

二维超高效液相色谱-QToF 质谱联用技术在来氟米特片杂质谱研究中的应用*

赵海云¹, 夏金霞², 王松¹, 刘广桢¹, 张丹丹¹, 袁铭², 王志英², 凌霄^{1**}

(1. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101; 2. Waters 科技(上海)有限公司, 上海 201206)

摘要 目的: 建立二维超高效液相色谱-QToF 质谱联用研究来氟米特片杂质谱的方法。**方法:** 通过二维液相色谱在线脱盐技术, 在不改变一维液相色谱条件的基础上, 将目标化合物通过阀切换转换至二维液相色谱柱, 在二维液相流动相的带动下进质谱, 进行结构鉴定。一维色谱柱为 Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为 0.025 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(57:43), 检测波长为 210 nm; 二维液相色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm 1.7 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱; 采用 ESI 负离子模式进行质谱扫描, 离子源温度 120 °C, 雾化气温度 500 °C, 雾化气流速 900 L·h⁻¹, 采集模式为 MS^E。**结果:** 对样品中存在的杂质进行分析, 解析出可能杂质结构 4 个, 部分结构片段 3 个; 对杂质的毒性预测显示, 杂质 7 具有高毒性风险, 所有杂质遗传毒性均属 5 级, 没有警示结构。**结论:** 本法建立了二维超高效液相色谱-QToF 质谱联用技术测定、分析来氟米特片杂质的方法, 可快速实现杂质定性, 结合软件解析结构更便捷; 国内产品与参比制剂 Sanofi 产品相比, 杂质谱更复杂, 建议生产企业优化处方、生产工艺, 保证药品的质量稳定性。

关键词: 来氟米特片; 二维液质联用; 杂质; 结构解析; 毒性预测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)11-1974-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.18

Application of two-dimensional UPLC-QToF MS technology in the study of the impurity profile of leflunomide tablets*

ZHAO Hai-yun¹, XIA Jin-xia², WANG Song¹, LIU Guang-zhen¹,
ZHANG Dan-dan¹, YUAN Ming², WANG Zhi-ying², LING Xiao^{1**}

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China;

2. Waters Technologies (Shanghai) Limited, Shanghai 201206, China)

Abstract Objective: To establish a two-dimensional UPLC-QToF MS method for the study of impurity profile of leflunomide tablets. **Methods:** By two-dimensional liquid chromatography online desalination technology, there was no need to change the onedimensional liquid chromatography conditions, and converse the target compound to two-dimensional

* 2016 年山东省重点研发计划: 药物一致性评价共性关键技术研究 (No. 2016ZDJ07A04)

** 通信作者 Tel:(0531)81216651; E-mail: xiaol6551@126.com

第一作者 Tel:(0531)81216550; E-mail: helen8204@126.com

liquid chromatography column by valve switching, which led it into the mass spectrometer under the second-dimensional mobile phase elution, and the compound structure was identified. First-dimensional column was Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm 5 μm), the mobile phase was 0.025 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (adjust pH to 3.0 using phosphoric acid) - acetonitrile (57 : 43), detection wavelength: 210 nm; second-dimensional column was Waters BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm 1.7 μm), mobile phase A was 0.1% formic acid solution, mobile phase B was 0.1% formic acid acetonitrile solution, gradient elution. Electrospray ionization (ESI) source was used as negative ion detection model, the temperature of ESI source was 120 °C, nebulizing temperature was 500 °C, nebulizing flow rate was 900 L · h⁻¹, and the acquisition mode was MS^E. **Results:** The existing impurities in the sample were determined, and four possible impurities structure and three structure segment were obtained; toxicity prediction of impurities showed that impurity 7 had high risk of toxicity, all impurity's genetic toxicity is level 5 with no warning structure. **Conclusion:** This article was focused on the method establishment to determine leflunomide impurities by two-dimensional UPLC-QToF MS technology. The qualitative of impurity was quickly obtained by using 2-dimensional HPLC-MS, and it is convenient to identify the structure of impurities combining the software. The domestic products' impurity profile was more complex compared with Sanofi products, which can suggest production enterprises to optimize the prescription and production process to ensure the quality stability of the drug.

Keywords: leflunomide tablets; two-dimensional HPLC-MS; impurity; structure determination; toxicity prediction

来氟米特是一个具有抗增殖活性的异噁唑类免疫调节剂,相对分子质量为 270.2,化学名称为 *N*-(4-三氟甲基苯基)-5-甲基异噁唑-4-羧酰胺,其作用机理主要是抑制二氢乳清酸脱氢酶的活性,从而影响活化淋巴细胞的嘧啶合成。来氟米特最初由德国 HRM 公司开发研制,于 1998 年 12 月在美国首次上市,美国 FDA 批准用于缓解症状和延缓结构损伤及用于成人活动性关节炎的治疗;1999 年,国家食品药品监督管理局批准苏州长征-欣凯制药有限公司来氟米特片作为 I 类新药在国内上市。来氟米特作为前药,在胃肠黏膜与肝脏中迅速转变为活性代谢产物 A771726,在人体内的半衰期为 10 多天,由于药物浓度维持时间较长,使药物疗效保持稳定,但也导致不良反应消退缓慢。其不良反应主要有一过性丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 升高,高血压、胸痛、头晕、恶心等。

2016 年山东省食品药品检验研究院承担了来氟米特片的国家计划抽验任务,共抽到来氟米特片 100 批次,涉及批准文号 7 个,占总批准文号的 87.5%;涉及生产企业 5 家,占总生产企业的 83.3%;按现行标准对各生产企业产品的有关物质进行考察,发现各企业产品杂质谱差异较大;且在制剂过程中有新杂质产生,制剂的稳定性差于原料;与参比 Sanofi 产品相比,国内产品杂质谱更复杂。国内外文献报道多为临床

应用、药代动力学研究及联合用药等方面,国内仅有 1 篇文献就来氟米特有关物质测定方法进行了研究;国内来氟米特片杂质谱及各企业产品杂质差异尚未见报道。为有效控制来氟米特片的质量,降低用药风险,本文采用 Waters 2D UPLC-QToF 二维液质联用系统,对来氟米特片的杂质谱进行深入研究,一维使用《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版二部来氟米特有关物质项下的色谱条件分离,二维使用与质谱兼容的色谱条件与 QToF 质谱相连,将样品中的杂质切入二维进质谱仪检测,进而进行结构解析,并采用国际公认的 3 款软件 Gastroplus 9.0 ADMET predictor 8.0 与 Derek Nexus 5.0.1 (基于知识规则的)、Sarah Nexus 2.0.1 (基于统计学的)进行毒性与遗传毒性(基因毒性)的评价。

1 仪器与试剂

Waters Acquity 2D UPLC-Xevo G2-XS QToF 二维液质联用仪, Gastroplus 9.0, ADMET predictor 8.0 毒性预测软件(美国 Simulations plus 公司), Derek Nexus 5.0.1 和 Sarah Nexus 2.0.1 遗传毒性预测软件(英国 Lhasa 有限公司)。

来氟米特对照品(批号 100571-200601,含量 99.7%)、来氟米特杂质 I (批号 101164-201602,含量 99.9%)、来氟米特杂质 II (批号 101165-201001)、杂质 III (批号 100738-201001)均购自中国食品药品

检定研究院,乙腈(色谱纯)、磷酸二氢钾(分析纯)、磷酸(化学纯)、甲酸(色谱纯)、超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

一维色谱条件:采用 Inertsil ODS-3 (250mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为 0.025 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾(用磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(57:43),流速 0.6 mL · min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 210 nm,柱温 50 °C。二维色谱条件:采用 Waters BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 50 °C,流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,切峰后流动相比例变化见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure

时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (mobile phase B)/%
0	95	5
3	20	80
6	20	80
6.1	95	5

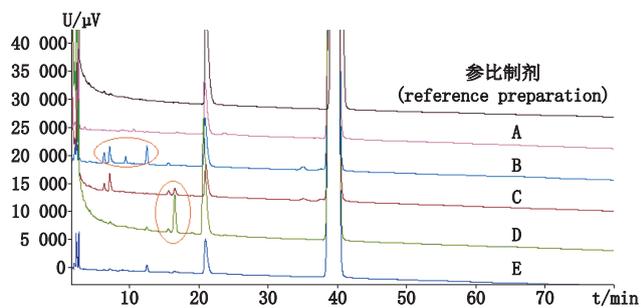
质谱条件:离子化模式为 ESI⁻,毛细管电压 2 kV,源温度 120 °C,雾化气温度 500 °C,雾化气流速 900 L · h⁻¹,采集模式为 MS^E,软件为 MassLynx 4.1/MassFragment。

