

LC-MS/MS法检查注射用氟氯西林钠中的有关物质

赵丽娜^{1,2*}, 钟文英^{1#}, 杨汉煜^{2#}, 赵曦², 汪玉梅²(1.中国药科大学, 南京 211100; 2.石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3134-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.22

摘要 目的:检查注射用氟氯西林钠中的有关物质。方法:采用液相色谱-质谱/质谱技术。液相条件:色谱柱为Hypersil ODS, 柱温为20℃, 流动相为乙腈-0.5 mmol/L 醋酸铵溶液(pH=5.0)(30:70), 流速为1.0 ml/min; 质谱条件:ESI离子源; 正离子模式, Q1全扫描, Q2扫描, 多离子反应监测(MRM)模式, 扫描范围100~1 000 amu。结果:从注射用氟氯西林钠中鉴别出5种有关物质, 并初步确定成分及主要离子碎片结构。结论:本法能够快捷、方便地检查出注射用氟氯西林钠中的有关物质。

关键词 注射用氟氯西林钠; 液相色谱-质谱/质谱法; 有关物质; 检查; 结构确证

Determination of Related Substances in Flucloxacillin Sodium for Injection by LC-MS/MS

ZHAO Li-na^{1,2}, ZHONG Wen-ying¹, YANG Han-yu², ZHAO Xi², WANG Yu-mei²[1.China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China; 2.CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the related substances in Flucloxacillin sodium for injection. METHODS: LC-MS/MS was used. The determination was performed on Hypersil ODS column with mobile phase of acetonitrile-0.5 mmol/L ammonium acetate (pH=5.0)(30:70) at the flow rate of 1.0 ml/min, and the column temperature was 20℃. MS parameter: ESI ion source, positive monitoring, Q1 full scan mode, Q2 scan mode, MRM, scanning scope of 100-1 000 amu. RESULTS: 5 related substances were identified in Flucloxacillin sodium for injection, and the components and main fragment structure were determined primarily. CONCLUSIONS: The method is rapid and convenient for the determination of related substances in Flucloxacillin sodium for injection.

KEY WORDS Flucloxacillin sodium for injection; LC-MS/MS; Related substances; Determination; Structure confirmation

间的团聚程度难以预测和控制,重现性较差。本试验通过加入分散剂同时考察相关影响因素,筛选出应用马尔文激光粒度分布仪测定ABZ脂质体的最佳分散体系:按照10%聚山梨酯80-ABZ脂质体体积比为4:1,0.9%氯化钠溶液稀释20倍。该方法经验证具有操作简便、快速、准确性、稳定性、重现性好等特点,在有效解决团聚现象的同时未破坏脂质体双分子层的结构,可用于ABZ脂质体平均粒径的测量。

本研究根据ABZ脂质体的特点选择10%的聚山梨酯80作为分散剂,获得了良好的分散效果,其测定结果也与透射电镜测量统计结果相吻合。但是该方法是否适用于测定包封其他药物的脂质体,仍有待进一步的研究与考察。

参考文献

- [1] Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, et al. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010(5):101.
- [2] Koradia DK, Parikh HR. Dissolution enhancement of albendazole through nanocrystal formulation[J]. *J Pharm*

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:shangxianyueyue@163.com

通信作者a:教授,博士。研究方向:药物分析、药用纳米材料。电话:025-86185217。E-mail:wyzhong@cpu.edu.cn

通信作者b:高级工程师,硕士。研究方向:药动学。电话:0311-67808866。E-mail:sjzzhongqi@163.com

Bioallied Sci, 2012, 4(1):62.

- [3] 李海涛,单骄宇,邵英梅,等.阿苯达唑脂质体和阿苯达唑片治疗囊型包虫病的临床疗效及安全性[J]. *中国肝脏病杂志*, 2011, 19(7):532.
- [4] 邓英杰.脂质体技术[M].北京:人民卫生出版社, 2007:39-40.
- [5] 王振新,钱彦虎.激光粒度仪测定PTA粒径分布[J]. *聚酯工业*, 2004, 17(3):50.
- [6] 许波,田颂九,吴如金,等.两性霉素B脂质体粒度测定方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(3):307.
- [7] 张晶晶,陈军,方芸.吐温80对9-硝基喜树碱脂质体药物动力学性质的影响[J]. *药学与临床研究*, 2011, 19(1):32.
- [8] 程益军,宋鹏.激光粒度仪与透射电镜测试结果的对比[J]. *中国粉体技术*, 2010, 16(4):23.
- [9] 万牡华,赵美霞,欧阳健明.激光散射法对尿液中纳米微晶粒径及其分布的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(1):217.
- [10] 程海斌,刘桂珍,李立春,等.激光散射法测定粒径的样品处理方法[J]. *武汉理工大学学报*, 2003, 25(3):7.
- [11] 胥传来,姚惠源.吐温-80与脂质体膜相互作用机理的研究[J]. *西安石油大学学报:自然科学版*, 2005, 20(6):45.
- [12] 王继波,岳旺,孙衍增,等.藻酸双酯钠脂质体的制备及粒度分布的测定[J]. *中国海洋药物杂志*, 2007, 26(6):28.

