

液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用

定性检测头孢替唑钠及其杂质

LCMS-QTOF-001

摘要：本文利用岛津液相色谱-四极杆飞行时间质谱（Q-TOF）对抗生素药物头孢替唑钠杂质进行定性分析。通过一级高分辨质谱信息获得准确分子量并用 formula predictor 预测分子式，结合紫外吸收光谱图推测化合物大致发色基团和可能的不饱和度，将该信息用于分子式的进一步筛选。结合头孢替唑钠[M+H]⁺峰与杂质[M+H]⁺峰的差异，以及二级碎片信息，推测可能的杂质结构。将该结构导入 ACD/Labs 软件，所得碎片与二级质谱匹配，最终筛选得到可能的杂质结构。

关键词：液相色谱-四极杆飞行时间质谱 Q-TOF 头孢替唑钠 Ceftezole Sodium

药物的质量研究过程中，常常需要对未知杂质进行定性分析，常用的鉴定方法为高分辨质谱一级和二级信息。根据 ICHQ3A 要求，当原料药最大日剂量大于 2g/天，杂质的鉴定阈值为 0.05%；当原料药最大日剂量小于等于 2g/天，则该杂质的鉴定阈值为 0.1%。头孢替唑钠（Ceftezole Sodium），化学名为 6R(反式)-8-氧代-7-[(1H-1-四氮唑基乙酰基)氨基]-3-[[2-(1,3,4-噻二唑基)硫]甲

基]-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸钠盐，化学式 C₁₃H₁₁N₈NaO₄S₃，MW 462.4528，是由日本藤泽药品公司合成和开发的半合成头孢菌素抗生素，于 1978 年 4 月以 Ceolslin 的商品名上市销售。由于该药物上市较晚、研究较少，但由于其显著的临床作用，生产厂家逐年增加。本文以头孢替唑钠为样品，介绍岛津 Q-TOF LCMS-9030 在药物杂质鉴定中应用及相关流程。

材料与amp;方法

1.1 试剂与仪器

试剂：MS 级乙腈、甲酸，水为超纯水机制备所得。

样品：注射用头孢替唑钠

仪器：快速液相色谱仪 Nexera 系统、四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030。Nexera 系统包括 LC-30AD×2（输液泵），DGU-20A₅（在线脱气机），SIL-20ACXR（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），SPD-M20A（二极管阵列检测器），CBM-20A（系统控制器）。数据采集和分析由 LabSolutions Ver5.95（工作站）完成。质谱碎片结构分析由 ACD/Labs Ver2012 完成。

1.2 样品信息

称取 1 mg 样品，用 1 mL 超纯水溶解，振摇，得到浓度为 1 mg/mL 样品溶液，0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤后进样分析。

1.3 分析条件

液相条件：

流动相：A相-0.1%甲酸水溶液；B相-0.1%甲酸乙腈 流速：0.3 mL/min

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. ×150 mm L., 2.2 μm

柱温：45°C 检测波长：254 nm

进样体积：2 μL 洗脱方式：等度洗脱, A/B=85/15(V/V)

质谱条件：

离子源：ESI(+) 接口电压：4.5 kV 雾化气：3.0 L/min

加热气流量：10.0 L/min 干燥气流量：10.0 L/min 接口温度：300°C

DL管温度：250°C 加热块温度：400°C 校准方法：外标法校准质量数

一级质谱质量范围：m/z 250-500 二级质谱质量范围：m/z 100-500 CE : 35±17 V

结果与讨论

头孢替唑的 LC-UV 图中 (图 1), 峰面积在 0.05%-0.6% 的杂质共 5 个 (杂质 1-5), 这 5 个化合物中, 杂质 1,3,4 和 5 具有较好的 ESI+ 响应, 可获得一级和二级质谱图。杂质 2 在 ESI+ 和 ESI- 响应均较弱, 需要其他手段鉴定。杂质 6 含量较低, 可通过增加进样量, 并选择仅杂质 6 进入质谱的方式获得完整的一级和二级质谱信息。从 [M+H]⁺ 峰数值和 formula predictor 推测得分子式可以看到, 杂质 1 和 6, 杂质 3 和 4 为两对同分异构体。杂质 1-6 一级质谱信息如表 1 所示 (杂质 2 未鉴定)。主成分头孢替唑紫外吸收光谱图和裂解规律如图 2 所示。

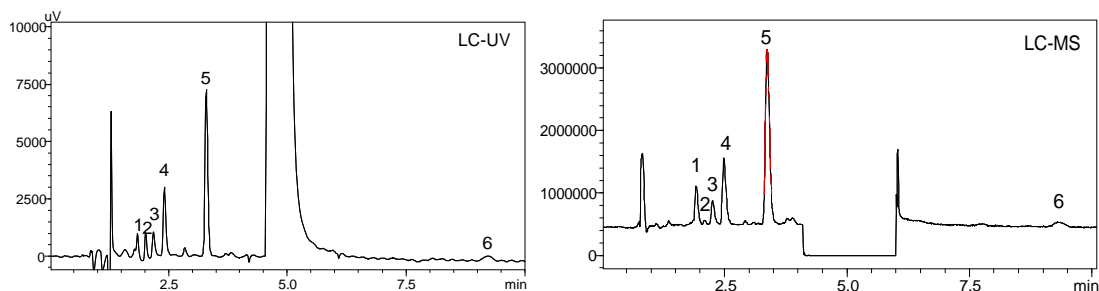


图 1 头孢替唑钠 LC-UV 图 (左) 和 LC-MS 图 (右)

