

注射用苯磺顺阿曲库铵有关物质的 LC-MS 初步鉴定

张璐^{1,2}, 强淑萍¹, 张云静¹, 王磊², 张晓飞², 杭太俊^{1*}

(¹中国药科大学药物分析学教研室,南京 210009; ²东英(江苏)药业有限公司,南京 210019)

摘要 采用高效液相色谱-高分辨质谱联用技术对注射用苯磺顺阿曲库铵中有关物质进行初步结构鉴定。采用 SEPAX GP-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 水-乙腈-甲醇-甲酸 (650: 175: 175: 10, 1.010 L 中含甲酸铵 1.3 g) 流动相等度洗脱, 对注射用苯磺顺阿曲库铵有关物质进行分离; 采用 LC/TOF-MS 测定各有关物质的准确质量, 电喷雾离子化 LC-MS/MS 进行结构解析。共检测出 11 个有关物质, 其中 7 个的含量在 0.1% 以上, 并初步鉴定了它们的结构, 其中 5 个有关物质在已有药典标准中未明确规定。

关键词 苯磺顺阿曲库铵; 有关物质; 结构鉴定; LC/TOF-MS; LC-MS/MS

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)01-0065-08

Preliminary identification of the related substances in cisatracurium besylate for injection by LC-MS

ZHANG Lu^{1,2}, QIANG Shuping¹, ZHANG Yunjing¹, WANG Lei², ZHANG Xiaofei², HANG Taijun^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Dongying (Jiangsu) Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210019, China

Abstract Hyphenated methods of chromatography and high resolution mass spectrometry were established for the identification of the related substances in cisatracurium besylate for injection. The analysis was conducted on SEPAX GP-C₁₈ column by isocratic elution using a mixture of water, acetonitrile, methanol, formic acid and ammonium formate in the ratio of 650: 175: 175: 10: 1.3 as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The related substances were detected and identified by LC/TOF-MS and LC-MS/MS with acetonitrile aided electrospray ionization. Eleven related substances were found in cisatracurium besylate for injection, seven of which had the area normalization content of over 0.1%. Based on the structural characterization of the text sample, the formula were speculated through the exact mass obtained by LC/ESI-TOF-MS using Mass Hunter software. All the related substances were preliminarily elucidated using the spectra as well as the organic reaction mechanisms, five of which were not listed in the corresponding monographs of official pharmacopoeias.

Key words cisatracurium besylate; related substances; structural identification; LC/TOF-MS; LC-MS/MS

注射用苯磺顺阿曲库铵的主要成分为苯磺顺阿曲库铵, 化学名为(1R, 1'R, 2R, 2'R)-2, 2'-(3, 11-二氧代-4, 10-二氧十三烷撑)二(1, 2, 3, 4-四氢-6, 7-二甲氧-2-甲基-1-藜芦基异喹啉)二苯磺酸盐。阿曲库铵有 4 个手性原子, 并且分子结构对称, 因此有 10 种立体异构体^[1]。顺式阿曲库铵(cisatracurium, 图 1)是阿曲库铵的顺式异构体, 它与阿曲库铵具有相似的肌松效应和代谢方

式, 其效能强于阿曲库铵^[2], 是近年来临床麻醉中最常用的中时效非去极化肌松药之一^[3-4]。美国药典(USP32-NF27)、英国药典(BP2010)和欧洲药典(EP7.0)^[5-7]均收录了苯磺酸阿曲库铵, 规定采用含有非挥发性缓冲盐的流动相梯度洗脱对其有关物质进行检查, 并提供了可能存在的部分有关物质的化学结构式及名称; 但是, 苯磺顺阿曲库铵未见收载。《中华人民共和国药典:

二部》(2010年版)^[8]收載了苯磺順阿曲庫銨及注射用苯磺順阿曲庫銨,對有關物質總量和部分單個有關物質含量限度進行控制,但是缺乏杂质对照品和典型色譜行為參照。根據人用藥物註冊技術要求國際協調會(ICH)要求^[9],對藥物中含量大於0.1%的杂质要進行定性研究。因此,研究注射用苯磺順阿曲庫銨有關物質,並進行結構分析或歸屬,對保障其臨床使用的安全性和有效性十分必要。

