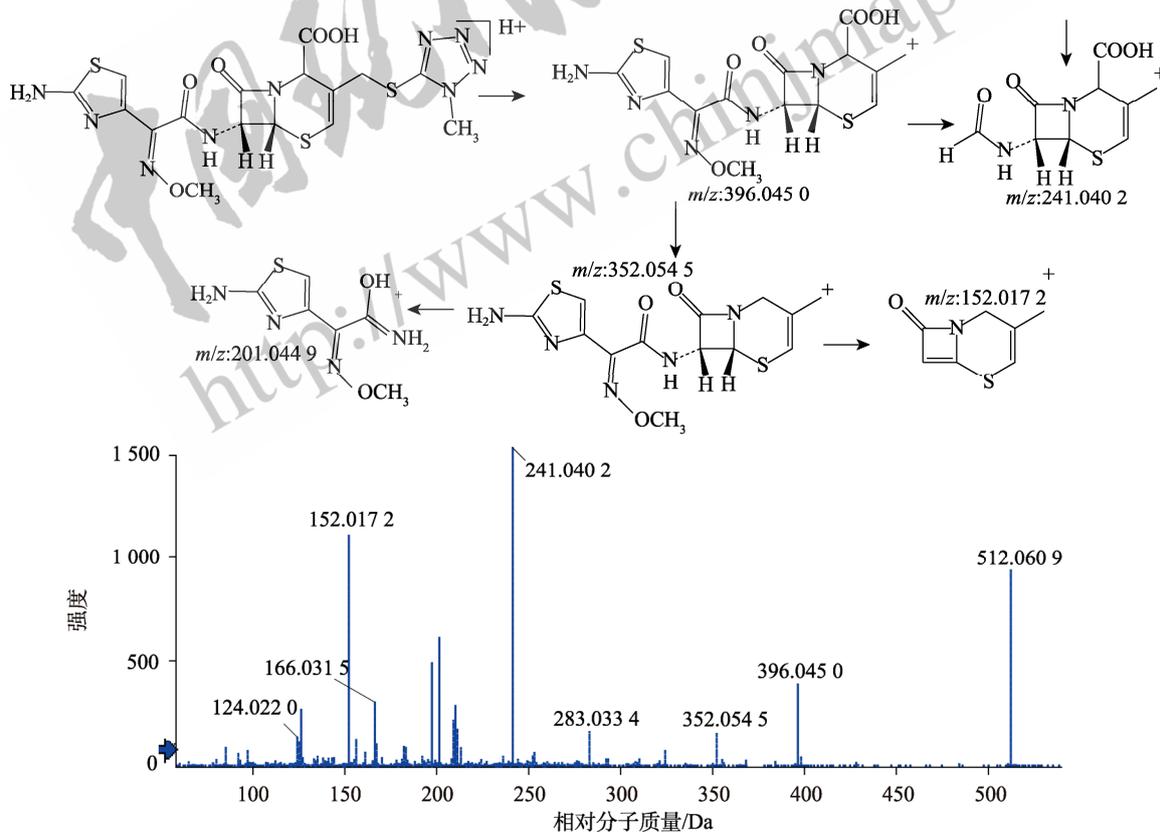


图 7 杂质 6[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 7 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 6

