

LC-MS/MS 法分析萘普生钠中强制破坏后的降解产物

王丽, 申兰慧, 沈于兰

(无锡市药品安全检验检测中心, 无锡 214028)

摘要 目的: 采用色谱-质谱联用技术对萘普生钠中强制破坏后的降解产物进行结构鉴定。方法: 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水-甲酸 (48:52:0.1) 为流动相, 检测波长为 262 nm, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL, 对萘普生钠的降解产物进行分离。同时, 采用 HPLC-QTOF MS 对萘普生钠的主要降解产物进行定性研究。结果: 在该色谱条件下, 各降解产物峰和萘普生钠峰达到有效分离, 并初步鉴定出萘普生钠中 4 个主要降解产物的结构。结论: 本法可用于测定萘普生钠的降解产物, 并对其药品质量控制提供了参考依据。

关键词: 液相色谱-四极杆飞行时间质谱法; 萘普生钠; 降解产物; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 09-1701-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.09.23

Identification of degradation compounds in naproxen sodium by LC-MS/MS

WANG Li, SHEN Lan-hui, SHEN Yu-lan

(Wuxi Institute for Drug Safety, Wuxi 214028, China)

Abstract Objective: To identify the degradation compounds in naproxen sodium by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods:** The sample was separated on a CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile-water-formic acid (48:52:0.1) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 262 nm. The column temperature was 35 °C and the injection volume was 20 μL. The molecular structures of the degradation compounds of naproxen sodium were identified by HPLC-QTOF MS, and the main degradation compounds were identified in positive ion mode. **Results:** The degradation compounds were completely separated from naproxen sodium. Four major degradation compounds in naproxen sodium were preliminarily identified. **Conclusion:** The established method is useful for the determination and identification of the degradation compounds in naproxen sodium, which can be used in the quality control of naproxen sodium.

Keywords: HPLC-QTOF MS; naproxen sodium; degradation compounds; separation; structure identification

萘普生钠(naproxen, 结构式见图1)为芳基乙酸类非甾体抗炎镇痛药萘普生的钠盐,是萘普生的换代产品,萘普生钠盐可以增加药物的溶解度,便于药物的溶出,有利于机体对药物的吸收利用^[1]。文献报道,光线、空气、pH对萘普生钠的稳定性有较大影响^[2]。中国药典2015年版采用薄层色谱法测定萘普生钠的有关物质^[3]。欧洲药典采用高效液相色谱法对萘普生钠进行有关物质的分析,但流动相中使用了非挥发性的磷酸盐体系,无法与质谱联用进行有关物质结构的分析^[4]。笔者在参与针对新版药典用的萘普生钠对照品的标化工作中,查阅各国药典及相关文献^[4-10],建立了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定萘普生钠中强制破坏后的降解产物,并对其主要降解产物进行结构鉴定,为该药品的质量标准提高提供科学参考。

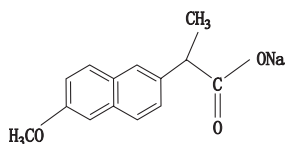


图1 萘普生钠化学结构

Fig.1 The chemical structure of naproxen sodium

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站;(包括四元泵, 柱温箱, 自动进样器, 二极管阵列 PDA 检测器, 美国 Waters 公司); Infinity 1290 超高效液相色谱仪 /6530A Q-TOF 联用质谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器, 四级杆飞行时间质谱仪, 美国 Agilent 公司); Mettler Toledo XS-205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

萘普生钠对照品(批号: 100330-200702, 中国食品药品检定研究院, 含量(按 $C_{14}H_{13}NaO_3$ 计): 100.0%, 供 UV 法含量测定用); 6-甲氧基-2-萘乙酮(批号: 100140-200303, 中国食品药品检定研究院, 供 TLC 法萘普生有关物质检查用); 乙腈、甲酸均为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C_{18} (填料: 十八烷基硅烷键合硅胶, 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水-甲酸(48:52:0.1); 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波

长: 262 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; PDA 扫描范围: 190~400 nm; 进样量: 20 μ L。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 ESI, 正离子检测模式, 喷雾电压: 3.5 kV; 毛细管温度: 350 $^{\circ}$ C; 干燥气流量: 10 L \cdot min⁻¹; 干燥气压力: 310.3 kPa; MS 扫描范围: m/z 50~1 000; MS/MS 扫描范围: m/z 50~500; MS/MS 分析时的碰撞能量: 20 eV。样品从高效液相色谱仪通过 T 型三通阀以 1:1 的分流比引入质谱离子源内。

