

HPLC-MS/MS 法分析孟鲁司特钠颗粒中的有关物质

王英新^{1,2}, 刘玲², 李树英², 兰颐², 聂磊^{1*}(¹ 山东大学药学院, 济南 250012; ² 山东达因海洋生物制药股份有限公司, 荣成 264300)

摘要 采用 HPLC-MS/MS 联用技术研究孟鲁司特钠颗粒的有关物质种类及来源途径。利用 HPLC-MS/MS 方法对市售孟鲁司特钠颗粒剂(顺尔宁[®], 规格 4 mg)的有关物质进行分离与质谱解析, 再根据孟鲁司特钠合成工艺、降解途径及相关文献, 确定各有关物质结构及来源。研究结果显示, 市售孟鲁司特钠颗粒中共检测到 7 个杂质, 同时基于 MS/MS 技术并结合相关文献对有关物质 1~7 的来源和结构进行了确认, 其中有关物质 7(孟鲁司特喹啉环氮氧化物)未见相关文献报道。通过对孟鲁司特钠颗粒有关物质和来源途径的研究, 将对相关制剂研究和质量控制提供参考与指导。

关键词 孟鲁司特钠; 孟鲁司特钠颗粒; 顺尔宁; 有关物质; HPLC-MS/MS

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)03-0330-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190309

引用本文 王英新, 刘玲, 李树英, 等. HPLC-MS/MS 法分析孟鲁司特钠颗粒中的有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(3): 330–336.
Cite this article as: WANG Yingxin, LIU Ling, LI Shuying, et al. Analysis of related substances in montelukast sodium granules by HPLC-MS/MS [J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(3): 330–336.

Analysis of related substances in montelukast sodium granules by HPLC-MS/MS

WANG Yingxin^{1,2}, LIU Ling², LI Shuying², LAN Yi², NIE Lei^{1*}¹School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012;²Shandong Dyne Marine Biopharmaceutical Co., Ltd., Rongcheng 264300, China

Abstract The aim of this paper was to study the species and sources of related substances in montelukast sodium granules based on HPLC-MS/MS. The related substances of the already marketed montelukast sodium granules(Singulair, 4 mg) were firstly separated and identified by HPLC-MS/MS method, and their chemical structures and sources were confirmed according to the published synthesis process and degradation studies. The results revealed that there were 7 related substances, whose chemical structures and sources were confirmed based on the MS/MS technique and the related literature. Impurity 7, montelukast quinoline ring oxynitride, had not been reported. This study systematically analyzed the related substances in the commercial product, which provides useful information for the development and quality control of the product.

Key words montelukast sodium; montelukast sodium granules; singulair; related substances; HPLC-MS/MS

白三烯为引发哮喘的重要炎性介质, 其在哮喘患儿气道中存在, 可增加哮喘患儿呼吸道血管通透性, 导致支气管黏膜水肿和平滑肌收缩, 促进黏液栓形成, 可导致支气管阻塞加重, 引发哮喘发作。孟鲁司特钠为选择性白三烯受体拮抗剂, 其与白三烯受体具有良好的亲和力, 用药后可与白三烯竞争受体, 对炎症反应进行抑制, 从而发挥抗炎和抗哮

喘作用。孟鲁司特钠适用于成人和儿童哮喘的预防和长期治疗, 包括预防白天和夜间的哮喘症状; 能够缓解哮喘急性发作, 减少激素用量, 提高患儿用药的依从性^[1]; 也适用于治疗对阿司匹林敏感的哮喘患者及预防运动引起的支气管收缩, 具有良好的临床效果^[2-3]。

孟鲁司特钠颗粒剂为儿童哮喘预防和治疗的

常用药,但目前尚未见关于孟鲁司特钠颗粒杂质谱与杂质来源详细解析的相关文献报道。有关物质作为药品质量的重要属性,关系用药安全,同时明确杂质种类与产生途径对制剂工艺开发与产品质量控制具有重要意义。因此,本文采用 HPLC-MS/MS 对市售孟鲁司特钠颗粒(顺尔宁,规格 4 mg)的杂质谱进行了研究,探究了其杂质谱中各杂质的来源与生成途径,以期对该品种的制备工艺制定及产品质量控制提供参考和指导。