(收稿日期:2013-04-26 修回日期:2013-05-21)

氟氯西林钠(Flucloxacillin sodium),属第4代异噁唑类青霉素,具有1个受保护的中央 β -内酰胺环,从而具有抗青霉素酶的作用,其通过抑制细菌细胞壁黏肽的生物合成而发挥抗菌作用。氟氯西林钠抗菌谱较青霉素广,主要用于治疗敏感的革兰阳性菌引起的皮肤及软组织感染、呼吸道感染及其他感染(骨髓炎、尿道感染、肠炎、脑膜炎、心内膜炎、败血病)^[1]。《欧洲药典》中关于注射用氟氯西林钠检查的有关物质有A、B、C、D、E 5种。有报道使用高效液相色谱(HPLC)法^[2]、HPLC离子对梯度洗脱法^[3]、HPLC等度离子交换法^[4]等对其有关物质进行分析。鉴于液相色谱(LC)具有高效的分离性能以及质谱(MS)具有高灵敏度和高选择性的特点^[5],笔者使用LC-MS/MS方法对注射用氟氯西林钠的有关物质进行了分析。据调查目前尚无文献报道采用此法对注射用氟氯西林钠的有关物质及主要离子碎片结构进行分析。氟氯西林钠及有关物质化学结构式见图1。

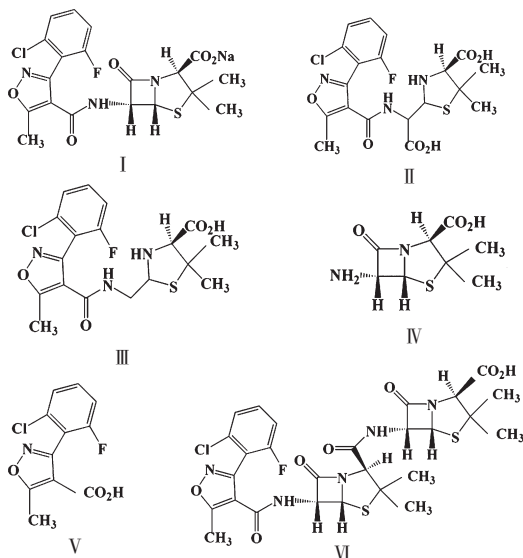


图1 氟氯西林钠及有关物质化学结构式

I. 氟氯西林钠; II. 杂质A; III. 杂质B; IV. 杂质C; V. 杂质D; VI. 杂质E

Fig 1 Chemical structures of flucloxacillin sodium and related substances

I. flucloxacillin sodium; II. impurity A; III. impurity B; IV. impurity C; V. impurity D; VI. impurity E

1 材料

1.1 仪器

API 4000 型液相色谱-三重四级杆质谱联用仪,配有ESI源、Analyst 1.4.2 数据处理系统(美国AB公司);液相色谱输液泵,Shimadzu 20A 系统;二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱(日本Shimadzu公司)。

1.2 药品与试剂

注射用氟氯西林钠[石药集团中诺药业(石家庄)有限公司提供,批号:201201101011,规格:每瓶0.5 g];杂质A对照品(批号:17428,纯度:100%)、B对照品(批号:19555,纯度:100%)由英国LGC公司提供;杂质C对照品(批号:003CL9,纯度:100%)、D对照品(批号:007GJ7,纯度:100%)、E对照品(批号:006J26,纯度:100%)均由European Medicines Agency提供;乙腈、醋酸铵为色谱纯,醋酸为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱、质谱条件

色谱条件:色谱柱为Hypersil ODS(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相为乙腈-0.5 mmol/L 醋酸铵溶液(醋酸调至pH 5.0)(30:70, V/V),流速为1.0 ml/min;柱温为20 $^{\circ}$ C;进样量为20 μ l。

