

制备液质系统分离纯化氘代结晶紫和去甲基氘代结晶紫

LCMS-018

摘要：本文建立了一种使用岛津制备液相质谱联用仪分离纯化氘代结晶紫和去甲基氘代结晶紫的方法。该方法使用质谱信号触发，增加了分离纯化样品的纯度。紫外检测器，面积归一化结果显示，分离纯化的氘代结晶紫纯度可达 99.1%，去甲基氘代结晶紫纯度可达 100%。连续 23 次进样收集，氘代结晶紫和去甲基氘代结晶紫的峰面积和保留时间重复性良好。峰面积的相对标准偏差分别为 2.05% 和 21.56%；保留时间的相对标准偏差分别为 2.75% 和 2.45%。

关键词：氘代结晶紫去甲基氘代结晶紫分离纯化制备液质

结晶紫有较好的杀菌作用，且无刺激性及毒性。溶液用于表浅创面、糜烂、溃疡及皮肤感染，糊剂用于足癣继发感染及脓皮病等。作为兽药，结晶紫被广泛的用于水产品的养殖过程中。科研结果表明，结晶紫可使多种实验动物发生癌变和基因突变，鉴于此，许多国家均将结晶紫列为水产养殖禁用药物。氘代结晶紫为结晶紫的同位素物质，常用做内标物质用于结晶紫残留的定量。但是，氘代试剂合成过程繁琐，回收率低，分离纯化难，因而，市售产品价格昂贵。

制备液相常用作化合物的分离纯化，常用的检测器为紫外检测器。但是一些化合物紫外吸收弱，仅通过紫外检信号无法触发采集。质谱检测器作为一种通用性检测器具有灵敏度高、定性能力强的特点，使用质谱信号触发采集，或用紫外信号和质谱信号共同触发采集，可以提高收集峰的纯度。本文即利用质谱检测器信号触发，使用岛津新型的制备液质系统，制备纯化了高纯度的氘代结晶紫和去甲基氘代结晶紫。

实验部分

1.1 仪器及分析条件

1.1.1 制备液质系统

分析仪器：LC-20AP×2 输液泵，LC-20AD 补偿泵，CTC-PAL 自动进样器和组分收集器，色谱柱支架，CBM-20A 控制器，DGU-20A₃ 脱气机，SPD-M20A 二极管阵列检测器，SPD-20A 紫外检测器，LCMS-2020 质谱，APV 分流阀，LabSolutions Ver5.4 软件工作站。（样品经过色谱柱分离后，以 10000:1 的比例分流，其中小比例流量的组分前后经过二极管阵列检测器和质谱检测器（分析流路），大比例流量的组分经过紫外检测器达到收集臂（制备流路），然后根据分析流路的质谱信号强度分别收集两个组分）

LC-20AP 输液泵特点：

- ①. 宽流量范围输液范围为 0.01 ~ 150.00 mL/min，且输液精度为 0.1%RSD，兼顾分析和制备。
- ②. 仪器耐压高在 0.01 ~ 100 mL/min 输液范围内，最大耐压可达 42 MPa；在 100.01 ~ 150 mL/min 输液范围内，最大耐压可达 30 MPa。支持使用 5 μm 填料长色谱柱的高效率制备。

液相色谱条件

色谱柱： Shim-pack PRC-ODS(H) (20 mm I.D. x 250 mm L., 5 μm)

流动相 A： 10 mM 乙酸铵 / 乙腈 =50/50 (v/v) (pH = 4.5)

流动相 B： 乙腈

补偿泵流动相： 水 / 乙腈 / 甲酸 =50/50/0.1 (v/v/v)

洗脱条件： 梯度洗脱，B 相初始浓度为 0。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	0
13.00	Pumps	Pump B Conc.	80
16.00	Pumps	Pump B Conc.	80
16.01	Pumps	Pump B Conc.	0
22.00	Controller	Stop	

制备泵流速： 15 mL/min

补偿泵流速： 0.2 mL/min

分流比： 10000:1

紫外检测波长： 588 nm

二极管阵列检测波长： 190-650 nm (588 nm)