2.1 主成分结构信息

根据头孢替唑的一级质谱图获得 [M+H]⁺ 峰信息为 441.02099, formula predictor 预测得到分子式 C₁₃H₁₂N₈O₄S₃。根据头孢替唑的二级质谱碎片信息, 结合 ACD/Labs 软件, 推得其质谱裂解规律如图 2 所示。

Formula Predictor - 441.020987 - MS(ESI+) RT: 0.104 - 0.126 Scan#: 53 - 63

441.020987 Charge: 1

Error Margin: 2 ppm

Fixed

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	99.20	440.014363	441.021640	441.020987	-0.653	C13 H12 N8 O4 S3	[M+H] ⁺	-1.4795	99.93
2	99.11	440.013678	441.020954	441.020987	0.033	C20 H12 N2 O6 S2	[M+H] ⁺	0.0747	99.02
3	99.07	440.013026	441.020302	441.020987	0.685	C12 H16 N4 O8 S3	[M+H] ⁺	1.5528	99.83

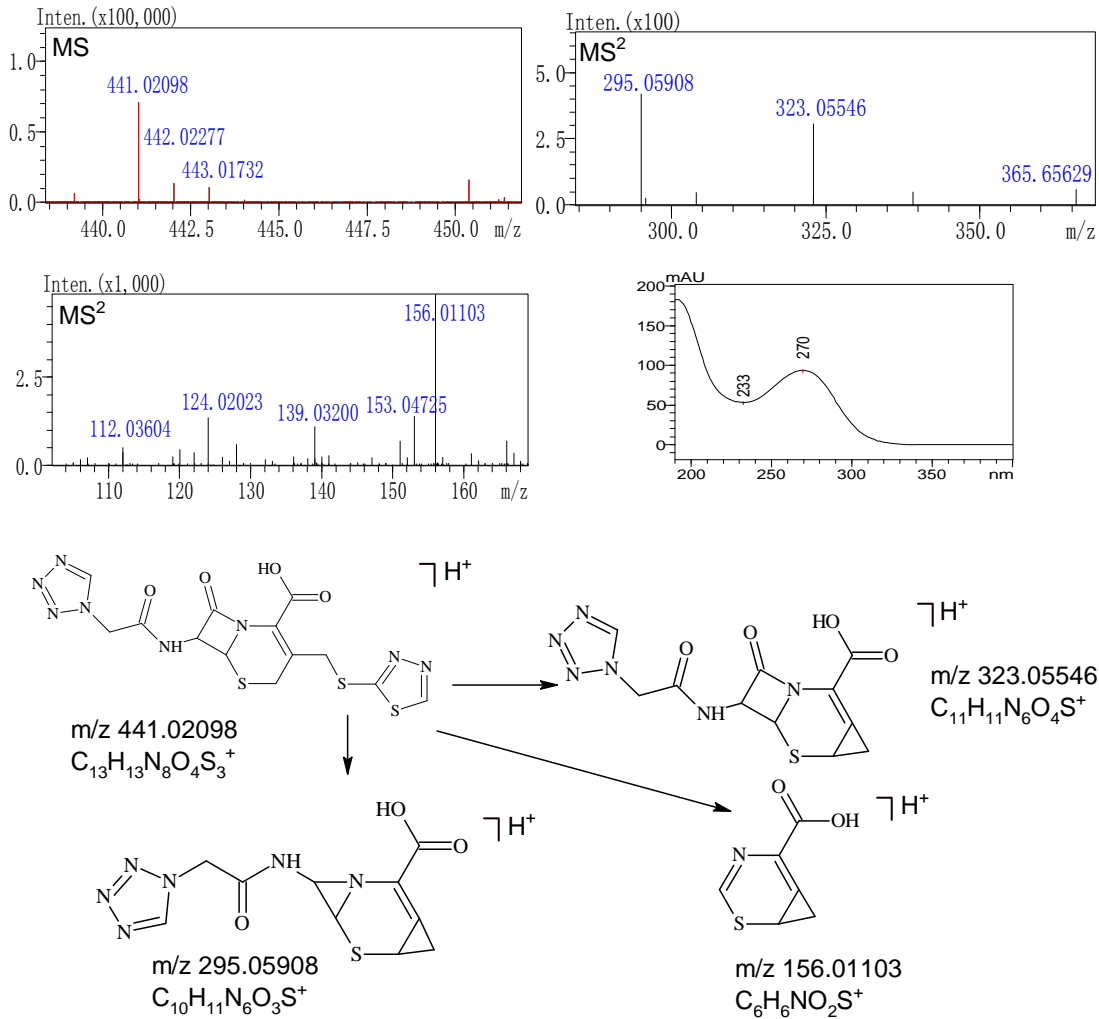


图 2 头孢替唑谱图信息 (上) 和可能的裂解规律 (下)

表 1 样品中杂质的分子式预测结果

名称	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Diff (ppm)	Iso Score
杂质 1	C ₁₁ H ₁₁ N ₆ O ₄ S	M ⁺	323.05539	323.05570	-0.9721	94.57
杂质 3	C ₁₃ H ₁₂ N ₈ O ₅ S ₃	[M+H] ⁺	457.01650	457.01654	-0.1207	99.16
杂质 4	C ₁₃ H ₁₂ N ₈ O ₅ S ₃	[M+H] ⁺	457.01654	457.01654	0.2185	97.74
杂质 5	C ₁₂ H ₁₀ N ₈ O ₂ S ₃	[M+H] ⁺	395.01616	395.01599	-0.3827	98.48
杂质 6	C ₁₁ H ₁₀ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	323.05557	323.05570	-0.4180	83.95

