

超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用解析泰地罗新注射液中的有关物质

严凤¹ 周哲² 黄家莺¹ 潘娟¹ 曹莹¹ 李丹妮¹ 张婧¹ 吴剑平¹ 顾欣^{1,*}

(1 上海市兽药饲料检测所, 上海 201103; 2 赛默飞世尔科技(中国), 上海 201206)

摘要: **目的** 本方法建立了超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用(UHPLC-Q Exactive)分析注射用泰地罗新中的有关物质。**方法** 采用(Zorbax SB-C₁₈, 100mm×3.0mm, 1.8μm) 色谱柱, 以0.1%三氟乙酸溶液(A)-0.1%三氟乙酸乙腈溶液(B)为流动相, 0.3mL/min线性梯度洗脱分离; 采用全扫描及自动触发二级质谱扫描的功能测定。采集有关物质的质谱母离子及子离子谱, 并进行解析, 推测有关物质的结构。**结果** 在所建立的条件下, 泰地罗新及其有关物质之间分离良好, 检测出12个有关物质, 并对其进行结构解析。**结论** 建立的Q Exactive四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法能有效地分离分析泰地罗新及其有关物质, 为注射用泰地罗新的质量控制和工艺优化提供了参考。

关键词: 泰地罗新注射液; 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 有关物质

中图分类号: R978.1+5 文献标志码: A

Analysis of the related substances in tildipirosin for injection by ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry

Yan Feng¹, Zhou Zhe², Huang Jia-ying¹, Pan Juan¹, Cao Ying¹, Li Dan-ni¹, Zhang Jing¹, Wu Jian-ping¹ and Gu Xin¹

(1 Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103;

2 Thermofisher Scientific (China), Shanghai 201206)

Abstract Objective An ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry method (UHPLC-Q Exactive) was developed for the analysis of the related substances in tildipirosin for injection. **Methods** The UHPLC separation was carried out on a Zorbax SB-C₁₈ (100mm×3.0mm, 1.8μm) by the gradient elution with a mobile phase consisting of 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution (A) and 0.1% trifluoroacetic acid acetonitrile solution (B) at a flow rate of 0.3mL/min. The rapid screening was carried out by Full MS/dd-MS². The analysis of the related substances were performed with the parent ions and the fragments ions by data dependent scan mode. **Results** Good resolution of tildipirosin and the main related substances were achieved. Twelve related substances in tildipirosin for injection were separated and detected. **Conclusion** The established method is effective for the separation and identification of the related substances in tildipirosin for injection and the results are useful for its quality control and process optimization.

Key words Tildipirosin for injection; Quadrupole orbitrap mass spectrometry; Related substances

泰地罗新(tildipirosin)是国外公司开发的最新动物专用的大环内酯类半合成抗生素, 为泰乐菌素的衍生物。2011年3月, 欧盟兽用药品委员会(CVMP)准许了英特威公司以泰地罗新为主要成分的无菌注

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[No. (2016)3-2]

作者简介: 严凤, 女, 生于1981年, 畜牧师, 主要从事兽药残留分析工作, E-mail: yan508@163.com

*通讯作者, E-mail: guxun@139.com

注射液(商品名为Zuprevo)的市场许可申请,随后在欧盟国家相继批准上市。泰地罗新是广谱抗菌药,对一些革兰阳性和革兰阴性细菌均具有抗菌活性,对引起猪、牛和羊呼吸系统疾病的病原菌尤其敏感,如胸膜肺炎放线菌、多杀性巴氏菌、支气管败血波氏杆菌、副猪嗜血菌以及溶血性曼海姆菌、睡眠嗜组织菌等。泰地罗新对牛和猪的呼吸道疾病具有十分明显的治疗效果,药效强于泰乐菌素和替米考星,而且具备动物专用、用量少、一次给药全程治疗、超长的消除半衰期、生物利用度高和低残留等众多优点^[1]。

药物中的杂质是指存在于药物中,但化学结构与药物不一样的任何一种成分,其中与药物结构类似或具渊源的杂质又称为有关物质^[2]。杂质的活性药物成分可能对药物产品的质量和靶动物的安全性产生较大影响。因此,进行药物或制剂中有关物质的测定,对于优化化学的合成过程和药物制剂工艺,减少甚至消除此类杂质是至关重要的。

近年来,药品“杂质谱控制”理念逐渐形成,而药品中的所有杂质被有效分离,确证每一个杂质的来源与结构是其中的关键技术^[3],传统药物分析中有关杂质检测方法包括HPLC色谱峰比较法和薄层色谱法等,相对于传统的有关物质检测方法,液质联用技术具有专属性好、灵敏度高、结构解析能力强和分析速度快优势^[4-5]。

