

高效液相色谱 - 电喷雾质谱联用分析 兰索拉唑及其副产物

曹书霞¹, 郭艳春¹, 廖新成¹, 郭彦春¹, 阮伯仰², 赵玉芬^{1,3}

(1. 郑州大学 化学系, 河南省化学生物与有机化学重点实验室, 河南 郑州 450052;

2. 郑州瑞康制药有限公司, 河南 郑州 450001; 3. 清华大学 化学系,

生命有机磷化学与化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要: 应用高效液相色谱 - 电喷雾离子阱质谱 (HPLC - ESIMS) 联用技术分析了兰索拉唑产品纯度, 并对兰索拉唑生产中产生的副产物进行了结构鉴定。HPLC 条件: C18 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm), 流动相为甲醇 - 水 - 三乙胺 - 磷酸 (体积比 700 550 5 1.5), 用磷酸调 pH = 7.0 ± 0.1, 检测波长 284 nm。实验结果表明此方法选择性好, 灵敏度高, 不需要标准对照品, 操作简便。HPLC - MS 以及多级质谱鉴定出兰索拉唑试样中的副产物及杂质分别为过氧化产物及未氧化的合成前体。本研究建立了评价兰索拉唑质量的分析检测方法, 为优化兰索拉唑工艺, 提高产品质量提供了技术依据。

关键词: 高效液相色谱 - 电喷雾质谱联用; 兰索拉唑; 副产物; 结构鉴定

中图分类号: O657.63; Q517 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2006)04 - 0041 - 04

Analysis of Lansoprazole and Its Byproducts by Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Mass Spectrometry

CAO Shu-xia¹, GUO Yan-chun¹, LAO Xin-cheng¹, GUO Yan-chun¹,
RUAN Bo-yang², ZHAO Yu-fen^{1,3}

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Organic Chemistry, Department of Chemistry, Zhengzhou University,

Zhengzhou 450052, China; 2. Ruikang Pharmaceutical Stock Co. Ltd, Zhengzhou 450001, China;

3. Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology, Ministry of Education,

Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering,

Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Lansoprazole and its byproducts were separated and identified by high performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry (HPLC - ESIMS/MS). Zorbax SB C18 column (2.1 mm × 150 mm) was used. The mobile phase was methanol - water - triethylenamine - phosphoric acid (700 550 5 1.5 by volume), with pH = 7.0 ± 0.1 adjusted with phosphoric acid. The wavelength was 284 nm. The results showed that the method is simple, rapid and sensitive. The byproducts were identified as sulphonyl products by HPLC - MS/MS. This provides technical information for evaluating the properties of lansoprazole, and gives references for optimizing the craft of lansoprazole.

Key words: HPLC - ESIMS/MS; Lansoprazole; Byproduct; Identification

兰索拉唑 (lansoprazole) 为新型的抑制胃酸分泌的药物, 临床上用于十二指肠溃疡、胃溃疡、返流性食管炎等的治疗, 疗效显著, 对幽门螺杆菌有抑制作用^[1-2]。我们以 2-[[[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)-2-吡啶基]甲基]巯基]-1H-苯并咪唑为原料, 成功地制得了兰索拉唑 (2-[[[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)-2-吡啶基]甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑), 方法操作简单, 易于工业化生产。该工艺的最后一步为兰索拉唑合成前体 2-[[[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)-2-吡啶基]甲基]巯基]-1H-咪唑经间氯过氧苯甲酸和多种氧化剂氧化得到兰索拉唑。在应用高效液相色谱对试样进行检测中, 发现在进行氧化反应后产物中存在两种杂质, 且不易通过重结晶方法除去。为此本文采用液相色谱 - 质谱联用技术对兰索拉唑产物中存在杂质的结构进行了分析, 旨在应用高灵敏、高选择性的色谱 - 质谱联用技术建立

收稿日期: 2005 - 06 - 15; 修回日期: 2005 - 09 - 13

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (200510459015)

作者简介: 曹书霞 (1968 -), 女, 河南濮阳人, 副教授, 博士, Tel: 0371 - 67767050, E - mail: csx@zzu.edu.cn

适于兰索拉唑质量分析的检测方法,为探索控制副产物生成的工艺条件,进一步优化和完善兰索拉唑工艺提供技术依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100系列色谱仪, Bruker Esquire 3000电喷雾离子阱质谱仪, Milli-Q 纯水器, HANNA instruments PH211型 pH计。

