

UPLC-MS-MS 法测定注射用头孢唑肟钠中 MBT 含量及国产样品风险分析*

王小亮, 贾丽华, 梁亚伟, 张秉华, 王建山

(陕西省食品药品检验研究院, 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 西安 710065)

摘要 目的:建立一种超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS-MS)测定注射用头孢唑肟钠中 2-巯基苯并噻唑(MBT)遗传毒性杂质的含量并对全国范围 28 个生产企业样品检出情况进行分析。**方法:**以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Phenomenex, Luna Omega, 2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm);柱温为 30 °C; 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵(含 0.001% 甲酸)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱;流速为 0.3 mL · min⁻¹;进样量:5 μL;电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM)正离子模式扫描, 外标法定量。**结果:**MBT 在质量浓度 1.45 ~ 58.12 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r=0.999$);检出限为 1.453 pg, 定量限为 7.265 pg;低、中、高三个质量浓度水平的平均回收率分别为 106.8%、107.1%、109.0%;相对标准偏差(RSD)均小于 2.0%;重复性相对标准偏差(RSD)均小于 6.0%;国产 28 家企业样品的 MBT 检出量均小于 10 ppm, 各企业检出差异源于不同生产工艺。**结论:**所建方法可用于注射用头孢唑肟钠中 MBT 定性定量检测, 部分检出 MBT 杂质的企业需进一步提高警示。

关键词:头孢唑肟钠; 2-巯基苯并噻唑(MBT); UPLC-MS-MS

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)06-0577-07

doi: 10.19778/j.chp.2024.06.008

Determination of MBT in cefazoxime sodium for injection by UPLC-MS-MS and risk analysis of domestic samples*

WANG Xiaoliang, LIANG Yawei, ZHANG Binghua, WANG Jianshan

(Shanxi Institute for Food and Drug Control, Shaanxi Provincial Food and Drug Safety Monitoring Key Laboratory, Xi'an, 710065, China)

Abstract Objective: To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) method for the determination of 2-mercaptobenzothiazole (MBT) genotoxic impurities in cefazoxime sodium for injection and to analyze the detection of domestic samples from 28 manufacturers. **Methods:** The UPLC analysis was performed on a Phenomenex Luna Omega C18 column, (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) with the column temperature 30 °C. The mobile phases A was 2 mmol · L⁻¹ ammonium acetate (containing 0.001% formic acid) and the mobile phase B was acetonitrile with gradient elute. The flow rate was 0.3 mL · min⁻¹. The injection volume was 5 μL. The electrospray ionization(ESI) source in positive mode and multiple reaction monitoring (MRM) were used for the detection of MBT, and external standard method for quantitative analysis. **Results:** The linear relationship of MBT was good in the concentration range of 1.4 – 58.12 ng · mL⁻¹ ($r=0.999$). The limit of detection was 1.453 pg and the limit of quantification was 7.265 pg. The average recoveries of low, medium and high concentrations were 106.8%, 107.1% and 109.0%, respectively with the

* 基金项目: 陕西省食品药品检验研究院青苗培育项目(2024KYYJQ004)

第一作者简介: 王小亮, 副主任药师; 研究方向: 抗生素药品分析。E-mail: xlwangpp@163.com

relative standard deviation (RSD) all less than 2.0%. The relative standard deviation (RSD) of repeatability was less than 6.0%. The content of MBT in the samples from 28 domestic enterprises was all less than 10 ppm, but there were obvious differences in the detected amount among all enterprises which is due to different production processes. **Conclusion:** The established method can be used for the qualitative and quantitative detection of MBT in cefazoxime sodium for injection and the partical enterprises which have been detected MBT impurities need to further raise the warning.

Key words: cefazoxime sodium; 2-mercaptobenzothiazole (MBT); UPLC-MS-MS

头孢唑肟钠为第三代、半合成、广谱氨基噻唑类头孢菌素。其抗菌谱广,杀菌力强,不良反应小,同时,对各种能产生 β -内酰胺酶的细菌也显示很强的抗菌力,所以在临床上备受青睐^[1-3]。新冠肺炎期间,在临床抗菌治疗中应用较多,发挥了重要作用。

