

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.023

高分辨液质联用法测定奥司他韦原料药中有关物质*

陈志谦¹, 符旭东², 钟昌平¹

(1. 湖北省武汉市汉阳医院, 湖北 武汉 430050; 2. 中国人民解放军中部战区总医院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 建立测定奥司他韦原料药中有关物质的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)法,并鉴定其结构。方法 色谱柱为 Kinetex 柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),进样量为 5 μL,检测波长为 207 nm,ESI 电离源,正离子扫描模式。结果 奥司他韦色谱峰峰形良好,经 UPLC-Q-TOF-MS 的一级和二级质谱图鉴定出 4 种有关物质,其中 2 种未见文献报道,并推导出了其裂解规律。结论 该方法适用于奥司他韦原料药中有关物质的快速测定,可供其质量控制参考。

关键词:奥司他韦;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱;质量控制;有关物质;原料药

中图分类号:R927.2;R978.7

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0086-04

Determination of Related Substances in the Bulk Oseltamivir by UPLC-Q-TOF-MS

CHEN Zhiqian¹, FU Xudong², ZHONG Changping¹

(1. Wuhan Hanyang Hospital, Wuhan, Hubei, China 430050; 2. Central Theater General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Wuhan, Hubei, China 430070)

Abstract: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS) method for determination of the related substances in bulk oseltamivir and to identify their structures. **Methods** The analysis was carried out by using a Kinetex Core-Shell C₁₈ column(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid solution with acetonitrile(gradient elution). The detection wavelength was 207 nm. The injection volume was 5 μL. The mass spectrometry analysis was performed in an ESI positive mode. **Results** The peak of bulk oseltamivir was well-shaped. Four related substances were identified by level I and II UPLC-Q-TOF-MS, two of which had not been reported. Possible fragmentation pathway of the drug as well as the two unknown substances were established. **Conclusion** This method is suitable for the quick determination of related substances in bulk oseltamivir, which can be used to improve the quality of the product.

Key words: oseltamivir; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry; quality control; related substances; bulk drug

奥司他韦磷酸盐是一种用于治疗流感的抗病毒药物,可选择性抑制病毒的神经氨酸酶来控制病毒的复制,用于治疗流感。与扎那米韦(zanamivir)相比,奥司他韦属乙酸酯类药物,在体内肝酯酶作用下能迅速转化为高活性的奥司他韦羧酸盐,有利于生物体的快速吸收,可大大减少并发症的发生(如气管与支气管炎、肺炎等)^[1-2],是目前治疗禽流感最有效的药物^[3-4]。随着禽流感在全球范围的暴发,奥司他韦作为对 H1N1, H5N1, H9N2 等亚病毒具有抑制作用的抗病毒药物受到

广泛关注。由于流行病暴发及相应市场需求的无法预测性,大量的奥司他韦会被存储起来,以防备流行病的发生,超过 5 年保存期导致大量过期,又因其存储昂贵而未被销毁。关于过期奥司他韦的药物有效性及安全性,欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局(FDA)规定,在非特殊情况下,不得使用过期及未按要求储存的奥司他韦。同时,学术界对过期奥司他韦的安全性及成分也开展了研究^[5-6]。本研究中采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)法测

*基金项目:湖北省武汉市科技计划项目[2017060201010182]。

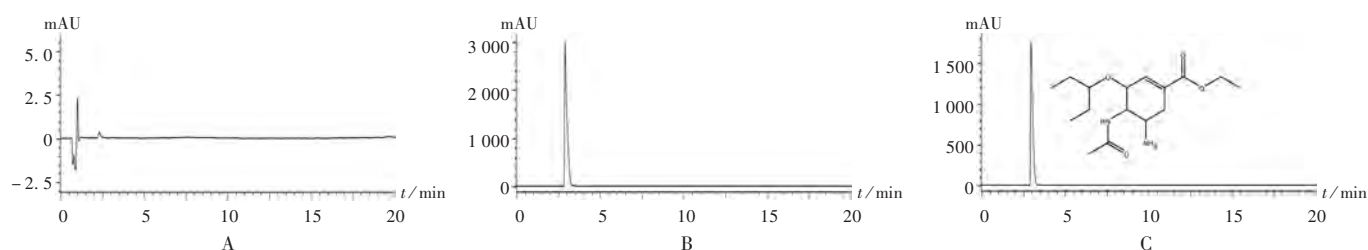
第一作者:陈志谦,男,大学本科,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)185289266@qq.com。

