

SCIEX 2D-LC-MS系统用于两性霉素B中杂质分析

The Application of 2D-LC-MS System in the Analysis of Drug Impurities in Amphotericin B

冷向阳, 龙志敏, 郭立海

Leng Xiangyang, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Keywords: 2D-LC-MS System; Drug impurities; Amphotericin B

引言

二维液相色谱技术(2D-LC)是将分离机制不同而又相互独立的两支色谱柱串联构成的分离系统, 利用切换阀实现柱切换的技术。2D-LC可以实现多种工作方式, 如捕集(On-line SPE)、中心切割、平行色谱柱再生以及全二维分析等。被广泛的应用到药物分析(杂质分析、DMPK等)、中药分析等多个领域。

在药物的有关物质分析中, 药典中的方法多为LC方法, 往往会在流动相中使用磷酸盐缓冲试剂、离子对试剂等来改善色谱峰形和分离度, 但这些非挥发盐和离子对试剂大大限制了LC-MS/MS法在杂质分析中应用, 它们会对质谱造成污染。所以要使用质谱对杂质进行定性分析时, 需要将非挥发性缓冲盐体系置换成挥发性的添加剂, 但这样的置换可能会造成杂质的保留时间变化, 从而无法对杂质进行定位。2D-LC可以有效消除流动相对质谱的限制, 利用中心切割方式, 一维仍使用磷酸盐或离子对试剂等质谱不兼容流动相, 可以将一维中感兴趣的峰切入到二维质谱体系, 二维使用质谱兼容型流动相, 实现质谱不兼容体系中感兴趣组分的定性鉴定。

本文使用了2D-LC-MS系统用方法对两性霉素B中杂质分析的主要杂质进行分析, 无需将含有非挥发性缓冲盐体系的流动相变为质谱兼容的流动相体系, 同时结合OS软件快速的数据处理方式, 可以有效的、更好的帮助实现药物中杂质分析。

本文中使用的2D-LC系统是利用岛津LC40搭建的, 可以与SCIEX TripleTOF™系统和QTRAP®系统兼容, SCIEX OS软件与Analyst™软件即可直接控制, 无需使用额外软件进行控制。

2D-LC流程与示意图:

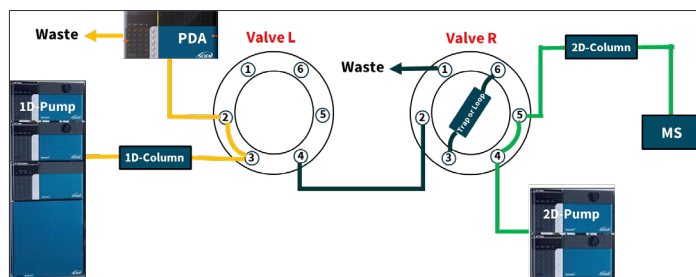


图1. Step1: 一维液相在分离分析; 二维液相在平衡色谱柱

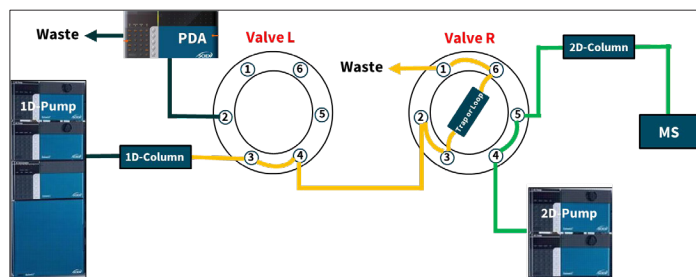


图2. Step2: 将一维中目标组分切入进定量换或者Trap柱上

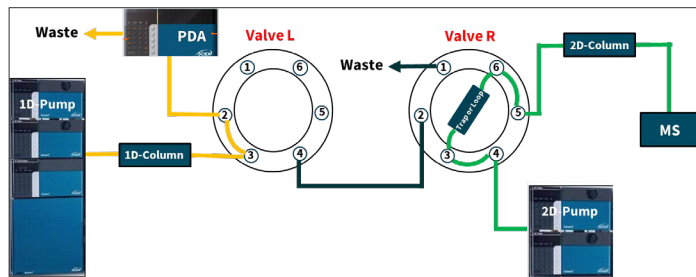


图3. Step3: 将捕获的目标组分在二维色谱柱上进行分离

实验思路

1. 根据样品的UV图确定样品中目标杂质的出峰位置
2. 使用2D-LC，采用中心切割方式，将目标杂质切入第二维液相进行检测
3. 经LC-MSMS分析，找到杂质峰，并确认m/z
4. 根据采集到目标杂质二级谱图，确认杂质结构

