UPLC-MS/MS 法研究紫杉醇及其注射液的杂质谱

张才煜, 李 婕, 高家敏, 张启明*, 施亚琴*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 本文采用超高效液相−三重四级杆质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 对国内多个生产企业的紫杉醇原料与注射液的有关物质及杂质谱进行了深入研究, 对紫杉醇及杂质的质谱裂解规律进行了分析与总结。采用对紫杉醇乙醇溶液进行酸、碱、氧化、光照等强制降解实验对紫杉醇原料与注射液中的降解杂质进行分析, 该方法模拟了紫杉醇注射液的处方, 但避免了其中辅料聚氧乙基蓖麻油的基质干扰, 降解杂质基本涵盖了紫杉醇注射液中所有的杂质。本文共推定了杂质 10 个, 分别为三尖杉宁碱 (cephalomannine, **1**)、7-表-10-脱乙酰紫杉醇 (7-epi-10-deacetylpaclitaxel, **2**)、7-表紫杉醇 (7-epi-paclitaxel, **3**)、巴卡汀 (baccatin Ⅲ, **4**)、侧链乙酯化合物 (ethyl ester side chain, **5**)、7-表巴卡汀 (7-epi-baccatin Ⅲ, **6**)、10-脱乙酰紫杉醇 (10-deacetylpaclitaxel, **7**)、紫杉醇 C3-C11 桥联异构体 (paclitaxel isomer, C3-C11 bridge, **8**)、紫杉醇异构体 (paclitaxel isomer, **9**) 和 *N*-苯甲酰-(2*R*,3*S*)-3-苯基异丝氨酸 [*N*-benzoyl-(2*R*,3*S*)-3-phenylisoserine, **10**], 其中 **1**～**3** 为工艺杂质, 紫杉醇乙醇溶液酸降解产生的主要杂质为 **3**～**7**, 碱降解产生的主要杂质为 **2**～**7**、**10**, 氧化降解产生的主要杂质为 **7**, 高温降解产生的主要杂质为 **3**～**5**、**7**, 光照产生的主要降解杂质为 **2**～**5** 及本文首次报道的 **9**, 原料直接光照产生的主要杂质为 **8**, 该研究成果对于国内紫杉醇及其注射液的工艺研究、质量控制与评价有较大的意义。

关键词: 紫杉醇; 杂质谱; UPLC-MS/MS; 7-表巴卡汀; 紫杉醇异构体

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870 (2016) 06-0965-07

The impurity profiling of paclitaxel and its injection by UPLC-MS/MS

ZHANG Cai-yu, LI Jie, GAO Jia-min, ZHANG Qi-ming*, SHI Ya-qin*

(*National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China*)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) method was developed to elucidate the impurity profiles of paclitaxel and paclitaxel injections from different Chinese pharmaceutical companies. The fragmentation patterns for paclitaxel and the related impurities were analyzed and summarized. To remove the interference from auxiliary materials, such as hydrogenated castor oil, paclitaxel was dissolved in ethanol for acid, base, peroxide, and light induced forced degradation analysis, which could produce all the impurities exist in the paclitaxel injection. A total of 10 impurities were characterized, such as cephalomannine (**1**), 7-epi-10-deacetylpaclitaxel (**2**), 7-epipaclitaxel (**3**), baccatin III (**4**), ethyl ester side chain (**5**), 7-epi-baccatin III (**6**), 10-deacetylpaclitaxel (**7**), paclitaxel isomer (C3-C11 bridge) (**8**), paclitaxel isomer (**9**), and *N*-benzoyl-(2*R*,3*S*)-3-phenylisoserine (**10**), respectively. Among them, compounds **1**−**3** could be introduced during manufacture processing. In the forced degradation studies, while acid induced degradation products included **3**−**7**, base induced degradation could produce **2**−**7** and **10**; while **7** is the main compound

收稿日期: 2015-09-28; 修回日期: 2016-01-01.

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助项目 (2008BAI55B01).

*通讯作者 Tel: 86-10-67095292, E-mail: zqm@nicpbp.org.cn;

Tel: 86-10-67095760, E-mail: yaqinshi@yahoo.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0750

produced by hydrogen peroxide treatment, 4 compounds (**3**−**5** and **7**) were produced by high temperature environment and 5 compounds (**2**−**5** and **9** which is the first reported) from intensity light exposure. Furthermore, **8** was the main impurity came from intensity light exposed paclitaxel powder. The results from this study provide an important reference in processing, optimization, quality control and evaluation of paclitaxel.

Key words: paclitaxel; impurity profiling; UPLC-MS/MS; 7-epi-baccatin III; paclitaxel isomer

紫杉醇为临床常用抗癌药, 最早发现于植物红豆杉, 1970 年发现了其抗癌作用, 1992 年获得美国 FDA 批准上市[1], 我国于 1993 年开始生产紫杉醇, 目前主要来源为天然提取, 此外还有半合成与生物发酵[2], 其制剂为紫杉醇注射液。

由于紫杉醇为天然提取物, 含同系列杂质较多, 因此较合成化学药物的杂质控制难度更大。紫杉醇结构复杂, 其二萜类母环具有 11 个手性中心, 带有多个羟基、氨基等基团。强制降解实验表明, 紫杉烷类化合物对热、碱、水解等均不稳定, 易水解、手性中心易反转, 因而在制备和贮存过程中易变质, 在酸、碱或湿、热条件下极易形成差向化、脱酰基、氧化、水解等降解杂质[3]。美国药典 (38 版)、欧洲药典 (8.0 版) 等国外药典已经将紫杉醇根据来源分别规定了多个已知杂质, 施贵宝制药公司研究人员[4]于 1997 年采用液质联用的方法对紫杉醇中的降解杂质进行了研究, 鉴定了 **3**～**5**、**7**、**8** 与氧杂环丁烷开环产物 (oxetane ring opened product) 等 6 个降解杂质的结构。中国药典 (2010 版) 首次收载了该品种, 收载了杂质 **1**～**3**, 与国外药典及企业对杂质的控制水平有较大差距, 因此非常有必要对国内产品进行全面的质量研究与评价。

本文收集了国内几乎所有目前在生产的 9 个企业的紫杉醇及 15 个企业的紫杉醇注射液的产品 (包括一部分近效期的产品), 分别对原料与制剂中的杂质进行了考察, 发现制剂中杂质较多, 因此建立了快速、灵敏的超高效液相−三重四级杆质谱联用技术 (UPLC-MS/MS), 并通过强制降解实验, 对紫杉醇原料和制剂中的杂质谱进行了分析, 对紫杉醇及其杂质的质谱裂解规律与途径进行了分析与归纳, 推定了 10 个杂质的结构。该研究成果对于国内紫杉醇及其注射液的工艺研究、质量控制与评价有较大的意义。

材料与方法

仪器、试药与材料 Agilent 1100 高效液相色谱系统 (美国安捷伦公司); Waters 2690 高效液相色谱系统 (美国沃特世公司); Waters Acquity^{TM} UPLC-Quattro Premier XE QQQ 质谱仪, Acquity^{TM} PDA 检测器, Masslynx 工作站 (美国 Waters 公司); Thermo LTQ ORBITRAP XL 高分辨质谱 (美国赛默飞公司); Mettler Toledo AE240 型电子天平 (瑞士 Mettler 公司); Mettler MP230 型 pH 计 (瑞士 Mettler 公司)。乙腈、甲醇 (色谱纯, Dikma 公司), 纯水 (Millipore 超纯水系统制备)。紫杉醇原料由国内 9 家企业提供, 注射液由国内 15 家企业提供。对照品: 三尖杉宁碱 (cephalomannine, 100926-200701)、7-表-10-脱乙酰紫杉醇 (7-epi-10-deacetylpaclitaxel, 100925−200701)、7-表紫杉醇 (7-epi-paclitaxel, 100927−200701) 均来自于中国食品药品检定研究院, 巴卡汀 (baccatin Ⅲ) 与 10-脱乙酰紫杉醇 (10-deacetylpaclitaxel) 均来自于桂林辉昂药业。

HPLC 色谱条件[5] 色谱柱: Agilent Zorbax Elipse C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈−水为流动相进行梯度洗脱, 初始流动相为乙腈−水 (40∶60), 洗脱至主峰出完 (约 35 min), 然后 25 min 后, 乙腈的比例增至 80%, 接着 10 min 后, 乙腈的比例降至 40%, 保持 10 min, 流速为 1.5 mL·min^{-1}, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 227 nm, 进样体积为 10 μL。

UPLC-MS/MS 条件 色谱柱为 C_{18}, Acquity UPLC^{TM} BEH (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (0→10 min, 65%→65% A; 10→15 min, 65%→20% A; 15→16 min, 20%→65% A; 16→18 min, 65%→65% A); 流速为 0.25 mL·min^{-1}, 进样量为 3 μL。采用正离子与负离子电离方式, 毛细管电压为 2.0～3.0 kV, 样品锥孔电压为 20～30 V, 源温度 120 ℃, 脱溶剂气温度为 350 ℃, 脱溶剂气流速为 600 L·h^{-1}, 碰撞电压为 10～20 V。

