

# 头孢克肟中一种新的聚合物杂质及其结构分析

袁晓<sup>1\*</sup>, 林顺权<sup>1</sup>, 刘功成<sup>1</sup>, 蒲含林<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>广州牌牌生物科技有限公司, 广东 广州

<sup>2</sup>暨南大学细胞生物学系, 广东 广州

Email: \*888@pipitech.com

收稿日期: 2020年12月9日; 录用日期: 2020年12月23日; 发布日期: 2021年2月5日

## 摘要

目的: 对抗生素头孢克肟中的小分子杂质和聚合物杂质进行深入研究。方法: 采用TSK凝胶色谱和反相液相色谱质谱联用和二维液相色谱质谱分析方法分析头孢克肟中的杂质成分, 用制备液相方法制备出相应的杂质进行结构确认。结果: TSK凝胶色谱和反相液相色谱质谱联用及二维液相色谱质谱分析鉴定出头孢克肟中的一个新杂质(用imp表示), 且该小分子杂质能以二聚体聚合物杂质形式存在。将imp做了分离纯化制备和分析鉴定, 结论: imp是在头孢克肟中新发现的杂质, 在头孢克肟颗粒中其含量达0.13%, imp能以二聚体的形式存在。

## 关键词

头孢克肟, 杂质, 聚合物杂质

# A New Polymer Impurity in Cefixime and Its Structure Analysis

Xiao Yuan<sup>1\*</sup>, Shunquan Lin<sup>1</sup>, Gongcheng Liu<sup>1</sup>, Hanlin Pu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Guangzhou PI & PI Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Jinan University, Guangzhou Guangdong

Email: \*888@pipitech.com

Received: Dec. 9<sup>th</sup>, 2020; accepted: Dec. 23<sup>rd</sup>, 2020; published: Feb. 5<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** To study the small molecular impurities and polymer impurities in cefixime. **Methods:** the impurities in cefixime were analyzed by TSK-gel chromatography, RP-HPLC coupled with mass

\*通讯作者。

spectrometry and two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. Results: a new impurity imp in cefixime was identified by TSK-gel chromatography, reversed-phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry and two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. The small molecule impurity can exist in the form of dimer polymer impurity. Imp was isolated, purified, prepared and identified. Conclusion: imp is a new impurity found in cefixime granules. The content of imp in cefixime granules is more than 0.1%, imp can exist in the form of dimer.

## Keywords

Cefixime, Impurity, Polymer Impurity

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

头孢菌素类抗生素中的高分子量杂质是引发速发型超敏反应的过敏原，高分子量杂质分为内源性杂质和外源性杂质，目前内源性高分子量的聚合物杂质是头孢类药物质量控制的重点。头孢菌素中高分子杂质类型主要分为只与母核有关的聚合反应和侧链参与反应的聚合反应两种类型。目前文献报道的聚合物主要有母核参与反应的二聚体、三聚体及侧链参与反应的二聚体和三聚体，还有少量的4~6聚体，其中有的抗生素聚合物杂质的分子量高达2000左右。聚合物杂质来自于生产过程，也可在产品出厂后的储运过程中形成，甚至也可因使用不当而产生。聚合物的形成在固体情况下与样品的水分有关，在溶液情况下与溶液的酸碱度密切相关，碱性条件更易形成聚合物。另外水分、时间、温度等对聚合物的形成有促进作用。

抗生素产品聚合物杂质的分离分析方法主要有反相高效液相色谱，凝胶色谱和离子交换色谱等。凝胶色谱一般选用Sephadex G-10作为β-内酰胺类抗生素高分子杂质的凝胶介质，经凝胶色谱柱分离后再用质谱分析聚合物杂质的结构信息。但是G10凝胶凝胶色谱结合质谱法分析聚合物杂质时，聚合物色谱峰的分​​离效果时常不令人满意，从而影响聚合物杂质的定量准确性。而合适的RP-HPLC方法对聚合物杂质的分离效果通常更好。