高分辨质谱借助超高的分辨率,可以准确地测得杂质精确的质荷比,进而计算出杂质的元素组成,并能区分复杂背景中质量数接近的杂质及共流出组分,可以不经复杂的分离和纯化步骤即可获得样品的色谱和质谱信息,通过一些相同的中性碎片或形成一些相同的特征离子,推导其裂解规律,为解析化合物的结构提供直接证据,是一种可以针对目标或非目标药杂质研究的有力工具,在药物质量研究领域得到越来越多的应用^[6-7]。

本文建立了Q Exactive四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析注射用泰地罗新中的有关物质,并通过高分辨质谱对泰地罗新中有关物质进行了质谱测定,得到了主成分和有关物质的质谱信息,并将国产制剂与进口制剂的有关物质进行了比较,为其质量控制和工艺优化提供参考。

1 仪器与试剂

Dionex Ultimate 3000 RSLC-Q Exactive, Xcalibur 2.2数据处理系统(美国Thermo Scientific

公司), Compound Discoverer软件(美国Thermo Scientific公司)。

泰地罗新注射液(上海同仁药业有限公司上海兽药厂,批号为20101201),进口泰地罗新注射液(英特威公司,批号为A153A01),异构体杂质HM-375_6-F对照品(上海同仁药业有限公司上海兽药厂,批号为20150312),水解杂质HM-375_6-1对照品(上海同仁药业有限公司上海兽药厂,批号为20150204);乙腈(色谱纯),去离子水,甲酸(分析纯)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈(100mm×3mm, 1.8μm); 流动相: 0.1%三氟乙酸溶液(A)-0.1%三氟乙酸乙腈溶液(B); 流速0.3mL/min, 采用梯度洗脱程序(表1); 柱温30℃, 进样量10μL。

2.2 质谱条件

离子源为HESI源, 雾化气40arb; 辅助气10arb; 喷雾电压3500V(+)/3000V(-); 离子传输毛细管温度320℃; 辅助气温度350℃; 扫描模式: 正负离子切换Full MS/dd-MS², Full MS分辨率70000, dd-MS²分辨率17500, 扫描范围*m/z*: 150~1000。MS/MS模式时, 归一化阶梯碰撞能量: 20%、40%和60%。

表1 梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution

<i>t</i> /min	A/%	B/%
0	95	5
5	75	25
10	10	90
12	10	90
14	95	5

2.3 供试品制备

取适量泰地罗新注射液,用10%乙腈溶液稀释至浓度为0.2mg/mL,混匀,离心,取上清液进样检测。

3 结果

采用本方法对国产泰地罗新和进口泰地罗新分别进行检测,共测到12个主要相关杂质,其中含有多个同分异构体。通过Q Exactive测得的各个有关物质的母离子精确质量和二级碎片推测可能的结构。同时比较了两种制剂有关物质的区别。

3.1 泰地罗新与有关物质1和有关物质2

泰地罗新(图1)的[M+H]⁺一级母离子精确质量为734.5304,与理论值734.53021偏差Δ*m*=1.62ppm,它的相对分子量为733.5241,保留时间7.36min,其二级质谱主要碎片主要有561.4262、174.1125和98.0964。

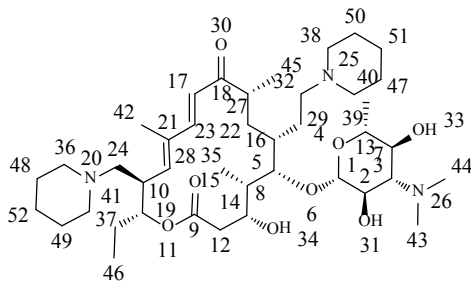


图1 泰地罗新结构

Fig. 1 Structure of tildipirosin

二级质谱碎片561.42560为酯键断裂后的泰勒内酯基团，174.11238为酯键断裂后的碳霉胺糖碎片，98.09682为哌啶胺碎片(图2)。上述3个碎片为泰地罗新及其有关物质的特征碎片。

有关物质1的保留时间为7.47min，在本文系统中与泰地罗新未完全分离；有关物质2的保留时间为7.65min(图3)；有关物质1和2的分子量与泰地罗新分子量相同，推测分别为泰地罗新的同分异构体杂质1和同分异构体杂质2，其二级质谱碎片信息(表2)与泰地罗新一致。

3.2 有关物质3和有关物质4

有关物质3和4，保留时间分别为6.90和7.03min(图4)，测得 $[M+H]^+$ 的精确质量 m/z 752.5419，根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $C_{41}H_{73}N_3O_9$ ，比泰地罗新多 H_2O ，为泰地罗新水解产物，有关物质3和4为同分异构体，其二级质谱碎片信息(表2)与泰地罗新相似。经杂质对照品比照分析，有关物质4为11位酯键水解杂质。有关物质3无法通过二级碎片确定水解位置，但因为 C_{30}

位上的羰基吸电子作用，使得 $C_{17}-C_{23}$ 双键位置电荷密度加大，在该位置发生水解的可能性较大^[8]。

3.3 有关物质5和有关物质6

有关物质5和6的保留时间分别为6.92和7.21min(图5)，测得 $[M+H]^+$ 的精确质量 m/z 720.5157，根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $C_{40}H_{69}N_3O_8$ ，比泰地罗新 $[M+H]^+$ 少 CH_2 ，因此推测为泰地罗新的去甲基杂质。由二级质谱可知，有关物质5含有碎片 m/z 174，同时存在碎片 m/z 547，表明其碳霉胺糖结构完整，故有关物质5去甲基发生在泰勒内酯基团上，有关物质6碎片 m/z 174消失，可见 m/z 561，故推测去甲基发生在碳霉胺糖的N位上(图6)。

3.4 有关物质7

有关物质7的保留时间为7.02min，测得 $[M+H]^+$ 的精确质量 m/z 706.5001，根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $C_{39}H_{67}N_3O_8$ ，比泰地罗新少 C_2H_4 ，极性增强，同时其产生可见碎片 m/z 561，因此推测为碳霉胺糖的N位二甲基脱去后形成的杂质(图7)。

3.5 有关物质8和有关物质9

有关物质8和9的保留时间分别为7.65和7.77min(图8)，测得 $[M+H]^+$ 的精确质量均为 m/z 748.5472，说明是同分异构体，比泰地罗新 $[M+H]^+$ 分子量多14，极性减弱，因此推测为泰地罗新的甲基化杂质。有关物质8和9可见碎片 m/z 174，表明去甲基位置发生在泰勒内酯与哌啶胺上，有关物质9可见明显碎片 m/z 112，元素组成拟合为 $C_7H_{14}N$ ，表明结构可能发生的变化为哌啶胺替换为环己亚胺(图9)。

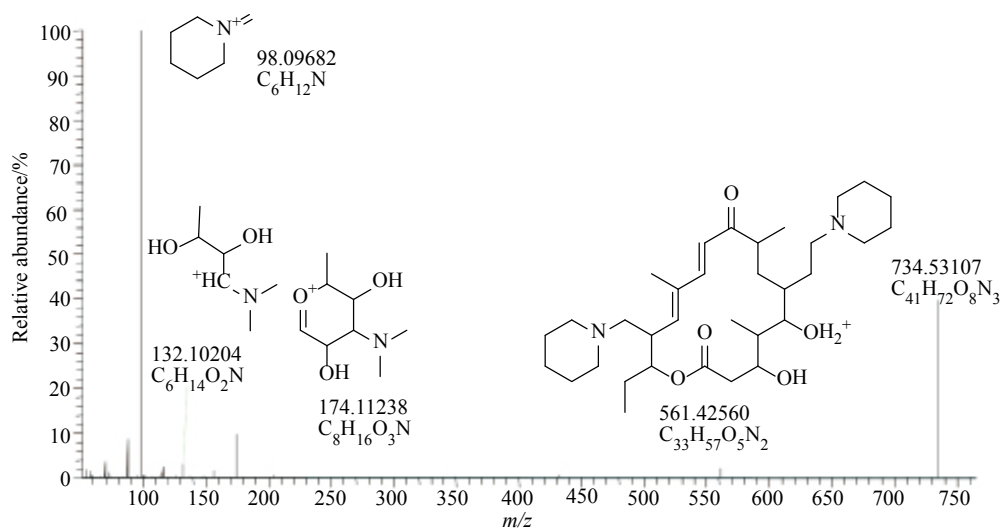


图2 泰地罗新二级碎片结构图

Fig. 2 MS/MS spectra of tildipirosin

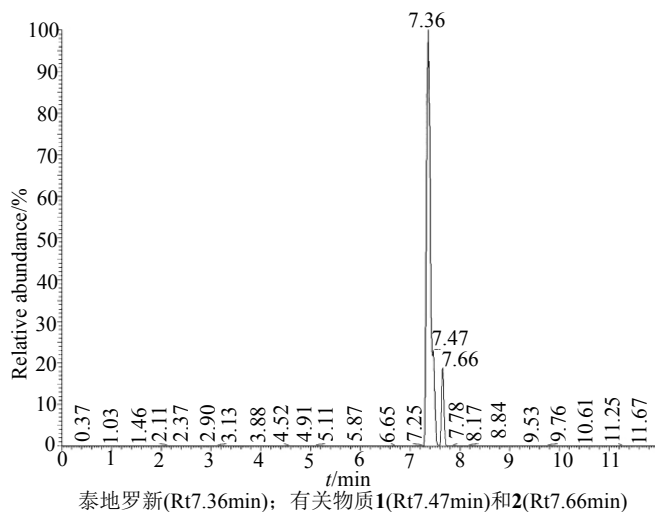


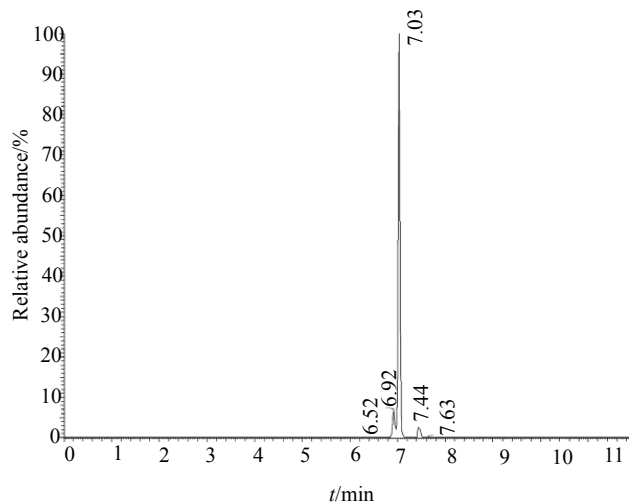
图3 泰地罗新、有关物质1和2的总离子流图(TIC)

Fig. 3 Total ion chromatography (TIC) of tildipirosin related substance 1 and 2

表2 泰地罗新与有关杂质的一级精确质量及二级碎片

Tab. 2 The parent ions and fragments ions of tildipirosin and its related substances

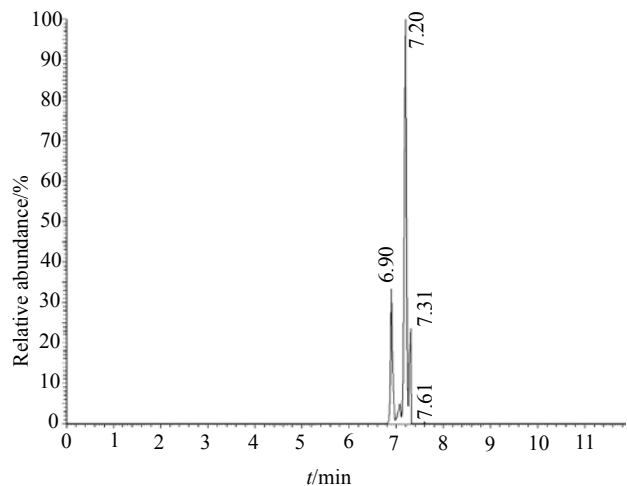
药物	实测值 m/z	理论值 m/z	分子式	偏差/ppm	t/min	碎片1 m/z	碎片2 m/z	碎片3 m/z
泰地罗新	734.53021	734.5314	$\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_8$	1.6	7.36	561.4262	174.1125	98.0964
有关物质1	734.53052	734.5314	$\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_8$	1.1	7.47	561.4262	174.1125	98.0964
有关物质2	734.53015	734.5314	$\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_8$	1.7	7.65	561.4262	174.1125	98.0964
有关物质3	752.54163	752.54196	$\text{C}_{41}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_9$	0.4	6.9	174.1125	98.0964	
有关物质4	752.5415	752.54196	$\text{C}_{41}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_9$	0.6	7.03	174.1125	98.0964	
有关物质5	720.51538	720.51574	$\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_8$	0.5	6.92	547.4105	174.1125	98.0964
有关物质6	720.51477	720.51574	$\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_8$	1.3	7.06	561.4262	98.0964	
有关物质7	706.49969	706.50009	$\text{C}_{39}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_8$	0.5	7.02	561.4262	98.0964	
有关物质8	748.54681	748.54704	$\text{C}_{42}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_8$	0.3	7.65	174.1125	98.0964	
有关物质9	748.54584	748.54704	$\text{C}_{42}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_8$	1.6	7.77	174.1125	112.1121	98.0964
有关物质11	665.43829	665.43716	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_9$	1.7	7.69	174.1125	98.0964	
有关物质12	649.44269	649.44224	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_8$	0.7	8.86	476.3367	174.1125	



有关物质3(Rt6.92min)和4(Rt7.03min)

图4 有关物质3和4的总TIC图

Fig. 4 TIC of related substance 3 and 4



有关物质5(Rt6.90min)和6(Rt7.20min)

图5 有关物质5和6的TIC

Fig. 5 TIC of related substance 5 and 6

3.6 有关物质10

有关物质10的保留时间为7.44min, 测得 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的精确质量 m/z 750.5272, 根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_9$, 比泰地罗新多个氧, 为泰地罗新的氧化杂质, 根据其特征碎片 m/z 577及结构特点, 推测其氧化位于哌啶N位(图10)。

3.7 有关物质11

有关物质11的保留时间为7.69min(图11), 测得 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的精确质量 m/z 665.4380, 根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_9$, 比泰地罗新 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 分子量少69, 因其工艺中存在中间体羰基-*O*-碳霉胺糖基-泰勒内酯^[9], 故推测为泰地罗新去哌啶环醛基杂质。

3.8 有关物质12

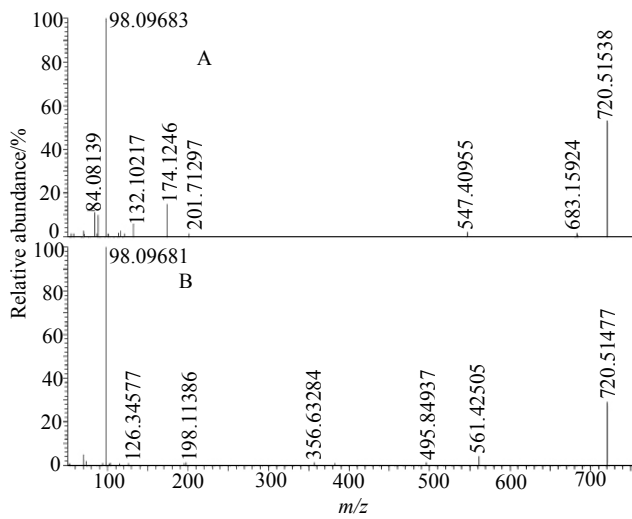


图6 有关物质5和6的二级碎片图
Fig. 6 MS/MS spectra of related substance 5 and 6

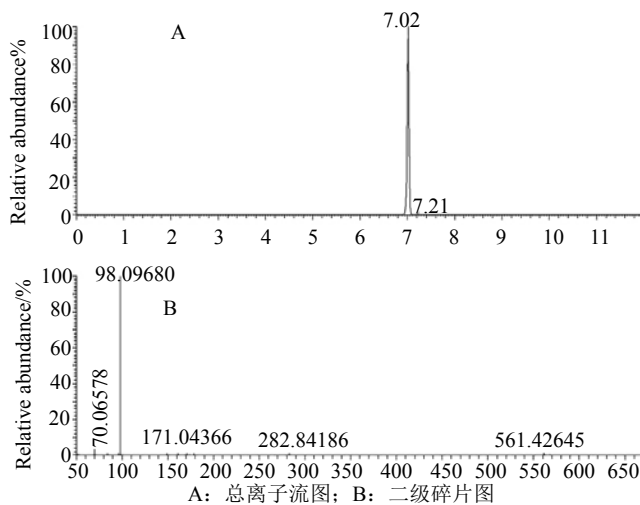


图7 有关物质7的TIC图和二级碎片图
Fig. 7 TIC and MS/MS spectra of related substance 7

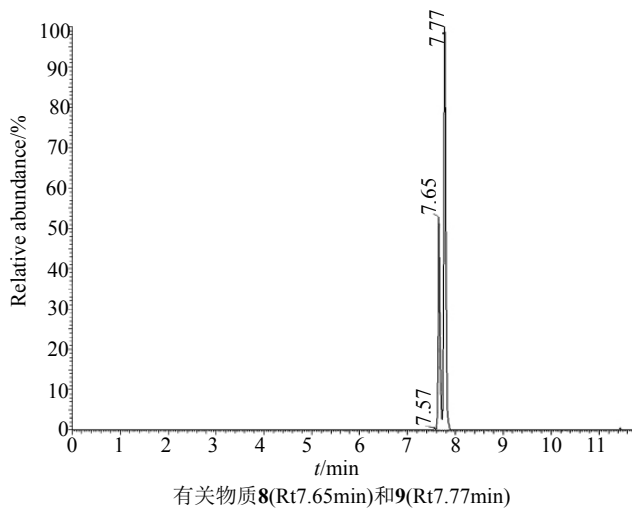


图8 有关物质8和9的TIC图
Fig. 8 TIC of related substance 8 and 9

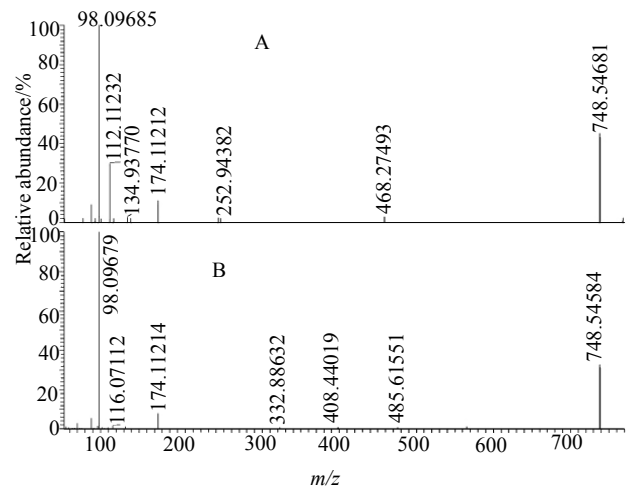


图9 有关物质8和9的二级碎片图
MS/MS spectra of related substance 8 and 9

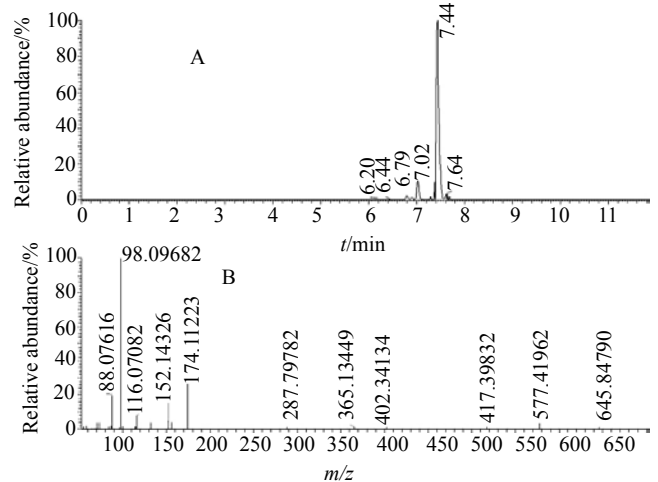


图10 有关物质10的TIC图和二级碎片图
TIC and MS/MS spectra of related substance 10

有关物质12的保留时间为8.86min(图12), 测得 $[M+H]^+$ 的精确质量 m/z 649.4427, 根据精确质量数结合同位素丰度计算可知其元素组成为 $C_{36}H_{60}N_2O_8$, 比泰地罗新的相对分子量少85, 推测为泰地罗新去哌啶环烯基杂质。