样品溶液与对照溶液的制备 精密称取各企业原料或注射液适量, 加甲醇制成 0.5 mg·mL^{-1} 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 加甲醇稀释成 0.5 μg·mL^{-1} 的溶液, 作为对照溶液。

强制降解实验

贮备液 精密称取杂质含量较低的 1 号企业原料 50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙醇适量溶解, 并定

容至刻度, 摇匀, 作为强制降解实验用样品贮备液。

碱降解溶液　精密量取贮备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 0.01 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL, 30 min 后加 0.01 mol·L^{-1} 盐酸 1 mL 中和, 即得。

酸降解溶液　精密量取贮备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L^{-1} 盐酸溶液 1 mL, 16 h 后加 0.1 mol·L^{-1} 氢氧化钠 1 mL 中和, 即得。

氧化降解溶液　精密量取贮备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 3% H_2O_2 1 mL 反应 16 h 即得。

高温降解溶液　精密量取贮备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 在 70 ℃水浴中放置 7 h。

光降解溶液　精密量取贮备液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 进行光照破坏 (4 000 lux 照射 48 h)。

光降解溶液 (原料)　取原料 (1 号企业) 适量, 进行光照破坏 (4 000 lux 照射 48 h), 称取适量, 用乙醇溶解并制成 0.5 mg·mL^{-1} 的溶液。

结果与讨论

1　样品中有关物质的测定

1.1　原料药中有关物质的测定　对国内 9 家原料进行有关物质测定的结果表明杂质含量均较低, 主要存在杂质 **1**～**3**, 总杂质含量在 0.11%～0.60%之间。

1.2　紫杉醇注射液中有关物质的测定　对国内 15 家企业制剂进行有关物质检测, 测定结果表明制剂中杂质的个数与含量明显高于原料 (表 1), 特别是近效期的样品, 杂质个数较多, 个别企业杂质含量超过限度。说明紫杉醇制剂较容易发生降解, 稳定性较差。其中杂质 **3**、**4** 和 **7** 含量较高, 此外紫杉醇注射液中亦可见到明显的辅料聚氧乙基蓖麻油 (cremophor EL) 的色谱峰。

2　杂质分析与鉴定

2.1　UPLC/MS/MS 对紫杉醇原料及紫杉醇降解溶液中杂质的分析　采用建立的 UPLC-MS/MS 方法, 对紫杉醇原料样品溶液以及酸、碱、氧化、高温与光等降解溶液进行分析, 得到降解杂质 **1**～**10** 的一级与二级质谱信息。

2.2　紫杉醇的裂解途径分析　文献[6, 7]报道了紫杉醇容易发生裂解的位点与裂解规律, 在电喷雾电离条件下, 准分子离子峰为 855, *m/z* 569 是由准分子离子峰丢失完整的侧链得到, 乙基侧链的离子峰为 *m/z* 286, 在源内碰撞诱导解离条件下, 离子碎片容易丢失中性小分子 H_2O (*m/z* 18)、CH_3COOH (*m/z* 60) 和 Ph-COOH (*m/z* 122)。文献[8, 9]均报道富含氧原子的结构容易形成 $[M+Na]^+$的离子, 文献[10]报道紫杉醇在 ESI 源电离时主要得到$[M+Na]^+$与$[M+K]^+$的离子, 紫杉醇有多个含氧的基团, 本文鉴定的杂质一级质谱图中, $[M+Na]^+$亦为主要的基峰。结合参考文献[4, 11−14], 本文对紫杉醇裂解机制进行了分析与归纳, 见图 1 (以下 ScH 代表侧链, T 代表 C6-C8-C6 环)。并根据紫杉醇的裂解规律对杂质的结构进行了推测与解析。

2.3　原料中主要杂质的结构分析　原料中主要的 3 个杂质, 杂质 **1** 的准分子离子峰为 *m/z* 832 $[M+H]^+$, 主要碎片离子峰为 *m/z* 754 $[M-CH_3COOH-H_2O+H]^+$、*m/z* 569 $[M-ScH+H]^+$、*m/z* 509 $[M-CH_3COOH-ScH+H]^+$

Table 1　The detemination results of impurities in paclitaxel injections.　RRT is the relative retention time of impurity peak to the peak of paclitaxel

