

盐酸莫西沙星注射液中杂质的检测及结构鉴定

王志英
沃特世科技(上海)有限公司

应用优势

- 使用亚2 μm 色谱柱, 分析时间由60 min缩短至25 min, 提高了分析效率。
- 使用Xevo® G2-S QToF能得到准确的分子量, 其质量偏差在0.8 mDa以内。
- 通过MassLynx®及MetaboLynx™软件快速自动进行杂质解析, 节省人力及时间。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®

Xevo G2-S QToF质谱仪

MassLynx、MetaboLynx软件

HSS T3(100*2.1mm, 1.8 μm) 色谱柱

关键词

UPLC®、QToF、杂质鉴定、MassLynx、
MetaboLynx、莫西沙星

前言

莫西沙星(Moxifloxacin)为人工合成的喹诺酮类抗菌药, 是一类较新的合成抗菌药。具有抗菌性强、抗菌谱广、不易产生耐药性, 并对常见耐药菌有效、半衰期长、不良反应少等优点。临床上用于治疗呼吸系统感染、生殖系统感染、皮肤软组织感染等。莫西沙星原研厂家为德国拜耳, 其注射剂在中国的专利保护期即将到期, 国内也有多个厂家正在进行莫西沙星的仿制。但如今基于药品安全的考虑, 仿制药中的有关物质的检测越发引起注意, 中国药典上也明确规定, 药物中杂质, 含量高于0.1%的所有杂质均需对其杂质结构进行鉴别(毒性药物限度则更低)。所以, 如何高效快速地测定药物中的杂质, 这一课题逐渐成为药物研究过程中亟待解决的难点。

本文采用沃特世(Waters®)超高效液相色谱飞行时间质谱(ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QToF)联用技术对莫西沙星注射液(光照10天)样品中杂质进行分析, 采用亚2 μm 色谱柱UPLC方法, 使整个分离时间由60分钟缩短至25分钟, 且杂质得到有效分离; 应用MassLynx和MetaboLynx软件, 自动得到包含各个杂质分子量、分子式、及结构信息的杂质列表, 使整个杂质鉴定过程高效快速、节省人力。

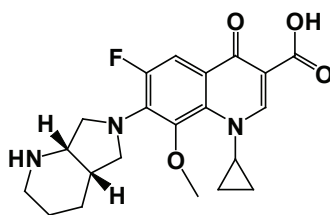


图1. 莫西沙星(Moxifloxacin) $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_4$

实验条件

样品制备: 莫西沙星注射液(光照10天)样品直接进样。

A. LC / UPLC 条件

LC系统: ACQUITY UPLC
色谱柱: HSS T3(100 x 2.1mm, 1.8 μm)
Part No.: 186003539
柱温: 35 °C
进样量: 1 μL
流速: 0.45 mL/min
流动相: 水(850mL)/乙腈(150 mL)/醋酸(30 mL)

B. MS 条件

MS系统: Xevo G2-S QToF
离子化模式: ESI+
毛细管电压: 2.0 KV
源温度: 120° C
雾化气温度: 550° C
雾化气流速: 800 L/h
锥孔气流速: 50 L/h
采集模式: MS^E

