

LC-MS/MS 法鉴定替米沙坦氨氯地平双层片中有关物质

杨友田¹, 毛白杨², 成黎霏³, 苏梦翔^{3,4}, 狄斌^{3,4*}⁽¹⁾盐城卫生职业技术学院, 盐城 224005; ⁽²⁾常州市亚邦医药研究所有限公司, 常州 213163;⁽³⁾中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; ⁽⁴⁾中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要 建立 LC-MS/MS 法对替米沙坦氨氯地平双层片的有关物质进行鉴定。双层片中的替米沙坦层及氨氯地平层分别取样和反相高效液相色谱线性梯度法分析测定, 替米沙坦及氨氯地平均与其有关物质分离良好。检测出替米沙坦中 14 个有关物质峰, 对其中主要 7 个有关物质经二级质谱测定和解析鉴定了它们的结构, 同时检测出氨氯地平中 2 个为英国药典收录的有关物质。

关键词 替米沙坦氨氯地平双层片; 有关物质; LC-MS/MS; 鉴定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)01-0065-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140111

Identification of the related substances in telmisartan/amlodipine double layer tablets by LC-MS/MS

YANG Youtian¹, MAO Baiyang², CHENG Lifei³, SU Mengxiang^{3,4}, DI Bin^{3,4*}

⁽¹⁾ Yancheng Health Vocational Technical College, Yancheng 224005; ⁽²⁾ Changzhou Yabang Medicine Research Institute Co., Ltd., Changzhou 213163; ⁽³⁾ Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ⁽⁴⁾ Ministry of Education Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract An LC-MS/MS method was established for the determination and identification of the related substances in telmisartan and amlodipine double layer tablets. Both sampling and HPLC separation of telmisartan and amlodipine were carried out separately using ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with linear gradient elution. Good resolution of telmisartan and amlodipine and their related substances were achieved. Fourteen related substances of telmisartan were detected and seven of them were elucidated. Two related substances of amlodipine were identified to be the same as those recorded in British Pharmacopoeia.

Key words telmisartan/amlodipine double layer tablets; related substances; LC-MS/MS; identification

替米沙坦 (telmisartan) 为德国 Boehringer Ingelheim 公司研发的一种选择性血管紧张素 II 受体拮抗剂, 可单独或与其他抗高血压药物联合应用于原发性高血压的治疗^[1]。当前联合用药已成为高血压治疗的一个新趋势^[2]。替米沙坦和钙通道阻滞剂氨氯地平的联合应用降低了氨氯地平诱导水肿的发生率, 是治疗高血压的首选组合^[3]。因此, 开发替米沙坦氨氯地平双层片复方新制剂具有良好的临床前景。

替米沙坦氨氯地平双层片中有关物质的分析控制对于保障其临床用药的安全有效至关重要。

美国药典 (USP 35 版) 和英国药典 (BP 2010 版) 中, 对替米沙坦有关物质均采用反相 HPLC 含非挥发性的磷酸盐为流动相进行梯度洗脱检测^{[4]4779, [5]2042}, 对苯磺酸氨氯地平有关物质均采用了 ODS 色谱柱甲醇或乙腈组成的挥发性流动相^{[4]4776, [5]139}。为了满足替米沙坦氨氯地平双层片复方新制剂中有关物质的分析鉴定, 本研究采用甲醇-醋酸铵水溶液挥发性流动相 LC-ESI-MS/MS 法进行测定研究, 并解析鉴定了主要有关物质的结构, 为该复方制剂的质量控制和工艺优化提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

替米沙坦氨氯地平双层片(江苏亚邦爱普森药业有限公司,批号:1106001);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司,批号:1012900);实验用水由 PALL 纯水仪制备;其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪与 Xcalibur 1.4 数据处理系统(美国 Thermo 公司);LC-2010C HT 高效液相色谱系统(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 色谱/质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Syncronis ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);替米沙坦:以 10 mmol/L 醋酸铵水溶液(冰醋酸调 pH 至 4.0)为 A 相,以甲醇为 B 相,线性梯度洗脱程序如下:0 min (30% A) → 30 min (30% A) → 60 min (10% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL;检测波长:298 nm。氨氯地平:以 20 mmol/L 醋酸铵水溶液为 A 相,以甲醇为 B 相,等度洗脱 30 min;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL;检测波长:237 nm。

