

液相色谱-质谱联用鉴定他克莫司的有关物质

付晓婷¹, 陈民辉¹, 严菲^{1*}, 杭太俊²

(¹江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019; ²中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要 采用液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术研究他克莫司的有关物质。采用 Agilent Eclipse Plus-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)色谱柱, 以 0.01% 甲酸水溶液-乙腈-甲基叔丁基醚为流动相体系, 对他克莫司及其强制降解试验样品中的有关物质进行梯度洗脱分离; 电喷雾正离子化-四极杆-飞行时间串联质谱法(ESI-Q-TOF/MS)测定各有关物质的母离子及碎片离子的准确质荷比和元素组成, 并解析鉴定有关物质的结构。在所建立的条件下, 他克莫司与其有关物质分离良好, 检测并鉴定出 35 个主要有关物质, 其中 2 个分别为他克莫司的互变异构体 I 和 II (他克莫司的有效成分), 3 个为美国药典收载的已知杂质, 其余 30 个为新鉴定的未知有关物质。研究结果可为他克莫司发酵生产过程的质量控制提供参考依据。

关键词 他克莫司; 有关物质; 降解产物; 结构鉴定; 液相色谱-质谱联用

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)05-0563-14

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220507

引用本文 付晓婷, 陈民辉, 严菲, 等. 液相色谱-质谱联用鉴定他克莫司的有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(5): 563–576.

Cite this article as: FU Xiaoting, CHEN Minhui, YAN Fei, *et al.* Identification of the related substances of tacrolimus by LC-MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(5): 563–576.

Identification of the related substances of tacrolimus by LC-MS

FU Xiaoting¹, CHEN Minhui¹, YAN Fei^{1*}, HANG Taijun²

¹Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019;

²School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To identify the related substances of tacrolimus by LC-MS techniques, the separation of the related substances contained in tacrolimus and its stressed samples was carried out on a Agilent Eclipse Plus-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column with 0.01% formic acid solution and a mixture of acetonitrile-methyl tert-butyl ether as the mobile phase. in linear gradient elution. Electrospray positive ionization high resolution Q-TOF/MS was used for the determination of the accurate mass and elemental composition of the parent ions of all the components, thence, the structures of all the detected substances were successfully characterized through spectra elucidation and fragmentation pathways analysis. Tacrolimus and its 35 detected related substances were well separated under the established conditions, among which 2 were its isomers, 3 were listed in United States Pharmacopeia(USP), and the rest 30 were identified as unknown products having not been reported before. These results were useful for its fermentation processes and quality control.

Key words tacrolimus; related substances; degradation products; structure identification; LC-MS

他克莫司(tacrolimus, 图1), 即[3S-[3R, E(1S, 3S, 4S)], 4S, 5R, 8S, 9E, 12R, 14R, 15S, 16R, 18S, 19S, 26aR]]-5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26, 26a-十六氢-5, 19-二羟基-3-[2-(4-羟基-3-甲氧基环己基)-1-甲基乙烯基]-14, 16-二甲氧基-4, 10, 12, 18-四甲基-8-(2-丙烯基)-15, 19-环

氧-3H-吡啶并[2, 1-c][1, 4]氧杂氮杂环二十三碳烷-1, 7, 20, 21(4H, 23H)-四酮, 是从链霉菌属发酵产物中分离出的 23 元大环内酯类抗生素^[1], 是强效免疫抑制剂, 既用于器官移植, 又用于自身免疫性疾病, 如特应性皮炎(AD)、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性眼病等的治疗^[2-5]。

虽然英国和美国药典已收载他克莫司及其制剂的质量标准,他克莫司的质量研究也有一些文献报道^[6-9],但是关于他克莫司有关物质的系统研究与鉴定未见文献报道。

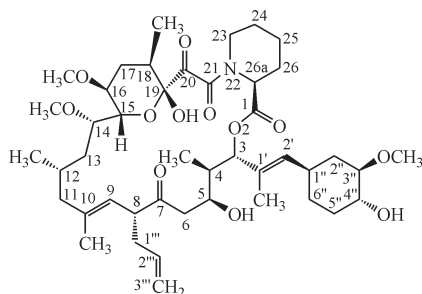


Figure 1 Chemical structure of tacrolimus

本研究建立了适用于他克莫司有关物质检查和鉴定的色谱-质谱联用分析方法,通过LC-Q-TOF/MS测定了他克莫司及其强制降解样品中35个有关物质的准确相对分子质量和分子式,同时结合其二级质谱特征,综合解析鉴定它们的结构,可用于他克莫司发酵生产过程的质量控制。他克莫司在电喷雾正离子化时, $[M+H]^+$ 峰很弱,主要形成 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰;由于 $[M+Na]^+$ 离子响应强同时产生碎片多,更有助于解析,故采用 $[M+Na]^+$ 进行结构解析。

1 材料

1.1 药品与试剂

他克莫司原料药(批号181201FK)、他克莫司粗品(批号PCR-181101)(江苏九阳生物制药有限公司);他克莫司及其有关物质A、8-差向异构体、8-丙基类似物(美国药典USP对照品)。乙腈、甲基叔丁基醚(CR,美国Tedia公司);甲酸、磷酸(AR,南京化学试剂有限公司),娃哈哈纯净水,自制二次重蒸水。

1.2 仪器

BS 21S 分析天平(德国Sartorius公司);LC-MS9030 Q-TOF(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱;以0.01% 甲酸-乙腈-甲基叔丁基醚(80:16:4)水溶液为流动相A相,0.01% 甲

酸-乙腈-甲基叔丁基醚(20:64:16)为流动相B相,进行线性梯度洗脱(A:B) 0 min(75:25)→19 min(75:25)→38 min(27.5:72.5)→39 min(75:25)→45 min(75:25),检测波长为220 nm,流速为1.5 mL/min,柱温为60 °C,进样量为20 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾正离子化,高分辨Q-TOF/MS测定。NaI溶液(4×10^4 mol/L)准确质荷比较正,喷雾电压4.00 kV,雾化气压力230 kPa,流量3.0 L/min,接口温度300 °C,干燥气流量10.0 L/min,加热气流10.0 L/min,氩气CID碰撞能量45~55 eV,扫描范围 m/z 100~900。

2.3 溶液配制

2.3.1 供试品溶液 取他克莫司原料药或供试品约15 mg,精密称定,置5 mL量瓶中,加稀释剂(乙腈)溶解并定量稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为3 mg/mL的供试品溶液。精密量取上述溶液适量,加稀释剂定量稀释制备0.1%自身对照溶液。

2.3.2 对照品溶液 取他克莫司有关物质A、他克莫司8-差向异构体、8-丙基类似物各适量,精密称定,分别加稀释剂溶解并定量稀释制成含他克莫司有关物质A、8-差向异构体、8-丙基类似物均约10 μg/mL的对照品溶液。

2.3.3 强制降解试验溶液 取他克莫司各约15 mg,分别经光照(4 500 lx) 7 d、或100 °C烘箱放置7 d;或稀释剂溶解后,加0.1 mol/L盐酸溶液1 mL 60 °C水浴反应4 h、加0.001 mol/L氢氧化钠溶液1 mL 60 °C水浴反应4 h、加3% 过氧化氢溶液1 mL 60 °C水浴中反应2.5 h、或光照(4 500 lx) 3.5 d、或90 °C水浴中反应24 h;制备强制降解样品。然后,各样品分别加稀释剂(酸碱处理样品先中和)溶解并稀释至5 mL,配制成质量浓度约为3 mg/mL的强制降解试验溶液。同时进行空白溶剂试验。

3 结果

3.1 有关物质检查

建立的他克莫司有关物质挥发性流动相HPLC检查方法适用于质谱联用鉴定。现行药典所使用的乙腈-甲基叔丁基醚-水流动相体系效果较好,色谱图中有关物质18(后期经解析为他克莫司异构体I自发脱水产生)呈鼓包状,尝试多种

流动相体系对峰形并无明显改善,归因为他克莫司与其异构体之间存在转化的动态平衡。

图 2 为他克莫司原料药、粗品、已知杂质对照品及其强制降解溶液的 HPLC-UV 谱图。采用 0.1% 自身对照法估算有关物质的含量,按保留时间由小到大顺序对含量大于 0.1% 主要杂质进行识别和编号,共检出发离良好的 35 个主要有关物质,其中有关物质 18 和 21 分别为他克莫司的互变异构体 I 和 II (均为他克莫司的有效成分)。

他克莫司原料药供试品共检出 1 个有关物质(有关物质 21,图 2-c),他克莫司粗品共检出 10 个有关物质(有关物质 3、14、17、21、22、23、25、26、29、31,图 2-k)。强制降解试验结果表明,本品在

