

2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测盐酸倍他司汀药物杂质

LCMS-IT-TOF-040

摘要：本文建立了使用 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测盐酸倍他司汀药物中未知杂质的方法。该方法使用非挥发性的离子对试剂（十二烷基硫酸钠）作为流动相对盐酸倍他司汀主成分和杂质进行了分离，并通过 LCMS-IT-TOF 在线对目标杂质进行 MS 定性分析。该系统由于无需转换分析所用流动相，因此，可以将药典的方法直接使用，大大节省了方法开发人员的时间，并且保证了杂质定性的准确度。

关键词：盐酸倍他司汀杂质离子对试剂 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统

目前，根据药典的规定和分离的要求，在进行许多药品分析时，需要在流动相中加入非挥发性缓冲盐（如磷酸盐、柠檬酸盐等）或离子对试剂。但是这些非挥发性盐，不能进入质谱，这在极大程度上影响了质谱作为定性工具在药品杂质鉴定上的使用。在 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统使用之前，研究机构和药厂通过方法转换（如将磷酸盐转换成挥发性缓冲盐）来实现质谱鉴定，但这是个费时费力的工程，并且有可能因为保留时间的改变而丢掉一些未知杂质。且如果流动相中含有离子对

试剂，则可能导致质谱灵敏度降低，故不适用于质谱分析。2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统突破了这些局限，用户即使使用非挥发性缓冲盐或离子对试剂，也可以在线使用 IT-TOF 进行杂质鉴定。本文使用 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测了盐酸倍他司汀片加热处理后样品中的未知杂质，流动相中使用了离子对试剂（十二烷基硫酸钠）以将盐酸倍他司汀与杂质分离。供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

分析仪器：2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统，包括 LC-20AD×4（输液泵），SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），DGU-20A₅（在线脱气机），SPD-M20A（二极管阵列检测器），SPD-20A（UV 检测器），FCV-12AH×3（高压流路选择阀），FCV-14AH×2（色谱柱切换阀），LCMS-IT-TOF（离子阱-飞行时间质谱）和 LCMSsolution Ver.3.60（工作站）。

1.2 分析条件

1.2.1 液相色谱条件

<LC 1stD>

色谱柱：Shim-pack VP-ODS, 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm

流动相：0.69 g 醋酸铵溶解于 1000 mL 水中，用冰醋酸调 pH 到 4.7，加入 4.43 g 十二烷基硫酸钠，混合均匀，过滤后取 600 mL 与 400 mL 乙腈混匀即得。

时间程序：7 %B (0 ~ 40 min) ~ 40 %B (40 ~ 80 min) ~ 7 %B (10.01 ~ 95 min)

流速：1 mL/min

柱温：40°C

进样体积：20 μL

检测波长：190 ~ 800 nm（检测：259 nm）

<LC 2ndD>

色谱柱：Shim-pack XR-ODS 2.0mm I.D.×50mm, 2.2μm

流动相 A：0.1 % 甲酸

流动相 B：乙腈

时间程序：10 %B (0min) ~ 60 %B (5min) ~ 95 %B (6~16 min)~10 %B (16.10 ~ 25min)

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样体积：5 μL（Loop 环体积）

检测波长：259 nm

1.2.2 质谱条件

分析仪器：LCMS-IT-TOF

离子源：ESI(+), ESI(-)

离子源接口电压：ESI(+), 4.5kV;

ESI(-), -3.5kV;

