·实验研究·

UPLC-MS/MS 法鉴定中乌宁的有关物质

吴雪婷,刘秀秀,钱广生,晁若冰
(四川大学华西药学院,成都 610041)

[摘要] **目的:** 对新药中乌宁的有关物质进行结构鉴定。**方法:** 采用 Gemini C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液(20∶80,*v*/*v*)为流动相,用蒸发光散射检测器(ELSD)进行有关物质检查;对中乌宁进行强制降解试验,归属杂质来源;采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF/MS)测定各杂质的精确分子量,并应用三重四极杆串联质谱(UPLC-MS/MS)测定各杂质碎片离子的质荷比,推测其化学结构和裂解规律。**结果:** 在中乌宁中共检出并鉴定了 4 个杂质,包括 3 个工艺杂质和 1 个降解杂质。**结论:** 液相色谱-质谱联用技术能有效地分离、鉴定中乌宁的有关物质,鉴定结果为其质量控制和工艺优化提供参考。

[关键词] UPLC-MS/MS;中乌宁;有关物质;结构鉴定;裂解规律
[中图分类号] R917 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)12-1110-07

Identification of related substances in mesaconine by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

WU Xue-ting, LIU Xiu-xiu, QIAN Guang-sheng, CHAO Ruo-bing
(*West China School of Pharmacy*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To identify the related substances in mesaconine. **Methods**: An HPLC-ELSD method was established using Gemini C_{18} column (150 mm×4.6 mm,5 μm) with mobile phase composed of methanol-0.1% trifluoroacetic acid to separate the impurities. Forced degradation tests were designed and performed on mesaconine to specify the impurities. Ultra-high performance liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF/MS) and triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were used for determination of exact mass and product ions of impurities. The structures of impurities and fragmentation regularity were then figured out. **Results**: A total of four impurities were detected and identified in mesaconine, including three impurities derived from synthesis process and a degradation product. **Conclusion**: UPLC-MS/MS technology can effectively separate and identify the impurities in mesaconine, and the results provide a valuable reference for the manufacturing process and quality control of mesaconine.

[**Key words**] ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; mesaconine; related substances; structure identification; fragmentation regularity

中乌宁(mesaconine)是从传统中药附子中发现的一个胺醇型二萜生物碱[1-5],是中乌头碱的全水解产物。王璐等[6]利用离体蛙心灌流实验对 13 种胺醇型二萜生物碱进行了强心活性实验,结果显示中乌宁具有明显的强心活性,因此中乌宁有望开发成为治疗心力衰竭的新药。在中乌宁的质量研究过程中,刘涛红等[7]建立了高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定中乌宁的含量,Liu 等[8]采用高分辨率飞行时间串联质谱(UPLC-TOF/MS)法对胺醇型二萜生物碱在质谱中的裂解行为和特征进行了研究。在中乌宁化学合成中,起始物料、中间体、

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81803705)
[作者简介] 吴雪婷,女,硕士研究生,研究方向为药物分析。E-mail: 718195851@qq.com。
[通讯作者] 刘秀秀,女,讲师,研究方向为药品质量控制与药物代谢研究。联系电话:(028)85501795,E-mail: liuxiuxiu@scu.edu.cn。

反应副产物及降解产物等均有可能成为其杂质，从而影响药物的安全性及有效性。由于中乌宁及其杂质均无紫外吸收，杂质研究难度较大。本文首先使用了 HPLC-ELSD 法对中乌宁及其强制降解溶液的有关物质进行分析，在此基础上，选择了专属性强、灵敏度高的 UPLC-MS/MS 法对中乌宁的有关物质进行结构鉴定，为保证药物的安全有效和质量可控打下基础。

材料与方法

1 药品与试剂

中乌宁（四川大学华西药学院，批号：20170801）；乌头宁（aconine）和次乌宁（hypaconine）对照品（四川大学华西药学院，纯度 >98.0%）；甲醇（美国 Sigma 试剂公司，色谱纯）；三氟乙酸、甲酸（天津科密欧化学试剂有限公司，色谱纯）；超纯水（成都品成科技纯水仪自制），其余试剂均为分析纯。

2 仪器

LC－10AT 高效液相色谱仪（日本岛津公司），配 ELSD 6000ES 检测器（美国奥泰公司）；Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪（美国赛默飞公司），配 micr OTOF-Q Ⅲ飞行时间质谱（德国布鲁克公司）；LCMS－8045 三重四级杆液质联用仪（日本岛津公司）；CPA 225D 天平（德国 Sartorius 公司）。

