华西药学杂志
W C J ·P S 2006 ,21(3) :270～272

色谱二维光谱相关法识别莫西沙星中的杂质

李 玮[1,2] ,胡昌勤[2] ,杭太俊[3]
(1. 安徽省药品检验所 ,安徽 合肥 230061 ;2. 中国药品生物制品检定所 ,北京 100050 ;3. 中国药科大学分析测试中心 ,江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 建立识别 HPLC 色谱图中莫西沙星杂质色谱峰的色谱二维光谱相关方法。**方法** 采用高效液相色谱 - 二极管阵列检测器(HPLC - DAD) ,建立杂质标准色谱光谱数据 ;通过样品的色谱光谱数据与标准色谱光谱数据的二维相似计算 ,对杂质进行识别。**结果** 色谱二维光谱相关法在不同色谱系统下均能准确定性 ,对样品中杂质判断结果与质谱法一致 ,识别的最低检出限为 30 ng。**结论** 色谱二维光谱相关法可有效地对 HPLC 分析中的色谱峰进行识别 ,具有准确度高、耐用性好、多组分同时快速定性的特点 ,适用于归属因色谱柱、流动相等色谱条件的改变 ,无法利用相对保留时间定性的色谱峰。

关键词:色谱二维光谱相关法 ;高效液相色谱 - 二极管阵列检测器 ;莫西沙星 ;杂质 ;鉴别
中图分类号:R927 **文献标识码**:A **文章编号**: 1006 - 0103(2006)03 - 0270 - 03

Identification of impurities in Moxifloxacin by chromatographic two - dimensional spectroscopy correlation

LI Wei[1,2] ,HU Chang - qin[2] ,HANG Tai - jun[3]
(1. *Anhui Institute for Drug Control , Hefei* 230061 , *China* ;2. *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products , Beijing* 100050 , *China* ;3. *Center for Instrumental Analysis , China Pharmaceutical University , Nanjing* 210009 , *China*)

Abstract : OBJECTIVE To establis a qualitative analysis method to identify related substances of Moxifloxacin by correlation of spectra in chromatography. **METHODS** Standard chromatographic and spectral data obtained by high - performance liquid chromatograpy with diode array detection(HPLC - DAD) were developed and used in identification of peaks in samples by calculating correlation coefficients. **RESULTS** Peaks in chromatography can be identified accurately and rapidly through chromatographic system such as column and mobile phase change. The limit amount for identification was 30 ng. **CONCLUSION** The method is accurate and reproducible as a new and effective way to identify multi - components in drugs when relative retention times are incapable due to changes of chromatographic system.

Key words : Chromatographic two - dimensional spectroscopy correlation ;HPLC - DAD ;Moxifloxacin ; Impurities ; Identification
CLC number :R927 **Document code :A** **Article ID :**1006 - 0103(2006)03 - 0270 - 03

控制药品中的杂质是药品质量控制的核心。HPLC 法是药品杂质检查的常用方法 ,通常采用杂质对照品或相对保留时间(当无杂质对照品时)对杂质峰进行定性。但相对保留时间易受色谱条件的影响 ,当杂质较多而流动相条件有所改变时 ,如何准确快速地对各色谱峰进行归属就成为一个难题。高效液相色谱仪 - 二极管阵列检测器(HPLC - DAD)在采集待分析物的色谱数据的同时提供了光谱数据 ,为色谱峰的识别提供了又一种辅助手段。

盐酸莫西沙星是第四代氟喹诺酮抗生素 ,质量控制中需对多个杂质逐一进行控制[1] ,分析方法主要采用 HPLC 法[2,3]。实际工作中 ,杂质的相对保留时间随不同色谱柱和流动相而改变 ,无法用来定性。用各对照品单独进样 ,通过保留时间一致性来定性 ,费时费力 ,且各杂质对照品用量较大、难以获得。为此 ,特建立了色谱二维光谱相关法 ,可在无杂质对照品的情况下对色谱图中莫西沙星的杂质进行快速而准确地识别。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

