

液-質聯用技術鑑定安立生坦有關物質

陳雷霖¹, 宋 敏¹, 張 戈¹, 王 磊², 杭太俊^{1*}

(¹中國藥科大學藥物分析教研室, 南京 210009; ²江蘇嘉逸醫藥有限公司, 南京 211106)

摘要 采用液相色譜-飛行時間質譜(LC-TOF/MS)和液相色譜-二級質譜聯用(LC-MS/MS)兩種液-質聯用技術對安立生坦有關物質進行結構鑑定。採用XBridge C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)色譜柱, 以乙腈-水溶液(含0.15%甲酸)為流動相線性梯度洗脫, 對安立生坦及其有關物質進行分離; 通過電噴霧正離子化TOF/MS檢測, 并結合MS/MS碎片和對照品對照鑑定各有關物質的結構。在建立的色譜條件下安立生坦及其有關物質均分離良好, 共檢測到10個有關物質, 并通過聯用技术和有機反應機制解析確證了它的結構。液-質聯用技術能夠有效地鑑定安立生坦有關物質, 為其質量控制和工藝優化提供參考依據。

關鍵詞 安立生坦; 有關物質; LC-TOF/MS; LC-MS/MS

中圖分類號 R917 文獻標誌碼 A 文章編號 1000-5048(2016)01-0058-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160108

引用本文 陳雷霖, 宋敏, 張戈, 等. 液-質聯用技術鑑定安立生坦有關物質[J]. 中國藥科大學學報, 2016, 47(1):58–65.

Cite this article as: CHEN Leilin, SONG Min, ZHANG Ge, et al. Identification of related substances in ambrisentan by LC-MS/MS[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(1):58–65.

Identification of related substances in ambrisentan by LC-MS/MS

CHEN Leilin¹, SONG Min¹, ZHANG Ge¹, WANG Lei², HANG Taijun^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Jiangsu Jiayi Pharmaceuticals Corporation, Nanjing 211106, China

Abstract An LC-TOF/MS and LC-MS/MS method was established for the identification the related substances in ambrisentan. HPLC separation was carried out on an XBridge C₁₈ column(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) with linear gradient elution using a mobile phase consisting of acetonitrile, water and 0.15% formic acid. The structures of the related substances were identified by electrospray positive ESI high resolution TOF/MS and MS/MS spectra, and verified further through reference substances. Ambrisentan and its related substances can be separated with the established HPLC conditions. Ten related substances were detected and identified. The established method is useful for the identification of related substances in ambrisentan. The results obtained are valuable for its manufacturing process optimization and quality control.

Key words ambrisentan; related substances; LC-TOF/MS; LC-MS/MS

安立生坦(ambrisentan)即(+)-(2S)-2-[(4,6-二甲基嘧啶-2-基)氨基]-3-甲氨基-3,3-二苯基丙酸(图1), 是2007年上市的由美国Abbott公司研发的内皮素受体拮抗剂^[1]。口服用于治疗肺动脉高血压, 可以改善患者的运动能力并延缓临床恶化, 具有高效、低毒等优点^[2-3]。目前尚无安立生

坦有关物质定性鉴定的研究报道^[4]。

本研究建立了适用于安立生坦有关物质检查鉴别的液-质联用方法, 结合杂质对照品对照和强制降解试验, 鉴定了安立生坦有关物质的结构并分析了降解途径, 为安立生坦的工艺优化和质量控制提供了参考依据。

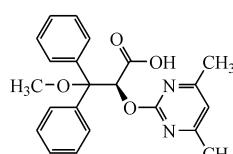


Figure 1 Chemical structure of ambrisentan

1 材 料

1.1 药品与试剂

安立生坦原料药(批号 AAL140601),安立生坦片剂(批号 TAL140801,规格 5 mg),安立生坦有关物质对照品 A~F(表 1)均由江苏嘉逸医药有限公司提供;市售安立生坦片剂(商品名:凡瑞克,规格 5 mg,英国葛兰素史克股份公司);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

1290 Infinity 液相色谱-6224 飞行时间质谱仪(美国安捷伦科技公司);TSQ Quantum Ultra AM 型 LC-MS/MS 联用仪(美国热电公司);BS 21S 电子天平(德国赛多利斯公司);ZF-C 型三用紫外分析仪器(上海康和光电仪器有限公司)。

2 方 法

2.1 液相色谱条件

Waters XBridge C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,含 0.15% 甲酸水溶液为流动相 A,含 0.15% 甲酸的乙腈为流动相 B,线性梯度洗脱(A:B):0 min(70:30)→40 min(55:45)→60 min(30:70)→70 min(30:70)→71 min(70:30)→76 min(70:30),流速 1 mL/min,检测波长 220 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。

2.2 TOF/MS 条件

电喷雾正离子化(ESI⁺)质谱检测;喷雾电压 4 kV,雾化氮气压力 275 kPa,干燥气流量 10 L/min,温度 325 °C,碎片电压 175 V,参比离子 *m/z* 121.050 8(质子化嘌呤)和 922.009 8(质子化六(1H,1H,3H-四氟丙氧基)磷嗪,HP-921),质量数扫描范围为 *m/z* 110~1 000。

2.3 MS/MS 条件

电喷雾正离子化(ESI⁺)质谱检测;喷雾电压 5 kV,雾化氮气压力 300 kPa,加热毛细管温度

350 °C,CID 氩气压力 0.20 Pa、能量 10~35 eV。

2.4 样品处理

2.4.1 供试液 取安立生坦或安立生坦片细粉适量(约相当于安立生坦 5 mg),精密称定,分别以乙腈溶解并稀释至 10 mL 作为供试液。精密量取上述各溶液适量,加起始比例流动相定量稀释,分别制成 1% 和 0.1% 的自身对照溶液。

2.4.2 强制降解供试液 取安立生坦约 5 mg,精密称定,加适量乙腈溶解,分别经 10% 过氧化氢溶液 80 °C 水浴 24 h、1 mol/L 盐酸溶液 60 °C 水浴 3 h、4 mol/L 氢氧化钠溶液 90 °C 水浴 48 h、乙腈溶液 75 °C 水浴 6 d 或乙腈溶液 UV 365 nm(6 W)光照 6 d 强制降解破坏处理后,酸碱破坏样品先中和,再加含 0.15% 甲酸的乙腈-水(30:70)溶液溶解并稀释至 10 mL(相当于供试液浓度 0.5 mg/mL)作为不同强制降解试验供试液。

2.4.3 杂质对照液 取安立生坦有关物质 A~F 对照品各适量,精密称定,分别用乙腈溶解并定量稀释制成质量浓度约为 0.5 mg/mL 的溶液作为对照品储备液。取各储备液适量,用起始比例流动相定量稀释制成质量浓度约为 5 μg/mL 的溶液作为杂质对照液。

3 结 果

3.1 有关物质检查

安立生坦及其强制降解供试液的 HPLC-DAD 检查图谱见图 2,对主要有关物质峰按保留时间从小到大顺次编号为 1~10。安立生坦原料药及供试片中均未检测到杂质,参比片中存在 1 个含量大于 1% 的杂质(有关物质 10)。强制降解共产生 5 个杂质(有关物质 2、3、4、5、9),其中杂质 3 和 9 分别与已知杂质 B 和 F 色谱保留一致。已知杂质 A、C、D、E 存在于原料药合成工艺中,有引入的可能,但均未在原料药、片剂及其降解产物中出现,鉴于篇幅仅将其检查结果列入杂质鉴定表中,不再做进一步分析。

强制降解结果表明:本品对强光相对稳定,未形成降解产物(未提供色谱图);酸破坏形成 1 个主要降解产物,为有关物质 9(图 2-e);碱破坏形成 3 个主要降解产物,分别为有关物质 3、5、9(图 2-f);高温破坏形成 3 个主要降解产物,分别为有关物质 2、4、9(图 2-g);氧化破坏形成含量均较小的

多个降解产物(不列入杂质鉴定表中)。各降解产物与主峰均分离良好,其紫外特征吸收曲线见图

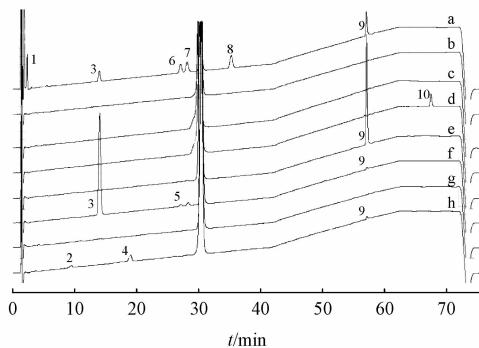


Figure 2 HPLC chromatograms of ambrisentan and its stress tests solutions

a: Mixed impurity references solution; b: API (AAL140601); c: Test tablets (TAL140801); d: Reference tablets; e: Acid hydrolysis; f: Alkaline hydrolysis; g: Oxidative degradation; h: Thermo degradation

3.2 有关物质结构的鉴定

负离子检测模式下除安立生坦和有关物质3、4外其余杂质均无响应,故均采用ESI⁺质谱检测。TOF/MS测得这些有关物质母离子的准确质量,通过Mass Hunter软件对各有关物质进行元素组成的

3,根据有关物质最大吸收相对安立生坦的变化来辅助有关物质结构解析。

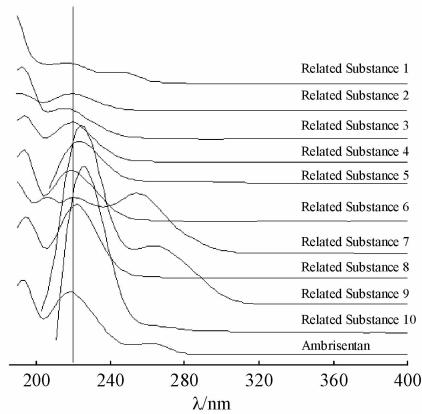


Figure 3 UV absorption curves of ambrisentan and its related substances

鉴定,再根据三重四极MS/MS碎片及裂解规律分析(以下所有裂解机制图中离子加合位点均为可能性较大的情况,同时也存在其他的可能),并结合对照品对照推定有关物质的结构。各有关物质的色谱、质谱信息及推断的结构见表1。

Table 1 Structures of the related substances in ambrisentan identified by LC-TOF/MS and LC-MS/MS

No.	Molecular ion/ (<i>m/z</i>)	<i>t</i> _R / min	Ion formula	Diff (×10 ⁻⁶)	Fragment ions (<i>m/z</i>)	Chemical structure	Chemical name	Proposed origins
1(A [*])	[M + H] ⁺ 187.053 5	2.2	C ₇ H ₁₁ N ₂ O ₂ S ⁺	-10.74	125, 107,82		2-Methanesulfonyl-4,6-dimethyl-pyrimidine	Starting material
2	[M + H] ⁺ 212.107 3	9.6	C ₁₄ H ₁₄ NO ⁺	6.64	195,167, 134,106		2-(4-Amino-phenyl)-2-phenylethenol	Degradation
3(B [*])	[M + Na] ⁺ 295.093 7	13.9	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ Na ⁺	-0.01	219		2-Hydroxy-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid	Starting material and degradation
4	[M + H] ⁺ 167.082 6	19.3	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₂ ⁺	-7.27	149, 126,85		(4,6-Dimethyl-pyrimidin-2-yloxy)-acetaldehyde	Degradation
5	[M + H] ⁺ 347.139 4	27.4	C ₂₁ H ₁₉ N ₂ O ₃ ⁺	-0.31	329, 303,125		2-(4,6-Dimethyl-pyrimidin-2-yloxy)-3,3-diphenyl-acrylic acid	Degradation
6(C [*])	[M + Na] ⁺ 309.109 9	27.7	C ₁₇ H ₁₈ O ₄ Na ⁺	0.16	205,197		2-Hydroxy-3-methoxy-3-phenyl-propionic acid methyl ester	Impurity in starting material

(Continued)

No.	Molecular ion/ (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> / min	Ion formula	Diff ($\times 10^{-6}$)	Fragment ions (<i>m/z</i>)	Chemical structure	Chemical name	Proposed origins
7(D [*])	[M + H] ⁺ 183.080 8	28.1	C ₁₃ H ₁₁ O ⁺	0.05	105		Diphenyl-methanone	Impurity in start- ing material
8(E [*])	[M + H] ⁺ 255.102 6	35.3	C ₁₆ H ₁₅ O ₃ ⁺	-0.13	223,195, 167,105		3, 3-Diphenyl-oxirane-2-carboxylic acid methyl ester	Impurity in start- ing material
9(F [*])	[M + H] ⁺ 303.150 1	57.2	C ₂₀ H ₁₉ N ₂ O ⁺	-7.33	179,125		2-(2,2-Diphenyl-vinyloxy)-4,6-dimethyl-pyrimidine	Degradation
10	[M + H] ⁺ 436.227 9	67.5	C ₃₀ H ₃₀ NO ₂ ⁺	-1.05	179		(2,2-Diphenyl-ethylamino)-acetic acid-2,2-diphenyl-ethyl ester	Degradation

^{*} Impurity reference substance

安立生坦:ESI⁺-TOF/MS 测得 *m/z* 379 的 [M + H]⁺、*m/z* 401 的 [M + Na]⁺ 和 *m/z* 417 的 [M + K]⁺,ESI⁻-TOF/MS 测得 *m/z* 377 的 [M - H]⁻,测得安立生坦 [M + H]⁺ 的准确质量为 379.165 6,与离子式 C₂₂H₂₃N₂O₄⁺ 相应。MS/MS 主要特征碎片离子 *m/z* 347、329、303、179 和 125 与安立生坦的结构相应:*m/z* 347 由 [M + H]⁺ 离子脱去甲氧基得

到,*m/z* 329 由 *m/z* 347 脱去羟基得到,*m/z* 303 由 [M + H]⁺ 离子脱去羧基和甲氧基得到,*m/z* 179 和 125 由 *m/z* 303 碳氧键断裂得到。可见安立生坦的主要碎片离子均来自于甲氧基、羧基以及间二甲基嘧啶氨基的断裂。安立生坦的二级质谱分析(图 4)对于解析其有关物质结构具有重要意义。

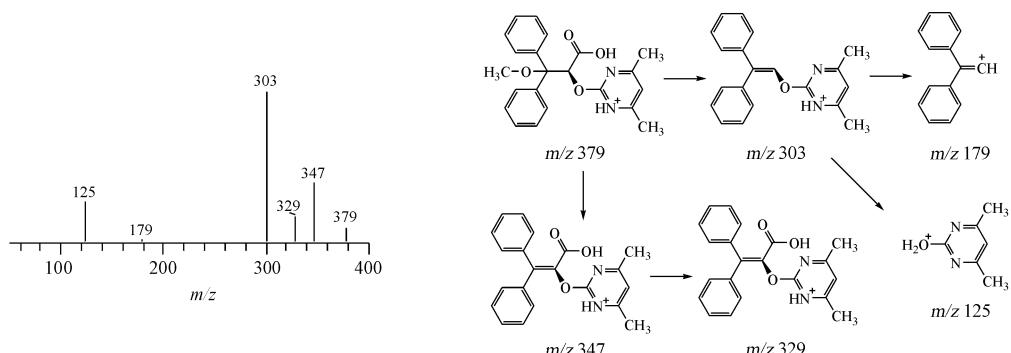


Figure 4 MS/MS spectrum of ambrisentan [M + H]⁺ (*m/z* 379) ion and its fragmentation mechanism

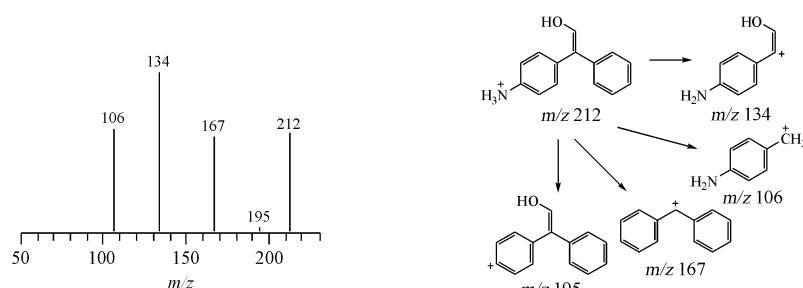


Figure 5 MS/MS spectrum of impurity 2 [M + H]⁺ (*m/z* 212) ion and its fragmentation mechanism

有关物质2: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 212 的 $[M + H]^+$ 、 m/z 234 的 $[M + Na]^+$ 和 m/z 250 的 $[M + K]^+$, 测得有关物质2 $[M + H]^+$ 离子的准确质量为212.1073, 与离子式 $C_{14}H_{14}NO^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子为 m/z 195、167、134、106。推测热破坏条件下甲氧基和羧基脱去, 由于出峰时间较早, 极性较大, 推测间二甲基嘧啶氧基碳氧键断裂生成羟基, 根据相对分子质量为奇数, 应含奇数个N, 推测在丢失间二甲基嘧啶环的同时与含氮化合物反应, 苯环上加氨基(氨基位置不确定)。其紫外最大吸收波长相对安立生坦红移, 推测是由于生成助色团-OH、-NH₂ 的同时又生成碳碳双键与苯

环发生共轭作用所致, 佐证了以上推测。故推测有关物质2为安立生坦在热破坏条件下脱羧基、甲氧基、间二甲基嘧啶基的氨基化反应产物(图5)。

有关物质3: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 295 的 $[M + Na]^+$, ESI⁻-TOF/MS 测得 m/z 271 的 $[M - H]^-$, 测得有关物质3 $[M + Na]^+$ 的准确质量为295.0937, 与离子式 $C_{16}H_{16}O_4Na^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子为 m/z 219。其紫外特征吸收曲线、质谱特征和保留时间($t_R = 13.9$ min)均与有关物质B对照品一致。故确证有关物质3为安立生坦脱间二甲基嘧啶基产物2-羟基-3-甲氧基-3,3-二苯基丙酸(图6)。

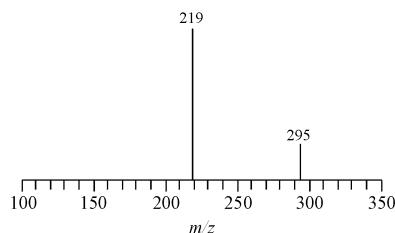


Figure 6 MS/MS spectrum of impurity 3 $[M + Na]^+$ (m/z 295) ion and its fragmentation mechanism

有关物质4: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 167 的 $[M + H]^+$ 、 m/z 205 的 $[M + K]^+$ 和 m/z 333 的 $[2M + H]^+$, ESI⁻-TOF/MS 测得 m/z 331 的 $[2M - H]^-$, 测得有关物质4 $[M + H]^+$ 的准确质量为167.0826, 与离子式 $C_8H_{11}N_2O_2^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子为 m/z 149、126、85。推测热破坏条件下丢失羧基, 根据出峰时间, 极性与安立生坦接近,

其相对分子质量比安立生坦少212, 推测丢失了两个苯基和一个甲基, 其中甲基由甲氧基碳氧键断裂脱去, 形成的烯羟基由于不稳定而转变成醛基。其紫外最大吸收波长相对安立生坦红移, 推测是脱去生色团羧基所致, 佐证了以上推测。故推测有关物质4为安立生坦在热破坏条件下脱去苯基、羧基、甲基的剩余结构部分(图7)。

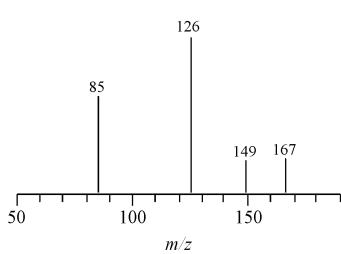
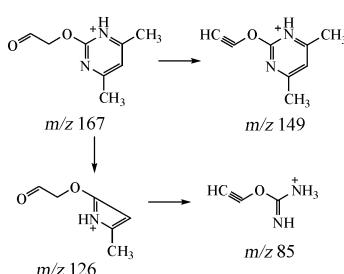


Figure 7 MS/MS spectrum of impurity 4 $[M + H]^+$ (m/z 167) ion and its fragmentation mechanism

有关物质5: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 347 的 $[M + H]^+$ 、 m/z 369 的 $[M + Na]^+$, 测得有关物质5 $[M + H]^+$ 的准确质量为347.1394, 与离子式 $C_{21}H_{19}N_2O_3^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子 m/z 329、303、125 与安立生坦部分碎片相同, 推测为碱性条



件下安立生坦脱去甲氧基生成。其紫外最大吸收波长相对安立生坦红移, 推测是生成碳碳双键与苯环和羰基发生共轭作用所致, 佐证了以上推测。故推测有关物质5为安立生坦碱破坏条件下脱去甲氧基的产物(图8)。

有关物质 9: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 303 的 $[M + H]^+$ 、 m/z 325 的 $[M + Na]^+$ 和 m/z 341 的 $[M + K]^+$, 测得有关物质 9 $[M + H]^+$ 的准确质量为 303.1501, 与离子式 $C_{20}H_{19}N_2O^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子为 m/z 179、125。其紫外特征吸收曲

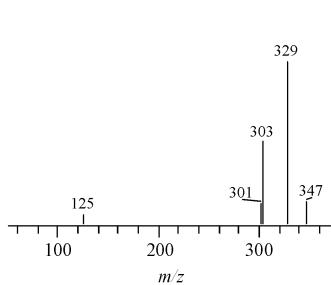


Figure 8 MS/MS spectrum of impurity 5 $[M + H]^+$ (m/z 347) ion and its fragmentation mechanism

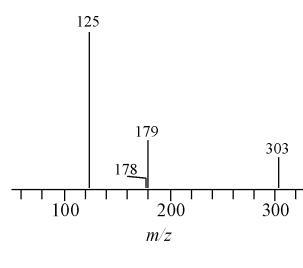


Figure 9 MS/MS spectrum of impurity 9 $[M + H]^+$ (m/z 303) ion and its fragmentation mechanism

有关物质 10: ESI⁺-TOF/MS 测得 m/z 436 的 $[M + H]^+$ 和 m/z 458 的 $[M + Na]^+$, 测得有关物质 10 $[M + H]^+$ 的准确质量为 436.2279, 由于出峰时间晚, 极性小, 应与离子式 $C_{30}H_{30}NO_2^+$ 相应; MS/MS 特征碎片离子为 m/z 179, 与安立生坦其中一

个碎片离子相同。其紫外最大吸收波长相对安立生坦红移, 推测是由于甘氨酸引入助色团-NH₂ 和 -OH 所致。结合安立生坦的裂解机制, 推测有关物质 10 为安立生坦与辅料中甘氨酸反应产物 (图 10)。

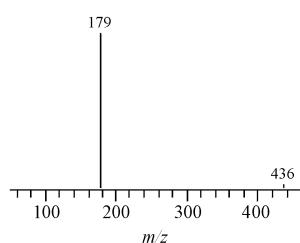
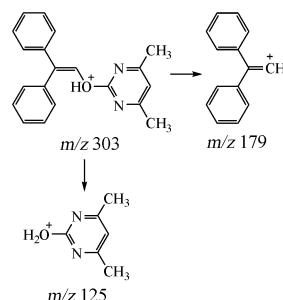
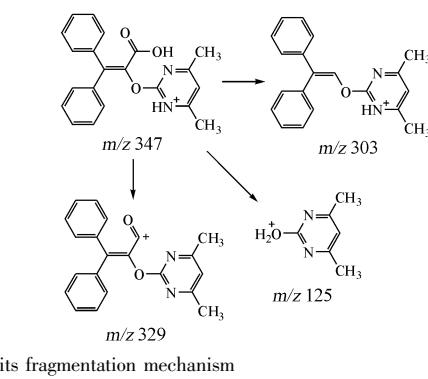


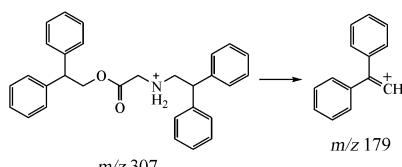
Figure 10 MS/MS spectrum of impurity 10 $[M + H]^+$ (m/z 436) ion and its fragmentation mechanism

4 讨 论

结合安立生坦的合成工艺、强制降解实验以及有关物质对照品比对, 研究鉴定出了 10 个有关物



质, 其降解途径见图 11。根据鉴定结果, 有关物质可分为 3 类: 合成起始原料或由起始原料引入的有关物质(有关物质 1、3、6、7、8), 降解产物(有关物质 2、3、4、5 和 9)和辅料杂质(有关物质 10)。



强制降解实验表明,安立生坦对光照相对稳定,对酸、碱、氧化、高温不稳定。强酸条件下,易脱去羧基及甲氧基生成比安立生坦极性小的有关物质9。强碱条件下,易脱去间二甲基嘧啶氧基生成比安立生坦极性大的有关物质3,脱去甲氧基生成有关物质5,和脱去羧基及甲氧基生成有关物质9。在持续高温条件下,安立生坦苯基、羧基脱去,甲氧基脱去或其碳氧键断裂,间二甲基嘧啶环脱去会生

成少量杂质,包括有关物质2,4,9。氧化破坏条件下,在相对保留时间为10.6~21.8 min处生成多个有关物质(图12),经LC-TOF/MS分析,其准分子离子m/z分别为395、365、363,分别与分子离子式 $C_{22}H_{23}N_2O_5^+$ 、 $C_{21}H_{21}N_2O_4^+$ 、 $C_{21}H_{19}N_2O_4^+$ 相对应,推测为安立生坦非选择性的羟基化、脱甲基以及脱甲基再羟基化的产物(分析见图13~15),另外还产生有关物质9。

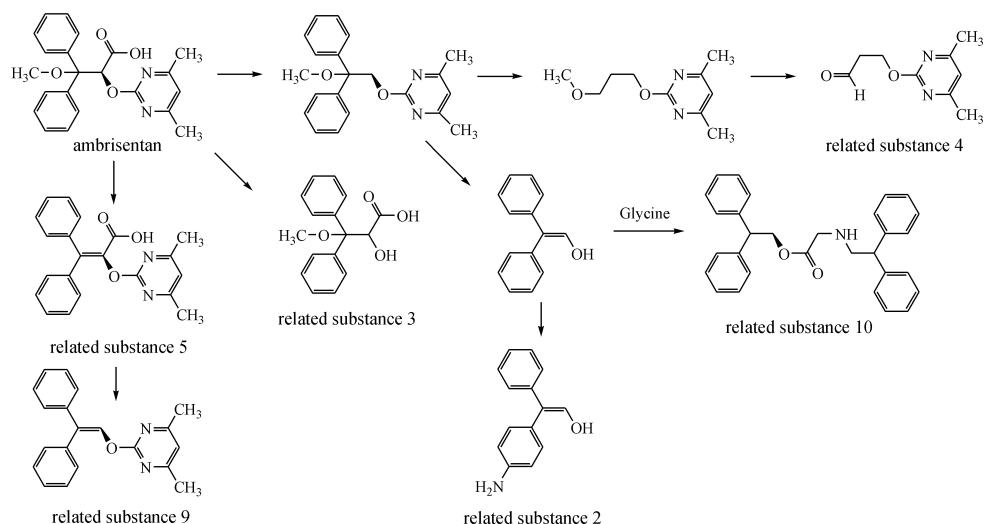


Figure 11 Degradation pathway of ambrisentan

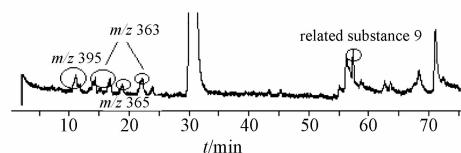


Figure 12 Total ion chromatogram of oxidative stress test solution

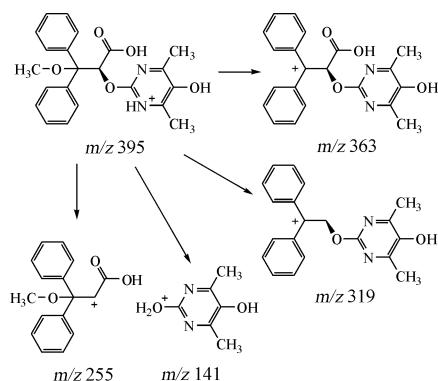
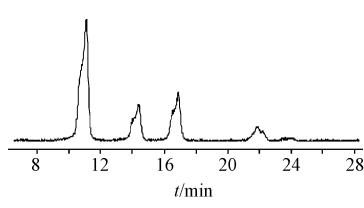


Figure 13 Extracted ion chromatogram, probable structure, representative fragmentation mechanism of m/z 395 of oxidative test related substances

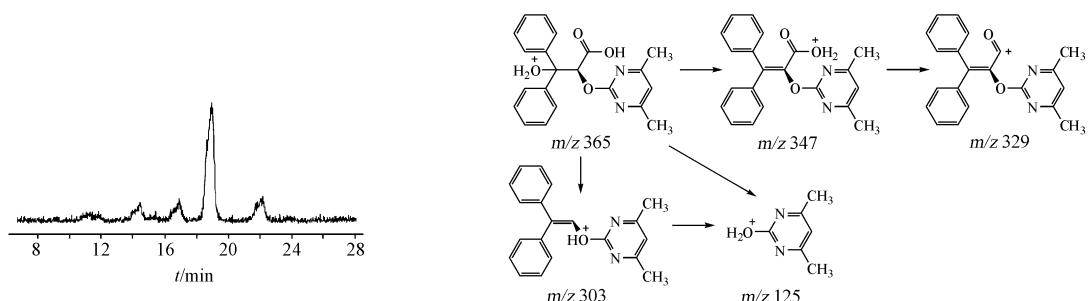


Figure 14 Extracted ion chromatogram, probable structure, representative fragmentation mechanism of $m/z\ 365$ of oxidative test related substances

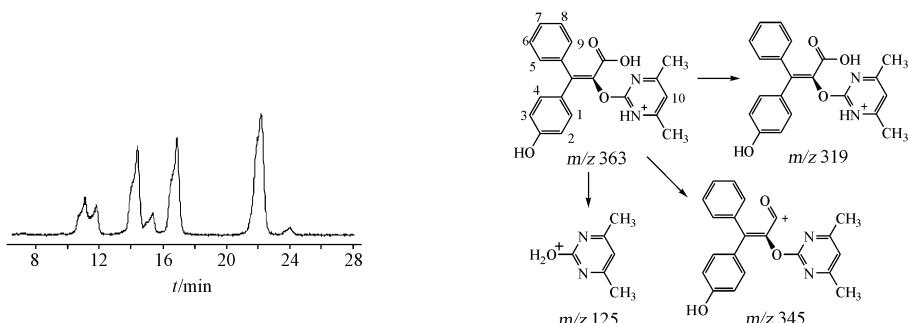


Figure 15 Extracted ion chromatogram, probable structure, representative fragmentation mechanism of $m/z\ 363$ of oxidative test related substances

安立生坦供试品中各有关物质含量均未超过0.1%,分析强制降解试验结果,其中有关物质2、3、4、5、9为降解产生,而降解产生的有关物质在片剂中均未检出,表明在适宜的存储条件下,其质量和稳定性良好。

参 考 文 献

- [1] Hrometz SL, Shields KM. Role of ambrisentan in the management of pulmonary hypertension [J]. *Ann Pharmacother*, 2008, **42**

(11):1653–1659.

- [2] Cheng JW. Ambrisentan for the management of pulmonary arterial hypertension[J]. *Clin Ther*, 2008, **30**(5):825–833.
- [3] Guo W. Potential drug for pulmonary arterial hypertension will rise[J]. *Shanghai Med Pharm J*(上海医药), 2007, **28**(4):160–161.
- [4] Jiang XP. To observe the development strategy of drug standards through Chinese Pharmacopoeia 2010 Edition[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2010, **45**(17):1281–1283.