溶液降解状态下,对酸、碱、氧化、光照、高温条件均比较敏感;在固体粉末干法降解状态下,对高温、光照较为稳定。酸降解形成 14 个主要降解产物(有关物质 5~7、15、18、19、20、21、25、30~34,图 2-i);碱降解形成 7 个主要降解产物(有关物质 3、5、8、18、19、20、21,图 2-j);氧化降解形成 5 个主要降解产物(有关物质 1、2、4、18、21,图 2-h);高温湿法降解形成 8 个主要降解产物(有关物质 13、17、18、21、24、27、31、35,图 2-d);光照湿法降解形成 5 个主要降解产物(有关物质 9、13、16、21、28,图 2-f);光照干法降解形成产生 2 个主要降解产物(有关物质 12、21,图 2-g);高温干法降解形成 4 个主要降解产物(有关物质 10、11、17、27,图 2-e)。

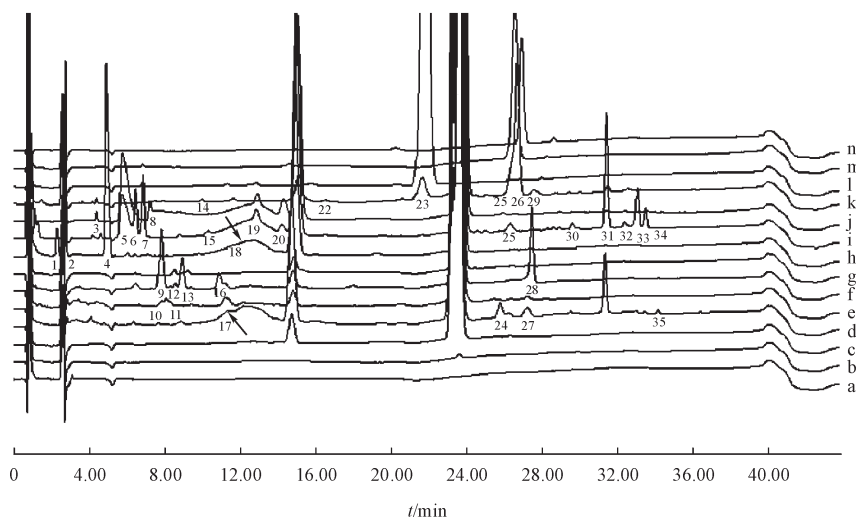


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of tacrolimus

a: Blank; b: 0.1% Reference; c: API; d: Wet heat; e: Dry heat; f: Wet light; g: Dry light; h: Oxidation; i: Acid; j: Alkaline; k: Crude; l: Reference of tacrolimus related substance A; m: Reference of tacrolimus 8-epimer; n: Reference of tacrolimus 8-propyl analogs

3.2 有关物质的结构鉴定

采用 LC-Q-TOF/MS 测定各有关物质母离子的准确质荷比和离子组成,以及它们的二级质谱特征碎片,并通过与他克莫司和已知有关物质的质谱特征进行对比分析,鉴定各主要有关物质的结构。结果见图 3。

3.2.1 已知有关物质的确证 通过对有关物质的 HPLC 定位及质谱定性,确证有关物质 23、25、26 分别与 USP 规定的已知有关物质 A、他克莫司 8-差向异构体、他克莫司 8-丙基类似物对应。根据文献报道和相对保留时间及在含水的溶剂中他克莫司的转化现象^[7],可以得出有关物质 18 和 21 分别对应他克莫司异构体 I 和 II。对他克莫司和各已

知有关物质的一级质谱母离子准确质荷比、二级质谱特征碎片离子(图 4)和裂解途径分析,可以辅助其未知有关物质结构的推断与鉴定。

他克莫司 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得他克莫司 $[M + Na]^+$ 准确质荷比为 826.474 4,与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{12}Na^+$ 相应;其主要碎片离子以及相应的离子式为 m/z 679.381 1 ($C_{38}H_{56}O_9Na^+$) 对应 $[(P-111-2H_2O)Na]^+$, m/z 653.403 0 ($C_{37}H_{58}O_8Na^+$) 对应 $[(P-111-H_2O-CO_2)Na]^+$, m/z 635.391 1 ($C_{37}H_{56}O_7Na^+$) 对应 $[(P-111-2H_2O-CO_2)Na]^+$, m/z 625.407 3 ($C_{36}H_{58}O_7Na^+$) 对应 $[(P-111-H_2O-CO_2-CO)Na]^+$, m/z 616.310 1 ($C_{31}H_{47}NO_{10}Na^+$) 对应 $[(P-210)Na]^+$, m/z 607.396 9 ($C_{36}H_{56}O_6Na^+$) 对应 $[(P-111-2H_2O-$