- [7] 张荣林,林雀跃. 超高效液相色谱法测定清咽糖中 6 种绿原酸类化合物的含量[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(16):5506-5511.
- [8] 牟倩倩,马祖兵,孙强,等. 五味子中五味子醇甲提取纯化工艺的优化[J]. 中成药,2019,41(2):255-261.
- [9] 姜鑫,董宇,曲绪楷,等. 高效液相色谱法同时测定保健食品软胶囊剂型中五味子甲素、五味子乙素和五味子醇甲[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(18):4959-4963.
- [10] 关皎,马莹慧,刘娇,等. UPLC-MS/MS 法同时测定五味子中 5 个活性成分的含量[J]. 中药新药与临床药理,

2018,29(6):785-789.

- [11] 尚海花,王森,刘颖,等. HPLC 法测定不同产地刺五加中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶[J]. 现代药物与临床,2018,33(6):1324-1328.
- [12] 王红梅,张水龙. HPLC 法测定喘息灵胶囊中甘草和五味子的含量[J]. 海峡药学,2018,30(10):72-74.
- [13] 胡小祥,何艳,张霞,等. HPLC 变换波长法测定伤风停胶囊中橙皮苷、甘草酸和欧前胡素含量[J]. 中国药师,2019,22(10):1925-1927.

(收稿日期:2020-01-14)



1. 奥司他韦
A. 空白溶剂 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 奥司他韦高效液相色谱图

定奥司他韦原料药中的有关物质,并对其结构进行鉴定,旨在为奥司他韦的质量控制及安全使用提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters acquity 液相色谱仪, Xevo TQ-S 型质谱仪, 配备电喷雾离子源, 飞行时间质谱检测器, Mass Lynx V4.1 数据分析软件, 均购自美国沃特世公司; Mettler AE-240 型电子天平(梅特勒公司, 精度为 0.1 mg)。

1.2 试剂

奥司他韦对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 101096-201501); 奥司他韦原料药(药企 A, 批号为 180621-34); 甲酸为 LCMS 级, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

液相色谱条件: 色谱柱为 Kinetex 柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~1 min 时 2% B, 7~9 min 时 100% B, 9.1~12 min 时 2% B); 流速为 0.4 mL/min; 检测波长为 207 nm; 柱温为 40 °C; 进样量为 5 μL。

质谱条件: ESI 离子源, 正离子全扫描方式, MS1 扫描范围为质荷比(m/z) 100~1 000, MS2 扫描范围为 m/z 100~1 000; 喷雾电压为 2.5 kV; 锥孔电压为 25 V; 去溶剂温度为 500 °C; 去溶剂气体为 800 L/h。

2.2 溶液制备

取奥司他韦对照品 5 mg, 精密称定, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 滤过, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的奥司他韦对照品溶液。取奥司他韦原料药 50 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 滤过, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的奥司他韦供试品贮备液; 量取上述贮备液 2 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容, 摇匀, 即得奥司他韦供试品溶液。

