

在线体积排阻反相液相色谱 - 飞行时间质谱法鉴定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中聚合物杂质

LCMS-QTOF-017

摘要： 本文建立在线体积排阻 - 反相液相色谱 - 飞行时间质谱法 (SEC-RPLC-QTOFMS) 用于注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的聚合物杂质的鉴定。一维采用 Shimpack Diol-150 (7.9 mm I. D. × 250 mm L., 5 μm) 色谱柱；进样量为 20 μL 并以 254 nm 为检测波长，建立了头孢哌酮和聚合物杂质的 SEC 分离条件；并将 SEC 分离所得聚合物杂质通过中心切割技术收集到二维 RPLC 中脱盐和进一步分离，采用 Q-TOF 为检测器，采集分离所得杂质一级和二级质谱信息后对其进行结构鉴定。在一维条件下头孢哌酮与聚合物峰分离良好；通过二维 RPLC-QTOFMS 推测出 9 个杂质的结构，其中有 4 个为闭环二聚物。在线 SEC-RPLC-QTOFMS 技术可以将聚合物指针性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来，为表征聚合物杂质的研究开拓了新的思路。

关键词： 头孢哌酮 聚合物杂质 在线体积排阻 - 反相液相色谱 - 飞行时间质谱

β-内酰胺类抗生素包括了头孢菌素、青霉素和碳青霉烯类，是临床最常用的注射剂型抗生素。注射用头孢哌酮钠 (Cefoperazone Sodium) 舒巴坦钠 (Sulbactam Sodium) 是一种复合制剂，是由第三代头孢菌素类抗生素头孢哌酮和由辉瑞公司研制开发的首个 β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦钠组合而成。β-内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应与药物中存在的高分子聚合物杂质有关。其中内源性聚合物是 β-内酰胺类抗生素杂质控制的重点。

聚合物杂质检测的难点是：含量低、类型多、且结构不稳定无商用对照品色谱不易定位。《中国药典》2015 年版采用 Sephadex G10 葡聚糖凝胶柱对 β-内

酰胺类抗生素中高分子聚合物进行测定，该色谱柱柱效低，聚合物杂质分离效率低，辅料干扰严重，除分子排阻作用外，还会产生吸附、疏水等作用。

本文首次使用 Shimpack Diol-150 色谱柱建立了注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的高分子聚合物的尺寸排阻色谱法，使用二维液相阀切技术并辅之以质谱联用，对头孢哌酮及高分子杂质分别进行了一级、二级质谱解析。对谱图进行分析归纳，推测出注射液头孢哌酮钠舒巴坦钠中 9 个未知杂质，其中 4 个为闭环聚合物杂质。该法进样量小，分离效能高，分析时间短，专属性强，灵敏度高，为注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的质量控制提供了重要的依据。

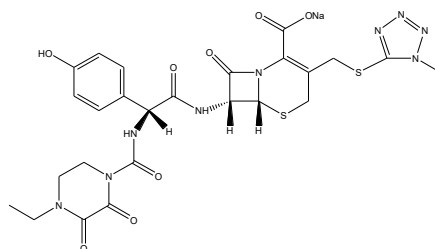


图 1. 头孢哌酮钠结构式

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津二维 SEC-RPLC-QTOFMS 系统，如图 2 所示。具体配置为 LC-20AD×4（输液泵），SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），DGU-20A₅（在线脱气机），SPD-20A（紫外检测器，一维检测器），SPD-M30A（二极管阵列检测器，二维检测器），FCV-32AH×2（流路选择阀），定量环体积 500 μL。LCMS 9030（LCMS-QTOF，四极杆 - 飞行时间质谱仪）和 LabSolution Ver.5.96（色谱工作站）。