边磊等很早就用液质联用来检测头孢克肟中的有关物质[1] [2] [3]，赵晓东等人[4]较早报道了采用Sephadex G10 色谱柱分离检测到头孢克肟中的一个聚合物杂质，石海英等[5]随后报道了用 TSK-gel® G2500PWXL 色谱柱分离检测到头孢克肟中的聚合物杂质，苏燕琼等[6]报道了用 TSK gel G2000 SW XL 色谱柱测定头孢克肟颗粒中的高分子杂质，证实头孢克肟双母核 1、聚合物杂质 B、头孢克肟二聚体 F 能较好的分离(双母核 1 对照品(广州牌牌生物科技有限公司，批号：20180518-01，含量为 86.8%)、聚合物杂质 B 对照品(广州牌牌生物科技有限公司，批号：20181206-01，含量为 90.34%)、头孢克肟二聚体 F 对照品(广州牌牌生物科技有限公司，批号：20190308-01，含量为 88.46%))。黄艳等人[7]报道了用 TSK-gel G2000 SW XL (7.8 mm × 300 mm, 5 μm) 色谱柱检测头孢克肟中聚合物的含量，在液相色谱中检测到三种聚合物杂质。李进等人[8]采用 Phenomenex Gemini-C18 型色谱柱，以 0.5% 甲酸水溶液 0.5% 甲酸乙腈溶液为流动相，进行梯度洗脱，建立 RP-HPLC 法分析头孢克肟聚合物，结果表明高效凝胶排阻色谱法分离头孢克肟聚合物杂质时，部分小分子杂质与聚合物共出峰，方法专属性差、定量准确性差；RP-HPLC 法分析头孢克肟聚合物杂质时，能够检出 2 种头孢克肟二聚体、脱水二聚体等 3 种聚合物杂质峰。他们以头孢克肟降解溶液为供试品，采用柱切换 LC-MS<sup>n</sup> 法鉴定出两个四元内酰胺环开环后形成的二聚体(分子

量 906.08), 一个头孢克肟二聚体, 一个头孢克肟脱水二聚体, 一个比头孢克肟二聚体的相对分子质量小 109 的头孢克肟二聚体降解物。

本公司一直致力于抗生素类杂质的检测、分离纯化和结构分析鉴定工作, 对头孢克肟中的所有药典杂质均作了分析制备, 还发现了更多的小分子杂质和聚合物杂质, 其中我们发现了一个新的小分子杂质 imp, 并且发现它能形成聚合物杂质, 并对其结构进行了推测。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 仪器和试剂

Thermo Fisher Q EXACTIVE FOCUS ORBITRAP, UItiMate 3000 Thermo Fisher Scientific。头孢克肟原料(批号: AP004-1906-2033, 广州白云山制药厂)、乙腈为色谱纯(天津康科德), 其他化学试剂(分析纯)从“西陇化工试剂有限公司”购买, 色谱仪器用水为娃哈哈纯净水, 分离制备用水为自制去离子水。

### 2.2. LC-HRMS 分析检测头孢克肟中的 imp 杂质

色谱条件: 色谱柱 Thermo Fisher Hypurity C18, 4.6 \* 250 mm, 5  $\mu$ m; 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ l; 流动相 A: 乙腈; B: 0.1% 甲酸水(洗脱条件: 0 min (A:B = 10:90), 3 min (A:B = 10:90), 21 min (A:B = 40:60), 23 min (A:B = 40:60), 24 min (A:B = 10:90), 30 min (A:B = 10:90))。

质谱仪器参数: 模式 ESI+; 喷雾电压: 3.8 KV; 金属毛细管温度: 320 $^{\circ}$ C; 鞘气压力: 30 arb; 辅助气压力: 10 arb; 喷雾温度: 120 $^{\circ}$ C; S-lens RF level: 55。

### 2.3. 分子排阻色谱法分析检测头孢克肟中的 imp 杂质

一维色谱条件: 色谱柱 TSK-gel G2000SWxl (300 mm  $\times$  7.8 mm, 5  $\mu$ m); 检测波长 254 nm; 柱温 20 $^{\circ}$ C; 流速 0.6 ml/min; 进样量 20  $\mu$ l; 流动相 A: pH 7.0 磷酸盐缓冲液(1.02 g 二水磷酸二氢钠和 1.26 g 十二水磷酸氢二钠, 加入 1000 ml 超纯水, 搅拌均匀, 氢氧化钠调节 pH 7.0); 流动相 B 乙腈 = 95:5。采用 Chromeleon 7.2 工作站进行采集。等度洗脱(0 min (A:B = 95:5), 30 min (A:B = 95:5))