2.3 奥司他韦含量测定

2.3.1 色谱分析

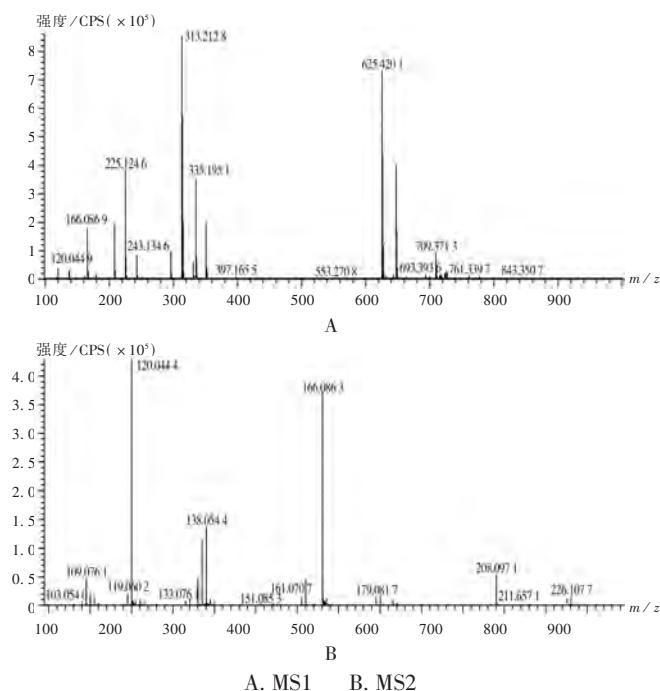
取 2.2 项下各溶液, 按拟订色谱条件进样分析。结

果奥司他韦相对保留时间(RT)为 4.18 min, 峰形良好。色谱图见图 1。

2.3.2 奥司他韦裂解规律

在 UPLC-Q-TOF-MS 系统中, 将奥司他韦对照品溶液以流动注射方式进样(流速为 0.1 mL/min), 获得一级(MS_1)和二级(MS_2)质谱图。奥司他韦分子式为 $C_{16}H_{28}N_2O_4$, 单同位素精确质量为 312.204 9。 MS_1 中 m/z 313.212 8 为 $[M+H]^+$ (见图 2 A), 与理论值 m/z 313.212 2 比较, 误差为 -1.91×10^{-6} , 表明仪器精密度高, 结果准确、可靠。

对奥司他韦二级质谱图进行解析(见图 2 B), 其裂解碎片规律主要根据准确分子方程式, 等效双键数(DBE), 奇偶数互变脱氮, 由分子结构特性等进行推测, 其主要碎片包括 m/z 226.107 7, 208.097 1, 166.086 3, 138.054 4, 120.044 4。



A. MS_1 B. MS_2

图2 奥司他韦标样质谱图

奥司他韦的加氢离子 $[M+H]^+$ 的 m/z 为 313.212 8, 分子结构式为 $C_{16}H_{29}N_2O_4^+$, DBE 为 4.0。碎片离子 m/z 226.107 7 的精确离子结构式为 $C_{11}H_{16}NO_4^+$, DBE 为 4.0。

由于 m/z 在碎裂前后由奇数变为偶数,表明有 N 的脱落,而 DBE 没有发生改变,且没有 O 的变化,表明脱落的 N 为连接在环上的氨基。根据分子结构,脱落的 C_5H_{13} 为醚上的碳支链。碎片离子 m/z 208.097 1,其精确离子结构式为 $C_{11}H_{14}NO_3^+$,DBE 为 5.0,在碎片离子 m/z 226.107 7 的基础下脱去 1 个 H_2O ,根据结构及 DBE 值增加 1 分析,脱去位置为环上的酚羟基,并形成双键。

奥司他韦有关物质提取离子流图见图 3。由碎片离子 m/z 208.097 1 可见,可发生多个途径的分子碎裂:1)碎片离子 m/z 166.086 3,其精确离子结构式为 $C_9H_{12}NO_2^+$,DBE 为 4.0,在碎片离子 m/z 208.097 1 的基础上脱去 C_2H_2O ,DBE 值减少 1,因此减去了 1 个含氧双键,但这个含氧双键不会是羧基上 $C=O$,否则其后面的 C_2H_5O 都会脱去,因此脱去的为连接在氨基上的羧基;2)碎片离子 m/z 138.054 4,其精确离子结构式为 $C_7H_8NO_2^+$,DBE 为 4.0,在碎片离子 m/z 208.097 1 的基础下脱去 $C_2H_2O + C_2H_4$,因此除了脱去连接在氨基上的羧基还脱去了酯上的乙基;3)碎片离子 m/z 120.044 4,其精确离子结构式为 $C_7H_6NO^+$,DBE 为 4.0,在碎片离

