

2D-LC-IT-TOF-MS 鉴定他克莫司原料有关物质

韩彬¹, 庞文哲¹, 高燕霞^{1*}, 刘英华², 韩丽莎²(1.河北省药品医疗器械检验研究院, 石家庄 050011, 2.华北制药股份有限公司, 石家庄 050011)

摘要: 目的 应用在线脱盐-飞行时间-液质联用法, 对他克莫司原料中检出的一杂质峰进行结构定性。方法 采用 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 3 μm), 乙腈-叔丁基甲醚-磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 然后采用 InertSustain C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2 μm), 0.1% 甲酸溶液-乙腈(30 : 70)为流动相, 等度洗脱; 电喷雾电离离子源, 正离子检测模式, 雾化气流速度 1.5 L·min⁻¹, 干燥气流速度 10 L·min⁻¹, 脱溶剂管温度 200 °C。根据多级图谱信息推定特定杂质峰结构。结果 推定出他克莫司原料中特定保留时间处色谱峰的物质结构, 该检出峰不是美国药典给出的子囊霉素杂质而是有药理活性的他克莫司异构体 I, 应参与含量计算。结论 建立的方法可用于他克莫司原料杂质的鉴定, 为更加精准控制产品质量和工艺优化研究提供可靠的技术保证。

关键词: 他克莫司; 在线脱盐-飞行时间-液质联用; 杂质鉴定

中图分类号: R927 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)06-0734-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.018

引用本文: 韩彬, 庞文哲, 高燕霞, 等. 2D-LC-IT-TOF-MS 鉴定他克莫司原料有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 734-738.

Identification of Related Substances in Tacrolimus by 2D-LC-IT-TOF-MS

HAN Bin¹, PANG Wenzhe¹, GAO Yanxia^{1*}, LIU Yinghua², HAN Lisha²(1.Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.North China Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To rapidly identify the impurity peak detected in tacrolimus by 2D-LC-IT-TOF-MS. **METHODS** Firstly, the chromatography was Thermo Hypersil GOLD C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 3 μm) column and the mobile phase containing a mixture of acetonitrile-1,1-dimethylethyl-phosphoric acid. Then a InertSustain C₁₈(2.1 mm×50 mm, 2 μm) column was used with 0.1% formic acid-acetonitrile(30 : 70) as mobile phase in a gradient elution mode. Electrospray ionization source was tested in positive ion modes, nebulized gas flow was 1.5 L·min⁻¹. Dry gas flow was 10 L·min⁻¹. The desolvation tube temperature was kept at 200 °C. Related substances were characterized according to multi-level MS behaviors. **RESULTS** The material structure of chromatographic peak at specific retention time in tacrolimus raw material was deduced, and the detected peak was not ascomycin impurity provided by USP but was tacrolimus isomer I with pharmacological activity, content should be involved in calculation. **CONCLUSION** The established method is suitable for rapid identification of impurities in tacrolimus, which can be applied as a useful analytical tool for quality control and drug process optimization.

KEYWORDS: tacrolimus; 2D-LC-IT-TOF-MS; impurity identification

他克莫司是一种来源于土壤链霉菌的二十三元大环内酯类免疫抑制剂, 在化学结构上与子囊霉素、雷帕霉素有很多共同点^[1], 广泛用于预防器官移植排斥反应, 作用机制为钙调磷酸酶抑制剂, 治疗窗窄、个体间差异较大^[2-3], 常需要进行治疗药物监测^[4-6]。中国药典 2015 年版没有收载该品种相关质量标准, 含量及有关物质检测的文献报道^[7-9]较少, 由于本品分子结构特点与发酵工艺对其质量影响的复杂性, 有关物质检查成为本品质量研究的重点^[10-11]。本研究参考美国药典(USP)^[12], 建立了他克莫司原料的含量及有关物质检测方法,

但是在实际检测中发现, 美国系统适用性对照品中子囊霉素杂质和他克莫司异构体 I 出峰时间很接近, 在对应的时间处样品中只检出一个色谱峰, 单纯按照色谱条件下出峰顺序或者常规的相对保留时间方法都不能准确归属该检出峰, 为了进一步确认检出物质是杂质还是有效成分, 本课题组应用在线脱盐-飞行时间-液质联用(2D-LC-IT-TOF-MS)技术, 建立快捷简便的鉴定方法, 对该检出物质进行结构确认。

