

天麻素注射液的杂质谱研究

张玉娟¹, 张晓明¹, 常琦¹, 于怀东², 杜兴¹

(1. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 2. SCIEX APAC 应用中心, 北京 100015)

摘要 目的: 研究天麻素注射液的杂质谱, 采用高效液相色谱-三重四极杆线性离子阱质谱(Q-TRAP LC/MS/MS)联用技术鉴定杂质的结构, 并归属杂质来源, 明确杂质与生产及储存的关系。**方法:** 采用 HPLC 法测定 18 家企业的 200 批天麻素注射液的有关物质, 确定检出杂质, 同时对天麻素进行强制降解试验研究, 归属杂质来源, 并采用 Q-TRAP LC/MS/MS 及 HPLC 对照比对法鉴定杂质结构。**结果:** 天麻素注射液中共检测到 3 种杂质: 4-醛基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(杂质 1)、对羟基苯甲醇(杂质 2)和 4-羟甲基苯基-二元糖苷(杂质 3)。其中杂质 1 为合成工艺杂质也是氧化降解杂质, 检出量最大, 在所有制剂的样品及原料药样品中均检出, 其校正因子为 1.04; 杂质 2 为酸碱降解杂质, 在部分样品中检出; 杂质 3 为一种原料药生产工艺的特有杂质, 在该工艺的原料药及部分制剂的样品中检出。**结论:** 本研究基于质量源于设计理念, 对天麻素注射液的杂质进行了结构鉴定及来源归属, 为其工艺优化, 提高产品质量及质量控制提供参考。

关键词: 天麻素注射液; 杂质结构鉴定; 杂质来源归属; 质量控制; 三重四极杆线性离子阱质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)09-1687-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.09.21

Study on impurity profile of gastrodin injection

ZHANG Yu-juan¹, ZHANG Xiao-ming¹, CHANG Qi¹, YU Huai-dong², DU Xing¹

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China; 2. SCIEX APAC Application Center, Beijing 100015, China)

Abstract Objective: To investigate the impurity profile of gastrodin injection, identify the structures of impurities by triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (Q-TRAP LC/MS/MS), and investigate the relations between impurities and production & storage. **Methods:** The related substances in 200 batches of gastrodin injection from 18 companies were determined by HPLC to confirm the impurities. The sources of impurities were studied by degradation test. The structures of impurities were identified by Q-TRAP LC/MS/MS and HPLC comparison test. **Results:** Three impurities were identified as 4-formylphenyl-β-D-glucopyranosid (impurity 1), 4-hydroxybenzyl alcohol (impurity 2) and 4-hydroxymethylphenyl-binary indicant (impurity 3). The impurity 1, which was found as the impurity with the highest content in all injection samples and two pharmaceutical ingredient (API) samples, was identified as by-product and degradation product. Its correction factor was 1.04. The impurity 2, which was found in some injection samples, was identified as hydrolyzing degradation product. The impurity 3, which was found in one API and some injection samples, was identified as a specific by-product of from that API process.

第一作者 Tel:15294190628; E-mail:yujuanzhang0625@126.com

Conclusion: Based on theory of quality by design (QbD), the structures and sources of impurities in gastrodin injection were identified, thus providing reference for optimizing synthesis process, improving the quality of products and quality control.

Keywords: gastrodin injection; structure identification of impurity; analysis of impurity origins; quality control; Q-TRAP LC/MS/MS

天麻素 (gastrodin), 又名天麻苷, 化学名为 4- 羟甲基苯基- β -D- 吡喃葡萄糖苷 (图 1), 具有镇痛、安眠、抗惊厥等中枢抑制作用^[1], 临床上广泛用于眩晕、头痛、神衰等, 是急性头痛发作的首选药。天麻素是兰科多年生寄生植物天麻 *Gastrodia elate* Blume 中的主要活性成分^[2], 于 1979 年从天麻中分离并合成^[3-4]。天麻素注射液的质量标准在 2001 年上升至国家药品标准^[5], 2014 年再次标准提高^[6], 国外药典无收载。该药每日用量大^[7], 国内外文献却未见对其杂质的系统研究报道。