子 m/z 138.054 4 基础上继续脱去 1 个 H_2O ,只能发生在羧基上脱水。奥司他韦分子的裂解规律分析与文献[7-9]报道一致,有助于分析奥司他韦降解规律,以及分解产物和杂质结构的鉴定。

2.4 奥司他韦有关物质检测及结构鉴定

在奥司他韦原料药中共鉴定出 4 种有关物质(杂质 1,2,3,4),其保留时间分别为 1.41,2.25,4.36,4.08 min,详见图 3。杂质 3 和杂质 4 为 2015 年版《中国药典(二部)》磷酸奥司他韦收录杂质。杂质 1 和杂质 2 尚未见报道,可能为药品合成工艺中的副产物,也可能是由于奥司他韦药物长期储存发生分解产生,其安全性未知。

杂质 1 出峰时间为 1.41 min,其一级质谱图中 m/z 243.133 8 为 $[M+H]^+$ (见图 4 A),分子式预测结果为 $C_{11}H_{18}N_2O_4$,与理论值 m/z 243.133 9 误差为 -0.59×10^{-6} 。按和奥司他韦裂解规律类似的方法推导杂质的结构,其可能的结构见图 3。二级质谱主要碎片为 m/z 208.096 4,166.085 7,137.070 1,120.043 8,109.075 6(见图 4 B),可能的二级裂解规律推导见图 5 A。

杂质 2 出峰时间为 2.25 min,其一级质谱图中 m/z 243.133 6 为 $[M+H]^+$ (见图 4 C)。分子式预测结果为 $C_{11}H_{18}N_2O_4$,与理论值 m/z 243.133 9 误差为 -1.40×10^{-6} 。由于杂质 2 的出峰时间在杂质 1 后,推测其可能的结构见图 3。二级质谱主要碎片为 m/z 166.085 7,162.052 6,137.070 1,120.043 8,109.075 6(详见图 4 D),可能的二级裂解规律推导见图 5 B。

2.5 方法学考察

专属性试验:称取奥司他韦原料药 50 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,按拟订色谱条件进样分析,记

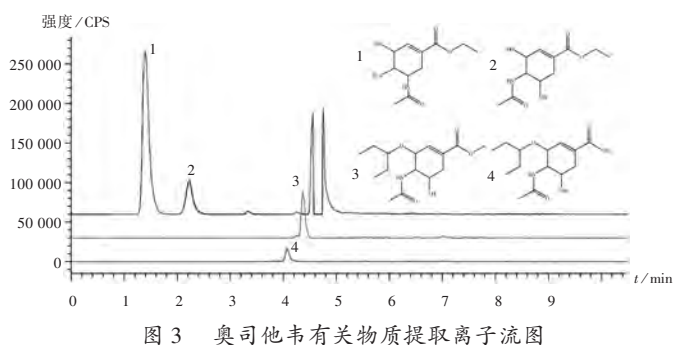
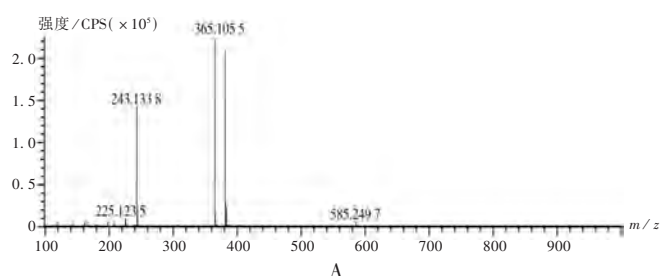
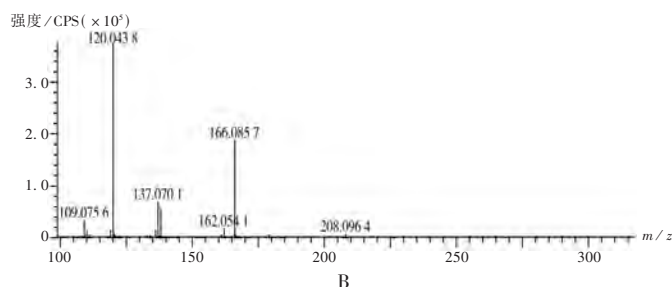