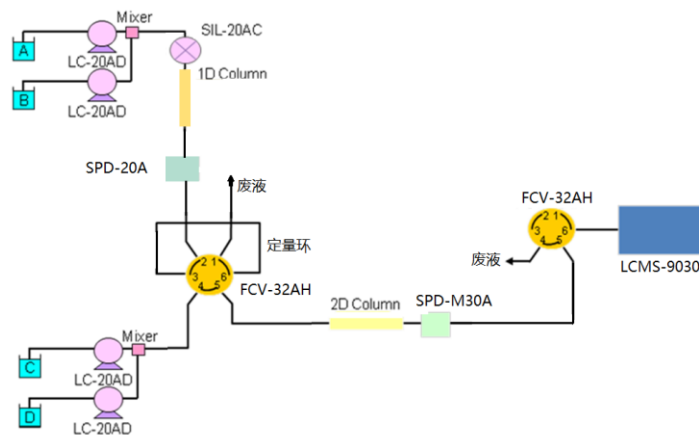


图 2 二维 SEC-RPLC-QTOFMS 杂质鉴定系统流程图

1.2 分析条件

1stD 液相色谱条件：Shimpack Diol-150 (7.9 mm I.D.×250 L. mm, 5 μm)；流动相：磷酸缓冲溶液 [5 mmol/L 磷酸氢二钠 -5 mmol/L 磷酸二氢钠 -61:39 (体积比)]- 乙腈 (95:5)。等度洗脱，0.8 mL/min。采集时间：60 min。检测波长：254 nm；柱温：30°C；进样量：20 μL。

2ndD 液相色谱条件：Shimpack VP ODS 色谱柱 (4.6 mm I.D.×250 L.mm, 5 μm)，检测波长：254 nm，柱温：30°C，流速：1.0 mL/min，定量环体积：500 μL，流动相 A：0.1% 甲酸水；流动相 B：0.1% 甲酸乙腈。梯度洗脱：0-10 min (5% B) → 10-20 min (5%-20% B) → 20-30 min (20%-50% B) → 40-50 min (100% B) → 51-60 min (5% B)。柱后分流比，废液端：质谱端 =8:2。进质谱流速约为 0.2 mL/min。右阀切入质谱端时间为 12 min。

质谱条件：离子源：ESI (+)，接口电压：4.5 kV，扫描范围：一级质谱：m/z 100 ~3000；自动二级：m/z 100 ~3000；雾化气：氮气 3.0 L/min，干燥气：氮气 10 L/min，加热气：空气 10 L/min，碰撞气：氩气，脱溶剂管温度：100°C，加热模块温度：100°C，接口温度：100°C，检测器电压：2.5 kV，校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。检测器工作时间 12-50 min。

1.3 溶液的配制

精密称取注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠原料药样品 0.2 g 置 5 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品溶液（临用新制）。

■ 结果与讨论

2.1 一维色谱图

按照 1.3 制备供试品溶液，按“1.2”项下的 <LC 1stD> 色谱条件进行分析，<LC 1stD> 色谱图如图 3 所示，峰 1 (R.T. = 8.66 min) 为高分子聚合物杂质；峰 2 (R.T. = 10.60 min) 为头孢哌酮主峰。本实验研究对象为聚合物杂质，在 SEC 色谱柱上，其出峰时间在主峰之前。在峰 1 前有一小峰，经鉴定不是目标物，本文不做讨论。

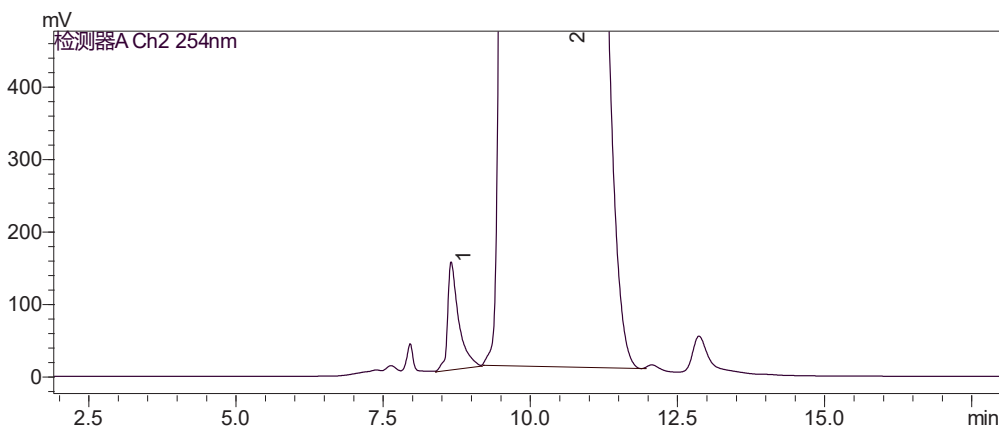
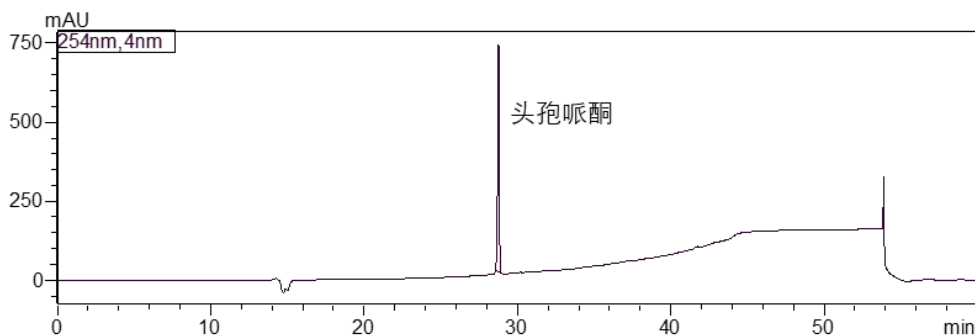