2.2 杂质 1 和 6 的结构鉴定

杂质 1 和杂质 6 的[M+H]⁺峰均为 323.055, formula predictor 预测得到相同分子式 C₁₁H₁₀N₆O₄S。杂质 1 和杂质 6 分子离子峰与头孢替唑[M+H]⁺峰分别相差 117.9656 和 117.9654, 用 formula predictor 推测得到相差结构的分子式为 C₂H₂N₂S₂, 推测为头孢替唑丢失含硫氮杂环和 H₂所得。

杂环丢失并增加双键或形成环的结构有 8 种, 如图 3 所示。β-内酰胺环的张力较大, 含这种结构的化合物稳定性较差, 故排除结构 3-1, 3-5 和 3-6。将剩余 5 种结构中分为酰胺化

合物和季胺两种类型。杂质 1 紫外吸收光谱图中有一个吸收峰与主成分类似 (255 nm)，而杂质 6 紫外吸收光谱图相对主成分存在明显的红移现象，说明杂质 6 可能有新的共轭体系生成。由于杂质 1 与头孢替唑最大吸收波长相似 (255 nm)，排除有新共轭体系生成的结构 3-8。综合以上信息，杂质 1 可能的结构为 3-2, 3-3, 3-4 和 3-7。杂质 1 的保留明显弱于杂质 6。季铵盐与 C18 残留硅羟基的离子交换作用会增强其在 C18 上离子交换保留，同时季铵基团的形成会增大化合物本身的极性，减少其在 C18 上的疏水保留。两种作用力综合结果通常为季铵盐保留弱于叔胺盐，如小檗碱和二氢小檗碱在 C18 上的保留，作为季铵盐的小檗碱保留弱于作为叔胺盐的二氢小檗碱 (Data was not shown)。因此，结构 1 可能的结构为 3-2 到 3-4。将 3-2 到 3-4 结构导入 ACD/Labs，所得 MS 碎片符合程度最高的为结构 3-3。杂质 1 质谱信息和结构推导如图 4 所示。由于杂质 1 为季铵类化合物，其 M⁺峰与分子量相同，因此杂质 1 分子式为 C₁₁H₁₁N₆O₄S。

排除季铵盐，杂质 6 可能的结构为 3-7 和 3-8，根据吸收波长紫移红移规则，结构 3-8 所形成的共轭体系紫外吸收波长最长(酸、酰胺 β 位共轭+5 nm, 延长一个双键共轭+30 nm)，可实现 299 nm 处出现最大吸收。将结构 3-8 导入 ACD/Labs，所得 MS 碎片符合实际测得信息。杂质 6 质谱信息和结构推导如图 5 所示。

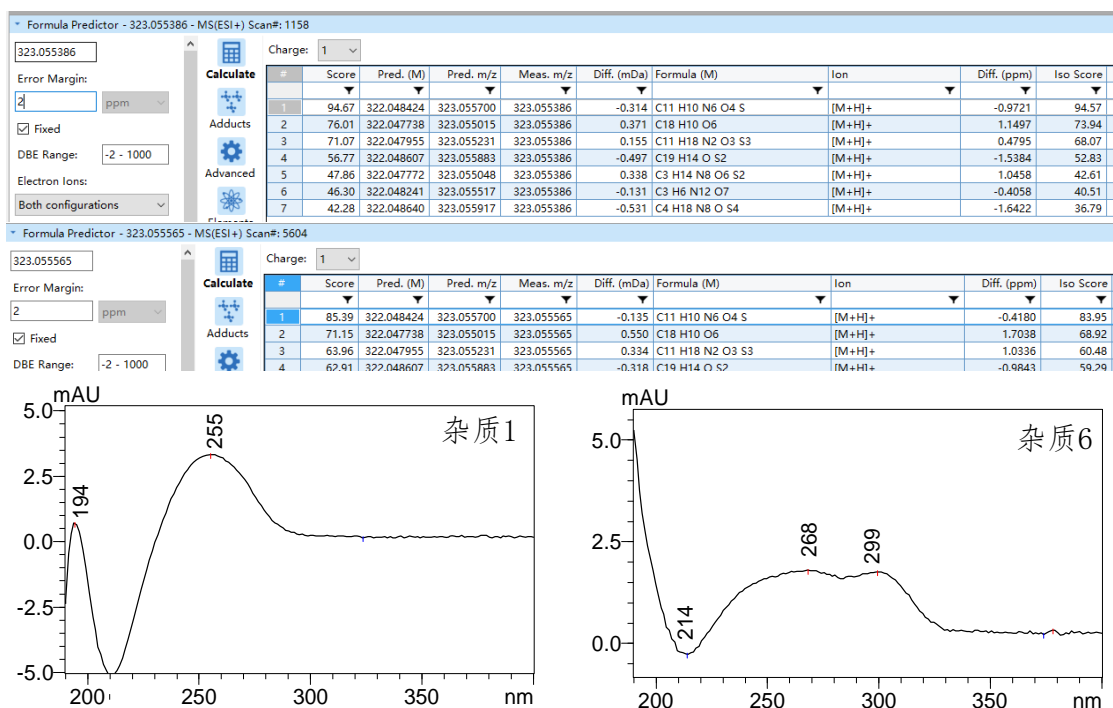


图 2 杂质 1 和杂质 6 分子式预测 (上) 紫外吸收光谱图 (下)