3 HPLC-ELSD 法

采用 HPLC-ELSD 法对中乌宁的有关物质进行检查。使用 Gemini C_{18} 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）；流速为 0.6 mL·min^{-1}；进样体积为 20 μL；检测器漂移管温度为 95 ℃；气体流量为 2.3 L·min^{-1}；不分流检测。

4 LC-MS 法

4.1 UPLC-TOF/MS 法 色谱条件：使用 Shim-pack GIST C_{18} 柱（100 mm×2.1 mm，2 μm）；流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）；流速为 0.25 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；进样体积为 1 μL。

质谱条件：电喷雾离子源（ESI），正离子扫描模式；雾化气压力为 2.0 Bar；干燥气流量为 8 L·min^{-1}；加热器温度为 200 ℃；毛细管压力为 4 500 V；扫描范围为 *m*/*z* 400～550。

4.2 UPLC-MS/MS 法 色谱条件同 TOF/MS 法。质谱条件为：电喷雾离子源（ESI），正离子扫描模式，雾化气流量为 3 L·min^{-1}，加热气流量为 10 L·min^{-1}，干燥气流量为 10 L·min^{-1}，接口温度为 300 ℃，DL 温度为 250 ℃，加热块温度为 400 ℃，接口电压为 －3.0 kV，产物离子扫描范围为 *m*/*z* 100～550，碰撞电压（CE）为 －50 V。

5 溶液配制

5.1 HPLC-ELSD 分析溶液 供试品溶液：称取中乌宁适量，加甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）溶解并稀释制成每 1 mL 中约含有 5 mg 的溶液。

乌头宁、次乌宁对照品溶液：称取乌头宁和次乌宁对照品各适量，分别加甲醇-0.1% 三氟乙酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）溶解并稀释制成每 1 mL 约含有 0.5 mg 的溶液。

强制降解溶液：称取中乌宁约 50 mg，分别经 2 mL 1 mol·L^{-1} 盐酸溶液，80 ℃ 水浴加热 1 h；2 mL 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液，80 ℃ 水浴加热 1 h；2 mL 30% 过氧化氢溶液，室温暗处放置 20 min；130 ℃ 烘箱加热 5 h；相对湿度为 92.5% 的恒温干燥器（25 ℃）中放置 5 d 和强光照射（4 500±500）lx 5 d 处理后，加流动相溶解（酸碱破坏溶液先中和）并稀释至 10 mL。

5.2 LC-MS 分析溶液 供试品溶液：称取中乌宁适量，加甲醇-0.1% 甲酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）溶解并稀释制成每 1 mL 约含有 0.5 mg 的溶液；TOF/MS 分析时使用六通切换阀将主成分切换至废液。

氧化降解溶液：称取中乌宁约 10 mg，加 30% 过氧化氢溶液 2 mL，摇匀，室温暗处放置 2 h，超声去除气泡，加甲醇-0.1% 甲酸水溶液（20∶80，*v*/*v*）稀释至 20 mL，摇匀，即得。

结 果

1 HPLC-ELSD 分析

采用 HPLC-ELSD 法对中乌宁进行有关物质检查，色谱图见图 1。

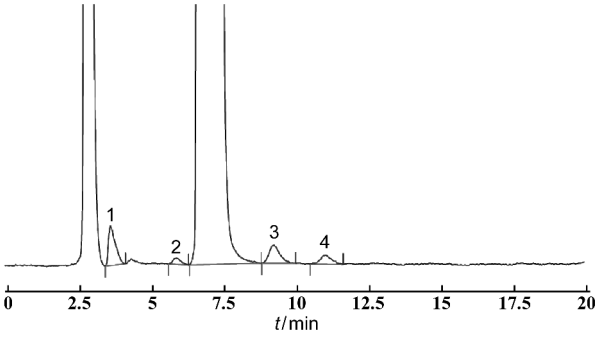


图 1 中乌宁有关物质检查色谱图

在该色谱条件下,从供试品中共分离出4个杂质,按出峰顺序分别命名为杂质1~杂质4。经过与乌头宁、次乌宁对照品溶液的色谱图比较(见图2),杂质3和杂质4分别与乌头宁和次乌宁的保留时间一致,推测杂质3可能为乌头宁,杂质4可能为次乌宁。

