

氢溴酸沃替西汀有关物质的色谱-质谱结构鉴定

王璐, 吴晓, 王叶, 梁方梅, 杭太俊, 宋敏*

(中国药科大学药物分析系, 江苏 南京 210009)

摘要: 为了研究氢溴酸沃替西汀原料药中的有关物质, 本研究采用 Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以乙腈-甲酸铵缓冲液为流动相梯度洗脱分离出 6 个主要有关物质, 结合电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱法 (ESI-Q-TOF/MS) 测定 5 个有关物质的母离子及碎片离子的准确质量和元素组成, 大气压化学电离飞行时间质谱法 (APCI-TOF/MS) 测定 1 个有关物质的准确分子质量, 三重四级杆串联质谱 (MS/MS) 测定其二级碎片离子特征。在所建立的条件下, 氢溴酸沃替西汀及其有关物质分离良好, 首次检测并鉴定出了 6 个主要有关物质, 为氢溴酸沃替西汀的工艺优化和质量控制提供了参考依据。

关键词: 氢溴酸沃替西汀; 有关物质; 结构鉴定; 色谱-质谱联用

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1351-06

Identification of the related substances of vortioxetine hydrobromide by LC-MS techniques

WANG Lu, WU Xiao, WANG Ye, LIANG Fang-mei, HANG Tai-jun, SONG Min*

(Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The study was aimed to identify the related substances of vortioxetine hydrobromide by hyphenated techniques. The separation of the six related substances was performed on a Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) by linear gradient elution of acetonitrile and ammonium formate solution. Electrospray and atmospheric pressure chemical ionization were interfaced respectively with high resolution Q-TOF/MS for the determination of the accurate mass and elemental composition of the parent ions of the related substances, and triple quadrupole tandem mass was employed for the product mass spectra determination. The structures of the related substances were identified through elucidation of the fragment ions. Vortioxetine hydrobromide and its related substances were adequately separated under the established HPLC conditions. Six major related substances were detected and identified for the first time. The data provides a reference for optimization of the synthetic process and quality assurance of vortioxetine hydrobromide.

Key words: vortioxetine hydrobromide; related substances; structure identification; HPLC-MS

氢溴酸沃替西汀 {1-[2-(2,4-甲基苯硫基)苯基]哌嗪氢溴酸盐, vortioxetine hydrobromide, 图 1}, 商品名为 Brintellix, 是由丹麦 Lundbeck 公司联合日本 Takeda 公司研发并与 2013 年 9 月被美国 FDA 批准用于治疗重度抑郁症 (MDD) 的药物, 其主要通过

增加中枢神经系统 (CNS) 的 5-羟色胺 (5-HT) 浓度发挥抗抑郁作用^[1-4]。多项临床试验表明本品对于治疗 MDD 有较好的有效性、安全性和耐受性^[5]。目前该药物尚未在中国上市, 且各国药典均未收载该品种, 而关于氢溴酸沃替西汀的质量研究与药代动力学研究已有文献^[6-10]报道, 但对其有关物质的研究仅停留在工艺杂质方面^[9, 10], 尚未见对其降解杂质进行全面分析鉴定的报道。

收稿日期: 2018-03-10; 修回日期: 2018-05-04.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271090, E-mail: cqsongmin@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0210

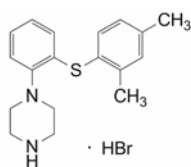


Figure 1 Chemical structure of vortioxetine hydrobromide

色谱-质谱联用技术^[11,12]为药物微量有关物质鉴定的有效技术,本研究建立了适用于氢溴酸沃替西汀有关物质检查和鉴定的色谱-质谱联用分析方法,通过 Q-TOF/MS 和 MS/MS 分别测定了主要有关物质的准确质量和二级质谱,首次检测并鉴定出了 6 个主要有关物质,可为氢溴酸沃替西汀生产工艺的优化和质量控制提供参考依据。

材料与方法

仪器 Agilent 1260 液相色谱-6520-四极杆-飞行时间串联质谱仪, Agilent Masshunter Qualitative Analysis 软件 (美国 Agilent 公司); Finnigan TSQ Quantum Ultra AM 型质谱仪, Xcalibur 3.0 数据处理系统 (美国 Finnigan 公司); BS 21S 分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

