

2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测磺胺类药物中的杂质

LCMS-IT-TOF-036

摘要：本文建立了使用 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测磺胺间二甲氧嘧啶中 4 个杂质（磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺喹恶啉）的方法。该方法使用非挥发性的磷酸缓冲盐对药物主成分和杂质进行了分离，并通过二维 LCMS 系统对目标杂质进行 MS 定性分析。该系统由于无需将非挥发性缓冲盐转换为挥发性缓冲盐，大大节省了方法开发人员的时间，并且保证了定性的准确度。

关键词：磺胺间二甲氧嘧啶杂质 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统

有关物质检查是药品质量控制的重要内容。合成药物中的有关物质通常来源于合成原料，中间体和副反应产物。对于药物中的这些杂质（含量 >0.1%）通常应进行鉴定。目前这些检查也是新药报批的必须项目。液质联用技术是药物杂质检测的不可或缺的手段。

世界各地药典的方法多是 LC 的方法，常常使用到磷酸盐、草酸盐等无机盐及这些盐类的缓冲溶液，甚至使用离子对试剂，以调节药物及杂质的保留时间。然而，非挥发性的缓冲盐作为流动相是无法应用到质谱中，因此，如果使用质谱对杂质进行定性，通常需要将非挥发

性的缓冲盐换成挥发性的来进行。但是，更换过流动相后，杂质的保留时间往往会发生变化，这使得目标杂质的定位产生困难。

岛津公司为了应对该领域面临的问题，特推出了 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统。使用该系统无需更换非挥发性缓冲盐的流动相，即可使用质谱仪（IT-TOF）对目标杂质进行质谱分析。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。

本文使用 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测了磺胺间二甲氧嘧啶中的 4 个杂质。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, 4.6mm I.D.×150mm, 5μm

流动相：0.01 mol/L 磷酸缓冲盐 (pH 2.6) / MeOH (7/3, v/v)

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL

检测波长：200 ~ 350 nm (检测：270 nm)

<LC 2ndD>

色谱柱：Shim-pack XR-ODS 2.0mm I.D.×75mm, 2.2μm

流动相 A：0.1 % FA

流动相 B：MeOH

时间程序：10 %B (0min) ~ 50 %B (10min) ~ 10 %B (10.01 ~ 20 min)

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL (Loop 环体积)

检测波长：270 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：4.5kV

采集范围：100-1000

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 °C

加热模块温度：200 °C

1.3 系统流程图

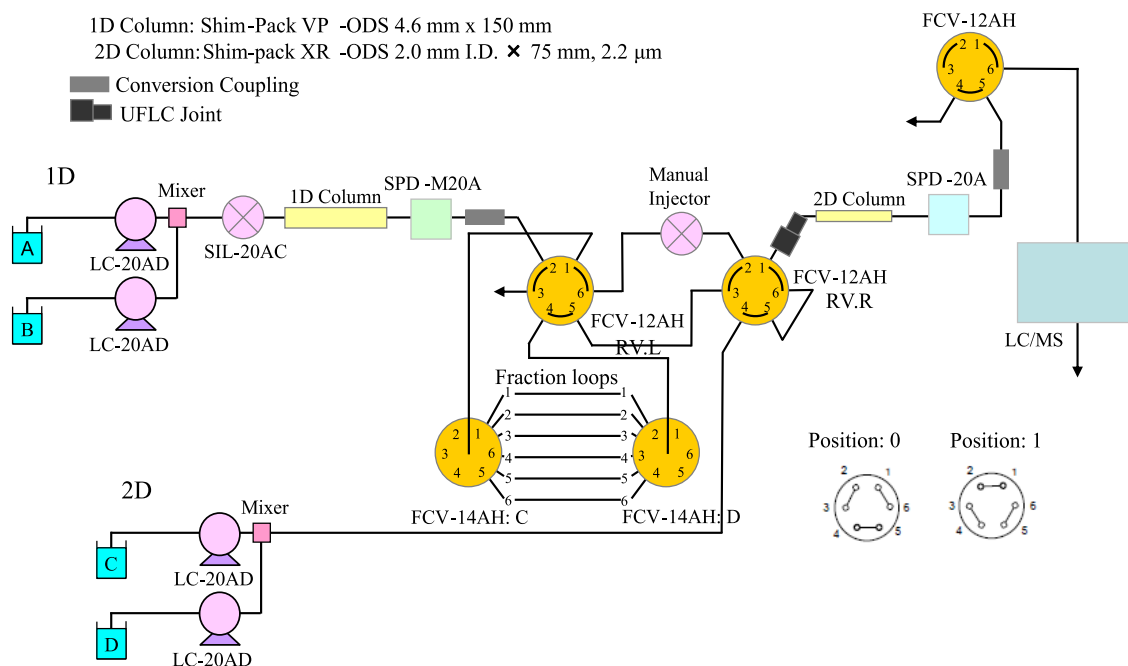


图1 2D-LC-IT-TOF的系统流程图

2DLC-IT-TOF 系统分析过程:

1. 1stD 初始状态, 药物样品进样, 如图 2 所示。此配置与常规 LC 一致, 可将药典中的测试方法完全移植过来。此过程的一个重要目的在于确定目标杂质的保留时间。

2. 1stD 分别收集馏分(根据目标杂质的保留时间)到 loop 1, 2, 3, 4, 5(最大收集 5 个杂质组分, 如需收集更多组分, 需要更换更多位的高压阀, 或者多次进样), 如图 3 和图 4 所示。Loop 6 的切换仅用作让 Valve C, D 的流路是顺时针变化, 而不是逆时针回到初始位置, 以免冲走 loop 1 ~ 5 中的馏分。

3. 2ndD 分析, 依次分析 loop 6, 1, 2, 3, 4, 5, 共进行六次, 如图 5 和图 6 所示。Loop 6 分析仅用于冲洗平衡管路, 不用于收集馏分。

4. 平衡 1stD 流路, 准备进行下一组分析。

5. 重复 1 到 4 的步骤, 只是进的样品变成了溶剂, 得到空白数据。完整的批处理如图 7 所示。

6. 将得到的空白数据与药物进样时得到的数据进行比较, 找出杂质峰, 并使用 IT-TOF 得到的多级质谱信息解析杂质的结构。

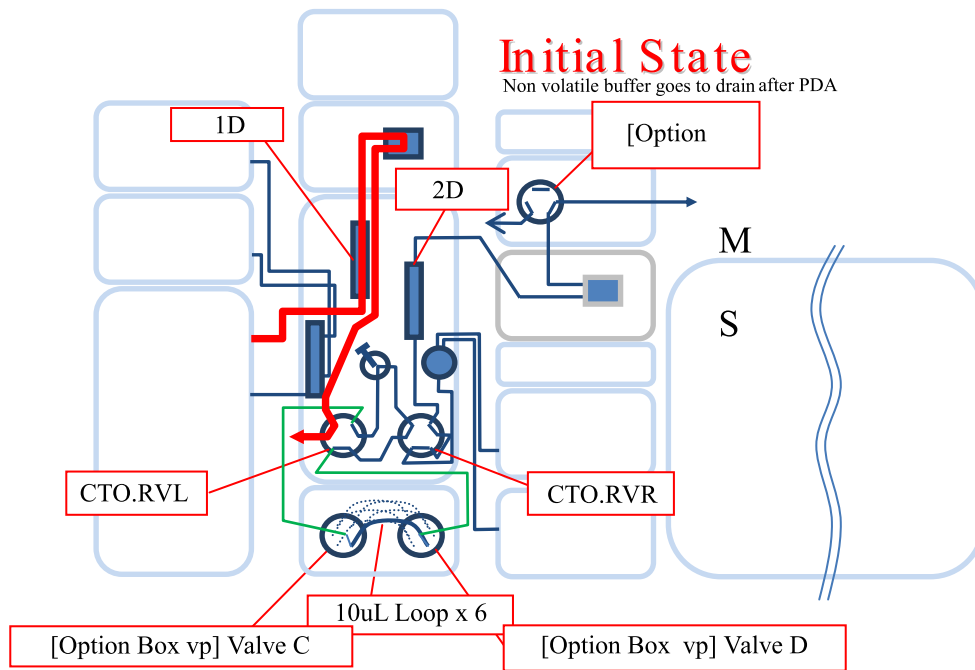
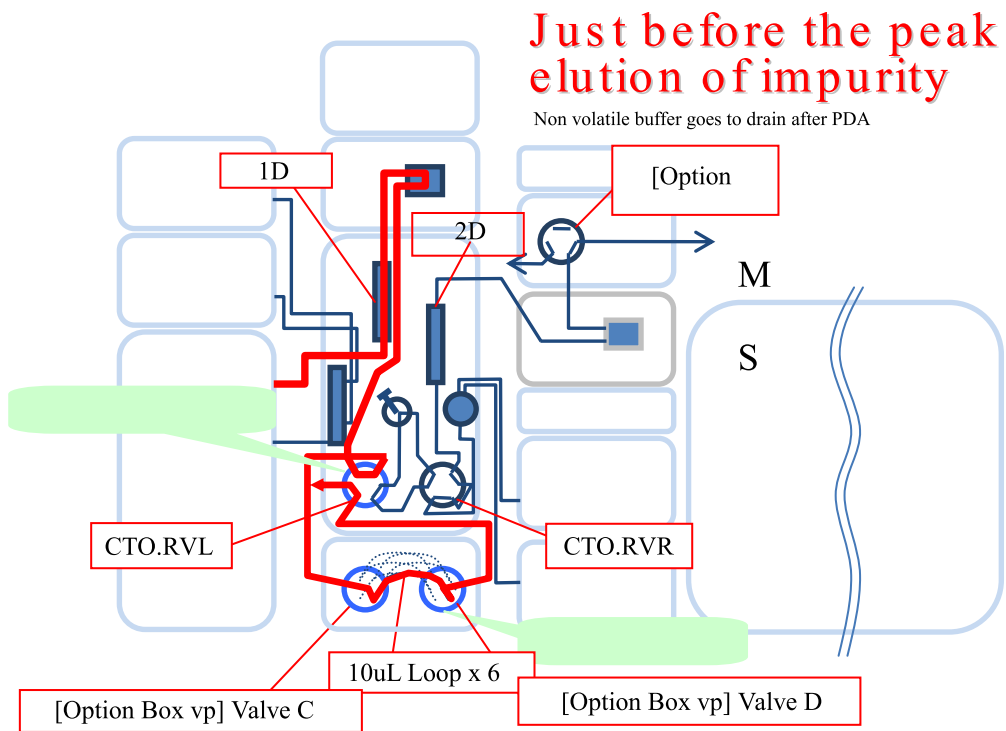