二维除盐色谱条件: 色谱柱 Welch(C18), Ultimate AQ-C18, 5  $\mu$ m, 3.0  $\times$  50 mm; 柱温: 20 $^{\circ}$ C; 流速: 0.300 ml/min; 流动相: A: 乙腈, B: 0.1% 甲酸水; 洗脱条件(0 min (A:B = 1:99), 16 min (A:B = 1:99), 28 min (A:B = 100:0), 31 min (A:B = 100:0), 32 min (A:B = 1:99), 33 min (A:B = 1:99))。

十通阀切换时间: 2D-LC-HRMS-MS 进行头孢克肟原料药检测, 先由下表确定聚合物组份 1 至组份 4 的保留时间, 按表 1 进行 2D-LC-HRMS-MS 阀切换检测。

**Table 1.** Switching schedule of each impurity component

**表 1.** 检测不同杂质成分时的切换时间

组份	保留时间(min)	切换时间(min)	切进质谱时间(min)
1	11.81	11.643~11.977	17
2	12.21	12.043~12.377	17
3	12.78	12.613~12.947	17
4	13.70	13.533~13.867	17

质谱参数: Thermo Fisher Q EXACTIVE FOCUS ORBITRAP, 模式 ESI+; 喷雾电压 3.8 KV; 金属毛细管温度 320 $^{\circ}$ C; 鞘气压力 30 arb; 辅助气压力 10 arb; 喷雾温度 120 $^{\circ}$ C; S-lens RF level 55, 勾选自动触发二级, 工作站 ThermoXcaliburQual Browser 4.0。

## 2.4. 溶液配制

精确称取原料药头孢克肟(批号: AP004-1906-2033) 10 mg 溶于 pH7.0 的磷酸缓冲盐(精密称定磷酸二氢钾 6.805 g 和氢氧化钠 0.940 g, 加 800 ml 水溶解, 先用饱和氢氧化钠调节 pH 至 6.9, 再用 1.0 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.0, 搅拌均匀, 用水稀释至 1000 ml)超声溶解, 用容量瓶定容至 10 ml, 使其浓度为约 1 mg/ml, 过滤后用于 LC-HRMS 检测。杂质对照品溶液: 取 imp 杂质 5 mg, 用磷酸缓冲盐(pH 7.0)同上超声溶解, 用容量瓶定容至 100 ml, 配成 0.05 mg/ml 溶液, 过滤后用于 LC-HRMS 检测。杂质对照品+原料药溶液的配制: 取 imp 杂质溶液适量滴加到头孢克肟原料药(批号: AP004-1906-2033)中, 同上述方法配成 0.05 mg/ml 溶液。

## 2.5. 头孢克肟中的 imp 杂质的制备

1) 制备方法: 90 g 原料加入 4.5 L 水中, 搅拌下滴加饱和磷酸氢二钾约 300 mL, 使之溶解完全, 溶液总体积 4.8 L, 加入 2.5 mL 甲酸混匀, 于 C18 制备柱中上样, 用乙腈水溶液洗脱, 经 4 次反复分离得到 150 ml 纯度 97.53% 的流份, 冷冻干燥得到目标杂质。

2) 检测方法: 杂质纯度检测方法用中国药典方法, 柱温 40℃, 波长 254 nm, 流速 1 ml/min, 柱子 InertSustain C18, 5 μm, 250 × 4.6 mm, 流动相 A: 四丁基氢氧化铵溶液(取 10% 四丁基氢氧化铵溶液 25 ml, 加水 1000 ml, 摇匀, 用 1.5 mol/L 磷酸溶液调节 pH 值至 7.0), 流动相 B: 乙腈。

## 3. 结果

### 3.1. LC-HRMS 分析头孢克肟中的 imp 杂质

用 LC-MS 方法对 imp 杂质做了定位和分子量确认, 测定结果为 imp 杂质在液相中的出峰时间是 16.57 min, 分子量为 453.0 (图 1, 图 2)。