高效液相色谱仪包括 LC - 10AT 泵 , SIL - 10AVP 自动进样器、SPDM10AVP 二极管阵列检测器(日本 Shimadzu 公司) ;Shiseido capcell MG C_{18}柱(250 mm ×4.6 mm ,5 μm) ;Alltech Alltima C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm ,5 μm) 。莫西沙星、8 - 羟基莫西沙星、6 ,8 - 二甲氧基莫西沙星、8 - 乙氧基莫西沙星和 6 - 甲氧基 - 8 - 氟代莫西沙星等对照品(图 1 ,德国 Bayer 公司) ;盐酸莫西沙星注射液(市售) ;三乙胺(北京化学试剂公司) ;乙腈(美国 Fisher 公司 ,色谱纯) ;其余试剂均为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 实验条件 流动相 1 为磷酸盐缓冲液(1 g 磷酸二氢钾 + 10 mmol 硫酸四丁基铵 ,加水 1 L 溶解 ,用磷酸调 pH2.5) - 乙腈(85 ∶15) 。流动相 2 为 1 %三乙胺溶液(磷酸调 pH2.5) - 甲醇(70 ∶30) 。流

作者简介:李玮(1975 -) ,男 ,主管药师 ,从事药品检验工作。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

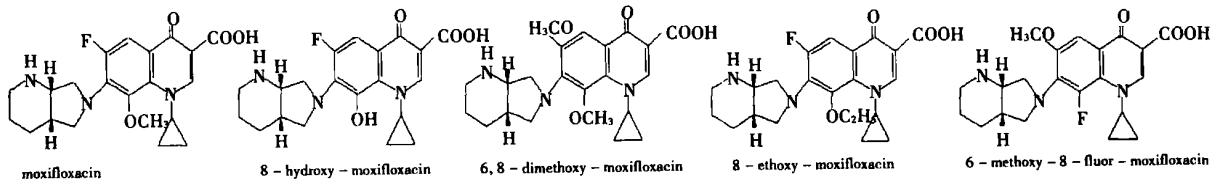

图 1　莫西沙星及其有关物质的结构

Fig 1　The structures of Moxifloxacin and its related substances

速 1.0 ml·min⁻¹;柱温 30 ℃;DAD 波长设定范围 190～500 nm;UV 检测波长 293 nm;进样量 20 μl。LC/MS 流动相为乙腈 - 水(50∶50);流速 0.6 ml·min⁻¹;柱后不分流;ESI 正离子检测;氮气流速 10 ml·min⁻¹;加热管温度 300 ℃;喷雾针电压 5.0 kV;锥孔电压为 80 V,扫描质谱范围 110～700 m/z。

1.2.2　对照品溶液的配制　精密称取盐酸莫西沙星和各杂质对照品适量,分别用适量稀磷酸贮备液(1∶1000)溶解,并定量稀释制成 1 mg·ml⁻¹的对照品贮备液;用时以流动相定量稀释成适当浓度的工作液。

1.2.3　标准色谱 - 光谱数据的建立　取莫西沙星及 4 个杂质对照品贮备液适量,制成约 50 μg·ml⁻¹的混合溶液。进样 20 μl,采用流动相 1,记录色谱图,提取 221～420 nm 的三维色谱(图 2)数据,步长 1 nm,以 ASC Ⅱ码形式保存,作为标准色谱光谱数据。

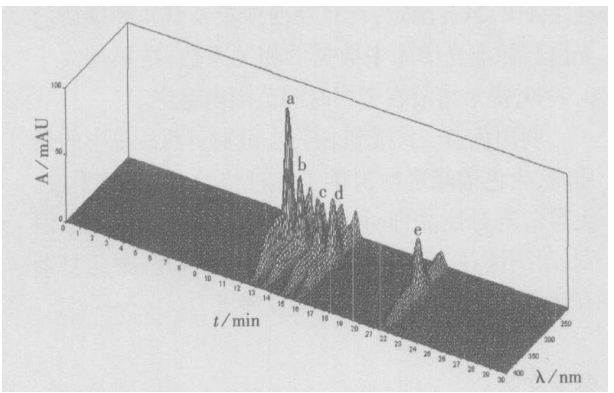

图 2　莫西沙星及其 4 种有关物质的三维色谱图(流动相 1)

Fig 2　HPLC chromatogram of Moxifloxacin and its related substances (mobile phase 1)

a. 8 - hydroxy - moxifloxacin; b. moxifloxacin; c. 6,8 - dimethoxy - moxifloxacin; d. 6 - methoxy - 8 - fluor - moxifloxacin; e. 8 - ethoxy - moxifloxacin

1.2.4　数据分析　采集的三维色谱图数据导出为 ASC Ⅱ码格式,执行 MATLAB 6.5 版语言程序进行二维相关计算及作图,在 IBM - PC 上运行。

1.2.5　不同流动相色谱峰的识别　当优化或比较不同色谱条件时,多组分的保留时间往往有变,难以确认其色谱峰归属。而色谱二维光谱相关法则能较好地解决这个问题。

取莫西沙星及 4 个杂质对照品贮备液适量,制成约 100 μg·ml⁻¹的混合溶液。取 20 μl 进样,采用

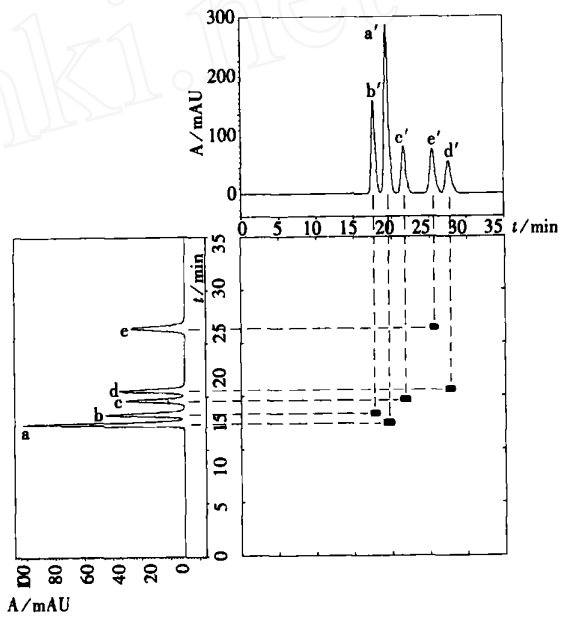

图 3　莫西沙星及其 4 种有关物质的色谱二维光谱相关图

Fig 3　Chromatographic two - dimensional spectral correlative maps of Moxifloxacin and its impurities

a,a′. 8 - hydroxy - moxifloxacin; b,b′. moxifloxacin; c,c′. 6,8 - dimethoxy - moxifloxacin; d,d′. 6 - methoxy - 8 - fluor - moxifloxacin; e,e′. 8 - ethoxy - moxifloxacin

流动相 2,记录色谱图(图 3),同法提取 221～420 nm 范围的三维色谱数据,将每一保留时间点的光谱与图 2 中每一保留时间点的光谱比较,进行二维光谱相关计算。比较后的结果以两色谱保留时间分别为 X 轴和 Y 轴、相关系数为 Z 轴作出三维相关图,设定 Z 轴相关系数阈值 0.9995 对三维图进行横切,等高图(色谱二维光谱相关图)见图 3。图中黑点表示两色谱图中光谱互相一致的色谱峰。可见,在流动相 2 的色谱系统中,各杂质峰相对保留时间变化较大,杂质峰 a′(moxifloxacin)与 b′(8 - hydroxy - moxifloxacin)、d′(8 - ethoxy - moxifloxacin)与 e′(6 - methoxy - 8 - fluor - moxifloxacin)相对于流动相 1 色谱系统,出峰顺序发生了对调。经各杂质对照品单独进样,证明色谱二维光谱相关图判断结果正确。

1.2.6　样品中杂质色谱峰的识别　当样品中有多个杂质组分时,往往难以判断其归属,而使用色谱二维光谱相关法无需对照品,可快速地同时定性各杂质色谱峰。取盐酸莫西沙星注射液适量,加流动相稀释成 1 mg·ml⁻¹的溶液,进样 0.2 ml,采用 Alltech

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Alltima C_{18}柱,流动相2。提取三维色谱数据,与图2中的标准色谱光谱数据进行二维光谱相关计算,r = 0.9995处的色谱二维光谱相关图见图4。可见,2号杂质与莫西沙星6,8-二甲氧基体标准光谱、3号杂质与8-乙氧基体标准光谱相似系数近似为1,故判定为同种物质。2号、3号杂质制备浓缩后用LC/MS鉴别(图5),质谱数据与色谱二维光谱相关法判别结果一致,证明色谱二维光谱相关法识别正确。