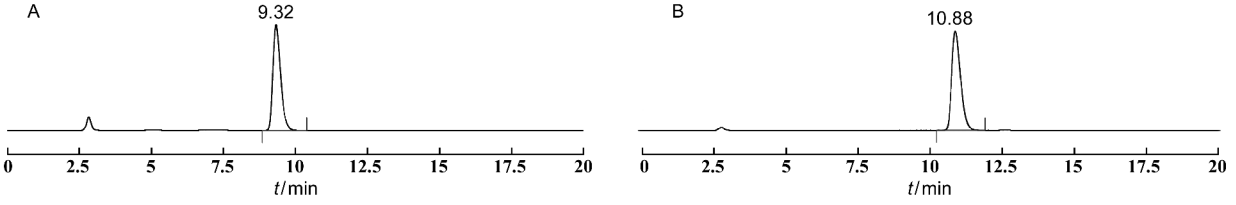
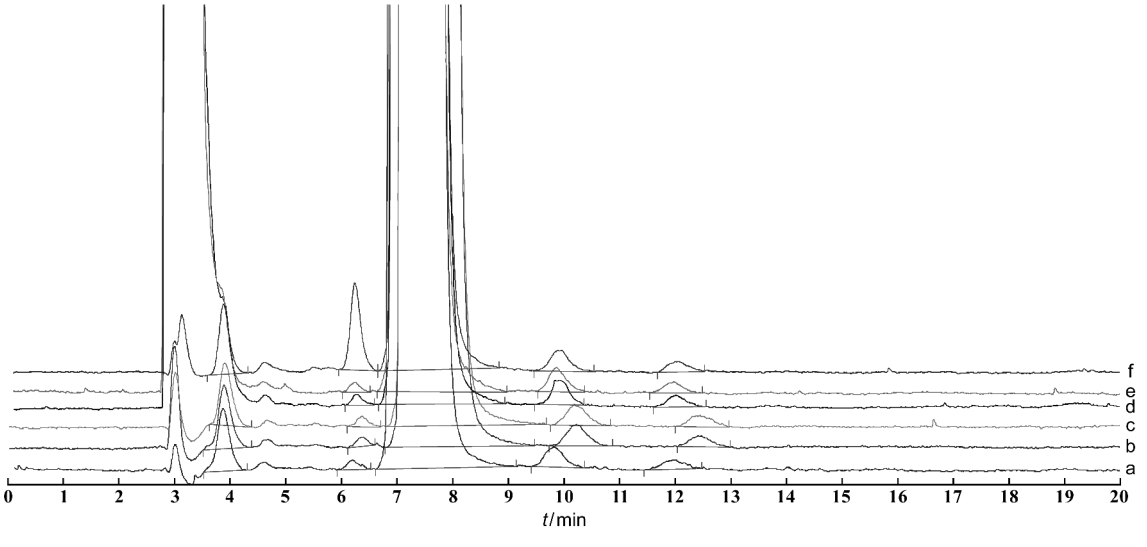


图2 乌头宁(A)和次乌宁(B)对照品色谱图

2 强制降解试验

为了探索杂质的来源,分别研究了在高温、高湿、光照、酸水解、碱水解、氧化条件下,样品中有关物质的变化情况,采用HPLC-ELSD法对强制降解溶液进行分析,结果见图3。从图3可以看出,经氧化破坏后,杂质2的量明显增加,说明杂质2可能为氧化降解产物。在其余条件下,有关物质的量未见明显增加。



a:高温;b:高湿;c:光照;d:酸水解;e:碱水解;f:氧化

图3 强制降解试验色谱图

3 有关物质的质谱解析

采用UPLC-TOF/MS测得各个杂质的精确分子量,并采用UPLC-MS/MS分别测得各杂质裂解碎片离子的质荷比。通过与中乌宁的分子量和碎片离子的对比分析,推测各有关物质的结构。质谱数据和鉴定结果见表1和图4。

表1 中乌宁及其有关物质的质谱数据和鉴定结果

名称	分子式	$[M+H]^+$ m/z	偏差/ppm	碎片离子 m/z	鉴定结果
中乌宁	$C_{24}H_{39}NO_9$	486.269 2	1.2	454.2, 436.2, 404.2, 378.2, 372.2	—
杂质1	$C_{23}H_{37}NO_9$	472.255 1	-2.1	454.1, 422.2, 390.2, 364.1, 346.2	去甲基中乌宁
杂质2	$C_{24}H_{39}NO_{10}$	502.264 8	-0.4	454.2, 436.1, 422.1, 404.2, 390.2	中乌宁-*N*-氧化物
杂质3	$C_{25}H_{41}NO_9$	500.285 3	0.3	468.2, 450.2, 436.3, 418.2, 392.2	乌头宁
杂质4	$C_{24}H_{39}NO_8$	470.274 8	0.1	438.2, 406.1, 374.2, 330.1	次乌宁