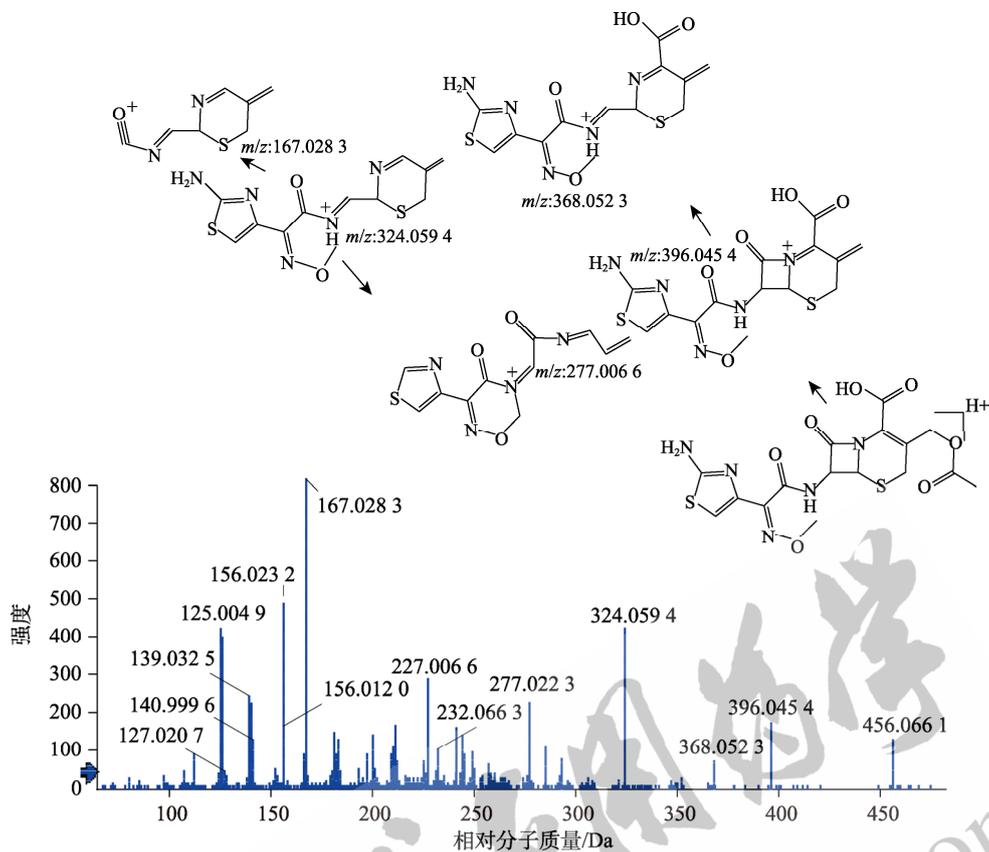


图 8 杂质 8[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 8 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 8

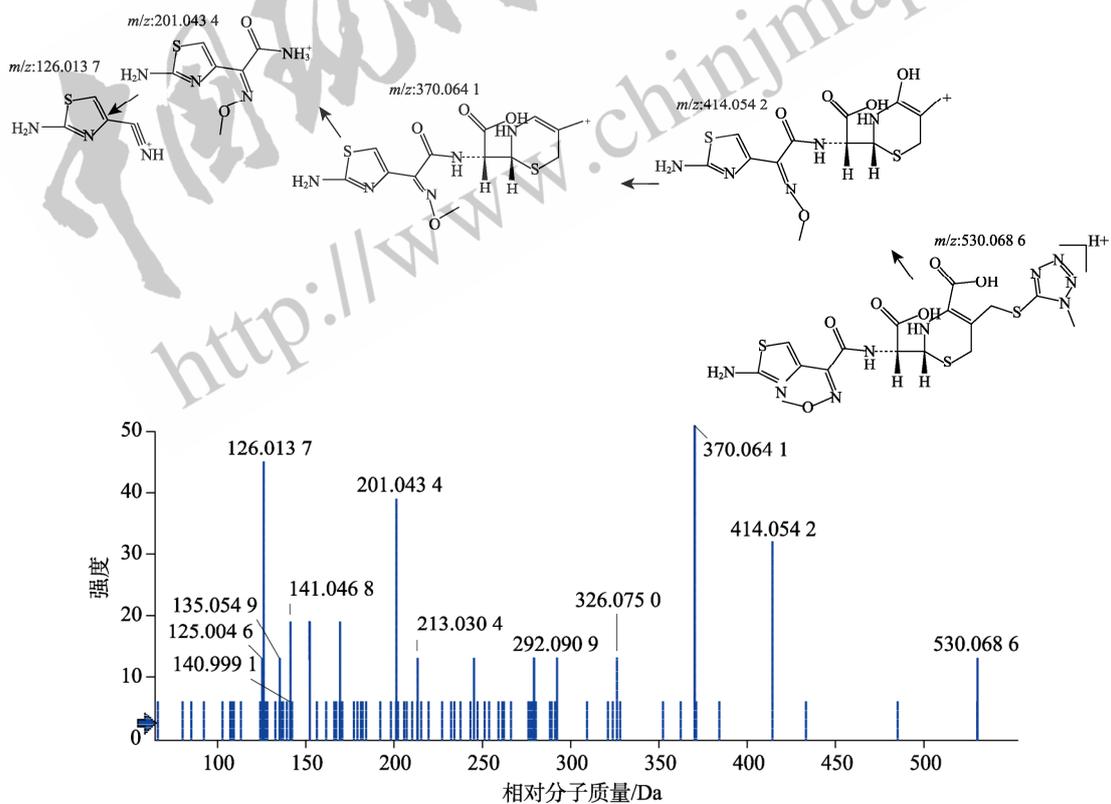


图 9 杂质 9[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 9 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 9