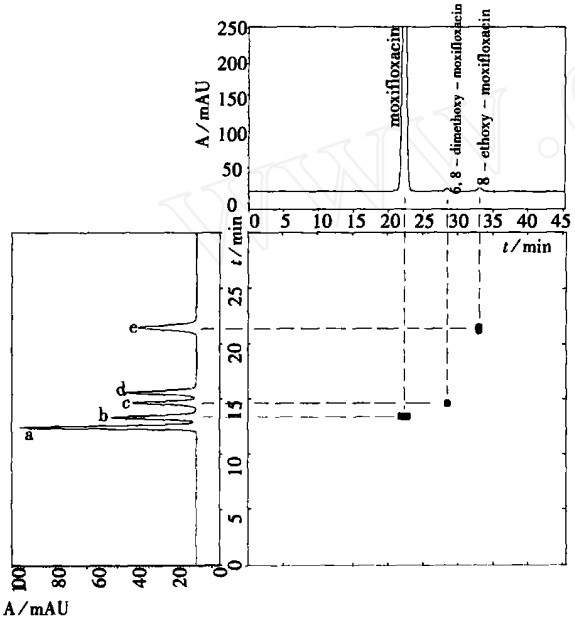

图4 莫西沙星注射液与标准色谱光谱数据的色谱二维光谱相关图

Fig 4 Two - dimensional chromatographic and spectral correlative map of Moxifloxacin injection and the standard data

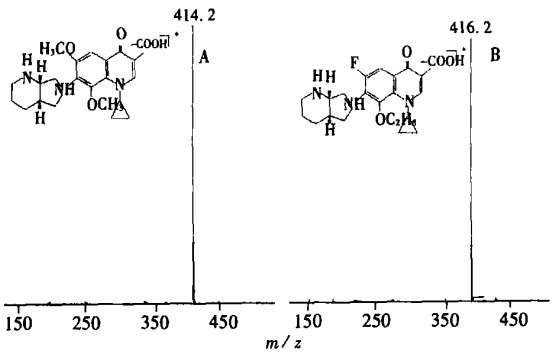

图5 图4中2号峰(A)和3号峰(B)的质谱图

Fig 5 Mass spectra of peak 2(A) and peak 3(B) in Fig 4

2 讨论

取莫西沙星及各杂质贮备液,分别稀释成0.5、1.0、1.5、3.0、8.0、15.0、30.0、50.0 μg·ml^{-1}的系列混合溶液,进样20 μl,分别计算各色谱峰光谱数据与标准光谱的相关系数。当浓度大于1.5 μg·ml^{-1}(即进样量大于30 ng)时,得到的光谱数据与各自的标准光谱相似度均在0.9995以上,每种物质的色谱峰都可通过其光谱特征被识别。低于此进样量时,各组分光谱因信噪比不足而有所变形,各色谱峰不能同时被准确识别。

用磷酸分别调节两种流动相的pH,分别在pH 2.0、2.5、3.0时试验。发现流动相pH的变化对杂质保留时间的影响较大。计算莫西沙星中4种杂质的光谱与标准光谱库中数据的相关系数,结果均大于0.9999,表明杂质光谱在pH2～3范围稳定。莫西沙星是两性化合物,pK_{a1}、pK_{a2}分别为6.4和9.5。在不同pH值条件下,阳离子、两性离子和阴离子这3种解离形式在溶液中的浓度分布不同,因此莫西沙星及其杂质的紫外吸收光谱对pH具有依赖性。在pH 2～3范围,溶液光谱较稳定。说明莫西沙星及其杂质的光谱与流动相pH有关,而与流动相中的组成成分、色谱柱关系不大,在pH接近的不同的色谱系统中,对各杂质峰有一定跟踪识别能力。

将莫西沙星及各杂质对照品贮备液混合,分别用两种流动相稀释成10 μg·ml^{-1}的混合溶液,分别在1、4、8、24 h测定,计算莫西沙星及其4种杂质的光谱与标准光谱库中数据的相关系数,结果均大于0.9999,提示溶液在考察时间范围内稳定。

利用色谱二维光谱相关法识别莫西沙星中的杂质峰,为色谱峰定性提供了一种快速、简便的手段。无需杂质对照品即可实现多种组分的同时跟踪识别,耐用性好,准确度高,在多组分药物和中药复杂有效成分归属方面有巨大的发展潜力。

参考文献:

[1] Y Ravindra K,VVNKV Prasad R,R Rajesh K,*et al*. Structural identification and characterization of impurities in moxifloxacin[J]. J Pharm Biomed Anal,2004,34(5):1125-1129.

[2] Sunderland J,Tobin CM,Hedges AJ,*et al*. Antimicrobial activity of fluoroquinolone photodegradation products determinated by parallel-line bioassay and high-performance liquid chromatography[J]. J Antimicrob chemother,2001,47(3):271-275.

[3] 朱斌,胡昌勤,蒋爱军,等. 高效液相色谱法测定莫西沙星制剂含量[J]. 中国抗生素杂志,2002,27(8):462-464.

收稿日期:2005-10

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net