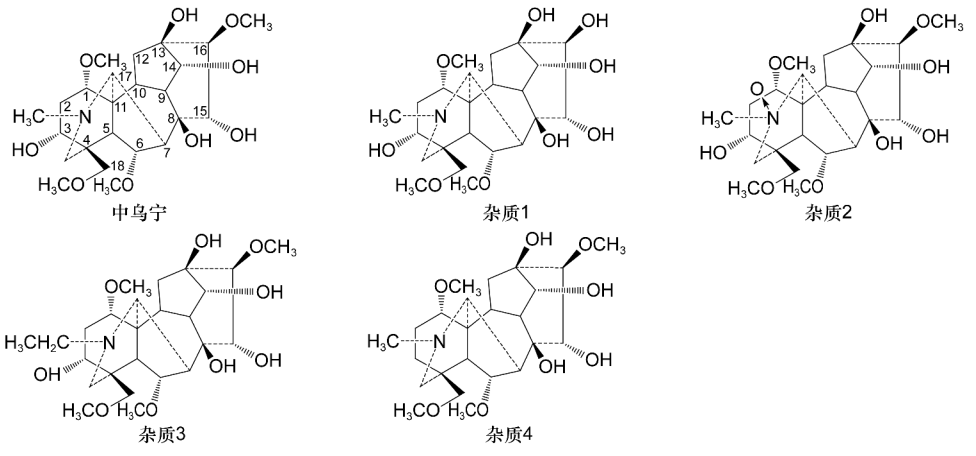


图 4 中乌宁及其有关物质的结构

3.1 中乌宁 TOF/MS 法测得中乌宁[M + H]$^+$ *m/z* 为 486.269 2，MS/MS 法测得主要碎片离子[M + H]$^+$ *m/z* 为 454，436，404，378 和 372，质谱图见图 5。根据中乌宁的化学结构，对中乌宁的 3 个主要碎片离子裂解途经进行了推测，见图 6。其中 *m/z* 454 为母离子 C_{16} 位甲氧基与邻位氢脱去 1 分子 CH_3OH 产生，*m/z* 436 为进一步脱去 1 分子 H_2O 产生；*m/z* 378 为母离子脱去 2 分子 CH_3OH，再脱去 C_{18} 亚甲基及其甲氧基产生。中乌宁的碎片离子和裂解途径对其有关物质的结构分析具有参考意义。