质谱条件:离子源ESI,正离子模式;喷雾电压为5 000 V;雾化温度为500 $^{\circ}$ C;雾化气(N_2)流速为60 L/min;卷帘气(N_2)流速为25 L/min;辅助气(N_2)流速为60 L/min;解簇电压为50 V;扫描范围为100~1 000 amu。多离子反应监测(MRM):喷雾电压IS为5 000 V;雾化温度为500 $^{\circ}$ C;雾化气(N_2)流速为50 L/min;卷帘气(N_2)流速为30 L/min;辅助气(N_2)流速为60 L/min;驻留时间为200 ms。

2.2 检测方法

精密量取注射用氟氯西林钠10.4 mg至10 ml量瓶中,用流动相稀释定容,得到质量浓度为1.0 mg/ml的氟氯西林钠溶液。取此溶液进行Q1全扫描,获得总离子色谱图,对总离子色谱图进行质量提取,可以得到杂质峰的主要离子碎片信息。对杂质A、B、C、D、E分别做Q2扫描,获得各自离子反应信息。对分别含100 ng/ml杂质A、B、C、D、E对照品的混合溶液以及氟氯西林钠溶液进行MRM扫描,得到更多有关物质的信息。根据得到的色谱图与质谱图进一步分析。

2.3 色谱图与质谱图

总离子色谱图见图2。

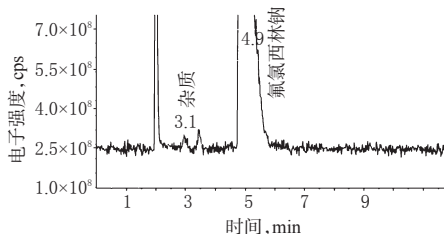


图2 Q1全扫描总离子流色谱图

Fig 2 Full scan mode chromatogram of Q1

由图2可知,主成分峰的保留时间为4.9 min,杂质峰出峰时间为3.1 min。然后对杂质峰进行Q1全扫描,获得主要的离子碎片为质荷比(m/z)471.7。对杂质A、B、C、D、E对照品进行Q2扫描,得到质谱图见图3;对空白(流动相)、杂质对照品溶液和氟氯西林钠溶液进行MRM正离子扫描,用于监测的离子反应及各优化参数见表1,得到MRM的扫描色谱图见图4,各杂质的主要裂解碎片见图5。

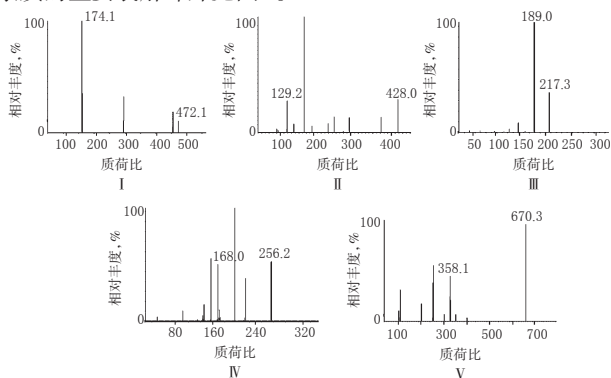


图3 杂质的二级质谱图

I. 杂质A; II. 杂质B; III. 杂质C; IV. 杂质D; V. 杂质E

Fig 3 MS2 spectrums for impurities

I. impurity A; II. impurity B; III. impurity C; IV. impurity D; V. impurity E

表1 MRM 监测离子及参数

Tab 1 MRM monitoring ions and parameters

化合物	母离子, m/z	子离子, m/z	入口电压, V	解簇电压, V	碰撞能量, eV	碰撞室出口电压, V
氟氯西林	453.3	159.0	10	70	20	15
杂质A	471.1	173.1	10	50	30	15
杂质B	427.0	128.2	10	60	40	20
杂质C	216.3	188.0	10	50	15	15
杂质D	255.2	167.0	10	60	35	15
杂质E	651.3	357.1	10	70	25	20

