

HPLC-IT-TOF MS 快速区分达格列净中间体及其位置异构体

黄 钰^{1,2}, 马 格², 尹欣驰², 张 健¹, 潘远江²

(1. 浙江大学电气工程学院, 浙江 杭州 310027; 2. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310027)

摘要:本研究采用高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法(HPLC-IT-TOF MS)对降糖药达格列净原料药中间体 5-溴-2-氯-4'-乙氧基二苯甲酮(化合物 1)及其异构体 5-溴-2-氯-2'-乙氧基二苯甲酮(化合物 2)进行区分。在不同碰撞能量下,对 $[M+H]^+$ 和碎片离子绘制能量分辨曲线,依据高精度质荷比信息确定碎片离子的元素组成,并提出了可能的碎裂机理。结果表明:两种异构体的能量分辨曲线表现出明显差异,化合物 1 的主要碎片离子为 $[M+H-C_6H_5OC_2H_5]^+$ (m/z 216.90),化合物 2 的主要碎片离子为 $[M+H-C_2H_4O]^+$ (m/z 294.95)。推测原因可能是乙氧基取代位置的不同对质子 H 迁移产生了不同的影响。该方法操作简便、灵敏度高,在没有对照品的情况下也能快速区分位置异构体。

关键词:达格列净;位置异构体区分;高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(HPLC-IT-TOF MS);能量分辨曲线

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2017)04-0443-07

doi:10.7538/zpxb.2017.0043

Rapid Identification of Dapagliflozin Intermediate and Its Isomer by HPLC-IT-TOF MS

HUANG Yu^{1,2}, MA Ge², YIN Xin-chi², ZHANG Jian¹, PAN Yuan-jiang²

(1. College of Electrical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Dapagliflozin is a sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT2) inhibitor for treating type II diabetes. In the process of synthesizing dapagliflozin, 5-bromo-2-chlorophenyl-4'-ethoxydiphenylmethanone (compound 1) is a key intermediate. According to the literatures, there is always by-product 5-bromo-2-chlorophenyl-2'-ethoxydiphenylmethanone (compound 2) in the synthesis procedure of compound 1. Due to the similarities of the two isomers in physical and chemical properties, it's difficult to separate and differentiate compound 1 and 2. As compound 2 affects the purity of dapagliflozin, it is of great importance to establish a method to rapidly distinguish compound 1 from com-