1 仪器与试剂

岛津 2D-LC-IT-TOF-MS 杂质鉴定系统, 配置

作者简介: 韩彬, 女, 主管药师 Tel: 13933853331 E-mail: 13933853331@139.com
(0311)69086005 E-mail: 13933853331@139.com

*通信作者: 高燕霞, 女, 博士, 主任药师 Tel:

为 LC-20AD×4(输液泵), SIL-20AC(自动进样器), CTO-20AC(柱温箱), CBM-20A(系统控制器), DGU-20A5(在线脱气机), SPD-M20A(二极管阵列检测器), SPD-20A(UV 检测器), FCV-12AH×3(流路选择阀), FCV-14AH×2(色谱柱切换阀), 离子阱-飞行时间质谱仪(liquid chromatography/mass spectrometry-ion trap time-of-flight, LC/MS-IT-TOF) 和 LC/MS solution Ver.3.80(色谱工作站)。

他克莫司原料(河北某药厂, 批号: 1810401, 1810402, 1810403); 他克莫司系统适用性对照品(USP, 批号: R053Y0; 含量: 100.0%); 他克莫司对照品(USP, 批号: 17071735; 含量: 98.0%); 乙腈、叔丁基甲醚为色谱纯; 甲酸为质谱纯; 磷酸为分析纯; 水为实验室自制超纯水。

2 液相色谱-质谱条件

2.1 一维色谱条件(1stD-LC)

Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3 μm); 检测波长: 220 nm; 柱温: 60 °C; 流速: 1.5 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 自动进样器温度: 4 °C; 稀释液: 水-乙腈(3 : 7); 6 mmol·L⁻¹ 磷酸水溶液-乙腈-叔丁基甲醚(80 : 16 : 4)为流动相 A, 6 mmol·L⁻¹ 磷酸水溶液-乙腈-叔丁基甲醚(20 : 66 : 14)为流动相 B, 梯度洗脱: 初始比例流动相 A-流动相 B(50 : 50), 保持 50 min, 10 min 内过渡到流动相 A-流动相 B(15 : 85), 维持 20 min。

2.2 二维色谱条件(2ndD-LC)

InertSustain™ C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2 μm); 检测波长: 220 nm; 柱温: 60 °C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL(Loop 环体积); 自动进样器温度: 4 °C; 1%甲酸-乙腈(30 : 70)为流动相, 等度洗脱。

2.3 质谱条件

离子源: ESI(+); 接口电压: 4.5 kV; 扫描范围: 一级质谱 m/z 780~860; 自动多级 m/z 200~1 000; 雾化气: 氮气 1.5 L·min⁻¹; 干燥气: 氮气 10 L·min⁻¹; 碰撞气: 氩气; 脱溶剂管温度: 200 °C; 加热模块温度: 200 °C; 检测器电压: 1.6 kV; 校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。

3 溶液的制备

3.1 供试品溶液的配制

避光操作, 精密称取他克莫司样品 30 mg, 置

10 mL 量瓶中, 加稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 静置 3 h, 滤过。

3.2 系统适用性溶液的配制

取他克莫司系统适用性对照品适量, 加稀释剂溶解并定量稀释成 3 mg·mL⁻¹ 溶液。

3.3 对照溶液配制

取他克莫司对照品适量, 加稀释剂溶解并定量稀释成 3 mg·mL⁻¹ 溶液, 作为含量用对照品溶液, 精密量取适量, 稀释液稀释成 0.1 mg·mL⁻¹ 溶液, 作为有关物质用对照溶液。

4 方法与结果

4.1 测定方法

本实验采用 2D-LC-IT-TOF-MS 法, 该系统的一维色谱条件(1stD-LC)和二维色谱条件(2ndD-LC)由一组共用的馏分收集环连接。

1stD-LC 按“2.1”项下色谱条件, 精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。通过时间控制程序自动将目标峰与他克莫司主峰分别捕集到 2 个馏分收集环中。

