

## 基于2D-LC-HR-MS/MS法的头孢丙烯原料药杂质谱分析

林辉, 李庆\*, 关晴, 刁富城

广州白云山医药集团股份有限公司白云山化学制药厂, 广东 广州 510515

**摘要:** 目的 基于二维液相色谱-高分辨串联质谱(2D-LC-HR-MS/MS)法分析头孢丙烯原料药杂质谱。方法 一维色谱条件进行样品色谱图采集, 确认各杂质的出峰位置, 采用YMC Hydrosphere色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以11.5 g·L<sup>-1</sup>磷酸二氢铵(用磷酸调节pH为4.4)为流动相A, 乙腈-流动相A(50:50)为流动相B, 梯度洗脱; 柱温40℃; 体积流量1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长230 nm; 进样量4 μL。二维液相脱盐后切进高分辨串联质谱进行分析, 根据结果推断杂质结构及生成机制, 采用Waters BEH C<sub>18</sub>色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以0.01%甲酸水溶液为流动相A, 乙腈为流动相B, 切峰后开始A相由98%到1%, 柱温40℃, 体积流量0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 质谱采用Xevo G2-XS QToF MS系统, 离子源为ESI源, 毛细管电压3.0 kV, 雾化器温度450℃, 扫描范围 $m/z$  100~2 000。结果 头孢丙烯样品中存在9个杂质色谱峰, 其中5个杂质为已知杂质, 峰3为杂质B(头孢羟氨苄)、峰5为杂质D、峰6为杂质F、峰7为杂质G、峰9为杂质I; 对其中3个未知杂质可能的结构式进行了初步推测以及探讨了可能的生成途径, 峰2分子式为C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S, 该化合物比头孢丙烯多一个氧, 分析其为头孢丙烯的氧化杂质; 峰4分子式为C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S, 与杂质B相比增加了1个氧原子, 减少了2个氢原子, 判断其为7-ACA内酯与对羟基苯甲甘氨酸甲酯(HPGM)反应产物中的硫原子继续发生了氧化生成的; 峰8分子式为C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S, 该组分为头孢丙烯分子结构的一部分。峰1有待进一步研究。结论 该方法有效解决了头孢丙烯流动相中含不挥发性磷酸盐的色谱体系与色谱-质谱快速鉴定杂质不兼容的难题, 可以简单、快速地对头孢丙烯有关物质进行定性分析及杂质谱研究。

**关键词:** 2D-LC-HR-MS/MS; 头孢丙烯; 有关物质; 杂质谱; 杂质控制

中图分类号: O65 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1316-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.016

## Impurity profile analysis of cefprozil using 2D-LC-HR-MS/MS

LIN Hui, LI Qing, GUAN Qing, DIAO Fucheng

Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holding Co., Ltd., Baiyunshan Chemical Pharmaceutical Factory, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** **Objective** To analyze the impurity profile of cefprozil API using 2D-LC-HR-MS/MS. **Methods** The sample chromatogram was acquired by one-dimensional chromatography conditions to confirm the peak positions of each impurity. The YMC Hydrosphere column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, with 11.5 g·L<sup>-1</sup> ammonium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 4.4 with phosphoric acid) as solvent A, a mixture of acetonitrile and solvent A (50:50) as solvent B, and gradient elution; column temperature was 40°C; flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; detection wavelength was 230 nm; injection volume was 4 μL. The impurity profile was analyzed by 2D-LC desalting and high-resolution tandem mass spectrometry (HR-MS/MS) after cutting into the mass spectrometer. Based on the results, the structures and formation mechanisms of the impurities were inferred. The Waters BEH C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used, with 0.01% formic acid aqueous solution as solvent A and acetonitrile as solvent B. The peaks were cut and the A phase was gradually increased from 98% to 1% starting from the cut. The column temperature was 40°C, the flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, and the mass spectrometer used was the Waters Xevo G2-XS QToF MS system with an ESI ion source, a capillary voltage of 3 kV, a vaporizer temperature of 450 °C, and a scanning range of  $m/z$  100—2 000. **Results** Nine impurity peaks were identified in the cefprozil sample, of which five were known impurities. Peak 3 was impurity B (cefhydroxime), peak 5 was impurity D, peak 6 was impurity F, peak 7 was impurity G, and peak 9 was impurity I. Preliminary structural hypotheses were made for the three unknown impurities and the possible generation routes were discussed. Peak 2 has a molecular formula of C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S, which was one oxygen atom more than cefprozil. It was analyzed as an oxidation impurity of cefprozil. Peak 4 has a

收稿日期: 2023-11-01

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2022B1111070004); 国家自然科学基金重点项目(61633006)

第一作者: 林辉, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物研发及企业管理。E-mail: linhui@gz.gov.cn

\*通信作者: 李庆, 男, 博士研究生, 研究方向为有机合成与药物研究。E-mail: lq03010301@163.com

molecular formula of  $C_{16}H_{15}N_3O_6S$ , which was one oxygen atom and two hydrogen atoms less than impurity B. It was judged that it was the sulfur atom of the reaction product between 7-ACA lactam and HPGM (hydroxyphenylglycine methyl ester) continuing to undergo oxidation. Peak 8 has a molecular formula of  $C_8H_9NO_2S$ , which is part of the molecular structure of cefprozil. Peak 1 needs further study. **Conclusion** This method effectively solved the problem of the chromatographic system with non-volatile phosphate in the mobile phase of cefprozil flowing phase and the incompatibility of chromatography-mass spectrometry rapid identification of impurities. It can simply and quickly determine the qualitative analysis and impurity spectrum of cefprozil-related substances.

**Key words:** 2D-LC-HR-MS/MS; cefprozil; related substances; impurity profile; quality control

头孢丙烯是美国Bristol-Myers Squibb公司研制的第二代非酯型广谱头孢菌素<sup>[1-3]</sup>,对革兰阳性菌及革兰阴性菌均表现出良好的抑制活性<sup>[4-5]</sup>,其抗菌谱比头孢呋辛更广,具有安全性高、不良反应小的优点<sup>[6]</sup>。临床使用的头孢丙烯是顺式异构体和反式异构体的混合物,其中顺式异构体约占90%,顺式和反式异构体均有抗菌活性,其中顺式头孢丙烯的抗菌活性是反式的6~8倍<sup>[7]</sup>。头孢丙烯的化学合成法一般以7-氨基-3-[(Z/E-丙烯)-1-基]-3-头孢烯-4-羧酸(7-APRA)和D-对羟基苯甘氨酸邓钾盐为起始原料,经混酐、成盐及缩合反应后,得到头孢丙烯的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂化物,再用水将DMF置换,最终得到头孢丙烯一水合物晶体;另一种制备方法为酶合成法,一般是以7-APRA和D-对羟基苯甘氨酸酯为起始原料,在酶的催化作用下进一步合成头孢丙烯,步骤简单。目前头孢丙烯已知的特定杂质包括杂质A( $\alpha$ -对羟基苯甘氨酸)、杂质B(头孢羟氨苄)、杂质D、杂质G、杂质H、杂质I、杂质M,其他非特定杂质C、杂质E、杂质F、杂质J、杂质K、杂质L和杂质N<sup>[8]</sup>,头孢丙烯及各杂质的化学结构式见图1,杂质多结构复杂。因此,对头孢丙烯中的杂质谱进行研究以便对其杂质进行有效的控制是非常必要的。