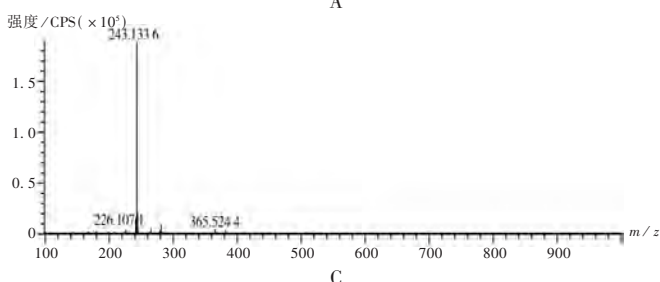
图 3 奥司他韦有关物质提取离子流图



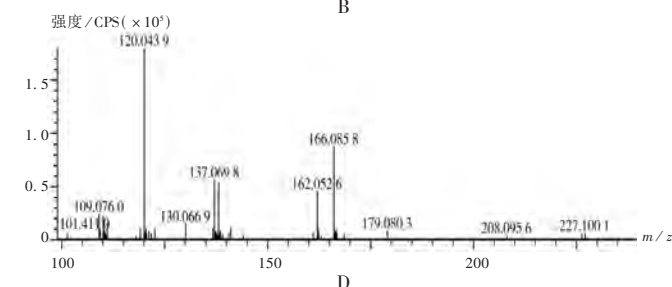
A



B



C



D

A. 杂质 1(MS1) B. 杂质 1(MS2) C. 杂质 2(MS1) D. 杂质 2(MS2)

图 4 奥司他韦杂质 1 和杂质 2 的一级和二级质谱图

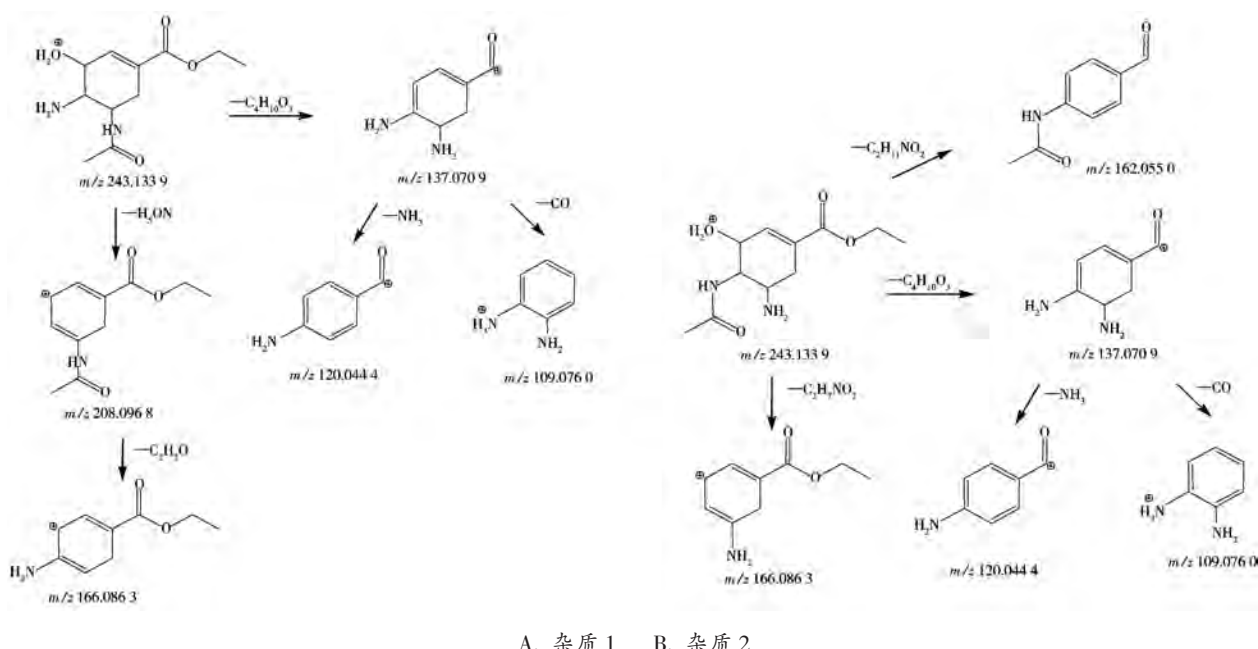


图5 奥司他韦杂质1和杂质2的二级碎片裂解推导图

录色谱图。结果主峰与以上破坏产生的降解物峰均能获得良好分离,不干扰奥司他韦的测定。

线性关系考察:取奥司他韦对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释成质量浓度为0.25,0.5,1.0,5.0,12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按拟订色谱条件进样20 μL ,测定。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(C)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $A=24.15C+1.213$, $r=0.9996$ ($n=5$)。结果表明,奥司他韦质量浓度在0.25~12.50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限:取奥司他韦对照品溶液,逐步稀释,按拟订色谱条件进样测定。以信噪比(S/N)=10计,奥司他韦定量限为9 ng;以 $S/N=3$ 计,检测限为3 ng。

精密度试验:取奥司他韦对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,重复进样5次。结果的 RSD 为0.17% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

3 讨论

采用UPLC-Q-TOF-MS法对奥司他韦药物的结构及其分子在质谱中的裂解规律进行精确地定性分析,其裂解碎片的质量数与理论值间的偏差均在 10^{-6} 量级,证明了方法的准确性及结构推导的可靠性。本研究中对奥司他韦碎片裂解的定性分析可以用于奥司他韦药物的质谱快速鉴定,以及食品、环境等各种基质中的残留检测及药物评价。

本研究中首次鉴定出奥司他韦原料药中2种新型有关物质。有可能为药品合成工艺中的副产物,也可能是由于奥司他韦药物长期储存发生分解产生,其服用后对生物体的影响未知,其药用效果及毒理有待后续评价。

参考文献:

- [1] 程能能,陈斌艳,王永铭. 新型口服抗流感药——磷酸奥司他韦[J]. 中国临床药理学杂志,2002,11(1):55-59.
