

## UPLC-MS/MS 法研究丁苯酞原料药的杂质谱

李 婕<sup>1</sup>, 王 英<sup>2</sup>, 袁 松<sup>1</sup>, 黄海伟<sup>1</sup>, 何 兰<sup>1\*</sup>

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 秦皇岛市食品药品检验中心, 河北 秦皇岛 066000

**摘要:** 目的 采用超高效液相-三重四级杆质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 对丁苯酞原料药的杂质谱进行分析。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液 (60:40); Waters Quattro Premier XE QQQ 质谱仪, 离子源为 ESI, 检测模式为正离子。结果 所有杂质均以丁苯酞的质谱裂解途径为模板, 进行了质谱解析, 共确证了 3 个杂质的化学结构。结论 该研究对于丁苯酞原料药的杂质分析、质量控制和合成工艺的改进具有重要作用。

**关键词:** 丁苯酞; 杂质谱; UPLC-MS/MS

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2015)05-0516-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.05.010

## Study on impurity profiling of butylphthalide by UPLC-MS/MS

LI Jie<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, YUAN Song<sup>1</sup>, HUANG Hai-wei<sup>1</sup>, HE Lan<sup>1</sup>

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Qinhuangdao Institute for Food and Drug Control, Qinhuangdao 066300, China

**Abstract: Objective** Investigation of butylphthalide and its related substances was carried out using a reversed phase ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method. **Methods** Separation was performed on Waters ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), the mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid in water (60:40); The identification of impurities in butylphthalide was performed with a triple-quadrupole mass spectrometer, with an electrospray ionization (ESI) source in the positive ion mode. **Results** All the impurities were deduced based on the MS fragment pathways of butylphthalide, a total of three compounds were characterized. **Conclusion** This work provides useful information for studying the origin of the impurities of butylphthalide and quality control of butylphthalide.

**Key words:** butylphthalide; impurity profiling; UPLC-MS/MS

丁苯酞与芹菜籽中提取的左旋芹菜甲素的结构相同, 为其人工合成的消旋体, 用于治疗轻、中度急性缺血性脑卒中<sup>[1]</sup>。本品为我国自主研发一类新药, 目前为石药集团恩必普药业独家品种。丁苯酞为苯骈呋喃酮类化合物, 合成方法主要有邻醛基苯甲酸法、邻苯二甲酸酐法、邻溴苯甲醛法等<sup>[2]</sup>。

杂质控制方面, 丁苯酞的执行标准为 WS<sub>1</sub>-(X-124)-2005Z<sup>[3]</sup>, 未对具体杂质进行定性和针对性控制。笔者试验中发现个别杂质检测波长与丁苯酞差异大, 在标准规定的检测波长下可能被低估。因此, 很有必要对丁苯酞的杂质谱进行研究。

目前, 采用质谱技术对丁苯酞的有关物质进行研究尚未见公开报道。本试验采用超高效液相-三重四级杆质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 对丁苯酞的相关杂质进行分析。对质量分数≥0.1%的 3 个杂质, 通过对丁苯酞质谱裂解规律、合成路线<sup>[4]</sup>及强制降解试验结果的分析, 较为科学地推定了它们的结构, 并通过强制降解试验及合成路线分析确定了杂质来源。本研究可为丁苯酞质量标准的修订提供依据, 也可为企业优化生产工艺提供参考。

### 1 仪器与试剂

UPLC 超高效液相色谱仪、Quattro Premier XE

收稿日期: 2015-06-09

基金项目: 科技重大专项重大新药创制 (2015ZX09303001); 科协新技术风险评估机制研究 (2014ZCYJ03); 农业部公益专项 (201103027)

作者简介: 李 婕 (1981—), 女, 河北唐山人, 硕士, 研究方向为药物分析。Tel: 13811204025 E-mail: lijie@nifdc.org.cn

\*通信作者 何 兰 Tel: (010)67095301 E-mail: helan@nifdc.org.cn

QQQ 三重四级杆液相质谱仪 (Waters 公司)。

甲醇 (LC-MS 级, Fisher Scientific), 甲酸 (LC-MS 级, Sigma), 水 (Millipore 纯化水), 双氧水 (分析纯, 北京化学试剂公司), 氢氧化钠 (分析纯, 北京化学试剂公司), 盐酸 (分析纯, 北京化学试剂公司)。丁苯酞原料药 (石药集团恩必普药业, 批号 08030151、528140901), 丁烯苯酞工作对照品 (石药集团恩必普药业, 纯度 98.2%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

