

表 4 3 批次样品测定结果

Tab 4 Contents of three samples

花粉批号	十四烷酸/mg·g ⁻¹	亚麻酸/mg·g ⁻¹	亚油酸/mg·g ⁻¹	十六烷酸/mg·g ⁻¹	油酸/mg·g ⁻¹	十八烷酸/mg·g ⁻¹	合计/mg·g ⁻¹
120829	3.01	25.92	4.60	18.39	2.84	3.44	58.20
HS120730	2.97	34.05	4.25	19.89	3.56	3.12	67.84
121104	2.98	37.14	4.53	18.52	2.69	3.27	69.13

6 讨论

本研究借鉴烟草中脂肪酸含量测定的研究方法,采用高效液相色谱-蒸发光散射法对油菜蜂花粉中十四烷酸、亚麻酸、亚油酸、十四烷酸、油酸及十八烷酸进行分析及含量测定。通过对不同提取溶剂提取效果进行比较,结果极性越高的溶剂提取效率也越高,以 KOH/乙醇溶液为皂化剂直接对油菜蜂花粉进行皂化测定结果更理想;优化了样品处理过程中皂化剂浓度、皂化温度以及皂化时间等的皂化条件和样品测定时的检测器参数,最终确定了较为合适的皂化条件及检测器工作参数。方法学实验表明该方法相对简便、准确、重复性好,所用试剂廉价、安全、易得,适合于油菜蜂花粉中脂肪酸含量分析测定。避免了脂肪酸研究时气相色谱(气相色谱-质谱)法中甲酯化反应及已报道高效液相色谱法中荧光衍生化反应过程中存在的操作复杂、副反应较多、反应不完全等问题,并弥补了油菜蜂花粉药材中脂肪酸绝对含量测定研究较少的空白,为油菜蜂花粉中脂肪酸类成分的开发奠定了一定基础。

REFERENCES

[1] LI K, YANG Y F, LI Y H. Studies on active fractions of rape bee pollen on anti-benign prostatic hyperplasia and inflammation [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010,

41(5): 798-802.
[2] XU L Y, HOU X. Effects of rape bee pollen on the growth of body weight, learning and memory in mice [J]. Primary J Chin Mater Med(基层中药杂志), 2000, 14(4): 11.
[3] TU W L. Effects of rape bee pollen of supercritical carbon dioxide extracts on lipid metabolism in hyperlipidemic rats [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2005.
[4] HAI H Y. Studies on the bioactive constituents of Qian Lie Kang and *Brassica napus* L. pollen [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2004.
[5] SUN H. Search inhibitor of 5 α -reductase in *Brassica napus* L. pollen [D]. Wuhan: Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 2009.
[6] KUANG Y J, SHI Y P, REN S X, et al. Extraction and GC analysis of fatty acids in rape bee pollen of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2011, 31(11): 30-33.
[7] ZHU F, ZHAO W C, ZHAO X E, et al. Determination of free fatty acids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and identification with mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2007, 35(4): 489-494.
[8] GANSU CHEMICAL SOCIETY. The central and western regions of China Academic Exchange and Chromatographic Instrument Exhibition proceedings [C]. Gansu: Wanfang data, 2006: 376-378.
[9] LIU J S, ZHANG D F, LAI W L, et al. Determination of high fatty acids in tobacco by high performance liquid chromatography with evaporative light-scatter detector [J]. Tobacco Sci Technol(烟草科技), 2011, 54(3): 55-58.
[10] YANG B C, LIU H, YANG Y F, et al. Determination of four fatty acids in fraction of rape bee pollen with anti-prostate hyperplasia by HPLC-ELSD [J]. Chin Tradit Herb Med(中草药), 2012, 43(10): 1967-1970.