- [2] 宋立刚,袁 晔,闵昌敏. 磷酸奥司他韦(达菲)的安全使用[J]. 天津药学,2006,18(1):34-35.
- [3] KUMAR S, CHUSID MJ, WILLOUGHBY RE, et al. Introduction of a novel swine - origin influenza A (H1N1) virus into Milwaukee, Wisconsin in 2009[J]. Viruses, 2009, 1(1):72-83.
- [4] NICHOLSON KG, AOKI FY, OSTERHAUS A, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial [J]. Lancet, 2000, 355(9218):1845-1850.
- [5] CORDOVES P, ISA A, FARIAS M, et al. Determination of the Antiviral Drug Oseltamivir (Tamiflu) by Adsorptive Stripping Voltammetry [J]. Curr Pharm Anal, 2011, 7(2):71-78.
- [6] CHARLES JJ, GENESTE C, LABORDE EK, et al. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu and generic versions [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 44(4):1008-1013.
- [7] WANG WL, WU QY, WANG ZM. Photocatalytic degradation of the antiviral drug Tamiflu by UV - A/TiO₂: Kinetics and mechanisms [J]. Chemosphere, 2015, 131:41-47.
- [8] ACCINELLI C, CARACCILO AB, GRENNI P. Degradation of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in surface water samples[J]. Int J Environ Anal Chem, 2007, 87(8):579-587.
- [9] GONCALVES C, PEREZ S, OSORIO V, et al. Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: Kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(10):4307-4314.

(收稿日期:2019-12-31;修回日期:2020-02-07)