2.1.2 质谱条件 ESI 正、负离子检测模式,正离子化喷雾电压 5 000 V,负离子化喷雾电压 4 000 V,雾化气压 280 kPa,辅助气压 80 kPa,毛细管温度 350 °C。替米沙坦正离子和负离子全扫描范围均为 m/z 200 ~ 800;氨氯地平正离子和负离子全扫描范围均为 m/z 200 ~ 700;各主要准分子离子采用二级质谱产物离子扫描,碰撞气氦气压力为 0.2 Pa,碰撞能量 35 eV。

2.2 供试品溶液的制备

替米沙坦供试品溶液:取替米沙坦氨氯地平双层片,分取替米沙坦层,研细,称取适量(约相当于替米沙坦 10 mg),加甲醇适量超声使替米沙坦溶解,并用甲醇稀释制成 1 mg/mL 的溶液,滤过,取续滤液作为替米沙坦供试品溶液。

氨氯地平供试品溶液:取替米沙坦氨氯地平双层片,分取氨氯地平层,同法制备。

3 结果

3.1 替米沙坦有关物质检查

按“2.1”项下色谱和质谱条件,测定替米沙坦供试品溶液的 LC-PDA 和 LC-MS 图谱(图 1)。结果表明,可以检测到替米沙坦的 14 个有关物质峰,参考美国药典(USP 35 版)和英国药典(BP 2010 版)中替米沙坦有关物质的规定,对其中主要的有关物质 3,4,5,6,8,11 和 12 进行质谱解析,并鉴定它们的可能结构。

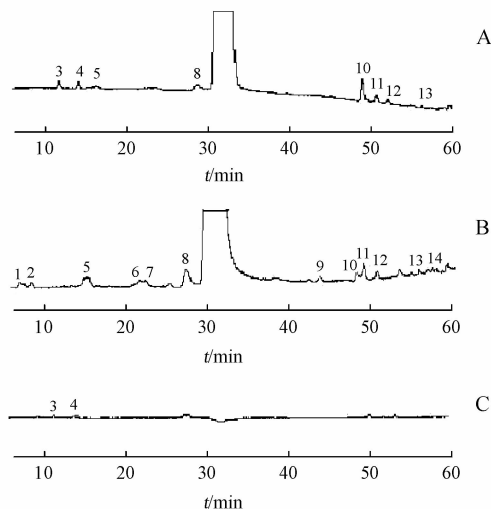


Figure 1 (A) Chromatogram of telmisartan in tablets by LC-PDA; (B) TIC of telmisartan in tablets by LC-ESI⁺-MS (m/z 400→600); (C) TIC of telmisartan in tablets by LC-ESI⁺-MS (m/z 200→400 and m/z 600→800)

3.2 替米沙坦有关物质的结构解析鉴定

3.2.1 有关物质 6 ESI⁺-MS 测得有关物质峰 6 (t_R = 23.66 min) 与替米沙坦的相对分子质量相同,其 $[M + H]^+$ 峰 m/z 均为 515, ESI⁻ MS 测得 $[M - H]^-$ 峰 m/z 为 513, 二级质谱测得其碎片离子有 497, 305 和 276。一级质谱和二级质谱及 PDA 信息均一致,故有关物质峰 6 为替米沙坦同分异构体,为英国药典中记载替米沙坦有关物质 B,替米沙坦结构如图 2 所示,有关物质 6 的裂解过程如图 3 所示。

