



阿齐沙坦有关物质的 LC-MS/MS 测定与鉴定

杨大龙¹, 孔蓉², 柏植政², 丁逸梅^{1,2*}

(1. 南京工业大学 江苏省药物研究所有限公司, 南京 210009; 2. 南京工业大学药学院, 南京 210009)

摘要 目的: 建立阿齐沙坦原料中有关物质的测定方法, 鉴定主要降解产物并推测降解机理。方法: 采用 HPLC 方法分离分析阿齐沙坦的有关物质, 使用 Inertsil ODS-SP 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈-水-冰乙酸 (20:80:0.1), 流动相 B 为乙腈-水-冰乙酸 (80:20:0.1), 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 40 °C; 采用相同色谱条件, ESI 正离子化方式 LC-MS/MS 进行杂质鉴定。结果: 阿齐沙坦与有关物质均能有效分离; 阿齐沙坦在酸中易水解, LC-MS/MS 鉴定主要降解产物为杂质 B (2-羧基-1-[[2'-(4,5-二氢-5-氧代-1,2,4-噁二唑-3-基)联苯-4-基]甲基]苯并咪唑-7-羧酸)。阿齐沙坦、杂质 A (2-乙氧基-1-[[2'-(酰胺基)[1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯) 和杂质 B 的检测下限及定量下限分别为 8.4、8.1、8.2 ng · mL⁻¹ 和 20.1、19.4、19.8 ng · mL⁻¹, 且在各自的线性范围内线性关系良好 ($r > 0.999$, $n=5$); 校正因子分别为 1.00、1.09、1.08。经 5 批样品检验, 均仅检出杂质 B, 均小于 0.05%。结论: 建立的方法可对阿齐沙坦的有关物质进行定量测定。关键词: 抗高血压药; 阿齐沙坦; 有关物质测定; 降解产物鉴定; 降解机理推测; 高效液相色谱; 液质联用

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 07-1231-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.19

Determination and identification of related substances in azilsartan by LC-MS/MS

YANG Da-long¹, KONG Rong², BAI Zhi-zheng², DING Yi-mei^{1,2*}

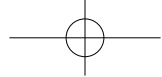
(1. Jiangsu Provincial Institute of Material Medica, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of related substances in azilsartan, and to identify the main degradation product and speculate mechanism of degradation. **Methods:** The related substances in azilsartan were separated by RP-HPLC on an Inertsil ODS-SP column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-water-acetic acid (20:80:0.1) as mobile phase A and acetonitrile-water-acetic acid (80:20:0.1) as mobile phase B with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 250 nm and the column temperature was 45 °C. The major impurity was identified by using LC-MS/MS in positive

* 通信作者 Tel: 13851670425; E-mail: jsyws@njtech.edu.cn

第一作者 Tel: 13951791300; E-mail: ydlmj@sina.com



mode with the same LC conditions. **Results:** The related substances in azilsartan could be separated effectively from azilsartan. The major impurity was identified using LC-MS/MS as impurity B (2-carbonyl-1-[[2'-(4,5-dihydro-5-oxo-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methyl]benzimidazole-7-carboxylate). The LOD and LOQ of azilsartan, impurity A (1-[[[(2-ethoxy-(2'-amido)) [1,1'-xenyl]-4-yl]methyl]-1H-benzimidazolyl-7-carboxylic methyl ether) and impurity B were 8.4, 8.1, 8.2 ng·mL⁻¹ and 20.1, 19.4, 19.8 ng·mL⁻¹, respectively. The calibration curves of azilsartan and the impurities were linear in the concentration range ($r>0.999$, $n=5$). The calibration factors were 1.00, 1.09 and 1.08, respectively. Impurities B detected in 5 batches of samples were all less than 0.05%. **Conclusion:** The established method was accurate and effective for qualitative determination of related substances in azilsartan.

Keywords: antihypertensive drug; azilsartan; determination of related substance; identification of degradation products; speculation of mechanism of degradation; HPLC; LC-MS/MS

阿齐沙坦 (azilsartan) (化合物 1), 化学名为 2-乙氧基-1-[[2'-(4,5-二氢-5-氧代-1,2,4-噁二唑-3-基)] [1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸, 是新一代选择性 AT₁ 亚型血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARBs) 类抗高血压药^[1-8], 与血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 类降压药物相比, 具有平稳降压及不会引起干咳的优点。尽管已上市多个 ARBs, 但对于许多患者, 仅抑制肾素-醛固酮系统 (RAS) 活性并不足以控制血压和降低心血管疾病及糖尿病的风险。研究显示, 阿齐沙坦作为新一代双重功能 ARBs, 不仅拮抗血管紧张素 II 的 1 型受体 (AT₁ 受体), 还可能通过多种机制降低心血管疾病及糖尿病的风险。临床试验证明, 阿齐沙坦具有较好疗效, 且不良反应发生率较低, 依从性较好的特点。阿齐沙坦由日本武田药品工业株式会社研制, 于 2011 年 11 月在日本以片剂形式上市, 商品名为“アジルバ錠”, 目前国内尚无阿齐沙坦的生产和销售。

本文采用的合成工艺是以 2-乙氧基-1-[(2'-氰基 [1,1'-联苯基]-4-基)甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯 (化合物 2) 为起始原料经加成、酰化、环合、水解等反应生成化合物 1 (阿齐沙坦), 反应过程如图 1。合成过程中的 2-乙氧基-1-[[2'-(羟基脒基)] [1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯 (化合物 3)、2-乙氧基-1-[[2'-[[[(乙氧羰基)氧基]脒基]] [1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯 (化合物 4) 和 2-乙氧基-1-[[2'-(2,5-二氢-5-氧代-1,2,4-噁二唑-3-基)] [1,1'-联苯基]-4-基]甲

基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯 (化合物 5) 为合成中间体; (2-乙氧基-1-[[2'-(酰胺基)] [1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-苯并咪唑-7-羧酸甲酯 (化合物 6) 为反应步骤一副产物 (杂质 A); 2-羰基-1-[[2'-(4,5-二氢-5-氧代-1,2,4-噁二唑-3-基)联苯-4-基]甲基]苯并咪唑-7-羧酸 (化合物 7) 为 API 的降解产物 (杂质 B)。起始物料、中间体、副产物以及降解产物等均可能成为阿齐沙坦有关物质, 从而影响药物的安全性。本研究建立了阿齐沙坦有关物质的 HPLC 测定法, 并进行了方法学验证^[9-12]。

1 仪器与试剂

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪, 含 2010A 型紫外检测器和岛津工作站 (Shimadzu 公司); Waters 2695、2996PDA 液质联用仪。

冰乙酸 (分析纯, 南京化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, Burdick & Jackson), 水 (重蒸水)。

阿齐沙坦 (化合物 1), 对照品批号 20130408 (含量 99.5%), 粗品批号 20130312, 样品批号 20130315、20130226、20130401、20130402、20130403, 由江苏省药物研究所有限公司合成; 起始原料 (化合物 2) 对照品, 批号 20130821 (含量 99.3%), 由泰州志诚化工科技有限公司提供; 中间体 (化合物 3~5) 对照品, 批号均 20131221 (含量分别为 99.1%、99.5%、98.9%), 由江苏省药物研究所有限公司提供; 副产物 (化合物 6, 杂质 A), 批号 20131015 (含量 98.5%), 江苏省药物研究所有限公司提供; 降解杂质 B (化合物 7), 批号为 20131018 (含量 99.0%), 由江苏省药物研究所有限公司提供。

