

利用 LC-MS 和二维色谱相关光谱技术识别 HPLC 色谱图中杂质峰

陈珍珍^{1,2,3}, 张斗胜¹, 王楠¹, 冯芳², 胡昌勤^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009;
3. 江西省食品药品检验所, 江西 南昌 330046)

摘要: 采用二维色谱相关光谱技术, 实现质控 HPLC 方法与 LC-MS 色谱系统色谱峰的相互识别。本文采用 HPLC-DAD (中国药典 2010 版方法) 得到头孢唑肟和头孢地尼混合降解杂质的色谱图, 建立降解杂质标准色谱光谱数据; 采用 LC-MS 的方法结合 MassWorks 软件的应用鉴别出头孢唑肟和头孢地尼的主要降解产物; 通过计算光谱相关性对杂质色谱峰进行归属。色谱二维光谱相关法在不同色谱系统下能够准确定性, 在没有杂质对照品的情况下, 可为质控 HPLC 方法中的杂质峰的归属提供新的途径和新的思路。

关键词: 二维色谱相关光谱技术; 头孢唑肟; 头孢地尼

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2012) 04-0492-06

Identification of impurity peaks in the HPLC chromatogram by LC-MS and two-dimensional chromatographic correlation spectroscopy

CHEN Zhen-zhen^{1,2,3}, ZHANG Dou-sheng¹, WANG Nan¹, FENG Fang², HU Chang-qin^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Jiangxi Provincial Institute For Food and Drug Control, Nanchang 330046, China)

Abstract: A novel qualitative analytical method by using two-dimensional chromatographic correlation spectroscopy techniques for recognizing impurity peaks of HPLC methods of quality control and LC-MS chromatographic system was established. The structures of major degradation products of ceftizoxime and cefdinir were identified by LC-MS and MassWorks application; the standard chromatographic and spectral data of the degradation impurities were obtained by high-performance liquid chromatography with diode array detection. The impurity peaks of two-dimensional chromatography were matched by comparison of spectra and calculating correlation coefficients. Peaks in chromatography can be identified accurately and rapidly in different chromatographic systems such as column and mobile phase changed. The method provides a new way and thought to identify the peaks in quality control of impurities without reference impurity substances.

Key words: two-dimensional chromatographic correlation spectroscopy; ceftizoxime; cefdinir

对化学药品中的杂质谱分析是当前药品质量控制的热点^[1,2]。按 ICH 的要求,对药物中含量大于或等于 0.1% 的杂质的结构均要进行结构确证,因此在杂质分析中对 HPLC 色谱图中的每个杂质峰进行定性是目前药品杂质谱分析的关键制约因素。LC-MS 分

析是快速鉴别药品中杂质的有效方法,已广泛用于对药品中杂质^[3-6]、降解产物^[7-9]等的分析。但 LC-MS 分析与常规的质控 HPLC 分析所采用的色谱系统不同,因此在没有杂质对照品的情况下,很难直接利用 LC-MS 的鉴别结果确定常规质控 HPLC 方法色谱图中的杂质峰。作者采用二维色谱相关光谱技术已经解决了当色谱柱等色谱条件改变时不同色谱图中色谱峰相互识别的技术问题,在没有对照品的情况下利用色谱峰的 UV 光谱结合相对保留时间可以实现

收稿日期: 2011-10-24; 修回日期: 2011-12-01.

基金项目: 十一五重大新药创制资助项目 (2010ZX09401-403).

*通讯作者 Tel: 86-10-67095308, E-mail: hucq@nicpbp.org.cn

对色谱峰的定性识别^[10, 11]。头孢地尼和头孢唑肟均为 2010 版中国药典收载的品种, 采用了 HPLC 法控制其有关物质, 但尚未对分离出的杂质进行归属^[12]。本文采用 LC-MS 方法鉴别头孢地尼和头孢唑肟中的主要降解杂质; 再利用二维色谱相关光谱技术, 通过对不同分析方法色谱图中色谱峰的 UV 光谱相似性的比较, 确定 LC-MS 方法鉴别出的降解杂质在中国药典方法色谱图中的位置; 在此基础上归纳出质检 HPLC 色谱图中的杂质峰和 LC-MS 结构鉴别结果相关联的一般方法。