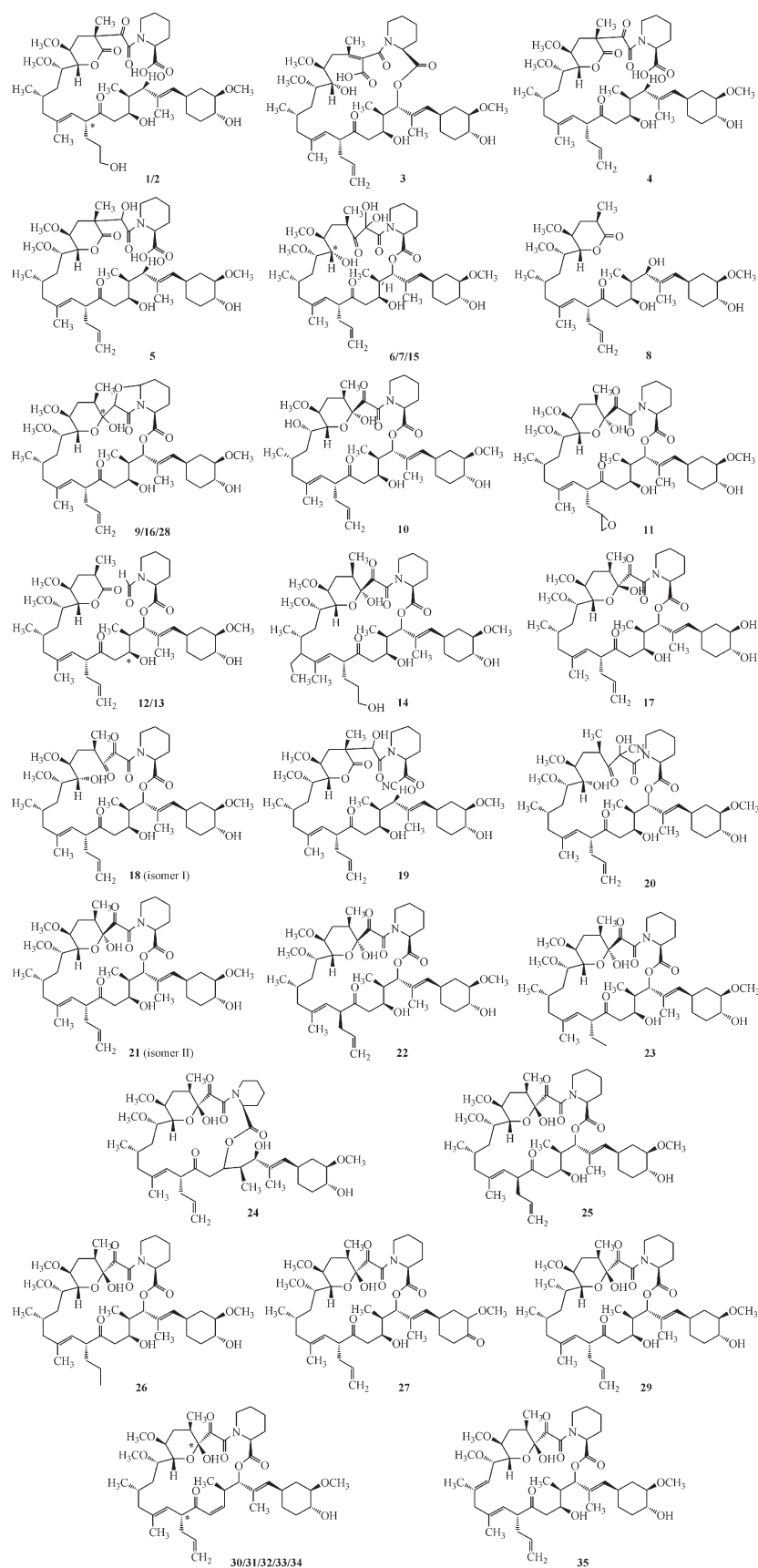


Figure 3 Chemical structures of the related substances (RS) 1–35 of tacrolimus

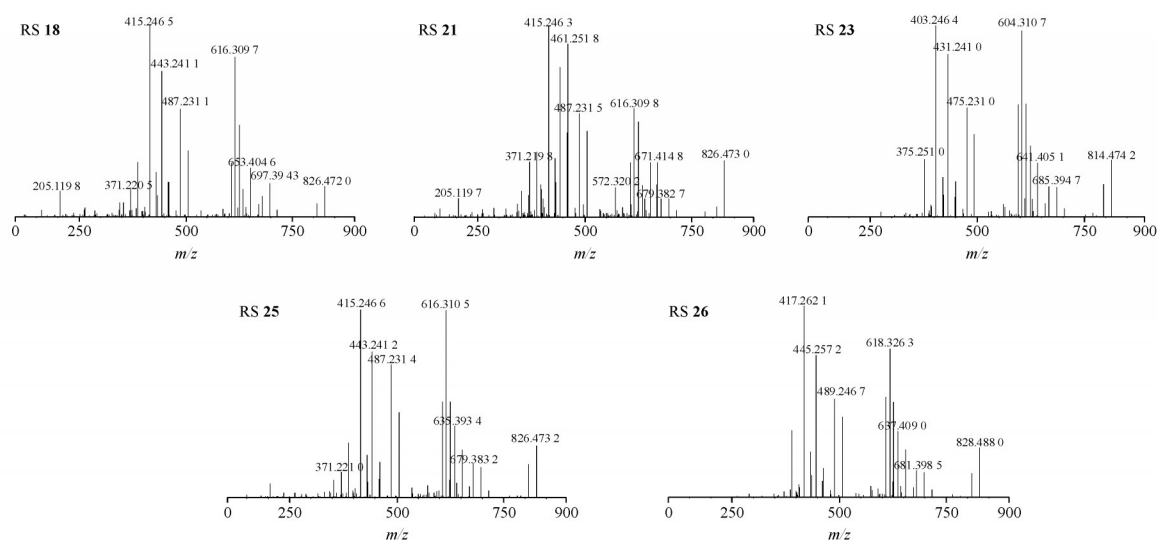


Figure 4 Q-TOF/MS spectrum of tacrolimus' impurity reference substance **18** (m/z 826), **21** (m/z 826), **23** (m/z 814), **25** (m/z 826) and **26** (m/z 828)

$\text{CO}_2 - \text{CO} \text{Na}]^+$, m/z 505.240.8 ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_9\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111)\text{Na}]^+$, m/z 487.229.7 ($\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{H}_2\text{O})\text{Na}]^+$, m/z 443.240.3 ($\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O})\text{Na}]^+$, m/z 415.245.7 ($\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CO})\text{Na}]^+$, m/z 387.250.8 ($\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}-2\text{CO})\text{Na}]^+$, 他克莫司的二级质谱图及推断裂解途径分别见图 5。可以看到他克莫司可以失去两个特征的碎片 m/z 111 和 m/z 210。特征碎片 m/z 111 (图 6) 与 2-甲酰哌啶-2-烯相对应, 在他克莫司、西罗莫司等断裂途径中都可以发现, 是归属于大环内酯类的一种特征碎裂方式, 特征碎片 m/z 210 的产生是由于羟基的孤对电子通过共价键转移, 羟基与反式氢发生消除脱水, 同时酯键发生水解, 酯键断裂 (图 7), 同样是大环内酯类他克莫司、西罗莫司的一种特征碎裂途径^[10]。

有关物质 **18**、**21** 它们的二级质谱特征碎片与他克莫司基本一致, 分别对应他克莫司的异构体 I 和 II^[6-7], 他克莫司在含水的溶剂中会发生异构体之间的相互转化 (图 8)。有关物质 **18** 与 **21** 的相对保留时间与 USP 所列出的异构体 I 和 II 相对保留时间一致, ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 **18** 与 **21** 的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 准确质荷比为 826.473.7 与他克莫司一致。图 8 中可以看到异构体 II 是由于他克莫司 19 位的羟基发生了差向异构, 而异构体 I 则是因为他克莫司 19 位为半缩醛结构, 结合 1 分子水后会开环形成醛和醇, 但异构体 I 结构上的胞二

醇结构并不稳定会自发脱去 1 分子水, 这也就解释了为什么有关物质 **18** 的相对分子质量并没有比他克莫司多 18。

有关物质 **23** 其结构为他克莫司 8 位的丙烯基变为了乙基, 相对分子质量比他克莫司少 12, 由于结构改变的位置位于他克莫司特征性失去碎片 (m/z 111 和 m/z 210) 之外, 故其二级质谱特征碎片 m/z 604.310.7 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_{10}\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210)\text{Na}]^+$, m/z 475.231.0 ($\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{H}_2\text{O})\text{Na}]^+$ 均相应地比他克莫司的碎片少 12。

有关物质 **25** 其结构为他克莫司 8 位的丙烯基构型发生了翻转, 相对分子质量与他克莫司相同, 不涉及特征性失去碎片 (m/z 111 和 m/z 210) 的改变, 故其二级质谱特征碎片 m/z 616.310.5 ($\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{NO}_{10}\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210)\text{Na}]^+$, m/z 487.231.4 ($\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{H}_2\text{O})\text{Na}]^+$ 与他克莫司相同。

有关物质 **26** 其结构为他克莫司 8 位的丙烯基变为了正丙基, 相对分子质量比他克莫司多 2, 由于结构改变的位置位于他克莫司特征性失去碎片 (m/z 111 和 m/z 210) 之外, 故其二级质谱特征碎片 m/z 618.326.3 ($\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{NO}_{10}\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210)\text{Na}]^+$, m/z 489.246.7 ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{Na}^+$) 对应 $[(\text{P}-210-111-\text{H}_2\text{O})\text{Na}]^+$ 均比他克莫司的碎片多 2。