试药与试剂 氢溴酸沃替西汀 (批号: 2016072500, 上海瀚香生物科技有限公司); 甲酸铵、甲酸 (AR 级, 南京化学试剂有限公司); 乙腈 (CR 级, 美国 TEDIA 公司); 去离子水 (市售娃哈哈纯净水)。

色谱条件 采用 Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸铵缓冲溶液-乙腈-甲酸 (80 : 20 : 0.2); 流动相 B 为 0.1% 甲酸铵缓冲溶液-乙腈-甲酸 (20 : 80 : 0.2), 线性梯度洗脱: 0 min (100% A ~ 0% B) → 25 min (0% A ~ 100% B) → 30 min (0% A ~ 100% B) → 30.1 min (100% A ~ 0% B) → 35 min (100% A ~ 0% B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 226 nm, 进样量 40 μL。

质谱条件 电喷雾正或负离子化, 高分辨 Q-TOF/MS 测定, 喷雾电压 3.5 kV, 雾化氮气压力 275 kPa, 流量 10 L · min⁻¹, 温度 350 °C, 碎片电压 135 V, 碰撞能量 20 ~ 30 eV, 正离子模式下的参比离子 *m/z* 为 121.050 8 (质子化嘌呤, C₅H₅N₄⁺) 和 922.009 8 (质子化氟代磷嗪 HP-0921, C₁₈H₁₉O₆N₃P₃F₂₄⁺), 负离子模式下的参比离子 *m/z* 为 112.985 5 (三氟乙酸阴离子, C₂O₂F₃⁻) 和 1 033.988 1 (HP-0921 三氟乙酸阴离子加合物, C₂₀H₁₈O₈N₃P₃F₂₇⁻); 大气压化学电离负离

子化, TOF/MS 测定离子源温度为 400 °C, 电晕放电针电流为 4 μA, 离子源辅助雾化气为超纯氮气; 质量数扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 000。APCI-MS/MS 测定的电晕放电针电流 8 μA, 辅助气压力 10 kPa, 毛细管温度 350 °C, 二级质谱扫描碰撞氩气压力 0.16 Pa, 碰撞能量 30 ~ 40 eV。

供试品溶液 精密称取氢溴酸沃替西汀供试品约 5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度作为供试品溶液; 精密量取上述溶液适量, 加溶剂定量稀释, 分别配制成 1% 和 0.1% 的自身对照溶液。

强制降解实验溶液 取氢溴酸沃替西汀约 5 mg, 经 0.5 mL 4 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 90 °C 水浴放置 3 天, 0.5 mL 4 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 90 °C 水浴放置 3 天, 0.5 mL 30% 过氧化氢室温放置 10 min, 200 °C 烘箱放置 6 h, 或 0.5 mL 50% 甲醇溶解后光照 (4 500 lx) 放置 10 天, 分别处理, 然后加 50% 甲醇溶解(酸碱处理溶液先中和)并稀释至 10 mL, 配制成质量浓度约为 0.5 mg · mL⁻¹ 的强制降解实验溶液。同时进行空白溶剂实验。

结果

1 有关物质检查

氢溴酸沃替西汀供试品及其各强制降解溶液 HPLC 检查图谱见图 2, 采用自身 0.1% 对照法估算有关物质的含量。结果表明, 供试品中有关物质的含量均未超过 0.1%, 所以本品合成工艺中的起始物料、中间体和副产物等有关物质, 能够得到很好的控制^[9]。

强制降解实验结果表明, 本品对强酸、光照和氧化相对敏感, 生成了明显的特征降解产物, 其中含量超过 0.1% 的有 6 个, 按色谱峰保留时间顺序编号为 1 ~ 6。酸破坏条件下产生 6 个主要降解产物 (图 2d,

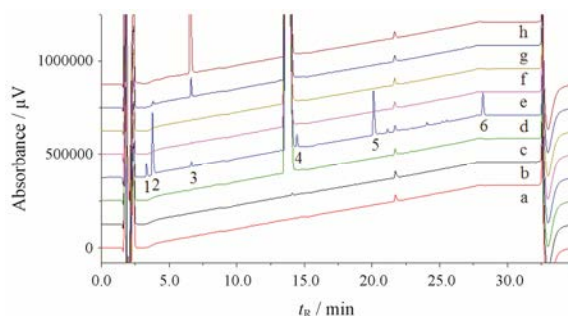


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of vortioxetine hydrobromide test and stressed solutions. a: Blank; b: 0.1% Reference solution; c: API; d: Acid; e: Alkaline; f: High temperature; g: Light; h: Oxidation. Peaks 1–6 represent six related substances