图 3 头孢哌酮 <LC 1stD> 色谱图 (1: 聚合物 (polymer); 2: 头孢哌酮 (Cefoperazone))

2.2 头孢哌酮主峰结构鉴定

使用 SEC-RPLC-QTOFMS 系统鉴定主峰的原因是为了得到主峰在二维柱上的出峰时间，便于结合二维保留时间鉴定聚合物杂质。在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中，将头孢哌酮主峰切换到定量环转至二维脱盐分析，左阀切阀时间为 10.5-11.1 min。馏分经过 <2ndD LC> 分析，得到头孢哌酮主峰的二维液相色谱图，TIC 总离子流色谱图和多级质谱图如图 4 所示。头孢哌酮主峰在二维的出峰时间为 28.76 min，TIC 图上亦可见明显响应。对头孢哌酮主峰进行二级质谱分析结果如下：头孢哌酮分子式 $C_{25}H_{26}N_9NaO_8S_2$ ，精确质量数为 645.1424，一级质谱图中 m/z 646.1506 为 $[M + H]^+$ ， m/z 668.1321 为 $[M + Na]^+$ ， m/z 530.1347 为头孢哌酮在离子源分解产生的碎片，以上离子与软件计算理论质核比误差均在 2 ppm 内。头孢哌酮二级质谱碎片主要有 m/z 530.1339、388.0636、360.0639、318.1089、290.1127、186.0867 和 143.0804。推测其可能的裂解规律见图 5。