兰索拉唑标准品及试样由郑州瑞康制药有限公司实验室提供。所用试剂均为色谱纯, 0.2、0.45 μm 滤膜由天津市腾达过滤器件厂生产。水为纯水机(美国 LABCONCO 公司)生产的超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent公司 Zorbax SB C18柱, 5 μm , 2.1 \times 150 mm。流动相: 甲醇-水-三乙胺-磷酸(700 550 5 1.5), 用磷酸调节 pH为 7.0, 等度洗脱。检测波长: 284 nm。进样量: 10 μL (200 mg/L)。流速: 0.4 mL/min。柱温: 室温。

1.3 液相色谱-质谱联用条件

色谱条件同上, 质谱采用电喷雾(ESD)离子源, 正、负离子检测模式, 喷雾电压为 4 000 V, 毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾气(N_2): 124.02 kPa, 干燥气(N_2): 9 L/min。

1.4 实验方法

取样品 50 mg, 精密称定, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤。再稀释成质量浓度为 200、10、1、0.4、0.04、0.005 mg/L 的样品溶液备用。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱分离条件的优化

按文献报道采用流动相为甲醇-水-三乙胺-磷酸(体积比 700 300 5 1.5, 用磷酸调节 pH为 7.3)^[3-4]对兰索拉唑试样进行了分析。但在主峰前发现有 1 个组分不能和兰索拉唑很好地分离。因此适当调节流动相中三乙胺和磷酸的加入量、甲醇与水的比例、pH值等参数, 结果发现当甲醇-水-三乙胺-磷酸的体积比为 700 550 5 1.5, pH值为 7.0 \pm 0.1 的条件下, 兰索拉唑及其两个杂质能够得到很好的分离, 且保留时间适中。兰索拉唑质量浓度在 0.005 ~ 200 mg/L 范围内, 溶液质量浓度与峰面积成线性关系, 相关系数 $r > 0.999$ 。此方法检出限为 1 $\mu\text{g/L}$ ($S/N = 3$), 优于已有的文献报道 50 $\mu\text{g/L}$ ^[5]。

2.2 在不同色谱柱上适应性的考察

为了考察该方法在不同色谱柱上的普适性, 选用了 Zorbax SB C18(2.1 \times 150 mm, 5 μm)、Hypersil BDS C18(2.1 \times 150 mm, 5 μm)、Hypersil BDS C18(4.6 \times 250 mm, 5 μm)、Microsorb-MW C18(4.6 \times 250 mm, 5 μm)、Aichrom Reliasil C18(4.6 \times 150 mm, 5 μm)、Zorbax Eclipse XDB-C8(4.6 \times 150 mm, 5 μm) 6种不同规格、不同填料的色谱柱进行考察。结果表明, 无论是哪种色谱柱, 兰索拉唑及其杂质在上述优化后的流动相条件下均获得了较好的分离效果。从分离度以及所需时间的角度综合考虑, 选用 Zorbax SB C18 色谱柱效果较好。

2.3 兰索拉唑试样中副产物的初步鉴定

在无标准对照品的情况下, 利用 HPLC-MS 对兰索拉唑试样 HPLC 分析中前后出现的杂质峰进行鉴定。由于在一种离子模式下, 兰索拉唑试样中的两个杂质峰无法同时获得较好的离子流信号, 因此分别对兰索拉唑试样在正、负离子模式下进行检测, 如图 1, 2 所示。图中 UV 表示紫外吸收色谱图, EIC 表示提取离子流图。由 HPLC-MS 检测结果可知, 保留时间在 3.9 min 处准分子离子峰为 384 的化合物的相对分子质量为 385; 保留时间在 4.5 min 处准分子离子峰为 370 的化合物的相对分子质量为 369, 即为兰索拉唑的吸收峰; 保留时间在 7.9 min 处准分子离子峰为 354 的化合物的相对分子质量为 353。

2.4 多级质谱确定副产物的结构

为了确证兰索拉唑试样中的两个杂质的结构, 利用 MS/MS 二级质谱对目标分子正、负离子的碎片离子进行了研究并对其规律进行了解析。兰索拉唑及其杂质、副产物的二级质谱图见图 3。

