

LC-MS 法研究盐酸克林霉素中的有关物质*

孙秋实¹ 李悦^{1**} 王慧敏¹ 覃俐²

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 2. 浙江天台药业有限公司, 台州 317200)

摘要 目的: 建立 LC-MS 方法检测盐酸克林霉素中有关物质, 并利用质谱对有关物质进行初步鉴定。**方法:** 液相色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为乙腈-四氢呋喃-水-无水甲酸 (18:3:79:0.2), 氨水调 pH 为 5.45 ± 0.02; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 柱温为室温; 质谱条件: 电喷雾电离源正离子检测; 源温 80 °C; 锥孔电压 35 V。**结果:** 检测出盐酸克林霉素原料中 6 个有关物质, 分别为林可霉素异构体 (1)、林可霉素 (2)、克林霉素 B (3)、7-表克林霉素 (4)、克林霉素异构体 (5) 及去氢克林霉素 (6)。除林可霉素、克林霉素 B 和 7-表克林霉素外, 其余均未被各国药典收载。**结论:** 本文采用液质联用法, 灵敏度高, 分离度好, 能用于盐酸克林霉素的质量控制及其代谢产物的研究。

关键词: 氯洁霉素; 有关物质; 林可霉素; 表克林霉素; 异构体; 液相色谱-质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)06-1059-05

LC-MS studies on related substances in clindamycin hydrochloride*

SUN Qiu-shi¹, LI Yue^{1**}, WANG Hui-min¹, QIN Li²

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China; 2. Zhejiang Tiantai Pharmaceutical Co., LTD, Taizhou 317200, China)

Abstract Objective: To set up an LC-MS method in order to detect the related substances in clindamycin hydrochloride and to identify those related substances by MS. **Methods:** LC: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm) was adopted. The mobile phase consisted of acetonitrile-THF-water-anhydrous formic acid (18:3:79:0.2) and adjust pH to 5.45 ± 0.02 with ammonia. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength was 210 nm. The test was carried out under room temperature. MS: positive electrospray ionization (ESI⁺); the source temperature was 80 °C and cone voltage was 35 V. **Results:** Six related substances has been detected in the clindamycin hydrochloride drug substance as isomer of lincomycin (1), lincomycin (2), clindamycin B (3), 7-epiclindamycin (4), isomer of clindamycin (5) and dehydroclindamycin (6). The others haven't been collected by pharmacopoeia except for lincomycin, clindamycin B and 7-epiclindamycin. **Conclusion:** This paper uses LC-MS method, which has the characteristics of high sensitivity and good separation. It proves that this method can be used in the study of quality control and metabolites of clindamycin hydrochloride.

Key words: clindamycin hydrochloride; related substances; lincomycin; epiclindamycin; dehydroclindamycin; isomer; LC-MS

盐酸克林霉素 (clindamycin hydrochloride) 又称盐酸氯洁霉素, 化学名称为 6-(1-甲基-反-4-丙基-L-2-吡咯烷甲酰氨基)-1-硫代-7(S)-氯-6,7,8-三脱氧-L-苏式-α-D-半乳糖吡喃糖苷盐酸盐, 结构如图 1 所示, 分子式为 C₁₈H₃₃ClN₂O₅S · HCl 相对分子质量为 461.45, 是盐酸林可霉素 7 位羟基为氯原子取代而得到的 1 种半合成衍生物, 主要用于革兰氏阳性菌及各种厌氧菌

感染所致疾病的治疗。盐酸克林霉素的合成工艺有很多, 其原料中可能含有的杂质为林可霉素、克林霉素 B、表克林霉素及其他未知杂质^[1-3]。本文主要采用 LC-MS 方法, 对盐酸克林霉素原料药中的有关物质进行分析及初步鉴定, 为盐酸克林霉素药品的质量控制提供较好的检测手段。

1 仪器与试剂

Waters 2486 液相色谱仪, Waters micromass ZQ

* 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(编号 2009ZX09301-007)