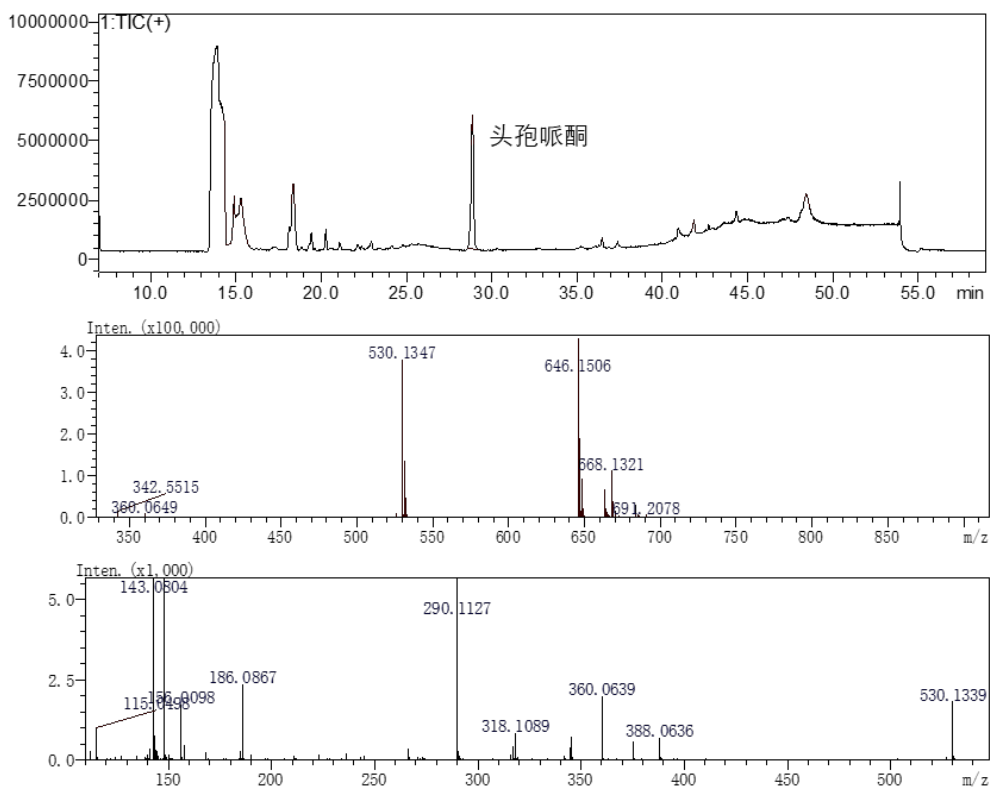


图 4 头孢哌酮主峰 <LC 2ndD> 液相色谱图、TIC 图及 MS¹ 和 MS² 质谱图

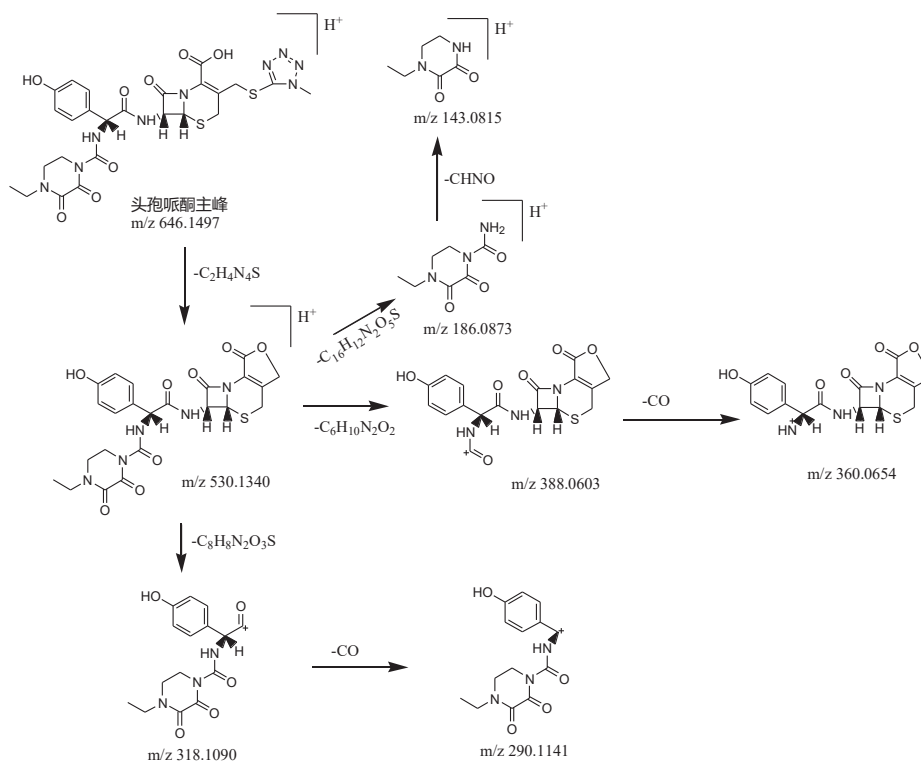


图 5 头孢哌酮主峰可能的裂解规律

2.3 聚合物杂质结构鉴定

在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中, 将头孢哌酮聚合物峰切换到定量环转至二维脱盐分析, 左阀切阀时间为 8.5-9.1 min。馏分经过 2^{nd}D LC 分析, 得到聚合物峰的二维液相色谱图如图 6 所示。与空白溶剂相比, 聚合物峰在二维紫外色谱图中分离出多种组分, 说明聚合物峰是混合物。质谱检测器上有 9 个物质峰检出。前 4 个杂质二维出峰时间在主峰之前, 后 5 个杂质的二维出峰时间在主峰之后。

聚合物峰 -1 的 MS^1 为 m/z 234.0434, MS^2 主要碎片为 m/z 217.1043、146.0537、124.0744 等, 经鉴定其为原料药中的舒巴坦。聚合物峰 -2 的 MS^1 为 m/z 377.1457, MS^2 主要碎片为 m/z 164.0705、143.0805、115.0486 等, 推测其结构可能是头孢哌酮 β -内酰胺键断裂生成的副产物。聚合物峰 -3 的 MS^1 为 m/z 548.1453, MS^2 主要碎片为 m/z 406.0703、319.0749、143.0802 等。其结构可能是头孢哌酮内酯的水解产物。聚合物峰 -4 物质的 MS^1 为 m/z 761.2280, MS^2 主要碎片为 m/z 575.1555、532.1819、390.1110、186.0867 和 143.0802 等。 m/z 186.0867 和 143.0802 二氮六元杂环的特征碎片, m/z 532.1819 和 390.1110 为头孢哌酮内酯及特征碎片的加氢还原峰。推断聚合物峰 -4 为头孢哌酮的有关物质, 碎片信息有限未推导出其可能的结构。聚合物峰 -5 的 MS^1 为 m/z 664.1614, MS^2 主要碎片为 m/z 548.1452、406.0703、143.0804 等, 其结构可能是头孢哌酮 β -内酰胺键水解产物。以上五个杂质均非聚合物杂质。