在正离子模式下, 兰索拉唑 **a** 的分子离子峰 m/z 370 的二级谱中可以观察到 m/z 252、220 以及 119 的碎片离子峰, m/z 252 为兰索拉唑脱去苯并咪唑的碎片离子峰; m/z 220 是重排所得的碎片离子峰; m/z 119 是苯并咪唑的碎片离子峰, 由此可知兰索拉唑母体易在硫原子附近受到自由基以及电荷诱导作用发生裂解。在化合物 **b** 的分子离子峰 m/z 354 的二级谱中观察到了 m/z 321、236 以及 119 的碎片离子峰, 由二级碎片离子 m/z 119 说明化合物 **b** 的苯并咪唑环部分没有变化; 而 m/z 321 碎片离子峰和分子离子峰为 m/z 354 相差 33, 推测 m/z 321 可能是失去了 1 分子的硫化氢得到的碎片离子峰, 提示化合物 **b** 可能含有硫醚结构单元。文献报导^[6-7]兰索拉唑、奥美拉唑等含有硫醚结构单元的合成前体在质谱裂解中会失去 1 分子硫化氢, 而具有亚磺酰基以及磺酰基结构单元的该类化合物在质谱裂解中不易失去 1 分子的硫化氢, 因此由二级质谱结果判断化合物 **b** 为兰索拉唑的合成前体 2-[[[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)-2-吡啶基]甲基]硫基]-1H-苯并咪唑。保留时间在 3.9 min 处化合物 **c** 所对应的负分子离子峰 m/z 384 的二级谱中观察到 m/z 320、181 以及 117 的碎片离子峰, 碎片离子 m/z 117 为苯并咪唑的负离子峰, 同样说明化合物 **c** 的苯并咪唑环部分没有变化; 而 m/z 320 碎片离子峰和分子离子峰为 m/z 384 相差 64, 为脱去 1 分子二氧化硫的特征离子峰, 由此可以推测在此化合物中含有磺酰基结构单元^[6,81]; m/z 181 为 2-磺酰基苯并咪唑负离子; 因此在 3.9 min 处化合物 **c** 所对应的为兰索拉唑的过氧化产物 2-[[[3-甲基-4-(2,2,2-三氟乙氧基)-2-吡啶基]甲基]磺酰基]-1H-苯并咪唑。兰索拉唑 **a** 及其合成前体 **b**、过氧化物 **c** 的氧化反应流程及其各自的质谱裂解特征见图 4 所示。

为了进一步确证产物中杂质的结构以及对碎片离子进行确认归属, 采用 Waters Micromass Q-TOF Micro 高分辨质谱仪对杂质及其碎片离子进行了精确质量测定。结果表明, 化合物 **b** 的实际测定值为 354.087 5

(兰索拉唑合成前体硫醚化合物的精确相对分子质量计算值为 354.088 8), 化合物 **c** 的实际测定值为 384.062 7 (兰索拉唑过氧化产物的精确相对分子质量计算值为 384.063 0), 因此由高分辨质谱测定结果确证了两种杂质的分子式。另外由高分辨二级质谱测定可知, 兰索拉唑合成前体硫醚化合物 **b** 得到的碎片离子的实际测定值为 321.110 2 (脱去 1 分子硫化氢所得到的碎片离子的精确相对分子质量计算值为 321.108 9), 理论值与实测值之间的误差均小于 5×10^{-6} , 这一结果进一步证实了图 4 所示部分裂解途径的正确性。

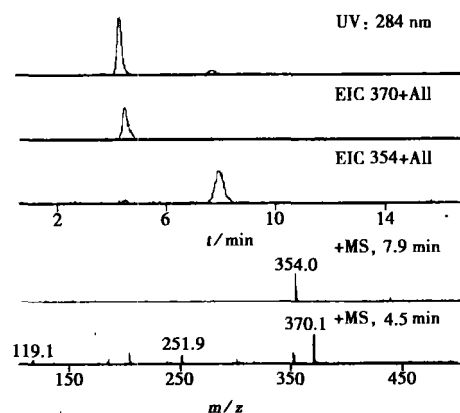


图 1 样品在正离子模式下的 LC-MS 图
Fig. 1 LC-MS spectra of sample in the positive ion mode

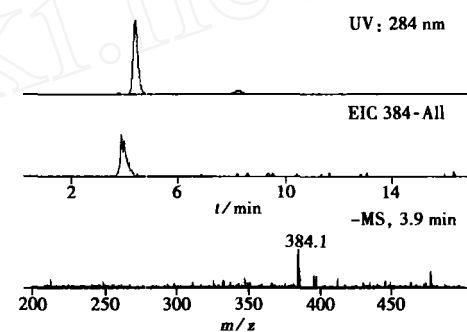


图 2 样品在负离子模式下的 LC-MS 图
Fig. 2 LC-MS spectra of sample in the negative ion mode

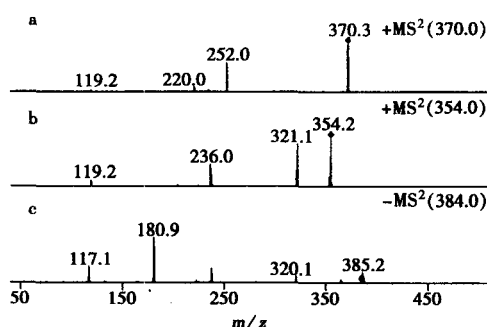


图 3 兰索拉唑 (a) 及其杂质分子离子 (b, c) 的 MS/MS 质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of lansoprazole and its byproducts

