

离子阱-飞行时间串联质谱定性检测依那普利中的未知杂质

LCMS-IT-TOF-016

摘要：依那普利(Enalapril)是临床上常用于抗高血压的血管紧张素转换酶抑制剂。它作为一种前体药物经口服给药在肝脏中迅速水解为活性二酸代谢物依那普利拉发挥作用，由此引起全身血管的舒张，最终达到降低血压的作用。本文使用LCMS-IT-TOF飞行时间串联质谱仪定性研究了依那普利原药中的未知微量杂质，并推导出裂解规律，对依那普利生产工艺优化具有实际意义。

关键词：UFLC LCMS-IT-TOF 液质联用 依那普利 杂质

实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器：超快速液相色谱和离子阱飞行时间串联质谱(LCMS-IT-TOF)(日本Shimadzu公司)，包括：LC-20ADXR×2(输液泵)，SIL-20AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，DGU-20A3(在线脱气机)，CBM-20A(控制器)，LCMS-IT-TOF(液相色谱-离子阱飞行时间串联质谱仪)，LCMSsolution Ver. 3.6(色谱工作站)。

试剂：乙腈(LCMS级)；纯水，Mili-Q超纯水仪制备得到；乙酸铵(LCMS级)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS(2.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2 μm)；**流动相：**A相-含10 mmol/L乙酸铵的水，B相-乙腈；**流速：**0.2 mL/min；**梯度洗脱程序：**0→6.00 min, 15%B→90%B；6.00 min→8.00 min, 90%B；8.10 min→16.00 min, 15%B；**柱温：**40℃；**进样量：**20 μL。

质谱条件

离子源：ESI正负离子同时采集；**采集范围：**MS1 m/z 100-600, MS2 m/z 100-500, MS3 m/z 50-300, **加热模块温度：**200℃；**CDL温度：**200℃；**雾化气流速：**1.5 L/min；**干燥气体压力：**100.0 kPa；**IT真空度：**1.6e-002 Pa, **TOF真空度：**2.8e-004 Pa, **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：**1.7 kV；**质量数校准方法：**自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

结果

2.1 杂质定性分析结果

图1为使用乙腈-乙酸铵缓冲液流动相进行液质联用分析得到的总离子流图，300 mg/L样品进样量20 μL。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，4.2 min切阀使流动相从PDA出来后直接到废液瓶，4.8 min再切回质谱。样品中找到四种杂质，杂质1在紫外图上被马来酸峰掩盖，但在TIC图上有响应。杂质1和2在ESI+-模式均有响应。

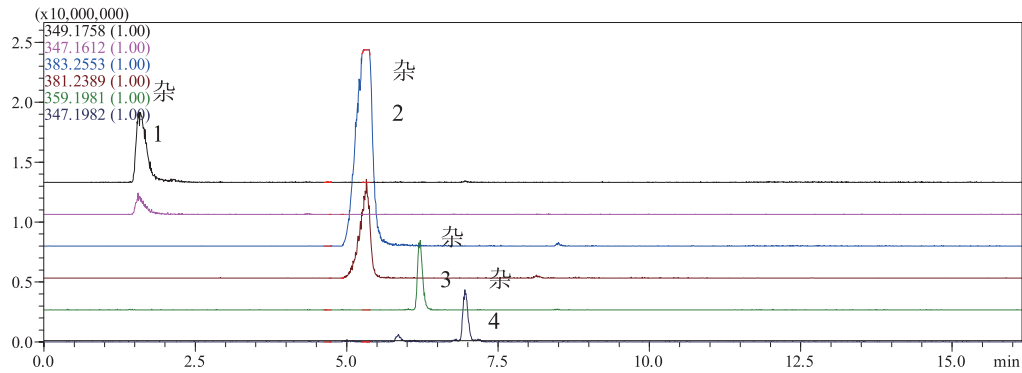


图1 依那普利中四杂质的EIC图

2.1.1 杂质1多级质谱信息及裂解规律推导(ESI+)

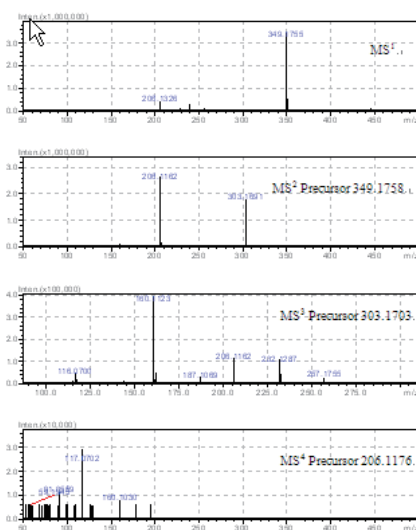


图2 杂质1的多级质谱图

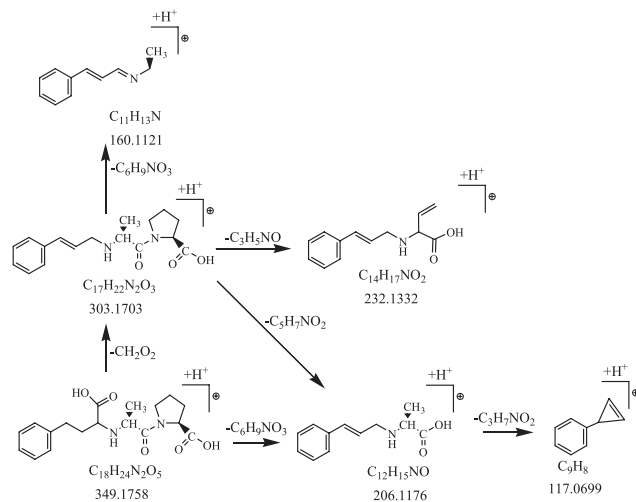


图3 杂质1的多级裂解规律

预测结果表明，杂质1分子式是 $C_{18}H_{24}N_2O_5$ ，比主成分少两个亚甲基。杂质峰与样品峰的后三级质谱图类似，依那普利的结构中含有羧酸乙酯基，该基团易发生水解反应，生成羧基，产生依那普利拉。

2.1.2 杂质2裂解规律推导(ESI-)

预测结果表明杂质2分子式是 $C_{20}H_{34}N_2O_5$ ，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2出现以下碎片335.1976、307.2027、291.2078、273.1972、263.2129、192.1394均可以在依那普利的质谱图中找到相应的减去六个H的离子响应，而183.0775、170.0823碎片在依那普利的质谱图中为相同质核比碎片。183.0775、170.0823碎片与以上碎片结构的共同区别为丢失苯环，从而可以推断杂质2为依那普利苯环加氢的副产物。

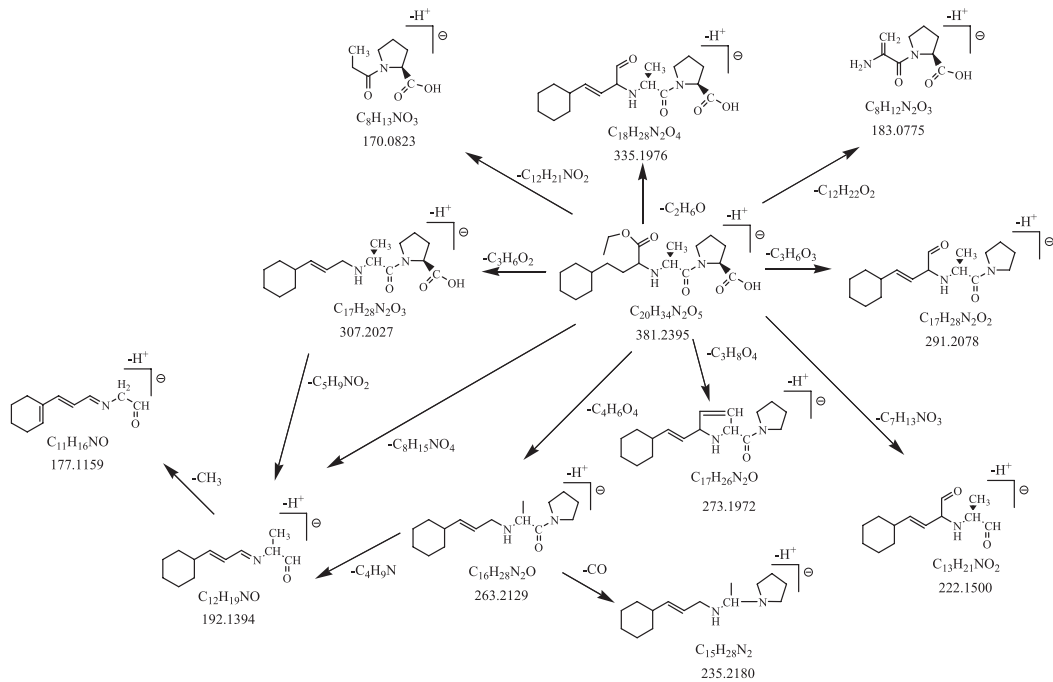


图4 杂质2的多级裂解规律

2.1.3 杂质3裂解规律推导(ESI+)

预测结果表明, 杂质3的分子式是 $C_{20}H_{26}N_2O_4$, 是主成分依那普利脱水的副产物。从碎片离子上分析, 杂质3出现285.1589和188.1070碎片, 可以在依那普利的质谱图中找到相应的加水碎片303.1703和206.1176, 可以推断脱水发生在这些碎片共有的结构。推断杂质3可能为如下结构, 并推导出其碎裂途径如下:

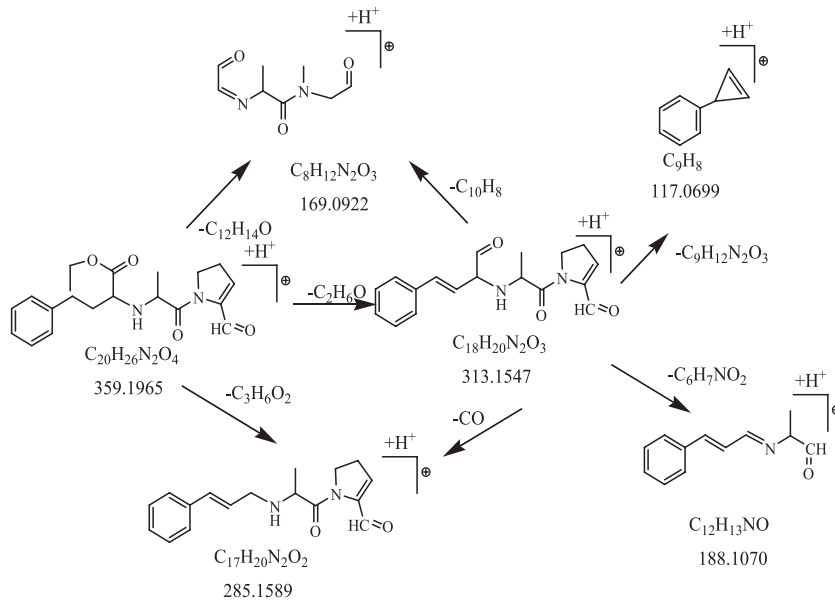


图5 杂质3的多级裂解规律

2.1.4 杂质4裂解规律推导(ESI+)

预测结果表明, 杂质4分子式是 $C_{19}H_{26}N_2O_4$, 是主成分依那普利脱去亚甲氧基的副产物。347.1965离子变成变成262.1445离子, 脱去 C_4H_7NO , 从而推断杂4为如下结构, 并推导出其碎裂途径如下:

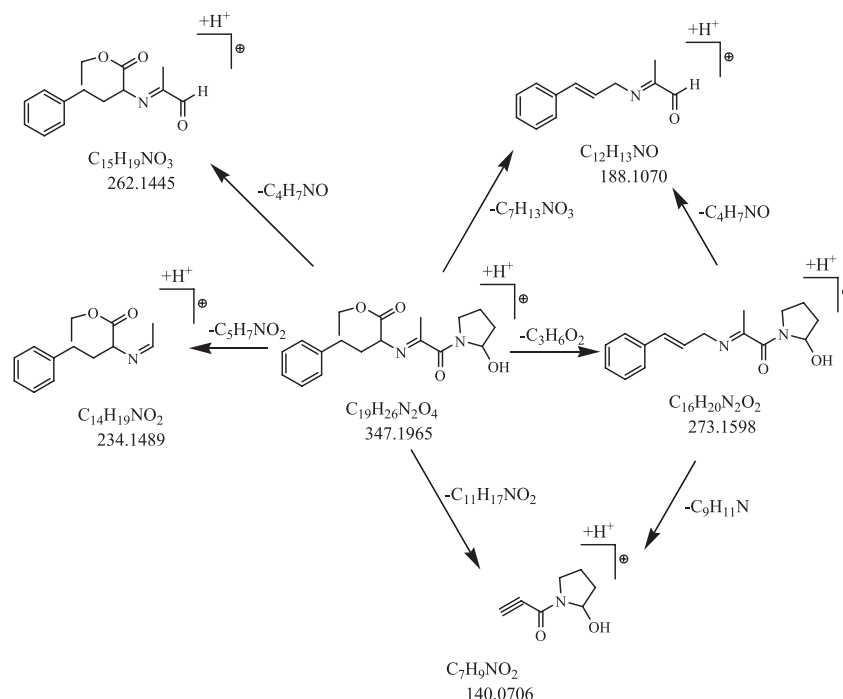


图6 杂质4的多级裂解规律

2.2 分子式预测结果

依那普利及四杂质分子式预测结果列表如下

样品名	Formula	Ion	Meas.m/z	Pred.m/z	Diff(mDa)	Diff(ppm)
依那普利	$C_{20}H_{28}N_2O_5$	[M+H] ⁺	377.2068	377.2071	-0.3	-0.80
依那普利	$C_{20}H_{28}N_2O_5$	[M-H] ⁻	375.1927	375.1925	+0.2	+0.53
1号杂质	$C_{18}H_{24}N_2O_5$	[M+H] ⁺	349.1755	349.1758	-0.3	-0.86
2号杂质	$C_{20}H_{34}N_2O_5$	[M-H] ⁻	381.2390	381.2395	-0.5	-1.31
3号杂质	$C_{20}H_{26}N_2O_4$	[M+H] ⁺	359.1965	359.1965	0.0	0.00
4号杂质	$C_{19}H_{26}N_2O_4$	[M+H] ⁺	347.1965	347.1965	0.0	0.00

讨论

使用LCMS-IT-TOF可以准确测得依那普利中四种杂质的分子式, 根据保留时间次序分别为 $C_{18}H_{24}N_2O_5$, $C_{20}H_{34}N_2O_5$, $C_{20}H_{26}N_2O_4$, $C_{19}H_{26}N_2O_4$, 并根据多级质谱裂解规律推导出杂质可能的结构式。岛津离子阱飞行时间串级质谱具有多级质谱功能, 每一级都具备高质量数准确度, 是未知物质筛查、结构定性的强有力工具。