2.3 溶液的配制

2.3.1 供试品溶液 精密称取萘普生钠对照品 10 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

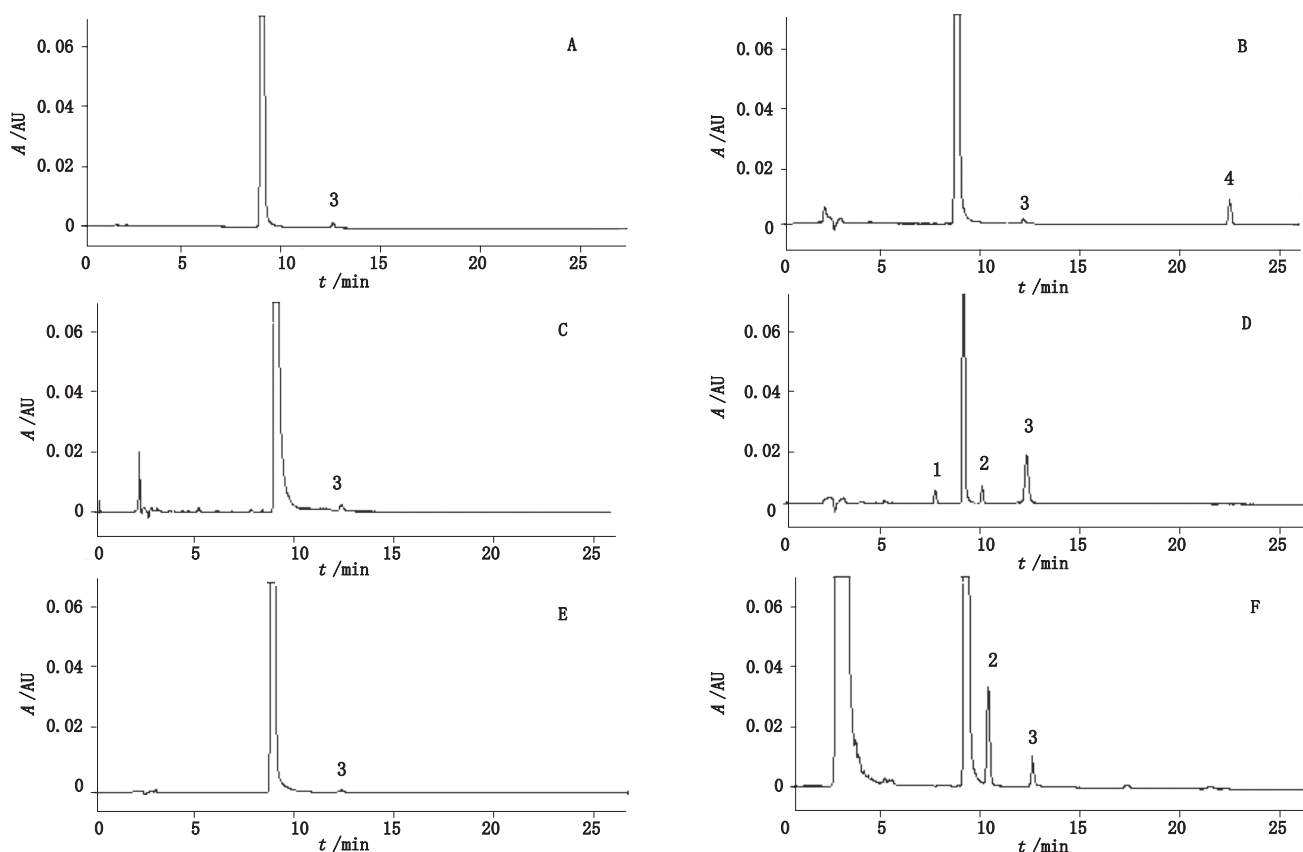
2.4 方法的验证

2.4.1 破坏性试验 取萘普生钠对照品约 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取续滤液 5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 进行破坏性试验: ①酸破坏: 加 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 室温下放置 3 h, 用 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 加流动相稀释至刻度, 摇匀; ②碱破坏: 加 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 室温下放置 3 h, 用 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 至中性, 加流动相稀释至刻度, 摇匀; ③光破坏: 置照度为 (4 500 \pm 500) lx 的灯检箱下照射 24 h, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。④高温破坏: 沸水浴放置 2 h 后, 放冷至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀; ⑤氧化破坏: 加 30% 过氧化氢 2 mL, 室温下放置 3 h, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。按“2.1”项下的色谱条件记录色谱图, 见图 2。可见, 该方法能有效检测出各种破坏产生的降解产物, 且各降解产物峰间及降解产物峰与主峰间均能达到基线分离。