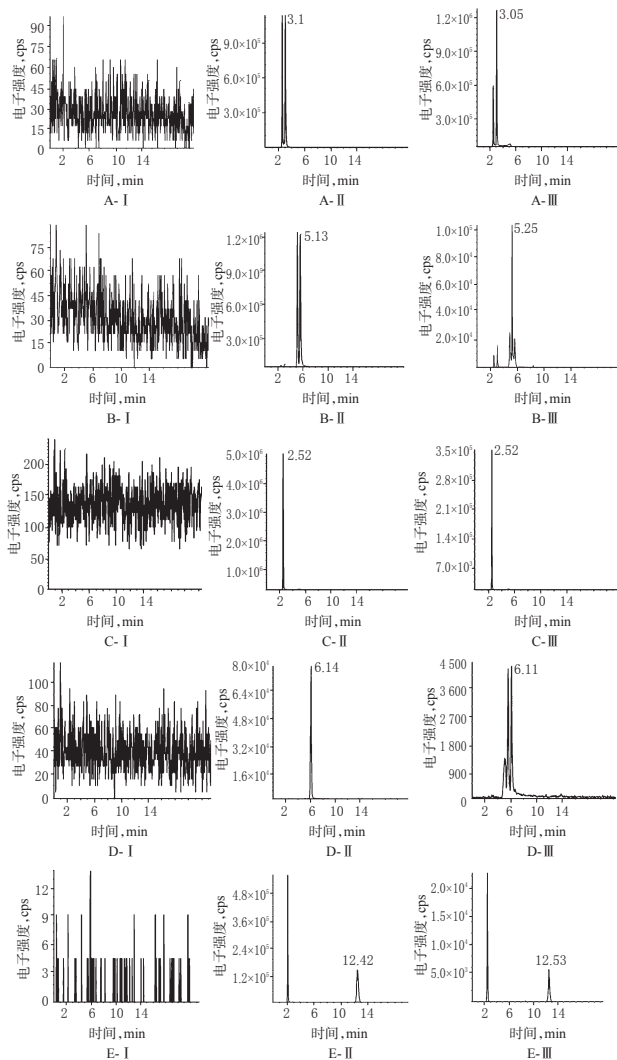


图4 MRM扫描色谱图

A-I. 空白; A-II. 杂质A对照品; A-III. 样品; B-I. 空白; B-II. 杂质B对照品; B-III. 样品; C-I. 空白; C-II. 杂质C对照品; C-III. 样品; D-I. 空白; D-II. 杂质D对照品; D-III. 样品; E-I. 空白; E-II. 杂质E对照品; E-III. 样品

Fig 4 MRM scanning chromatograms

A-I. blank; A-II. impurity A control; A-III. sample; B-I. blank; B-II. impurity B control; B-III. sample; C-I. blank; C-II. impurity C control; C-III. sample; D-I. blank; D-II. impurity D control; D-III. sample; E-I. blank; E-II. impurity E control; E-III. sample

