



(21)申请号 201610025607.4

(22)申请日 2016.01.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105646474 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(73)专利权人 成都大学

地址 610106 四川省成都市龙泉驿区外东
十陵镇

(72)发明人 王宇驰 唐克慧 张志兰 李成龙

孙样 张春然 张静霞 李喆宇

王瑛瑛 李强 赵经纬 徐明琴

邓思思 丁文字 王术兰

(74)专利代理机构 成都佳划信知识产权代理有
限公司 51266

代理人 余小丽

(51)Int.Cl.

C07D 417/12(2006.01)

(56)对比文件

CN 102718779 A, 2012.10.10, 全文.

CN 101348492 A, 2009.01.21, 全文.

杨倩,等.注射用头孢唑肟钠的杂质谱研究.
《中国药学杂志》.2014,第49卷(第19期),第
1750-1754页.孙雪奇,等.头孢他啶杂质H研究.《药物分析
杂志》.2014,第34卷(第9期),第1606-1608页.陈珍珍,等.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.《药学学报》
.2012,第47卷(第4期),第493-495页.于华生.HPLC法测定注射用头孢唑肟钠的含
量和有关物质.《中国药事》.2008,第22卷(第4
期),第335-337页.

审查员 姚旻

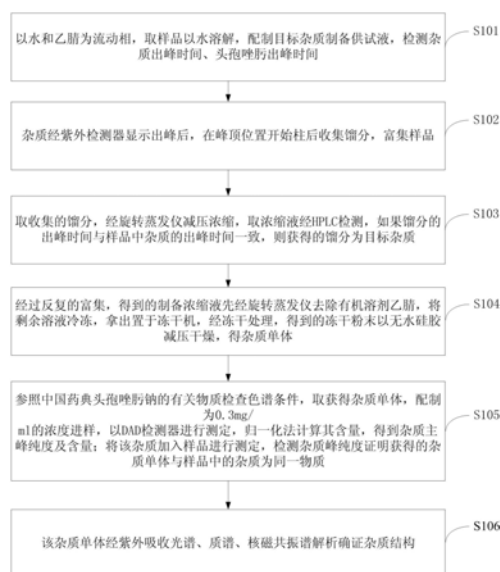
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证
方法

(57)摘要

本发明公开了一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法,包括:检测杂质出峰时间、头孢唑肟出峰时间;在峰顶位置开始柱后收集馏分,富集样品;取收集的馏分,取浓缩液经HPLC检测判定馏分为目标杂质;经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液冻干处理,得杂质单体;计算杂质主峰纯度及含量;经紫外吸收光谱、质谱、核磁共振谱解析确证杂质结构。本发明对杂质进行了分离制备,获得了杂质单体,进行了结构确证,以此基础制订了严格的杂质限度,为本药品的安全使用提供了理论依据,可对提高头孢唑肟钠质量标准提供有效的数据支持,为头孢唑肟钠的临床安全使用提供有效保障。



1. 一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法,其特征在于,所述的头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法包括:

步骤一、以水和乙腈为流动相,取样品以水溶解,配制目标杂质制备供试液,检测杂质出峰时间、头孢唑肟出峰时间;

步骤二、杂质经紫外检测器显示出峰后,在峰顶位置开始柱后收集馏分,富集样品;

步骤三、取收集的馏分,经旋转蒸发仪减压浓缩,取浓缩液经HPLC检测,如果馏分的出峰时间与样品中杂质的出峰时间一致,则获得的馏分为目标杂质;

步骤四、经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液冷冻,拿出置于冻干机,经冻干处理,得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥,得杂质单体;

步骤五、参照中国药典头孢唑肟钠的有关物质检查色谱条件,将步骤四获得杂质单体配制为0.3mg/ml的浓度进样,以DAD检测器进行测定,归一化法计算其含量,得到杂质主峰纯度及含量;将该杂质加入样品进行测定,检测杂质峰纯度证明获得的杂质单体与样品中的杂质为同一物质;

步骤六、该杂质单体经紫外吸收光谱、质谱、核磁共振谱解析确证杂质结构;