2ndD-LC 在 1stD-LC 分析结束后, 捕集在 2 个馏分收集环中的组分分次注入二维色谱柱中, 通过阀切换操作除去样品中残留的一维色谱条件中不挥发的缓冲盐, 然后将组分注入质谱进行分析, 此操作可由批处理自动执行。

4.2 系统适用性试验

取“3.2”项下系统适用性溶液, 按“2.1”项下 1stD-LC 色谱条件进行分析, 得到的一维 PDA 色谱图见图 1, 已知 USP 系统适用性对照品中含有的 4 个成分, 按相对保留时间先后依次出峰为子囊霉素、他克莫司 19 位异构体、他克莫司、他克莫司 8 位异构体, 其中 $t_R=31.482$ min 为他克莫司主峰, 他克莫司 19 位异构体同样为活性成分。

取“3.1”项下供试品溶液, 按“2.1”项下的 1stD-LC 色谱条件进行分析, 得到的一维 PPA 色谱图见图 2, $t_R=30.154$ min 为他克莫司主峰, 结构式见图 3。相对保留时间为 0.52 处目标峰($t_R=15.933$ min), 按照 USP 系统适用性对照品定位, 该目标峰应为发酵副产物——子囊霉素^[3], 因产品中检出含量偏高, 怀疑其为他克莫司有效组分他克莫司开环异构体——他克莫司异构体 I(结构式见图 4), 将其切入质谱, 进行色谱峰归属鉴定。

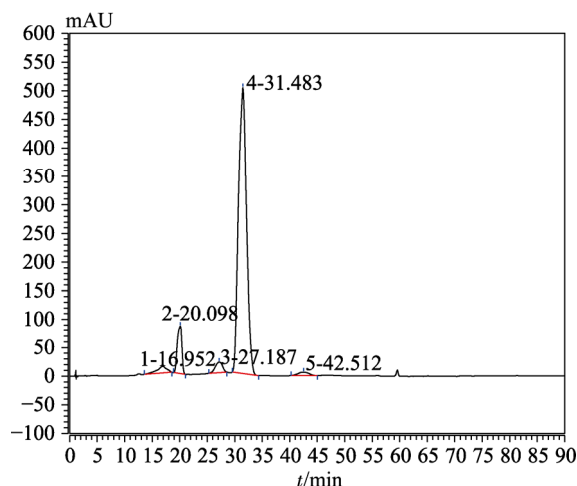


图 1 他克莫司系统适用性对照品一维 PDA 色谱图 (220 nm)

1-子囊霉素; 2-他克莫司 19 位异构体; 3-子囊霉素降解杂质; 4-他克莫司; 5-他克莫司 8 位异构体。

Fig. 1 First dimensional PDA chromatogram of tacrolimus for system suitability reference (220 nm)

1-ascomycin; 2-tacrolimus 19-epimer; 3-ascomycin impurity; 4-tacrolimus; 5-tacrolimus 8-epimer.

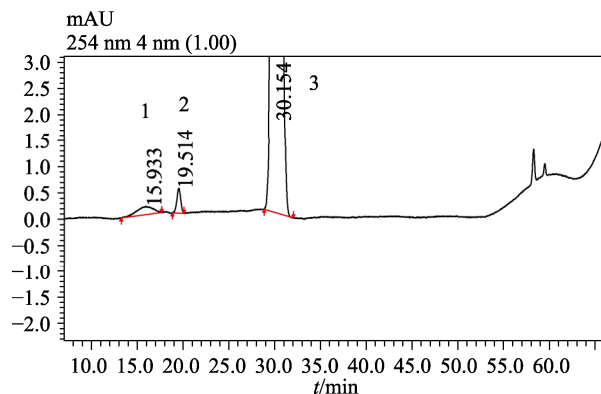


图 2 他克莫司样品一维 PDA 色谱图 (220 nm)

1-目标杂质; 2-他克莫司 19 位异构体; 3-他克莫司。

Fig. 2 First dimensional PDA chromatogram of tacrolimus (220 nm)

1-impurity; 2-tacrolimus 19-epimer; 3-tacrolimus.