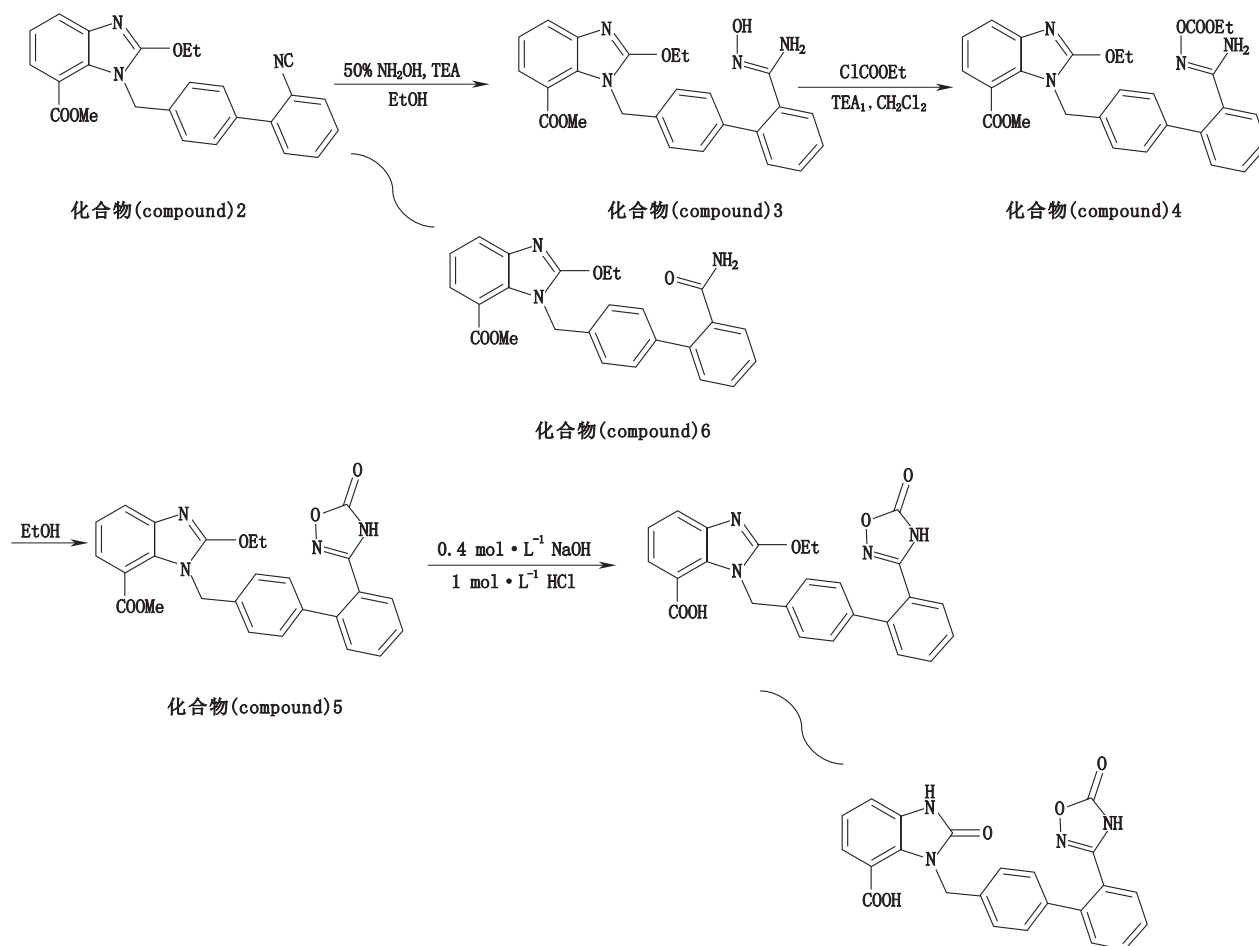


图1 合成工艺路线

Fig. 1 Synthetic route

2 方法与结果

2.1 溶液配制

取阿齐沙坦样品适量,置棕色量瓶中,加60%乙腈溶解并稀释制成每1 mL约含阿齐沙坦0.5 mg的溶液,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液1 mL,置100 mL量瓶中,用60%乙腈稀释至刻度,摇匀,作为自身对照溶液;取杂质B对照品适量,用60%乙腈制成每1 mL中含0.005 mg的溶液,作为杂质B对照品溶液;取阿齐沙坦对照品及杂质A对照品适量,加60%乙腈溶解并稀释制成每1 mL中分别约含0.5 mg和0.005 mg的混合溶液,作为系统适用性试验溶液。

