

头孢菌素常用关键起始原料的质量控制探讨

邓贵福(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆市化学药品质量控制与评价协同创新中心, 重庆 401121)

摘要: 头孢菌素是我国使用最为广泛的一类抗菌药物, 其质量情况一直受到药品监管部门及患者的密切关注。头孢菌素一般采用微生物发酵物或其衍生物作为关键起始原料, 经进一步的化学修饰或酶催化制得, 头孢菌素最终的质量情况与关键起始原料的质量好坏密切相关。本文旨在讨论头孢菌素常用关键起始原料的质量控制策略, 供相关研发及生产企业参考。

关键词: 头孢菌素; 关键起始原料; 质量控制

中图分类号: R943 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2019)02-0251-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.026

引用本文: 邓贵福. 头孢菌素常用关键起始原料的质量控制探讨[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 251-255.

Discussion of Key Starting Materials Quality Control in Cephalosporin Antibiotics

DENG Guifu(*Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Collaborative Innovation Center for Chemical Medicine Quality Control and Evaluation, Chongqing 401121, China*)

ABSTRACT: Cephalosporins are the most widely used antibiotics in China. Their quality has been closely watched by the drug regulatory authorities and patients. Cephalosporins are usually prepared by chemical modification or enzyme catalysis with microbial ferments or derivatives thereof as a key starting material. The final quality of the cephalosporins is closely related to the quality of the key starting materials. This paper aims to discuss the quality control strategies for key starting materials commonly used for cephalosporins, which can be referred by relevant R&D and production companies.

KEYWORDS: cephalosporins; key starting material; quality control

国际人用药品注册技术协调会的“原料药的优良制造规范(GMP)指南”(ICH Q7)对“起始物料”的定义中明确其是用于生产某种原料药并成为该原料药结构重要组成部分的原材料、中间体, 或者其他原料药。头孢菌素作为典型的 β -内酰胺抗菌药物, 其骨架结构来源于常用的关键起始原料, 如 7-氨基头孢烷酸(7-aminocephalosporic acid, 7-ACA), 7-氨基-3-乙烯基头孢烷酸(7-amino-3-vinyl cephalosporic acid, 7-AVCA), 7-氨基-3-氯-3-头孢烯-4-羧酸(7-amino-3-chloro-3-cephalene-4-carboxylic acid, 7-ACCA)等, 再经 β -内酰胺环 C3 或 C7 位的进一步修饰而得到目标头孢菌素。关键起始原料中所含杂质以及这些杂质在后续反应中的转化产物可能带入到原料药中, 同时起始物料的某些质量属性也可能对后续反应产生影响(例如, 起始物料中的含水量对无水反应的影响)等^[1]。鉴于关键起始原料的重要性, 各国监管机构在原料药的审评中均给予了高度关注。欧洲 EDQM 发

布的统计信息显示, CEP 证书新申请首轮审评发现的十大缺陷中, 起始物料的选择和质量控制问题位列前 2 位^[2]。在美国 FDA 仿制药(ANDA)审评中, 起始原料的质量控制也被视为一个复杂的问题^[3]。在国内, 2012 年, 国家药品审评中心发布“化药共性问题解答——药学”^[4], 对起始原料的选择原则及质量控制要求进行了补充说明: 原料药生产厂应对起始原料的杂质(包括残留溶剂与重金属等毒性杂质)有全面而准确的了解, 在此基础上采用适当的分析方法进行控制, 并根据各杂质对后续反应及终产品质量的影响制订合理的限度要求。

在头孢菌素的研发或生产过程中, 不同企业对 7-ACA, 7-AVCA, 7-ACCA 等关键起始原料的质量控制策略有较大的差异, 有的仅对性状、鉴别及色谱纯度进行控制, 未对影响终产品质量的溶液颜色、比旋度、有关物质、残留溶剂、重金属及毒性杂质等项目进行控制^[5]。不利于对后续反

