

# 盐酸吡格列酮有关物质的色谱-质谱结构鉴定

殷潇雅<sup>1</sup>, 汪 澄<sup>1</sup>, 明国军<sup>2</sup>, 杭太俊<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国药科大学药物分析系, 南京 210009; <sup>2</sup> 江苏九阳生物制药有限公司, 盐城 224300)

**摘要** 采用色谱-质谱联用技术鉴定盐酸吡格列酮的有关物质。使用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 乙酸铵缓冲液为流动相, 梯度洗脱, 对盐酸吡格列酮有关物质进行分离; 以电喷雾正离子化-飞行时间质谱法测定各有关物质 [M + H]<sup>+</sup> 母离子的准确质量和元素组成, 三重四极质谱测定特征碎片离子, 对有关物质进行分析鉴定。根据质谱分析结果, 结合合成工艺与强制降解机制分析, 检测并鉴定出 11 个主要有关物质(1 个合成中间体、6 个合成副产物、4 个降解产物), 可为其生产工艺优化和质量控制提供理论参考。

**关键词** 盐酸吡格列酮; 有关物质; 结构鉴定; 色谱-质谱联用

**中图分类号** R917    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2017)06-0701-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170611

**引用本文** 殷潇雅, 汪澄, 明国军, 等. 盐酸吡格列酮有关物质的色谱-质谱结构鉴定[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 701–710.  
**Cite this article as:** YIN Xiaoya, WANG Cheng, MING Guojun, et al. Identification of the related substances in pioglitazone hydrochloride by hyphenated LC-MS techniques[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(6): 701–710.

## Identification of the related substances in pioglitazone hydrochloride by hyphenated LC-MS techniques

YIN Xiaoya<sup>1</sup>, WANG Cheng<sup>1</sup>, MING Guojun<sup>2</sup>, HANG Taijun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup> Jiangsu Jiuyang Biological Pharmaceutical Co., Ltd, Yancheng 224300, China

**Abstract** To identify the related substances in pioglitazone hydrochloride by hyphenated LC-MS techniques, an Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used for separation of the related substances with methanol and 0.1% ammonium acetate buffer as the mobile phases in gradient elution. Electrospray positive ionization high resolution TOF/MS was used for the determination of the accurate mass and elemental composition of parent [M + H]<sup>+</sup> ions of the related substances, and triple quadrupole tandem mass spectrometry was employed for the product mass spectra determination. Eleven major related substances were detected and identified to be one synthesis intermediate, six by-products and four degradation products, by using LC-MS determination, spectra elucidation, and further synthetic process and stress degradation mechanisms analysis. The results are useful for pioglitazone hydrochloride manufacturing processes optimization and quality control.

**Key words** pioglitazone hydrochloride; related substances; structural identification; LC-MS

盐酸吡格列酮(pioglitazone hydrochloride, PIO, 图 1)是由日本武田(Takeda)和美国礼来公司联合开发的噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂<sup>[1-3]</sup>, 1999 年 7 月被 FDA 批准在美国上市。它是高选择性的过氧化酶增殖体活化受体 γ(PPAR-γ)激动剂, 可增强外围组织对胰岛素的敏感性<sup>[4-5]</sup>, 降低胰岛素抵

抗, 从而降低血糖。主要用于 2 型糖尿病的治疗, 可单独用药<sup>[6]</sup>或联合给药<sup>[7-9]</sup>。虽然已有盐酸吡格列酮有关物质检查<sup>[10-12]</sup>、药代动力学研究<sup>[13-15]</sup>以及主要降解杂质结构研究报道<sup>[16]</sup>。但是, 盐酸吡格列酮杂质谱的系统研究尚未见报道。

本研究建立了适用于盐酸吡格列酮有关物质

检查和联用鉴定的色谱分析条件,通过TOF/MS和MS/MS研究了盐酸吡格列酮的杂质谱,鉴定了主要有关物质的结构,可为其生产工艺优化和质量控制提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

盐酸吡格列酮(PIO,批号151101YB)、吡格列酮(批号pg151101-gzy)及中间体吡格烯(EPEBT,批号160401CBJ)均由江苏九阳生物制药有限公司

提供。甲酸、乙酸铵(AR级,南京化学试剂有限公司);甲醇(CR级,美国Tedia公司);水(市售娃哈哈纯净水)。

### 1.2 仪器

Chromaster 5430高效液相色谱仪(日本日立公司);1290 Infinity液相色谱-6224飞行时间质谱仪(美国Agilent公司);TSQ Quantum Ultra AM型三重四极质谱(美国Thermo Finnigan公司);AV500/AV300核磁共振仪(德国Bruker公司);BS 21S分析天平(德国Sartorius公司)。

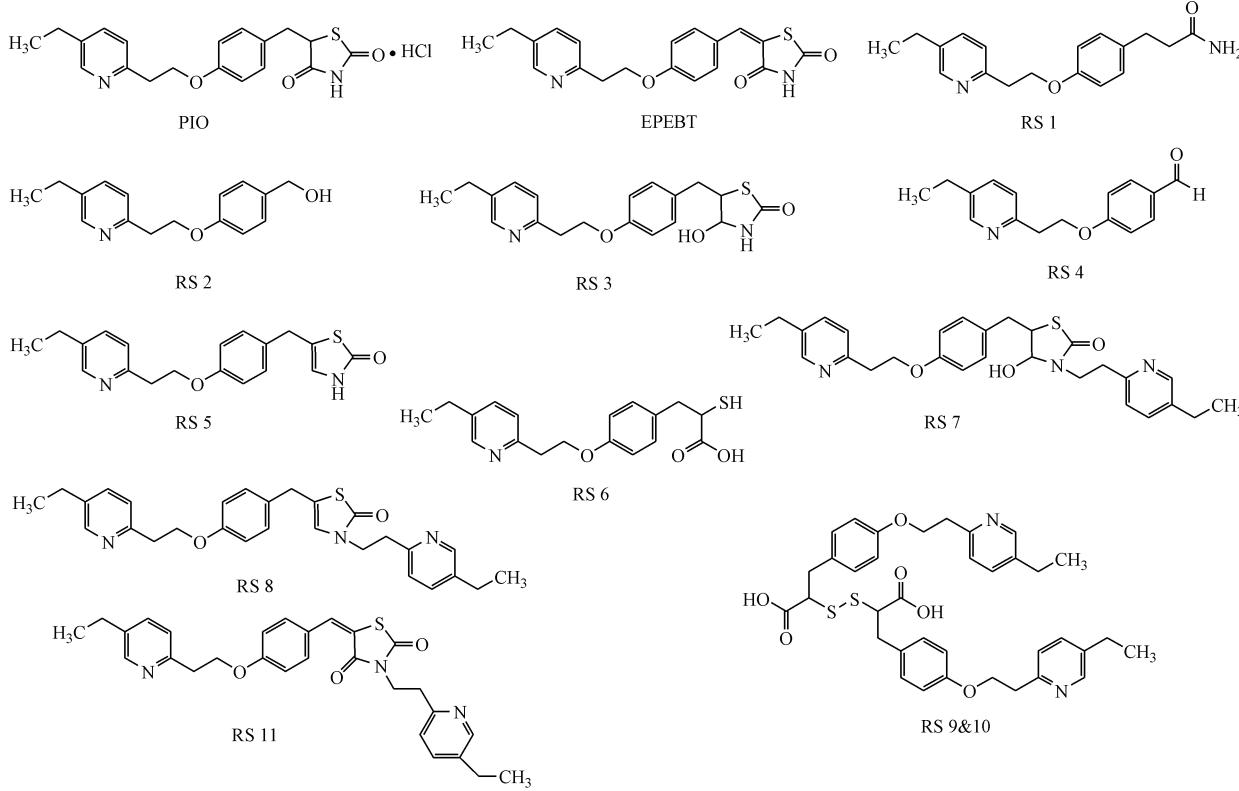


Figure 1 Chemical structures of pioglitazone hydrochloride(PIO),EPEBT and its related substances RS 1-RS 11

## 2 方法

**2.1 色谱条件** 采用Ultimate XB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以0.1%乙酸铵缓冲溶液(取乙酸铵1.0 g,加水900 mL溶解后,用甲酸调节至pH 3.0,加水稀释至1 L)为流动相A,甲醇为流动相B,线性梯度洗脱(A:B):0 min(50:50)→5 min(50:50)→40 min(10:90)→54 min(10:90)→55 min(50:50)→62 min(50:50),流速1 mL/min,柱温25 °C,检测波长为269 nm,进样量20 μL。分流比7:3供质谱检测。

**2.2 质谱条件** 电喷雾正离子化。高分辨TOF/MS测定参数:喷雾电压3.5 kV,雾化氮气压力275 kPa,流量10 L/min,温度350 °C,碎片电压135 V,实时参比离子m/z 121.050 8(质子化嘌呤,C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup>)和m/z 922.009 8(质子化氟代膦嗪,C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub><sup>+</sup>),质量数扫描范围m/z 105~1 000。MS/MS(二级质谱)测定参数:喷雾电压5 kV,雾化气压力350 kPa,辅助气压力50 kPa,毛细管温度350 °C,碰撞氩气压力0.2 Pa,碰撞能量22~26 eV。

### 2.3 样品处理

**2.3.1 供试品溶液** 取盐酸吡格列酮约10 mg,

精密称定,置50 mL量瓶中,加稀释剂(流动相A-B,50:50)溶解并定量稀释成质量浓度约为0.2 mg/mL的溶液作为供试品溶液;精密量取上述溶液适量,加稀释剂定量稀释,制成0.1%的主成分自身对照溶液。

**2.3.2 中间体溶液** 取中间体吡格列酮各适量,分别精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成质量浓度均约为0.2 mg/mL的溶液作为中间体供试液。

**2.3.3 强制降解试验<sup>[17]</sup>溶液** 取盐酸吡格列酮约10 mg,经0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL 70 ℃水浴45 min、10%过氧化氢溶液1 mL 70 ℃水浴2 h、4 mol/L盐酸溶液1 mL 70 ℃水浴2 d、固体粉末120 ℃烘箱放置6 h、或固体粉末光照(4 500 lx)9 d,分别处理,制得不同的强制降解样品。各加稀释剂溶解(酸碱处理的样品溶液预先中和),并稀释至50 mL,制成含盐酸吡格列酮均约为0.2 mg/mL的溶液,作为强制降解试验溶液。同时进行空白溶剂试验。

### 3 结果

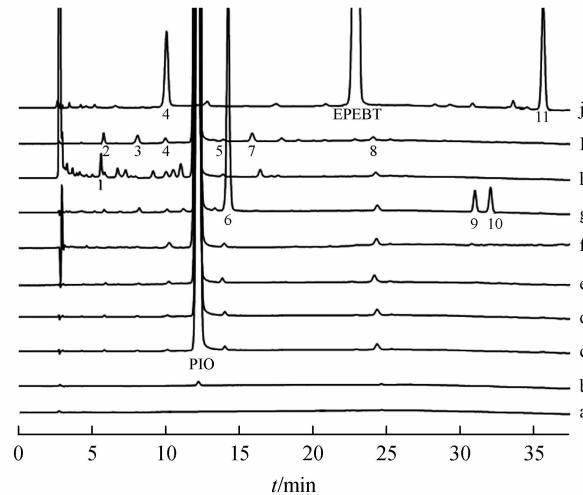
#### 3.1 有关物质检查

建立了盐酸吡格列酮有关物质检查的挥发性流动相HPLC分析法,适用于其有关物质的联用质谱鉴定。采用该方法对盐酸吡格列酮原料药、中间体以及强制降解样品分别进行分析检查。结果(图2)表明,在建立的色谱条件下,各有关物质色谱分离良好。检测到11个主要有关物质(按保留时间顺序编号为1~11)。

有关物质2,3,4,5,7,8和11为工艺杂质;原料药中各工艺杂质含量均较小,采用0.1%主成分自身对照法估算有关物质的含量,只有1个杂质(图2-c,有关物质8)的含量大于0.1%。

强制降解试验结果表明,有关物质1,6,9和

10为主要降解杂质。本品在强酸、高温和光照条件下,均相对稳定,未产生明显的降解产物(图2-d~f);碱破坏条件下形成3个主要降解产物(图2-g,有关物质6,9和10);氧化破坏降解产物多,且不具特征性(图2-h),本研究仅对主要氧化降解杂质有关物质1进行分析。有关物质4在强酸及氧化条件下,含量略有增加。



**Figure 2** Typical LC-UV chromatograms of PIO and its stress solutions and intermediates

a;Blank;b;Reference solution of 0.1%;c;Pioglitazone hydrochloride;d;Photolysis stressed in solid;e;Thermal stressed in solid;f;Acid;g;Base;h;Oxidation;i;Pioglitazone;j;EPEBT

#### 3.2 有关物质结构的质谱解析鉴定

LC-ESI-TOF/MS测得各有关物质[M+H]<sup>+</sup>母离子的准确质量和离子组成,三重四极质谱测定有关物质母离子的二级质谱碎片信息,并与吡格列酮的相应信息进行对比分析,鉴定各主要有关物质的结构(表1,图1)。并结合合成工艺(图3)及降解试验,进一步确定杂质来源及结构的合理性。吡格列酮及各主要有关物质的二级质谱和裂解途径分别如图4,图5和图6所示。

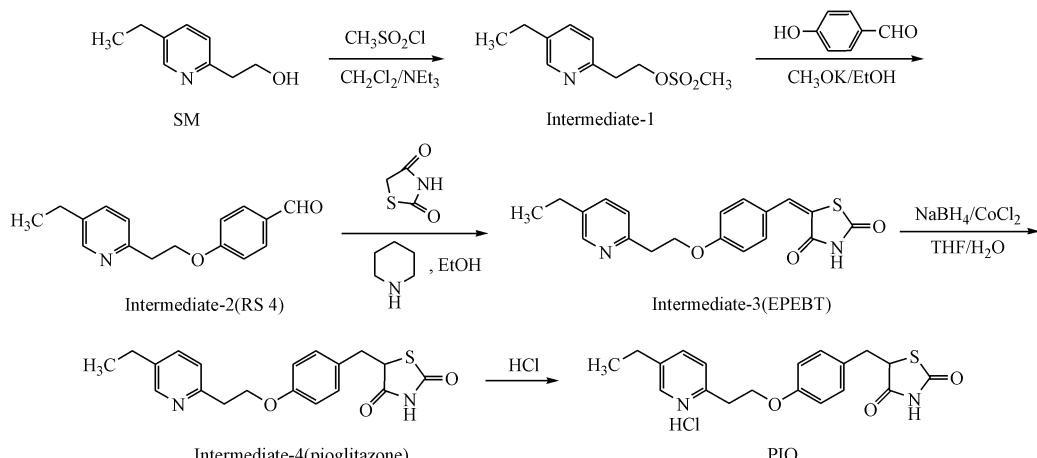
**Table 1** Structures of PIO and its relative substances (RSs) identified by hyphenated LC-MS techniques

Impurity	RRT	[M+H] <sup>+</sup> /(m/z)	Ion formula	Score/dif	Product ions/(m/z)	Origins <sup>*</sup>
RS 1	0.47	299, 175 4	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	94.82/2.25	282, 240, 134, 119	Dr
RS 2	0.48	258, 148 9	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	97.79/0.99	240, 228, 134, 119, 106	Pr
RS 3	0.67	359, 142 4	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	91.37/1.19	341, 316, 240, 134, 119, 106	Pr
RS 4	0.83	256, 133 2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	98.31/0.18	134, 119, 106	Pr
PIO	1.00	357, 126 7	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	96.22/0.93	286, 240, 134, 119, 106	API
RS 5	1.15	341, 131 8	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	97.41/0.24	240, 228, 134, 119	Pr
RS 6	1.17	332, 131 5	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	95.26/1.25	314, 286, 254, 240, 134, 119, 106	Dr

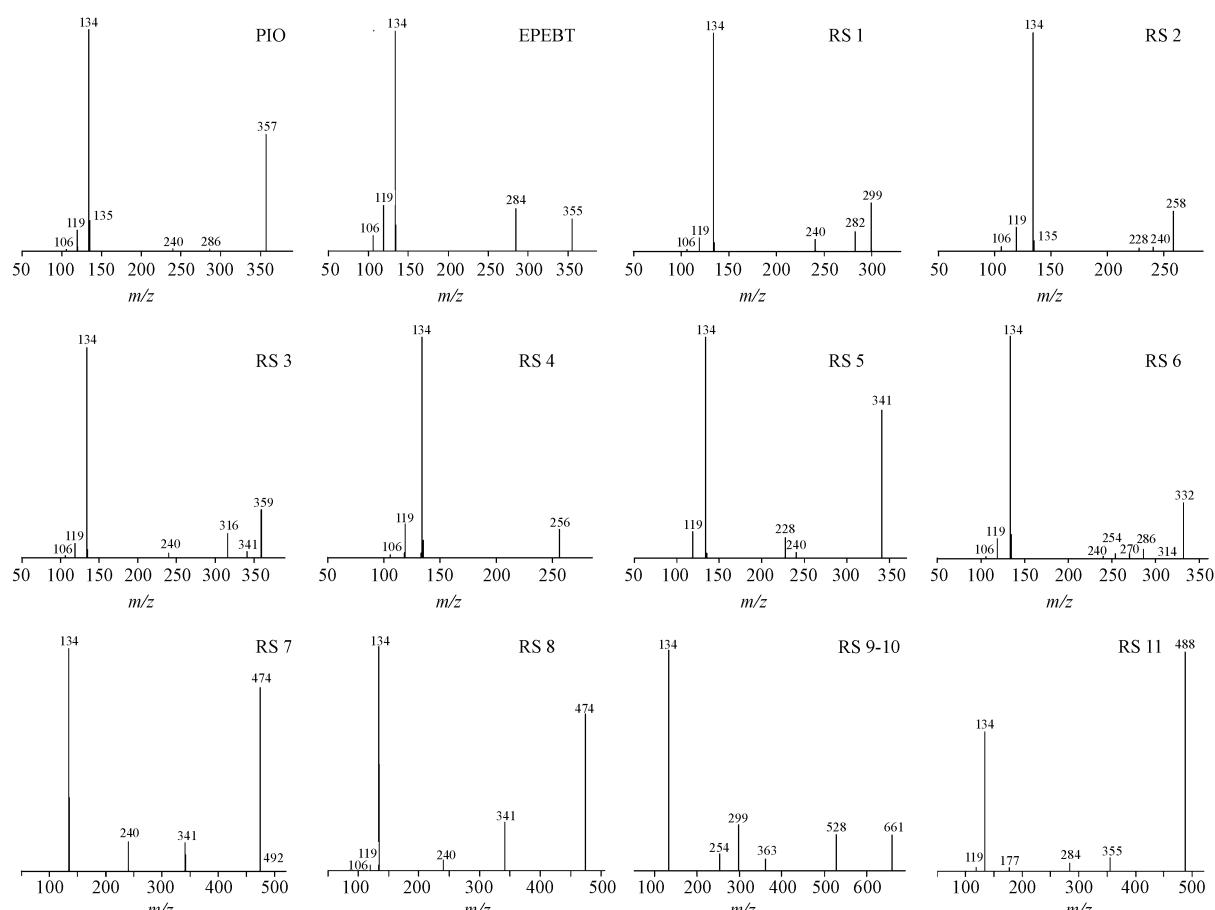
(Continued)

Impurity	RRT	$[\text{M} + \text{H}]^+ / (\text{m/z})$	Ion formula	Score/dif	Product ions/ ( $\text{m/z}$ )	Origins *
RS 7	1.30	492, 231, 5	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}^+$	99.13/0.90	474, 341, 240, 134	Pr
EPEBT	1.87	355, 111, 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$	87.53/1.59	284, 134, 119, 106	Pr
RS 8	1.97	474, 221, 0	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}^+$	97.74/0.08	341, 240, 134, 119, 106	Pr
RS 9&10	2.53/2.61	661, 240, 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2^+$	99.85/0.25	528, 363, 299, 254, 134	Dr
RS 11	2.91	488, 200, 2	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}^+$	97.23/1.12	355, 284, 177, 134, 119	Pr

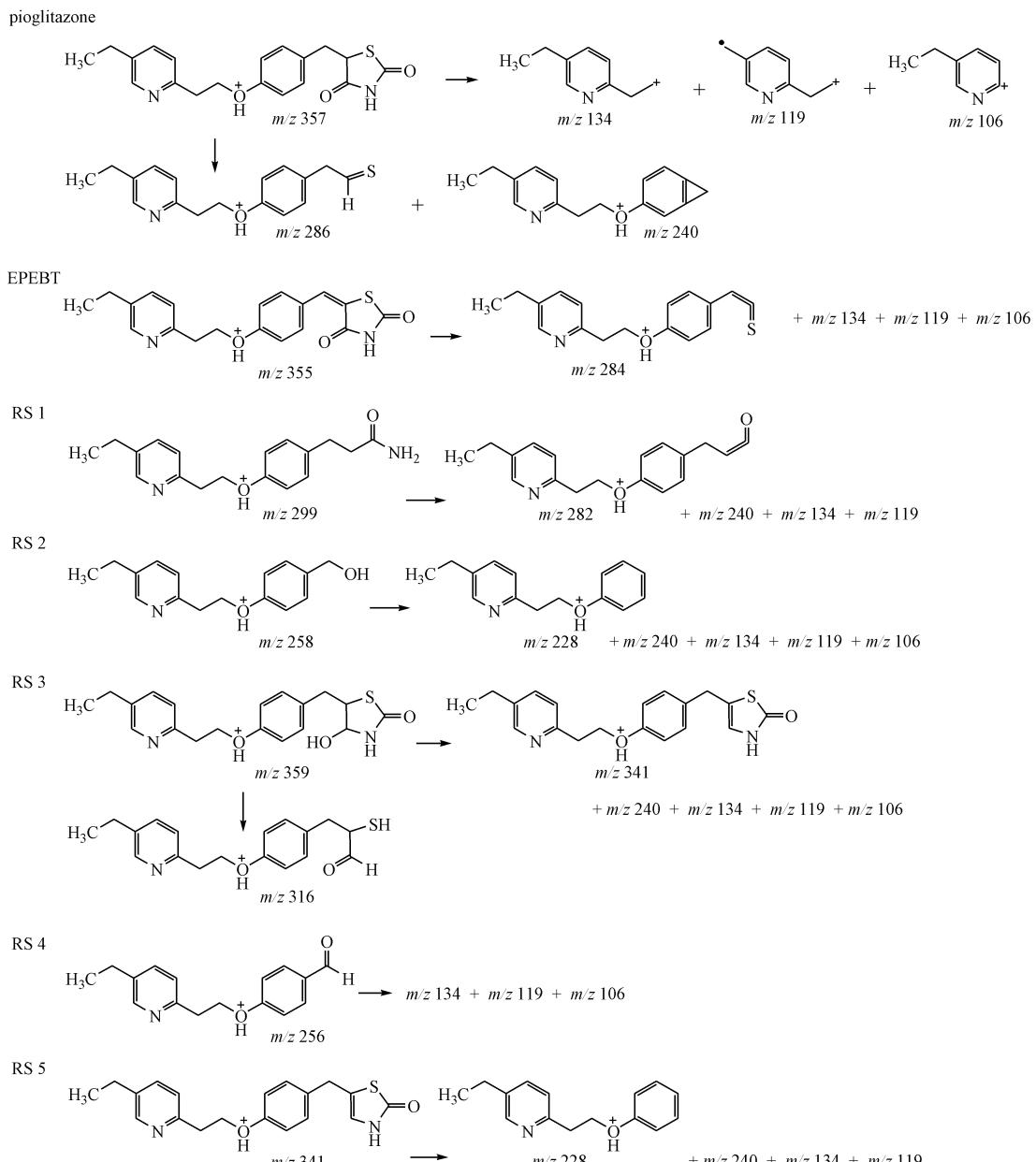
RRT: Relative retention time with reference to PIO; Pr: Process related substance, Dr: Degradation product



**Figure 3** Synthetic route of pioglitazone hydrochloride



**Figure 4** MS/MS spectra of  $[M + H]^+$  ions of pioglitazone and its RS 1-RS 11



**Figure 5** MS/MS fragmentation pathways of product ions of  $[M + H]^+$  for pioglitazone, EPEBT and RSs 1-5

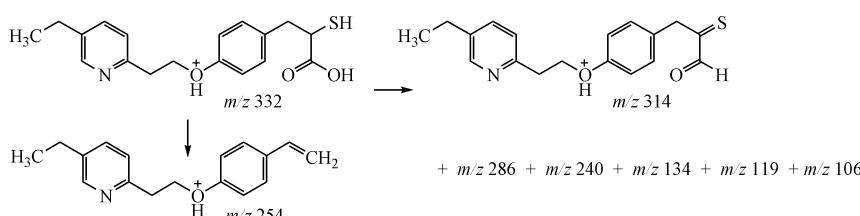
**吡格列酮:** 吡格列酮的质谱分析对于分析鉴定其有关物质结构具有参考意义。TOF/MS 测得吡格列酮  $[M + H]^+$  的准确质量为 357.1267, 与离子式  $C_{19}H_{21}N_2O_3S^+$  相应; 其 MS/MS 主要特征碎片离子  $m/z$  为 286、240、134、119 和 106。 $m/z$  240 和 286 分别与  $[M + H]^+$  离子脱去 2,4-噻唑烷二酮或其开环裂解脱去乙二酰亚胺分子相应; $m/z$  134、119 和 106 均为乙氧基苯基醚键裂解产生的特征碎片离子。

**吡格烯:** 吡格烯是盐酸吡格列酮合成的重要中间体, 其质谱碎片分析对盐酸吡格列酮未知杂质结

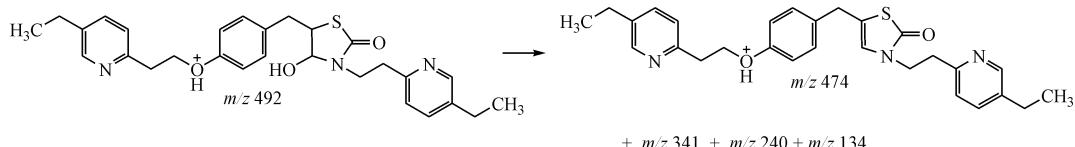
构的鉴定也具有参考价值。TOF/MS 测得吡格烯  $[M + H]^+$  的准确质量为 355.1111, 与离子式  $C_{19}H_{19}N_2O_3S^+$  相应; 其 MS/MS 主要特征碎片离子  $m/z$  为 284、134、119 和 106。由于吡格烯与吡格列酮中的苯甲基不同, 不产生特征的  $m/z$  240 碎片离子, 其他碎片均与吡格列酮的产生方式一致。

**有关物质 1** 有关物质 1 是氧化条件下吡格列酮的主要降解产物之一, 其色谱保留较主峰显著减弱, 可见有关物质 1 的极性大于吡格列酮。TOF/MS 测得有关物质 1  $[M + H]^+$  的准确质量为 299.1754, 与离子式  $C_{18}H_{23}N_2O_2^+$  相应, 与吡格列酮

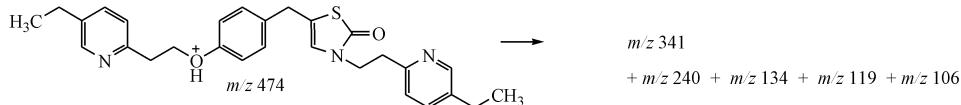
RS 6



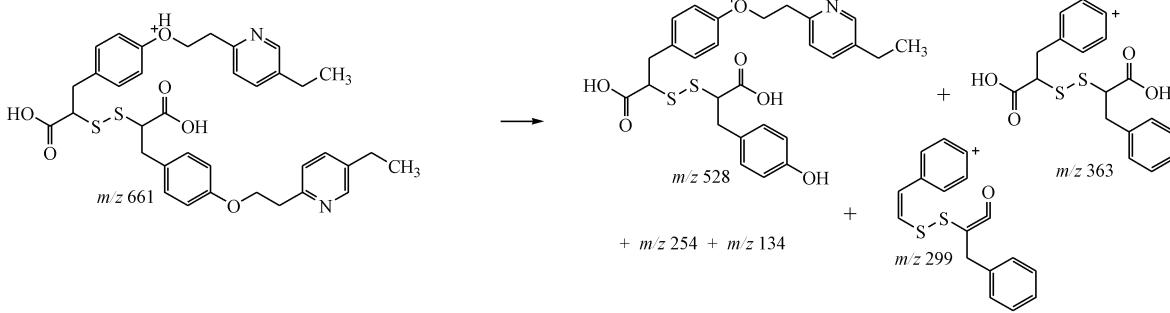
RS 7



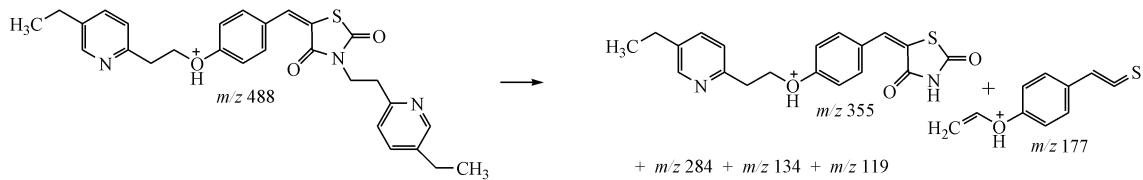
RS 8



RS 9&amp;10



RS 11

**Figure 6** MS/MS fragmentation pathways of product ions of  $[\text{M} + \text{H}]^+$  for RSs 6-11

$[\text{M} + \text{H}]^+$  相比相对分子质量少 50 ( $+2\text{H} - \text{COS}$ )。特征碎片离子  $m/z$  240、134 和 119 均与吡格列酮的特征碎片一致, 证明与吡格列酮相比, 除 2,4-噻唑烷二酮单元外, 其他结构单元未发生改变。根据 COS 元素组成差异, 有关物质 1 为吡格列酮中 2,4-噻唑烷二酮单元氧化降解, 脱去酰硫基团, 生成酰胺的产物; MS/MS 主要特征碎片离子  $m/z$  282 和 240 确证了该替代特征, 它们分别与  $[\text{M} + \text{H}]^+$  离子脱去  $\text{NH}_3$  和乙酰氨基相应。故, 有关物质 1 为 2,4-噻唑烷二酮被乙酰氨基替代的吡格列酮。来源于吡格列酮中噻唑烷二酮环在氧化破坏条件下的水解开环。

有关物质 2 有关物质 2 是吡格烯还原成吡格列酮过程中引入的工艺杂质, 其色谱保留较主峰

显著减弱, 可见有关物质 2 的极性大于吡格列酮。TOF/MS 测得有关物质 2  $[\text{M} + \text{H}]^+$  的准确质量为 258.1489, 与离子式  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_2^+$  相应, 与吡格列酮  $[\text{M} + \text{H}]^+$  相比相对分子质量少 99 ( $\text{C}_3\text{HNOS}$ ), 特征碎片离子  $m/z$  240、134、119 和 106 均与吡格列酮的相应特征碎片一致, 证明与吡格列酮相比, 除 2,4-噻唑烷二酮单元外, 其他结构单元未发生改变。 $m/z$  240 和 228 特征碎片分别与  $[\text{M} + \text{H}]^+$  离子脱去  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{CH}_2 = \text{O}$  相应, 证明分子结构中存在羟甲基。故, 有关物质 2 为 2,4-噻唑烷二酮被羟基替代的吡格列酮。来源于吡格烯还原成吡格列酮过程中的过度还原和水解。

有关物质 3 有关物质 3 是吡格烯还原成吡格列酮过程中引入的工艺杂质, 其色谱保留较主峰

减弱,可见有关物质 $\mathbf{3}$ 的极性大于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{3}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为359.1424,与离子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ 相应,与吡格列酮 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子式相比多2个H原子。主要碎片离子 $m/z$ 240、134、119和106均与吡格列酮的相应特征碎片一致,证明与吡格列酮相比,除2,4-噻唑烷二酮单元外,其他结构单元未发生改变。根据 $2\text{H}$ 元素组成差异及合成工艺,有关物质 $\mathbf{3}$ 为吡格列酮中2,4-噻唑烷二酮单元的4位羰基还原为羟基的产物;MS/MS主要特征碎片离子 $m/z$ 341和316分别与 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子脱去 $\text{H}_2\text{O}$ 和异氰酸分子相应,确证了该还原特征。有关物质 $\mathbf{3}$ 来源于吡格列酮还原成吡格列酮过程中的过度还原。

**有关物质 $\mathbf{4}$**  有关物质 $\mathbf{4}$ 是吡格列酮合成过程中引入的工艺杂质,其色谱保留较主峰减弱,可见有关物质 $\mathbf{4}$ 的极性大于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{4}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为256.1332,与离子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$ 相应,与吡格列酮 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 相比相对分子质量少101( $-\text{C}_3\text{H}_3\text{NOS}$ )。主要特征碎片离子 $m/z$ 134、119和106均与吡格列酮的相应特征碎片一致,证明与吡格列酮相比,除5-甲基-2,4-噻唑烷二酮单元外,其他结构单元未发生改变。根据其与吡格列酮的元素组成差异及合成工艺,有关物质 $\mathbf{4}$ 也为中间体-2;其在吡格列酮的合成中被引入,但是,还原工艺后,该杂质含量显著降低。吡格列酮强酸和氧化降解时,也使有关物质 $\mathbf{4}$ 的含量有所增大。故,有关物质 $\mathbf{4}$ 既为盐酸吡格列酮的合成中间体-2,又为吡格列酮的降解产物。

**有关物质 $\mathbf{5}$**  有关物质 $\mathbf{5}$ 是吡格列酮还原成吡格列酮过程中引入的工艺杂质,其色谱保留与主峰相近,可见有关物质 $\mathbf{5}$ 的极性与吡格列酮相近。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{5}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为341.1318,与离子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 相应,与吡格列酮 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子式相比少1个O原子。主要碎片离子 $m/z$ 240、134和119与吡格列酮的相应特征碎片离子一致,证明与吡格列酮相比,除2,4-噻唑烷二酮单元外,其他结构单元未发生改变。未产生与噻唑环裂解有关的碎片,与4位羰基还原脱水形成碳碳双键增加了噻唑酮环的稳定性相应。故有关物质 $\mathbf{5}$ 为4位羰基还原脱水的吡格列酮,来源于吡格列酮还原成吡格列酮过程中的过度还原和进一

步脱水。

**有关物质 $\mathbf{6}$**  有关物质 $\mathbf{6}$ 是碱性条件下吡格列酮的主要降解产物之一,其色谱保留与主峰相近,证明有关物质 $\mathbf{6}$ 的极性与吡格列酮相近。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{6}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为332.1315,与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3\text{S}^+$ 相应,与吡格列酮 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 相比相对分子质量少25( $+\text{H} - \text{CN}$ ),主要碎片离子 $m/z$ 240、134、119和106均与吡格列酮相应特征碎片一致,证明与吡格列酮相比,除2,4-噻唑烷二酮单元外,其他结构单元未发生改变。 $m/z$ 314和286特征碎片分别与 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子脱去 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{HCOOH}$ 中性分子相应,证明2,4-噻唑烷二酮单元在碱性条件下开环水解形成包含羧酸的结构单元,同时脱去内酰胺。故有关物质 $\mathbf{6}$ 为2,4-噻唑烷二酮被2-巯基乙酸基替代的吡格列酮。来源于吡格列酮中噻唑烷二酮环在碱破坏条件下的水解开环。

**有关物质 $\mathbf{7}$**  有关物质 $\mathbf{7}$ 是吡格列酮还原成吡格列酮过程中引入的工艺杂质,其色谱保留较主峰增强,可见有关物质 $\mathbf{7}$ 的极性小于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{7}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为492.2315,与离子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}^+$ 相应,与吡格列酮的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 相比相对分子质量多135( $+\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$ )。特征碎片离子 $m/z$ 240、134和119均与吡格列酮的特征碎片一致,证明与吡格列酮相比,除2,4-噻唑烷二酮单元外,其他结构单元未发生改变。 $m/z$ 474和 $m/z$ 341特征碎片分别与 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子脱去 $\text{H}_2\text{O}$ 及同时脱去(5-乙基-吡啶-2-基)-乙烯分子相应,证明2,4-噻唑烷二酮单元在还原工艺中发生3位 $N$ -(5-乙基-吡啶-2-基)-乙基取代,同时4位羰基被过度还原为羟基。故,有关物质 $\mathbf{7}$ 为吡格列酮与过量的中间体-1反应形成的副产物参与后续还原的产物。

**有关物质 $\mathbf{8}$**  有关物质 $\mathbf{8}$ 是吡格列酮还原成吡格列酮过程中引入的工艺杂质,其色谱保留较主峰增强,可见有关物质 $\mathbf{8}$ 的极性小于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质 $\mathbf{8}[\text{M} + \text{H}]^+$ 的准确质量为474.2210,与离子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}^+$ 相应,与有关物质 $\mathbf{7}[\text{M} + \text{H}]^+$ 相比相对分子质量少18( $-\text{H}_2\text{O}$ )。主要特征碎片离子 $m/z$ 341、240和134均与有关物质 $\mathbf{7}$ 的相应特征碎片一致,证明与有关物质 $\mathbf{7}$ 相比,除2,4-噻唑烷二酮单元中4位羟基外,其他结

构单元未发生改变。故,有关物质<sup>8</sup>为有关物质<sup>7</sup>的脱水产物,来源于吡格烯与过量的中间体-1反应形成的副产物参与后续还原脱水。

**有关物质9、10** 有关物质<sup>9</sup>和<sup>10</sup>是碱性条件下吡格列酮的主要降解产物,其色谱保留相近且较主峰增强,可见有关物质<sup>9</sup>和<sup>10</sup>的极性相近且小于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质<sup>9</sup>、<sup>10</sup>的 $[M + H]^+$ 和 $[M + 2H]^{2+}$ 的准确质量均分别为661.240 1和331.123 7,与离子式 $C_{36}H_{41}N_2O_6S_2^+$ 和 $C_{36}H_{42}N_2O_6S_2^{2+}$ 相应,它们 $[M + H]^+$ 离子的MS/MS主要特征碎片离子均为 $m/z$  528、363、299、254和134,而两者在反相色谱柱上的保留时间略有不同,推断杂质<sup>9</sup>与杂质<sup>10</sup>互为非对映异构体。与有关物质<sup>6</sup> $[M + H]^+$ 的离子式比较分析表明,有关物质<sup>9</sup>、<sup>10</sup>均为两分子有关物质<sup>6</sup>的二聚体。MS/MS主要特征碎片离子证明了该二聚体通过二硫键连接的结构特征: $m/z$  528和363碎片分别与

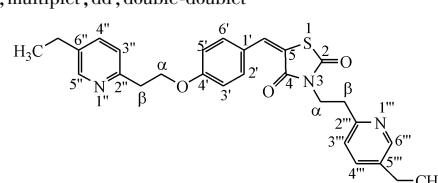
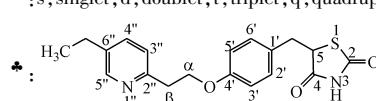
$[M + H]^+$ 离子脱去单分子(5-乙基-吡啶-2-基)-乙烯基和双分子(5-乙基-吡啶-2-基)-乙氧基单元相应; $m/z$  363碎片进一步脱去HCOOH和羧酸邻位脱 $H_2O$ 则生成特征碎片离子 $m/z$  299。所以,有关物质<sup>9</sup>和<sup>10</sup>为吡格列酮中噻唑烷二酮环在碱破坏条件开环降解形成的有关物质<sup>6</sup>通过二硫键形成的二聚体。它们二级质谱中同时具有的特征碎片 $m/z$  254和134与有关物质<sup>6</sup>相应,进一步确证了二硫键二聚体的结构特征。

**有关物质11** 有关物质<sup>11</sup>是吡格烯合成过程中引入的工艺杂质,其色谱保留较主峰增强,可见有关物质<sup>11</sup>的极性小于吡格列酮。TOF/MS测得有关物质<sup>11</sup>的 $[M + H]^+$ 的准确质量为488.200,与离子式 $C_{28}H_{30}N_3O_3S^+$ 相应,与吡格烯 $[M + H]^+$ 相比相对分子质量多133(+ $C_9H_{11}N$ ),与1个(5-乙基-吡啶-2-基)-乙基取代相应。特征碎片 $m/z$  355、284、134和119均与吡格烯的特征

Table 2  $^1H$  NMR assignments for PIO and RS 11

PIO				RS 11			
Positions*	$\delta_H$	Mult.	Integ. H	Positions*	$\delta_H$	Mult.	Integ. H
1	-	-	-	1	-	-	-
2	-	-	-	2	-	-	-
3	12.088	s	1	3	-	-	-
4	-	-	-	4	-	-	-
5	4.883	t	1	5	-	-	-
-	-	-	-	$3\alpha$	3.989	t	2
-	-	-	-	$3\beta$	3.019	t	2
Ph-CH <sub>2</sub> -	3.322	m	2	Ph-CH=	7.843	s	1
1'	-	-	-	1'	-	-	-
2' / 6'	7.164	d, d	1, 1	2' / 6'	7.584	d, d	1, 1
3' / 5'	6.896	d, d	1, 1	3' / 5'	7.108	d, d	1, 1
4'	-	-	-	4'	-	-	-
1''	-	-	-	1'' / 1'''	-	-	-
2''	-	-	-	2'' / 2'''	-	-	-
3''	8.017	d	1	3'' / 3'''	7.288 / 7.195	dd	2
4''	8.442	d	1	4'' / 4'''	7.554	dd	2
5''	-	-	-	5'' / 5'''	-	-	-
6''	8.727	s	1	6'' / 6'''	8.372 / 8.322	d	2
CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ )	4.436	t	2	CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ / N $\alpha$ )	4.445	t	2
CH <sub>2</sub> ( $\beta$ )	3.555	t	2	CH <sub>2</sub> ( $\beta$ / N $\beta$ )	3.183	t	2
CH <sub>2</sub> (5'')	2.825	q	2	CH <sub>2</sub> (5'' / 5''')	2.600	m	4
CH <sub>3</sub> (5'')	1.248	t	3	CH <sub>3</sub> (5'' / 5''')	1.195	m	6

\* : s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet; dd, double-doublet



碎片离子一致,证明有关物质<sup>11</sup>具有完整的吡格列酮结构单元。 $m/z$  355与 $[M + H]^+$ 离子脱去(5-乙基-吡啶-2-基)-乙烯分子相应。所以,有关物质<sup>11</sup>为吡格列酮的2,4-噻唑烷二酮的3位N-(5-乙基-吡啶-2-基)-乙基取代的产物;并经合成制备和<sup>1</sup>H NMR与吡格列酮比较确证(表2):有关物质<sup>11</sup>氢谱中少了噻唑二酮环中3位N质子 $\delta_H$  12.1(1H,s)及5位质子 $\delta_H$  4.9(1H,s)的两个共振峰, $\delta_H$  7.29(dd,2H), $\delta_H$  7.55(dd,2H), $\delta_H$  8.37(d,2H), $\delta_H$  2.60(m,4H)和 $\delta_H$  1.20(m,6H)与两组“(5-乙基-吡啶-2-基)-乙基”结构的质子相应。故确证有关物质<sup>11</sup>为3位N-(5-乙基-吡啶-2-基)-乙基取代的吡格列酮,为吡格列酮与过量的中间体-1副反应的产物。

#### 4 讨 论

本研究建立了挥发性流动相的液-质联用色谱条件用于吡格列酮有关物质分离和检测鉴定。

流动相中缓冲溶液的pH为影响分离的关键因素。在pH 2.5~6.0范围内,pH减小,保留减弱,但有利于改善主峰与其相邻杂质的分离,经优化选择流动相中缓冲溶液的pH为3.0。通过调整有机相的组成和比例可获得理想的保留和分离。为了兼顾分离和电喷雾离子化的效率,优化确定以甲醇-0.1%乙酸铵缓冲液(pH 3.0)为流动相进行梯度洗脱,色谱分离良好。吡格列酮与其主要有关物质均具有吡啶及苯环的共轭结构,因此在226及269 nm处有最大吸收,考虑到挥发性流动相中存在有较大UV末端背景吸收的乙酸铵、甲酸等添加剂,干扰杂质的低波长检测,因此选用269 nm作为检测波长。

检出并鉴定了吡格列酮中的11个主要有关物质。根据杂质来源可将其分为工艺杂质(中间体和反应副产物)和降解杂质两类(图7)。有关物质<sup>4</sup>为反应中间体-2,且在强酸及氧化条件下含量有所增加;有关物质<sup>11</sup>为吡格列酮合成过程中引入的副产物;有关物质<sup>2,3,5,7,8</sup>为吡格列酮还原合成吡格列酮过程中引入的副产物。通过合成条件优化与精制纯化等措施,实现了原料药中各有关物质含量有效控制,采用0.1%主成分自身对照法估算有关物质的含量,只有有关物质<sup>8</sup>的含量大于0.1%。工艺杂质的结构鉴定及来源分析对于工艺优化和质量控制具有重要指导意义。

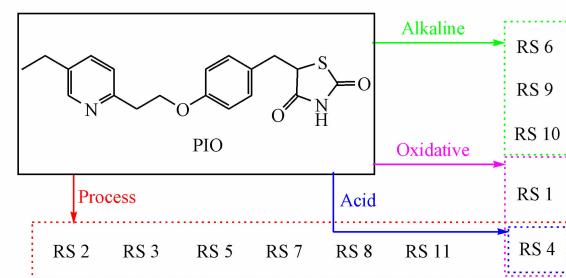


Figure 7 Correlation of the RSs in pioglitazone hydrochloride and the stress conditions

强制降解试验表明,吡格列酮在碱和氧化条件下噻唑烷二酮环易水解开环或开环聚合。有关物质<sup>1</sup>和<sup>6</sup>是吡格列酮中噻唑烷二酮环水解开环的降解产物;有关物质<sup>9</sup>和<sup>10</sup>为吡格列酮在碱性条件下噻唑烷二酮水解开环,经二硫键聚合成的非对映异构体,并又可能分别含有各自的对映异构体<sup>[17]</sup>。通过强制降解实验对降解产物及降解途径进行研究,有助于评估药物的内在稳定性,为药物的存储条件及质量控制提供参考<sup>[18~19]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [1] Gillies PS, Dunn CJ. Pioglitazone [J]. Drugs, 2000, **60**(2):333~343.
- [2] Bajpeyi S, Pasarica M, Conley KE, et al. Pioglitazone-induced improvements in insulin sensitivity occur without concomitant changes in muscle mitochondrial function [J]. Metab Clin Exp, 2017, **69**:24~32.
- [3] Yasmin S, Jayaprakash V. Thiazolidinediones and PPAR orchestra as antidiabetic agents: from past to present [J]. Eur J Med Chem, 2017, **126**:879~893.
- [4] Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease [J]. Trends Pharmacol Sci, 2005, **26**(5):244~251.
- [5] Smith U. Pioglitazone: mechanism of action [J]. Int J Clin Pract Suppl, 2001(121):13~18.
- [6] Derosa G. Efficacy and tolerability of pioglitazone in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with other oral antihyperglycaemic agents [J]. Drugs, 2010, **70**(15):1945~1961.
- [7] Qingju LI, Pengnuo LI, Tian C. Effects of treatment of pioglitazone combined with insulin on beta-cell function [J]. J Med Forum, 2005, **26**(1):32~34.
- [8] Stolar M. Safety and efficacy of pioglitazone/metformin combination therapy in treatment of type 2 diabetes: a rationale for earlier use [J]. Clin Med Insights Ther, 2009, **1**(3):445~451.
- [9] Sen S, Sinha S, Gupta K. Comparative evaluation of effects of combined oral anti-diabetic drugs (sulfonylurea plus pioglitazone and sulfonylurea plus metformin) over lipid parameters in type 2

- diabetic patients [J]. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 2013, 2 (3):257.
- [10] Srinivasulu D, Sastry BS, Prakash GO, et al. A new RP-HPLC method for separation and determination of process related impurities in pioglitazone hydrochloride API[J]. *J Sci Ind Res*, 2014, 73(9):618-621.
- [11] Xun YB, Jiang LG, Kai D, et al. The related substances research and product evaluation for pioglitazone hydrochloride oral solid dosage form[J]. *Drug Stand China*(中国药品标准), 2011, 12 (6):450-454.
- [12] Rashmitha N, Rao CS, Chandra K, et al. A validated stability indicating HPLC method for the determination of impurities in pioglitazone hydrochloride [J]. *Der Pharma Chemica*, 2010, 2 (5):426-433.
- [13] Chinnalalaiah R, Pigili R, Avanapu SR. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for quantitative determination of pioglitazone and its metabolite 5-hydroxy pioglitazone in human plasma[J]. *Ann Pharm Fr*, 2017, 75(2):105-111.
- [14] Jagadeesh B, Bharathi D V, Pankaj C, et al. Development and validation of highly selective and robust method for simultaneous estimation of pioglitazone, hydroxypioglitazone and metformin in human plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 930:136-145.
- [15] Karra VK, Pillai NR, Inamadugub JK, et al. Simultaneous determination of pioglitazone and candesartan in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Anal*, 2012, 02(3):167-173.
- [16] Ramulu K, Kumar TT, Krishna SR, et al. Identification, isolation and characterization of potential degradation products in pioglitazone hydrochloride drug substance [J]. *Pharmazie*, 2010, 65 (3):162-168.
- [17] ICH. Stability testing of new drug substances and products [EB/OL]. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>.
- [18] Ngwa G. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development[J]. *Drug Deliv Technol*, 2010, 10 (5):56-59.
- [19] Rawat T, Pandey IP. Forced degradation studies for drug substances and drug products-scientific and regulatory considerations [J]. *J Pharm Sci Res*, 2015, 7(5):238-241.

## · 新药信息 ·

### 2018 预测: 六大创新医疗技术展望(1)

健点子 ihealth 精心挑选出六项医疗技术和产品,作为 2018 年的展望。

#### 1. 智能药上路

美国 FDA 批准了第一个智能药,这个带有芯片的药能追踪用药,帮助提供患者依从性。这个由大冢(Otsuka)制药和位于加州的 Proteus 数字健康的智能药丸,获得了美国食品药品管理局 FDA 的批准。自从 5 月提交申请,到最近获批,整个过程也就 6 个月时间。治疗精神分裂症和阿尔茨海默病的安律凡(Abilify)智能药片成为世界首个带有芯片的智能药。这个组合药将大冢的安律凡(阿立哌唑)包埋进 Proteus 的可摄取传感器中,从而追踪患者的用药情况,并可以及时作出指导。阿立哌唑是世界级重磅抗焦虑和精神分裂症药。对于中枢神经系统和慢病来说,遵从医嘱按时正确服药尤为重要。因为如果患者不按时服药,导致额外的经济负担庞大,而且对病情控制不利。

虽然安律凡和这个传感器都已经分别在美国,中国和欧盟获批,但是,组合产品却是首获通行。就在一年前,大冢制药提交的申请被 FDA 无情拒绝,原因是其提供的安全性分析不足。公司被要求提供更多个人能够安全使用的证据。该传感器的尺寸和一粒砂砾相似,在药物片剂制作过程中嵌入。传感器会在患者胃液中被激活,与外部穿戴的传感器交流,记录安律凡片剂在患者体内的消化情况。

#### 2. 数字健康开花

类似智能药片的可追踪的数字化医疗方兴未艾。2018 可能看到更多的数字健康全面开花。从健身追踪到胰岛素管理的移动应用程序,这些数字工具可以为我们提供丰富有价值的健康信息。此外,临床证据表明,更好地了解健康状况,可以帮助我们做出更有效的决策,采取措施改善生活方式和健康选择,从而获得更好的治疗结果。

12 月 7 日,FDA 出台了三个最新指导意见,两个草案和一个最终版本。第一个指导草案“临床和病人决策支持软件”概述了临床决策支持软件(CDS)的方法”。CDS 类型的技术能提供给患者充分利用数字工具来改善决策。FDA 发布的第二项指南“21 世纪治愈法案带来的现有医疗软件政策的变化”概述了对不再被视为医疗器械的软件类的解释。

(来源:生物谷 Bioon.com,本刊有删节)