1 材料

1.1 藥品與試劑

注射用苯磺順阿曲庫銨[批號:20110501-1,東英(江蘇)藥業有限公司];乙腈、甲醇(色譜純,美國Merck公司);其餘試劑均為市售分析純。

1.2 儀器

Chromaster 5430高效液相色譜儀(日本日立公司);1260 Infinity液相色譜-6224飛行時間質譜儀,MassHunter Qualitative Analysis B.04.00數據處理系統(美國Agilent公司);TSQ Quantum Ultra AM型LC-MS/MS聯用儀,Xcalibur 1.2數據處理系統(美國Thermo Finnigan公司);Milli-Q超純水機(美國Millipore公司)。

2 方法

2.1 色譜/質譜條件

2.1.1 色譜條件 SEPAK GP-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)色譜柱,水-乙腈-甲醇-甲酸(650:175:175:10,1.010 L中含甲酸銨1.3 g)流動相等度洗脫;柱溫:35 °C;流速:1.0 mL/min;進樣量:20 μL;檢測波長:280 nm。

2.1.2 質譜條件 采用電噴霧離子化方法正離子檢測。TOF-MS測定的噴霧電壓4 kV,霧化氣壓力 2.76×10^5 Pa,流量10 L/min,溫度350 °C,碎片電壓200 V,參比離子 m/z 121.050 8和922.009 8,質量掃描範圍 m/z 100~1 200。MS/MS測定的噴霧電壓5 kV,霧化氣壓力 3.10×10^5 Pa,輔助氣壓力 1.38×10^5 Pa,毛細管溫度350 °C,二級質譜碰撞氣氮氣壓力0.17 Pa,碰撞能量25 eV。柱後分流,0.2 mL/min進入質譜檢測,同時用0.2 mL/min乙腈ESI鞘液輔助質譜離子化。

2.2 供試品溶液的制備

取注射用苯磺順阿曲庫銨適量,加流動相溶解並稀釋成質量濃度大約為0.5 mg/mL的溶液,濾過,取續濾液作為供試品溶液。

3 結果和討論

3.1 有關物質檢查圖譜與數據

將供試品溶液按“2.1.1”和“2.1.2”項下色譜與質譜條件,利用LC/TOF-MS和LC-MS/MS分別採用全掃描質譜和子離子二級質譜對樣品進行檢測。獲得注射用苯磺順阿曲庫銨的DAD圖(圖略)、總離子流圖(圖2)及二級質譜圖。根據HPLC-UV測得各有關物質保留時間从小到大順次編號,顯示11個主要有關物質峰,其中7個(峰1、2、4、6、8、10和11)的含量大於0.1%。

3.2 有關物質的實驗式鑑定

根據本品結構特徵,對LC/ESI-TOF-MS測得各有關物質正離子的準確質量,通過Mass Hunter軟件進行有關物質的實驗式鑑定(設置C、H、O、N組成限度分別為60、120、30和5,質量偏差限度為3)。結果(表1)表明,注射用苯磺順阿曲庫銨中的主要有關物質為其中間體、結構單元以及它的同分異構體。

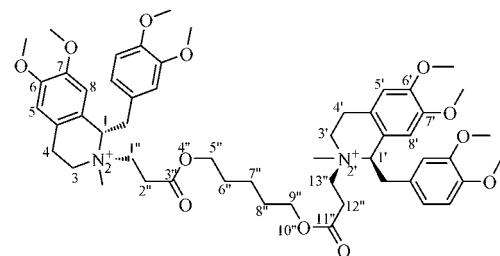


Figure 1 Structure of cisatracurium

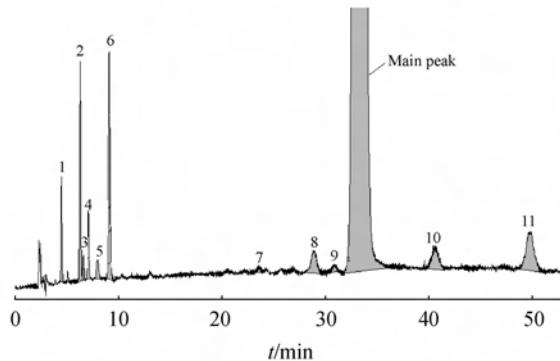


Figure 2 Total ion current (ESI⁺) chromatogram of the related substances in cisatracurium besylate for injection by LC/TOF-MS