C. PDA检测器

紫外检测波长: 293nm

D. 软件

MassLynx, MetaboLynx

实验流程

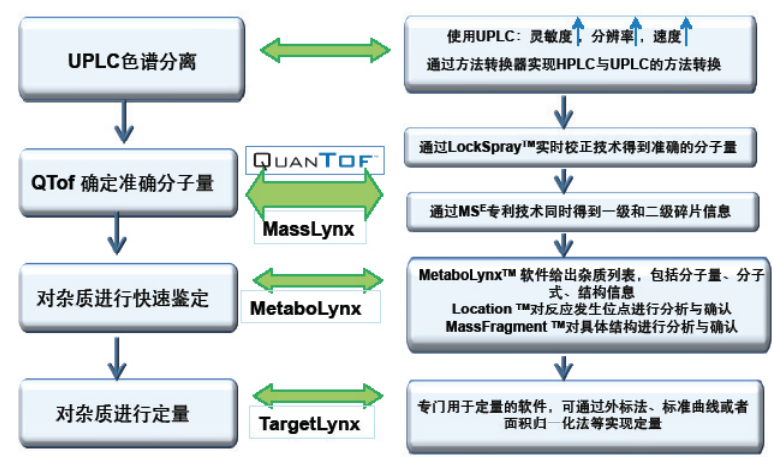


图2. 实验流程图。

结果与讨论

使用方法转换器及色谱柱选择卡, 将客户提供的HPLC普通液相平行转化为UPLC方法, 如表1。图3为客户使用HPLC得到的紫外谱图, 图4为转化为亚2 μm色谱柱后得到的紫外谱图。从结果可看出, 分析时间由60分钟缩短至25分钟, 流速由1.0 mL/min降低到0.45 mL/min, 使用UPLC可提高效率、大大节省成本; 同时, 从谱图的分离度及响应来看, UPLC的分离度更好, 响应更高(进样量由5 μL降为1 μL)。其中谱图中红色箭头处几个大峰为我们特别关注的杂质。

表1.将样品检测方法转化到亚2 μm色谱柱上进行分离

分析条件	HPLC方法	UPLC方法
色谱柱	C ₁₈ , 4.6*150 mm, 3.5 μm	HSS T3, 100*2.1 mm, 1.8 μm
流速	1.0 mL/min	0.45 mL/min
进样量	5 μL	1 μL
分析时间	60 min	25 min

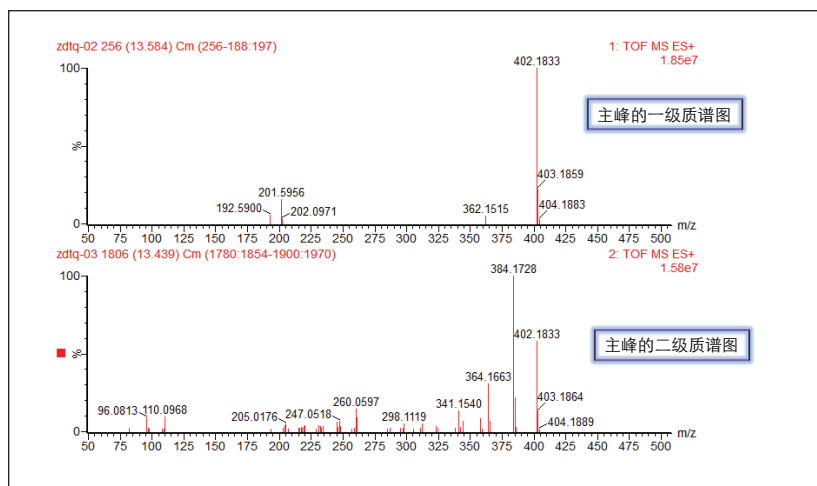


图6. 主峰的一级质谱图和二级质谱图。

采用MassLynx软件, 通过准确的质量数和同位素匹配确定分子式, 之后再根据二级碎片质谱对结构进行确认。以主峰为例说明判断分子式的过程, 如图7确认分子式。再通过软件MassFragment功能对二级碎片进行自动解析, 如图8, 可看出, 其碎片的精确度也非常好, 质量偏差很小。

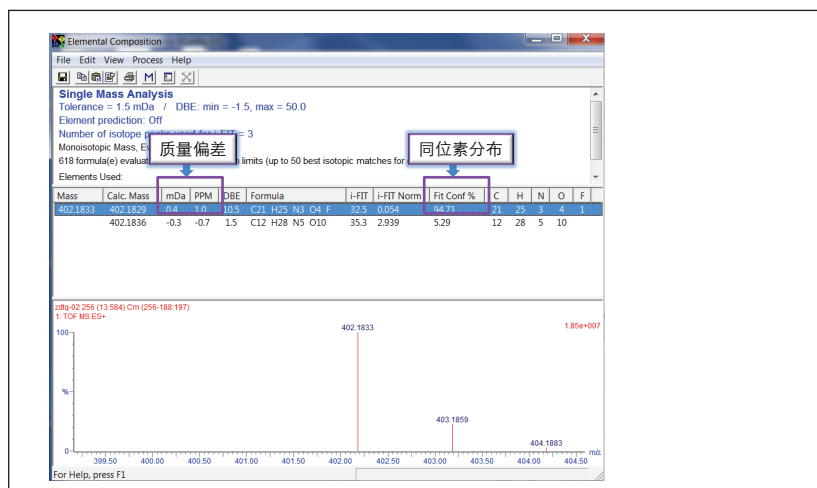


图7. 通过准确的质量数和同位素分布来确定分子式(以主峰为例)。

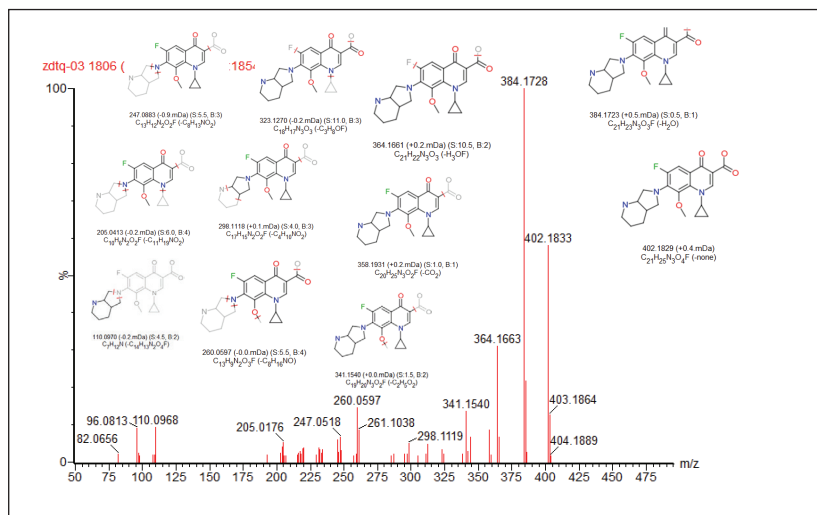


图8. 通过准确的质量数和同位素分布来确定分子式(以主峰为例)。

使用MetaboLynx对杂质进行自动解析, 其解析结果界面如图9, 可以自动得到杂质列表, 其中包含分子量、分子式、质量偏差、峰面积及其结构信息。软件还自动显示每个杂质在样品中的提取离子流图、在空白中的提取离子流图、一级质谱图和二级质谱图, 使杂质的分析更明确。通过此软件可快速得到其整个样品谱图上所有杂质的信息, 具体如图10显示。其中从“质量偏差(mDa)”可看出由Xevo G2-S QTof可获得很好的质量精度, 其质量偏差在0.8 mDa以内。“杂质与母药关系”一栏, 可快速获得其结构的相关信息。如写“Hydroxylation”即“主峰的结构+O”, “Hydroxylation + desaturation”即“主峰的结构+O-H₂”。另外出现如(R₀-CH₂)等“R₋”的形式是指软件自动对主峰进行烷基化断裂后的结构(软件已自动给出结构), 如“Hydration-CH₂ (R₀-CH₂)”即指“主峰-CH₂后的结构再+H₂O-CH₂”, 其结构也已呼之欲出。