1 材 料

1.1 试剂与药品

孟鲁司特钠颗粒(顺尔宁[®],规格 4 mg;美国 Merck sharp & Dohme 公司,批号 0000522303 与 0000546722);孟鲁司特钠 EP 杂质对照品均购自加拿大 Molcan 公司:杂质对照品 B(批号 121107,含量 97.6%)、杂质对照品 C(批号 121016,含量 91.9%)、杂质对照品 D(批号 121008,含量 95.3%)、杂质对照品 E(批号 121018,含量 96.7%)、杂质对照品 G(批号 121014,含量 90.1%);孟鲁司特钠原料(牡丹江恒远药业有限公司,批号 150801)。甲醇、乙腈、三氟乙酸为色谱纯,水为超纯水(电阻系数 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$,本实验室制备)。

1.2 仪 器

高效液相质谱联用仪(美国安捷伦公司,包含 1290 高效液相色谱仪、6460 Triple Quad LC/MS 质谱、Mass Hunter 工作站)。

2 方 法

2.1 检测条件

色谱条件:菲罗门苯基-己基柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);流动相 A:0.15% 三氟乙酸水溶液;流动相 B:0.15% 三氟乙酸乙腈;梯度洗脱流动相 A 比例变化:0~10 min 为 60%,10~25 min 由 60%~32%,并保持 32% 至 40 min,40.1 min 变更为 60%,并持续至 45 min;流速 1.0 mL/min;检测波长 238 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

质谱条件:电喷雾电离源,正离子化,喷雾电压 4 000 V,雾化器压力 50 psi(1 psi = 6.895 kPa),毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,碰撞气为高纯氮气,碰撞电压 50 eV。

2.2 样品制备

供试品溶液(避光操作):称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于孟鲁司特钠 25 mg)研细,置 50 mL 量瓶中,加甲醇-水(9:1)的混合溶液,振摇使溶解,0.45 μm 滤膜过滤即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下供试品溶液适量,光照约 5 min,生成孟鲁司特钠顺式异构体,得系统适用性溶液。精密量取 20 μL 进样测定,记录色谱图,顺式异构体与孟鲁司特钠的分离度不小于 2.5。

3 结 果

3.1 有关物质测定与杂质对照品定位

采用 HPLC-VWD(紫外可见检测器)法检测孟鲁司特钠颗粒样品的有关物质杂质谱,并使用孟鲁司特钠 EP 杂质对照品进行色谱保留时间定位,定位结果如图 1 所示。

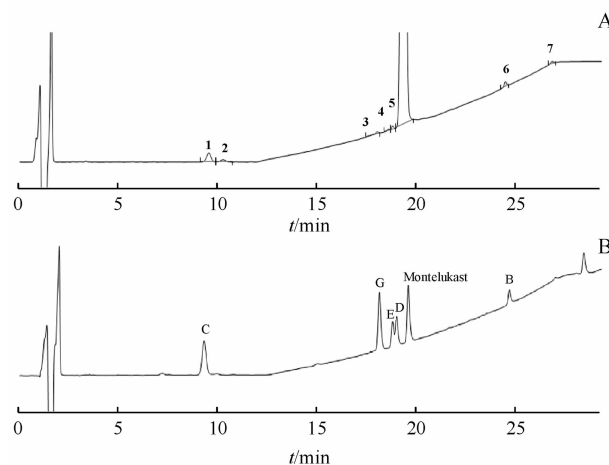


Figure 1 Montelukast sodium granule related substances and impurity references positioning

A: Montelukast sodium granule impurity spectrum; B: Montelukast + impurity references (B-G)

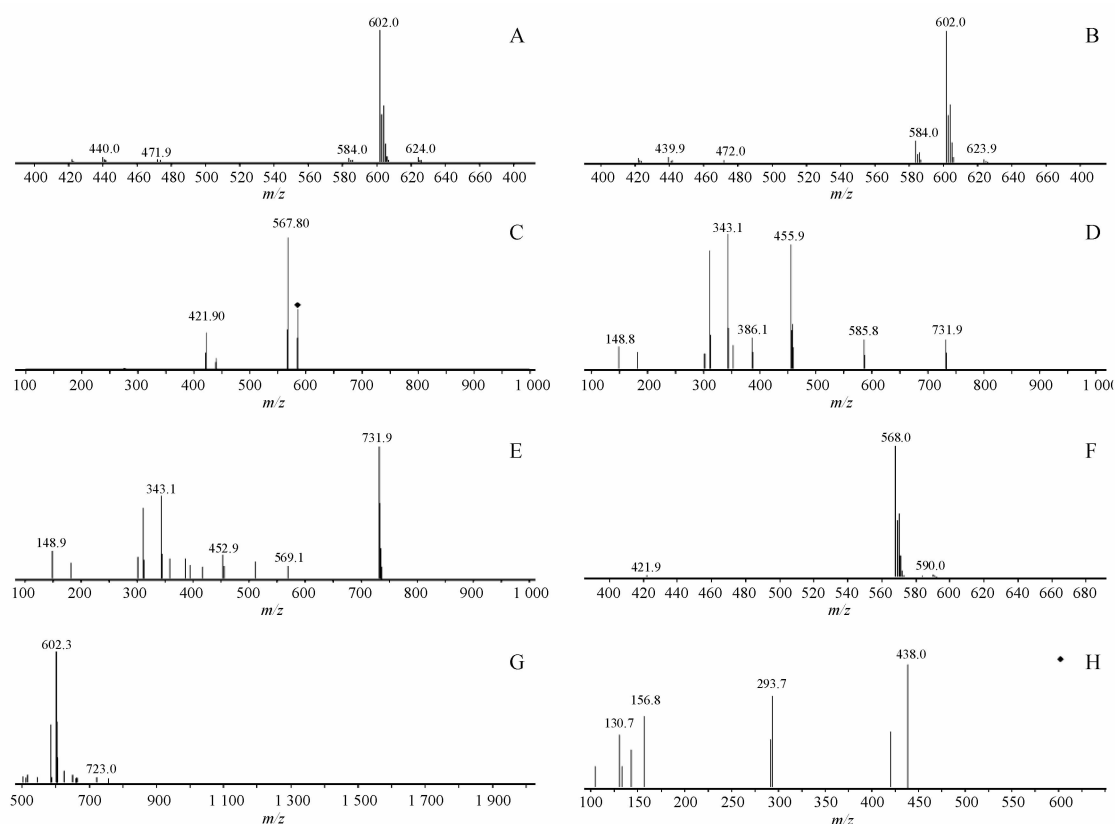
在孟鲁司特钠颗粒中检测出 7 种有关物质(编号 1~7),其中有关物质 1、3、4、5、6 的保留时间分别与孟鲁司特钠 EP 杂质对照品 C、G、E、D、B 一致,可能对应为同种物质,进而采用质谱法进行进一步的鉴定确认。

3.2 杂质鉴定

采用 HPLC-MS/MS 法测定了孟鲁司特钠颗粒有关物质 1~7 及孟鲁司特钠 EP 杂质对照品(B、C、D、E、G)的分子离子($[M+H]^+$)与二级碎片离子信息,测定结果见表 1 与图 2。

Table 1 Mass spectra results of montelukast sodium related substances

Compd.	<i>t</i> /min	$[M+H]^+ (m/z)$	Secondary fragment ion (m/z^+)	References/M
Montelukast	20.1	586	—	—
1	9.9	602	440,472,584	C/601.21
2	10.8	602	440,472,584	—
3	17.8	586	422,440,568	G/585.21
4	19.1	732	311,343,456,586	E/731.25
5	19.3	732	311,343,453,569	D/731.25
6	25.6	568	—	B/567.20
7	26.9	602	131,157,294,438	—

**Figure 2** Mass spectra of montelukast sodium related substance (A-H)A: Impurity **1**; B: Impurity **2**; C: Impurity **3** product ion; D: Impurity **4**; E: Impurity **5**; F: Impurity **6**; G: Impurity **7**; H: Impurity **7** product ion

测定结果表明,孟鲁司特钠颗粒中的有关物质**1**、**3**、**4**、**5**、**6**的分子离子与二级碎片离子分别与孟鲁司特钠 EP 杂质对照品 C(亚砷)、G(顺式异构体)、E(迈克尔加成物 2)、D(迈克尔加成物 1)、B(甲基苯乙烯)一致,可以确定其分别对应为同一物质;杂质**2**与**7**的相对分子质量较孟鲁司特钠大 16,推测此二者为孟鲁司特的氧化产物(分子内增加 1 个氧原子),在孟鲁司特分子中硫原子与氮原子可被氧化,产物分别为含亚砷与喹啉环氮氧化物结构的化合物。查阅文献,欧洲药典 8.0、美国药典 40 表明 EP 杂质 C(亚砷)存在立体异构体,共存的异构体在色谱上呈现为相邻的双峰^[4-5],杂质**2**在相对分子质量与色谱行为上满足以上特征,因

此判定杂质**2**是杂质**1**(亚砷)的异构体。假定杂质**7**为喹啉环氮氧化物,在此基础上进行二级碎片离子解析,结果表明假定与实验结果具有较高的吻合度(图 3),表明杂质**7**较可能为喹啉环氮氧化物,该杂质未见相关文献报道。

