

HPLC-Q-TOF-MS 分析注射用泮托拉唑钠中降解杂质

杨伟峰^{1,2}, 许梦佳¹, 石云峰², 朱培曦² (1.浙江工业大学化学工程学院, 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 优化注射用泮托拉唑钠有关物质检查方法, 并用高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱法(HPLC-QTOF-MS)对注射用泮托拉唑钠中降解杂质进行结构鉴定。方法 采用色谱柱 Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用乙酸调节 pH 至 4.5)(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~20 min, B 相 20%; 20~30 min, B 相 20%→40%; 30~45 min, B 相 40%→30%; 45.01~65 min, B 相 20%); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 289 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C; 离子源: ESI 源; 扫描模式: 正离子模式。结果 优化后有关物质测定方法可有效分离各降解杂质。根据各降解杂质的二级质谱图以及高分辨数据, 推测出了 4 个降解杂质的结构式。结论 所建立的色谱条件可有效检测注射用泮托拉唑钠中的有关物质, 降解杂质结构式的确定为该产品稳定性研究提供了技术支持。

关键词: 泮托拉唑钠; 杂质; 高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱法; 鉴定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)09-1174-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.019

Analysis of Degradation Impurities in Pantoprazole Sodium for Injection by HPLC-Q-TOF-MS

YANG Weifeng^{1,2}, XU Mengjia¹, SHI Yunfeng², ZHU Peixi² (1.College of Chemistry Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the method for the examination of related substances in pantoprazole sodium for injection and establish an HPLC-Q-TOF-MS method for the structure determination of the degradation impurities. **METHODS** The analysis was performed on Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (adjusted to pH 4.5 by acetic acid)-acetonitrile in gradient mode. The detection wavelength was 289 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The compound was ionized in the electrospray ionization(ESI) and operated in positive mode. **RESULTS** The improved method for the examination of related substances could separate the major degradation impurities effectively. According to the mass spectrum and high resolution data of degradation impurities in pantoprazole sodium the structure of four degradation impurities could be inferred. **CONCLUSION** The chromatographic condition can detect the related substances in pantoprazole sodium for injection effectively. And the structure identification of the degradation impurities can provide technical support for stability study of this medicine.

KEY WORDS: pantoprazole sodium; impurities ;HPLC-QTOF-MS; determination

泮托拉唑钠是继奥美拉唑、兰索拉唑之后上市的第 3 代质子泵抑制剂, 主要用于胃溃疡系统疾病的治疗, 其结构式见图 1。查阅不良反应数据显示, 注射用泮托拉唑钠不良反应较多。而注射用泮托拉唑钠制成溶液后稳定性较差, 国内外药品说明书中均明确注明: 本品需用 0.9%氯化钠注射液溶解后, 在一定时间内注射完。另外本品在近效期时外观颜色有明显变化, 但有关物质增加不明显。因此, 研究注射用泮托拉唑钠放置过程中主要的降解杂质具有重要意义^[1-3]。为提高产品质量以及为注射用泮托拉唑钠的使用和保存提供意见, 本实验通过优化色谱条件, 使主要降解杂质与主成分得到良好的分离, 并利用高效液相色谱-

四级杆飞行时间质谱法高分辨率和高灵敏度的特点^[4], 对主要降解杂质的结构进行确认并推测其来源。

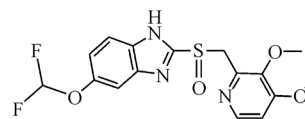


图 1 泮托拉唑结构图

Fig. 1 Structure of pantoprazole

1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津); Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配 VWD 检测器)-Agilent 6538 四级杆飞行时间质

作者简介: 杨伟峰, 男, 主任药师 Tel: (0571)86459413 E-mail: ywfzhz@163.com

谱仪; S40k pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

注射用泮托拉唑钠(山东罗欣药业股份有限公司, 批号: 513126042, 规格: 40 mg); 乙腈(Merck 公司)、乙酸铵(Sigma Aldrich 公司)和乙酸(Sigma Aldrich 公司)均为色谱纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱条件 1: 色谱柱 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(用乙酸调节 pH 至 4.5)(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~20 min, B 相 20%; 20~30 min, B 相 20%→40%; 30~45 min, B 相 40%→30%; 45.01~65 min, B 相 20%); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 289 nm; 进样量: 20 μL。

