Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

阿托伐他汀片剂杂质鉴定

——应用ACQUITY UPLC/Xevo G2 QTof系统

乔立瑞
沃特世科技（上海）有限公司

背景介绍

阿托伐他汀钙(Atorvastatin Calcium)，又名立普妥，是一种人工合成的HMG-CoA还原酶抑制剂，临床常用降血脂药。能够降低血浆胆固醇和脂蛋白水平，减少低密度脂蛋白的生成。原研发企业为辉瑞公司（Pfizer）。目前国内有原研发企业产品及仿制药上市，其原料药及其制剂质量标准收载于国家新药转正标准、USP33、EP7.1。根据人用药品注册技术规范国际协调会（简称ICH）准则的要求，药物中杂质的限度仅为0.1%(毒性药物限度则更低)，高于此水平的所有未知杂质均应被鉴别。药物中的有关杂质大多具有潜在的生物活性，有的甚至会与药物发生相互作用从而影响药物的安全性和有效性，严重时甚至会产生毒性作用，因此有关杂质的鉴定研究是药物质量研究中最重要的一个方面，同时也是药品开发过程中的一个重要内容。

本文采用沃特世（Waters®）超高效液相色谱飞行时间质谱联用（ACQUITY UPLC®/Xevo® G2 QTof）技术对阿托伐他汀（$C_{33}H_{35}FN_2O_5$）片剂样品杂质进行分析，快速准确推测其杂质的分子式和结构式，并进行相对定量。

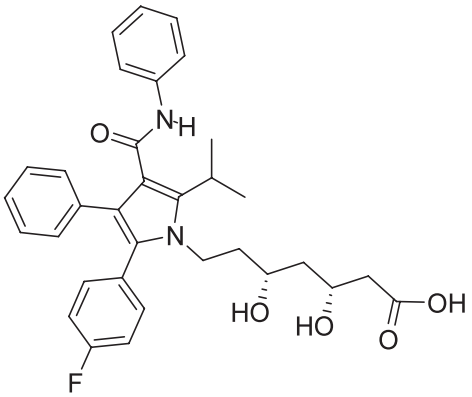

图1. 阿托伐他汀结构式。

实验流程

使用UPLC分离：灵敏度更好，分辨率更高
↓
UPLC/MS，MS^E检测杂质精确质量，数据信息丰富
↓
MetaboLynx™进行数据处理鉴定预料中与非预料中有关杂质
↓
MassFragment™对有关物质结构进行分析与确认
↓
Location™对反应发生位点进行分析与确认
↓
对相关物质进行绝对定量或者相对定量

图2. 采用UPLC/Xevo G2 QTof进行药物杂质结构鉴定分析工作流程。

实验条件

样品制备

阿托伐他汀片剂约16 mg，加甲醇1ml溶解，直接进样分析。

LC / UPLC® 条件

A. LC / UPLC 条件

LC系统:	ACQUITY UPLC/PDA system
柱温:	30 °C
样品室温度:	4 °C
进样量:	10 µL
流速:	0.60 mL/min
Mobile Phase A:	Water+0.1% FA
Mobile Phase B:	ACN
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 1.7 µm, 2.1 x 100mm; P/N:186003539

梯度表:

Time	Flow	%A	%B	Curve
0.00	0.600	82.0	18.0	Initial
0.20	0.600	82.0	18.0	6
5.00	0.600	5.0	95.0	6
6.00	0.600	5.0	95.0	6
7.00	0.600	82.0	18.0	1

B. MS 条件

MS系统:	Xevo G2 QTOF
离子化模式:	ESI-
毛细管电压:	2.5 KV
源温度:	120 °C
雾化气温度:	450 °C
雾化气流速:	800 L/h
锥孔气流速:	30 L/h

C. 软件

MassLynx™ 4.1

结果与讨论

采用UPLC和二极管阵列检测器PDA、飞行时间质谱Xevo G2 QTof联用，对阿托伐他汀片剂样品中的有关物质进行分离分析。

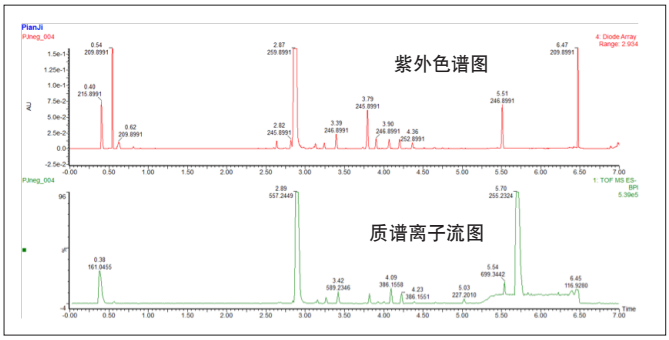

图3. 阿托伐他汀片剂紫外色谱图和质谱离子流图（BPI）。

采用专利软件MetaboLynx™寻找和鉴定杂质，MetaboLynx可快速检测LC/MS样本中的杂质色谱峰，并通过数据自动处理快速鉴定杂质。阿托伐他汀片剂样品溶液中，MetaboLynx可以明显的检测到杂质16个。