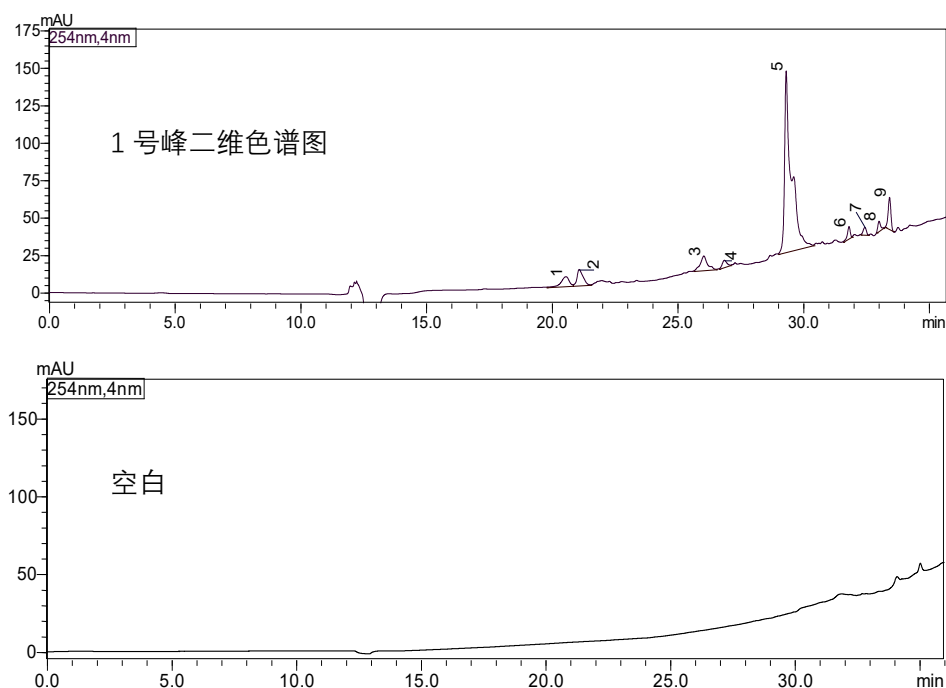


图 6 头孢哌酮聚合物峰 2^{nd}D 液相色谱图及空白溶剂二维色谱图

聚合物峰 -6 与聚合物峰 -7 的质谱图见图 7。两者的 MS^1 均为 m/z 1175.2797, MS^2 主要碎片为 m/z 1059.2567、345.0546、530.1317 等。推测其结构是头孢哌酮和头孢哌酮内酯闭环二聚而成, 分子式为 $C_{48}H_{50}N_{14}O_{16}S_3$, 与理论质核比相对误差为 1.02 ppm。闭环二聚的反应过程, 可能是头孢哌酮 7 位侧链活性氨基进攻内酯的 β -内酰胺键 (8a), 也可能是内酯的 7 位侧链活性氨基进攻头孢哌酮的 β -内酰胺键 (8b), 对应的结构式见图 8。8a 与 8b 的二级碎片完全一致, 由于没有对照品, 不能进一步鉴定。以 8a 为例推导其可能的裂解规律见图 9。聚合峰 -6 与聚合物峰 -7 二维出峰时间在主峰之后, 满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