材料与方 法

仪器与试剂 高效液相色谱仪: Dionex P680A HPLC, PDA-100 二极管阵列监测器。LC-MS 系统: Shiseido 液相色谱仪, ABI3200Q TRAP LC/MS/MS 系统。MassWorks™ Version3.0 为美国 Cerno BioScience 公司产品。头孢唑肟和头孢地尼对照品均来自中国食品药品检定研究院。

HPLC 方法 按中国药典 (2010 版)^[12]方法。均采用 Capcell PAK C₁₈ (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱; DAD 波长设定为 190~400 nm; UV 检测波长为 254 nm。

LC-MS 方法 头孢唑肟: 以 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (pH 3.6)-(甲醇-乙腈 1:1) (90:10) 为流动相; DP (去簇电压): 37 V, CE (碰撞气能量): 20 V。头孢地尼: 以 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (pH 5.2) 为流动相 A, (甲醇-乙腈 1:1) 为流动相 B; 梯度洗脱, 95:5 (0 min), 85:15 (20 min), 75:25 (35 min), 95:5 (36 min), 95:5 (45 min); DP: 45 V, CE: 20 V。均采用 BDS HYPERSIL C₁₈ (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱; 柱温 30 °C; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; DAD 波长设定为 190~400 nm; UV 检测波长为 254 nm; 进样量为 20 μL。ESI 正离子检测, 柱后分流比为 1:1; curtain gas (气帘气): 30 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); IS (喷雾针电压): 4 500 V; TEM (温度): 400 °C; GS1 (辅助气): 65 psi; GS2 (辅助气): 60 psi。

降解杂质溶液的制备

头孢唑肟降解溶解制备 分别制备以下降解溶液: 质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 头孢唑肟水溶液 (90 °C 水浴加热 30 min), 加 30% 双氧水 2 mL (静置 5 min); 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液配制成 0.5 mg·mL⁻¹ 头孢唑肟溶液 (室温放置 6 h) 和用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液配制成 0.5 mg·mL⁻¹ 头孢唑肟溶液 (室温放置 30 min)。取以上降解溶液充分混匀, 即为混合降解溶液。

头孢地尼降解溶液制备 分别制备以下降解溶液: 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 头孢地尼水溶液 (90 °C 水浴加热 30 min), 加 30% 双氧水 2 mL (静置 20 min); 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 头孢地尼溶液 (室温放置 1 h) 和用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 头孢地尼溶液 (室温放置 2 h)。取以上降解溶液充分混匀, 即为混合降解溶液。

数据处理 将 HPLC-DAD 采集的三维色谱图数据以 ASC II 码的格式导出 (紫外光谱波长范围为 220~400 nm, 步长为 1.0 nm), 扣除空白后进行归一化处理, 作为标准色谱光谱数据。用 DrugChroCorr 软件进行二维相关计算及作图, 在 PC 上运行。

结果与讨论

1 对头孢唑肟质控 HPLC 方法色谱图中杂质峰的识别

1.1 中国药典 2010 版方法分析 采用中国药典头孢唑肟有关物质方法分析混合降解溶液, 可分离出 8 个杂质峰 (图 1), 7 号峰为头孢唑肟峰。其三维色谱图数据扣除空白并归一化处理, 以 ASC II 码的格式保存, 即构成了头孢唑肟降解杂质的标准色谱-UV 光谱库。各种加速降解条件下产生的杂质峰的相对保留时间见表 1, 据此可以初略判断杂质的来源与产生机制。

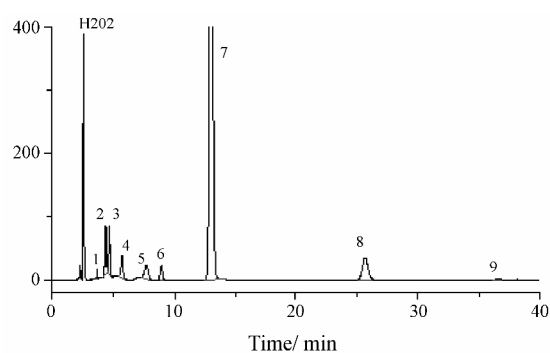


Figure 1 The chromatogram of mix degradation sample of ceftizoxime under Chinese pharmacopoeia condition. Peaks 1-9 are listed in Table 1. Peak 7: Ceftizoxime