3.9 进口制剂与国产制剂的比较

进口制剂与国产制剂的有关物质峰种类并无明显差别, 但在各自制剂中的相对含量有所不同(图13), 可能与生产工艺的不同有关(表3)。

4 讨论

4.1 异构体杂质

国产泰地罗新注射液中有有关物质1和2是两个明显的异构体杂质, 有关物质1是最大的异构体杂质且与主峰未完全分离, 经对照品分析该有关物质为

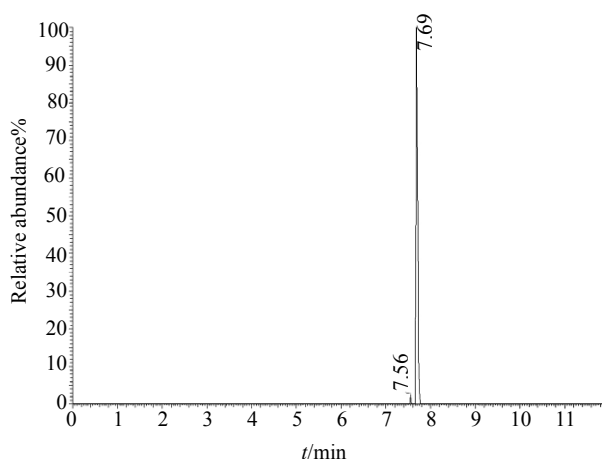


图11 有关物质11的TIC图
Fig. 11 TIC of related substance 11

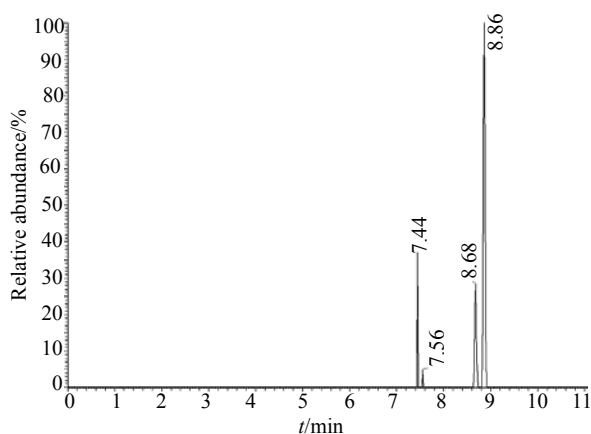


图12 有关物质12的TIC图
Fig. 12 TIC of related substance 12

HM-375_6-F。有关物质1在国产泰地罗新注射液中的含量大于其在原料中的含量(图14)。异构体杂质二级质谱未见明显差异,推测为手性异构体。

4.2 水解杂质

国产泰地罗新注射液中至少有2个明显的水解杂质,即有关物质3和4。经杂质对照分析,图15制剂中4.57min杂质为水解杂质HM-375_6-1。4.2min杂质推

测可能是在C₁₇-C₂₃位置发生水解^[8],水解杂质在制剂中的含量大于原料中的含量,推测与生产工艺相关。

4.3 进口制剂与国产制剂比较

进口制剂与国产制剂的有关物质基本一致,由于不同化合物在质谱中的响应差异较大,因此对提取离子流图谱采用面积归一化方法来计算有关物质的含量是不准确的,但本文通过这个方法对进口制剂与国产制剂的有关物质进行了横向的比较,发现去二甲基杂质(有关物质7)、甲基化杂质(有关物质8)、甲基化杂质(有关物质9)、去哌啶环醛基杂质(有关物质11)和去哌啶环烯基杂质(有关物质12)的含量有较大的差异,推测可能生产工艺不同导致的结果。通过比较国产制剂在药效学上与进口制剂相似。

4.4 流动相的选择

本方法将0.1%三氟乙酸溶液-0.1%三氟乙酸乙腈溶液和0.1%甲酸溶液-0.1%甲酸乙腈溶液两种流动相体系进行比较,发现在含有三氟乙酸的流动相条件下,泰地罗新及其相关物质的分离度更好,有关物质8和9在乙腈-甲酸体系中虽能分离出,但分离度不高(图16)。但三氟乙酸浓度过高对质谱会产生离子抑制作用,因此,最终选用0.1%的浓度添加到流动相中。

5 小结

本方法建立了Q Exactive四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析注射用泰地罗新中的有关物质,检测灵敏度高,检测出注射用泰地罗新中的12个有关物质。根据母离子精确质量和二级碎片推测可能的结构。同时比较了进口制剂与国产制剂的有关物质,因为生产工艺的不同其有关物质的含量也有所不同。利用四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱检测和鉴定有关物质的结构将会有更广泛的应用。

参考文献

- [1] 李伟岭, 杨芳, 于振梅, 等. 泰地罗新研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(10): 50-53.
- [2] 农业部兽药评审中心. 兽用化学药物杂质研究技术指导

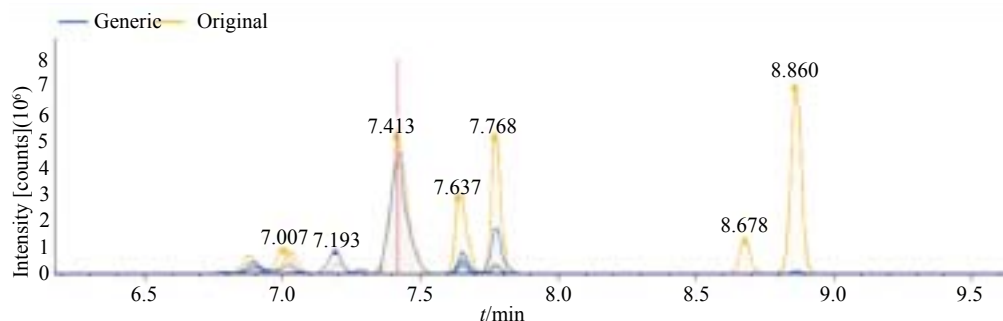
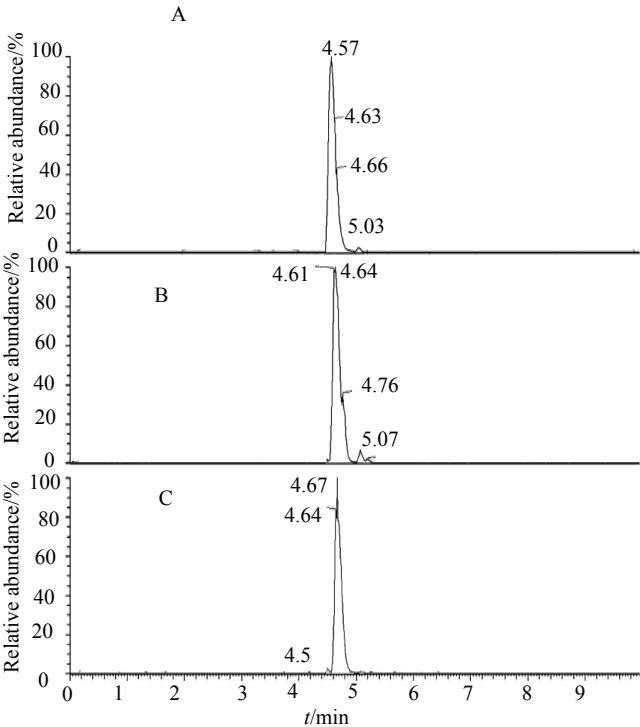