检测器电压：1.7 kV

雾化气：氮气 1.5 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200℃

加热模块温度：200℃

质量数范围：m/z 50 ~ 150, m/z 150 ~ 500

1.3 系统流路图

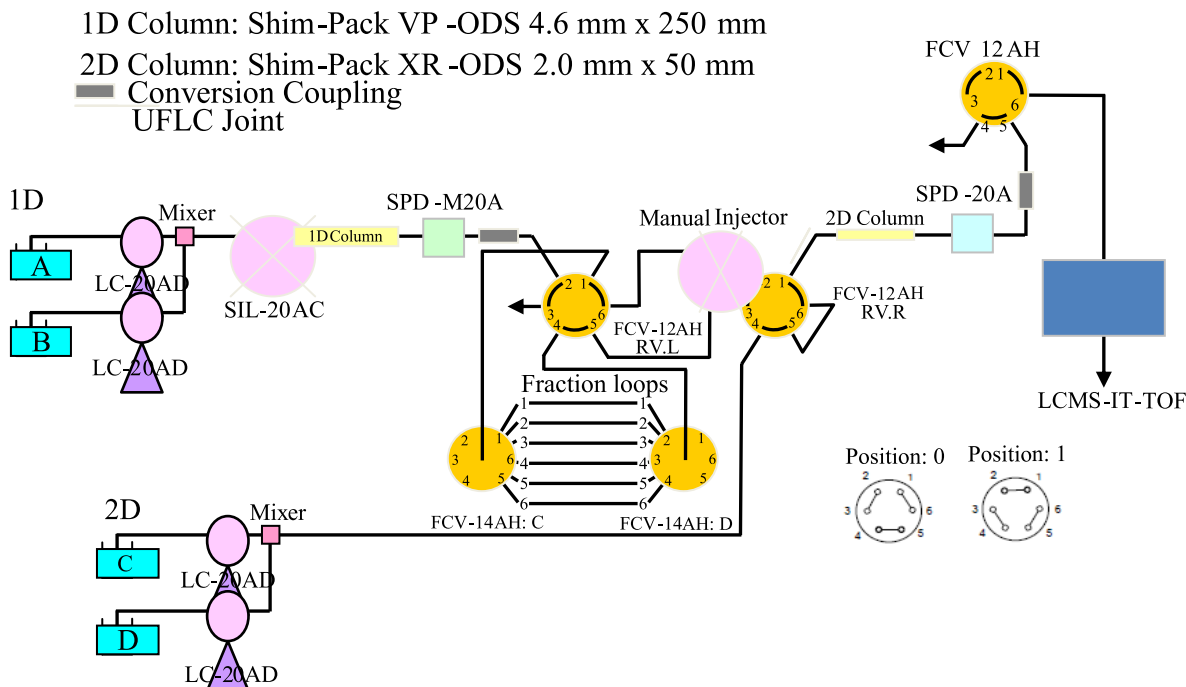
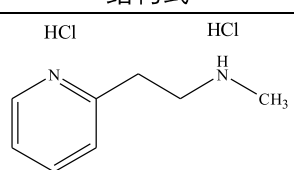


图1 2D-LC-IT-TOF 的系统流路图

1.4 样品制备

将盐酸倍他司汀片于 105℃加热 4 小时后碾磨成粉末，称取 0.15 g，加 10 mL 流动相超声溶解 10 min，离心 10 min，滤膜过滤后进样分析。

主成分盐酸倍他司汀信息如下：

成分	中文名称	英文名称	分子式	分子量	CAS No.	结构式
主成分	盐酸倍他司汀	Betahistine dihydrochloride	$C_8H_{12}N_2 \cdot 2HCl$	209.12	5579-84-0	

结果讨论

2.1 LC 1stD 分析结果

1stD 分析的主要目的为确定目标杂质的保留时间，以便于捕集到 LOOP 环中，用于二维脱盐分析。本次实验 1stD 色谱图如下，客户关注的未知杂质和主成分的出峰时间分别为：7.244 min 和 10.460 min。