注射用头孢唑肟钠是由头孢唑肟钠原料直接无菌分装制成,遗传毒性杂质主要来源于原料。企业调研得知,国产头孢唑肟钠原料主要涉及两条合成路线,一是使用AE活性酯和7-氨基-3-头孢环4-羧酸(7-ANCA)作为原料,两者在发生化学反应时,C-S键断裂,形成头孢唑肟酸和副产物2-巯基苯并噻唑(MBT);二是使用DAMA新型活性酯和7-ANCA合成头孢唑肟钠,会避免工艺中MBT的产生。但由于储存和运输过程中需要低温($<5^{\circ}\text{C}$),且价位较高,国内大部分企业使用的是第一种合成路线。2017年,MBT被世界卫生组织国际癌症研究机构列入2A类致癌物清单,其在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤,导致基因突变并可能促使肿瘤发生,且MBT具有较强的致敏性^[4]。但国内关于头孢唑肟钠和制剂质量标准均未控制该杂质,企业内控也没有控制。因此,我们建立了超高效液相色谱-串联质谱法来考察28个制剂生产企业的76批样品中的MBT含量^[5-10],同时对不同生产企业的样品检出情况进行风险分析。

1 仪器及试剂

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-质谱联用仪(AB SCIEX QTRAP5500+),电子分析天平(瑞士梅特勒XPE205),高纯水机(美国Millipore公司)。

乙腈(色谱纯,Sigma公司),乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),甲酸(分析纯,阿拉丁生化科技股份有限公司),高纯水(实验室自制)。

1.2 对照品

2-巯基苯并噻唑对照品(EHRENSTORFERF公司,批号G1211642,含量98.45%)。

1.3 样品

76批注射用头孢唑肟钠均为2023年国家药品评价性抽验样品,涉及28个生产企业,0.25、0.5、0.75、1.0、1.5及2.0 g共6个规格。头孢唑肟原料为企业提供。

2 方法

2.1 色谱条件

采用Phenomenex, Luna Omega C18(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.6 μm)色谱柱;以2 mmol $\cdot$ L⁻¹乙酸铵(含0.001%甲酸)为流动相A,乙腈为流动相B,按表1方式进行梯度洗脱;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流速为0.3 mL $\cdot$ min⁻¹;进样量:5 μL ;阀切换时间:0.1~2 min进废液;2~11 min进质谱。

表1 UPLC法流动相梯度洗脱表

Tab.1 The gradient elution procedure of UPLC mobile phase

t/min	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%
0	70	30
6	70	30
7	10	90
8	10	90
8.1	70	30
11	70	30

2.2 质谱条件

采用质谱检测器,电喷雾离子化(ESI)正离子模式,选择质荷比167.7 $\rightarrow$ 135.0作为检测离子,167.7 $\rightarrow$ 124.0和167.7 $\rightarrow$ 109.0作为辅助定性离子。总离子流图见图1。

源参数:气帘气(CUR)241.32 kPa,离子化电压(IS)5 500 V,离子化温度(TEM)550 $^{\circ}\text{C}$,喷雾气(GS1)379.21 kPa,辅助加热气(GS2)379.21 kPa,喷嘴气(CAD)55.16 kPa,射入电压(EP)10 V,喷嘴室射出电压(CXP)10 V。