样品浓度： 2 mg/mL

上样量： 500 μL

质谱条件

采集模式：ESI 正离子扫描

扫描范围：m/z 300-500

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

雾化气流速：1.5 L/min

干燥气流速：15 L/min

收集条件：

信号出发模式：质谱信号强度触发

触发离子质量：(1) m/z364.25; (2) m/z378.30

触发信号强度：100000 μ V

1.1.2 常规液质系统

分析仪器：LC-20AD \times 2 输液泵，SIL-20AC 自动进样器，CBM-20A 控制器，DGU-20A5 脱气机，SPD-M20A 二极管阵列检测器，LCMS-2020 质谱，LabSolutions Ver5.4 软件工作站。（样品经过色谱柱到达二极管阵列检测器，然后利用三通分流后约 1/5 样品到达质谱检测器）

液相色谱条件

色谱柱：Inertsil ODS-4 (4.6 mm I.D. x 150 mm L., 5 μ m)

流动相：10 mM 乙酸铵 / 乙腈 =60/40 (v/v) (pH 4.5)

洗脱方法：等度洗脱

流速：1 mL/min

进样体积：5 μ L

检测波长：190-650 nm (588 nm)

质谱条件

采集模式：ESI 正离子扫描

扫描范围：m/z 300-500

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

雾化气流速：1.5 L/min

干燥气流速：15 L/min

1.2 样品制备

样品溶解于甲醇，过滤后上样分离，二极管阵列检测器和质谱检测器同时检测样品信号，利用质谱信号强度触发样品收集臂分别收集去甲基氘代结晶紫和氘代结晶紫样品。然后利用常规液相色谱检测制备后的样品纯度。

实验部分

2.1 制备液质系统的样品分析结果

2.1.1 质谱结果

根据总离子流色谱质谱图中，两个色谱峰的质谱结果（图 1 和图 2）显示，色谱峰 1 是去甲基氘代结晶紫，色谱峰 2 是氘代结晶紫。两者的质谱图如图 3 和图 4 所示，其质荷比与理论值相符。