干燥条件下的头孢菌素类药物较稳定, 其水溶液随 pH 和温度不同而易降解。 β -内酰胺环是头孢菌素分子中最不稳定的结构, 在一般酸碱催化、中性环境的水分子直接攻击, 其内酰胺环很容易断裂开环。pH 依赖型的立体异构主要有中性或酸性条件下的 C-6 位结构的立体异构、碱性条件下的 C-7 位结构的立体异构和 C-7 位侧链甲氧亚胺键构型的顺反异构。

Table 1 Relative retention time of impurity peaks in chromatograms under Chinese pharmacopoeia condition

Peak	Degradation sample				
	Mix	H ₂ O ₂	Acid	Hydrolysis	Alkaline
1	0.282	0.283			
2	0.336				
3 (F)	0.359	0.359			
4 (A)	0.438				0.435
5 (B)	0.591		0.592		0.593
6 (C)	0.685			0.681	0.685
7 (D)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8 (E)	1.972			1.963	1.962
9	2.810				2.790

1.2 LC-MS 方法分析 根据一级质谱正负离子扫描得杂质 A 和 B: $M_r = 401$; E 和 C: $M_r = 383$; F: $M_r = 399$ 。MS 能提供分子离子和分子碎片的质量, 但对分子式的推断有很多不确定性。利用基于同位素峰形校正检索技术 (CLIPS) 的 MassWorksTM 软件可以实现对目标物分子式的准确识别^[13, 14]。在低分辨率单四级杆液质联用仪上实现了对头孢唑啉水溶液降解杂质元素组成的分析, 进而准确推断出降解杂质的结构^[15]。

表 2 为目标物经处理所得的分子式。杂质 B、C 和 F 的同位素峰形与目标物的校正同位素峰形的相似度最大, 排在待选分子式的第 1 位, 且其不饱和度 (DBE) 等信息与目标物相符合, 实现了对目标物分子式的准确识别。杂质 A 虽排在第 2 位, 但 MS 得到的是 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 所给出的分子式加 1 个氢, 因此由此分子式算出的不饱和度应不是整数;

排在第 1 位的分子式的 DBE 为 9.0, 而排在第 2 位的分子式的信息与目标物相符合, 故结合不饱和度的信息, 可以确定其为目标物的准确分子式。杂质 E 排在了待选分子式的第 3 位, 但由于杂质 E 为碱降解产物, 其 N 和 O 元素组成与母体化合物相比不会发生太大的变化, 故第 1 位待选分子式可以排除; 根据 DBE 值, 第 2 位待选分子式也可以排除; 而排在第 3 位的分子式的信息与目标物相符合, 即为目标物的准确分子式。从以上结果可知, 杂质 A 和 B 分子式为 $C_{13}H_{15}N_5O_6S_2$, 杂质 C 和 E 分子式为 $C_{13}H_{13}N_5O_5S_2$, 杂质 F 的分子式为 $C_{13}H_{13}N_5O_6S_2$ 。

分别进行二级质谱正离子扫描, 杂质 A、B、C、E 和 F 的二级质谱图见图 2。根据碎片离子推断杂质的质谱裂解规律 (图 3), 结合降解机制和已得到的分子式来推断杂质的可能结构式。

杂质 A 和 B 由碱降解得到。其二级质谱图中 m/z 358 的碎片峰推测为准分子离子峰 (402) 脱去一分子 CO_2 , 碎片峰进一步脱去小分子并环合形成一个六元环, 得到 m/z 296 的碎片峰。准分子离子峰发生 A 裂解产生 A1 m/z 259 碎片峰。杂质 A 和 B 的二级裂解碎片峰基本一致, 推断可能为同分异构体。

杂质 F 由双氧水降解产生, 分子离子峰比头孢唑啉多 16, 推测头孢唑啉上的硫被氧化成亚砷结构。其二级质谱图中 m/z 382 的碎片峰推测为准分子离子峰 (400) 脱去一分子 H_2O 。准分子离子峰的 7 位侧链上的 C-C 键断裂产生了 m/z 243 和 156 的碎片峰, 而 m/z 243 碎片峰进一步脱去一分子 H_2O , 产生 m/z 225 的碎片峰。文献^[4]报道头孢唑啉有 M_r 399 的杂质