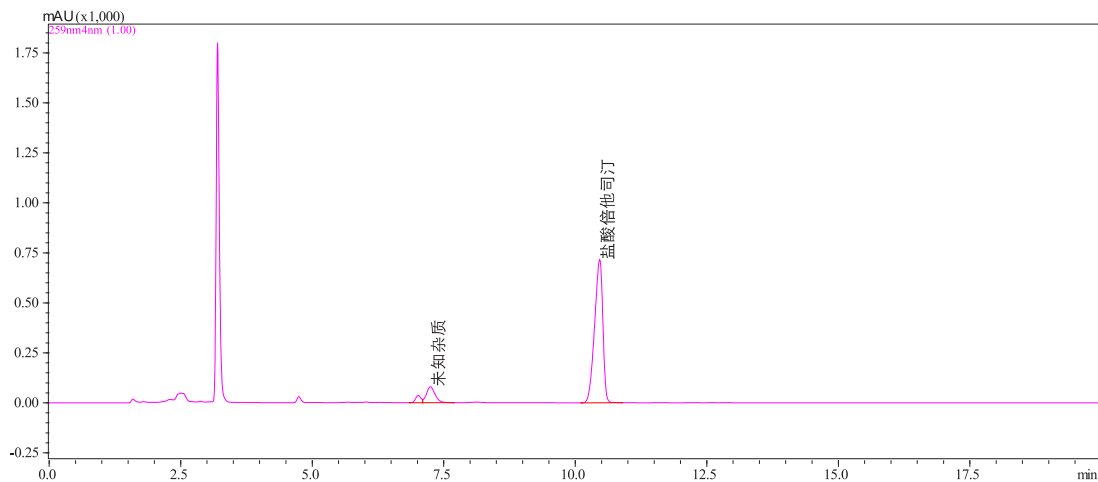


图 2. LC 1stD 分析色谱图

2.2 LC 2ndD 分析结果

将未知杂质 (R.T. = 7.244 min) 切换到 LOOP 环 1 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图和 MS 色谱图和质谱图如下:

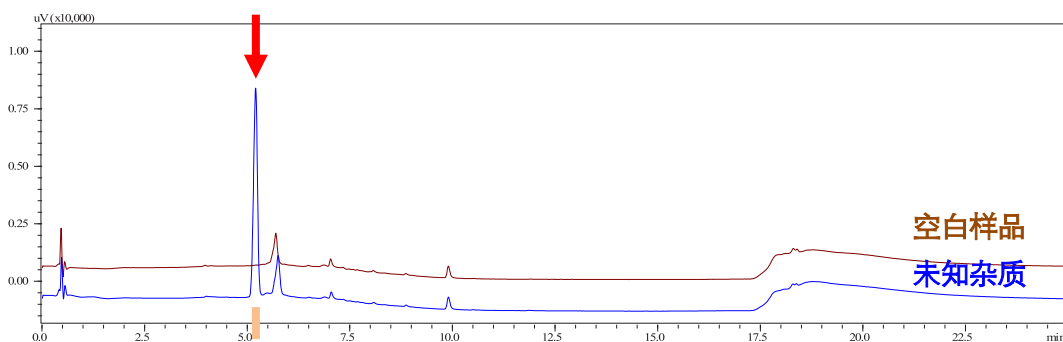


图 3. 未知杂质二维 UV 色谱图

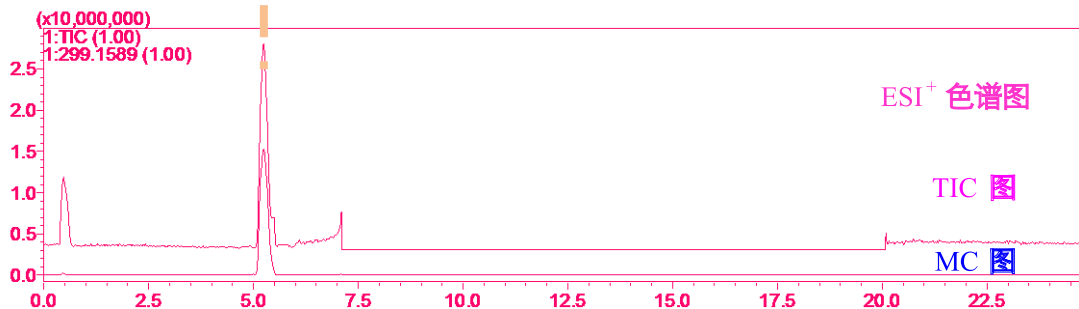
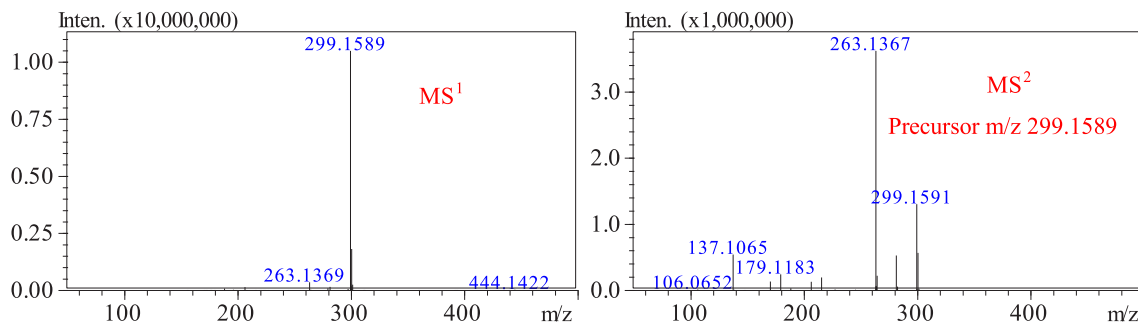