2.4.2 精密度试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录各色谱图的峰面积, RSD 为 0.30% ($n = 6$)。

2.4.3 检出限 精密称取萘普生钠对照品适量, 加流动相溶解并定量稀释, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 当信噪比为 3:1 时, 得到检出限为 1.1 ng。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在室温下于 0、2、4、8、10、12 h 分别进行测定, 记录色谱峰面积, 结果 RSD 为 0.19% ($n = 6$), 表明室温下供试品溶液在 12 h 内稳定。



A. 未破坏 (untreated) B. 酸破坏 (destruction with acid) C. 碱破坏 (destruction with base) D. 光照破坏 (photo destruction) E. 高温破坏 (heat destruction) F. 氧化破坏 (oxidative destruction)

图2 破坏性试验 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of samples in destruction tests

2.4.5 耐用性试液 分别对液相色谱方法中典型变动因素: 流动相组成比例乙腈-水-甲酸 (48:52:0.1, 45:55:0.1)、不同品牌的同类型色谱柱 [Agilent Eclipse C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)、Waters Xbridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]、柱温 (32、38 °C) 及流速 (0.8、1.2 mL·min⁻¹), 以同一破坏性试验样品进行检测, 各降解产物峰与主峰的分度均达到要求, 表明该方法耐用性良好。

2.5 萘普生钠降解产物测定

按“2.3”项下分别制备供试品溶液和对照溶液, 按“2.1”项下的色谱条件, 取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分峰高约为满量程的 10%~20%; 再取供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍, 平行测定 3 次, 采用主成分自身对照法计算降解产物含量, 结果测得对照品中单个最大降解产物含量为

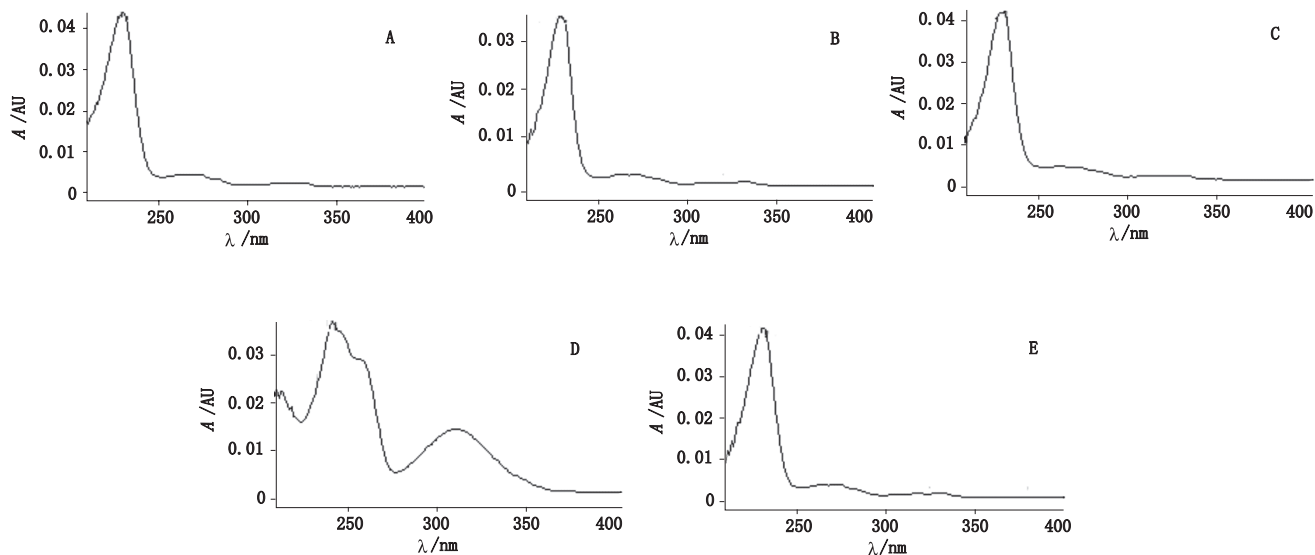
0.03%。

2.6 主要降解产物的确认

对供试品溶液破坏后 4 个主要的降解产物, 按“2.1”项下的色谱条件和质谱条件进行分析, 得到其 LC-PDA (图 3) 和 LC-MS/MS, 检查各峰的纯度, 4 个峰均被认为是单一物质峰, LC-TOF 测得这些降解产物母离子的精密质量 (见表 1), 经综合解析, 确证了其主要的结构。