Table 2 Accurate element composition measurement for impurities

Impurity	Rank	M+H	Mono isotope	Mass error		Spectral accuracy	DBE	Formula of target
				mDa	ppm			
A	1	$C_{11}H_{14}N_8O_5S_2$	402.052 9	-0.043 0	-0.107 0	96.920 9	9.0	
	2	$C_{13}H_{16}N_5O_6S_2$	402.054 2	1.299 7	3.232 5	96.786 3	8.5	√
	3	$C_{14}H_{16}N_3O_7S_2$	402.043 0	-9.933 7	-24.707 5	96.695 4	8.5	
B	1	$C_{13}H_{16}N_5O_6S_2$	402.054 2	-6.200 3	-5.421 4	95.523 1	8.5	√
	2	$C_{12}H_{16}N_7O_5S_2$	402.065 4	5.033 0	12.518 1	95.491 3	8.5	
	3	$C_{11}H_{14}N_8O_5S_2$	402.052 9	-7.543 0	-18.760 9	95.472 9	9.0	
C	1	$C_{13}H_{14}N_5O_5S_2$	384.043 6	0.835 0	2.174 1	96.922 3	9.5	√
	2	$C_{11}H_{12}N_8O_4S_2$	384.042 3	-0.507 7	-1.322 0	96.912 3	10.0	
	3	$C_{15}H_{16}N_2O_6S_2$	384.045 0	2.177 6	5.670 3	96.695 0	9.0	
E	1	$C_{12}H_{18}NO_9S_2$	384.042 3	-0.002 4	-0.006 3	96.726 7	4.5	
	2	$C_{11}H_{12}N_8O_4S_2$	384.042 3	-0.007 7	-0.020 1	96.708 1	10.0	
	3	$C_{13}H_{14}N_5O_5S_2$	384.043 6	1.335 0	3.476 1	96.483 7	9.5	√
F	1	$C_{13}H_{14}N_5O_6S_2$	400.038 5	1.549 6	3.873 6	97.742 6	9.5	√
	2	$C_{14}H_{14}N_3O_7S_2$	400.027 3	-9.683 8	-24.207 3	97.732 6	9.5	
	3	$C_{11}H_{12}N_8O_5S_2$	400.037 2	0.206 9	0.517 2	97.596 5	10.0	