3.3 杂质来源分析

从孟鲁司特钠(原料)的合成工艺、强制降解实验及制剂工艺等方面进行分析,以明确孟鲁司特钠颗粒杂质**1**~**7**的来源途径。

3.3.1 原料合成工艺杂质分析 孟鲁司特钠原料与颗粒均由默克公司研制,孟鲁司特钠合成路线^[6]如图 4 所示,结合“3.2”项中对杂质**1**~**7**的鉴定结果,判定杂质**4**、**5**、**6**应来源于合成工艺,杂

质 4、5 为孟鲁司特钠母核分子中双键发生迈克尔加成反应生成,杂质 4 和 5 的生成途径见图 5;杂

质 6 为甲基磺酰氯 (MeSO_2Cl) 进攻分子中多余的羟基生成的副产物,杂质 6 的生成途径见图 6。

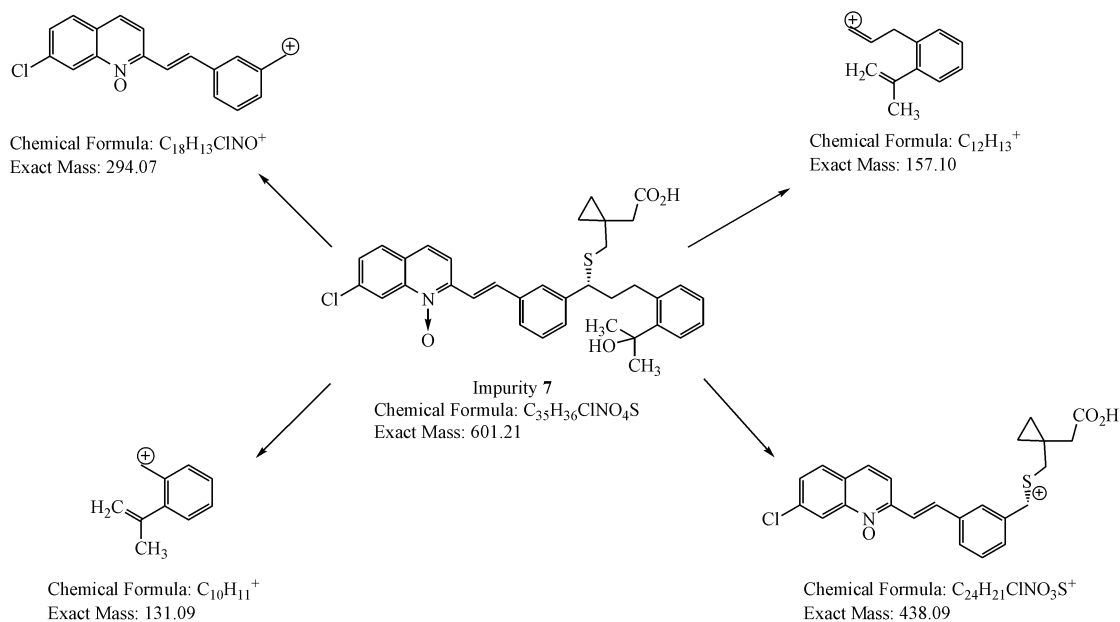


Figure 3 Structure analysis of impurity 7

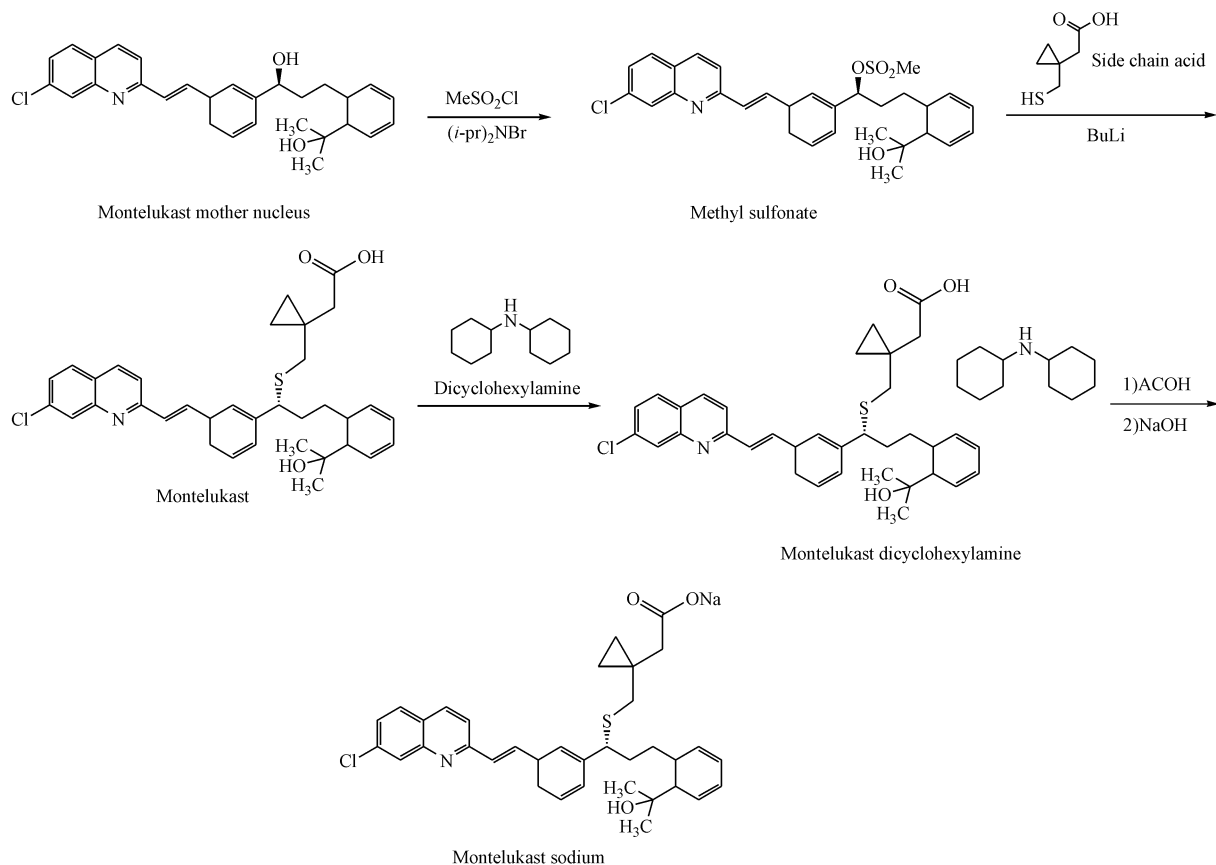


Figure 4 Synthesis pathway of montelukast sodiums

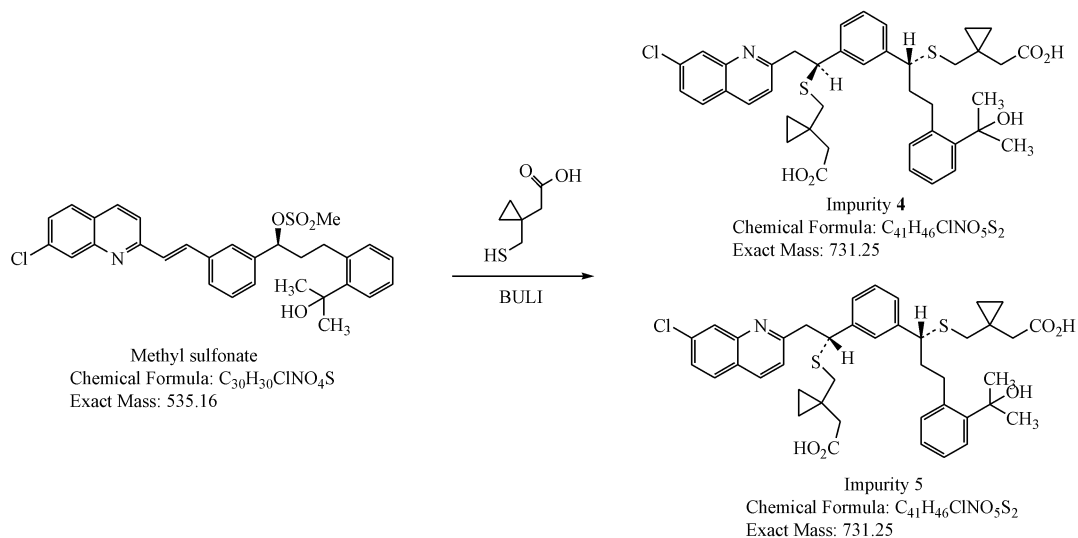


Figure 5 Formation route of impurities 4 and 5

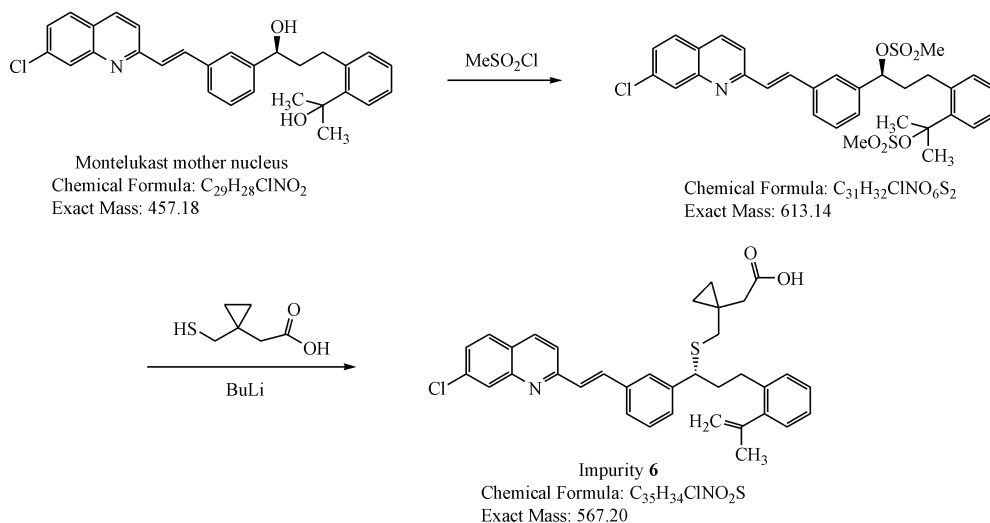


Figure 6 Formation route of impurity 6 of montelukast sodium