萘普生钠: 萘普生钠在该流动相体系中以萘普生的形成存在, 萘普生的相对分子质量为 230, 一级质谱图中测得的 m/z 231 和 m/z 253 分别为萘普生的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰, 进一步对 m/z 231 进行二级全扫描质谱分析, 其二级质谱图及可能裂解途径见图 4。

降解产物 1: ESI⁺-MS 测得萘普生钠降解产物 1 的一级质谱图中 m/z 203 为 $[M+H]^+$ 峰, 表明其相对分子质量为 202, 进一步对 m/z 203 进行二级全扫描



A. 萘普生钠(naproxen sodium) B. 降解产物 1(degradation compound 1) C. 降解产物 2(degradation compound 2) D. 降解产物 3(degradation compound 3) E. 降解产物 4(degradation compound 4)

图 3 萘普生钠及其主要降解产物的 LC-PDA 图

Fig. 3 LC-PDA spectra of naproxen sodium and its major degradation compounds

质谱分析,其二级质谱碎片与萘普生钠相似,且其 PDA 谱也与萘普生钠相似,说明其与萘普生钠具有相似的共轭体系。结合其二级质谱碎片信息及欧洲药典^[3],推测降解产物 1 为萘普生钠的羧基还原产物。其二级质谱主要碎片均可经此结构合理裂解产生(图 5)。

降解产物 3: 对 6-甲氧基-2-萘乙酮对照品进行质谱分析,一级质谱分析结果产生了准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 201,在相同的色谱及质谱条件下,萘普生钠降解产物 3 与 6-甲氧基-2-萘乙酮对照品色谱保留时间及 PDA 光谱图均相同。此外,在相应的一级全扫描质谱及二级全扫描分析中,检测到降解产物 3 与 6-甲氧基-2-萘乙酮相同的准分子离子峰及二级质谱碎片也完全相同,由此证明降解产物 3 为 6-甲氧基-2-萘乙酮,其二级质谱主要碎片及可能裂解过程如图 6 所示。

降解产物 2: ESI⁺-MS 测得降解产物 2 的一级质谱图中 m/z 201 为 $[M+H]^+$ 峰,表明其相对分子质量为 200,与 6-甲氧基-2-萘乙酮相对分子质量相同。同时与 6-甲氧基-2-萘乙酮相比,降解产物 2 的 PDA 光谱谱缺少 242 nm 的吸收带,最大吸收波长在 230 nm,说明其萘环上的共轭体系减少,K 吸收带蓝移^[11]。推测降解产物 2 与 6-甲氧

基-2-萘乙酮具有相同的母体结构,取代基部分有所不同,二级质谱主要碎片均可经此结构合理裂解产生(图 7)。

降解产物 4: ESI⁺-MS 测得降解产物 4 的一级质谱图中 m/z 245 为 $[M+H]^+$ 峰,表明其相对分子质量为 244,比萘普生多 14,与一个甲基单元对应。降解产物 4 的 LC-PDA 光谱图均与萘普生钠相似,且其二级质谱碎片也与萘普生钠相似,结合欧洲药典^[4],推测降解产物 4 与萘普生钠具有相同的母体结构,取代基部分有所不同,见图 8。

3 讨论

3.1 波长的选择

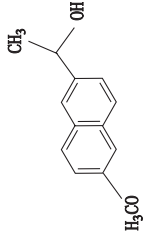
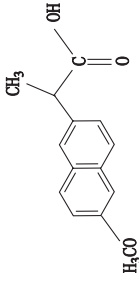
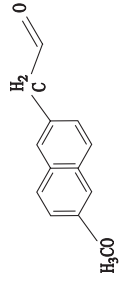
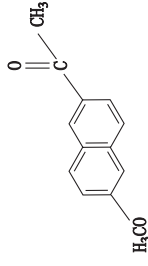
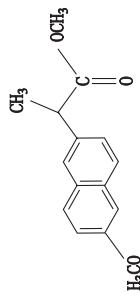
采用 PDA 检测器分别对萘普生钠及其主要降解产物进行光谱分析,萘普生钠及其降解产物在 262 nm 波长处均有较大的响应,且在该波长下测得的杂质个数较多,基线更平直,色谱峰形更好,故最终确定 262 nm 为检测波长。