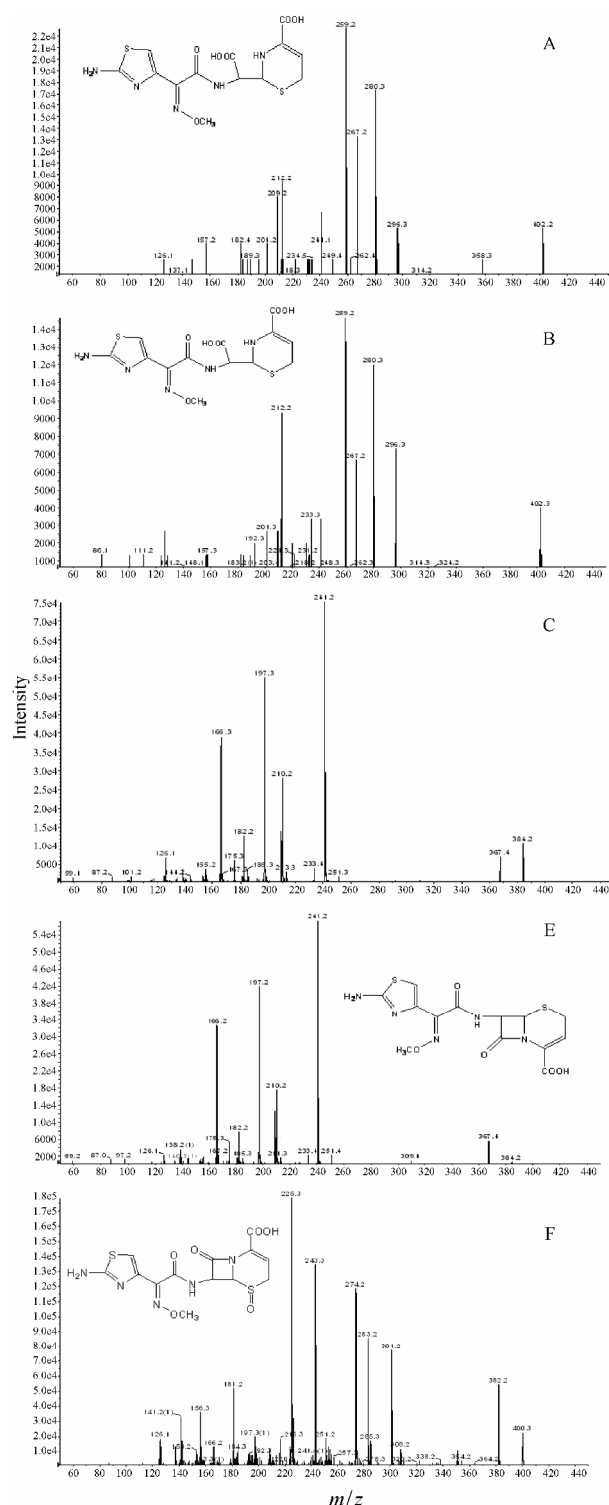


Figure 2 MS² spectra of degradation impurities (A, B, C, E, F represent different degradation impurities under LC-MS condition)

峰且与杂质F有相同的二级碎片离子, 根据以上推断应为杂质F。

杂质E和C由水和碱降解得到, 与头孢唑肟相对分子质量相同, 推测可能为异构体。其二级质谱图中

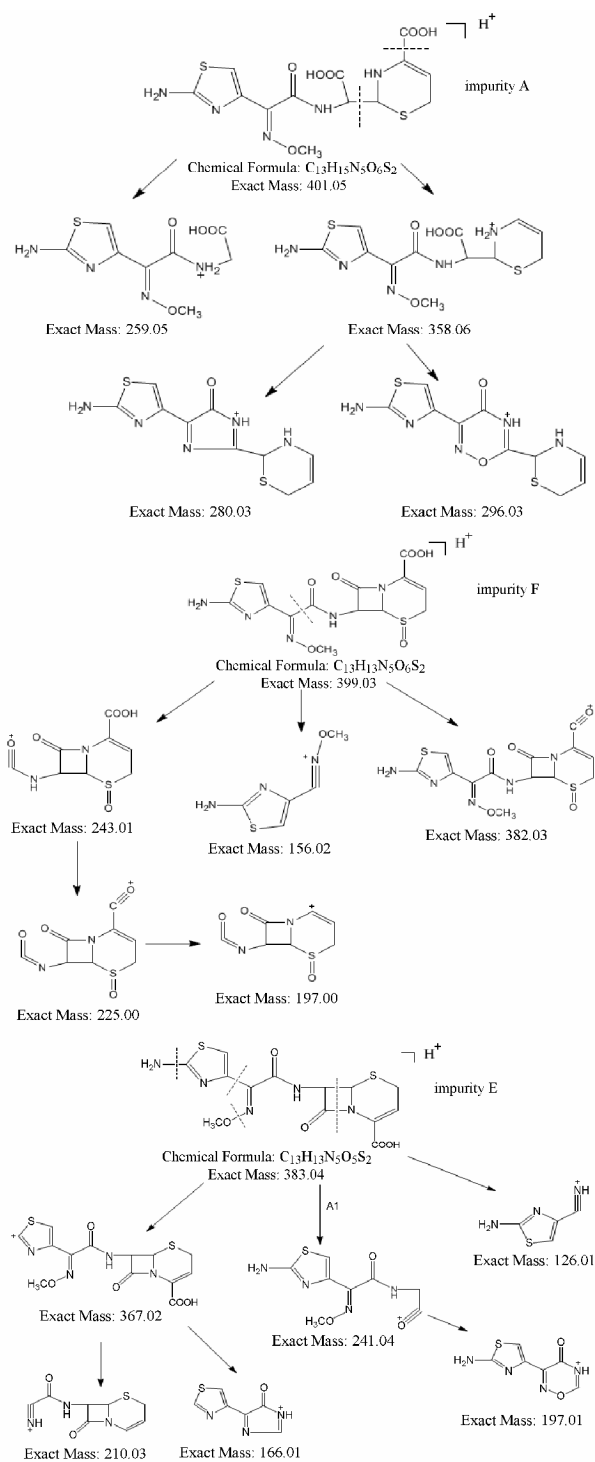


Figure 3 Proposed fragmentation pathway of impurities (A, E, F represent different degradation impurities under LC-MS condition)

有峰强度很大的 m/z 241 碎片峰, 推测为准分子离子峰发生 A 裂解产生的 A1 碎片, 进一步脱去 CO 和 CH₄ 并形成一个六元环 m/z 197 的碎片峰。准分子离子峰 (384) 脱去一分子 NH₃ 得到的 m/z 367 的碎片峰。文献^[4]报道头孢唑肟有 M_r 383 的杂质, 根据相对保留时间推测杂质 E 为头孢唑肟的反式异构体。