2.2 色谱条件

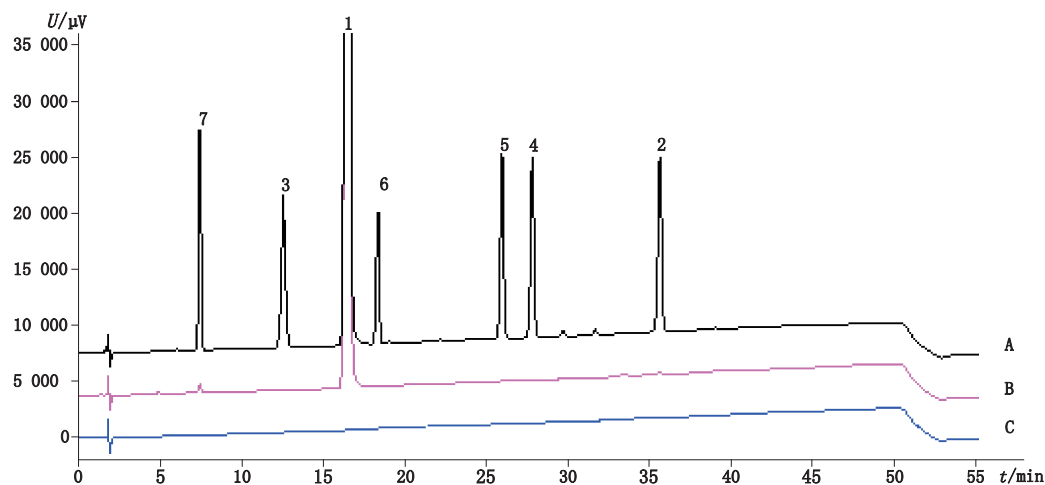
2.2.1 HPLC 色谱条件 采用Inertsil ODS-SP色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相A为乙腈-水-冰乙酸(20:80:0.1),流动相B为乙腈-水-冰乙酸(80:20:0.1),梯度洗脱(0~48

min, 18%B→78%B; 48~50 min, 78%B→18%B; 50~58 min, 18%B),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长250 nm,柱温40℃,进样量20 μL。

2.2.2 色谱-质谱条件 色谱条件同“2.2.1”项;电喷雾离子源,正离子检测,喷雾电压3.5 kV,锥孔电压30 kV,碰撞能量30 eV,离子源温度120℃,干燥温度350℃,雾化气流速400 L·h⁻¹,质量数扫描范围100~500。

2.3 专属性试验

将化合物1~7的对照品加60%乙腈配制成含化合物1约500 μg·mL⁻¹,其他化合物各约5 μg·mL⁻¹的混合溶液,进样测定;结果显示各物质均分离良好(分离度大于4.7)。理论板数以化合物1(阿齐沙坦)峰计大于20 000。为考察阿齐沙坦中可能存在的未知杂质,取阿齐沙坦的粗品适量,用60%乙腈制成500 μg·mL⁻¹的溶液,进样测定,粗品中的有关物质与阿齐沙坦分离完全。色谱图见图2。



1. 化合物 1 (compound 1) 2. 化合物 2 (compound 2) 3. 化合物 3 (compound 3) 4. 化合物 4 (compound 4) 5. 化合物 5 (compound 5) 6. 化合物 6 (compound 6) 7. 化合物 7 (compound 7)