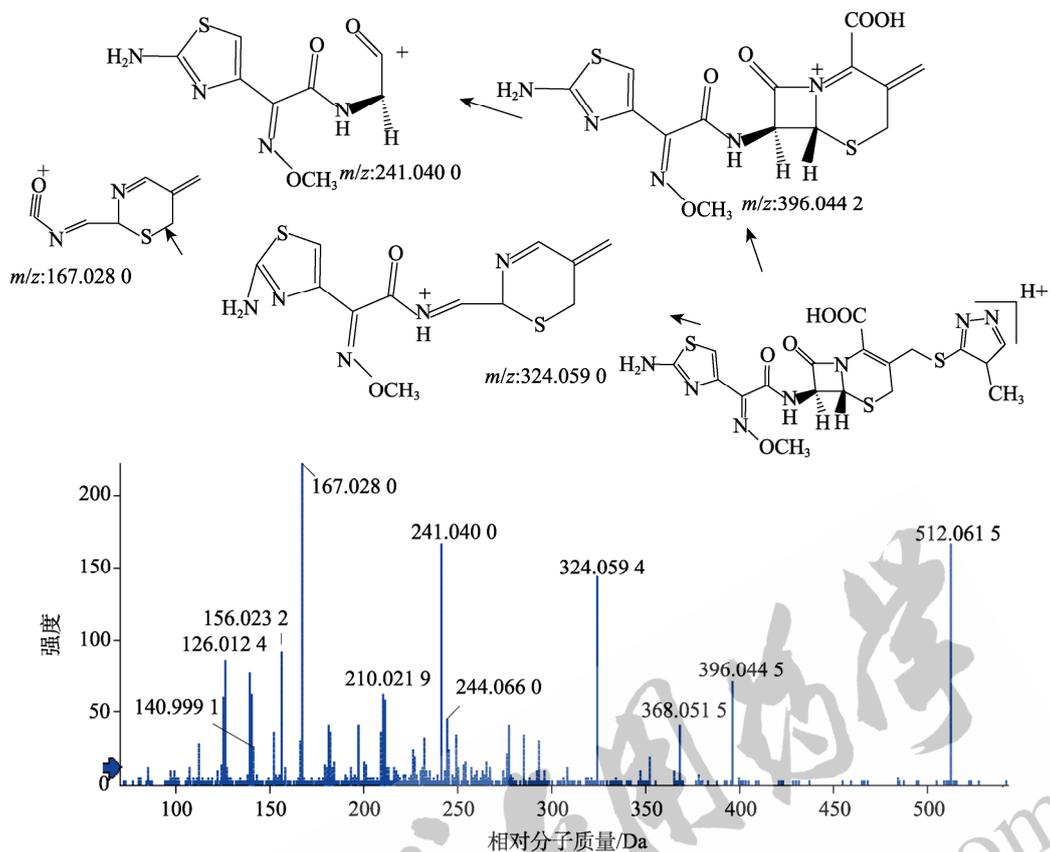


图 10 杂质 10[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 10 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 10