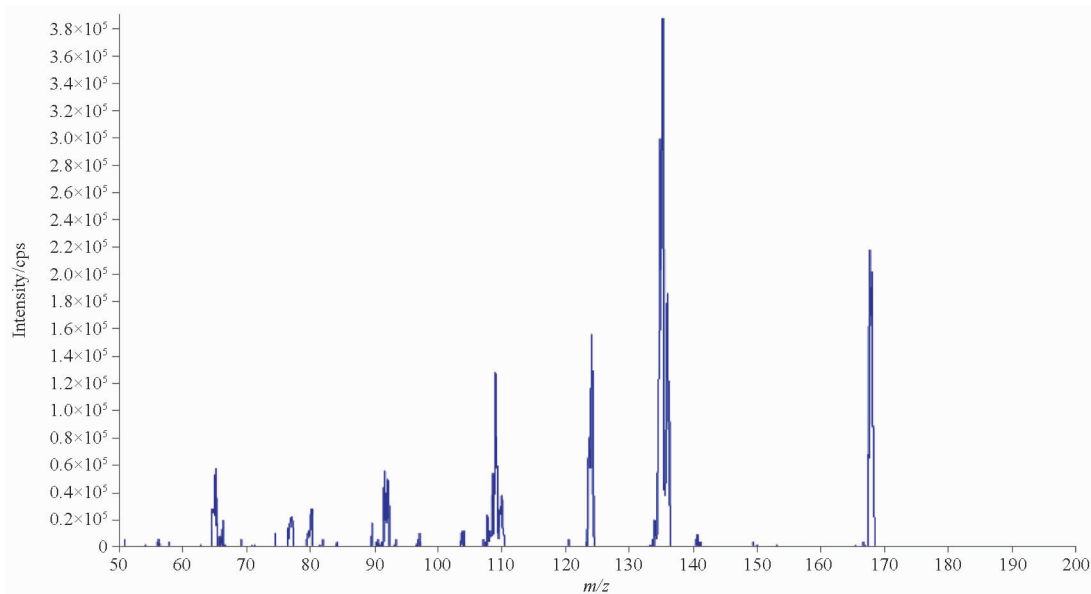


图1 总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatogram

采用多反应监测模式 (MRM) 测定, 参数: Q1 167.7 Da, Q3 135.0 Da, 去簇电压 (DP) 90 V, 驻留时间 (Dwell time) 50 ms, 碰撞能量 (CE) 33 eV。

2.3 样品制备

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取 MBT 对照品 14.76 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液 (1), 精密量取上述溶液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液 (2), 再精密量取对照品贮备液 (2) 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水-乙腈 (90:10) 制成约含 MBT $28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 灵敏度溶液制备 精密量取对照品溶液 1 mL, 加水-乙腈 (90:10) 稀释至 10 mL, 制成约含 MBT $2.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得。

2.3.3 供试品溶液制备 取本品约 20 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加空白溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.4 测定法

精密量取空白溶液、灵敏度溶液、对照品溶液及供试品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。取对照品溶液连续进样 6 次, 2-巯基苯并噻唑峰的相对标准偏差应不大于 2.0%。以外标法计算样品中 MBT 的含量。典型图谱见图 2。

3 结果与讨论

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性 精密量取空白溶液、对照品溶液

与供试品溶液 (西南药业股份有限公司样品), 分别注入液质串联仪, 记录色谱图, 见图 3, 2-巯基苯并噻唑峰 ($t = 4.841 \text{ min}$) 位置上未见吸收峰, 样品溶液与空白溶液均无干扰, 表明该方法专属性良好。

3.1.2 线性 分别精密量取“2.3.1 对照品溶液制备”项下对照品贮备液 (2) 适量, 逐级稀释制成含 MBT 1.453 1、2.906 2、14.531 2、29.062 4、43.593 7 和 58.124 9 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的线性溶液, 按“2.1 和 2.2”的色谱和质谱条件分别进样, 记录峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $y = 9\,619.4x - 13\,475$, 相关系数 $r = 0.999$ 。结果表明 MBT 在质量浓度 1.453 1 ~ 58.124 9 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

3.1.3 检出限与定量限 精密量取最低质量浓度的线性对照品溶液适量, 逐级稀释, 以信噪比为 3 作为检出限, 质量浓度为 1.453 pg; 信噪比为 10 作为定量限, 质量浓度为 7.265 pg。

3.1.4 准确度考察 分别精密称取未检出 MBT 的一批样品 (企业 A) 50 mg 共 9 份, 置 50 mL 量瓶中, 加空白溶液溶解, 再分别加入对照品溶液 (29.062 4 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.6、1.0、1.4 mL, 用空白溶液稀释至刻度, 摇匀, 制成含 MBT 60%、100%、140% 的供试品溶液, 每个质量浓度平行制备 3 份样品, 按“2.1 和 2.2”的色谱和质谱条件分别进样, 记录峰面积, 测定结果见表 2。