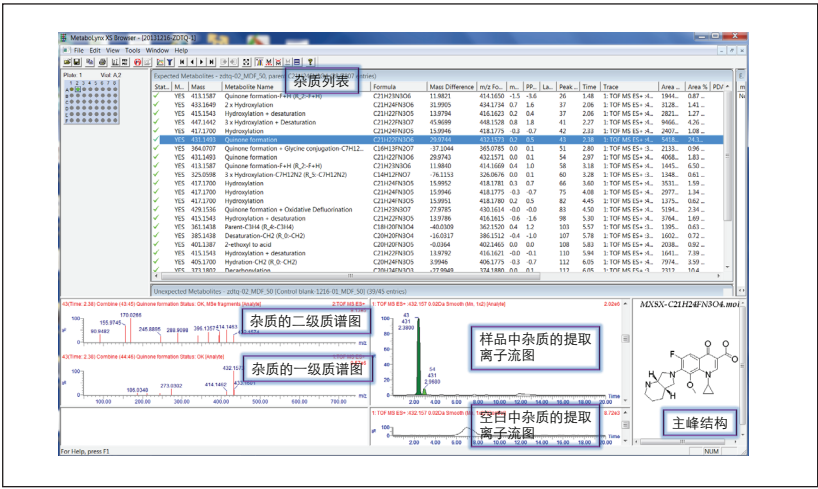


图9. MetaboLynx对杂质进行自动解析的界面。

杂质数	保留时间 (min)	分子量	杂质与母药关系	分子式	与母药的质量偏差	m/z [H]	质量偏差 (mDa)	峰面积 (MS)
1	2.06	415.1543	Hydroxylation + desaturation	C21H22FN3O5	13.9794	416.1623	0.2	28215.4
2	2.06	433.1649	2 x Hydroxylation	C21H24FN3O6	31.9905	434.1734	0.7	31281.3
3	2.27	447.1442	3 x Hydroxylation + Desaturation	C21H22FN3O7	45.9699	448.1528	0.8	94660.8
4	2.33	417.1700	Hydroxylation	C21H24FN3O5	15.9946	418.1775	-0.3	24078.7
5	2.38	431.1493	Quinone formation	C21H22FN3O6	29.9744	432.1573	0.2	541861.1
6	2.80	364.0707	Quinone formation + glycine conjugation-C7H12N2	C16H13FN2O7	-37.1044	365.0785	0	21339.3
7	2.97	431.1493	Quinone formation	C21H22FN3O6	29.9743	432.1571	0	40682.5
8	3.18	413.1587	Quinone formation-F+H (R ₂ -F+H)	C21H23N3O6	11.984	414.1669	0.4	144555.6
9	3.28	325.0598	3 x Hydroxylation-C7H12N2 (R ₅ -C7H12N2)	C14H12FN3O5	-76.1153	326.0676	0	13489.6
10	3.60	417.1700	Hydroxylation	C21H24FN3O5	15.9952	418.1781	0.3	35315.7
11	4.08	417.1700	Hydroxylation	C21H24FN3O5	15.9946	418.1775	-0.3	29776.5
12	4.45	417.1700	Hydroxylation	C21H24FN3O5	15.9951	418.178	0.2	13750.1
13	4.50	429.1536	Quinone formation + Oxidative Defluorination	C21H23N3O7	27.9785	430.1614	0	51941.1
14	5.30	415.1543	Hydroxylation + desaturation	C21H22FN3O5	13.9786	416.1615	-0.6	37645.7
15	5.57	361.1438	Parent-C3H4 (R ₄ -C3H4)	C18H20FN3O4	-40.0309	362.152	0.4	13959.6
16	5.78	385.1438	Desaturation-CH2 (R ₀ -CH2)	C20H20FN3O4	-16.0317	386.1512	-0.4	16024
17	5.83	401.1387	2-ethoxyl to acid	C20H20FN3O5	-0.0364	402.1465	0	20389.5
18	5.94	415.1543	Hydroxylation + desaturation	C21H22FN3O5	13.9792	416.1621	0	164162.6
29	6.05	373.1802	Decarbonylation	C20H24FN3O3	-27.9949	374.188	0	231287.6
20	6.05	405.1700	Hydration-CH2 (R ₀ -CH2)	C20H24FN3O5	3.9946	406.1775	-0.3	79747.6
21	6.52	359.1645	Decarbonylation-CH2 (R ₀ -CH2)	C19H22FN3O3	-42.0112	360.1717	-0.6	69515.3
22	8.01	279.0543	Demethylation + hydroxylation-C7H12N2 (R ₅ -C7H12N2)	C13H10FN3O5	-122.1215	280.0614	-0.7	19689.1
23	8.64	399.1794	Oxidative Defluorination	C21H25N3O5	-1.9965	400.1864	-0.8	140767.3
24	8.70	417.1700	Hydroxylation	C21H24FN3O5	15.9952	418.1781	0.3	57685
25	11.62	415.1907	Methylation	C22H26FN3O4	14.0152	416.1981	-0.4	192541.7
26	15.76	415.1743	Hydroxylation + Oxidative Defluorination	C21H25N3O6	13.999	416.1819	-0.2	52295.1
27	18.20	397.1638	Oxidative Defluorination + Desaturation	C21H23N3O5	-4.012	398.1709	-0.7	36549.6
28	18.73	292.0859	C14H13N2O4F	C14H13N2O4F	-109.0892	293.0938	0	487233.2