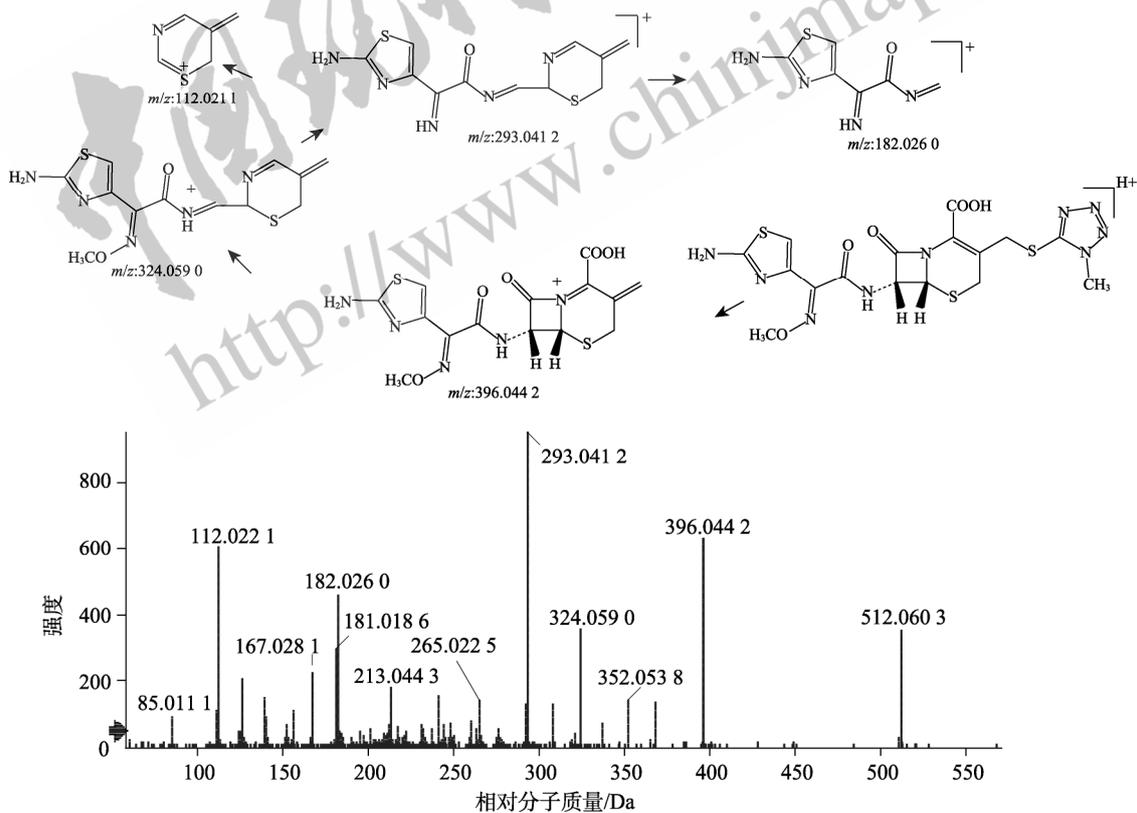


图 11 杂质 11[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 11 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 11

