

液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱仪定性分析硝苯地平原料药中未知杂质

LCMS-QTOF-033

摘要: 本文使用岛津液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱 (LCMS-9030) 对硝苯地平中的未知杂质进行定性分析。通过紫外色谱图确定杂质的出峰时间, 基于对应时间的一级高分辨质谱信息, 结合 Insight Explore 软件预测可能的分子式。将可能的结构信息通过 ACD/Labs 软件, 进行二级高分辨质谱图中高丰度碎片匹配, 并推导可能的裂解规律, 进一步确认杂质峰结构式。

关键词: Q-TOF 硝苯地平 杂质

硝苯地平是第一代二氢吡啶类钙拮抗剂, 临床上主要用于高血压、心绞痛及其他心血管疾病的治疗。硝苯地平遇光不稳定, 分子内部易发生化学岐化作用而降解产生硝基吡啶衍生物和亚硝胺吡啶衍生物等杂质, 且生产过程中也会带入相关原料、中间体、副产物和降解产物, 它们对药品的质量安全有重要安全有重要的影响。《中国药典》2020 年版硝苯地平品种下,

已经对其中两种降解产物 2,6- 二甲基 -4- (2- 硝基苯基) -3,5- 吡啶二甲酸二甲酯 (杂质 I) 与 2,6- 二甲基 -4- (2- 亚硝基苯) -3,5- 吡啶二甲酸二甲酯 (杂质 II) 进行控制, 但实际工作中常会出现未知杂质, 需要进行定性鉴别。

本文使用岛津高分辨液质联用仪 LCMS-9030, 利用其一级和二级谱质量准确度, 结合 ACD/Labs 软件进行未知杂质的准确定性。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与高分辨质谱仪 LCMS-9030 联用系统。

具体配置为:

系统控制器: CBM-20A

脱气机: DGU-20A₅

输液泵: LC-30AD×2

自动进样器: SIL-30AC

柱温箱: CTO-20AC

液相检测器: SPD-M20A

色谱工作站: LabSolutions Ver.5.95

质谱仪: LCMS-9030

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shimadzu Shim-pack GIST 75 mm L×2.1 mm I.D., 2.0 μm;

P/N: 227-32001-03; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流动相: 乙腈 - 甲醇 - 水 (20:30:50), 等度洗脱

