

## 液相色谱 - 紫外光谱 - 离子阱质谱法分析灰黄霉素中的相关杂质

杜玥<sup>1</sup> 杨慧元<sup>1\*</sup> 邓泮<sup>2</sup> 刘浩<sup>1</sup> 陈笑艳<sup>2</sup>

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**摘要** 目的: 建立液相色谱 - 紫外光谱 - 离子阱质谱法分析灰黄霉素原料中主要杂质。方法: 采用反相梯度色谱系统对灰黄霉素溶液进行分离, 以紫外检测。对其中的主要杂质采用电喷雾离子阱质谱进行多级质谱分析, 鉴定结构。结果: 经多级质谱解析, 鉴定了灰黄霉素原料中的 6 个杂质, 分别为去氯灰黄霉素、去氢灰黄霉素、异灰黄霉素、灰黄霉酸、4 - 去甲灰黄霉素和 6 - 去甲灰黄霉素。结论: 本研究为测定灰黄霉素中相关杂质提供了新的分析方法, 有助于加强灰黄霉素的质量控制。

**关键词:** 抗生素; 灰黄霉素; 杂质; 液相色谱 - 紫外光谱 - 离子阱质谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)08 - 1475 - 05

LC - UV/MS<sup>n</sup> analysis of related impurities of griseofulvinDU Yue<sup>1</sup>, YANG Hui - yuan<sup>1\*</sup>, DENG Pan<sup>2</sup>, LIU Hao<sup>1</sup>, CHEN Xiao - yan<sup>2</sup>

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract Objective:** To develop an LC - UV/MS method for analysis of impurities of griseofulvin. **Methods:** Reversed - phase gradient chromatography was used to separate griseofulvin solution, which was detected by UV detector. The major impurities were identified by ion trap mass spectrometry equipped with ESI source in the positive ion mode. **Results:** Six impurities of griseofulvin, including dechlorgriseofulvin, dehydrogriseofulvin, isogriseofulvin, griseofulvic acid, 4 - demethylgriseofulvin and 6 - demethylgriseofulvin were identified. **Conclusion:** The new developed method for the analysis of the related impurities in griseofulvin is useful to control the quality of griseofulvin. **Key words:** antibiotic; griseofulvin; impurities; LC - UV/ion trap mass spectrometry

灰黄霉素由 Oxford 等人于 1939 年自灰黄青霉菌 (*Penicillium griseofulvum*) 的培养液中分离而得, 于 1958 年开始应用于临床。本品是抗真菌类抗生素, 能抑制真菌有丝分裂, 使有丝分裂的纺锤结构断裂, 终止中期细胞分裂。主要对毛发癣菌、小孢子菌、表皮癣菌等浅部真菌有良好抗菌作用, 适用于包括头癣、须癣、体癣、股癣、足癣和甲癣等各种癣病的治疗<sup>[1]</sup>。灰黄霉素在水中溶解度极小<sup>[2]</sup>, 易溶于油脂, 吸收后分布于全身, 以脂肪、皮肤、毛发等组织中含较高<sup>[3]</sup>。

中国药典(2010 年)、英国药典(2009 年)、美国药典(32) 等对灰黄霉素均有收载。其中, 美国药典(32) 对其有关物质未作规定; 英国药典(2009 年) 采用气相色谱法检查其中的去氯灰黄霉素和去氢灰黄霉素, 柱温高达 250 °C。文献报道<sup>[4]</sup>, 灰黄霉素

在 200 °C 以上会发生分解。因此, 中国药典(2010 年) 采用高效液相色谱法检查有关物质, 对去氯灰黄霉素和去氢灰黄霉素的限量有所规定, 并明确了去氯灰黄霉素和去氢灰黄霉素的相对保留时间<sup>[5]</sup>。文献报道, 灰黄霉素生产过程中可产生双氢灰黄霉素、四氢灰黄霉素、去氯灰黄霉素、去氢灰黄霉素、异灰黄霉素以及灰黄霉酸等杂质<sup>[4]</sup>, 为了对灰黄霉素中相关杂质做进一步确认, 本文建立了液相色谱 - 紫外光谱 - 离子阱质谱法(LC - UV/MS<sup>n</sup>), 对其中 6 种杂质进行定性分析, 为灰黄霉素质量控制提供了更为专属、准确的分析方法。