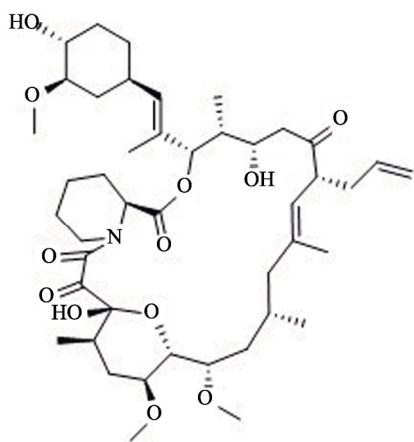


图 3 他克莫司主峰结构式

Fig. 3 Structure of tacrolimus

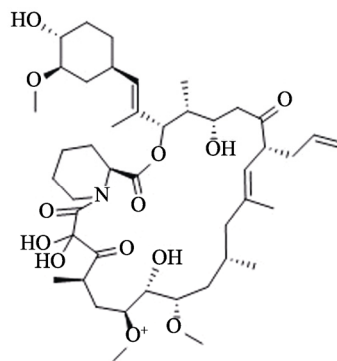


图 4 目标峰结构式

Fig. 4 Structure of impurity

4.3 结构鉴定

在 2D-LC-IT-TOF-MS 系统中, 将他克莫司主峰切入 Loop 环中, 经过 2ndD-LC 分析, 得到质谱图见图 5, 应用分子量计算软件, 他克莫司(C₄₄H₆₉NO₁₂)准确分子量为 803.482 0, 一级质谱图中 m/z 804.481 2 为[M+H]⁺, m/z 826.458 2 为[M+Na]⁺, 误差<5 ppm, 可认为与理论分子量一致。

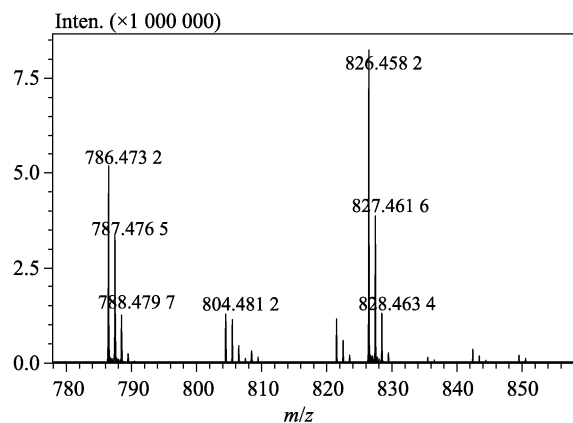


图 5 他克莫司主峰质谱图

Fig. 5 Mass spectrum of tacrolimus

将目标峰切入 Loop 环中, 经过 2ndD-LC 分析, 得到多级质谱图见图 6, 他克莫司异构体 I(C₄₄H₇₁NO₁₃)理论分子量为 821.492 5, 一级质谱图中 m/z 822.495 6 为[M+H]⁺, 与他克莫司异构体 I 一致^[13]。 m/z 804.487 1 为脱去 1 个 H₂O 的闭环结构, 与他克莫司一致, 其可能的结构式与裂解规律见图 4 和图 7。二级质谱图中, m/z 787.482 5 碎片与他克莫司主峰碎片峰 m/z 786.473 2 互为同位素峰, 可认为具有相同裂解规律, 其可能的结构式及其裂解规律见图 8。