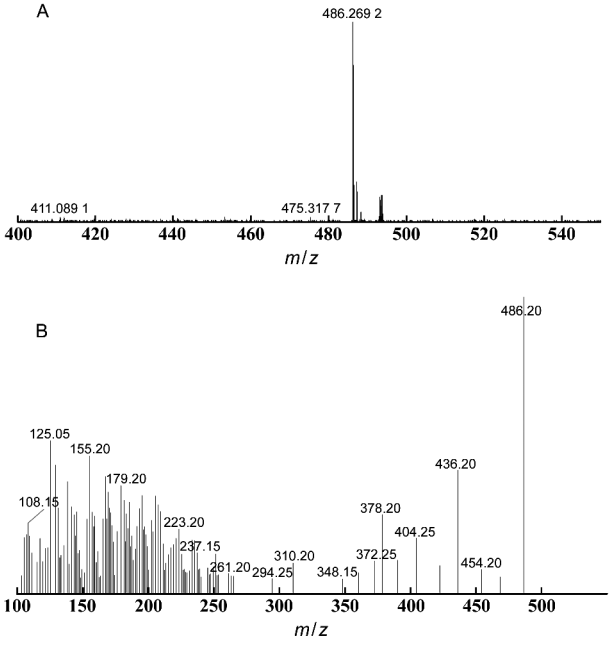


图 5 中乌宁的 TOF/MS(A)和 MS/MS(B)图

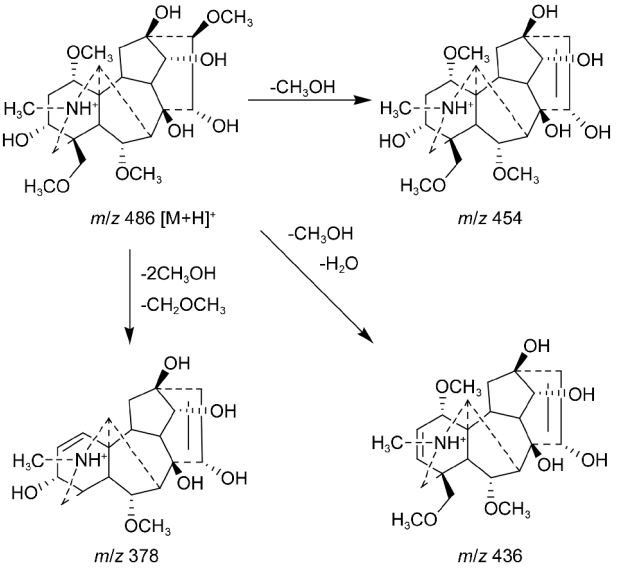


图 6 中乌宁主要的质谱裂解途径

3.2 杂质 3 HPLC-ELSD 结果表明，该杂质可能为乌头宁。TOF/MS 法测得杂质 3 [M + H]$^+$ *m/z* 为 500.285 3，比中乌宁质量数多 14，与乌头宁质量数一致，进一步证明该杂质为乌头宁。MS/MS 法测得主要碎片离子[M + H]$^+$ *m/z* 为 468，450，436，418 和 392，质谱图见图 7。其中 *m/z* 468，*m/z* 450 和 *m/z* 392 的 3 个主要碎片离子分别比中乌宁 *m/z* 454，*m/z* 436 和 *m/z* 378 的碎片离子质量数多 14，推测其主要质谱裂解途径见图 8。

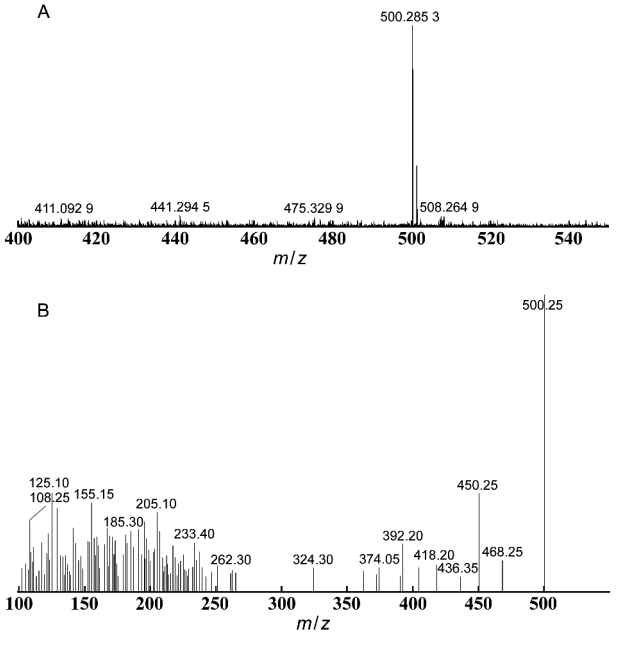


图 7 杂质 3 的 TOF/MS(A)和 MS/MS(B)图

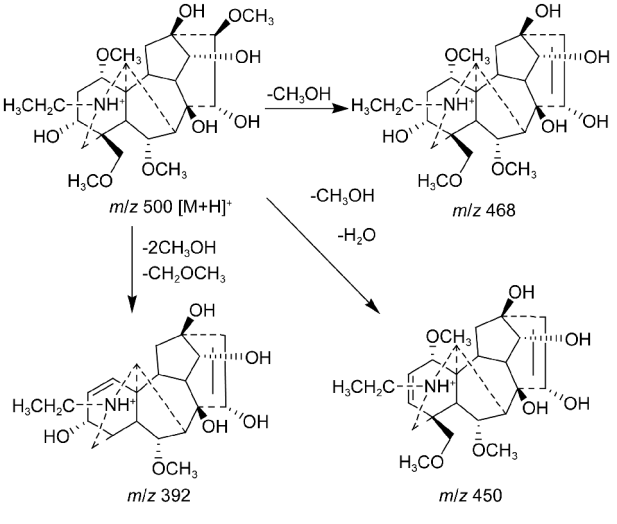


图 8 杂质 3 主要的质谱裂解途径

3.3 杂质 4 HPLC-ELSD 结果表明,该杂质可能为次乌宁。TOF/MS 法测得杂质 4 $[M+H]^+$ m/z 为 470.274 8,比中乌宁质量数少 16,与次乌宁质量数一致,进一步证明该杂质为次乌宁。MS/MS 法测得主要碎片离子 $[M+H]^+$ m/z 为 438,406,374 和 330,质谱图见图 9。通过与中乌宁的碎片离子的对比分析,推测其主要质谱裂解途径见图 10。其中 m/z 438 为母离子脱去 1 分子 CH_3OH 产生,m/z 406 为母离子脱去 2 分子 CH_3OH 产生;m/z 330 为母离子脱去 3 分子 CH_3OH,再脱去 C_{18} 亚甲基及其甲氧基产生。