作者简介: 邓贵福, 男, 硕士, 工程师 Tel: (023)86072727

E-mail: dgfgood@163.com

应物及终产品的质量研究和控制。

随着我国加入 ICH, 药品审评审批的各项技术要求和标准全面与国际同步, 给药品研发和生产提出了更高的要求。本文拟对头孢菌素类抗菌药物常用关键起始原料的质量控制进行分析和探讨, 以供相关研发及生产企业参考。

1 7-ACA

7-ACA 是头孢菌素的主要起始原料, 可用于合成头孢曲松钠、头孢地嗪钠、头孢唑兰、头孢特仑酯、头孢克洛、头孢呋辛钠、头孢甲肟等。7-ACA 主要由头孢菌发酵得到的头孢菌素 C 再经化学法^[6]或酶法^[7-8]裂解而得到, 同时其还可作为制备 7-氨基-去乙酰氧基头孢烷酸(7-amino-deacetyloxycephalosporic acid, 7-ADCA)^[9]和(6R,7R)-7-氨基-3-[(1Z)-2-(4-甲基-5-噻唑基)乙烯基]-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸(7-ATCA)^[10]等的原料, 进一步用于头孢氨苄、头孢拉定、头孢克洛、头孢他美酯、头孢孟多酯等的合成。7-ACA 的制备及进一步修饰方法见图 1。

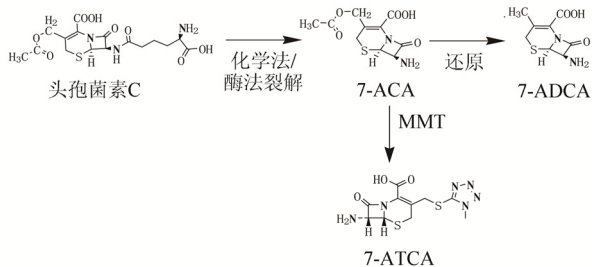


图 1 7-ACA 的来源及衍生化中间体

Fig. 1 The source of 7-ACA and derivative intermediates

由于 7-ACA 主要由发酵所得的头孢菌素 C(Cephalosporin C, CC, 头 C)制得, 发酵过程会产生一些结构和溶解度相似的杂质, 如可能产生脱乙酰氧基-头孢菌素(DAO-CC)、脱乙酰基-头孢菌素(DA-CC)和头孢菌素内酯(CC-LT)等^[11], 同时以上杂质经化学法或酶法裂解成 7-ACA 时, 又会引入新的杂质到 7-ACA 中, 如脱乙酰氧基 7-ACA(DAO-ACA)、脱乙酰 7-ACA(DA-ACA), C2,C3-内酯-7-ACA(LT-ACA)等。7-ACA 中的这些杂质如果未能很好地去除或控制, 就可能参与后续的化学反应, 成为终产品中的有关物质, 而降低产品的质量。所以对 7-ACA 等关键起始原料的杂质进行合理的控制将会有利于提高终产品的质量, 比如: 盐酸头孢甲肟常规的合成工艺为 7-ACA 的 C3 位与甲基巯基四氮唑(MMT)缩合反应得到

7-ATCA, 再用 AE-活性酯[2-(2-氨基-4-噻唑基)-2-(甲氧亚氨基)乙酸硫代苯并噻唑酯]与 7-ATCA 的 C7 位发生酰化反应得到头孢甲肟酸, 最后成盐酸盐而得到盐酸头孢甲肟成品。7-ACA 中存在的 DAO-ACA、DA-ACA, LT-ACA 等杂质可能在 AE-活性酯酰化步骤参与反应生成上述杂质 C7 位酰化反应相应的杂质。如果 7-ACA 中对 DAO-ACA、DA-ACA, LT-ACA 等杂质进行了合理的控制(表 1, 经多批生产验证数据支持), 在整个反应链条中 DAO-ACA、DA-ACA, LT-ACA 等杂质可以在第 1 步中间体 7-ATCA 的结晶和洗涤过程中被部分去除, 剩余部分及生成的相应酰化杂质在头孢甲肟酸和盐酸头孢甲肟的结晶和洗涤过程中被去除, 7-ACA 中的杂质及产生的相应有关物质在终产品中的残留量很小(<0.1%鉴定限)。此外, 以 7-ACA 为母核的头孢菌素类抗菌药物在制备或放置过程中可能会形成聚合物, 并引发过敏反应。终产品中的聚合物可能来源于 7-ACA 的聚合物, 如 7-ACA 的二聚体等, 故需要建立液相^[12]或灵敏度更高的液质方法进行检测。