3.2.2 未知有关物质的确证 通过有关物质 HPLC 定位及质谱特征, 以及未知有关物质的一级质谱母离子准确相对分子质量、二级质谱特征碎

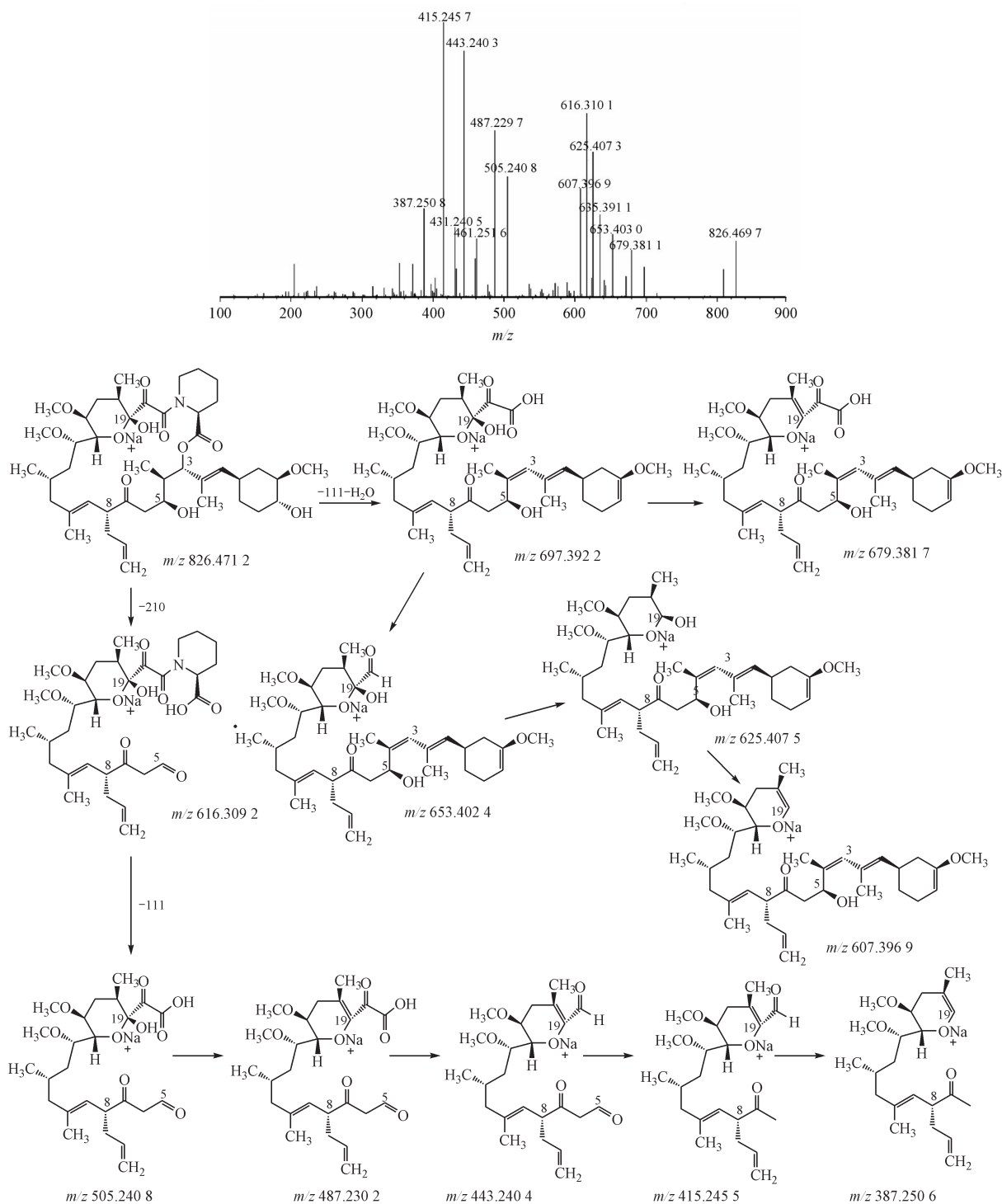


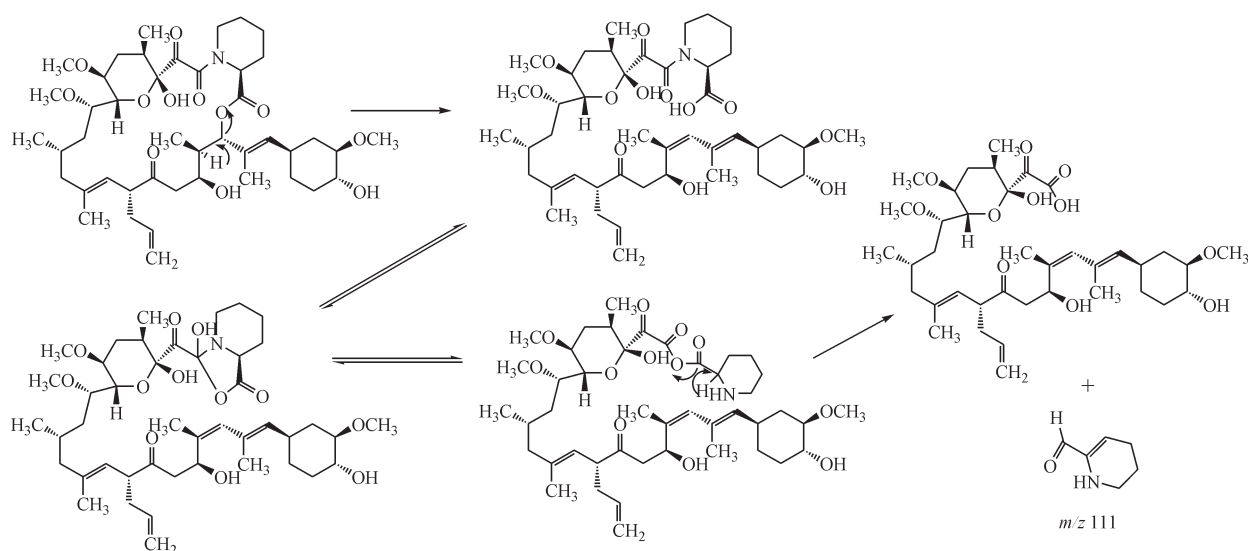
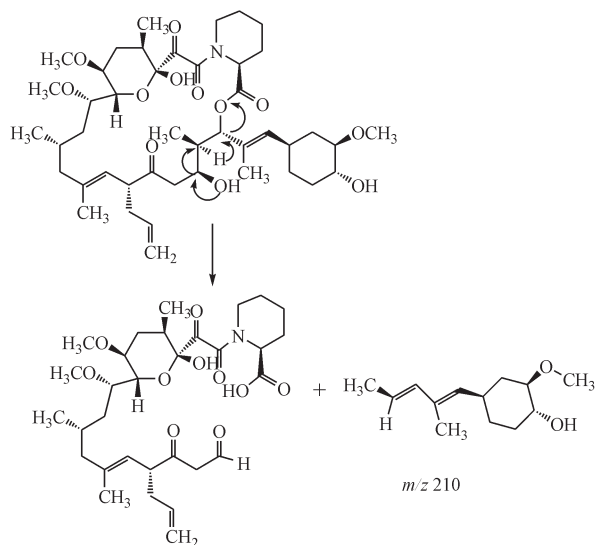
Figure 5 Q-TOF/MS spectrum of tacrolimus $[M + Na]^+$ (m/z 826) ion and its fragmentation pathways

片离子,结合他克莫司及已知有关物质裂解规律,对各未知有关物质进行综合分析鉴定其结构。根据结构将其大致分为以下几类:

(1)半缩醛结构重排成内酯

有关物质1、2、4、5、8、12、13、19保留时间相对

较弱而极性较大,且其二级质谱特征碎片(图9)均大致含有 m/z 659.4123 (641.4036)与离子式 $C_{36}H_{60}O_9Na^+$ ($C_{36}H_{58}O_8Na^+$) 相应、 m/z 449.2504 (431.2412)与离子式 $C_{23}H_{38}O_7Na^+$ ($C_{23}H_{36}O_6Na^+$) 相应、 m/z 421.2549与离子式 $C_{22}H_{38}O_6Na^+$ 相应、 m/z

Figure 6 Formation reaction of fragment m/z 111Figure 7 Formation reaction of fragment m/z 210

403.245 9 与离子式 $C_{22}H_{36}O_5Na^+$ 相应。由特征碎片可以看出上述所列有关物质的特征碎片 m/z 659.412 3(641.403 6) 和 m/z 449.250 4(431.241 2) 相差 210, 也就是可以失去他克莫司 m/z 210 的特

征碎片, m/z 111 的碎片并未产生, 参考 TLC 已记录的他克莫司杂质对照品结构^[11], 又结合它们的保留特性及产生的条件推测这几个杂质共有的特点为半缩醛结构处重排为内酯。

有关物质 12/13 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 12 和 13 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比分别为 798.479 7 与 798.480 0, 均与离子式 $C_{43}H_{69}NO_{11}Na^+$ 相应, m/z 比他克莫司少 28 对应 CO, 结合其碎片特征以及与文献已知杂质比较, 推测在光照条件下, 半缩醛结构开环后重排为内酯, 在此过程中母核可能发生结构反转, 故保留不同, 形成有关物质 12/13。

有关物质 5 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 5 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 844.485 0, 与离子式 $C_{44}H_{71}NO_{13}Na^+$ 相应, m/z 比他克莫司多 18, 元素组成多 H_2O 。有关物质 5 在酸碱降解条件下产生, 保留时间相对较弱, 故推测有关物质 5 是由于他克莫司在酸碱加热的条件下酯键水解同时半缩醛结构处重排为内酯, 其仅可以失去 m/z 210 的特征碎片并

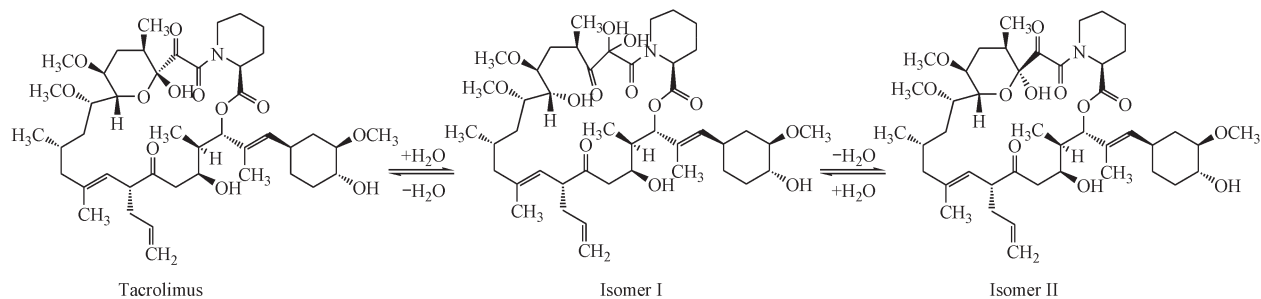


Figure 8 Chemical structure of tacrolimus and its isomers

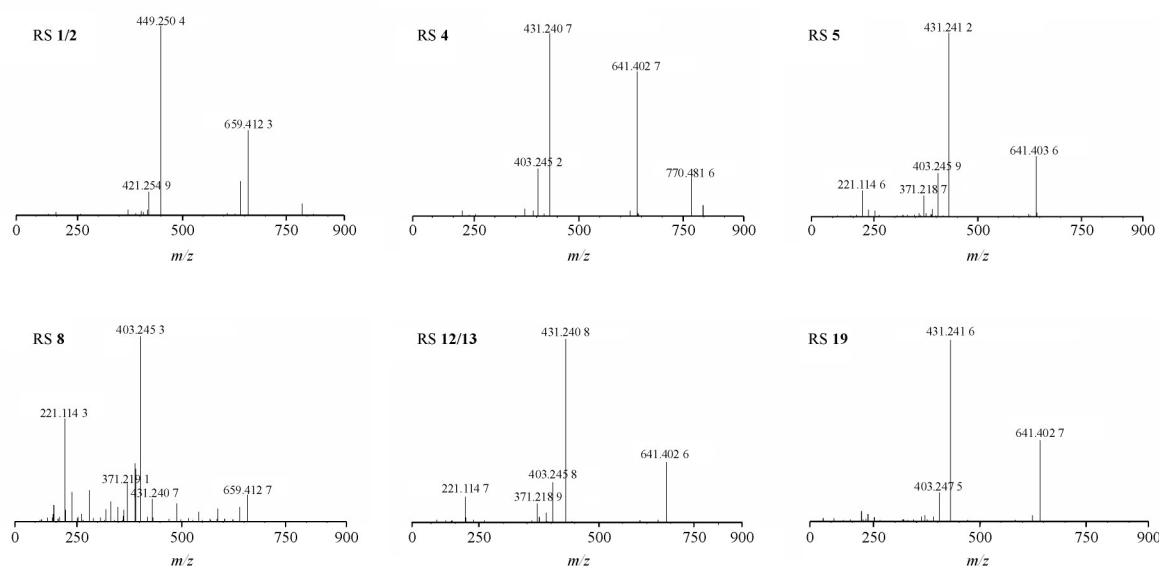


Figure 9 Q-TOF/MS spectrum of RS 1/2, 4, 5, 8, 12/13, 19 $[M+Na]^+$ ion

未失去 m/z 111, 是因为半缩醛结构重排为内酯后 18 位键更容易断裂失去 $185 + H_2O$ 后产生 m/z 641. 401 7 的碎片, 分子式组成与 Q-TOF 生成分子式一致。

有关物质 8 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 8 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 659. 416 4, 与离子式 $C_{36}H_{60}O_9Na^+$ 相应, 恰比有关物质 5 的碎片 m/z 641. 403 6 多 18 对应 H_2O , 当此碎片支链上羟基不脱去时为有关物质 8。为他克莫司在碱降解条件下产生。

有关物质 4 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 4 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 842. 470 0, 与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{13}Na^+$ 相应, 质荷比比有关物质 5 少 2, 元素组成少 H_2 。有关物质 4 在氧化降解条件下产生, 故推测其结构为他克莫司酯键水解以及半缩醛结构重排为内酯后酰胺键连接的羟基被氧化为了羰基。

有关物质 1/2 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 1 和 2 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比分别为 860. 479 3 与 860. 479 0, 均与离子式 $C_{44}H_{71}NO_{14}Na^+$ 相应, 质荷比比有关物质 4 多 18, 元素组成多 H_2O , 且其碎片离子也相应比有关物质 4 多 18 对应 H_2O , 又因为它们是在氧化降解下产生, 故推测其与有关物质 4 有类似的结构, 当他克莫司酯键水解以及半缩醛结构重排为内酯后酰胺键连接的羟基被氧化为羰基继而 8 位丙烯基的烯键被氧化为羟基, 生成有关物质 1/2。

在此过程中母核可能发生结构反转, 故保留不同。

有关物质 19 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 19 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 853. 484 5, 与离子式 $C_{45}H_{70}N_2O_{12}Na^+$ 相应, 有关物质 19 质荷比比他克莫司多 27, 元素组成多 HCN。其与有关物质 5 具有相同的二级质谱特征碎片, 有关物质 19 在酸降解条件下产生, 由于酸降解溶液为乙腈水溶液, 故推测其结构为他克莫司酯键水解以及半缩醛重排为内酯后哌啶环上的羧基的羟基被腈基取代。

以上结构以有关物质 5 为例进行解析, 质谱裂解均得到合理归属(图 10)。

(2) 半缩醛结构开环

有关物质 6、7、15 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比分别为 844. 485 2、844. 485 2、844. 485 0, 均与离子式 $C_{44}H_{71}NO_{13}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司多 18 对应 H_2O , 观察其二级质谱特征碎片(图 11)可以发现它们 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-111)Na]^+$ 的相关碎片与他克莫司的一致, 结合有关物质 6、7、15 在酸降解条件下产生且保留较弱, 极性较大, 推测有关物质 6、7、15 对应他克莫司异构体 I 胞二醇结构, 在酸性加热条件下, 半缩醛结构结合 1 分子水开环形成醛和醇, 在此过程中母核可能发生构型翻转, 因此存在立体异构, 故有关物质 6、7、15 保留时间不同。

有关物质 20 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得有关物质 20 的 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 853. 484 5, 与离子式

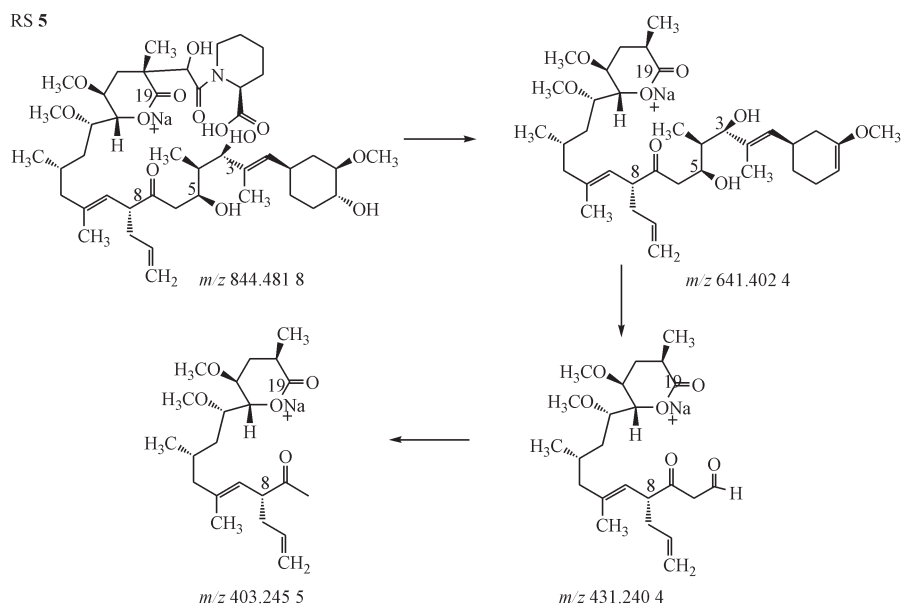
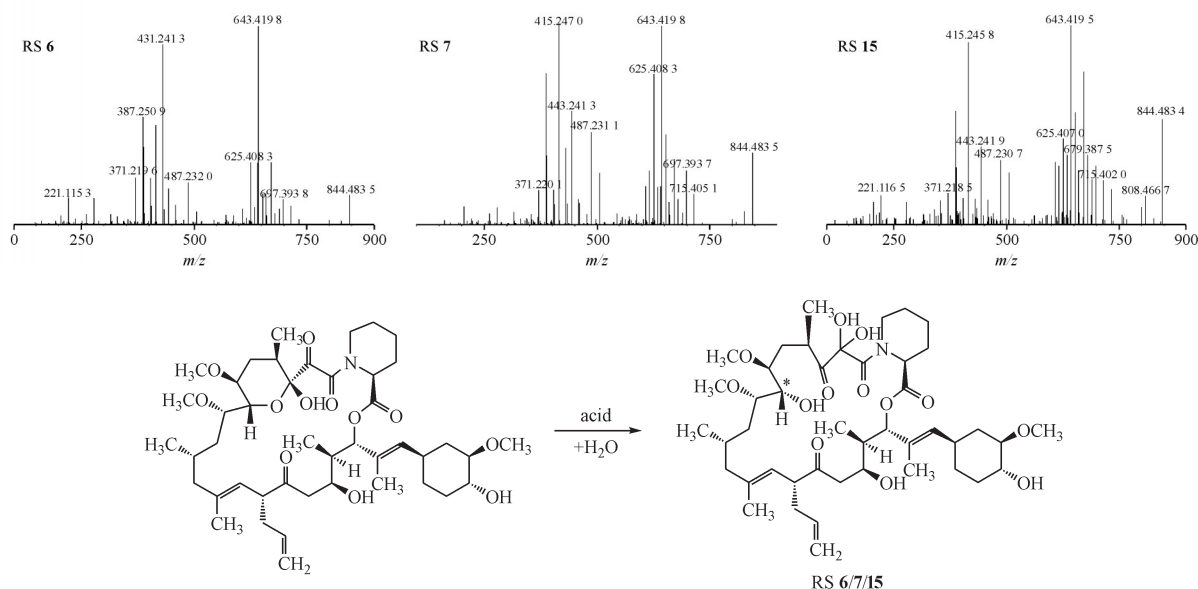


Figure 10 Fragmentation pathway of RS 5

Figure 11 Q-TOF/MS spectrum of RS 6, 7, 15 $[M+Na]^+$ ion and their formation reaction

$C_{45}H_{70}N_2O_{12}Na^+$ 相应,有关物质 20 质荷比比他克莫司多 27,元素组成多 HCN。其主要特征碎片(图 12)除了 m/z 641.402 4、 m/z 431.240 3、 m/z 403.245 5,还产生了 m/z 742.410 3($C_{39}H_{61}NO_{11}Na^+$)对应[(P-111)Na] $^+$ 、 m/z 532.251 6($C_{26}H_{39}NO_9Na^+$)对应[(P-111-210)Na] $^+$,故有关物质 20 除具有与有关物质 5 相似的裂解途径,还可以失去 m/z 111 和 m/z 210 的特征碎片,且特征碎片离子均比他克莫司的多 27,故推测有关物质 20 为他克莫司在酸

降解条件下,由于溶液为乙腈水溶液,半缩醛结构开环后 20 位羰基活性较强发生加成反应上去腈基。除酰胺键较易断裂产生 P-111 的碎片,其 19 位和 20 位之间的键也较易断裂产生 641.402 4 的碎片。

(3) 5 位羟基失水成双键

有关物质 30、31、32、33、34 ESI $^+$ -Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比分别为 808.464 1、808.464 1、808.463 9、808.463 5、808.463 0,均与离子式 $C_{44}H_{67}NO_{11}Na^+$ 相应,质荷比比他克莫司少