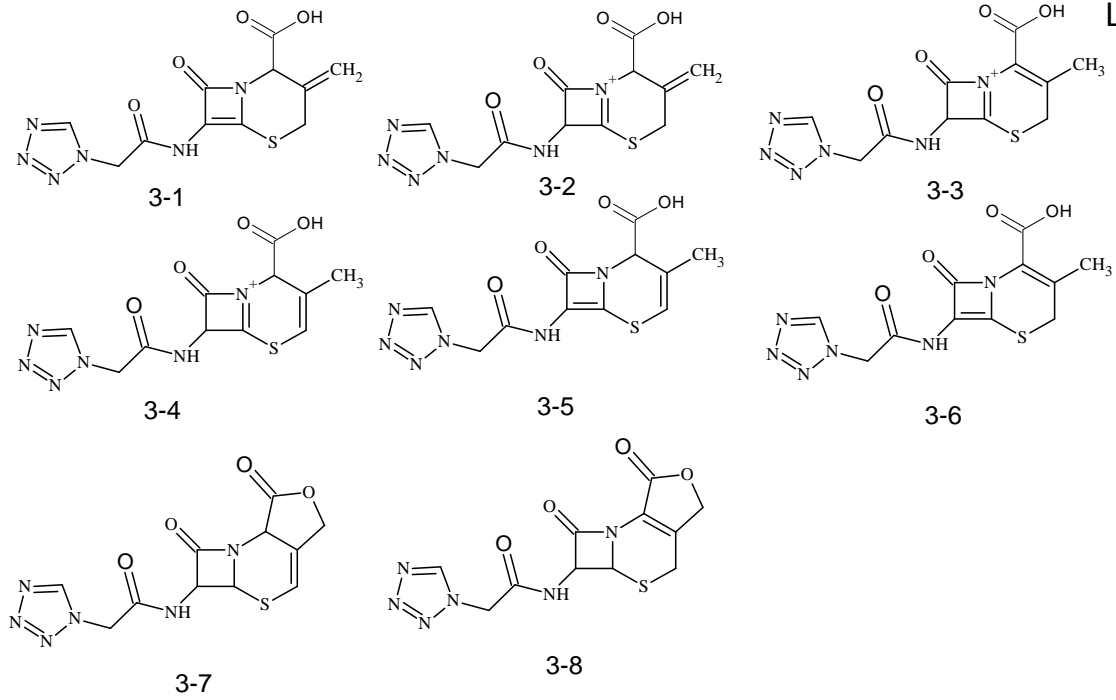


图3 杂质1和6可能的结构

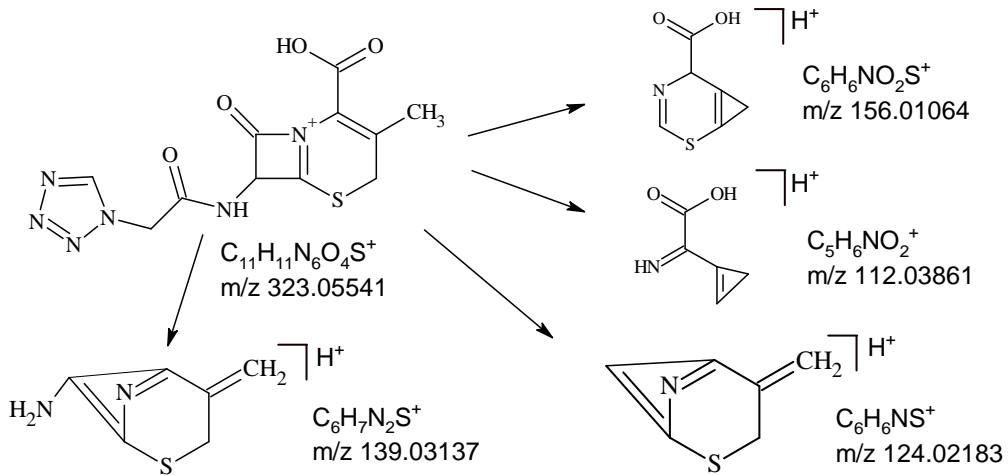
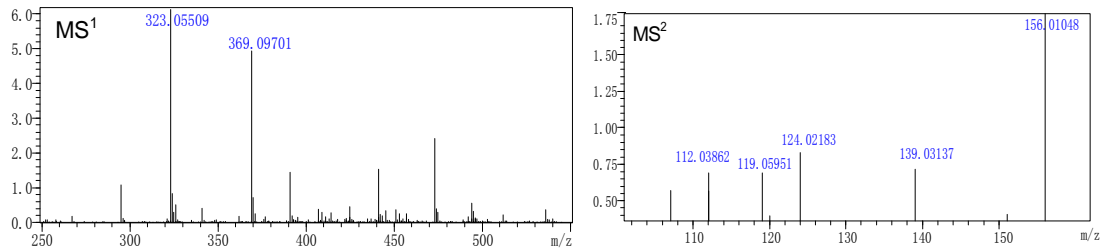


