

# 离子阱飞行时间串联质谱定性 检测阿扎那韦中间体中的杂质

## No.LCMS-IT-TOF-013

**摘要：** 本文使用离子阱飞行时间串联质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了阿扎那韦中间体中的杂质。使用注射进样模式研究了主成分的三级质谱裂解规律。液质联用方式分析了阿扎那韦中间体，并对含量较高的杂质进行了多级质谱分析。根据主成分的多级质谱裂解规律，推导出了四个杂质的化学结构，并给出了各自的多级质谱裂解规律。

**关键词：** 阿扎那韦 离子阱飞行时间串联质谱 LCMS-IT-TOF

抗HIV作用的蛋白酶抑制剂阿扎那韦是目前世界上主要的抗艾滋病药物，具有持续强效抑制艾滋病病毒、低耐药、用药方便、对脂肪代谢副作用小的特点，2006年全球销售额达到32.26亿美元，仅在美国就已有约13万名患者接受这种药物的治疗。阿扎那韦药品目前仍属于专利保护药品，专利由施贵宝公司掌握，只授权少数几家制药公司生产。阿扎那韦的专利预计于2011年到期，届时随着药品专利的失效，仿制药生产厂家将大量出现，对中间体的需求也将成倍增长。

出于对用药安全的考虑，原料药中超过0.1%含量的杂质都要进行定性。液质联用技术是药物杂质检测的不可或缺的手段。在各种质谱仪中，离子阱飞行时间串联质谱由于既具备多级质谱功能（最多到10级），又具备高分辨率和高质量数准确度，因此特别适合于同时对多种微量成分进行准确的定性和定量分析。本文使用离子阱飞行时间串联质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了阿扎那韦中间体中的四种杂质。

## ■ 实验部分

### 1、试剂与仪器

试剂：乙腈，HPLC级；纯水，Milli-Q超纯水仪制备得到；乙酸铵，LCMS级；所有试剂和样品需用0.45 μm以下滤膜过滤。仪器：岛津超快速液相色谱仪（UFLC）和离子阱飞行时间串联质谱仪（LCMS-IT-TOF）。具体配置为：输液泵LC-20AD×2，在线脱气机DGU-20A3，自动进样器SIL-20AHT，柱温箱CTO-20AC，二极管阵列检测器SPD-M20A，控制器CBM-20A，离子阱飞行时间串联质谱仪LCMS-IT-TOF，工作站LCMSsolution V3.50。

### 2、样品前处理方法

称取约30mg样品于100mL容量瓶，加10mM乙酸铵/乙腈（3/1,v/v）稀释至刻度得300 μg/mL溶液，再稀释至10 μg/mL，过0.45 μm滤膜后供LC-MS分析。

#### 色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS 2.0 mm I.D. × 75 mm L., , 2.2 μm；流动相：A相 - 10mM乙酸铵的水溶液，B相 - 乙腈；流速：0.3mL/min；柱温：30℃；进样量：2 μL；梯度洗脱程序：0到3分钟维持10%B，3分钟到8分钟线性增加到90%B，8分钟到10分钟维持90%B，10分钟到10.10分钟线性递减到10%B，15分钟结束。

#### 质谱条件

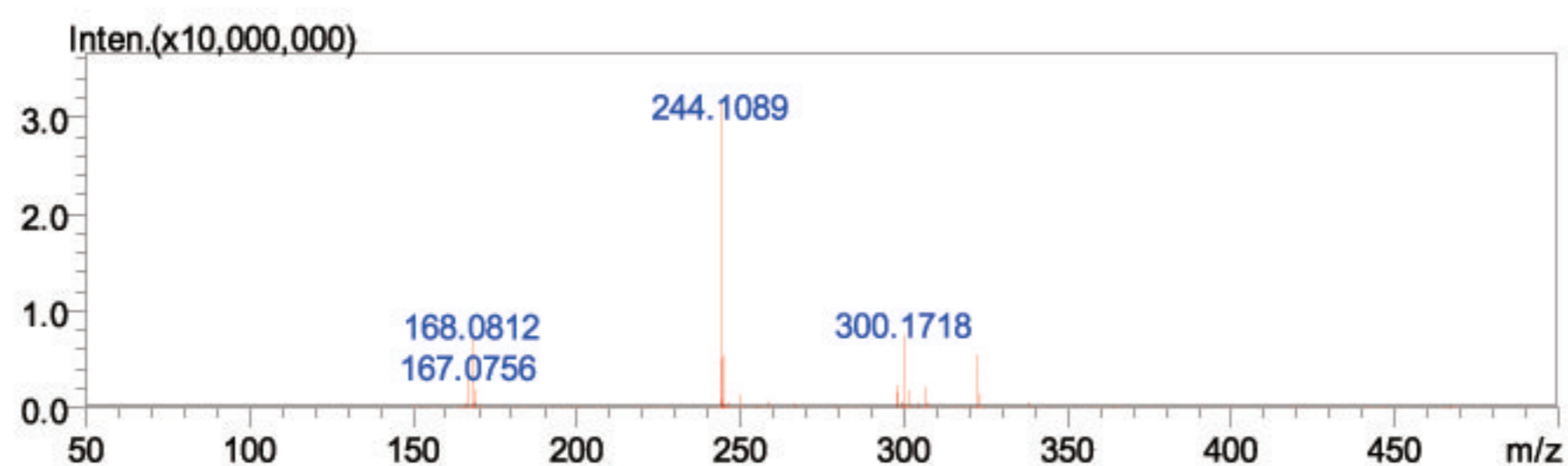
离子源：ESI，正负离子同时扫描；扫描范围：MS<sup>1</sup>m/z100-400, MS<sup>2</sup>m/z100-300, MS<sup>3</sup>m/z50-200；加热模块温度：200℃；CDL温度：200℃；雾化气流速：1.5L/min；干燥气流速：10L/min；离子源电压：正离子模式+4.5 kV，负离子模式-3.5 kV；检测器电压：1.70 kV；校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

## 结果与讨论

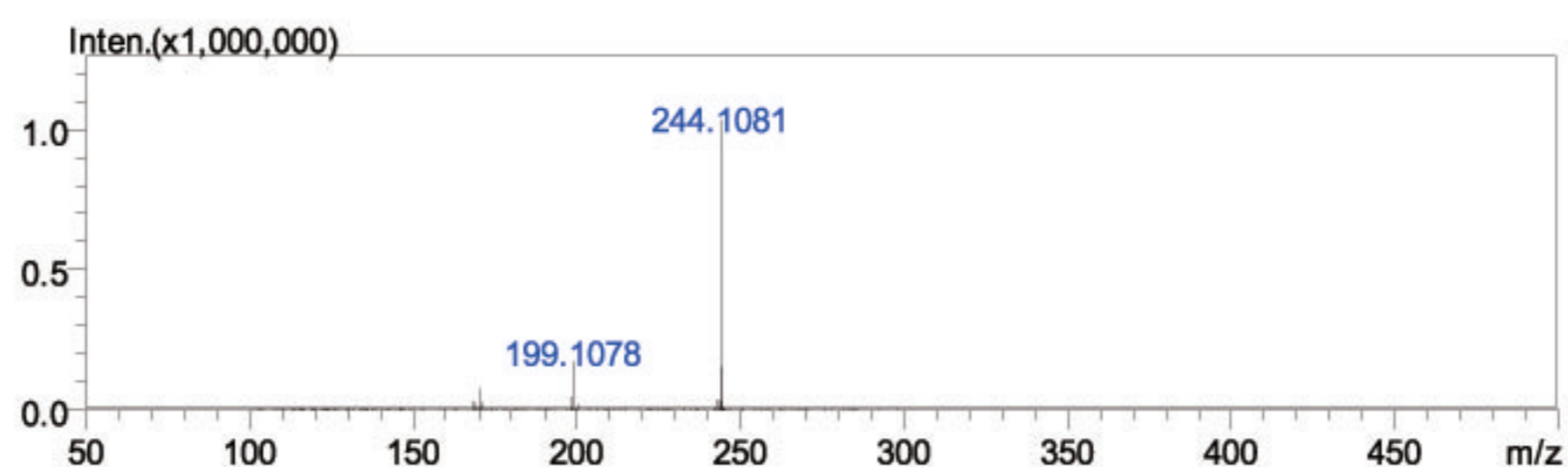
### 1、样品流动注射进样分析

样品为阿扎那韦中间体（ATA中间体），主成分化学名为2-[[4-(2-吡啶基)苯基]甲基]-胍羧酸-(1,1-二甲基)乙酯，分子式为 $C_{17}H_{21}N_3O_2$ 。液相分析结果表明，面积归一化法样品纯度在98%以上，因此可以采用注射进样模式研究主成分裂解规律。ESI正离子模式下得到多级质谱图如下：