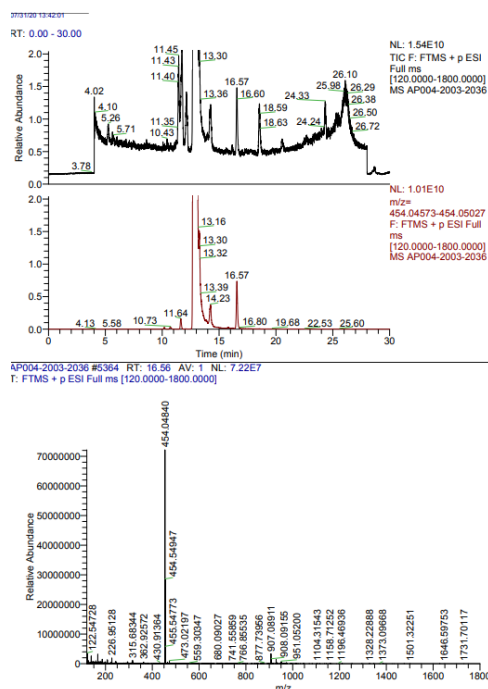


Figure 1. Localization of imp impurities in cefixime by HPLC-MS  
图 1. 头孢克肟中 imp 杂质的 HPLC-MS 定位图

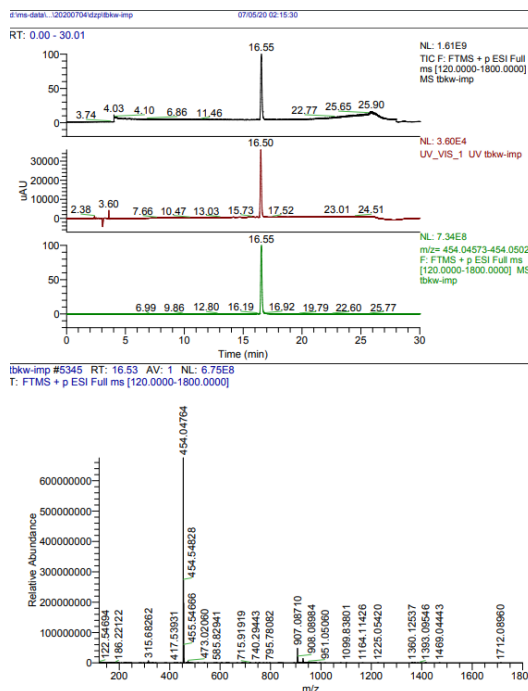


Figure 2. Localization of imp reference substance by HPLC-MS  
图 2. 头孢克肟 imp 杂质对照品的 HPLC-MS 定位

### 3.2. 从头孢克肟中分离纯化制备出的 imp 杂质确认

准分子离子峰 454.04941 ( $M + H$ )和 907.09071 ( $2M + H$ )其与头孢克肟 imp 杂质对照品保留时间及精密分子量基本一致, 且头孢克肟 imp 杂质对照品滴加到头孢克肟原料中, 头孢克肟 imp 杂质峰重叠且信号明显增加, 在质谱检测中能观察到 454.0491 形成明显的双电荷(与第一个同位素相差 0.5 Da), 907.09071 实为( $2M + H$ )离子峰, 确定为 imp 的二聚体。

另外原料药中未知杂质 3 与头孢克肟 imp 杂质相对保留时间基本一致, 将头孢克肟 imp 杂质对照品分别添加到原料药中, 杂质峰重叠, 并且含量明显增高, 确认头孢克肟 imp 杂质与未知杂质 3 为同一个物质 (图 3~图 5)。