图4 杂质1质谱图（上）和可能的裂解规律（下）

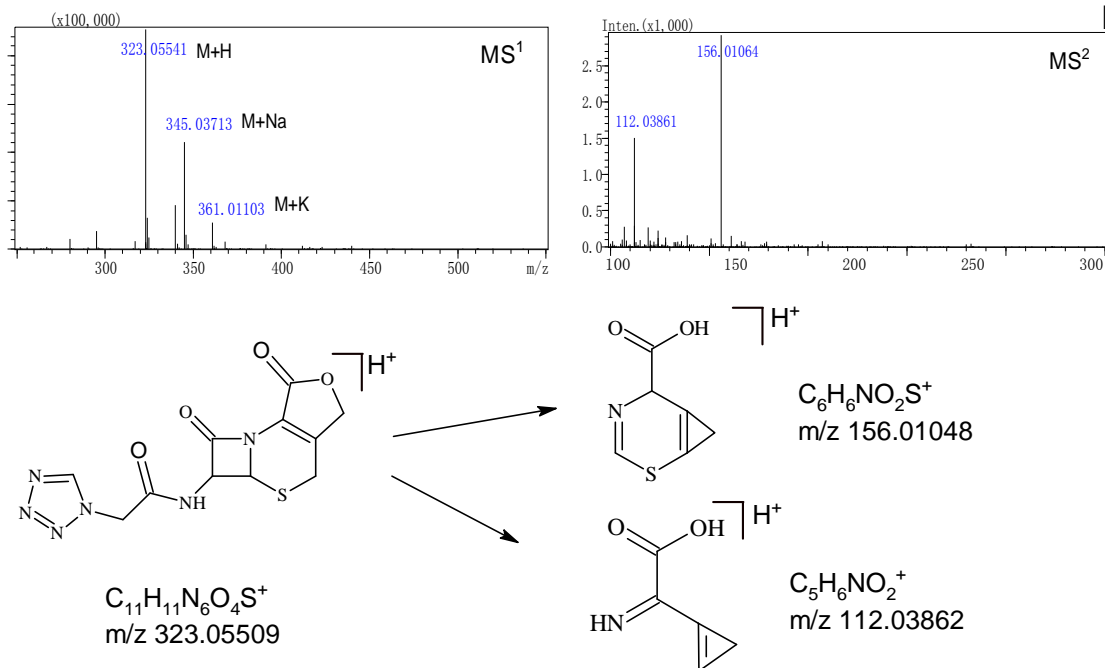


图5 杂质6质谱图(上)和可能的裂解规律(下)

2.3 杂质3和杂质4的鉴定

杂质3和杂质4的[M+H]⁺峰均为457.0161，formula predictor 预测得到相同分子式C₁₃H₁₂N₈O₅S₃。杂质3和杂质4的[M+H]⁺峰与头孢替唑[M+H]⁺峰分别相差15.9955和15.9956，即与头孢替唑相差一个氧原子，推测为头孢替唑某氢原子被羟基取代所得。

头孢替唑某氢原子被羟基取代的结构有7种，如图7所示。这7种结构中分为双键或酰胺键α位取代(结构3-7)和非α位取代(1-2)。双键或酰胺键α位羟基取代会均会使得最大吸收波长红移约15nm。杂质3和4与头孢替唑相比紫移4nm，推测杂质3和4可能的结构为图7中结构7-1和7-2。将结构7-1和7-2导入ACD/Labs，所得MS碎片相同且与杂质3和4所得二级质谱信息吻合。ACD/Lab 预测化合物logP值，结构7-1和7-2的logP分别为-0.19±0.86和0.07±0.86，根据C₁₈疏水保留规律，杂质3可能为结构7-1(图8)，杂质4可能为结构7-2(图9)。

Formula Predictor - 457.016499 - MS(ESI+) Scan#: 1363										
#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	
1	99.21	456.009278	457.016554	457.016499	-0.055	C13 H12 N8 O5 S3	[M+H] ⁺	-0.1207	99.16	
2	78.12	456.009061	457.016338	457.016499	0.161	C20 H4 N6 O8	[M+H] ⁺	0.3531	75.84	
3	72.12	456.008809	457.016085	457.016499	0.414	C13 H20 N4 O4 S5	[M+H] ⁺	0.9055	69.47	
4	66.95	456.008592	457.015869	457.016499	0.630	C20 H12 N2 O7 S2	[M+H] ⁺	1.3792	64.02	
5	65.06	456.009461	457.016737	457.016499	-0.238	C21 H16 N2 O2 S4	[M+H] ⁺	-0.5209	61.41	
6	60.42	456.008400	457.016596	457.016499	0.812	C13 H8 N8 O10 S	[M+H] ⁺	-1.7205	45.05	

Formula Predictor - 457.016654 - MS(ESI+) Scan#: 1500										
#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	
1	97.89	456.009278	457.016554	457.016654	0.100	C13 H12 N8 O5 S3	[M+H] ⁺	0.2185	97.74	
2	96.85	456.009061	457.016338	457.016654	0.316	C20 H4 N6 O8	[M+H] ⁺	0.6922	96.84	
3	73.79	456.008809	457.016085	457.016654	0.569	C13 H20 N4 O4 S5	[M+H] ⁺	1.2446	71.54	
4	71.63	456.010146	457.017423	457.016654	-0.769	C14 H16 N8 S5	[M+H] ⁺	-1.6816	69.43	
5	69.14	456.008592	457.015869	457.016654	0.785	C20 H12 N2 O7 S2	[M+H] ⁺	1.7183	66.70	