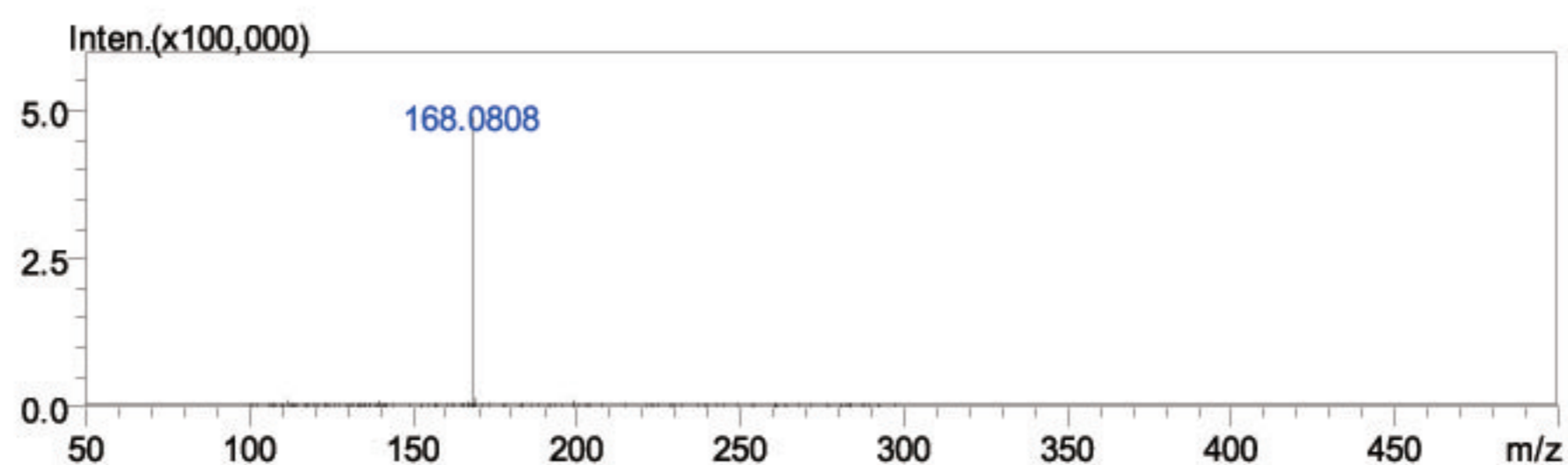
#### (1) MS<sup>1</sup>



#### (2) MS<sup>2</sup> Precursor 300.1707



#### (3) MS<sup>3</sup> Precursor 244.1081



分子式预测结果表明， $m/z$ 300.1707分子式是 $C_{17}H_{21}N_3O_2$ （与理论分子式吻合）。根据多级碎片信息推导出的碎裂途径如下：

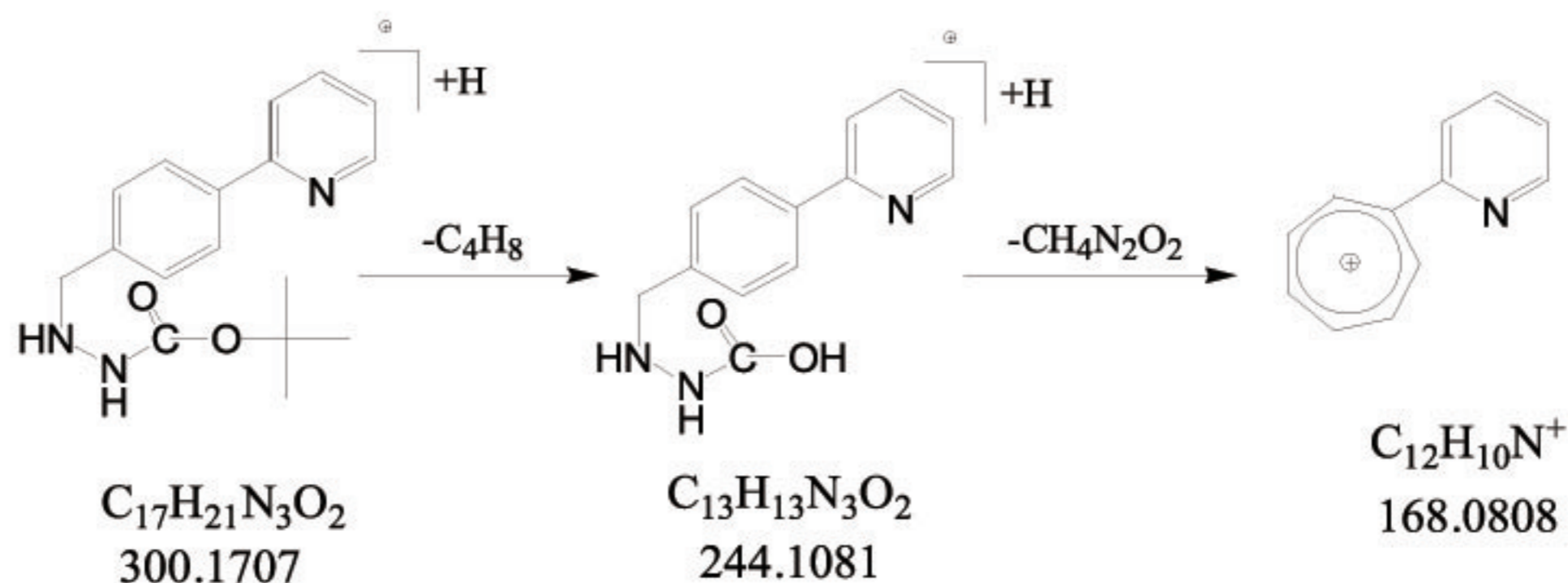


图1  $C_{17}H_{21}N_3O_2$ 裂解规律

### 2、样品液质联用分析

图2为300  $\mu$ g/mL样品在260nm下的UV色谱图，2为ATA中间体，1、3、4为杂质。

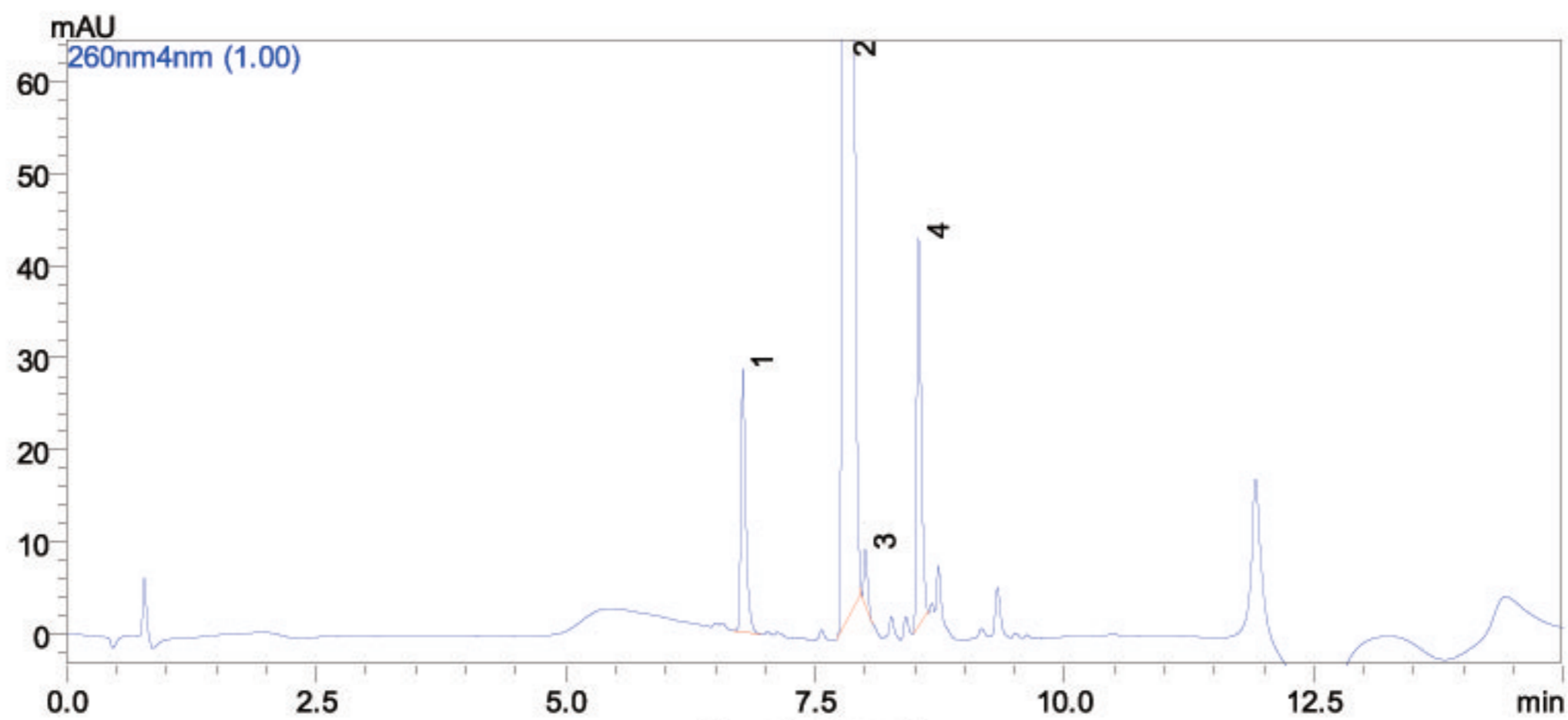
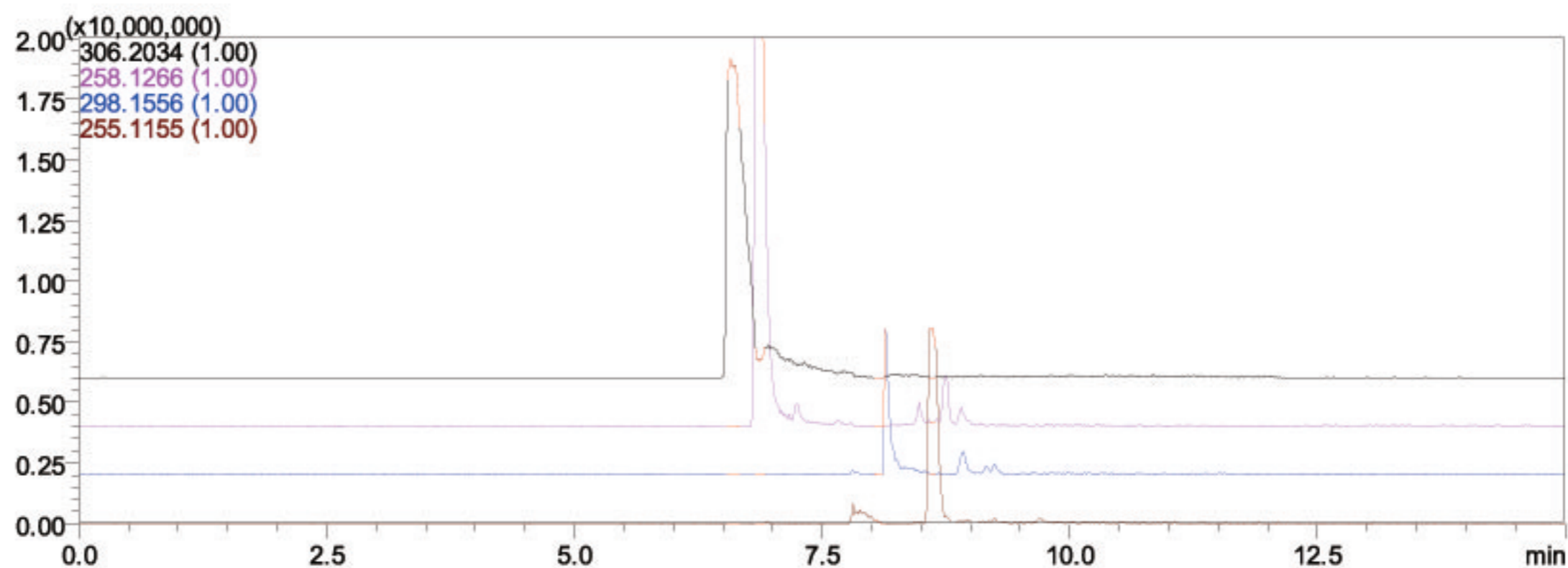