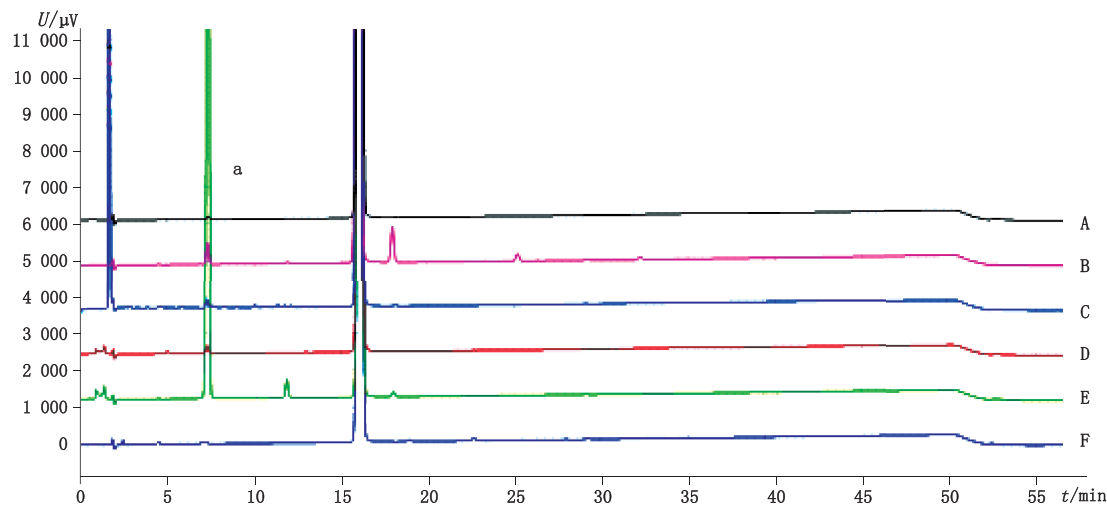
A. 混合对照品 (mixed reference substances) B. 阿齐沙坦粗品 (crude azilsartan) C. 空白溶剂 (blank)

图 2 专属性试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms for specificity test

精密称取化合物 1 的样品约 12.5 mg 置 25 mL 量瓶中,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL (100 °C 水浴加热 1 h,冷却,以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和),或加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL (100 °C 水浴加热 3 h,冷却,以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和),或加 30% 双氧水 0.5 mL (100 °C 水浴加热 5 h,冷却),或加水 1 mL (在 100 °C 水浴加热 2 h) 处理后,上述各溶液分别加 60% 乙腈定容至刻度,摇匀,即得强制降解供试溶液;另取 1 份化合物 1 的样品约 12.5 mg 置 25 mL 量瓶

中,加 60% 乙腈溶解,稀释至刻度,摇匀,在自然光下放置 8 h,作为光照降解供试溶液。取上述降解供试溶液,按“2.2”项下条件进样测定。结果表明,样品在酸、碱、氧化、高温以及光照条件下,均有不同程度的破坏,各降解产物峰与主峰分离完全;峰纯度考察结果表明,在本色谱条件下,样品经高温、酸、碱、氧化、光照破坏后,阿齐沙坦峰纯度因子均大于阈值,主峰纯度较好,破坏试验中产生的降解产物均与阿齐沙坦峰达到了良好分离。色谱图见图 3。

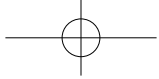


a. 杂质 B (impurity B)

A. 光照破坏 (illumination destruction) B. 高温破坏 (heat destruction) C. 氧化破坏 (oxidation destruction) D. 碱破坏 (basic destruction) E. 酸破坏 (acid destruction) F. 未破坏 (undestruction)

图 3 破坏性试验色谱图

Fig. 3 Chromatograms for destruction tests



2.4 线性试验及灵敏度试验

精密称取化合物 1、6、7 的对照品适量,加流动相分别制成质量浓度均为 0.05、0.5、1、2.5 和 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,按“2.2”项下方法分别进样,记录色谱图,以质量浓度 C 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,进行线性回归,化合物 1 斜率与化合物 6、7 斜率的比值即为校