Company No.	Impurity/%									
	10 RRT = 0.09	**4** RRT = 0.17	**5** RRT = 0.19	**6** RRT = 0.35	**7** RRT = 0.43	**1** RRT = 0.77	**2** RRT = 0.93	**3** RRT = 1.41	Other	Total
1	−	0.30	−	−		0.07	0.06	0.15	0.23	0.80
2	−	0.06	0.03	−	0.08	0.08	0.11	0.24	−	0.59
3	−	0.24	0.10	−	0.11	0.08	0.06	0.07	0.34	1.01
4	−	−	−	−	0.20	−	0.27	0.07	0.25	0.79
5	−	2.55	1.76	−	0.39	0.08	−	0.51	0.06	5.35
6	−	0.04	−	−	0.10	−	0.41	0.14	0.06	0.74
7	−	0.03	0.02	−	0.11	−	−	0.12	0.10	0.38
8	−	0.10	0.05	−		−	−	0.05	0.16	0.37
9	−	0.19	0.10	−	0.21	−	0.14	0.17	0.39	1.20
10	−	0.02	−	−	0.22	−	−	0.08	−	0.32
11	−	0.76	0.48	0.04	0.39	0.24	−	1.22	−	3.13
12	−	0.18	0.11		0.20	−	−	−	0.14	0.63
13	0.06	0.15	0.08	−	0.24	0.04	−	0.13	−	0.71
14	−	−	−	−	0.08	−	−	0.57	0.18	0.82
15	−	0.08	0.02	−	0.09	0.18	−	0.11	−	0.48

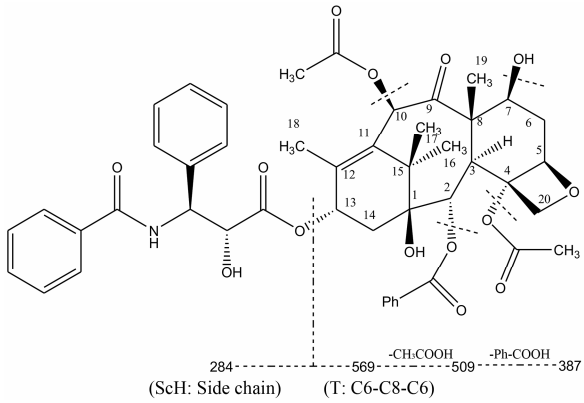

Figure 1　Proposed fragmentation pathway for paclitaxel

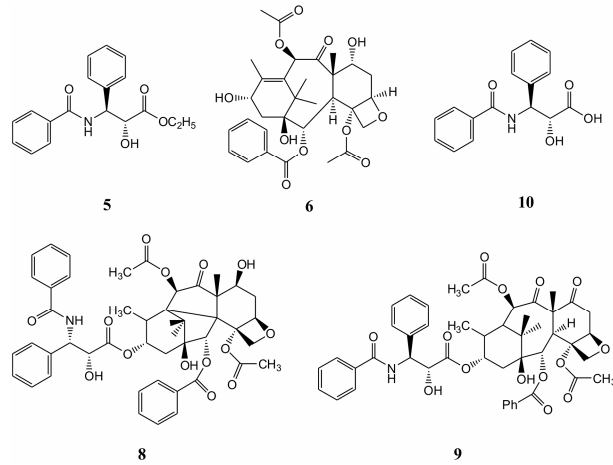

Figure 2　The chemical structures of paclitaxel impurities. Ethyl ester side chain (**5**), 7-epi-baccatin III (**6**), paclitaxel isomer (C3-C11 bridge) (**8**), paclitaxel isomer (**9**), and *N*-benzoyl-(2*R*, 3*S*)-3-phenylisoserine (**10**), impurity **9** had never been reported

与 *m/z* 264 $[M-T+H]^+$, 鉴定为三尖杉宁碱, 杂质 **1** 在侧链的结构上与紫杉醇有较大区别, 一般降解实验不能实现这种结构的变化, 因此推测为天然提取工艺中的杂质。杂质 **2** 的一级质谱加合离子峰为 *m/z* 834 $[M+Na]^+$, 杂质 **3** 的准分子离子峰为 *m/z* 854 $[M+H]^+$, 根据其主要碎片离子峰, 分别鉴定为 7-表-10-去乙酰紫杉醇与 7-表紫杉醇。推测可能是提取工艺中的天然杂质也可能为降解产物。杂质 **1**～**3** 均与相应的杂质对照品质谱图一致。

2.4　降解杂质结构分析　在强制降解实验杂质研究中, 除了在原料中已经鉴定的杂质 **2** 与 **3** 亦为降解杂质外, 还鉴定出了杂质 **4**～**10** (表 2, 图 2)。