色谱条件 2^[5]: 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 7.0)(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~40 min, B 相 20%→80%; 40~45 min, B 相 80%→20%; 45~55 min, B 相 20%); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 289 nm, 进样量: 20 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子检测; 氮气作为干燥气和雾化气, 干燥气温度: 300 °C, 流速: 10 L·min⁻¹, 压力: 241 kPa; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 65 V; 裂解电压: 175 V; 二级质谱碰撞能量: 35 eV。

2.3 供试品溶液制备

取一支供试品, 用 pH 7.0 的 0.9%NaCl 溶液溶解于 50 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.4 稳定性试验

取供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件 1 分别于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样分析。按面积归一化法计算不同时间段泮托拉唑钠与降解杂质的百分含量, 结果分别见表 1, 供试品溶液降解 48 h 后典型色谱图见图 2。

供试品溶液放置过程中, 泮托拉唑钠百分含量有明显降低, 放置 8 h 后由 99.48%降至 99.22%。未经过降解的供试品溶液中存在微量的杂质 I、II、IV, 推测可能为生产过程中存在的副产物。供试品溶液放置过程中, 杂质 I、II、III、IV 百

分含量均有较大幅度的增加。因此注射用泮托拉唑钠使用过程中不宜放置过久^[6], 以免造成不良影响。

表 1 泮托拉唑钠和各降解杂质的百分含量

Tab. 1 Percent contents of pantoprazole sodium and degradation impurities

成分	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
泮托拉唑钠	99.48	99.31	99.22	99.17	98.87	97.21
杂质 I	0.008	0.020	0.034	0.050	0.096	0.199
杂质 II	0.038	0.053	0.051	0.051	0.055	0.070
杂质 III	ND	0.008	0.013	0.023	0.067	0.523
杂质 IV	0.010	0.030	0.050	0.063	0.268	1.127

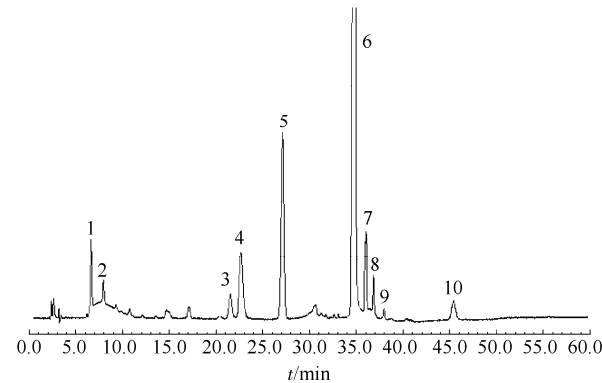


图 2 供试品溶液降解 48 h 色谱图(色谱条件 1)

1-杂质 I; 2-杂质 II; 3-杂质 C; 4-杂质 III; 5-杂质 IV; 6-泮托拉唑钠; 7-杂质 D+F; 8-杂质 A; 9-杂质 E; 10-杂质 B。

Fig. 2 Chromatogram of the degradation solution(chromatographic condition 1)

1-impurity I; 2-impurity II; 3-impurity C; 4-impurity III; 5-impurity IV; 6-pantoprazole sodium; 7-impurity D+F; 8-impurity A; 9-impurity E; 10-impurity B.

将放置 48 h 的供试品溶液按照中国药典 2015 年版方法(色谱条件 2)进样分析, 结果见图 3。比较图 2 和图 3, 可见优化后的色谱条件能使主要降解杂质与主成分的得到良好的分离。

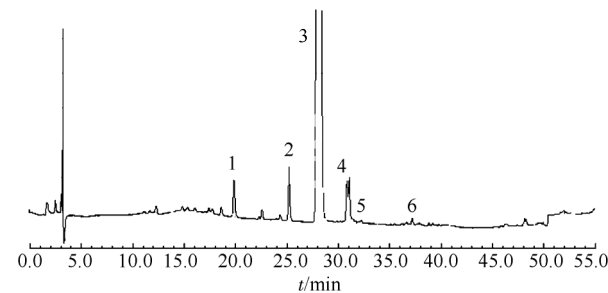


图 3 供试品溶液降解 48 h 色谱图(色谱条件 2)

1-杂质 C; 2-杂质 A; 3-泮托拉唑钠; 4-杂质 D+F; 5-杂质 E; 6-杂质 B。

Fig. 3 Chromatogram of the degradation solution(chromatographic condition 2)

1-impurity C; 2-impurity A; 3-pantoprazole sodium; 4-impurity D+F; 5-impurity E; 6-impurity B.