收稿日期: 2013-08-28

RRLC-QTOF 鉴定拉科酰胺的未知杂质

吴怀秀¹, 王军娟², 胡凯³, 宋珊珊³, 王向军^{1,3*} (1.浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2.杭州宝荣科技有限公司, 杭州 310030; 3.浙江九洲药业股份有限公司, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 通过快速液相-四极杆飞行时间串联质谱(RRLC-QTOF)法分离、鉴定拉科酰胺粗品中 4 个未知杂质。方法 采用美国 Agilent RRLC 快速液相色谱系统和 6530 型四极杆-飞行时间串联质谱仪, 色谱柱为 XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为醋酸铵-水溶液(甲酸调节 pH 至 4.5)和乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 采用柱后分流, 其中质谱

作者简介: 吴怀秀, 女, 硕士生 Tel: (0571)63741827 E-mail: wuhuaixiu@163.com *通信作者: 王向军, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (0571)63741827 E-mail: xjwang@zafu.edu.cn

仪进样流速为 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果 结合高分辨质量数和二级质谱碎片推测得到了拉科酰胺粗品中 4 个可能的杂质结构。

结论 本研究为拉科酰胺的质量研究提供参考。

关键词: 拉科酰胺; 杂质; 四极杆-飞行时间质谱仪

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)05-0563-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.012

RRLC-QTOF Applied to the Impurities Profile of Lacosamide

WU Huaixiu¹, WANG Junjuan², HU Kai³, SONG Shanshan³, WANG Xiangjun^{1,3*} (1.School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China; 2.Hangzhou Baorong Science and Technology Co.,Ltd, Hangzhou 310051, China; 3.Zhejiang Jiuzhou Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the impurities profile of lacosamide with RRLC-QTOF method. **METHODS** The high performance liquid chromatography and quadrupole-flight time tandem mass spectrum (RRLC-QTOF) were used to analyze lacosamide. The column was XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm). Acetonitrile and ammonium acetate buffer (pH4.5) were used as mobile phase with gradient elution. The total flow was $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flowing into mass spectrum by a joint. **RESULTS** Combined the high resolution mass and MS² fragment ions, the possible structure of four impurities in lacosamide were inferred. **CONCLUSION** It is good reference for the research of the impurities profile in lacosamide.

KEY WORDS: lacosamide; impurity; Q-TOF

拉科酰胺(lacosamide), 化学名: (R)-2-乙酰胺基-N-苄基-3-甲氧基丙酰胺(C₁₃H₁₈N₂O₃), 是由德国 UCB 公司研发的一种新型的功能性氨基酸, 是 NMDA 受体甘氨酸位点结合拮抗剂, 其结构见图 1。2008 年 9 月欧盟批准拉科酰胺片上市, 同年 10 月美国 FDA 批准拉科酰胺片上市, 商品名为 Vimpat[®], 本品目前尚未在我国上市。拉科酰胺用于辅助治疗 17 岁以上癫痫部分性发作患者的疾病发作及缓解糖尿病患者疼痛, 它选择性促进钠通道失活并调节反应介导蛋白 22(CRMP22), 是具有双重作用机制的抗癫痫类药物^[1-4]。

作为一种新型的抗癫痫药物, 国内外有多家制药业企业和研究机构对拉科酰胺及其杂质进行了研究^[5], 但是采用本研究开发的合成路线产生的几个工艺杂质的研究未见报道。本实验采用快速液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(RRLC-QTOF)对拉科酰胺原料药粗品进行分离, 并研究了其中的 2-叔丁酰胺基-N-苄基-3-羟基丙酰胺和 2-叔丁酰胺基-N-苄基-3-甲氧基丙酰胺等 4 个杂质。实验为拉科酰胺合成工艺的改进和提高提供了信息, 有利于拉科酰胺杂质的控制和质量标准的制定。