有关物质 1~6); 光照破坏产生 2 个降解产物 (图 2g, 有关物质 2、3); 氧化破坏条件下生成 1 个降解产物 (图 2h, 有关物质 3)。各有关物质与主峰分离良好。

2 有关物质的结构鉴定

采用 Q-TOF/MS 测得有关物质 1~5 母离子及碎片离子的准确质量和分子式; TOF/MS 测得有关物质 6 母离子的准确质量和分子式, 再经二级质谱测定碎片离子特征, 并通过与沃替西汀的质谱特征对比和有机化学反应机制分析, 推定各主要有关物质的结构 (表 1)。

2.1 沃替西汀 ESI⁺-Q-TOF/MS 测得沃替西汀 [M+H]⁺ 的准确质量为 299.157 4, 与离子式 C₁₈H₂₃N₂S⁺ 相应; 其主要特征碎片离子 *m/z* 为 256.1157 (C₁₆H₁₈NS⁺) 和 150.0363 (C₈H₈NS⁺) 等均由 [M+H]⁺ 离子中哌嗪开环断裂, 或脱去 2,4-二甲基苯硫基单元而产生 (图 3)。沃替西汀的二级质谱和裂解途径分析对解析确证其有关物质结构具有参考意义。

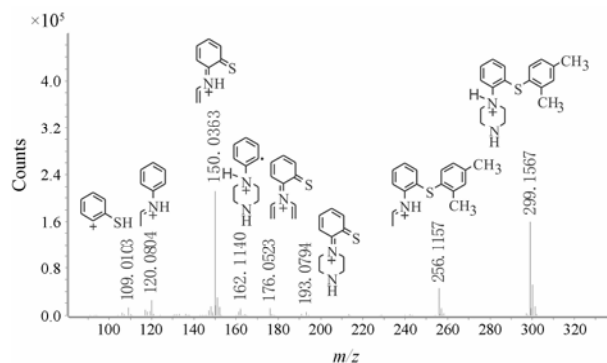


Figure 3 Q-TOF/MS spectrum of vortioxetine [M+H]⁺ (*m/z* 299) ion and its fragmentation pathways

2.2 有关物质 1 ESI⁻-Q-TOF/MS 测得有关物质 1 的 [M-H]⁻ 的准确质量为 185.027 7, 与离子式 C₈H₉O₃S⁻ 相应, 比沃替西汀结构中 2,4-二甲基苯硫酚质量数多 48, 与 3 个 O 相应; 其主要特征碎片离子 *m/z* 为 121.065 1 (C₈H₉O⁻) 和 79.957 0 (O₃S⁻)。有关物质 1 主要在酸破坏条件下产生, 与沃替西汀相比保留较弱, 极性较大, 且该有关物质仅在 ESI 负离子模式下有响应, 结合沃替西汀结构中存在硫醚键, 确证有关物质 1 是沃替西汀硫醚键被酸解氧化为磺酸而形成的水解产物^[13]。*m/z* 121.065 1 (C₈H₉O⁻) 和 79.957 0 (O₃S⁻) 分别是 [M-H]⁻ 脱 SO₂ 及形成磺酸游离基离子的特征碎片 (图 4)。

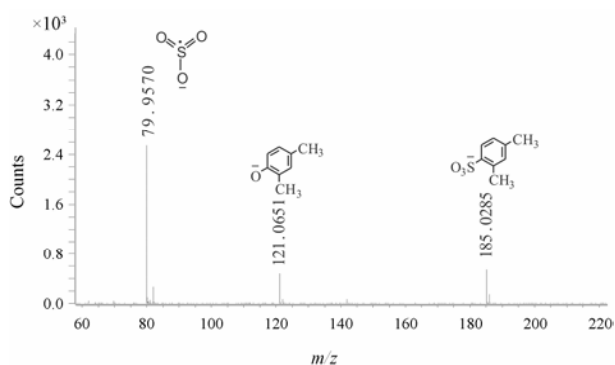
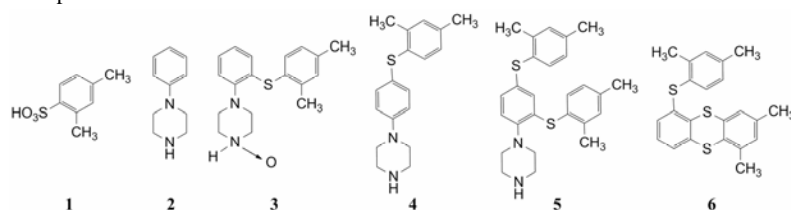


Figure 4 Q-TOF/MS spectrum of related substance 1 [M-H]⁻ (*m/z* 185) ion and its fragmentation pathways

2.3 有关物质 2 ESI⁺-Q-TOF-MS 测得有关物质 2 的 [M+H]⁺ 的准确质量为 163.122 9, 与离子式 C₁₀H₁₅N₂⁺ 相应, 比沃替西汀质量数少 136, 元素组成少 C₈H₈S, 与脱去 2,4-二甲基苯硫酚单元对应。有关物质 2 在酸

Table 1 Related substances identified in vortioxetine hydrobromide by HPLC-Q-TOF/MS. *The accurate molecular formula could not be confirmed due to the poor response

Compound	<i>t_R</i> /min	Ionization method	Parent ion (<i>m/z</i>)	Ion formula	Dif (ppm)	Product ion (<i>m/z</i>)	Origin
Vortioxetine	13.2	ESI ⁺	299.157 4	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ S ⁺	0.74	256, 193, 176, 162, 150, 120, 109	—
Impurity 1	3.2	ESI ⁻	185.027 7	C ₈ H ₉ O ₃ S ⁻	0.26	121, 80	Acid
2	3.6	ESI ⁺	163.122 9	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ ⁺	0.35	120, 118	Acid, light
3	6.3	ESI ⁺	315.152 3	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ OS ⁺	0.93	256, 242, 191, 148, 136, 120, 106	Acid, light, oxidation
4	13.9	ESI ⁺	299.157 4	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ S ⁺	0.77	256, 193, 176, 162, 150, 120, 109	Acid
5	19.5	ESI ⁺	435.192 1	C ₂₆ H ₃₁ N ₂ S ₂ ⁺	0.50	392, 349, 298, 286, 256, 242, 149, 119	Acid
6*	27.5	APCI ⁻	380.056 6	C ₂₂ H ₂₀ S ₃ ⁻	—	275	Acid



破坏和光照破坏条件下产生，保留时间相对较弱而极性较大。故推测有关物质 **2** 是沃替西汀硫醚键断裂后形成的 *N*-苯基哌嗪水解产物。其主要特征碎片离子 m/z 120.0804 ($C_8H_{10}N^+$) 和 118.0648 ($C_8H_8N^+$) 分别是 $[M+H]^+$ 哌嗪环 N_1-C_2 、 N_4-C_5 键断裂开环而产生的特征碎片 (图 5)。

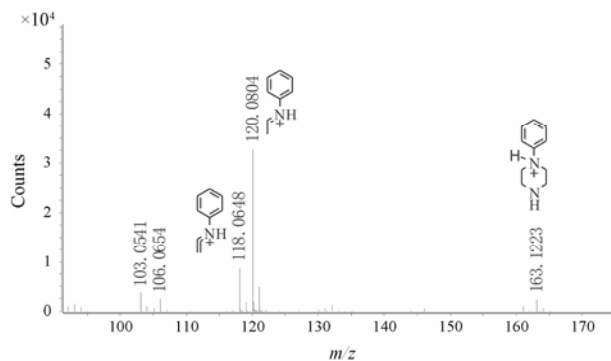


Figure 5 Q-TOF/MS spectrum of related substance **2** $[M+H]^+$ (m/z 163) ion and its fragmentation pathways