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

进样体积: 1 μL

检测波长: 190-400 nm

质谱条件

离子化模式: ESI

接口温度: 300°C

DL 温度: 3 L/min

干燥气流速: 10 L/min

加热模块温度: 400°C

雾化气: 3.0 L/min

加热气: 10.0 L/min

扫描模式: MS full scan m/z: 100-800

MS/MS m/z: 100-600 CE: 30±10 V

碰撞气: 氩气

MS 阀: 5.2min-6min 切主成分至废液

■ 样品前处理

称取硝苯地平粉末样品 10 mg，加入甲醇溶解后，流动相稀释至 1 mg/mL 的溶液，取上清液过 0.22 μm 有机滤膜后，制得上样溶液。

■ 结果与讨论

3.1 硝苯地平样品的紫外色谱图

硝苯地平样品在 254 nm 下紫外色谱图见图 1，图 1 放大后在主峰后 6.31 min 处有明显杂质峰，该未知杂质峰需进行定性分析。

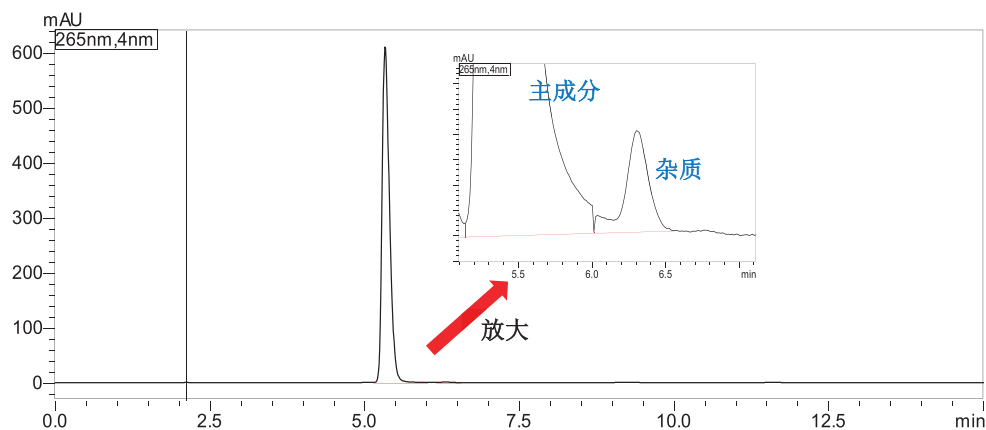


图 1 硝苯地平样品紫外色谱图

3.2 主成分与杂质分子式预测结果

图 2 为色谱图对应的 TIC 总离子流图。图中显示在对应的 6.4 min 处正负离子有明显的信号，与紫外色谱图 6.3 分钟杂质峰的物质对应，提取该处的离子可得到该杂质峰 m/z 为 466.1245；对主成分对应位置提取得到主成分 m/z 为 347.1248。

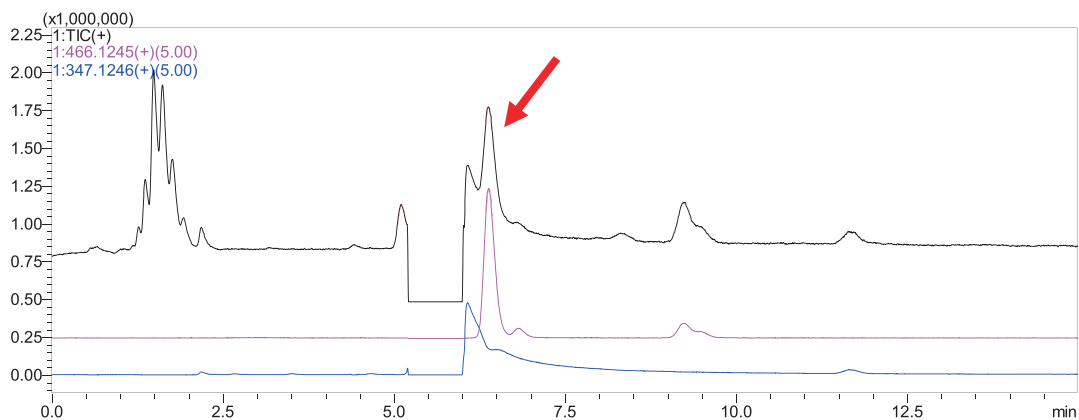


图 2 硝苯地平样品 TIC 及提取离子流图

图 3 为杂质峰的一级质谱图。对该杂质进行高分辨质谱解析，m/z 466.12449 为该杂质的加氢峰，m/z 488.10648 为加钠峰。使用 Insight Explore 软件预测其分子式，m/z 466.12449 得到唯一可能的分子式为 C₂₃H₁₉N₃O₈，质量数偏差 -0.0025 ppm，同位素评分为 100，结果如图 5 所示。

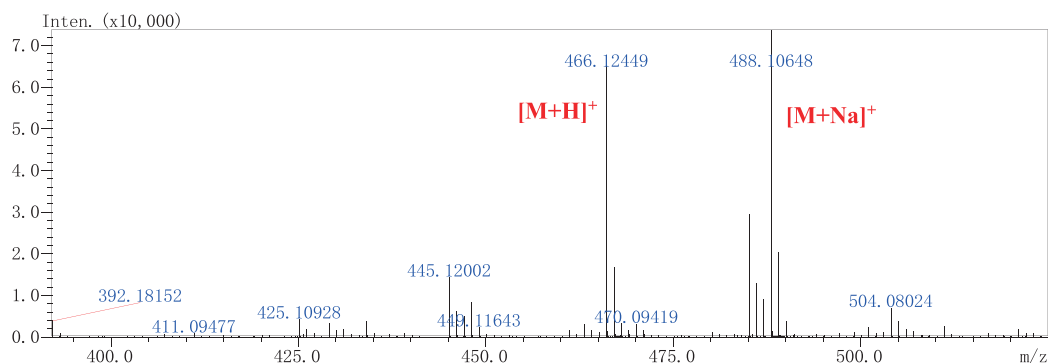


图3 硝苯地平杂一级质谱图

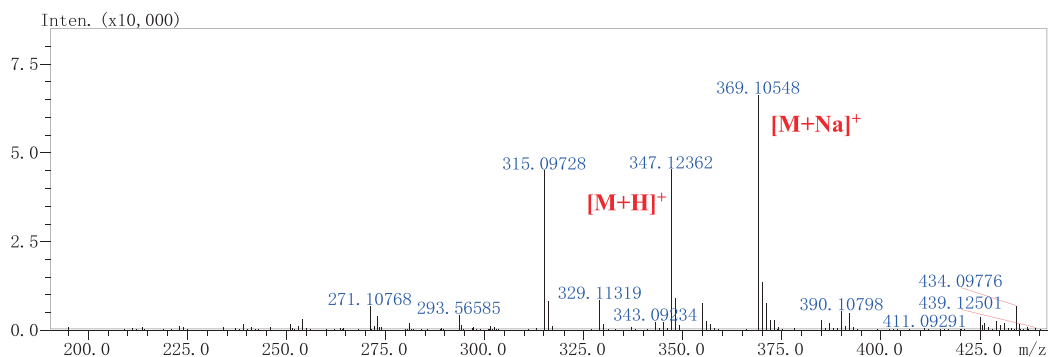


图4 硝苯地平主成分一级质谱图

图4为主成分的一级质谱图。使用 Insight Explore 软件预测其分子式，m/z 347.12362 得到唯一可能的分子式为 C₁₇H₁₈N₂O₆，质量数偏差 -0.41 ppm，同位素评分为 99.99，结果如图6所示。