正因子。结果,测得各杂质校正因子均在 0.90~1.10,可采用不加校正因子的自身对照法对它们进行有关物质检查。

对化合物 1、6、7 的混合溶液逐级稀释进样,记录色谱图,以 $S/N=3$ 、 $S/N=10$ 计测定各杂质检测下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)。结果见表 1。

表 1 线性试验结果

Tab. 1 Results of linearity test

化合物 (compound)	线性范围 (linearity range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程 (linear equation)	r	F	LOD/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
阿齐沙坦 (azilsartan)	0.050 29~5.029	$A=4.768 \times 10^4 C+0.731 2 \times 10^2$	1.00 0	1.00	8.4	20.1
杂质 A (impurity A)	0.048 59~4.895	$A=5.195 \times 10^4 C-0.705 1 \times 10^3$	0.999 9	1.09	8.1	19.4
杂质 B (impurity B)	0.049 45~4.945	$A=5.133 \times 10^4 C-1.409 \times 10^5$	0.999 5	1.08	8.2	19.8

2.5 精密度试验

取自身对照溶液,按“2.2”项下方法连续进样测定 6 次,阿齐沙坦峰面积的 RSD 为 0.83%。

2.6 稳定性试验

精密量取“2.1”项下供试品溶液,分别于溶液制备后 0、2、4、6 和 8 h 进样测定,峰面积的 RSD 为 0.71%,结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 样品测定

按“2.1”项下方法制备杂质 B 对照品溶液、系统适用性试验溶液、供试品溶液和自身对照溶液。精密

量取系统适用性试验溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,图中阿齐沙坦峰与杂质 A 峰的分度应不小于 2.5。取自身对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 20%~25%,再精密量取供试品溶液与杂质 B 对照品溶液各 20 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,测定供试品溶液所得色谱图中除主峰外的各杂质峰的峰面积。分别测定 3 批样品,化合物 6(杂质 A)均未检出,化合物 7(杂质 B)小于 0.05%,其他单个杂质均未检出,总杂均小于 0.05%。结果见表 2。

表 2 有关物质测定结果 (%)

Tab. 2 Determination of the related substances

批号 (lot No.)	杂质 B (impurity B)	杂质 A (impurity A)	其他最大单杂 (the max unknown impurity)	总杂 (total impurity)
20130315	0.02	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.02
20130226	0.02	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.02
20130401	0.02	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.02
20130402	0.02	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.02
20130403	0.02	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.02

3 讨论

3.1 色谱条件的建立

阿齐沙坦结构与缬沙坦类似,参照英国药典 (BP) 2012 年版 Updated 中缬沙坦的有关物质检查条件,采用乙腈-水-冰乙酸系统进行条件摸索。冰

乙酸的加入,使阿齐沙坦的保留大大提高,采用梯度洗脱使该方法达到良好的分离效果及合理的分析时间,有利于有关物质的全面洗脱。

由于各物质母体结构一样,阿齐沙坦(化合物 1)、起始原料(化合物 2)、杂质 A(化合物 6,副产物)、杂

质 B (化合物 7, 降解产物) 及各中间体 (化合物 3~5) 在 250 nm 的波长处均有较强的吸收, 而且吸光强度相当, 因此选择 250 nm 作为有关物质检测波长。

3.2 主要降解产物归属及降解机理分析

本文所采用的 HPLC 色谱法专属性良好, 可有效地将起始原料 2, 中间体 3、4、5, 副产物 6 以及化合物 7 与 TM1 分开。破坏性试验的降解产物峰也均能与主峰分开, 根据各杂质对照品的保