图2 样品紫外色谱图

图3 待定性的四个杂质的EIC图 (进样浓度300  $\mu$ g/mL)

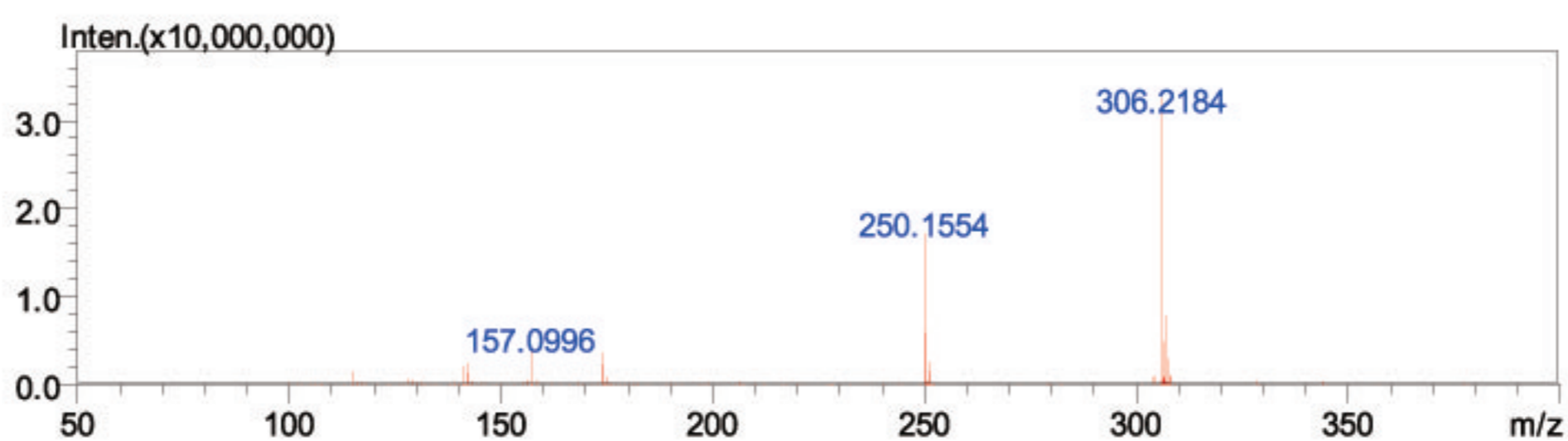
为了提高杂质响应，用300mg/L高浓度样品进行LC-MS分析。为避免过高浓度的主成分进质谱导致饱和，采用高压流路切换阀，7.7min切阀使流动相从PDA出来后直接到废液瓶，8.0min再切回质谱。对照紫外色谱图中杂质出峰位置，得到如图3的EIC图，样品中找到四种杂质。紫外色谱图中的1号杂峰在TIC图上相同时间处有两个峰，因此对TIC图上两个峰都进行定性。总共需要定性的杂质峰有四个。

### 3、杂质定性分析过程

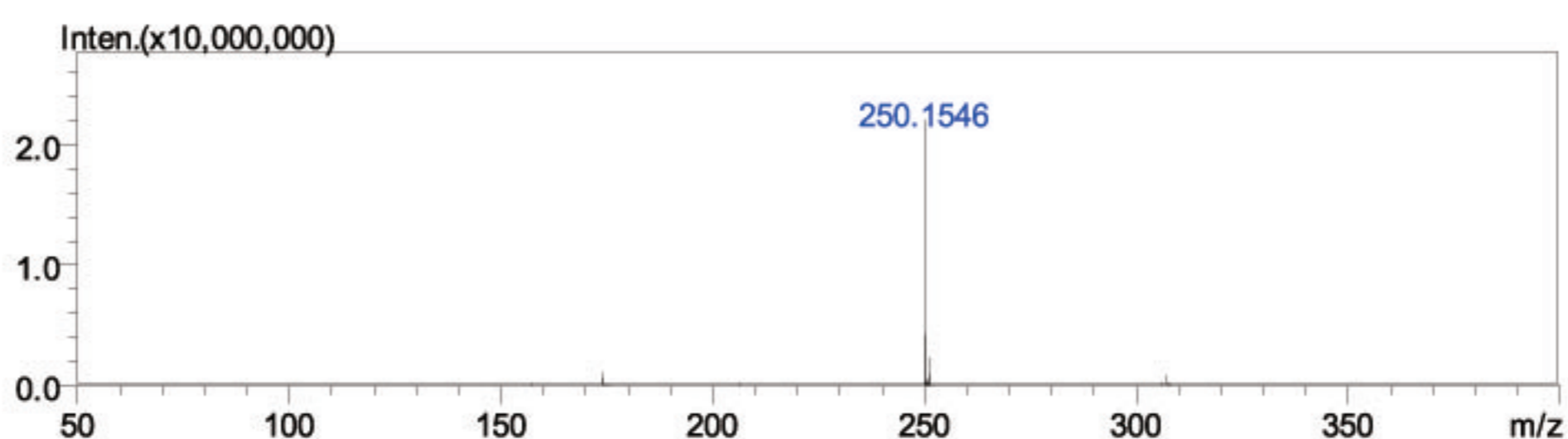
#### 1) 1号杂质峰质谱图信息

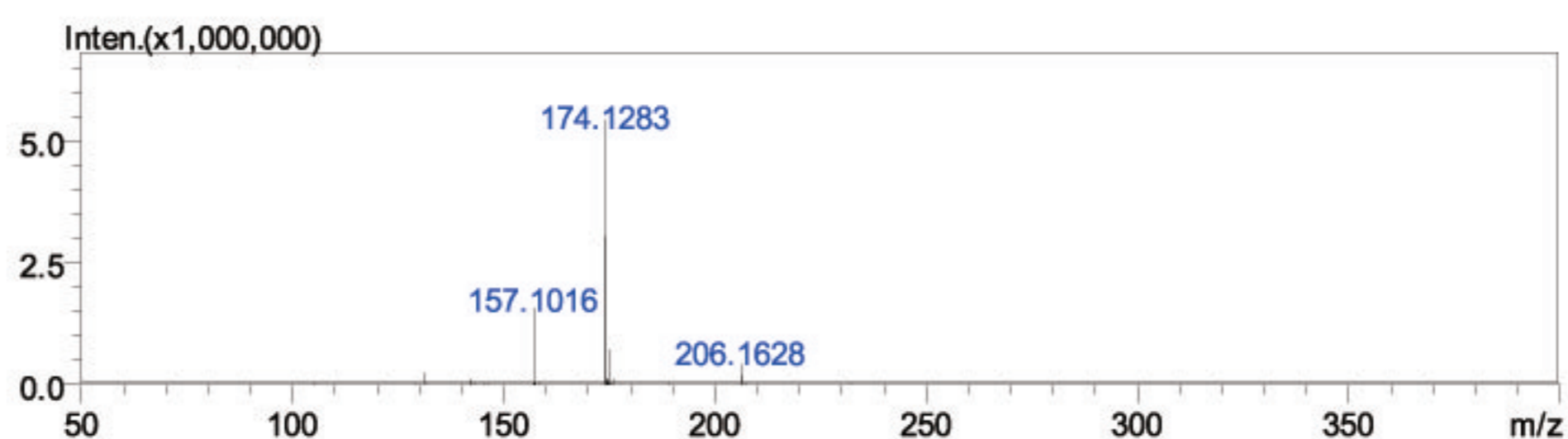
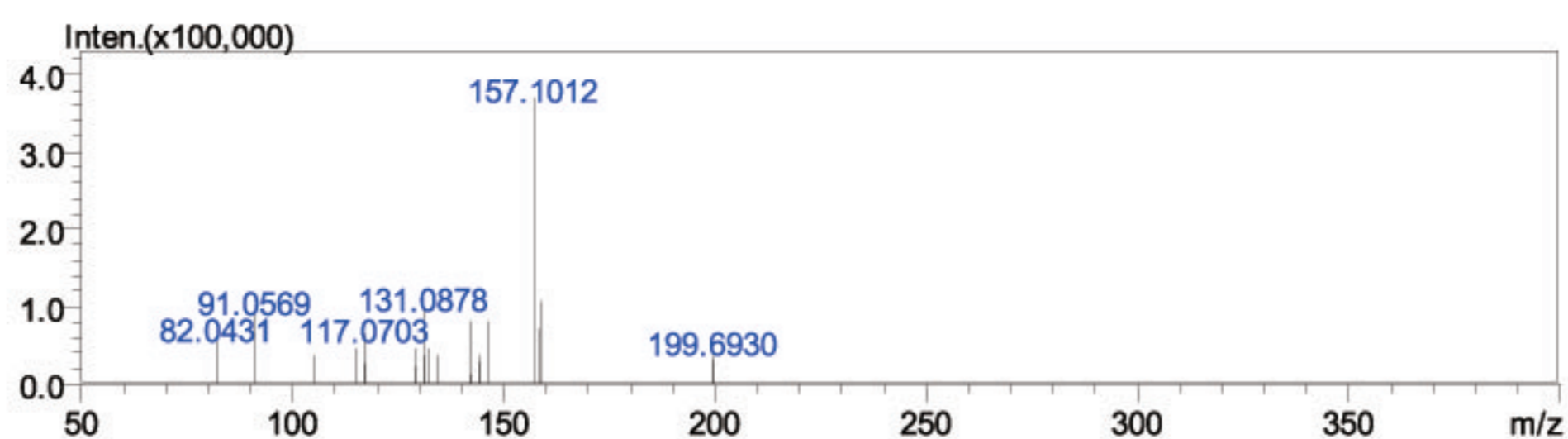
多级质谱图如下：