杂质 **4**　该杂质为注射液里常见的降解杂质, 在酸、碱、光照、加热条件下, 均较容易产生, 一级质谱加合离子峰为 *m/z* 609 $[M+Na]^+$, 其碎片峰分别为 *m/z* 549 $[M-CH_3COOH+Na]^+$、*m/z* 521 $[M-CH_3COOH-H_2O+Na]^+$、*m/z* 427 $[M-CH_3COOH-Ph-COOH+Na]^+$ 与 *m/z* 367 $[M-2CH_3COOH-Ph-COOH+Na]^+$, 鉴定为巴卡汀Ⅲ, 与巴卡汀Ⅲ对照品质谱图一致。

杂质 **5**　该杂质保留时间与杂质 **4** 相邻, 且经常与杂质 **4** 同时存在, 其裂解途径推测如图 3, 其产生原因可能为紫杉醇侧链断裂产生了杂质 **4** 与乙基侧链, 同时乙基侧链可以与紫杉醇裂解产生的 CH_3COOH 反应生成紫杉醇侧链乙酯化合物, 与文献[4]报道一致。

杂质 **6**　该杂质在酸、碱、加热等条件下产生, 含量较低, ESI^+一级质谱加合离子峰为 *m/z* 609 $[M+Na]^+$, 其二级碎片峰与巴卡汀Ⅲ基本一致, 应为其同分异构体, 采用 ESI^-质谱条件进行分析, 一级质谱主要含有两个较明显的基峰, 分别为 631 与 585, 推测分别为 $[M+HCOOH-H]^-$与 $[M-H]^-$, 二级质谱与巴卡汀Ⅲ相比, 则多出 *m/z* 433 峰, 根据文献[15]报道, 所有具有 10-DAB 母核及 C-13 侧链的紫杉烷类 C-7*α* 异构体

Table 2　Data of paclitaxel impurities identified by UPLC-MS/MS

Name	M_W	Molecular formula	Sample source	Ion type/Parent ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)
Paclitaxel	854	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	Substance	$[M+H]^+$: 854	569, 509, 286
				$[M+Na]^+$: 876	591, 531, 308
Cephalomannine	831	$C_{45}H_{53}NO_{14}$	Impurity, light	$[M+H]^+$: 832	754, 569, 509, 264
7-epi-10-Deacetylpaclitaxel	811	$C_{45}H_{49}NO_{13}$	Base, impurity	$[M+Na]^+$: 834	549, 308
7-epi-Paclitaxel	854	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	Impurity, base, acid, light, warm	$[M+H]^+$: 854	794, 569, 509, 286
Baccatin Ⅲ	586	$C_{31}H_{38}O_{11}$	Base, acid, light, warm	$[M+Na]^+$: 609	549, 521, 427, 367
Ethyl ester side chain	313	$C_{18}H_{19}NO_4$	Base, acid, light, warm	$[M-H]^-$: 312	266, 238, 210
7-epi-Baccatin Ⅲ	586	$C_{31}H_{38}O_{11}$	Base, acid, warm	$[M+HCOOH-H]^-$: 631	433, 121
				$[M-H]^-$: 585	
10-Deacetylpaclitaxel	811	$C_{45}H_{49}NO_{13}$	Base, peroxide acid, light, warm	$[M+Na]^+$: 834	549, 308
Paclitaxel isomer (C3-C11 bridge)	854	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	Light (API)	$[M+Na]^+$: 876	816, 531, 308
Paclitaxel isomer (first report)	854	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	Light (paclitaxel solution in ethanol)	$[M+Na]^+$: 876	816, 531, 503, 351, 308
N-Benzoyl-(2*R*,3*S*)-3-phenylisoserine	285	$C_{16}H_{15}NO_4$	Base	$[M-H]^-$: 284	266, 238

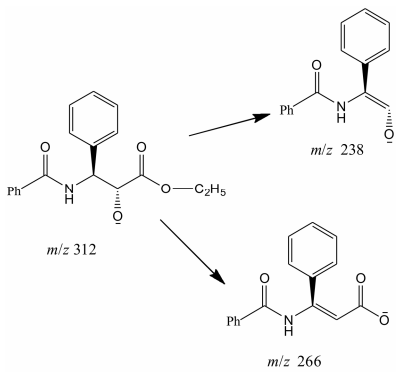

Figure 3 Proposed fragmentation pathway for impurity **5**

化合物中, *m/z* [M−152(-Ph-COOH-HCOH)−H]$^-$是最主要的特征碎片, 且 C-7*α* 位异构体比 C-7*β* 位异构体的保留时间更长, 因此推测该化合物为降解杂质巴卡汀Ⅲ的 7 位羟基继续发生差向异构体化反应, 生成 7-表巴卡汀。该化合物为首次报道的紫杉醇降解杂质。