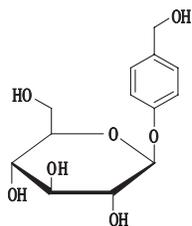


图 1 天麻素的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of gastrodin

本研究基于质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念, 即高品质的产品源于优质的工艺设计^[8], 对天麻素注射液的杂质谱进行研究^[9-12], 采用 Q-TRAP LC/MS/MS 技术鉴定杂质结构^[13-14], 并结合

合成工艺及强力降解试验研究杂质来源, 旨在为天麻素的工艺优化及质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695/2998 高效液相色谱仪; 岛津 LC30A 液相色谱-AB SCIEX 4500 Q-TRAP™ 复合型三重四极杆/线性离子阱串联质谱仪; 资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶), Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶)。Mettler AE-160 电子天平; 北京永光明 DZKW-D-4 水浴锅。

1.2 药品与试剂

天麻素注射液 (2015 年国家评价性抽验品种, 200 批, 18 家生产企业, 典型样品的信息见表 1); 天麻素原料药 (昆明制药, 批号 JT20151013; 浙江诚意药业, 批号 0601-2014-12602); 天麻素对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110807-201306, 含量 96.8%); 杂质 1 (4- 醛基苯基- β -D- 吡喃葡萄糖苷, 委托昆明制药合成, 纯度 > 98.0%); 乙腈为 HPLC 级, 对羟基苯甲醇、磷酸、盐酸、氢氧化钠和高锰酸钾为分析纯, 水为自制纯化水。

表 1 典型样品的样品信息表

Tab. 1 Information of typical samples

编号 (No.)	生产企业 (company)	批号 (batch No.)	规格 (specification)
1	昆明制药 (Kunming Pharmaceutical Corp)	15CW201-11	1 mL: 0.1 g
2	昆明制药 (Kunming Pharmaceutical Corp)	15AX212-22	2 mL: 0.2 g
3	上海现代哈森药业 (Shanghai Modern Hasen Pharmaceutical Cd., Ltd.)	1412160111	2 mL: 0.2 g
4	西南药业 (Southwest Pharmaceutical Co., Ltd.)	15040001 081	5 mL: 0.5 g
5	悦康药业 (Youcare Pharmaceutical Group Co., Ltd.)	4850204	5 mL: 0.6 g

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

采用资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (3:97) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长

220 nm, 进样量 10 μL。

2.2 Q-TRAP LC/MS/MS 条件

色谱条件: 采用 Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 柱温 30 °C, 以乙腈-0.005 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 (2:98) 为流动相, 流速

0.25 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,进样量 3 μL。

Q-TRAP 质谱条件:采用负离子采集模式,多反应监测扫描模式,碰撞电压 45 V;采用正离子采集模式,单离子监测扫描模式,碰撞电压 45 V;电喷雾离子源(ESI);线性离子阱扫描范围 *m/z* 50~600;温度 550 °C,GAS1/2 379 kPa,喷雾电压 5.5~4.5 kV。