3.2 杂质来源分析

萘普生钠在高温、强碱、强酸条件下较为稳定,但在光照、氧化条件下降解产物明显增多,尤其是降解产物 2、3,故在药品制备或贮存过程中应注意密闭隔氧。根据萘普生的合成工艺^[12-15],降解产物 3 可能为合成过程中不完全反应带入的杂质。参照欧洲药

表 1 萘普生钠及其主要降解产物的质谱特征和推测结构

Tab. 1 Mass spectrometry characteristics and proposed chemical structures of naproxen sodium and its major degradation compounds

峰号 (peak No.)	母离子 (parent ion) <i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min (LC-PDA)	推测的离子式 (proposed ion formula)	实测精确质量 (exact mass)	质量误差 (mass error)	不饱和度 (degree of unsaturation)	主要离子 (major product ion) <i>m/z</i>	λ_{max} /nm	降解产物可能化学结构 (proposed chemical structure of degradation product)
1	203	7.8	C ₁₃ H ₁₅ O ₂ ⁺	203.107 2	2.461 8 × 10 ⁻⁶	7	185, 170	230, 262, 271, 331	
萘普生 (naproxen)*	231	8.9	C ₁₄ H ₁₅ O ₃ ⁺	231.107 5	-0.432 7 × 10 ⁻⁶	7.5	213, 185, 170	231, 262, 272, 330	
2	201	10.1	C ₁₃ H ₁₃ O ₂ ⁺	201.090 9	-3.481 0 × 10 ⁻⁶	7	201, 185, 169	230, 262, 271, 330	
3	201	12.5	C ₁₃ H ₁₃ O ₂ ⁺	201.091 2	-1.989 1 × 10 ⁻⁶	7	201, 185, 157	242, 258, 310	
4	245	23.4	C ₁₅ H ₁₇ O ₃ ⁺	245.117 7	2.039 8 × 10 ⁻⁶	7	185, 170	232, 262, 272, 331	

*注 (note): 以萘普生的形式存在 (in the form of naproxen)

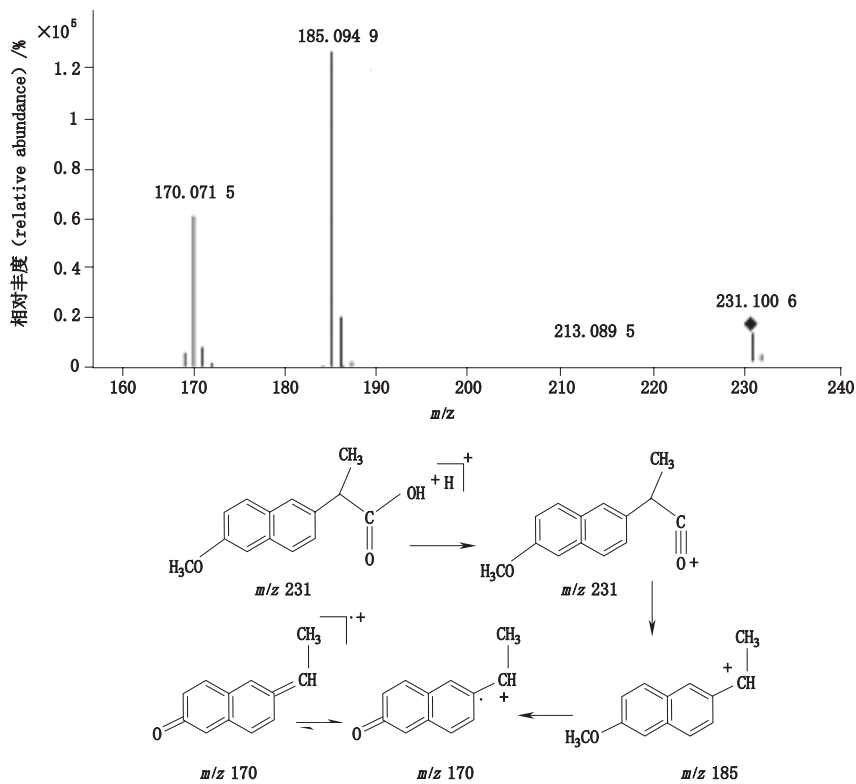


图 4 萘普生 $[M+H]^+$ 离子图的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 4 MS/MS spectrum of naproxen $[M+H]^+$ ion and its fragmentation pathway