2.4 有关物质 3 ESI⁺-Q-TOF-MS 测得有关物质 **3** 的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 315.1523，与离子式 $C_{18}H_{23}N_2OS^+$ 相应，比沃替西汀质量数多 16，对应一个 O 原子； m/z 315.1523 提取离子流图呈双峰 (图 6)，表明沃替西汀一氧化物至少存在 2 种形式。有关物质 **3** 的 (图 7，峰 1) 主要特征碎片离子 m/z 为 191.0630 ($C_{10}H_{11}N_2S^+$) 和 148.0194 ($C_8H_6NS^+$)，比沃替西汀相应特征碎片离子质量数少 2，与沃替西汀的一氧化物脱去中性水分子的过程相应， m/z 242.0956 ($C_{15}H_{16}NS^+$) 是 $[M+H]^+$ 哌嗪环 N_1-C_2 、 C_5-C_6 键断裂开环而产生的特征碎片， m/z 136.0221 ($C_7H_6NS^+$) 是 $[M+H]^+$ 哌嗪环 N_1-C_2 、 C_5-C_6 键断裂开环并脱去 2,4-二甲基苯硫基单元而产生的特征碎片，而其他主要碎片离子与沃替西汀的均一致，说明有关物质 **3** 为哌嗪 4 位氮原子被氧化的产物。而提取离子流图中的另一氧化物则为 *S*-氧化物，该峰的主要特征碎片离子 (图 7，峰 2) m/z 为

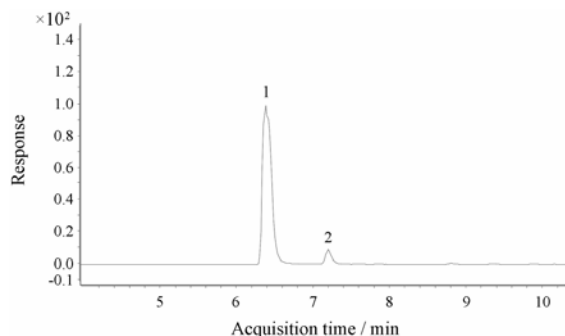


Figure 6 Extraction ion chromatogram of m/z 315.1523

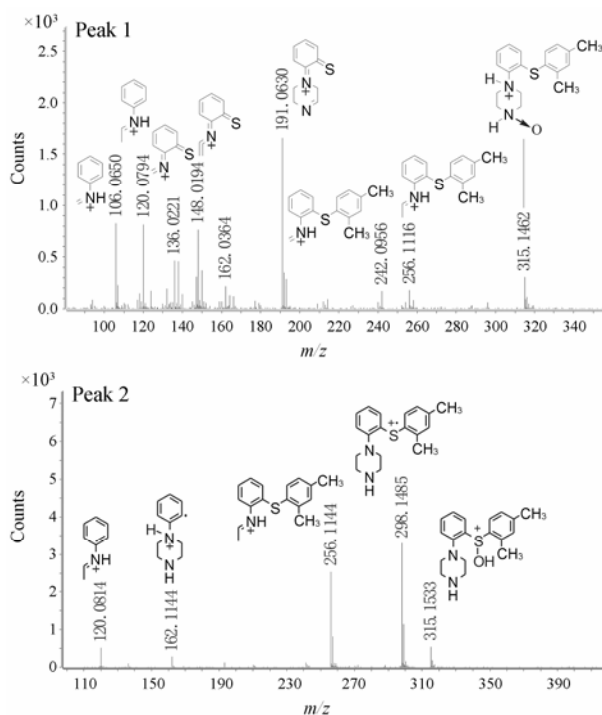


Figure 7 Fragmentation pathways of $[M+H]^+$ (m/z 315) ion

298.1485 ($C_{18}H_{22}N_2S^+$)，与沃替西汀的 *S*-氧化物易脱去 $HO\cdot$ 自由基相应，*S*-氧化物和 *N*-氧化物的色谱保留与它们的化学极性特征差异也相符。文献^[14, 15]也报道了沃替西汀主要氧化降解产物的鉴定，并解析为 *S*-氧化物，则不准确。

2.5 有关物质 4 和 5 ESI⁺-Q-TOF-MS 测得有关物质 **5** 的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 435.1921 (图 8)，与离子式 $C_{26}H_{31}N_2S_2^+$ 相应，比沃替西汀质量数多 136，与沃替西汀结构中增加 1 个 2,4-二甲基苯硫酚取代相应；其主要特征碎片 m/z 392.1485 ($C_{24}H_{26}NS_2^+$) 比沃替西汀特征碎片 m/z 256.1157 ($C_{16}H_{18}NS^+$) 多 136，元素组成多 C_8H_8S ，对应一分子 2,4-二甲基苯硫酚，提示非哌嗪环取代，又因叔胺为强邻对位定位基，而 2,4-二甲基苯硫酚空间结构较大，故亲电取代位置应