2.4 有关物质解析

根据氟氯西林的Q1全扫描总离子流色谱图可以获得

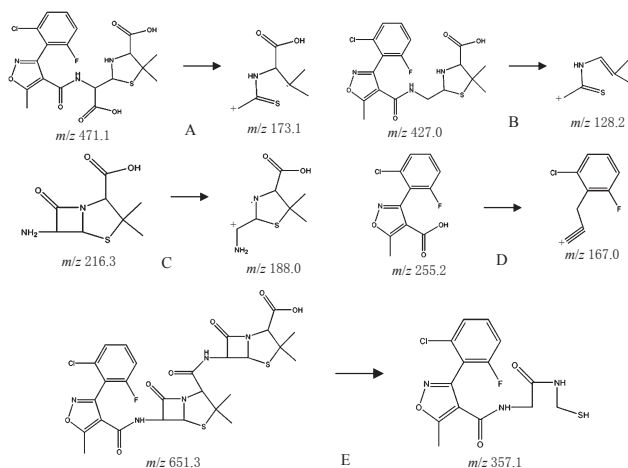


图5 裂解碎片

A. 杂质A; B. 杂质B; C. 杂质C; D. 杂质D; E. 杂质E

Fig 5 Fragments

A. impurity A; B. impurity B; C. impurity C; D. impurity D; E. impurity E

杂质峰的主要质荷比为 m/z 471.7, 其与杂质A的离子信息 m/z 471.1 相符。根据氟氯西林钠溶液Q1全扫描色谱图杂质峰的保留时间3.05 min, 以及杂质A对照品MRM色谱图的保留时间3.10 min, 推测杂质峰是有关物质A引起的, 可能是由主成分化合物氟氯西林钠的 β -内酰胺环开环所形成。 β -内酰胺环是抗青霉素酶的药效基团, 从氟氯西林钠转变为有关物质A失去了药效, 在药物成分中变成了干扰药效的杂质, 所以在药物生产、贮藏中要控制有关物质A的含量。《欧洲药典》对氟氯西林钠生产、贮藏过程中产生的杂质及含量进行了明确的规定。其中, 要求有关物质A的2个峰峰面积之和不大于主成分峰面积的2.0%; 其他杂质限量要求为: 有关物质B的2个峰峰面积之和不大于主成分峰面积的1.0%, 有关物质C的峰面积不大于主成分峰面积的1.0%, 有关物质D与E的峰面积分别不大于主成分峰面积的0.3%; 总杂质峰面积(杂质A、B、C、D、E和其他杂质峰面积之和)不大于主成分峰面积的3.0%。有关物质B、C、D、E仅仅依赖Q1全扫描检测不出相应的杂质峰, 所以其后使用MRM模式同时监测主成分以及杂质A、B、C、D、E的离子反应通道, 然后得到了与各个有关物质相关的色谱峰。通过比较杂质对照品与氟氯西林钠溶液的色谱峰保留时间判断药物中有关物质的检出, 结果见表2。

表2 MRM扫描杂质A、B、C、D、E对照品及其在氟氯西林钠中的保留时间

Tab 2 Retention time for impurity A, B, C, D, E control and flucloxacillin by MRM scanning

有关物质	保留时间, min			氟氯西林钠溶液中是否含有相应有关物质
	空白	杂质对照品	氟氯西林钠溶液	
A	无	3.10	3.05	是
B	无	5.13	5.25	是
C	无	2.52	2.52	是
D	无	6.14	6.11	是
E	无	12.42	12.53	是

由表2推测各个有关物质的形成规律: 杂质A为主成分 β -内酰胺环开环形成的产物, 杂质B为杂质A脱羧形成的产物, 杂质C、D为主成分的酰胺键断裂形成的两部分碎片, 杂质

E为主成分和杂质C缩合形成的产物。质谱图中[M+H]峰为 m/z 670.3,初步分析为杂质E([M+H]峰为 m/z 652.3)其中一个 β -内酰胺环开环形成的分子离子。各个杂质的化学名分别为:杂质A:(4S)-2-[羧基[[[3-(2-氯-6-氟苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]羰基]氨基]甲基]-5,5-二甲基噁唑烷-4-羧酸;杂质B:(2R,4S)-2-[[[3-(2-氯-6-氟苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]羰基]氨基]甲基]-5,5-二甲基噁唑烷-4-羧酸;杂质C:(2S,5R,6R)-6-氨基-3,3-二甲基-7-氧-4-硫杂-1-二环[3.2.0]庚烷-2-羧酸;杂质D:3-(2-氯-6-氟苯基)-5-甲基异噁唑-4-羧酸;杂质E:(2S,5R,6R)-6-[[[3-(2-氯-6-氟苯基)-5-甲基异噁唑-4-基]羰基]氨基]-3,3-二甲基-7-氧-4-硫杂-1-二环[3.2.0]庚烷-2-羧酸。

3 讨论

目前,氟氯西林钠有口服剂和注射剂2种剂型,其注射剂有山西和桂林的公司在进行生产。其在中容易产生杂质,在贮藏过程中也不稳定,由此也会生成杂质。为了方便对药物进行质量控制,本研究使用了一种新的检测方法,能够检测出《欧洲药典》规定的注射用氟氯西林钠的所有有关物质并初步判断了其结构及主要的裂解碎片。前人所使用的HPLC离子对梯度洗脱法^[3],流动相中的盐相成分复杂,整个检测过程时间较长(有关物质在30 min内测定);而本方法中流动相盐相成分简单、易配制,洗脱检测在15 min内即可完成。另外,其他方法^[2-4,6]只是对氟氯西林钠的主成分与杂质进行了色谱上的分离,但并不能推断杂质峰成分、有关物质及主要离子碎片的结构,大部分也都是只针对杂质含量的,其中包括主要杂质峰的含量以及总杂质峰含量;而本文则通过LC以及MRM的进一步监测,得到了5个杂质峰,并通过与对照品进行比较进行推断。笔者采用合适的色谱条件对样品进行色谱分离,使杂质峰与主成分峰的分离度大于1.5,并串联质谱检测手段进行分析。其中应用Q1全扫描模式进行全质量数扫描,得到样品的总离子色谱图,初步确定了主成分峰和杂质峰的峰位;然后对杂质峰进行质量提取,获得主要的离子碎片信息;对杂质对照品及样品进行二级质谱分析,得到主要的离子反应,并根据这些离子对信息进行MRM模式扫描,从MRM色

谱图中,比对各个杂质的保留时间与样品MRM扫描色谱图杂质峰的保留时间,从而通过质量信息与保留时间两个方面来确定杂质峰中分别含有哪些有关物质并推断出有关物质及主要裂解碎片的结构。

杂质A对照品与样品色谱图中色峰均出现双峰现象,两峰峰形尖锐且保留时间较近,推测二者可能互为同分异构体,可能为杂质A中2位C手性所致。本文中所应用的色谱条件并不能将二者很好地分离开来。《欧洲药典》中计算杂质A含量时一并统计了这两个峰。进行杂质B通道监测时同样出现这种情况,推测两峰可能为杂质B中2位手性C的R型与S型同分异构体,样品的两峰峰强度不一致,可能为其中一种构型占据主导位置,另一种则含量较低。

笔者所做的工作只是初步对双峰进行了定性分析,双峰的具体结构确证还需要进一步试验,并结合相关文献和工艺条件进行阐明。

参考文献

- [1] 林静,郭丽贞.注射用氟氯西林钠与盐酸氨溴索存在配伍禁忌[J].中外健康文摘,2011,8(35):196.
 - [2] 邢亮彬,张菁,高燕霞.HPLC法测定注射用氟氯西林钠氨苄西林钠的含量及有关物质[J].中国抗生素杂志,2006,31(7):414.
 - [3] 陈悦.HPLC离子对梯度洗脱法同时测定注射用阿莫西林钠氟氯西林钠的含量和有关物质[J].中国抗生素杂志,2004,29(1):15.
 - [4] Liu H, Wang H, Sunderland VB. An isocratic ion exchange HPLC method for the simultaneous determination of flucloxacillin and amoxicillin in a pharmaceutical formulation for injection[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2005, 37(2):395.
 - [5] 钟传青,曹广祥,陈仿.克拉维酸钾中有关物质的HPLC/ESI/MS分析[J].中国抗生素杂志,2008,33(12):750.
 - [6] 曹晓云,刘海玲.高效液相色谱法测定注射用阿莫西林氟氯西林钠有关物质和含量[J].天津药学,2005,17(4):15.
- (收稿日期:2012-11-12 修回日期:2013-01-21)

国家食品药品监督管理总局约谈全国17个中药材专业市场负责人

本刊讯 2013年7月30日,国家食品药品监督管理总局(下简称总局)副局长吴涪主持召开中药材专业市场整治约谈会,亳州、安国等全国17个集中的中药材专业市场所在地政府负责人参加。

近期,总局对部分中药材专业市场进行了明察暗访,发现中药材专业市场及其周边存在假冒伪劣、掺杂使假、违规经营、非法加工等现象,个别地方还比较严重。7月17日,总局在全国部署了药品“两打两建”专项行动,其中打击中药违法生产行为、整治中药材专业市场是专项行动的重点之一。这次约谈会的目的就是要实事求是地摆出问题,痛下决心,坚决整治,以遏制市场制假售假势头,规范中药材市场。

会议对中药材专业市场整治提出要求:1、坚决整治市场,要在当地政府领导下,动员各有关方面参与,坚决打击市场及其周边中药材染色增重、掺杂使假、制假售假等各类违法行为;2、净化市场周边环境,坚决取缔市场周边私切滥制、非法加工、变相生产中成药片活动,严厉打击企业与不法商贩勾

结,出租出借饮片生产经营资质票据等行为;3、切实加强管理,配备专门机构和专门人员,负责中药材专业市场管理工作,保障必备经费和检验检测设备,完善市场交易和质量管理规范等规章制度;4、建立长效机制,加强中药材市场管理工作的督促检查,落实各项工作目标责任,防止问题回潮。

吴涪副局长强调,总局将会同有关部门,采取抽查、监督检查和明察暗访等方式,对整治效果进行检查。对存在问题较多、屡整屡犯、市场混乱、质量问题依然严重的中药材专业市场予以曝光,坚决关闭,严惩违法犯罪分子,并依纪依法追究行政管理责任。

会上,17个中药材专业市场所在地政府负责人签署《中药材专业市场管理责任书》,并表示全力组织开展中药材市场整治,通过整治,形成规范有序、健康发展的中药材专业市场。

农业部、商务部、国家工商行政管理总局、国家中医药管理局相关司局负责人参加了约谈会。