Table 1 Related substances of cisatracurium besylate preliminarily elucidated by LC/TOF-MS and LC-MS/MS

Peak No.	t_R /min	Ion mass found/ (m/z)	Ionic formula	Ion mass calculated/ (m/z)	Product ions/ (m/z)	Proposed chemical structures	Conformation*
cisatracurium	33.48	464.253 9 [M] ²⁺	[C ₅₃ H ₇₂ N ₂ O ₁₂] ²⁺	464.253 7	370,358,327,307, 244,189,165,151	See Figure 1	cis-
1	4.79	430.221 7 [M] ⁺	[C ₂₄ H ₃₂ NO ₆] ⁺	430.222 4	370,327,189,165, 151,116		cis-
2	6.61	358.201 1 [M + H] ⁺	[C ₂₁ H ₂₈ NO ₄] ⁺	358.201 3	206,189,151		-
3	6.94	444.238 7 [M] ⁺	[C ₂₅ H ₃₄ NO ₆] ⁺	444.238 1	370,327,189,165, 151,130		trans-
4	7.40	444.237 7 [M] ⁺	[C ₂₅ H ₃₄ NO ₆] ⁺	444.238 1	370,327,189,165, 151,130		cis-
5	8.23	516.294 8 [M] ⁺	[C ₂₉ H ₄₂ NO ₇] ⁺	516.295 6	412,370,327,202, 189,165,151		trans-
6	9.40	516.295 7 [M] ⁺	[C ₂₉ H ₄₂ NO ₇] ⁺	516.295 6	412,370,327,202, 189,165,151		cis-
7	23.88	472.250 7 [M] ²⁺	[C ₅₃ H ₇₂ N ₂ O ₁₃] ²⁺	472.2512	343,315,307,189, 244,151		cis-, trans- or cis-trans
8	29.12	464.253 6 [M] ²⁺	[C ₅₃ H ₇₂ N ₂ O ₁₂] ²⁺	464.2537	370,358,327,307, 244,189,165,151		cis-trans

(Continued)

Peak No.	t_R /min	Ion mass found/(m/z)	Ionic formula	Ion mass calculated/(m/z)	Product ions/(m/z)	Proposed chemical structures	Conformation*
9	31.07	471.242 6 [M] ²⁺	[C ₅₃ H ₇₀ N ₂ O ₁₃] ²⁺	471.243 3	341,313,307,151		cis-,trans- or cis-trans
10	40.90	456.237 2 [M+H] ²⁺	[C ₅₂ H ₆₈ N ₂ O ₁₂] ²⁺	456.238 1	342,327,299,189,165,151		cis- or trans-
11	50.13	570.306 5 [M] ⁺	[C ₃₂ H ₄₄ NO ₈] ⁺	570.306 1	370,327,256,189		cis-

*: Conformations were determined referring to EP 7.0^[7]

3.3 有关物质的质谱解析与结构推定

注射用苯磺顺阿曲库铵及其部分有关物质结构中均含季铵离子基团,电喷雾离子化时可形成[M]²⁺或[M]⁺离子;另有部分有关物质结构中含有叔胺基团,则在电喷雾离子化时可形成[M+H]²⁺或[M+H]⁺离子。根据所测得各有关物质的母离子及其二级质谱碎片离子进行解析,并参照欧洲药典(第7版)^[7]关于苯磺酸阿曲库铵的系统适用性试验及可能的有关物质结构,可对本品中各有关物质的结构进行初步鉴定。

顺阿曲库铵与有关物质峰8:ESI-MS测得顺阿曲库铵C₅₃H₇₂N₂O₁₂²⁺母离子[M]²⁺的m/z为464,其二级质谱中主要产生的碎片离子为m/z 370、358、327、307、244、189、165和151(图3)。顺阿曲库铵[M]²⁺离子的二级质谱裂解途径见图4。

母离子中的1个四氢吡啶环的逆狄-阿反应开环裂解分别形成含有2个季铵基团的双电荷碎片离子m/z 307和含有1个季铵基团的单电荷碎片离子m/z 244。母离子中四氢吡啶环的开环裂解还形成不含氮原子的特征碎片离子m/z 327,进一步断裂形成m/z 189、165的特征单电荷