《中国药典》2020年版中头孢丙烯有关物质测定方法为高效液相色谱-紫外光谱联用(HPLC-UV),其流动相含有较高浓度的非挥发性成分磷酸二氢铵<sup>[9]</sup>,与质谱检测不兼容。若重新建立适合LC/MS检测的色谱系统,虽可对检出杂质的结构进行推定,但却无法对药典条件下色谱图中各杂质峰进行准确定位<sup>[10-11]</sup>。因此,常规解决方案为收集HPLC色谱馏分,对馏分进行脱盐处理后再进行质谱分析。该方法操作繁琐,对于低含量组分需要进行多次收集,而且在收集馏分和脱盐等处理的过程中,目标杂质容易损失或被破坏,增加了实验结果的不确定性<sup>[12-13]</sup>。二维液相色谱-高分辨串联质谱(2D-LC-HR-MS/MS)法可以在对目标杂质峰快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程,确保

联用的质谱仪可以获得稳定可靠的信号。该方法在不改变原流动相条件的基础上,实现液质联用分析目标杂质,可在准确推定检出杂质结构的同时,实现对药典条件下色谱图中各杂质的准确定位。

本研究采用2D-LC-HR-MS/MS对头孢丙烯有关物质方法进行了验证,对头孢丙烯样品进行了分析,并与欧洲药典(EP)收录的有关物质进行对比研究,建立头孢丙烯原料药的杂质谱,以期对头孢丙烯原料药的合成工艺路线进行优化,对其有关物质进行切实可行的控制,并为头孢丙烯杂质谱的建立及有效控制提供新的思路。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Waters ACQUITY UPLC 液相系统、Waters ACQUITY UPLCTM 2D 技术、Xevo G2-S QToF 系统(美国 Waters 公司);mass lynx 4.2 处理软件;SQP 十万分之一分析天平(赛多利斯公司)。

### 1.2 主要试剂

头孢丙烯原料药(批号1612002,广州白云山医药集团股份有限公司白云山化学制药厂);对羟基苯甲甘氨酸甲酯(HPGM)对照品(质量分数99.1%,批号201607,国药集团大同威奇达中抗制药有限公司);头孢丙烯对照品[批号130567-201203,含(Z)异构体为85.9%,含(E)异构体为9.2%,中国食品药品检定研究院];头孢丙烯杂质D和杂质F对照品(APRA,货号Y0001368,批号2.0,欧洲药品质量管理局);头孢丙烯峰鉴别对照品(杂质B、H、M,货号Y0001367,批号2.0,欧洲药品质量管理局);乙腈和甲醇为色谱纯(Merck);水为超纯水(实验室自制);磷酸二氢铵(分析纯,阿拉丁);磷酸(分析纯,阿拉丁);甲酸(分析纯,阿拉丁)。

## 2 方法

### 2.1 色谱、质谱条件

**2.1.1 一维色谱条件** 色谱柱: YMC Hydrosphere(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 柱温 40  $^{\circ}$ C; 流动相 A: 11.5 g·L<sup>-1</sup>磷酸二氢铵(用磷酸调节 pH 为 4.4); 流动相 B: ACN-流动相 A(50:50); 梯度洗脱程

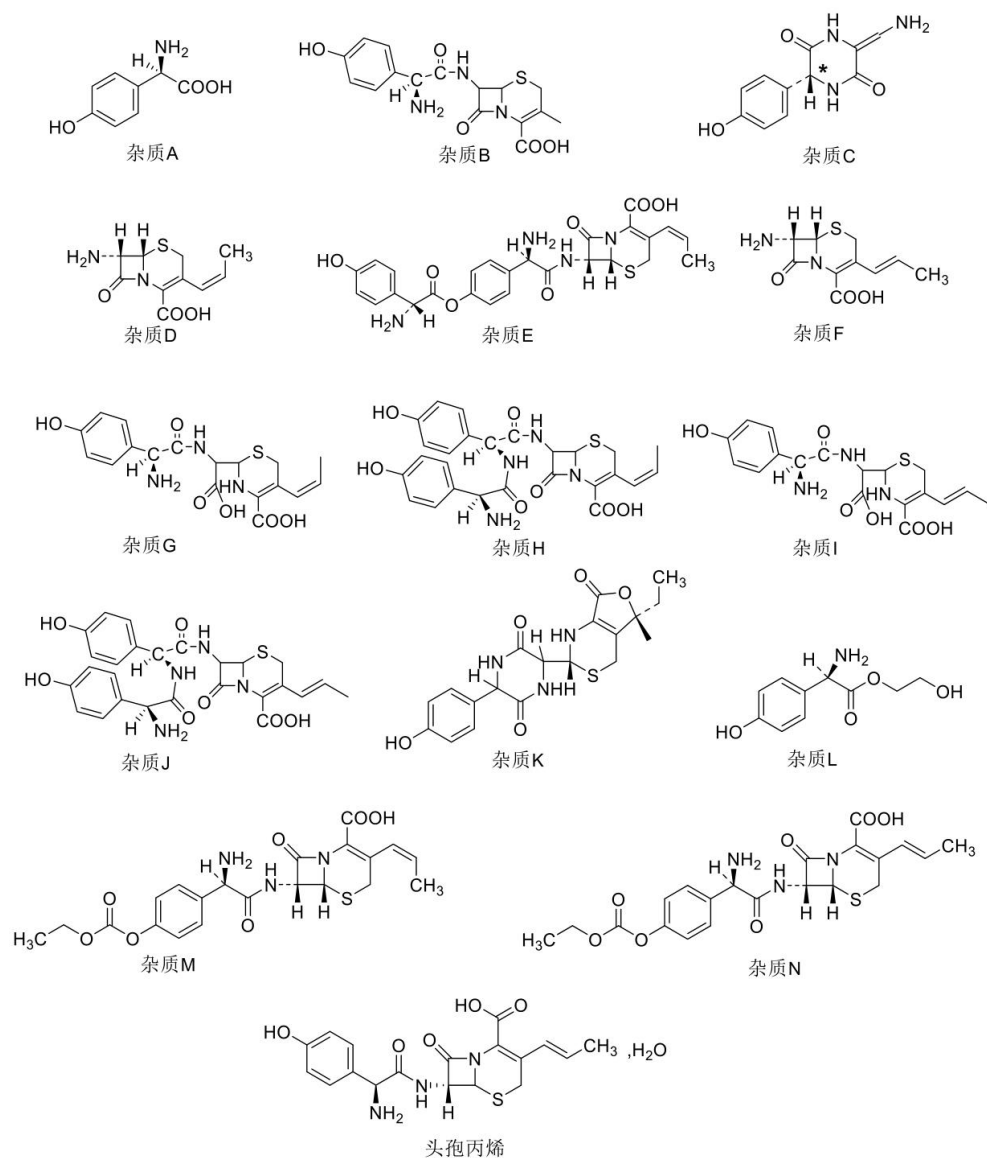


图1 头孢丙烯各杂质结构式

Fig. 1 Structural formula of cefprozil impurities

序:0~8 min, 81% A; 8~20 min, 81%→36% A; 20~25 min, 36% A; 25~25.1 min, 36%→81% A; 25.1~35 min, 81% A; 检测波长: 230 nm; 体积流量: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 4 μL。该方法来源于欧洲药典头孢丙烯品种项下有关物质检测方法, 采用 mass lynx 4.20 工作站进行采集。