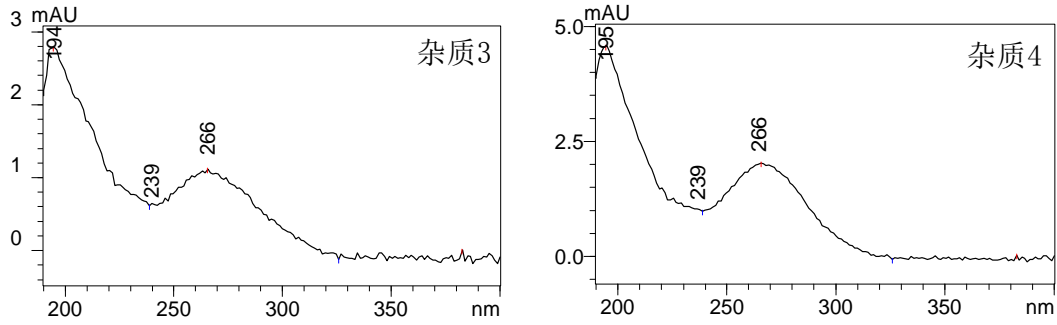


图6 杂质3和杂质4质谱图(上)和紫外吸收光谱图(下)

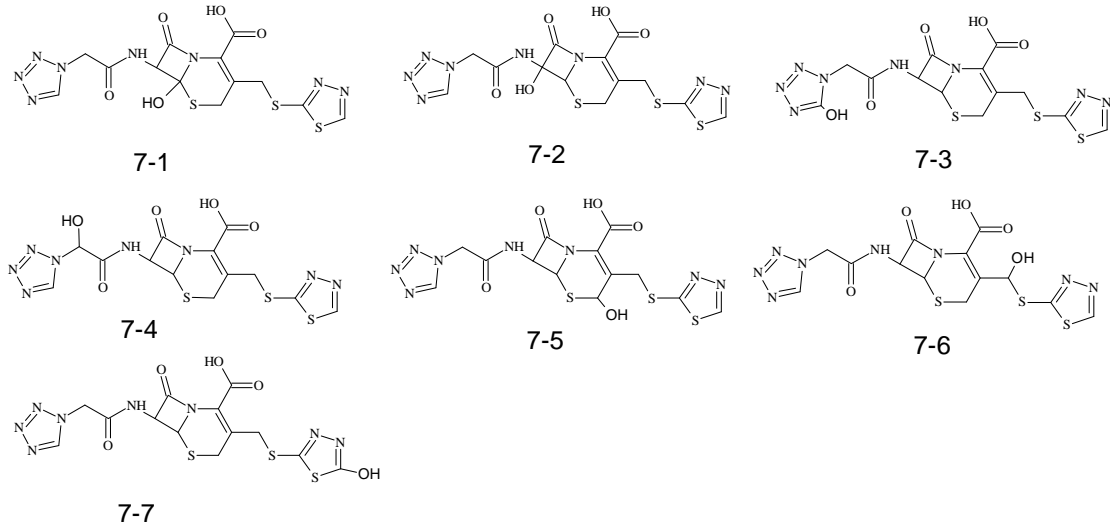


图7 杂质3和4可能的结构

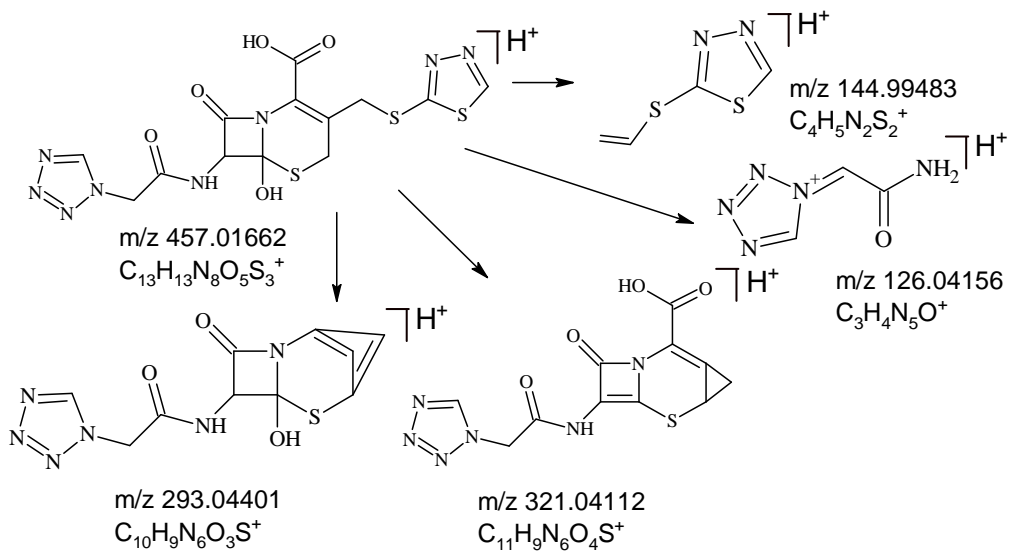
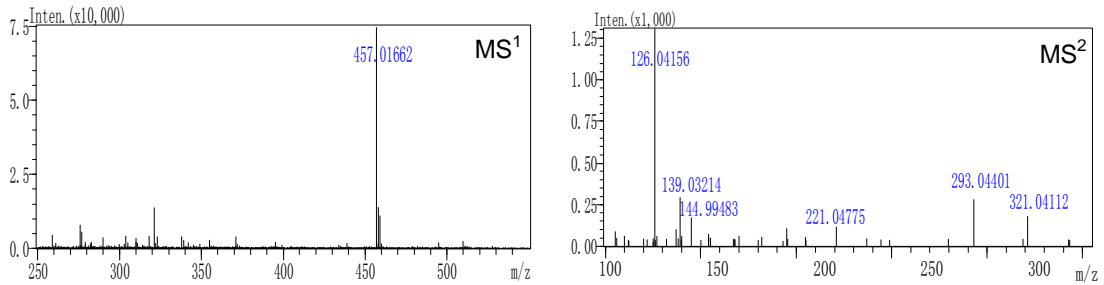