MS<sup>1</sup>

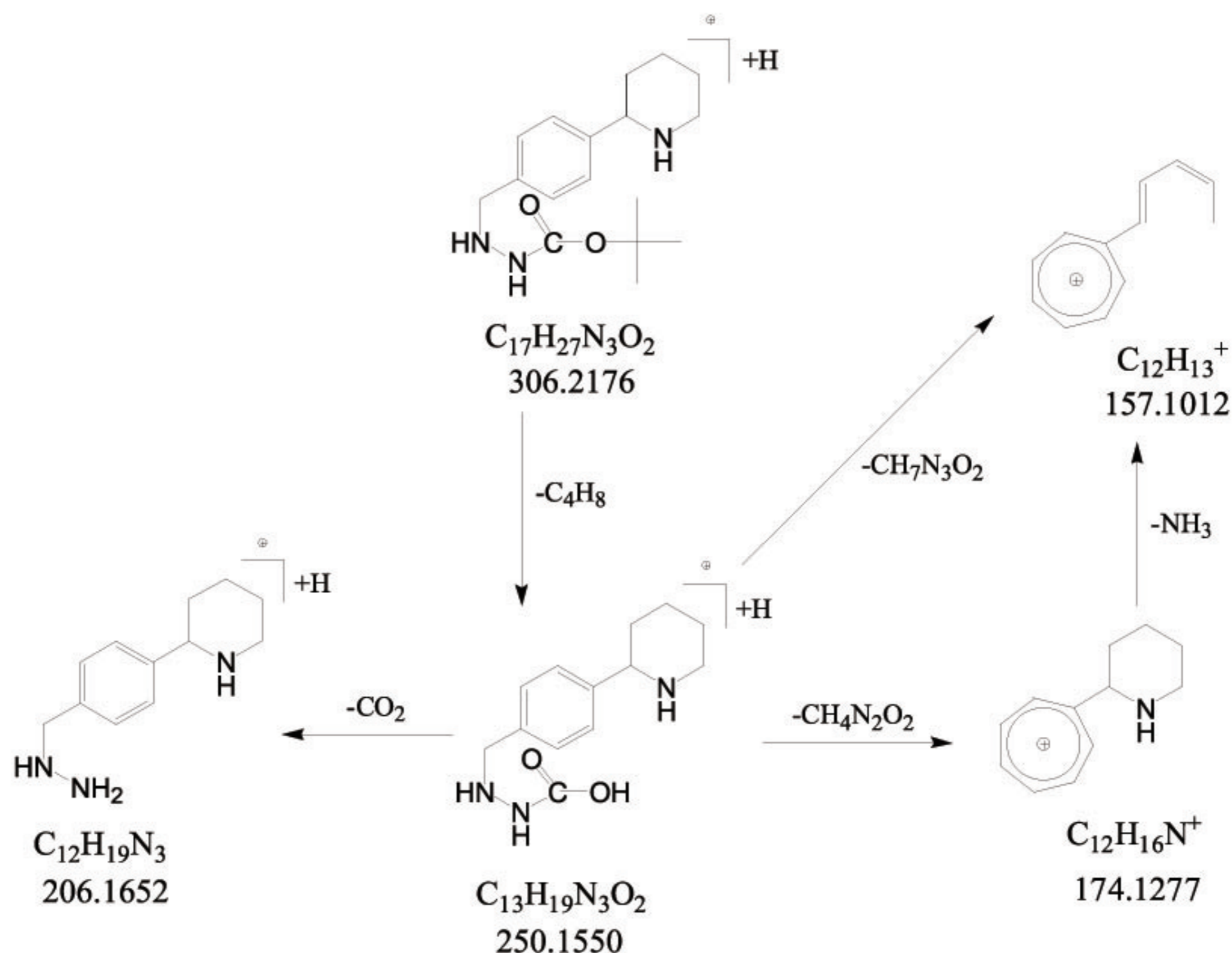


MS<sup>2</sup> Precursor 306.2176



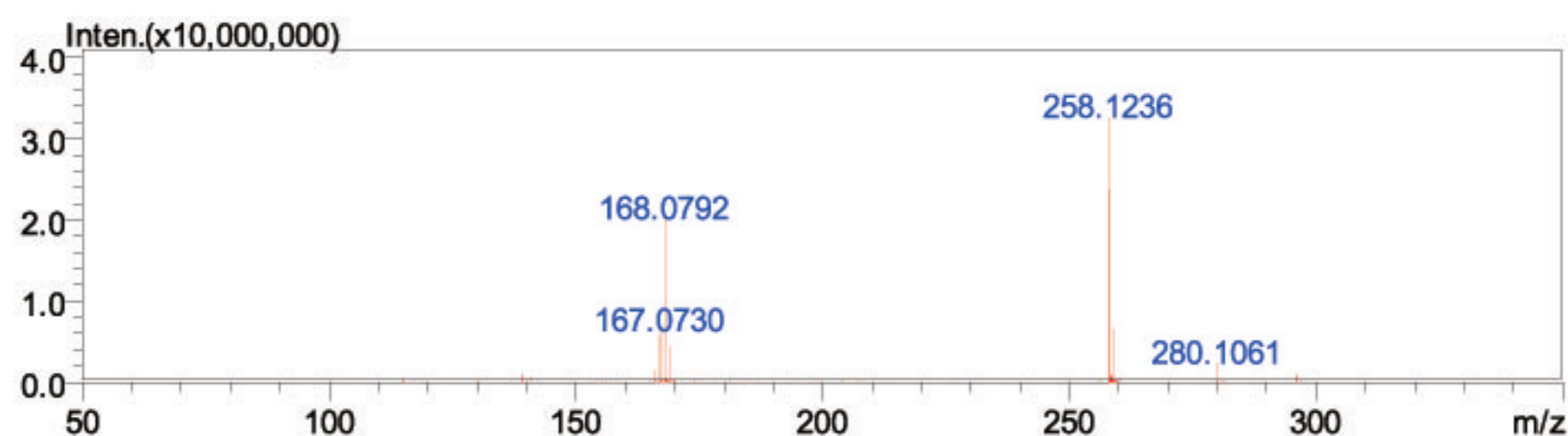
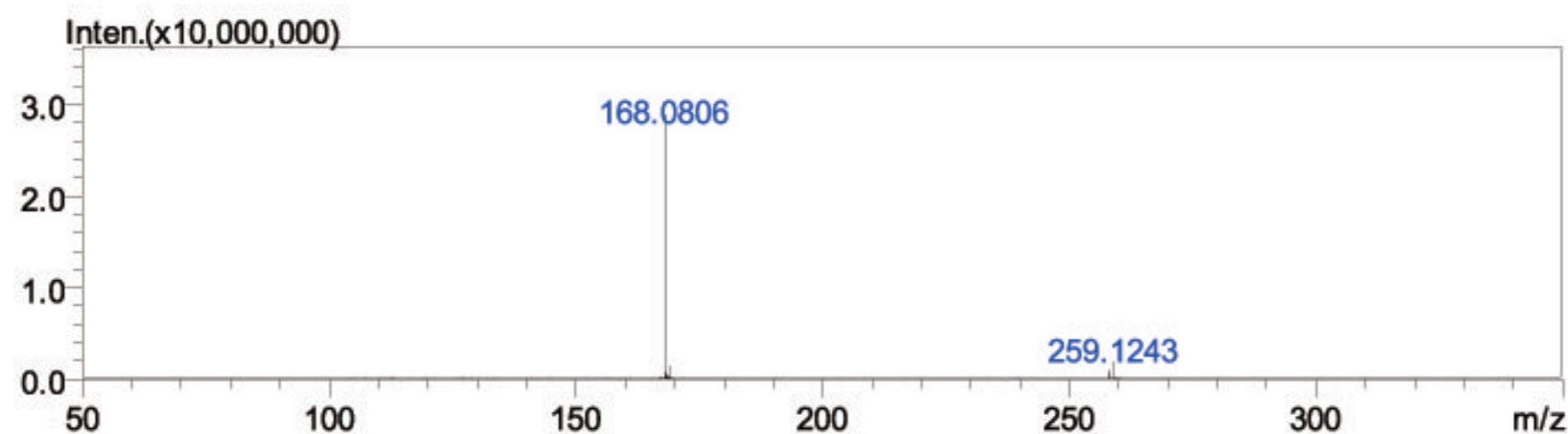
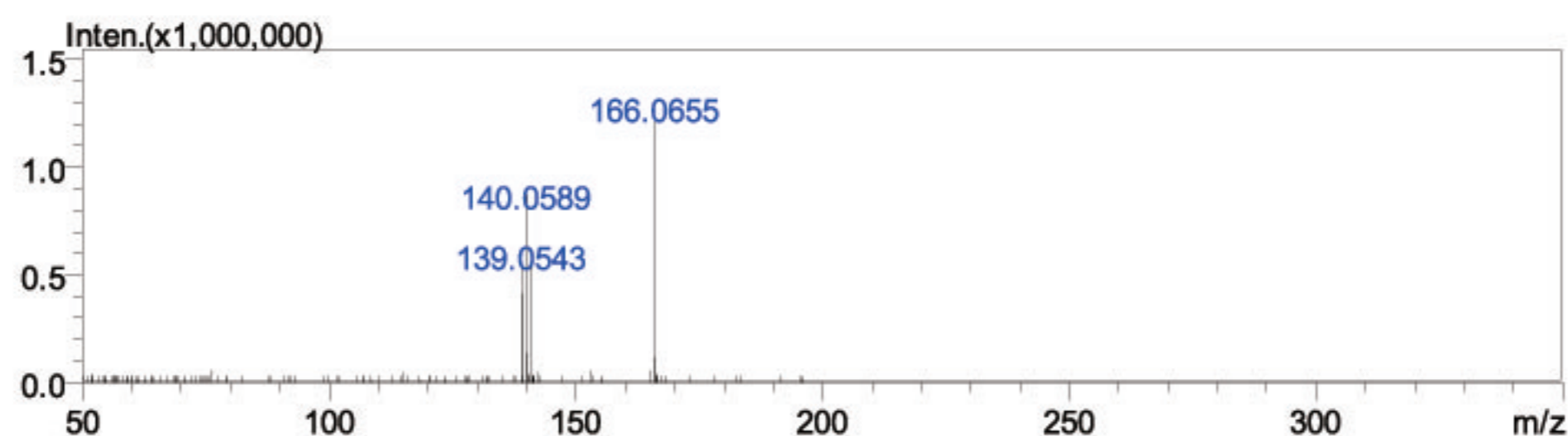
MS<sup>3</sup> Precursor 250.1550MS<sup>4</sup> Precursor 174.1277

分子式预测结果表明，杂质1分子式是 $C_{17}H_{27}N_3O_2$ ，比主成分多了六个H，即少了三个不饱和度。从碎片离子上分析，杂质1出现以下碎片： $m/z$ 250.1550和 $m/z$ 174.1277均可以在主成分的质谱图中找到相应的减去六个H的离子响应。 $m/z$ 157.1012为 $m/z$ 174.1277丢失 $NH_3$ 的碎片，从而可以推断杂质1为主成分含氮杂环还原的副产物，还原没有发生在苯环上。推导出的碎裂途径如下：

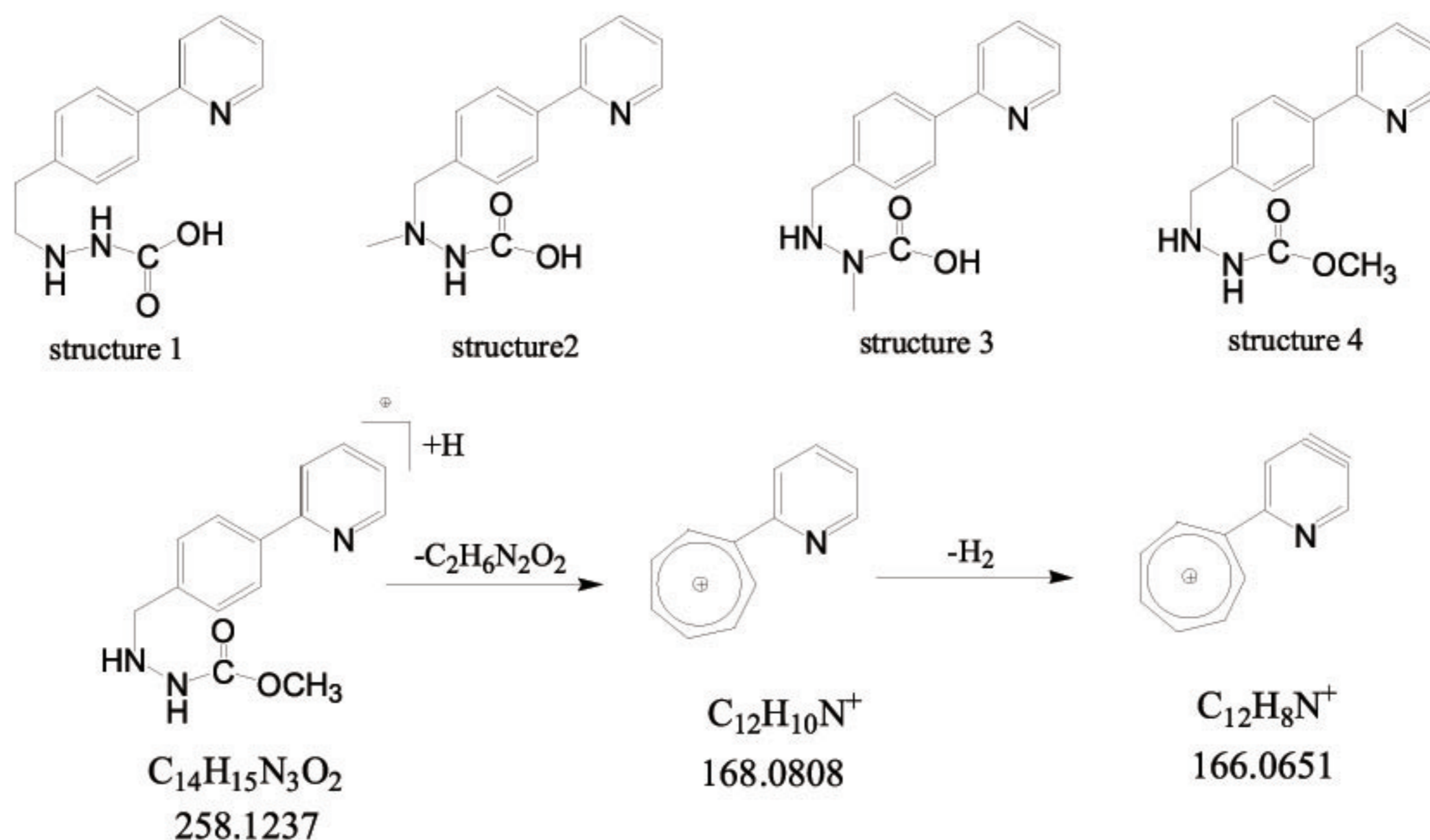
图4 杂质1 (分子式 $C_{17}H_{27}N_3O_2$ ) 的裂解规律