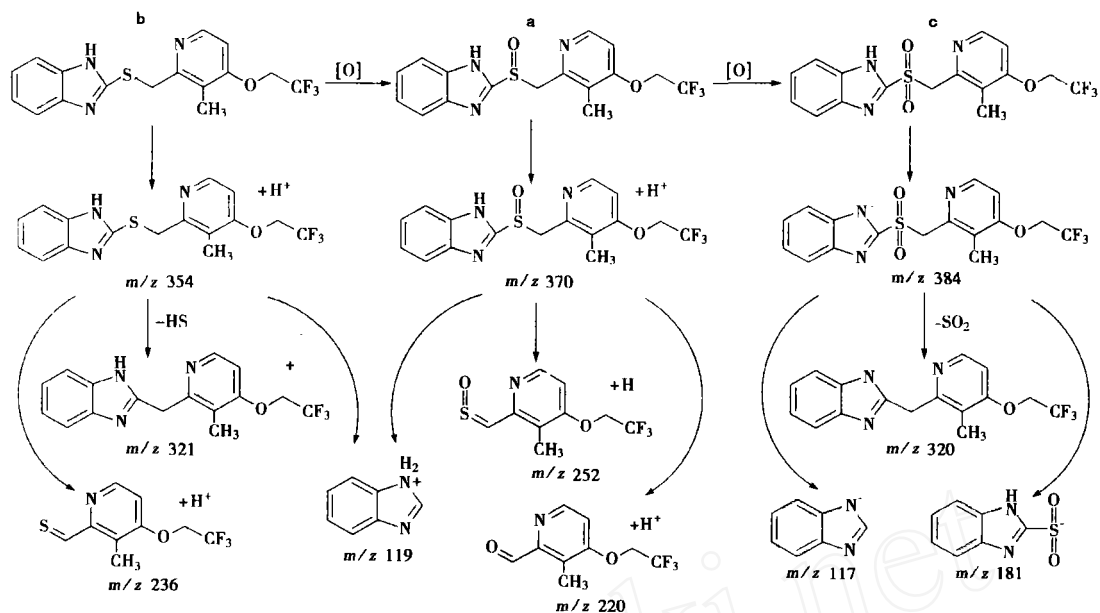


图 4 兰索拉唑 (a)及其合成前体 (b)、过氧化物 (c)的反应及其质谱裂解途径示意图

Fig. 4 Reaction and the fragmentation pathways of Lansoprazole and its byproducts

3 结论

本研究优化了兰索拉唑及其副产物、杂质的 HPLC 分离条件, 同时利用 HPLC - MS 联用及多级质谱技术对兰索拉唑产物中存在的副产物及其杂质的结构进行了分析。结果表明兰索拉唑产物中存在的副产物为氧化过程中的过氧化造成的砷类产品, 而杂质为残留的兰索拉唑氧化合成前体硫醚化合物。本研究建立了评价兰索拉唑质量的分析检测方法, 为优化兰索拉唑工艺, 提高产品质量提供了技术依据。

参考文献:

- [1] 刘学峰, 蒋军荣, 陈建军. 兰索拉唑合成路线图解 [J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(10): 635 - 637.
- [2] 王瑞彬, 阮金兰, 丁惟培, 等. 质子泵抑制剂——兰索拉唑的合成 [J]. 中国药物化学杂志, 1995, 5(2): 146 - 148.
- [3] 卫生部药品标准 (试行) [S]. WS - 134(X - 106) - 98.
- [4] 林 斌. 反相 HPLC 法测定兰索拉唑及片剂的含量 [J]. 广东药学院学报, 1998, 14(4): 247 - 249.
- [5] 李毅敏, 陈丽宇, 马丽娟, 等. 兰索拉唑血药浓度的 HPLC 测定 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(4): 252 - 254.
- [6] 姜 浩, 姜 泓, 江 骥, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾离子阱质谱法鉴定人尿中奥美拉唑代谢物 [J]. 分析化学, 2002, 30(12): 1431 - 1434.
- [7] HOFFMANN K J. Identification of the main urinary metabolites of omeprazole after an oral dose to rats and dogs [J]. Drug Metabolism and Disposition, 1986, 14(3): 341 - 348.
- [8] RENBERG L, SMONSSON R, HOFFMANN K J. Identification of two main urinary metabolites of [14C] omeprazole in humans [J]. Drug Metabolism and Disposition, 1989, 17(1): 69 - 76.