制备杂质单体时的色谱条件如下:

十八烷基键合硅胶填料的制备或半制备柱,以体积比水:乙腈=100:0~30:70为流动相,取样品以水溶解,配制为10~200mg/ml目标杂质制备供试液,进样量100 μ l,流速1~3ml/min,检测波长254nm,柱温30 $^{\circ}$ C;

经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻24h,拿出置于冻干机,经24小时冻干处理,得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥4小时,得杂质单体。

一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物分析领域,尤其涉及一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法。

背景技术

[0002] 头孢唑肟钠是由日本藤泽药品公司开发的第3代半合成头孢菌素,于1982年在日本和中国台湾首次上市,为广谱抗菌药,口服无效。注射用头孢唑肟钠为头孢唑肟钠无菌原料直接分装制得,《中国药典》自2010年版起收载原料及制剂。该药对细菌产生的 β -内酰胺酶具有良好的耐性,具有高效、广谱、耐酶的特点,用于治疗敏感菌所致的下呼吸道感染、尿路感染、腹腔感染、盆腔感染等。

[0003] 本发明制备验证的杂质属于市售样品中含量较高杂质,多批样品按《中国药典》有关物质检查方法检测,其含量均超过0.1%,而本品为注射剂,杂质含量的高低直接影响了药品临床使用的安全性,根据《中国药典》2010年版附录XIXF药品杂质分析指导原则的规定,对于表观含量在0.1%及其以上的杂质以及表观含量在0.1%以下的具强烈生物作用的杂质或毒性杂质,予以定性或确证其结构,对在稳定性试验中出现的降解产物,也应进行研究。因此,发明该杂质的制备方法,并对该杂质的结构进行确证,可对提高头孢唑肟钠质量标准提供有效的数据支持,为本品的临床安全使用提供有效保障。

[0004] 目前,各国药典收载该品种的杂质中未列本发明的化合物,也未见其他文献对该杂质的制备与确证报道。

[0005] 头孢唑肟钠收载标准中,无该杂质的制备与结构报道,有文献报道采用UPLC-MS联用技术对注射用头孢唑肟钠存在的主要的共有杂质进行结构推定,但未发现与本发明相同的杂质结构,也未实现对本发明的杂质的制备与结构确认方法。

[0006] 头孢唑肟钠为注射用原料,其含有的杂质,将影响产品使用的安全性,特别是头孢类药物的临床副反应较多,更应对样品中的杂质进行彻底研究,严格限制。现有方法和文献对其中的有些杂质进行了归属,但未进行详细的结构确证,无法对杂质的限量和药品使用安全性提供保障。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确证方法,旨在解决现有方法未对头孢唑肟钠中的杂质进行详细的结构确证,无法对杂质的限量和药品使用安全性提供保障的问题。

[0008] 本发明是这样实现的,一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确认方法包括:

[0009] 步骤一、以水和乙腈为流动相,取样品以水溶解,配制目标杂质制备供试液,检测杂质出峰时间、头孢唑肟出峰时间;

[0010] 步骤二、杂质经紫外检测器显示出峰后,在峰顶位置开始柱后收集馏分,富集样品;

[0011] 步骤三、取收集的馏分,经旋转蒸发仪减压浓缩,取浓缩液经HPLC检测,如果馏分的出峰时间与样品中杂质的出峰时间一致,则获得的馏分为目标杂质;

[0012] 步骤四、经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液冷冻,拿出置于冻干机,经冻干处理,得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥,得杂质单体;

[0013] 步骤五、参照中国药典头孢唑肟钠的有关物质检查色谱条件,取获得杂质单体,配制为0.3mg/ml的浓度进样,以DAD检测器进行测定,归一化法计算其含量,得到杂质主峰纯度及含量;将该杂质加入样品进行测定,检测杂质峰纯度证明获得的杂质单体与样品中的杂质为同一物质;

[0014] 步骤六、该杂质单体经紫外吸收光谱、质谱、核磁共振谱解析确证杂质结构。

[0015] 进一步,色谱条件如下:

[0016] 十八烷基键合硅胶填料的制备或半制备柱,以体积比水:乙腈=100:0~30:70为流动相,取样品以水溶解,配制为10~200mg/ml目标杂质制备供试液,进样量100 μ l,流速1~3ml/min,检测波长254nm,柱温30 $^{\circ}$ C。

[0017] 进一步,经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻24h,拿出置于冻干机,经24小时冻干处理,得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥4小时,得杂质单体。

[0018] 本发明对杂质进行了分离制备,获得了杂质单体,进行了结构确证,以此基础制订了严格的杂质限度,为本药品的安全使用提供了理论依据,可对提高头孢唑肟钠质量标准提供有效的数据支持,为头孢唑肟钠的临床安全使用提供有效保障。

附图说明

[0019] 图1是本发明实施例提供的杂质一级质谱扫描图;

[0020] 图2是本发明实施例提供的杂质二级质谱扫描图;

[0021] 图3是本发明实施例提供的杂质初步推导结构图;

[0022] 图4是本发明实施例提供的杂质推断分子结构式;

[0023] 图5是本发明实施例提供的头孢唑肟分子结构式;

[0024] 图6是本发明实施例提供的杂质确证分子结构式;

[0025] 图7是本发明实施例提供的杂质确证结构式;

[0026] 图8是本发明实施例提供的头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确认方法流程图。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图对本发明做进一步描述:

[0028] 如图8所示,一种头孢唑肟钠中杂质的制备与结构确认方法包括:

[0029] S101、以水和乙腈为流动相,取样品以水溶解,配制目标杂质制备供试液,检测杂质出峰时间、头孢唑肟出峰时间;

[0030] S102、杂质经紫外检测器显示出峰后,在峰顶位置开始柱后收集馏分,富集样品;

[0031] S103、取收集的馏分,经旋转蒸发仪减压浓缩,取浓缩液经HPLC检测,如果馏分的出峰时间与样品中杂质的出峰时间一致,则获得的馏分为目标杂质;

[0032] S104、经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液冷冻,拿出置于冻干机,经冻干处理,得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥,得杂质单体;

[0033] S105、参照中国药典头孢唑肟钠的有关物质检查色谱条件,取获得杂质单体,配制为0.3mg/ml的浓度进样,以DAD检测器进行测定,归一化法计算其含量,得到杂质主峰纯度及含量;将该杂质加入样品进行测定,检测杂质峰纯度证明获得的杂质单体与样品中的杂质为同一物质;

[0034] S106、该杂质单体经紫外吸收光谱、质谱、核磁共振谱解析确证杂质结构。

[0035] 杂质的制备色谱条件如下:

[0036] 色谱条件:十八烷基键合硅胶填料的制备(或半制备柱),以水-乙腈(100:0~30:70)为流动相,取样品适量,以水溶解,配制为10~200mg/ml目标杂质制备供试液,进样量100 μ l,流速1~3ml/min,检测波长254nm,柱温30 $^{\circ}$ C。在该色谱条件下,4.5分钟出峰,头孢唑肟10.0分钟出峰,杂质经紫外检测器显示出峰后,在峰顶位置开始柱后收集馏分,富集样品。

[0037] 取收集的馏分,经旋转蒸发仪减压浓缩约2小时,取该浓缩液经HPLC检测,馏分的出峰时间约5.8分钟,与样品中杂质IX的出峰时间一致,即获得的馏分为目标杂质。

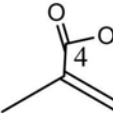
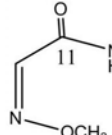
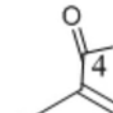
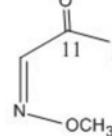
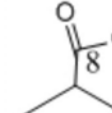
[0038] 经过反复的富集,得到的制备浓缩液先经旋转蒸发仪去除有机溶剂乙腈,将剩余溶液在-80 $^{\circ}$ C下冷冻24h,拿出置于冻干机,经冻干处理(冻干时间为24小时),得到的冻干粉末以无水硅胶减压干燥约4小时,得杂质单体。