样品溶液: 精密称取丁苯酞约 25 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。

强制降解试验贮备液: 精密称取丁苯酞约 0.3 g (批号 528140901), 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为强制降解试验用样品贮备液。

氧化降解溶液: 精密量取强制降解试验用样品贮备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 30% 双氧水 1 mL, 放置 1 h 后, 加入甲醇至刻度, 摇匀。

碱降解溶液: 精密量取强制降解试验用样品贮备液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL, 放置 1 h 后, 加 0.1 mol/L 盐酸 2 mL 中和, 加甲醇至刻度, 摇匀。

酸降解溶液: 精密量取强制降解试验用样品贮备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL, 放置 1 h 后, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL 中和, 加甲醇至刻度, 摇匀。

光降解溶液: 精密量取强制降解试验用样品贮备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 置 4 500 Lx 光照强度下, 放置 12 h, 摇匀。

热降解溶液: 精密量取强制降解试验用样品贮备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 置 60 °C 水浴, 放置 4 h, 摇匀。

### 2.2 色谱与质谱条件

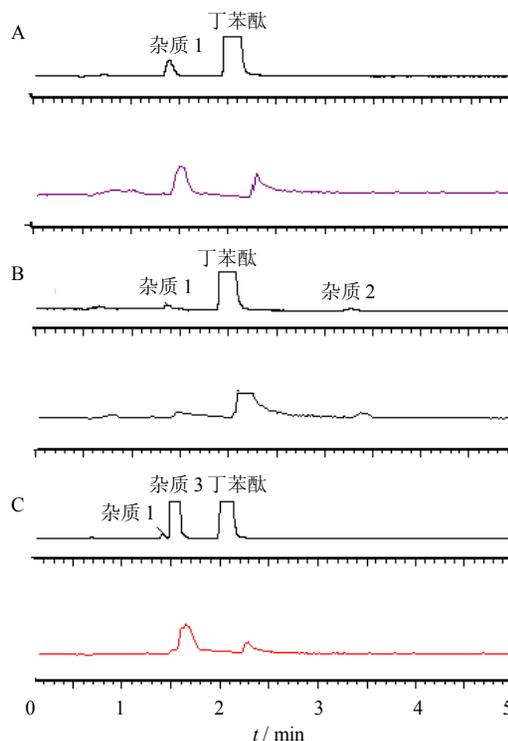
**2.2.1 色谱条件** 采用 Waters UPLC 液相色谱系统; 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液 (60:40), 体积流量 250 μL/min; 检测波长 280 nm/228 nm; 进样量 2 μL。

**2.2.2 质谱条件** 采用 Waters Quattro Premier XE QQQ 质谱仪, 电喷雾电离源 (ESI)。正离子模式 ESI<sup>+</sup>, 毛细管电压 3.0 kV, 样品锥孔电压 15 V, 源温 120 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流量 500

L/h, 锥孔气流量 50 L/h, 碰撞电压 10~20 V。丁苯酞的 UPLC 保留时间约为 2.0 min, 故在 1.8~2.2 min 把 UPLC 流出的丁苯酞组分切换至 Waste 阀, 从而既能提高丁苯酞中的杂质浓度, 又不污染质谱仪。

### 2.3 杂质结构与来源分析

利用 HPLC 对丁苯酞进行质量监控时检测到两个杂质, 由于标准中采用甲醇-水体系, 直接转移至 UPLC 得到同样结果。对比 2 批原料的杂质谱, 杂质种类不同, 批号 08030151 主要检出杂质 1, 且留样结果显示室温放置 6 年后, 杂质 1 的含量增加了 0.5%, 提示杂质 1 为降解杂质; 批号 528140901 主要检出杂质 2, 此外还有少量杂质 1 (图 1)。采用 UPLC-MS/MS 的方法对丁苯酞的杂质进行逐一分析, 并且结合强制降解试验及合成路线对杂质来源进行归属。



A-批号 08030151; B-批号 528140901; C-批号 528140901 碱破坏  
A- Batch 08030151; B- Batch 528140901; C- Batch 528140901 by alkalization destroying

图 1 丁苯酞原料药的 UPLC-UV-MS 谱图

Fig. 1 UPLC-UV-MS Chromatogram of butylphthalide substance

**2.3.1 丁苯酞的质谱裂解途径** 在正离子模式下, 丁苯酞的准分子离子峰  $m/z$  191  $[M+H]^+$  可裂解为 173  $[M-H_2O+H]$ 、155  $[M-H_2O-H_2O+H]$ 、145

[M-H<sub>2</sub>O-CO+H]、117 [M-H<sub>2</sub>O-CO-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>+H]、135 [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>+H]和91 [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-CO<sub>2</sub>+H]等,与文献<sup>[5]</sup>报道基本一致(图2)。