2.5 质谱分析

在 ESI(+)模式下, 泮托拉唑钠及其主要降解杂质的二级质谱及高分辨数据分别见图 4 与表 2。

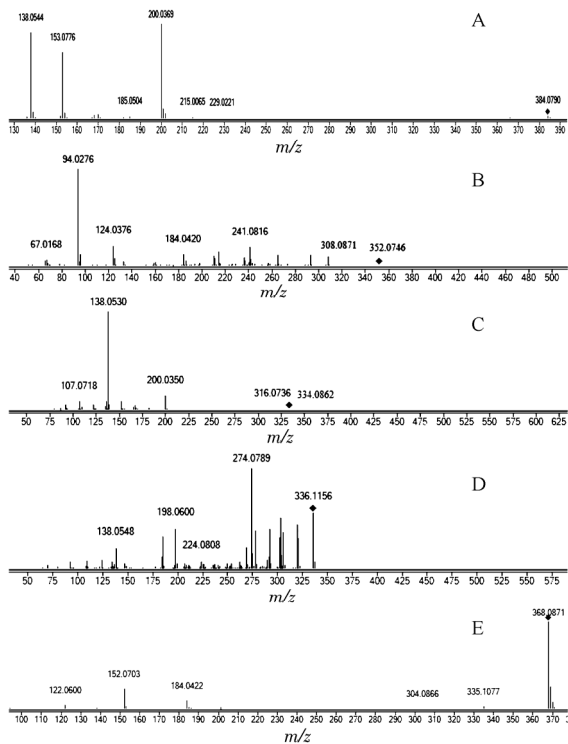


图 4 泮托拉唑钠及主要降解杂质的二级质谱图

A-泮托拉唑钠; B-杂质 I; C-杂质 II; D-杂质 III; E-杂质 IV。

Fig. 4 MS² spectra of pantoprazole sodium and main degradation impurities

A-pantoprazole sodium; B-impurity I; C-impurity II; D-impurity III; E-impurity IV.

由图 2 可知, 杂质 I 的保留时间较短, 推测其极性较强。图 4 中杂质 I 的[M+H]⁺峰 m/z 为 352, 根据氮规则则应含奇数个氮, 并推断它与泮托拉唑钠的结构较为相似。此外, 与泮托拉唑钠的[M+H]⁺峰(m/z 384)相差 32, 结合泮托拉唑钠自身的结构, 推测杂质 I 可能是由泮托拉唑钠脱去 1 个硫或者 1 个氟和甲基产生。根据质谱高分辨数据, 推测出 I 的可能结构, 其结构及裂解途径见图 5。

由图 2 杂质 II 的保留时间可见其极性较强并且稍弱于杂质 I。图 4 中杂质 II 的[M+H]⁺峰 m/z 为 334, 应含奇数个氮。与泮托拉唑钠的[M+H]⁺峰(m/z 384)相差 50。结合质谱高分辨数据, 推测出杂质 II 的可能结构, 其结构及裂解途径见图 5。

表 2 泮托拉唑钠及各降解杂质的高分辨数据

Tab. 2 High-resolution data of pantoprazole sodium and main degradation impurities