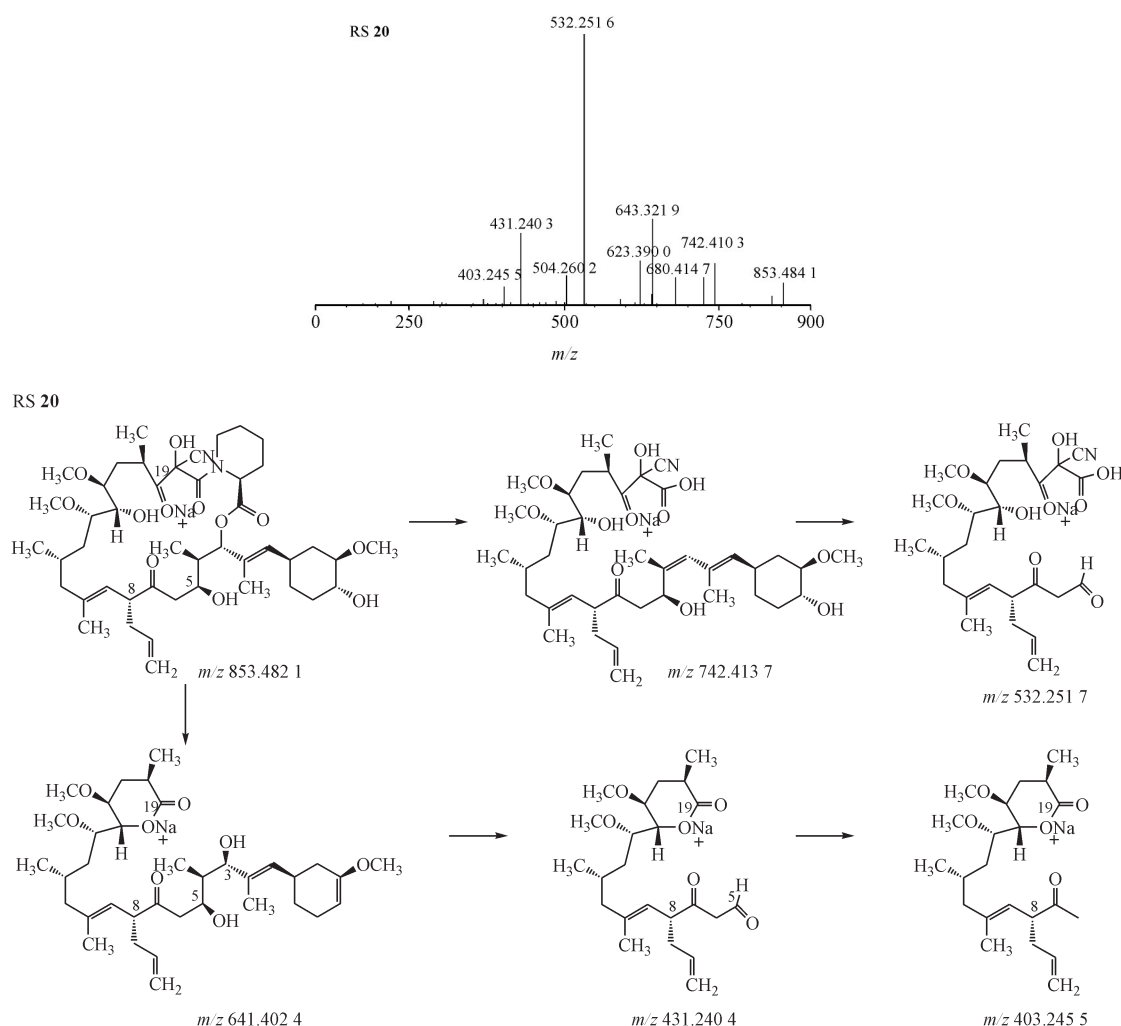


Figure 12 Q-TOF/MS spectrum of RS 20 $[M+Na]^+$ ion and its fragmentation pathway

18 对应 H_2O , 观察其二级质谱特征碎片(图 13)仅可以产生与 m/z 111 相关的碎片, 由于特征碎片 m/z 210 的产生是由于 5 位羟基的孤对电子通过共价键转移, 羟基与反式氢发生消除脱水, 同时酯键发生水解有关。5 个杂质对应的离子式以及主要特征碎片离子一致, 故有关物质 30、31、32、33、34 为他克莫司 5 位羟基脱水在 5、6 位(7 位羰基的存在使 6 位的氢更易与羟基脱水失去)形成双键使 m/z 210 的碎片无法失去, 在此过程中母核可能发生构型翻转, 因此产生多种立体结构, 5 个杂质的具体构型无法确定。他克莫司在酸降解条件下主要产生这些杂质, 发酵过程工艺中以及高温湿法降解条件下也产生杂质 31。

(4) 特征碎片(失去)210 上的修饰

他克莫司归属大环内酯类, 可以失去 m/z 111

和 m/z 210 的特征碎片, 产生相应的特征碎片离子, 观察有关物质 17、27 二级质谱特征碎片(图 14)发现其可以产生 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-111)Na]^+$ 、 $[(P-210)Na]^+$ 的系列特征碎片, $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-210)Na]^+$ 的系列特征碎片与他克莫司的特征碎片相一致, 但 $[(P-111)Na]^+$ 系列碎片和他克莫司的特征碎片相差质荷比恰为母离子相差的质荷比, 故推测结构的改变位置位于 210 部分。

有关物质 17 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 812.4577, 与离子式 $C_{43}H_{67}NO_{12}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司少 14 对应 CH_2 , 观察其二级质谱特征碎片可以发现它与 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-210)Na]^+$ 相关的碎片与他克莫司的一致, 但 $[(P-111)Na]^+$ 相关碎片均比他克莫司的对应少 14

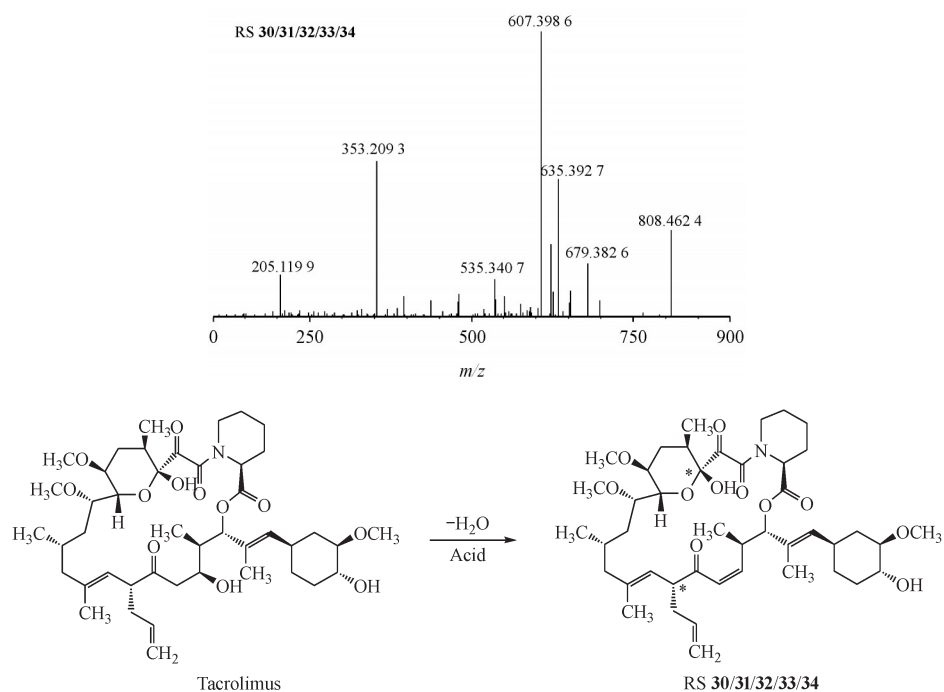


Figure 13 Q-TOF/MS spectrum of RS 30, 31, 32, 33, 34 $[M+Na]^+$ ion and their formation reaction

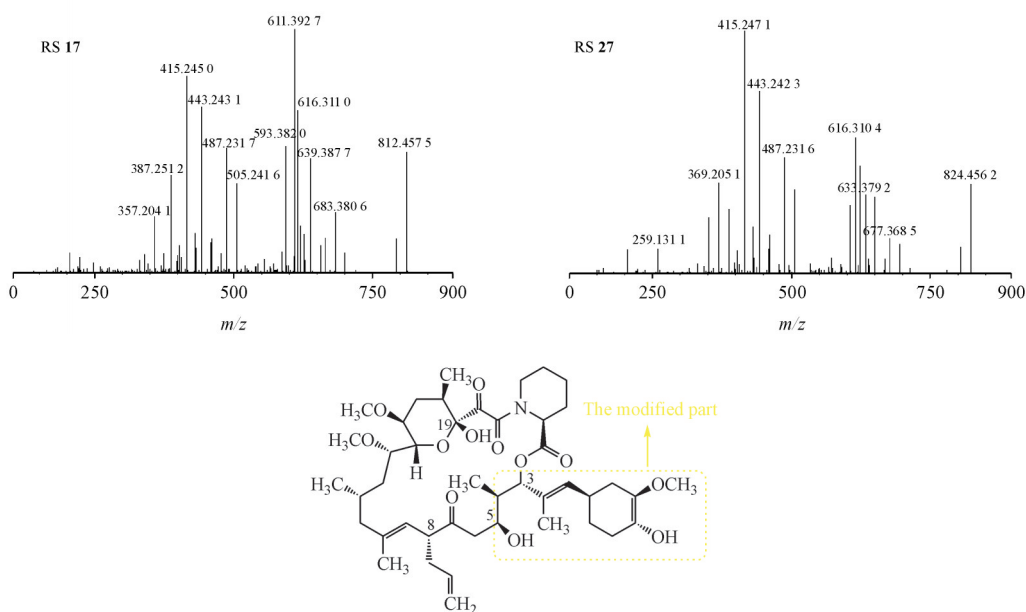


Figure 14 Q-TOF/MS spectrum of RS 17, 27 $[M+Na]^+$ ion and their formation mechanism