收稿日期:2017-03-14;修回日期:2017-05-10

基金项目:国家自然科学基金项目(21372199)资助

作者简介:黄 钰(1993—),女(汉族),四川自贡人,博士研究生,化学专业。E-mail: huangyu0402@zju.edu.cn

通信作者:张 健(1980—),男(汉族),吉林辽源人,助理研究员,从事可靠性测试、仪器开发。E-mail: jianzhangzju@zju.edu.cn

潘远江(1966—),男(汉族),湖南武陵源人,教授,从事生物活性分子的质谱研究。E-mail: panyuanjiang@zju.edu.cn

pound 2. In this article, high performance liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry (HPLC-IT-TOF MS) method was used to analyze compound 1 and 2. The samples were dissolved in methanol for direct injection. Under the optimized chromatographic conditions, good separation for the two isomers was obtained on a Cap-cell PAK C18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m) with a mobile phase of water (0.1% formic acid) and acetonitrile-methanol (3 : 1, V/V) at a flow rate of 0.6 mL/min. The target compounds were assayed by IT-TOF MS/MS in positive mode with the spray voltage set at 1.77 kV. The nitrogen flow was set at 1.5 L/min, and the capillary temperature was set at 200 $^{\circ}$ C. The collision gas was helium. The ion at m/z 338.97 was chosen as the target to perform MS/MS experiment, and the collision energies were set at 10%, 15%, 20% and 25%, respectively. The MS/MS results under different collision energies were gained simultaneously by setting events in parallel on IT-TOF mass spectrometer. In order to visually distinguish the two isomers, breakdown curves were mapped by $[M+H]^+$ and fragment ions. The breakdown curves of the two isomers show significant differences, which provided strong support in this study. In addition, the element compositions of the three product ions were also confirmed by IT-TOF MS. Loss of C_2H_2 from the precursor ions of $[M+H]^+$ was observed in the MS/MS spectra of both the isomers. For compound 1, the major fragmentation pathway was loss of $C_2H_5OC_6H_5$ from $[M+H]^+$ via a 2-step proton transfer. While, for compound 2, $[M+H-C_2H_4O]^+$ via 1-4 H shift from *ortho*-substituted ethoxy group to the benzene ring was found to be the major product ion. The difference in the fragmentation pathways of the two isomers may be due to the different substitution sites of the ethoxy groups. When the ethoxy group is *ortho*-substituted, the 2-step proton transfer is quite difficult. As a result, it goes through loss of C_2H_4O mainly. The method is simple, effective and accurate, which is suitable for rapidly qualitative and semi-quantitative analysis of the isomers, and also can provide a reliable and effective technique for the quality control of dapagliflozin.

Key words: dapagliflozin; isomer identification; high performance liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry (HPLC-IT-TOF MS); breakdown curve

达格列净(dapagliflozin, ForxigaTM)是由百时美施贵宝和阿斯利康公司联合开发的抗糖尿病药物,用于治疗Ⅱ型糖尿病。该药分别于2012年11月、2014年1月在欧盟和美国上市^[1]。达格列净的作用机制是通过抑制钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)的合成,阻断进曲小管对葡萄糖的重吸收,增加葡萄糖在尿液中的排泄,从而降低血糖^[2-4]。有文献报道,达格列净合成工艺中^[5,6],5-溴-2-氯-4'-乙氧基二苯甲酮(化合物1)是关键中间体,在其合成过程中往往伴随着副产物5-溴-2-氯-2'-乙氧基二苯甲酮(化合物2)的生成^[7]。达格列净及化合物1和2的结构式示于图1。化合物2的存在将直接影响后

续的合成进程,进而影响药物的纯度和质量。但由于化合物1和2互为位置异构体,在分离鉴定上有一定难度。因此,为提高达格列净的用药安全,达到有效控制质量的目的,对化合物1和2进行快速识别和鉴定具有重要意义。

核磁共振^[8]和液质联用^[9-10]是鉴定同分异构体常用的分析手段。其中,核磁共振技术所需的样品量较大,且对纯度要求较高;液质联用技术则兼具高效液相色谱的分离能力和质谱的结构分析能力,具有快速、高效、灵敏等优点,已被广泛应用于同分异构体化合物的研究。

质谱能量分辨曲线是以不同的碰撞能量为横坐标,碎片离子丰度占该能量下该化合物产

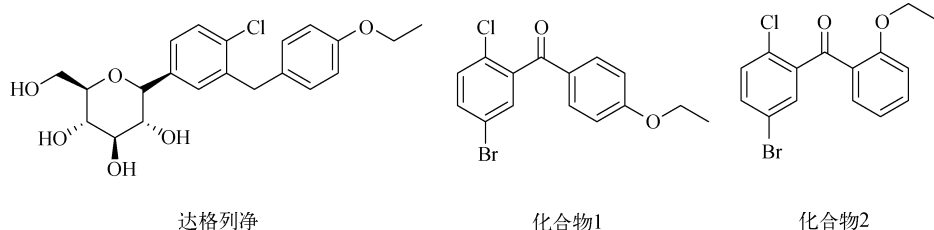


图1 达格列净及化合物1和2的结构式

Fig. 1 Chemical structures of dapagliflozin and compounds 1&2

生的所有离子丰度总和的比值为纵坐标建立的^[11-13]。它能够提供区分异构体的裂解信息,特别是在没有对照品的情况下,可以快速高效地区分异构体^[12-13]。Tai等^[13]利用大气压化学电离串联质谱研究了查尔酮化合物的裂解机理,并通过绘制能量分辨曲线对异构体进行区分。Yin等^[14]利用电喷雾电离串联质谱快速识别了米格列醇及其异构体,其与 benzoboroxole 的反应产物硼酸酯的能量分辨曲线表现出显著差异,可以通过特征碎片离子进行异构体的快速识别。