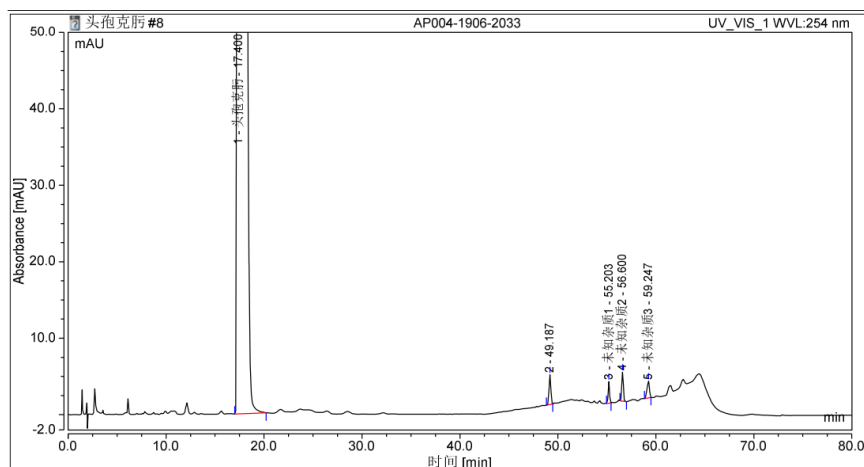


Figure 3. HPLC analysis of impurities in cefixime  
图 3. 头孢克肟中的杂质的高效液相图

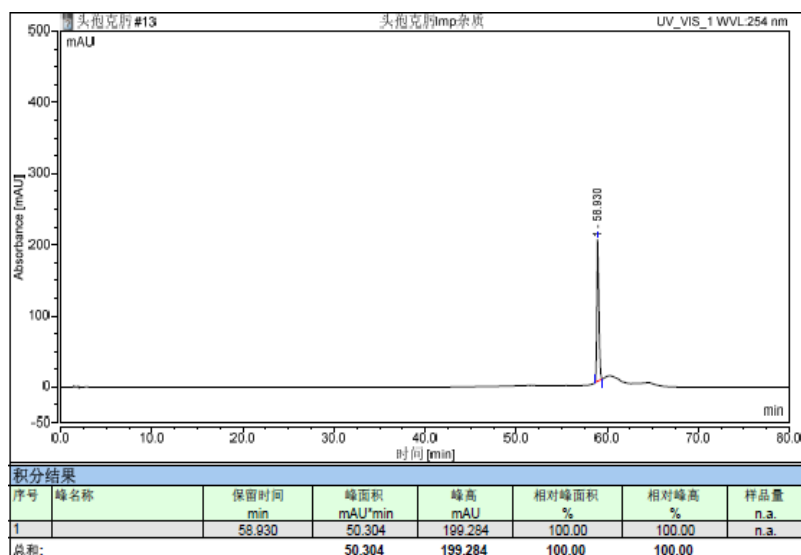


Figure 4. HPLC of imp impurity reference substance

图 4. imp 杂质对照品液相色谱图

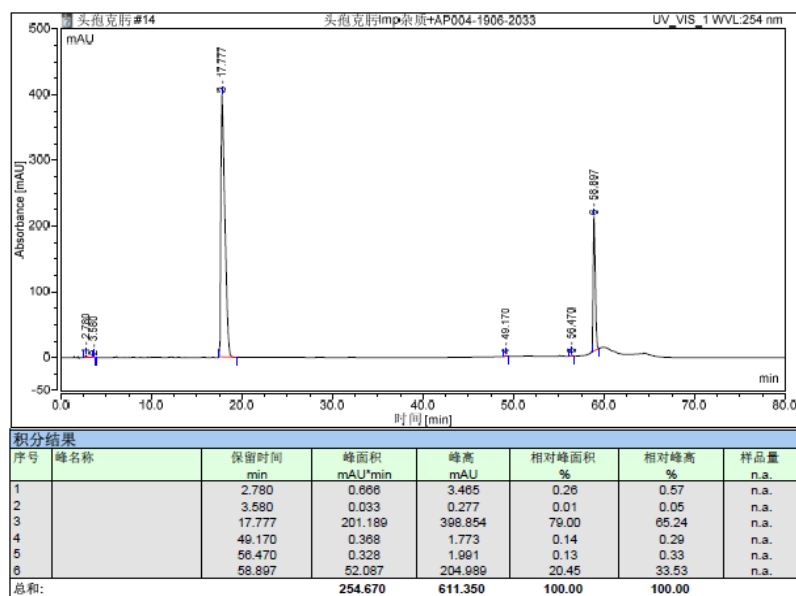


Figure 5. HPLC of imp impurity with cefixime

图 5. imp 杂质加头孢克肟原料的液相色谱图

### 3.3. 分子排阻色谱法分析检测头孢克肟中的 imp 杂质

#### 3.3.1. 一维色谱分析结果如表 2 所示

Table 2. One dimensional chromatographic analysis results

表 2. 一维液相色谱分析结果

组份	保留时间(min)	相对保留时间	含量(%)
3	12.925	0.85	0.13
API	15.148	1.00	99.59

### 3.3.2. 二维色谱质谱检测结果(表 3)

Table 3. 2D-HPLC-HRMS-MS results of component 3

表 3. 组分 3 的二维液相色谱高分辨质谱结果

样品	1D 保留时间	2D 保留时间	第二维准分子离子峰	二级母离子	LC-HRMS-MS
原料药	12.78	23.43	454.04874	454.0490	329.00177, 285.02863, 210.02055, 182.02588, 126.01222
		23.92	925.10155	925.0990	881.11102, 126.01206
对照品(头孢克肟 imp 杂质)	12.73	23.45	454.04883	454.0485	329.00055, 285.02844, 210.02109, 126.01226
头孢克肟 imp 杂质 + 原料药	12.72	23.43	454.04787	454.0482	329.00076, 285.02820, 210.02074, 182.02623, 126.01208

采用凝胶色谱法, 通过 2D-LC-HRMS-MS 液质检测, 结果表明, 图 6 中组分 3 为头孢克肟 imp 杂质与聚合物(924)重叠, 准分子离子峰分别为 454.04871 和 925.10022; 聚合物杂质的第三个峰中也能够提取出明显的质量数为 907.09 的峰, 又证实了 imp 二聚体的存在。

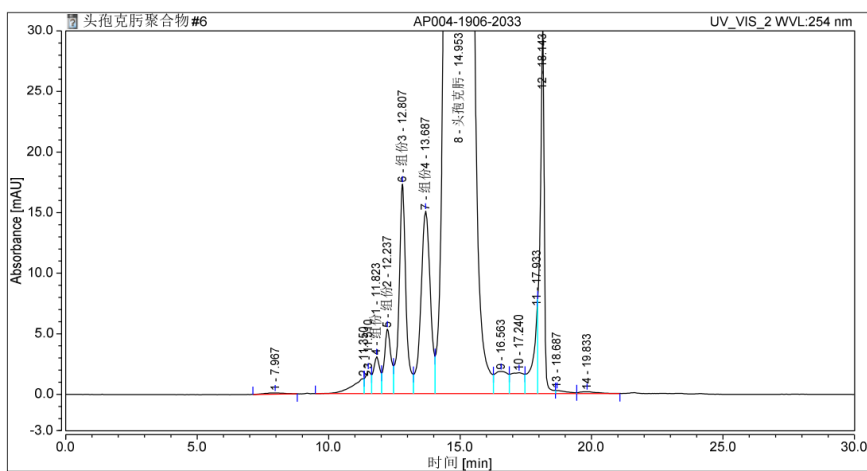


Figure 6. Analysis of polymer impurities in cefixime by TSK gel permeation chromatography  
图 6. 头孢克肟中聚合物杂质 TSK 凝胶色谱分析

### 3.4. 杂质组份 3(imp)的结构确认

组份 3 为头孢克肟 imp 杂质, LC-HRMS 得到准分子离子峰(M+H)为 454.04871, 理论精密分子量为 454.04911, 实测值与理论计算结果相符, 推断其结构如下(图 7):