** 通讯作者 Tel: (021) 62892876; E-mail: liyue.cn@126.com

液质联用仪; PHS-2F 数字 pH 计; 美国 Varian 400 MHz 核磁共振波谱仪。

盐酸克林霉素原料药(批号: 090303 × 7 批, 浙江天台药业有限公司); 盐酸林可霉素(批号: 0808008, 浙江天台药业有限公司); 乙腈为色谱纯(Scharlau chemie S. A.); 四氢呋喃、甲醇、甲酸、氨水均为分析纯; 双蒸水为实验室自制。

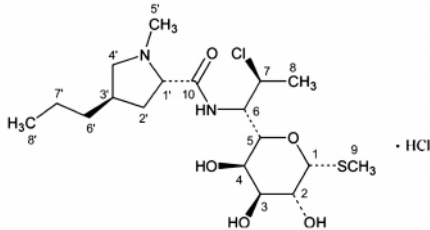


图1 盐酸克林霉素结构

Fig 1 The structure of clindamycin hydrochloride

2 方法与结果

2.1 盐酸克林霉素的 LC-MS 分析 液相色谱条件: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-四氢呋喃-水-无水甲酸(18:3:79:0.2) 氨水调 pH 5.45 ± 0.02; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为室温; 检测波长^[4]: 210 nm。质谱条件: 电喷雾电离源正离子检测; 源温 80 °C; 锥孔电压 35 V。7 个组分的检测结果如表 1 所示。所得液相质谱图如图 2 所示。按总离子流图将各个色谱峰分别命名为组分 1、组分 2、组分 3、组分 4、组分 5、克林霉素、组分 6。各个组分对应的质谱图如图 3 所示。

表 1 盐酸克林霉素原料有关物质的检测结果

Tab 1 Results of the seven components in clindamycin hydrochloride

组分名称 (component)	相对保留时间 (relative retention time)	相对分子质量	
		[M + H] ⁺	(relative molecular mass)
组分 1 (component 1)	0.12	407	406
组分 2 (component 2)	0.16	407	406
组分 3 (component 3)	0.44	411	410
组分 4 (component 4)	0.76	425	424
组分 5 (component 5)	0.81	425	424
克林霉素 (clindamycin)	1.00	425	424
组分 6 (component 6)	1.14	423	422

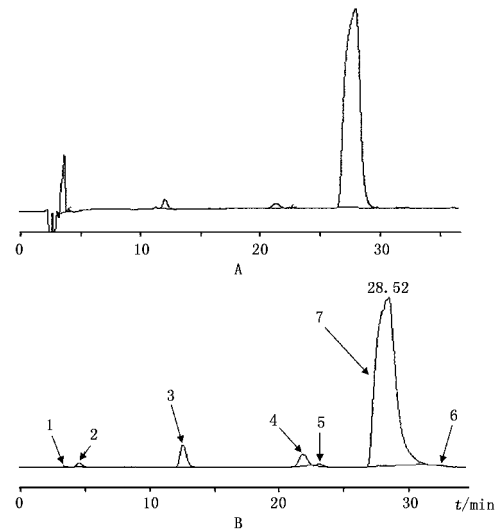


图2 盐酸克林霉素的 LC-MS 谱图

Fig 2 LC-MS spectra of clindamycin hydrochloride

A. 紫外检测色谱图 (chromatogram with UV detection) B. 质谱总离子流图 (TIC spectrum)

1~6. 组分 1~6 (component 1~6) 7. 克林霉素 (clindamycin)

2.2 盐酸克林霉素有关物质的鉴定

2.2.1 药典已收录的有关物质

有关药典^[1-3]中规定需要检测盐酸克林霉素中的有关物质为林可霉素(相对分子质量 406)、克林霉素 B(相对分子质量 410)、7-表克林霉素(相对分子质量 424)。英国药典^[3]给出的三者的结构如图 4 所示。