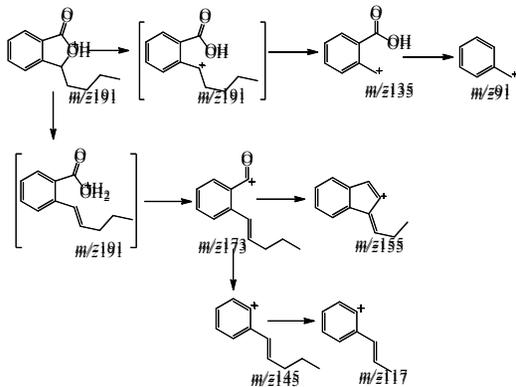


图2 丁苯酞可能的裂解途径

Fig. 2 Proposed fragmentation pathway for butylphthalide

**2.3.1 杂质1** 杂质1的准分子离子峰为  $m/z$  207 [M+H]<sup>+</sup>,较丁苯酞增加质量数16。碎片离子  $m/z$  189 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>,较丁苯酞少质量数2; 171、143均比丁苯酞碎片离子少2; 117、91均与丁苯酞碎片离子相同(图3)。由于杂质1随丁苯酞放置年限延长,有缓缓增加的趋势,推定杂质1为丁苯酞水解脱氢产物。化学名为2-(1-氧代戊基)-苯甲酸(CAS号:550-37-8),结构式见图4。

**2.3.2 杂质2** 杂质2的准分子离子峰为  $m/z$  189 [M+H]<sup>+</sup>,较丁苯酞减少质量数2。碎片离子171、143、133均比丁苯酞碎片离子少2; 117、91均与丁苯酞碎片离子相同(图3)。杂质2的量不随丁苯酞放置年限延长而变大,不随酸、碱、光、热、氧化破坏试验而变大。推定杂质2为合成杂质,与邻苯二甲酸酐法合成中间体3-丁烯苯酞吻合。经试验,杂质2与企业提供3-丁烯苯酞对照品的质谱行为一致。化学名为3-丁烯基-1(3H)-异苯并呋喃酮(CAS

号:551-08-6),结构式见图4。

**2.3.3 杂质3** 笔者设计了酸、碱、光、热、氧化破坏试验,试图找到影响丁苯酞稳定性的关键因素。结果表明,丁苯酞在光、热、氧化破坏试验中稳定性良好;在酸破坏条件下生成少量杂质3;碱条件下生成大量的杂质3及少量杂质1(图1)。杂质3的准分子离子峰为  $m/z$  209 [M+H]<sup>+</sup>,较丁苯酞增加质量数18。碎片离子  $m/z$  191 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>,与丁苯酞质量数相同; 173、145均与丁苯酞碎片离子相同(图3)。推定杂质3为丁苯酞水解开环产物。化学名为2-(1-羟戊基)-苯甲酸(CAS号:380905-48-6),结构式见图4。

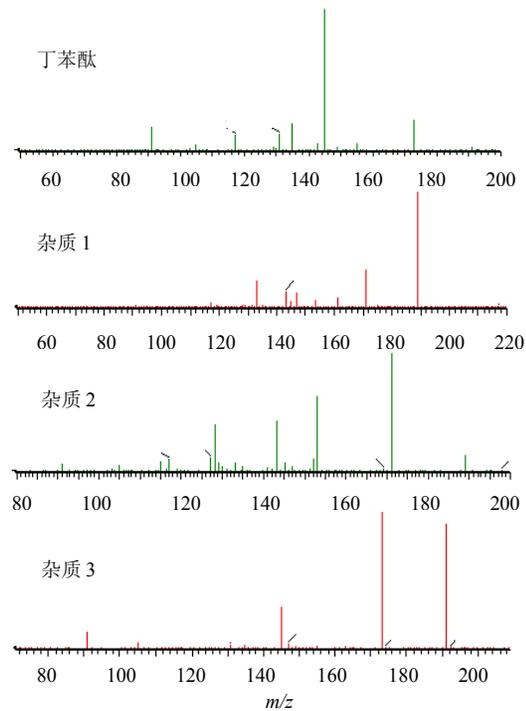


图3 丁苯酞及其杂质的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrums of butylphthalide and impurities