图 4. 未知杂质二维 MS 色谱图 (m/z 150~500)



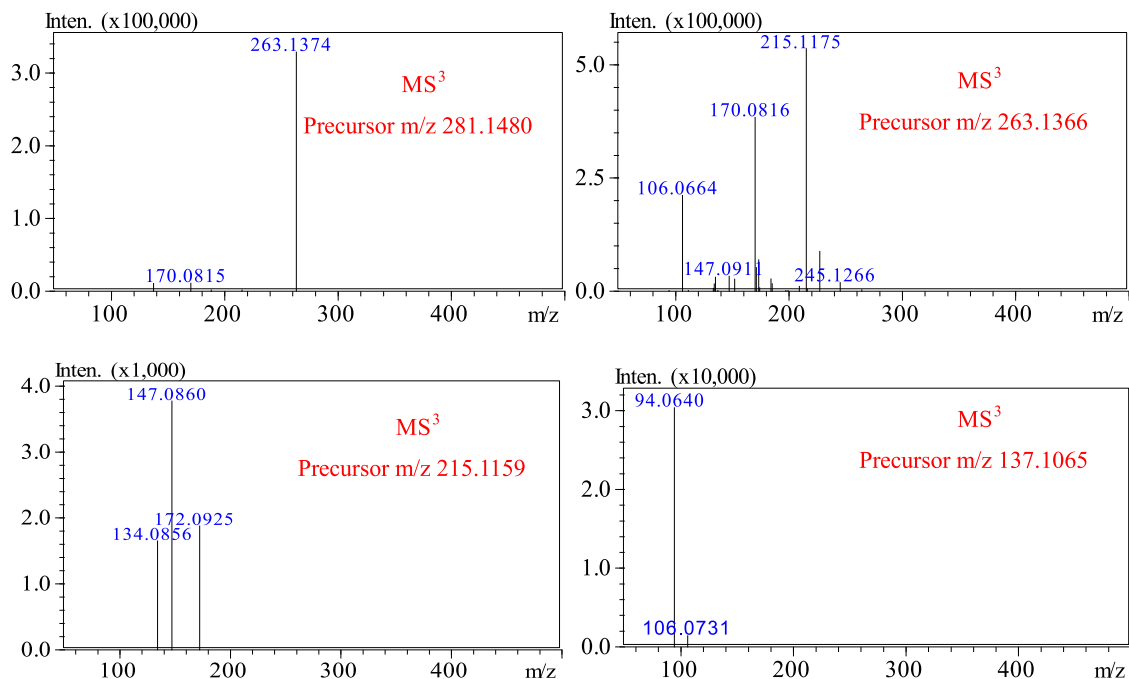


图 5. 未知杂质的多级质谱图 ESI(+)