3.3.2 孟鲁司特钠降解杂质分析 根据文献调研信息^[7]与“3.2”项中杂质鉴定结果,杂质 1、2、3、7 应为降解产物。取孟鲁司特钠颗粒,分别进行酸、碱、氧化、光照与高温破坏,确认杂质 1、2、3、7 的降解途径。

氧化降解样品溶液制备:精密称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于原料 25 mg),置 50 mL 棕色量瓶中,加入甲醇-水(9:1)混合溶液 5 mL,加 30% 过氧化氢溶液 2 mL,室温避光放置 10 min,加混合溶液定容,摇匀,即得。

光降解样品溶液制备:精密称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于原料 25 mg),置 50 mL 无色透明量瓶中,加入甲醇-水(9:1)混合溶液约 30 mL,超

声 1 min,置 5 500 lx 光照强度下照射约 3.5 h,取出,加混合液定容,摇匀,即得。

酸降解样品溶液制备:精密称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于原料 25 mg),置 50 mL 棕色量瓶中,加入乙腈-水(9:1)混合溶液 5 mL,再加入 0.1 mol/L 的盐酸溶液 2 mL,60 °C 烘箱加热 3 h,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,加乙腈-水(9:1)混合溶液定容,摇匀,即得。

高温降解样品溶液制备:精密称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于原料 25 mg),置 50 mL 棕色量瓶中,加入甲醇-水(9:1)混合溶液适量,于 80 °C 水浴避光加热 10 d,取出,放冷至室温,加混合溶液定容,摇匀,即得。