2.2 样品溶液制备

取供试品适量,加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 1.0 mg 的溶液,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 杂质谱差异与目标杂质选择

比较国内企业产品与参比制剂 Sanofi 产品的杂质谱,详见图 1,各企业产品杂质谱差异较大,且杂质较原研产品多且复杂。选取 B、D 两企业产品作为代表,进行质谱结构分析。

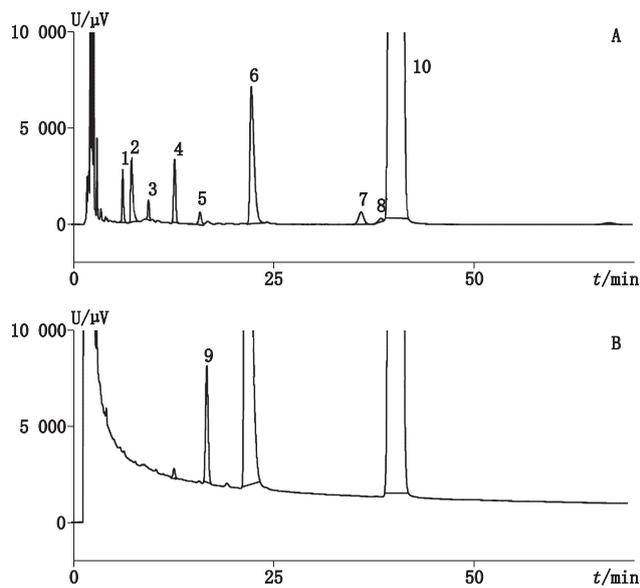


A~E. 国内企业产品 (domestic products)

图 1 各企业产品杂质比较

Fig. 1 The impurity comparison from different enterprise products

采用 Waters 2D UPLC-QToF 二维液质联用系统,一维采用“2.1”项下一维色谱条件进行,将一维色谱图中目标杂质切入二维色谱柱,二维使用“2.1”项下二维色谱条件进行分析,洗脱液进 Q-ToF 质谱检测器,进行目标化合物的一级、二级质谱数据采集,见色谱图 2。



1~9. 目标杂质 (target impurities) 10. 来氟米特 (leflunomide)

A. MS B. MS²

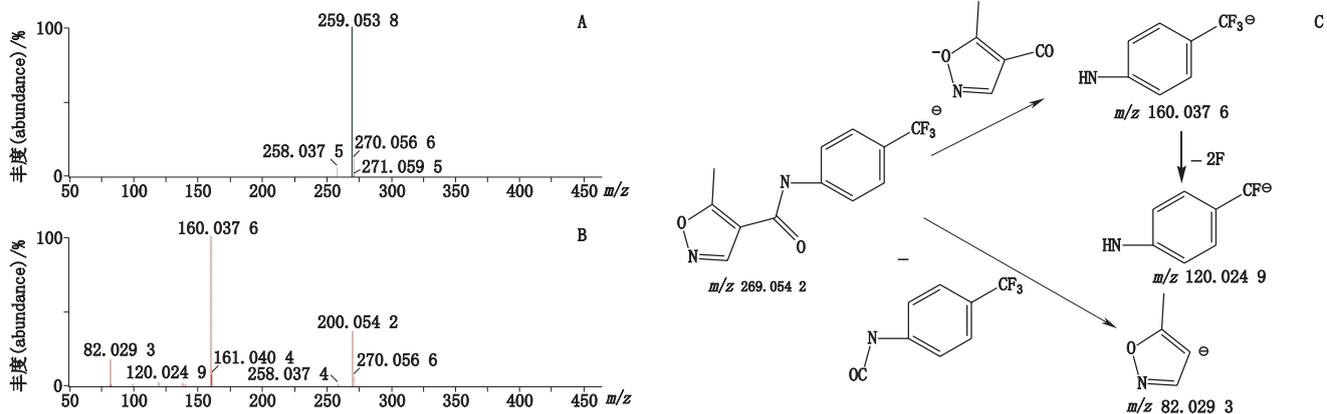
图 2 来氟米特一维 HPLC 色谱图 (检测波长 210 nm)

Fig. 2 1D HPLC chromatograms of leflunomide (detection wavelength 210 nm)