2.3 供试品溶液的制备

取天麻素注射液样品适量,加水稀释制成每 1 mL 中含 0.5 mg 的溶液,即得。

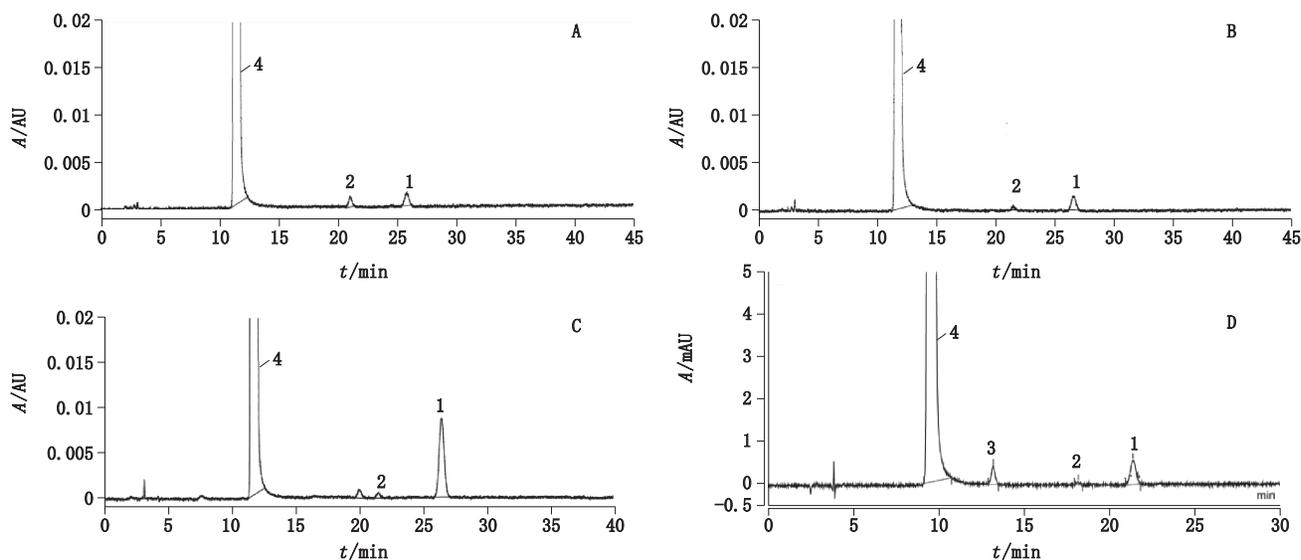
2.4 对照溶液的制备

精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,

用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 强制降解试验

本试验考察了酸、碱、高温、氧化 4 种条件的降解产物。取样品 1 mL,置 50 mL 量瓶中,分别经 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 10 mL 室温放置 24 h,0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 10 mL 室温放置 24 h,直接水浴回流 4 h,0.2 mol·L⁻¹ 高锰酸钾溶液 1 mL 室温放置 20 h 破坏,酸碱破坏样品用适量 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸或 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠中和,各破坏后的溶液用水稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件分析,同时进行空白试验。酸、碱及氧化降解色谱图见图 2,由图看出,在该色谱条件下,各降解产物及天麻素主峰之间均能有效分离。



1. 杂质 1 (impurity 1) 2. 杂质 2 (impurity 2) 3. 杂质 3 (impurity 3) 4. 天麻素 (gastrodin)

A. 酸破坏 (destroyed by acid) B. 碱破坏 (destroyed by alkali) C. 氧化破坏 (destroyed by oxidation) D. 天麻素注射液样品 (sample of gastrodin injection)

图 2 降解试验 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of degradation tests

2.6 样品分析结果

2.6.1 有关物质结果统计 采用“2.1”项下 HPLC 色谱条件对 18 家企业的 200 件样品及 2 家企业的原料药进行测定,测得供试品溶液的高效液相色谱图。共检出 3 种杂质(杂质 1、杂质 2、杂质 3),结果见表

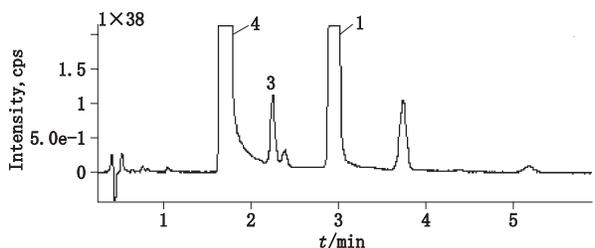
2,典型色谱图见图 2。分析各杂质的检出结果,杂质 1 在所有企业的样品及 2 家企业的原料药中均检出,且为最大单杂,有 25 批次的检出量为 0.2% 及以上,杂质 2 和杂质 3 在部分企业的样品中检出,杂质 3 在浙江诚意药业的原料药中检出。

表 2 天麻素注射液有关物质测定结果

Tab. 2 Detection results of the related substances in gastrodin injection

有关物质 (related substances)	相对保留时间 (RRT)	检出批次 (detection batches)	检出率 (detection rate)/%	检出量 (detection amount)/%
杂质 (impurity) 1	2.25	200	100	0.02~0.3
杂质 (impurity) 2	1.90	19	10	0.002~0.1
杂质 (impurity) 3	1.38	73	37	0.006~0.09

2.6.2 质谱分析结果 采用“2.2”项下 Q-TRAP LC/MS/MS 条件分析,典型色谱图见图 3,杂质 1 的质谱图见图 4,杂质 3 的质谱图见图 5。



1. 杂质 1 (impurity 1) 3. 杂质 3 (impurity 3) 4. 天麻素 (gastrodin)