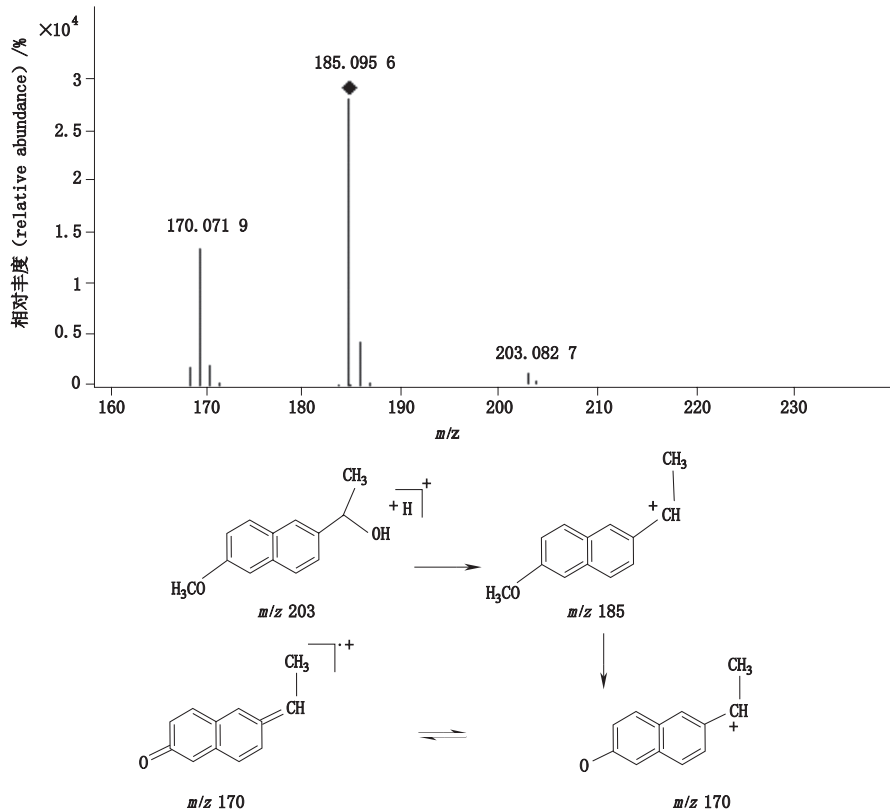


图 5 降解产物 1 $[M+H]^+$ 离子图的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 5 MS/MS spectrum of degradation product 1 $[M+H]^+$ ion and its fragmentation pathway