化合物	结构式	理论值	实验值	偏差(10^{-6})
泮托拉唑	$C_{16}H_{16}F_2N_3O_4S^+$	384.082 4	384.079 0	8.8
	$C_9H_7F_2N_2OS^+$	229.024 2	229.022 1	9.2
	$C_8H_5F_2N_2OS^+$	215.008 5	215.006 5	9.3
	$C_8H_{10}NO_3S^+$	200.037 6	200.036 9	3.5
	$C_8H_7F_2N_2O^+$	185.052 1	185.050 4	9.2
	$C_8H_{11}NO_2^{+\bullet}$	153.078 4	153.077 6	5.2
	$C_7H_8NO_2^+$	138.055 0	138.054 4	4.3
杂质 I	$C_{15}H_{15}FN_3O_4S^+$	352.076 2	352.074 6	4.5
	$C_{14}H_{16}N_2O_4S^{+\bullet}$	308.082 5	308.087 1	14.9
	$C_8H_{10}NO_2S^+$	184.042 7	184.042 0	3.8
	$C_6H_6NO_2^+$	124.039 3	124.037 6	13.7
	$C_5H_4NO^+$	94.028 7	94.027 6	11.7
	$CH_4FO_2^+$	67.018 0	67.016 8	17.9
杂质 II	$C_{15}H_{16}N_3O_4S^+$	334.085 6	334.086 2	1.8
	$C_{15}H_{14}N_3O_3S^+$	316.075 0	316.073 6	4.4
	$C_8H_{10}NO_3S^+$	200.037 6	200.035 0	13.0
	$C_7H_8NO_2^+$	138.055 0	138.053 0	14.5
	$C_7H_9N^{+\bullet}$	107.073 0	107.071 6	13.1
杂质 III	$C_{16}H_{16}F_2N_3O_3^+$	336.115 4	336.115 6	0.6
	$C_{14}H_{10}F_2N_3O^+$	274.078 6	274.078 9	1.1
	$C_{13}H_{10}N_3O^+$	224.081 8	224.080 8	4.5
	$C_9H_8F_2N_2O^{+\bullet}$	198.059 9	198.060 0	0.5
	$C_7H_8NO_2^+$	138.050 0	138.054 8	1.4
	$C_6H_6N^+$	92.049 5	92.049 9	4.3
杂质 IV	$C_{16}H_{16}F_2N_3O_3S^+$	368.087 5	368.087 1	1.1
	$C_{16}H_{15}F_2N_3O_3^{+\bullet}$	335.108 1	335.107 7	1.2
	$C_{15}H_{12}F_2N_3O_2^+$	304.089 2	304.086 6	8.6
	$C_8H_6F_2N_2O^{+\bullet}$	184.044 3	184.042 2	11.4
	$C_8H_{10}NO_2^+$	152.070 6	152.070 3	2.0
	$C_7H_8NO^+$	122.060 0	122.060 0	0.0

图 2 杂质 III 的保留时间推测其极性较弱, 图 4 中杂质 III 的[M+H]⁺峰 m/z 为 336, 应含奇数个氮。杂质 III 与泮托拉唑钠的[M+H]⁺峰(m/z 384)相差 48, 结合泮托拉唑钠的结构, 推测 III 的分子式与泮托拉唑钠相差 1 个硫与 1 个氧。结合质谱高分辨数据, 推测出杂质 III 的可能结构, 其结构及裂解途径见图 5。

图 4 中杂质 IV 的[M+H]⁺峰 m/z 为 368, 与 USP 中已知杂质 B 的 m/z 相同, 两者可能有相同分子式的同分异构体。从图 2 杂质 IV 的出峰时间先于