图 3 天麻素注射液 LC/MS/MS 总离子流图

Fig. 3 TIC profile of gastrodin injection

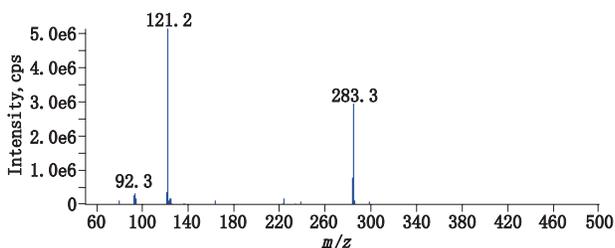


图 4 杂质 1 的二级质谱图

Fig. 4 MS/MS spectrum of the impurity 1

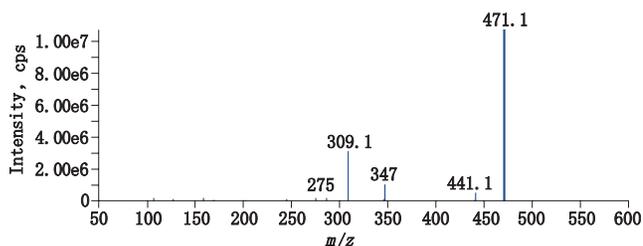


图 5 杂质 3 的二级质谱图

Fig. 5 MS/MS spectrum of the impurity 3

采用 Q-TRAP LC/MS/MS 技术得到相对分子质量和二级质谱碎片信息,结合杂质的产生途径,根据化合物的一般裂解规律,推测化学结构。各杂质的分析结果见表 3。

4- 醛基苯基 -β-D- 吡喃葡萄糖苷 (杂质 1): 在相对保留时间 2.25 处测得。杂质 1 在氧化条件下随氧化时间延长而不断增大,说明其为氧化降解杂质,杂质 1 在 2 家企业的原料药及所有样品中均有检出,判断其也为合成工艺杂质。应用 Q-TRAP LC/MS/MS 技术进行分析,负离子模式下,一级全扫描测得准分子离子 [M-H]⁻ m/z 为 283.3,比天麻素对照品分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 285.3 少 2。二级质谱测得的主

表 3 天麻素注射液杂质的质谱特征和推测结构

Tab. 3 Mass characteristics and proposed chemical structures of impurities in gastrodin injection

杂质编号 (impurity No.)	母离子 (parent ion) m/z	碎片离子 (daughter ion) m/z	结构 (structure)
杂质 (impurity) 1	[M-H] ⁻ 283.3	121.1	
杂质 (impurity) 2	/	/	
杂质 (impurity) 3	[M+Na] ⁺ 471.1	309.1, 347.0, 441.1	

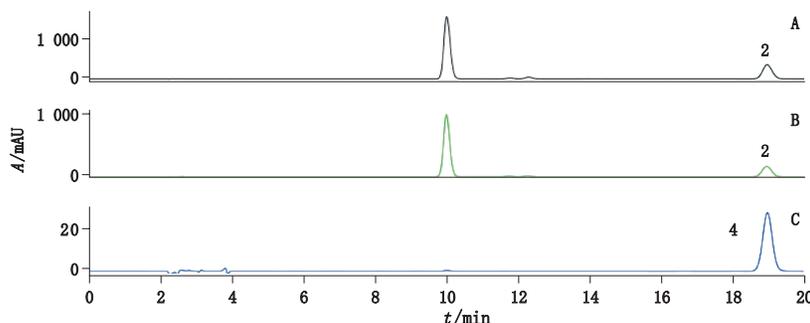
要碎片离子 m/z 121.2 为 [M-H-162]⁻, 162 为 1 个六碳糖分子,碎片离子 m/z 121.2 与对羟基苯甲醛的特征碎片离子吻合,因此确证杂质 1 即为 4- 醛基苯基 -β-D- 吡喃葡萄糖苷,其分子式 C₁₃H₁₆O₇, 相对分子质量 284.3。质谱图见图 4。

对羟基苯甲醇 (杂质 2): 在相对保留时间 1.91

处测得。杂质 2 在酸碱条件下产生,并随水解时间延长而不断增多,说明其为酸碱水解杂质。查阅中国药典,检索到天麻素相关的杂质有对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛等^[15-18],采用 HPLC 对照比对法,比对出杂质 2 对应为对羟基苯甲醇,且在 3D 图上其紫外谱图完全一致;分析天麻素结构是对羟基