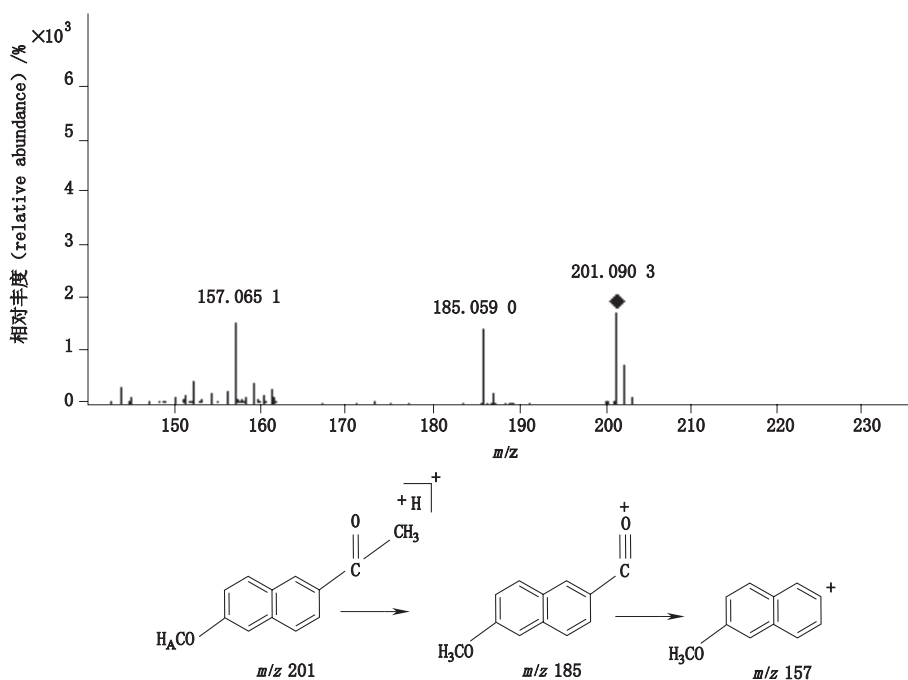


图 6 降解产物 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子图的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 6 MS/MS spectrum of degradation compound 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion and its fragmentation pathway

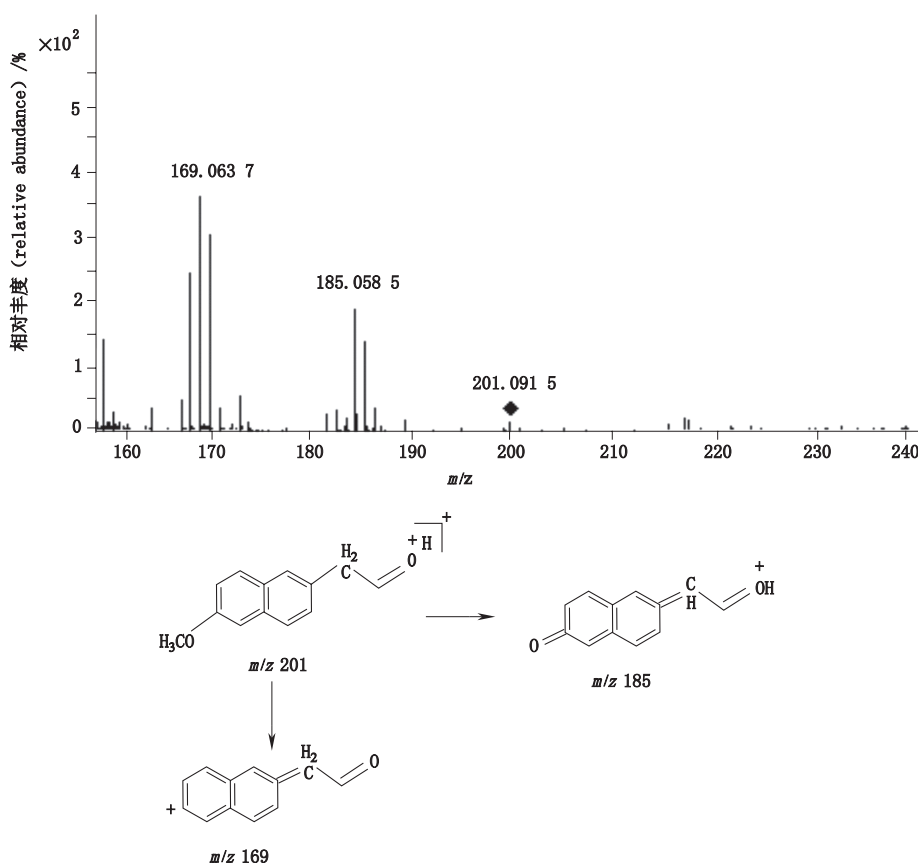


图 7 降解产物 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子图的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 7 MS/MS spectrum of degradation compound 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion and its fragmentation pathway