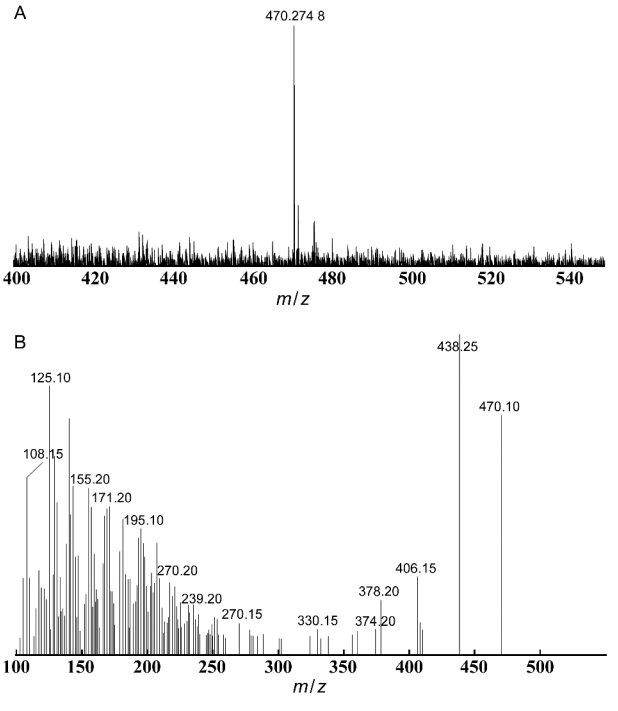


图 9 杂质 4 的 TOF/MS(A)和 MS/MS(B)图

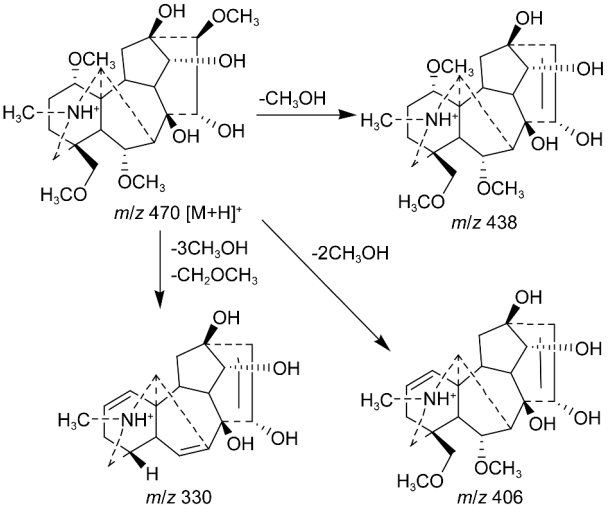


图 10 杂质 4 主要的质谱裂解途径

3.4 杂质 1 TOF/MS 法测得杂质 1 $[M+H]^+$ m/z 为 472.255 1,比中乌宁质量数少 14,应为去甲基中乌宁。MS/MS 测得主要碎片离子 $[M+H]^+$ m/z 为 454,422,390,364 和 346,质谱图见图 11。

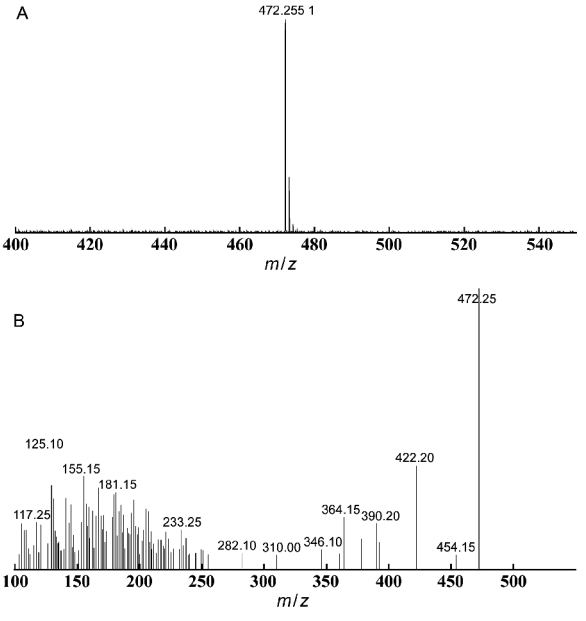


图 11 杂质 1 的 TOF/MS 图(A)和 MS/MS 图(B)

在中乌宁等胺醇型生物碱中,C_{16}和 C_{18}位上的甲氧基较活泼,易发生反应,在中乌宁合成的去烷基步骤中可能脱去甲基。根据在中乌宁、杂质 1、杂质 3 和杂质 4 的二级质谱中均有脱去 C_{18}亚甲基及其上甲氧基形成的碎片,说明 C_{18}位上的甲氧基未发生变化。由于 C_{16}位上甲氧基受两侧羟基的影响,活性较高,在中乌宁合成过程中可能脱去甲基,因此推测杂质 1 的 C_{16}位是羟基而不是甲氧基。通过与中乌宁碎片离子的对比分析,推测其主要质谱裂解途径见图 12。其中 *m/z* 454 为母离子脱去 1 分子 H_2O 产生,*m/z* 422 为进一步脱去 1 分子 CH_3OH 产生;*m/z* 346 为母离子脱去 2 分子 CH_3OH 和 1 分子 H_2O,再脱去 C_{18}亚甲基及其甲氧基产生。

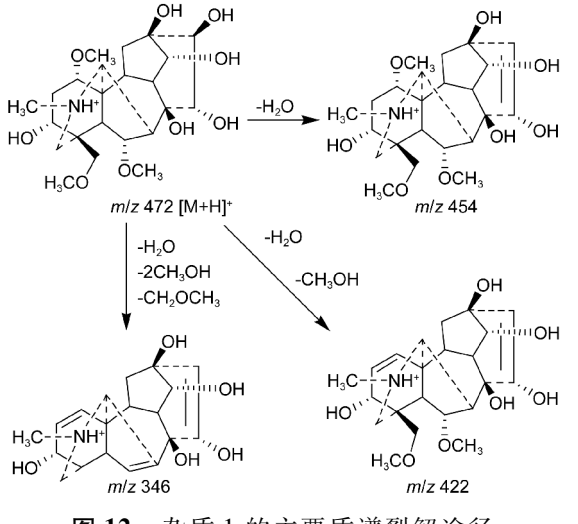


图 12 杂质 1 的主要质谱裂解途径

3.5 杂质 2 中乌宁经氧化破坏后,杂质 2 的量明显增加。TOF/MS 法测得杂质 2 $[M+H]^+$ *m/z* 为 502.264 8,比中乌宁的质量数多 16,即一个 O 原子的质量数,可能为中乌宁-*N*-氧化物。MS/MS 法测得主要碎片离子 $[M+H]^+$ *m/z* 为 454,436,422,404 和 390,质谱图见图 13。通过与中乌宁碎片离子的对比分析,推测其主要质谱裂解途径见图 14。其中 *m/z* 454 为母离子脱去 O 原子和 1 分子 CH_3OH 产生,*m/z* 436 为进一步脱去 1 分子 H_2O 产生,*m/z* 404 为再脱去 1 分子 CH_3OH 产生。

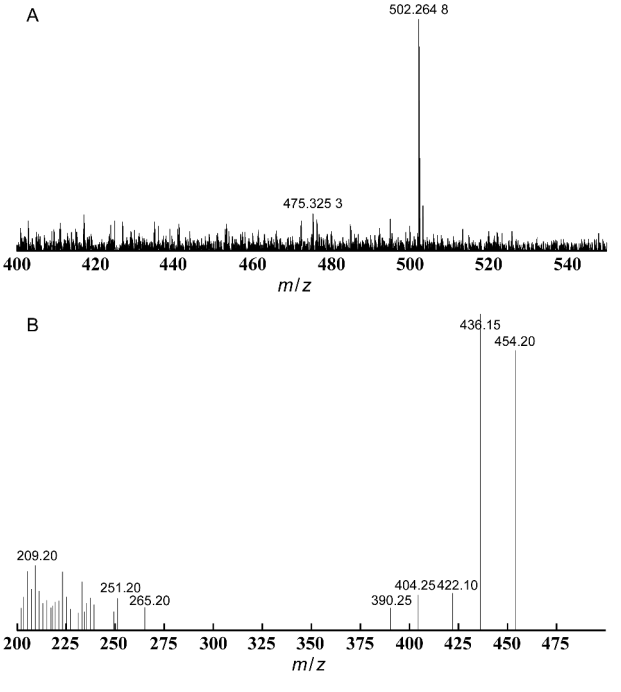


图 13 杂质 2 的 TOF/MS 图(A)和 MS/MS 图(B)

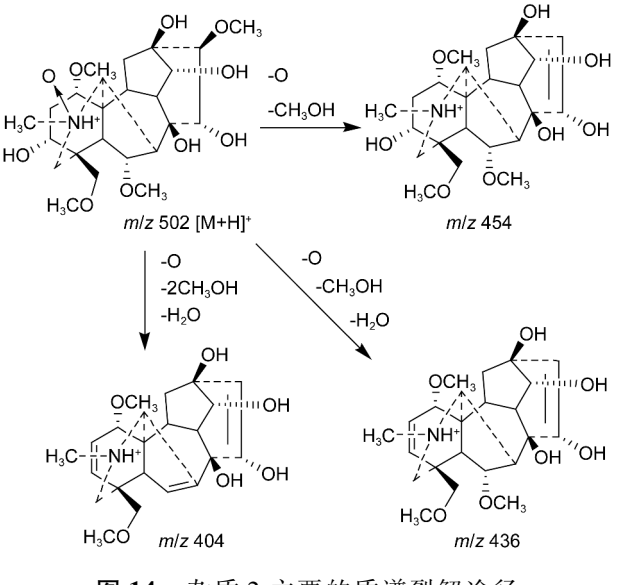


图 14 杂质 2 主要的质谱裂解途径

再采用 UPLC-MS/MS 法对氧化降解溶液进行分析,氧化降解产物的质谱数据均与杂质 2 一致,进一步证明杂质 2 为中乌宁-*N*-氧化物。

讨　论

根据中乌宁的化学结构,推测中乌宁的质谱裂解规律主要为脱去 CH_3OH 和 H_2O 等中性分子。C_{16}位上甲氧基受两侧羟基的影响,活性较高,可能与相邻碳上的氢一起脱去 1 分子 CH_3OH;C_{18}位亚甲基可与其相连的甲氧基一起脱去。杂质 2(中乌宁-*N*-氧化物)、杂质 3(乌头宁)质谱裂解规律与中乌宁一致;杂质 4(次乌宁)为 3-去氧中乌宁,无脱水碎片。在中乌宁、杂质 1、杂质 3、杂质 4 的二级质谱中,均有脱去 C_{18}亚甲基及其甲氧基形成的碎片,说明 C_{18}上的甲氧基未发生变化,因此推测杂质 1 脱去的甲基位点在 C_{16}位。中乌宁结构的二萜环骨架稳定,不发生变化。

本研究采用 HPLC-ELSD 法对中乌宁进行了有关物质检查,并对中乌宁进行强制降解试验,归属了杂质来源;采用 UPLC-MS/MS 法推测了杂质结构和裂解途径。在中乌宁中共检出和鉴定了 4 个杂质。结合中乌宁的合成工艺和降解实验结果,可将杂质按来源分为 2 类,一类为工艺杂质,杂质 1 为合成步骤中脱烷基化产生的副产物,杂质 3 和杂质 4 为合成起始物料中引入的工艺杂质;另一类为降解杂质,杂质 2 为氧化降解产物。采用 UPLC-MS/MS 法能有效地分离鉴定中乌宁中的杂质,为其质量控制和工艺优化提供参考。

[参 考 文 献]

[1] SHEN Y, ZUO AX, JIANG ZY, *et al*. Two new C20-diterpenoid alkaloids from Aconitum carmichaelii[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2011, 94(1): 122 - 126.

[2] 斯琴巴特尔, 席琳图雅, 青格勒, 等. 附子生物碱类化学成分的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019,19(98): 50 - 51, 55.

[3] 陈思, 李武宏, 陈啸飞, 等. 附子生物碱化学成分和质量控制的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014,34(10): 1709 - 1717.

[4] 于清民, 栾永福, 李晓骄阳, 等. 基于物质基础和药理作用的附子功效研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012,9(11): 674 - 678.

[5] 周远鹏. 作用于心血管系统的附子水溶性活性成份研究回顾和评价[J]. 中药药理与临床, 2011,27(6): 106 - 110.

[6] 王璐,丁家昱,刘秀秀,等. 附子中胺醇型二萜生物碱的鉴定及其强心活性研究[J]. 药学学报, 2014,49(12): 1699 - 1704.

[7] 刘涛红, 刘秀秀, 晁若冰. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定中乌宁碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2016,51(17): 1459 - 1461.

[8] LIU XX, TANG MH, WANG L, *et al*. Fragmentation study of aminoalcohol-diterpenoid alkaloids by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30(1): 161 - 169.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 03 - 30