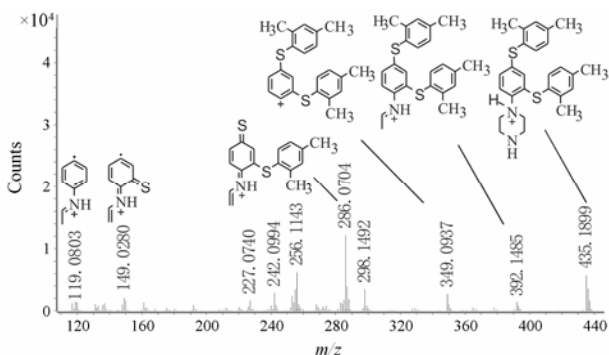


Figure 8 Q-TOF/MS spectrum of related substance **5** $[M+H]^+$ (m/z 435) ion and its fragmentation pathways

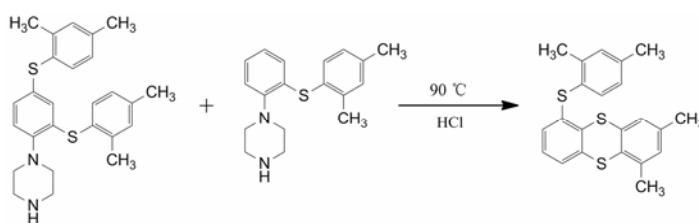


Figure 9 Formation mechanism of related substance 6

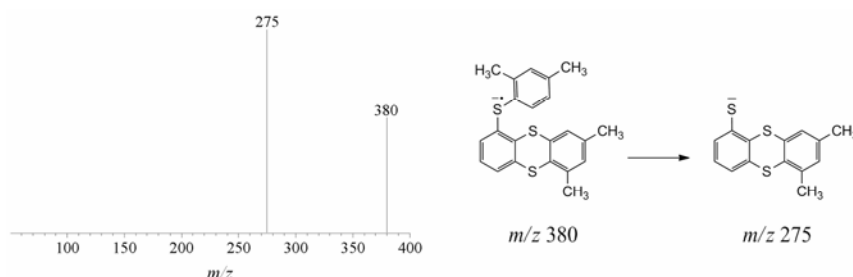


Figure 10 MS/MS spectrum of related substance 6 M^- (m/z 380) ion and its fragmentation pathways

为哌嗪环对位; m/z 349.093 7 ($C_{22}H_{21}S_2^+$) 与 $[M+H]^+$ 脱哌嗪相应; m/z 298.149 2 ($C_{18}H_{22}N_2S^+$), 149.028 0 ($C_8H_7NS^+$) 和 119.080 3 ($C_8H_9N^+$) 碎片, 分别比沃替西汀及其相应特征碎片 m/z (299, 150 和 120) 少 1, 判断为 $[M+H]^+$ 脱去 2,4-二甲基苯硫基单元游离基或哌嗪环 N_1-C_2 、 N_4-C_5 键断裂开环后形成的系列奇电子离子; 同时 m/z 286.070 4 ($C_{16}H_{16}NS_2^+$) 为 $[M+H]^+$ 脱去间二甲苯并哌嗪环 N_1-C_2 、 N_4-C_5 键断裂开环后形成的特征碎片。

ESI⁺-Q-TOF-MS 测得有关物质 4 与沃替西汀具有相同的准确质量, 且二级碎片亦完全相同, 故判断二者互为同分异构体; 结合有关物质 5 的结构, 推断有关物质 4 为有关物质 5 的 2 位水解脱一分子 2,4-二甲基苯硫酚后形成的降解产物。

2.6 有关物质 6 在 ESI^{+/−} 及 APCI⁺ 模式下, 有关物质 6 均无质谱响应, 在 APCI[−] 模式下的质谱响应较弱, 判断该有关物质的结构中不含 N 原子。APCI[−]-TOF-MS 测得有关物质 6 的 M^- 的准确质量为 380.056 6, 比沃替西汀质量数多 81, 结合文献^[16]判断该有关物质为沃替西汀与有关物质 5 发生取代反应并脱哌嗪而形成 (图 9); MS/MS 主要特征碎片离子 m/z 为 275, 比 M^- 少 105, 与脱间二甲苯相应 (图 10)。