二级谱图中 m/z 769.467 3 可能结构式及裂解规律见图 8, 二级谱图 m/z 787.482 5 可能结构式及裂解规律见图 9。

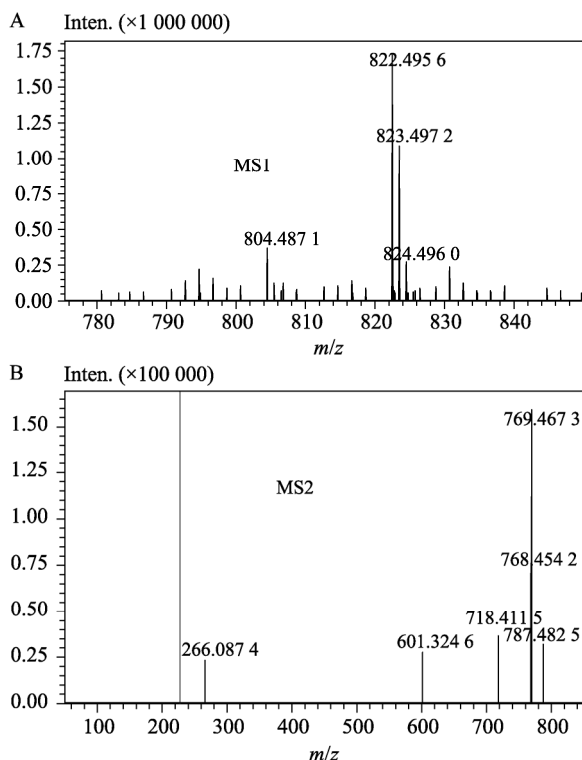


图6 目标峰多级质谱图

A—一级质谱图；B—二级质谱图。

Fig. 6 Multilevel mass spectrum of impurity

A—first-level mass spectrum; B—second-level mass spectrum.

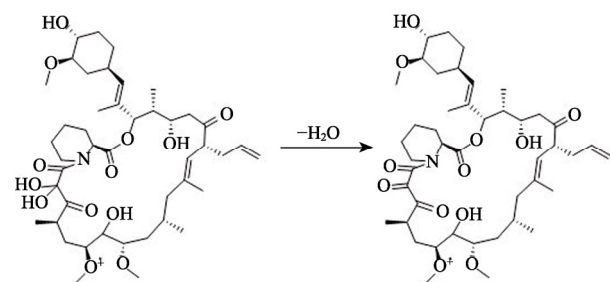


图7 目标峰可能裂解过程

Fig. 7 Plausible fragmentation pathway of impurity

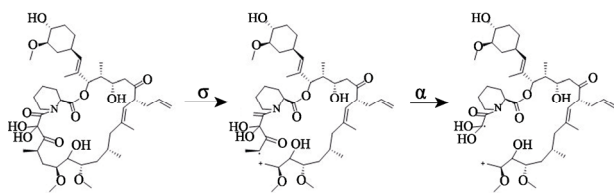


图8 结构式(m/z 769.4673)及其可能裂解过程

Fig. 8 Plausible fragmentation pathway and structure of m/z 769.4673

4.4 色谱峰纯度验证

采用“2.1”项下色谱条件，用二极管阵列检测器检测，考察目标峰有无杂质峰包裹现象，结果显示，目标峰纯度因子 0.999 82，可认为单一化合物峰。

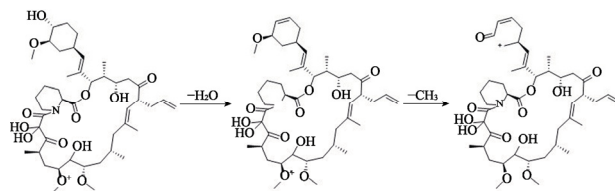


图9 结构式(m/z 787.4825)及其可能裂解过程

Fig. 9 Plausible fragmentation pathway and structure of m/z 787.4825

4.5 样品测定结果

样品 3 批，按“2.1”项下色谱条件测定含量及有关物质，结果见表 1，产品质量好，工艺稳定。

表 1 样品测定结果

批号	有关物质		%
	单一杂质	杂质总和	
1810401	0.12	0.28	99.7
1810402	0.11	0.29	99.6
1810403	0.12	0.28	99.6

5 讨论

5.1 色谱峰的归属

通过 LC 串联质谱技术对特定目标峰进行定性分析，确认主峰相对保留时间 0.52 处色谱峰为他克莫司有效组分他克莫司异构体 I，并不是 USP 给出的子囊霉素异构体杂质，计算时应将该色谱峰计算入含量中，指征发酵工艺良好，产品质量稳定。