## 2) 2号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如下:

MS<sup>1</sup>MS<sup>2</sup> Precursor 258.1237MS<sup>3</sup> Precursor 168.0808

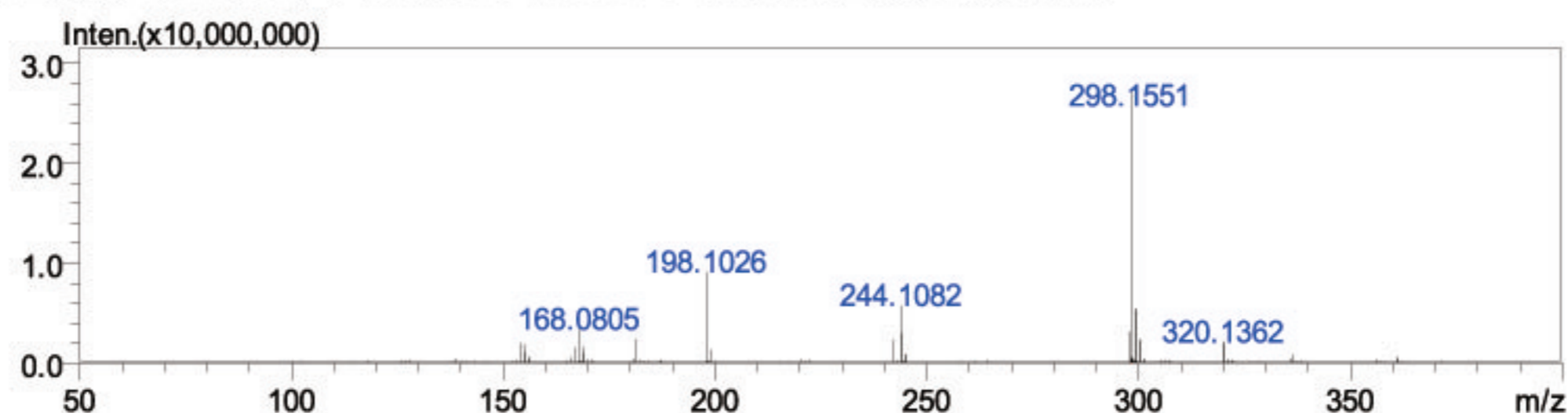
分子式预测结果表明, 杂质2分子式是 $C_{14}H_{15}N_3O_2$ , 比主成分少了 $C_3H_6$ 。杂质峰与样品峰的后2级质谱图类似, 从质谱图的角度上只能判断亚甲基不在苯环或氮杂环上, 但是无法进一步推测亚甲基的位置。杂质2可能的结构式有以下四种, 从色谱出峰时间上推测第四种结构的可能性更大些。因此以结构四推导出杂质2的碎裂途径如图5。

图5 杂质2 (分子式 $C_{14}H_{15}N_3O_2$ ) 的裂解规律

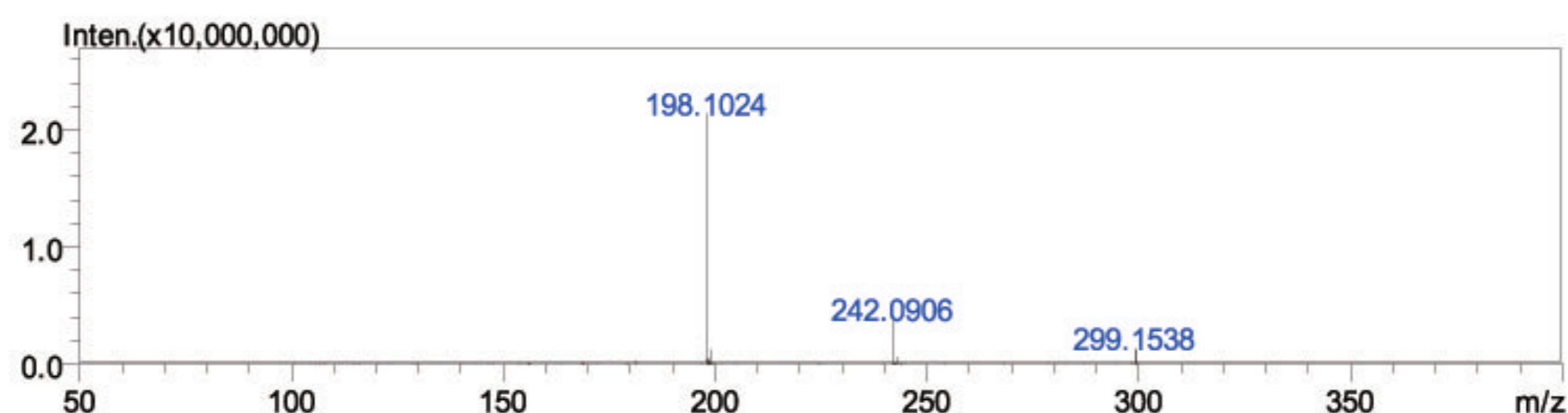
## 3) 3号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如下:

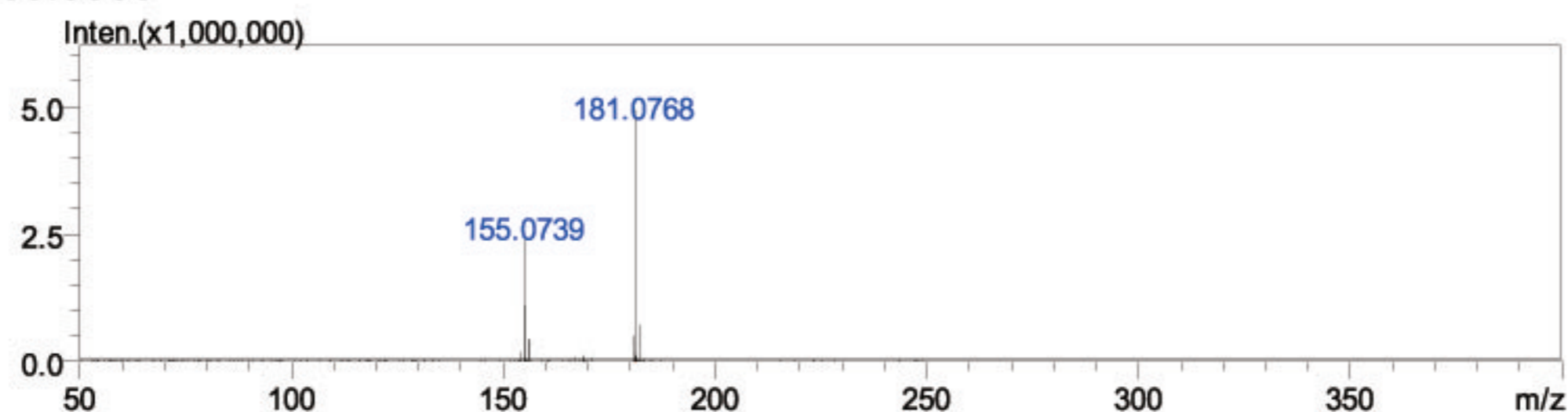
MS<sup>1</sup> (由于杂3与主成分出峰时间非常接近, 在MS<sup>1</sup>中还看到主成分的反应)



MS<sup>2</sup> Precursor 258.1237



MS<sup>3</sup> Precursor 168.0808



分子式预测结果表明, 杂质3的分子式是C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 比主成分少两个H。推断杂质3可能为如下结构, 并推导出其碎裂途径如下:

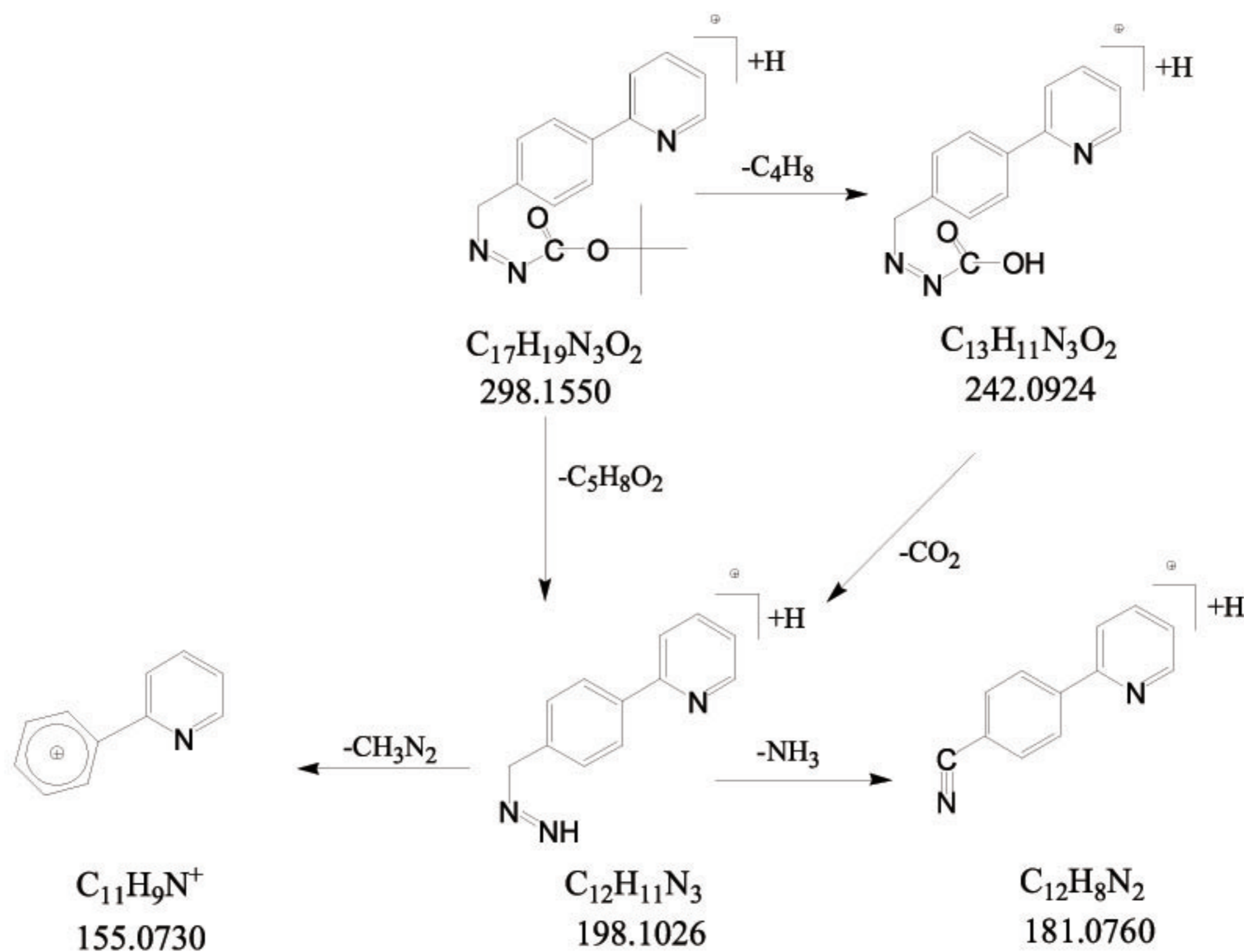
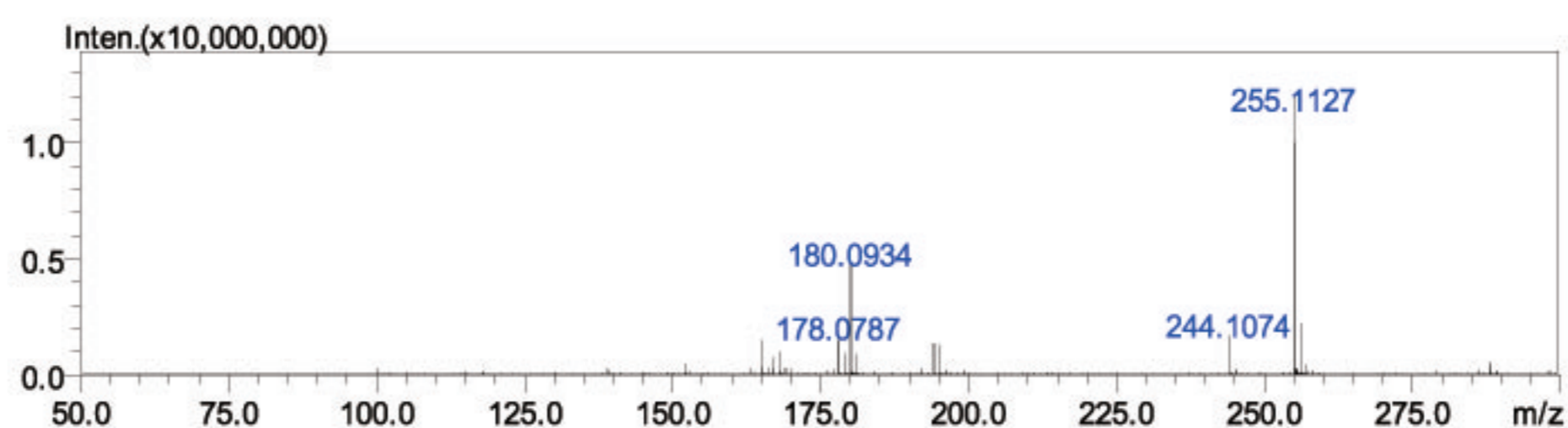
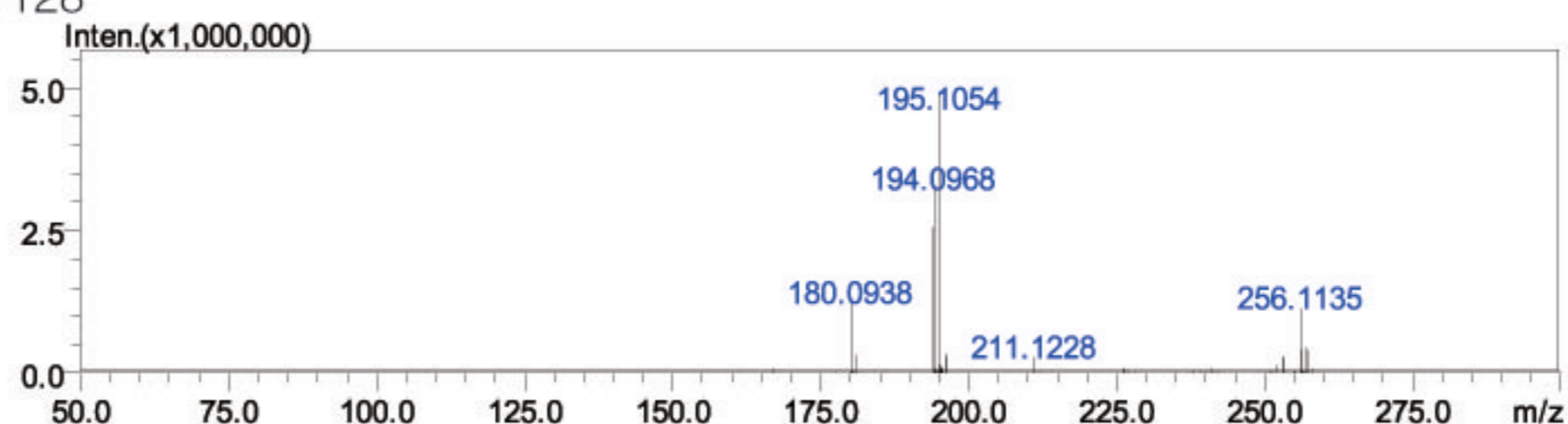
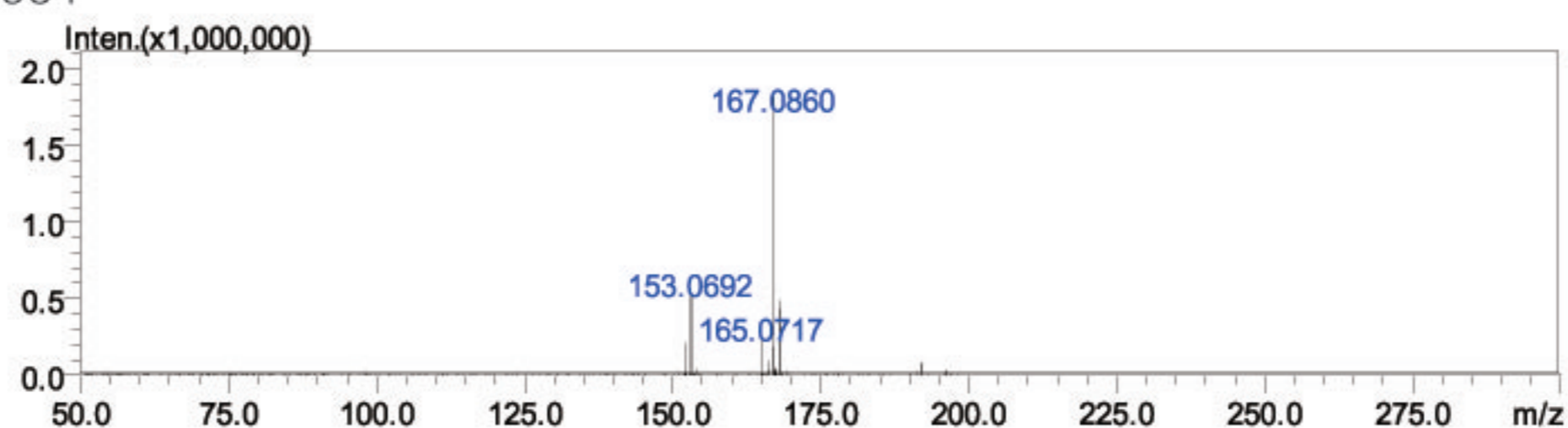
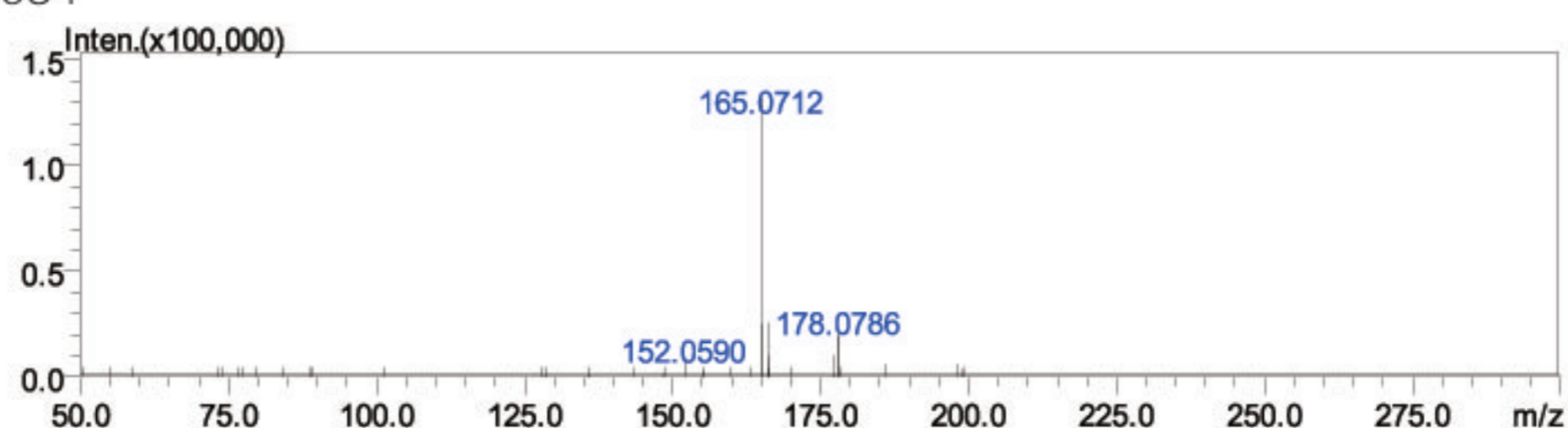