留时间定性分析, 初步判断主要降解产物 a 为化合物 7。

本研究进一步通过 LC-MS 对破坏性试验的产物进行鉴定。降解产物 a 的分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 429.1, 该杂质的相对分子质量为 428.4。结合阿齐沙坦强制降解试验条件以及专属性定位确定该化合物为化合物 7, 推测其降解机理如图 4: 苯并咪唑环上的乙氧基水解, 脱除乙基而产生, 即杂质 B^[13-15]。

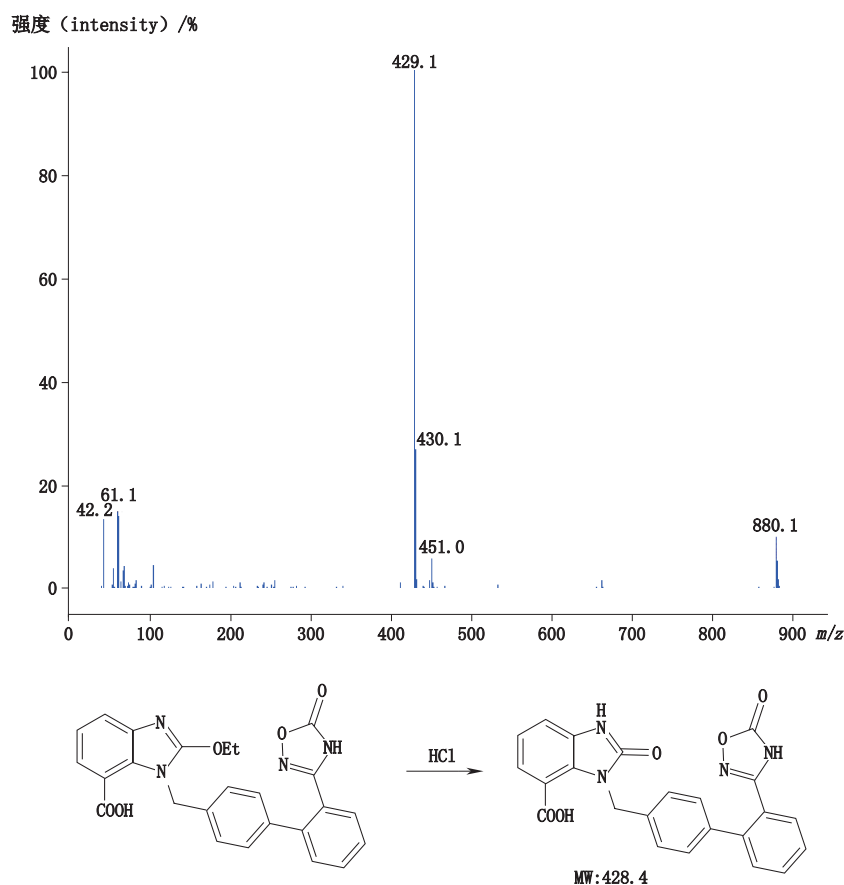


图 4 降解产物 a 质谱图及其可能的降解途径

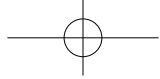
Fig. 4 MS spectrum of the degradation product a and degradation pathways

3.3 方法耐用性

本研究分别以 0.05% 和 0.2% 乙酸溶液配制流动相, 分别使用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Waters Nova-Pak C₁₈ 色谱柱 (3.9 mm × 150 mm, 4 μm) 以及改变柱温 (35、40、45 °C)、流速 (0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹)、流动相 B 初始比例 (16%、18%、20%), 考察在上述条件下各色谱峰的分离情况。结果显示系统适用性试验均符合要求, 有关物质测定结果基本一致, 本法适用于阿齐沙坦的有关物质的检查。

