

# 应用液相色谱-串联质谱联用技术分析厄贝沙坦及其制剂的杂质谱

张文慧<sup>1,2</sup>, 程冬<sup>1\*</sup>, 陆益红<sup>1\*</sup>, 赵述强<sup>1</sup>, 裘旭华<sup>1</sup> (1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室, 南京 210019; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

**摘要:**目的 采用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)分析厄贝沙坦及其制剂的杂质谱。方法 采用色谱柱 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm), 以体积分数 0.1% 甲酸溶液(用氨水调节 pH 值至 3.5)-乙腈(体积比 62:38)为流动相, 等度洗脱, 对厄贝沙坦及其制剂中有关物质进行分离, 采用电喷雾-飞行时间质谱法(ESI-TOF-MS/MS)测定各有关物质分子结构信息, 并结合对照品质谱结构信息确证有关物质结构。结果 厄贝沙坦与其有关物质在该色谱条件下分离良好, 共检出 16 个有关物质, 通过对照品质谱结构信息确证其中 10 个有关物质的结构。结论 本实验建立的 LC-MS/MS 方法能够有效分离鉴定厄贝沙坦及其制剂中有关物质, 为其质量控制和工艺优化提供参考依据。

**关键词:**厄贝沙坦; 厄贝沙坦制剂; 有关物质; 杂质谱; 液相色谱-串联质谱联用

doi: 10.11669/cpj.2024.07.007 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)07-0612-15

## Analysis of Impurity Profile of Irbesartan and Its Preparations by LC-MS/MS

ZHANG Wenhui<sup>1,2</sup>, CHENG Dong<sup>1\*</sup>, LU Yihong<sup>1\*</sup>, ZHAO Shuqiang<sup>1</sup>, QIU Xuhua<sup>1</sup> (1. NMPA Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210019, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze the impurity profile of irbesartan and its preparations by LC-MS/MS. **METHODS** ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) was used for the separation of the related substances with a mixture of 0.1% formic acid solution (adjusted to pH 3.5 with ammonia) and acetonitrile (62:38) as the mobile phase by isocratic elution. The structures of the related substances were speculated by ESI-TOF-MS/MS and verified further by reference substances. **RESULTS** Irbesartan and its related substances were separated under the established chromatographic condition, and a total of 16 related substances were detected. The structures of 10 related substances were verified by reference substances. **CONCLUSION** The established LC-MS/MS method is effective for separation and identification of the related substances of irbesartan and its preparations, and the results obtained are valuable for its quality control and manufacturing process.

**KEY WORDS:** irbesartan; irbesartan preparation; related substance; impurity profile; LC-MS/MS

厄贝沙坦(irbesartan), 化学名为 2-丁基-3-[4-[2-(1H-四氮唑-5-基)苯基]苯甲基]-1,3-二氮杂螺[4,4]壬-1-烯-4-酮, 分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O, 结构见图 1。厄贝沙坦作为一种血管紧张素 II 受体拮抗剂, 临床主要用于原发性高血压以及合并高血压的 2 型糖尿病肾病的治疗, 已上市产品有片剂、分散片、胶囊剂剂型。此外, 还可与氢氯噻嗪制成的复方片剂用于单药未能控制的高血压患者的治疗, 两者协同降压, 改善患者用药依从性<sup>[1]</sup>。

2020 年版《中国药典》及《欧洲药典》10.0 版等厄贝沙坦标准中有关物质项下仅收录了已知杂质 I (impurity I), 结构见图 2。本研究建立了适用于

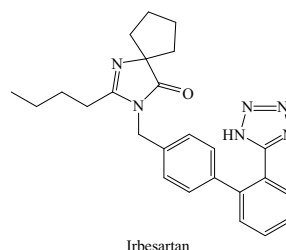


图 1 厄贝沙坦结构图

Fig. 1 Chemical structures of irbesartan

厄贝沙坦及其制剂中有关物质检测的液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)方法, 通过对厄贝沙坦及其制剂在强制破坏和加速稳定性试验中的有关

基金项目: 2022 年国家药品抽检计划第 60 号厄贝沙坦项目资助

作者简介: 张文慧, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物质量与过程控制 \* 通讯作者: 程冬, 男, 硕士, 主管药师 研究方向: 药物分析  
Tel: (025)86251231; 陆益红, 女, 博士, 主任药师 研究方向: 药物分析 Tel: (025)86251220

物质进行分离和结构鉴定,共检出包括已知杂质 I 在内的 16 个杂质,结构见图 2。通过购买对照品及合成对照品,对其中的 10 个杂质的结构进行了确

证,再结合生产工艺对各有关物质的结构和来源进行系统分析,为厄贝沙坦原料药及其制剂的产品质量控制和生产工艺优化提供参考依据。

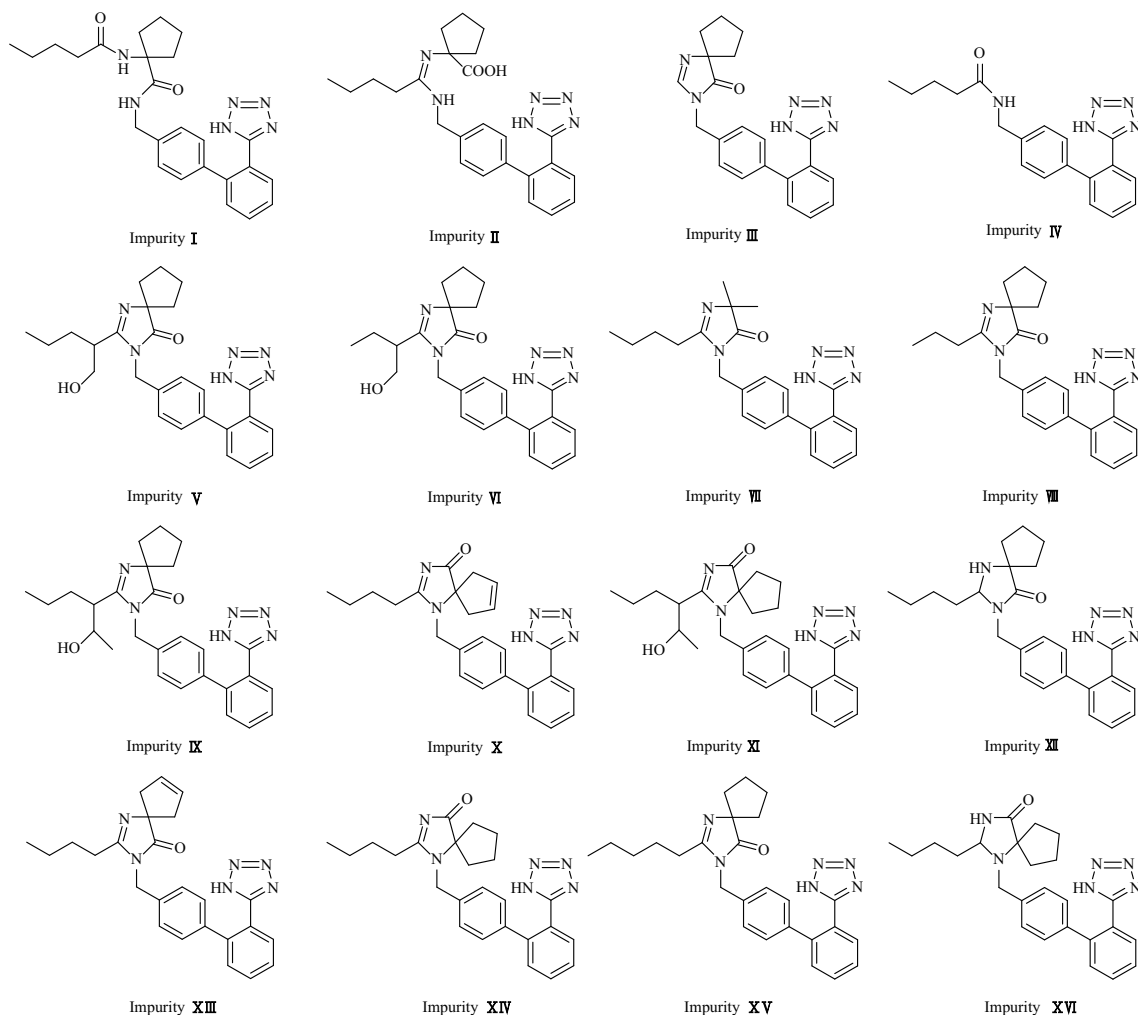


图 2 厄贝沙坦有关物质结构图

Fig. 2 Chemical structures of related substances of irbesartan

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

SCIEX ExionLC 高效液相色谱仪、SCIEX Triple TOF 5600 质谱仪、Analyst 数据分析软件(美国 AB SCIEX 公司); XSE-205DU 十万分之一电子天平、pH 计(美国 Mettler 公司)。

### 1.2 试药

厄贝沙坦对照品(批号 100607-201804, 含量 100%)、杂质 I 对照品(批号 101312-201902, 含量 100%)(中国食品药品检定研究院);杂质 III 对照品(批号 2208-072A7, 含量 99%)、杂质 VII 对照品(批号 3069-034A4, 含量 99%)、杂质 VIII 对照品(批号 2963-061A1, 含量 95%)(TLC);杂质 XIV 对照品(批

号 05S-TBK-71-1, 含量 97%)、杂质 XVI 对照品(批号 05S-PAM-99-7, 含量 95%)(PANPHY);杂质 IV 对照品(批号 20220916, 含量 98%)、杂质 V 对照品(批号 20220912, 含量 98%)、杂质 IX 对照品(批号 20220908-1, 含量 98%)、杂质 XI 对照品(批号 20220908-2, 含量 98%)均来自于自制;甲醇和乙腈均为色谱纯;其他试剂均为分析纯;超纯水由 Millipore 超纯水系统制备。

### 1.3 样品

本研究实验样品均来自于 2022 年国家药品抽检项目,其中厄贝沙坦原料药来自于 7 家生产企业,厄贝沙坦制剂(厄贝沙坦片、厄贝沙坦分散片、厄贝沙坦胶囊)来自于 20 家生产企业。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以体积分数 0.1% 甲酸溶液(用氨水调节 pH 值至 3.5)-乙腈(62:38) 为流动相, 等度洗脱, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长为 220 nm, 进样体积为 10 μL。

### 2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子化模式(ESI<sup>+</sup>), 离子源温度(TEM) 650 °C, 气帘气流速(CUR) 206.84 kPa, 雾化气流(GS1) 344.74 kPa, 辅助加热气(GS2) 344.74 kPa, 离子源喷雾电压(ISVF) 5 500 V, 去簇电压(DP) 80 V, 碰撞电压(CE) 10 V, 扫描范围(*m/z*) 100 ~ 800; 二级质谱去簇电压(DP) 100 V, 碰撞电压(CE) 35 V, 碰撞电压扩展(CES) 15 V, 扫描范围(*m/z*) 100 ~ 800。

### 2.3 供试品溶液的制备

取厄贝沙坦原料药和制剂适量(约相当于厄贝沙坦 100 mg), 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇使厄贝沙坦溶解并稀释制成每 1 mL 中约含厄贝沙坦 1 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液。

### 2.4 对照品溶液的制备

分别取厄贝沙坦对照品和厄贝沙坦各杂质对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中各约含 10 μg 的溶液。

### 2.5 强制破坏溶液的制备

称取供试品适量(约相当于厄贝沙坦 100 mg), 加 5 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠溶液, 放置 2 h, 加 5 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸溶液中和, 用甲醇稀释并定容至 100 mL, 混匀, 滤过, 取续滤液。

## 3 结果

### 3.1 厄贝沙坦对照品溶液

厄贝沙坦分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O, 理论精确相对分子质量为 428.232 5, 正离子模式下 [M + H]<sup>+</sup> 峰理论精确相对分子质量为 429.239 7。参考文献[2] 推测其裂解规律见图 3, 二级质谱主要理论裂解碎片包括 [C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> (*m/z*) 401.233 6、[C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> (*m/z*) 386.222 7、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 235.097 8、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 207.091 7、[C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (*m/z*) 195.149 2、[C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> (*m/z*) 180.080 8、[C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup> (*m/z*) 178.065 1。厄贝沙坦对照品溶液 LC-MS/MS 典型图谱见图 4, 一级质谱和二级质谱实验结果与理论值匹配一致。

### 3.2 厄贝沙坦杂质 I 对照品溶液

厄贝沙坦杂质 I 分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 理论精确相对分子质量为 446.243 0, 正离子模式下 [M + H]<sup>+</sup> 峰理论精确相对分子质量为 447.250 3。推测其裂解规律<sup>[3]</sup> 见图 3, 二级质谱主要理论裂解碎片包括 [C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 419.244 2、[C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O]<sup>+</sup> (*m/z*) 363.192 8、[C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 291.135 3、[C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 252.124 4、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 235.097 8、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 207.091 7、[C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 196.133 2、[C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> (*m/z*) 192.080 8、[C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> (*m/z*) 180.080 8、[C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NO]<sup>+</sup> (*m/z*) 168.138 3。厄贝沙坦杂质 I 对照品溶液 LC-MS/MS 典型图谱见图 5, 一级质谱和二级质谱实验结果与理论值匹配一致。

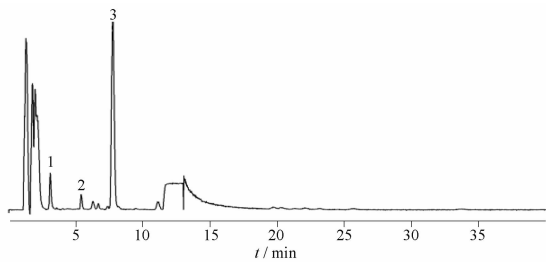
### 3.3 厄贝沙坦强制破坏有关物质

研究结果<sup>[4]</sup> 表明, 厄贝沙坦原料药及其制剂在高温、强酸和强氧化条件下较稳定, 主要在强碱性条件下易发生降解反应。厄贝沙坦在碱性条件下主要降解为保留时间约 7.7 min 的已知杂质 I, 与杂质 I 对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。此外, 还可降解为保留时间约 3.1 min 的杂质 II 和保留时间约 5.4 min 的杂质 IV, 杂质 IV 通过对照品进行了结构确证, LC-MS 典型总离子流色谱图见图 6。

厄贝沙坦杂质 II 一级质谱精确相对分子质量为 447.250 3, 软件分析匹配分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 与已知杂质 I 为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 446.243 0, 正离子模式下 [M + H]<sup>+</sup> 峰理论精确相对分子质量为 447.250 3。通过二级质谱主要裂解碎片 [C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 213.159 6、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 207.091 5、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 179.085 1, 推测其结构与杂质 I 结构类似, 同为厄贝沙坦的二氮杂螺开环产物<sup>[4,6]</sup>, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 7。

厄贝沙坦杂质 IV 一级质谱精确相对分子质量为 336.182 2, 软件分析匹配分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O, 理论精确相对分子质量为 335.174 6, 正离子模式下 [M + H]<sup>+</sup> 峰理论精确相对分子质量为 336.181 9。通过二级质谱主要裂解碎片 [C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 252.124 8、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 235.097 7、[C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (*m/z*) 207.091 6、[C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> (*m/z*) 180.080 5, 推测其结构与文献[7-8] 报道碱降解杂质结构一致, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 8。杂质 IV 与经核磁确证结构的合成对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。





1 - 杂质 II; 2 - 杂质 IV; 3 - 杂质 I。

1 - Impurity II; 2 - Impurity IV; 3 - Impurity I.

图6 厄贝沙坦强制破坏溶液典型 LC-MS/MS 总离子流色谱图  
Fig. 6 Typical LC-MS/MS total ion flow chromatogram of Irbesartan forced disruption solution

### 3.4 厄贝沙坦原料药中有关物质

厄贝沙坦原料药中共检出 9 种杂质 (含量  $\geq 0.001\%$ ), a ~ g 共 7 家原料药生产企业厄贝沙坦杂质种类基本一致, 典型色谱图见图 9, 杂质含量有差异, 加速试验 (温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $75\%$ ) 2 个月各杂质含量见表 1。除已知杂质 I 以外, 原料药供试品溶液还检出杂质 V、杂质 VIII、杂质 X、杂质 XII、杂质 XIII、杂质 XIV、杂质 XV 和杂质 XVI。其中, 杂质 V、杂质 VIII、杂质 XIV 和杂质 XVI 通过对照品进行了结构确证。

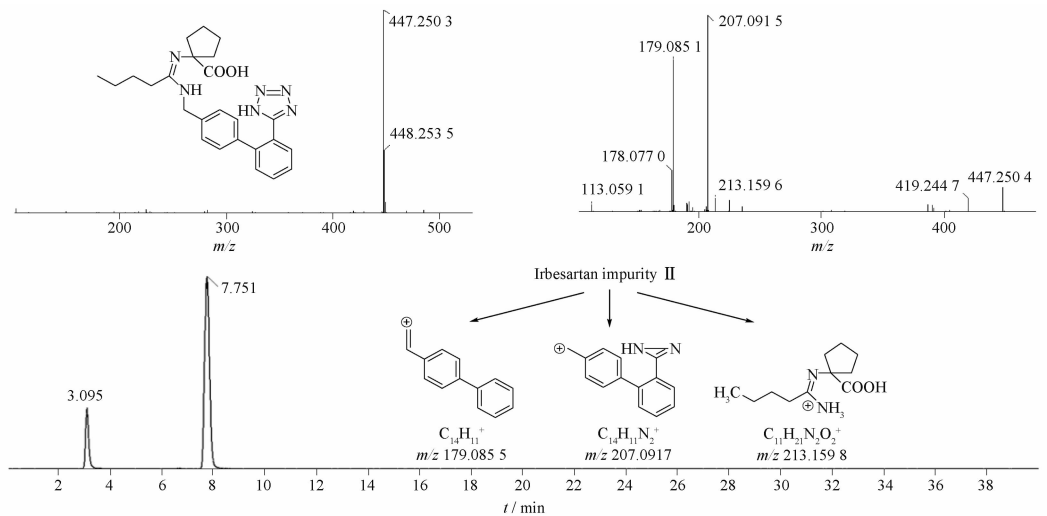


图7 厄贝沙坦杂质 II LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 7 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity II