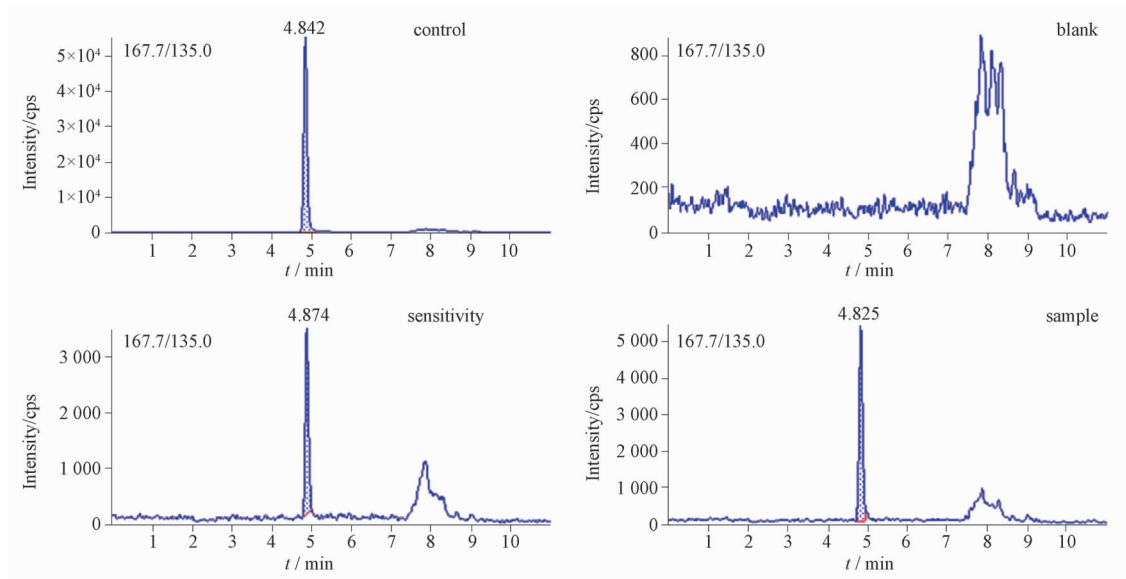


图2 MBT 检测典型图谱

Fig. 2 The typical chromatograms of MBT analysis

表2 MBT 准确度测定结果

Tab. 2 The results of accuracy for MBT

Analyte	Design concentration	Sample measurement /g	Added amount of reference substance/ng	Measured amount/ng	Recovery /%	Average recovery /%	RSD /%
MBT	60% -1	0.050 33	17.437 5	18.902 2	108.4	106.8	1.46
	60% -2	0.050 24	17.437 5	18.623 2	106.8		
	60% -3	0.050 79	17.437 5	18.361 7	105.3		
	100% -1	0.050 20	29.062 4	31.009 6	106.7	107.1	0.96
	100% -2	0.050 02	29.062 4	30.922 4	106.4		
	100% -3	0.050 35	29.062 4	31.474 6	108.3		
	140% -1	0.050 56	40.687 4	31.184 0	107.3	109.0	1.36
	140% -2	0.050 19	40.687 4	31.823 3	109.5		
	140% -3	0.050 07	40.687 4	31.997 7	110.1		

根据现行版《中国药典》通则 9306 遗传毒性杂质控制指导原则中遗传杂质的限值制定方法,计算杂质限度为 10 ppm。通则 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则中规定:“样品中待测成分含量为 10 ppm 时,回收率限度要求为 80% ~ 115%”。平均回收率分别为 106.8%、107.1%、109.0%,表明 MBT 的回收率符合验证要求,所建立的方法测定 MBT 含量准确度良好。

3.1.5 重复性考察 取检出 MBT 的 1 批样品(企业 B),按“2.3.3 供试品溶液制备”方法平行制备 6 份溶液,分别测定其 MBT 的含量,6 份样品的测定结果及计算见表 3,RSD 均小于 6.0%,该方法重复性良好。

4 样品的测定结果与分析

4.1 样品测定结果

精密量取空白溶液、灵敏度溶液、对照品溶液与供试品溶液,分别注入液质串联仪,记录色谱图,见图 3,对照品溶液连续进样 5 次,MBT 峰面积的相对标准偏差为 1.4%,灵敏度溶液色谱图中,MBT 峰的信噪比为 23,按外标法以峰面积计算 MBT 的含量,结果见表 4。

根据现行版《中国药典》通则 9306《遗传毒性杂质控制指导原则》规定^[11],按单个杂质日摄入量 120 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ (<1 个月)计,注射用头孢唑肟钠日最大剂量 12 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$,计算杂质限度为 10 ppm。本次考察 28 家制剂生产企业生产的 76 批样品均采用