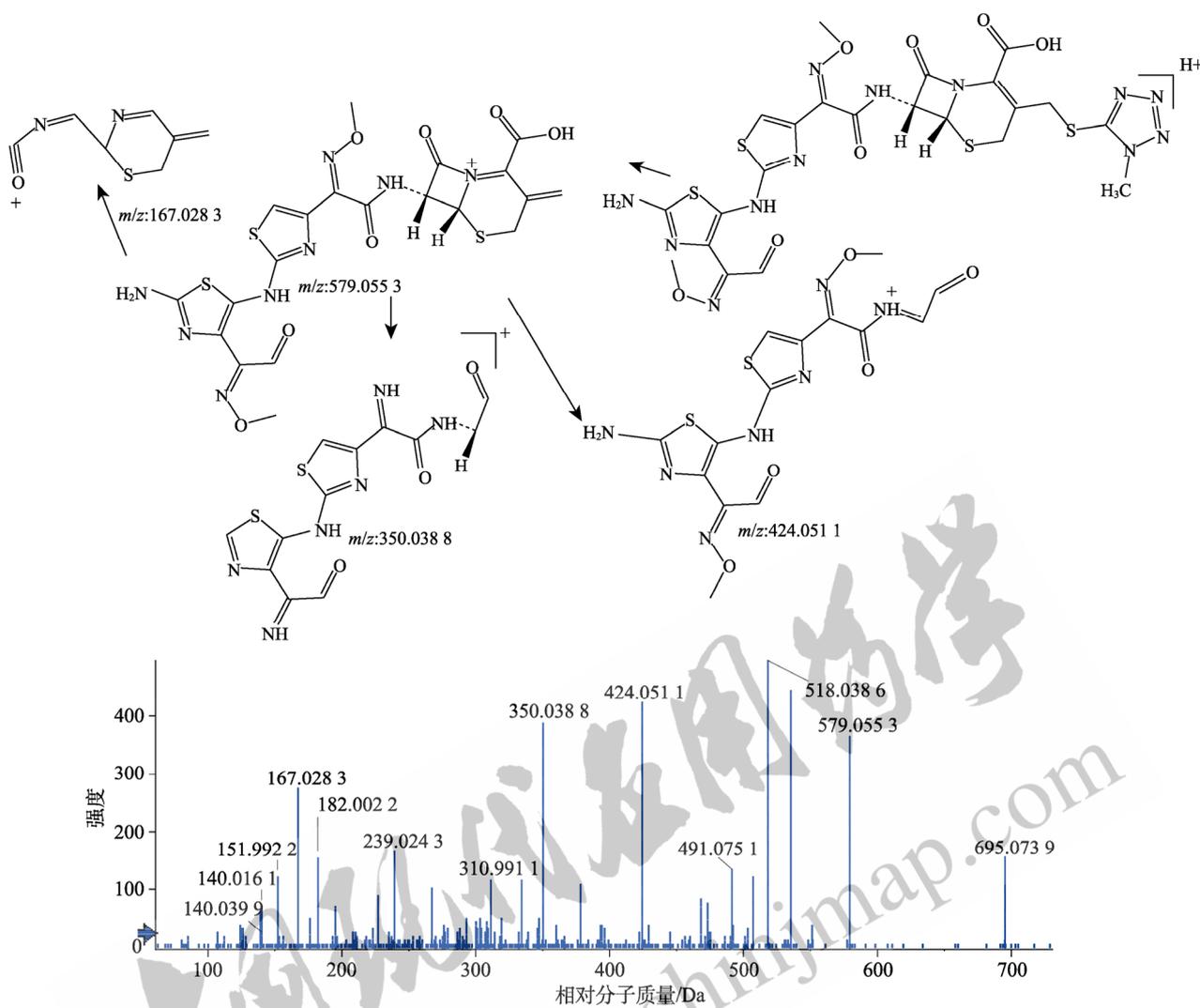


图 12 杂质 13[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 12 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 13

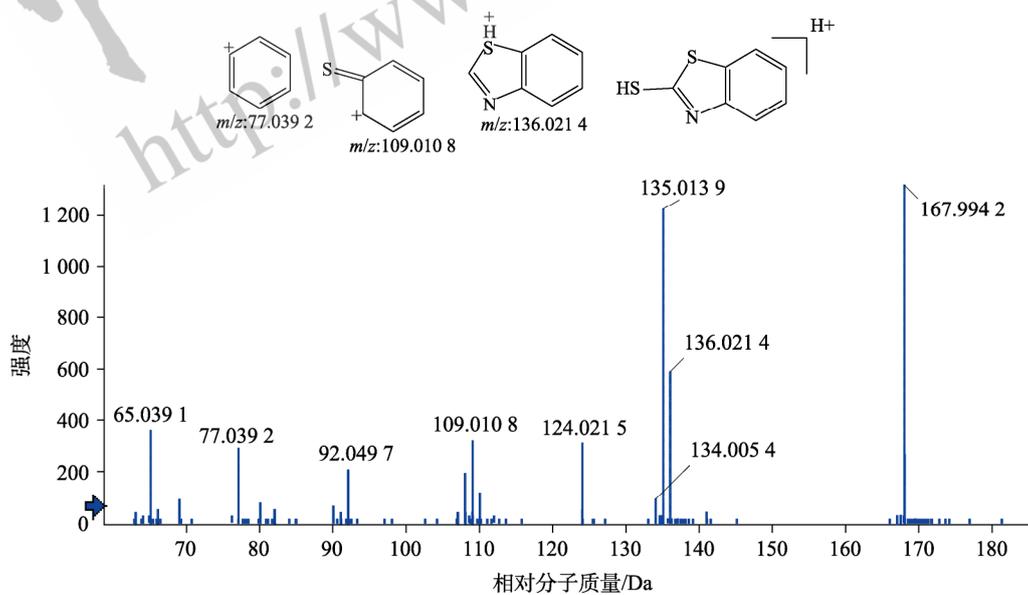


图 13 杂质 14[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 13 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 14

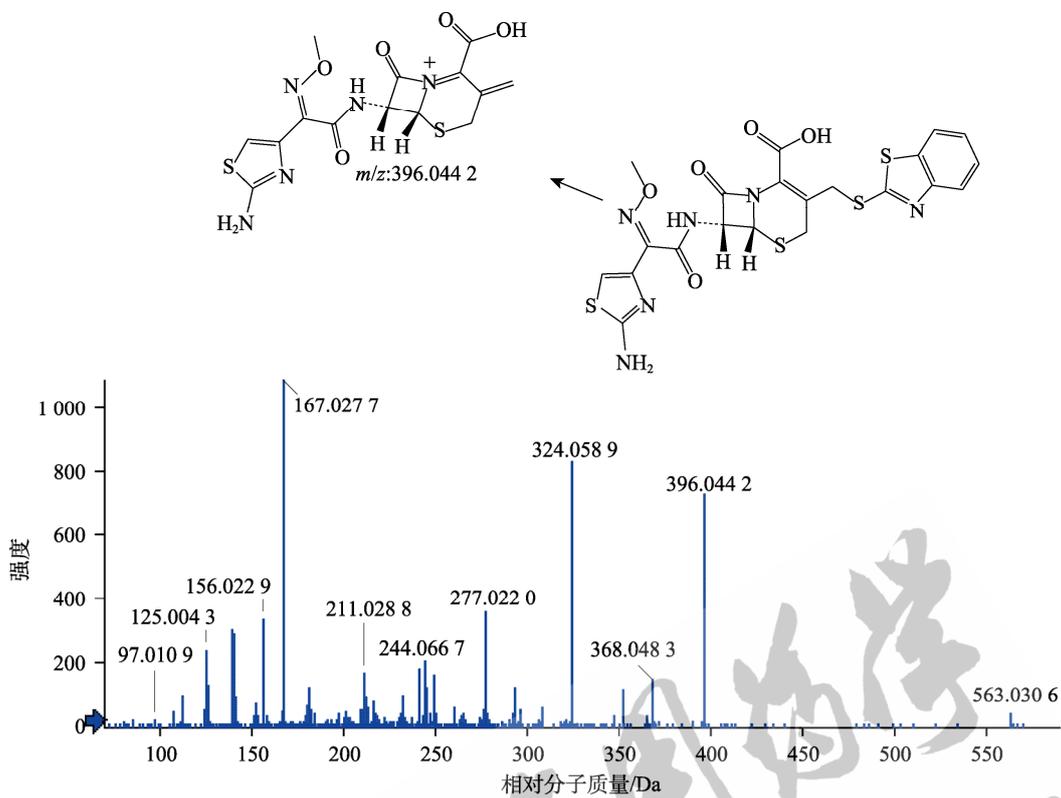


图 14 杂质 15[M+H]⁺二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 14 [M+H]⁺ MS spectrum and possible fragmentation pathway of impurity 15