图 2 初始状态, 1stD 分析



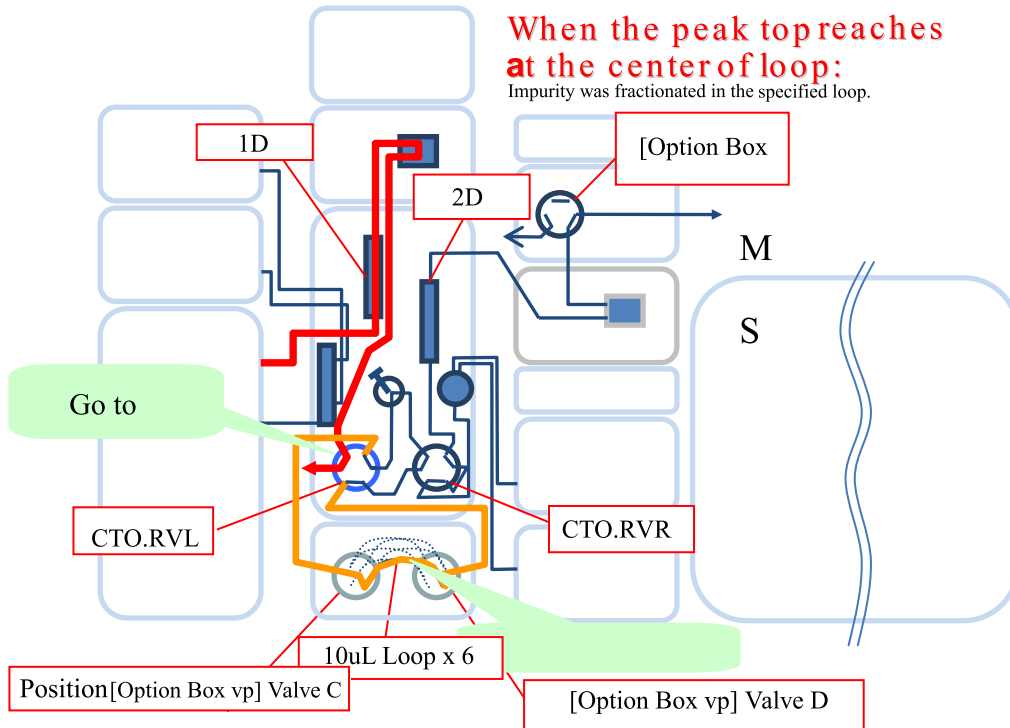


图4 当峰顶到达馏分环的中央时，RVL 到 0 位，停止收集。

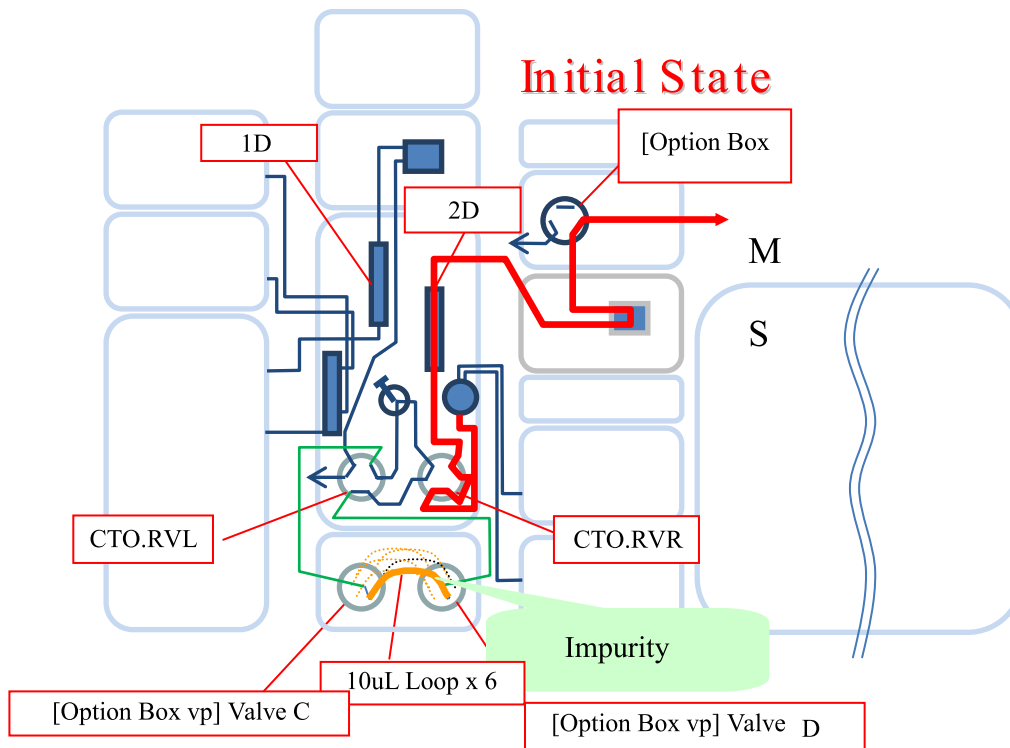


图5 2ndD 初始状态

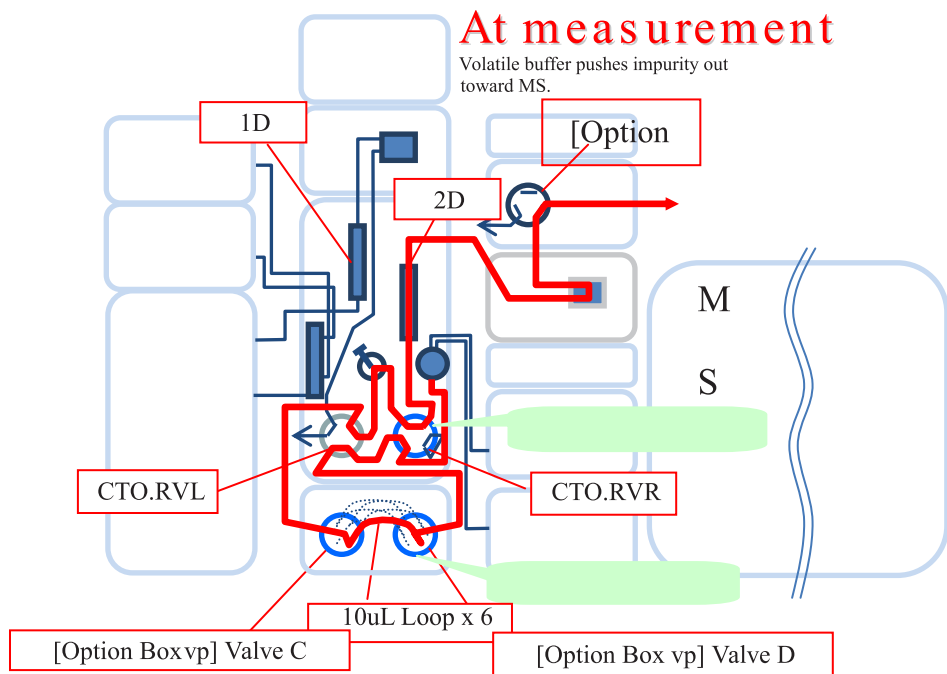


图6 2ndD 馏分环中杂质被输送经过柱子分离后进质谱

Analysis	Vial#	Tray Name	Inj. Volume	Sample Name	Sample ID	Method File	Data File
1	1	1	10			D:\2DLC\1stD-LC_fractionate.lcm	20100921_1stD-LC_fractionate.lcd
2	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop6.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop6.lcd
3	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop1.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop1.lcd
4	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop2.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop2.lcd
5	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop3.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop3.lcd
6	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop4.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop4.lcd
7	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop5.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop5.lcd
8	-1	1	10			D:\2DLC\1stD-LC_equilibrate.lcm	20100921_1stD-LC_equilibrate.lcd
9	2	1	10			D:\2DLC\1stD-LC_fractionate.lcm	20100921_1stD-LC_fractionate.lcd
10	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop6.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop6.lcd
11	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop1.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop1.lcd
12	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop2.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop2.lcd
13	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop3.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop3.lcd
14	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop4.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop4.lcd
15	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop5.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop5.lcd

图7 完整的批处理表

1.4 样品制备

使用流动相配制主成分浓度为 500 μg/mL，杂质浓度为 0.5 μg/mL。

本次实验涉及的标准品信息如下：

成分	中文名称	英文名称	分子式	分子量	CAS No.
主成分	磺胺间二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311.0809	122-11-2
杂质	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265.0754	127-79-7
杂质	磺胺二甲基嘧啶	sulfamethazine/Sulfadimidine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.0910	57-68-1
杂质	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.0703	1220-83-3
杂质	磺胺喹噁啉	Sulfachinoxalin/Sulfaquinoxaline	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301.0754	59-40-5

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，主成分和 4 个杂质的出峰时间分别为：3.59 min，4.60 min，6.61 min，17.82 min 和 14.65 min。

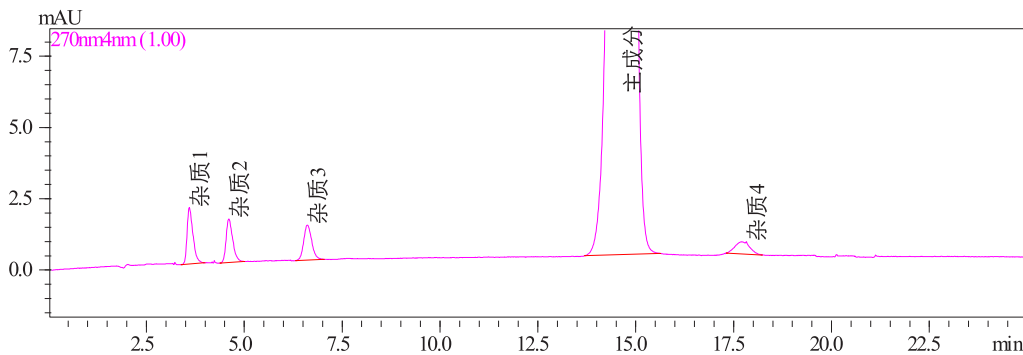
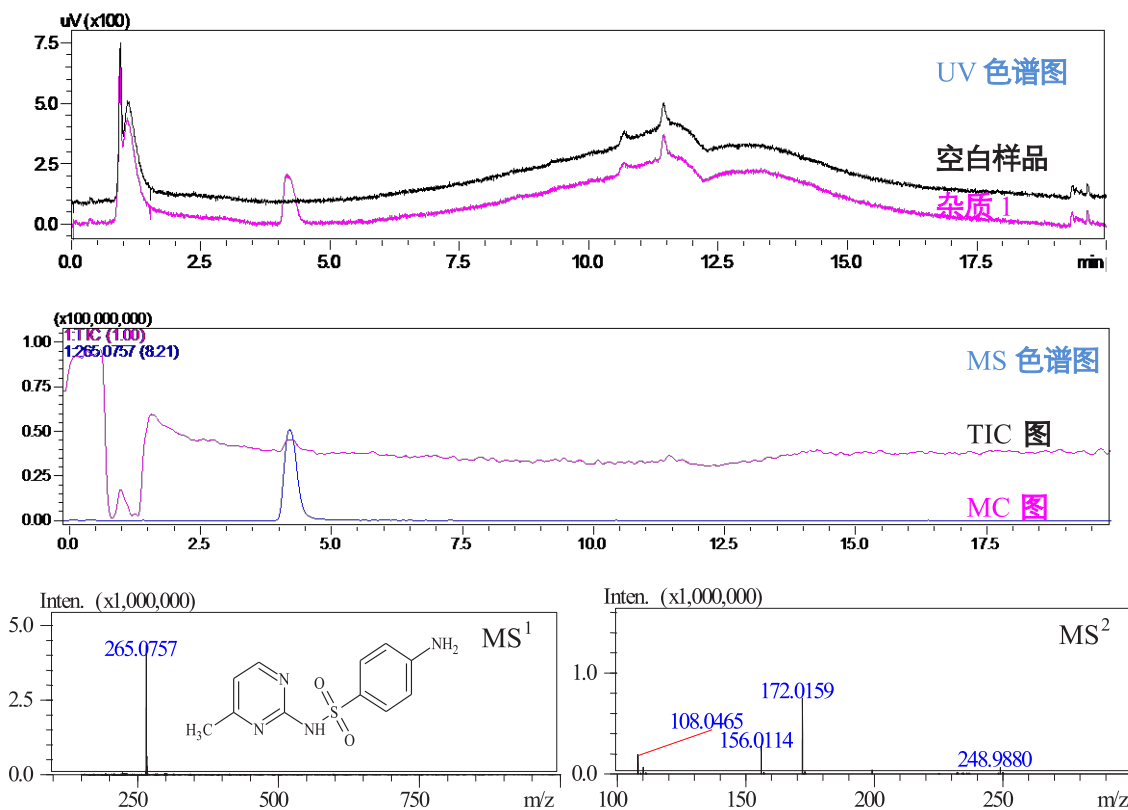


图8 LC 1stD分析色谱图

2.2 LC 2stD 分析结果

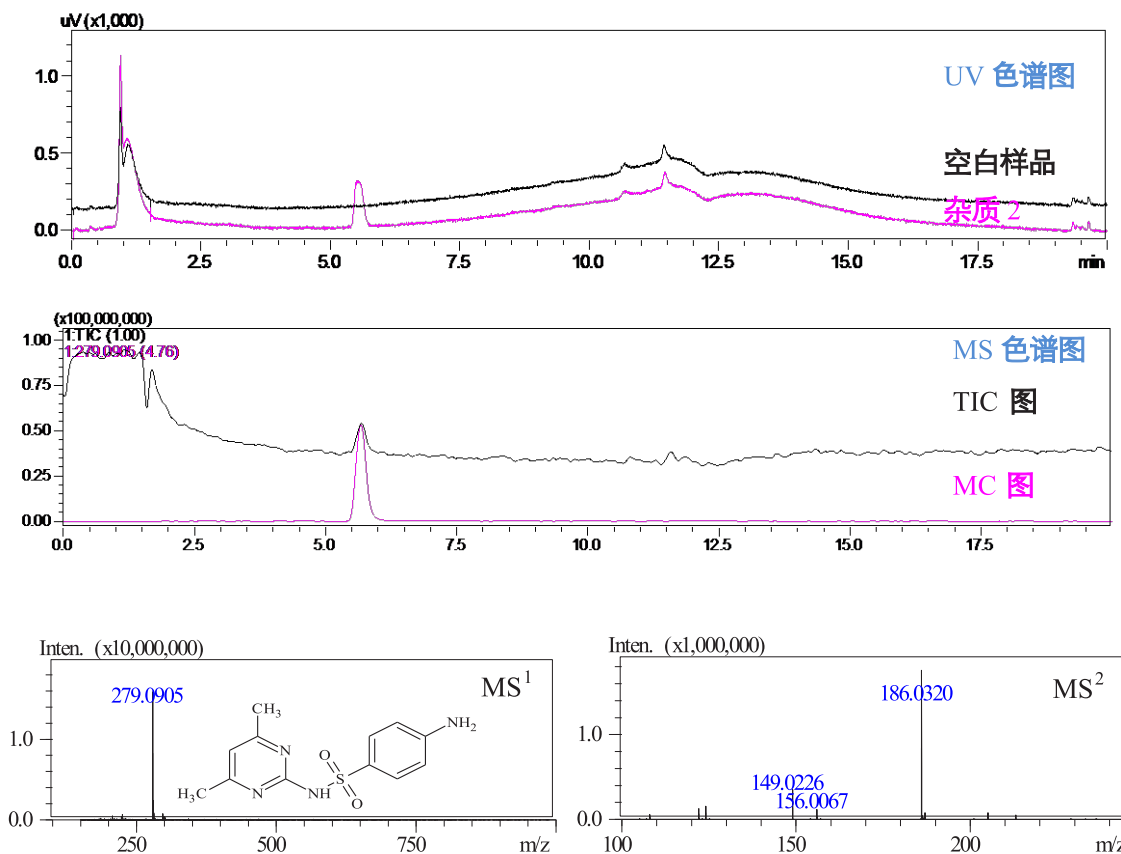
2.2.1 杂质 1 的分析结果

杂质 1 切换到 LOOP 环 1 中，经过 2D LC 分析，得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出杂质 1 正离子模式 $m/z = 265.0757$ ，为磺胺甲基嘧啶，分子式 $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ ，理论值 $[M+H]^+ = 265.0754$ ，测试值与理论值偏差为 1.13 ppm。使用自动二级功能得到磺胺甲基嘧啶的二级质谱图，质谱图如下所示。



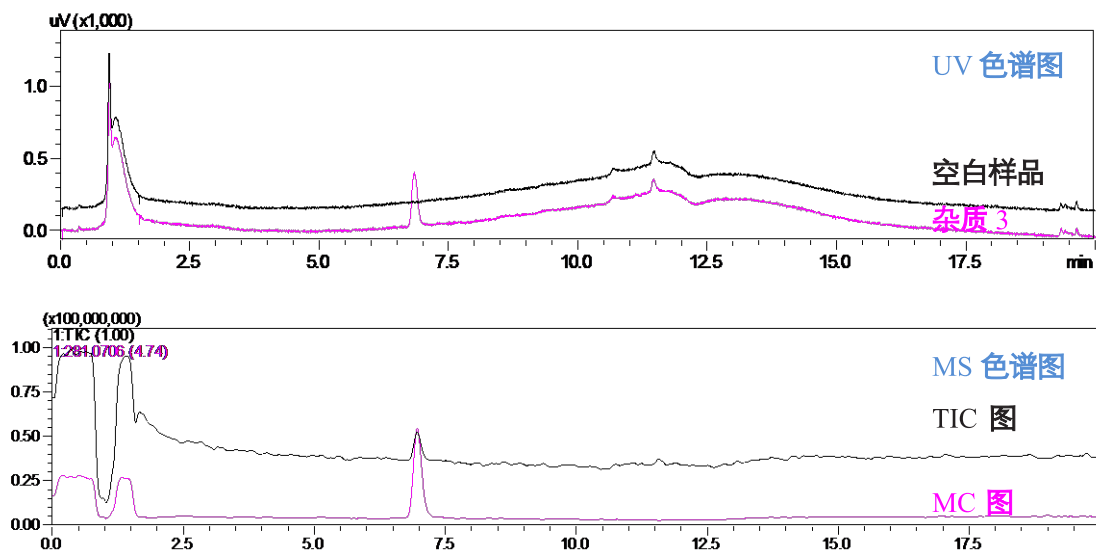
2.2.2 杂质 2 的分析结果

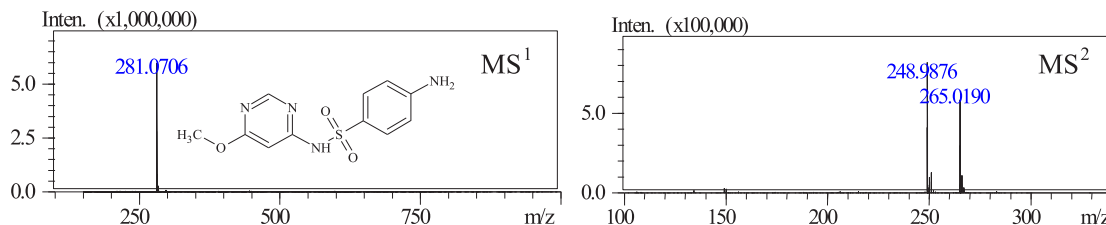
杂质 2 切换到 LOOP 环 2 中，经过 2D LC 分析，得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出杂质 2 正离子模式 $m/z = 279.0905$ ，为磺胺二甲嘧啶，分子式 $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ ，理论值 $[M+H]^+ = 279.0910$ ，测试值与理论值偏差为 -1.79 ppm。使用自动二级功能得到磺胺二甲嘧啶的二级质谱图，质谱图如下所示。



2.2.3 杂质3的分析结果

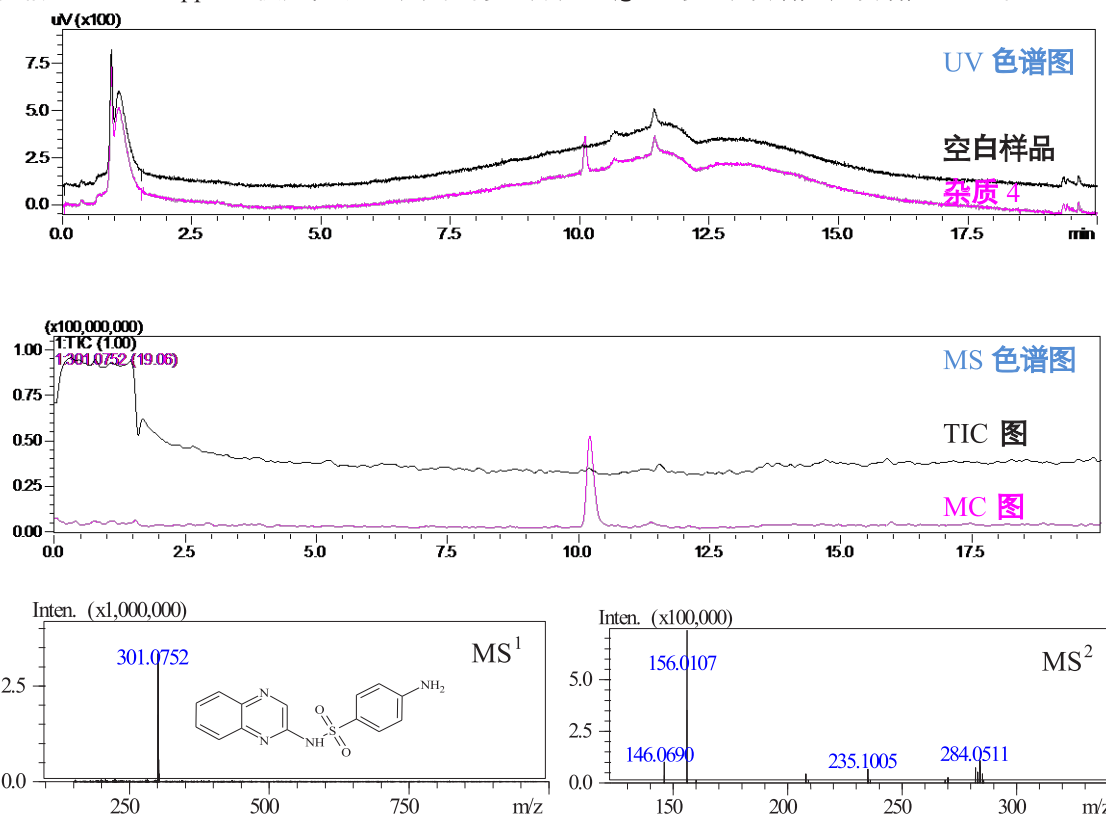
杂质3切换到 LOOP 环3中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出杂质3 正离子模式 $m/z = 281.0706$, 为磺胺间甲氧嘧啶, 分子式 $C_{11}H_{12}N_4O_3S$, 理论值 $[M+H]^+ = 281.0703$, 测试值与理论值偏差为 1.07 ppm。使用自动二级功能得到磺胺间甲氧嘧啶的二级质谱图, 质谱图如下所示。





2.2.4 杂质4的分析结果

杂质4切换到LOOP环4中，经过2D LC分析，得到UV色谱图、MS色谱图和质谱图如下。从MS质谱图可以看出杂质4正离子模式 $m/z = 301.0752$ ，为磺胺喹恶啉，分子式 $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ ，理论值 $[M+H]^+ = 301.0754$ ，测试值与理论值偏差为 -0.66 ppm。使用自动二级功能得到磺胺喹恶啉的二级质谱图，质谱图如下所示。



结论

本文建立了使用2D-LC-IT-TOF杂质鉴定系统定性检测磺胺间二甲氧嘧啶中的4个杂质的方法。该方法使用磷酸缓冲盐作为流动相对药物主成分和杂质的分离，并使用IT-TOF对目标杂质进行质谱分析。由于使用该系统保留了药典分析的方法，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。