## 1 材料与仪器

灰黄霉素对照品(批号: 426 - 9101; 含量: 99.0%) 购自中国药品生物制品检定所; 色谱纯乙腈和甲醇购自美国 Merck 公司; 色谱纯醋酸铵和冰

\* 通讯作者 Tel: (021) 50798237; E - mail: yanghy04@yahoo.com.cn

醋酸购自美国 Tedia 公司; 水为去离子水。

Agilent 公司 1200 型液相色谱仪, 包括 G1312A 型二元输液泵、G1367A 型自动进样器、G1316A 型柱温箱、G1322A 型脱气机和 G1314C 紫外检测器; Agilent 公司 6330 MSD XCT Ultra 型离子阱质谱仪, 数据采集和处理采用 Agilent Chem-Station 工作站。

## 2 实验方法

**2.1 灰黄霉素溶液的制备** 称取灰黄霉素对照品适量, 用流动相配制成  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 备用。

**2.2 HPLC 条件** 色谱柱: YMC-PACK ODS-AM ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相:  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵溶液-乙腈-甲醇 (57:38:5), 用冰醋酸调节 pH 至 4.5; 流速:  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 紫外检测波长:  $254 \text{ nm}$ 。

**2.3 质谱条件** 离子源为电喷雾电离源 (ESI), 正离子扫描方式检测, 干燥气流速为  $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 雾化气流速为  $275.8 \text{ kPa}$ , 加热毛细管温度为  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , 源喷射电压为  $3.5 \text{ kV}$ , 扫描范围为  $m/z$  100~800。

## 3 实验结果

**3.1 灰黄霉素杂质的色谱分离** 在上述色谱条件下, 取“2.1”项下的“灰黄霉素溶液” $10 \mu\text{L}$  进样, 经紫外检测器检测, 所得色谱图见图 1。灰黄霉素与其相关杂质之间能有效分离。对图 1 所标注的 6 个主要杂质分别进行定性分析。

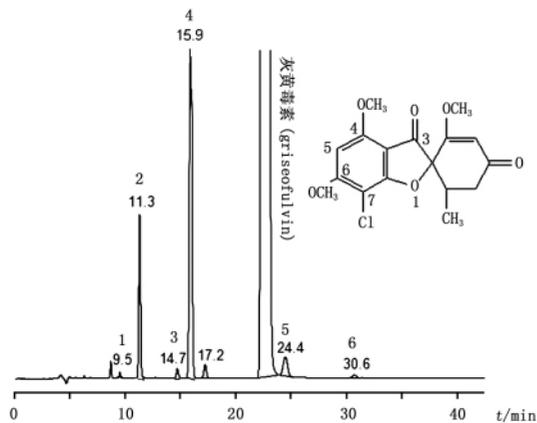


图 1 灰黄霉素溶液 ( $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的色谱图  
Fig 1 HPLC chromatogram of griseofulvin solution ( $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
1~6. 杂质 (impurities)

**3.2 离子阱质谱检测结果** Ballantine 等人<sup>[6]</sup> 将灰黄霉素及其结构类似物按照结构特征归为螺-环己烯酮、螺-环己二酮、螺-环己二烯酮和螺-环己酮等几类, 并论述了各类型的质谱特征裂解方式。在

此基础上, 本文对灰黄霉素及其 6 个杂质的质谱断裂分别进行解析及归属。

**3.2.1 去氯灰黄霉素的鉴定** 在灰黄霉素溶液的色谱图中, 保留时间为  $15.9 \text{ min}$  处有一杂质峰 (峰 4), 对该杂质进行质谱分析, 其一级全扫描质谱图 (图 2-A) 显示准分子离子 ( $[M + H]^+$ )  $m/z$  为 319, 与灰黄霉素  $[M + H]^+$  峰相差 34。进行二级全扫描分析 (图 2-B), 质谱裂解与灰黄霉素主峰 (图 3) 基本相同, 一级全扫描质谱图中也未发现含氯化物特征的  $[M + H + 2]^+$  同位素峰, 推断该杂质为去氯灰黄霉素。

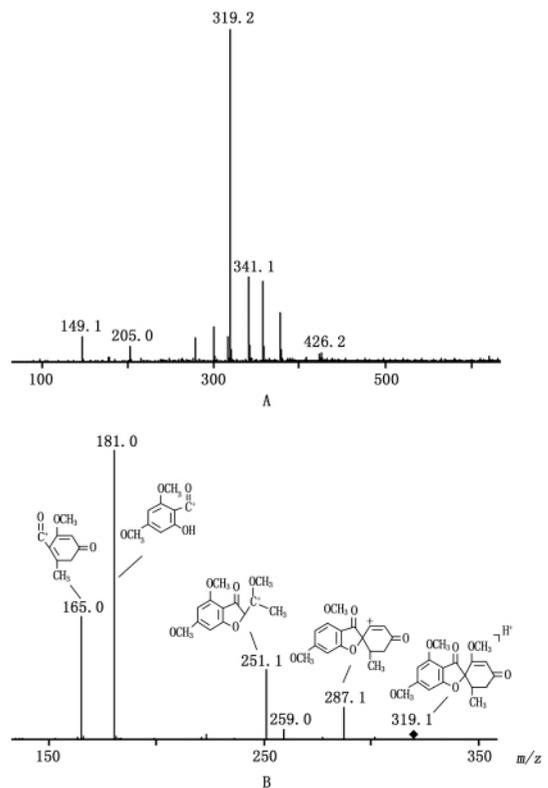


图 2 去氯灰黄霉素的一级 (A) 和二级 (B) 全扫描质谱图  
Fig 2 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup> (B) spectra of dechlorgriseofulvin

**3.2.2 去氢灰黄霉素的鉴定** 在灰黄霉素溶液的色谱图中, 保留时间为  $24.4 \text{ min}$  处有一杂质峰 (峰 5), 对该杂质进行质谱分析, 其一级全扫描质谱图 (图 4-A) 显示准分子离子 ( $[M + H]^+$ )  $m/z$  为 351, 与灰黄霉素  $[M + H]^+$  峰相差 2。进行二级全扫描分析 (图 4-B), 该化合物中甲基易以自由基形式脱去, 且易中性丢失甲醛 ( $\text{HCOH}$ )、一氧化碳 ( $\text{CO}$ ) 和甲醇 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 等, 质谱断裂规律与 Ballantine 等人<sup>[6]</sup> 所述灰黄霉素结构类似物中的 2'-5'-二烯-3- $\beta'$ -二酮系统一致, 推断该杂质为去氢灰

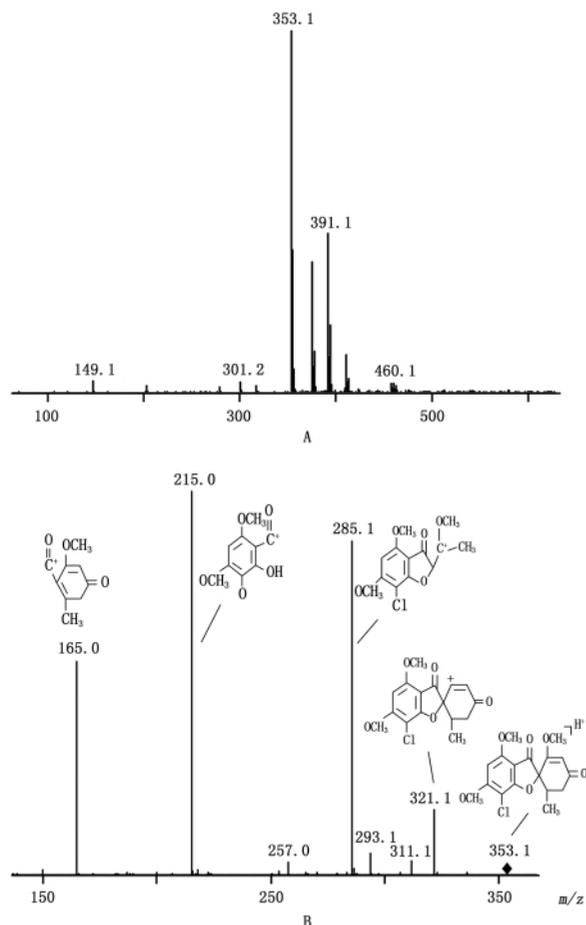


图3 灰黄霉素的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图  
Fig 3 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of griseofulvin

黄霉素。

**3.2.3 去甲灰黄霉素的鉴定** 在灰黄霉素溶液的色谱图中,保留时间为9.5 min和14.7 min处有2个杂质峰(峰1和峰3),分别对其进行质谱分析,排除本底噪音(如  $m/z$  301、 $m/z$  279等)后,二者的一级全扫描质谱图(图5-A和图6-A)均显示准分子离子( $[M+H]^+$ )  $m/z$ 为339,与灰黄霉素 $[M+H]^+$ 峰相差14。进行二级全扫描分析(图5-B和图6-B),质谱特征均与灰黄霉素主峰(图3)基本相同,推断2个杂质分别为6-去甲灰黄霉素和4-去甲灰黄霉素。具体峰归属见讨论部分。

**3.2.4 灰黄霉酸的鉴定** 在灰黄霉素溶液的色谱图中,保留时间为11.3 min处有一杂质峰(峰2),对该杂质进行质谱分析,其一级全扫描质谱图(图7-A)显示准分子离子( $[M+H]^+$ )  $m/z$ 为339,与灰黄霉素相差14。进行二级全扫描分析(图7-B),其质谱断裂规律与Ballantine等人<sup>[6]</sup>所述灰黄霉素

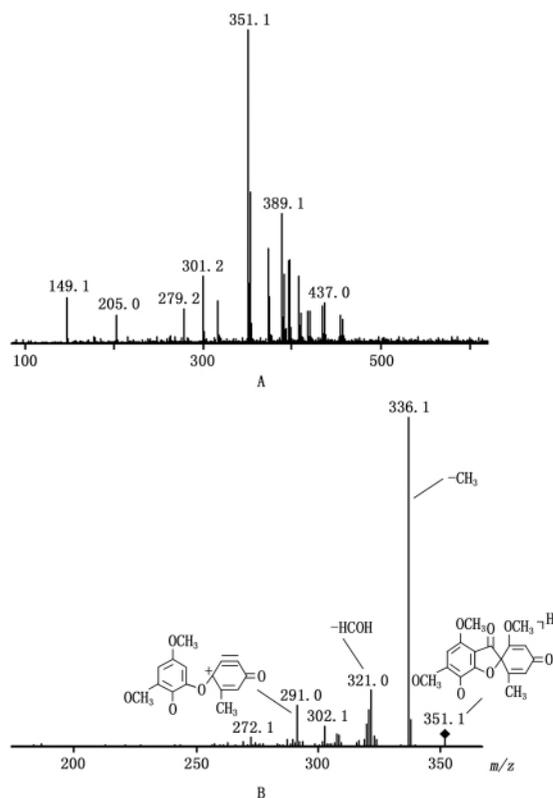


图4 去氢灰黄霉素的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图  
Fig 4 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of dehydrogriseofulvin

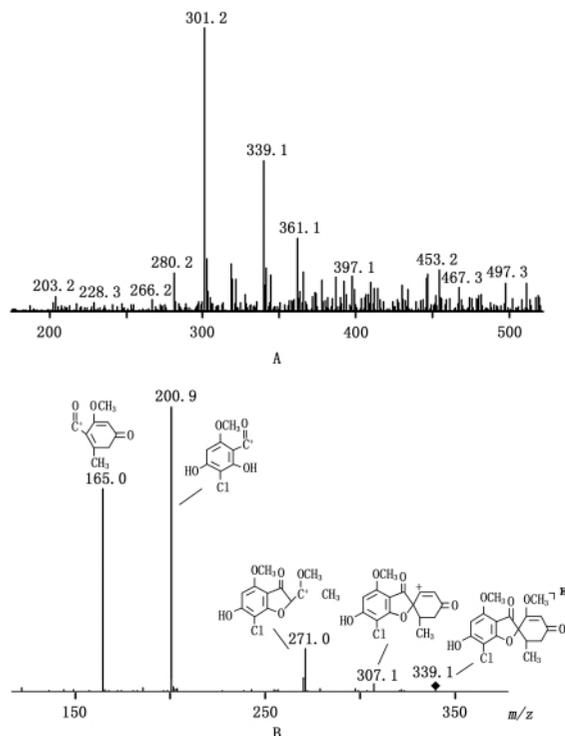


图5 6-去甲灰黄霉素的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图  
Fig 5 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of 6-demethylgriseofulvin

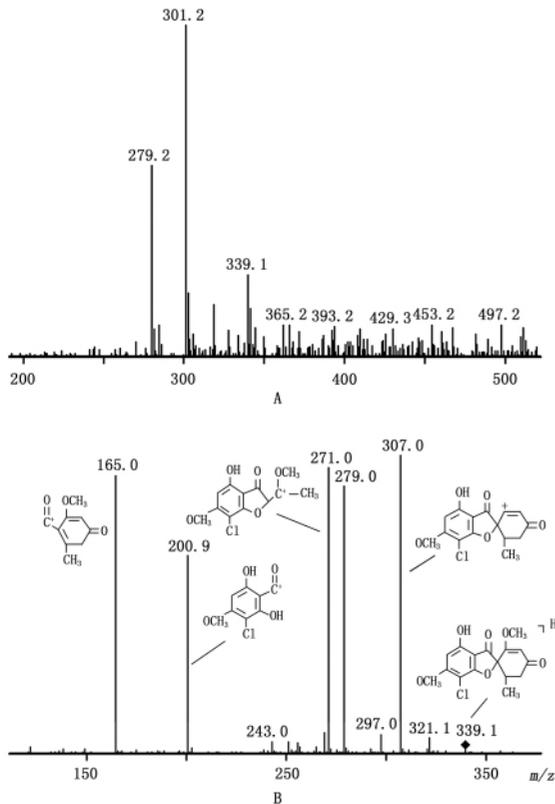


图6 4-去甲灰黄霉素的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图

Fig 6 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of 4-demethylgriseofulvin

结构类似物中的2',3'-二酮系统一致,推断该杂质为灰黄霉素。

**3.2.5 异灰黄霉素的鉴定** 在灰黄霉素溶液的色谱图中,保留时间为30.6 min处有一杂质峰(峰6),对该杂质进行质谱分析,其一级全扫描质谱图(图8-A)显示准分子离子([M+H]<sup>+</sup>) m/z为353,与灰黄霉素相同。进行二级全扫描分析(图8-B),因结构中存在2'-羰基,易发生脱水反应。其质谱断裂规律与Ballantine等人<sup>[6]</sup>所述3'-烯2',3'-二酮系统一致,推断该杂质为异灰黄霉素。

**4 讨论**

**4.1 鉴于液相色谱-质谱联用技术**,尤其是离子阱多级质谱在化合物定性分析方面具有较高的专属性、灵敏度等特点<sup>[7-10]</sup>,本文采用该项技术对灰黄霉素中6个杂质进行了结构归属鉴定。实验中考察了不同的流动相系统对灰黄霉素中杂质测定的影响,通过对缓冲盐种类及不同pH的比较,建立了适于液相色谱-质谱分析的色谱系统。研究表明,流动相pH的变化对前2个组分(即图1中

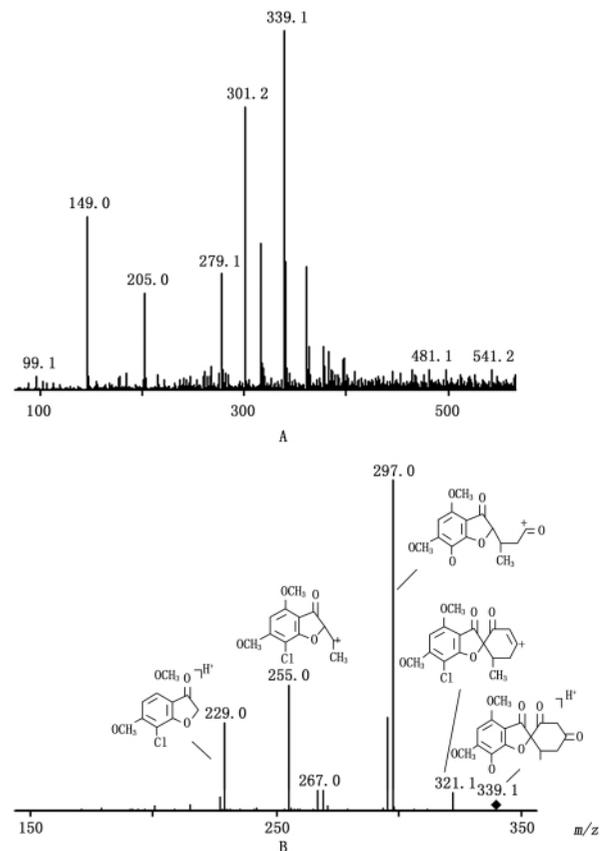


图7 灰黄霉素酸的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图

Fig 7 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of griseofulvic acid

保留时间分别为9.5 min和11.3 min的2个峰)保留时间影响较大,对其余4个待测物几乎无影响。本实验分别考察了pH 3.7,4.0,4.5,5.0,7.8对分离的影响。随着流动相pH增大,前2个组分的保留时间均呈减小趋势,在醋酸铵缓冲溶液系统下,pH 4.5对灰黄霉素及其中各杂质分离效果最佳。

**4.2 经质谱分析**,图1中前3个待测物(保留时间分别为9.5,11.3,14.7 min)的准分子离子([M+H]<sup>+</sup>) m/z均为339,为同分异构体。其中,11.3 min组分的色谱保留时间受流动相pH影响较大,且其质谱断裂规律与Ballantine等人<sup>[6]</sup>所述灰黄霉素结构类似物中的螺-环己二酮类一致,故推断其为灰黄霉素酸。其余两组分的准分子离子及主要碎片离子(除m/z 165相同)均与灰黄霉素母体相差14,推断为去甲灰黄霉素,且去甲基化反应发生在苯环上。鉴于4位去甲基后所形成的羟基易与3位羰基形成氢键,多以分子形式存在;而6位去甲基后所形成的

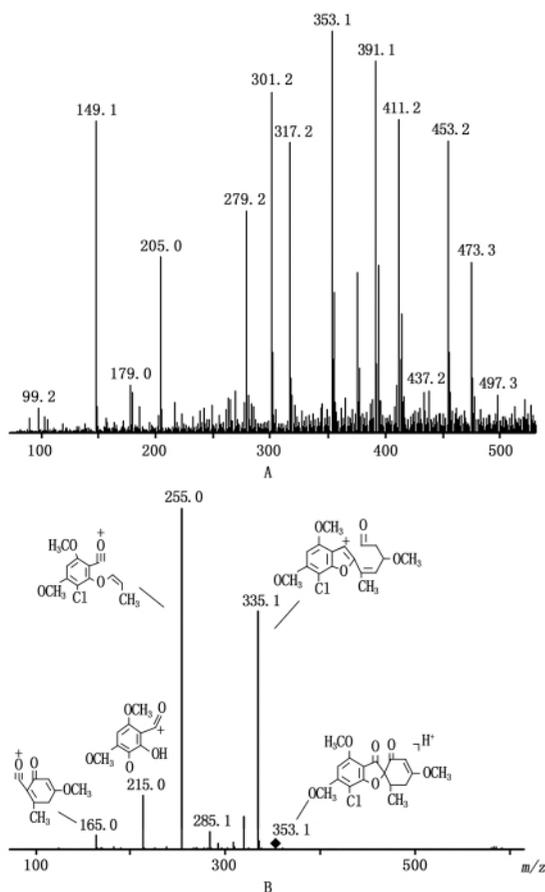


图8 异灰黄霉素的一级(A)和二级(B)全扫描质谱图

Fig 8 Full scan MS (A) and MS<sup>2</sup>(B) spectra of isogriseofulvin

羟基在邻位氯原子的吸电作用下易脱氢,极性强于前者,在 C<sub>18</sub>反相系统下保留时间短,且其色谱行为受流动相 pH 影响较大,故推断保留时间 9.5 和 14.7 min 的 2 个组分分别为 6-去甲灰黄霉素和 4-去甲灰黄霉素。

参考文献

1 Oxford AE, Raistrick H, Simonart P. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C(17) H(17) O(6) Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem J*, 1939, 33 (2): 240

2 YANG Han-chu(杨汉初). Determination of the apparent particle size of griseofulvin by specific surface area method (比表面积法测定灰黄霉素粒度的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1992, 12(6): 342

3 ZHONG Da-fang(钟大放). *Drug Metabolism*(药物代谢). Beijing(北京): China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 1996. 61

4 Florey K. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol 8. New York: Academic Press, 1979. 219

5 ChP(中国药典). 2010. Vol II(二部): 259

6 Ballantine JA, Fenwick RG. The mass spectra of griseofulvin analogues. Characteristic fragmentation processes in the mass spectra of spiro-cyclohexenones and spiro-cyclohexanones containing the griseofulvin skeleton. *Org Mass Spectrom*, 1969, 2: 1145

7 GU Jing-kai(顾景凯), ZHONG Da-fang(钟大放), JIANG Hao(姜浩) et al. Identification of estazolam and its major metabolite in biological samples using electrospray ion trap mass spectrometry(用电喷雾离子阱质谱法分析生物样品中艾司唑仑及其主要代谢物). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1999, 19(3): 150

8 WANG Ke(王柯), HU Qing(胡青), CUI Yi-ling(崔益玲) et al. Detection of 28 chemical drugs added illegally into slimming traditional Chinese medicines and health food by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry method(液相色谱-离子阱质谱联用检测减肥类中药及保健食品中 28 种非法添加药物的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(8): 1268

9 WANG Ying(王颖), SHENG Long-sheng(盛龙生), ZHANG Zheng-xing(张正行) et al. Determination of related substances in epirubicin by using LC/ESI/MS(表阿霉素中有关物质的 LC/ESI/MS 分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2001, 21(6): 392

10 HU Zeng-feng(胡增峰), HUANG Rong-qing(黄荣清), XIAO Bing-kun(肖炳坤) et al. Online hyphenation of LC-NMR-MS and its application in metabolites identification(LC-NMR-MS 联用技术及其在代谢物结构研究中的应用). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(4): 637

(本文于 2010 年 12 月 30 日收到)