[0039] 参照中国药典头孢唑肟钠的有关物质检查色谱条件,取获得杂质单体适量,配制为0.3mg/ml的浓度进样,以DAD检测器进行测定,归一化法计算其含量,结果表明,杂质主峰纯度999.9,即未包裹其它杂质,含量为98.9%;将该杂质加入样品进行测定,杂质峰纯度为999.9,证明获得的杂质单体与样品中的杂质为同一物质。

[0040] 1) 紫外吸收光谱解析:

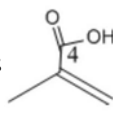
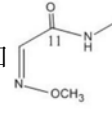
[0041] 测定方法:取获得杂质适量,加水配制为每1ml约含10 μ g的供试液,照紫外-可见分光光度法(中国药典附录IVA)在200~400nm进行扫描,紫外图谱解析如下:

[0042]

测试样品	吸收峰					
	1		2		3	
	λ_{max} (nm)	吸收谱带归属	λ_{max} (nm)	吸收谱带归属	λ_{max} (nm)	吸收谱带归属
头孢唑肟钠	292.80	 共轭体系产生	233.40	 共轭体系产生	—	—
杂质	290.00	 共轭体系产生	228.00	 共轭体系产生	204.80	 n-电子与 π -电子的p- π 共轭产生

[0043]

共轭体系产生	共轭体系产生	n-电子与 π -电子的p- π 共轭产生
--------	--------	-------------------------------

[0044] 结论:杂质分子结构中含有与头孢唑肟相同的共轭体系  和  , 还有个羧酸的结构,与推测结果一致。

[0045] 2) 质谱解析

[0046] 测试方法:色谱条件:色谱柱为inertsil ODS-SP (4.6×250mm,5 μ m);流动相为0.01mol/L的甲酸铵溶液—乙腈(95:5);流速为0.5ml/min。质谱条件:ESI正离子检测;Fragmentor Voltage:135V;扫描模式:全扫描;扫描范围:100~1000。

[0047] 取上述获得的杂质样品适量,样品溶解测定。由杂质一级质谱图(图1)可知,其分子离子峰[M+H]⁺应为402.1,即该杂质的分子量为401。以m/z 402.1作为母离子进行子离子二级质谱扫描,质谱条件:ESI(+);Fragmentor Voltage:135V;Collision Energy:15v;扫描模式:子离子扫描,得对应离子碎片图2。

[0048] 头孢唑肟钠杂质与主成分的紫外吸收吸收图谱无较大区别,即杂质与主成分双键共轭结构相似,通过二级质谱将各碎片峰进行归属,并结合文献,经推断,杂质可能为头孢唑肟钠在碱性条件下内酰胺环断裂开环的产物,初步推导其结构式如图3。

[0049] 3) 核磁共振谱(NMR)

[0050] (1) ¹H-NMR谱

[0051] 分别取头孢唑肟钠样品与杂质适量,进行¹H-NMR谱的测定,以四甲基硅烷为内标,以DMSO为溶剂,用Bruker Avance 600进行测定,具体解析如下。

[0052] 表1 ¹H—核磁共振谱数据列表

[0053]	序	化学位移(ppm)		H 原子	
	号	杂质	头孢唑肟 测定值	头孢唑肟 文献值	归属
	2	2.49(d,1H) 、 2.53(d,1H)	3.46(d,1H) 、 3.32(d,1H)	3.55(m, 2H)	2-CH ₂
	3	2.71-2.83(m, 2H)	6.00(m, 1H)	6.47(m, 1H)	3-CH
	4	-	-	13.20(brs,1 H)	4-OH
[0054]	6	3.75(d,1H)	4.95(d,1H)	5.09(d,1H)	6-CH
	7	4.51(dd,1H)	5.61(dd,1H)	5.81(dd,1H)	7-CH
	8	-	-	-	8-OH
	10	8.18(d,1H)	9.50(d,1H)	9.60(d,1H)	10-NH
	14	5.06(s,1H)	6.70(s,1H)	6.73(s,1H)	14-CH
	16	7.00(m,2H)	7.21(s,2H)	7.22(s,2H)	16-NH ₂
	17	3.78(s,3H)	3.82(s,3H)	3.83(s,3H)	17-OCH ₃