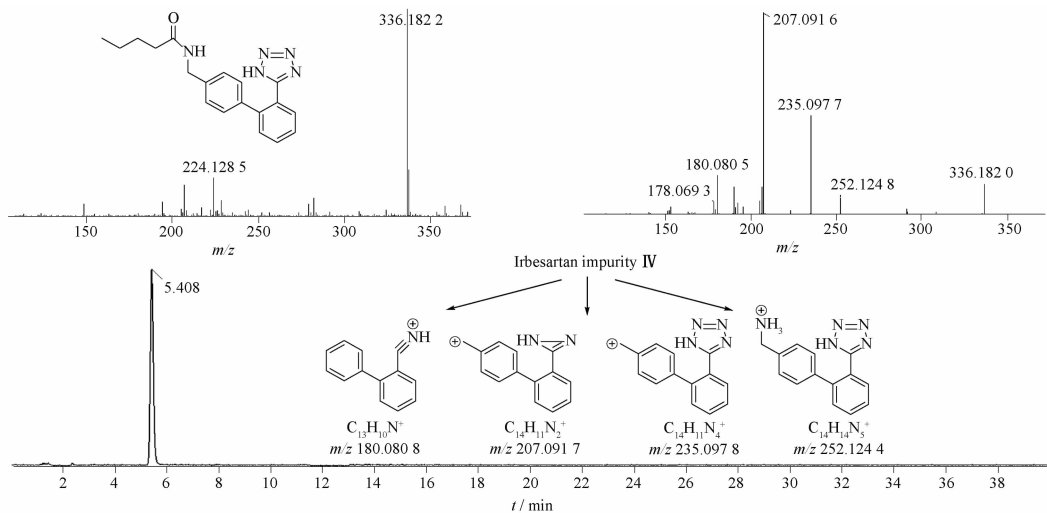


图8 厄贝沙坦杂质 IV LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 8 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity IV

厄贝沙坦杂质 V 提取离子流图色谱峰保留时间约 6.2 min, 一级质谱精确相对分子质量为 459.2504, 软

件分析匹配分子式为  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2$ , 理论精确相对分子质量为 458.2430, 正离子模式下  $[\text{M} + \text{H}]^+$  峰

理论精确相对分子质量为 459.250 3。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{12}H_{21}N_2O_2]^+$  ( $m/z$ ) 225.159 4、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 2、 $[C_{13}H_{10}N]^+$  ( $m/z$ ) 180.080 1,推测其结构为厄贝沙坦与甲醛反应生成

的羟甲基化产物<sup>[9-11]</sup>,LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 10。杂质 V 与经核磁确证结构的合成对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致,确证结构。

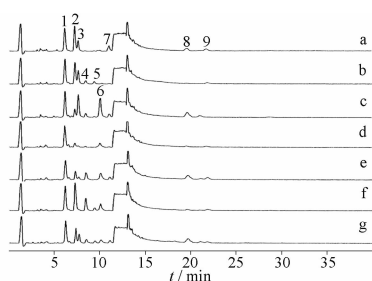
表 1 a~g 厂家厄贝沙坦原料药中有关物质检测结果. %

Tab. 1 Test results of related substances in irbesartan API from manufacturer a - g. %

Manufacturer	Impurity V	Impurity VIII	Impurity I	Impurity X	Impurity XII	Impurity XIII	Impurity XIV	Impurity XV	Impurity XVI
a	0.021	0.043	0.009	-	-	-	0.009	0.006	0.005
b	0.018	0.044	0.013	0.004	0.004	-	-	-	0.002
c	0.020	0.011	0.027	0.005	-	0.047	0.005	0.012	0.003
d	0.020	0.005	-	-	-	0.007	-	0.001	0.002
e	0.020	0.011	0.003	0.011	-	0.015	0.004	0.008	0.003
f	0.018	0.058	-	0.015	0.005	0.013	-	0.001	0.002
g	0.019	0.021	0.009	0.005	0.004	0.006	0.004	0.010	0.002

注: - - 未检出。

Note: - - not detected.



1 - 杂质 V; 2 - 杂质 VIII; 3 - 杂质 I; 4 - 杂质 X; 5 - 杂质 XII; 6 - 杂质 XIII; 7 - 杂质 XIV; 8 - 杂质 XV; 9 - 杂质 XVI。

1 - Impurity V; 2 - Impurity VIII; 3 - Impurity I; 4 - Impurity X; 5 - Impurity XII; 6 - Impurity XIII; 7 - Impurity XIV; 8 - Impurity XV; 9 - Impurity XVI.

图 9 a~g 厂家厄贝沙坦原料药供试品溶液 LC-MS/MS 总离子流典型色谱图

Fig. 9 Typical LC - MS/MS chromatogram of total ion flow of test solution of irbesartan API from manufacturer a - g

杂质 VIII 提取离子流图色谱峰保留时间约 7.3 min,一级质谱精确相对分子质量为 415.224 1,软件分析匹配分子式为  $C_{24}H_{26}N_6O$ ,理论精确相对分子质量为 414.216 8,正离子模式下  $[M+H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 415.224 1。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{24}H_{26}N_3O]^+$  ( $m/z$ ) 372.206 1、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 5、 $[C_{10}H_{17}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 181.133 5,推测其为文献[12-13]报道的厄贝沙坦脱去端甲基结构,LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 11。杂质 VIII 与对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致,确证结构。

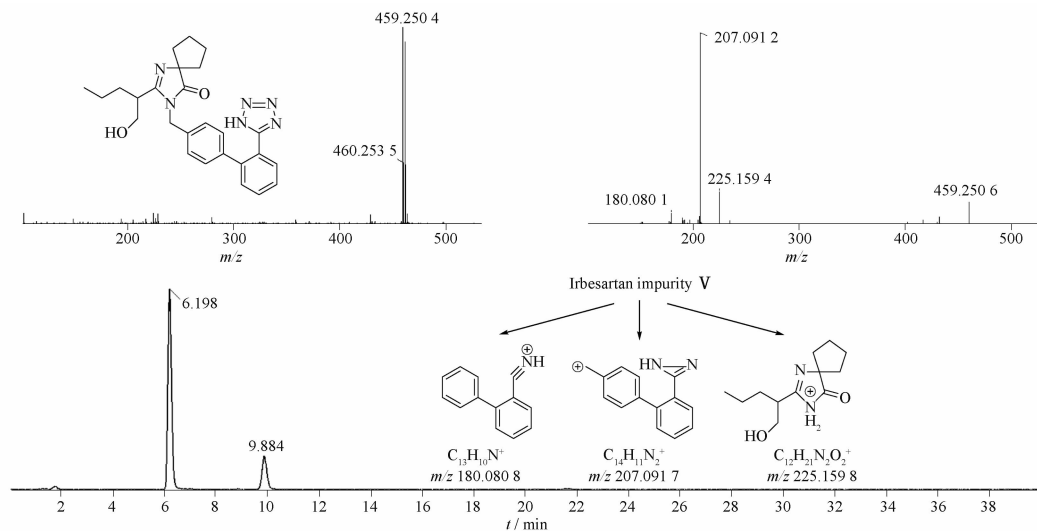


图 10 厄贝沙坦杂质 V LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 10 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity V

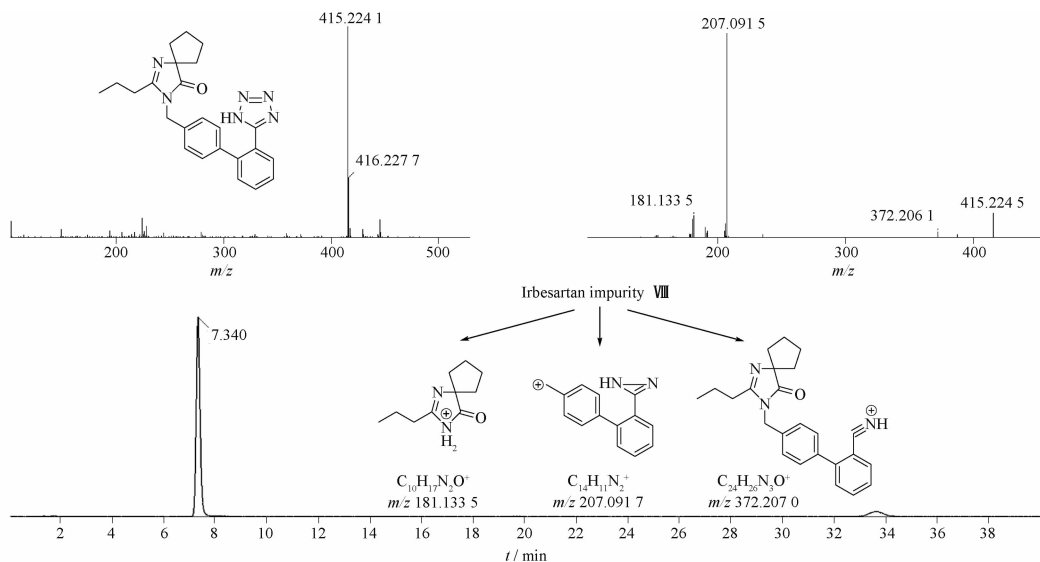


图 11 厄贝沙坦杂质VIII LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 11 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity VIII

厄贝沙坦杂质X提取离子流图色谱峰保留时间约 8.5 min,一级质谱精确相对分子质量为 427.224 2,软件分析匹配分子式为  $C_{25}H_{26}N_6O$ ,与厄贝沙坦杂质XIII为同分异构体,理论精确相对分子质量为 426.216 8,正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相

对分子质量为 427.224 1。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{25}H_{26}N_3O]^+$  ( $m/z$ ) 384.207 5、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 8、 $[C_{11}H_{17}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 193.133 8,参考文献[9]推测其为厄贝沙坦环戊烷基脱氢成双键结构,LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 12。

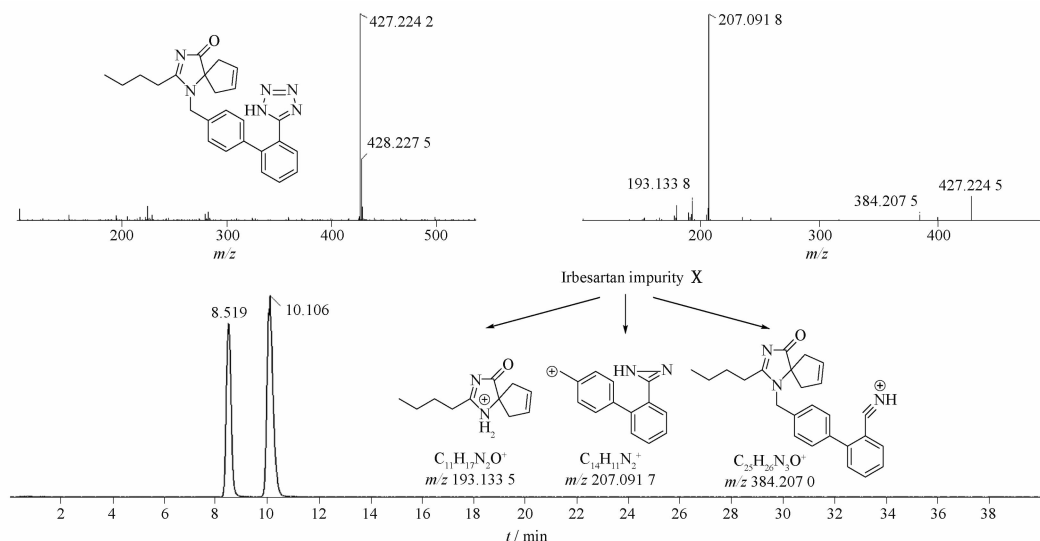


图 12 厄贝沙坦杂质X LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 12 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity X

厄贝沙坦杂质XII提取离子流图色谱峰保留时间约 9.5 min,一级质谱精确相对分子质量为 431.255 4,软件分析匹配分子式为  $C_{25}H_{30}N_6O_2$ ,理论精确相对分子质量为 430.248 1,正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 431.255 4。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{19}H_{22}N_5]^+$  ( $m/z$ ) 320.186 8、

$[C_{14}H_{11}N_4]^+$  ( $m/z$ ) 235.097 8、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 7、 $[C_{10}H_{18}N]^+$  ( $m/z$ ) 152.143 2,推测其为厄贝沙坦的二氮杂螺环加氢结构,二氮杂螺环羰基可与环戊烷基位置发生异构化,与厄贝沙坦杂质XVI为同分异构体,LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 13。

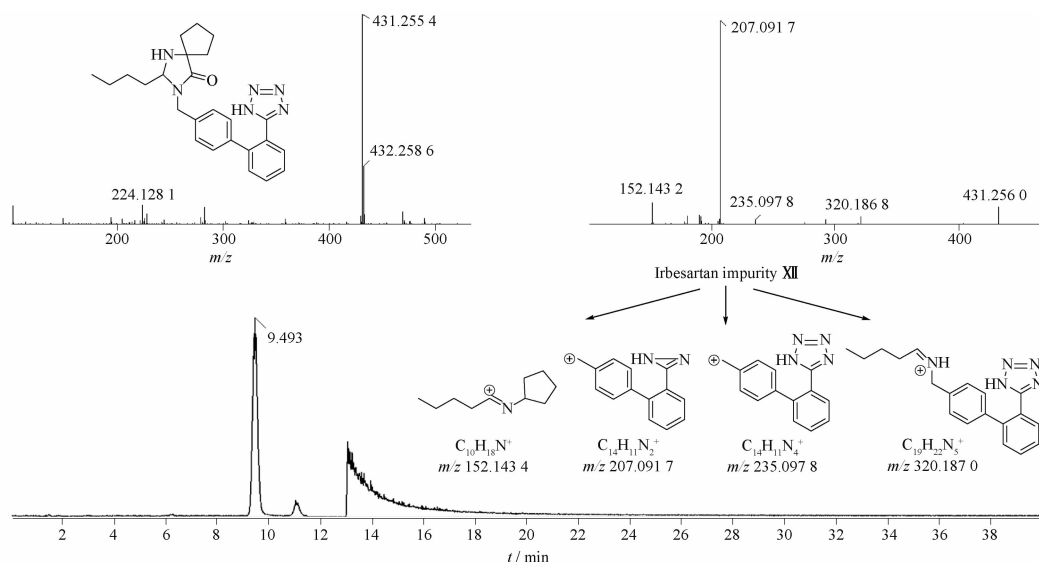


图 13 厄贝沙坦杂质 XII LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 13 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XII

厄贝沙坦杂质 XIII 提取离子流图色谱峰保留时间约 10.1 min, 一级质谱精确相对分子质量为 427.224 0, 软件分析匹配分子式为  $C_{25}H_{26}N_6O$ , 与厄贝沙坦杂质 X 为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 426.216 8, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确

相对分子质量为 427.224 1。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{25}H_{26}N_3O]^+$  ( $m/z$ ) 384.206 6、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 7、 $[C_{11}H_{17}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 193.133 6, 推测其结构为厄贝沙坦杂质 X 的二氮杂螺环羰基位置异构<sup>[9]</sup>, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 14。

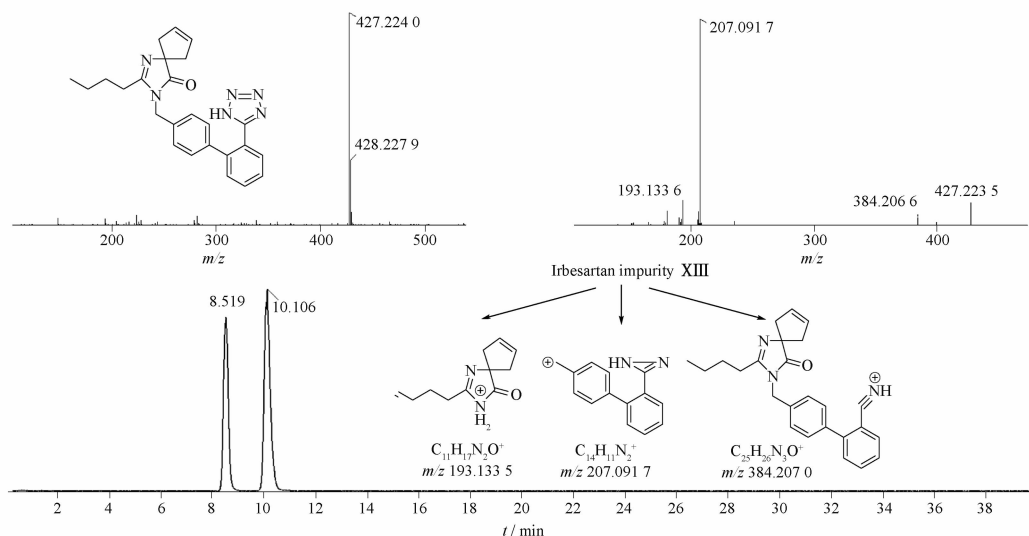


图 14 厄贝沙坦杂质 XIII LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 14 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XIII

厄贝沙坦杂质 XIV 提取离子流图色谱峰保留时间约 11.1 min, 一级质谱精确相对分子质量为 429.239 7, 软件分析匹配分子式为  $C_{25}H_{28}N_6O$ , 与厄贝沙坦为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 428.232 5, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 429.239 7。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{25}H_{28}N_3O]^+$  ( $m/z$ )

386.222 2、 $[C_{14}H_{11}N_4]^+$  ( $m/z$ ) 235.097 9、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 5、 $[C_{11}H_{19}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 195.148 8, 参考专利文献<sup>[14]</sup> 推测其结构为厄贝沙坦的二氮杂螺环羰基位置异构, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 15。杂质 XIV 与对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。