2.4 质谱解析

2.4.1 来氟米特的质谱解析 首先对来氟米特的一、二级质谱图进行分析,确定加合物及二级碎片裂解规律。所得分子离子峰 m/z 269.054 2 为 [M-H]⁻ 峰,主要碎片离子为 m/z 160.037 6、120.024 9、82.029 3,推测其可能的裂解规律主要问题是酰胺 C-N 键断裂,得到碎片 m/z 160.037 6,进一步失去 CF₃ 上的 F,得到碎片 m/z 120.024 9;另一裂解途径为五元环与羰基 C-C 键断裂,得到碎片 m/z 82.029 3,碎片解析见图 3。

2.4.2 杂质解析 根据来氟米特的裂解规律,对杂质的裂解途径进行推测,初步鉴定了 4 个杂质的可能结构,杂质 1 与 5 为同分异构体,且杂质 1、2、5 仅根据一级、二级质谱,推导出其结构片段,未能完全解析,杂质 8 与来氟米特为同分异构体,杂质 3 通过碎片不能建立其与主峰的联系,未解析,可能为辅料。详细信息见表 2。



A. MS B. MS² C. 裂解途径 (fragmentation pathway)

图3 来氟米特质谱图及裂解途径

Fig. 3 Mass spectrum and fragmentation pathway of leflunomide

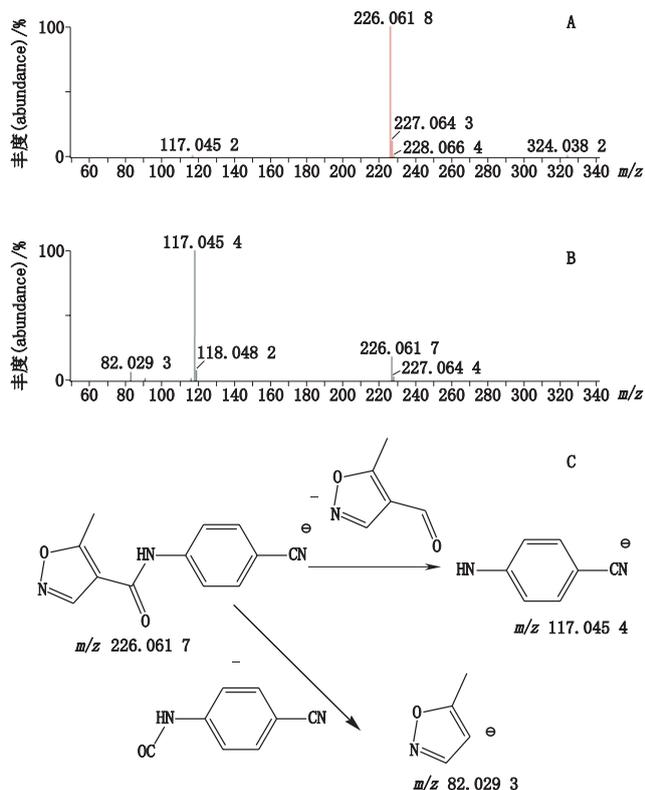
表2 来氟米特杂质质谱分析及可能结构

Tab. 2 Mass analysis and possible structures of leflunomide impurities

峰号 (peak No.)	<i>t_R</i> /min	分子式 (formular)	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	MS ² <i>m/z</i>	可能的结构式 (possible structure)
1	6.45/0.16	C ₉ H ₆ NO ₂ CF ₃	216.027 2	188.032 6、160.037 6	
2	7.25/0.18	C ₉ H ₆ NO ₃ CF ₃	232.022 1	160.037 3、100.930 6	
3	9.57/0.24	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.232 8	229.143 3、211.133 6	未解析,其二级谱与来氟米特无关,可能为辅料 (unparsed, the MS ² spectrum is irrelevant to leflunomide, and maybe it is excipient)
4	12.62/0.32	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₂	226.061 8	117.045 4、82.029 3	
5	15.61/0.39	C ₉ H ₆ NO ₂ CF ₃	216.027 2	188.032 6、160.037 6	
6	20.99/0.52	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₂ F ₃	269.054 0	160.037 6、82.039 4	1号峰的同分异构体 (the isomer of impurity 1)
7	35.09/0.88	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₃ F ₃	285.048 5	269.053 0、216.027 1、88.032 0	
8	39.41/0.99	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₂ F ₃	269.054 0	247.857 0、227.043 1、160.037 1	主峰同分异构体 (the isomer of main peak)
9	16.68/0.42	C ₁₀ H ₇ N ₂ OF ₃	227.043 2	186.016 3、160.037 1	

*. 主峰保留时间约为 40 min (the retention time of main peak is about 40 min)

杂质4的准分子离子峰为 m/z 226.061 8,为其 $[M-H]^-$ 峰,拟合元素组成为 $C_{12}H_9N_3O_2$,二级质谱显示 m/z 117.045 4、82.029 3的碎片离子,推测其结构为来氟米特苯环上三氟甲基被氰基取代产生。杂质4的质谱裂解方式见图4。



A. MS B. MS² C. 裂解途径 (fragmentation pathway)

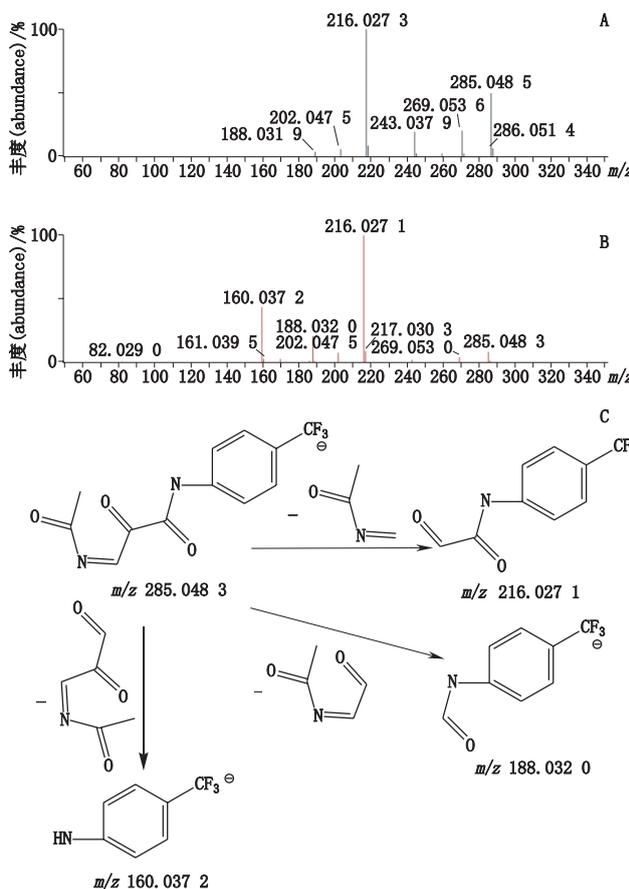
图4 杂质4质谱图及裂解途径

Fig. 4 Mass spectra and fragmentation pathway of impurity 4

杂质6的准分子离子峰为 m/z 269.054 0,为来氟米特同分异构体,二级碎片与主峰一致,仅峰强度不太一致,经液相色谱定位,为《中国药典》标准中来氟米特杂质II。

杂质7的准分子离子峰为 m/z 285.048 5,为其 $[M-H]^-$ 峰,拟合元素组成为 $C_{12}H_9N_2O_3F_3$,为主峰+O结构,二级质谱显示 m/z 216.027 1、188.032 0、160.037 2的碎片离子,推测其结构为来氟米特五元环上C=C被氧化,后发生分子重排,生成CO双键。杂质7的质谱裂解方式见图5。

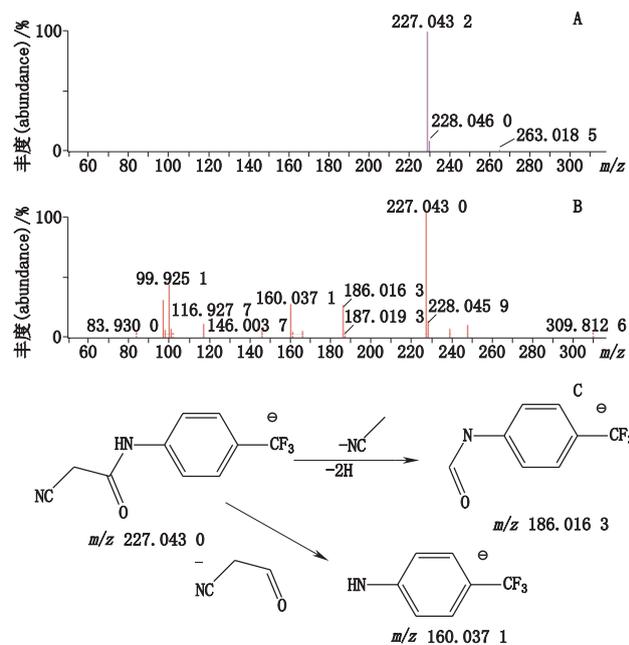
杂质9的准分子离子峰为 m/z 227.043 2,为其 $[M-H]^-$ 峰,拟合元素组成为 $C_{10}H_7N_2OF_3$,为主峰-C₂H₂O结构,二级质谱显示 m/z 186.016 3、160.037 1、99.925 1的碎片离子,杂质9的质谱裂解方式见图6。



A. MS B. MS² C. 裂解途径 (fragmentation pathway)

图5 杂质7质谱图及裂解途径

Fig. 5 Mass spectra and fragmentation pathway of impurity 7



A. MS B. MS² C. 裂解途径 (fragmentation pathway)

图6 杂质9质谱图及裂解途径

Fig. 6 Mass spectra and fragmentation pathway of impurity 9

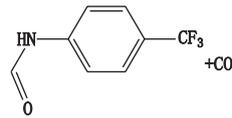
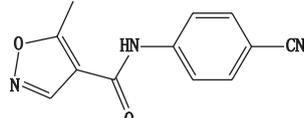
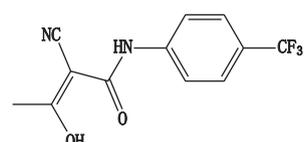
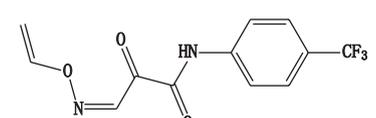
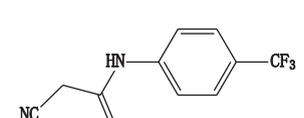
2.5 杂质毒性预测

采用 Gastrolplus 9.0 ADMET Predictor 8.0 软件对推测出的杂质进行毒性预测,采用 Derek Nexus 5.0.1 (基于知识规则的)和 Sarah Nexus 2.0.1 (基于统计学的)进行遗传毒性预测,并根据 ICH M7 指导原则对

其毒性分级,详细结果见表 3。结果表明,5 种杂质均属遗传毒性 5 级,没有警示结构。而毒性预测发现 7 号杂质 TOX_Risk 为 4,属于高毒性风险物质,根据软件说明,TOX_Risk 大于 3.3 即为高毒性风险物质,应严格控制。

表 3 杂质毒性预测

Tab. 3 The toxicity prediction of impurity

杂质 (impurity)	结构式 (structure)	毒性风险 (TOX_Risk)	毒性代码 (TOX_Code)	Derek 预测 (Derek Prediction)	Sarah 预测 (Sarah Prediction)	ICH M7 等级 (ICH M7 Class)
1		2.485	rat, SG, Hp	■ ■ ■ □	■ ■ □ □	Class 5
4		1	Hp	■ ■ ■ □	□ □ □ □	Inconclusive
6		1	Hp	■ ■ ■ □	■ □ □ □	Class 5
7		4	rat, Xr, SG, Hp	■ ■ □ □	□ □ □ □	Inconclusive
9		1.443	rat, Hp	■ ■ ■ □	■ ■ □ □	Class 5

注 (note): rat: 急性大鼠毒性 (acute rat toxicity); SG: 谷丙转氨酶和谷草转氨酶升高 (SGOT and SGPT elevation); Xr: 在大鼠中有致癌性 (carcinogenicity in rat); Hp: 肝毒性 (hepatotoxicity)

3 讨论

3.1 二维液质联用的优势

采用二维液质联用,一维采用常规液相色谱条件,二维采用与质谱兼容的液相色谱条件与 QToF 质谱相连,在不改变原方法的基础上,进行质谱检测,快速实现化合物谱定性,节省摸索质谱条件的时间;同时结合仪器所带软件 MassLynx 4.1/MassFragment,根据一、二级质谱数据,结合裂解规律快速解谱。