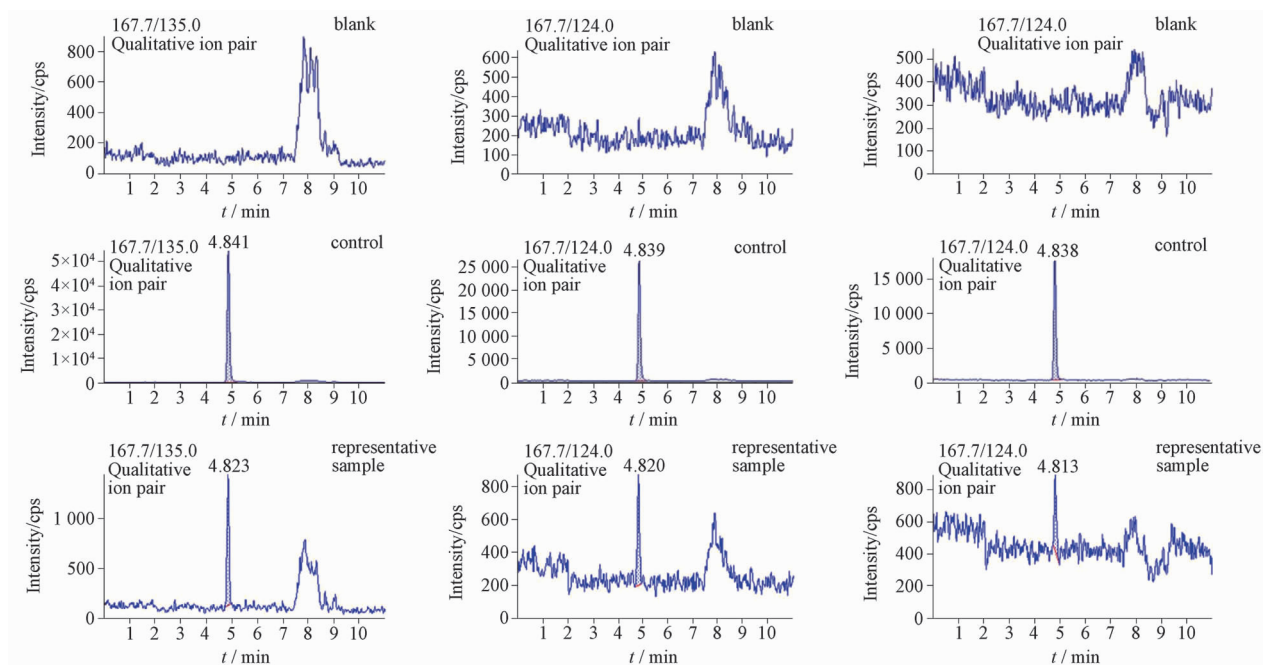


图3 专属性考察色谱图

Fig. 3 The chromatograms of specificity

表3 重复性结果

Tab. 3 The results of repeatability for MBT

No.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	RSD/%
Mass/mg	20.14	20.11	20.20	20.04	20.15	20.17	/
MBT/ppm	3.4	3.3	3.5	3.2	3.4	3.4	3.1

上述方法检测,10家企业未检出MBT,占比为35.7%,18家企业均检出MBT,占比为64.3%,范围在0.11~5.23 ppm,76批样品检验结果均符合规定,质量安全可控。

4.2 结果分析

注射用头孢唑肟钠为原料直接分装而成,因此,MBT的来源主要为原料引入。我们对8家原料企业的MBT检出量绘制频数分布图和散点图如图4所示。各企业原料MBT检出量均小于拟定限度,均符合规定。参比企业的产品选用合成路线2,使用DAMA新型活性酯和7-ANCA作为起始原料^[12],合成工艺不会产生MBT,产品也均未检出。企业A产品中MBT的量检出较低,企业C检出量较高,分析原因,虽然其合成起始原料相同,但涉及的原料企业不同,合成工艺条件、后处理工艺略有不同,会导致副产物MBT的量有差异。MBT被世界卫生组织国际癌症研究机构列入2A类致癌物清单,其在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤,导致基因突

变并可能促使肿瘤发生,而头孢唑肟钠原料和制剂现行法定标准均未设置控制MBT的限度,从安全药用的角度出发,企业仍需提高警示,进一步监测产品中MBT的量。同时,应优化工艺,寻求不会产生MBT等遗传毒性杂质的原料合成工艺。

5 结论

本文所建立的液质联用测定注射用头孢唑肟钠中MBT的方法,准确性和精密度均良好,为头孢类抗生素质量控制和监督检验提供技术支持和方法参考。同时对全国范围内注射用头孢唑肟钠的合成工艺及MBT检出情况进行数据分析,提示检出MBT杂质的企业需要在质量控制中监控MBT的检出情况,同时应进一步优化工艺,使用更优的合成工艺,避免遗传毒性杂质MBT在样品中的残留,保证用药安全。在此次监督抽样中亦发现个别企业样品检出情况和所用原料不符,监管部门已责令整改。