对应 CH_2 , 故推测有关物质 **17** 为他克莫司 210 结构部分六元环上甲氧基甲基丢失。他克莫司在高温条件下以及发酵工艺中主要产生此杂质。

有关物质 **27** ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 824.459 2, 与离子式 $C_{44}H_{67}NO_{12}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司少 2 对应 H_2 , 观察其二级

质谱特征碎片可以发现它与 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-210)Na]^+$ 相关的碎片与他克莫司的一致, 但 $[(P-111)Na]^+$ 相关碎片均比他克莫司的对应少 2 对应 H_2 , 故推测有关物质 **27** 为他克莫司在高温条件下 210 结构部分六元环羟基被氧化为羰基。

(5) 特征性碎片之外的修饰

观察有关物质 **10**、**11**、**14**、**29**、**35** 二级质谱特征碎片, 发现其可以产生与 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 $[(P-111)Na]^+$ 、 $[(P-210)Na]^+$ 相关的系列特征碎片, 但

这些特征碎片与他克莫司的特征碎片相差质荷比为母离子相差的质荷比, 故推测结构的改变位置位于 111 和 210 结构部分之外(图 15)。

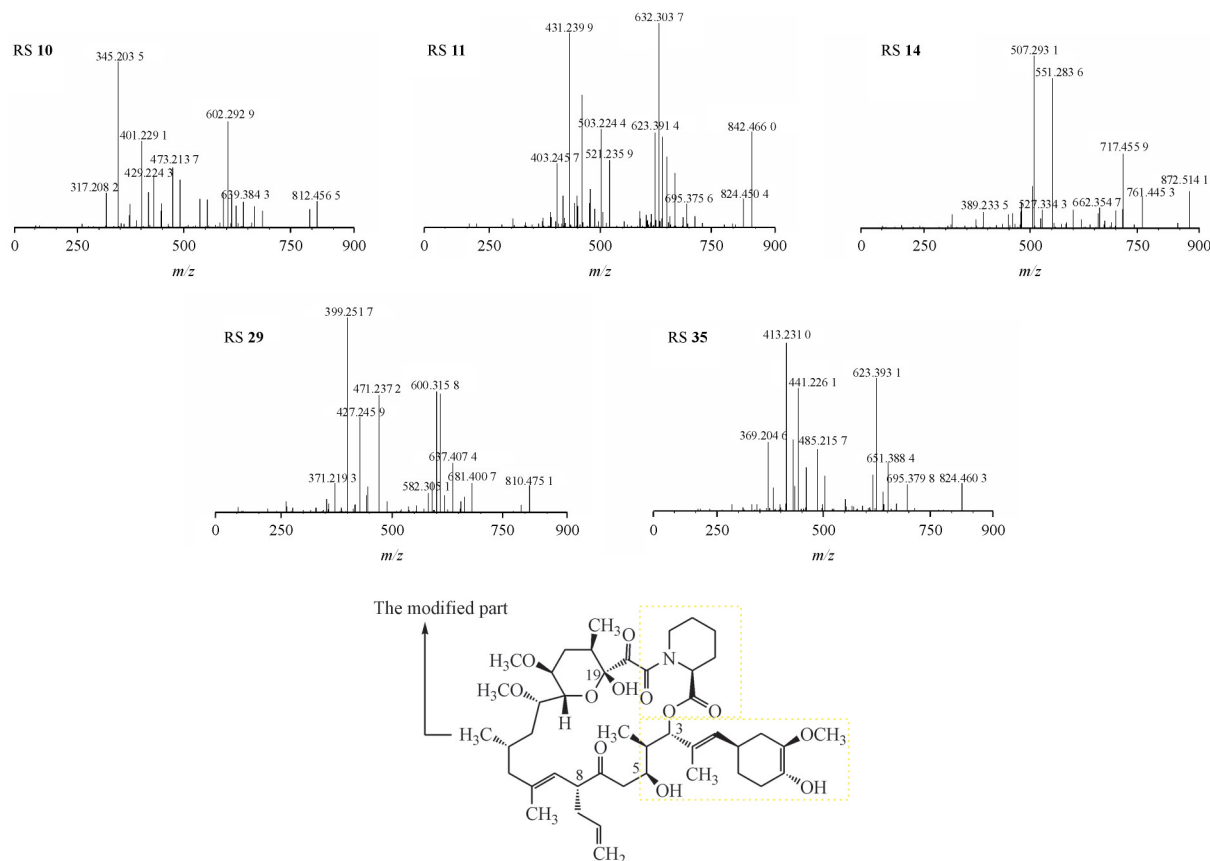


Figure 15 Q-TOF/MS spectrum of RS **10**, **11**, **14**, **29**, **35** $[M+Na]^+$ ion and their formation mechanism

有关物质 **10** ESI⁺-Q-TOF/MS测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 812.459 2, 与离子式 $C_{43}H_{67}NO_{12}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司少 14 对应 CH_2 , 其所有特征性碎片均比他克莫司的对应少 14, 与文献已知杂质比较, 又其保留偏弱, 故推测有关物质 **10** 为他克莫司异构体 II 在高温条件下失去 14 位的氧甲基变为羟基。

有关物质 **11** ESI⁺-Q-TOF/MS测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 842.470 0, 与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{13}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司多 16 对应 O, 其所有特征性碎片均比他克莫司的对应多 16, 故推测为他克莫司在高温条件下 8 位丙烯基的双键被氧化为环氧基。

有关物质 **14** ESI⁺-Q-TOF/MS测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 872.515 8, 与离子式 $C_{46}H_{75}NO_{13}Na^+$

相应, 质荷比比他克莫司多 46 对应 C_2H_6O , 其主要特征碎片 m/z 551.283 6 ($C_{27}H_{44}O_{10}Na^+$) 对应 $[(P-111-210)Na]^+$ 、 m/z 761.445 3 ($C_{40}H_{66}O_{12}Na^+$) 对应 $[(P-111)Na]^+$ 、 m/z 662.354 7 ($C_{33}H_{53}NO_{11}Na^+$) 对应 $[(P-210)Na]^+$ 相关的特征碎片均对应比他克莫司多 46, 保留较弱, 故推测为他克莫司异构体 II 的 11 位上去乙基同时 8 位的丙烯基双键被氧化为羟基, 为发酵工艺中产生。

有关物质 **29** ESI⁺-Q-TOF/MS测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 810.479 1, 与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{11}Na^+$ 相应, 质荷比比他克莫司少 16 对应 O, 其所有特征性碎片均比他克莫司的对应少 16, 推测为他克莫司 14 位甲氧基变为甲基, 为发酵工艺中产生。

有关物质 **35** ESI⁺-Q-TOF/MS测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 824.459 0, 与离子式 $C_{44}H_{67}NO_{12}Na^+$

相应,质荷比比他克莫司少 2 对应 H_2 ,其所有特征性碎片均比他克莫司的对应少 2,推测为他克莫司在高温条件下 12、13 位脱氢生成双键。

(6) 他克莫司立体异构体

有关物质 **22** ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 826.473 7,与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{12}Na^+$ 相应,质荷比、特征碎片离子(图 16)以及离子式与他克莫司完全相同,为他克莫司发酵工艺中产生,根据其相对保留时间推测为他克莫司异构体 II 8 位丙烯基发生了异构化。

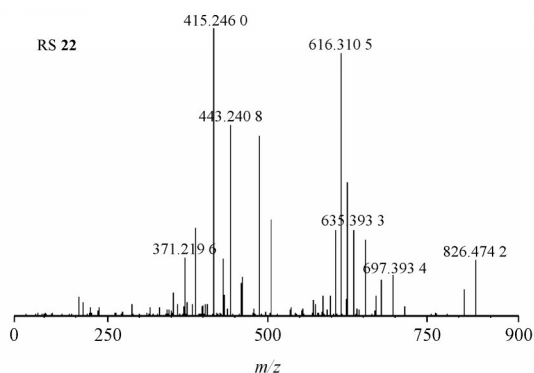


Figure 16 Q-TOF/MS spectrum of RS 22 $[M+Na]^+$ ion

(7) 其他

有关物质 **3** ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 826.473 1,与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{12}Na^+$ 相应,质荷比以及离子式与他克莫司完全相同,为他克莫司发酵工艺中产生,观察其二级质谱特征碎片(图 17),782.481 4($C_{43}H_{69}NO_{10}Na^+$)对应 $[(P-CO_2)Na]^+$ 、738.494 3($C_{42}H_{69}NO_8Na^+$)对应 $[(P-2CO_2)Na]^+$ 可以连续失去两个 CO_2 ,616.309 7($C_{31}H_{47}NO_{10}Na^+$)对应 $[(P-210)Na]^+$,可以失去他克莫司特征性失去的碎片 210,572.320 9($C_{30}H_{47}NO_8Na^+$)对应 $[(P-210-CO_2)Na]^+$,528.330 8($C_{29}H_{47}NO_6Na^+$)对应 $[(P-210-2CO_2)Na]^+$,有关物质 **3** 在失去 210

的碎片后可以继续失去两分子 CO_2 ,故可知有关物质 **3** 结构中存在两处羧基或可以生成羧基的内酯结构^[12],又有关物质 **3** 保留比较靠前,在他克莫司碱降解条件下或者发酵过程中存在,推测与 TLC 记录的杂质他克莫司羟基酸有着类似结构^[11],故可以先脱掉酯键水解后哌啶环上的羧基又可以继续脱掉 19 位羧基继而再失去 1 分子 CO_2 。

有关物质 **24** ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比为 826.474 9,与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{12}Na^+$ 相应,其二级质谱特征碎片如图 17,有关物质 **24** 可以产生 m/z 653.404 5、 m/z 635.395 5、 m/z 625.408 9、 m/z 607.400 0 等有 P-111 相关的碎片,与 P-210 相关的碎片没有或峰度很低,但存在 m/z 499.266 7($C_{27}H_{40}O_7$)、427.281 9($C_{25}H_{40}O_4$),猜测生成 m/z 210 碎片断键处存在结构的改变,又根据其 P-111 之外的碎片离子以及文献已知杂质,推测有关物质 **24** 是他克莫司在高温条件下内酯处发生了重排,内酯处羟基由 3 位异位到 5 位。

有关物质 **9**、**16**、**28** 有关物质 **9**、**16**、**28** 均为他克莫司在光照条件下产生,ESI⁺-Q-TOF/MS 测得其 $[M+Na]^+$ 准确质荷比均为 826.475 3,与离子式 $C_{44}H_{69}NO_{12}Na^+$ 相应,其二级质谱特征碎片(图 17),可以产生 m/z 616.309 3($C_{31}H_{47}NO_{10}Na^+$)对应 $[(P-210)Na]^+$ 的特征碎片,碎片信息显示没有失去与哌啶环相关的碎片,Q-TOF 生成分子式更是显示所有的特征碎片均含有 N 原子,故推测在光照条件下,他克莫司酰胺键处发生了一些结构的改变从而使酰胺键不易断裂。有关物质 **9**、**16**、**28** 与他克莫司分子式以及相对分子质量完全一致,又结合文献已知杂质,得出酰胺键处结构重排为内酰胺,从而使酰胺键处变得很稳定不易开裂。在这个过程中母核可能存在结构翻转,故有关物质 **9**、**16**、**28** 保留时间不同。

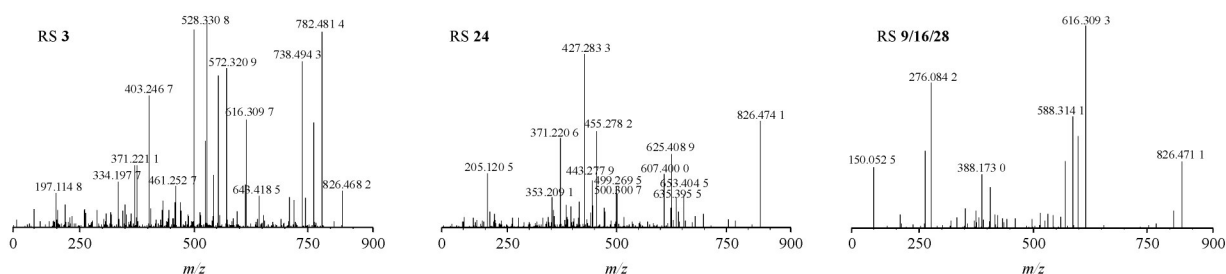


Figure 17 Q-TOF/MS spectrum of RS 3, 24, 9, 16, 28 $[M+Na]^+$ ion

4 讨论

在建立的挥发性流动相色谱-质谱联用条件下,他克莫司与各有关物质得到了有效的分离,共检测到35个有关物质;其中2个为他克莫司的互变异构体(美国药典规定为他克莫司的有效成分),3个已知杂质。对这些有关物质进行了结构鉴定,对发酵工艺质量控制、评估药物内在稳定性及储存条件具有一定意义^[13]。

他克莫司有关物质的产生途径见图18。他克莫司在发酵工艺中产生了10个有关物质(有关物质3、14、17、21、22、23、25、26、29、31);原料药中检测到1个有关物质21(他克莫司异构体II),含量未超过《中华人民共和国药典》规定的限度。

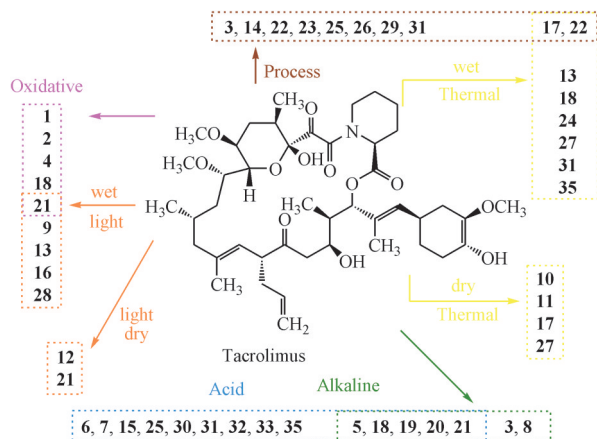


Figure 18 Generation of main RSs of tacrolimus

强制降解实验表明,他克莫司在酸碱氧化降解等含有水的溶液中,异构体的转化率增高,同时在酸碱氧化加热的条件下易发生酯键之间的断裂与半缩醛结构的开环重排(有关物质1、2、4、5、8、12、13、19、20);他克莫司在溶液状态时在光照及高温条件下不稳定,在光照条件下较易产生重排(有关物质9、16、28),在高温条件下较易发生去甲基(有关物质17)支链氧化(有关物质27)以及脱氢脱水反应(有关物质31、35)。从杂质解析结果可知,无论是发酵过程还是外加条件的降解,他克莫司内酯以及19位半缩醛结构处活性较强,较易发生结构的改变,他克莫司需避免潮湿,在密封干燥处保存。

References

- [1] Schutte-Nutgen K, Tholking G, Suwelack B, et al. Tacrolimus-pharmacokinetic considerations for clinicians [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, **19**(4):342-350.
- [2] Kropeit D, von Richter O, Stoberneck HP, et al. Pharmacokinetics and safety of letermovir coadministered with cyclosporine A or tacrolimus in healthy subjects [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2018, **7**(1):9-21.
- [3] Wang LP, Ma KF, Yao Y, et al. Carcinogenicity risk associated with tacrolimus use in kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Transl Androl Urol*, 2022, **11**(3):358-366.
- [4] Mok CC. Calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2017, **31**(3):429-438.
- [5] Tian JR, Luo YE, Wu HJ, et al. Risk of adverse events from different drugs for SLE: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Lupus Sci Med*, 2018, **5**(1):e000253.
- [6] Li GQ, Zeng S. Determination of related substances of tacrolimus by HPLC with gradient elution [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2008, **43**(7):551-553, 558.
- [7] 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.
- [8] Liu HP, Ma P, Li PF, et al. Domestic and imported tacrolimus capsules in healthy human body Pharmacokinetics and bioequivalence [J]. *Chin J Pharm Clin Rem* (中国药物与临床), 2008, **8**(1):65-66.
- [9] Mohanty L, Bhushan S, Rüttger B. Bioequivalence of two tacrolimus 1-mg formulations under fasting conditions in healthy subjects: a randomized, two-period crossover trial [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2020, **58**(3):183-193.
- [10] Lhoëst G, Hertsens R, Verbeeck RK, et al. In vitro immunosuppressive activity of tacrolimus dihydrodiol precursors obtained by chemical oxidation and identification of a new metabolite of SDZ-RAD by electrospray and electrospray-linked scan mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2001, **36**(8):889-901.
- [11] TLC Tacrolimus related substance reference materials [EB/OL]. (2022-02-21) [2022-02-22]. <http://www.tlcstandards.com/ProductsSearchList.aspx?key=tacrolimus>.
- [12] Chen YX, Xie Y, Wen YM, et al. Study on the fragmentation pathway of tacrolimus and ascomycin by ESI MSⁿ under negative mode [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2011, **36**(1):25-29.
- [13] Ni YL, Han X, Song M, et al. Identification of the related substances of cyclosporin A by LC-MS techniques [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(4):423-437.