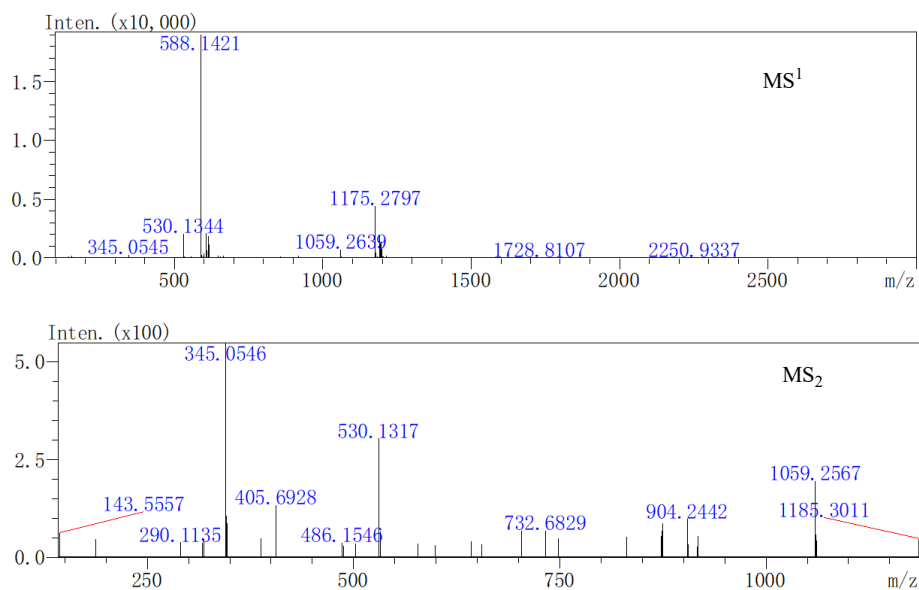


图7 聚合物峰 -6、7 MS¹ 和 MS² 质谱图 (母离子 m/z 1175.2797)

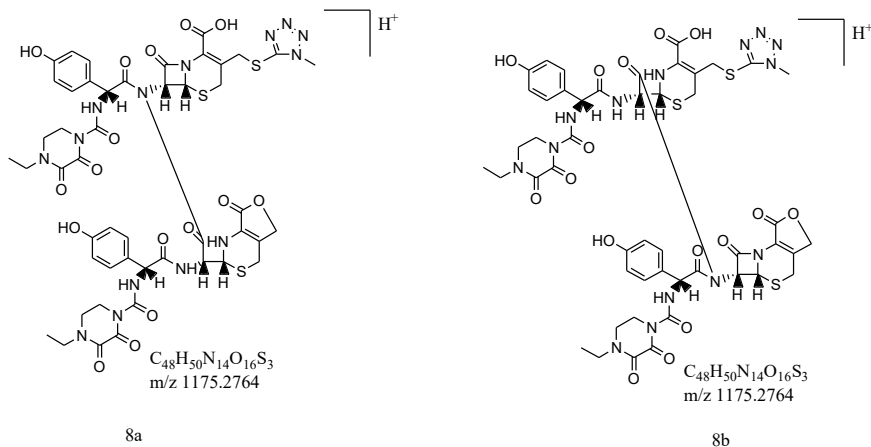


图8 聚合物峰 -6、7 可能的结构式

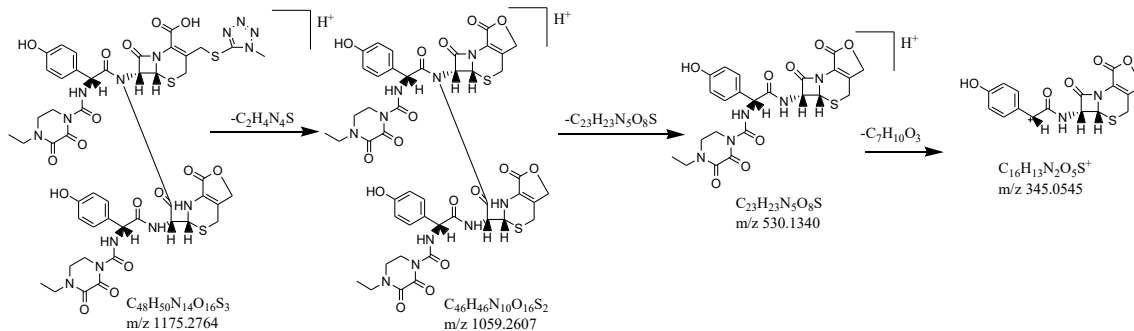


图9 聚合物峰 -6、7 可能的裂解规律

聚合物峰 -8 与聚合物峰 -9 的质谱图见图 10，两者的 MS^1 均为 m/z 1291.2926。推测其结构是头孢哌酮闭环二聚产物，分子式为 $C_{50}H_{54}N_{18}O_{16}S_4$ ， $[M+H]^+$ 与理论质核比误差为 0.38 ppm。聚合物峰 -8 强度弱无二级碎片，聚合物峰 -9 的二级主要碎片为 m/z 1175.2793、1059.2636、1015.2711、829.2091 等，上述二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在，为推测聚合物杂质的结构和聚合方式提供了依据。由于头孢哌酮 7 位侧链有两个活性氨基位点，发生 L 型聚合反应有两种产物，可能的结构式见图 11。由于没有对照品，不能进一步鉴定。结合聚合物峰 -9 的二级碎片，以 11a 为例推导其可能的裂解规律见图 12。聚合物峰 -8 与聚合物峰 -9 的二维出峰时间在主峰之后，满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