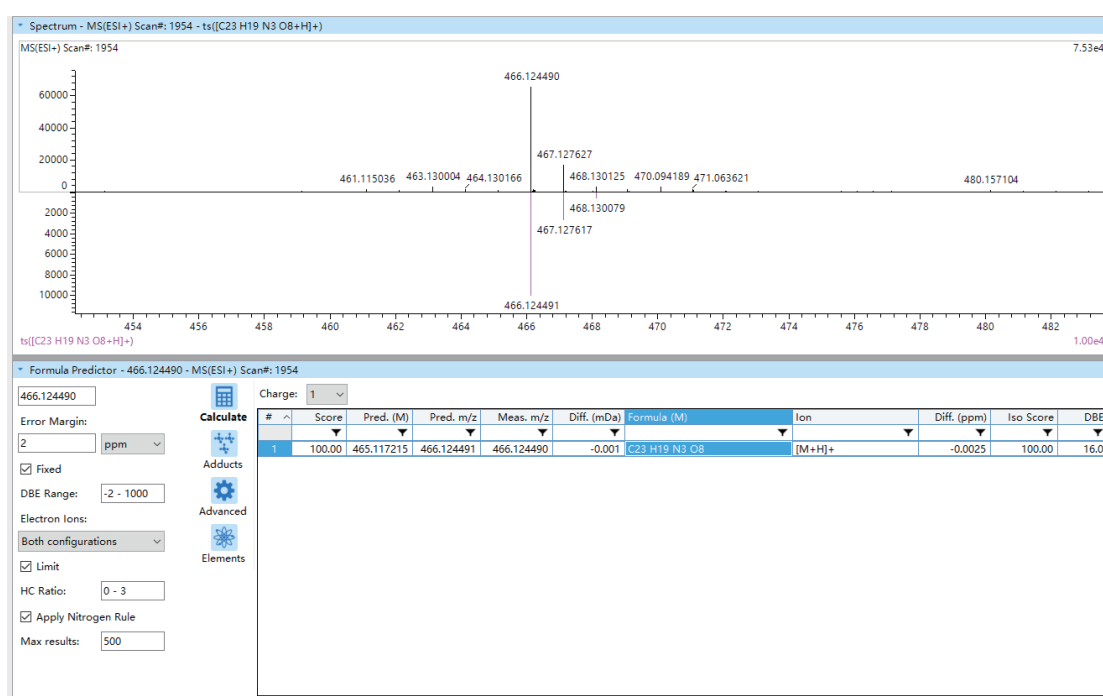


图5 杂质 m/z 466.12449 的分子式预测结果

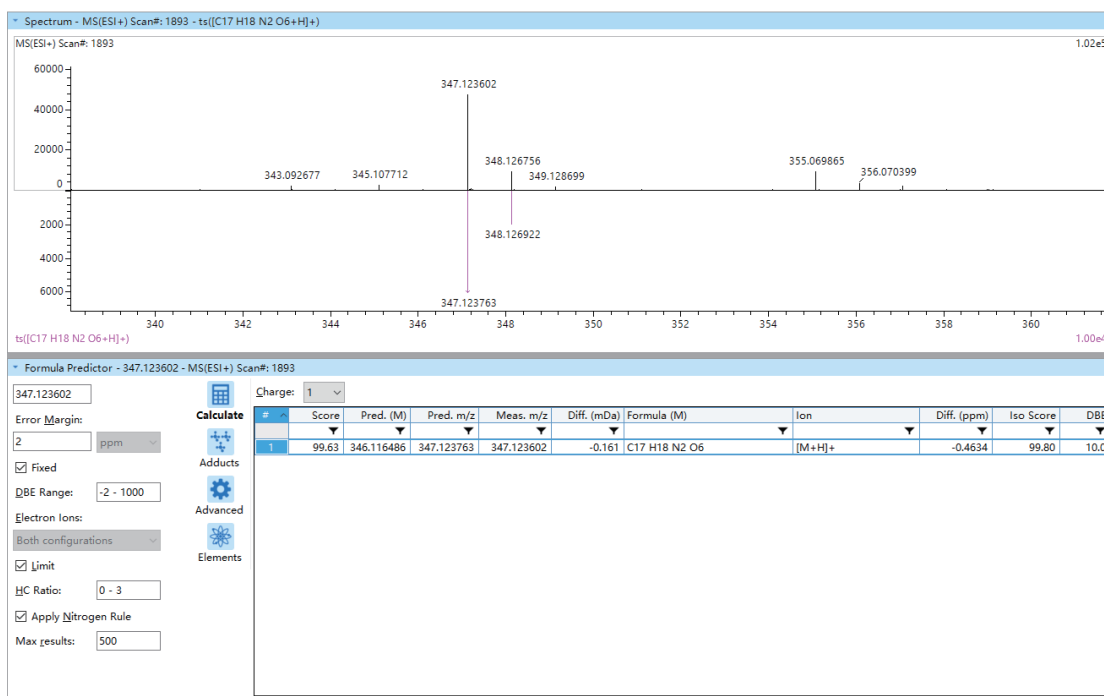


图 6 主成分 m/z 347.12362 的分子式预测结果

3.3 结构解析

3.3.1 主成分结构裂解规律

将 m/z 347.12362 对应的二级质谱图导入 ACD/Labs, 预测出碎片可能的结构式, 进行高丰度碎片的结构预测, 预测结果见图 7。从表 1 可知, 各碎片分子量准确度均在 2 ppm 以内, 质量准确度良好。

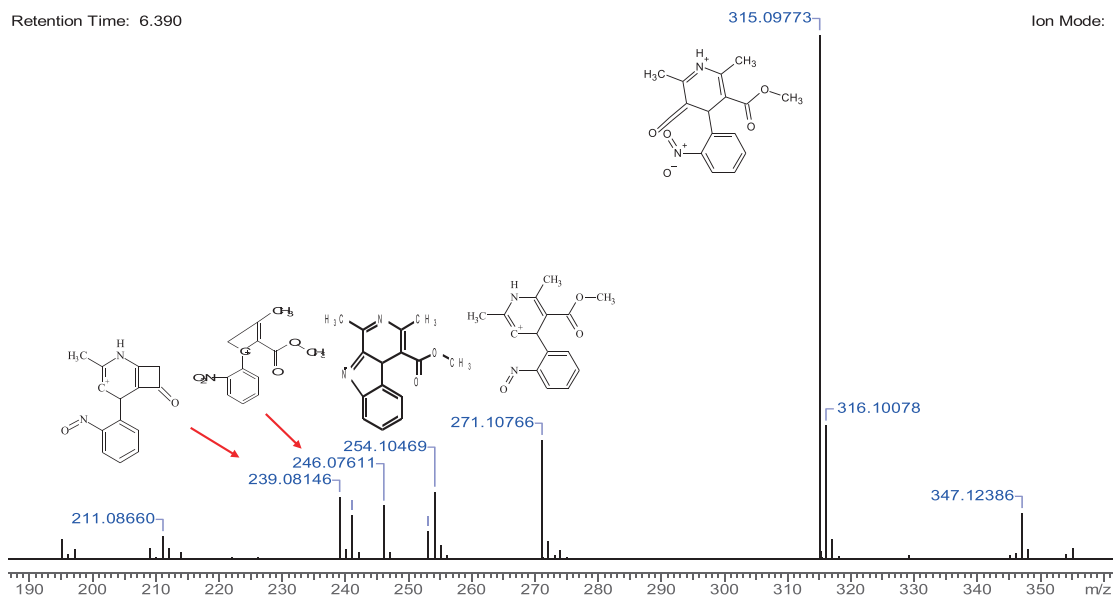


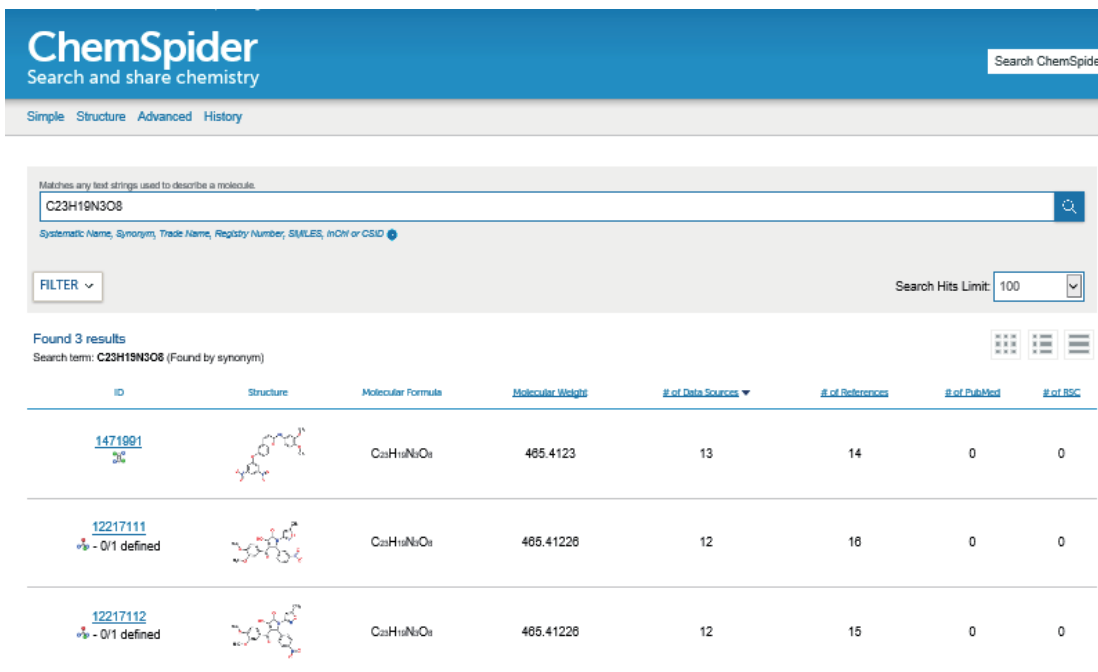
图 7 ACD 软件对主成分碎片离子进行色谱峰归属

表 1 主成分二级碎片分子质量信息

m/z Calc.	m/z Exp.	Difference(ppm)	Formula	Label
315.0976	315.0977	-0.58	C ₁₆ H ₁₅ N ₂ O ₅ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₄ H ₄ O
271.1077	271.1077	-0.23	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₃ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₂ H ₄ O ₃
254.1050	254.1047	-1.18	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₂ H ₅ O ₄
246.0761	246.0761	0.04	C ₁₃ H ₁₂ NO ₄ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₄ H ₇ NO ₂
239.8150	239.0815	-0.18	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₂ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₃ H ₈ O ₄

3.3.2 杂质结构解析

将杂质分子式 C₂₃H₁₉N₃O₈ 导入 ChemSpider 中进行检索得到的分子结构式, 共搜索得到 3 种可能结构, 如下图 8。但这 3 种结构同主成分无共同或相近结构, 且二级碎片峰无法匹配, 故这 3 种结构不可能为原料药合成或光降解导致产生的杂质。



ChemSpider
Search and share chemistry

Search ChemSpider

Simple Structure Advanced History

Matches any text strings used to describe a molecule.

Systematic Name, Synonym, Trade Name, Registry Number, SMILES, InChI or CASID

FILTER Search Hits Limit: 100

Found 3 results
 Search term: C23H19N3O8 (Found by synonym)




ID	Structure	Molecular Formula	Molecular Weight	# of Data Sources	# of References	# of PubMed	# of BSC
1471991		C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₈	465.4123	13	14	0	0
12217111 - 0/1 defined		C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₈	465.41226	12	16	0	0
12217112 - 0/1 defined		C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₈	465.41226	12	15	0	0

 图 8 分子式 C₂₃H₁₉N₃O₈ 在 ChemSpider 数据库检索结果

根据杂质和主成分的特征碎片分子量差异, 如下图 9 所示。推测杂质可能为主成分结构增加了分子量为 119 Da 的结构。根据硝苯地平合成路线 (如图 10 所示) 可知合成原料中含有邻硝基苯甲醛, 可推测 119 Da 的基团可能来源于邻硝基苯甲醛中的硝基苯结构。

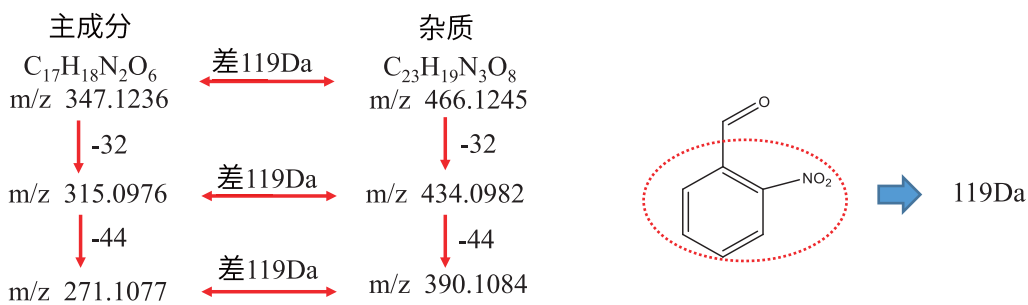


图9 杂质同主成分结构差异解析

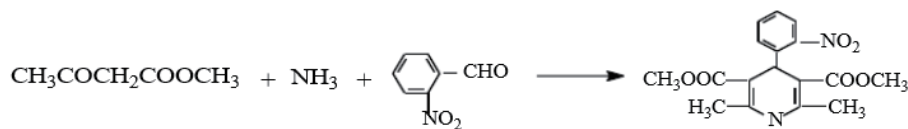


图10 硝苯地平合成路线图

由此，推测该杂质为硝苯地平加上邻位的硝基苯结构。根据主成分硝苯地平的结构，邻位硝基苯可能的连接位点，推测可能的结构式有以下两种，如图11所示：

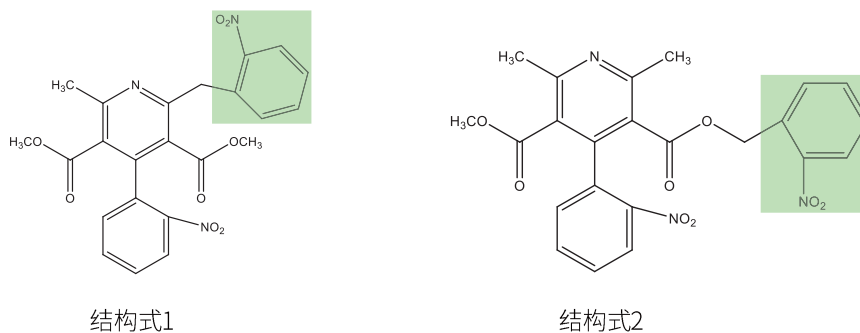


图11 杂质可能的结构式

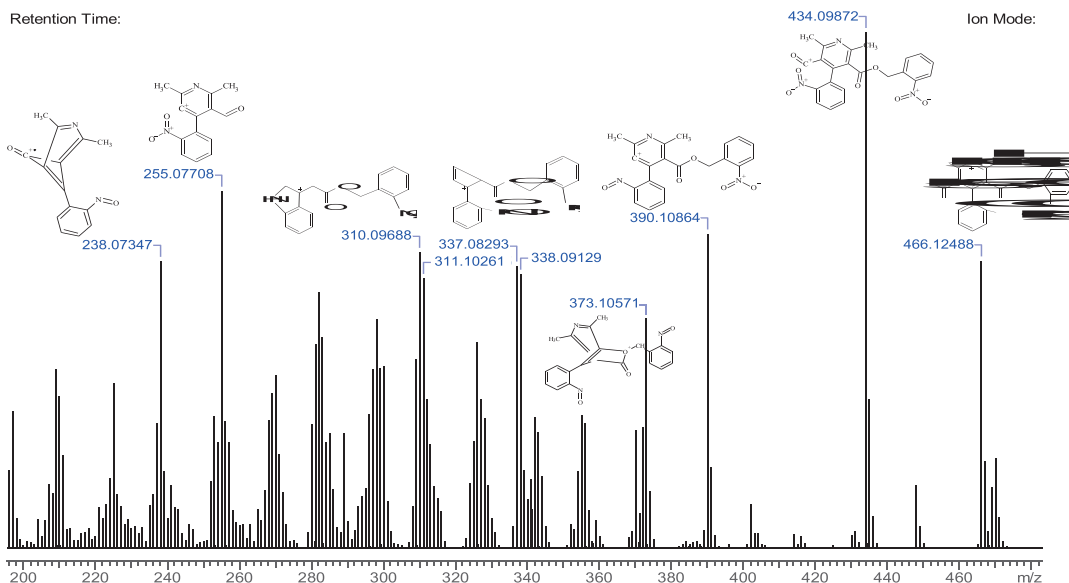


图12 ACD 软件对结构式2 碎片离子进行色谱峰归属

将以上两种结构分别导入 ACD/Labs 软件, 结合杂质峰的二级碎片结构, 进行匹配。通过 ACD 软件对杂质二级离子碎片归属, 结果可知结构式 2 能够匹配 (如图 12 所示), 推测结构式 2 为杂质可能结构。且从表 2 可知, 各碎片分子量准确度均在 3 ppm 以内, 质量准确度良好。

表 2 杂质二级碎片分子质量信息

m/z Calc.	m/z Exp.	Difference(ppm)	Formula	Label
448.1139	448.1137	-0.56	C ₂₃ H ₁₈ N ₃ O ₇ (+)	M ⁺ H ⁻ H ₂ O
434.0983	434.0981	-0.42	C ₂₂ H ₁₆ N ₃ O ₇ (+)	M ⁺ H ⁻ CH ₄ O
390.1085	390.1082	-0.61	C ₂₁ H ₁₆ N ₃ O ₅ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₂ H ₄ O ₃
373.1057	373.1055	-0.50	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₄ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₂ H ₅ O ₄
337.0819	337.0829	2.67	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ O ₅ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₅ H ₇ NO ₃
311.1033	311.1026	2.25	C ₁₇ H ₁₅ N ₂ O ₄ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₆ H ₅ NO ₄
255.0764	255.0771	2.50	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₃ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₉ H ₉ NO ₅
238.0737	238.0734	-1.01	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ (+)	M ⁺ H ⁻ C ₉ H ₁₀ NO ₆

■ 结论

本文使用岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用仪, 结合 Insight Explore、ChemSpider、ACD/Labs 等多元化辅助软件及数据库, 成功用于硝苯地平未知杂质鉴定。结果显示 LCMS-9030 具有高分辨率、高质量准确度等优点, 一级质谱数的偏差均在 1 ppm 以内, 二级碎片质谱数偏差均在 3 ppm 以内, 是未知物分析和鉴定的有利武器。

岛津应用云