表 1 7-ACA 的质量控制项目及限度

Tab. 1 Quality control items and limit of 7-ACA

控制项目	质量标准
性状	白色或类白色结晶性粉末
鉴别(HPLC 法)	符合规定
比旋度	≥+88°
吸光度(pH 7.0 磷酸盐缓冲液; 10 mg·mL ⁻¹ ; 425 nm)	≤0.1
酸度(1%水混悬液)	3.0~5.0
水分(卡氏法)	≤1.0%
色级(4%浓度, 用 10%碳酸氢钠溶解)	≤4 号(黄色或黄绿色)
残留溶剂	符合中国药典四部要求
有关物质	
去乙酰 7-ACA	≤1.0%
去乙酰氧 7-ACA	≤1.0%
头孢菌素 C	≤0.5%
去乙酰基-7-ACA-内酯	≤0.2%
其他单个杂质	≤0.3%
总杂质	≤2.0%
炽灼残渣	≤0.1%
重金属	20 ppm
含量(HPLC 法)	≥98.0%

7-ACA 中有 2 个手性碳, 其立体构型来源于经微生物发酵得来的头孢菌素 C, 由微生物体内通过菌体的初级或次级代谢等生命过程完成, 这种

生命过程是生物细胞按照其固有的遗传信息，在所处的营养和培养条件下，进行的复杂而细微的各种动态生化反应集合，所得产物的结构相对固定，故无需提供 7-ACA 立体构型的结构确证资料，可以采用对比旋度的控制来判断其构型。

如采用化学裂解法制备的 7-ACA，可能会用到一种或多种有机溶剂，其可能会残留在 7-ACA 中，并最终残留在原料中。故需要对所用有机溶剂的残留进行控制。有文献显示^[5,13]，7-ACA 的颜色会对终产品的色泽产生明显影响，甚至会导致终产品不合格，所以对 7-ACA 的颜色进行控制也非常有必要。此外，水分、pH 值也会不同程度地影响 7-ACA 的质量，也有必要进行控制。由于发酵工艺及后续裂解方法的不同，会导致 7-ACA 的含量有较大差异，需提高其含量限度，以保证后续产品的质量。总之，为保证终产品的质量，需对 7-ACA 制定较为科学全面的内控质量标准，具体控制项目及限度可以参见表 1。

2 7-AVCA

7-AVCA 是合成第 3 代头孢菌素头孢克肟^[14]及头孢地尼的关键起始原料，主要由(6R,7R)-7-苯乙酰氨基-8-氧代-5-硫杂-双环[4.2.0]辛-2-烯-3-氯甲基-2-羧酸对甲氧基酯(GCLE)制备而来^[15-16]，常规合成路线为：在 β-内酰胺环 C-3 位引入乙烯基，再脱去 4-对甲氧基苄基和 7-苯乙酰氨基，而得到 7-AVCA，见图 2。7-AVCA 常见杂质为 7-ADCA、未反应完全的起始原料(GCLE)及中间体[7-苯乙酰氨基-3-乙烯基-4-头孢烯酸对甲氧基共酯(GVNE)和 7-苯乙酰氨基-3-乙烯基-4-头孢烯酸(DGVNE)]，此外还可能多种副产物，各有关物质的结构和控制限度可以参见表 2。7-AVCA 的比旋度范围(用 5%碳酸氢钠溶液配制为每 1 mL 中含 7-AVCA 2 mg 的溶液)为 $-78^{\circ}\sim-88^{\circ}$ 。根据制备过程中所用有机溶剂的种类，应保证其残留的量满足中国药典四部残留溶剂项下的要求。也有工艺采用青霉素酰化酶用于脱除 7-氨基保护基^[17]，故需要对残留的蛋白进行针对性的研究和控制。在 7-AVCA 的制备工艺中，引入乙烯基的步骤中常会使用甲醛溶液，这是一种明确的致癌物质，应该结合其毒理学数据进行严格的控制。以头孢地尼为例，其甲醛的控制限度依据如下：

