

UPLC-ESI-MS法分析美罗培南的降解产物

王晓雪*, 赵铁, 赫军, 张相林[#](中日友好医院药学部, 北京 100029)

中图分类号 R917;R978.1⁺¹ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2354-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.18

摘要 目的:对美罗培南的降解产物进行结构分析。方法:采用超高效液相色谱-电喷雾-质谱联用技术(UPLC-ESI-MS)。色谱柱为Acquity UPLC[®] BEH-C₁₈,流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.2 ml/min,柱温为40 ℃。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正负离子检测模式;毛细管电压为3.0 kV和-2.5 kV;锥孔电压为25 V和-20 V;离子源温度为350 ℃;全扫描模式,扫描范围 m/z 100~1 000。结果:初步鉴定美罗培南的8个降解产物M1~M8,其中M1和M8已知,其余6个化合物未见报道,推测出了其可能的结构,形成机制包括支链羟基甲基化和成环反应等。结论:本方法灵敏、快速、高效,可用于美罗培南降解产物的分析,并为其药品质量控制提供了有效手段。

关键词 美罗培南;降解产物;超高效液相色谱法;质谱;分析鉴定

Analysis of Degradation Products of Meropenem by UPLC-ESI-MS

WANG Xiao-xue, ZHAO Tie, HE Jun, ZHANG Xiang-lin (Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the structure of degradation products of meropenem. METHODS: UPLC-ESI-MS method was adopted. The determination was performed on Acquity UPLC[®] BEH-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.2 ml/min; the column temperature was 40 ℃. Mass spectrum condition was as follows: ESI ion source, positive and negative ion detection mode; capillary voltage of 3.0 kV and -2.5 kV; bore-hole voltage of 25 V and -20 V; ion temperature of 350 ℃; full scan pattern; mass range m/z 100-1 000. RESULTS: 8 degradation products (M1-M8) of meropenem were detected preliminarily, M1 and M8 were known and other 6 compounds were not reported before. It estimated their potential structure and mechanism as branch chain hydroxyl methylation and annelation. CONCLUSIONS: The established method is sensitive, rapid and efficient, which can be used for the identification of degradation products of meropenem and provide effective way to control the quality of it.

KEYWORDS Meropenem; Degradation product; UPLC; MS; Identification and analysis

超高效液相色谱-质谱联用技术(Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)以其卓越的灵敏度、高选择性和快速的特点已成为药物中微量有关物质分析的首选技术。对于成分复杂的药物,使用UPLC-MS技术可以不经复杂的分离和纯化步骤即可同时获取样品的色谱和质

谱信息,进而获得化合物的丰富片段信息和分子组成信息,为药物中有关物质的结构鉴定提供了快速、准确的方法^[1-4]。美罗培南是第二代碳青霉烯类抗生素,与第一代碳青霉烯类抗生素亚胺培南相比,美罗培南在1-β位上修饰的甲基增强了其对肾脱氢酶I(DHP-I)的稳定性,故不需与酶抑制剂合用,

这样可提高抽验的针对性,且操作简便,非检验人员也可利用模型进行初筛。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:984.
- [2] 金少鸿. 药品检测车的研制及其应用[J]. 中国药事, 2007, 21(1):8.
- [3] 雷毅, 罗卓雅, 王彩媚. 近红外光谱快速检测痰液净中咖啡因的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6):1 041.
- [4] 刘绪平, 冯艳春, 胡昌勤, 等. 头孢拉定胶囊剂通用性近红

外定量分析模型的建立[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 722.

- [5] 陈贵斌, 陶巧凤, 洪利娅, 等. 辛伐他汀片近红外漫反射光谱定量分析模型的建立[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 989.
- [6] 陈贵斌, 杨伟峰, 陶巧凤, 等. 吡嗪酰胺片近红外定量分析通用性模型的建立[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(10): 934.
- [7] 黄海, 武洋. 近红外光谱法快速测定卡托普利片含量[J]. 中国药事, 2011, 25(7):695.
- [8] 郗冰冰, 王润彪, 郭毅. 利用近红外光谱法测定洛伐他汀胶囊的含量[J]. 中国药事, 2011, 25(7):698.