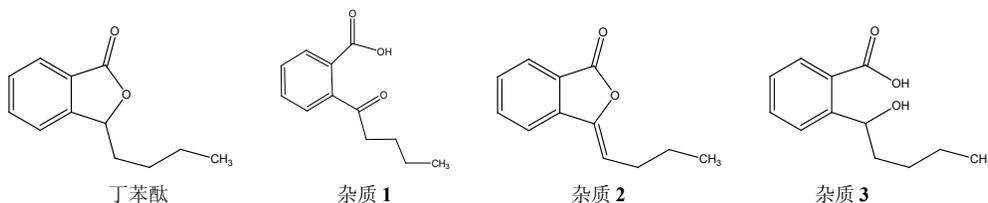


图4 丁苯酞及其杂质的化学结构

Fig. 4 Chemical structures of butylphthalide and impurities

### 3 讨论

#### 3.1 丁苯酞稳定性的探讨

丁苯酞在热、光、氧化条件下相对稳定,在酸、碱条件下会水解开环。但将碱破坏溶液(经酸中和)隔天再进样,结果发现杂质3又转变成丁苯酞和少量杂质1。佐证了杂质1为丁苯酞水解开环再脱氢产物。提示丁苯酞合成过程应注意溶液的pH,尽管杂质3在溶液恢复中性后会转化为丁苯酞,但杂质1的降解是不可逆的。

#### 3.2 丁苯酞的杂质结构解析

采用超高效液相-三重四级杆质谱联用技术(UPLC-MS/MS),对2批丁苯酞原料的杂质谱进行分析,其中1批为2008年3月生产,1批为2014年9月生产。通过对丁苯酞的质谱裂解规律、合成

路线的分析,对杂质谱中质量分数 $\geq 0.1\%$ 的3个杂质(杂质1、2、3)的结构进行了解析。本研究为全面了解产品质量及其质量标准的提高提供了详实的数据支持。同时本文所建立的超高效液相色谱-三重四级杆质谱的联用方法既缩短了分析时间,又提高了杂质间的分离度,使杂质的分析变得简便易行,是一种较好的杂质结构分析技术。

#### 3.2 丁苯酞质量标准中检测波长的探讨

采用DAD检测器提取丁苯酞及其杂质的紫外吸收光谱图,结果表明只有杂质3的UV图谱与丁苯酞一致,而样品中实际含量较高的杂质1和杂质2,在标准规定的280 nm下,紫外吸收很弱(图5)。在现行标准检测方法下,杂质1和杂质2的含量将被低估,建议修订质量标准,对检测波长重新评估。

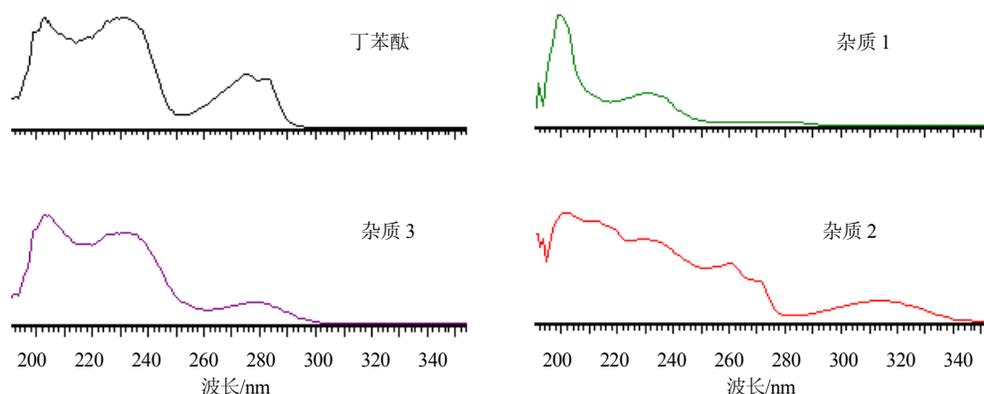


图5 丁苯酞及其杂质的紫外吸收光谱图

Fig. 5 UV spectrums of butylphthalide and impurities

#### 参考文献

- [1] 刘小荣, 卢海儒. 恩必普 [J]. 北方药学, 2006, 3(3): 46-47.
- [2] 徐智, 胡高云, 谭桂山. n-丁基苯酞合成方法研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(5): 91-93.
- [3] WS<sub>1</sub>-(X-124)-2005Z [S]. 2005.

- [4] 李绍白, 张少明, 李裕林. (±)-芹菜甲素的合成 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1990, 26(1): 118-119.
- [5] 牛占旗, 牛峰, 孟芳. 苯骈咪喃酮类化合物的质谱裂解特征研究 [J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(1): 66-70.