苯甲醇苷元在酚羟基上连有 1 个葡萄糖苷的结构,在酸碱水解条件下,天麻素最易水解断裂的一定是酚糖苷键,糖苷键水解断裂生成对羟基苯甲醇苷

元,与杂质 2 为酸碱水解杂质相一致,因此确认杂质 2 为对羟基苯甲醇, HPLC 对照比对试验图谱见图 6。



2. 杂质 2 (impurity 2) 4. 对羟基苯甲醇 (hydroxybenzyl alcohol)

A. 酸破坏 (destroyed by HCl) B. 碱破坏 (destroyed by NaOH) C. 对羟基苯甲醇对照品 (4-hydroxybenzyl alcohol reference standard)

图 6 HPLC 对照比对试验图谱

Fig. 6 HPLC chromatograms of comparison test

4- 羟甲基苯基 - 二元糖苷 (杂质 3): 在相对保留时间 1.38 处测得。杂质 3 在破坏降解溶液中未见增加,在浙江诚意药业的原料药及部分制剂中检出,说明其为合成工艺杂质。应用 Q-TRAP LC/MS/MS 技术进行分析,负离子模式下,一级全扫描测得准分子离子 $[M-H]^-$ m/z 为 447.2,正离子模式下,准分子离子 $[M+Na]^+$ m/z 为 471.1。二级质谱的主要碎片离子 m/z 309.1 为 $[M+Na-162]^+$, 162 是 1 个六碳糖分子,碎片离子 m/z 309.1 恰与天麻素加钠离子 (286+23) 一致,因此初步判断结构为天麻素结构上再加 1 个六碳糖;碎片离子 m/z 347.0 为 $[M+Na-124]^+$ 峰, 124 与天麻素苷元对羟基苯甲醇 ($C_7H_8O_2$) 苷元特征离子一致;碎片离子 m/z 441.1 为 $[M+Na-30]^+$ 峰, 30 是 1 个水分子 (H_2O), 丢失 1 个水分子说明苷元上有 1 个羟基。综上,判断结构是对羟基苯甲醇苷元在酚羟基上连有 1 个二糖的糖苷。质谱图见图 5。

2.7 杂质 1 的校正因子测定

采用斜率比法对杂质 1 的校正因子进行测定。取天麻素对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释制成每 1 mL 中含 43.79、87.58、131.37、175.16、218.95、262.74、306.53 μg 的溶液;取杂质 1 适量,精密称定,加水溶解并稀释制成每 1 mL 中含 2.87、4.78、23.91、38.26、119.55、239.10、478.20 μg 的溶液。分别取上述溶液,按“2.1”项下色谱条件分析,以峰面积 Y 为纵坐标,对浓度 X 进行线性回归,天麻素、杂质 1 的

线性方程:

$$Y=2.03 \times 10^7 X - 5.68 \times 10^4 \quad r=1.000$$

$$Y=2.11 \times 10^7 X - 3.03 \times 10^3 \quad r=1.000$$

天麻素及杂质 1 的线性关系均良好。根据线性方程斜率计算得杂质 1 的校正因子为 1.04,因此可以采用不加校正因子的主成分自身对照法计算杂质 1 的含量。

2.8 讨论

本研究依据现行中国药典标准检验有关物质,对天麻素注射液及其原料的杂质进行检测分析,并结合 Q-TRAP LC/MS/MS 技术及强制降解试验对检出的 3 种杂质进行结构鉴定及来源归属。其中杂质 1 和杂质 3 都为合成工艺杂质,杂质 1 在所有样品中检出,其校正因子为 1.04,杂质 3 在浙江诚意药业的原料药及部分制剂中检出,说明杂质 3 是浙江诚意药业原料药合成工艺的特有杂质。杂质 2 为酸碱降解杂质,在原料药中未检出,仅在少量样品中微量检出,因此该制剂在生产使用过程中应控制 pH。本研究为天麻素合成工艺优化及其制剂质量控制提供了参考依据。

参考文献

- [1] JU XH, SHI Y, LIU N, *et al.* Determination and pharmacokinetics of gastrodin in human plasma by HPLC coupled with photodiode array detector[J]. J. Chromatogr B, 2010, 878(22): 1982
- [2] 徐顶巧,周建军,刘益红. 天麻中天麻素提取检测方法研究[J]. 中药材, 2012, 35(11): 1799