碱降解样品溶液制备:精密称取孟鲁司特钠颗粒 3 g(约相当于原料 25 mg),置 50 mL 棕色量瓶中,加入甲醇-水(9:1)混合溶液 5 mL,再加入 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 2 mL,80 °C 水浴避光加热 10 d,取出,放冷至室温,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,加混合溶液定容,摇匀,即得。

取上述样品溶液注入高效液相色谱仪测定,降解实验色谱图如图 7 所示。

孟鲁司特钠颗粒在氧化、光照、酸性条件下稳定性较差,在高温与碱性条件下较稳定(图谱中的杂质 1、2 是在空气中氧化所致)。强制降解实验确认了杂质 1、2、3、6 可通过降解途径产生,其中杂质 1、2 来源于氧化降解,实验中发现随降解强度的增加,降解量呈等比例增长,表明杂质 1、2 的生成具有相关性,结合“3.2”项鉴定结果,杂质 1、2 的生成过程应如图 8 所示;杂质 3 来源于光照降解,据 EP8.0 孟鲁司特钠标准可知在光照条件下孟鲁司特钠可转化为顺势异构体,因此杂质 3 应为孟鲁

司特钠的顺势异构体,其转化过程为双键两侧基团由反式构型转化为顺势构型(图 9)。酸性降解条件下产生较大的杂质 6,根据“3.2”项杂质 6 的鉴定结果,判定孟鲁司特钠在酸性条件下可通过分子内羟基脱水途径生成杂质 6(图 10)。杂质 7 在降解实验未见产生。