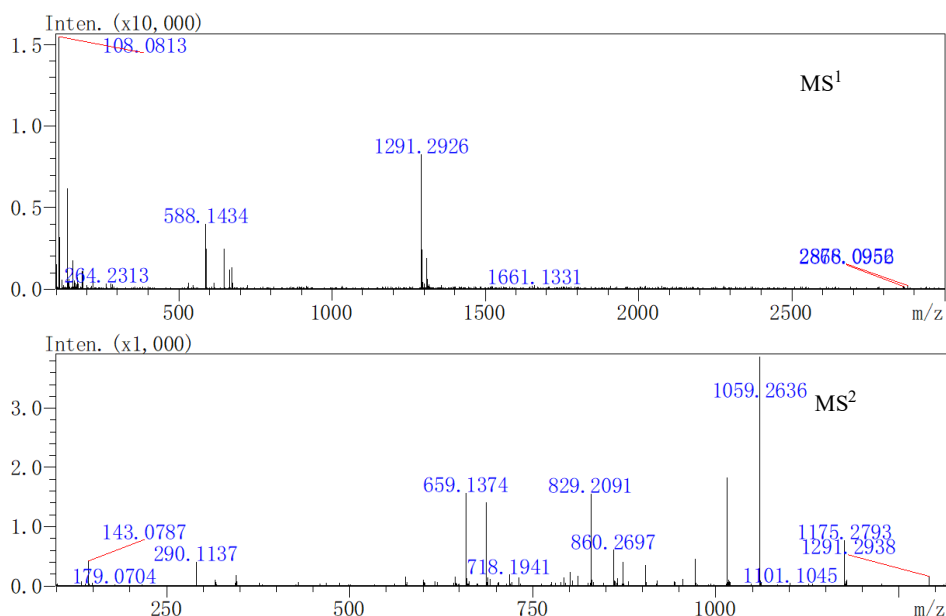


图 10 聚合物峰 -8、9 MS^1 和 MS^2 质谱图 (母离子 m/z 1291.2961)

