

苯唑西林钠碱性降解物的分析研究

吴琦琦^{1,2} 刘雁鸣^{1*} 倪孟祥²

(1. 湖南省药品检验所,长沙 410001; 2. 中国药科大学,南京 210009)

摘要 目的:应用液相色谱-三重四极杆质谱分析苯唑西林钠的碱性降解物。方法:采用 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm);流动相:0.01 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液(醋酸调 pH 至 5.0) - 乙腈(75:25);流速:1.0 mL · min⁻¹;检测波长:225 nm;柱温:30 ℃;液相出口分流 20% 进入四极杆质谱,以电喷雾电离源正离子模式(ESI⁺)进行质谱数据采集。结果:得到苯唑西林钠碱性降解物液相色谱图以及液相色谱峰对应的一级质谱图。对谱图进行分析归纳,推测苯唑西林钠碱性降解物中 4 个主要组分为苯唑西林的青霉噻唑酸及其异构体、苯唑西林的脱羧青霉噻唑酸以及 6-APA 与苯甲异恶唑酰氯的结合物。结论:本方法灵敏、可靠、快速,为杂质控制和工艺改进提供了有力帮助,对苯唑西林钠质量的提高及杂质含量控制指标的制订具有重要的指导意义。

关键词: 苯唑西林钠; 降解物; 杂质; 青霉噻唑酸; 异构体; 电喷雾离子化质谱; 分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)06-1102-04

Analyzing impurities degraded by alkali in oxacillin sodium

WU Qi - qi^{1,2} LIU Yan - ming^{*} NI Meng - xiang²

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To analyze impurities degraded by alkali in oxacillin sodium by using liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. **Methods:** Using C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 0.01 mol · L⁻¹ ammonium acetate(pH 5.0) - acetonitrile (75:25) as mobile phase, temperature: 30 ℃, the flow rate: 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength: 225 nm; 20% of the liquid exit come into the quadrupole mass spectrometry and collect the mass spectral date about ESI⁺. **Results:** The penicilloic acid of oxacillin and its isomer, decarboxylation penicilloic acid of oxacillin, the associated compound of phenacyl 6 - aminopenicillinate and 5 - methyl - 3 - phenylisoxazole - 4 - carbonyl chloride, as impurities degraded by alkali in oxacillin sodium have been determined by the liquid chromatogram and its first order mass spectrum. **Conclusion:** The method is sensitive, rapid and credible in production and quality control of oxacillin sodium.

Key words: oxacillin sodium; degradation products; impurities; penicilloic acid; isomer; electrospray ionization mass spectrometry; analysis

药品再评价是对已上市药品的安全、有效进行调查、分析、确认的过程。开展药品的再评价是《药品管理法》对药品监督管理部门的要求。多年来国内外对药品质量的评价均依据法定的标准检验合格率来评价,这在一定程度上存在局限性。近年来,国家食品药品监督管理局根据处置药品安全事件的经验,提出了国家评价性抽验新机制:在常规检验的基础上,增加与药品上市后安全、有效相关的评价性检验研究,建立药品质量评价的新体系,以促进药品质量

的提高。按照要求,临床常用的国家基本药物注射用苯唑西林钠被列入 2010 年度全国药品质量评价性抽验计划。

苯唑西林钠(oxacillin sodium)为耐酸耐酶的半合成青霉素。为 6-氨基青霉烷酸(6-APA)的衍生物,它的抗酸抗青霉素酶的能力明显优于其他类抗生素,在生物体内不会被青霉素酶破坏。对于那些青霉素 G 治疗不敏感的患者,苯唑西林钠发挥着重要作用。但它对碱很不稳定,在较低浓度的碱性

* 通讯作者 Tel: (0731) 82275886; E-mail: ymliu68@yahoo.com.cn

环境中即可极快地发生降解,产生一系列杂质,这些杂质的存在不仅使药效降低,抗菌活性减弱,甚至引起严重的过敏反应,而现行法定标准^[1]并未对此类杂质进行有效控制。因此,本次抽验在常规检验的基础上,参考相关文献^[2~4]建立了分析方法,对此类相关杂质进行了较全面、深入的研究。

1 仪器与试药

美国 Waters 公司 Acquity Ultra Performance LC 超高效液相色谱仪; 美国 Waters 公司 Quattro Premier XE LC/MS 分析仪。

注射用苯唑西林钠(批号: 1008131),山西振东泰盛制药有限公司; 乙腈(色谱纯),Burdick&Jackson; 醋酸铵(分析纯),国药集团化学试剂有限公司; 醋酸(分析纯),国药集团化学试剂有限公司; 水为实验室制备的超纯水。

2 色谱条件

色谱柱: Thermo gold C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(醋酸调 pH 至 5.0) - 乙腈(75:25); 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 检测波长: 225 nm; 柱温: 30 °C。

3 质谱扫描条件

液相出口分流 20% 进入质谱检测器(0.2 mL·min⁻¹); 离子源: ESI⁺; 源温度: 110 °C; 脱溶剂气温: 350 °C; 脱溶剂流量: 500 L·h⁻¹; 电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 35 V; 透镜电压: 0.1 V。

4 苯唑西林钠碱性降解物的初步推测

取样品 50.42 mg, 用 0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL 溶解, 放置 3 min, 用流动相稀释至 50 mL, 备用。

碱性降解物的 LC/MS 图见图 1-A, 液相色谱主要分离出 4 个杂质峰, 保留时间分别为 3.47, 4.35, 7.25, 8.55 min; 电喷雾离子化正离子检测方式(ESI⁺)一级质谱全扫描总离子流图见图 1-B, 对应的色谱峰的质谱图见图 2。

保留时间为 3.37 min(杂质 I, 图 2-A)、4.35 min(杂质 II, 图 2-B)所对应的准分子离子峰 [M + H]⁺ 均为 420.2, 即其相对分子质量均为 419.2, 根据其裂解规律可推测它们的分子归属可能为苯唑西林的青霉噻唑酸及其异构体, 将进行进一步的确认。

保留时间为 7.25 min(杂质 III, 图 2-C)所对应的准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 437.13, 且有 [A + 2]⁺ 的同位素峰(丰度 32.5%), 可以确定在其化学结构中存在 1 个氯原子。根据苯唑西林钠合成路线可知, 其合成起始原料为 6-APA 与苯甲异恶唑酰氯,

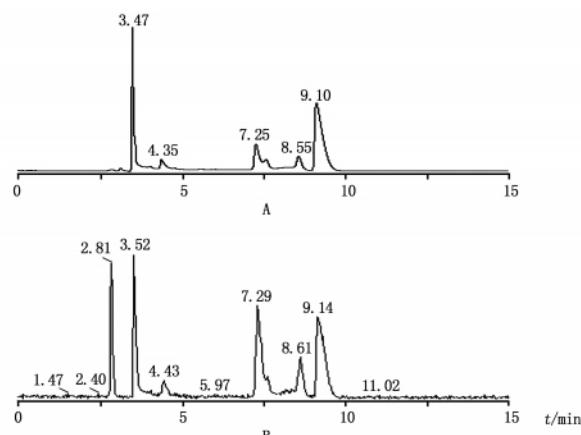


图 1 碱破坏溶液液相色谱图(A)、电喷雾离子化正模式一级质谱总离子流图(B)

Fig 1 HPLC chromatogram(A) and total ion chromatogram(B) of impurities degraded by alkali

且杂质 III 有与苯甲异恶唑酰氯相似的紫外行为, 综合以上现象推断, 杂质 III 可能为 6-APA 与苯甲异恶唑酰氯的结合物。此推断是否准确有待进一步研究确证。

保留时间为 8.55 min(杂质 IV, 图 2-D)所对应的准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 376.20, 即其相对分子质量为 375.20。根据其结构式可推断此杂质可能为苯唑西林的脱羧青霉噻唑酸, 此推断是否准确有待进一步研究确证。

5 杂质 I 及杂质 II 的制备及确证

5.1 苯唑西林的青霉噻唑酸的钠盐根据文献方法制备^[2]

5.1.1 5R,6R 青霉噻唑酸 称取注射用苯唑西林钠 4.07 g, 溶解于 8 mL 超纯水中, 并放置于冰水浴中, 溶液温度降为 0 °C 后, 加入 10 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2.5 mL, 放置 30 min, 用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸调 pH 至 8.62。取 1 mL, 用流动相稀释 500 倍, 备用(供试液 1)。

5.1.2 5S,6R 青霉噻唑酸 称取注射用苯唑西林钠 3.7 g, 溶于 100 mL 浓度为 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液中, 保持溶液温度 25 °C, pH 大于 12, 并持续磁力搅拌 30 min 后, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至 8.7, 将溶液在 30 °C 水浴中放置 48 h。取 1 mL, 用流动相稀释 50 倍, 备用(供试液 2)。

5.2 结果

供试液 1 的 LC/MS 图见图 3-A, 液相色谱的主峰保留时间为 3.48 min, 电喷雾离子化正离子检测方式(ESI⁺)一级质谱全扫描总离子流图见图 3-B。其质谱图见图 4。

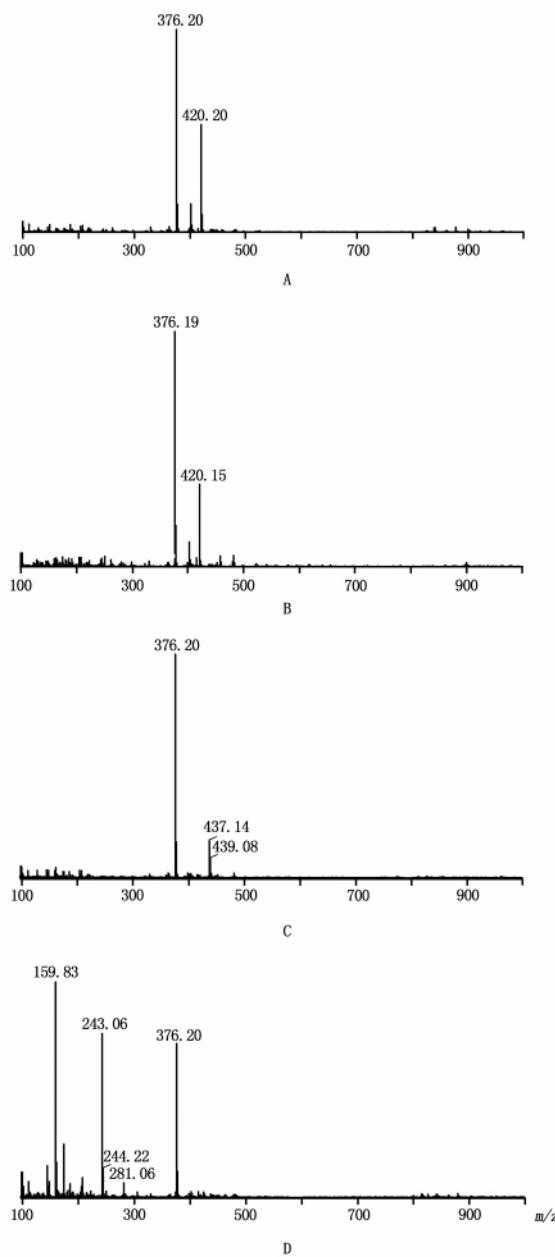
图2 各杂质组分的质谱图(ESI^+)

Fig 2 Mass spectra of impurities degraded by alkali

A. 3.47 min B. 4.35 min C. 7.25 min D. 8.55 min

供试液2的LC/MS图见图5-A, 液相色谱的主峰保留时间为4.32 min, 电喷雾离子化正离子检测方式(ESI^+)一级质谱全扫描总离子流图见图5-B。其质谱图见图6。

结果显示杂质I与苯唑西林的5R,6R青霉噻唑酸的保留时间及质谱行为一致, 杂质II与苯唑西林的5S,6R青霉噻唑酸的保留时间及质谱行为一致。由此可进一步认为制备的杂质I、杂质II符合LC/MS初步结构的推断。

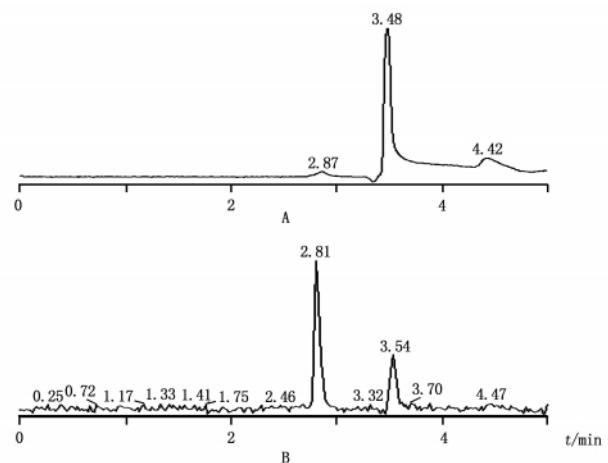


图3 苯唑西林的5R,6R青霉噻唑酸液相色谱图(A)、电喷雾离子化正模式一级质谱总离子流图(B)

Fig 3 HPLC chromatograms(A) and total ion chromatogram of 5R,6R penicilloic acids of oxacillin(B)

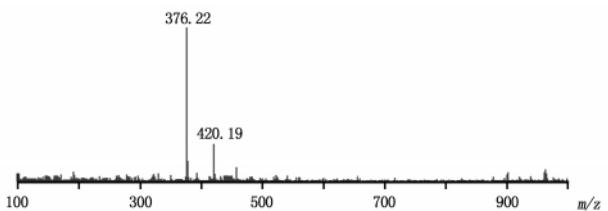


图4 苯唑西林的5R,6R青霉噻唑酸质谱图

Fig 4 Mass spectrum of 5R,6R penicilloic acids of oxacillin

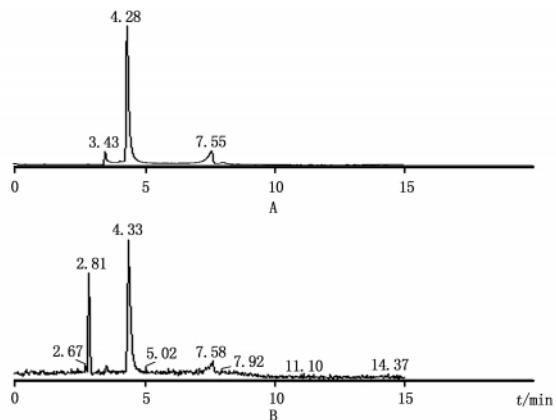


图5 苯唑西林的5S,6R青霉噻唑酸液相色谱图(A)、电喷雾离子化正模式一级质谱总离子流图(B)

Fig 5 HPLC chromatogram(A) and total ion chromatogram(B) of 5S,6R penicilloic acids of oxacillin

6 讨论

6.1 本研究确证苯唑西林在碱性环境中的降解路线及4个主要相关杂质的结构见图7。杂质I为苯唑西林的5R,6R青霉噻唑酸;杂质II为苯唑西林的5S,6R青霉噻唑酸;杂质III为6-APA与苯甲异恶唑酰氯的结合物;杂质IV为苯唑西林的脱羧青霉噻唑酸。

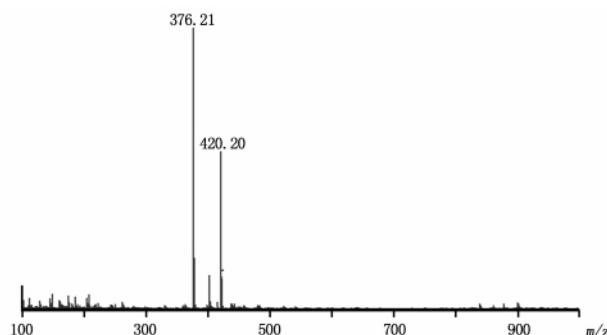


图 6 莎唑西林的 5S,6R 青霉噻唑酸的质谱图

Fig 6 Mass spectra of 5S,6R penicilloic acids of oxacillin

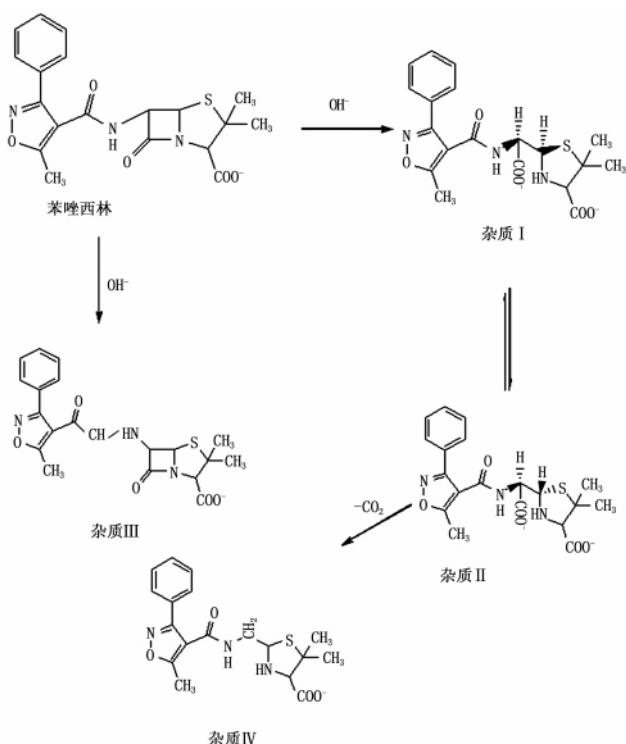


图 7 莎唑西林碱降解路线图

Fig 7 Roadmap of degrading of oxacillin by alkali

6.2 莎唑西林为耐酸耐酶的抗生素,但在碱性条件下极易分解,产生的青霉噻唑酸与脱羧青霉噻唑酸等杂质无抗菌活性,且成为半抗原,易与外源及内源性蛋白质结合,成为潜在过敏原,是用药过程中发生过敏现象的主要原因。因此,对此类杂质的深入研究有着重要的实际意义,该研究工作为杂质控制和工艺改进提供了有力帮助,对莎唑西林钠质量的提高及杂质含量控制指标的制订具有重要的指导意义,同时提示应注意本品的储藏条件和使用的期限。

6.3 本文采用分离和定向制备手段对莎唑西林的碱性降解物进行了较全面、深入、透彻的研究。试验表明,本文介绍的色谱条件,能将莎唑西林的4个碱性降解物包括青霉噻唑酸的2个异构体进行良好分离,专属性强,灵敏度高,结果准确。

6.4 影响药品质量的因素很多,除生产过程、工艺、处方、原辅料质量控制、剂型等因素外,流通、存储、使用过程都会对药品质量产生影响^[5]。从传统的分散型、流于形式的简单检验评价,到组织、引导全国药检机构集中型、系统化、深入细致研究评价,分析存在的问题,制定方案,开展实验研究,评价性抽验能发现不同品种的药品容易在哪些过程产生不合格,可以有针对性地解决问题。例如:发现了西咪替丁、阿司匹林肠溶片等口服制剂的溶出度与国外同类参比制剂不一致,且不同批号之间溶出曲线的离散性较大;发现丁基胶塞质量不仅影响头孢曲松钠的澄清度还与引发动物过敏反应相关;发现了辅料吐温80是鱼腥草类注射液引起过敏反应的一个主要原因;证实了丹参注射液、香丹注射液中残留的微量高分子杂质与临床不良反应存在一定的相关性;以及本研究中所证实的莎唑西林碱性降解物。这些药品质量评价成果,为制定药品研制和生产的技术指导原则提供了有力的依据,也为生产企业改进工艺,提高质量提供了技术指导。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部):325
- 2 Ghebre - Sellassie I, Knevel AM, Hem SL. Epimerization of benzylpenicilloic acid in alkaline media. *J Pharm Sci*, 1984, 73:125
- 3 YUAN Yao - zuo(袁耀佐), HU Chang - qin(胡昌勤), JIN Shao - hong(金少鸿). The establishment of method for the determination of tazobactam and tazocin(piperacillin sodium and tazobactam sodium for injection) (他唑巴坦及其制剂注射用哌拉西林钠/他唑巴坦钠的HPLC含量测定方法的建立). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 1999, 19(4):256
- 4 ZENG Ling - gao(曾令高). HPLC determination of cloxacillin sodium for injection and its related substances(高效液相色谱法测定注射用氯唑西林钠的含量及其有关物质). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2004, 24(4):406
- 5 WANG Min(王敏). The effect and significance of spot - check test for drugs evaluation(药品评价性抽验工作的作用和意义). *Strait Pharm J(海峡药学)*, 2007, 19(6):133

(本文于2011年3月30日修改回)