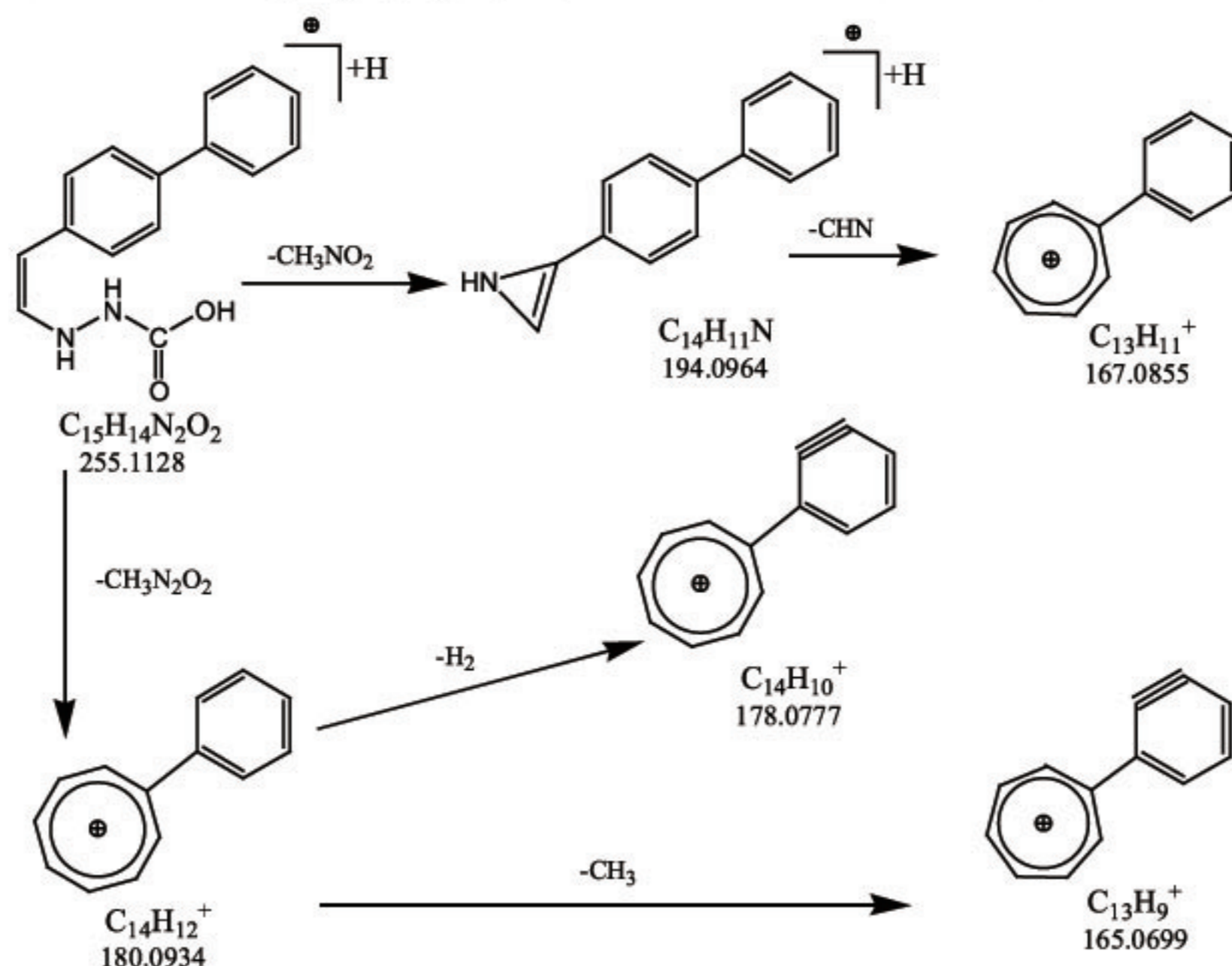
图5 杂质2 (分子式C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) 的裂解规律

## 4) 4号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如下:

MS<sup>1</sup>MS<sup>2</sup> Precursor 255.1128MS<sup>3</sup> Precursor 194.0964MS<sup>3</sup> Precursor 180.0934

分子式预测结果表明, 分子式是 $C_{15}H_{14}N_2O_2$ , 参考前述三个杂质的裂解规律, 推导出其碎裂途径如下:

图7 杂质4 (分子式 $C_{15}H_{14}N_2O_2$ ) 的裂解规律

## 5) ATA中间体及四杂质分子式预测结果列表

样品名	Formula	Ion	Meas.m/z	Pred.m/z	Diff(mDa)	Diff(ppm)
ATA 中间体	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	300.1718	300.1707	+1.1	+3.66
1 号杂质	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	306.2184	306.2176	+0.8	+2.61
2 号杂质	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	258.1236	258.1237	-0.1	-0.39
3 号杂质	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	298.1551	298.1550	+0.1	+0.34
4 号杂质	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	255.1127	255.1128	-0.1	-0.39

## 结论

本文使用离子阱飞行时间串联质谱 (LCMS-IT-TOF) 定性检测出了阿扎那韦中间体中的四种杂质。药物中间体在合成过程中原料已知, 反应步骤已知, 因此生成产物的元素组成已知。所以杂质的分子式预测较简单, 用一般的高分辨质谱都能满足要求。但是对于杂质结构推断来说, Q-TOF的二级质谱功能并不能很好地满足要求。因为仅仅依靠二级质谱并不能给出清晰的离子裂解规律, 在二级质谱图上前体离子和子离子之间的关系不清晰, 对于依靠裂解规律来推断结构的过程就会产生不利影响。而离子阱飞行时间串联质谱的MS<sup>n</sup>功能和每一级都具备高质量数准确度的特点就可以很好地解决这一问题。如果将离子裂解的过程比喻成花瓶打碎的话, LCMS-IT-TOF就可以帮助我们吧花瓶进行复原, 从而知道花瓶的形状, 即杂质的结构。LCMS-IT-TOF可以精确预测化合物的分子式, 描述裂解规律并推导出结构式, 是药物杂质定性分析的强有力工具。