杂质 **7** 为常见的降解杂质, 在酸、碱、光照、加热条件下, 均较容易产生, 一级质谱加合离子峰 *m/z* 834 [M+Na]$^+$, 主要碎片峰为 *m/z* 549 [M−ScH+Na]$^+$、*m/z* 308 [M−T+Na]$^+$, 与紫杉醇相比, 分子量少了 43, 推测该化合物可能为紫杉醇发生了去乙酰化反应, 鉴定为 10-去乙酰紫杉醇, 与 10-去乙酰紫杉醇对照品质谱图一致。

杂质 **8** 为紫杉醇原料直接光照产生的独有且主要的降解产物, 其 RRT 为 0.73, 一级质谱加合离子峰为 *m/z* 876 [M+Na]$^+$, 说明该化合物相对分子质量为 854, 与紫杉醇为同分异构体, 其碎片峰 *m/z* 816 [M−CH_3COOH+Na]$^+$、*m/z* 531 [M−ScH−CH_3COOH+H]$^+$ 较为明显, 但没有紫杉醇中较明显的 *m/z* 569 碎片峰, 其相对保留时间与碎片峰与文献[4]报道的紫杉醇异构体 (C3-C11 桥联化合物) 的碎片峰基本一致, 其反应机制为紫杉醇发生重排反应生成桥联化合物, 因此其准分子离子峰也更容易失去 CH_3COOH 而生成 794 的碎片, 其 569 碎片峰则更容易失去 CH_3COOH 成为 509 的碎片峰。

杂质 **9** 为紫杉醇乙醇溶液光照产生的杂质, 其 RRT 为 1.24, 一级质谱加合离子峰为 *m/z* 876 [M+Na]$^+$ (图 4), 高分辨质谱显示其准分子离子峰为 854.339 0, 分子量与紫杉醇相同, 其中碎片峰 794、509、286 的加钠峰与紫杉醇典型碎片峰相似, 即结构与紫杉醇类似, 较为特征的 481 与 329 的加钠峰在紫杉醇二级质谱中未出现, 而紫杉醇二级质谱中常见的丢失 H_2O (−18) 现象在杂质 **9** 中并未出现。对杂质 **9** 二级质谱图进一步分析, 从 509 到 481 丢失 28 的碎片峰, 而 329 也较紫杉醇的特征碎片峰 327 多 2, 因此推测紫杉醇在乙醇溶液中经光照诱导发生自由基反应, 11,12 位的双键可能打开成为单键, 7 位 -OH 生成酮基, 可以丢失 CO (28) 碎片峰, 推定杂质 **9** 的结构见图 5, 其分子式 $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 与高分辨质谱软件预测最佳分子式一致, 采用 ChemAxon 软件预测杂质 **9** 与紫杉醇

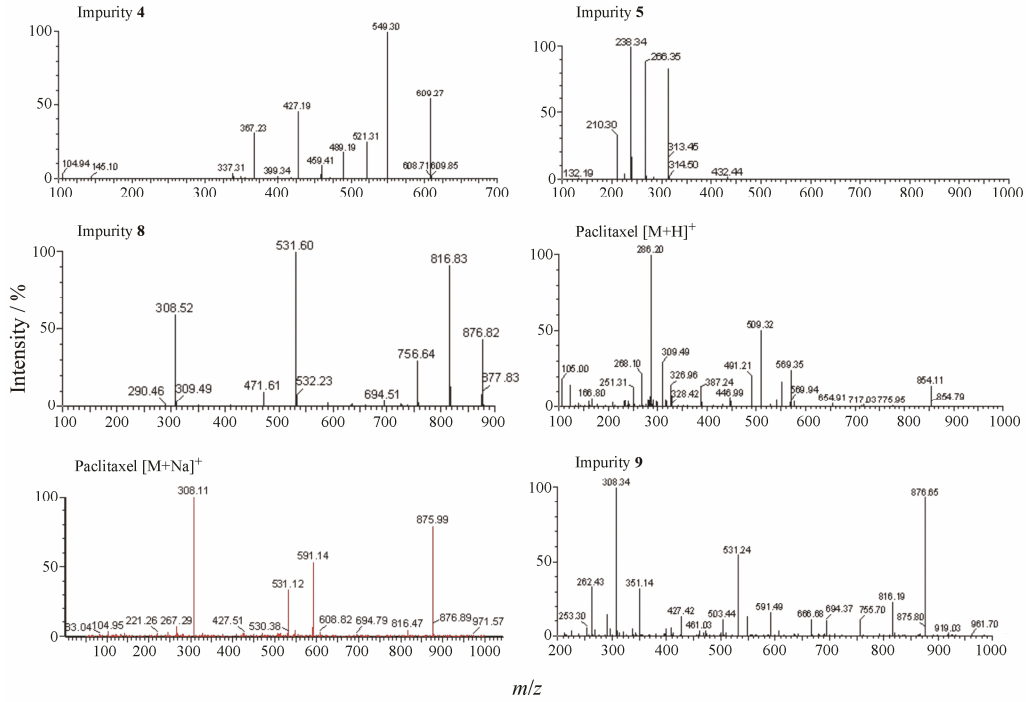

Figure 4 MS/MS spectrums of paclitaxel and impurities (**4**, **5**, **8**, **9**)

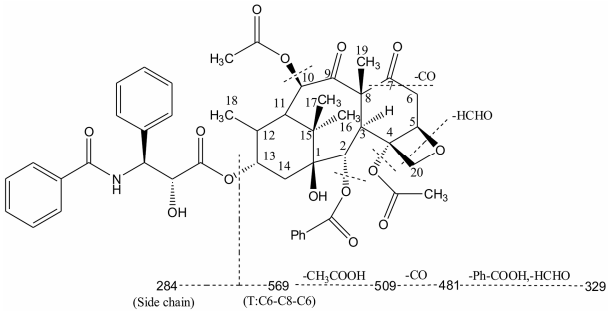

Figure 5 Proposed fragmentation pathway for impurity **9**

的 CLog*P* 值分别为 4.795 与 3.298, 即杂质 **9** 的极性小于紫杉醇, 符合其在反向色谱中保留时间长于紫杉醇的现象。命名为 (2*α*,4*α*,5*β*,10*β*,13*α*)-4,10-bis(acetyloxy)-13-{[(2*R*,3*S*)-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy}-1-hydroxy-7,9-dioxo-5,20-epoxy tax-2-yl benzoate, 该结构仍需要结合 NMR 等方法进一步确证。

杂质 **10** 为紫杉醇乙醇溶液碱降解产生的杂质, 准分子离子峰为 *m/z* 284 $[M-H]^-$, 其碎片峰为 *m/z* 266 $[M-H-H_2O]^-$、*m/z* 238 $[M-H-COOH]^-$, 推测为紫杉醇断裂产生的侧链碎片, 为 *N*-苯甲酰基-(2*R*,3*S*)-3-苯基异丝氨酸, 与文献[8]报道一致。

结论

由于紫杉醇为难溶的脂溶性化合物, 其注射液的配方组成基本由紫杉醇、聚氧乙基蓖麻油 (助溶剂与稳定剂)、乙醇 (助溶剂) 组成。其中聚氧乙基蓖麻油有较强的基质效应, 因此难以将紫杉醇注射液溶液直接接入质谱对杂质进行分析, 基于上述两个原因, 本文采用了只加入处方中另一主要辅料乙醇, 即对紫杉醇乙醇溶液进行强制降解实验, 较好的解决基线干扰问题, 并且得到的降解杂质涵盖了紫杉醇与紫杉醇注射液中的杂质。

由于中国药典中收载原料药有关物质 HPLC 方法梯度洗脱时间较长 (约为 60 min), 本文建立了 UPLC-MS-MS 方法进行了杂质谱的分析研究, 因中国药典 2010 版紫杉醇中 HPLC 色谱条件流动相中不含缓冲盐, 因此只调整了梯度洗脱的时间程序, 并分别采用两种方法对同一份降解溶液进行测定, 测定的图谱峰型基本一致, 因此认为两种方法测定的杂质有一一对应关系。

对杂质的生成机制进行分析, 发现在酸、碱等不同的降解条件下, 均较容易发生 10、13、2、4 位的水解断裂, 降解生成杂质 **3**～**5** 和 **7**, 并且 7 位羟基较容易发生醇醛缩合与逆向醇醛缩合反应[15], 从而产生差向异构化, 如生成杂质 **2**、**3**、**6**。而在光照条件下, 紫杉醇原料直接光照产生与紫杉醇乙醇溶液光照产生的主要降解杂质不同, 提示原料与制剂光照时的降解途径有较大的不同, 分析原因为紫杉醇在乙醇的作用下首先比较容易发生的是水解反应, 而且难易程度通常是 C-10, 13 位>C-2 位>C-4 位[16], 同时发生了自由基反应, 产生了杂质 **9**, 而紫杉醇原料在无乙醇的光照环境中, 则优先发生裂环−环合的重排反应, 生成了杂质 **8**。杂质 **6** 和 **9** 为本文首次报道的紫杉醇降解杂质。本文研究成果提示在紫杉醇注射液的包装、贮存、运输等环节中需要十分注意, 并对国内紫杉醇及其注射液的杂质控制和质量标准的有效制订提供了详实的数据支持。

References

[1] Rodríguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel [J]. Pharmacogenomics, 2010, 11: 621−623.