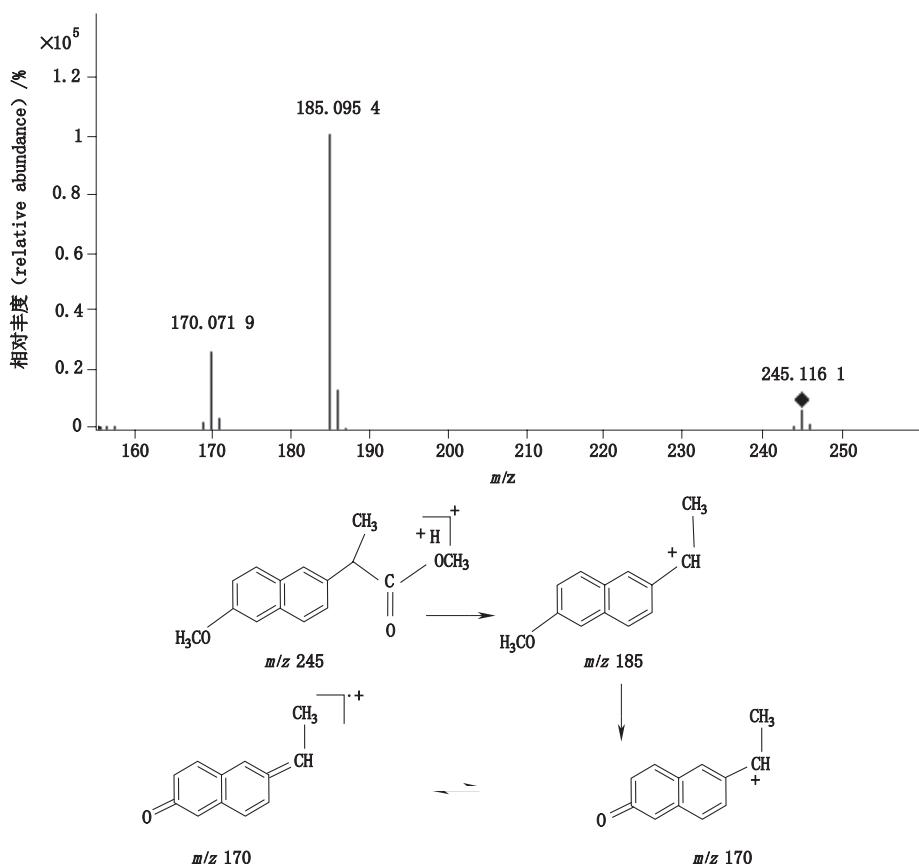


图 8 降解产物 4 [M+H]⁺ 离子图的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 8 MS/MS spectrum of degradation compound 4 [M+H]⁺ ion and its fragmentation pathway

典^[4]所规定的可能降解产物结构,结合各降解产物峰的一级及二级质谱信息,初步鉴定出萘普生钠的降解产物 1、3、4 分别与英国药典的杂质 K、L、E 相对应,而降解产物 2 尚未见报道,其准确结构有待于通过制备进行 H-NMR 确证。

4 结论

文献报道大多采用磷酸盐的色谱体系对萘普生或萘普生钠进行质量控制^[4,16],但是,磷酸盐作为非挥发性盐常常会由于结块而将电喷雾质谱的喷针堵死,因而无法利用色谱-质谱联用技术对萘普生钠的降解产物进行定性分析。本文建立了 LC-MS/MS 法分析萘普生钠强制破坏后的主要降解产物,该方法简便、灵敏、准确,专属性强,为评价萘普生钠的质量提供了依据。

参考文献

[1] 王丽君,王东凯,黎玲,等. HPLC 法测定注射用萘普生钠的含量及有关物质[J]. 中国药理学杂志, 2006, 4(1): 16
WANG LJ, WANG DK, LI L, *et al.* Determination of naproxen

sodium for injection with HPLC [J]. *Chin J Pharm*, 2006, 4(1): 16
[2] 王国祥,宋宏春,宋士强,等. 萘普生钠注射液的稳定性研究[J]. 中国药理学杂志, 1992, 27(11): 663
WANG GX, SONG HC, SONG SQ, *et al.* Study on the stability of naproxen sodium injection [J]. *Chin Pharm J*, 1992, 27(11): 663
[3] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 1211
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 1211
[4] EP 8.0 [S]. 2013: 2830
[5] 杨俊玲,康新立. HPLC 法测定萘普生钠片的含量[J]. 中国当代医药, 2011, 18(20): 39
YANG JL, KANG XL. Determination of daidzein naproxen sodium tablets by HPLC [J]. *China Mod Med*, 2011, 18(20): 39
[6] 高磊,石婧. HPLC 法测定萘普生有关物质[J]. 中国药品标准, 2005, 6(6): 17
GAO L, SHI Q. Examination of related substances in naproxen by HPLC [J]. *Drug Stand China*, 2005, 6(6): 17
[7] 刘玉春,许世辉. HPLC 法测定萘普生钠注射液的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(11): 60
LIU YC, XU SH. Determination of naproxen sodium injection by HPLC [J]. *Strait Pharm J*, 2008, 20(11): 60.
[8] 王国祥,宋宏春,宋士强,等. 紫外分光光度法测定萘普生钠含量[J]. 内蒙古医学院学报, 1990, 12(1): 35