讨论

本研究建立的 LC-MS 方法检测出氢溴酸沃替西汀的 6 个主要降解杂质, 并通过对各杂质的质谱解析、鉴定了它们的结构。有关物质 1 和 2 分别为沃替西汀水解后形成的 2,4-二甲基苯硫酚被过度氧化后

的降解产物及 *N*-苯基哌嗪降解产物; 有关物质 3 为沃替西汀结构中哌嗪环被氧化后形成的 *N*-氧化物; 有关物质 4 与沃替西汀互为同分异构体, 为有关物质 5 经水解后脱一分子 2,4-二甲基苯硫酚后形成的降解产物; 有关物质 5 为沃替西汀与其水解产物 2,4-二甲基苯硫酚发生亲电取代反应后的降解产物; 有关物质 6 为沃替西汀与有关物质 5 发生取代反应并脱哌嗪而形成的降解产物。

强制降解实验表明, 沃替西汀在酸破坏条件下硫醚键易断键水解, 产生极性较大的有关物质, 并在酸性高温条件下哌嗪苯环易发生亲电取代反应和苯硫醚的聚合反应; 在酸、光照及氧化条件下哌嗪环易被氧化成 *N*-氧化物, 故贮存过程应注意密封、避光。

References

- [1] Baune BT, Sluth LB, Olsen CK. The effects of vortioxetine on cognitive performance in working patients with major depressive disorder: a short-term, randomized, double-blind, exploratory study [J]. *J Affective Disord*, 2018, 229: 421–428.
- [2] Sanchez C, Asin KE, Artigas F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 145: 43–57.
- [3] Vieta E, Sluth LB, Olsen CK. The effects of vortioxetine on cognitive dysfunction in patients with inadequate response to current antidepressants in major depressive disorder: a short-term, randomized, double-blind, exploratory study versus escitalopram [J]. *J Affect Disord*, 2018, 227: 803–809.
- [4] Yang FP, He Y, Wang Z, et al. Research progress of antipsy-

- chotics [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2016, 51: 1809–1821.
- [5] Nomikos GG, Tomori D, Zhong W, et al. Efficacy, safety, and tolerability of vortioxetine for the treatment of major depressive disorder in patients aged 55 years or older [J]. CNS Spect, 2017, 22: 348–362.
- [6] Douša M, Doubský J, Srbek J. Utilization of photochemically induced fluorescence detection for HPLC determination of genotoxic impurities in the vortioxetine manufacturing process [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54: 1–6.
- [7] Kall MA, Rohde M, Jørgensen M. Quantitative determination of the antidepressant vortioxetine and its major human metabolite in plasma [J]. Bioanalysis, 2015, 7: 2881–2894.
- [8] Kragelj Lapanja N, Zupančič B, Toplak Časar R, et al. Evaluation of starting materials for PMIs (potentially mutagenic impurities): a vortioxetine case study [J]. Org Process Res Dev, 2018, 22: 125–135.
- [9] Liu L, Cao N, Ma XL, et al. Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC-MS, IR and NMR [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117: 325–332.
- [10] Li JW, Song SL, Zhang H, et al. Determination of related substances in vortioxetine hydrobromide tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2017, 48: 1359–1363.
- [11] Zhang CY, Li J, Gao JM, et al. The impurity profiling of paclitaxel and its injection by UPLC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2016, 51: 965–971.
- [12] Zeng XF, Liu J, Song M, et al. Identification of related substances in nicergoline by HPLC-MS [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2015, 50: 1026–1031.
- [13] Parida KN, Chandra A, Moorthy JN. Oxidation of thiols to sulphonic acids with Oxone[®]/NaHCO₃ and KBrO₃ [J]. Chemistryselect, 2016, 1: 490–494.
- [14] Xu R, Zhang GY, Wang DC, et al. Determination of related substances of vortioxetine hydrobromide by HPLC [J]. Chin Pharm J (中国药 学 杂 志), 2018, 53: 312–317.
- [15] Fang SM, Kang JP, Su MJ, et al. Preparation and application of degradation product of vortioxetine hydrobromide: CN, 201610363167.3 [P]. 2017-12-05.
- [16] Nekhoroshev VP, Gubaidullin RR, Yarkova AG, et al. Transformations of diphenyl sulfide and diphenylamine on aluminum chloride [J]. Pet Chem, 2017, 57: 272–277.