**2.1.2 二维色谱条件** 色谱柱: Waters BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 体积流量: 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 流动相 A: 0.01% 甲酸水溶液; 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~10 min, 98%→50% A; 10~11 min, 50%→1% A; 11~12 min, 1% A; 12~12.1 min, 1%→98% A; 12.1~15 min, 98% A。该方法为适用于液相色谱-高分辨串联质谱分析而开发的色谱方法。

**2.1.3 质谱条件** Xevo G2-XS QToF MS 系统, 离子源为 ESI 源。毛细管电压 2.0 kV; 雾化器温度: 450 °C; 采集质量范围 *m/z* 100~1 200; 采集模式: MSe。工作站: Mass Lynx 4.2/Mass Fragment/Metabolynx。

## 2.2 方法学验证

取头孢丙烯原料药适量, 加 1 mL 配制好的盐酸溶液(103 g·L<sup>-1</sup>)溶解, 并用流动相 A 稀释成质量浓度约为 5.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的头孢丙烯供试品溶液。取 1 mL 头孢丙烯供试品溶液, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 即得对照品溶液。

**2.2.1 专属性考察** 分别取空白溶液、头孢丙烯供试品溶液、对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样分析。空白溶液所得色谱图在头孢丙烯(Z)异构体

和(E)异构体峰及其他杂质峰保留时间( $t_R$ )处无干扰。结果见图2。

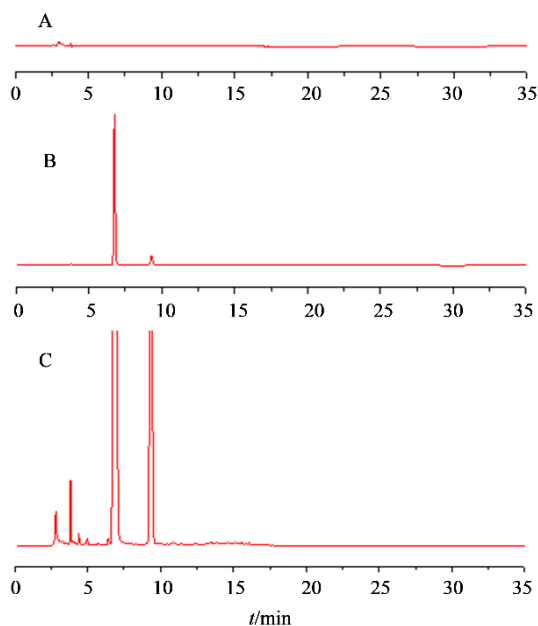


图2 空白溶液(A)、对照品溶液(B)、供试品溶液(C)液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatography of blank solution (A), reference solution (B), test solution (C)

**2.2.2 重复性考察** 平行配制6份头孢丙烯供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果显示6份样品各单杂最大极差为0.01%,总杂极差为0.01%。表明方法重复性良好。

**2.2.3 线性范围、定量限、检测限考察** 取头孢丙烯对照品适量,置棕色量瓶中,加 $103\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $1\text{ mL}$ 溶解后,用流动相A稀释配制成 $2.5$ 、 $5.0$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列头孢丙烯对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。以峰面积和对照品溶液质量浓度进行线性回归,得回归方程为 $Y=20.704\ 02\ X+0.627\ 765$ ( $R^2=0.999\ 93$ ),结果表明头孢丙烯在 $2.31\sim 23.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于样品浓度 $0.046\%\sim 0.462\%$ )线性关系良好。定量限( $S/N\geq$

$10$ )为 $0.05\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于样品浓度 $0.001\%$ ),检测限( $S/N\geq 3$ )为 $0.015\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于样品浓度 $0.000\ 3\%$ )。表明方法灵敏度良好。

**2.2.4 回收率考察** 取头孢丙烯对照品适量,置棕色量瓶中,加 $103\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $1\text{ mL}$ 溶解后,用流动相A稀释配制成 $2.5$ 、 $5$ 、 $15$ 、 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的准确度溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果显示各浓度准确度溶液单个回收率均在 $100.7\%\sim 101.7\%$ ,平均回收率为 $101.0\%$ ,RSD为 $0.27\%$ ( $n=12$ ),表明方法准确度良好。

**2.2.5 溶液稳定性考察** 取头孢丙烯供试品溶液室温避光放置,按“2.1”项下色谱条件,根据实际情况在不同的时间进样分析,结果显示室温放置 $1.3\text{ h}$ 内供试品溶液稳定,建议临用新制。

本方法可适用于头孢丙烯有关物质的测定。

### 2.3 2D-MS检测

分别取头孢丙烯供试品溶液、HPGM、APRA、头孢丙烯峰鉴别对照品(杂质B、H、M)按“2.1”项下色谱条件进行分析。使用HPGM、APRA、头孢丙烯峰鉴别对照品获得的色谱图鉴别杂质HPGM、APRA以及B、H和M的峰;其他杂质根据EP头孢丙烯品种项下通过其相对保留时间(RRT)进行鉴别。与头孢丙烯(Z)-异构体( $t_R$ 约为 $7\text{ min}$ )的RRT:杂质A为 $0.4$ ;杂质B为 $0.5$ ;杂质D为 $0.7$ ;杂质F为 $0.9$ ;头孢丙烯(E)-异构体为 $1.4$ ;杂质G为 $1.7$ ;杂质H为 $2.0$ ;杂质I为 $2.1$ ;杂质M为 $2.9$ 。然后对供试品色谱图中每个色谱峰进行中心切割,对疑为杂质A~N的组分采用质谱进行确证。对于RRT吻合,但质谱数据不匹配的组分,进一步进行元素组成分析,以推测可能结构。

### 3 结果

图3为头孢丙烯原料药在一维色谱条件下的实验检测结果,其中 $t_R$   $6.5$ 和 $10.0\text{ min}$ 对应的色谱峰为头孢丙烯和异构体的色谱峰,根据出峰时间先后将