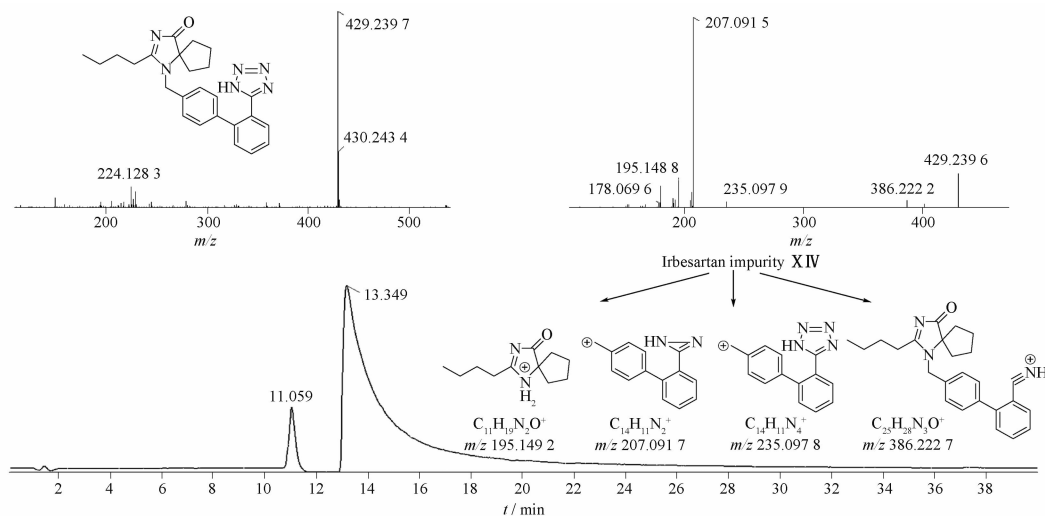


图 15 厄贝沙坦杂质 XIV LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 15 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XIV

厄贝沙坦杂质 XV 提取离子流图色谱峰保留时间约 19.6 min, 一级质谱精确相对分子质量为 443.255 4, 软件分析匹配分子式为  $C_{26}H_{30}N_6O$ , 理论精确相对分子质量为 442.248 1, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 443.255 4。

通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{26}H_{30}N_3O]^+$  ( $m/z$ ) 400.238 3、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 4、 $[C_{13}H_{10}N]^+$  ( $m/z$ ) 180.080 4, 参考文献<sup>[9]</sup>报道推测其为厄贝沙坦延长端甲基结构, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 16。

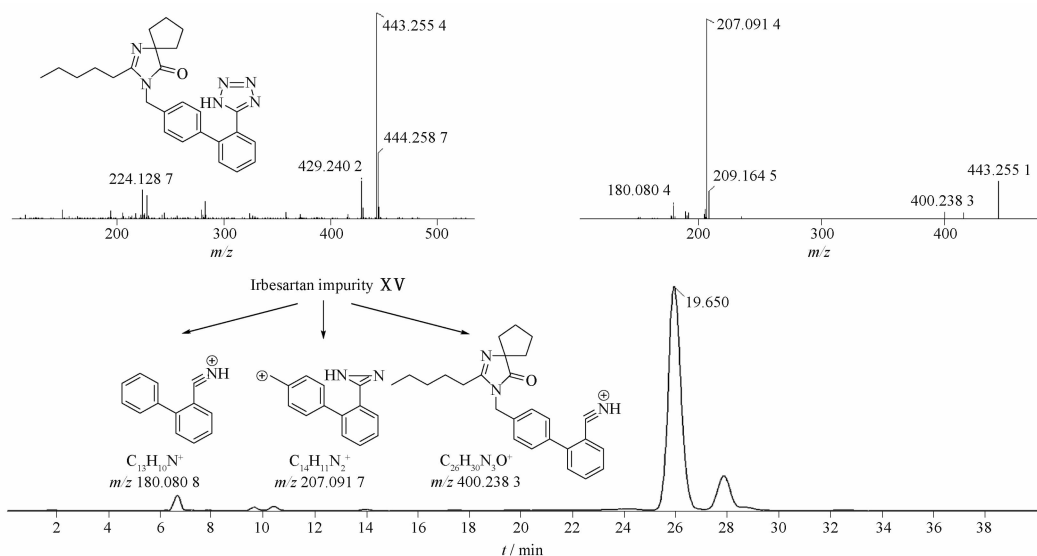


图 16 厄贝沙坦杂质 XV LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 16 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XV

杂质 XVI 提取离子流图色谱峰保留时间约 22.9 min, 一级质谱精确相对分子质量为 431.255 4, 软件分析匹配分子式为  $C_{25}H_{30}N_6O_2$ , 与厄贝沙坦杂质 XII 为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 430.248 1, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 431.255 4。通过二级质谱主要裂解碎片包括

$[C_{19}H_{20}N_5]^+$  ( $m/z$ ) 318.172 2、 $[C_{19}H_{19}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 275.155 1、 $[C_{14}H_{11}N_4]^+$  ( $m/z$ ) 235.098 2、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 5, 推测其结构为厄贝沙坦杂质 XII 的二氮杂螺环羰基位置异构, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 17。杂质 XVI 与对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。

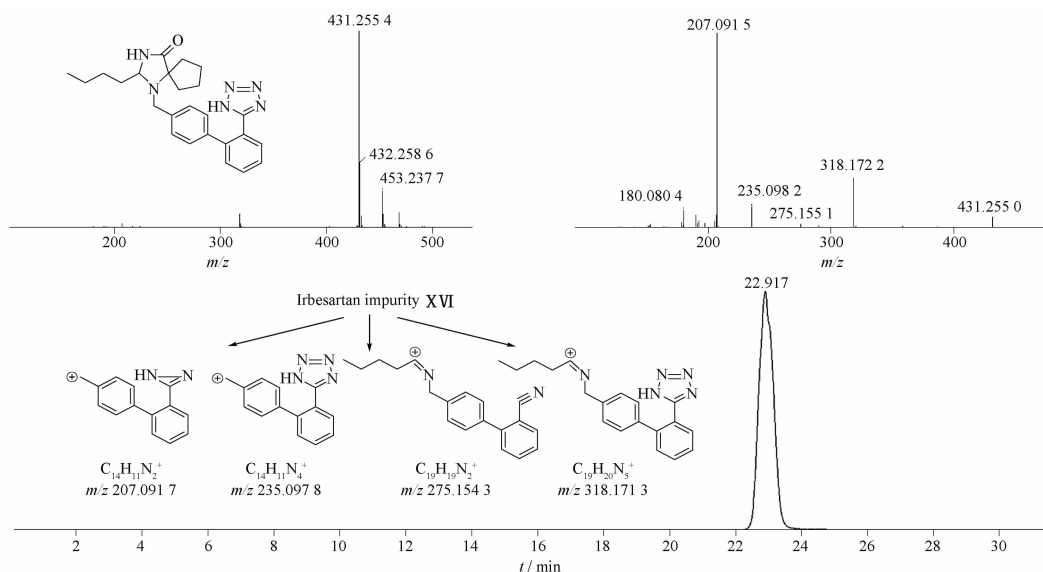


图 17 杂质 XVI LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 17 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XVI

### 3.5 厄贝沙坦制剂中有关物质

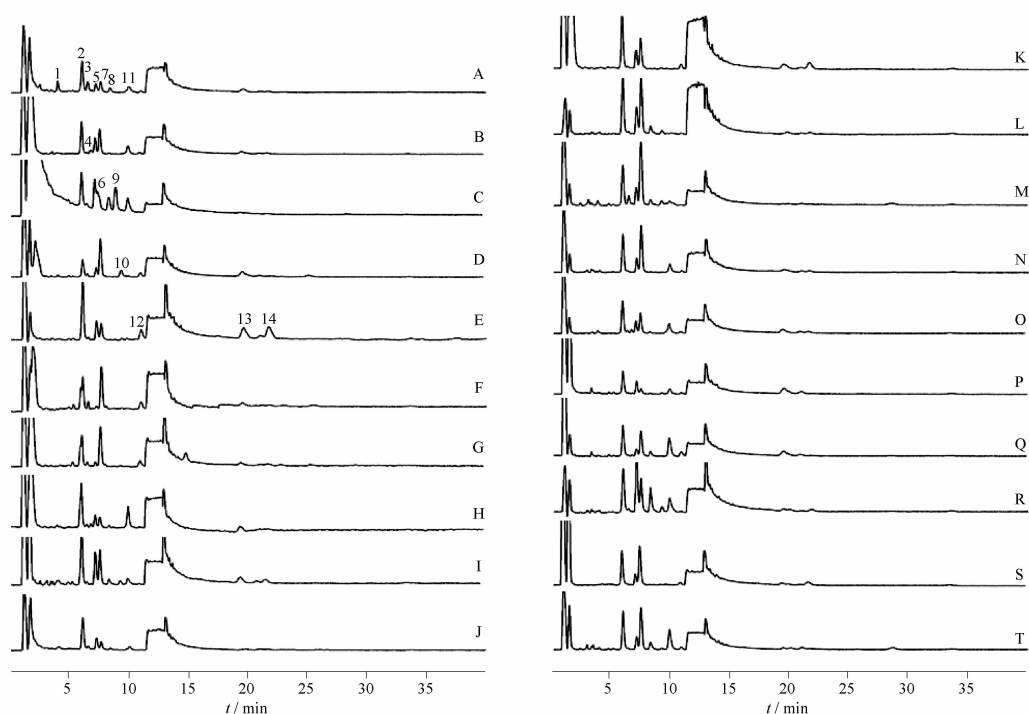
厄贝沙坦制剂中共检出 14 种有关物质 ( $\geq 0.001\%$ ), A ~ T 共 20 家制剂生产企业厄贝沙坦杂质种类和含量有差异, 典型色谱图见图 18, 加速试验(温度 40 °C、相对湿度 75%) 6 个月

各杂质含量见表 2。除强制降解溶液和原料药中检出各杂质外, 制剂供试品溶液中还检出杂质 III、杂质 VI、杂质 VII、杂质 IX 和杂质 XI。其中, 杂质 III、杂质 VII、杂质 IX 和杂质 XI 通过对照品进行了结构确证。

表 2 A ~ T 厂家厄贝沙坦制剂有关物质检测结果. %

Tab. 2 Test results of related substances of irbesartan preparations from manufacturer A-T. %

Manu- cturer	Impurity III	Impurity V	Impurity VI	Impurity VII	Impurity VIII	Impurity IX	Impurity I	Impurity X	Impurity XI	Impurity XII	Impurity XIII	Impurity XIV	Impurity XV	Impurity XVI
A	0.022	0.050	0.019	0.002	0.011	-	0.015	0.006	-	-	0.014	0.003	0.005	0.002
B	-	0.049	0.003	0.006	0.018	-	0.045	-	-	-	0.017	0.003	0.006	0.003
C	-	0.266	0.003	-	0.062	0.009	-	0.019	0.016	-	0.032	-	-	0.001
D	-	0.022	0.002	-	0.011	-	0.050	-	-	0.014	-	0.007	0.012	-
E	-	0.048	-	-	0.013	-	0.013	-	-	-	-	0.010	0.012	0.020
F	-	0.037	0.004	-	0.002	-	0.071	-	0.002	-	-	0.009	0.002	0.001
G	-	0.042	0.002	-	0.002	-	0.070	-	-	-	-	0.008	0.002	0.003
H	-	0.039	0.004	-	0.009	-	0.015	-	-	-	0.020	0.003	0.008	0.002
I	-	0.072	0.002	-	0.034	-	0.034	0.004	-	0.004	0.007	-	0.006	0.005
J	0.004	0.050	0.006	-	0.015	-	0.015	0.002	-	-	0.010	-	0.003	0.002
K	-	0.040	-	-	0.013	-	0.027	-	-	-	-	0.004	0.004	0.008
L	-	0.053	-	-	0.029	-	0.068	0.005	-	0.004	-	-	-	0.002
M	0.010	0.074	0.002	0.019	0.026	-	0.443	0.002	-	0.005	0.008	0.002	0.002	0.003
N	-	0.056	-	-	0.014	-	0.094	-	-	-	0.012	0.002	0.003	0.002
O	0.003	0.057	0.004	0.004	0.013	-	0.037	0.002	-	-	0.019	0.003	0.007	0.003
P	-	0.026	-	-	0.015	-	0.004	-	-	0.002	0.009	0.003	0.014	-
Q	-	0.044	-	-	0.010	-	0.040	0.004	-	-	0.044	0.005	0.010	-
R	-	0.018	-	-	0.061	-	0.027	0.017	-	0.005	0.013	-	0.002	0.003
S	-	0.036	-	-	0.012	-	0.065	-	-	-	-	0.003	0.003	0.006
T	0.003	0.056	0.001	-	0.019	-	0.093	0.010	-	0.003	0.049	0.004	0.002	-



1 - 杂质 III; 2 - 杂质 V; 3 - 杂质 VI; 4 - 杂质 VII; 5 - 杂质 VIII; 6 - 杂质 IX; 7 - 杂质 I; 8 - 杂质 X; 9 - 杂质 XI; 10 - 杂质 XII; 11 - 杂质 XIII; 12 - 杂质 XIV; 13 - 杂质 XV; 14 - 杂质 XVI。

1 - Impurity III; 2 - Impurity V; 3 - Impurity VI; 4 - Impurity VII; 5 - Impurity VIII; 6 - Impurity IX; 7 - Impurity I; 8 - Impurity X; 9 - Impurity XI; 10 - Impurity XII; 11 - Impurity XIII; 12 - Impurity XIV; 13 - Impurity XV; 14 - Impurity XVI.

图 18 企业 A~T 厄贝沙坦制剂供试品溶液典型 LC-MS/MS 总离子流色谱图

Fig. 18 Typical LC-MS/MS total ion flow chromatogram of test solution of irbesartan preparation from manufacturer A - T

厄贝沙坦杂质 III 提取离子流图色谱峰保留时间约 4.1 min, 一级质谱精确相对分子质量为 373.177 3, 软件分析匹配分子式为  $C_{21}H_{20}N_6O$ , 理论精确相对分子质量为 372.169 9, 正离子模式下  $[M+H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 373.177 1。通过二级质谱主

要裂解碎片  $[C_{14}H_{11}N_4]^+$  ( $m/z$ ) 235.098 4、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 6、 $[C_{13}H_{10}N]^+$  ( $m/z$ ) 180.080 5, 参考文献[9]推测其为厄贝沙坦脱去丁基结构, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 19。杂质 III 与对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。

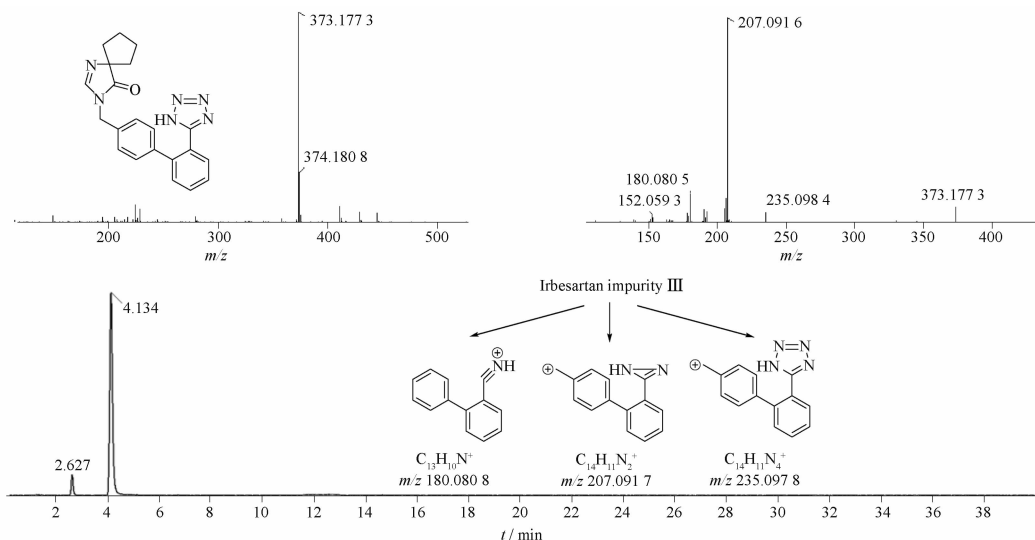


图 19 厄贝沙坦杂质 III LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 19 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity III

厄贝沙坦杂质VI提取离子流色谱峰保留时间约6.7 min,一级质谱精确相对分子质量为445.234 9,软件分析匹配分子式为 $C_{25}H_{28}N_6O_2$ ,理论精确相对分子质量为444.227 4,正离子模式下 $[M+H]^+$ 峰理论精确相对分子质量为445.234 7。通过二级质

谱主要裂解碎片 $[C_{11}H_{19}N_2O_2]^+$  ( $m/z$ ) 211.144 6、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 5、 $[C_{11}H_{19}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 195.149 1、 $[C_{13}H_{10}N]^+$  ( $m/z$ ) 180.080 8,推测其为厄贝沙坦杂质VIII羟甲基化产物,LC-MS/MS质谱图和裂解规律见图20。

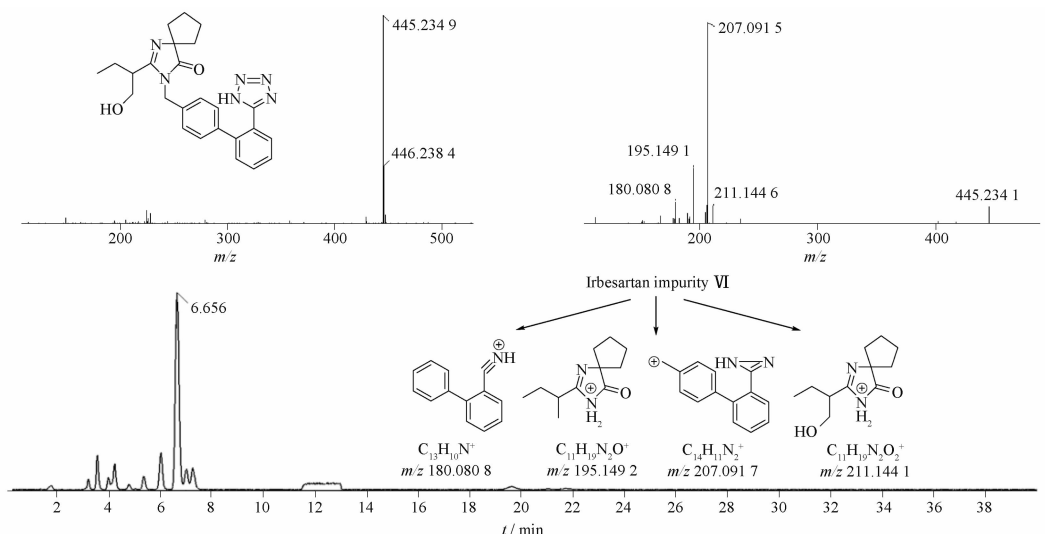


图20 厄贝沙坦杂质VI LC-MS/MS提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 20 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity VI

厄贝沙坦杂质VII提取离子流色谱峰保留时间约7.0 min,一级质谱精确相对分子质量为403.224 2,软件分析匹配分子式为 $C_{23}H_{26}N_6O$ ,理论精确相对分子质量为402.216 8,正离子模式下 $[M+H]^+$ 峰理论精确相对分子质量为403.224 1。通过二级质

谱主要裂解碎片 $[C_{23}H_{26}N_3O]^+$  ( $m/z$ ) 360.207 4、 $[C_{14}H_{11}N_4]^+$  ( $m/z$ ) 235.098 2、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 8、 $[C_{13}H_{10}N]^+$  ( $m/z$ ) 180.080 7,推测其为厄贝沙坦上环戊烷基开环结构,LC-MS/MS质谱图和裂解规律见图21。杂质VII与对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致,确证结构。

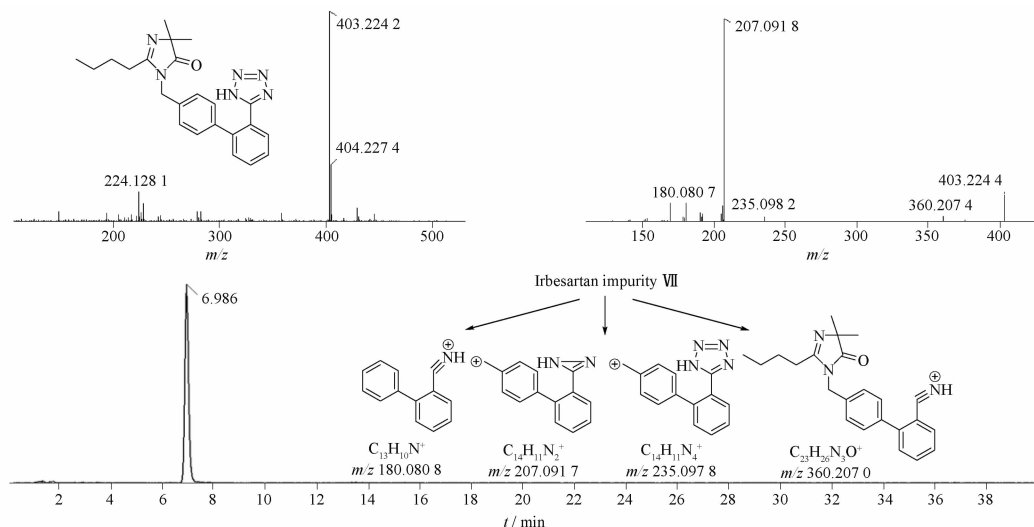


图21 厄贝沙坦杂质VII LC-MS/MS提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 21 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity VII

厄贝沙坦杂质 IX 提取离子流图色谱峰保留时间约 7.6 min, 一级质谱精确相对分子质量为 473.265 9, 软件分析匹配分子式为  $C_{27}H_{32}N_6O_2$ , 与厄贝沙坦杂质 XI 为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 472.258 7, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 473.266 0。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{25}H_{29}N_6O]^+$  ( $m/z$ ) 429.239 5、

$[C_{13}H_{23}N_2O_2]^+$  ( $m/z$ ) 239.175 7、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.092 0、 $[C_{11}H_{19}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 195.149 6, 参考文献[10]推测其结构为厄贝沙坦与乙醛反应生成的羟乙基化产物, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 22。杂质 IX 与经核磁确证结构的合成对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。

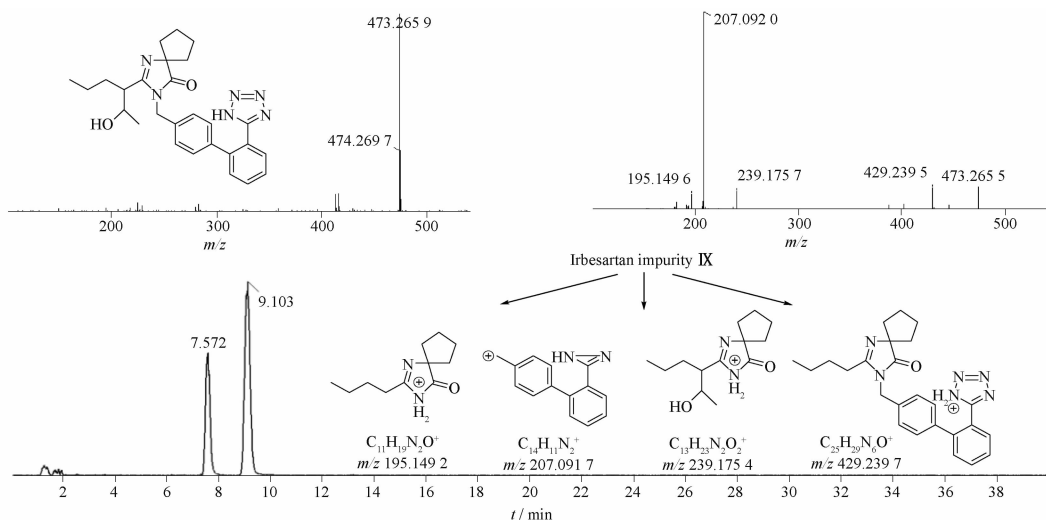


图 22 厄贝沙坦杂质 IX LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 22 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity IX

厄贝沙坦杂质 XI 提取离子流图色谱峰保留时间约 9.1 min, 一级质谱精确相对分子质量为 473.266 0, 软件分析匹配分子式为  $C_{27}H_{32}N_6O_2$ , 与厄贝沙坦杂质 IX 为同分异构体, 理论精确相对分子质量为 472.258 7, 正离子模式下  $[M + H]^+$  峰理论精确相对分子质量为 473.266 0。通过二级质谱主要裂解碎片  $[C_{25}H_{29}N_6O]^+$  ( $m/z$ ) 429.239 6、

$[C_{13}H_{23}N_2O_2]^+$  ( $m/z$ ) 239.175 4、 $[C_{14}H_{11}N_2]^+$  ( $m/z$ ) 207.091 7、 $[C_{11}H_{19}N_2O]^+$  ( $m/z$ ) 195.149 2, 参考文献[10]推测其结构为厄贝沙坦与乙醛反应生成的羟乙基化产物, LC-MS/MS 质谱图和裂解规律见图 23。杂质 XI 与经核磁确证结构的合成对照品溶液的保留时间、一级和二级质谱结果匹配一致, 确证结构。

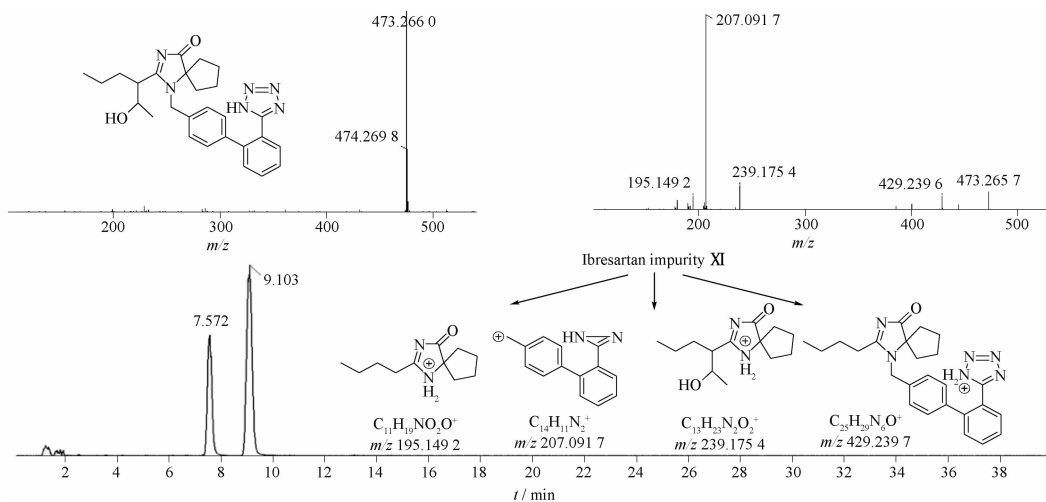


图 23 厄贝沙坦杂质 XI LC-MS/MS 提取离子流图、一级和二级质谱图及裂解规律

Fig. 23 LC-MS/MS chromatograms and fragmentation pathways of irbesartan impurity XI