图13 原研制剂和国产制剂杂质提取TIC图
Fig. 13 TIC of original injection and generic injection

表3 国产注射液与进口注射液有关物质比较
Tab. 3 Compared of generic injection and original injection

有关物质	m/z	Rt/min	进口注射液	国产注射液
有关物质1	734.5304	7.46	未完全分离	未完全分离
有关物质2	734.5304	7.65	155565873(1.88%)	69763911(1.07%)
有关物质3	752.5419	6.9	1710120(0.02%)	1193222(0.02%)
有关物质4	752.5419	7.03	1780697(0.02%)	714573(0.01%)
有关物质5和6	720.5157	6.92和7.21	1495997(0.02%)	2676840(0.04%)
有关物质7	706.5001	7.02	63595(0.001%)	461894(0.01%)
有关物质8	748.5472	7.65	5397356(0.07%)	1328215(0.02%)
有关物质9	748.5472	7.77	7917068(0.10%)	2802614(0.04%)
有关物质10	750.5272	7.44	15185989(0.18%)	11787467(0.18%)
有关物质11	665.438	7.69	64914(0.001%)	389361(0.01%)
有关物质12	649.4427	8.86	12167648(0.15%)	190210(0.003%)
泰地罗新主峰	734.5304	7.36	8083320189(97.57%)	6451900743(98.60%)



A: 泰地罗新原料; B: 国产泰地罗新注射液; C: HM-375 6-F对照品
图14 异构体杂质
Fig. 14 Isomer impurity

原则[S]. 北京: 化学工业出版社, 2012.

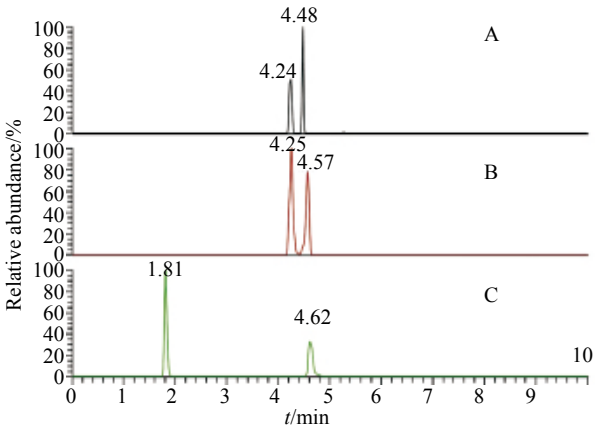
[3] 梁晟, 胡娟妮, 吴琦琦, 等. 头孢呋辛酯中有关物质的LC-MS/MS分析[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(4): 480-485.

[4] 雷勇胜, 宋丽明, 蒋庆峰. 液质联用技术在药物的有关物质分析中的应用[J]. 现代仪器, 2011, 4(17): 9-13.

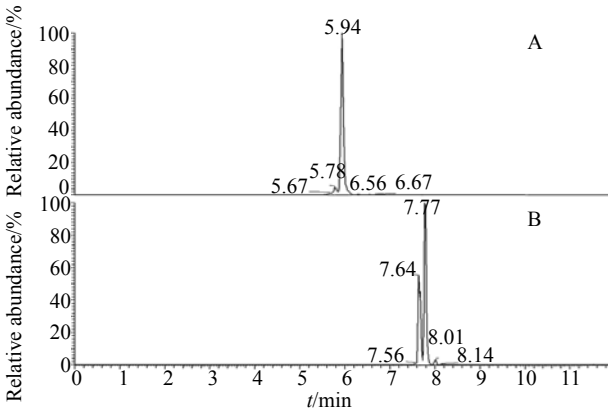
[5] 王宇驰, 唐克慧, 张静霞, 等. 超高效液相色谱法测定罗红霉素分散片的溶出度[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(4): 260-263.

[6] 高明, 颜晓丹, 金松子, 等. LC-MS在药物有关物质分析中的应用[J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 63-66.

[7] 陈晓雨, 李银峰, 林秀云, 等. LC-MS技术在化学药杂质分析中的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(6): 696-700.



A: 泰地罗新原料; B: 国产泰地罗新注射液; C: HM-375_6-1对照品
图15 水解杂质
Fig. 15 Hydrolysis impurity



A: 乙腈-甲酸流动相体系; B: 乙腈-三氟乙酸流动相体系
图16 有关物质10和11在2种流动相体系中的分离效果
Fig. 16 The separation of related substance 10 and 11 by two types of mobile phases

[8] Shruti C, Ann V S, Jos H, *et al.* Characterization of impurities in tylosin using dual liquid chromatography combined with iontrap mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2013, 106: 29-38.

[9] 何林华, 向毅, 陈小林, 等. 一种泰地罗新的制备方法及中间体化合物: CN, 104558076A[P]. 2015-04-29.