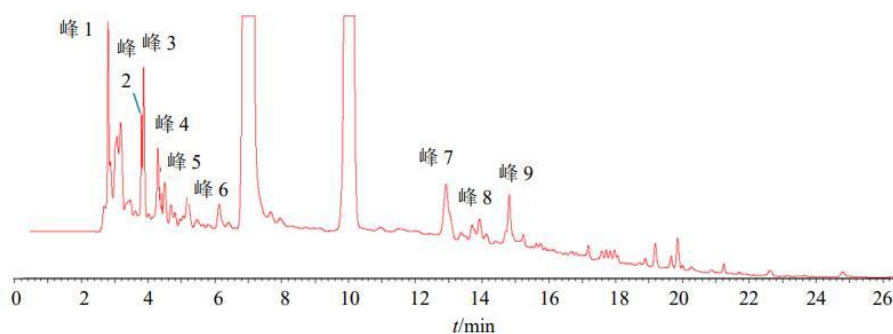


图3 头孢丙烯原料药一维液相色谱图

Fig. 3 One dimensional liquid chromatography of cefprozil raw material



图3中的色谱峰使用峰+阿拉伯数字进行编号,分别将峰1~9切换至2D-MS进行分析研究。

### 3.1 峰1的2D-LC-HR-MS/MS结果

通过在液相色谱方法设置阀切换时间为2.8 min,对 $t_R$  2.80 min处的峰1进行中心切割,采用2D-MS方法对峰1进行分析,结果见图4。对比峰1的二维质谱图和提取杂质A对应相对分子质量的XIC,发现峰1疑为EP中杂质A。但由于峰1出峰时间比较靠前,在一维液相色谱图中,几乎与流动相中的磷酸盐同时出峰,受到较大干扰。因此,从二维色谱图中 $t_R$  3.83 min处的质谱图(图5),可以看到峰1基本是磷酸盐的信号,难以找到杂质A( $m/z$  168.06)的明显质谱峰,所以推测峰1为磷酸盐的干扰峰,并不是杂质A。

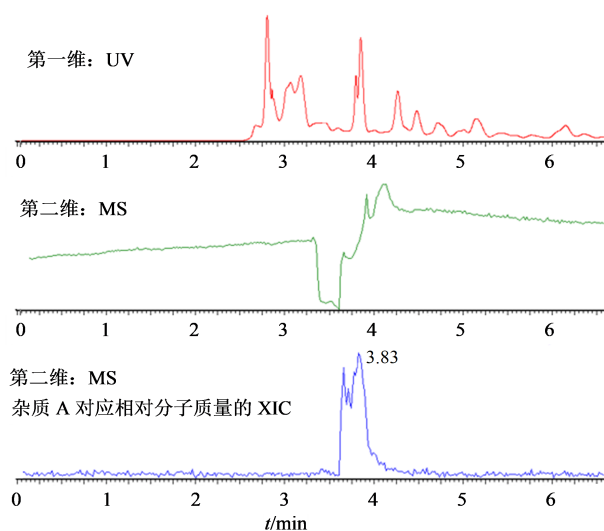


图4 峰1 2D-MS谱图

Fig. 4 2D-MS spectrum of peak 1

### 3.2 峰2的2D-LC-HR-MS/MS结果

对图3中的峰2进行分析,与“2.3”项下的EP杂质的RRT对比,可以得知该杂质并非EP杂质A~N中的任意杂质。因此,考察峰2是否为物料HPGM的残留。将峰2切换入2D-MS进行分析,获得了其2D-MS谱图,如图6所示。在二维谱图中,峰2的出峰时间为7.19 min。通过查看HPGM的XIC,没有发现明显的信号峰出现。打开第二维保留时间7.19 min处的质谱图,如图7所示,分析发现其 $[M+H]^+$   $m/z$ 为406.107 7。对峰2进行元素组成分析,结果如表1所示,表明该峰对应的分子式为 $C_{18}H_{19}N_3O_6S$ ,从分子式上看,该化合物比头孢丙烯多一个氧,分析其为头孢丙烯的氧化杂质,结构见图8。

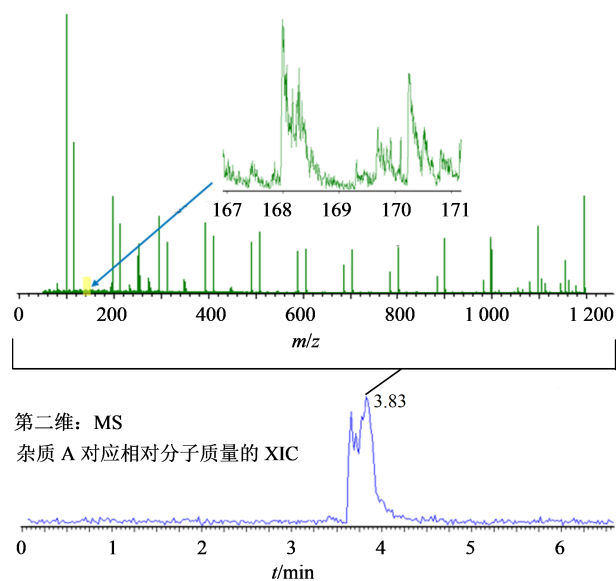


图5 头孢丙烯样品中峰1质谱图

Fig. 5 Mass spectrum of peak 1 in cefprozil

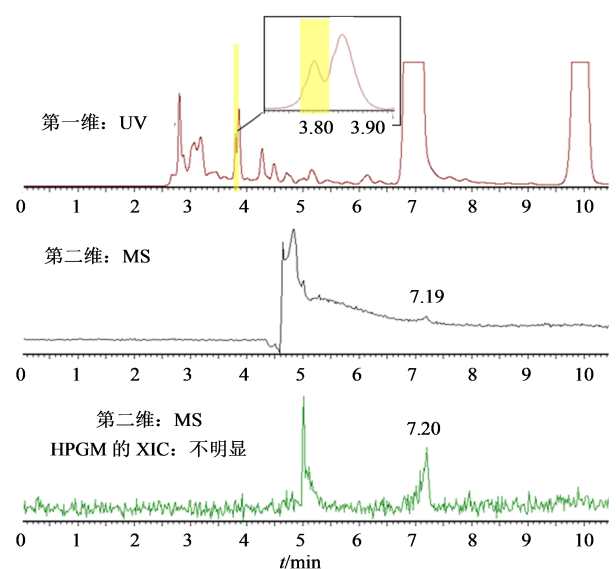


图6 头孢丙烯样品中峰2的2D-MS谱图

Fig. 6 2D-MS spectrum of peak 2 in cefprozil

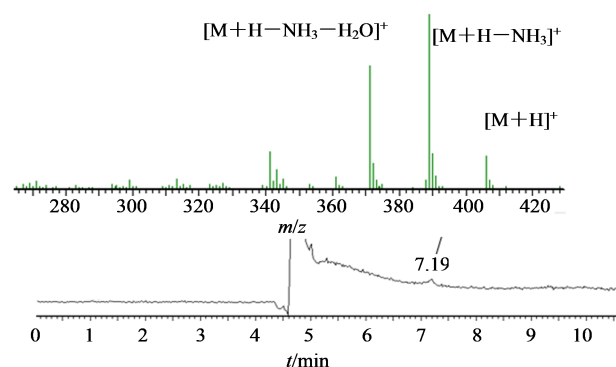


图7 头孢丙烯样品中峰2质谱图

Fig. 7 Mass spectrum of peak 2 in cefprozil

表1 峰2元素组成分析

Table 1 Elemental composition analysis of peak 2

测定 $m/z$	计算 $m/z$	测定与计算 $m/z$ 差值	误差/ ( $\times 10^{-6}$ )	不饱和度 DBE	可能的分子式	i-FIT <sup>a</sup>	i-FIT Norm <sup>b</sup>	Fit Conf/% <sup>c</sup>
406.107 7	406.107 3	0.4	1.0	10.5	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	41.5	0.755	47.00
	406.105 8	1.9	4.7	2.5	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub>	42.4	1.694	18.38
	406.111 3	-3.6	-8.9	14.5	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> S	42.8	2.090	12.37
	406.109 8	-2.1	-5.2	6.5	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub>	43.3	2.558	7.75
	406.109 3	-1.6	-3.9	24.5	C <sub>27</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub>	43.5	2.795	6.11
	406.103 9	3.8	9.4	15.5	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	43.6	2.918	5.40