碎片离子。结构中与四氢异喹啉N相连支链的价键断裂,则形成m/z分别为370和358的具有藜芦基异喹啉母核结构单元特征的单电荷含氮碎片离子。m/z 358进一步断裂形成m/z 151的特征单电荷碎片离子。有关物质峰8具有与顺阿曲库铵峰完全相同的母离子和二级碎片离子(图4)。参考欧洲药典(第7版)^[7]苯磺酸阿曲库铵标准中所列出的可能有关物质结构,确证其为阿曲库铵的顺-反异构体。

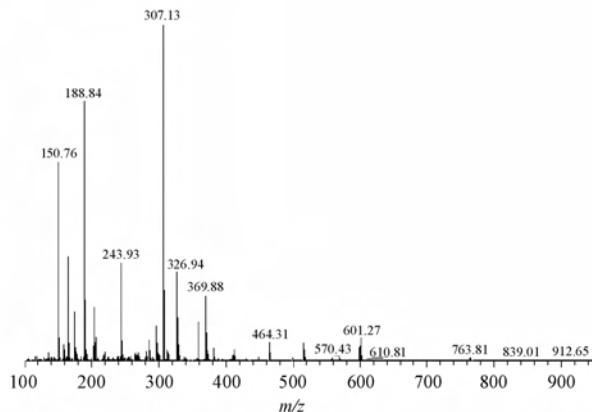


Figure 3 Product ion scan of m/z 464 ion of cisatracurium

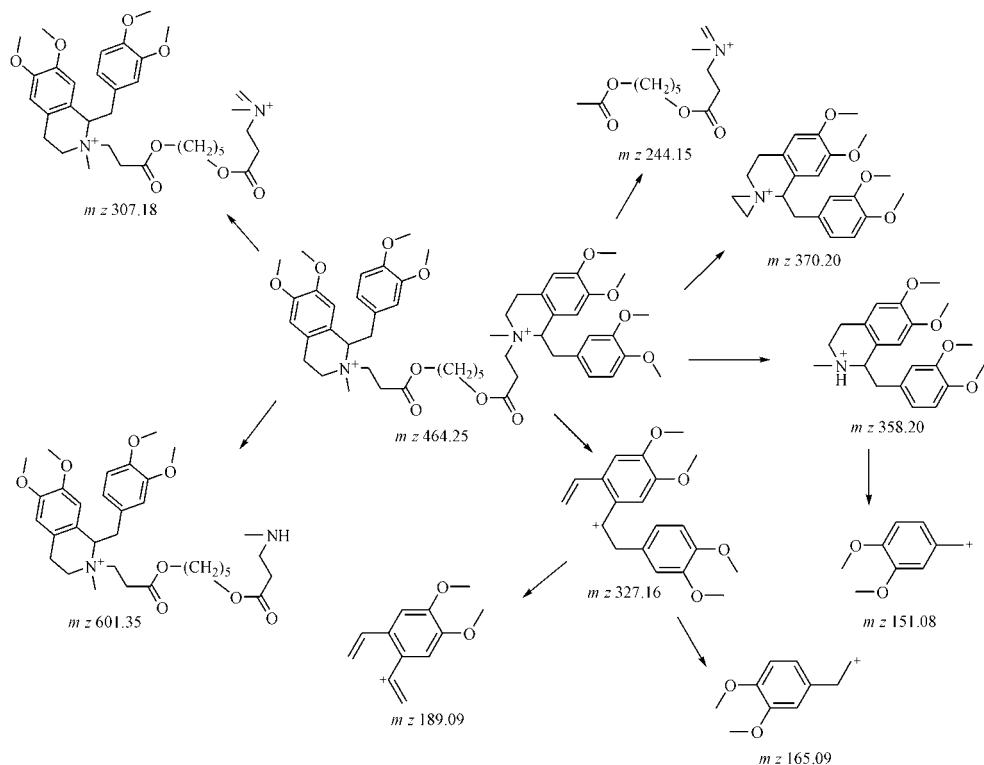


Figure 4 Proposed fragmentation pathways of cisatracurium and impurity peak 8

有关物质峰 1:LC/TOF-MS 确定其离子组成为 $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_6^+$, 碎片离子 m/z 370、327、189、165 和 151 与顺阿曲库铵二级质谱中的特征碎片离子相同, 说明也具有藜芦基异喹啉的母核, 推测其可能为顺阿曲库铵结构中酯键断裂形成的单季铵离子产物, m/z 116 为其特征碎片离子, 为结构中四氢吡啶环的逆狄-阿反应开环裂解形成(图 5)。并参考欧洲药典^[7], 确证有关物质峰 1 为 3-[1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉]丙酸盐。

有关物质峰 2:LC/TOF-MS 确定其离子组成为 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{NO}_4^+$, 比顺阿曲库铵的相对分子质量少 572, 推断由顺阿曲库铵主要结构单元脱落形成。 m/z 206 为其特征碎片离子, 为结构中四氢异喹啉环上与碳相连的取代基断裂形成(图 6)。并参考欧洲药典^[7], 确证有关物质峰 2 为 1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

有关物质峰 3 和 4:LC/TOF-MS 确定两者离子组成为 $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{NO}_6^+$, 比有关物质峰 1 的相对分子质量多 14。两者碎片离子相同, 推测有关物质峰 3 和 4 在结构上为有关物质峰 1 的甲酯化物。 m/z 130 为其特征碎片离子, 为结构中四氢吡啶环的逆

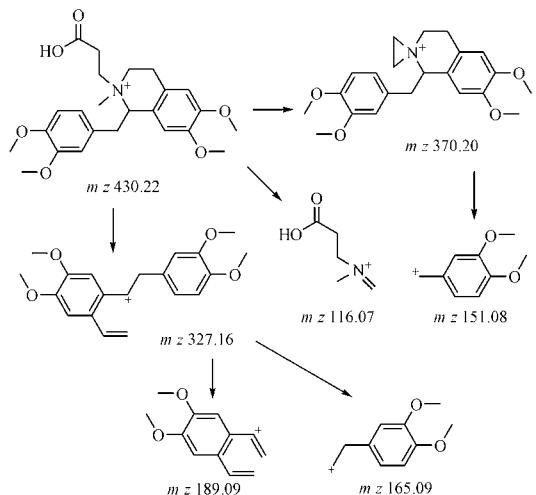


Figure 5 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 1

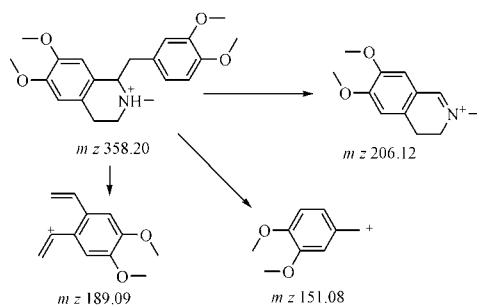


Figure 6 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 2

狄-阿反应开环裂解形成(图7)。综上,有关物质峰3和4为3-[1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉]甲基丙酸酯的一对顺反异构体,在已有药典标准中未明确规定。根据欧洲药典^[7]苯磺酸阿曲库铵有关物质检查项下各有关物质相对保留时间的先后顺序,顺式化合物较其反式结构有更强的色谱保留。故推断有关物质峰3为反式异构体,有关物质峰4为顺式异构体。

有关物质峰5和6:LC/TOF-MS确定两者离子组成为 $C_{29}H_{42}NO_7^+$,比顺阿曲库铵的相对分子质量少413,推测其为顺阿曲库铵结构中保留1个酯键,而另一酯键断裂形成的羟基化合物。两者碎片离子相似,特征碎片离子 m/z 202为结构中四氢吡啶环的逆狄-阿反应开环裂解形成。 m/z 412为结构中酯键断裂并与二甲氧基苄基环合形成(图8)。推测有关物质峰5和6为1-(3,4-二甲氧基苄基)-2-[3-(5-羟戊基)氧]3-氧丙基]-6,7-二甲氧

基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉的一对顺反异构体,按前述色谱保留规律,推断有关物质峰5为反式异构体,有关物质峰6为顺式异构体。