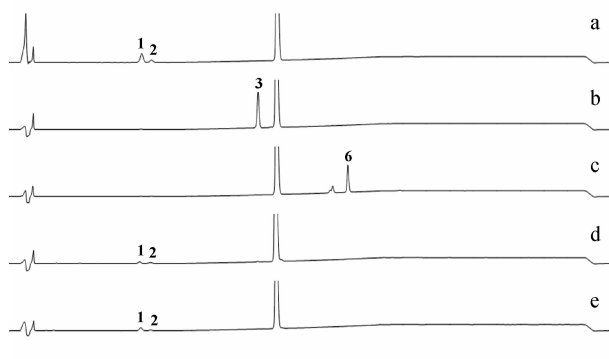


Figure 7 Degradation experimental chromatography
a: Oxidative degradation; b: Light degradation; c: Acid degradation; d: Thermal degradation; e: Alkaline degradation

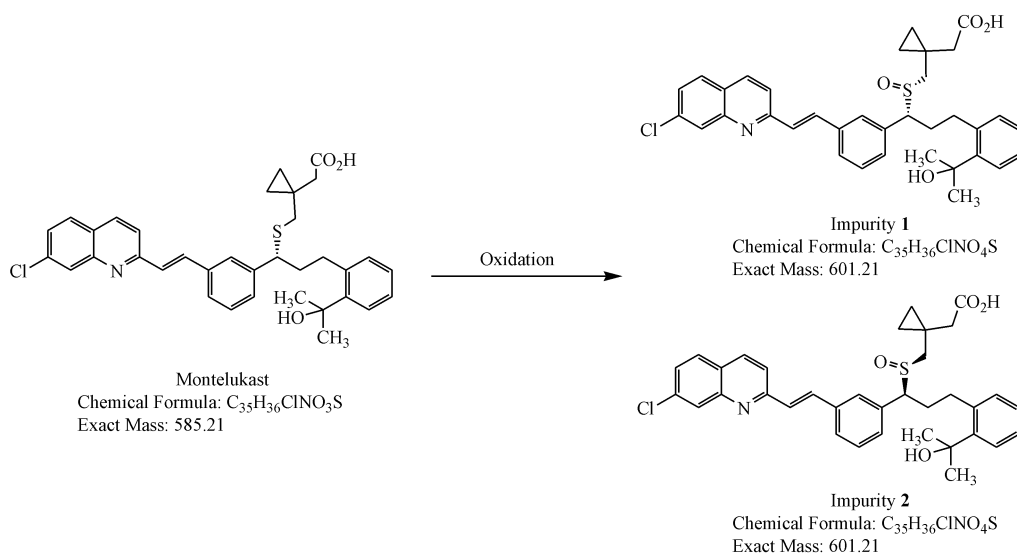


Figure 8 Formation route of impurities 1 and 2

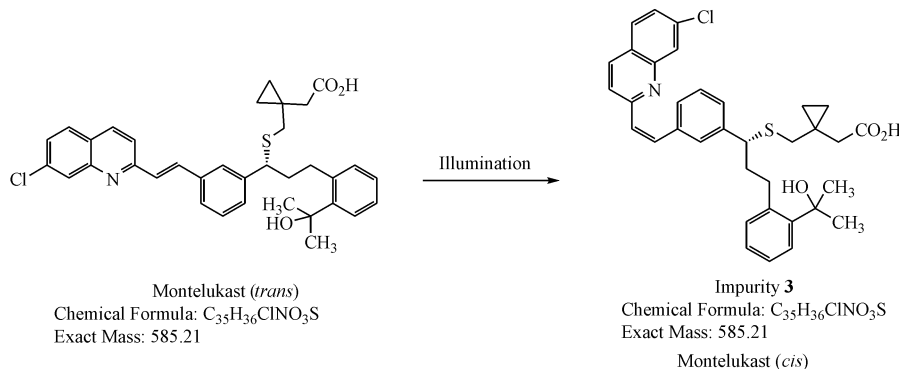


Figure 9 Formation route of impurity 3 of montelukast sodium

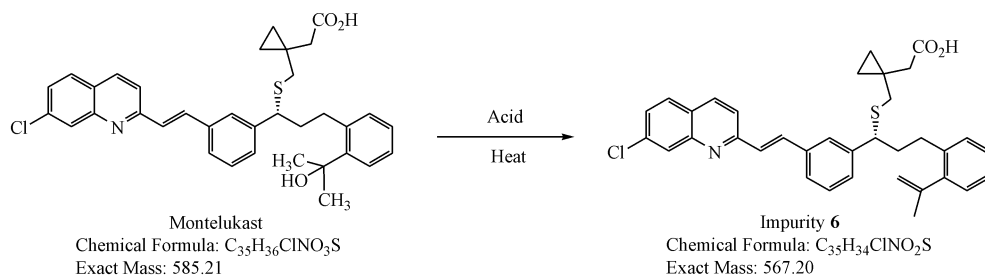


Figure 10 Acid degradation pathway of montelukast sodium

3.3.3 制剂工艺杂质分析 实验中发现孟鲁司特钠原料中未检测到有关物质 7,但以该原料按照默克公司孟鲁司特钠颗粒制备工艺^[8]制备所得的颗粒样品中却检测到了该杂质,说明有关物质 7 来源于颗粒制剂工艺。颗粒的制备工艺过程具体为先将甘露醇与羟丙基纤维素溶液经流化床(氮气做流化气)制粒干燥(约 60 °C)成空白颗粒,再将空白颗粒与孟鲁司特钠水溶液经流化床(氮气做流化气)制粒干燥(约 60 °C)成含药颗粒,最后将含药颗粒与硬脂酸镁物理混合制得成品。模仿该工艺条件下物料所处环境(60 °C,低氧)进行实验,发现孟鲁司特钠与羟丙基纤维素相互作用产生杂质 7,因孟鲁司特钠分子中具有喹啉环,查阅相关文献,表明喹啉环结构上的氮原子在弱氧化条件下加热能接受氧原子而生成喹啉环氮氧化物,该反应在强氧化条件下不易发生^[9],据此并结合“3.2”项对杂质 7 鉴定的结果,判定杂质 7 较可能为孟鲁司特钠喹啉环氮氧化物,推断其是孟鲁司特钠在低氧高温条件下喹啉环上的氮原子被辅料羟丙基纤维素或羟丙基纤维素中的环氧丙烷(制备工艺残留)氧化生成。

4 结 论

孟鲁司特钠颗粒存在 7 个有关物质(编号为 1~7),其中有关物质 1、2、3 为降解杂质,4、5、6 为原料合成工艺杂质,7 为制剂工艺杂质。有关物质 1、2 来源于氧化降解途径,为分子内的硫原子氧化生成的具亚砷基团的化合物,两者互为立体异构体;有关物质 3 来源于光照降解途径,为孟鲁司特钠(反式)的顺式异构体;有关物质 4、5 为合成反应时侧链酸与孟鲁司特母核上的双键发生加成反应生成的副产物,互为非对映异构体;有关物质 6 为合成反应时孟鲁司特母核中的羟基在甲基磺酰氯的作用下脱水生成,降解实验表明,有关物质 6 也较易通过酸性条件下羟基脱水的方式生成;有关物质 7 推断是喹啉环氮氧化物,是在高温弱氧化条件

下(约 60 °C 的氮气流中)孟鲁司特钠分子中喹啉环上的氮原子被辅料羟丙基纤维素(或其中含有成分)氧化生成,其生成量与受热温度与时间有关,温度越高,受热时间越长,生成量越大。

孟鲁司特钠在光照与氧化条件下稳定性较差,生产制备过程中应注意避光、避氧。来源于颗粒制剂过程的有关物质 7 未见相关文献报道,按照 ICH 分类属于非特定杂质,其控制限度较低(通常不大于 0.1%),研究发现有关物质 7 较易超过控制限度,导致产品质量不合格,因此,在生产过程中应严格控制物料的加热温度与受热时间,加热温度越低,受热时间越短,有关物质 7 的生成量越低。

参 考 文 献

- [1] Wang F. Application and clinical effectiveness of montelukast sodium in the treatment of asthma in children[J]. *J Chin Prescrip Drug* (中国处方药), 2017, 15(3): 76-77.
- [2] Zhao QH, Guo F. Clinical efficacy of montelukast sodium in the treatment of asthma in children[J]. *J Mod Diagn Treat* (现代诊断与治疗), 2017, 28(18): 3391-3392.
- [3] Yang J, Li J. Clinical study of montelukast sodium in the treatment of childhood asthma[J]. *J Pract Med Clin* (实用药物与临床), 2016, 19(5): 606-609.
- [4] European Pharmacopoeia Convention. *European Pharmacopoeia* 8.0 [S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2013: 2794-2796.
- [5] The United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia* 40 [S]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2017: 5220-5222.
- [6] Belley, Leger ML, Labelle S, et al. Unsaturated hydroxyalkylquinoline acids as leukotriene antagonists; US, 5565473 [P]. 1996-10-15 [2019-02-15].
- [7] Al Ommri MM. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 465-471.
- [8] Down B. Granule Formation; US, 8007830B2 [P]. 2011-08-30 [2019-02-15].
- [9] Zhou LS, Qu HM. Progress in quinoline nitrogen oxide[J]. *J Chem Propel Poly Mater* (化学推进剂与高分子材料), 2000(3): 9-11.