[0055] 结构解析：根据前面的推测结果，杂质为头孢唑肟四元环的开环化合物。比较杂质与头孢唑肟的¹H-NMR谱数据，10-17位氢谱数据与头孢唑肟相应的数据相符，2-7位氢谱数据比之头孢唑肟相应的数据向高场移动，为四元环开环后2-7位的氢质子化学环境发生改变，引起信号移向高场。具体解析如下：

[0056] a) 3.32ppm、3.46ppm各有一个二重峰，为2位亚甲基碳原子上的两个氢质子。

[0057] b) 2.71ppm、2.83ppm各有一个多重峰，为3位亚甲基碳原子上的两个氢质子。推测，头孢唑肟的四元环开环后，结构上的3-9位双键转移，形成稳定性更好的结构。

[0058] c) 3.75ppm有一个二重峰，为6位叔碳上的氢质子。

[0059] d) 4.51ppm有一个四重峰，为7位叔碳上的氢质子。

[0060] e) 8.18ppm有一个二重峰，结合重水交换，为10位酰胺上的活波氢质子。

[0061] f) 5.06ppm有一个单峰，为14位上的氢质子。

[0062] g) 7.00ppm有一个多峰，结合重水交换氢谱图，为16位氨基上的活波氢质子。

[0063] h) 3.78ppm有一个单峰，为17位甲基上的氢质子。

[0064] 结论：杂质为头孢唑肟的四元环开环产物，其氢谱信息与图6的分子结构信息相符。

[0065] (2) ¹³C-NMR谱 (¹³C、DEPT135°)

[0066] 分别取头孢唑肟钠与目标杂质适量，进行¹³C-NMR以及DEPT135°谱的测定，以四甲基硅烷为内标，以DMSO为溶剂，用BrukerAvance 600进行测定，具体解析如下。

[0067] 表2 ¹³C-核磁共振数据列表

序 号	化学位移(ppm)			C 原 子归属
	杂质	头孢唑 肟测定值	头 孢 唑 肟文献值	
2	23.6	24.5	24.6	2-CH ₂
3	26.6	109.6	121.2	3-CH
4	173.2	169.2	169.4	4-C
6	58.5	57.8	57.8	6-CH
7	63.9	59.0	59.8	7-CH
8	171.7	164.0	164.2	8-C
9	162.3	135.8	128.9	9-C
11	167.8	163.3	163.6	11-C
12	150.1	149.8	149.8	12-C
13	143.4	143.3	143.3	13-C
14	112.0	112.5	110.0	14-C H
15	168.9	164.9	164.0	15-C
17	62.4	62.5	62.8	17-C H ₃

[0069] 结构解析:数据显示,杂质3位碳原子化学位移26.6ppm,处于高场位置,而头孢唑肟3位碳原子化学位移123.6ppm,处于低场,这是由于杂质3位亚甲基碳与头孢唑肟的3位不饱和碳比,化学位移往高场移动。其他各杂质碳谱数据与头孢唑肟碳谱数据基本一致。具体解析如下:

[0070] a) 23.6ppm处为2位碳原子,结合DEPT谱,该碳原子为亚甲基碳。

[0071] b) 26.6ppm处为3位碳原子,结合DEPT谱,该碳原子为亚甲基碳。

[0072] c) 173.2ppm处为4位羧基碳原子。

[0073] d) 58.5ppm为6位碳原子。

[0074] e) 63.9ppm为7位碳原子。

[0075] f) 171.7ppm为8位羧基碳原子。

[0076] g) 162.3ppm为9位碳原子。

[0077] h) 167.8ppm为11位羧基碳原子。

[0078] i) 150.1ppm为12位碳原子。

[0079] j) 143.4ppm为噻唑环上的13位 碳原子。

[0080] k) 112.0ppm为14位碳原子。

[0081] l) 168.9ppm为15位碳原子。

[0082] m) 62.4ppm为17位碳原子。

[0083] 结论:杂质的碳谱信息与确证的杂质结构信息一致,碳谱确证结果与氢谱数据解析结果一致。

[0084] 4) 综合结论

[0085] 通过对以上数据的综合解析,头孢唑肟β-内酰胺环水解开环断裂时,5位的N形成

孤对电子,具有强供电能力,更容易与4位羰基形成较稳定的共轭体系,结合以上各谱图的信息,再加上之前的质谱解析,可确证目标杂质的结构式如图7。

[0086] 本发明对杂质进行了分离制备,获得了杂质单体,进行了结构确证,以此基础制订了严格的杂质限度,为本药品的安全使用提供了理论依据,可对提高头孢唑肟钠质量标准提供有效的数据支持,为头孢唑肟钠的临床安全使用提供有效保障。

[0087] 利用本发明所述的技术方案,或本领域的技术人员在本发明技术方案的启发下,设计出类似的技术方案,而达到上述技术效果的,均是落入本发明的保护范围。

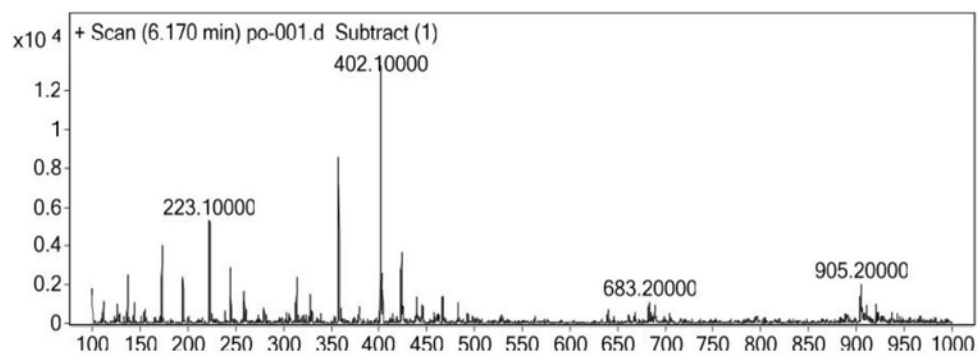
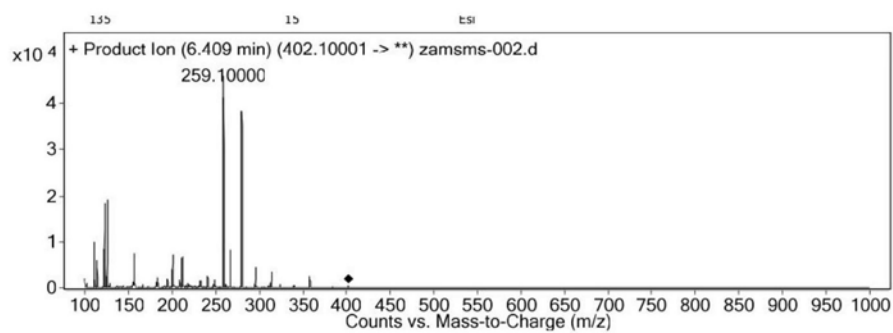


图1



<i>m/z</i>	Abund.
111.2	10066
114.2	6034
123.1	18429
126.1	19190
157.1	7354
201.1	7257
212.1	6819
259.1	45928
267.2	8179
280.2	38232