2.3 结果与讨论

根据质谱结果使用分子式预测软件预测未知杂质的分子式。分子式预测结果见图 6。

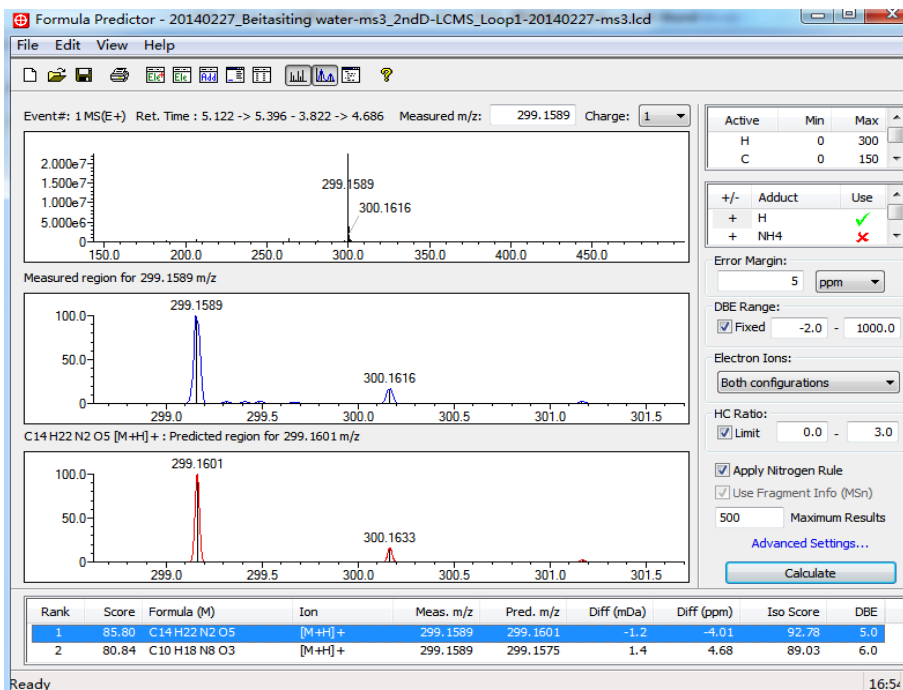


图 6. 未知杂质的 ESI(+)质谱图对应的分子式预测结果

由上知，未知杂质正离子模式 $m/z = 299.1589$ ，可能的分子式为 $C_{14}H_{22}N_2O_5$ ，理论值 $[M+H]^+ = 299.1601$ ，测试值与理论值质量数偏差为 -4.01 ppm。

再由该化合物的多级质谱图，推测其可能的分子式裂解规律如下：

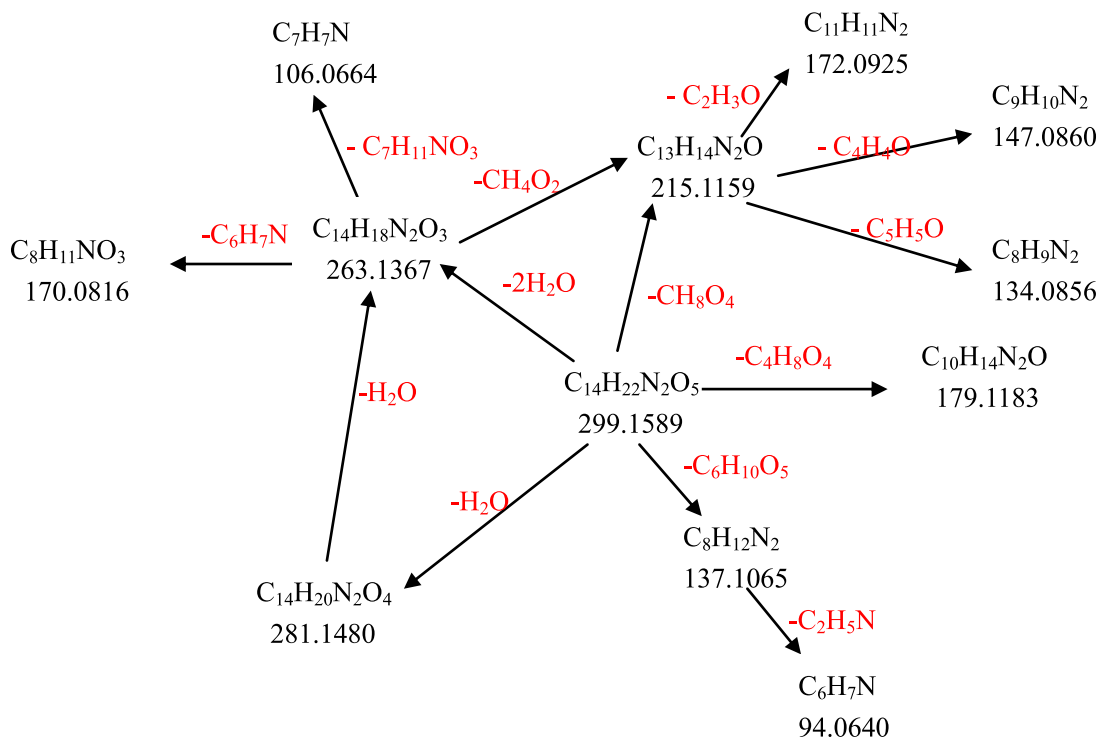


图 7. 未知杂质的 ESI(+)多级质谱碎裂方式分析

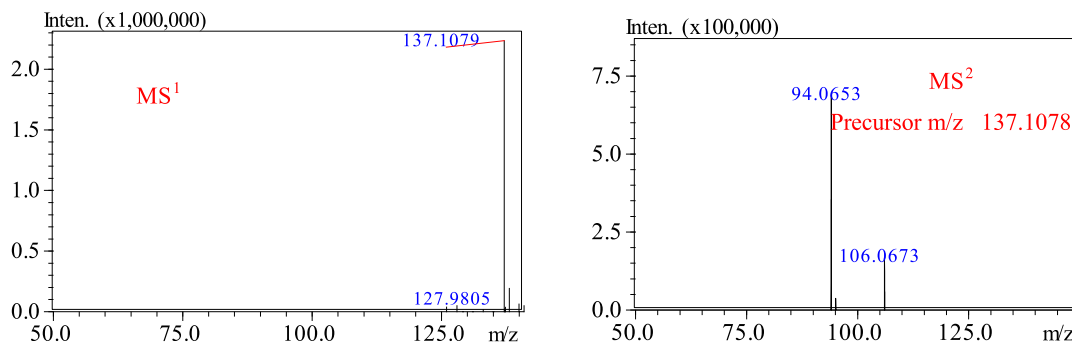
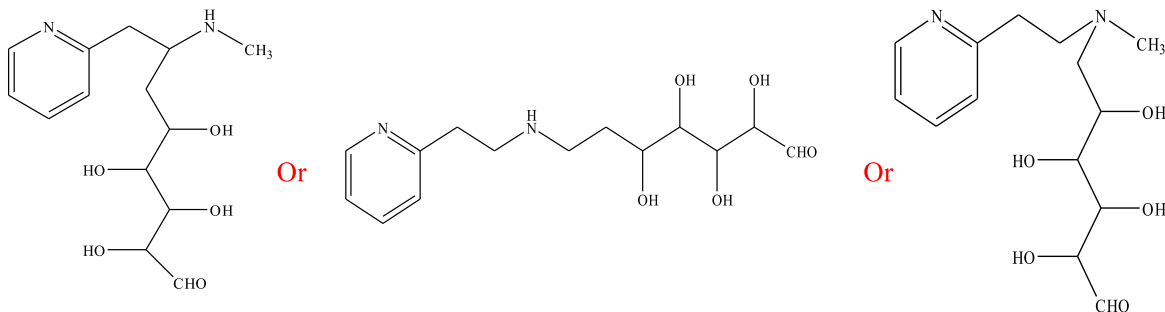


图 8. 盐酸倍他司汀多级质谱图 ESI(+)

未知化合物具有碎片离子 $m/z=137.1065$ ，其二级质谱图与盐酸倍他司汀二级质谱图基本一致，从而推得其分子式可能是 $C_8H_{12}N_2$ ，可能为倍他司汀。综合未知杂质的分子式裂解规律分析，推测出未知杂质可能的结构式如下：



■ 结论

本文建立了一种使用非挥发性离子对试剂 – 十二烷基硫酸钠作为流动相，2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统在线定性检测盐酸倍他司汀药物中未知杂质的方法。该方法由于无需转换分析所用的流动相，即保证了杂质定性的准确性，又大大节省了方法开发人员的时间。