5.2 在线脱盐液质联用技术

本实验采用 2D-LC-IT-TOF-MS 法^[14]对他克莫司原料有关物质中特定色谱峰进行鉴定，该方法基于一组共用的馏分收集环的二维液相质谱联用系统建立，对目标峰快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程，在不改变原流动相条件的基础上，实现了液质联用分析目标杂质，其中 1stD-LC 使用“2.1”液相条件进行分析，通过时间程序控制自动对分离过程中的目标杂质进行捕集；分析 1stD-LC 结束后，批处理自动执行 2ndD-LC 分析，此时捕集在 1 个或多个馏分收集环中的杂质组分分批依次通过适合质谱分析的流动相注入同时，2ndD-LC 色谱柱中，可在准确推定检出杂质结构的又能实现对一维液相色谱条件下色谱图中各杂质的准确定位。

5.3 流动相筛选

参考文献色谱条件^[7-9,12]，考察磷酸盐系统，

四氢呋喃系统和醚类系统，磷酸盐系统主峰与前后杂质峰无法达到完全分离，四氢呋喃系统杂质峰检出数量少，最后选定叔丁基甲醚作为流动相有机组分。

5.4 方法耐用性考察

本研究色谱条件中，流动相乙腈相比比例增加或减少 2%，对分离效果没有影响；色谱柱规格对比发现，色谱柱长度 150 mm 和 250 mm 都可以达到检测要求；柱温增加或减少 5 °C，对主峰保留时间没有影响，因为叔丁基甲醚有一定黏性，柱温 60 °C 可有效降低柱压，建议实际检测时，控温不要 < 55 °C。

6 小结

本研究所建立的液相分析方法，可以快速分离鉴定他克莫司及其异构体。经采用 2D-LC-IT-TOF/MS 方法测定，3 批他克莫司原料样品的有关物质检查色谱图中，与主峰相对保留时间 0.52 处目标峰为他克莫司异构体 I，含量符合规定。

REFERENCES

- [1] CHEN D D, CEN P L, LIU W, et al. Progress in studying the biosynthetic mechanism of the macrolide immunosuppressant tacrolimus[J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2013, 33(6): 1254-1262.
- [2] 孙雨平, 史国兵, 樊蓉, 等. 他克莫司致不良反应 67 例文献分析[J]. 医药导报, 2014, 33(11): 1535-1537.
- [3] DU Y, WANG M, WANG Z, et al. Evaluation of related factors on adverse reactions induced by tacrolimus after transplantation in Chinese population[J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(11): 1504-1506.
- [4] XIN H W, OUYANG M, TANG X. Association of gene polymorphism with individualized tacrolimus dosage regimen in renal transplant recipients[J]. Her Med(医药导报), 2016, 35(8): 877-881.
- [5] ZHOU Y, ZHOU B, LYU F J, et al. Analysis of influence factors of tacrolimus concentration in pediatric patients with nephrotic syndrome[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(18): 2299-2304.
- [6] LI S C, XU H, YE Q, et al. Using population pharmacokinetic model to investigate effect of Wuzhi capsules on pharmacokinetics of tacrolimus in children with nephrotic syndrome[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(8): 477-485.
- [7] LI G Q, ZENG S. Determination of related substances of tacrolimus by HPLC with gradient elution[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(7): 551-553, 558.
- [8] CHEN Y. HPLC determination of tacrolimus and its related substances[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(2): 309-313.
- [9] XU M Z, YIN L H, HU C Q, et al. Content determination and content uniformity of tacrolimus ointment by HPLC[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2005, 30(12): 748-751, 755.
- [10] HAO J, ZHANG Z F, BI X P. Analysis of method for testing and controlling the impurity of crude drug[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(6): 757-763.
- [11] CHEN X Y, LI Y F, LIN X Y, et al. Research progress on analysis on impurity in chemical drug by LC-MS technology[J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2014, 29(6): 696-700.
- [12] USP 42[S]. 4151-4154.
- [13] WANG C X, LE Z X, CHEN Y X, et al. Isolation and structure determination of tacrolimus tautomeric compounds[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2014, 39(10): 734-737.
- [14] HAN B, GAO Y X, PANG W Z, et al. Structure identification of unknown impurity in ceftazidime sodium for injection by 2D-LC-IT-TOF/MS[J]. China Pharm(中国药师), 2019, 22(2): 358-360.

收稿日期: 2020-03-09
(本文责编: 李艳芳)