甲醛限度要求为 $(1.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 50 \text{ kg})$

$/(0.3 \text{ g} \times 50 \text{ 000}) = 0.00045\%$ 。

其中：1.35 mg 为毒理学关注阈值(来源于致癌数据库 CPDB Chemical)；50 kg 为正常人体质量；0.3 g 为最大日剂量；50 000 为半数致死率(患癌风险十万分之一)。

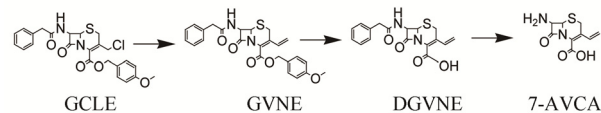


图 2 7-AVCA 的制备路线

Fig. 2 The synthesis route of 7-AVCA

3 7-ACCA

7-ACCA 是合成第 2 代头孢菌素抗菌药物头孢克洛^[18-19]的关键起始物料，其主要由青霉素-G 钾盐经多步反应制备而来，见图 3。7-ACCA 中常见的杂质为未反应完全的青霉素及各步中间体、7-ACCA 的 Δ 异构体^[20]及其他副产物等。此外，由于合成 7-ACCA 的工艺不同，杂质情况也不一样，需要结合 7-ACCA 的合成工艺对其可能含有的杂质谱进行详细的分析，并建立相应的质控方法。7-ACCA 具体控制项目及限度可以参见表 3。

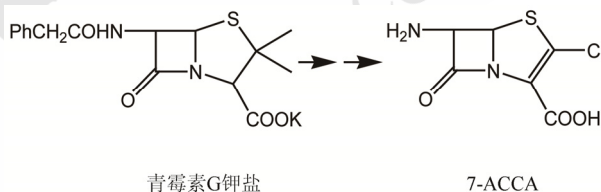


图 3 7-ACCA 的制备路线

Fig. 3 The synthesis route of 7-ACCA

4 其他

除上述几种头孢菌素的关键起始原料外，还有部分企业采用 7-ACA、GCLE 等的修饰物作为起始原料，用于多种头孢菌素的合成^[21]。如以 7-ACA 为原料制备的 7-ADCA(可用于合成头孢氨苄、头孢羟氨苄^[22]、头孢拉定等)，除关注 7-ACA 中的常见杂质外，还需特别关注 7-ADCA 中 Δ 异构体等杂质；以 7-ACA 为原料制备的 7-ATCA(可用于合成头孢西酮、头孢哌酮、头孢孟多酯、头孢米诺、头孢美唑及头孢匹胺^[23]等)，除关注 7-ACA 中的常见杂质外，还需特别关注未反应完全的甲基巯基四氮唑(MMT)等；此外，还应关注制备这些关键起始原料时用到的或产生的毒性杂质，需进行针对性地研究，并进行严格控制。

表 2 7-AVCA 的杂质结构及限度

Tab. 2 The structure and limit of impurity for 7-AVCA

杂质名称	结构式	杂质来源描述	控制限度
7-ADCA		原料产生的副产物。	≤0.5%
GCLE	见图 2	未反应完全的原料	0.1%
GVNE	见图 2	未反应完全的中间体	0.1%
DGVNE	见图 2	未反应完全的中间体	0.1%
(6R, 7R)-7-氨基-3-(氯甲基)-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸		未参与 wittig 反应的 GCLE 与五氯化磷反应带来的副产物。	≤0.2%
(6R,7R)-8-氧代-7-(2-苯乙酰氨基)-3-乙烯基-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸对甲氧基苄酯		参与 wittig 反应的 GCLE 未与五氯化磷反应完全的中间态。	≤0.2%
(6R,7R)-7-氨基-8-氧代-3-乙烯基-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸-5-氧化物		7-AVCA 氧化产生的杂质。	≤0.2%
(R)-2-氨基-2-((2S,5S)-5-甲基-7-氧代-2,4,5,7-四氢-1H-咪唑并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)乙酸		7-AVCA 发生 β 内酰胺开环反应, 发生 3 位乙烯基 β 加成后与 2 位羧基发生酯化反应。	≤0.2%
(6R,7R)-7-氨基-3-(2-羟乙基)-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸		7-AVCA 发生 3 位乙烯基 α 加成。	≤0.2%
(R)-2-氨基-2-((2S,5R)-5-甲基-7-氧代-2,4,5,7-四氢-1H-咪唑并[3,4-d][1,3]噻嗪-2-基)乙酸		7-AVCA 发生 β 内酰胺开环反应, 发生 3 位乙烯基 β 加成后与 2 位羧基发生酯化反应。	≤0.2%
(5aR,6R)-6-氨基-3-甲基-5a,6-二氢氮杂环丁烷并[2,1-b]咪唑并[3,4-d][1,3]噻嗪-1,7(3H,4H)-二酮 5-氧化物		7-AVCA 发生 3 位乙烯基 β 加成后与 2 位羧基发生酯化反应。	≤0.2%
(2R)-2-((R)-氨基(羧基)甲基)-5-乙烯基-3,6-二氢-2H-1,3-噻嗪-4-羧酸-1-氧化物		7-AVCA 发生 β 内酰胺开环反应。	≤0.2%
未知单个杂质	/	/	0.1%
总杂质	/	/	3.0%

表 3 7-ACCA 的质量控制项目及限度

Tab. 3 Quality control items and limit of 7-ACCA

控制项目	质量标准	控制项目	质量标准
性状	类白色至淡黄色结晶性粉末	残留溶剂	符合中国药典四部要求
鉴别(HPLC 法)	符合规定	有关物质	
比旋度	+138°~+148°	单个杂质	≤0.5%
吸光度(pH 7.0 磷酸盐缓冲液; 10 mg·mL ⁻¹ ; 425 nm)	≤0.1	总杂质	≤2.0%
pH 值	3.6~4.2	炽灼残渣	≤0.1%
水分(卡氏法)	≤1.0%	重金属	20 ppm
炽灼残渣	≤0.3%	含量(HPLC 法)	≥98.0%

5 结语

目前各研究单位对 7-ACA, 7-AVCA, 7-ACCA 等用于制备头孢菌素的关键起始原料的质量控制水平参差不齐, 导致终产品的质量水平各有高低, 建议相关研究单位在开发头孢菌素产品时, 应持续提高关键起始物料和终产品的质控水平, 以满足法规要求, 同时为患者提供高质量的药品。

REFERENCES

- [1] WANG H L, CHEN Z. Comparison of domestic and foreign related requirements of starting materials for synthetic drug substances [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2014, 23(9): 998-1003.
- [2] EDQM. Top ten deficiencies found after first assessment of new applications in 2011 [EB/OL]. (2012-06) [2013-12-05]. https://www.edqm.eu/site/paphcep_12_15pdf-en-30964-2.html.
- [3] BARBARAS. FDA perspectives: designation of regulatory starting materials in the manufacturing of drug substances: impact on ANDA review time [J]. *Pharm Technol*, 2012, 36(1): 63-66.
- [4] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 化药共性问题解答-药学[EB/OL]. (2012-07-25) [2013-12-06]. <http://www.cde.org.cn/commonQu.do?method=showFAQ&id=2>.
- [5] JIANG Y, WANG H, ZHANG Z F. Starting materials research and control in cephalosporin antibiotics [J]. *Chin J Antibio*(中国抗菌药物杂志), 2010, 35(9): 647-653.
- [6] WAN D, WANG J K. The preparation and crystallization processes of 7-ACA [J]. *Chem Indust Eng*(化学工业与工程), 2003, 20(6): 507-511.
- [7] 芮菊, 张体磊. 酶法合成 7-ACA 及头孢菌素类抗生药的研究进展[C]. 2008 年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周, 2008: 1-6.
- [8] 马晨露. 一步酶法制备 7-氨基头孢烷酸关键技术的研究[D]. 南阳: 南阳师范学院, 2016.
- [9] WANG W M, DUAN M J, SU S H. Studies on synthesis of intermediates of cephalosporin derivatives [J]. *Chin J Antibio*(中国抗菌药物杂志), 1994, 19(2): 122-123.
- [10] 岳学荣, 郭冬梅. 医药中间体 7-ATCA 的合成工艺研究[J]. *化工管理*, 2017, 9(26): 63.
- [11] 胡昌勤. 高风险抗菌药物品种的质量控制[C]. 2008 中国药学会学术年会暨第八届中国药师周, 2008: 108-111.
- [12] HU C Q. Developments on analysis of polymers of β -lactam antibiotics [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2008, 17(24): 2098-2102.
- [13] ZHANG D S, XUE J, WANG C, et al. Critical quality attributes of cephalosporins for injection [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2016, 25(22): 2606-2613.
- [14] CHEN L, REN H Y, KI X F, et al. Synthesis of cefixime [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2011, 42(7): 487-488.
- [15] BAI G Y, XU K, PENG H W, et al. Synthesis of 7-AVCA [J]. *J Hebei Univ (Nat Sci Edit)*(河北大学学报 自然科学版), 2010, 30(4): 375-380.
- [16] 彭洪伟. 7-AVCA 及其类似物的合成研究[D]. 保定: 河北大学, 2008.
- [17] LU H J, ZHENG M L, SHI S L, et al. An Improved synthesis of 7-amino-3-vinyl cephalosporanic acid [J]. *Chem World*(化学世界), 2016(1): 40-42.
- [18] DENG K S, GU L Z, LI X L. Study on preparation of cefaclor by enzymatic method [J]. *Chin J Antibio*(中国抗菌药物杂志), 2015, 40(2): 96-99.
- [19] HU C M, XUE P, CAO X R, et al. Synthesis of cefaclor over Penicillin G acylase immobilized on magnetic polymer microspheres [J]. *Mod Chem Indust*(现代化工), 2018, 38(4): 95-99.
- [20] JANG Y, ZHANG Z F, WANG H. Isomeric impurity research and quality control of β -lactam antibiotics [J]. *Chin J Antibio*(中国抗菌药物杂志), 2010, 35(8): 561-566.
- [21] DAI W G. Production status, development tendency, and suggestion of 7-ACA, 7-ADCA, GCLE in our country [J]. *Shanghai Med Pharm J*(上海医药), 2003, 24(9): 415-416.
- [22] WU Y H, LIU D J, WANG Y H, et al. Study on the process of enzymatic synthesis of cefadroxil [J]. *Chin J Antibio*(中国抗菌药物杂志), 2016, 41(4): 255-260.
- [23] ZHANG Y F. Study on the compatibility of cefpiramide sodium and metronidazole injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(10): 1307-1311.

收稿日期: 2018-03-27

(本文责编: 李艳芳)