(收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-12-12)

* 药师, 博士。研究方向:利用质谱技术研究药物代谢产物。电话:010-84205563。E-mail:67671218@qq.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:临床药学、治疗药物监测。电话:010-84205370。E-mail:xianglin63@yahoo.com

安全性较高;美罗培南对革兰阴性菌的活性更强,对革兰阳性菌稍弱^[5]。虽然美罗培南粉末在室温条件下可以放置较长时间,但是其水溶液易发生降解反应^[6]。同时,临床上使用美罗培南注射液与某些溶液进行配伍,会出现禁忌,产生不稳定现象^[7]。因此,有必要对该药物的降解产物进行详细的研究。此前的研究证实,美罗培南水溶液中的降解产物为 β -内酰胺环水解产物、二聚体及三聚体^[8-9]。本文采用UPLC-电喷雾(ESI)-MS法对美罗培南的降解产物进行了灵敏、快速、高效的分离和鉴定分析,共发现8个降解产物(其中6个化合物未见报道),并推导出其可能的结构和形成机制。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC仪、Quattro Premier XE三重四级杆MS仪、电喷雾离子化源(ESI)及Masslynx4.1数据处理系统(美国Waters公司);Milli-Q Advantage A10超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

美罗培南对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130506-200702,纯度:98%);甲酸、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

2 方法

2.1 样品配制

称取美罗培南对照品5 mg置于5 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得质量浓度为1 mg/ml的供试品溶液。室温放置48 h,进样。

2.2 UPLC-MS条件

2.2.1 UPLC条件。色谱柱:Acquity UPLC[®] BEH-C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μ m);柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ l;流动相:A为0.1%甲酸水溶液,B为乙腈,梯度洗脱(B的体积比例在0~8 min,从5%增至20%;8~9 min,从20%下降至5%;9~12 min保持5%,A的体积比例相应变化);流速:0.2 ml/min。

2.2.2 MS条件。正负离子检测模式的电喷雾(ESI)电离;毛细管电压:3.0 kV和-2.5 kV;锥孔电压:25 V和-20 V;离子源温度:350 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速:600 L/h;锥孔反吹气流速:30 L/h;采用全扫描方式;扫描范围 m/z :100~1 000。

3 结果与讨论

3.1 美罗培南降解产物的UPLC-MS分析结果

经过MS条件优化,发现美罗培南及其降解产物在正离子检测模式(+ESI)下的相应强度比负离子检测模式(-ESI)要高很多,所以主要采用前者进行分析,后者作为补充试验以确定降解产物的分子质量。

室温放置48 h美罗培南水溶液的(+ESI)总离子流色谱图(TIC)见图1。

由图1可以看出,M1和M7离子强度较高,可能为主要降解产物。此外,在该试验条件下,美罗培南及其大部分降解产物可以达到基本分离,对于一些未分离的降解产物,可以通过对降解产物的准分子离子[M+H]⁺的提取进行分析。例如图1中,M4与M5无法分离,而M6则完全被美罗培南的色谱峰所覆盖;而利用提取离子流色谱技术(XIC)即可将M4与M5、M6与美罗培南进行质谱分离,见图2。

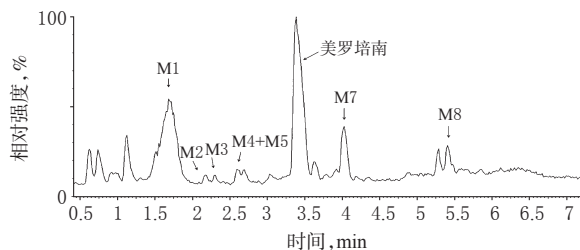


图1 美罗培南水溶液的(+ESI)TIC图

Fig 1 TIC (+ESI) of meropenem aqueous solution

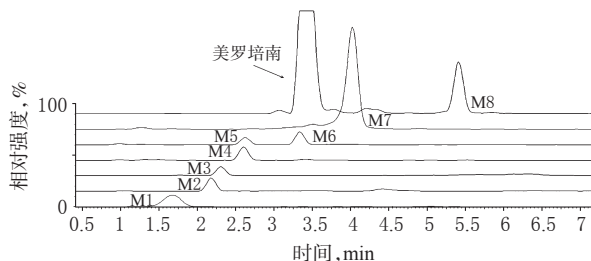


图2 美罗培南及其降解产物的(+ESI)XIC图

Fig 2 XIC (+ESI) of meropenem and its degradation products

图2给出了美罗培南及其降解产物的(+ESI)XIC图。依据保留时间,将降解产物依次命名为M1~M8。通过图1、图2的对比,可以看出M1[保留时间(Rt)1.68 min]在TIC图中强度较高,而在XIC图中反而较低。这是由于M1的准分子离子[M+H]⁺ m/z 402在该MS检测条件下,易发生源内裂解使[M+H]⁺脱掉1分子CO₂而产生离子 m/z 358。由此可知,TIC图中M1的高强度是子离子 m/z 358贡献的。而XIC图中的M1是提取[M+H]⁺ m/z 402进行分析的,所以强度较低。同上,M8(Rt 5.41 min)的[M+H]⁺为 m/z 767,而在此条件下,易发生裂解反应产生子离子 m/z 384,强度较高,使得[M+H]⁺的离子强度较低。为了便于比较,在XIC图中提取 m/z 384离子来代替[M+H]⁺ m/z 767以表征M8。此外,降解产物中还包含一组同分异构体M5(Rt 2.63 min)和M6(Rt 3.33 min),[M+H]⁺离子为 m/z 374。图2显示,M5与M4(Rt 2.61 min,[M+H]⁺ m/z 388),M6与美罗培南(Rt 3.40 min,[M+H]⁺ m/z 384)的保留时间较为接近,表明 m/z 374有可能分别为上述离子的子离子,而非M5和M6的[M+H]⁺离子。通过改变梯度洗脱条件,可以使M5和M4有较程度的分离,证实 m/z 374非 m/z 384的子离子;此外,通过对美罗培南的[M+H]⁺离子 m/z 384进行二级裂解试验,也未出现 m/z 374离子。

3.2 美罗培南降解产物的结构推断

结合(-ESI)检测模式下的[M-H]⁻离子,可以分别确定M1~M8的分子质量。根据碳青霉烯类化合物降解规律^[10]并结合文献报道^[11],推导出M1~M8的可能结构,如图3所示。其中M1(美罗培南酸)^[8-9,11]和M8(闭环二聚体)^[9]为已报道的降解产物。

图3展示了美罗培南降解产物可能的结构及形成机制。美罗培南的四元内酰胺环结构不稳定,易发生水解反应。M1即为美罗培南加合1分子水形成的开环降解产物,图1显示该化合物在降解产物中含量较高;之后,M1与美罗培南在水溶

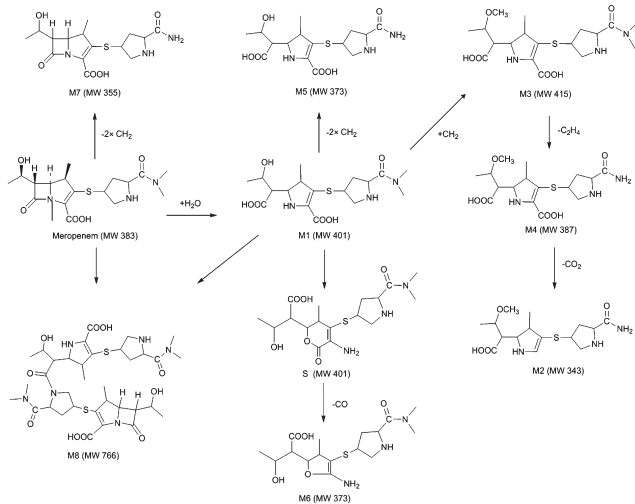


图3 美罗培南降解产物可能的结构及形成机制

Fig 3 Possible structures and formation mechanisms of degradation products of meropenem

液中易发生聚合反应,形成二聚体M8;由于硫原子右侧的二氨基甲酰结构在水溶液中脱掉2分子甲基,故美罗培南和M1又分别降解为M5和M7,后者含量较高;M3经由M1的支链羟基发生甲基化反应而产生。随后,脱去2分子甲基生成M4;M2是由M4脱去1分子CO₂形成的,考虑到环上的羧基比支链羧基更易丢失,所以形成机制如图3所示;水溶液中,M1能够发生成环反应形成S,化学名称:2-{4-[5-(二氨基甲酰)四氢吡咯-3-硫]-3-甲基-5-亚氨基-6-氧代-2-氢-吡喃-2-代]-3-羟基丁酸^[11],之后脱去1分子CO生成M6;结合(-ESI)检测模式下,M5和M6的[M-H]⁻均为m/z 372,可知其分子质量均为373 Da,为一组同分异构体,而MS对同分异构体区分能力有限,不易进行结构归属。此时,可以依靠极性大小来判断。由于使用反相C₁₈色谱柱,M5比M6保留时间小,说明M5极性稍大,故为环上含羧酸的结构。

上述降解产物的结构为合理的可能推断。若需要准确鉴定,对于已知降解产物M1和M8最优的方法是合成相应对照品,通过保留时间和MS数据的比对来进行结构判断。下一步,笔者将重点针对未知产物M2~M7,对其进行高分辨MS测定,并结合碳青霉烯类化合物的ESI-MS裂解规律进行更准确的结构鉴定。

4 结语

本研究采用UPLC-ESI-MS技术,建立了用于美罗培南降解产物结构推定的分析方法。该方法使美罗培南及其降解产物在8 min以内全部出峰,且响应强度较高,同时获得大量结构信息。共推断出8个降解产物的可能结构,其中6个化合物未见报道。综上,该方法可以快速、灵敏、高效地分析美罗培南降解产物,为美罗培南药品质量控制提供了参考依据。

参考文献

- [1] Mazzeo JR, Neue UD, Kele M, *et al.* Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(23):460A.
- [2] Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, *et al.* High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies[J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(2):591.
- [3] Vijaya BRA, Venugopal N, Madhavi G, *et al.* A selective and sensitive UPLC-MS/MS approach for trace level quantification of four potential genotoxic impurities in zolmitriptan drug substance[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 84:84.
- [4] Hubicka U, Mudzki P, Talik PA, *et al.* Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS/MS and DSC[J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1):133.
- [5] Rhomberg PR, Jones RN. Antimicrobial spectrum of activity for meropenem and nine broad spectrum antimicrobials: report from the MYSTIC Program (2002) in North America[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003, 47(1):365.
- [6] Takeuchi Y, Takebayashi Y, Sunagawa M, *et al.* The stability of a novel carbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338), in a solid state formulation for injection[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 41(11):1998.
- [7] 劳佳,陈晓辉,韩木南,等.美罗培南与8种特殊输液的配伍稳定性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(5):294.
- [8] Yutaka T, Makoto S, Yutaka I, *et al.* Stability of a 1β-methylcarbapenem antibiotic, meropenem (SM-7338) in aqueous solution[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 43(4):689.
- [9] Cai SY, Hu CQ. Chromatographic determination of polymerized impurities in meropenem[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(3):585.
- [10] Sun CR, Wu JM, Pan YJ. Characterization of novel hydrolysis products of carbapenems by electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(19):3205.
- [11] 吴健美.药物微量未知成分及降解产物的质谱研究[D].杭州:浙江大学硕士学位论文,2010:26-28.

(收稿日期:2013-09-02 修回日期:2013-10-09)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