图10. 通过软件自动得到的莫西沙星注射液(光照10天)样品杂质列表, 包含杂质峰m/z、保留时间、分子量、分子式、质量偏差、峰面积及具体的结构信息等。

客户特别关心的三个大峰紫外谱图中5.93 min、8.60 min、18.68 min的杂质信息如表2。其中5.93 min和8.60 min的峰包含有多个杂质，未完全分开。从图11中，RT 5.93 min的一级质谱图可看出：m/z 187.5981为带了双电荷的分子离子，与m/z 374.1880为同一化合物，且m/z 374.1880的含量较高。图12可以看出，200.5981为带了双电荷的分子离子，与400.1866为同一化合物，此杂质浓度较高。图11、12、13分别列出了这三个色谱峰的一级质谱图、每个杂质组分的二级质谱图及可能的结构。

表2. 客户关心峰的杂质信息

紫外谱图中保留时间 (min)	保留时间 (min)	分子量	杂质与母药关系		分子式	m/z[+H+]	质量偏差 (mDa)
5.93	5.94	415.1543	Hydroxylation + desaturation	+O-H ₂	C ₂₁ H ₂₂ FN ₃ O ₅	416.1621	0
	6.05	373.1802	Decarbonylation	-CO	C ₂ OH ₂₄ FN ₃ O ₃	374.188	0
	6.05	405.1700	Hydration-CH ₂ (R ₀ -CH ₂)	+H ₂ O-CH ₂	C ₂ OH ₂₄ FN ₃ O ₅	406.1775	-0.3
8.60	8.64	399.1794	Oxidative Defluorination	-F+OH	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₅	400.1864	-0.8
	8.70	417.1700	Hydroxylation	+O	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₅	418.1781	0.3
18.68	18.73	292.0859	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ F	-C ₇ H ₁₁ N	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ F	293.0938	0