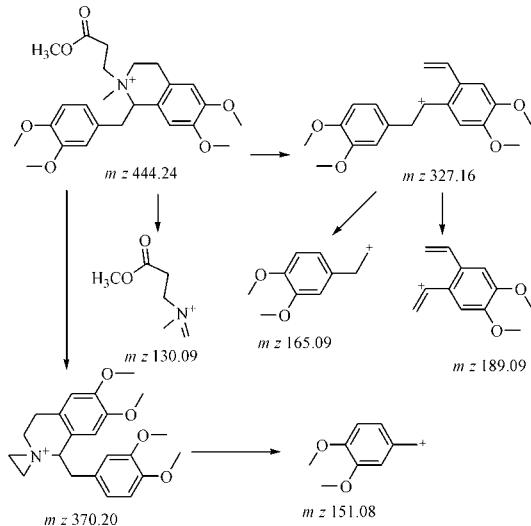


Figure 7 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 3 and 4

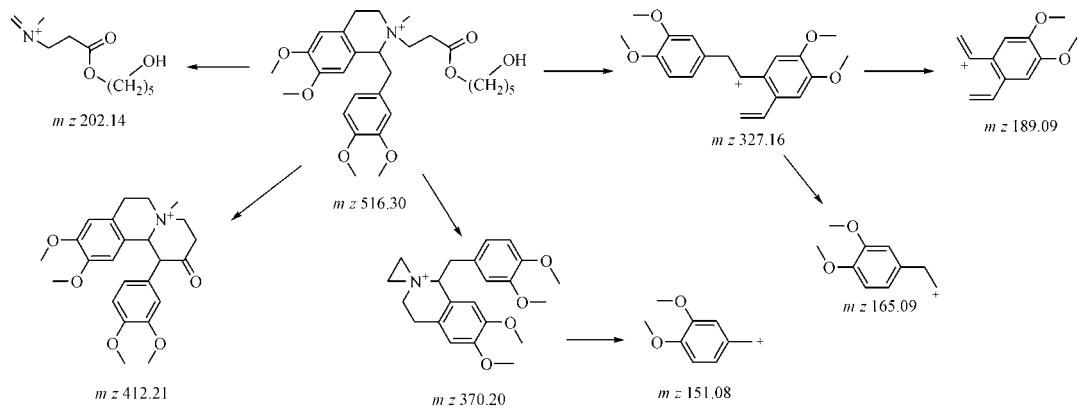


Figure 8 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 5 and 6

有关物质峰7:LC/TOF-MS确定其离子组成为 $C_{53}H_{72}N_2O_{13}^{2+}$,比顺阿曲库铵的相对分子质量多16,推测其为顺阿曲库铵结构中苯环羟基化的产物,在已有药典标准中未明确规定,酚羟基的具体取代位置有待进一步确定。特征碎片离子 m/z 343为母离子中含酚羟基的1个四氢吡啶环的逆狄-阿反应开环裂解形成, m/z 315为结构中含酚羟基的四氢吡啶环开环断裂形成,其裂解途径见图9。

有关物质峰9:LC/TOF-MS确定其离子组成为 $C_{53}H_{70}N_2O_{13}^{2+}$,比顺阿曲库铵的相对分子质量多14,推测其为顺阿曲库铵结构中苯环羟基化且四氢异喹啉环脱氢的产物,在已有药典标准中未明确规定,酚羟基的具体取代位置有待进一步确定。特征

碎片离子 m/z 341和313分别为结构中含酚羟基和结构中不含酚羟基的四氢吡啶环开环断裂形成,其裂解途径见图10。

有关物质峰10:LC/TOF-MS确定其离子组成为 $C_{52}H_{68}N_2O_{12}^{2+}$,比顺阿曲库铵的相对分子质量少16,推测其为顺阿曲库铵结构中脱 CH_2 和 H_2 形成。特征碎片离子 m/z 299为结构中四氢异喹啉环开环断裂形成, m/z 342为结构中二氢异喹啉N相连支链的价键断裂形成,其裂解途径见图11。推测有关物质峰10为1-(3,4-二甲氧基苄基)-2-{3-{5-[1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉-2-烷基]丙酰氧基}戊氧基}-{3-氧丙基}-6,7-二甲氧基-1,2-二氢异喹啉,