- XU DQ, ZHOU JJ, LIU YH. Research the extraction and detection method of gastrodin content in *Gastrodin elata* [J]. *J Chin Med Mater*, 2012, 35(11): 1799
- [3] 李海燕, 郑萍, 谢笑天. 合成天麻中微量二组分的分离和鉴定 [J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(15): 1478
- LI HY, ZHENG P, XIE XT. Isolation and identification of two components in the synthetic agent gastrodin [J]. *Chin J New Drugs*, 2006, 15(15): 1478
- [4] 袁胜浩, 王东, 张香兰. 天麻中天麻素含量的影响因子研究 [J]. *云南植物研究*, 2008, 30(1): 110
- YUAN SH, WANG D, ZHANG XL, *et al.* The influencing factors on content in the herbal materials of *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2008, 30(1): 110
- [5] 国家药品标准: 化学药品地方标准上升国家标准. 第 16 册 [S]. 2001: 214
- National Drug Standard: National Standards for Chemicals Promoted from Local Standards. Vol 16 [S]. 2001: 214
- [6] WS₁-XG-023-2001-2014 国家药品标准 [S]. 2014
- WS₁-XG-023-2001-2014 National Drug Standard [S]. 2014
- [7] 刘辉, 张婧, 樊光辉, 等. HPLC 法测定天麻素缓释片中天麻素的含量 [J]. *中国药师*, 2013, 16(6): 825
- LIU H, ZHANG J, FAN GH, *et al.* Determination of gastrodin in Tianmasu sustained release tablets by HPLC [J]. *China Pharm*, 2013, 16(6): 825
- [8] 金少鸿, 粟晓黎. 基于 QbD 理念的药品质量分析研究新概念 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(10): 1845
- JIN SH, SU XL. A new concept of drug quality surveillance based on quality by design [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(10): 1845
- [9] 蔡鹏俊, 李悦. 几种沙坦类药物的杂质谱研究现状 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(3): 377
- CAI PJ, LI Y. Research progress of sartans' impurity profile [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(3): 377
- [10] 黄婧, 吴宏伟, 李玲玲. 依诺沙星制剂有关物质的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(2): 330
- HUANG J, WU HW, LI LL. Study on related substances in enoxacin preparations [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(2): 330
- [11] 康铁纯, 顾宵, 何佳佳, 等. RP-HPLC 测定卡维地洛片中的杂质 D 和 E [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(10): 1838
- KNG TC, GU X, HE JJ, *et al.* Determination of impurities D and E of carvedilol tablets by RP-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(10): 1838
- [12] 闻洪亮, 裴亚, 张含智, 等. 注射用氯唑西林钠的杂质谱研究 [J]. *中国药学杂志*, 2016, 51(6): 488
- WEN HL, QIU Y, ZHANG HZ, *et al.* Impurity profile study of cloxacillin sodium for injection [J]. *Chin Pharm J*, 2016, 51(6): 488
- [13] SHAW LH, LIN LC, TSAI TH. HPLC-MS/MS analysis of a traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): 1
- [14] 董洪燕, 陶玮彦, 刘孟, 等. 基于 LC-MS/MS 法的盐酸胍屈嗪片有关物质研究 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 155
- DONG XY, TAO WY, LIU M, *et al.* Study on the related substances in hydralazine hydrochloride tablets by LC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 155
- [15] 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 58
- ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 58
- [16] ZHANG W, SHENG YX, ZHANG JL. Determination and pharmacokinetics of gastrodin and *p*-hydroxybenzylalcohol after oral administration of *Gastrodia elata* Bl. extract in rats by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric method [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(10): 844
- [17] LIN LC, CHEN YF, LEE WC, *et al.* Pharmacokinetics of gastrodin and its metabolite *p*-hydroxybenzyl alcohol in rat blood, brain and bile by microdialysis coupled to LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 909
- [18] ZHANG HF, HE GQ, LIU J, *et al.* Production of gastrodin through biotransformation of *p*-2-hydroxybenzyl alcohol by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 43(1): 25

(本文于 2016 年 9 月 19 日收到)