3.2 杂质谱的研究

根据质谱推测所得结构,《中国药典》2015 年版二部仅控制了 6 号杂质 (即杂质 II),9 号杂质为

USP 40 来氟米特原料中 2- 氨基 - 乙酸 - (4'- 三氟甲基) 苯胺, USP 40 控制来氟米特原料中含此杂质不得过 0.1%,来氟米特片项下并未规定限度;4 号、7 号杂质均未见文献报道。

与参比制剂 Sanofi 产品比较,国内产品杂质复杂,且存在高毒性风险化合物杂质 7;标准检验也发现制剂的稳定性差于原料,且制剂中杂质种类多于原料,即表明在制剂过程中有新杂质生成,为保证药品的安全有效性,建议生产企业优化处方、生产工艺,查找引起药物不稳定原因,保证药品的质量稳定性,同时加强药品在有效期内的质量监管。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 462
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 462
- [2] DUYGU Y, DILEK DA, MUZAFFER T. Determination of leflunomide in tablets by high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 197
- [3] POOMINA S, DEBRAJ G, PHOOL C, *et al.* Detection of *in vitro* metabolite formation of leflunomide: a fluorescence dynamics and electronic structure study [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 3418
- [4] MANFRED S. The use of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis: an experimental and clinical review [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47: 291
- [5] 余彬, 罗晶. 来氟米特不良反应并文献分析 [J]. *临床合理用药*, 2010, 3(20): 8
YU B, LUO J. Document analysis of adverse reactions of leflunomide [J]. *Chin J Clin Rational Drug Use*, 2010, 3(20): 8
- [6] 余志勇. 来氟米特合成工艺优化及质量控制研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2012
YU ZY. Research on Synthetic Process Optimization and Quality Control of Leflunomide [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012
- [7] 谢思骏, 汪航. 高效液相色谱-线性离子阱质谱鉴定瑞舒伐他汀中间体中相关杂质 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(2): 243
XIE SJ, WANG H. Identification of impurities in rosuvastatin intermediate by high performance liquid chromatography coupled with linear ion trap mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(2): 243
- [8] 马晓宁, 梁晟, 蒋涛, 等. 酒石酸唑吡坦片中杂质的色谱-质谱结构鉴定 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(6): 1087
MA XN, LIANG S, JIANG T, *et al.* Separation and identification of unknown impurities in zolpidem tartrate tablets by LC-MS method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(6): 1087
- [9] 徐明明, 郑璐侠, 邵泓, 等. 二维液相色谱法检测注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚残留量 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(3): 502
XU MM, ZHENG LX, SHAO H, *et al.* Determination of residual phenol content in ribonucleic acid I / II / III for injection by two-dimensional liquid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(3): 502
- [10] 荀琰, 耿昭, 张燕飞, 等. 液质联用法快速筛查中药材及饮片中常见染色掺假物质的方法研究及数据库建立 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(3): 461
XUN Y, GENG Z, ZHANG YF, *et al.* Rapid screening method based on LC-MS for common dyeing adulterated material in traditional Chinese medical materials and decoction pieces [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(3): 461
- [11] 张丽敏, 王嘉仡, 孟宪生, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法对中药山绿茶化学成分分析 [J]. *药学研究*, 2017, 36(5): 266
ZHANG LM, WANG JY, MENG XS, *et al.* Study on chemical constituents in *Ilex hainanensis* Merr. by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *J Pharm Res*, 2017, 36(5): 266
- [12] VIVIEN CH, BRUCE GC, SUSAN ET. Rapid determination of the active leflunomide metabolism A771726 in human plasma by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 803: 331
- [13] HAIIMA R, TOMAS R, ASHLEY H, *et al.* Quantitation of total and free teriflunomide (A771726) in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55: 325
- [14] LIM YJ, KIM HS, SHON M, *et al.* Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of leflunomide tablets in Korean healthy volunteers [J]. *Drug Res*, 2013, 63: 633
- [15] PARK JY, KIM KA, LEE YH, *et al.* Pharmacokinetic comparison and bioequivalence of two leflunomide formulations in humans: a single dose, randomized, open-label, two-way crossover study [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2010, 48(4): 291
- [16] 施务务, 吴欢. 来氟米特片中来氟米特及有关物质的测定 [J]. *淮海医药*, 2012, 30(6): 545
SHI WW, WU H. The determination of leflunomide and related substance in leflunomide tablets [J]. *J Huaihai Med*, 2012, 30(6): 545

(本文于 2017 年 8 月 24 日收到)