图 8 杂质 3 质谱图 (上) 和可能的裂解规律 (下)

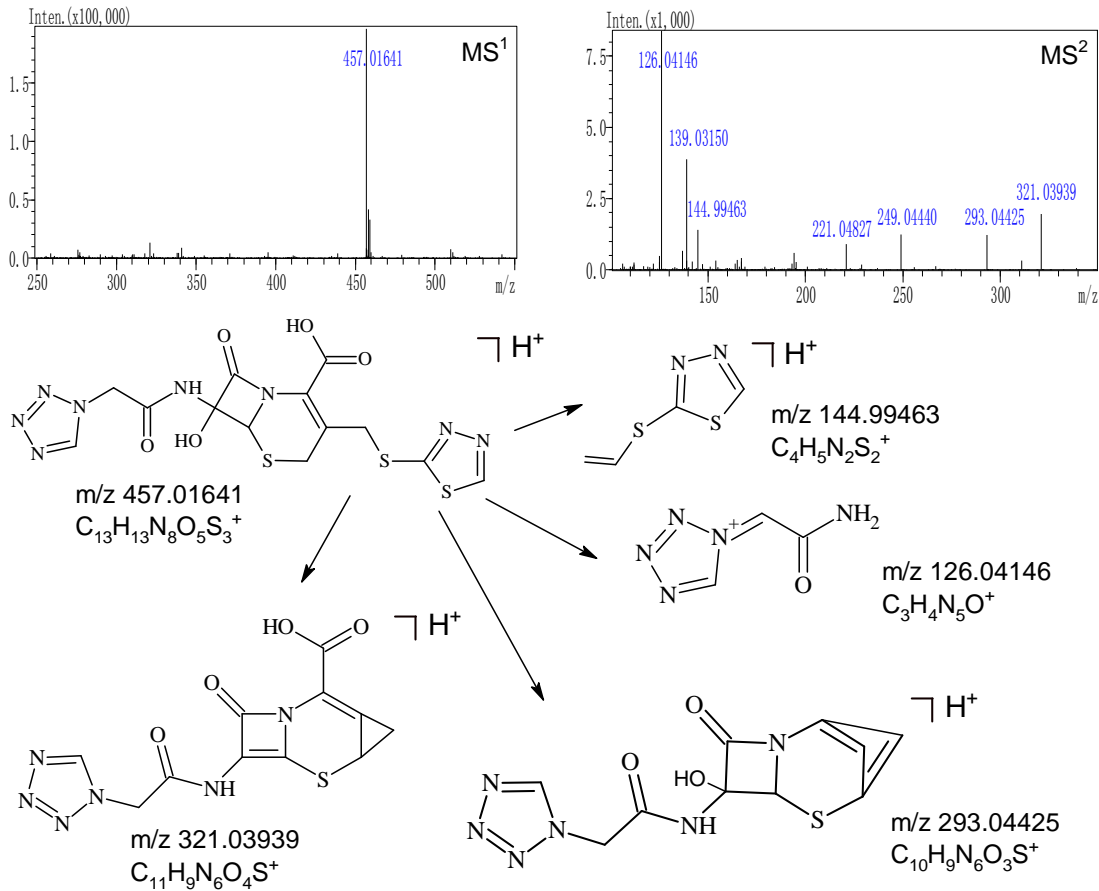


图 9 杂质 4 质谱图 (上) 和可能的裂解规律 (下)

2.4 杂质 5 的鉴定

杂质 5 的[M+H]⁺峰为 395.0160, formula predictor 预测得到分子式 C₁₂H₁₀N₈O₂S₃。杂质 5 的[M+H]⁺峰与头孢替唑的[M+H]⁺峰相差 46.0050, 即与头孢替唑相差 CH₂O₂, 推测为头孢替唑羧基被 H 取代同时丢失 H₂。杂质 5 与头孢替唑紫外吸收光谱图相比, 最大吸收紫移 4 nm, 因此新生成的双键与原有双键并非共轭结构, 可能结构如图 10 所示。将图 10 结构导入 ACD/Labs, 所得 MS 碎片与杂质 5 所得二级质谱信息吻合。