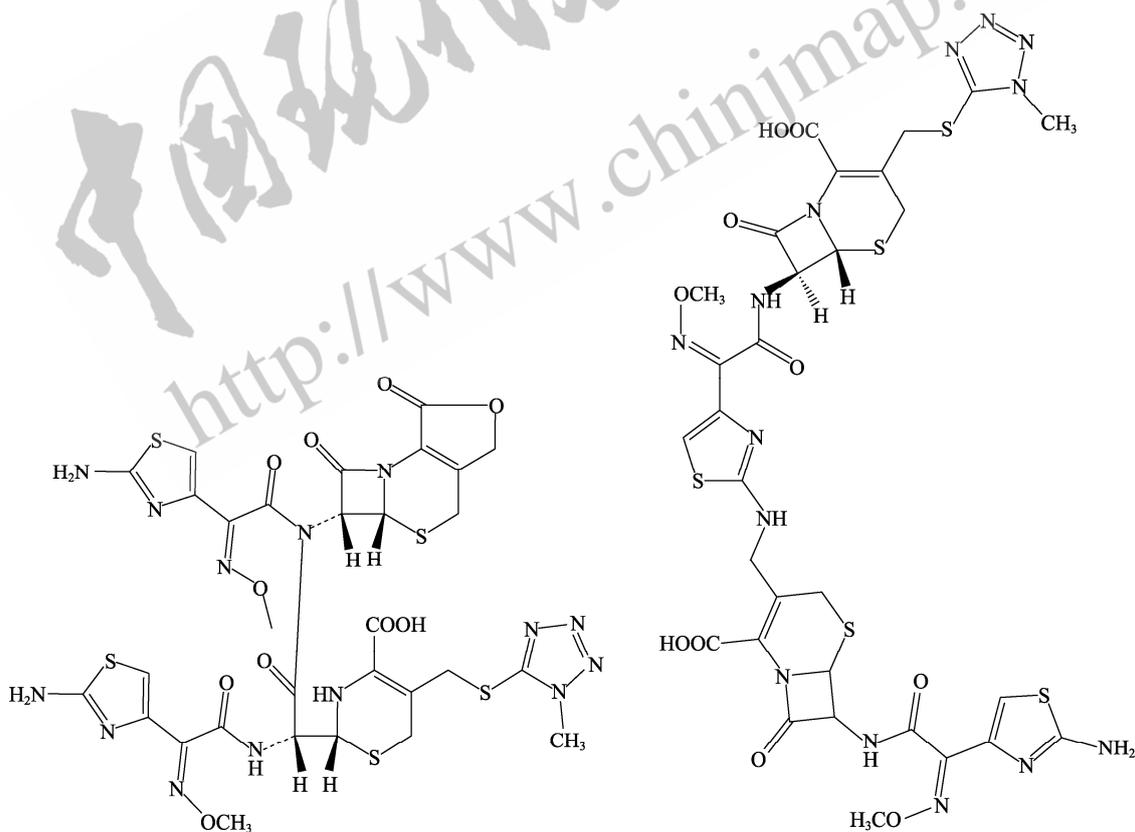


图 15 杂质 12 可能的结构式

Fig. 15 Possible structure of impurity 12

质 10; 强氧化有杂质 9; 光照有杂质 11。本品的杂质主要是生产中引入、盐酸头孢甲肟的降解产物和异构体。

4 讨论

本实验建立了超高效液相色谱-质谱联用分析注射用盐酸头孢甲肟杂质的方法。用 UHPLC-TOF/MS 对注射用盐酸头孢甲肟的杂质谱进行研究。结合杂质的一级、二级质谱数据以及相关文献^[8-10], 鉴定了其中比较有代表性的 15 个杂质, 并进行了详细的结构解析。其中, 杂质 14 为 2A 类致癌物, 也是皮肤致敏反应的阳性物, 研究中发现该物质在部分样品中含量不低, 有必要在标准中增加对该杂质的单独控制, 参考 ICH Q3^[12]对新原料和制剂杂质控制限度指导原则及 EMEA^[13]中对抗菌药物类药物的杂质控制限度的指导原则, 将限度定为 0.2%。破坏试验结果表明, 该样品性质不稳定, 遇酸、碱、光、热、氧化条件会发生降解反应, 成品放置过程中也会有部分降解物或异构体产生。因此, 制剂需要严格执行说明书的储存条件。

REFERENCES

- [1] WANG Y H, LI J H. Pharmacoeconomics analysis of cefmenoxime hydrochloride injection versus cefoperazone injection in the treatment of acute bacterial infection[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2006, 15(10): 830-832.
- [2] CHEN S Q, TAO X X, GAO H Y. Clinical Evaluation of Injectable cefmenoxime hydrochloride in the treatment of acute bacterial infection[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2008, 32(12): 559-562.
- [3] 中国药典. 二部[S]. 2020:1094-1097.
- [4] CHONG X M, TIAN Y, WANG L X, et al. Analysis of related substances and stability of moxifloxacin hydrochloride tablets[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(15): 1531-1541.
- [5] LIANG J M, WANG Z Y, WANG Y et al. UPLC/MS determination of the related substances of azlocillin for injection[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志). 2020, 40(2): 285-294.
- [6] HOU Y R, HUANG M W, ZHAO L L, et al. Analysis of impurity profile of cefotaxime sodium by HPLC-MS[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2017(8): 681-689.
- [7] NARAYANAM M, HANDA T R, SHARMA P, et al. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(87): 191-217.
- [8] RUAN D, WANG H B, WANG J. Gradient HPLC determination of related substances of cefmenoxime hydrochloride drug substance and its sterilized powder for injection[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2012, 37(11): 843-846, 884.
- [9] XIA J, XI S D. Determination of related substances of cefmenoxime hydrochloride drug substance and injection by UPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(22): 2769-2772.
- [10] RUAN D. The Quality research of cefmenoxime hydrochloride drug substance and its sterilizer powder for injection and isepamicin sulfate and its injection[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.
- [11] TIAN Y, HAN Y, HU C Q. Impurity profile study of cefotiam hydrochloride for injection[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(5): 513-522.
- [12] ICH. Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances[S]. 2006.
- [13] EMEA. Guideline on Setting Specifications for Related Impurities in Antibiotics[S]. 2012.

收稿日期: 2022-03-07

(本文责编: 曹粤锋)