把各降解溶液的三维色谱图数据与头孢唑肟混合降解杂质标准色谱-UV 光谱库进行二维相关分析(图 4), 其中 LC-MS 方法的色谱峰 A~F 分别与混合降解杂质标准色谱图 (Chp2010) 中的色谱峰 4~8 和 3 实现相互识别 (阈值为 0.999)。

2 对头孢地尼质控 HPLC 方法色谱图中杂质峰结构的识别

2.1 中国药典 2010 版方法分析

采用中国药典头孢地尼有关物质方法分析混合降解溶液, 可分离出 13 个杂质峰, 10 号峰为头孢地尼峰, 得到头孢地尼降解杂质的标准色谱-UV 光谱库。

2.2 LC-MS 方法分析

采用 LC-MS 方法, 逐一进样各降解溶液, 进行质谱分析。根据一级质谱正负离子扫描, 得知杂质 C 和 D: $M_r = 411$; A: $M_r = 395$ 。对目标物经 MassWorks™ 处理所得分子式的结果进行分析。杂质 C 和 D 的同位素峰形与目标物的校正同位素峰形的相似度最大, 排在待选分子式的第 1 位, 且其不饱和度 (DBE) 等信息与目标物相符合, 实现了对目标物分子式的准确识别。杂质 A 排在了待选分子式的第 2 位, 但由于杂质 A 为水降解产物, 其 N 元素组成与母体化合物相比不会发生太大的变化, 故第 1 位

待选分子式 ($C_{13}H_{14}N_7O_4S_2$) 可以排除; 而排在第 2 位的分子式的信息与目标物相符合, 其即为目标物的准确分子式。从以上结果可知杂质 A 分子式为 $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, 杂质 C 和 D 分子式为 $C_{14}H_{13}N_5O_6S_2$ 。

分别进行二级质谱正离子扫描, 得到杂质 A、C 和 D 的二级质谱图。

杂质 C 和 D 由过氧化氢降解产生, 推测头孢地尼上的硫被氧化成亚砷结构。其二级质谱图中, m/z 394 的碎片峰推测为准分子离子峰 (412) 脱去一分子 H_2O 得到的, m/z 168 的碎片峰, 推测为准分子离子峰的 A 裂解得到的 A2 碎片脱去一分子 H_2O 得到的, 而进一步脱去一分子 CO 产生 m/z 140 的碎片峰。文献^[5]报道头孢地尼原料药中存在 M_r 411 的杂质峰, 相对保留时间约 0.4 min 与杂质 C 基本相符, 推测杂质 C 与文献报道为同一物质。杂质 D 分子式与二级碎片均与杂质 C 一致, 推断二者为同分异构体。

杂质 A 由水解得到, 与头孢地尼相对分子质量一样, 推测可能为异构体。其二级质谱图中, m/z 227 的碎片峰推测为准分子离子峰 (396) 发生 A 裂解产生的 A1 碎片, m/z 170 碎片峰为 A2 碎片, 进一步脱去一分子的 H_2O 为 m/z 152 碎片峰。 m/z 209 碎片峰