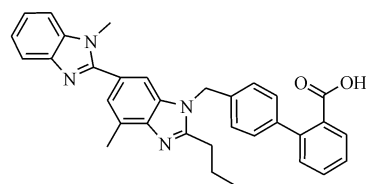


Figure 2 Chemical structure of telmisartan

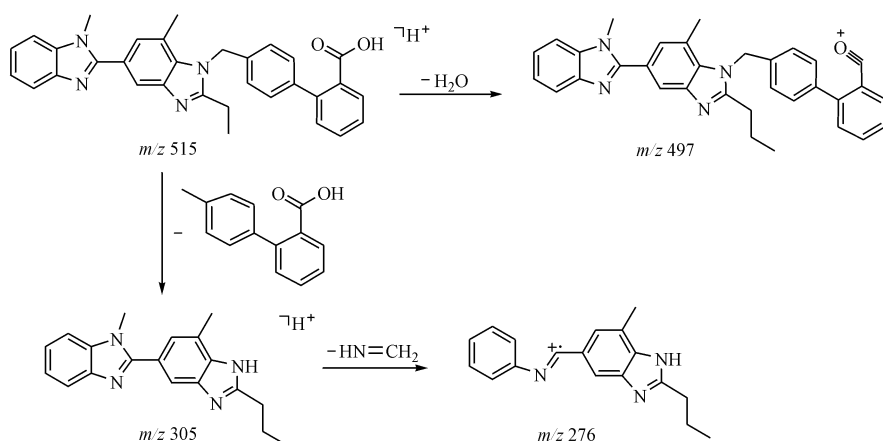


Figure 3 Proposed fragmentation pathways of impurity 6 of telmisartan

3.2.2 有关物质 3 ESI⁺-MS 测得有关物质峰 3 ($t_R = 11.59$ min) 中 m/z 305 为 $[M + H]^+$ 峰, 且 ESI⁻MS 测得其 $[M - H]^-$ 为 m/z 303, 故有关物质 3 的相对分子质量应为 304, 二级质谱测得其碎片离子为 276。根据其碎片信息及参考英国药典, 推测有关物质 3 即为英国药典 (BP 2010 版) 中杂质 A, 为合成过程中的中间体, 其结构及裂解途径如图 4 所示。

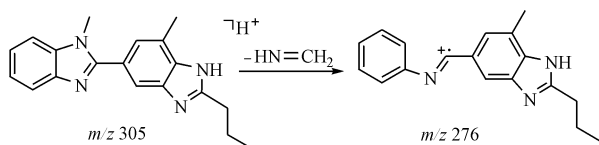


Figure 4 Proposed fragmentation pathways of impurity 3 of telmisartan

3.2.3 有关物质 4 LC-ESI-MS/MS 扫描供试品溶液, 有关物质 4 的保留峰时间为 14.15 min。一级全扫描质谱测得 m/z 319 为 $[M + H]^+$ 峰, 二级质谱测得其碎片离子有 303, 289 和 275。推测有关物质 4 的结构及裂解途径如图 5 所示。

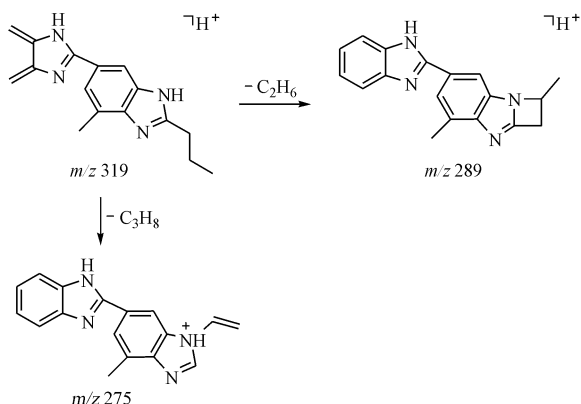


Figure 5 Proposed fragmentation pathways of impurity 4 of telmisartan

3.2.4 有关物质 5 有关物质 5 的保留时间为 16.54 min。一级全扫描质谱测得 m/z 487 的 $[M + H]^+$ 离子, 并根据其 ESI⁻MS 出现 m/z 485 的 $[M - H]^-$ 的离子判断其相对分子质量为 486, 二级质谱测得其碎片离子峰有 469, 289 和 276, 推测其结构及裂解过程如图 6 所示。

3.2.5 有关物质 8 LC-PDA-ESI-MS/MS 扫描供试品溶液, 有关物质 8 的保留时间为 28.79 min。分析有关物质一级全扫描质谱, ESI⁺-MS 离子 m/z 513 为 $[M + H]^+$ 峰; ESI⁻MS 离子 m/z 511 为 $[M - H]^-$ 峰, 所以有关物质 8 的相对分子质量应为 512。由于其碎片离子信息较少, 所以根据参考文献^[6], 推测其可能结构及其裂解途径如图 7 所示。

3.2.6 有关物质 11, 12 有关物质 11, 12 的保留时间分别为 51.13 和 52.56 min, 一级全扫描质谱测得 m/z 549 的 $[M + H]^+$ 离子, 且它们的 ESI⁻MS 的主要离子均为 m/z 547, 为 $[M - H]^-$ 峰, 因此有关物质 11 及 12 的相对分子质量均为 548。二级质谱碎片信息也类似, 主要碎片离子有 531 和 473。推测其可能为合成过程中产生的副产物, 结构及裂解途径如图 8 所示。

3.3 氨氯地平有关物质推测结果

按“2.1”项下色谱和质谱条件, 得到其 LC-UV 和 LC-MS 图谱, 结果 (图 9) 表明, 氨氯地平中可以检测到 2 个有关物质峰, 对有关物质 1, 2 及氨氯地平的质谱进行解析, 并根据合成工艺及英国药典关于氨氯地平有关物质检查项下已知的有关物质结构推测这些有关物质的可能结构, 最终确定有关物质 1, 2 分别为英国药典 (BP 2010 版) 中已知杂质 D, F, 有关物质 2 来源于原料药, 应是合成过程中

的副产物。其结构参见图 10。

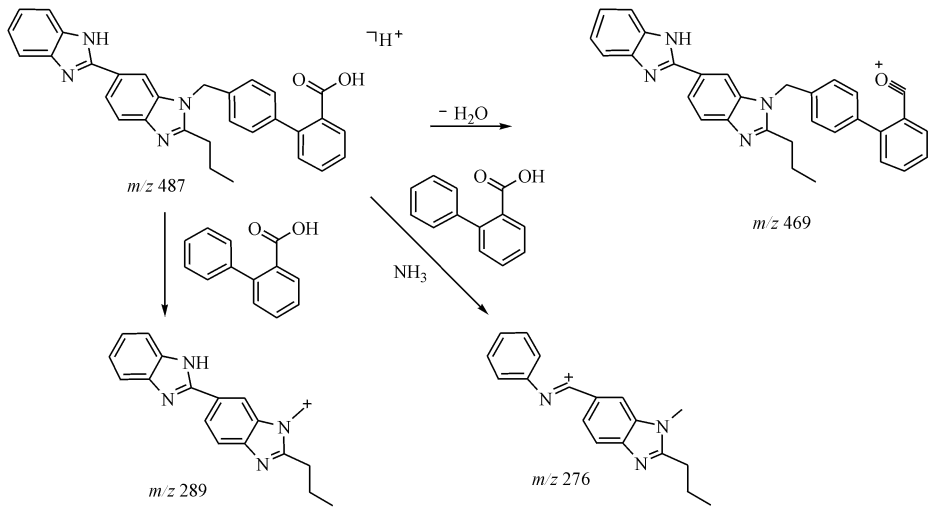


Figure 6 Proposed fragmentation pathways of impurity 5 of telmisartan

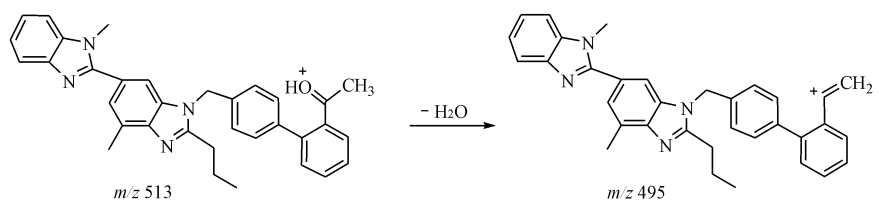


Figure 7 Proposed fragmentation pathways of impurity 8 of telmisartan

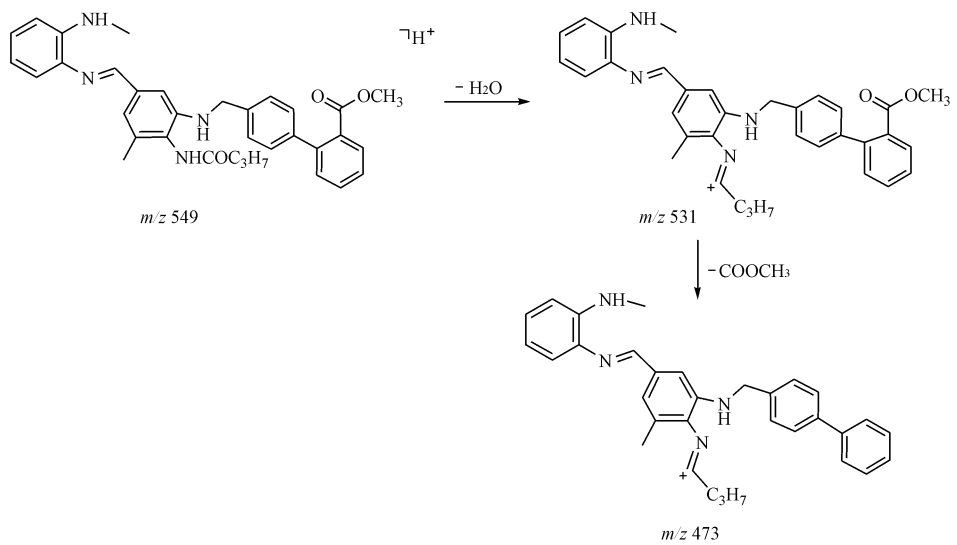


Figure 8 Proposed fragmentation pathways of impurity 11 and impurity 12 of telmisartan

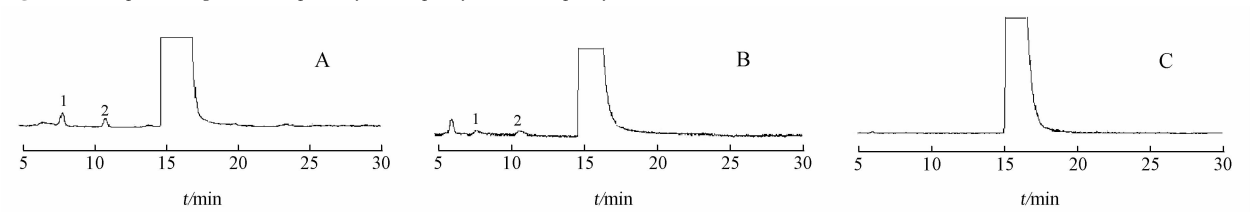


Figure 9 (A) Chromatogram of amlodipine in tablets by LC-UV(237 nm); (B) TIC of amlodipine in tablets by LC-ESI⁺ -MS(m/z 200-700); (C) TIC of amlodipine in tablets by LC-ESI⁻ MS(m/z 200-700)

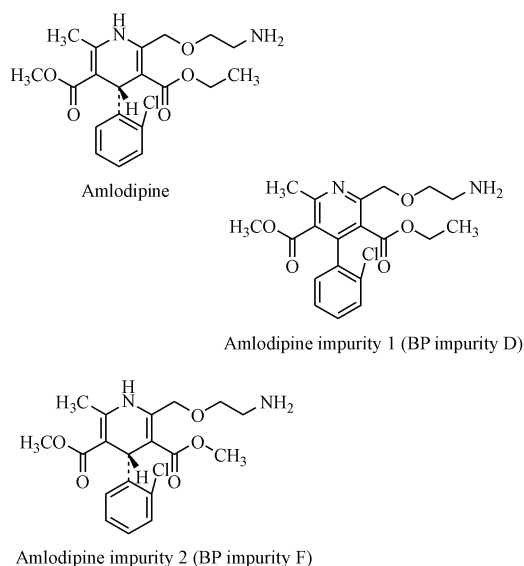


Figure 10 Structures of amlodipine and impurity 1 and 2

4 讨论

4.1 色谱条件的选择与优化

关于替米沙坦的有关物质检测方法,文献中大多采用非挥发性的缓冲溶液作为流动相^[6-7],无法用于电喷雾离子化的质谱分析。本文建立了适合替米沙坦的 LC-MS/MS 分析的挥发性流动相,并对其梯度进行了优化。在该色谱条件下,替米沙坦和其有关物质均能较好分离。

4.2 替米沙坦的有关物质

初步推测出的替米沙坦片层的有关物质中,均可以直接从原料药的有关物质谱中得到归属,说明受试制剂中替米沙坦的有关物质大部分来源于原

料。由于替米沙坦结构较大且较为稳定,所以在较高碰撞能量中得到的碎片信息也较少,但根据合成工艺^[8],并参照英国药典替米沙坦标准中所规定的可能有关物质结构,结合各有关物质峰的一级及二级质谱信息,可推测出它们的可能结构。

参考文献

- [1] Xu GQ, Li W, Hao EJ. Graphical synthetic routes of telmisartan [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, **40** (9): 714-715.
- [2] Yuan LL. Comparison of telmisartan therapy with amlodipine in the treatment of patients with mild and moderate hypertension: randomized, double blind, parallel-controlled [J]. *Mod Med J* (现代医学), 2012, **40** (1): 35-38.
- [3] Suárez C. Single-pill telmisartan and amlodipine; a rational combination for the treatment of hypertension [J]. *Drugs*, 2011, **71** (17): 2 295-2 305.
- [4] The United States Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmacopeia [M]. 35 ed. Baltimore: United Book Press, Inc, 2012.
- [5] The British Pharmacopoeia Commission. The British Pharmacopoeia 2010 [M]. London: the Station Office, 2009.
- [6] Ding XQ, Chao RB, Liao L, et al. Determination of telmisartan and its related substances by HPLC [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2003, **18** (3): 212-214.
- [7] Wang B, Chen W, Yin XZ. Determination of the related substances in compound telmisartan tablets by RP-HPLC gradient elution method [J]. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2010, **37** (12): 227-228.
- [8] Xiao SJ, Yang XY, Wu FH, et al. Synthesis of the antihypertensive drug telmisartan [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2010, **19** (18): 1 726-1 728.