

2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测 盐酸多西环素片中的药物杂质

LCMS-IT-TOF-042

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多西环素药物中杂质 A(β -多西环素)、杂质 B(美他环素)、杂质 E(土霉素)和杂质 C(4-表多西环素)的方法。该方法使用药典的方法对药物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 MSn 定性分析。在该例中杂质 A 和杂质 C 的分子量相同,多级质谱碎片也几乎一样,如果分析条件改变,出峰顺序也可能发生变化,从而无法对两者准确定性。该系统由于无需条件转换,直接使用药典的方法,因此可以进行准确定性,从而大大节省了方法开发人员的时间。

关键词：盐酸多西环素杂质 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统

盐酸多西环素(Doxycycline Hyclate)是以土霉素为原料制得的半合成广谱四环类抗生素,其含半分子乙醇和半分子结晶水的盐酸盐在临床上有着广泛的应用。2010年《中国药典》检测用流动相为醋酸盐缓冲液(0.25 mol/L 醋酸铵-0.1 mol/L 乙二胺四醋酸二钠-三乙胺),含有离子对试剂乙二胺四醋酸二钠,该方法不能直接

使用 MS 进行检测。而更换流动相即费时费力又有可能因为保留时间的改变而丢掉一些未知杂质。本文使用 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统,在不改变流动相的条件下定性检测了盐酸多西环素药物中的 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 \times 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 \times 3(高压流路选择阀), FCV-14AH \times 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

液相色谱条件

<LC 1stD>

色谱柱: InertSustainTM C18, 4.6 mm I.D. \times 150 mm, 5 μ m

流动相: A-醋酸盐缓冲液 [0.25 mol/L 醋酸铵-0.1 mol/L EDTA 钠盐-三乙胺(100:10); 流动相 B-乙腈

A/B = 85/15 (v/v)

流速: 1 mL/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L

检测波长: 280 nm

<LC 2ndD>

色谱柱: InertSustainTM C18, 2.1 mm I.D. \times 50 mm, 2 μ m

流动相: A 相-0.1% 甲酸-水溶液; B 相-0.1% B 相-乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L (Loop 环体积)

检测波长: 280 nm

时间程序: 见表 1 (2 min 后阀切换流路进质谱)

质谱条件

分析仪器: LCMS-IT-TOF

离子源: ESI

离子源接口电压: ESI(+), 4.5 kV;

ESI(-), -3.5 kV;

检测器电压: 1.6 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 $^{\circ}$ C

加热模块温度: 200 $^{\circ}$ C

校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数

表 1 二维梯度洗脱时间程序

| 时间 | B 浓度 |
|-------|------|
| 0.01 | 10 |
| 8.00 | 50 |
| 10.00 | 50 |
| 10.10 | 10 |
| 15.00 | Stop |

1.3 系统流路图示意图

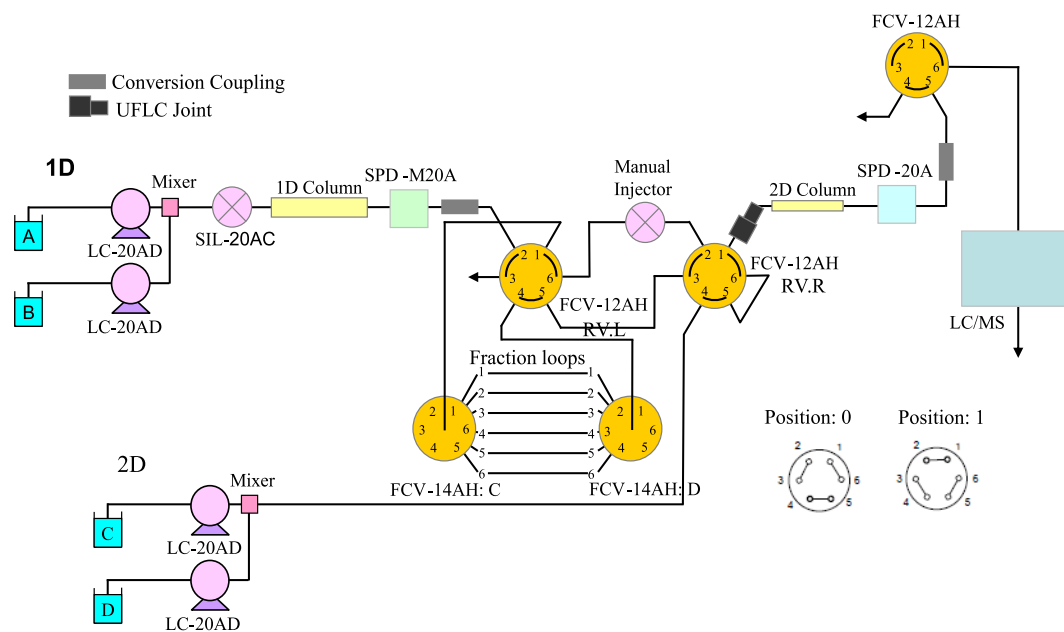


图 1 2D-LC-IT-TOF 的系统流路图

1.4 样品制备

- (1) 将对照品配成 1 mg/L 溶液，使用质谱探索裂解规律。对照品信息见表 2。
- (2) 按照药典配制一定浓度混标及待测样品溶液，使用二维杂质鉴定系统进行杂质定性。

表 2 多西环素及可能的杂质信息

| 名称 | 多西环素 | 杂质A | 杂质B | 杂质C* | 杂质E | 杂质F |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| 分子式 | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | $C_{22}H_{22}N_2O_8$ | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | $C_{22}H_{24}N_2O_9$ | $C_{23}H_{25}NO_8$ |
| 分子量 | 444.4 | 444.4 | 442.4 | 444.4 | 460.4 | 443.4 |

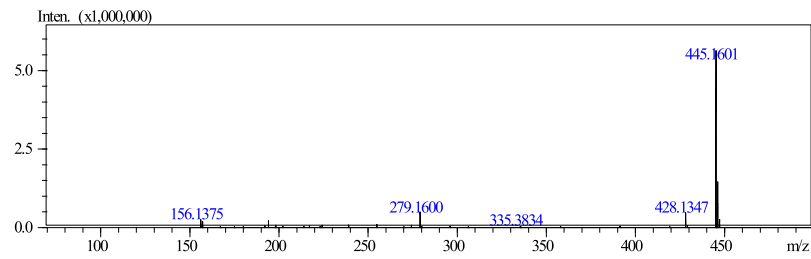
结果讨论

2.1 对照品分析

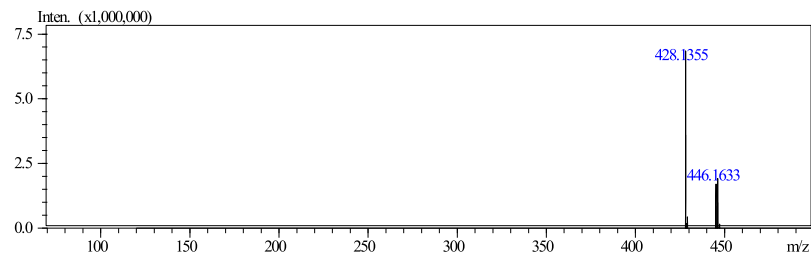
不接色谱柱，对对照品单标进行多级质谱分析，了解其多级裂解规律。

2.1.1 盐酸多西环素质谱分析

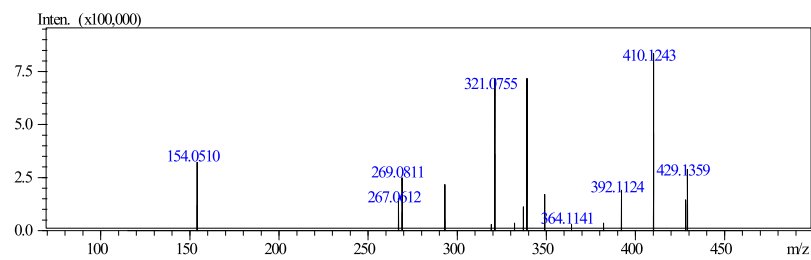
MS¹



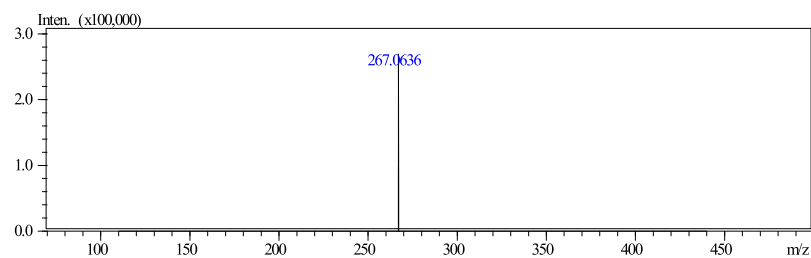
MS² 前体离子 m/z 445.1601



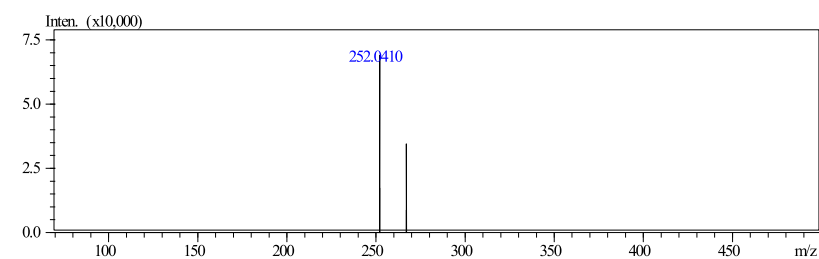
MS³ 前体离子 m/z 428.1355



MS⁴ 前体离子 m/z 321.0755



MS⁵ 前体离子 m/z 267.0636



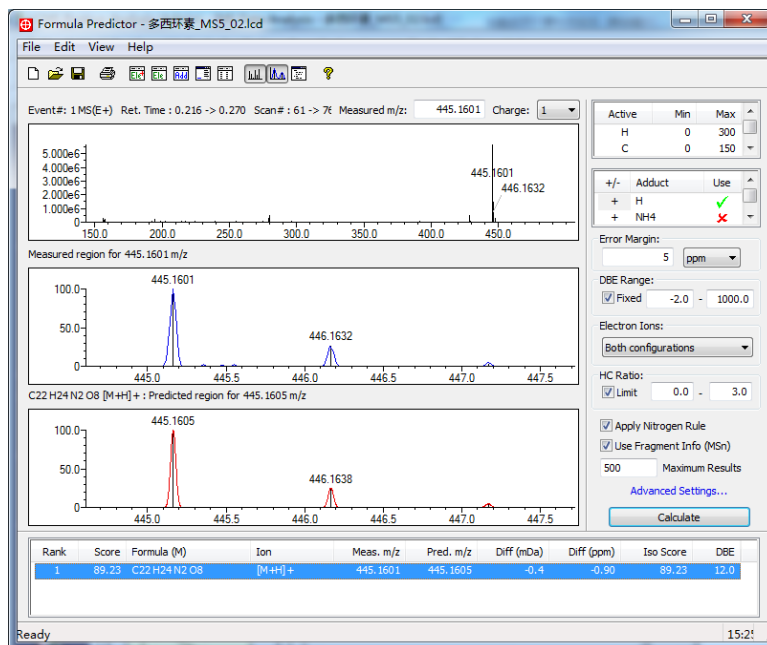


图 2 盐酸多西环素的五级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₄N₂O₈，多西环素分子式相一致，质量数偏差为 -0.90 ppm。根据多级质谱信息推测可能的多级质谱裂解规律如下所示：

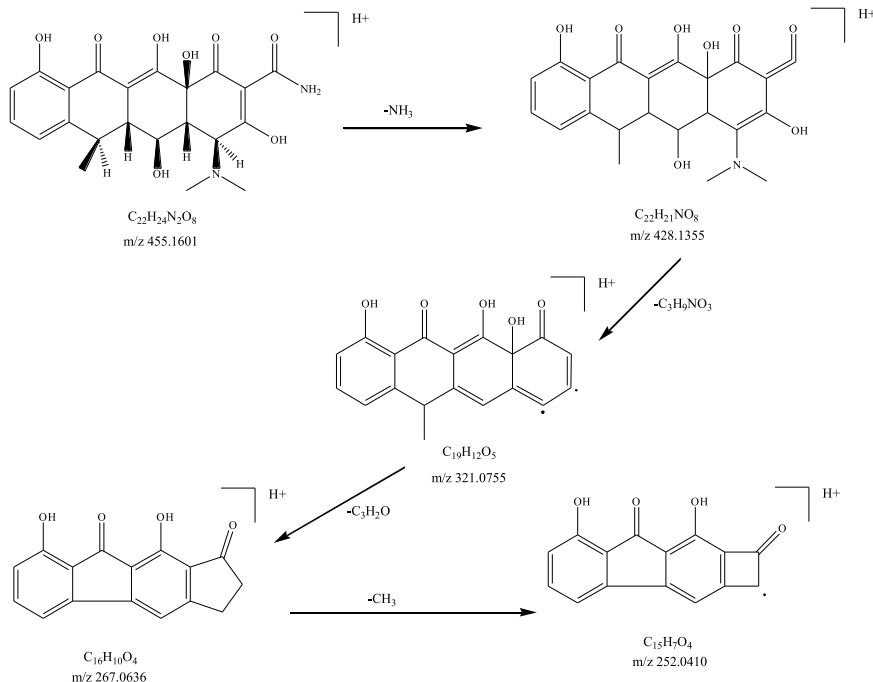
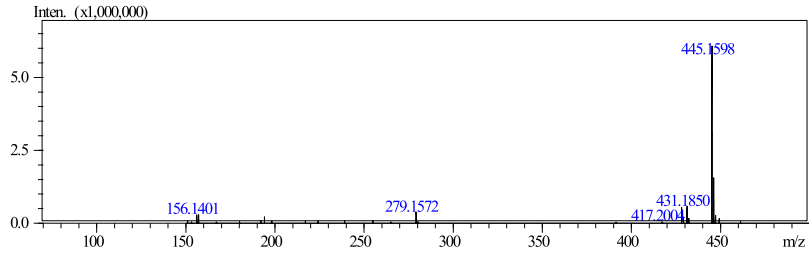


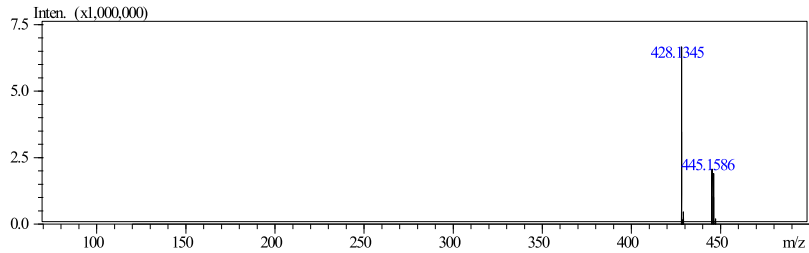
图 3 多西环素可能的质谱裂解规律

2.1.2 杂质 A 质谱分析

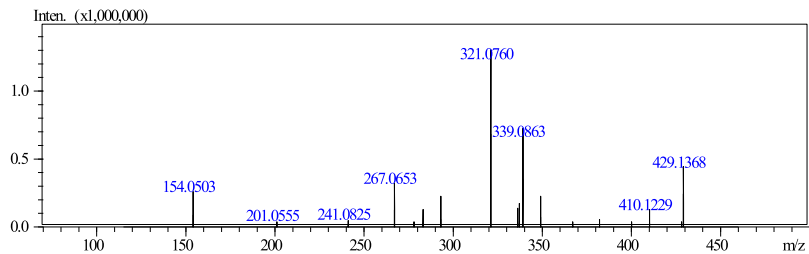
MS¹



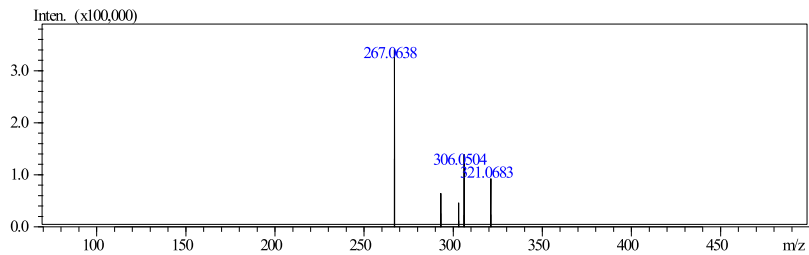
MS² 前体离子445.1598



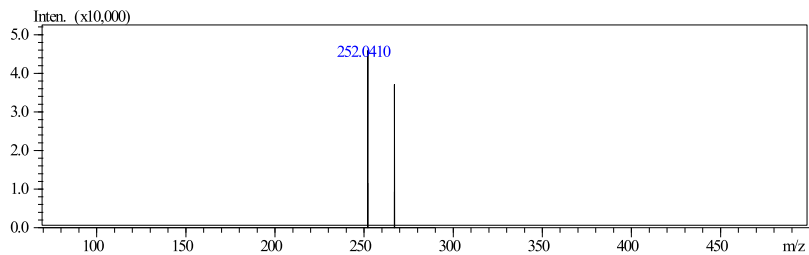
MS³ 前体离子428.1345



MS⁴ 前体离子321.0760



MS⁵ 前体离子267.0638



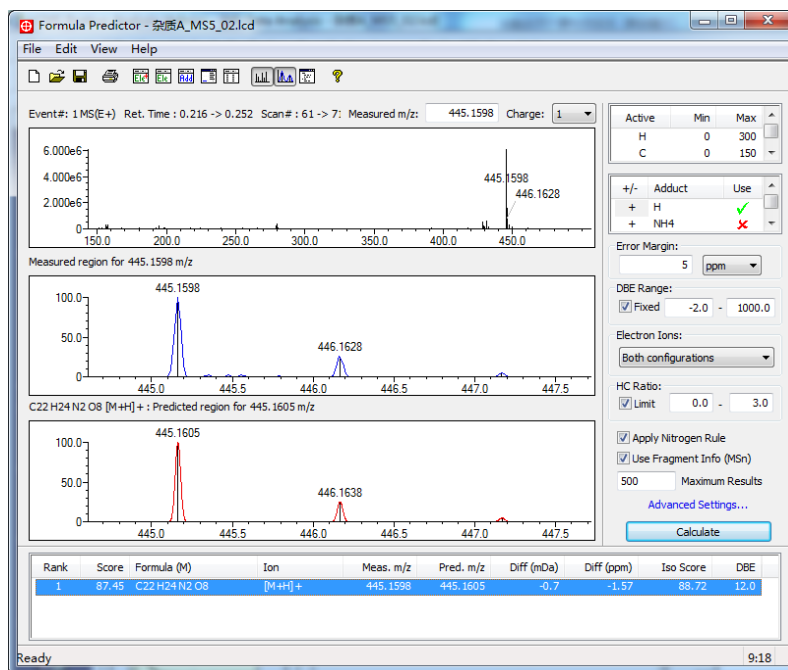


图 4 杂质 A 的四级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₄N₂O₈，与杂质 A 相一致质量数偏差为 -1.57 ppm，根据多级质谱信息推倒其可能的质谱裂解规律如下：

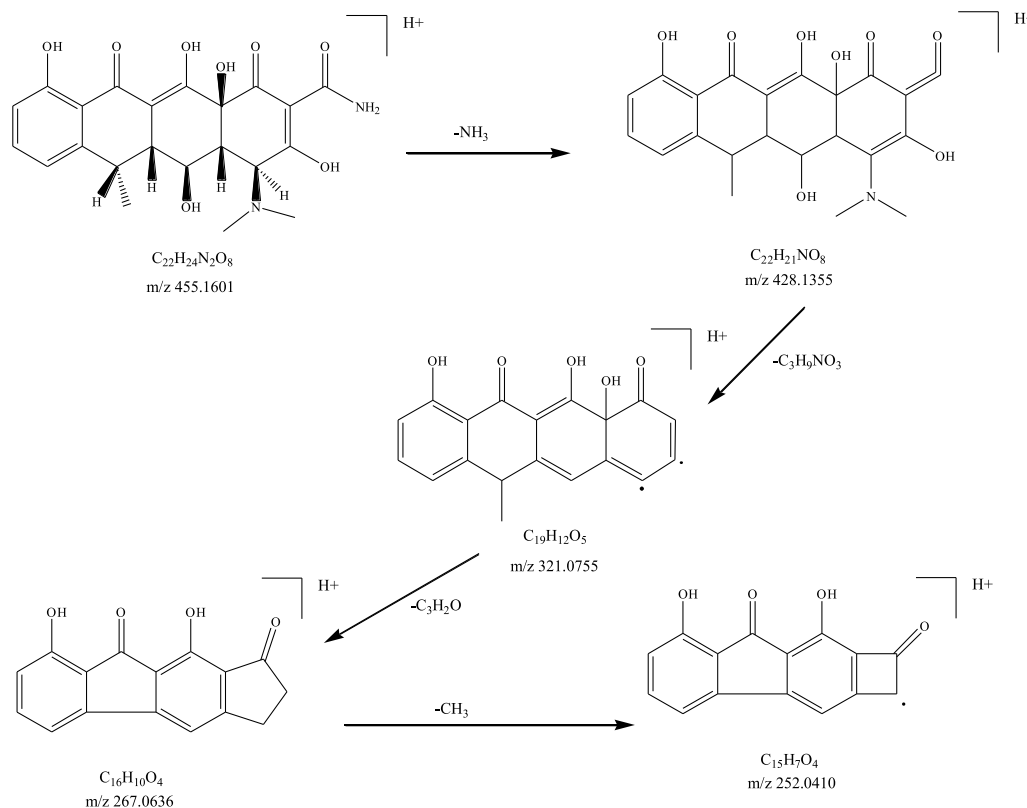
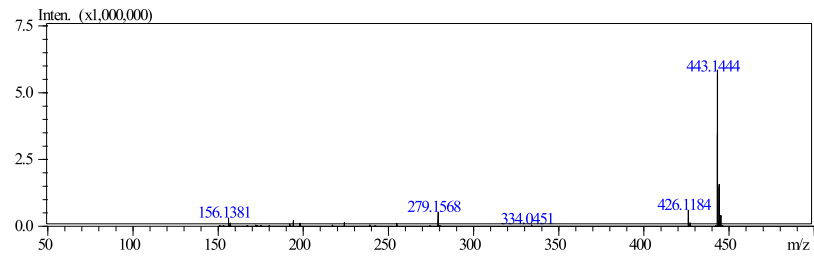


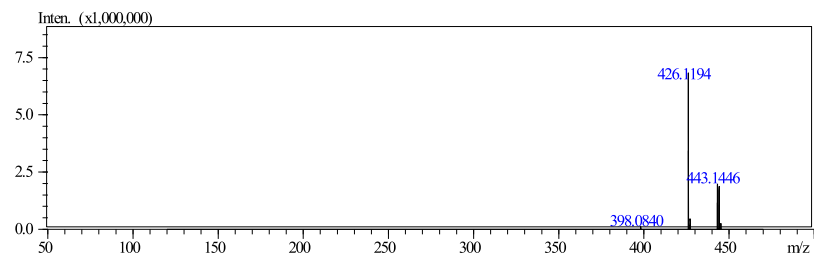
图 5 杂质 A 可能的结构式及质谱裂解规律

2.1.3 杂质 B 质谱分析

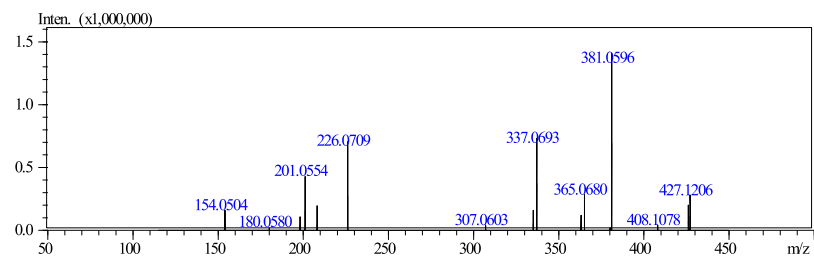
MS¹



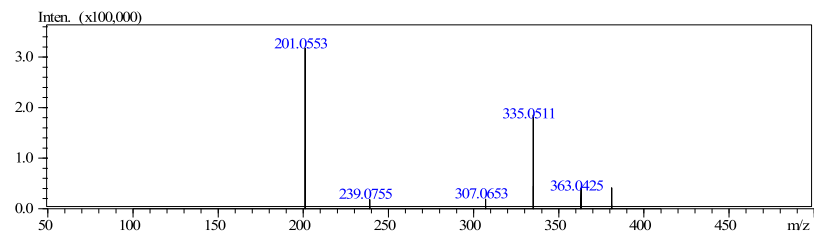
MS² 前体离子443.1444



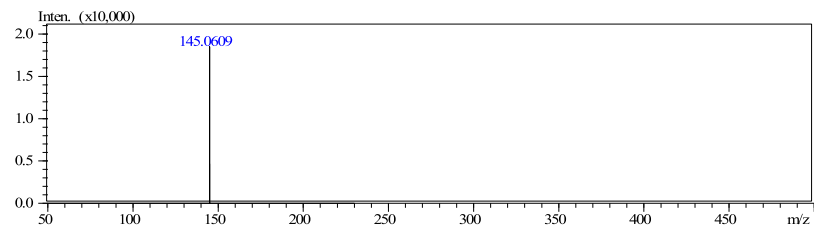
MS³ 前体离子426.1194



MS⁴ 前体离子381.0596



MS⁵ 前体离子201.0553



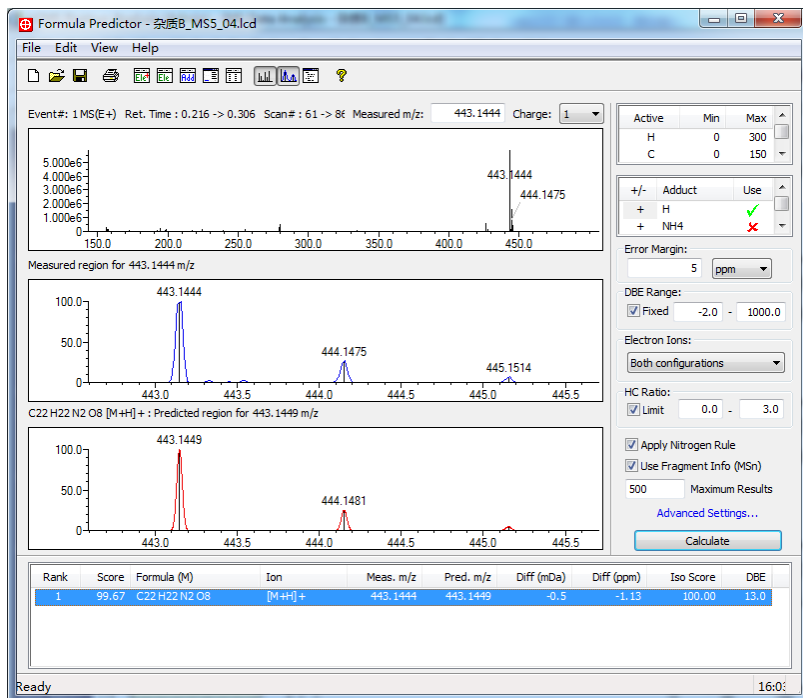


图 6 杂质 B 的二级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₂N₂O₈，与杂质 B 相一致，质量数偏差为 -1.13 ppm，根据多级质谱信息推测可能的结构式以及多级质谱裂解规律如下所示：

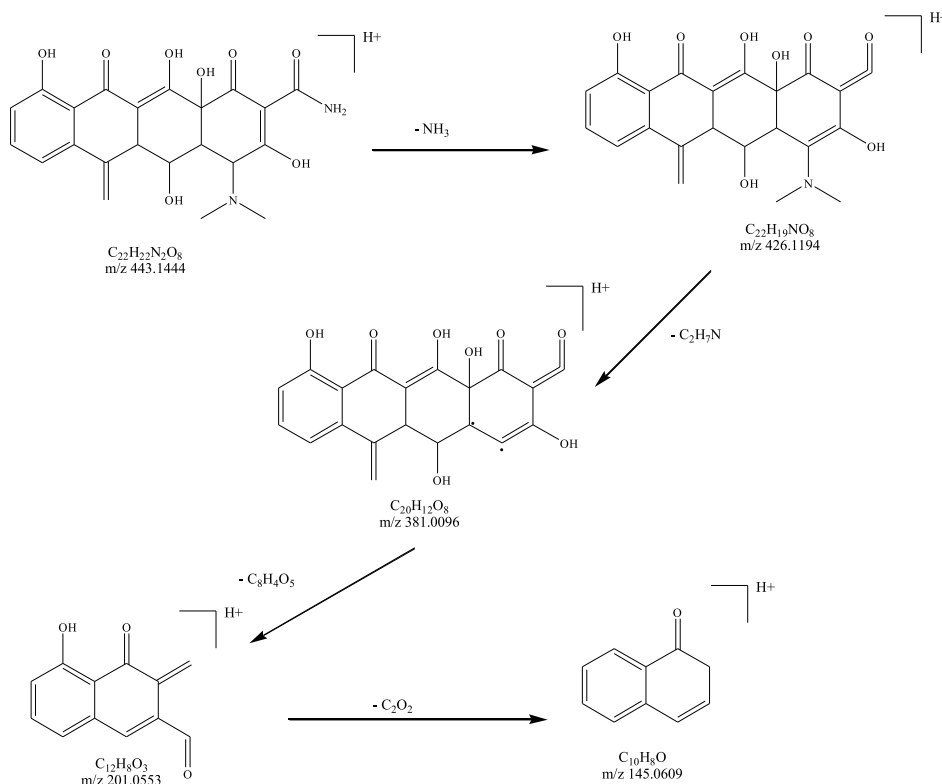
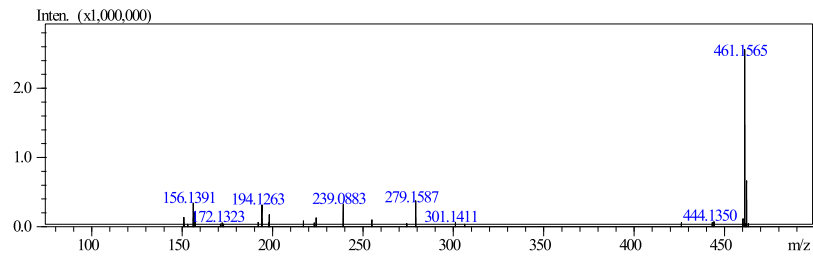


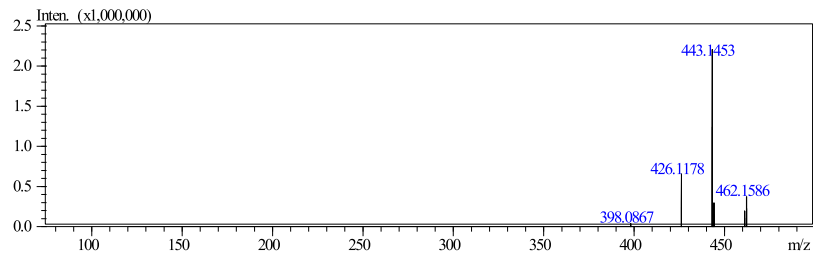
图 7 杂质 B 可能的结构式以及多级质谱裂解规律

2.1.4 杂质 E 质谱分析

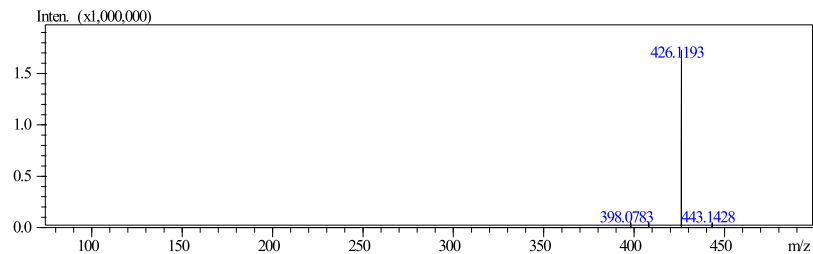
MS¹



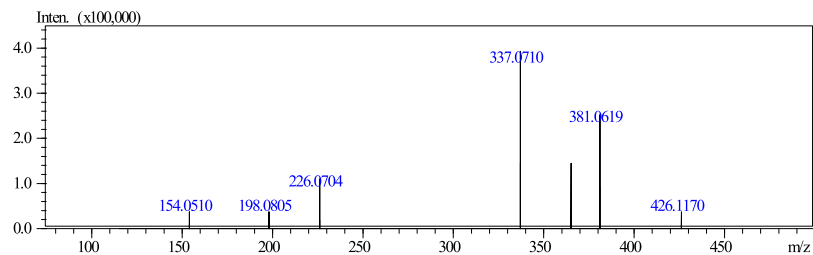
MS² 前体离子461.1565



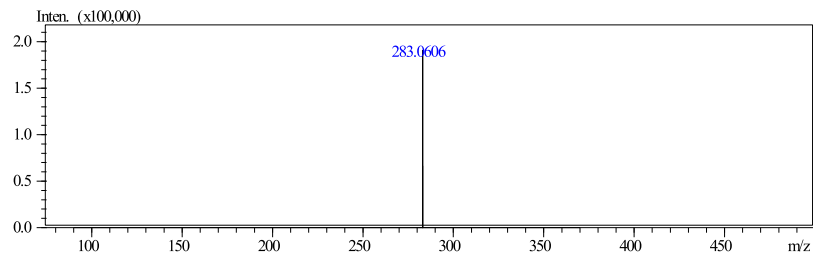
MS³ 前体离子443.1453



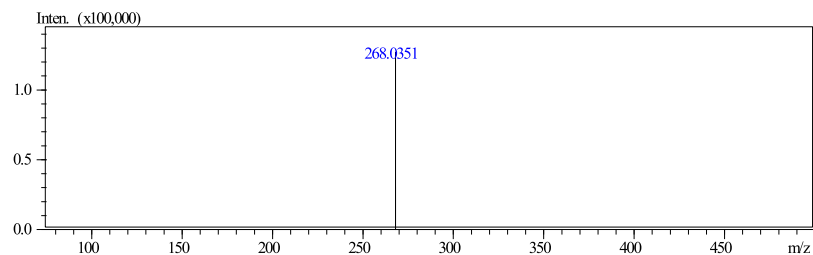
MS⁴ 前体离子426.1193



MS⁵ 前体离子 337.0710



MS⁶ 前体离子 283.0606



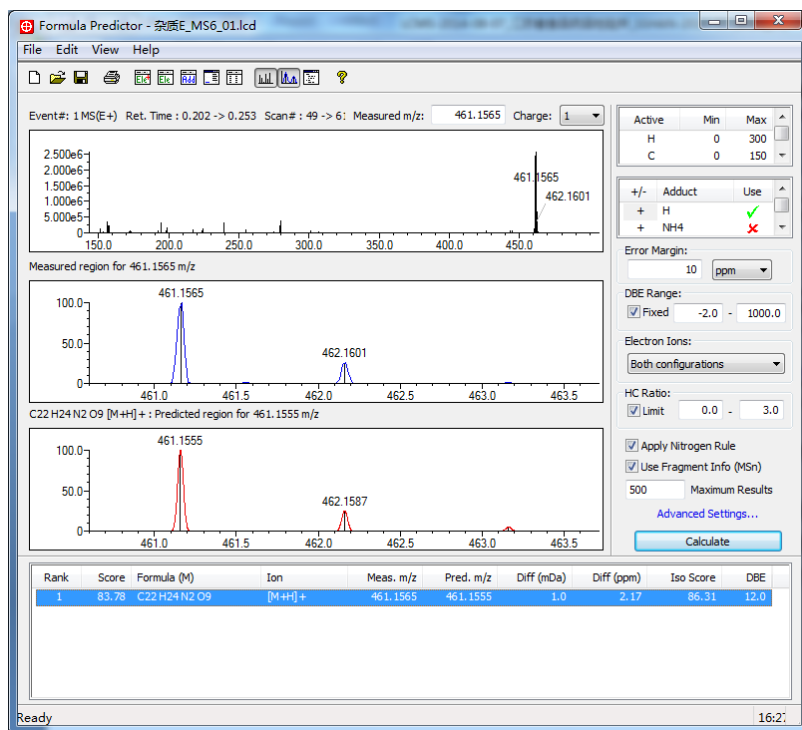


图 8 杂质 E 的六级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₄N₂O₉，与杂质 E 相一致，质量数偏差为 2.17 ppm，根据多级质谱信息推测可能的结构式以及多级质谱裂解规律如下所示：

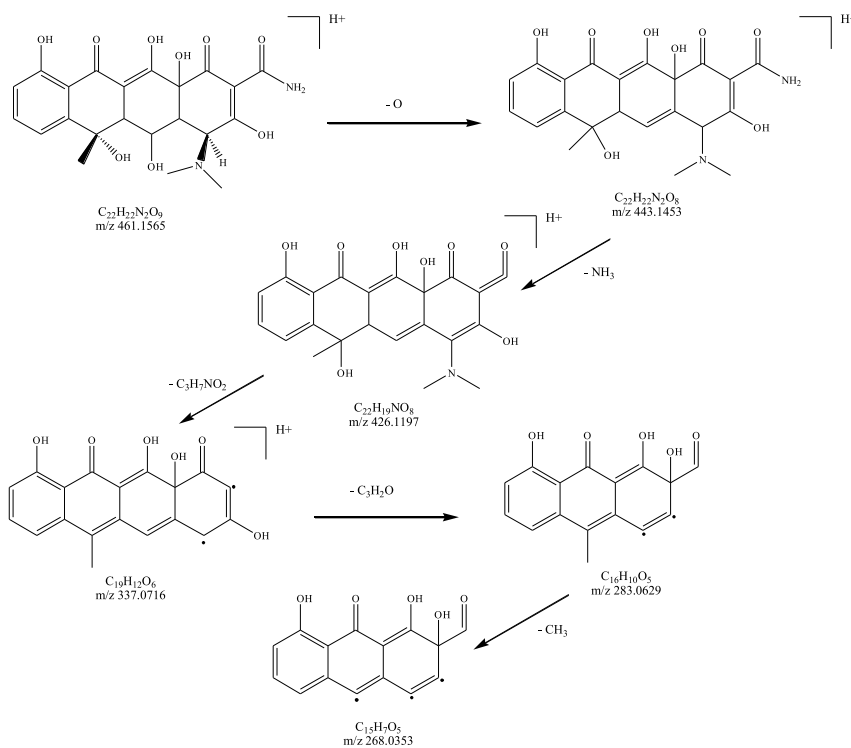
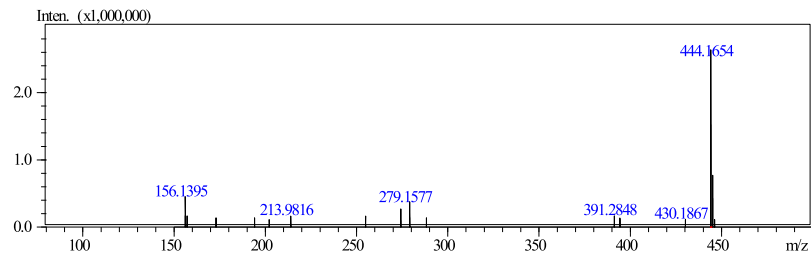


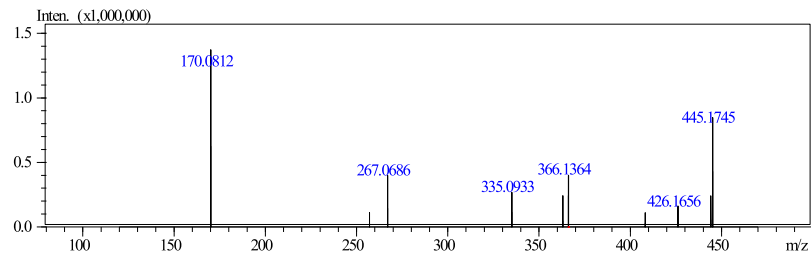
图 9 杂质 E 可能的结构式以及多级质谱裂解规律

2.1.5 杂质 F 质谱分析

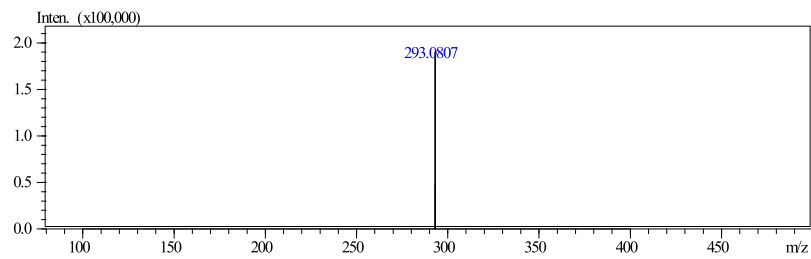
MS¹



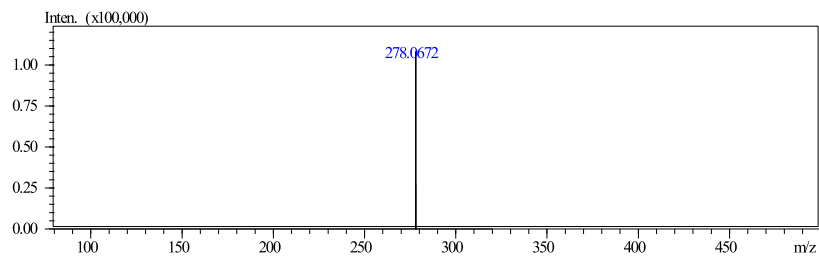
MS² 前体离子444.1654



MS³ 前体离子366.1364



MS⁴ 前体离子293.0807



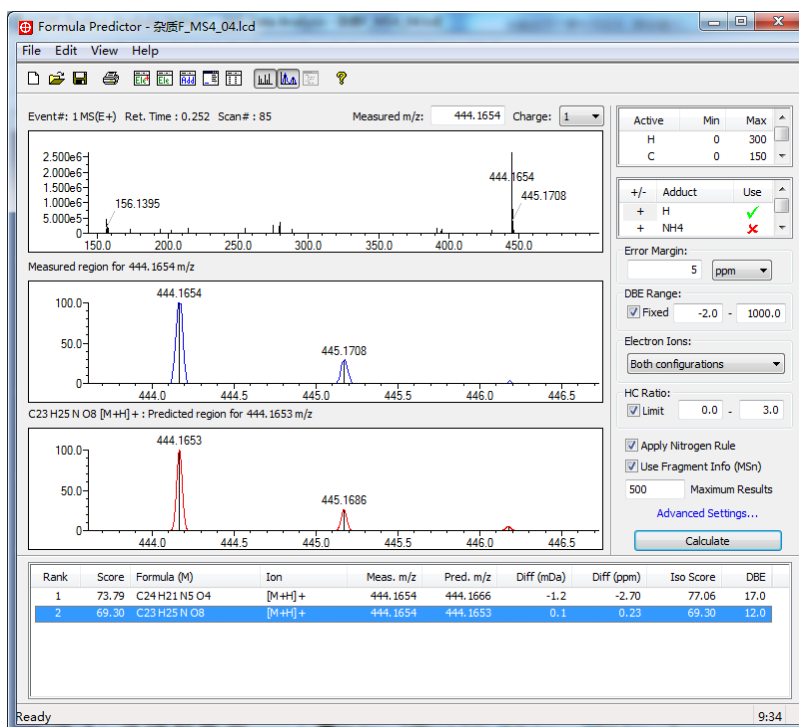


图 10 杂质 F 的四级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₃H₂₅NO₈，与杂质 F 相一致，质量数偏差为 0.23 ppm。根据质谱结果分析其可能的结构式及质谱裂解规律：

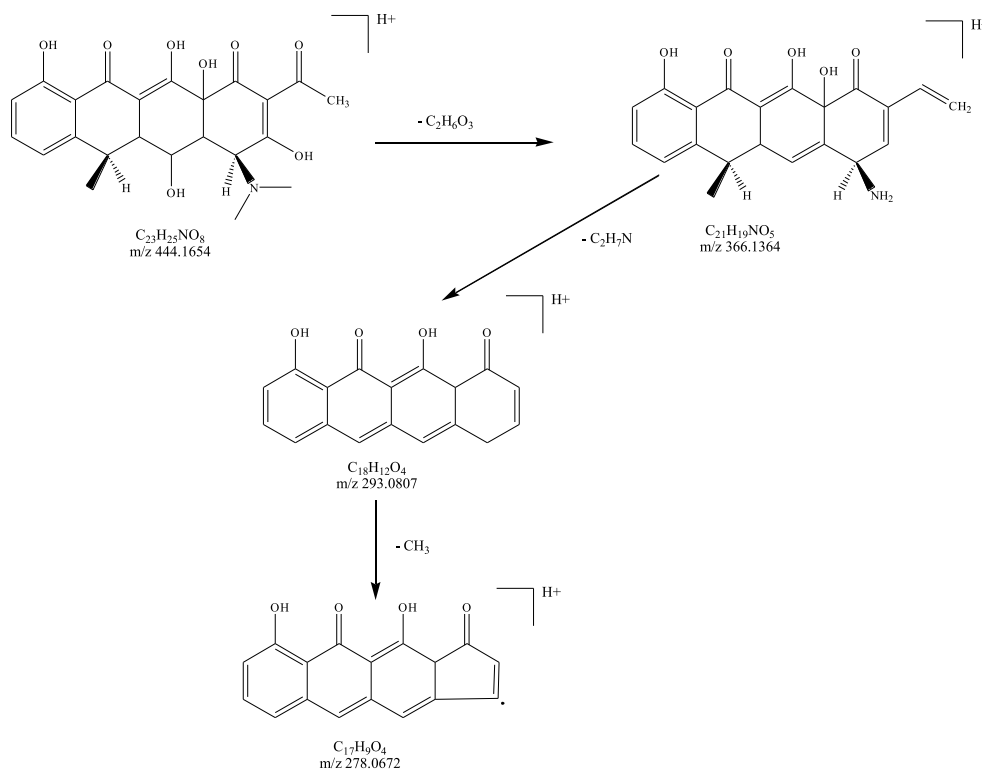


图 11 杂质 F 可能的结构式及质谱裂解规律

2.1.6 对照品多级质谱信息汇总

表 3 对照品多级质谱信息汇总

| 名称 | 多西环素 | 杂质A | 杂质B | 杂质E | 杂质F |
|-----------------|---|---|---|---|---|
| 分子式 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈ | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ | C ₂₃ H ₂₅ NO ₈ |
| MS ¹ | 445.1601 | 445.1598 | 443.1444 | 461.1565 | 444.1654 |
| MS ² | 428.1355 | 428.1345 | 426.1194 | 443.1453 | 366.1364 |
| MS ³ | 321.0755 | 321.0760 | 381.0596 | 426.1193 | 293.0807 |
| MS ⁴ | 267.0636 | 267.0638 | 201.0553 | 337.0710 | 278.0672 |
| MS ⁵ | 252.0410 | 252.0410 | 145.0609 | 283.0606 | - |
| MS ⁶ | - | - | - | 268.0351 | - |

2.2 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 个杂质均有明显吸收。

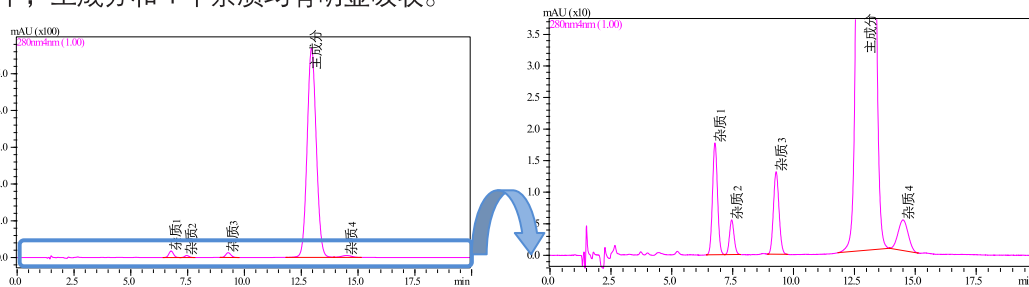


图 12 盐酸多西环素的一维 UV 色谱图

2.2.1 杂质 1 的分析结果 t

将目标杂质 1 切换到 loop 1 中，2D-LC 分析杂质和空白溶剂。二维 UV 色谱图如图 13 所示。从两者对比可以看出，保留时间为 5.705 min 的色谱峰为杂质 1。对杂质 1 进行质谱分析，总离子流图及提取离子流图见图 14，杂质 1 的质谱结果 m/z 为 445.1609，见图 15。

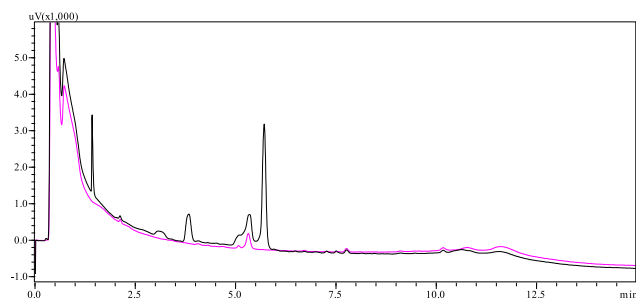


图 13 杂质 1 二维 UV 色谱图 (黑色: 杂质; 玫红色: 空白)

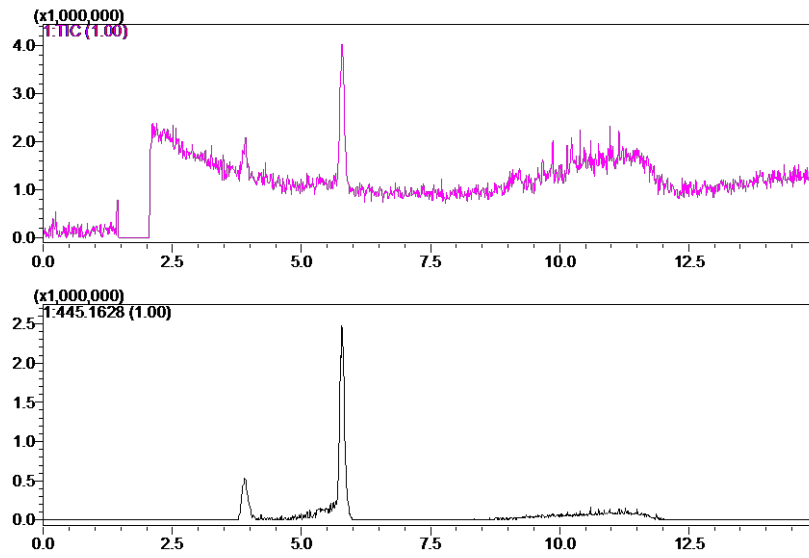
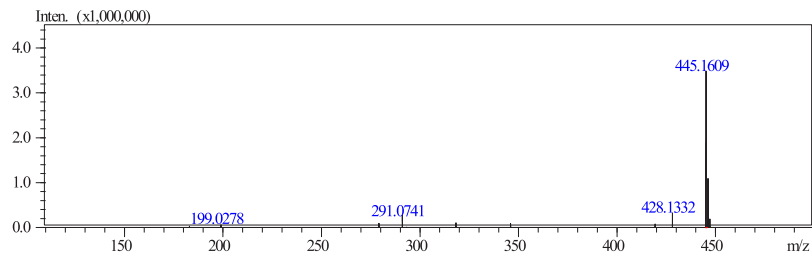
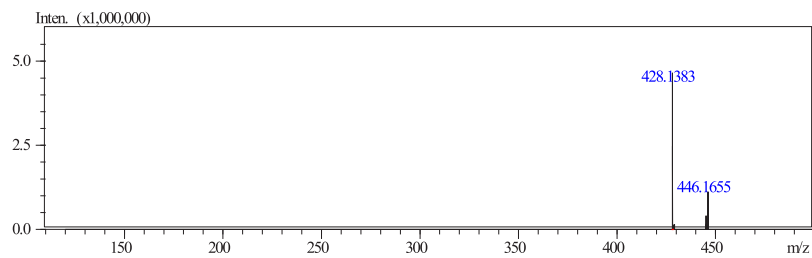


图 14 杂质 1 正离子模式下总离子流图及正离子提取离子流图

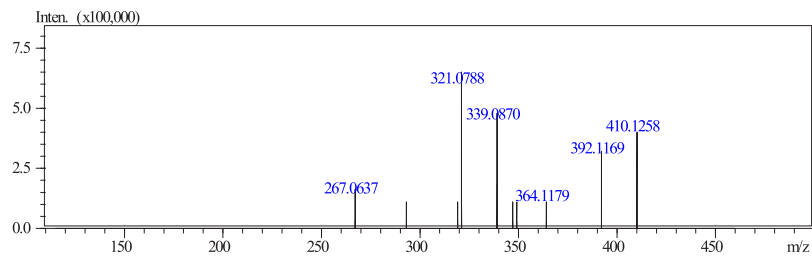
MS¹



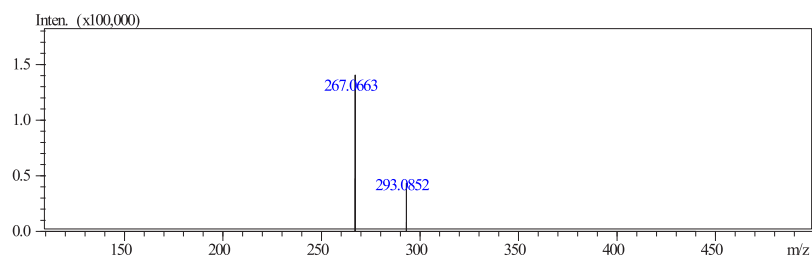
MS² 前体离子 445.1609



MS³ 前体离子 428.1383



MS⁴ 前体离子 321.0788



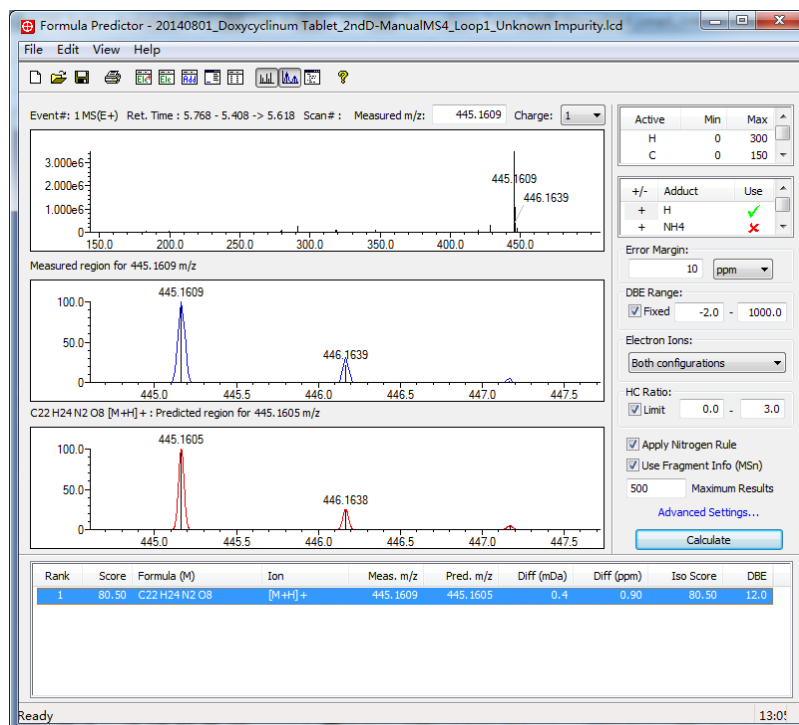


图 15 杂质 1 的四级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₄N₂O₈，质量数偏差为 -1.57 ppm，与主成分多西环素分子式一致，且多级质谱信息几乎一致，杂质 1 应为主成分多西环素的同分异构体，根据保留时间及出峰先后顺序，并结合相关资料，杂质 1 可能为主成分的旋光异构体，可能为杂质 C。可能的结构及多级质谱结果如下：

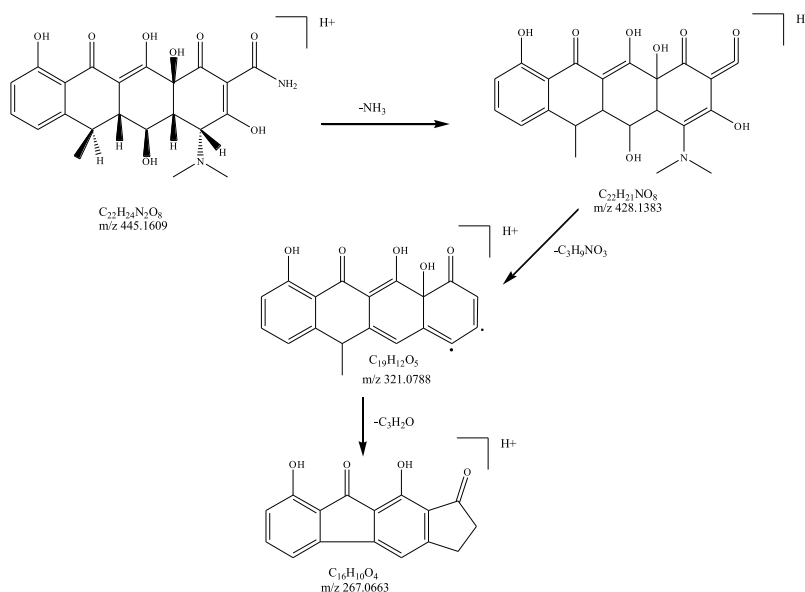


图 16 杂质 1 的可能结果及质谱裂解规律

2.2.2 杂质 2 的分析结果

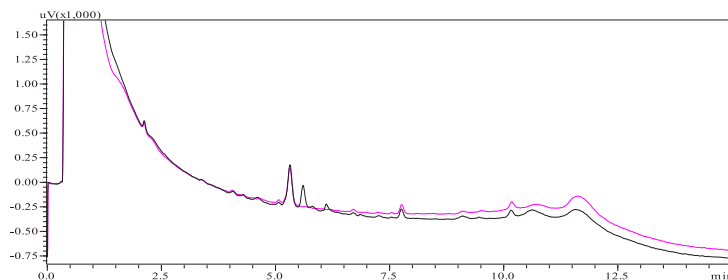


图 17 杂质 2 二维 UV 色谱图 (黑色: 杂质; 玫红色: 空白)

将目标杂质 2 切换到 loop 2 中, 2D-LC 分析杂质和空白溶剂。二维 UV 色谱图如图 17 所示。从两者对比可以看出, 保留时间为 5.596 min 的色谱峰为杂质 2。对杂质 2 进行质谱分析, 总离子流图及提取离子流图见图 18, 杂质 2 的质谱结果 m/z 为 443.1450, 见图 19。

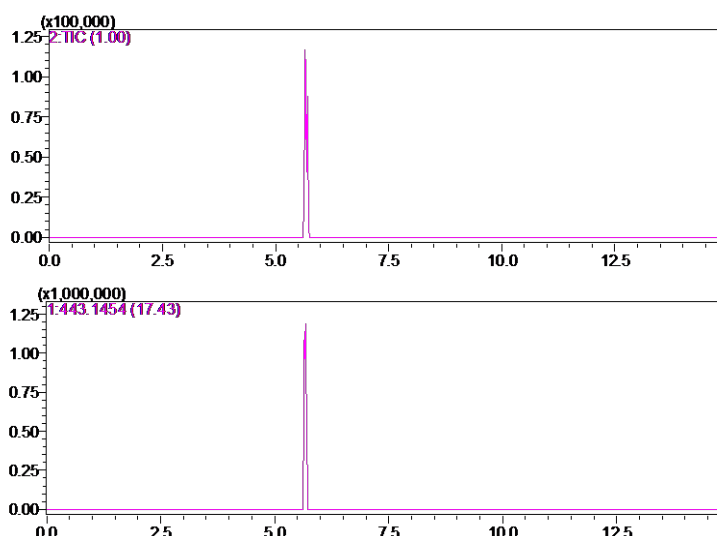
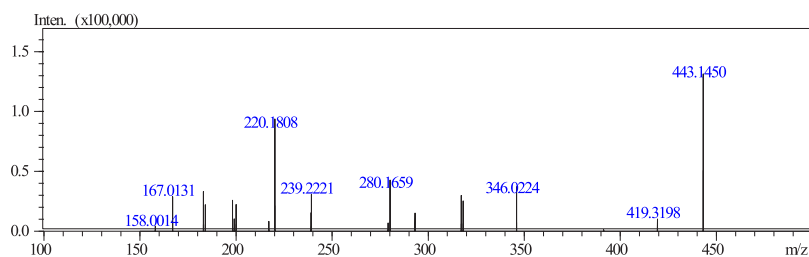
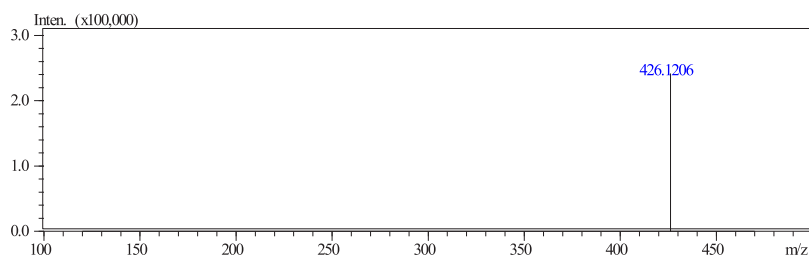


图 18 杂质 2 正离子模式下总离子流图及正离子提取离子流图

MS¹



MS² 前体离子 443.1450



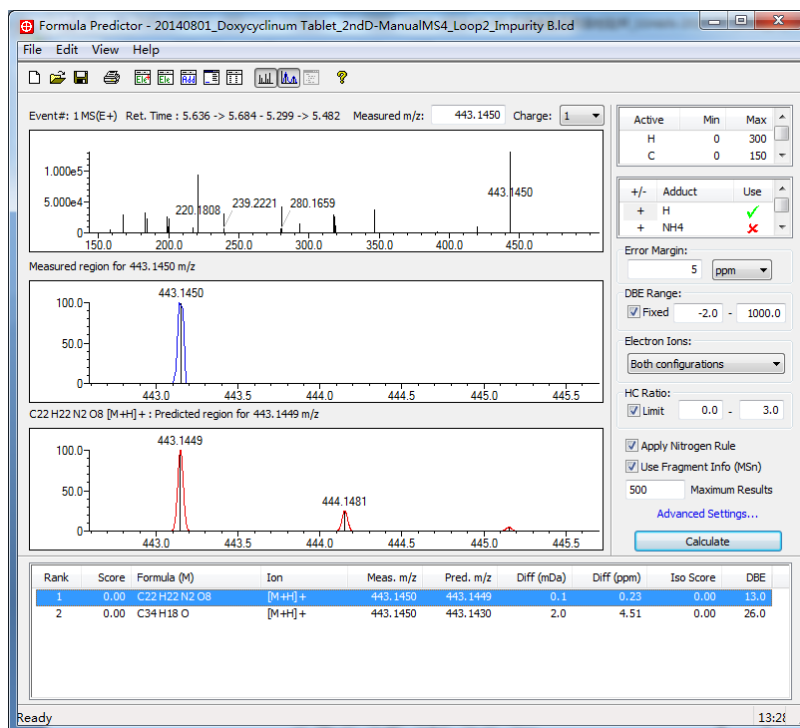


图 19 杂质 2 的二级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₂N₂O₈，质量数偏差为 0.23 ppm，与主成分多西环素相比少了两个 H。且其一级、二级质谱与杂质 B 的一级、二级质谱几乎一致，根据其保留时间、出峰顺序等相关信息，杂质 2 可能是杂质 B。

2.2.3 杂质 3 的分析结果

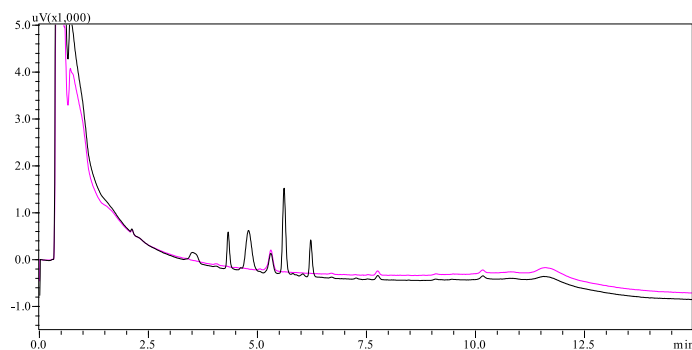


图 20 杂质 3 二维 UV 色谱图 (黑色: 杂质; 玫红色: 空白)

将目标杂质 3 切换到 loop 3 中，2D-LC 分析杂质和空白溶剂。二维 UV 色谱图如图 20 所示。从两者对比可以看出，保留时间为 5.622 min 的色谱峰为杂质 3。对杂质 3 进行质谱分析，总离子流图及提取离子流图见图 21，杂质 3 的质谱结果 m/z 为 445.1615，见图 22。

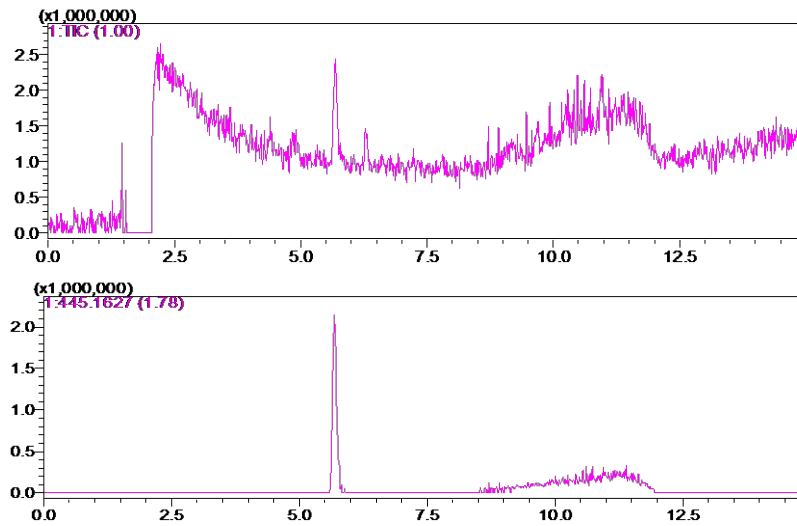
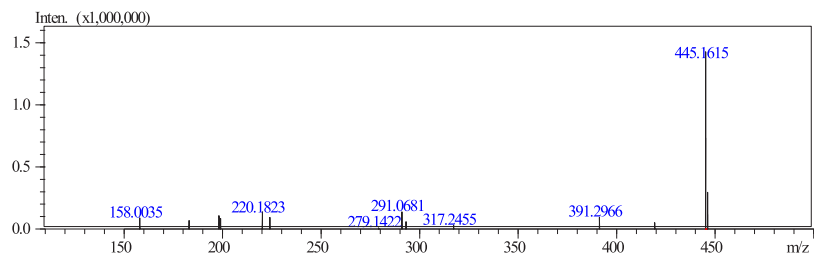
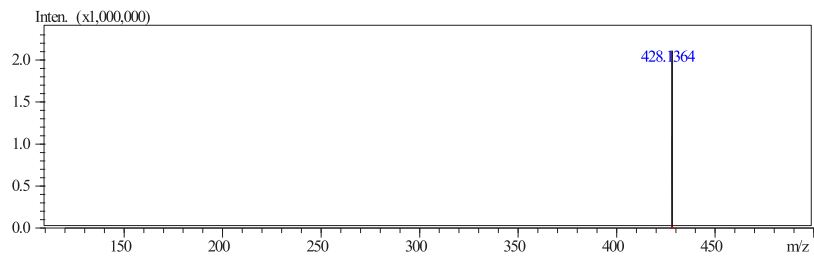


图 21 杂质 3 正离子模式下总离子流图及提取离子流图

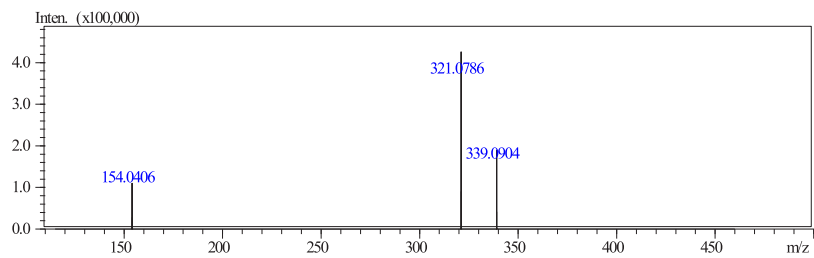
MS¹



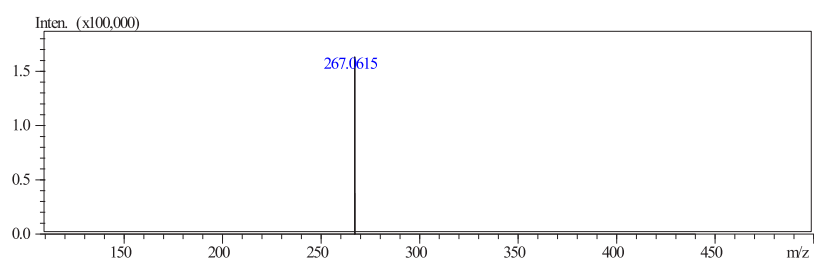
MS² 前体离子 445.1615



MS³ 前体离子 428.1364



MS⁴ 前体离子 321.0786



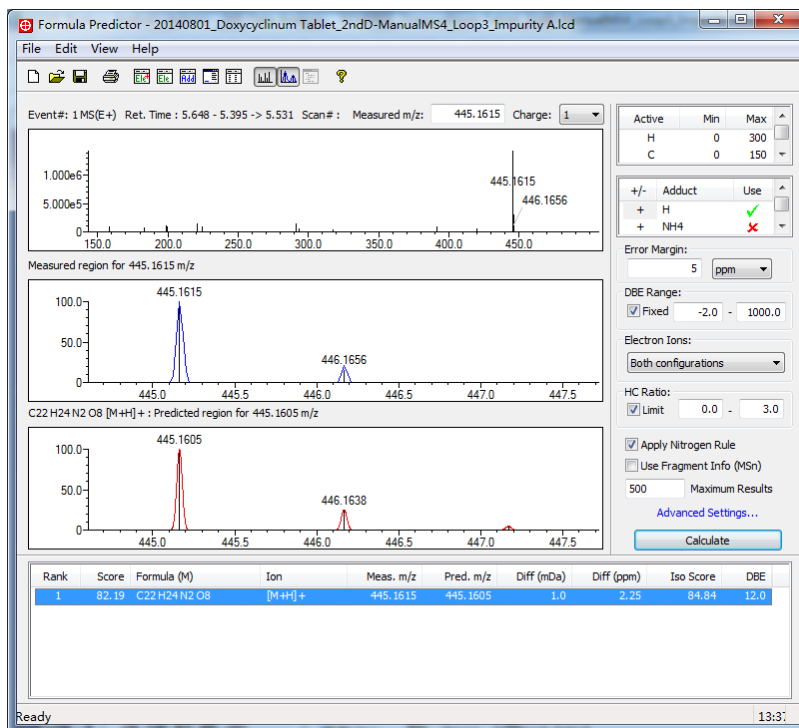


图 22 杂质 3 的四级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₂H₂₄N₂O₈，质量数偏差为 2.25 ppm，与主成分多西环素相分子是一致的，但多级质谱结果略有不同，其多级质谱结果与杂质 A 基本一致，根据其保留时间、出峰顺序等相关信息，杂质 3 可能是杂质 A。

2.2.4 已知杂质 4 的分析结果

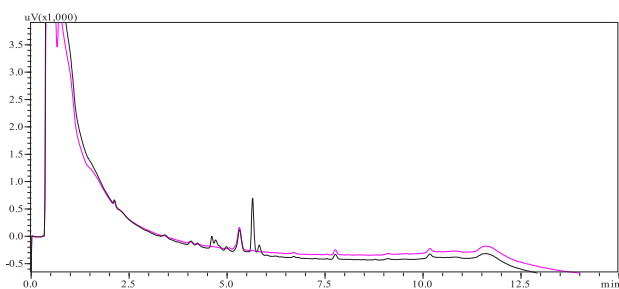
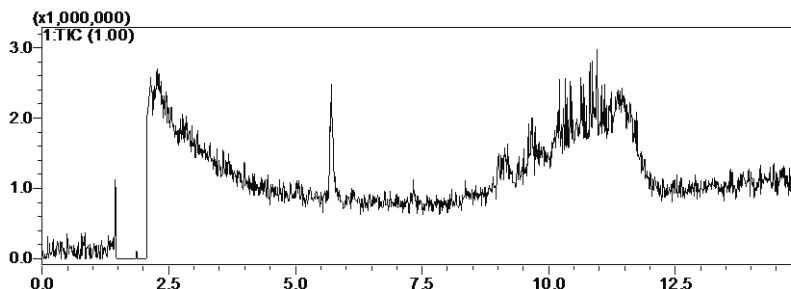


图 23 杂质 4 二维 UV 色谱图 (黑色: 杂质; 玫红色: 空白)

将目标杂质 4 切换到 loop 4 中，2D-LC 分析杂质和空白溶剂。二维 UV 色谱图如图 23 所示。从两者对比可以看出，保留时间为 5.648 min 的色谱峰为杂质 4。对杂质 4 进行质谱分析，总离子流图及提取离子流图见图 24，杂质 4 的质谱结果 m/z 为 444.1660，见图 25。



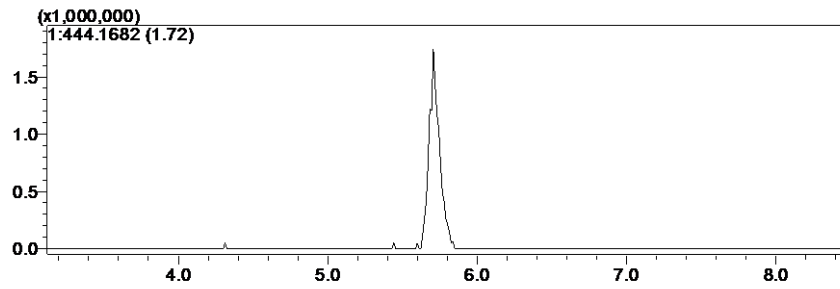
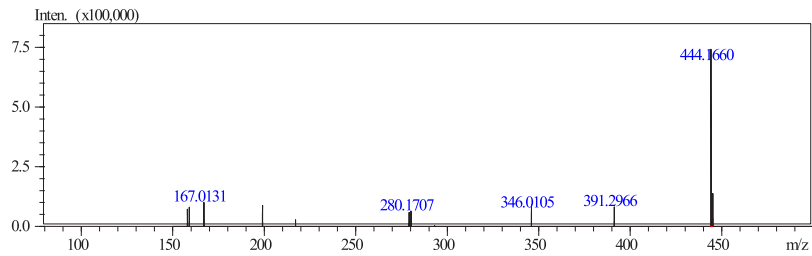
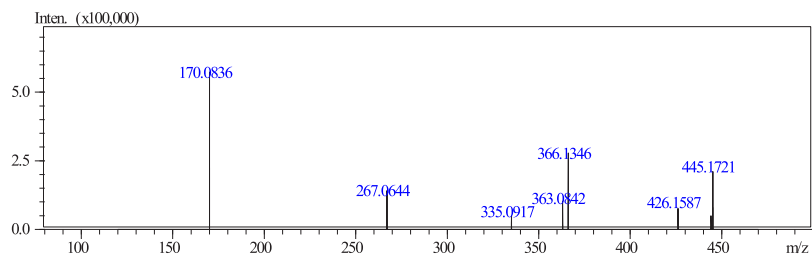


图 24 杂质 4 正离子模式下总离子流图及正离子提取离子流图

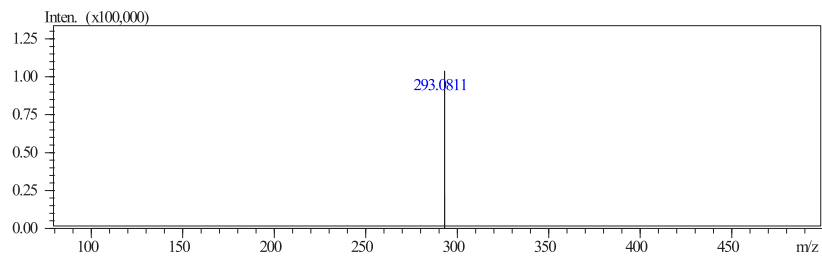
MS¹



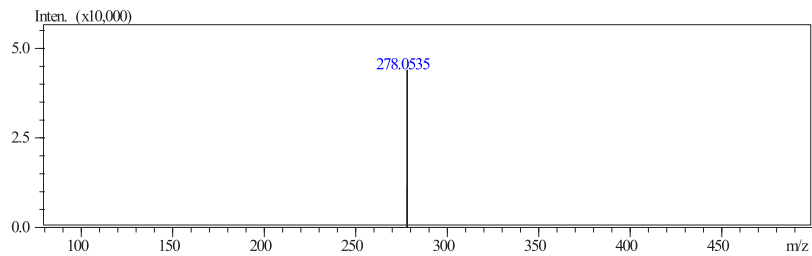
MS² 前体离子444.1660



MS³ 前体 366.1346



MS⁴ 前体离子293.0811



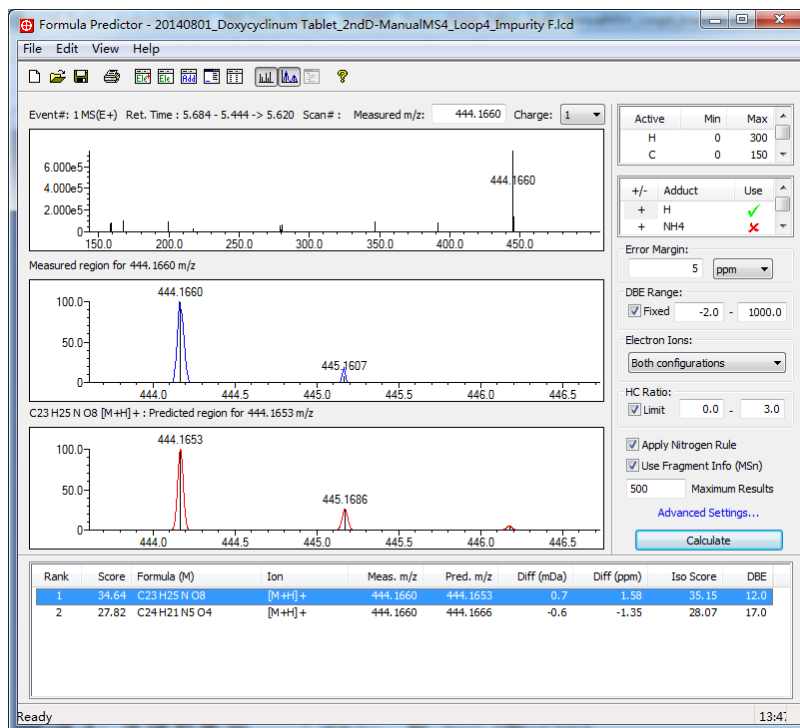


图 25 杂质 4 的四级质谱图及一级质谱分子式预测结果

对一级质谱进行预测，假设元素组成 C、H、O、N，质量数偏差 5 ppm，采用氢碳比，氮规则及多级质谱信息，预测分子式为 C₂₃H₂₅NO₈，质量数偏差为 1.58 ppm，其多级质谱与杂质 F 基本一致，根据其保留时间、出峰顺序等相关信息，杂质 4 可能是杂质 F。

2.2.5 杂质分析结果汇总

表 4 盐酸多西环素中杂质分析结果汇总

| 杂质 No. | 可能的杂质 | 1stD保留时间 (min) | 2ndD保留时间 (min) | 实测 m/z | 预测得分子式 | 理论 m/z | 质量数偏差 (ppm) |
|--------|-------|----------------|----------------|----------|---|----------|-------------|
| 杂质1 | 杂质C | 6.826 | 5.705 | 445.1609 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 445.1605 | 0.90 |
| 杂质2 | 杂质B | 7.516 | 5.596 | 443.1454 | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈ | 443.1449 | 0.23 |
| 杂质3 | 杂质A | 9.351 | 5.622 | 445.1615 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 445.1605 | 2.25 |
| 杂质4 | 杂质F | 14.621 | 5.648 | 444.1660 | C ₂₃ H ₂₅ NO ₈ | 444.1653 | 0.23 |

结论

本文建立了一种使用非挥发性缓冲液作为流动相，2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统在线定性检测盐酸多西环素药物中 4 个杂质的方法。该方法由于保留了药典分析所用的流动相，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的时间。