Formula Predictor - 395.016009 - MS(ESI+) Scan#: 2063

Charge: 1

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	98.48	394.008894	395.016160	395.016009	-0.151	C12 H10 N8 O2 S3	[M+H] ⁺	-0.3827	98.48
2	88.24	394.008667	395.015844	395.016009	0.065	C19 H2 N6 O5	[M+H] ⁺	0.1653	86.99
3	77.30	394.008415	395.015691	395.016009	0.318	C12 H18 N4 O S5	[M+H] ⁺	0.8045	75.17
4	54.47	394.008198	395.015475	395.016009	0.534	C19 H10 N2 O4 S2	[M+H] ⁺	1.3525	50.14
5	49.16	394.008232	395.015508	395.016009	0.501	C4 H14 N10 O4 S4	[M+H] ⁺	1.2676	44.18
6	47.82	394.008015	395.015292	395.016009	0.717	C11 H6 N8 O7 S	[M+H] ⁺	1.8156	43.08
7	45.18	394.009353	395.016629	395.016009	-0.620	C12 H2 N12 O3 S	[M+H] ⁺	-1.5699	39.97
8	23.40	394.008850	395.016127	395.016009	-0.118	C27 H6 O2 S	[M+H] ⁺	-0.2978	15.01

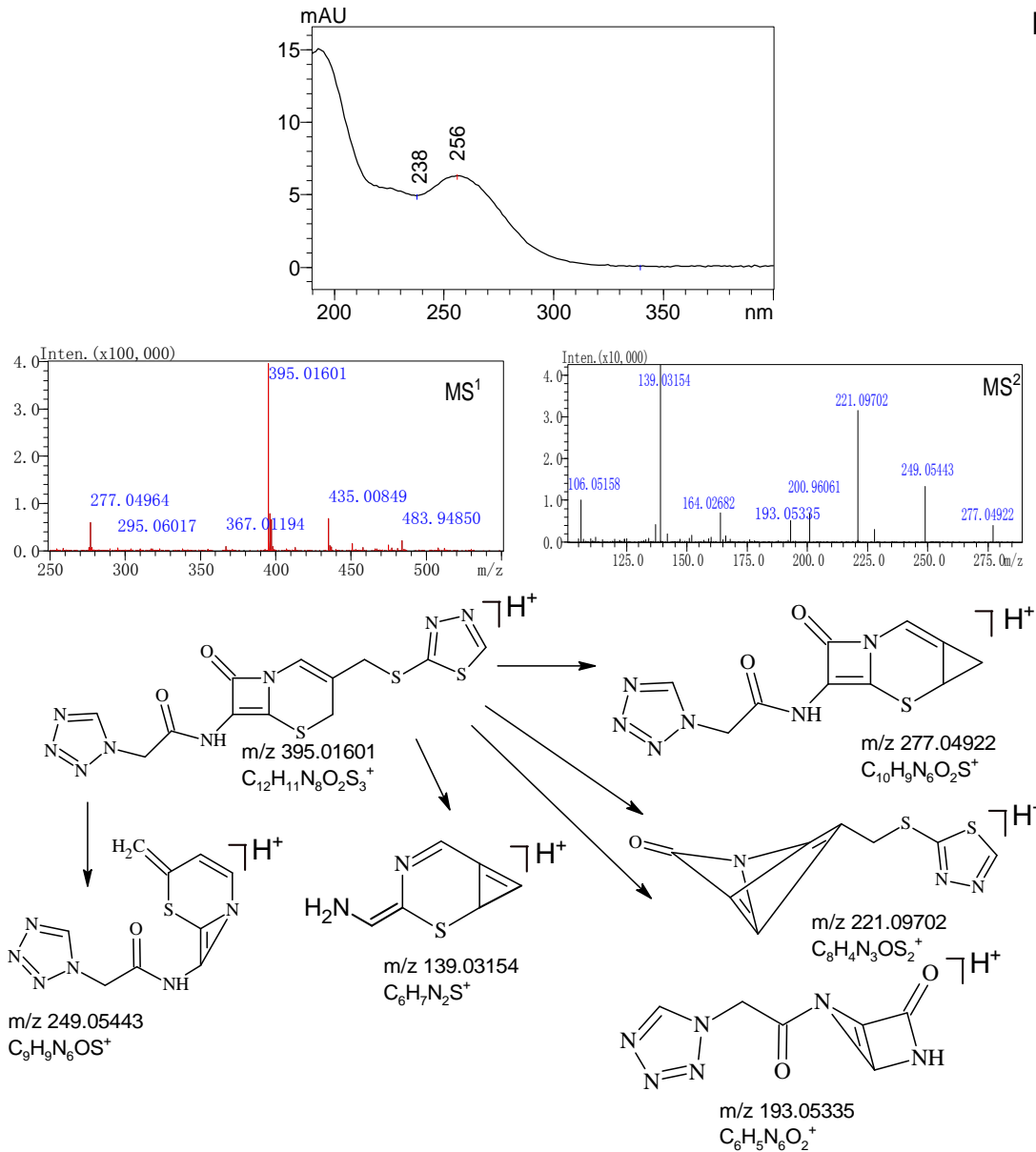


图 10 杂质 5 质谱图 (左上)、光谱图 (右上) 和可能的裂解规律 (下)

结论

经过 Q-TOF 分析, 对头孢替唑钠进行一级质谱信息和二级质谱采集, 并结合紫外吸收光谱图、formula predictor 软件推测杂质分子式和结构信息, 所得结构与 ACD/Labs 软件预测相互验证, 共鉴定出 5 个杂质。对低浓度杂质, 如杂质 6, 可采用增加进样量并用 Q-TOF 自带的废液阀选择性切入目标杂质的方法实现鉴定。由于 Q-TOF LCMS-9030 的高灵敏度, 本应用实现了峰面积百分含量从 0.05% 到 0.6% 杂质的结构鉴定。