质谱检测得到组分 1 和组分 2 的 [M + H]⁺ 峰均为 407, 表明两者相对分子质量均为 406, 与林可霉素相对分子质量相同。对照图 3-A 和图 3-B, [M + H]⁺ m/z 407 的准分子离子经裂解脱去 1 个中性分子 CH₃SH 生成 m/z 359 特征碎片离子。m/z 126 为母核特征碎片离子 [C₈H₁₅N]⁺, 即克林霉素吡咯环的特征峰。通过液相色谱与盐酸林可霉素原料保留时间对照, 组分 2 可确认为林可霉素。

质谱检测得到组分 3 的 [M + H]⁺ 峰为 411, 表明其相对分子质量为 410, 与克林霉素 B 相对分子质量相符。质谱图中准分子离子 [M + H]⁺ m/z 411 的同位素峰为 m/z 413, 由两者丰度比例关系可知组分 3 中含有氯原子。[M + H]⁺ 经裂解脱去 1 个中性分子 CH₃SH 生成 m/z 363 特征碎片离子。m/z 112 为母核特征碎片离子, 即吡咯环 [C₇H₁₃N]⁺ 的峰。与克林霉素相应碎片 [C₈H₁₅N]⁺ 比较, 少 1 个 CH₂, 表明吡咯环上的 3' 位为乙基而非丙基, 因此证明组分 3 为克林霉素 B。

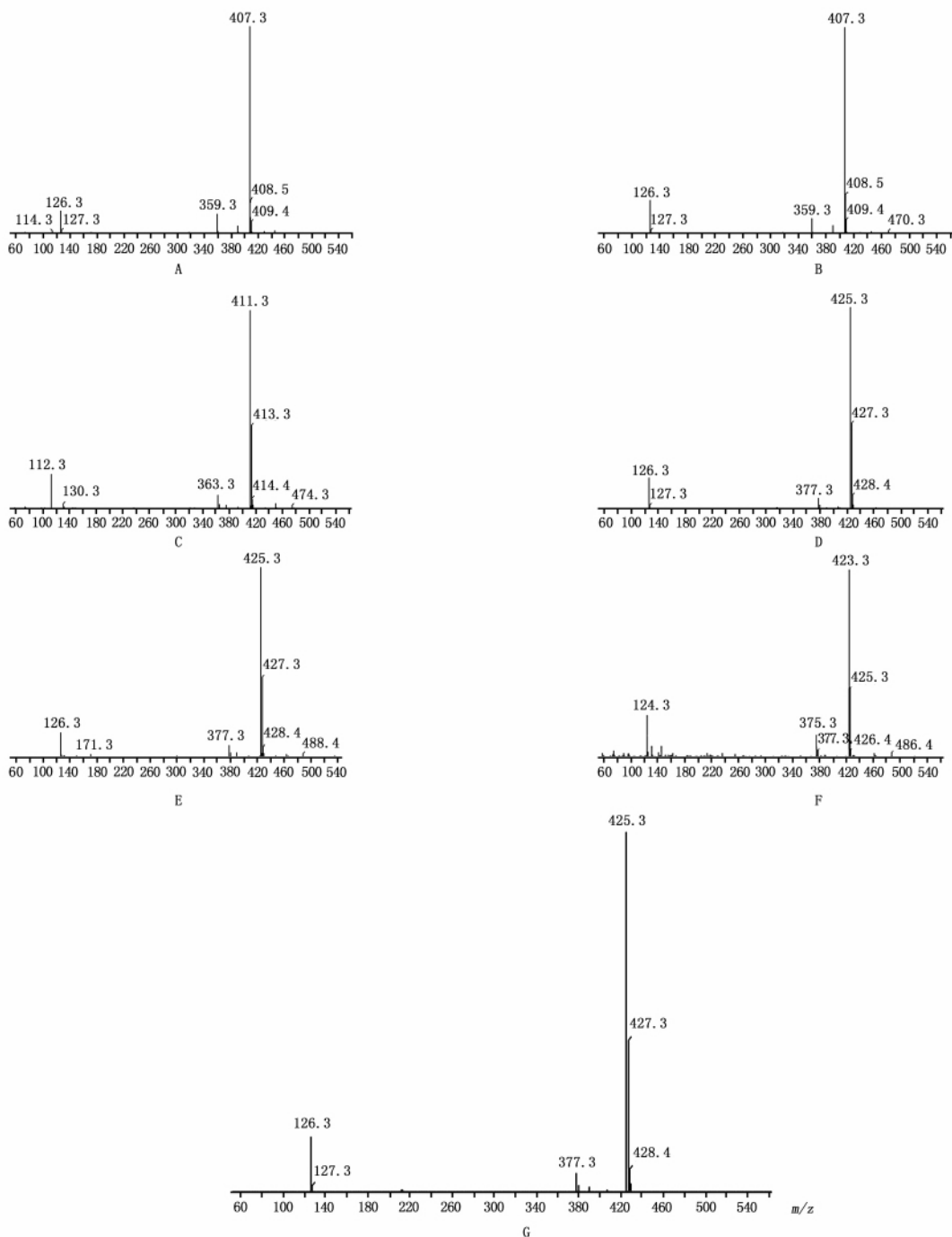


图3 7个组分对应的质谱图

Fig 3 MS spectra of the seven components

A ~ F. 组分1 ~ 6 (component 1 ~ 6) G. 克林霉素 (clindamycin)

质谱检测组分4和组分5的质谱信号 $[M + H]^+$ 峰为425, 表明相对分子质量均为424, 为克林霉素的异构体。对组分4进行制备液相色谱分离富集, HR-ESI-MS检测 $[M + H]^+$ 峰的质荷比为

425.1879 通过波谱分析确定其结构为7-表克林霉素。7-表克林霉素与克林霉素的核磁共振谱数据对照如表2所示。

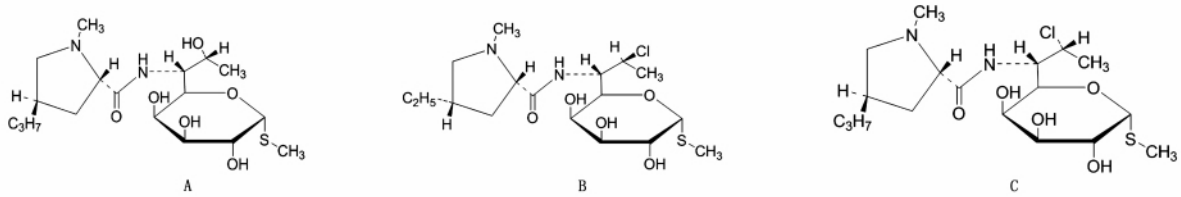


图4 林可霉素(A)、克林霉素(B)及7-表克林霉素(C)的结构

Fig 4 Structures of lincomycin (A), clindamycin (B) and 7-epiclindamycin (C)

表2 7-表克林霉素和克林霉素的¹H NMR和¹³C NMR
Tab 2 ¹H NMR and ¹³C NMR of 7-epiclindamycin and clindamycin

位置 (position)	δ_{H}		δ_{C} /DEPT	
	7-表克林霉素 (7-epiclindamycin)	克林霉素 (clindamycin)	7-表克林霉素 (7-epiclindamycin)	克林霉素 (clindamycin)
1	5.27 (1H, d, $J=6.0$ Hz)	5.33 (1H, d, $J=6.0$ Hz)	91.2/CH	90.6/CH
2	4.02 (1H, dd, $J=6.0, 10.4$ Hz)	4.05 (1H, dd, $J=6.0, 10.4$ Hz)	70.3/CH	70.5/CH
3	3.52 (1H, dd, $J=3.2, 10.4$ Hz)	3.60 (1H, dd, $J=2.4, 10.4$ Hz)	73.0/CH	73.1/CH
4	3.80 (1H, d, $J=2.8$ Hz)	3.84 (1H, brs)	71.0/CH	70.8/CH
5	4.12 (1H, d, $J=10.0$ Hz)	4.25 (1H, d, $J=9.6$ Hz)	71.7/CH	71.1/CH
6	4.46 (1H, dd, $J=2.8, 6.8$ Hz)	4.40 (1H, d, $J=9.6$ Hz)	60.5/CH	60.8/CH
7	4.60~4.57 (1H, m)	4.50 (1H, m)	56.2/CH	55.9/CH
8	1.40 (3H, d, $J=6.8$ Hz)	1.36 (3H, d, $J=6.8$ Hz)	20.5/CH ₃	24.6/CH ₃
9	2.07 (3H, s)	2.11 (3H, s)	16.0/CH ₃	15.9/CH ₃
10	/	/	171.9/C	171.8/C
1'	4.26~4.22 (1H, m)	4.35~4.31 (1H, m)	71.2/CH	71.7/CH
2'	2.29~2.24 (2H, m)	2.32~2.22 (2H, m)	38.3/CH ₂	38.4/CH ₂
3'	2.29~2.24 (1H, m)	2.32~2.22 (1H, m)	39.1/CH	39.2/CH
4'	2.84~2.79 (1H, m); 3.80~3.77 (1H, m)	3.83~3.81 (1H, m); 2.86~2.84 (1H, m)	64.1/CH ₂	64.1/CH ₂
5'	2.87 (3H, s)	2.90 (3H, s)	43.6/CH ₃	43.7/CH ₃
6'	1.37~1.34 (2H, m)	1.43~1.39 (2H, m)	36.2/CH ₂	36.4/CH ₂
7'	1.27~1.19 (2H, m)	1.30~1.22 (2H, m)	22.9/CH ₂	23.1/CH ₂
8'	0.78 (3H, d, $J=6.8$ Hz)	0.82 (3H, d, $J=6.8$ Hz)	15.7/CH ₃	15.5/CH ₃

NOESY 谱显示 7-表克林霉素的 8 位 H 与 H-5 和 H-6 相关,说明 7-表克林霉素的 H-8 与 H-5 的空间位置比较接近。克林霉素的 8 位 H 与 H-6 和 H-7 相关,未与 H-5 相关,说明 H-8 与 H-5 位置较远。以上数据表明 7 位碳上的取代基存在空间异构现象。参考英国药典^[3]和相关文献^[5,6],7-表克林霉素的 7 位碳为 R 构型,克林霉素 7 位碳为 S 构型。

2.2.2 药典未收录的有关物质

2.2.2.1 组分 1 组分 1 的质谱图如图 3-A 所示,与林可霉素(组分 2)的 $[M+H]^+$ 峰相同均为 407 相

对分子质量为 406。且质谱图中的碎片离子信息显示组分 1 同林可霉素具有相同的裂解方式,主要特征碎片离子为 $[M-CH_3SH]^+ 359$ 和 $[C_8H_{15}N]^+ 126$,因此鉴定组分 1 为林可霉素的异构体。根据林可霉素的分子结构推断该异构体可能为林可霉素 7 位-OH 异构化所得。

2.2.2.2 组分 5 如图 3-E 所示,组分 5 的相对分子质量为 424,具有典型的氯元素同位素峰(426)。经与图 3-G 克林霉素的质谱图对比,两者都产生 $[M-CH_3SH]^+ 377$ 和 $[C_8H_{15}N]^+ 126$ 的特征碎片离子峰,因此推断组分 5 为克林霉素的同分异

构体。由于克林霉素含有多个手性碳,因此组分5的具体结构需进一步研究确定。

2.2.2.3 组分6 如图3-F所示,组分6的相对分子质量为422,具有典型的氯元素同位素峰(424)。质谱图中主要特征碎片离子 $[M - CH_3SH]^+ 375$ 和 $[C_8H_{13}N]^+ 124$ 显示其裂解途径与克林霉素相同,再结合克林霉素的结构,推断组分6为克林霉素失去2个H发生消去反应生成的去氢克林霉素。

2.2.2.4 其他组分 在盐酸克林霉素的总离子流图中发现了另外2个含量在千分之一以下的2个组分,保留时间分别为8.50 min和10.33 min, $[M + H]^+$ 峰分别为425和411,质谱图如图5。两者可能分别为克林霉素和克林霉素B的同分异构体。

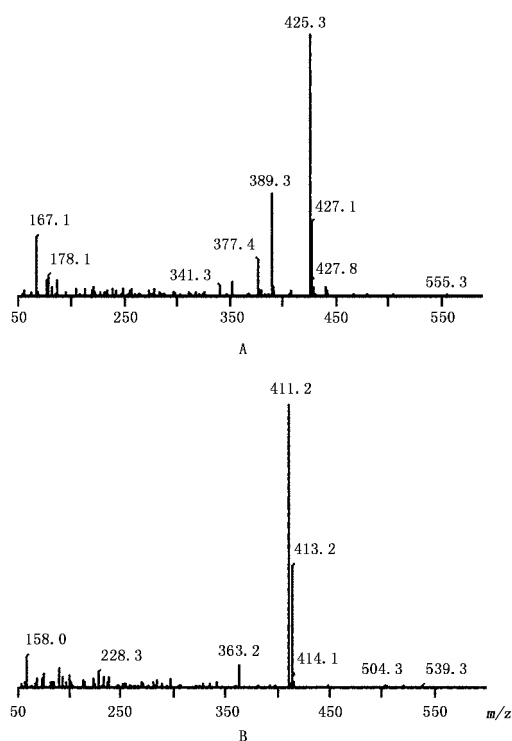


图5 保留时间分别为8.50 min(A)和10.33 min(B)的2个组分的质谱图

Fig 5 Spectra of $t_R = 8.50$ min (A) and $t_R = 10.33$ min (B)

3 讨论

3.1 本文通过一系列实验,考察了盐酸克林霉素原料中各有关物质间分离度随流动相中pH、有机相比例、缓冲盐比例的变化而变化的规律,即:组分3与组分4、克林霉素与组分6随pH增加而分离度减小,其他各组分分离度有增加的趋势,但pH越大克林霉素峰对称性越差;有机相增加,洗脱能力增强,各个组分的分离度有下降的趋势;随缓冲盐浓度增加,组分3与组分4、克林霉素与组分6的分离度有所增加,但其他各组分之间的分离度下降。以上规律为进一步研究各有关物质奠定了基础。

3.2 色谱流动相中添加了四氢呋喃。四氢呋喃的作用是改善主峰峰形,减小峰不对称的情况,而且四氢呋喃的加入有利于克林霉素与组分6的分离。

3.3 本文确立了一种盐酸克林霉素的LC-MS分析方法,分析并鉴定了盐酸克林霉素原料中的6个有关物质。方法灵敏度高,分离与鉴定同时完成,有利于盐酸克林霉素生产工艺的优化及杂质的控制,同时方法可以用于研究药物在体内的代谢途径。

参考文献

- 1 USP 30 - NF25. 2006. 1778
- 2 ChP(中国药典). 2005. Vol II(二部): 515
- 3 BP. 2009. 1431
- 4 XIONG Su-bin(熊素彬), LIAO Xiao-jun(廖小君), ZHANG Yong-hong(张永红). Comparison of two HPLC methods for determination of clindamycin hydrochloride(两种高效液相色谱法检测盐酸克林霉素的比较). *Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志)*, 2005, 25(8): 726.
- 5 Zhou Hui, Zheng Zhiguo, Wu Shihua *et al.* Separation and characterization of clindamycin and related impurities in bulk drug by high-performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal(药学与生物医学分析杂志)* 2006, 41: 1116
- 6 LI Fang(李芳). Determination of lincomycine in preparation by HPLC(高效液相色谱法测定盐酸林可霉素制剂). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 1990, 10(6): 328

(本文于2010年6月7日收到)