[2] The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia 38/The National Formulary 33 [S]. Baltimore: United Book Press, Inc, 2015: 4732−4734.

[3] Zhang P, Sun J, Zhang WJ, et al. Method for purifying taxane compound: CN, 101648928 (A) [P]. 2010-2-17.

[4] Volk KJ, Hill SE, Kerns EH, et al. Profiling degradants of paclitaxel using liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry substructural techniques [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 1997, 696: 99−115.

[5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Vol II. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 1007.

[6] Zhang J, Duan JC, Liang Z, et al. Separation and identification of taxol in the crude extracts of *Taxus cuspidata* and its callus culture with HPLC-ESI-MS/MS [J]. Acta Pharma Sin (药学学报), 2006, 41: 863−866.

[7] Ma WX, Wang H, Wang TT, et al. Fragmentation behaviors of taxanes drugs using electrospray ionization with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2013, 48: 1812−1816.

[8] Rao YK, Wang M, Ding L, et al. Identification of the related substances in docetaxel injection by LC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2012, 47: 779−784.

[9] Jonkers N, Govers H, Voogt PD. Adduct formation in LC-ESI-MS of nonylphenol ethoxylates: mass spectrometrical,

theoretical and quantitative analytical aspects [J]. Anal Chim Acta, 2005, 531: 217−228.

[10] Mortier KA, Zhang GF, Peteghem CHV, et al. Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ioniazation conditions on paclitaxel [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2004, 15: 585−592.

[11] Abliz Z, Fang QC, Liang XT, et al. Study on fragmentation behaviors of taxoids by tandem mass spectrometry [J]. Chin Sci Bull (科学通报), 1999, 44: 691−703.

[12] Tian J, Stella VJ. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions II: nonepimerization degradation under neutral to basic pH conditions [J]. J Pharm Sci, 2008, 97: 3100−3108.

[13] Tian J, Stella VJ. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions III: degradation under acidic pH conditions and overall kinetics [J]. J Pharm Sci, 2010, 99: 1288−1298.

[14] Ge GB, Luan HW, Zhang YY, et al. Profiling of yew hair roots from various species using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 2315−232.

[15] Tian J, Stella VJ. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization [J]. J Pharm Sci, 2008, 97: 1224−1235.

[16] Fang WS, Fang QC, Liang XT, et al. Chemical reactivities and the structural modifications of the parent nucleuses of taxol and its analogues [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1998, 33: 310−320.

正大天晴药业集团股份有限公司为国内肝健康药物研发和生产基地之一, 是国家重点高新技术企业、国家火炬计划连云港新医药产业基地重点骨干企业、“国内最佳研发生产线”十佳工业企业 (第 2 名)、江苏省创新型企业。企业效益连续多年增长 30%以上并连续多年位居全国医药行业百强之列, 且逐年上升, 工信部发布的 2012 年度中国制药工业百强榜中, 正大天晴排名第 28 位。

公司现有员工 2 750 人, 拥有 5 个全资子公司、6 个控股子公司, 在连云港、南京、盐城和淮安分别建有研发和生产基地。正大天晴药业产品治疗涉及肝病、肿瘤、糖尿病、呼吸、心脑血管、感染等多个疾病领域, 在肝病药物研发领域具备突出优势, 2013 年肝病药物产品在国内医院市场占有率已达到 19% (IMS)。

正大天晴一贯重视研发创新工作, 始终把技术创新视为企业生命的源泉, 经过 40 多年的发展和探索, 逐步形成了完善的创新体系。目前拥有研发人员 500 余名, 高级工程师 23 名, 博士 17 名, 硕士 200 余名, 博士、硕士及具有高级技术职称的人员占 40%以上, 逐渐形成了以国家“千人计划”等高端人才组成的海归团队、博士项目创新团队、高工经验技术团队和专家学术支持团队几大人才梯队, 承担着正大天晴药业的新药研发、工艺改造等一系列重要的科研任务。公司先后成功地研制了具有自主知识产权的肝病治疗药物, 并成功完成了数十个科研成果的产业化。

“十五”以来, 公司先后承担了国家、省重点科技项目 30 多个, 通过这些重点项目的实施及产业化, 加大了企业与科研院所之间学术交流、产品研究、技术支持、成果转让等方面的合作力度, 使得企业创新能力及科技管理水平得到了明显提高, 为公司的快速发展提供了有力的支持。