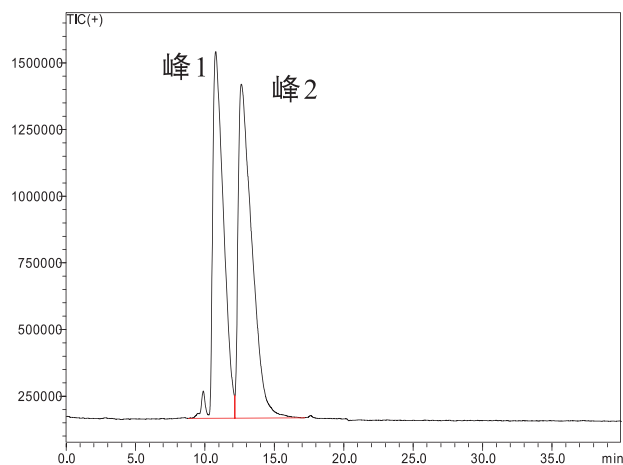


图 1 样品的总离子流色谱图结果

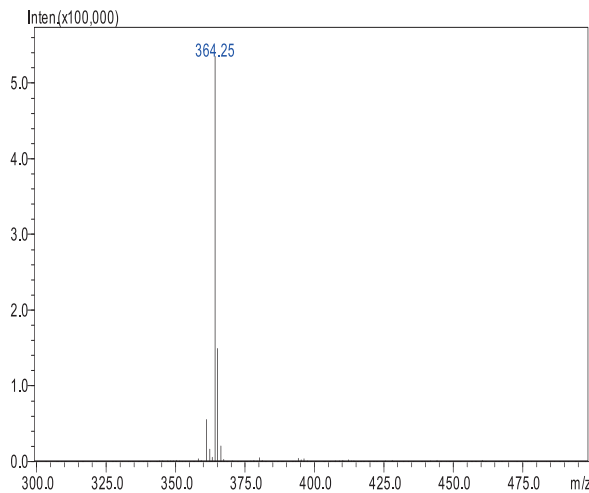


图 2 色谱峰 1 的质谱图

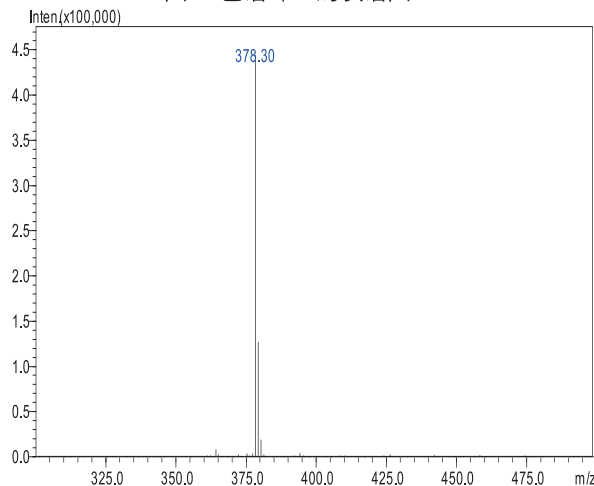


图 3 色谱峰 2 的质谱图

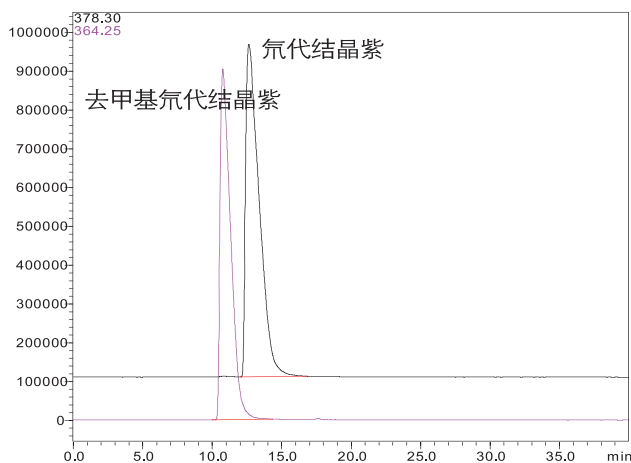


图4 样品的提取离子流色谱图

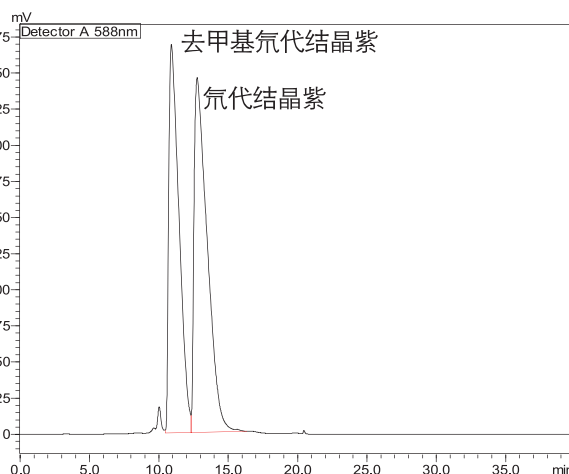


图6 紫外检测器的样品分析结果

2.1.2 色谱结果

在紫外检测器或者二极管阵列检测器的分析结果中，两个色谱峰的分离度分别为 1.12 和 1.14。基本可满足制备液质系统的分离要求。

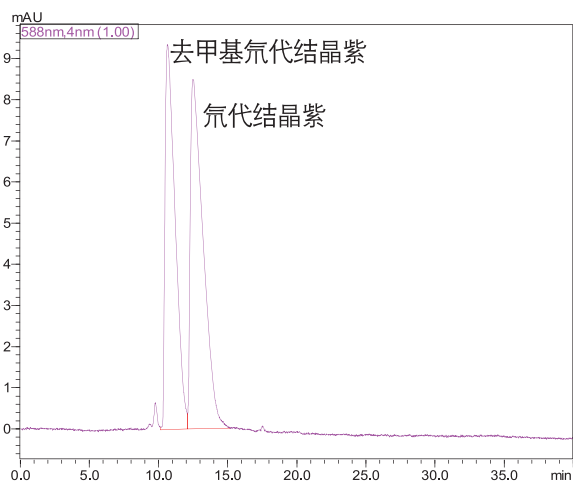


图5 二极管阵列检测器的样品分析结果

2.1.3 样品收集结果

根据质谱信号强度，一共收集两个组分，分别是去甲基氘代结晶紫和氘代结晶紫。

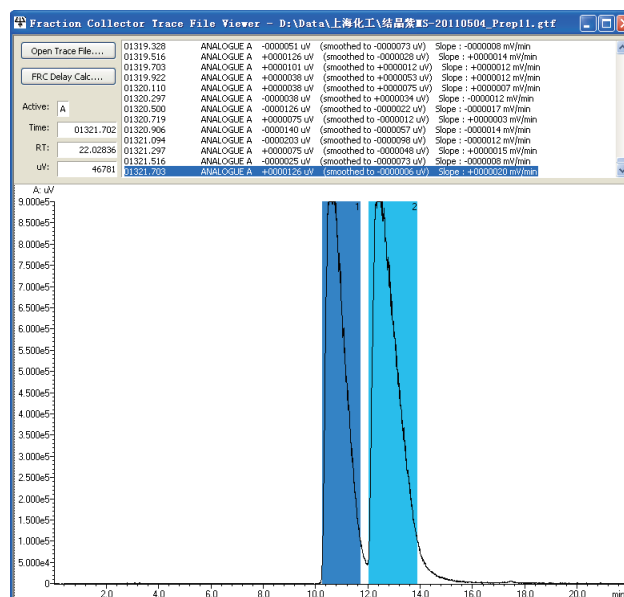


图7 样品的收集结果

2.1.4 重复性分析

样品的浓度为 2 mg/mL，上样量为 500 μ L，所以每次制备氘代结晶紫的质量约为 0.5 mg。23 次样品制备共收集氘代结晶紫的质量约为 11.5 mg。

表 2 和表 3 中显示紫外检测器分析的两个物质的色谱峰结果，保留时间的相对标准偏差分别为 2.45% 和 2.75%。峰面积的相对标准偏差分别为 1.56% 和 2.05%。结果的重复性良好。

表 2 去甲基氘代结晶紫的紫外检测结果汇总

No.	Ret. Time	Area	Area%
1	11.37	13515742	46.0
2	11.29	14301005	45.5
3	11.33	14294864	45.7
4	11.33	14223009	45.7
5	11.32	14318131	45.6
6	11.31	14233662	45.7
7	11.26	14125272	45.7
8	11.23	14009625	46.2
9	11.22	13956003	46.2
10	11.20	14031076	45.6
11	10.72	14378062	45.9
12	10.76	14368669	46.1
13	10.76	14247372	45.9
14	10.75	14010544	45.9
15	10.74	14049793	45.9
16	10.73	14086862	45.9
17	10.72	13936683	46.0
18	10.72	13973782	46.0
19	10.73	13811312	45.9
20	10.76	13773103	46.0
21	10.83	13837400	46.0
22	10.91	13918758	46.3
23	10.82	13853905	45.9
Average	10.99	14054549	45.9
%RSD	2.45	1.56	0.43

表 3 氘代结晶紫的紫外检测结果汇总

No.	Ret. Time	Area	Area%
1	13.36	15884571	54.0
2	13.28	17105569	54.5
3	13.33	16993004	54.3
4	13.32	16901199	54.3
5	13.31	17072892	54.4
6	13.30	16938777	54.3
7	13.23	16810786	54.3
8	13.20	16324810	53.8
9	13.19	16275202	53.8
10	13.17	16740473	54.4
11	12.54	16921176	54.1
12	12.57	16833040	53.9
13	12.58	16812629	54.1
14	12.57	16531512	54.1
15	12.55	16537992	54.1
16	12.54	16597083	54.1
17	12.52	16378955	54.0
18	12.52	16406596	54.0
19	12.54	16261589	54.1
20	12.57	16186541	54.0
21	12.67	16258062	54.0
22	12.76	16161278	53.7
23	12.66	16339784	54.1
Average	12.88	16577110	54.1
%RSD	2.75	2.05	0.36

2.2 制备样品的纯度分析结果

2.2.1 质谱结果

在质谱检测结果中，对两个色谱峰进行了定性分析，确定了去甲基氘代结晶紫和氘代结晶紫的相对保留时间。收集组分 1 中未发现氘代结晶紫。收集组分 2 中发现少量去甲基氘代结晶紫。

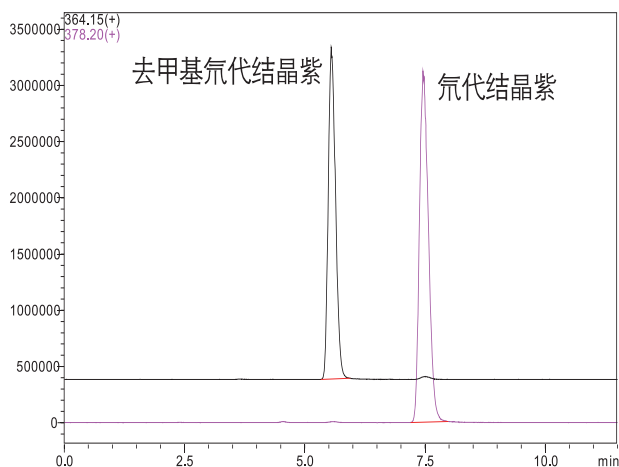


图 8 样品的提取离子流色谱质谱结果

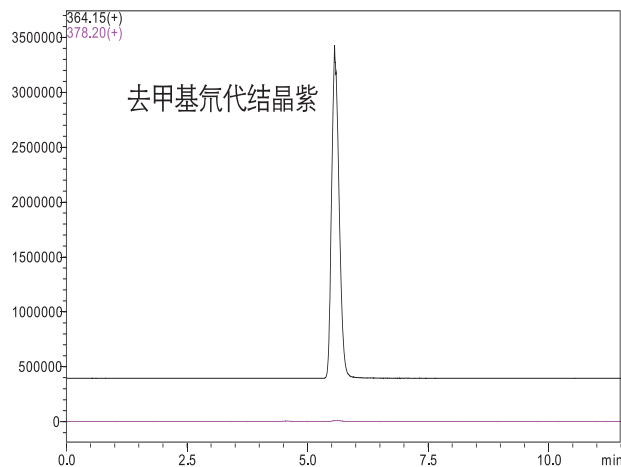


图 9 收集组分 1 的提取离子流色谱质谱结果

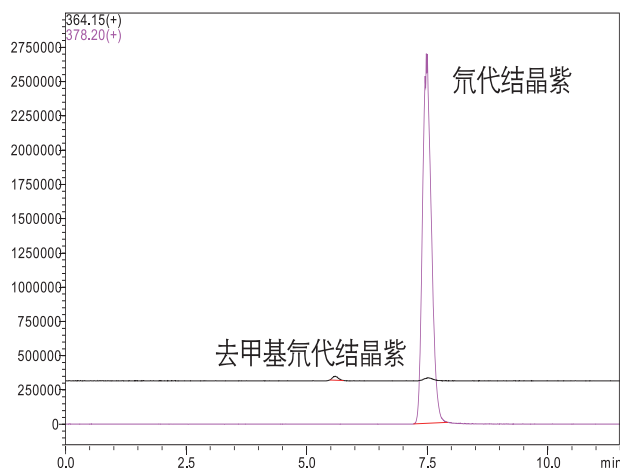


图 10 收集组分 2 的提取离子流色谱质谱结果

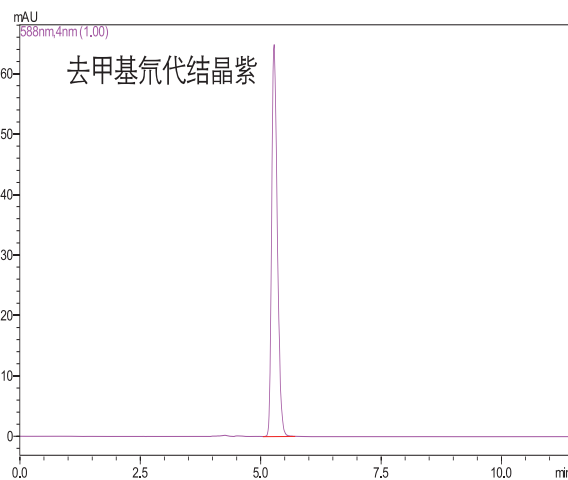


图 12 收集组分 1 的二极管阵列检测色谱图

2.2.2 色谱结果

利用二极管阵列检测，面积归一化法对结果进行定量分析，其中收集组分 1 中去甲基氘代结晶紫的纯度为 100%，收集组分 2 中氘代结晶紫的纯度为 99.1%。

表 5 收集组分 1 的二极管阵列检测结果

组分名称	Ret. Time	Area	Area%
去甲基氘代结晶紫	5.277	38257	100

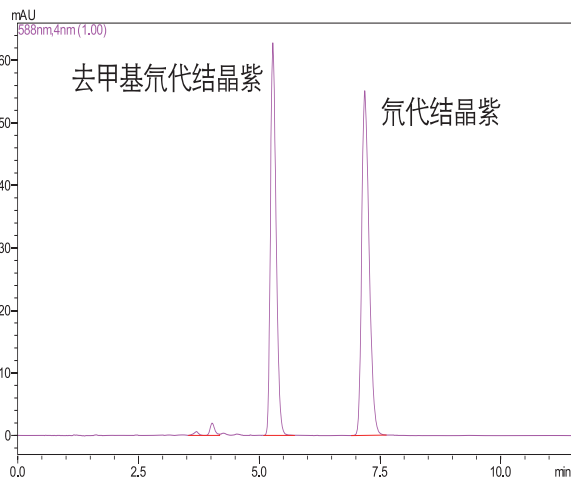


图 11 样品的二极管阵列检测色谱图

表 4 样品的二极管阵列检测结果

组分名称	Ret. Time	Area	Area%
去甲基氘代结晶紫	5.282	511137	45.528
氘代结晶紫	7.184	589473	52.505

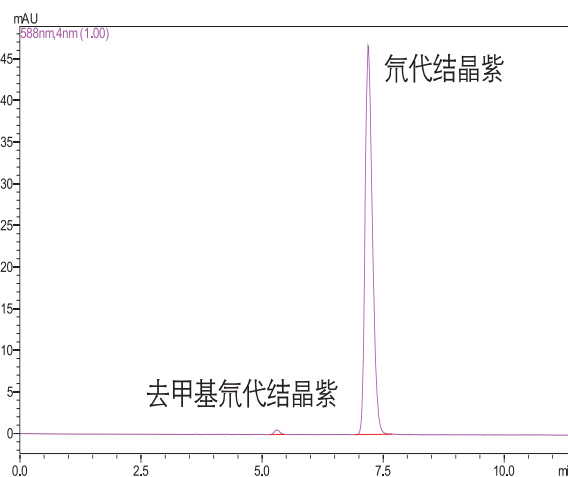


图 13 收集组分 2 的二极管阵列检测色谱图

表 6 收集组分 2 的二极管阵列检测结果

组分名称	Ret. Time	Area	Area%
去甲基氘代结晶紫	5.304	4273	0.864
氘代结晶紫	7.191	490275	99.136

结论

本实验利用岛津 Prep-LCMS 制备液质系统，对样品中分离度仅为 1.12 的去甲基氘代结晶紫和氘代结晶紫两个组分进行了分离纯化。收集到的去甲基氘代结晶紫的纯度为 100%，氘代结晶紫的纯度为 99.1%。连续 23 次进样收集，氘代结晶紫和去甲基氘代结晶紫的峰面积和保留时间重复性良好，峰面积的相对标准偏差分别为 2.05% 和 1.56%；保留时间的相对标准偏差分别为 2.75% 和 2.45%。使用质谱信号触发采集，能够制备出高纯度的样品，从而提高纯化效率。