本工作拟采用 HPLC-IT-TOF MS 技术同时采集不同碰撞能量下的二级质谱数据,绘制能量分辨曲线,快速区分达格列净中间体及其位置异构体。利用精确二级质谱数据和能量分辨曲线,进一步分析二者的质谱裂解行为,对化合物结构进行确证,希望为控制达格列净原料药的质量提供有效途径。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

LC/MS-IT-TOF 质谱仪:日本岛津公司产品,配有电喷雾离子源;Milli-Q 水纯化系统:美国 Millipore 公司产品;HPLC 色谱柱:Capcell PAK C18 柱(250 mm×4.6 mm×5 μm),日本资生堂公司产品;PHS-3B 型 pH 计:上海 INESA 科学仪器有限公司产品。

1.2 材料与试剂

乙腈、甲醇、甲酸:均为色谱纯,美国 Tedia 公司产品;实验用水:Milli-Q 高纯水;三氟乙酸、氢氧化钠:美国 Sigma 公司产品。

三氟乙酸钠聚合物调谐液的制备:分别配制 0.1% 三氟乙酸水溶液和 10 mmol/L 氢氧化钠水溶液,取等体积的上述两种溶液混合均匀,并用氢氧化钠溶液调至 pH 3.5 后,加入等体

积乙腈并混合均匀,即制得标准调谐液。

混合物样品:由本实验室根据文献报道的方法合成^[5];5-溴-2-氯-4'-乙氧基二苯甲酮标准品:阿达马斯试剂公司产品。混合物样品和标准品均需用甲醇溶液稀释后进样。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Capcell PAK C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈-甲醇溶液(3:1, V/V);流速:0.6 mL/min;梯度洗脱程序:0~15.0 min(15%~70%B),15.0~60.0 min(70%~90%B);进样量:2 μL;柱温:40 ℃。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子模式采样;检测电压:1.77 kV;氮气流速:1.5 L/min;曲线脱溶剂管(CDL)温度:200 ℃;氮气流速压力:100 kPa;离子累计时间:50 ms;碰撞气体:高纯氦气;二级质谱碰撞能量:10%、15%、20%、25%;一级质谱采集质荷比范围: m/z 150~450;二级质谱采集质荷比范围: m/z 94~400,前体离子设定为 m/z 338.97;高分辨质量校正:采用三氟乙酸钠聚合物。

2 结果与讨论

2.1 混合物样品的 HPLC-IT-TOF MS 结果分析

化合物 1 和 2 互为位置异构体,由于其理化性质相似,通常很难将二者有效分离。本实验通过条件优化,最终确定以 0.1% 甲酸水溶液为 A 相,乙腈-甲醇溶液(3:1, V/V)为 B 相进行梯度洗脱。在该实验条件下,混合物的色谱图和总离子流图示于图 2。色谱峰的峰形和强度较好,目标化合物在 43.86 min 开始出峰,峰 A 和峰 B 的保留时间分别为 44.42 min 和 45.23 min,峰基有一定的重叠,但裸露的峰面积足够用于高灵敏度的质谱分析。

色谱峰 A 和峰 B 对应的二级质谱图示于图 3,二者的质谱图具有显著差异。图 3a 中碎片离子 m/z 294.951 8 丰度最高, m/z 216.909 8 丰度最低;图 3b 中碎片离子 m/z 216.903 9 丰度最高,没有出现碎片离子 m/z 294.95。因此,可以将这两个碎片离子作为区分这对位置

异构体的特征碎片离子。

2.2 对照实验

为了归属图 2a 中色谱峰 A 和峰 B,将化合物 1 的标准品在正离子模式下进行二级质谱解析,并在不同的碰撞能量下绘制能量分辨曲线,结果示于图4。可以发现,峰A和峰B的能量分

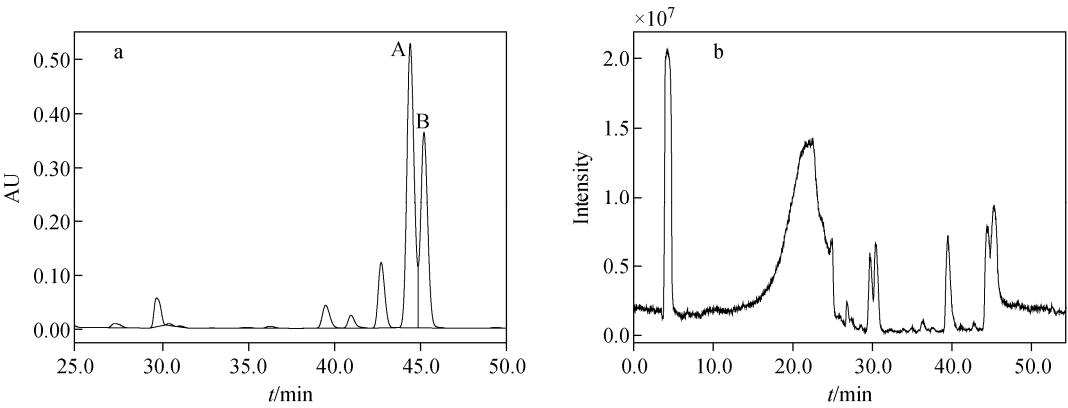


图 2 混合物样品的色谱图(a)和总离子流图(b)

Fig. 2 Chromatogram (a) and total ion chromatogram (b) of the mixture sample

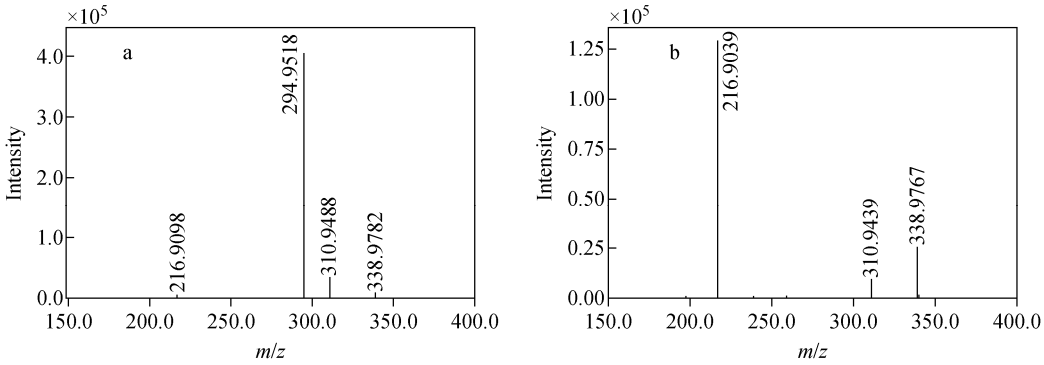


图 3 色谱峰 A(a)和 B(b)在 15%碰撞能量下的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrums of chromatographic peak A (a) and peak B (b) under 15% collision energy

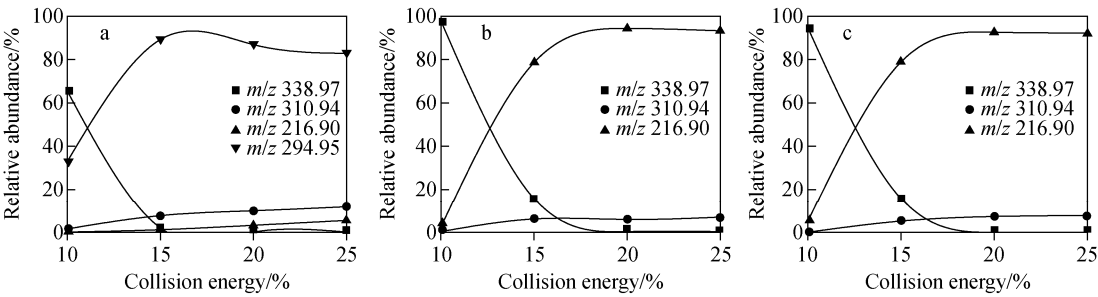


图 4 色谱峰 A(a)、峰 B(b)和化合物 1 标准品(c)的能量分辨曲线

Fig. 4 Breakdown curves of peak A (a), peak B (b) and standard compound 1 (c)

辨曲线表现出显著差异。随着碰撞能量增大,峰 A 的 $[M+H]^+$ 离子及 m/z 294. 95 碎片离子丰度变化趋势较大,而峰 B 和化合物 1 标准品的 $[M+H]^+$ 离子及 m/z 216. 90 碎片离子丰度变化趋势较大。能量分辨曲线直观地体现了峰 A 和峰 B 所对应的这对位置异构体质谱裂解行为存在差异,峰 B 和化合物 1 标准品质谱裂解行为一致。进而判定峰 A 和峰 B 分别对应化合物 2 和 1。

2.3 碎裂机理分析

化合物 1 和 2 结构的区别在于苯环上乙氧基的取代位置。二者的高分辨质谱数据列于表 1。化合物 1 主要产生 2 种碎片离子 a 和 c,化合物 2 主要产生 3 种碎片离子 a、b 和 c。化合物 1 的乙氧基在苯环上为对位取代,此时主要发生乙氧基苯的中性丢失(ion c),而当乙氧基为邻位取代(化

合物 2)时,主要丢失 C_2H_4O (ion b)。质子化的化合物 1 和 2 可能的碎裂途径示于图 5。

推测化合物可能的碎裂机理,碎片离子 a 为乙氧基上甲基 H 迁移至 O 原子发生乙烯的中性丢失而产生;碎片离子 b 由乙氧基上的甲基 H 发生 1-4H 迁移到苯环上中性丢失环氧乙烷(C_2H_4O)产生;碎片离子 c 的形成过程中,质子 H 首先发生 1-4H 迁移至苯环邻位,然后进行 1-2H 迁移丢失乙氧基苯。因此,当乙氧基为邻位取代时,由于位阻效应,质子 H 发生 1-4H 迁移难度增加,难以产生 c 离子。由于 b、c 两种碎裂途径的竞争,化合物 1 主要产生 c 离子,化合物 2 主要产生 b 离子。在两种位置异构体中,a 离子丰度无明显差异。 $[M+H]^+$ 离子可能的碎裂机理示于图 6。

表 1 质子化的化合物 1 和 2 碎片离子的 IT-TOF MS/MS 数据

Table 1 Experimental data for the product ions of compounds 1&2 by IT-TOF MS/MS

化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	离子 Ions	实验值 Experiment values (m/z)	理论值 Theoretical values (m/z)	元素组成 Elemental compositions	误差 Errors/ mmu
1	45. 23	$[M+H]^+$	338. 9767	338. 9782	$C_{15}H_{12}O_2ClBr$	-4. 43
		a	310. 9439	310. 9469	$C_{13}H_8O_2ClBr$	-9. 65
		c	216. 9039	216. 9050	C_7H_3OClBr	-5. 07
2	44. 42	$[M+H]^+$	338. 9782	338. 9782	$C_{15}H_{13}O_2ClBr$	0
		a	310. 9488	310. 9469	$C_{13}H_9O_2ClBr$	6. 11
		b	294. 9518	294. 9520	$C_{13}H_9OClBr$	-0. 68
		c	216. 9098	216. 9050	C_7H_3OClBr	22. 13

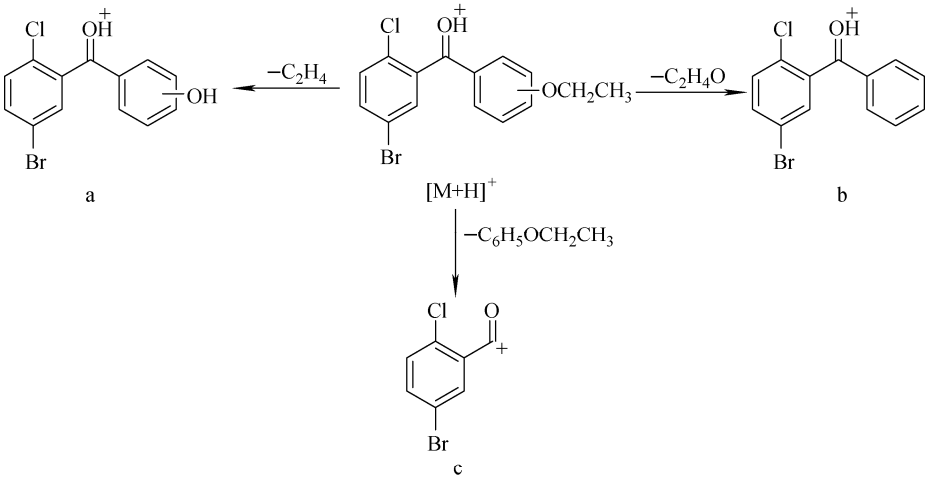


图 5 质子化的化合物 1 和 2 可能的碎裂途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathway of protonated compounds 1&2

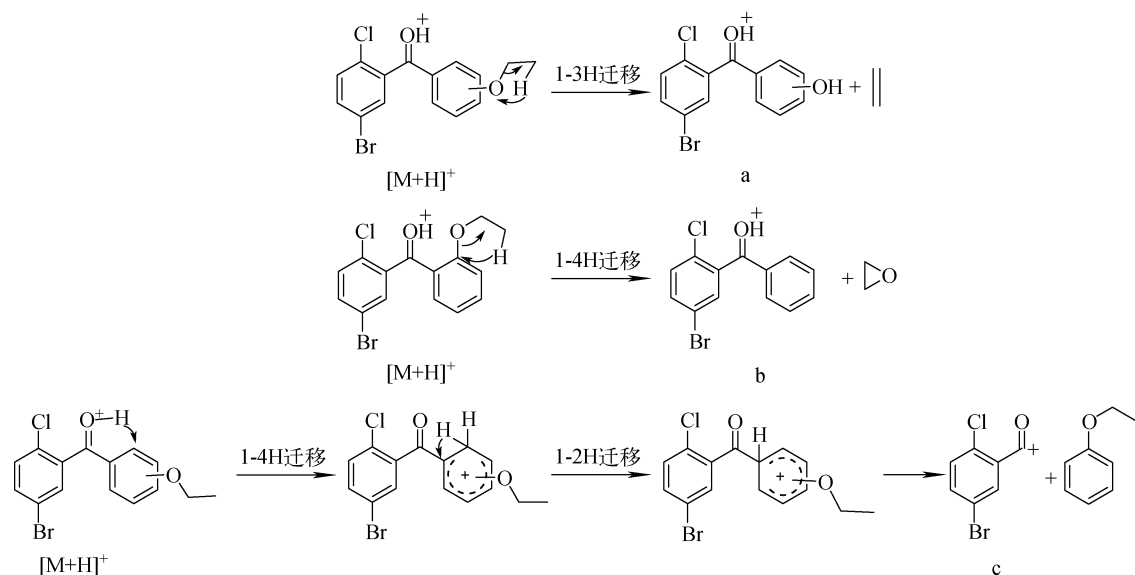


图 6 $[M+H]^+$ 离子可能的碎裂机理

Fig. 6 Proposed fragmentation mechanism of $[M+H]^+$ ions

3 结论

本实验采用 HPLC-IT-TOF MS 法快速、高效地区分了降糖药达格列净中间体(化合物 1)及其位置异构体(化合物 2)。化合物 1 和 2 的能量分辨曲线具有显著差异,这是因为乙氧基取代位置不同,对质子 H 的迁移造成不同的影响,导致了异构体裂解行为的差异。当乙氧基为邻位取代时,由于位阻效应使得碎片离子 c 不容易形成。该方法操作简便、快速高效,能够同时获得化合物的色谱和质谱信息,可对化合物进行快速的定性鉴别和半定量分析,为控制达格列净原料药的质量提供了方法参考。

参考文献:

- [1] 石卫峰,李晓宇,刘皋林. 治疗 2 型糖尿病新药达格列净[J]. 中国新药杂志,2013,22(16):1 861-1 863.
SHI Weifeng, LI Xiaoyu, LIU Gaolin. Dapagliflozin, a new anti-hyperglycemic agent for type 2 diabetes[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2013, 22(16): 1 861-1 863(in Chinese).
- [2] CHAO E C, HENRY R R. SGLT2 inhibition-a novel strategy for diabetes treatment[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(7): 551-559.
- [3] HAN S P, HAGAN D L, TAYLOR J R, et al. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1 723-1 729.

- [4] WEI M, ELLSWORTH B A, NIRSCHE A A, et al. Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2(SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51(5): 1 145-1 149.
- [5] 禹艳坤,冀亚飞. 达格列净的合成[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(2):84-87.
YU Yankun, JI Yafei. Synthesis of dapagliflozin[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2011, 42(2): 84-87(in Chinese).
- [6] 张帅阳,徐斌,王德才. 达格列净合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志,2014,45(12):1 192-1 194.
ZHANG Shuaiyang, XU Bin, WANG Decai. Graphical synthetic routes of dapagliflozin[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2014, 45(12): 1 192-1 194(in Chinese).
- [7] 王彪,曹胜,杜月,等. 降糖药达格列净中 2 种杂质的合成[J]. 精细化工中间体,2016,46(3):24-27.
WANG Biao, CAO Sheng, DU Yue, et al. Synthesis of two impurities in dapagliflozin[J]. Fine Chemical Intermediates, 2016, 46(3): 24-27(in Chinese).
- [8] 施燕红,刘松柏,宋国强. 利用 NMR 测定盐酸头孢吡肟中杂质的含量[J]. 波谱学杂志,2003,20

- (3):259-264.
- SHI Yanhong, LIU Songbin, SONG Guoqiang. Measurement of the percentage of impurity in cefepime dihydrochloride by NMR[J]. Chinese Journal of Magnetic Resonance, 2003, 20(3): 259-264(in Chinese).
- [9] ABLAJAN K. A study of characteristic fragmentation of isoflavonoids by using negative ion ESI-MS⁺[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2011, 46(1): 77-84.
- [10] OHASHI Y, KUBOTA M, HATASE H. Studies on ESI-MS/MS of a glycosaminoglycan disaccharide *N*-acetylactosamine-6,6'-disulfate disodium salt-charge-localization isomers[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2012, 312: 179-184.
- [11] 李敏,王秀娟,陈娟娟,等. 质谱能量分辨曲线法区分氧化脂类前列腺素异构体[J]. 药物分析杂志,2014,34(7):1 161-1 169.
- LI Min, WANG Xiujuan, CHEN Juanjuan, et al. Identification of the oxylipins prostaglandin by mass spectrometry using breakdown curves [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(7): 1 161-1 169(in Chinese).
- [12] KUURANNE T, VAHERMO M, LEINOEN A, et al. Electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric behavior of eight anabolic steroid glucuronides [J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000, 11(8): 722-730.
- [13] TAI Y P, PEI S F, PAN Y J, et al. Fragmentation study of protonated chalcones by atmospheric pressure chemical ionization and tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(6): 994-1 000.
- [14] YIN Q H, WANG L, SUN C R. Rapid identification of miglitol and its isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2016, 30(1): 155-161.