a-同位素模型和精确质量数; b-同位素模型及精确质量数的一致性; c-测定质谱同位素峰与列表分子式对应理论同位素模型相吻合的可信度。

a-Isotope model and exact mass number; b-consistency between isotope model and exact mass number; c-the degree of confidence that the mass spectrometric isotope peaks correspond to the theoretical isotope model of the listed molecular formula.

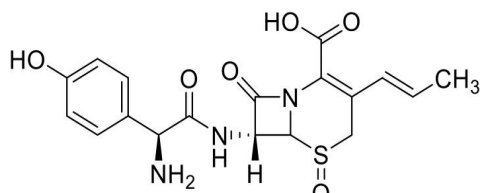


图8 头孢丙烯氧化杂质的结构

Fig. 8 Structure of oxidation impurity of cefprozil

### 3.3 峰3的2D-LC-HR-MS/MS结果

根据“2.3”项下的EP头孢丙烯的杂质A~N的RRT及头孢丙烯峰鉴别对照品(杂质B)的出峰时间,初步怀疑头孢丙烯的一维液相色谱中峰3位置对应的是头孢丙烯的杂质B。将峰3切换二维液相色谱模式进行2D-MS分析,结果如图9所示,峰3对应 $t_R$ 为7.76 min的色谱峰。通过查看提取杂质B的XIC,发现在 $t_R$ 为7.76 min处有明显的信号峰出现。基于上述分析,确认了峰3对应的化合物为杂质B。结合图1可知,杂质B是起始原料7-APRA中所含杂质7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)经后续反应的转化产物。

### 3.4 峰4的2D-LC-HR-MS/MS结果

对图3中头孢丙烯原料药的1D-LC中的峰4进行分析,根据EP中各杂质RRT、头孢丙烯杂质对照品和反应原料的出峰时间,发现峰4有可能是头孢丙烯的杂质D或残留的HPGM。因此,将峰4切换为2D-LC后继续采用2D-MS分析,结果如图10所示,通过查看提取杂质D和HPGM各自对应相对分子质量的XIC,没有发现杂质D和HPGM明显的信号峰出现,可以确认峰4不是杂质D和HPGM残留。

分析峰4的第二维质谱,如图11所示,得到其 $[M+H]^+$ 为378.076 5,元素组成的分析结果如表2

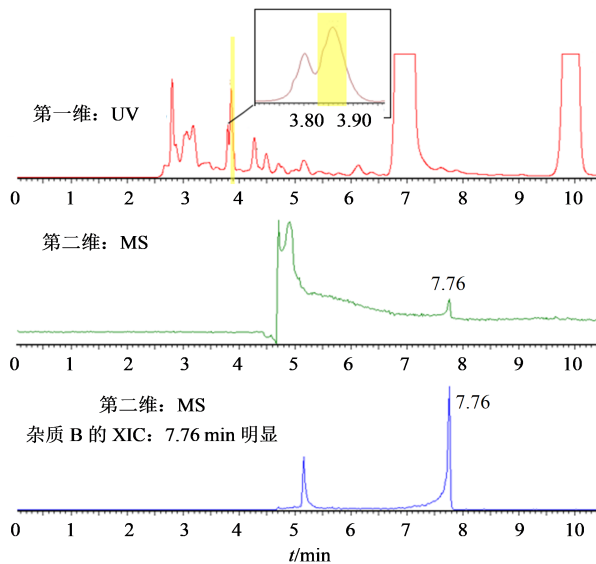


图9 头孢丙烯样品中峰3的2D-MS谱图

Fig. 9 2D-MS spectrum of peak 3 in cefprozil

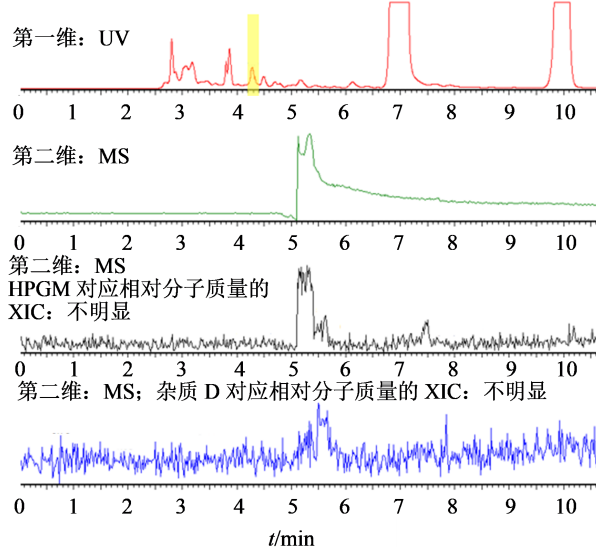


图10 头孢丙烯样品中峰4的2D-MS谱图

Fig. 10 2D-MS spectrum of peak 4 in cefprozil

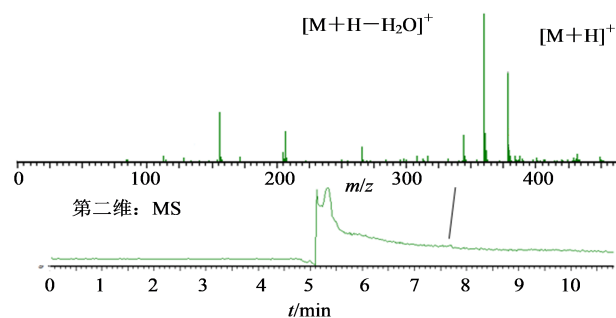


图 11 头孢丙烯样品中峰 4 质谱图  
Fig. 11 Mass spectrum of peak 4 in cefprozil

所示,得到了其分子式为 $C_{16}H_{15}N_3O_6S$ 。从峰 4 对应的分子式上看,与杂质 B 相比,该化合物增加了 1 个氧原子,减少了 2 个氢原子,判断其为 7-ACA 内酯与 HPGM 反应产物中的硫原子继续发生了氧化生成的,其反应机制如图 12 所示。

### 3.5 峰 5、6 的 2D-LC-HR-MS/MS 结果

分析峰 5 和峰 6 对应的 2D-MS,结果如图 13 所示,发现一维色谱图中峰 5 和峰 6 的  $t_R$  与中 APRA 两异构体组分的一维色谱出峰时间基本一致,分别为 4.59、6.05 min。再根据头孢丙烯杂质 D 和杂质

表 2 峰 4 元素组成分析

Table 2 Element composition analysis of peak 4

测定 $m/z$	计算 $m/z$	测定与计算 $m/z$ 差值	误差/ ( $\times 10^{-6}$ )	不饱和度 DBE	可能的分子式	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf/%
378.076 5	378.076 0	0.5	1.3	10.5	$C_{16}H_{16}N_3O_6S$	32.1	0.191	82.58
378.078 5	378.078 0	-2.0	-5.3	6.5	$C_{12}H_{16}N_3O_{11}$	34.2	2.206	11.02
378.080 0	378.080 0	-3.5	-9.3	14.5	$C_{21}H_{16}NO_4S$	34.9	2.949	5.24
378.074 5	378.074 5	2.0	5.3	2.5	$C_7H_{16}N_5O_{13}$	36.5	4.537	1.07
378.076 6	378.076 6	-0.1	-0.3	19.5	$C_{24}H_{12}NO_4$	39.3	7.330	0.07
378.078 0	378.078 0	-1.5	-4.0	24.5	$C_{25}H_8N_5$	40.1	8.184	0.03

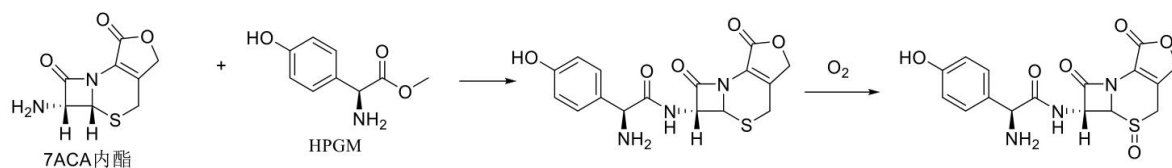


图 12  $C_{16}H_{15}N_3O_6S$  的生成路径  
Fig. 12 Generation pathway for  $C_{16}H_{15}N_3O_6S$

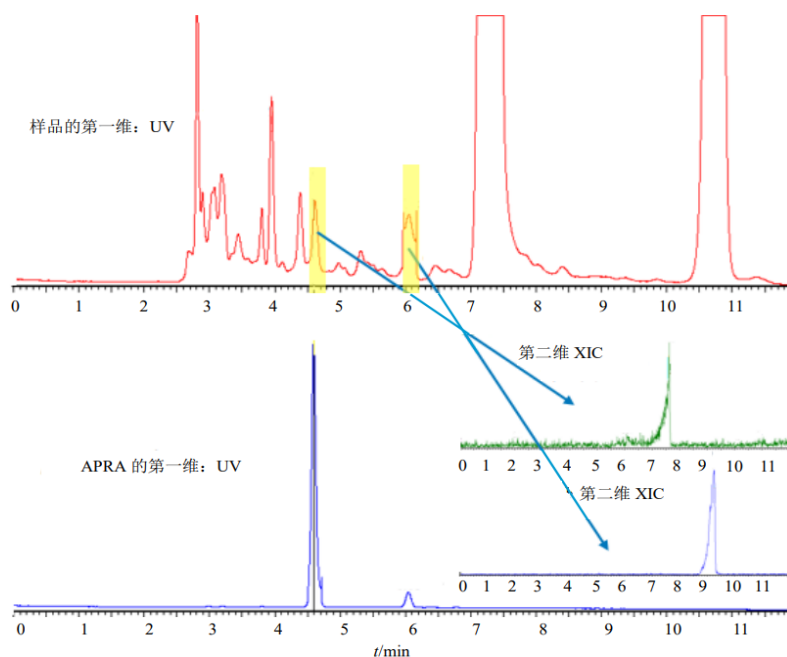


图 13 头孢丙烯样品中峰 5、6 的 2D-MS 谱图  
Fig. 13 2D-MS spectrum of peaks 5 and 6 in cefprozil

F XIC,均找到了杂质D和F的信号(右侧插图)。因此,可以判断图3中的峰5和6即为杂质D和F。值得注意的是,本研究的质谱检测模式为正离子模式,在该条件下杂质D和F易发生源内裂解,因此只能找到 $[M+H-CO]^+$ 的信号。

### 3.6 峰7的2D-LC-HR-MS/MS结果

将峰7的一维色谱切换至2D-MS后进行分析,结果如图14所示,根据头孢丙烯中各杂质RRT,分析峰7可能是头孢丙烯的杂质G。通过查看提取杂质G对应相对分子质量的XIC,可找到二维模式中 $t_R$ 为17.19 min处杂质G的明显信号。因此,本研究确定了图3中头孢丙烯原料药中的色谱峰7为图1中的杂质G,即头孢丙烯Z构型的开环杂质。

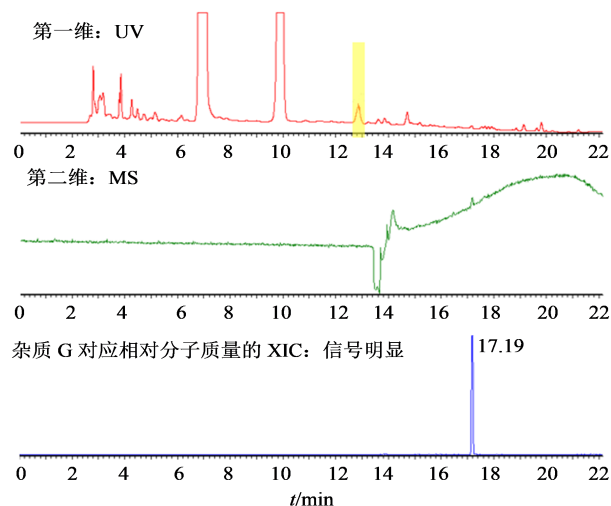


图14 头孢丙烯样品中峰7的2D-MS谱图  
Fig. 14 2D-MS spectrum of peak 7 in cefprozil

### 3.7 峰8的2D-LC-HR-MS/MS结果

对图3中的峰8进行分析2D-MS分析,结果如图15所示,通过RRT分析,怀疑峰8为杂质H,进一步查看杂质H对应相对分子质量的XIC并与峰8进行对比,发现杂质H信号不明显,首先确认了峰8不是杂质H。

进一步分析了峰8的二维质谱,如图16所示,发现该峰的 $[M+H]^+$ 值为184.0437,分析元素组成如表3所示,得到其分子式为 $C_{18}H_{10}NO_2S$ ,图17给出了其可能的结构,表明该组分为头孢丙烯分子结构的一部分。

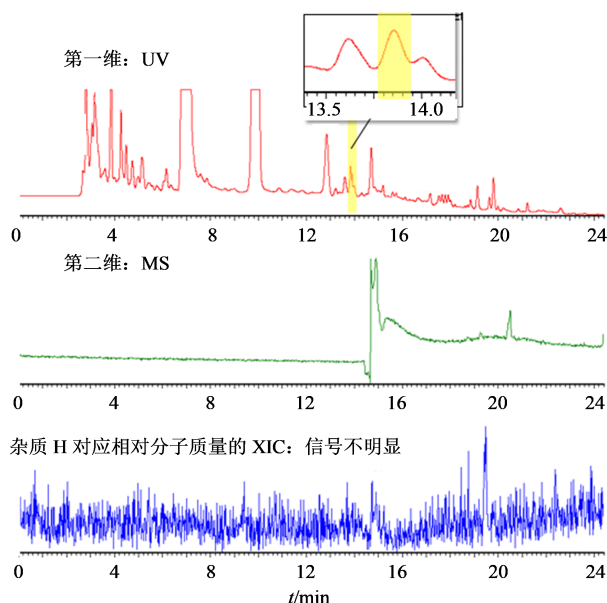


图15 头孢丙烯样品中峰8的2D-MS谱图  
Fig. 15 2D-MS spectrum of peak 8 in cefprozil

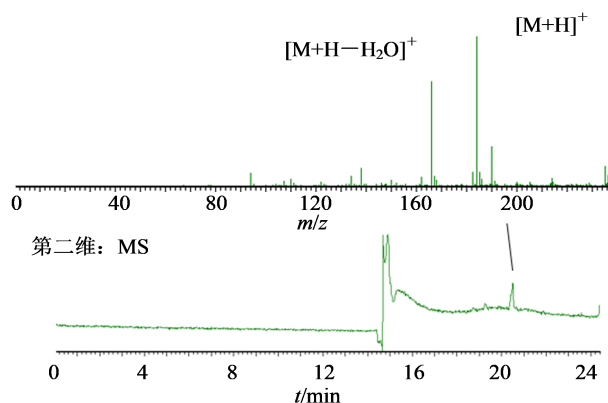


图16 头孢丙烯样品中峰8质谱图  
Fig. 16 Mass spectrum of peak 8 in cefprozil

### 3.8 峰9的2D-LC-HR-MS/MS结果

按相同的方法分析峰9,结果如图18所示,根据头孢丙烯中已知各杂质的RRT,初步分析该 $t_R$ 对应的组分为头孢丙烯杂质I。进一步查看杂质I对应相对分子质量的XIC,发现二维色谱中 $t_R$ 19.52 min处出现杂质I的明显信号。确定了图3中一维色谱中的峰9为图1中的杂质I,即头孢丙烯E构型开环杂质。

## 4 讨论

### 4.1 头孢丙烯杂质谱分析

采用一维色谱对头孢丙烯有关物质进行定量

表3 峰8元素组成分析

Table 3 Element composition analysis of peak 8

测定 $m/z$	计算 $m/z$	测定与计算 $m/z$ 差值	误差/ ( $\times 10^{-6}$ )	不饱和度 DBE	可能的分子式	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf/%
184.0437	184.0432	0.5	2.7	4.5	$C_{18}H_{10}NO_2S$	109.7	n/a	n/a



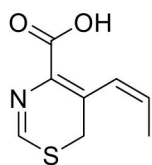
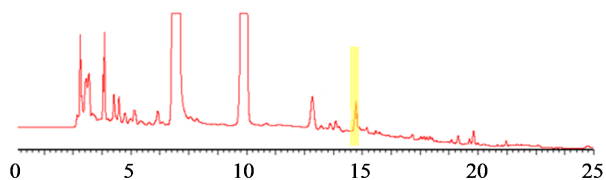


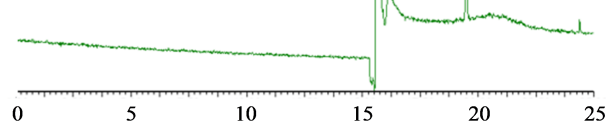
图17 峰8可能结构式

Fig. 17 Possible structural formula of peak 8

第一维: UV



第二维: MS



杂质 I 对应相对分子质量的 XIC: 信号明显

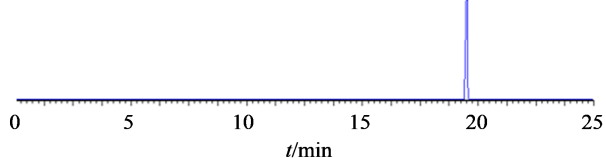


图18 头孢丙烯样品中峰9的2D-MS谱图

Fig. 18 2D-MS spectrum of peak 9 in cefprozil

分析并对方法进行了验证,二维采用质谱进行定性分析并对头孢丙烯供试液样品进行了杂质种类筛查,根据一维色谱分析发现供试液样品存在9个杂质色谱峰,根据已有的杂质信息进行了筛查后,结合2D-MS对一维色谱图中较大的色谱峰进行中心切割,发现主要存在的已知杂质有杂质B、杂质D、杂质F、杂质G和杂质I,对无法与已有杂质A~N对

应的峰2、峰4和峰8进行了元素分析,初步推测了可能的化学结构以及生成的机制。

采用2D-LC-HR-MS/MS对头孢丙烯原料药有关物质与EP收载的有关物质进行对比研究,分析结果与2D-MS的结果如表4和图19所示。

表4 2D-MS杂质分析结果

Table 4 Analysis of impurities in cefprozil by 2D-MS

峰号	RRT	杂质
1	0.39	未知
2	0.54	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S
3	0.55	杂质B
4	0.60	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S
5	0.69	杂质D
6	0.90	杂质F
7	1.82	杂质G
8	1.96	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S
9	2.09	杂质I

#### 4.2 头孢丙烯杂质来源分析

通过对头孢丙烯杂质的分析,可以用图20总结头孢丙烯降解的规律。

本研究采用2D-LC-HR-MS/MS技术对头孢丙烯原料药有关物质进行研究,有效解决了头孢丙烯有关物质检测方法中流动相体系采用不挥发性磷酸盐、而不适用于LC-MS联用鉴定杂质结构的难题,确定了头孢丙烯杂质谱,并对其其中3个未知杂质的结构式进行了初步推测以及探讨了可能的生成途径,可为头孢丙烯生产过程中的杂质控制及质量研究提供一定的借鉴意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