参考文献

- [1] 邹寿涛, 秦健. 阿齐沙坦的临床应用进展 [J]. 药学与临床研究, 2015, 23 (6): 573
ZOU ST, QIN J. Progress in clinical application of azilsartan [J]. Pharm Clin Res, 2015, 23 (6): 573
- [2] 赵春艳, 王京晶, 刘洋, 等. 心血管疾病新药阿齐沙坦酯的药理与临床评价 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20 (19): 1831
ZHAO CY, WANG JJ, LIU Y, et al. Pharmacology and clinical evaluation of edarbi, a new drug for the treatment of cardiovascular disease [J]. Chin J New Drugs, 2011, 20 (19): 1831
- [3] [H] GPH 3-1 化学药物杂质研究技术指导原则 [S]. 2005



- [H] GPH 3-1 Guidelines of Chemical Drug Impurity Research Technique [S]. 2005
- [4] 谢沐风. 如何建立高效液相色谱法测定有关物质的方法[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(1): 45
- XIE MF. How to establish an HPLC method for determination of related substances in drugs [J]. Chin J Pharm, 2007, 38(1): 45
- [5] 吴强, 陈金嫚, 何广卫. LC-MS/MS 鉴定阿齐沙坦降解产物[J]. 广州化工, 2014, 42(19): 105
- WU Q, CHEN JM, HE GW. Identification of the degradation compounds of azilsartan by LC-MS [J]. Guangzhou Chem Ind, 2014, 42(19): 105
- [6] 韩世磊, 赵世明, 罗振福. 阿齐沙坦酯及相关杂质的合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(1): 102
- HAN SL, ZHAO SM, LUO ZF. Graphical synthetic routes of azilsartan medoxomil and related impurities [J]. Chin J Pharm, 2015, 46(1): 102
- [7] WHITE WB, WEBER MA, SICA D, *et al.* Effects of the angiotensin receptor blocker azilsartan medoxomil versus olmesartan and valsartan on ambulatory and clinic blood pressure in patients with stages 1 and 2 hypertension [J]. Hypertension, 2011, 57(3): 413
- [8] KOHARA Y, IMAMIYA E, KUBO K, *et al.* A new class of angiotensin II receptor antagonists with a novel acidic bioisostere [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1995, 5(17): 1903
- [9] RADL S, CERNY J, STACH J, *et al.* Improved process for azilsartan medoxomil: a new angiotensin receptor blocker [J]. Org Process Res Dev, 2013, 17(1): 77
- [10] AZAD AK, KSHIRSAGAR PB, SINGH SK, *et al.* Process for the Preparation of Azilsartan Medoxomil or Pharmaceutically Acceptable Salts Thereof: WO, 2013114305 [P]. 2013-10-30
- [11] FDA. Pharmacology review [EB/OL]. [2017-07-20]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/200796Orig1s000PharmR.pdf
- [12] 束蓓艳, 吴雪松, 岑均达. 阿齐沙坦的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(12): 881
- SU BY, WU XS, CHEN JD. Synthesis of azilsartan [J]. Chin J Pharm, 2010, 41(12): 881
- [13] 隋立朋, 李日东, 宋波, 等. 通过微粉化工艺获得的阿齐沙坦两个降解杂质的定性以及对此降解过程控制的方法[J]. 中国药学(英文版), 2014, 23(5): 302
- SUI LP, LI RD, SONG B, *et al.* Characterization of two degradation products of azilsartan formed during the micronization process and development of a method to control the degradation [J]. J Chin Pharm Sci, 2014, 23(5): 302
- [14] 张敏, 霍立茹, 公晓伟, 等. HPLC 法测定阿齐沙坦片含量[J]. 中国药房, 2014, 25(41): 3907
- ZHANG M, HUO LR, GONG XW, *et al.* Content determination of azilsartan tablets by HPLC [J]. China Pharm, 2014, 25(41): 3907
- [15] 蔡鹏俊, 李悦. 沙坦类药物的质谱裂解规律及其应用[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(1): 68
- CAI PJ, LI Y. Mass fragmentation patterns of sartans and application [J]. Chin J Pharm, 2017, 48(1): 68

(本文于 2017 年 8 月 31 日收到)