图2

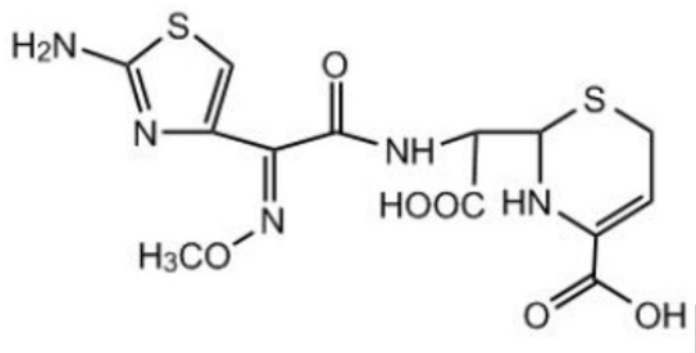


图3

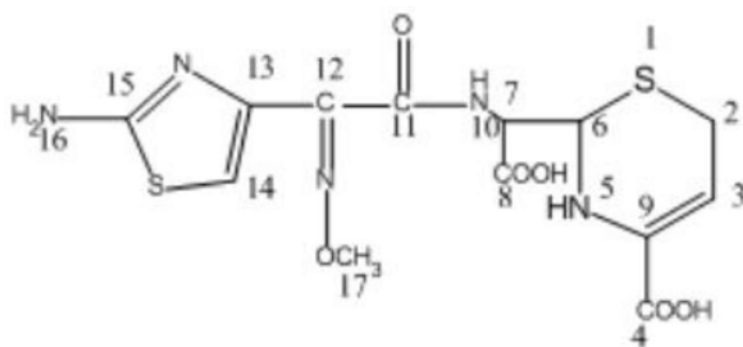


图4

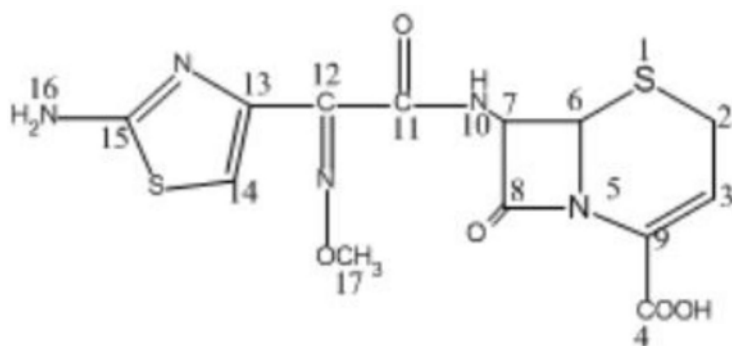