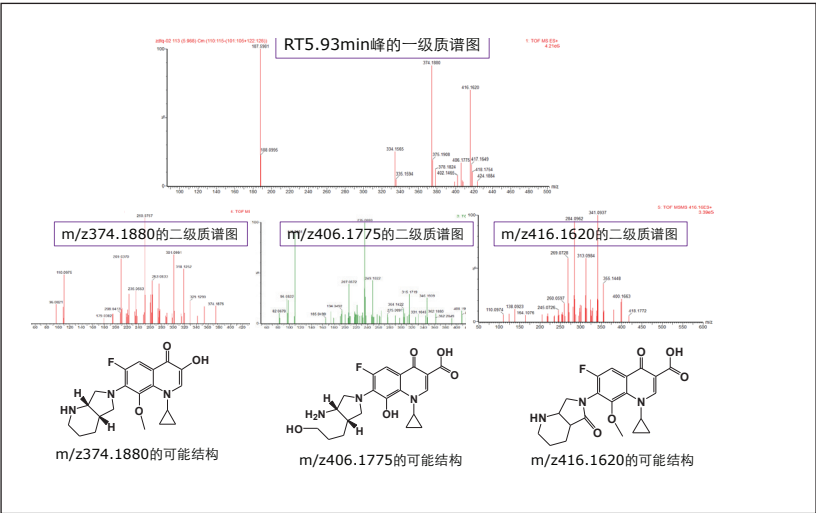


图11. 紫外谱图中RT 5.93 min峰包含的杂质一级及二级质谱图及可能结构。

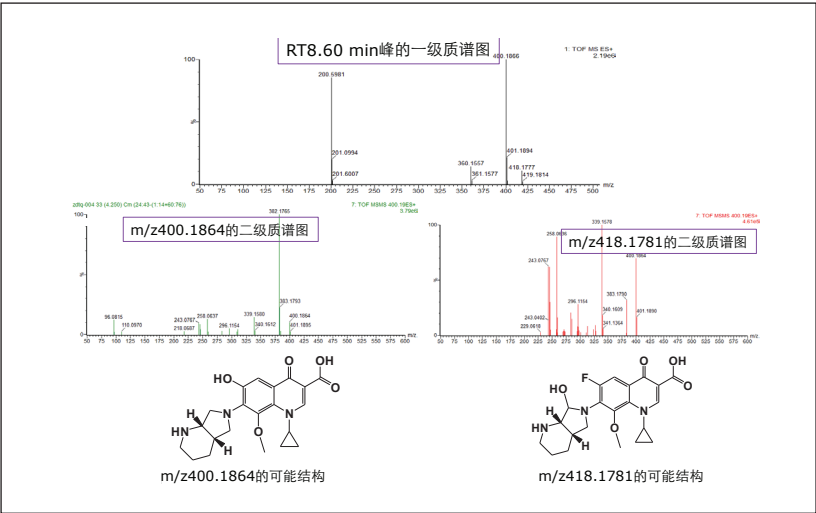


图12. 紫外谱图中RT 8.60 min峰包含的杂质一级及二级质谱图及可能结构。

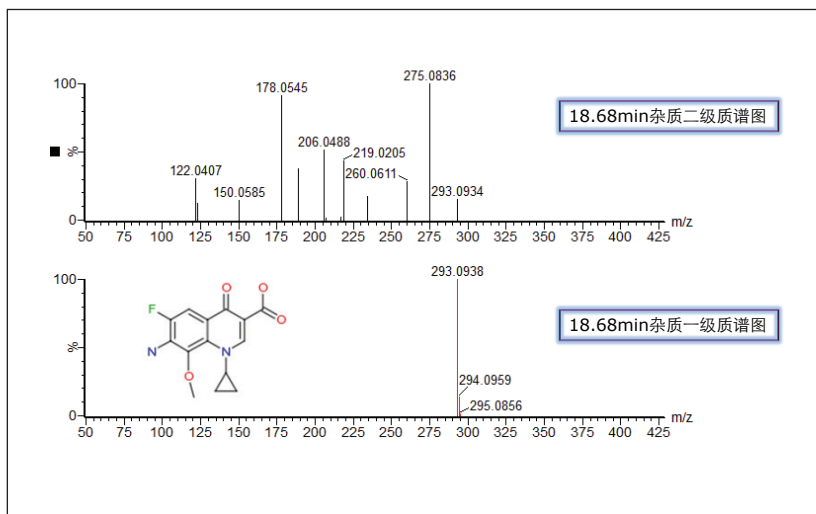


图13. 紫外谱图中RT 18.68 min峰包含的杂质一级及二级质谱图及可能结构。

结论

本实验将常规HPLC色谱柱检测方法平行转化为亚2 μm 的UPLC色谱柱检测, 分析时间由60 min缩短至25 min, 大大提高分析效率, 同时流速由1 mL/min降至0.45 mL/min, 节约了溶剂成本。分离度及出峰情况与原谱图保持一致。应用Xevo G2-S QToF能得到最准确的分子量,其杂质质量偏差在0.8 mDa以内, 同时利用MetaboLynx智能软件, 快速得到包含所有杂质峰m/z、保留时间、分子量、分子式、质量偏差、峰面积及具体结构信息的杂质列表, 提取离子流图、一级和二级质谱图等信息, 大大节省人力及时间。通过此杂质列表及质谱图可得到杂质的可能结构, 再通过MassFragment功能对杂质二级碎片结构进行匹配进而确定杂质结构。从此推断流程可看出, 在高效的UPLC、精准的QToF仪器及强大的智能软件帮助下, 复杂的杂质结构鉴定工作变得更简单轻松, 对人员的经验、资历背景依赖性降低, 大大节省人力、物力和时间成本, 对于药物的有关物质研究工作起到积极的推动作用。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, Xevo, MassLynx, ACQUITY UPLC, UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。MetaboLynx是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司
2014年7月 印制于中国

沃特世中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 5999
成都: 028 - 6578 4990
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com