图4. MetaboLynx自动查找杂质结果视图。

如上图4所示MetaboLynx给出杂质检测结果分析如表1所示，针对不同的保留时间软件自动分析出了杂质的质核比，分子式，可能的结构，峰面积，及百分含量等信息。

保留时间	质核比	分子式	含量(%)	可能的结构推测	峰面积
0.38	161.0455	$C_6H_{10}O_5$	9.88	2-ethoxyl to acid-$C_{26}H_{21}N_2OF$ (R_12:-$C_{26}H_{21}N_2OF$)	7321.3
2.77	573.2396	$C_{33}H_{35}FN_2O_6$	0.10	Hydroxylation	75.1
2.84	539.2541	$C_{33}H_{36}N_2O_5$	0.42	Reductive Defluorination	313.5
2.87	555.229	$C_{33}H_{33}FN_2O_5$	0.15	Desaturation	114.2
2.89	557.245	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	53.58	Parent	61915.2
2.93	575.239	$C_{32}H_{36}N_2O_8$	0.05	Demethylation + 2x hydroxylation + Hydration -F+H (R_3:-F+H)	34.7
2.96	543.2277	$C_{32}H_{33}FN_2O_5$	0.06	Demethylation	42.4
3.26	589.2354	$C_{33}H_{35}FN_2O_7$	0.98	2xHydroxylation	728.5
3.42	589.2346	$C_{33}H_{35}FN_2O_7$	1.89	2x Hydroxylation	1399.2
3.82	521.2251	$C_{33}H_{31}FN_2O_3$	0.95	Desaturation + Alcohols dehydration-O (R_0:-O)	700.8
3.92	397.17	$C_{26}H_{23}FN_2O$	0.06	Parent-$C_7H_{12}O_4$ (R_11:-$C_7H_{12}O_4$)	45.4
3.93	453.1962	$C_{26}H_{29}FNO_5$	0.09	2xHydroxylation + Decarboxylation-C_6H_5N (R_7:-C_6H_5N)	67.6
4.09	430.1451	$C_{26}H_{22}FNO_4$	1.53	Oxidative Deamination to alcohol + 2 Hydroxylation-$C_7H_{12}O_4$ (R_11:-$C_7H_{12}O_4$)	1133.3
4.23	430.1453	$C_{26}H_{22}FNO_4$	1.58	Isopropyl to acid + Hydroxylation-C_6H_4(R_6:- C_6H_4)	97.0
5.54	453.1992	$C_{29}H_{27}FN_2O_2$	0.20	Alcohols dehydration + Deethylation-$C_2H_2O_2$(R_5:-$C_2H_2O_2$)	149.5
5.69	255.2323	$C_{16}H_{32}O_2$	30.05		34

表1.MetaboLynx给出16个杂质检测结果分析。

选择16个有关物质中保留时间为2.77 min（M2）的化合物为例，来说明结构鉴定的过程。采用Xevo G2 QTof，得到该峰的精确质量数和质谱图(图5-6)。

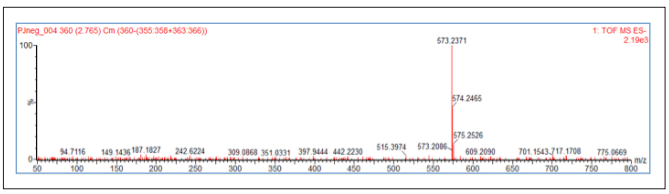

图5. 化合物M2的质谱图。

对其质谱图中m/z=573.2371的质谱信号进行元素组成分析(图6)，通过计算同位素的位置和丰度比，确定该离子的元素组成为$C_{33}H_{34}N_2O_6F$，为$C_{33}H_{35}N_2O_6F$的[M-H]-信号，综合软件分析结果初步推断该化合物为阿托伐他汀羟基化的产物。

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	F
573.2411	573.2401	1.0	1.7	17.5	C33 H34 N2 O6 F	41.5	1.104	33.17	33	34	2	6	1
	573.2441	-3.0	-5.2	21.5	C38 H34 O4 F	42.0	1.603	20.13	38	34		4	1
	573.2389	2.2	3.8	21.5	C36 H33 N2 O5	42.0	1.627	19.65	36	33	2	5	
	573.2455	-4.4	-7.7	26.5	C39 H30 N4 F	42.2	1.856	15.64	39	30	4		1
	573.2448	-3.7	-6.5	12.5	C29 H37 N2 O10	42.6	2.169	11.42	29	37	2	10	

图6. 化合物M2的元素组成分析图。

采用Location™功能快速判断结构变化（羟基化）发生的位点。软件会对预测的可能结构进行打分。打分数字越大，表示软件支持此处发生变化的可能性越大。

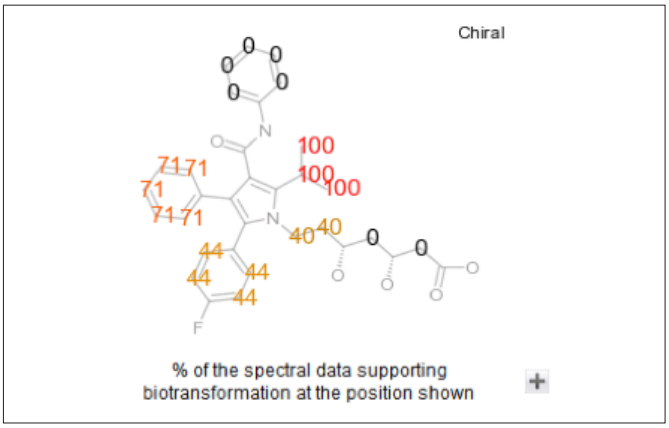

图7. 化合物M2的Location功能分析图。

采用MassFragment™功能进一步推断其化学结构。对其二级质谱图中的碎片离子进行分析，结果如图8所示。其实际的碎片离子和理论碎裂时可能产生的碎片相符，因此，进一步确证了该化合物的结构。

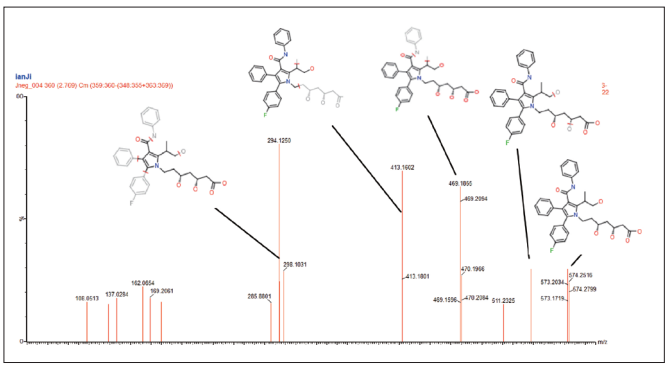

图8. MassFragment分析显示M2二级碎片离子碎片归属结果。

通过以上的分析我们进一步推测了其他杂质可能的分子式和结构，见图9-10。

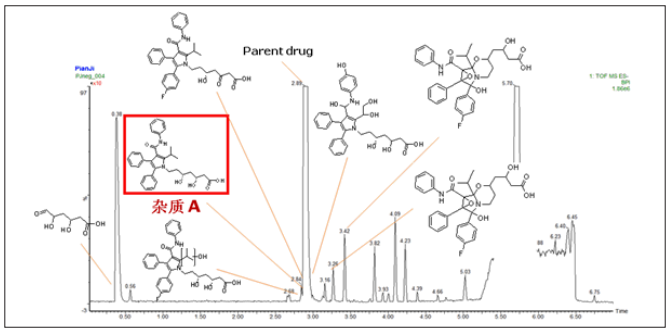

图9. 阿托伐他汀片剂样品杂质鉴定结果A。

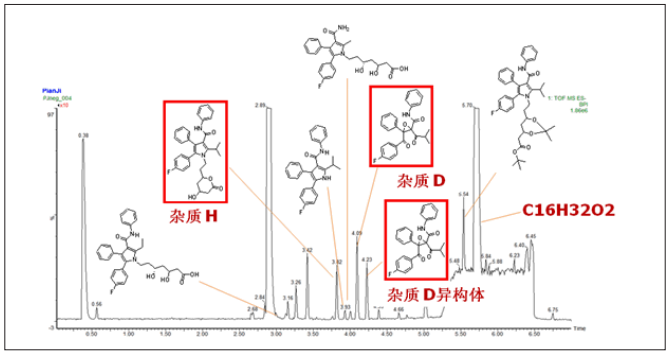

图10. 阿托伐他汀片剂样品杂质鉴定结果B。

说明

如果杂质结构有重排过程或有手性中心的区别，软件无法识别，需要结合文献或已有的化学背景知识或通过NMR技术确认---杂质结构鉴定过程中面临的挑战 。

结论

随着药物质量标准的要求提高，需要对药物中的有关物质进行定性分析，得到有关物质可靠的结构信息对药物质量控制和质量保证都起着重要的作用。本文采用沃特世ACQUITY UPLC/Xevo G2 QTOF系统，对药物阿托伐他汀片剂样品有关物质进行结构鉴定，其精确分子质量测定准确，化学结构推导过程科学严谨，报告清晰，对于药物的有关物质研究工作可以起到积极的推动作用。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特世科技（上海）有限公司
沃特斯中国有限公司

上海：021 - 6156 2666
北京：010 - 5209 3866
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

©2012 沃特世公司 中国印刷
2012 年 11 月