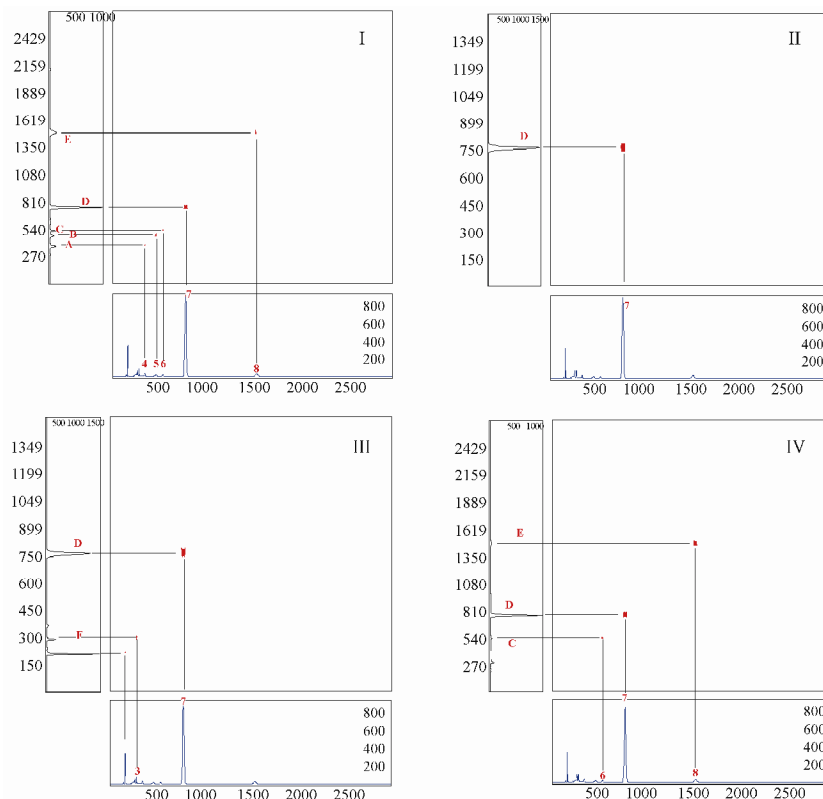


Figure 4 2D chromatographic spectral correlation map of degradation samples analyzed in HPLC and LC-MS methods. I: Alkaline; II: Acid; III: Hydrogen peroxide; IV: Hydrolysis

推测为准分子离子峰的 7 位侧链上的 C-C 键断裂进一步脱去一分子的 CO_2 产生的。美国药典^[16]报道了 M_r 395 的杂质, 根据相对保留时间推测杂质 A 为头孢地尼的反式异构体。

把各降解溶液的三维色谱图数据与混合降解杂质标准色谱-UV 光谱库进行二维相关分析, 其中混合降解杂质标准色谱图 (Chp2010) 中的色谱峰 1、3、4、10 和 14 与 LC-MS 方法的色谱峰 B、C、D、E 和 A 实现相互识别 (阈值为 0.999)。

References

- [1] Görög S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis [J]. *Trends Anal Chem*, 2006, 25: 755–757.
- [2] Hu CQ. Current situation and the trend in impurity control of chemical drugs [J]. *Sci Sin Chim (中国科学: 化学)*, 2010, 40: 679–687.
- [3] Lu CY, Feng CH. Identification of dimer impurities in ampicillin and amoxicillin by capillary LC and tandem mass spectrometry [J]. *Sep Sci*, 2007, 30: 329–332.
- [4] Bharathi C, Prasad CS, Bharathi DV, et al. Structural identification and characterization of impurities in ceftizoxime sodium [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 733–740.
- [5] Rao KVVP, Rani A, Reddy AVR, et al. Isolation, structural elucidation and characterization of impurities in cefdinir [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 1476–1482.
- [6] Grahek R, Zupancic-Kralj L. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2009, 50: 1037–1043.
- [7] Hu M, Hu CQ. Identification of the components and products of hydrolysis in acetyloucomycin by LC-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 476–480.
- [8] Loke ML, Jespersen S, Vreeken R, et al. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 783: 11–23.
- [9] Hu M, Hu CQ. Identification of the degradation compounds of cefathiamidine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 1015–1019.
- [10] Li W, Hu CQ. Spectral correlation of high-performance liquid chromatography-diode array detection data from two independent chromatographic runs peak tracking in pharmaceutical impurity profiling [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1190: 141–149.
- [11] Li W, Hu CQ, Jin SH. Identification of related substances in rifampicin by HPLC-DAD spectroscopy correlation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1292–1297.
- [12] State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Part II. Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- [13] Li XS, Li ZA, Wang ZQ, et al. Application of accurate mass and elemental composition determination for pesticides identification using a unit mass resolution gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Chem Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2010, 31: 2383–2389.
- [14] Erve JCL, Gu M, Wang YD, et al. Spectral accuracy of molecular ions in an LTQ/Orbitrap mass spectrometer and implications for elemental composition determination [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 2058–2069.
- [15] Qian JQ, Hu CQ. Rapid identification of the degradation products in cefuroxime aqueous solution by HPLC coupled with unit resolution single quadrupole mass spectrometer and calibrated lineshape isotope profile search (CLIPS) [J]. *Chin Pharm Anal (药物分析杂志)*: in press.
- [16] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia / National Formulary [S]. 2011 ed. Vol. 2. Baltimore: United Book Press, 2011.