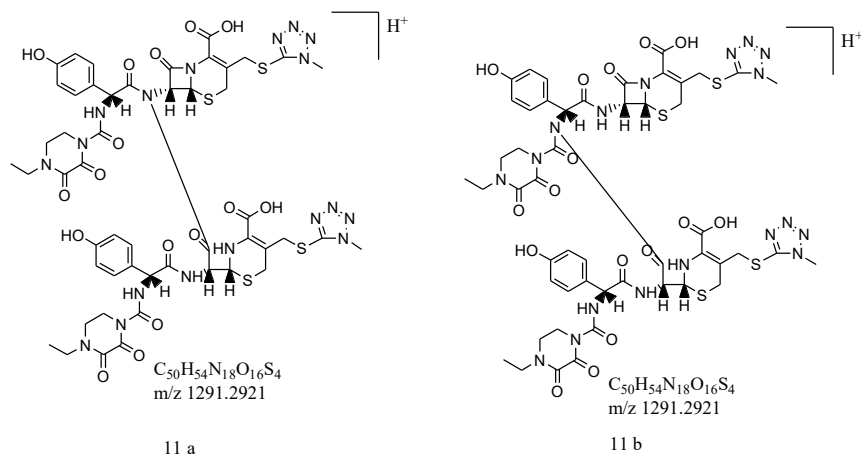


图 11 聚合物峰 -8、9 可能的结构式

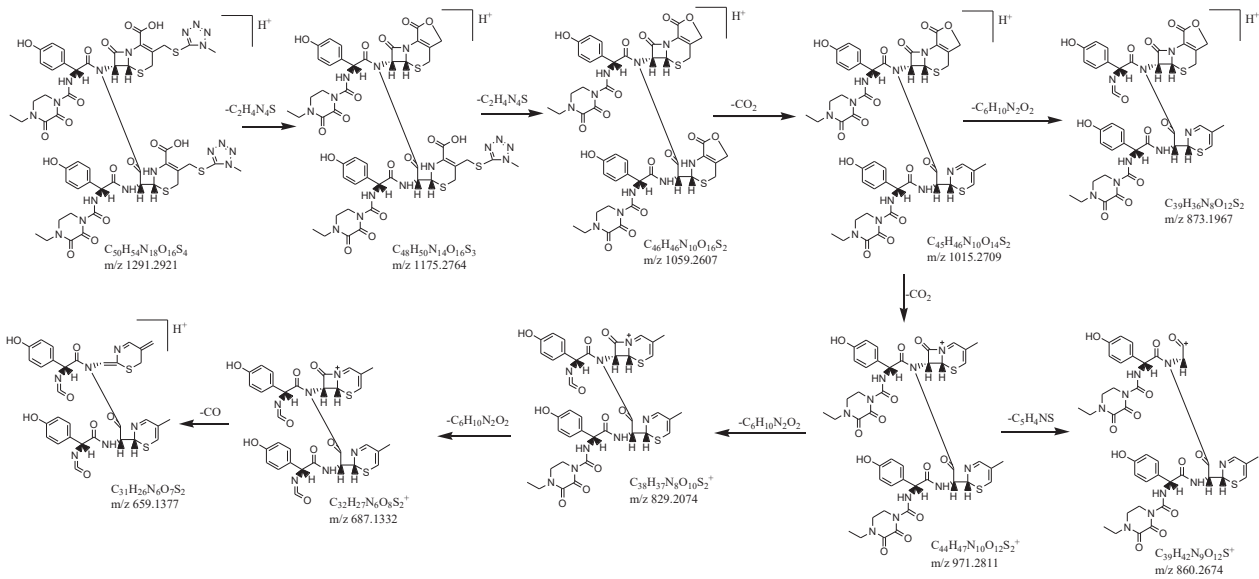


图 12 聚合物峰 -8、9 可能的裂解规律

讨论

3.1 在线脱盐液质联用技术

本实验采用二维 SEC-RPLC-QTOFMS 法对注射用头孢哌酮聚合物进行鉴定,该方法基于馏分收集环 (Fraction loop) 将目标馏分从一维转移至二维液相质谱联用系统,对目标峰指针性的快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程,即在不改变原流动相条件的基础上,实现了液质联用鉴定目标聚合物杂质。鉴定出 4 种聚合物,并对其结构及裂解规律进行推测。二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在,并非范德华力结合的二聚体。4 种聚合物杂质二维出峰时间均在主峰二维的出峰时间之后,符合聚合物杂质保留更强的特性。

3.2 色谱柱的选择

现行标准采用的葡聚糖 G10 的色谱柱,色谱条件下由于高分子助悬剂的影响,聚合物峰检出数量少,聚合物峰型差,无法与主峰完全分离。本文选择的 Shimpack Diol-150 色谱柱 (岛津公司) 采用二醇基键合的多孔高纯硅胶,独有的化学修饰技术确保分离度的同时峰型更加尖锐。实验结果表明聚合物峰与主峰之间分离度有了很大改善。尽管供试品采用过量进样,一维色谱图中主峰为平头峰,聚合物峰切至二维经高分辨质谱确证聚合物峰中未检测到头孢哌酮主峰。表明本法一维聚合物峰与主峰分离度良好。

3.3 与《中国药典》方法对比

本法结合 QTOFMS 对头孢哌酮聚合物杂质进行精准检测,克服了药典方法定性能力不足的技术缺陷。按《中国药典》2015 版收载的注射用头孢哌酮聚合物检查方法进行对比实验,本法的进样量更少,选择性更高,灵敏度更高,分离度更好。聚合物峰在二维为混合物,经高分辨质谱确证其紫外谱图中响应最大的峰是头孢哌酮水解产物,并非聚合物杂质。聚合物杂质在样品中的含量微乎其微,本法采用 500 μ L 定量环将一维中聚合物峰全切入二维才得以检测。同时由于一维流动相中无有机相,并未引起二维溶剂效应。全切的另一个优点是:如有需要,二维可以对聚合物杂质进行定量检测。

3.4 方法的优化

β -内酰胺类抗生素的聚合物结构不稳定易水解,需临用新配。质谱检测时需将离子源温度设置为较低值,避免聚合物在离子源上分解。 β -内酰胺类抗生素的闭环二聚体的响应为 $[2M+H]^+$ 。当样品浓度高时由于范德华力聚合在离子源上也能出现 $[2M+H]^+$ 的响应,需要结合保留时间和二级质谱图进行区分。

■ 结论

本文建立了在线 SEC-RPLC-QTOFMS 系统，将聚合物指纹性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来。经高分辨质谱 LCMS-9030 鉴定二维色谱图中强度最高峰并非聚合物杂质，高分辨质谱的使用克服了药典方法定性不足的问题。LCMS-9030 灵敏度高，适用于低含量杂质的结构鉴定，为 β -内酰胺类抗生素中聚合物的分离、分析及产品质量提高提供了依据。