## 4 讨论

本研究建立了液-质联用色谱技术用于检测厄贝沙坦及其制剂中有关物质的方法,共检测出厄贝沙坦有关物质 16 个,除杂质 I 结构已知外,其他 15 个杂质均根据 LC-MS/MS 数据推测结

构。通过合成对照品对杂质 IV、杂质 V、杂质 IX 和杂质 XI 的结构进行确证,通过购买对照品对杂质 III、杂质 VII、杂质 VIII、杂质 XIV 和杂质 XVI 的结构进行确证。厄贝沙坦及其制剂中有关物质详细信息见表 3。

表 3 厄贝沙坦及其制剂中有关物 LC-MS/MS 鉴定结果

Tab. 3 Related substances identified in irbesartan and its preparations by LC-MS/MS

Name	$t_R/\text{min}$	$m/z$ ( $[M+H]^+$ )	Ion formula	Structure confirmation	Impurity source
Impurity I	7.7	447.250 3	$C_{25}H_{31}N_6O_2^+$	Reference substances	Alkaline degradation
Impurity II	3.1	447.250 3	$C_{25}H_{31}N_6O_2^+$	Speculative structure	Alkaline degradation
Impurity III	4.1	373.177 1	$C_{21}H_{21}N_6O^+$	Reference substances	Process impurities of the preparation
Impurity IV	5.4	336.181 9	$C_{19}H_{22}N_5O^+$	Reference substances	Alkaline degradation
Impurity V	6.2	459.250 3	$C_{26}H_{31}N_6O_2^+$	Reference substances	Formaldehyde degradation impurity
Impurity VI	6.7	445.234 7	$C_{25}H_{29}N_6O_2^+$	Speculative structure	Process impurities of the preparation
Impurity VII	7.0	403.224 1	$C_{23}H_{27}N_6O^+$	Reference substances	Process impurities of the preparation
Impurity VIII	7.3	415.224 1	$C_{24}H_{27}N_6O^+$	Reference substances	Process impurity of the API
Impurity IX	7.6	473.266 0	$C_{27}H_{33}N_6O_2^+$	Reference substances	Acetaldehyde degradation impurity
Impurity X	8.5	427.224 1	$C_{25}H_{27}N_6O^+$	Speculative structure	Process impurity of the API
Impurity XI	9.1	473.266 0	$C_{27}H_{33}N_6O_2^+$	Reference substances	Acetaldehyde degradation impurity
Impurity XII	9.5	431.255 4	$C_{25}H_{31}N_6O^+$	Speculative structure	Process impurity of the API
Impurity XIII	10.1	427.224 1	$C_{25}H_{27}N_6O^+$	Speculative structure	Process impurity of the API
Impurity XIV	11.1	429.239 7	$C_{25}H_{29}N_6O^+$	Reference substances	Process impurity of the API
Impurity XV	19.6	443.255 4	$C_{26}H_{31}N_6O^+$	Speculative structure	Process impurity of the API
Impurity XVI	22.9	431.255 4	$C_{25}H_{31}N_6O^+$	Reference substances	Process impurity of the API

厄贝沙坦制剂的每日最大剂量为 0.3 g,参考人用药品技术要求国际协调理事会原料药中的杂质和制剂中的杂质的指导原则(ICH Q3A、ICH Q3B),厄贝沙坦原料药降解产物的鉴定限度为 0.1%,厄贝沙坦制剂降解产物的鉴定限度为 0.2%。厄贝沙坦原料药及其制剂的加速试验中,上述 16 个杂质中,仅制剂中已知杂质 I 和杂质 V 含量超过了 0.2%,其余杂质含量均低于 0.1%。本研究对杂质 V 结构进行了确证,并参考人用药品技术要求国际协调理事会基因毒性杂质指导原则(ICH M7)的要求,采用 Derek Nexus 和 Sarah Nexus 对其遗传毒性(致突变性)进行了预测,结果均为阴性,因此建议规定厄贝沙坦制剂中杂质 V 含量不得过 0.2%。现有厄贝沙坦制剂标准中规定杂质 I 含量不得过 0.2%,其他单个杂质含量不得过 0.2%,现有标准较为合理。

根据稳定性试验结果数据分析,厄贝沙坦在高温高湿条件下杂质 III、杂质 VI、杂质 VII、杂质 VIII、杂质 X、杂质 XII、杂质 XIII、杂质 XIV、杂质 XV 和杂质 XVI 含量基本保持稳定,推测以上 10 个杂质均为工艺杂质。其中杂质 III、杂质 VI、杂质 VII

为厄贝沙坦制剂中检出杂质,推测为制剂工艺杂质,与制剂生产过程中的干燥工艺有关。各工艺杂质均保留了厄贝沙坦的主要结构,结构差异均集中在二氮杂螺环上的基团,并且存在多个同分异构体。

厄贝沙坦制剂在高温高湿条件下杂质 I、杂质 V、杂质 IX 和杂质 XI 含量均有明显增加趋势,推测均为制剂降解杂质。此外,杂质 I、杂质 II 和杂质 IV 为碱降解杂质,共计 6 个降解杂质。杂质 V 结构上比厄贝沙坦增加了羟甲基,推测其是厄贝沙坦与甲醛加成反应生成的产物<sup>[10]</sup>。杂质 IX 和杂质 XI 是在厄贝沙坦结构上增加了羟乙基,推测其是厄贝沙坦与乙醛加成反应生成的产物,并且在反应时发生二氮杂螺环异构化,生成两个同分异构体。

根据降解杂质结构与来源分析,提示厄贝沙坦原料药与制剂生产企业在生产过程中需要关注高温、高湿和碱性等影响因素对厄贝沙坦稳定性产生的影响。对于厄贝沙坦制剂过程中以及辅料<sup>[15]</sup>中可能引入的甲醛和乙醛残留需要严格控制,避免厄贝沙坦和甲醛和乙醛反应生成相应的杂质产物。

## REFERENCES

- [ 1 ] LAI Y H. Clinical effect and safety of irbesartan hydrochlorothiazide in the treatment of primary hypertension [J]. *Chin J Clin Ratio Drug Use*(临床合理用药杂志), 2022, 15(18):19-25.
- [ 2 ] SHAH R P, SAHU A, SINGH S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC-MS/TOF, MS<sup>n</sup>, on-line H/D exchange and LC-NMR. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5):1037-1046.
- [ 3 ] CAI P J, LI Y. Mass fragmentation patterns of sartans and application [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2017, 48(1):68-77.
- [ 4 ] KUMAR A, DAREKAR G, RAMAGIRI S, *et al.* Generic workflow using advanced analysis and data interpretation tools for identification of irbesartan degradation products by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2015, 15(8):352-363.
- [ 5 ] MUTHA A K, GUDURU S, KAL M, *et al.* Degradation study of irbesartan: Isolation and structural elucidation of novel degradants [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 157:180-205.
- [ 6 ] CAI P J, LI Y. Research progress of sartans' impurity profile [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(3):377-405.
- [ 7 ] SATYA B, ANJANE Y, VEERA P, *et al.* Synthesis and characterization of irbesartan impurities [J]. *Heterocycl Commun*, 2007, 13(4):223-228.
- [ 8 ] HUI F, SONG M, HANG T J. Content determination of irbesartan and hydrochlorothiazide tablets and its related substances [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2010(3):236-245.
- [ 9 ] SARAVANAN S, ANSARI AT. LC-MS/MS study of the trace level impurities of irbesartan an angiotensin II receptor antagonist molecule to its origin through nMS<sup>2</sup> technique [J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2019, 11(1):38-43.
- [ 10 ] WANG G, FISKE J-D, JENN S-P, *et al.* Identification and control of a degradation product in Avapro film-coated tablet: low dose formulation. [J]. *Pharm Dev Technol*, 2008, 13(5):393-399.
- [ 11 ] GOSWAMI N. A validated stability-indicating liquid chromatographic method for determination of process related impurities and degradation behavior of irbesartan in solid oral dosage [J]. *J Adv Pharm Technol*, 2014, 5(1):33-40.
- [ 12 ] RADL S, STACH J, HAVLICEK J, *et al.* Synthesis and identification of some impurities of irbesartan [J]. *Acta Chim Slov*, 2009, 56(3):559-565.
- [ 13 ] RAO KVVP, DANDALA R, HANDA V K, *et al.* Improved methods for the synthesis of irbesartan, an antihypertensive active pharmaceutical ingredient [J]. *Synthetic Commun*, 2007, 37(17):2897-2905.
- [ 14 ] WANG S Q, CHEN W W, DONG P, *et al.* Preparation method of irbesartan isomers and intermediates:China, 201610471864.0 [P]. 2016-11-09.
- [ 15 ] WU Y, LEVONS J, NARANG AS, *et al.* Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(4):1248-1263.

(收稿日期:2023-09-25)