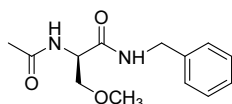


图 1 拉科酰胺结构式

Fig 1 The structure of lacosamide

1 仪器与试剂

Agilent RRLC 液相色谱系统(美国 Agilent 公司), 包括 G1312B 型二元输液泵, G1322A 型脱气机, G1367D 型自动进样器和 G1316A 型柱温箱; Agilent 6530 型四极杆-飞行时间串联质谱仪(美国 Agilent 公司), 配备电喷雾电离源(ESI 源)及 Agilent Mass Hunter 数据采集软件(Version B.02.01)。XS105 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SevenMulti pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); KUDOS 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。拉科酰胺粗品(浙江九洲药业股份有限公司, 批号: LCA-120821, 纯度: 90.6%); 乙腈、甲醇、甲酸均采用美国 Merck 色谱纯, 醋酸铵采用 Fluka 色谱纯, 实验用水由 Millipore 纯水仪(美国, Millipore 公司)制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZOBAX XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 紫外检测波长为 210 nm; 流动相 A 为醋酸铵水溶液(甲酸调 pH 4.5), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱程序为: 0~15 min, 流动相 A 75%→20%, 平衡 5 min。流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用柱后分流, 分流进质谱仪的流速为 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 紫外检测器流速为 $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI 源), 正离子检测;

干燥气温度为 300 ℃；干燥气流速为 8 L·min⁻¹；鞘气温度为 300 ℃；鞘气流速为 10 L·min⁻¹，毛细管电压为 3 500 V；喷雾针气压为 45 psi，skimmer 电压为 45 V，MS² 碰撞能量(CE)为 16 V。

2.3 样品处理

称取拉科酰胺粗品 50 mg 于 50 mL 量瓶中，用乙腈-水(3：7)溶解并定容至刻度，配制溶液得 1 mg·mL⁻¹，取 10 μL 进样进行色谱和 LC-MS/MS 分析。

2.4 色谱分析

取样品溶液 10 μL 进样，按“2.1”项下色谱条件进样分析，据面积归一法得到色谱图见图 2。从图中可见除主峰拉科酰胺外还有 4 个未知杂质峰，分别定义为 Imp- I、Imp- II、Imp-III和 Imp-IV，相关杂质的色谱信息见表 1。实验同时对样品进行质谱信号采集。

2.5 质谱分析

拉科酰胺粗品的一级质谱图见图 3，在一级质谱图得到的 4 个杂质 Imp- I、Imp- II、Imp-III和 Imp-IV分别与色谱图上的杂质一一对应，同时对每

个杂质峰按“2.2”项下条件进行一级离子破碎，得到相应杂质的二级质谱碎片(MS²)离子的精确质量数信息。拉科酰胺和 4 个杂质的保留时间、精确分子量和 MS² 碎片离子精确质量数等信息见表 1。

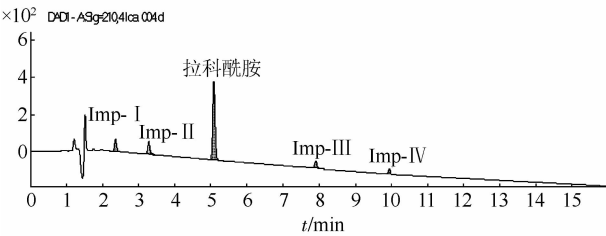


图 2 拉科酰胺原料药粗品液相色谱图
Fig 2 LC-UV chromatography of lacosamide crude sample

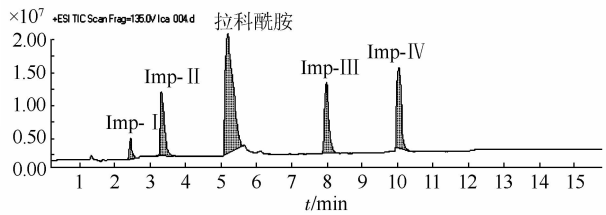


图 3 拉科酰胺粗品的 LC-MS 总离子流图
Fig 3 Total ion chromatography of lacosamide crude sample

表 1 拉科酰胺色谱、一级质谱和二级质谱信息表
Tab 1 Chromatography, MS and MS² profiles of lacosamide

色谱峰	保留时间/min	相对保留时间	精确质量数[M+H] ⁺	MS ² 碎片离子
Imp- I	2.370	0.45	195.108 9	150.090 1, 108.079 0
Imp- II	3.237	0.62	209.128 5	164.105 2, 108.079 4
拉科酰胺	5.221	1.00	251.139 0	209.126 4, 108.079 5
Imp-III	8.002	1.53	295.161 3	195.110 4, 150.090 4, 108.079 4
Imp-IV	10.053	1.93	309.180 9	209.127 0, 164.105 5, 108.079 6

2.6 杂质结构的推断

拉科酰胺分子式为 C₁₃H₁₈N₂O₃，主峰的 [M+H]⁺ 质荷比(m/z)为 251.139 0，其二级质谱为 209.126 4 和 108.079 5，其中 209.126 4 和 108.079 5 分别产生于拉科酰胺结构中 2 处酰胺 C-O 键的断裂，高分辨质谱计算后分子式分别为[C₁₁H₁₇N₂O₂]⁺ 和 [C₇H₁₀N]⁺；m/z 108.079 5 丰度较高是由于 N 的另一端与苄基相连，其在后续的杂质二级谱中都是丰度很高的。

杂质 Imp- I 的一级质谱精确质量数 m/z ([M+H]⁺)为 195.108 9，其二级质谱的碎片离子的精确质量数为 150.090 1 和 108.079 0，由高分辨质谱计算元素组成得分子式为 C₁₀H₁₄N₂O₂，结合杂质 Imp- I 的出峰时间较拉科酰胺快，推测杂质

Imp- I 为拉科酰胺水解后产生的杂质：2-氨基-N-苄基-3-羟基丙酰胺，结构见图 4。

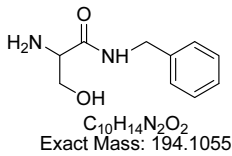


图 4 Imp- I 杂质的结构式
Fig 4 The structure of Imp- I

杂质 Imp- II 一级质谱精确质量数 m/z ([M+H]⁺)为 209.128 5，其二级质谱的碎片离子的精确质量数为 164.105 2 和 108.079 4，由高分辨质谱计算分子式为 C₁₁H₁₆N₂O₂，推测杂质 Imp- II 是拉科酰胺的反应副产物杂质：2-氨基-N-苄基-3-甲氧基丙酰胺，其结构见图 5。

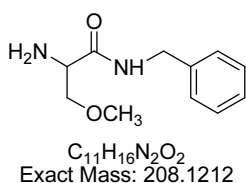


图 5 Imp-II 杂质的结构式

Fig 5 The structure of Imp-II

杂质 Imp-III 一级质谱精确质量数 $m/z([M+H]^+)$ 为 295.161 3, 其二级质谱的碎片离子的精确质量数为 195.110 4, 150.090 4 和 108.079 4, 高分辨质谱计算分子式为 $C_{15}H_{22}N_2O_4$, 由其二级质谱与杂质 Imp-I 的二级谱对比具有很大的相关性, 且将其分子式与拉科酰胺的分子式对比, 结合开发的合成工艺路线, 初步推测其可能是拉科酰胺的中间体 2-叔丁酰胺基-N-苄基-3-羟基丙酰胺。Imp-II 的结构见图 6, 合成路线见图 7。

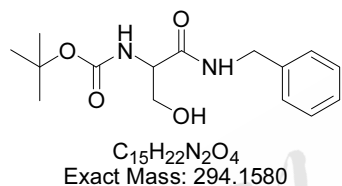


图 6 Imp-III 杂质的结构式

Fig 6 The structure of Imp-III

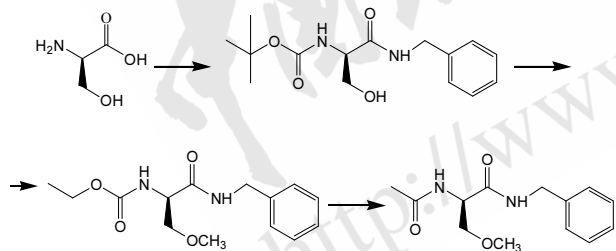


图 7 拉科酰胺合成路线

Fig 7 Synthetic route of lacosamide

杂质 Imp-IV 一级质谱精确质量数 $m/z([M+H]^+)$ 为 309.180 9, 其二级质谱的碎片离子的精确质量数为 209.127 0, 164.105 5 和 108.079 6, 高分辨质谱计算分子式为 $C_{16}H_{24}N_2O_4$, 杂质 Imp-IV 和杂质 Imp-II 的二级质谱图对比, 杂质 Imp-IV 的碎片结构与 Imp-II 相似, 且杂质 Imp-IV 分子式与拉科酰胺对比多一个官能团 “ $-C_3H_6O$ ”, 参考合成工艺路线, 再结合杂质 Imp-II 的推算和色谱上的相对保留时间大于拉科酰胺的结果, 可推测杂质 Imp-IV 是拉科酰胺的反应副产物: 2-叔丁酰胺基-N-苄基-3-甲氧基丙酰胺, 结构式见图 8。

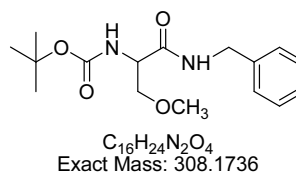


图 8 Imp-IV 杂质的结构

Fig 8 The structure of Imp-IV

3 讨论

本实验通过快速液相色谱串联高分辨质谱分离拉科酰胺粗品, 并推导分析了拉科酰胺粗品中分离的 4 个杂质的可能结构。首先通过高分辨质谱的精确分子量计算出可能的分子式, 通过对主药和杂质同时进行二级质谱碰撞, 得到相似的二级碎片离子, 分析比较二级碎片离子, 计算高分辨质量数, 同时结合化合物的合成路线和色谱性质, 推测可能的杂质结构, 并进行杂质的可能溯源。由于 RRLC-QTOF 联用仪可以提供的信息还是相对较为单一, 4 个杂质结构的完全正确确定还是需要杂质成分的富集或合成, 通过经典的方法获得结构方面的数据(如核磁共振、元素分析、紫外光谱、红外光谱等), 然后解析得到杂质的结构; 或是通过相关杂质标准品对照的方法, 进行结构确证。但是在缺少对照品的情况下或是需要快速推导化合物可能结构时, RRLC-QTOF 联用不失为一种快速、相对准确的检测方法。

本方法 RRLC-QTOF 联用可以使目标成分和杂质组分得到好的分离和确定, 利用高分辨质量数减少可能的杂质分子式, 更快速地推测出杂质结构及从工艺路上进行溯源, 为拉科酰胺原料和制剂的杂质检测和杂质标准品制备提供了很好的指导和参考。

REFERENCES

- [1] RAUCK R L, SHAIKANI A, BITON V, et al. Lacosamide in painful diabetic peripheral neuropathy: a phase 2 double-blind placebo-controlled study [J]. Clin J Pain, 2007, 23(2): 150-158.
- [2] ERRINGTON A C, COYNE L, SELVE N, et al. Seeking a mechanism of action for the novel anticonvulsant lacosamide [J]. Neuropharmacology, 2006, 50(8): 1016-1029.
- [3] ERRINGTON A C, LEES G. The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73(1): 157-169.
- [4] ROGAWSKI M A. Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline [J]. Epilepsy Res, 2006, 69(3): 273-294.
- [5] JIN S Y, YU D H, LI Y. Study on by-products in N-benzyl-2-bromo-3-methoxypropionamide by mixed anhydride methods [J]. Chem World(化学世界), 2013(1): 22-25.

收稿日期: 2013-07-27