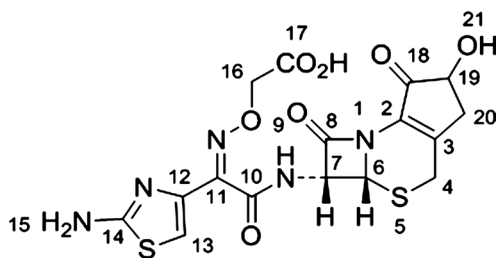


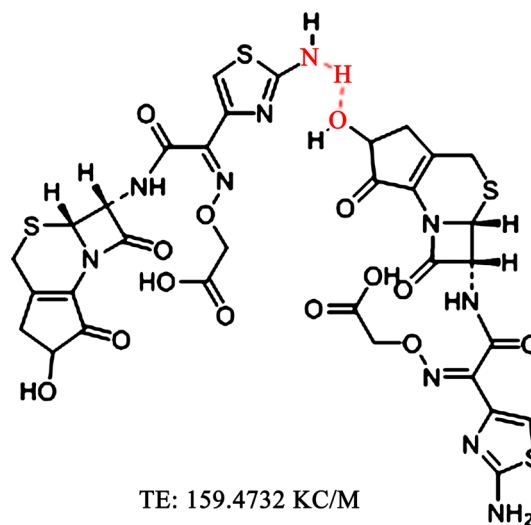
Figure 7. Molecular structure formula of impurity imp  
图 7. 杂质 imp 的分子结构式



组份 3 高分辨二级裂解碎片与推测结构一致, 且头孢克肟 imp 杂质对照品的 2D-LC-HRMS-MS 质谱同位分析中保留时间、一级精密分子量及二级裂解碎片相同, 故能够确认组份 3 为头孢克肟 imp 杂质, 分子量为 453.0。另外杂质 imp 的  $^{13}\text{C}$ NMR,  $^1\text{H}$ NMR 数据也与该化合物的结构相符合。

### 3.5. 头孢克肟中 imp 的二聚体聚合物杂质结构推测

经 Chemical office 软件计算, 杂质 imp 二聚体聚合物的结构推测如下(图 8):



**Figure 8.** Inferred impurity structure of imp dimer based on intermolecular energy calculation  
**图 8.** 根据分子间能量计算推测的 imp 二聚体杂质结构

两个单体小分子(杂质 imp)之间以分子内氢键的形式结合, 这一结构在所有几个可能存在的结构中能量最低, 相对稳定性最高。

## 4. 结论

采用 LC-HRMS 和 2D-LC-HRMS-MS 均能检测到头孢克肟中的新杂质 imp, 反相液相色谱法的分离度优于凝胶色谱层析法, 凝胶色谱层析法在聚合物杂质分离确认上有一定优势, 我们利用这两种分析方法分析检测和鉴定出头孢克肟中的分子量为 453.0 的新杂质, 并发现该杂质能形成一种相对稳定的二聚体杂质, 并推测出该二聚体杂质的结构。

## 参考文献

- [1] 边磊, 宋敏, 杭太俊, 等. 乙腈辅助电喷雾 LC-MS/MS 法分析头孢克肟中的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 872-878.
- [2] Talebpour, Z., Pourabdollahi, H., Rafati, H., *et al.* (2013) Determination of Cefixime by a Validated Stability-Indicating HPLC Method and Identification of its Related Substances by LC-MS/MS Studies. *Scientia Pharmaceutica*, **81**, 493-503. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1301-15>
- [3] Wang, H.C., Huang, H.W., Cao J., *et al.* (2015) Mass Spectral Profile for Rapid Differentiating Beta-Lactams from Their Ring-Opened Impurities. *BioMed Research International*, **2015**, Article ID: 697958. <https://doi.org/10.1155/2015/697958>
- [4] 赵晓冬, 傅蓉, 陆军, 等. 分子排阻色谱法测定头孢克肟聚合物[J]. 中国药师, 2011, 14(1): 61-63.
- [5] 苏燕琼, 蔡国伟, 高琳. 排阻法测定头孢克肟颗粒中的高分子杂质[J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1948-1952.
- [6] 石海英, 陈修毅, 王金虎. 分子排阻色谱法测定头孢克肟干混悬剂中高分子杂质[J]. 中国抗生素杂志, 2016,



41(2): 122-124.

- [7] 黄艳, 黄燕婷, 周向荣, 等. 高效分子排阻色谱法测定头孢克肟颗粒中聚合物的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): L326-329.
- [8] 李进, 姚尚辰, 尹利辉, 等. 头孢克肟原料及制剂的聚合物杂质分析[J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2442-2448.