杂质 B, IV 的极性应强于杂质 B。结合杂质 B 的结构及质谱高分辨数据, 推测出杂质 IV 的可能结构, 其结构及裂解途径见图 5。

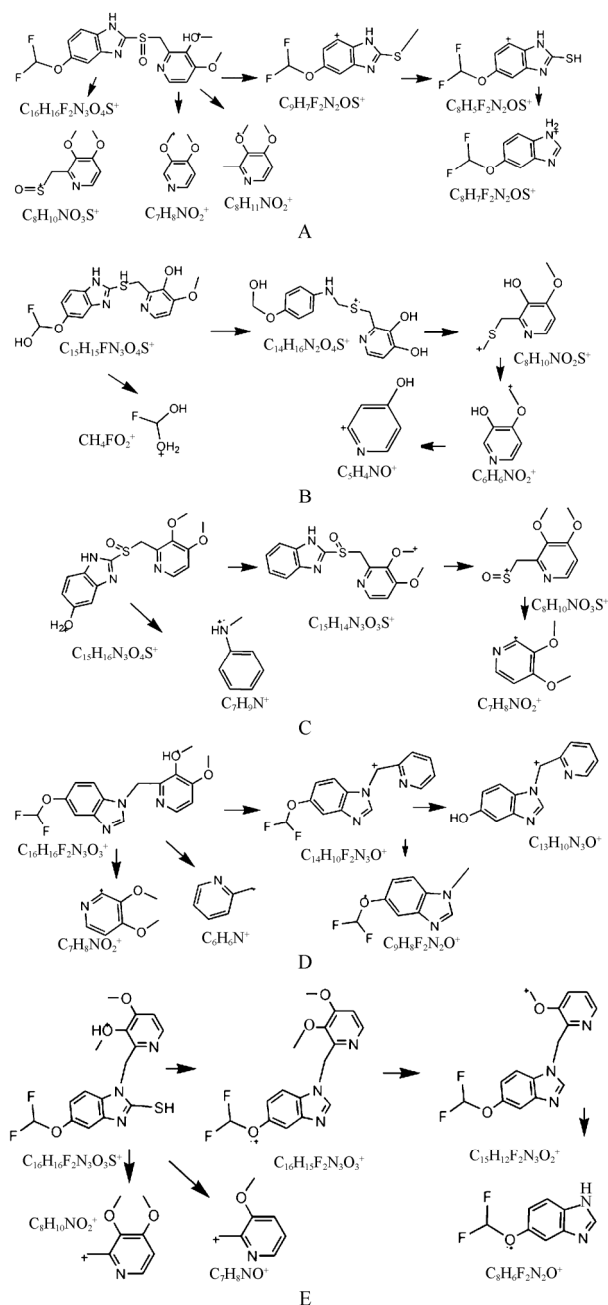


图 5 泮托拉唑钠及主要降解杂质的结构及裂解途径
A-泮托拉唑钠; B-杂质 I; C-杂质 II; D-杂质 III; E-杂质 IV。

Fig. 5 Structure and Fragmentation pathway of pantoprazole sodium and main degradation impurities

A-pantoprazole sodium; B-impurity I; C-impurity II; D-impurity III; E-impurity IV.

3 讨论

由稳定性数据可见未降解的供试品溶液中存在微量的杂质 I、II、IV, 放置过程中杂质 I、II、III、IV 百分含量均有较大幅度增加。结合四级杆飞行时间质谱的高分辨数据以及泮托拉唑钠的结构, 得出杂质 I、II、III、IV 分别为 2-[5-(氟-羟基-甲氧基)-1 氢-苯并咪唑-2-亚硫甲基]-4-甲氧基吡啶-3-酚、2-[(3, 4-二甲氧基-2-吡啶基)甲基]亚硫酰基-1 氢-苯并咪唑-5-酚、5-二氟甲氧基-1-[(3, 4-二甲氧基-2-吡啶基)甲基]-1 氢-苯并咪唑, 并且 4 个杂质目前均未被 USP 或 EP 收载。

本实验中优化后的色谱条件可有效地分离各降解杂质。而四级杆飞行时间质谱的灵敏度、分辨率均较高^[4], 观察表 2 中质谱的高分辨数据, 各个碎片质荷比的实验值与理论值之间的偏差 $<20 \times 10^{-6}$, 数据准确可靠。因此, 根据各降解杂质的二级质谱图以及高分辨数据, 可推测出其结构式。降解杂质结构式的确定为该产品稳定性研究提供了技术支持。

REFERENCES

- [1] HU C Q. The present status and prospect of impurities control of chemicals [J]. Sci China(中国科学), 2010, 40(6): 679-687.
- [2] GÖRÖG S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis [J]. Trac-trends Anal Chem, 2006, 25(8): 755-757.
- [3] GÖRÖG S, BABJÁK M, BALOGH G, et al. Drug impurity profiling strategies [J]. Talanta, 1997, 44(9): 1517-1526.
- [4] ZHU P X, CHEN J J, LI H L, et al. Characterization of impurities in nitrendipine bulk drug by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(1): 88-92.
- [5] 中国药典, 二部[S]. 2015: 704-705.
- [6] HUANG X H, PAN F S, XIE R R, et al. HPLC determination and stability of study pantoprazole sodium injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2001, 18(5): 362-363.

收稿日期: 2016-03-02