表4 MBT 检出结果表

Tab. 4 The results of MBT in samples

Sample No.	Manufacturers of preparation	Manufacturers involving bulk drug	Detectable quantity/ ppm	Synthetic routes
1	1	A	N. D.	1
2	1	A	N. D.	1
3	2	B	1.36	1
4	3	C	3.27	1
5	3	C	3.39	1
6	3	C	3.42	1
7	4	B	1.02	1
8	4	D	1.06	1
9	4	B	1.07	1
10	5	A	N. D.	1
11	5	A	N. D.	1
12	5	A	N. D.	1
13	6	B	3.76	1
14	6	E	3.95	1
15	6	B	4.07	1
16	7	B	0.79	1
17	7	B	0.82	1
18	7	B	0.82	1
19	7	B	0.88	1
20	7	B	0.89	1
21	8	A	0.09	1
22	8	A	0.1	1
23	8	A	0.11	1
24	9	C	3.09	1
25	9	C	4.51	1
26	9	C	4.91	1
27	10	A	N. D.	1
28	10	A	N. D.	1
29	10	A	N. D.	1
30	11	A	N. D.	1
31	11	A	N. D.	1
32	11	A	N. D.	1
33	12	B	1.11	1
34	12	B	1.16	1
35	12	B	1.19	1
36	13	C	4.91	1
37	13	C	5.02	1
38	13	C	5.23	1
39	14	/	N. D.	1
40	15	F	N. D.	1
41	15	F	N. D.	1

续表4(Tab. 4 continued)

Sample No.	Manufacturers of preparation	Manufacturers involving bulk drug	Detectable quantity/ ppm	Synthetic routes
42	16	B	0.73	1
43	16	B	0.82	1
44	16	B	0.88	1
45	17	D	0.22	1
46	17	D	0.28	1
47	17	D	0.31	1
48	18	H	1.09	2
49	19	D	0.11	1
50	19	D	0.12	1
51	19	D	0.13	1
52	20	C	4.16	1
53	20	C	4.27	1
54	20	C	4.3	1
55	20	C	4.33	1
56	21	B	0.86	1
57	21	B	0.91	1
58	21	B	1.03	1
59	22	F	N. D.	1
60	22	F	N. D.	1
61	22	F	N. D.	1
62	23	F	0.11	1
63	23	F	0.12	1
64	23	F	0.13	1
65	24	F	N. D.	1
66	25(reference)	I	N. D.	2
67	25(reference)	I	N. D.	2
68	25(reference)	I	N. D.	2
69	26	B	0.93	1
70	26	B	1.02	1
71	26	B	1.05	1
72	27	A	N. D.	1
73	27	A	N. D.	1
74	27	A	N. D.	1
75	28	B	0.93	1
76	28	B	1.06	1

注:“/”代表企业未提供相关原料和资料;“N. D.”代表未检出;合成路线1:使用 AE 活性酯和 7-ANCA 作为起始原料;合成路线2:使用 DAMA 新型活性酯和 7-ANCA 作为起始原料。

Note:“/”represents that the enterprise did not provide relevant raw materials and information; “N. D.” represents that no detection; synthesis route 1:uses AE active ester and 7-ANCA as starting materials; synthesis route 2:uses DAM.

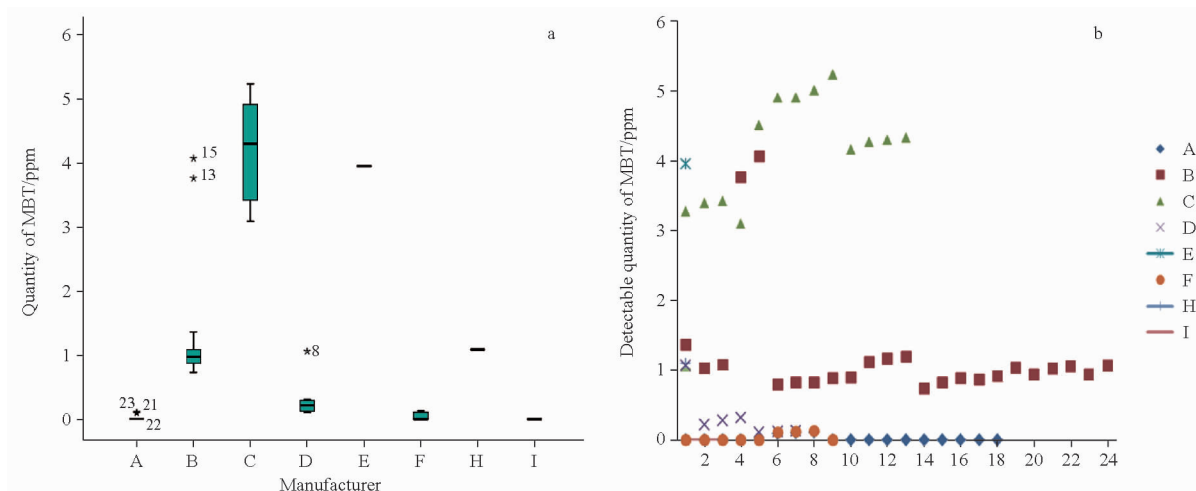


图4 不同原料企业样品 MBT 检出频数分布图(a)和散点图(b)情况分布

Fig. 4 The frequency distribution (a) and scatter diagram (b) of MBT in samples from different manufactures

参考文献

- [1] 施毅, 苏欣, 肖永营, 等. 注射用头孢唑肟钠治疗细菌性感染的多中心随机对照临床研究[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005(6):350.
- [2] 戎霞君, 陈巍, 黄绍光. 注射用头孢唑肟钠治疗下呼吸道感染的研究[J]. 世界临床药物, 2006(7):395.
- [3] 熊安. 国产头孢唑肟钠对急性中重度细菌感染的临床疗效与安全性分析[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(9):1973.
- [4] 朱文泉, 马健, 李敏. 基因毒性杂质的挑战与控制策略——从 ICH 指导纲领到实际操作层面[J]. 中国食品药品监管, 2020(12):29.
- [5] 齐恒芹, 吕远, 孟龙等. 高效液相色谱-质谱联用法在头孢唑肟钠中基因毒性杂质控制的应用[J]. 中国医药导刊, 2023, 25(6):570.
- [6] 魏永涛, 崔玉玲, 林娣等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定注射用头孢曲松钠中 2-巯基苯并噻唑的含量[J]. 分析实验室, 2023, 42(11):1502.
- [7] 李秋迎, 郭利娟, 薄晓文等. 高效液相色谱法测定卤化丁基橡胶塞中 2-巯基苯并噻唑残留量[J]. 化学分析计量, 2023, 32(4):20.
- [8] 贾菲菲, 程佳美, 赵霞等. 药用卤化丁基橡胶塞中 2-巯基苯并噻唑的检测[J]. 药学研究, 2022, 41(9):581.
- [9] 王喃喃, 许鑫, 刘姣等. 高效液相色谱法测定头孢曲松钠中 2-巯基苯并噻唑含量[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(6):581.
- [10] 肖慧, 王婷婷, 吴文获等. HPLC 法测定注射用盐酸头孢吡肟中 2-巯基苯并噻唑[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(2):183.
- [11] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:527.
- [12] 王荣耕, 刘承平, 肖志英等. 新型活性酯 DAMA[J]. 精细与专用化学品, 2004(13):11.
- [13] WEI YT, CUI YL, LIN D, *et al.* Determination of 2-mercaptobenzothiazole in ceftriaxone sodium for injection by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Anal Lab, 2023, 42(11):1502.
- [14] LI QY, GUO LJ, BO XW, *et al.* Determination of 2-mercaptobenzothiazole residues in halogenated butyl rubber plugs by high performance liquid chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2023, 32(4):20.
- [15] JIA FF, CHENG JM, ZHAO X, *et al.* Determination of 2-mercaptobenzothiazole in pharmaceutical halogenated butyl rubber stopper[J]. J Pharm Res, 2022, 41(9):581.
- [16] WANG NN, XU X, LIU J, *et al.* Determination of 2-mercaptobenzothiazole in ceftriaxone sodium by HPLC[J]. Chin J Antibiot, 2022, 47(6):581.
- [17] XIAO H, WANG TT, WU WH, *et al.* Determination of 2-mercaptobenzothiazole in cefepime hydrochloride for injection by HPLC[J]. Chin J Antibiot, 2022, 47(2):183.
- [18] WANG RG, LIU CP, XIAO ZY, *et al.* A Novel Active Ester DAMA[J]. Fine Spec Chem, 2004(13):11.

(收稿日期:2024-08-08)