图5

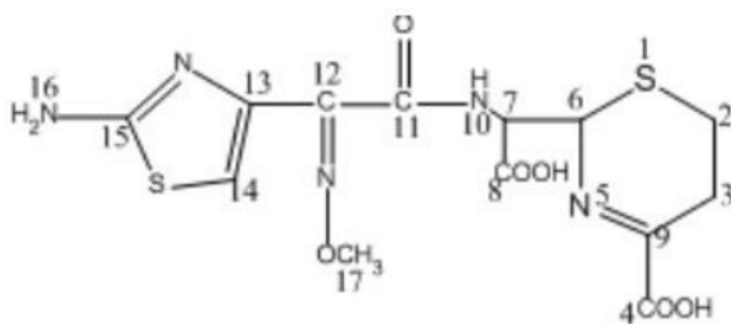


图6

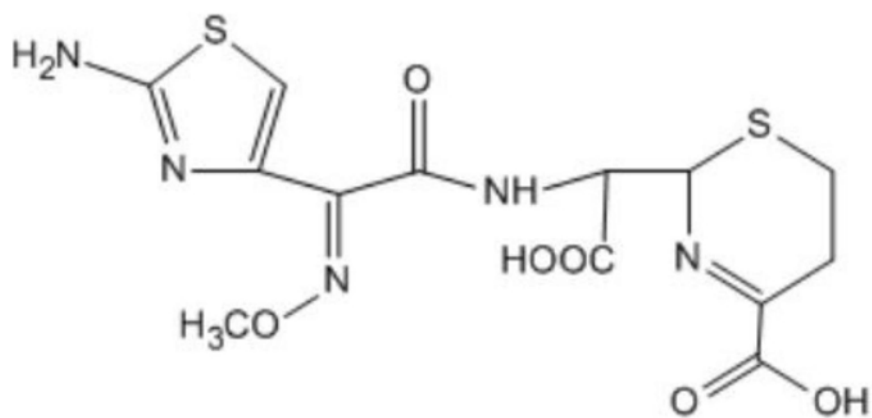


图7

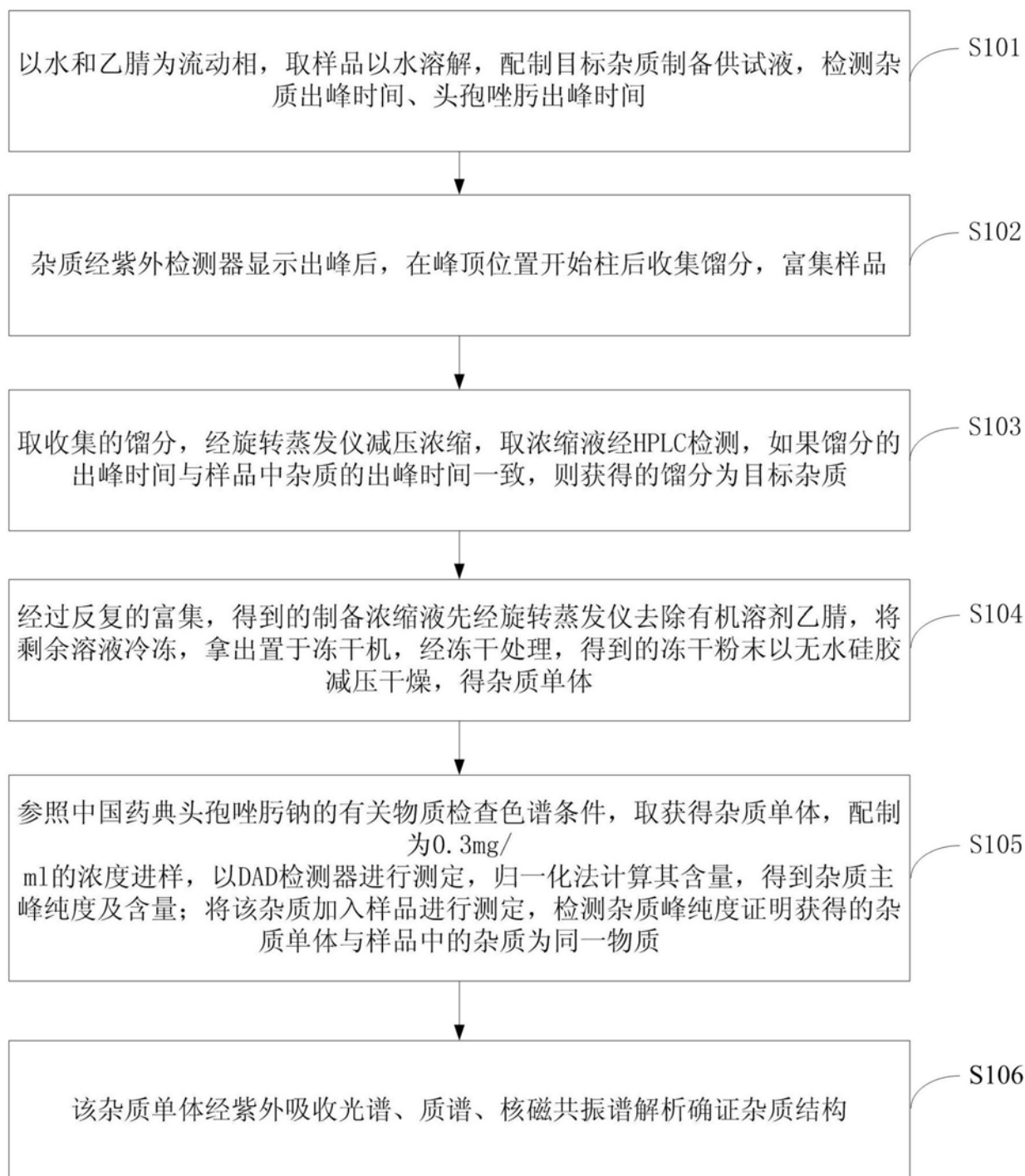


图8