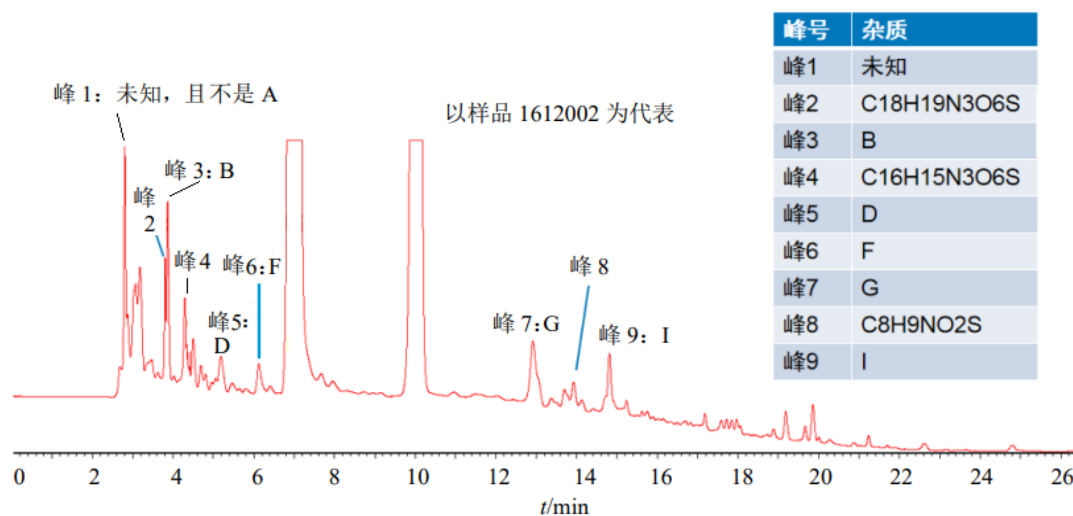


图19 头孢丙烯杂质确认及结构鉴定图

Fig. 19 Identification and confirmatory for cefprozil impurities

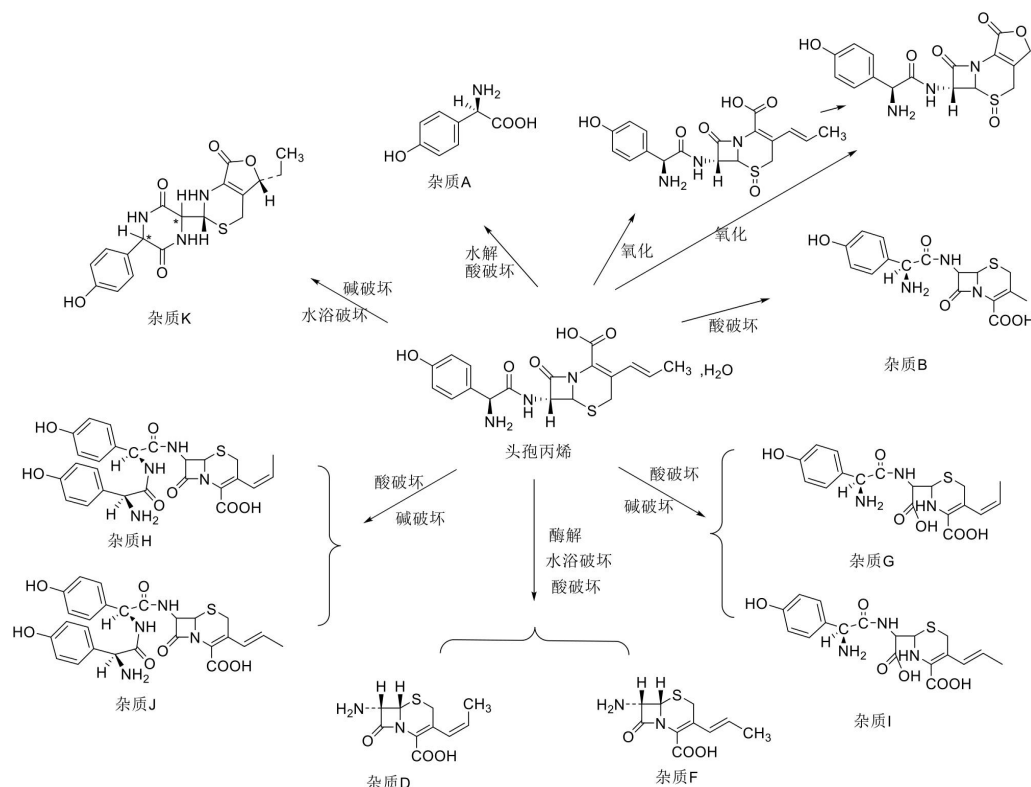


图20 头孢丙烯杂质降解规律

Fig. 20 Degradation of impurities of cefprozil

## 参考文献

- Jang J H, Jeong S H, Cho H Y, et al. Population pharmacokinetics of *Cis*-, *Trans*-, and total cefprozil in healthy male koreans [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(10): 531.
- 张雯, 刘晓琰, 董世波, 等. 析因设计筛选头孢丙烯干混悬剂处方 [J]. *中国药师*, 2018, 21(4): 635-639. Zhang W, Liu X Y, Dong S B, et al. Formula screening of cefprozil dry suspension by factorial design [J]. *China Pharm*, 2018, 21(4): 635-639.
- 肖颖, 袁晓, 林顺权. LC-HR-MS/MS法鉴定头孢丙烯干混悬剂中的未知杂质 [J]. *中国药房*, 2020, 31(10): 1217-1222. Xiao Y, Yuan X, Lin S Q. Identification of unknown impurities in cefprozil suspension by LC-HR-MS/MS [J]. *China Pharm*, 2020, 31(10): 1217-1222.
- Jeong S H, Jang J H, Cho H Y, et al. Pharmacokinetic comparison with different assays for simultaneous determination of *cis*-, *trans*-cefprozil diastereomers in human plasma [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11(3): 351-363.
- Liu M, Ma J Y, Zhang Y N, et al. An LC-MS/MS method for simultaneous determination of cefprozil diastereomers in human plasma and its application for the bioequivalence study of two cefprozil tablets in healthy Chinese volunteers [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(3): 288-293.
- 邱家军, 王宗利, 胡琳娜, 等. 头孢丙烯中一个未知杂质的合成与确认 [J]. *精细化工中间体*, 2016, 46(1): 53-56. Qiu J J, Wang Z L, Hu L N, et al. Synthesis and confirmation of an unknown impurity in cefprozil [J]. *Fine Chem Intermed*, 2016, 46(1): 53-56.
- He G D, Mai L P, Wang X P. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for rapid simultaneous determination of cefprozil diastereomers in human plasma [J]. *Int J Anal Chem*, 2018, 2018: 6959761.
- European Pharmacopoeia 11th edition [S]. 2023.
- 中国药典 [S]. 二部. 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [J]. Volume II. 2020.
- 张锦琳, 张娅, 赵述强, 等. 在线脱盐-高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法鉴定盐酸多西环素有关物质结构 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(23): 2073-2080. Zhang J L, Zhang Y, Zhao S Q, et al. Structure identification of related substances in doxycycline hyclate by 2D-LC-IT-TOF/MS [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(23): 2073-2080.
- 徐明明, 郑璐侠, 汪泓, 等. 2D-LC-QTOF MS 识别氨基葡萄糖液相含量测定方法中可疑色谱峰 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(2): 336-341. Xu M M, Zheng L X, Wang H, et al. Detection of suspicious peaks in HPLC of the content of glucosamine with 2D-LC-QTOF MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(2): 336-341.
- He J T, Meng L Y, Ruppel J, et al. Automated, generic reagent and ultratargeted 2D-LC-MS/MS enabling quantification of biotherapeutics and soluble targets down to pg/mL range in serum [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(13): 9412-9420.
- Chen H X, Wang L, Wang C X, et al. Strategy of combining offline 2D LC-MS with LC-DIA-MS/MS to accurately identify chemical compounds and for quality control of *Dioscorea septemloba* Thunb [J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(7): 1135-1146.

[责任编辑 兰新新]