实验条件

LC系统配置

- LC-40D X3 泵 (4个)
- SIL-40C X3 进样器 (1个)
- SCL-40 控制器 (1个)
- CTO-40C 柱温箱 (1个)
- SPD-M40 检测器 (1个)

液相方法

一维色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150mm, 5 μm)
 流动相: A: 甲醇:乙腈:0.1%磷酸二氢钾=1:3:7
 B: 甲醇:乙腈:0.1%磷酸二氢钾=12:68:20

流速: 0.6 ml/min

柱温: 30°C;

检测波长: 386 nm

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
3.0	90	10
25.0	40	60
26.0	40	60
26.1	90	10
30.0	90	10

二维色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5 (100 × 3mm, 2.6 μm)

流动相: A: 水; B: 甲醇

流速: 0.55 ml/min

柱温: 30°C;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
18.0	90	10
19.0	90	10
24.0	10	90
25.0	10	90
25.1	90	10
30.0	90	10

质谱方法

离子源: ESI源, 负离子模式

离子源参数:

电喷雾电压IS: -4500 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 55 psi

辅助加热气 GS2: 55 psi

碰撞气 CAD: 8

源温度 TEM: 550°C

实验结果

2D-LC-X500系统测试结果

1. 二维液相分析结果

根据一维液相的分析结果确认杂质出峰时间，通过在液相方法中设置阀的切换时间，将RT为17.2min杂质切入到第二维色谱柱中进行分析；从XIC质谱图，找到一系列一级离子，排除空白溶剂中的干扰离子，从而确定可能杂质，结果见图4。

2. 杂质解析

根据精确分子量和同位素丰度比，通过OS软件里面的Formula Finder，自动计算分子式，列出可能的分子式（图5），同时可以

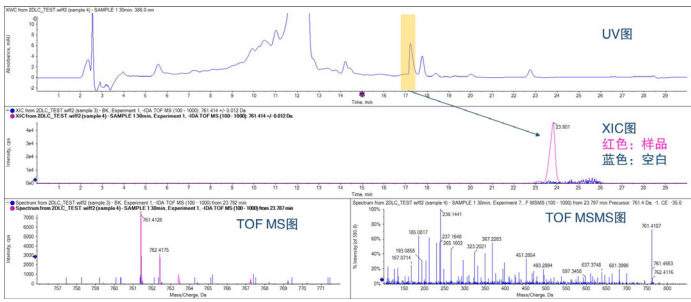


图4. 杂质进入质谱后得到的XIC图、TOF MS图及TOF MSMS图

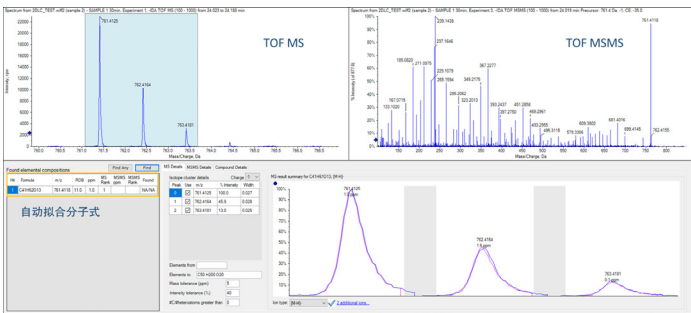


图5. 使用Formula Finder自动计算分子式

结合二级质谱精确质量数及元素组成进一步确认母离子元素组成 (图6), 推测可能的分子式为; 根据主成分二级碎裂方式 (图7), 推测其可能结构, 通过OS软件中Fragment pane结合相应的二级谱图进行结构解析 (图8), 确认其可能结构。即可完成快速杂质确认工作。

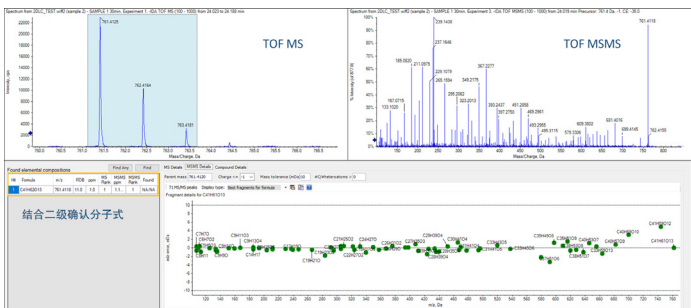


图6. 结合二级进一步确认分子式

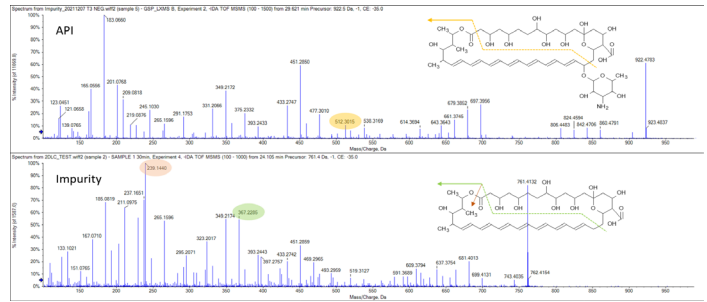


图7. 结合主成分二级推测杂质可能结构

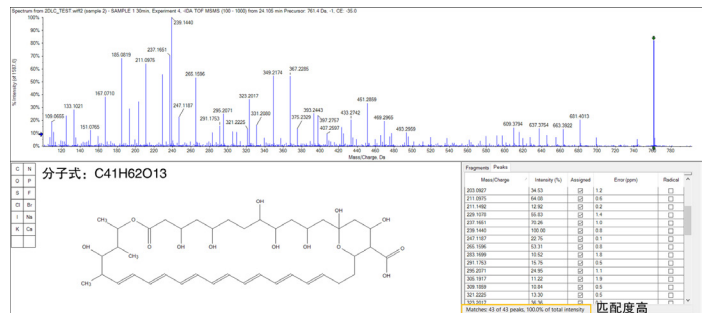


图8. 利用Fragment pane功能进行结构确认

2D-LC-QTRAP系统测试结果

结合2D-LC, 并利用SCIEX QTRAP®四极杆-线性离子阱复合质谱系统具有特有的信息相关采集模式 (IDA) 和智能化的DBS功能触发EPI 图谱采集的方式, 确保能够获得高质量的二级图谱, 帮助实现杂质分析, 结果见图9。

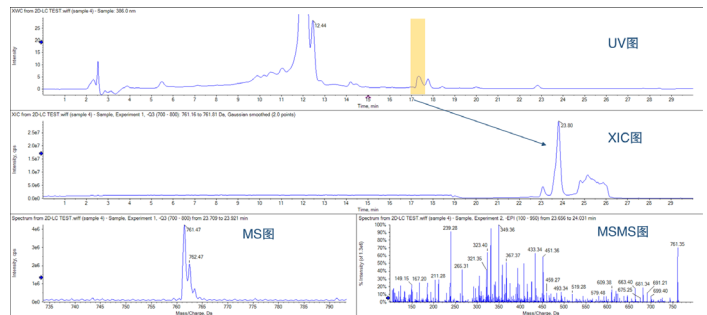


图9. 利用QTRAP®质谱完成杂质分析

总结

本文使用了2D-LC-MS系统用方法对两性霉素B中杂质分析，无需将含有非挥发性缓冲盐体系的流动相变为质谱兼容的流动相体系，可有效解决前端液相色谱分离必须使用非挥发盐流动相系统与后端采用质谱检测器的兼容性问题，节省了工作人员在杂质检测和分析中重新方法开发液相方法的时间。利用岛津LC40搭建的2D-LC，可以与SCIEX Q-TOF系统和QTRAP®系统兼容，OS软件与Analyst软件即可直接控制，无需使用额外软件进行控制，同时利用OS软件快速的数据处理功能，可有效方便的完成杂质定性工作。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15235-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)