在已有药典标准中未明确规定。

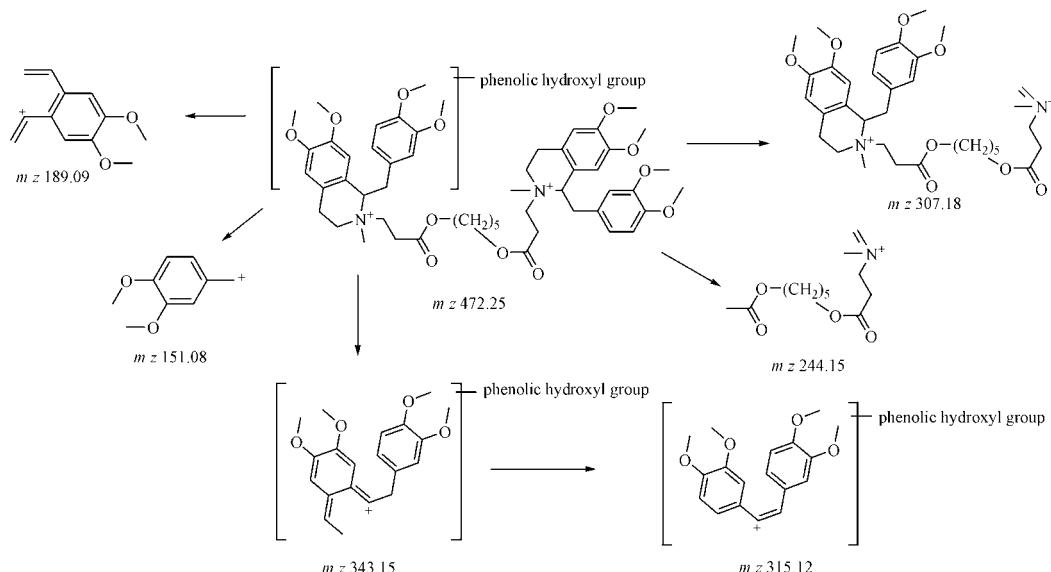


Figure 9 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 7

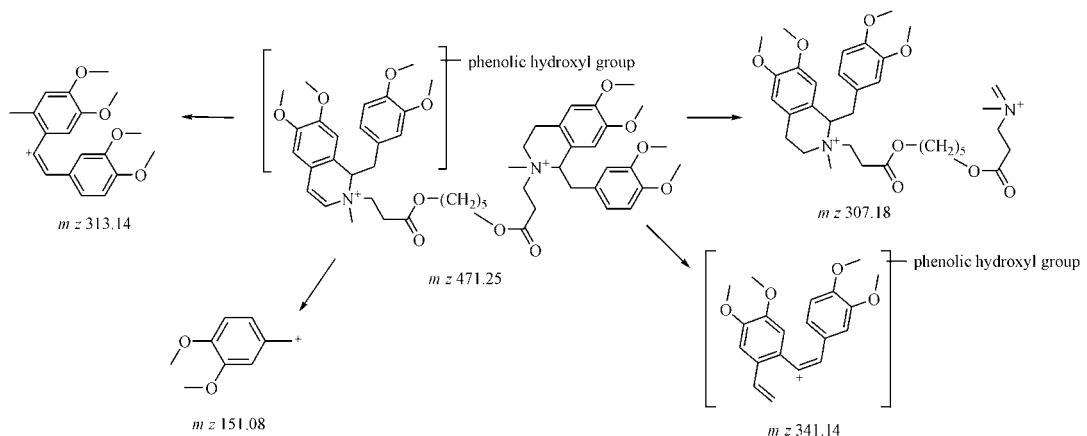


Figure 10 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 9

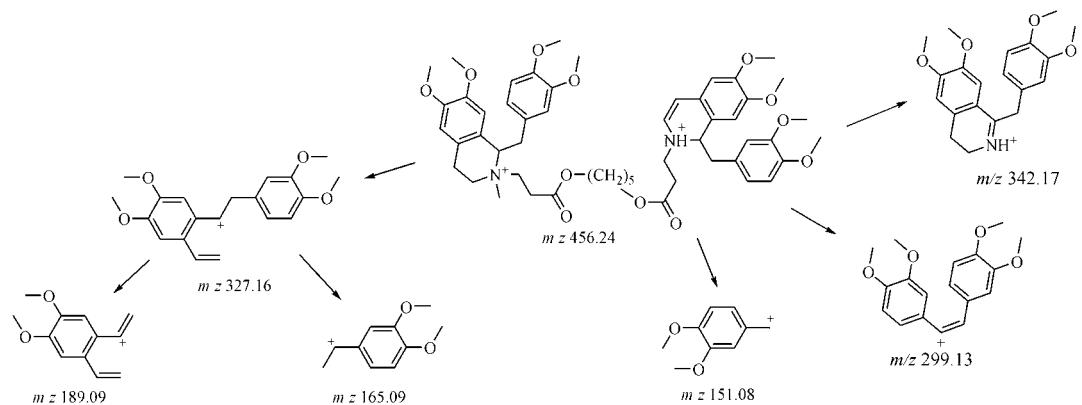


Figure 11 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 10

有关物质峰 11:LC/TOF-MS 确定其离子组成为 $C_{32}H_{44}NO_8^+$, 比顺阿曲库铵的相对分子质量少

359, 碎片离子 m/z 370、327、256、189 均与顺阿曲库铵二级质谱中的特征碎片离子相同, 推测其为顺

阿曲库铵分子中一个四氢异喹啉 *N* 相连支链的价键断裂形成, 其裂解途径见图 12。并参考欧洲药典^[7], 确证有关物质峰 11 为 1-(3,4-二甲氧基苯

基)-2-(3,11-二氧代4,10-二氧十三烷-12-烯烃)-6,7-二甲氧基-2-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

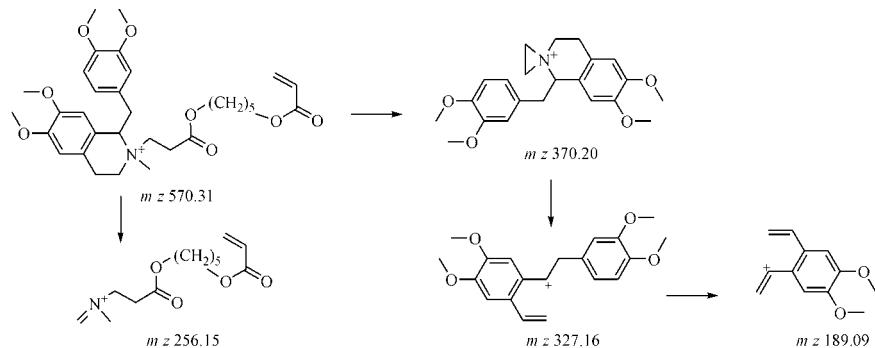


Figure 12 Proposed fragmentation pathways of impurity peak 11

4 结论

建立的高效液相色谱-高分辨质谱联用方法, 通过鞘液乙腈辅助提高电喷雾检测的灵敏度, 能够检测出注射用苯磺顺阿曲库铵中的 11 个可能的有关物质。通过测得各杂质峰的质谱与解析, 结合欧洲药典(第 7 版)苯磺酸阿曲库铵标准中所规定的可能有关物质结构比对, 直接鉴定或间接推断了检测到的所有有关物质结构, 其中峰 3、4、7、9 和 10 相应有关物质在已有药典标准中均未收载。本实验结果为注射用苯磺顺阿曲库铵的质量控制和工艺优化提供了参考依据。

参考文献

- [1] Błażewicz A, Fijałek Z, Warowna-Grzeskiewicz M, et al. Determination of atracurium, cisatracurium and mivacurium with their impurities in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with charged aerosol detection [J]. *J Chromatogr A*, 2010, **1 217**(8):1 266 – 1 272.
- [2] Long Y, Li ZM, Yi LQ. Progress in the study of the new muscle relaxants-rapacuronium, rocuronium and cisatracurium [J]. *Henan Med Res* (河南医学研究), 2006, **15**(3):267 – 271.

- [3] Gao CQ, Wei YL, Qin LG. Determination of *R*-*S*-isomer and *S*-*S*-isomer of cisatracurium besilate by high performance liquid chromatography [J]. *Chem Res* (化学研究), 2010, **21**(1):80 – 82.
- [4] Gong TW. Research status and prospects of cisatracurium [J]. *Med J West China* (西部医学), 2012, **24**(5):1 011 – 1 014.
- [5] United States Pharmacopeial Convention. *USP32-NF27 (U. S. Pharmacopeia 32- National Formulary 27)* [S]. Washington: The United States Pharmacopeial Convention, 2009;1 603.
- [6] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia 2010 edition* [S]. London: The Stationery Office, 2009;187 – 190.
- [7] European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM). *European Pharmacopoeia 7.0 edition* [S]. Strasbourg: Council of Europe, 2010;1 425 – 1 427.
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 2(中华人民共和国药典:二部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010;447.
- [9] ICH Steering Committee. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Impurities in new drug substances, Q3A (R2) [EB/OL]. (2006-10-25) [2013-1-14]. http://www. ich. org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf.