

2D-LC-QTRAP在药物杂质分析中的应用

The application of 2D-LC-QTRAP in the analysis of drug impurities

冷向阳 (Leng Xiangyang), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)
SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国 (SCIEX, APAC Support Center, China)

Key Words: 2D-LC-QTRAP, drug impurities

前言

药物在合成、配置或者储存过程中可能会形成某些中间体、反应产物或降解物, 这些有关物质可能会对我们的用药安全产生极大影响, 因此对这些有关杂质的检测和鉴定是药品质量控制中的重要内容。

目前在各国的药典中, 很多药物的有关物质分析是采用的是LC-UV的方法, 为了杂质具有更好的色谱峰形和分离度, 在流动相中往往会使用磷酸盐缓冲试剂、离子对试剂等非挥发性缓冲盐。

随着质谱技术 (MS) 的普及, LC-MS的方法越来越多的用于药物的杂质分析, 然而流动相中的非挥发性盐类会大大降低质谱的灵敏度并对质谱仪造成污染, 这给方法转移带来了很大的困难。使用质谱对杂质进行定性分析时, 通常需要将非挥发性缓冲盐体系置换成挥发性的添加剂, 有时将原有方法中质谱不兼容的添加剂替换, 可能造成杂质的保留时间变化, 从而无法对杂质进行定位。

针对这个问题, 本文建立了2D-LC-Qtrap联用的方法, 采用QTRAP[®]质谱系统对目标杂质进行分析, 同时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。大大节省了工作人员重新进行方法开发的时间, 并且保证了杂质定性的准确度。本文采用基于阀切换的2D-LC技术与QTRAP[®]质谱技术的联用方法, 实现一针进样同时对西罗莫司的几个主要杂质进行鉴定。

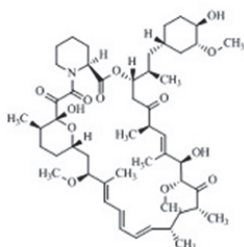


图1. 西罗莫司的结构 (NW: 913.5, 分子式: C₅₁H₇₉NO₁₃)。

2D-LC原理与流路示意图

原理: 一维液相使用原始液相色谱流动相 (如非挥发性流动相) 及方法对母药和杂质进行分离。当目标杂质组分出峰时, 通过阀切换将目标杂质准确切割并捕获后, 第二维液相将捕获的组分洗脱进行质谱检测。

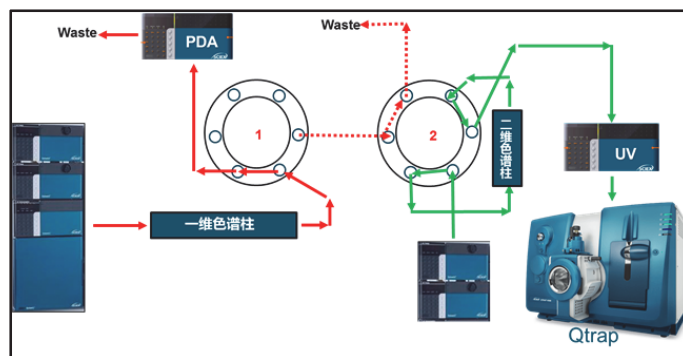


图2. Step1: 一维液相在分离分析; 二维液相在平衡色谱柱。

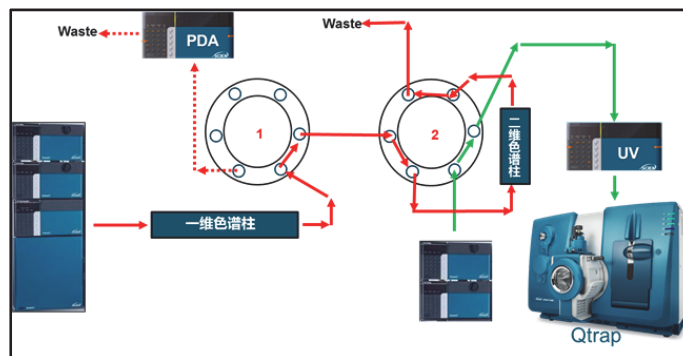


图3. Step2: 将一维中目标组分切入进二维色谱柱上。

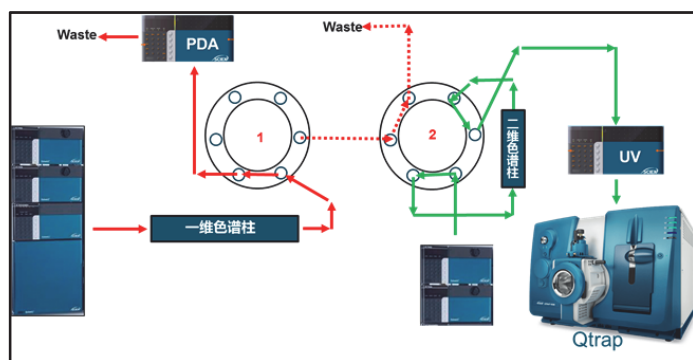


图4. Step3: 将捕获的目标组分在二维色谱柱上进行分离。

注: 红色代表一维液体流向, 绿色代表二维液体流向, 虚线代表有流路连接但无液体。

实验思路

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, 从而帮助实现杂质分析。在杂质分析过程中, 根据一维色谱采集到的紫外信号对想要分析的目标杂质进行定位, 结合2D-LC的阀切换技术将目标杂质切到第二维色谱柱上进行质谱分析, 得到目标杂质母离子的m/z和相应的二级质谱图, 与母药的二级碎裂方式进行比较从而实现结构解析。

实验条件

液相方法

一维液相色谱条件:

流动相: A: 水 (含2 mM磷酸二氢钠)

B: 甲醇:乙腈=70:15

等度洗脱: A:B=20:80

流速: 1 mL/min

柱温: 40°C

色谱柱: Eclipse XDB-C18, 150 × 4.6 mm, 5 μm;

二维液相色谱条件:

流动相: A: 水; B: 甲醇

流速: 0.6 mL/min

柱温: 40°C

色谱柱: Venusil MP C18, 100 × 2.1 mm, 5 μm;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	60	40
5.00	60	40
7.00	5	95
14.00	5	95
14.10	60	40
18.00	60	40

质谱方法

离子源: ESI源, 负离子模式; Q3-IDA-EPI采集模式

离子源参数:

IS电压: -4500V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 60 psi

碰撞气 CAD: 8

源温度 TEM: 350°C

辅助加热气 GS2: 60psi

实验结果

1. 一维液相分析结果

一维液相的分析的主要目的是确定目标杂质的保留时间 (其中RT为4.63 min和8.80 min为目标杂质), 以便将其准确切入到第二维色谱柱上进行分析, 结果见图5。

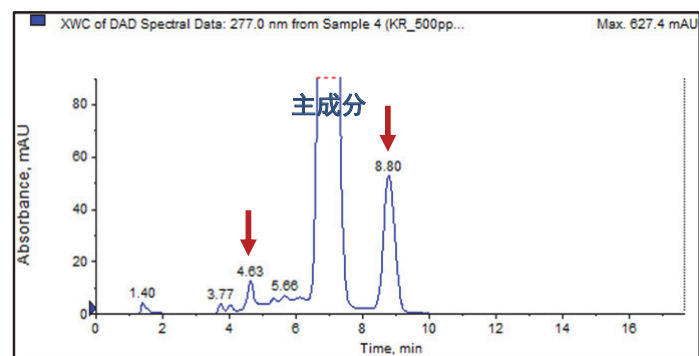


图5. 一维液相DAD图。

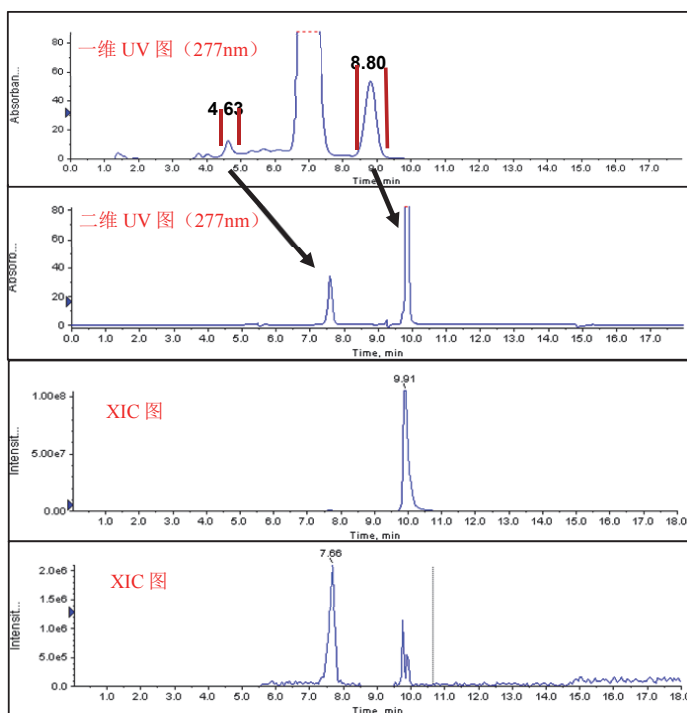


图6. 从上到下依次为一维紫外图 (277 nm) ; 目标杂质切入到二维后的紫外色谱图; RT为4.63 min杂质切入二维后的XIC图; RT为8.80 min杂质切入二维后的XIC图。

2. 二维液相分析结果

根据一维液相的UV色谱结果, 确定了目标杂质的保留时间, 通过在液相方法中设置阀的切换时间, 将RT为4.63 min和8.80 min的两个杂质依次切入到第二维色谱柱中, 二维液相中的挥发性流动相依次将目标杂质冲入质谱中进行分析, 目标杂质在进行质谱分析前, 先经过第二维液相中的紫外检测器进行定位分析, 从而确保杂质定性的准确性, 结果见图6。Qtrap质谱采用Q3-IDA-EPI的采集方式同时得到目标化合物的一级和二级质谱图, 结合母药的二级碎裂方式 (图7), 从而实现目标杂质的结构解析, 确定其

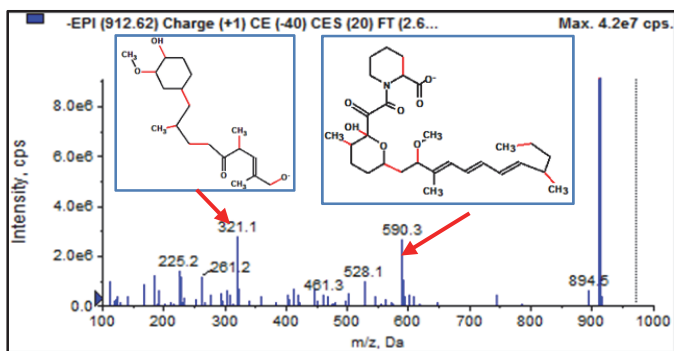


图7. 西罗莫司的二级质谱图。

可能的结构; 从MS质谱图中看出RT为4.63 min和RT为8.80 min的杂质的m/z分别为928.5和912.5, 结合相应的二级谱图, 推测杂质分别为西罗莫司的氧化结构 (分子式: $C_{51}H_{80}NO_{14}$) 和西罗莫司的异构体 (分子式: $C_{51}H_{79}NO_{13}$), 结果见图8和图9。

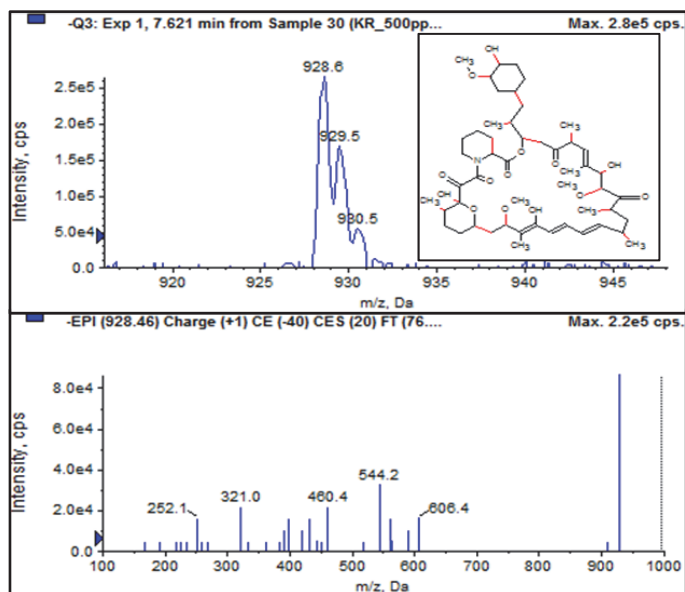


图8. RT为4.63 min杂质的一级和二级质谱图及可能结构。

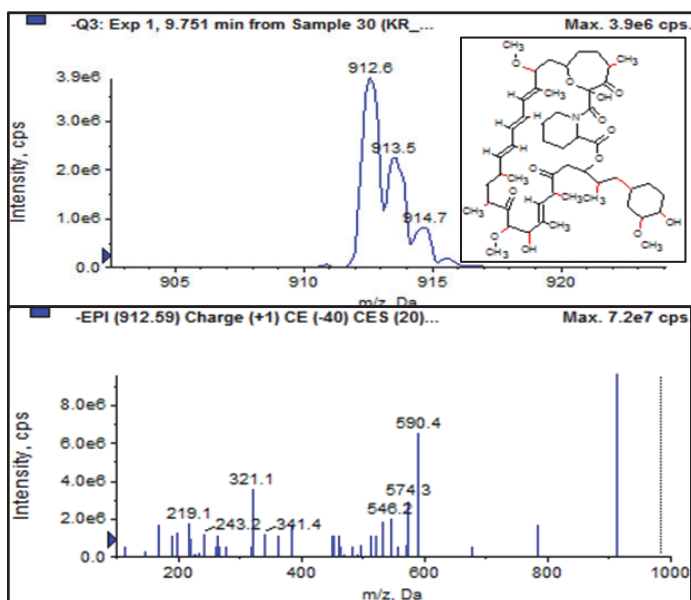


图9. RT为8.80 min杂质的一级和二级质谱图及可能结构。

总结

本文建立的基于阀切换的2D-LC技术与QTRAP® 质谱技术的联用方法，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，同时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，实现了一次进样分析，同时获得杂质的一级质谱和高质量的二级质谱信息，避免了二次采集，减少了分析时间，使得药物杂质鉴定变的简单、方便、准确。

Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2018 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8667-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX