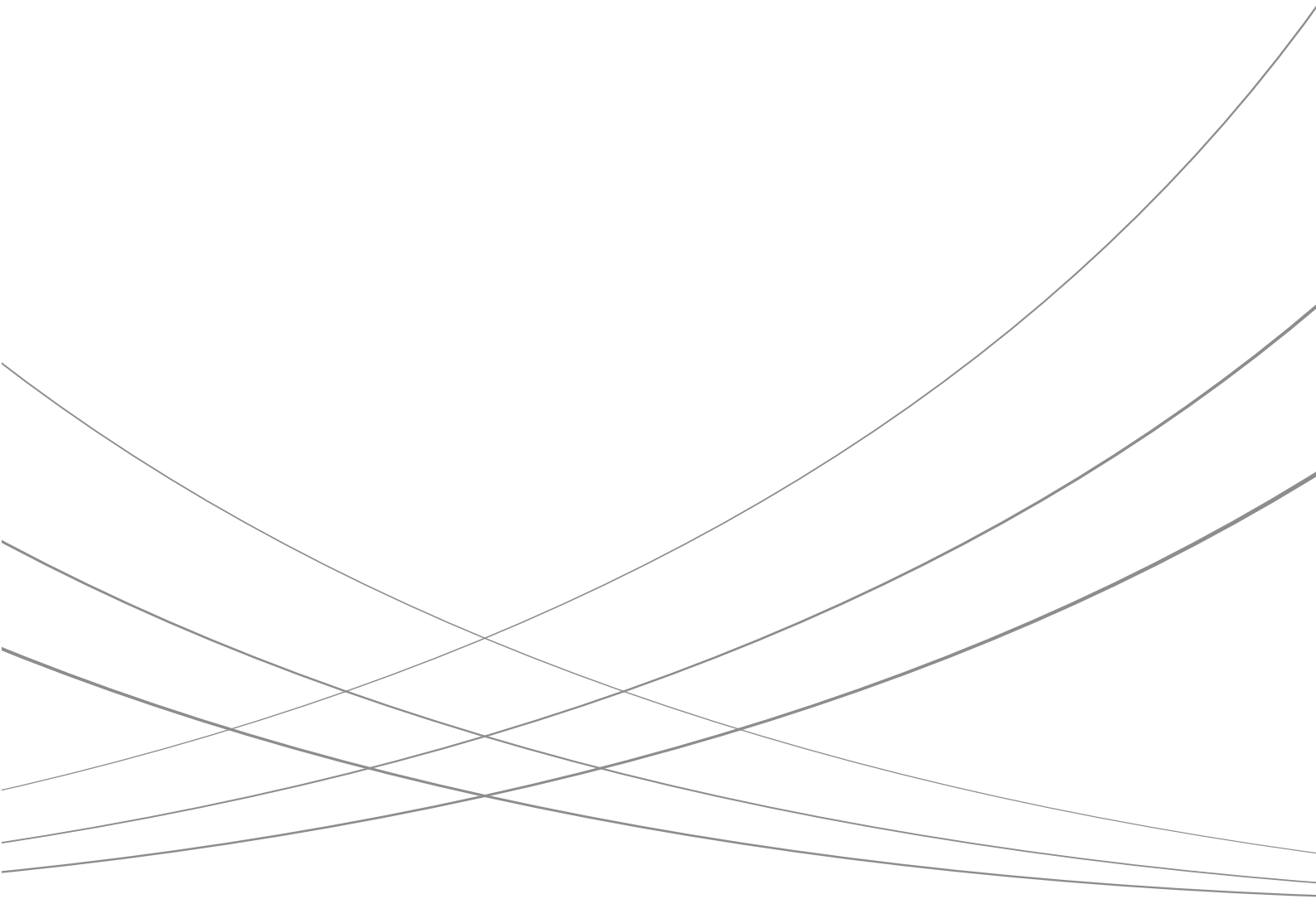


## 岛津 LC/LCMS

# 药物杂质鉴定解决方案



## 序言

药物杂质是活性药物成分（API，原料药）或药物制剂中不希望存在的化学成分。原料药中的杂质可能源于合成过程或起始物料、中间体、溶剂、催化剂，以及反应副产物等其它来源。ICH 指南（INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE）将原料药相关杂质分为三个大类：有机杂质，无机杂质和溶剂残留。ICH 规定要求：申报时新药原料药中有机杂质实际存在的表观量大于或等于 0.1%的杂质（以原料药的响应因子计算所得量）应有其结构特征描述，并对模拟上市生产的批次中，反复出现的大于或等于 0.1%的杂质予以界定。申报药物中各种杂质的数量将影响最终药品的安全性。因此，杂质的鉴别、定量、定性和控制已成为药物开发过程的关键组成部分。目前，各国药典，例如美国药典（USP）、日本药典（JP）、和欧洲药典（EP）对原料药和药品制剂中杂质限量水平的规定也越来越多。

岛津公司长期以来，一直致力于药物检测领域，对于药物中杂质，特别是未知杂质的检测技术在不断的创新。岛津公司的科研人员，不仅仅满足于常规的检测手段，而且为了满足未来新药杂质鉴定的更高要求，不断的推出灵敏度更高、定性可靠度更大、操作更便利的分析系统，为科研人员工作效率的提高不断努力着。早在 2000 年，岛津公司与 Eisai 制药公司就合作研发了 Co-Sense for Impurity 分析系统（Co-Sense: Collaboration of Shimadzu and Eisai for New Systematic Efficiency）。该系统不仅可以使使用非挥发性缓冲盐作为分析条件进行药物的 LC/MS 分析，而且通过杂质富集大大提高了检测的灵敏度。尽管 Co-Sense for Impurity 系统在微量未知药物杂质鉴定方面发挥着重要的作用，但是岛津公司的研发人员仍然不满足于现状，进一步研发出了 2D LC/MS 杂质鉴定系统。该系统是为药物中杂质鉴定量身定做的利器：首先，可以实现非挥发性缓冲盐作为流动相的 LCMS 分析；其次，该系统一针进样即可对多个杂质同时进行分析，大大提高了分析的通量；再次，该系统使用定量环捕集药物杂质，相比于捕集柱，无需摸索捕集条件，即可捕集任何性质的杂质。

岛津公司作为全球著名的分析仪器厂商，自 1875 年创业以来，始终继承创始人岛津源藏的创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术。长期以来，岛津公司一致关注制药领域的检测，及时提供全面的解决方案。

本册应用文集收录了 10 篇代表性的药物杂质鉴定相关的应用数据，其中 2D LC/MS 杂质鉴定系统 3 篇，常规 LCMS-IT-TOF 5 篇，Co-Sense for Impurity 分析系统 2 篇，供相关用户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司

## 目 录

第一部分 2D LC/MS 杂质鉴定系统在药物杂质鉴定中的应用 .....	1
1.2D LC/MS 杂质鉴定系统工作原理.....	1
2.2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测磺胺类药物中的杂质 .....	5
3.2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测阿托伐他汀药物杂质 .....	10
4.2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测盐酸倍他司汀药物杂质 .....	17
第二部分 常规 LCMS-IT-TOF 分析系统在药物杂质鉴定中的应用 .....	23
1.LCMS-IT-TOF 液质联用仪工作原理 .....	23
2.离子阱飞行时间质谱定性检测氯噻酮及其杂质 .....	24
3.离子阱飞行时间质谱定性分析文拉法辛中间体及杂质 .....	28
4.液相色谱-离子阱飞行时间质谱定性分析头孢米诺钠及杂质.....	31
5.离子阱飞行时间质谱定性检测阿扎那韦中间体中的杂质 .....	34
6.阿莫西林原料药目标杂质的结构鉴定.....	40
第三部分 Co-sense for Impurity 分析系统在药物杂质鉴定中的应用 .....	47
1.Co-sense for Impurity 分析系统工作原理 .....	47
2.使用 HPLC 高灵敏度定量分析痕量杂质和活性组分.....	49
3.Co-Sense for Impurity 系统对原料药中杂质的 LC/MS/MS 分析 .....	52

# 第一部分 2D LC/MS 杂质鉴定系统在药物杂质鉴定中的应用

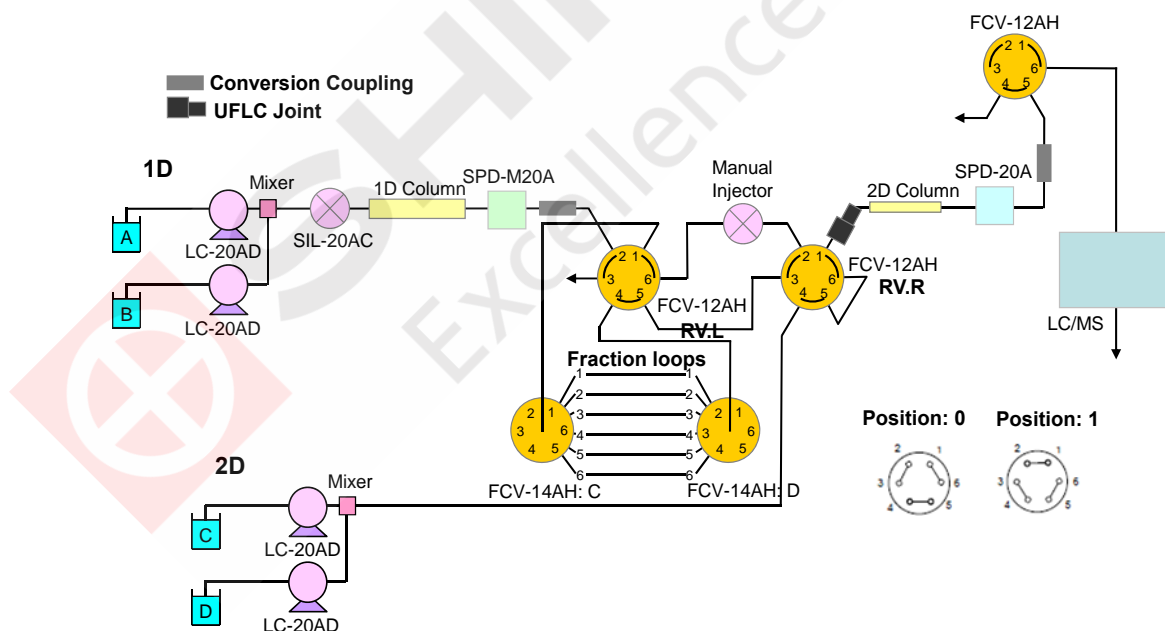
## 2D LC/MS 杂质鉴定系统工作原理

岛津公司在 Co-Sense for Impurity 系统的基础上不断改进，研发出了 2D LC/MS 杂质鉴定系统。该系统沿承了使用非挥发性缓冲盐的优势，在杂质捕集方面做了更加便利的设计。相比 Co-Sense for Impurity 系统，该系统使用多个 loop 环取代捕集柱，不但增加了捕集的容量而且节省了探索捕集条件的时间；同时 2D 部分增加了紫外检测器，可以更加灵活的监控杂质的出峰。

该系统是为药物中杂质鉴定量身定做的利器。目前，根据药典的规定和分离的要求，很多药品都在使用磷酸盐作缓冲液和离子对试剂作为流动相。但它们作为不挥发性的盐，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。如果将其换成挥发性的盐，往往会导致药物杂质的保留时间甚至出峰顺序发生变化，为杂质的定性带来困难。使用该系统可以将使用非挥发性缓冲盐甚至是离子对试剂的 LC 分析方法直接移植过来，即保证了目标杂质的定位，提高了杂质定性的准确性，而且节省了方法开发人员的时间。

2D LC/MS 杂质鉴定系统的系统流路及详细的分析过程如下所述。

系统流路图如下所示：



2D LC/MS 系统分析过程如下：

1. 1<sup>st</sup>D 初始状态，药物样品进样，如图 1 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。

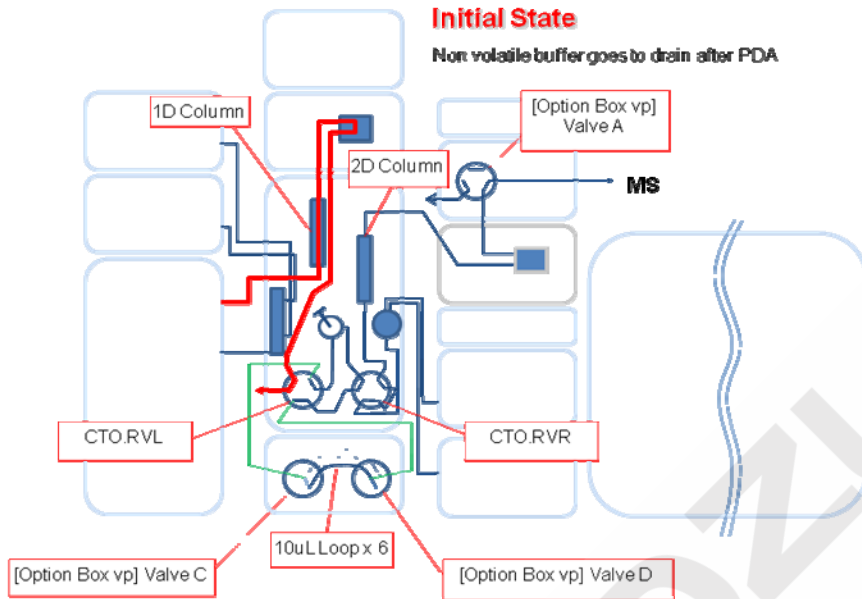


图 1. 初始状态，1<sup>st</sup>D 分析

2. 1<sup>st</sup>D 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 2 和图 3 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。

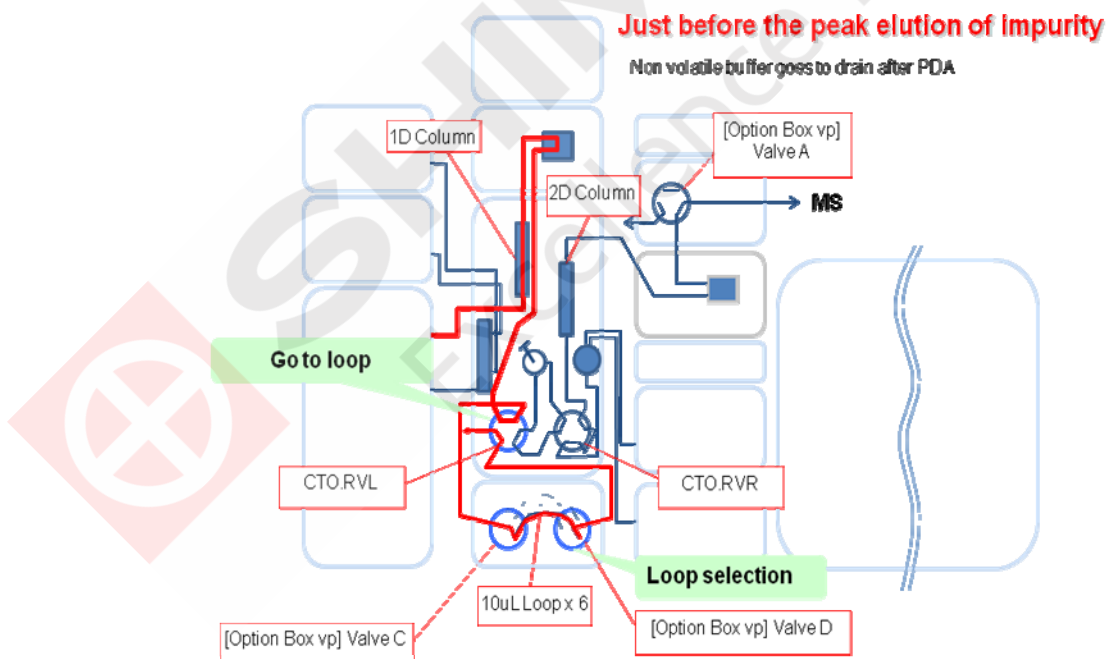


图 2. 在杂质洗脱下来前切换馏分环到指定位置，切换 RVL 到 1 位。

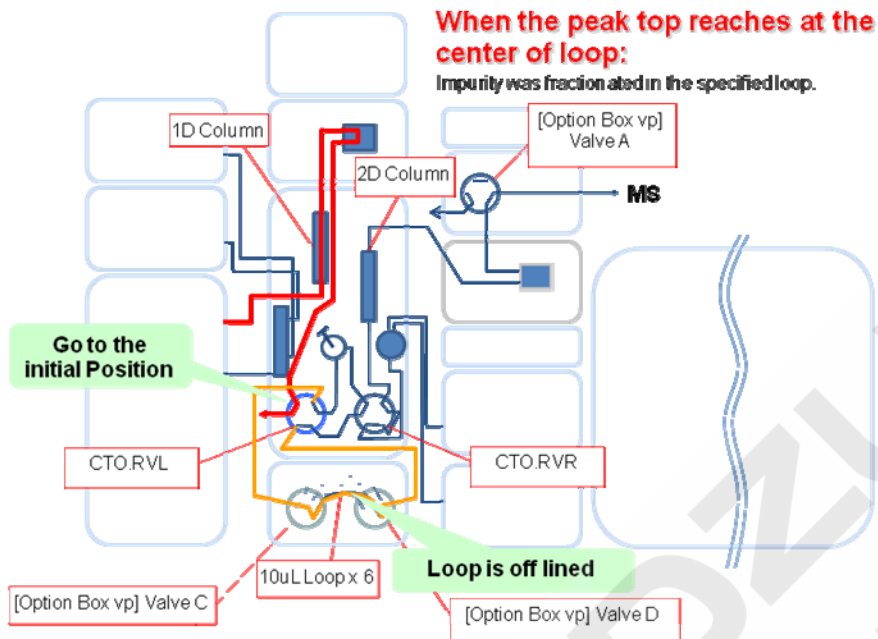


图 3. 当峰顶到达馏分环的中央时，RVL 到 0 位，停止收集。

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

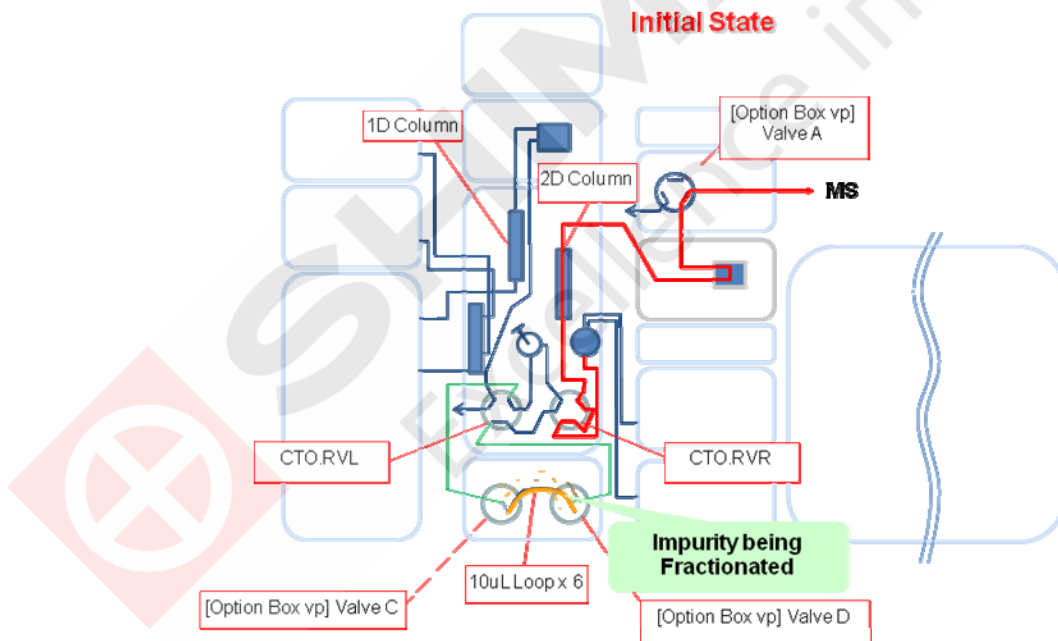


图 4. 2<sup>nd</sup>D 初始状态

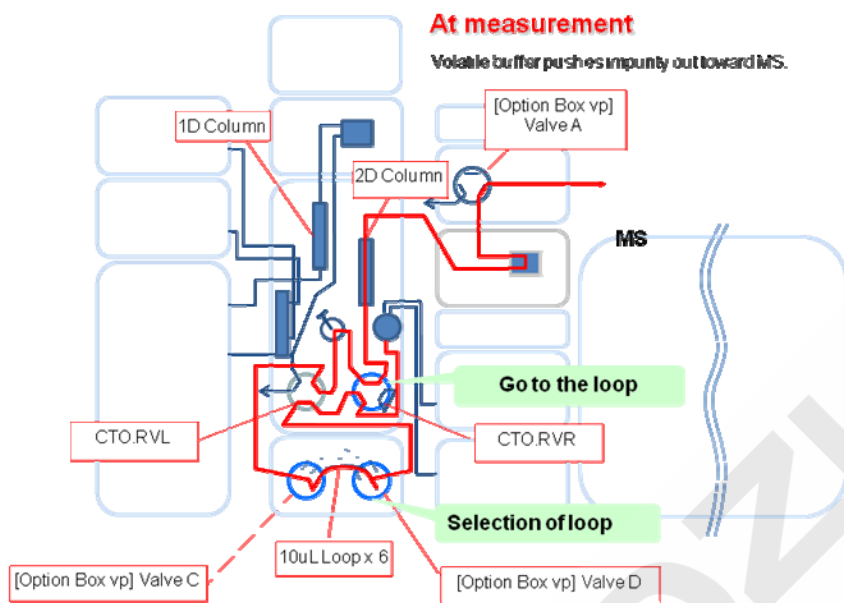


图 5. 2<sup>nd</sup>D 馏分环中杂质被输送经过柱子分离后进质谱

4. 平衡 1<sup>st</sup>D 流路, 准备进行下一组分析。
5. 重复 1 到 4 的步骤, 只是样品变成了溶剂, 得到空白数据。完整的批处理如图 6 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 LCMS-IT-TOF 得到的多级质谱信息解析杂质的结构。

Analysis	Vial#	Tray Name	Ini. 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.blank.lcd
10	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop6.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop6.blank.lcd
11	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop1.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop1.blank.lcd
12	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop2.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop2.blank.lcd
13	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop3.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop3.blank.lcd
14	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop4.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop4.blank.lcd
15	-1	1	10			D:\2DLC\2ndD-LCMS_loop5.lcm	20100921_2ndD-LCMS_loop5.blank.lcd

图 6. 完整的批处理表

## 2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测磺胺类药物中的杂质

**摘要:** 本文建立了使用2D LC/MS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噁啉）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质谱定性分析。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/MS 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/MS 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（LCMS-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/MS 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。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

分析仪器： 2D LC/MS 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-20A<sub>5</sub>（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-飞行时间质谱仪）和 LCMSsolution Ver.3.60(工作站)。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

###### <LC 1<sup>st</sup>D>

色 谱 柱： Shim-pack VP-ODS,  
4.6 mm I.D. × 150 mm, 5 μm

流 速： 1 mL/min

流 动 相： 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐 (pH 2.6)  
/MeOH (7/3, V/V)

柱 温： 40 °C

进样体积: 10  $\mu$ L

检测波长: 200 ~ 350 nm (检测: 270 nm)

<LC 2<sup>nd</sup>D>

色谱柱: Shim-pack XR-ODS

10%B (10.01 ~ 20 min)

2.0 mm I.D.  $\times$  75 mm, 2.2  $\mu$ m

流速: 0.3 mL/min

流动相 A: 0.1%甲酸水溶液

柱温: 40  $^{\circ}$ C

流动相 B: 甲醇

进样体积: 10  $\mu$ L (Loop 环体积)

时间程序: 10%B (0 min) ~ 50%B (10 min) ~

检测波长: 270 nm

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-IT-TOF

干燥气: 氮气 10 L/min

离子源: ESI(+), ESI(-)

碰撞气: 氦气

离子源接口电压: 4.5 kV, -3.5 kV

脱溶剂管温度: 200  $^{\circ}$ C

采集范围: m/z 100-1000

加热模块温度: 200  $^{\circ}$ C

雾化气: 氮气 1.5 L/min

### 1.3 样品制备

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

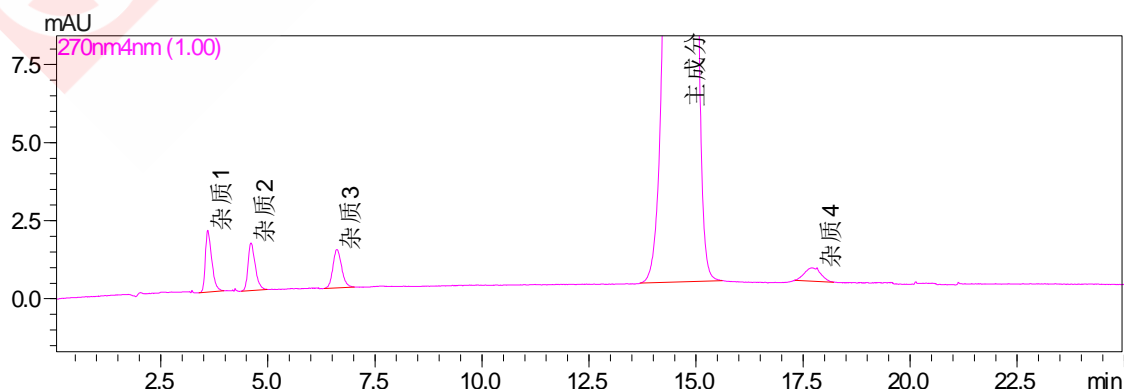
本次实验涉及的标准品信息如下:

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 <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	311.0809	122-11-2
杂质	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	265.0754	127-79-7
杂质	磺胺二甲基嘧啶	sulfamethazine/Sulfadimidine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	279.0910	57-68-1
杂质	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	281.0703	1220-83-3
杂质	磺胺喹噁啉	Sulfachinoxalin/Sulfaquinoxaline	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	301.0754	59-40-5

## 2. 结果讨论

### 2.1 LC 1<sup>st</sup>D 分析结果

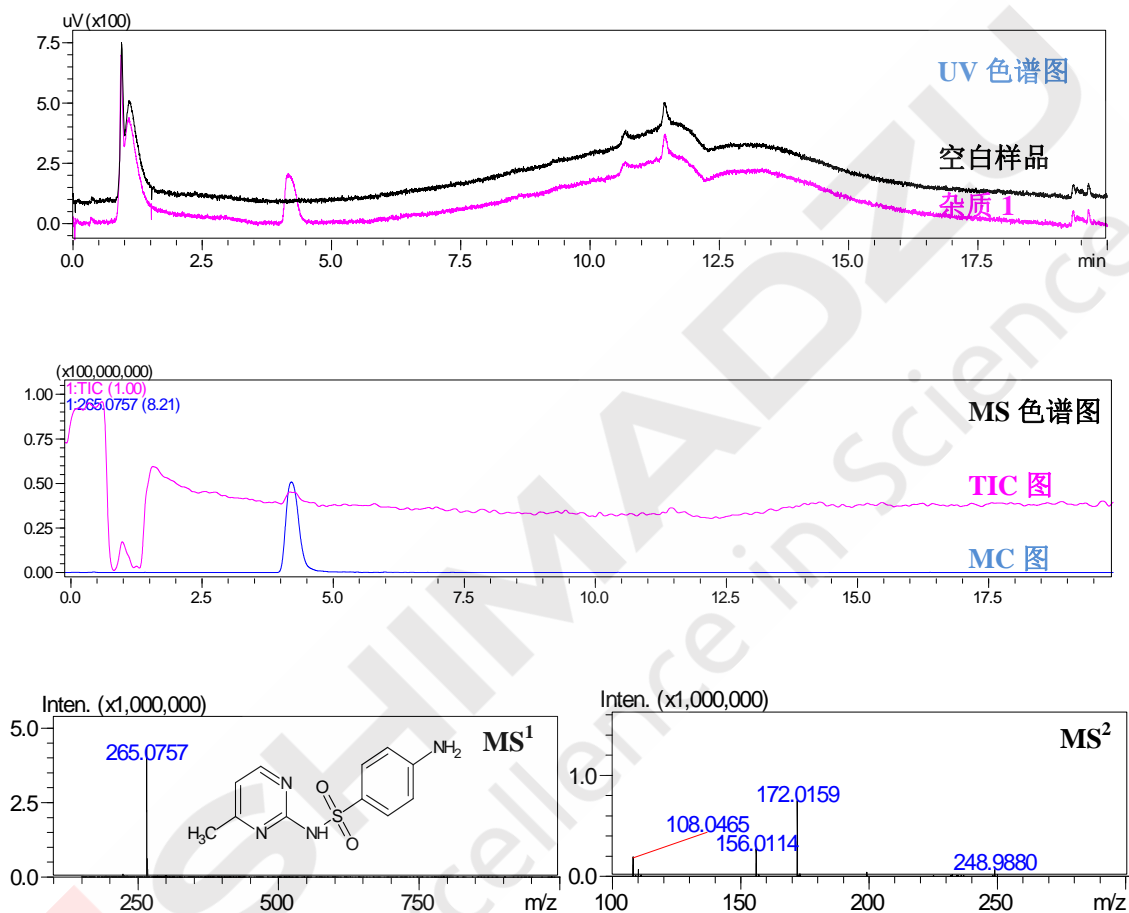
1<sup>st</sup>D 分析的主要目的为确定目标杂质的保留时间, 以便于捕集到 LOOP 环中, 用于二维脱盐分析。本次实验 1<sup>st</sup>D 色谱图如下, 主成分和 4 个杂质的出峰时间分别为: 3.59 min, 4.60 min, 6.61 min, 17.82 min 和 14.65 min。



## 2.2 LC 2<sup>nd</sup>D 分析结果

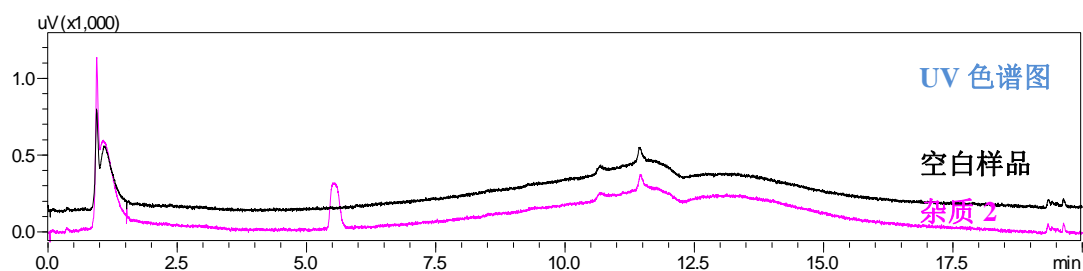
### 2.2.1 杂质 1 的分析结果

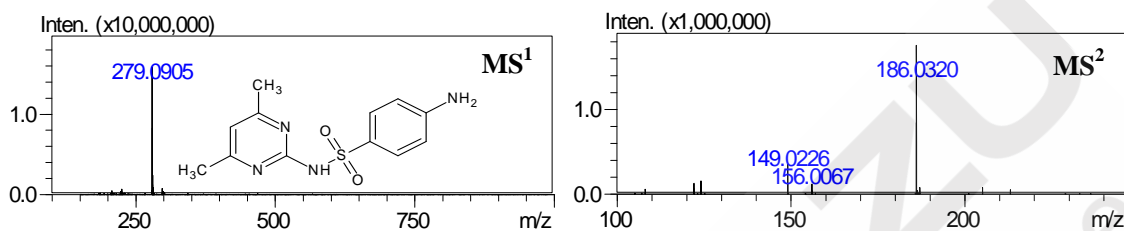
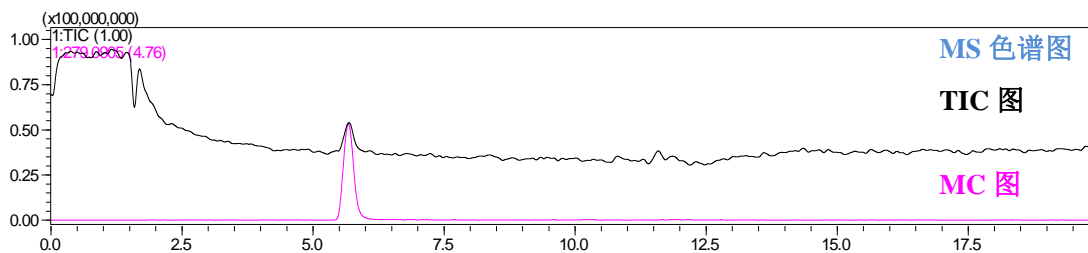
杂质 1 切换到 LOOP 环 1 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出杂质 1 正离子模式  $m/z$  265.0757, 为磺胺甲基嘧啶, 分子式  $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ , 理论值  $[M+H]^+$  265.0754, 测试值与理论值偏差为 1.13 ppm。使用自动二级功能得到磺胺甲基嘧啶的二级质谱图, 质谱图如下所示。



### 2.2.2 杂质 2 的分析结果

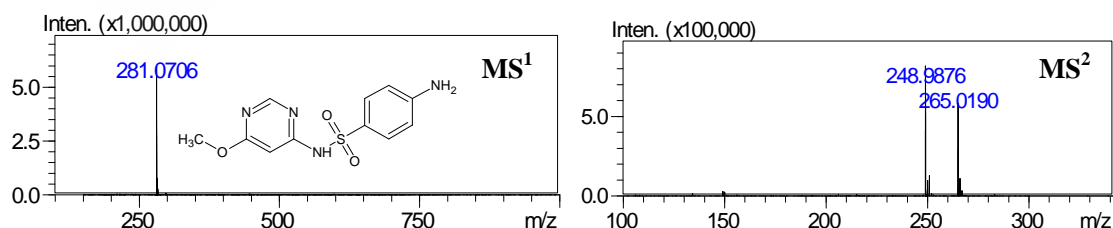
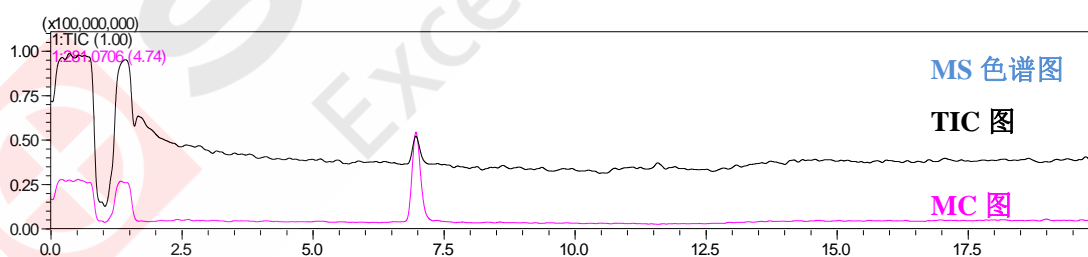
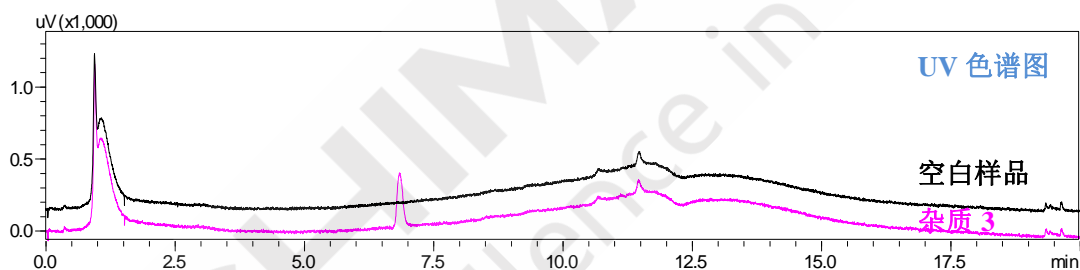
杂质 2 切换到 LOOP 环 2 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出杂质 2 正离子模式  $m/z$  279.0905, 为磺胺二甲基嘧啶, 分子式  $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ , 理论值  $[M+H]^+$  279.0910, 测试值与理论值偏差为 -1.79 ppm。使用自动二级功能得到磺胺二甲基嘧啶的二级质谱图, 质谱图如下所示。





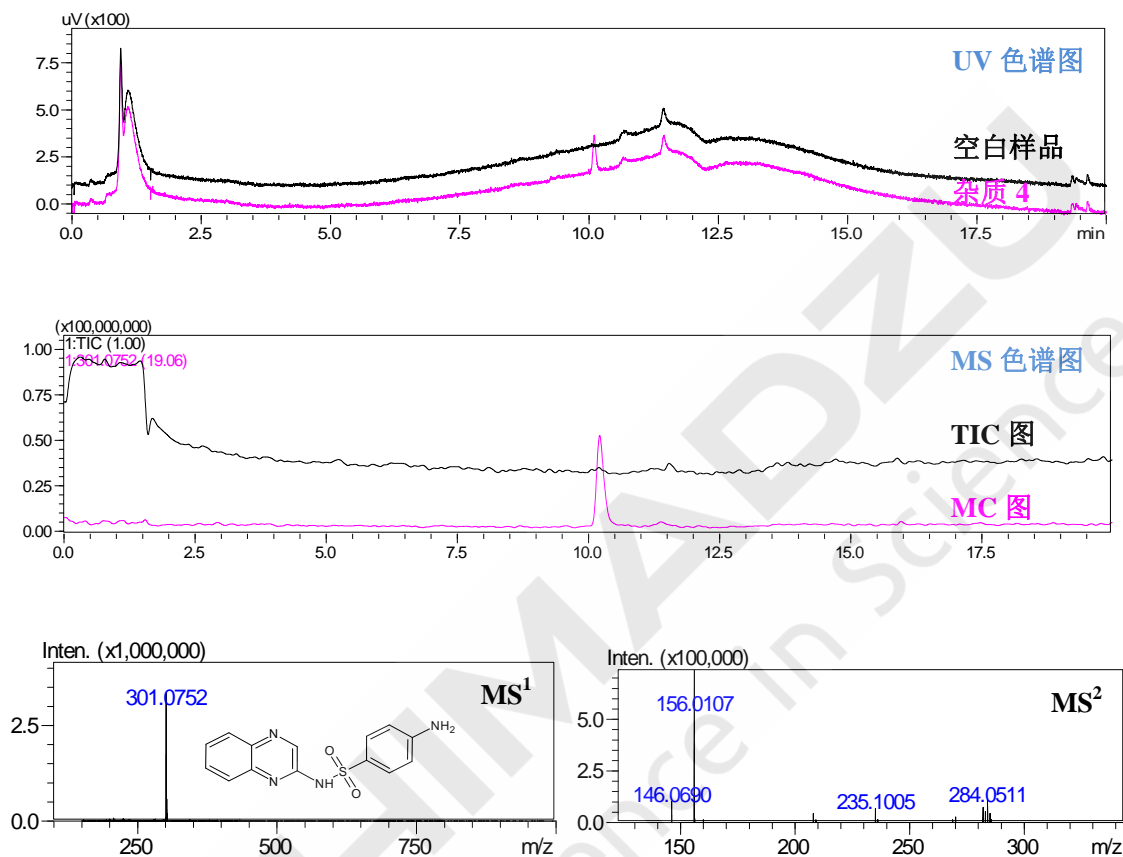
### 2.2.3 杂质 3 的分析结果

杂质 3 切换到 LOOP 环 3 中，经过 2D LC 分析，得到 UV 色谱图和 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。



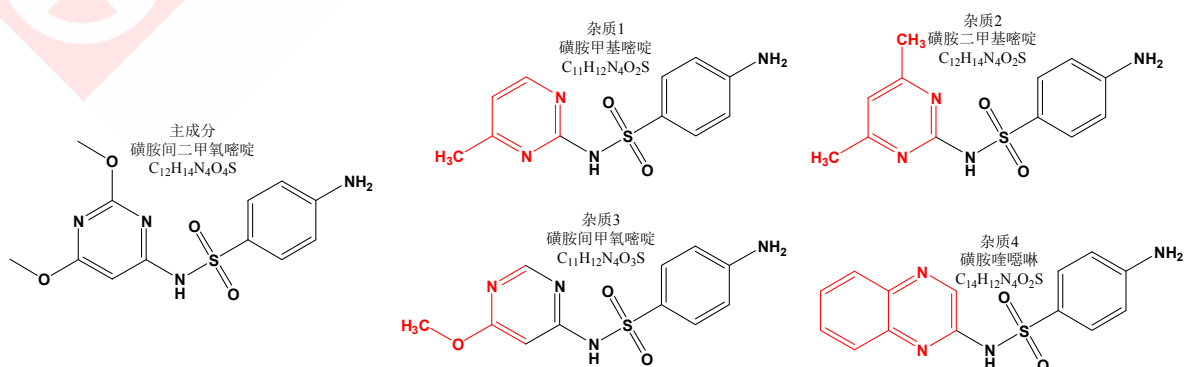
## 2.2.4 杂质 4 的分析结果

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, 为磺胺喹噁啉, 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噁啉的二级质谱图, 质谱图如下所示。



## 3. 结论

本文建立了使用 2D LC/MS 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 LCMS-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。



## 2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测阿托伐他汀药物杂质

**摘要:** 本文建立了使用2D LC/MS杂质鉴定系统定性检测阿托伐他汀药物中4个已知杂质（阿托伐他汀杂质A、阿托伐他汀杂质F、阿托伐他汀杂质G以及阿托伐他汀杂质H）和1个未知杂质（阿托伐他汀脱氢酸）的方法。该方法使用非挥发性的柠檬酸缓冲盐作为流动相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质谱定性分析。该系统由于无需将非挥发性缓冲盐转换为挥发性缓冲盐，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:** 阿托伐他汀 杂质 离子对试剂 2D LC/MS 杂质鉴定系统

目前，根据药典的规定和分离的要求，很多药品都在使用磷酸盐作为缓冲液或离子对试剂。但它们作为非挥发性的盐，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/MS杂质鉴定系统使用之前，研究机构和药厂通过方法转换（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。2D LC/MS杂质鉴定系统克服了这一局面，用户即使使用磷酸盐或离子对试剂，也可以在线使用LCMS-IT-TOF进行杂质鉴定。本文使用2D LC/MS杂质鉴定系统定性检测了阿托伐他汀药物中4个已知杂质和1个未知杂质。供相关人员参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

分析仪器：2D LC/MS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-20A<sub>5</sub>（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

##### 1.1 液相色谱条件

###### <LC 1<sup>st</sup>D>

色谱柱：Shim-pack VP-ODS,

(4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm)

流动相 A：柠檬酸缓冲液/乙腈/四氢呋喃 =  
400/100/100 (V/V/V),

(柠檬酸缓冲液：10.5 g 柠檬酸  
单水合物溶于 900 mL 水中，28%  
的氨水调 pH 值到 5.0，然后加水  
定容到 1 L)

流动相 B：乙腈/四氢呋喃 = 1/1 (v/v)

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

流速：1.3 mL/min

柱温：40°C

进样体积：20 μL

检测波长：190 ~ 350 nm (检测：254 nm)

## <LC 2<sup>nd</sup>D>

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 10%B (10.01 ~ 20 min)  
2.0 mm I.D. × 50 mm, 2.2 μm 流速: 0.3 mL/min  
流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液 柱温: 40°C  
流动相 B: 乙腈 进样体积: 5 μL (Loop 环体积)  
时间程序: 10%B (0 min) ~ 90%B (10 min) ~ 检测波长: 254 nm

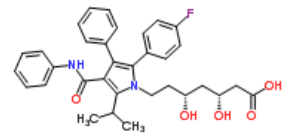
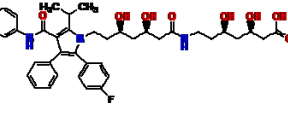
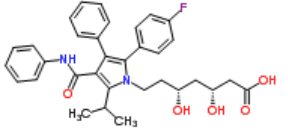
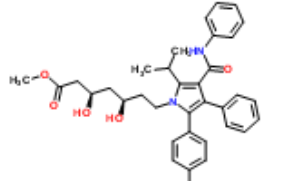
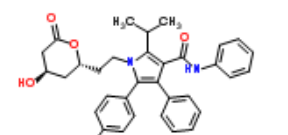
### 1.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-IT-TOF 干燥气: 氮气 10 L/min  
离子源: ESI(+), ESI(-) 碰撞气: 氩气  
离子源接口电压: ESI(+), 4.5 kV; 脱溶剂管温度: 200°C  
ESI(-), -3.5 kV; 加热模块温度: 200°C  
检测器电压: 1.7 kV 质量数范围: m/z 200 ~ 800  
雾化气: 氮气 1.5 L/min 多级质谱检测: Auto MS<sup>n</sup>

### 1.3 样品制备

使用流动相配制阿托伐他汀药物, 样品浓度为 1 mg/mL, 过滤后进样分析。

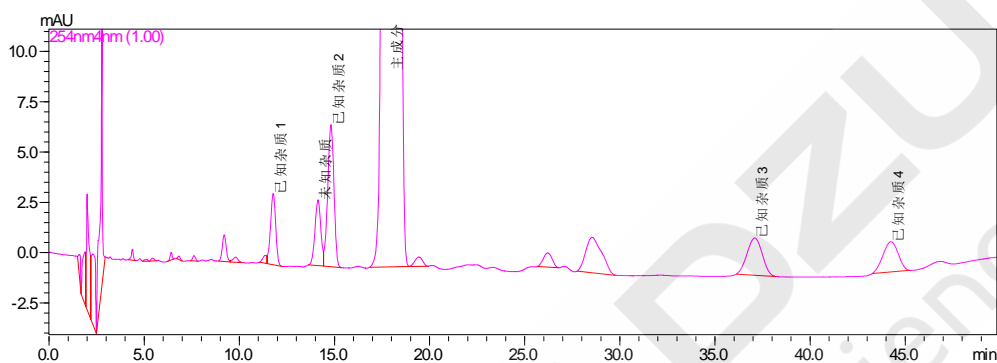
本次实验涉及的药物主成分及已知的 4 个杂质的信息如下:

成分	中文名称	英文名称	分子式	分子量	CAS No.	结构式
主成分	阿托伐他汀	Atorvastatin	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	558.64	110862-48-1	
已知杂质 1	阿托伐他汀杂质 F	Atorvastatin Amide Acid	C <sub>40</sub> H <sub>48</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	717.82	-	
已知杂质 2	阿托伐他汀杂质 A	Atorvastatin Desfluoro impurity	C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	540.65	433289-83-9	
已知杂质 3	阿托伐他汀杂质 G	3-O-Methylatorvastatin Lithium Salt	C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	572.67	887196-29-4	
已知杂质 4	阿托伐他汀杂质 H	Atorvastatin Lactone	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	540.63	125995-03-1	

## 2. 结果讨论

### 2.1 LC 1<sup>st</sup>D 分析结果

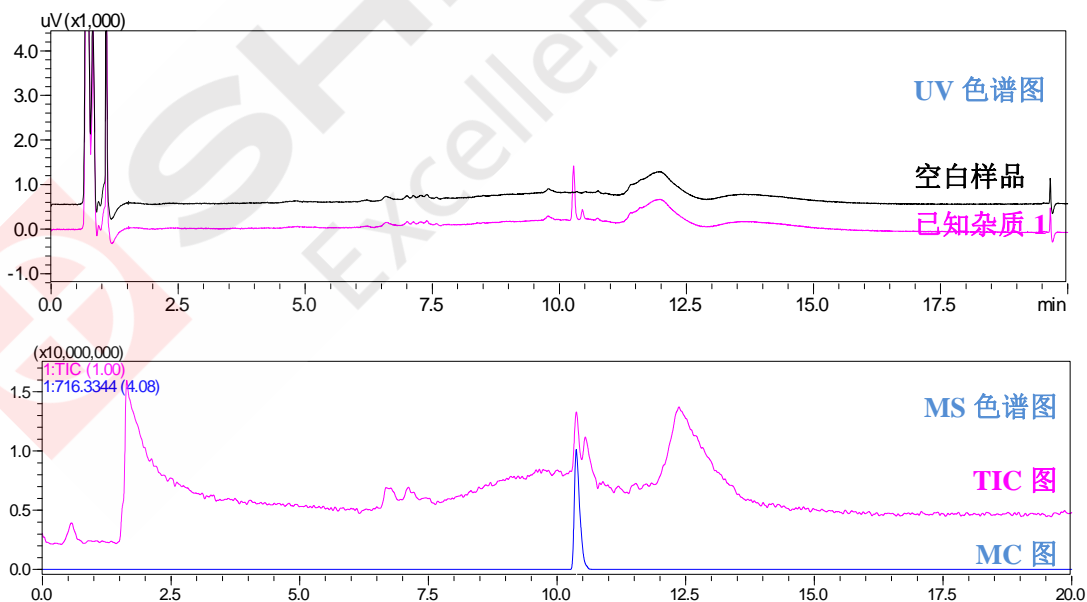
1<sup>st</sup>D 分析的主要目的为确定目标杂质的保留时间，以便于捕集到 LOOP 环中，用于二维脱盐分析。本次实验 1<sup>st</sup>D 色谱图如下，主成分和 5 个杂质的出峰时间分别为：17.361 min, 11.454 min, 13.762 min, 14.436 min, 35.705 min 和 42.152 min，其中 R.T = 13.762 min 的杂质为客户关注的未知杂质，其他 4 个为药典中报道的杂质。

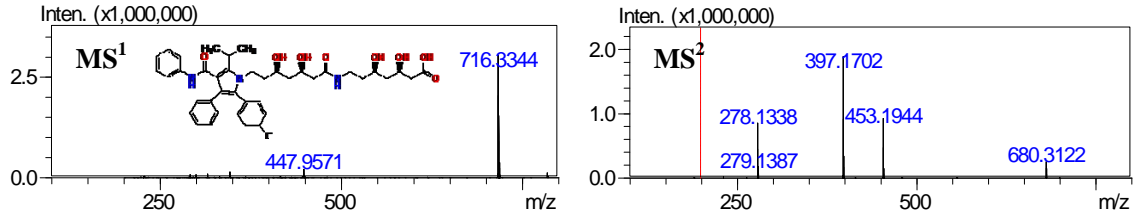


### 2.2 LC 2<sup>nd</sup>D 分析结果

#### 2.2.1 已知杂质 1 的分析结果

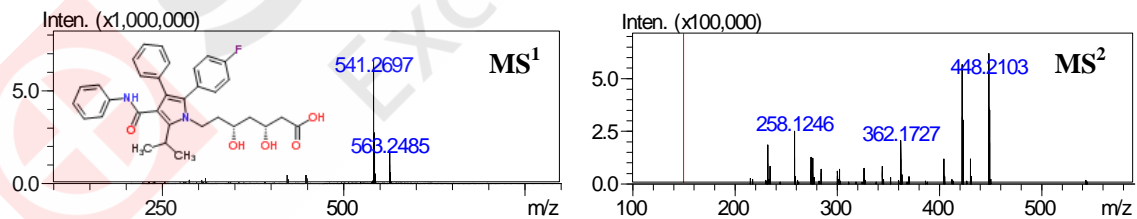
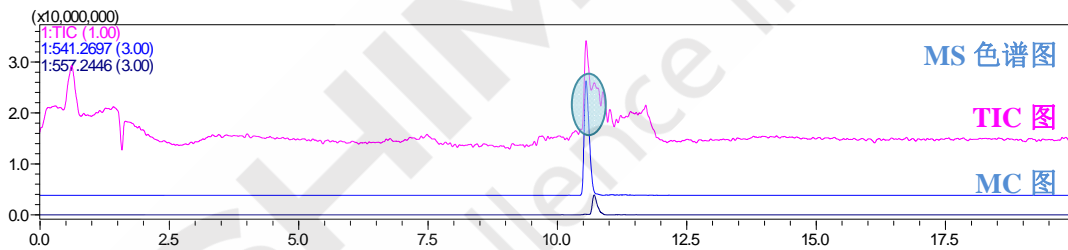
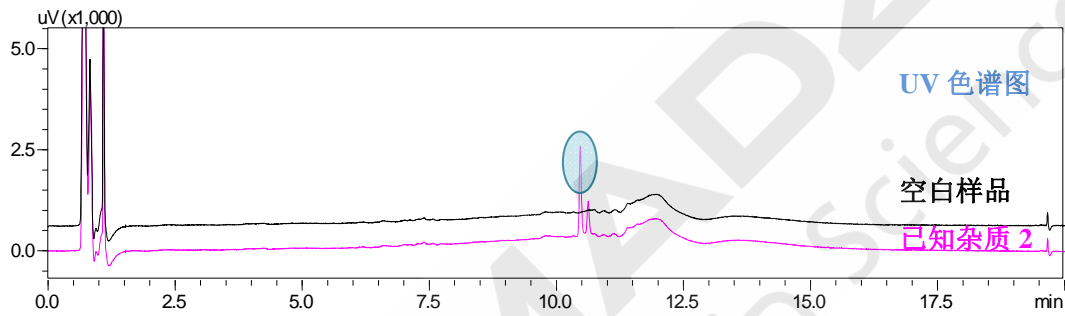
已知杂质 1 (R.T. = 11.454 min) 切换到 LOOP 环 1 中，经过 2D LC 分析，得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 1 负离子模式  $m/z$  716.3344，确证为阿托伐他汀杂质 F，分子式为  $C_{40}H_{48}FN_3O_8$ ，理论值  $[M-H]^-$  716.3353，测试值与理论值质量数偏差为 -1.26 ppm。





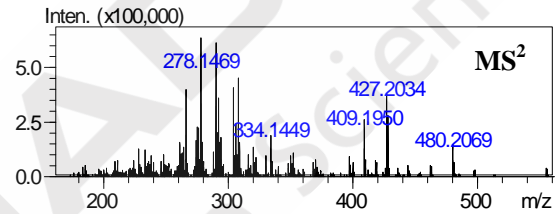
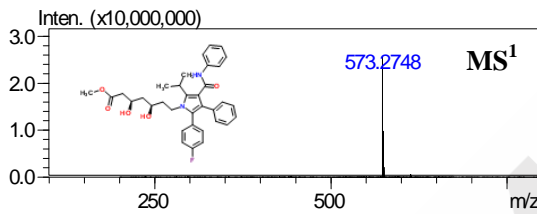
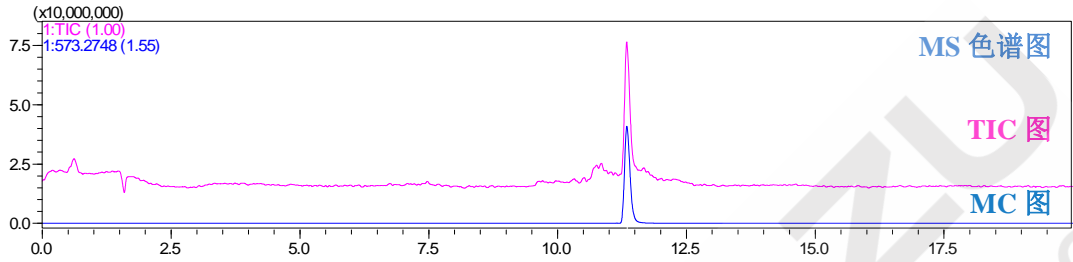
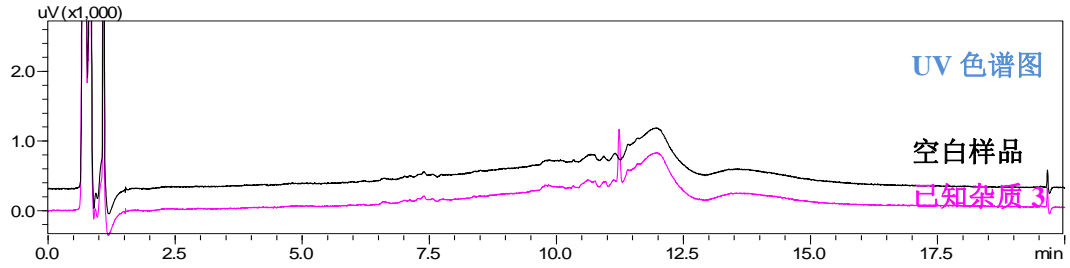
### 2.2.2 已知杂质 2 的分析结果

已知杂质 2 (R.T. = 14.436 min) 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 质谱图可以看出已知杂质 2 存在两个峰, 正离子模式分别为  $m/z$  541.2697 和  $m/z$  557.2446, 从 LC 1<sup>st</sup>D 分析色谱图可以看到已知杂质 2 和未知杂质的保留时间差异不大, 所以, 可能有部分未知杂质切到 LOOP 3 中, 已知杂质 2 为阿托伐他汀杂质 A, 分子式为  $C_{33}H_{36}N_2O_5$ ,  $m/z$  541.2697, 理论值  $[M+H]^+$  541.2697, 测试值与理论值质量数偏差为 0.00 ppm。



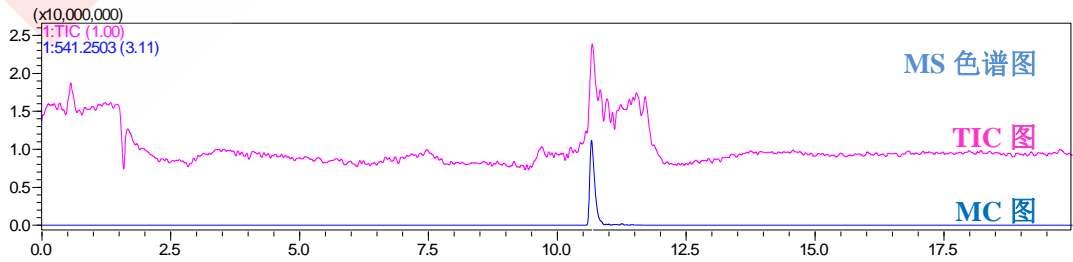
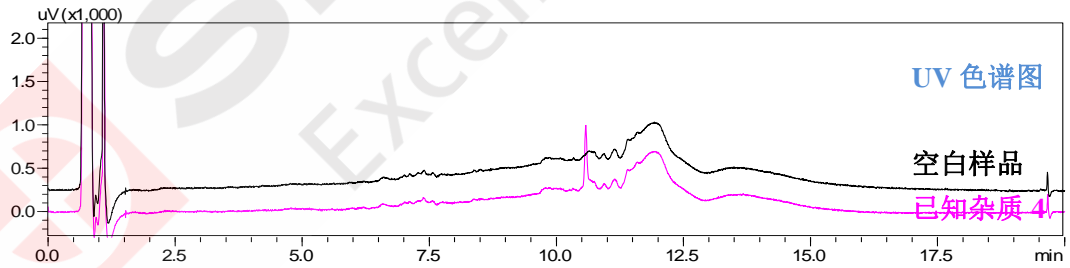
### 2.2.3 已知杂质 3 的分析结果

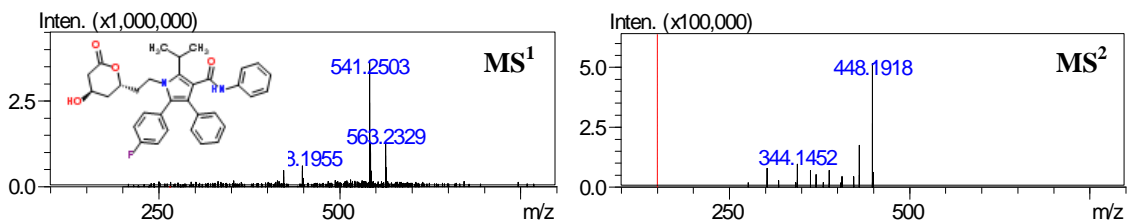
已知杂质 3 (R.T. = 35.705 min) 切换到 LOOP 环 4 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 3 正离子模式  $m/z$  573.2748, 为阿托伐他汀杂质 G, 分子式为  $C_{34}H_{37}FN_2O_5$ , 理论值  $[M+H]^+$  573.2759, 测试值与理论值质量数偏差为 -1.92 ppm。



#### 2.2.4 已知杂质 4 的分析结果

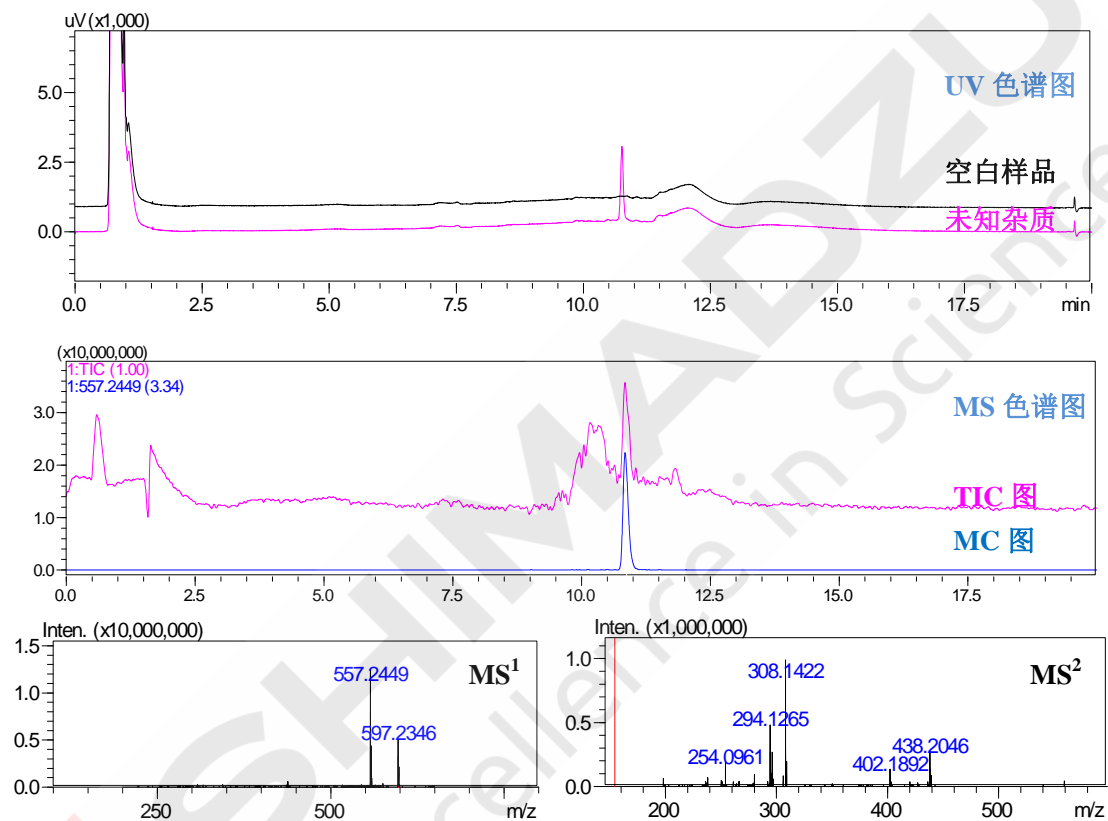
已知杂质 4 (R.T. = 42.152 min) 切换到 LOOP 环 5 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 4 正离子模式  $m/z$  541.2503, 为阿托伐他汀杂质 H, 分子式为  $C_{33}H_{33}FN_2O_4$ , 理论值  $[M+H]^+$  541.2497, 测试值与理论值质量数偏差为 1.11 ppm。





### 2.2.5 未知杂质的分析结果

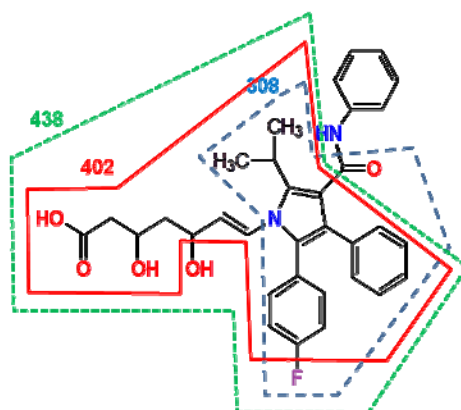
未知杂质 (R.T. = 13.762 min) 切换到 LOOP 环 2 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。



从 MS 质谱图可以看出未知正离子模式  $m/z$  557.2449, 相对于主成分阿托伐他汀 (分子式  $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ , 正离子模式  $m/z$  559.2603) 少了 2 个质量数, 可能是脱氢产物。经文献检索, 未知杂质可能为阿托伐他汀脱氢酸, 分子式为  $C_{33}H_{33}FN_2O_5$ , 详细信息列于下表。

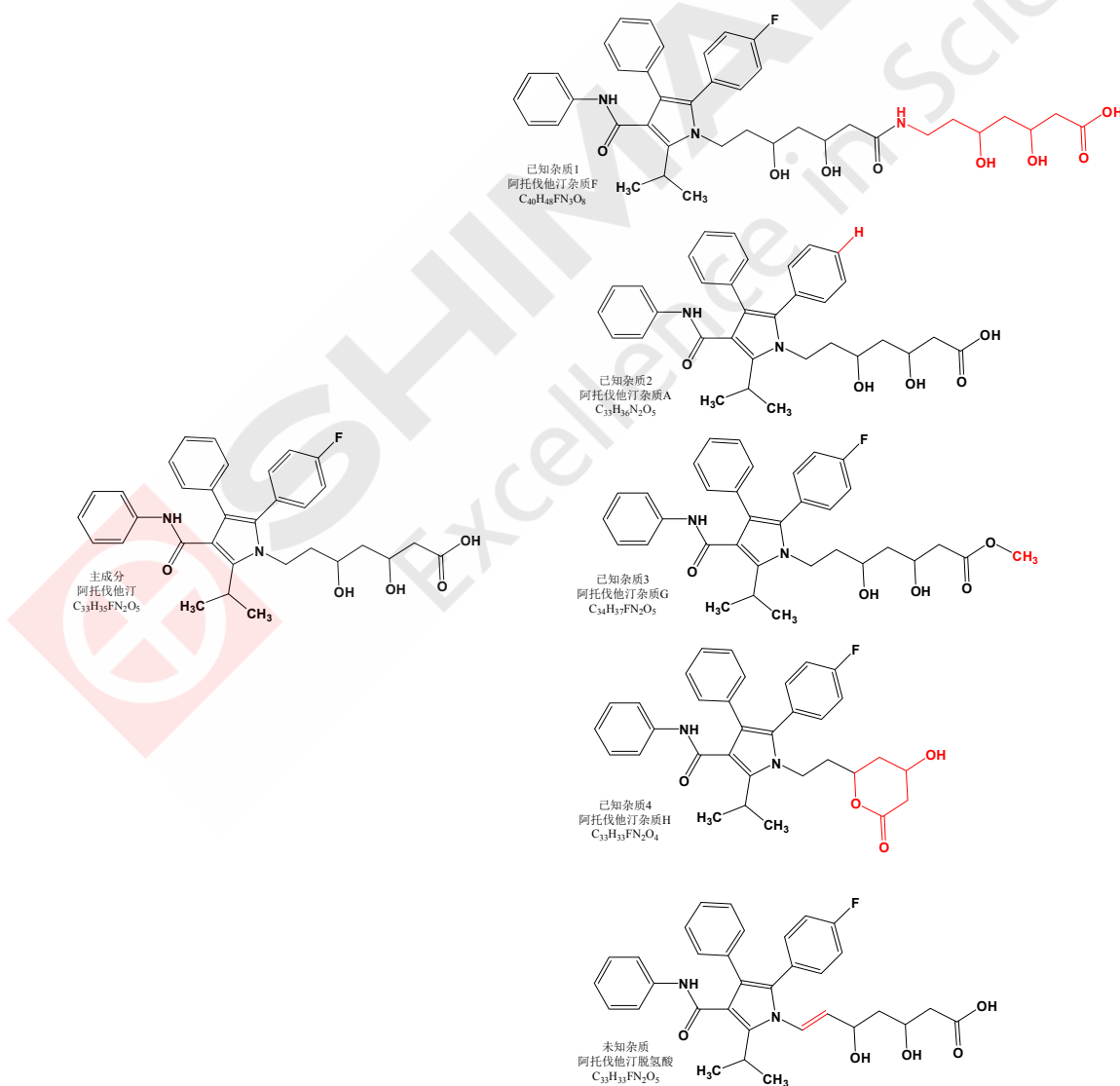
中文名称	英文名称	分子式	结构式	测试值 [M+H] <sup>+</sup>	理论值 [M+H] <sup>+</sup>	质量数偏差 (ppm)
阿托伐他汀脱氢酸	Atorvastatin Dehydro Acid	$C_{33}H_{33}FN_2O_5$		557.2449	557.2446	0.54

根据 MS<sup>2</sup> 的碎片信息，推测其裂解规律为：



### 3. 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/MS 杂质鉴定系统在线定性检测阿托伐他汀药物中 4 个已知杂质和 1 个未知杂质的方法。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时间。



## 2D LC/MS 杂质鉴定系统定性检测盐酸倍他司汀药物杂质

**摘要:** 本文建立了使用 2D LC/MS 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质谱定性分析。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/MS 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/MS 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/MS 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 LCMS-IT-TOF 进行杂质鉴定。本文使用 2D LC/MS 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。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

分析仪器: 2D LC/MS 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-20A<sub>5</sub>(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 1<sup>st</sup>D>

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 2<sup>nd</sup>D>

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 95%B (6~16 min)~10%B (16.10~25 min)  
 2.0 mm I.D. × 50 mm, 2.2 μm 流速: 0.3 mL/min  
 流动相 A: 0.1% 甲酸 柱温: 40℃  
 流动相 B: 乙腈 进样体积: 5 μL (Loop 环体积)  
 时间程序: 10%B (0 min) ~ 60%B (5 min) ~ 检测波长: 259 nm

### 1.2.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-IT-TOF 干燥气: 氮气 10 L/min  
 离子源: ESI(+), ESI(-) 碰撞气: 氩气  
 离子源接口电压: ESI(+), 4.5 kV; 脱溶剂管温度: 200℃  
 ESI(-), -3.5 kV; 加热模块温度: 200℃  
 检测器电压: 1.7 kV 质量数范围: m/z 50 ~ 150, m/z 150 ~ 500  
 雾化气: 氮气 1.5 L/min

### 1.3 系统流程图

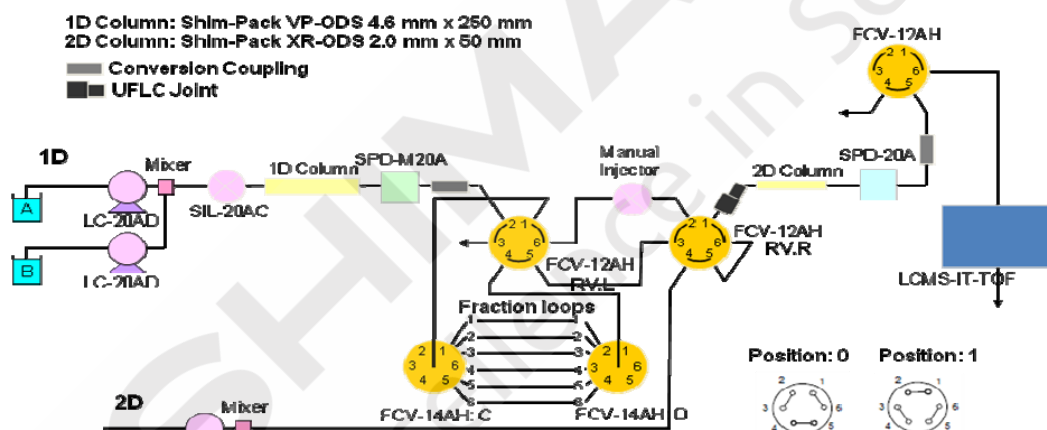


图 1. 2D-LC-IT-TOF 的系统流程图

### 1.4 样品制备

将盐酸倍他司汀片于 105℃ 加热 4 小时后研磨成粉末, 称取 0.15g, 加 10 mL 流动相超声溶解 10min, 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 <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> · 2HCl	209.12	5579-84-0	

## 2. 结果讨论

### 2.1 LC 1<sup>st</sup>D 分析结果

1<sup>st</sup>D 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 1<sup>st</sup>D 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。

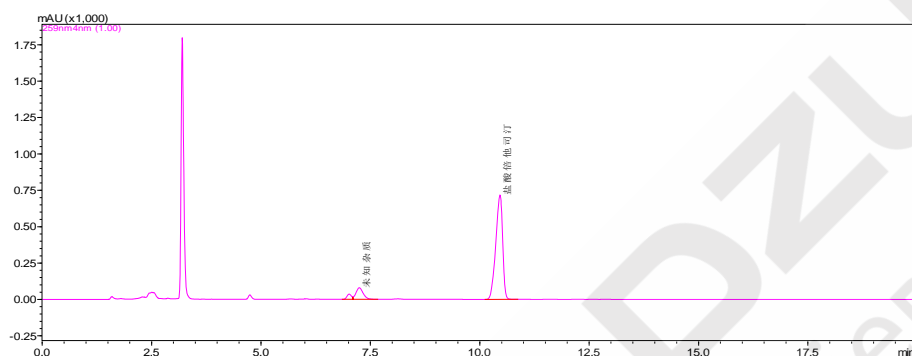


图 2. LC 1<sup>st</sup>D 分析色谱图

### 2.2 LC 2<sup>nd</sup>D 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、MS 色谱图和质谱图如下：

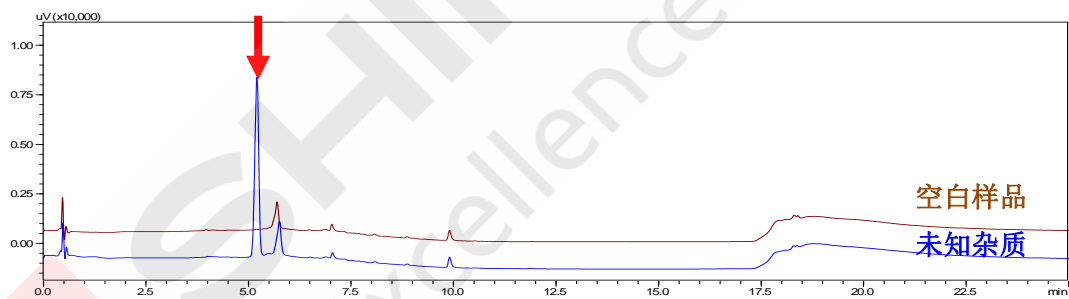


图 3. 未知杂质二维 UV 色谱图

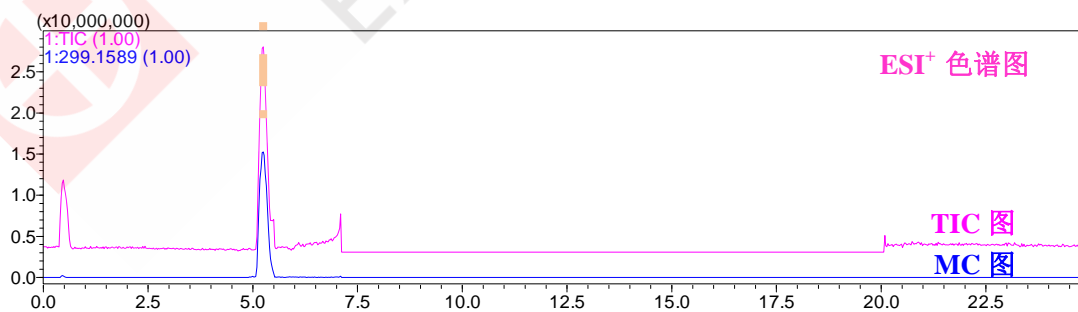


图 4. 未知杂质二维 MS 色谱图 (m/z 150~500)

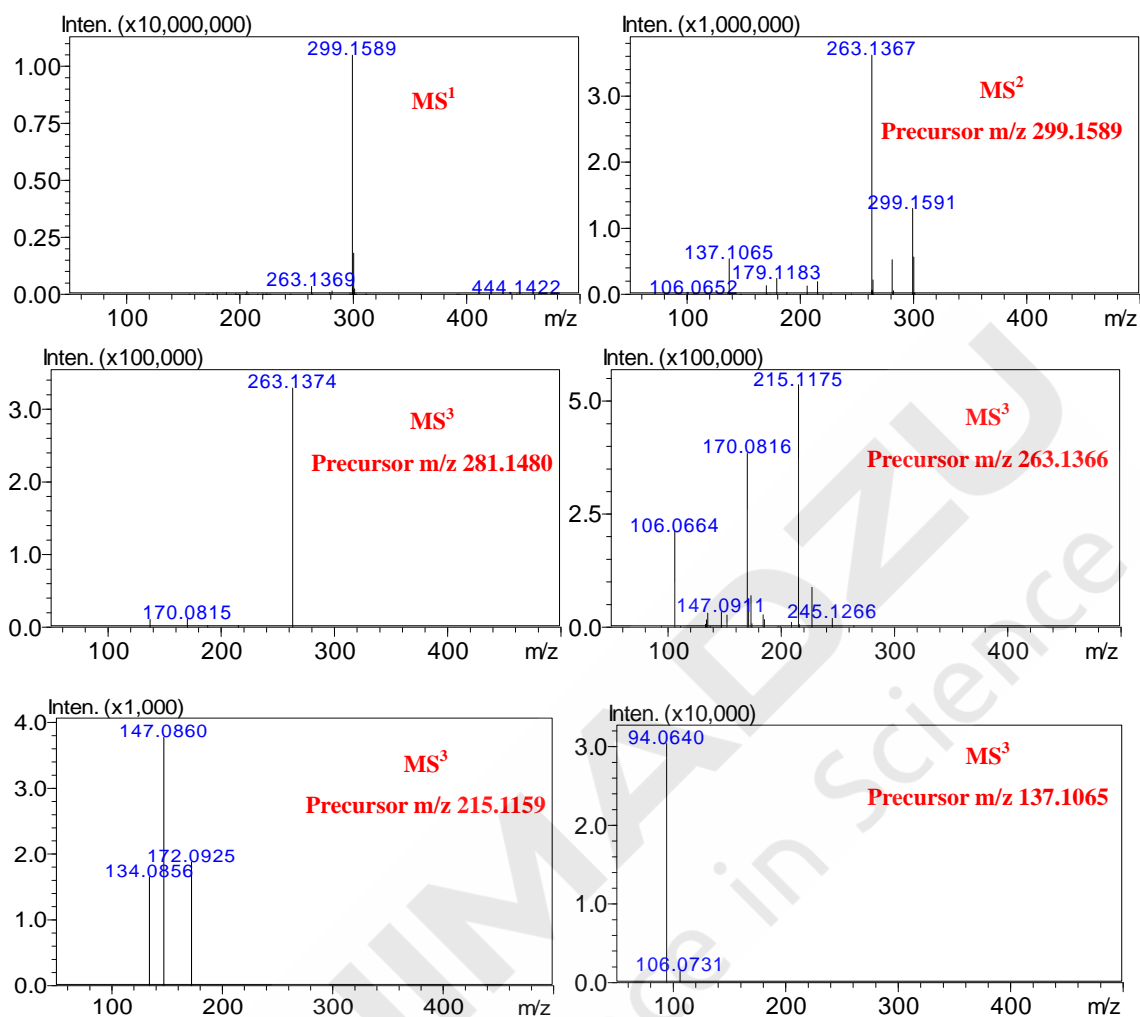


图 5. 未知杂质的多级质谱图 ESI(+)

### 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。

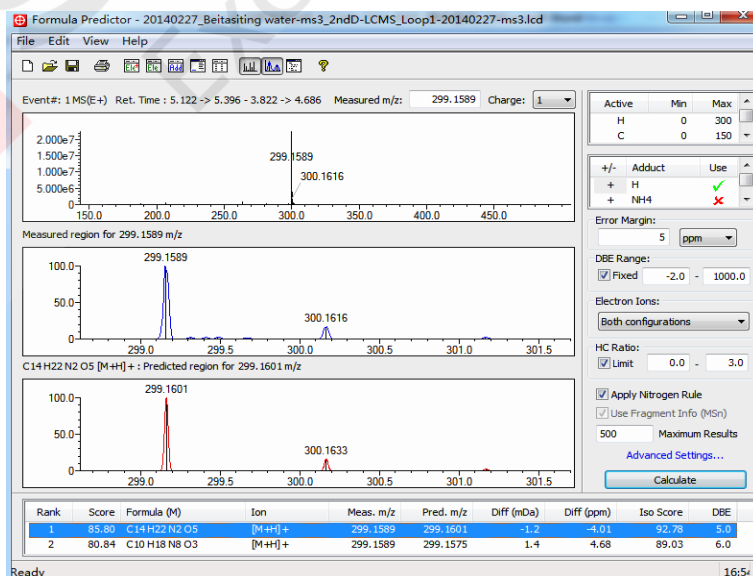


图 6. 未知杂质的 ESI(+)质谱图对应的分子式预测结果

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:

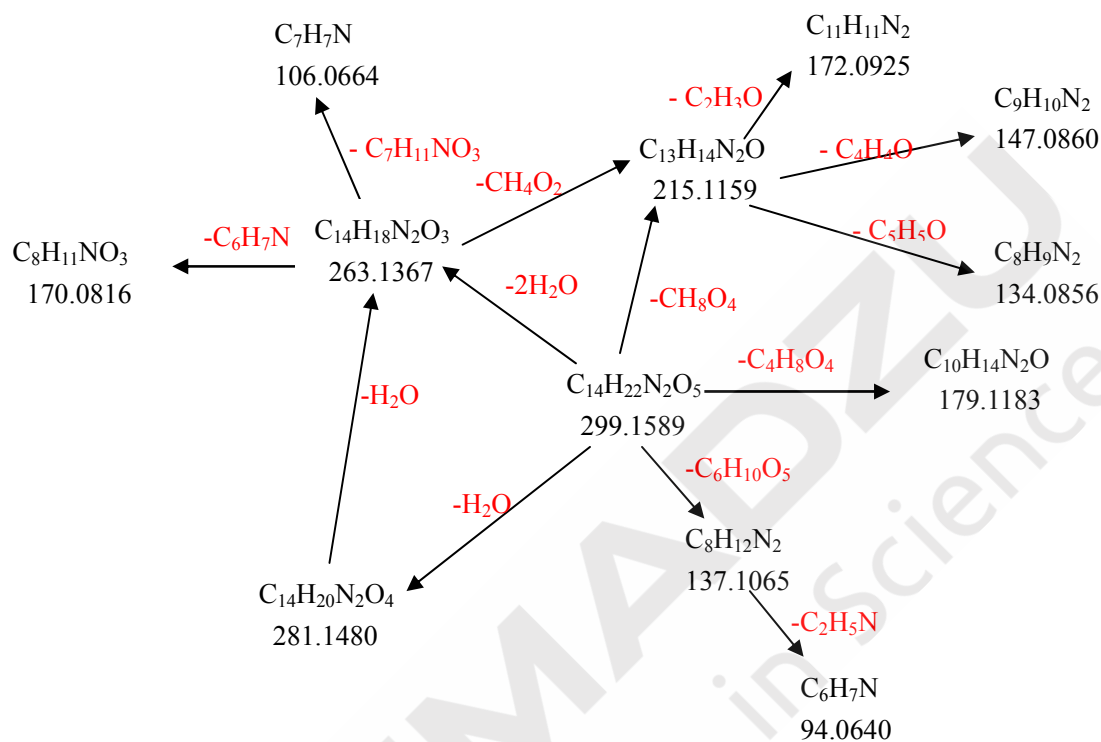


图 7. 未知杂质的 ESI(+)-多级质谱碎裂方式分析

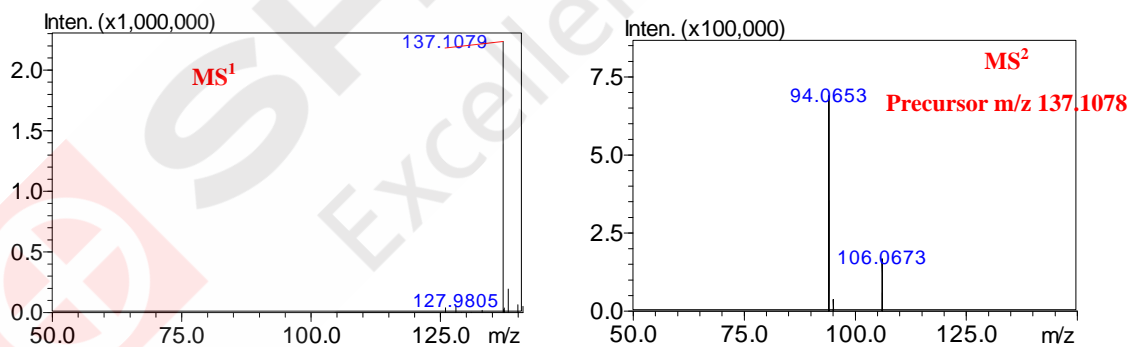
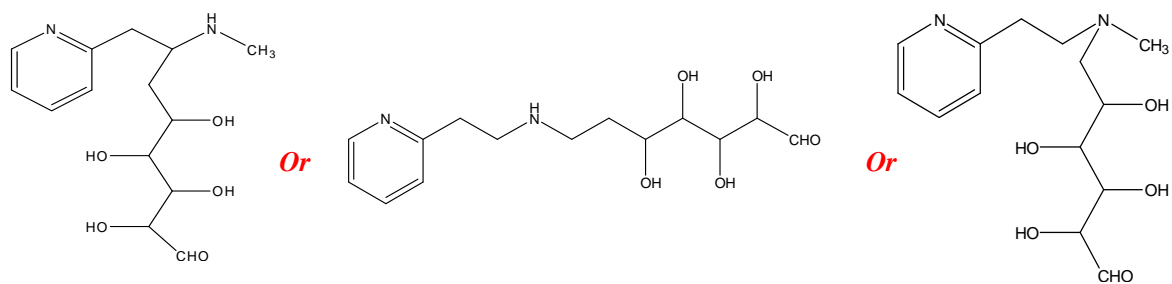


图 8. 盐酸倍他司汀多级质谱图 ESI(+)

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:



### 3. 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。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 第二部分 常规 LCMS-IT-TOF 分析系统在药物杂质鉴定中的应用

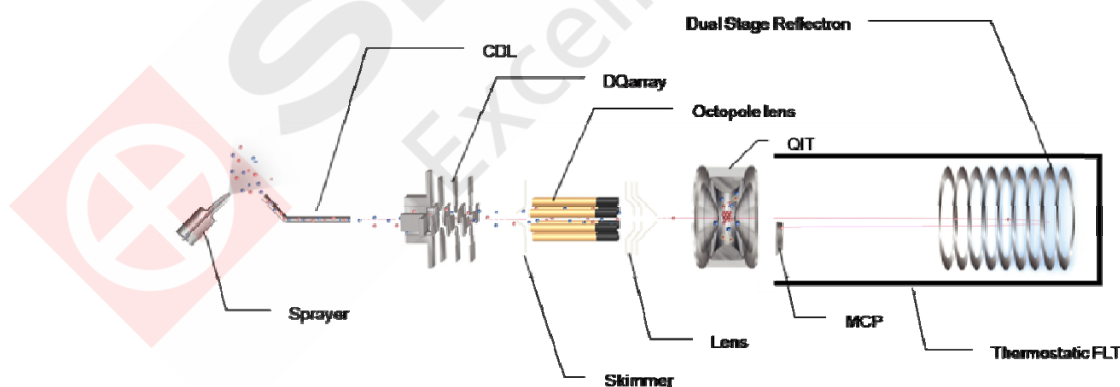
### LCMS-IT-TOF 液质联用仪工作原理

岛津 LCMS-IT-TOF 质谱仪是一款新型的串联质谱仪，其广泛应用于生物标记、代谢物鉴定、人类健康研究、药物研发以及环境化学等领域。由于兼备了离子阱 (IT) 和飞行时间 (TOF) 的技术优势, LCMS-IT-TOF 可以同时达到高质量精度和高分辨率(10,000/1000 m/z), 成为真正具有高质量精度多级质谱仪。通过优化到 TOF 质量分析器的离子传输系统及离子阱, LCMS-IT-TOF 达到了极高的灵敏度和定性能力。在这里, 离子阱的作用为离子聚焦和多级质谱分析, 即聚焦进入 TOF 的离子和有效选择前体离子进行多级质谱分析。由于具有高质量精度和多级质谱的特点, LCMS-IT-TOF 成为微量药物杂质结构鉴定的利器。

LCMS-IT-TOF 液质联用仪流路图:



IT-TOF 离子通路系统示意图:



# 离子阱飞行时间质谱定性检测氯噻酮及其杂质

**摘要:** 本文采用岛津超快速液相色谱仪(UFLC)和电喷雾电离-离子阱-飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF)联用定性检测出氯噻酮样品中的杂质。对氯噻酮和杂质进行多级质谱分析,根据多级质谱裂解规律推导出了杂质的结构式。

**关键词:** UFLC, LCMS-IT-TOF, 液质联用, 氯噻酮, 杂质检测

## 前言

氯噻酮(Chlorthalidone),一种利尿类药物,主要治疗以下几种病症:1.水肿性疾病,排泄体内过多的钠和水,减少细胞外液容量,消除水肿。2.高血压,可单独与其他降压药联合应用,主要用于治疗原发性高血压。3.中枢性或肾性尿崩症。4.肾石症,主要用于预防含钙盐成分形成的结石。对氯噻酮药物中含量高的杂质按规定需要定性。

岛津离子阱飞行时间质谱由于既具备多级质谱功能(最多到10级),又具备高分辨率和高质量数准确度,从而在对未知化合物进行定性分析方面具有独特的优势。本文采用岛津超快速液相色谱和离子阱飞行时间质谱联用,定性检测出了氯噻酮样品中含有的杂质组分,并根据多级质谱裂解规律推导出了杂质的结构式。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Shimadzu LCMS-IT-TOF 液质联用系统,包括 LC-20AD×2(输液泵),SIL-20ACHT(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),CBM-20A(控制器),DGU-20A<sub>3</sub>(在线脱气机),LCMS-IT-TOF(离子阱-飞行时间质谱仪)。

试剂:甲醇,HPLC级;纯水,Milli-Q超纯水仪制备得到;醋酸铵,醋酸,LCMS级;所有试剂和样品需用0.22 μm滤膜过滤。

### 1.2 分析条件

#### 色谱条件

色谱柱:Shimadzu Shim-pack XR-ODS,2.0 mm I.D.×75 mm L.,2.2 μm;流动相:10 mM 醋酸铵溶液(用醋酸调节pH到5.5)/甲醇=70/30(v/v);流速:0.4 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL。

#### 质谱条件

离子源:ESI,负离子模式;扫描范围:m/z 50-400;加热模块温度:250℃;CDL温度:300℃;雾化气流速:1.5 L/min;干燥气流速:10 L/min;离子源电压:-3.5 kV;检测器电压:1.70 kV;质量数校准方法:自动调谐优化电压,外标法校准质量数。

### 1.3 样品前处理

称量氯噻酮样品10 mg,流动相定容到100 mL,终浓度为0.1 mg/mL,经0.22 μm滤膜过滤后进样测试。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氯噻酮的分析结果

#### 1) 氯噻酮样品的 TIC 图

从氯噻酮样品的 TIC 图中可以看出, 样品中除了主要成分氯噻酮外, 还含有一种杂质。

#### 2) 氯噻酮的 1 级质谱图

样品的 1 级质谱(图 2)得到样品的  $m/z$  为 337.0057, 使用分子式预测软件进行分子式预测(如图 3)得样品的分子式为  $C_{14}H_{11}N_2O_4SCl$ , 分子式结果与样品实际情况吻合, 质量数偏差仅为 0.59 ppm。

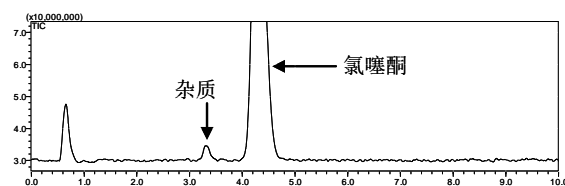


图 1. 氯噻酮样品的 TIC 图

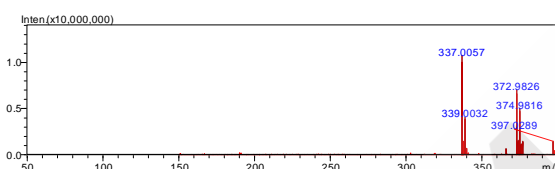


图 2. 氯噻酮的 1 级质谱图

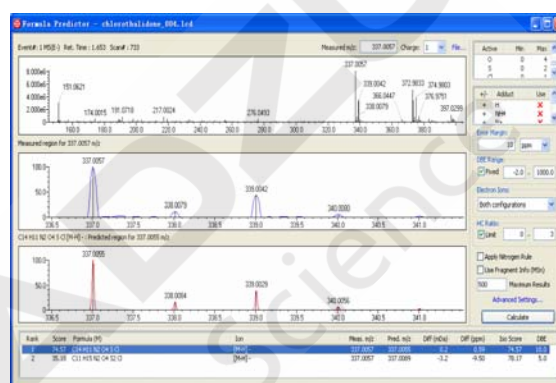


图 3. 氯噻酮样品的 1 级质谱分子式预测结果

#### 2) 氯噻酮的 2 级质谱图

对  $m/z$  337.0057 进行 2 级质谱测试, 得到了  $m/z$  为 146.0242, 189.9742 和 318.9951 的裂解碎片。其中  $m/z$  146.0242 和 189.9742 分别是组成主成分的两个基本单元。

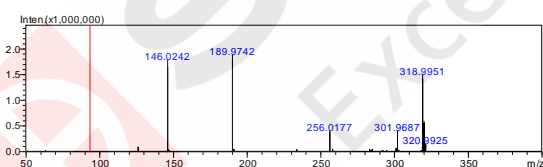


图 4. 氯噻酮的 2 级质谱图

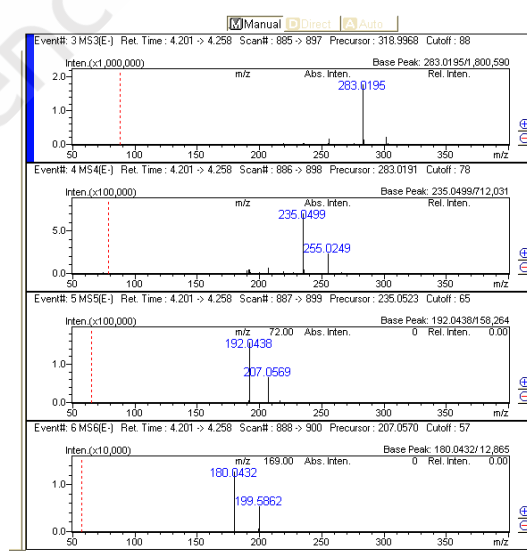


图 5. 氯噻酮样品的 3-6 级质谱图

#### 3) 氯噻酮的 3-6 级质谱图

选择  $m/z$  318.9951 进行多级质谱测试, 得到氯噻酮的 3-6 级质谱图, 如图 5 所示。

#### 4) 氯噻酮的裂解机理

根据氯噻酮的多级质谱信息, 推测其可能的裂解机理, 如图 6 所示。

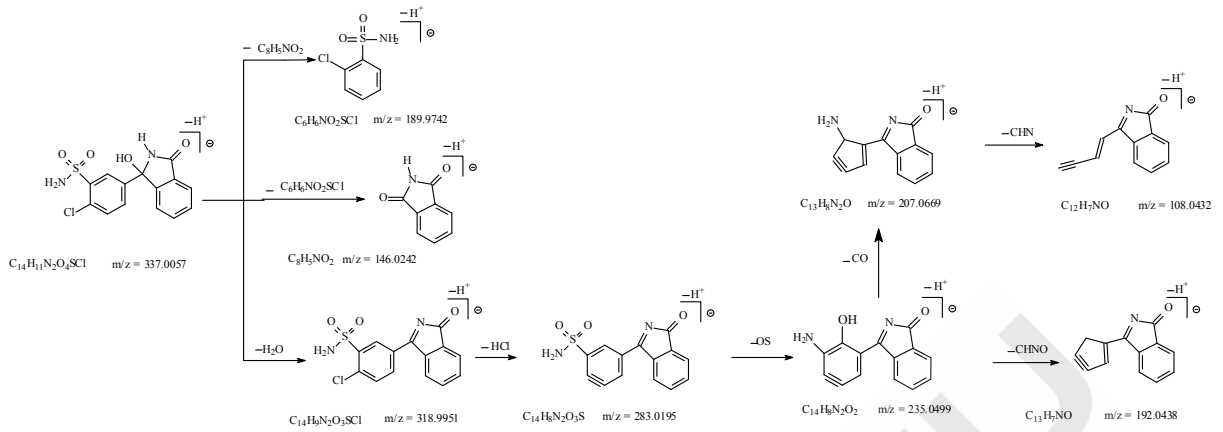


图 6. 氯噻酮的裂解机理

## 2.2 杂质的分析结果

### 1) 杂质的 1 级质谱图

样品中检测到 1 个杂质， $m/z$  336.0217。分子式预测结果如图 7 所示，最有可能的分子式为  $C_{14}H_{12}N_3O_3SCl$ ，质量数偏差仅为 0.66 ppm(见图 8)。

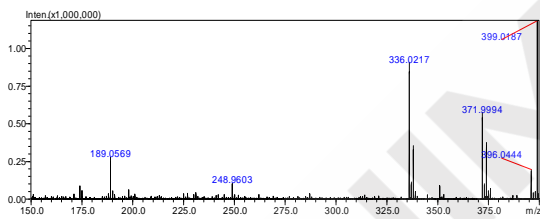


图 7. 杂质的 1 级质谱图

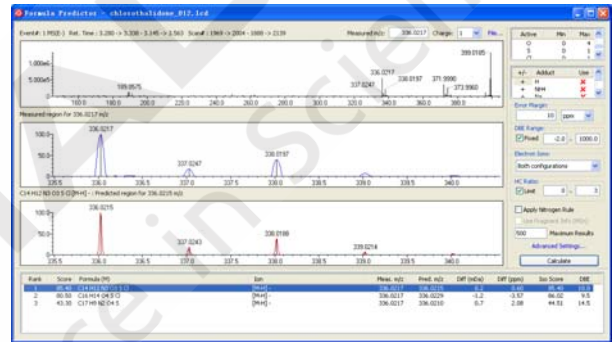


图 8.  $m/z$  336.0217 分子式预测结果

### 2) 杂质的 2 级质谱图

杂质的 2 级质谱图中(图 9)存在与主成分氯噻酮相同的分子离子峰  $m/z$  318.9968 和  $m/z$  189.9742，可以推测杂质分子中存在和主成分相似的结构  $C_{14}H_9N_2O_3SCl$  和  $C_6H_6NO_2SCl$ 。同时检测到碎片  $m/z$  145.0412，推测该碎片为构成杂质的另外一主要部分，分子式预测软件预测其分子式为  $C_8H_6N_2O$  (图 10)。

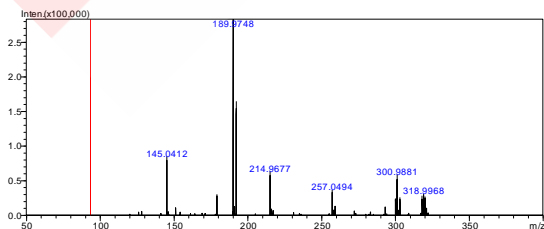


图 9. 杂质的 2 级质谱图

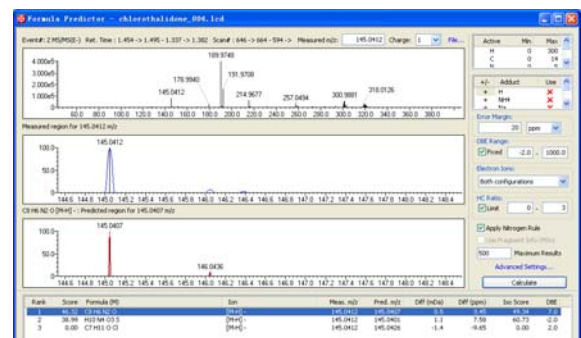


图 10. 碎片  $m/z$  145.0412 的分子式预测结果

### 3) 杂质的 3 级质谱图

将  $m/z$  318.9968 的碎片继续碎裂, 得到  $m/z$  283.0192 的分子离子峰, 与主成分 3 级质谱相同。

### 4) 杂质的 4 级质谱图

将  $m/z$  283.0192 的碎片继续碎裂, 得到  $m/z$  235.0511 的碎片峰, 与主成分 4 级质谱相同。

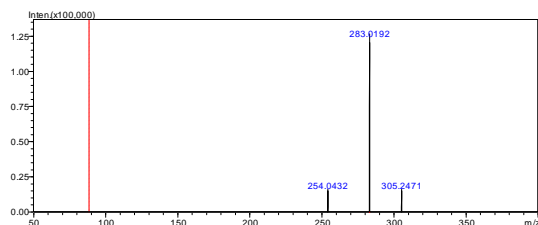


图 11. 杂质的 3 级质谱图

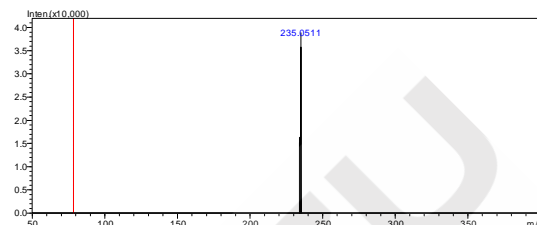


图 12. 杂质的 4 级质谱图

### 5) 杂质可能裂解机理

根据预测分子式  $C_{14}H_{12}N_3O_3SCl$ , 以及杂质的二级质谱图中存在与主成分氯噻酮相同的碎片组分  $C_{14}H_9N_2O_3S$  和  $C_6H_6NO_2S$ 。由  $m/z$  145.0412 推测另一主要碎片分子式为  $C_8H_6N_2O$ 。因此, 推断杂质的结构式和裂解途径如下:

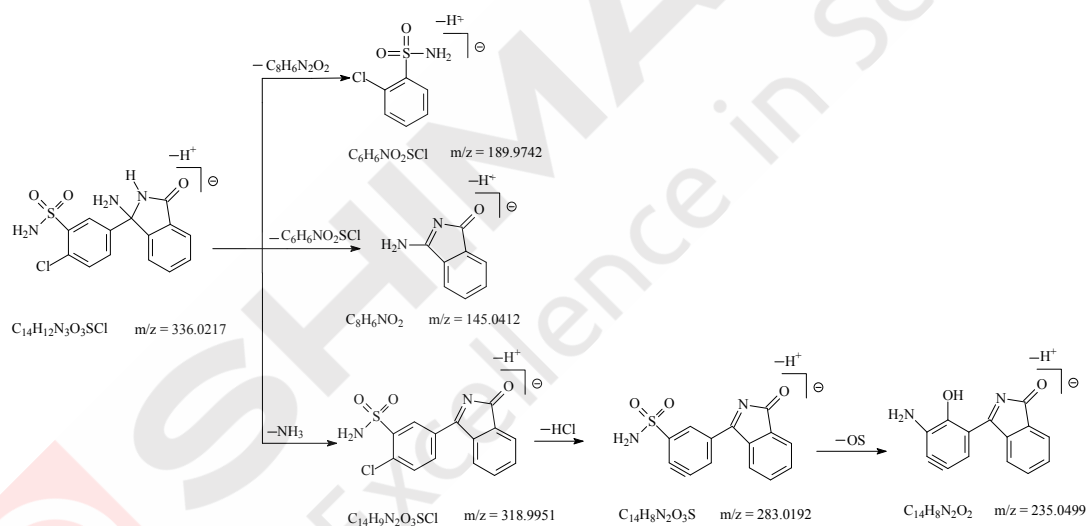
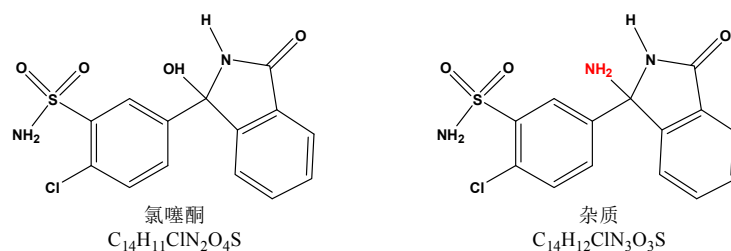


图 13. 杂质的裂解机理

## 3 结果与讨论

本文使用岛津超快速液相色谱仪(UFLC)和电喷雾电离-离子阱-飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF)联用对氯噻酮样品中的杂质成分进行定性分析。通过多级质谱裂解规律推导出了杂质的结构式。岛津离子阱飞行时间质谱仪是药物有效成分及杂质定性检测的强有力工具。



# 离子阱飞行时间质谱定性分析文拉法辛中间体及杂质

**摘要：** 本文使用离子阱飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)对文拉法辛中间体及杂质进行定性分析。样品主成分是文拉法辛中间体，分子式是  $C_{14}H_{21}NO_2$ ，化学名为 1-[2-氨基-1-(4-羟基苯基)乙基]环己醇。根据主成分和相应杂质峰的多级质谱裂解规律，推导出 5 号杂质峰的分子式为  $C_{15}H_{23}NO_2$ ，化学名为 1-[2-氨基-1-(4-甲氧基苯基)乙基]环己醇。

**关键词：** 离子阱飞行时间质谱 LCMS-IT-TOF 液质联用 文拉法辛 Venlafaxine

FDA 在 2008 年 12 月公布关于药物中有遗传毒性的和致癌的不纯物的草案指导。在这份草案中限制这些不纯物的剂量应不超过  $1.5 \mu\text{g}/\text{天}$ 。这就需要对药物及药物最终产品中含量较多的杂质进行定性并通过实验证明它们的每日摄入量在安全剂量以下。常用的定性手段是液质联用、光谱分析和核磁共振。其中，质谱的定性检测是制药行业杂质定性中必不可少的手段。为了准确的预测杂质的分子式和结构式，需要多级质谱图信息来帮助推导。如果是使用 Q-TOF 来进行杂质定性检测的话，由于只能做二级质谱，为了减少分子式预测时候选化合物的数量，就需要仪器具备很高的质量数准确度。当元素组成较复杂时，对分子式的预测就会比较困难。另一方面，二级质谱所得到的碎片离子信息量虽然很多，对于碎片离子碎裂机理的推导需要非常丰富的经验才能进行，就会对杂质的结构预测造成困难。而岛津的离子阱飞行时间质谱即可以做多级质谱分析(最高 10 级)，又具备高分辨率和高质量数准确度，因此就不存在上述问题，是制药行业杂质定性检测的理想工具。本文采用岛津超快速液相色谱仪(UFLC)和电喷雾电离—离子阱—飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF)联用对文拉法辛中间体及杂质进行定性分析，推导出杂质的结构式。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

试剂：乙腈和纯水，HPLC 级；甲酸和甲酸铵，LCMS Grade。样品：文拉法辛中间体。

仪器：Shimadzu UFLC 和 LCMS-IT-TOF，包括 LC-20AD×2(输液泵)，SIL-20ACHT(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，SPD-M20A(二极管阵列检测器)，DGU-20A3(在线脱气机)，CBM-20A(控制器)，LCMS-IT-TOF(电喷雾电离—离子阱—飞行时间质谱仪)，LCMSsolution(色谱工作站)。

### 1.2 色谱条件

色谱柱：	流速：0.4 mL/min；
Shimadzu Shim-pack XR-ODS 2.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2 $\mu\text{m}$ ；	柱温：40℃；
流动相：A: pH 4.4 的 10 mM 甲酸—甲酸铵缓冲液；B: 乙腈；	进样量：10 $\mu\text{L}$ ；
梯度程序：15-50%B (0-5.25 min) —70%B (5.26-6.25min) —15%B (6.27-10.00 min)	波长：225 nm；

质谱：

离子化模式：ESI+

检测器电压：1.70 kV

雾化气流速：1.5 L/min  
 (注射进样模式时 1.0 L/min)  
 干燥气流速：18 L/min  
 CDL 温度：200℃  
 Heater Block 温度：200℃

注射进样模式流速：10 μL/min  
 样品浓度：1 mg/L  
 液质联用进样模式样品浓度：1 mg/mL  
 自动调谐优化电压，外标法校正质量数。

## 2 结果与讨论

图 1 为使用甲酸-甲酸铵缓冲液流动相进行液质联用分析得到的 PDA 色谱图。

为避免过高浓度的主成分进质谱导致饱和，采用高压流路切换阀，2.5 min 后切换到进质谱。

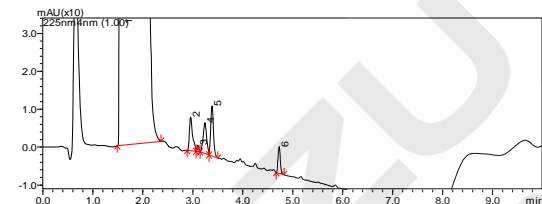


图 1 样品的 PDA 色谱图

采用注射进样模式研究主成分裂解规律，液质联用进样模式研究 5 号杂质峰裂解规律。得到多级质谱图如下：

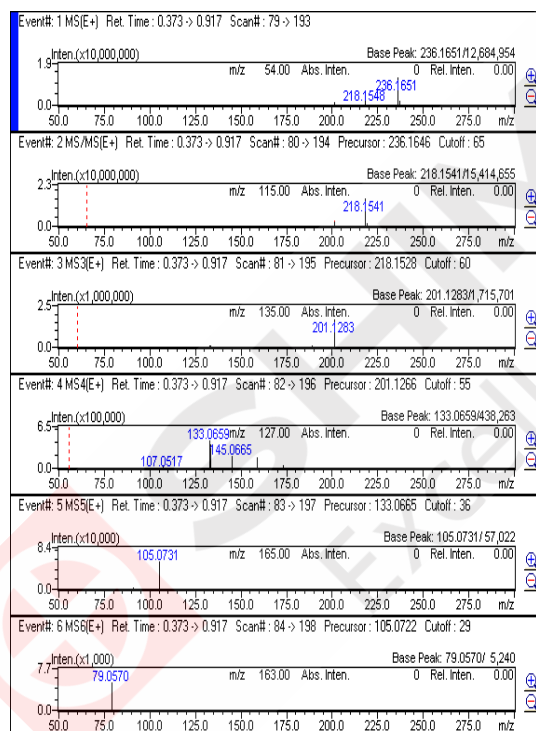


图 2 主成分注射进样多级质谱图

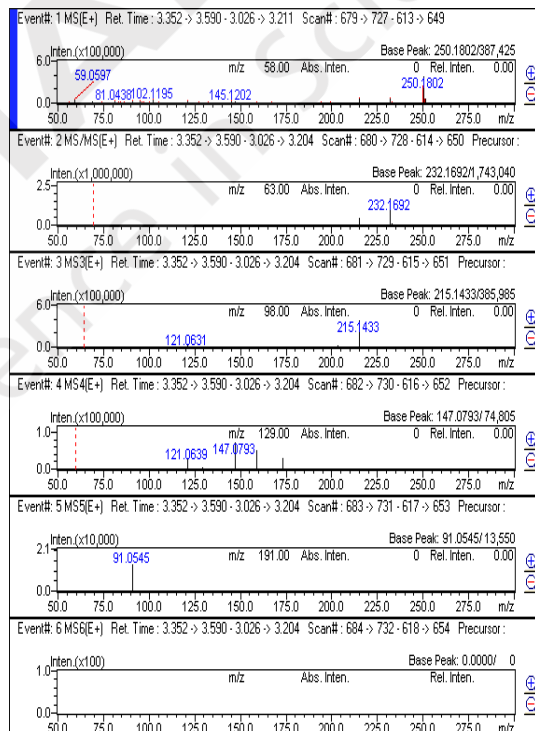


图 3 5 号杂质峰多级质谱图

主成分分子式预测结果是  $C_{14}H_{21}NO_2$ ，与理论值吻合。由于主成分的结构已知，根据注射进样多级质谱图，推导出主成分的裂解规律见图 4。杂质峰分子式预测结果是  $C_{15}H_{23}NO_2$ ，比文拉法辛中间体的分子式多一个甲基。杂质峰与主成分峰的前 4 级质谱图类似，都是丢失相同质量数的片段，可以推断出多出的甲基连在苯环上或者是以甲氧基连接于苯环。而杂质峰第 5 级质谱未产生类似主成分的 CO 丢失，而是苯环断裂，丢掉  $C_3H_4O$ ，结合离子阱质谱裂解规律，说明杂质峰苯环上连接的只能是甲氧基。杂质峰的裂解规律见图 5。

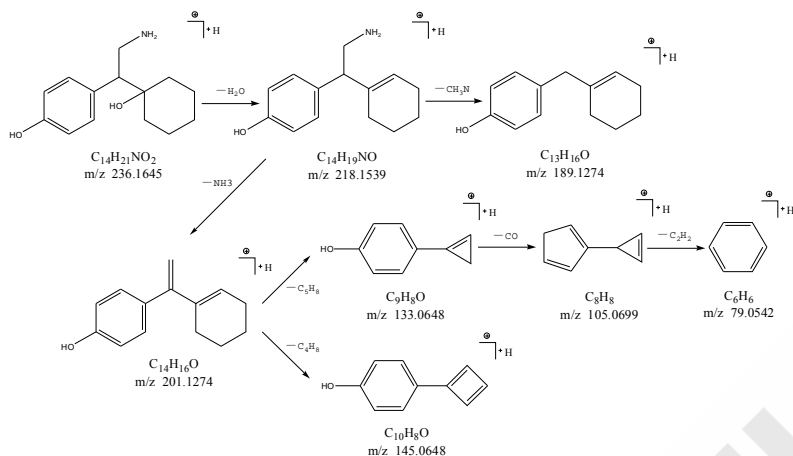


图4 文拉法辛中间体的MS<sup>6</sup>裂解规律

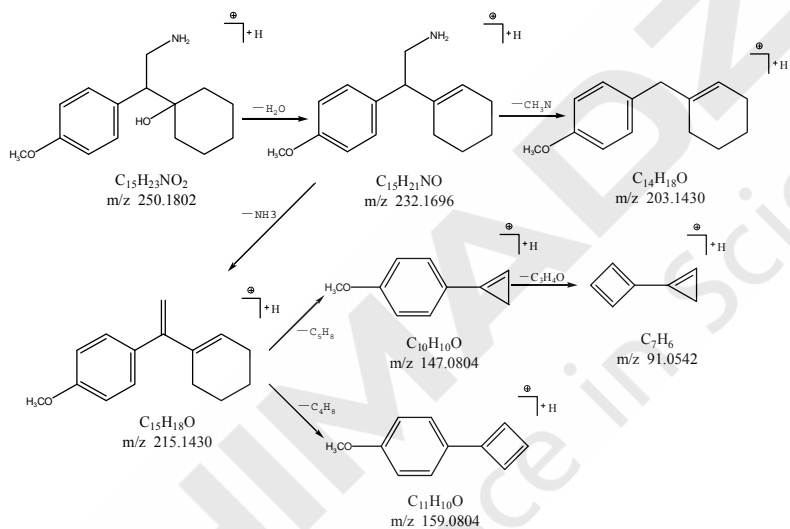


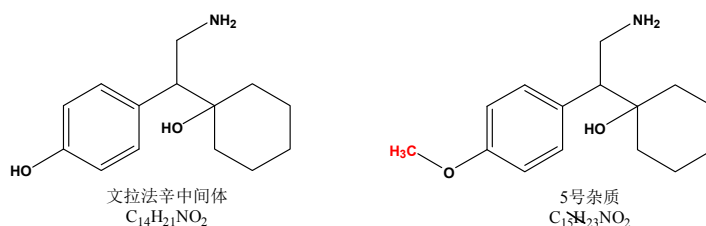
图5 5号杂质峰的MS<sup>5</sup>裂解规律

分子式预测结果列表如下：

化合物代号	Formula	Ion	Meas.m/z	Pred.m/z	Diff(mDa)	Diff(ppm)
主成分	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	236.1651	236.1645	+0.6	+2.54
5号杂质峰	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	250.1802	250.1802	+0.0	+0.00

### 3 结论

用离子阱飞行时间质谱检测了文拉法辛中间体，根据主成分和杂质的多级质谱图，预测出了杂质的分子式并推导出结构式。样品主成分为1-[2-氨基-1-(4-羟基苯基)乙基]环己醇，5号杂质峰为1-[2-氨基-1-(4-甲氧基苯基)乙基]环己醇。5号杂质峰经过制备和核磁共振检测确证，结果与质谱解析得到的结果吻合。用LCMS-IT-TOF可以准确预测化合物的分子式，描述裂解规律并推导出结构式，因而是制药行业杂质定性检测的强有力工具。



# 液相色谱-离子阱飞行时间质谱定性分析头孢米诺钠及杂质

**摘要：** 本文使用液相色谱-离子阱飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)对抗生素药物头孢米诺钠及杂质进行定性分析。样品主成分是头孢米诺钠，分子式是 $C_{16}H_{20}N_7NaO_7S_3 \cdot 7H_2O$ ，化学名(6R,7S)-7 $\beta$ -[(S)-2-[(2-氨基-2-羧乙基)硫]乙酰氨基]-7 $\alpha$ -甲氧基-3-[[[(1-甲基-1H-四唑-5-基)硫]甲基]-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸钠七水合物。根据主成分和相应杂质峰的多级质谱裂解规律，推导出目标杂质峰在流动相中的分子式为 $C_{16}H_{21}N_7O_6S_4$ ，并进一步推测了其结构。

**关键词：** 液相色谱-离子阱飞行时间质谱 LCMS-IT-TOF 液质联用 头孢米诺钠 Cefminox

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%)应进行鉴定。目前这些检查也是新药报批中必须项目。液质联用是常用的定性手段，岛津 LCMS-IT-TOF（液相色谱-离子阱飞行时间质谱仪）可以做多级质谱分析(最高 10 级)，并且每一级质谱都具备高分辨率和高质量数准确度，适合进行未知物如药物中不纯物的鉴定，可以准确的预测杂质的分子式和结构式。本文采用 LCMS-IT-TOF 对头孢米诺钠原料药主组分及杂质进行定性分析，推导出杂质的分子式及结构式。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂与仪器

试剂：乙腈和纯水，HPLC 级；冰醋酸，LCMS Grade。样品：头孢米诺钠原料药。

仪器：Shimadzu LCMS-IT-TOF，包括 LC-20AD $\times$  2(输液泵)，SIL-20ACHT(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，SPD-M20A(二极管阵列检测器)，DGU-20A<sub>3</sub>(在线脱气机)，CBM-20A(控制器)，LCMS-IT-TOF(液相色谱-离子阱飞行时间质谱仪)。

### 1.2 色谱条件

色谱柱：

YMC-Pack ODS-A 150\*6.0mm I.D, 5 $\mu$ m

流动相：醋酸溶液（10ml 冰醋酸，加水稀释至 1000ml）/甲醇/四氢呋喃（990/5/5，v/v/v）

流速：1.0 mL/min

柱温：40 $^{\circ}$ C

波长检测范围：190-370nm

质谱：

离子化模式 ESI (+)

雾化气流速 1.5 L/min

干燥气流速 14 L/min

CDL 温度 250 $^{\circ}$ C

Heater Block 温度 250 $^{\circ}$ C

检测器电压 1.70 kV

液质联用进样模式，样品浓度 1mg/mL，研究主组分裂解规律时进样体积 5 $\mu$ L。研究杂质裂解规律时进样体积 100 $\mu$ L，采用高压流路切换阀，20 分钟后流路进入质谱

自动调谐优化电压，外标法校正质量数。

## 2 结果与讨论

图1为分析得到的PDA色谱图(254nm)。其中16.075min为头孢米诺钠主组分色谱峰,36.488min色谱峰为未知的目标杂质。得到多级质谱图如图2和图3所示。

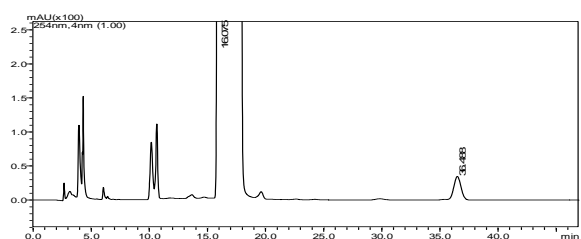


图1 254nm 色谱图

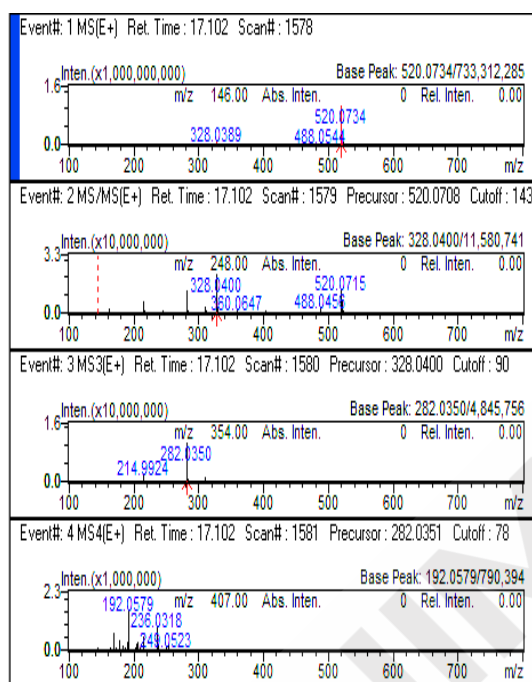


图2 主组分多级质谱图

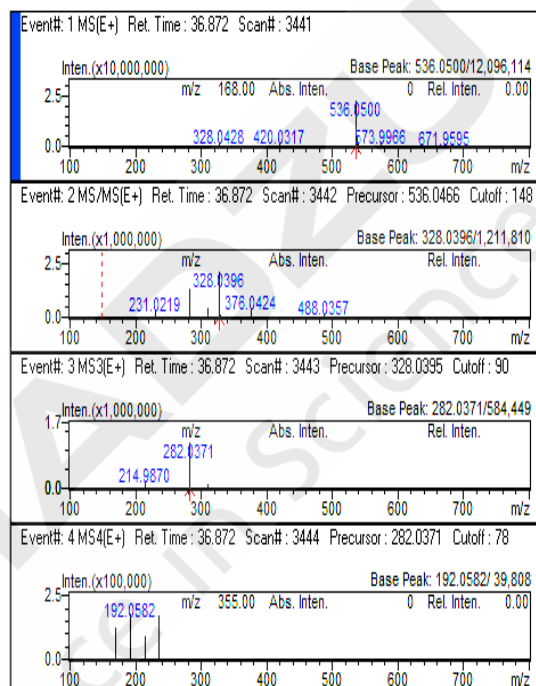


图3 目标杂质峰多级质谱图

主成分分子式预测结果是  $C_{16}H_{21}N_7O_7S_3$ 。头孢米诺钠分子式  $C_{16}H_{20}N_7NaO_7S_3 \cdot 7H_2O$ , 结构式如图4。

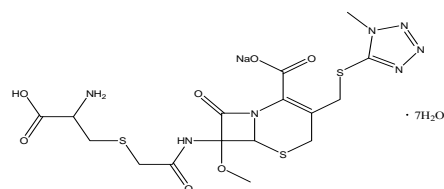


图4 头孢米诺钠结构式

预测结果与主组分在流动相中的分子式  $C_{16}H_{21}N_7O_7S_3$  一致。推导其裂解规律见图5。

杂质峰在流动相中分子式预测结果是  $C_{16}H_{21}N_7O_6S_4$ , 比较头孢米诺钠在流动相中的分子式, 一个氧被硫替代。并且杂质峰与主成分峰的后面三级质谱图相似, 都是相同的碎片离子, 可以推断出甲氧基上的氧被硫替代, 并且在二级质谱生成过程中被取代的基团已丢失。杂质峰的裂解规律如下图6。

分子式预测结果列表如下:

化合物代号	Formula	Ion	Meas.m/z	Pred.m/z	Diff(mDa)	Diff(ppm)
主成分	$C_{16}H_{21}N_7O_7S_3$	$[M+H]^+$	520.0734	520.0737	-0.3	+0.58
目标杂质峰	$C_{16}H_{21}N_7O_6S_4$	$[M+H]^+$	536.0500	536.0509	-0.9	+1.68

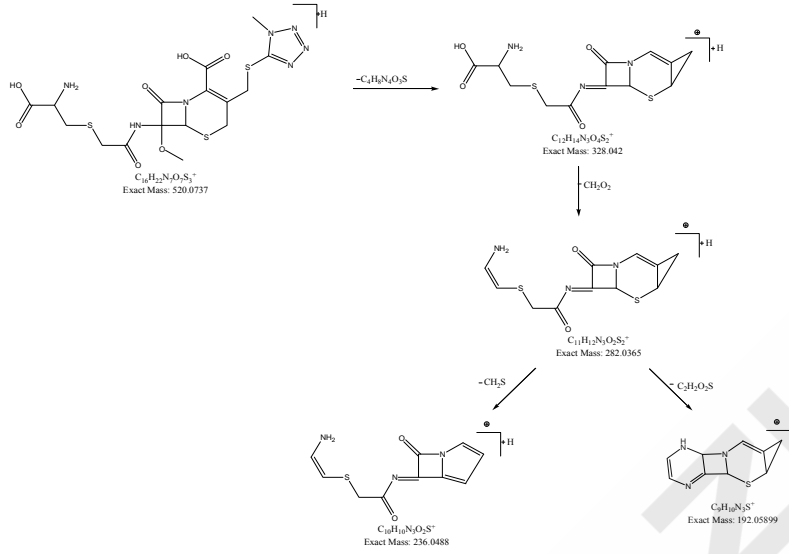


图5 主组分的裂解规律

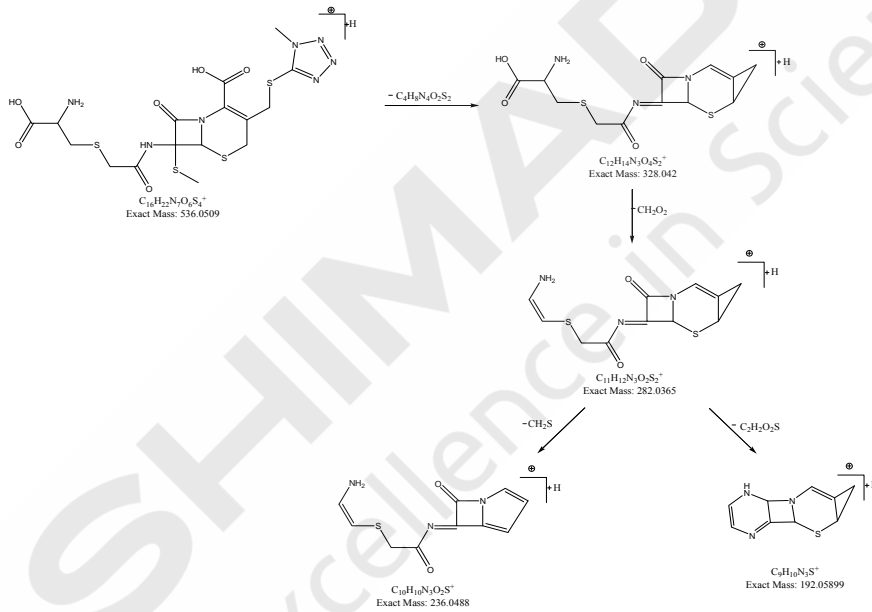
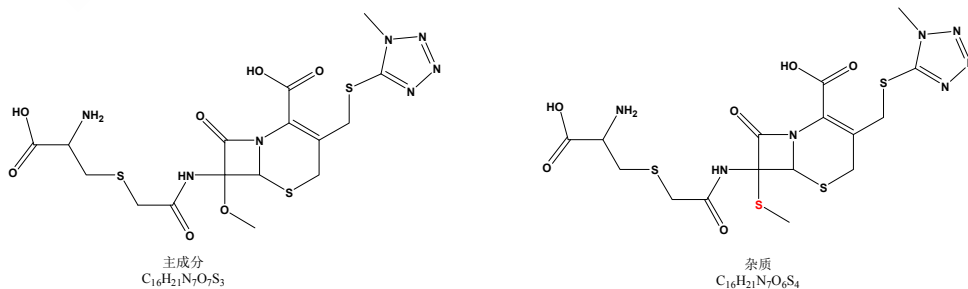


图6 杂质的裂解规律

### 3 结论

用 LCMS-IT-TOF 检测了头孢米诺钠和目标杂质，获得其多级质谱图，预测了杂质的分子式并推导出结构式。结合主组分结构，推测杂质的分子式为  $C_{16}H_{21}N_7O_6S_4$  或者  $C_{16}H_{20}N_7NaO_6S_4$ ，化学名为(6R,7S)-7β-[(S)-2-[(2-氨基-2-羧乙基)硫]乙酰氨基]-7α-甲基硫基-3-[[[1-甲基-1H-四唑-5-基)硫]甲基]-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸（钠）。



# 离子阱飞行时间质谱定性检测阿扎那韦中间体中的杂质

**摘要：** 本文使用离子阱飞行时间质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了阿扎那韦中间体中的杂质。使用注射进样模式研究了主成分的三级质谱裂解规律。液质联用方式分析了阿扎那韦中间体，并对含量较高的杂质进行了多级质谱分析。根据主成分的多级质谱裂解规律，推导出了四个杂质的化学结构，并给出了各自的多级质谱裂解规律。

**关键词：** 阿扎那韦 离子阱飞行时间质谱 LCMS-IT-TOF

抗 HIV 作用的蛋白酶抑制剂阿扎那韦是目前世界上主要的抗艾滋病药物，具有持续强效抑制艾滋病病毒、低耐药、用药方便、对脂肪代谢副作用小的特点，2006 年全球销售额达到 32.26 亿美元，仅在美国就已有约 13 万名患者接受这种药物的治疗。阿扎那韦药品目前仍属于专利保护药品，专利由施贵宝公司掌握，只授权少数几家制药公司生产。阿扎那韦的专利预计于 2011 年到期，届时随着药品专利的失效，仿制药生产厂家将大量出现，对中间体的需求也将成倍增长。

出于对用药安全的考虑，原料药中超过 0.1%含量的杂质都要进行定性。液质联用技术是药物杂质检测的不可或缺的手段。在各种质谱仪中，离子阱飞行时间质谱由于既具备多级质谱功能（最多到 10 级），又具备高分辨率和高质量数准确度，因此特别适合于同时对多种微量成分进行准确的定性和定量分析。本文使用离子阱飞行时间质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了阿扎那韦中间体中的四种杂质。

## 1 材料与方方法

试剂与仪器

试剂：乙腈，HPLC 级；纯水，Milli-Q 超纯水仪制备得到；乙酸铵，LCMS 级；所有试剂和样品需用 0.45  $\mu\text{m}$  以下滤膜过滤。仪器：岛津超快速液相色谱仪(UFLC)和离子阱飞行时间质谱仪(LCMS-IT-TOF)。具体配置为：输液泵 LC-20AD $\times$ 2，在线脱气机 DGU-20A<sub>3</sub>，自动进样器 SIL-20ACHT，柱温箱 CTO-20AC，二极管阵列检测器 SPD-M20A，控制器 CBM-20A，离子阱飞行时间质谱仪 LCMS-IT-TOF，工作站 LCMSsolution V3.50。

样品前处理方法

称取约 30 mg 样品于 100 mL 容量瓶，加 10 mM 乙酸铵/乙腈(3/1,v/v) 稀释至刻度得 300  $\mu\text{g/mL}$  溶液，再稀释至 10  $\mu\text{g/mL}$ ，过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后供 LC-MS 分析。

色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS 2.0 mm I.D. $\times$ 75 mm L., 2.2  $\mu\text{m}$ ；流动相：A 相—10 mM 乙酸铵的水溶液，B 相—乙腈；流速：0.3 mL/min；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：2  $\mu\text{L}$ ；梯度洗脱程序：0 到 3 分钟维持 10%B, 3 分钟到 8 分钟线性增加到 90%B, 8 分钟到 10 分钟维持 90%B, 10 分钟到 10.10 分钟线性递减到 10%B, 15 分钟结束。

质谱条件

离子源：ESI，正负离子同时扫描；扫描范围：MS<sup>1</sup> m/z 100-400, MS<sup>2</sup> m/z 100-300, MS<sup>3</sup> m/z

50-200; 加热模块温度: 200℃; CDL 温度: 200℃; 雾化气流速: 1.5 L/min; 干燥气流速: 10 L/min; 离子源电压: 正离子模式+4.5 kV, 负离子模式-3.5 kV; 检测器电压: 1.70 kV; 校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品流动注射进样分析

样品为阿扎那韦中间体 (ATA 中间体), 主成分化学名为 2-[[4-(2-吡啶基)苯基]甲基]-胍羧酸-(1,1-二甲基)乙酯, 分子式为  $C_{17}H_{21}N_3O_2$ 。液相分析结果表明, 面积归一化法样品纯度在 98% 以上, 因此可以采用注射进样模式研究主成分裂解规律。ESI 正离子模式下得到多级质谱图如图 1 所示。

分子式预测结果表明,  $m/z$  300.1707 分子式是  $C_{17}H_{21}N_3O_2$  (与理论分子式吻合)。根据多级碎片信息推导出的碎裂途径如图 2 所示。

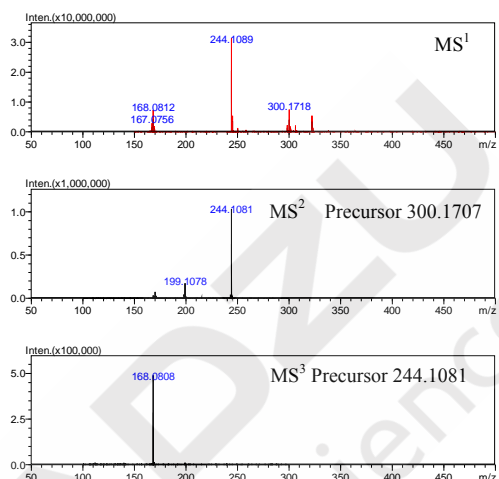


图 1 阿扎那韦中间体的多级质谱图

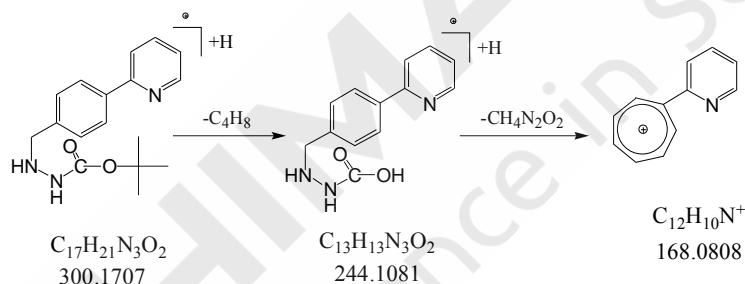


图 2  $C_{17}H_{21}N_3O_2$  裂解规律

### 2.2 样品液质联用分析

图 3 为 300  $\mu\text{g/mL}$  样品在 260 nm 下的 UV 色谱图, 2 为 ATA 中间体, 1、3、4 为杂质。

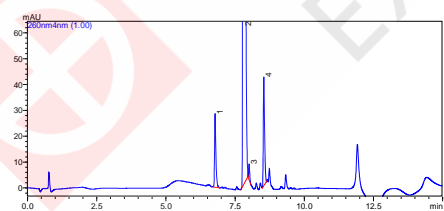


图 3 样品紫外色谱图

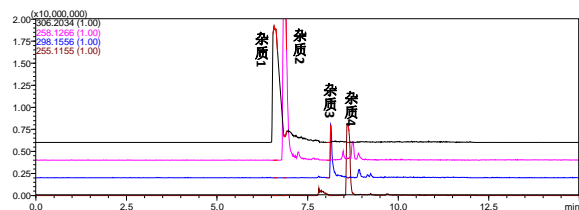


图 4 待定性的四个杂质的 EIC 图(进样浓度 300  $\mu\text{g/mL}$ )

为了提高杂质响应, 用 300 mg/L 高浓度样品进行 LC-MS 分析。为避免过高浓度的主成分进质谱导致饱和, 采用高压流路切换阀, 7.7 min 切阀使流动相从 PDA 出来后直接到废液瓶, 8.0 min 再切回质谱。对照紫外色谱图中杂质出峰位置, 得到如图 4 的 EIC 图, 样品中找到四种杂质。紫外色谱图中的 1 号杂峰在 TIC 图上相同时间处有两个峰, 因此对 TIC 图上两个峰都进行定性。总共需要定性的杂质峰有四个。

### 2.3 杂质定性分析过程

### (1) 1号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如图5所示。

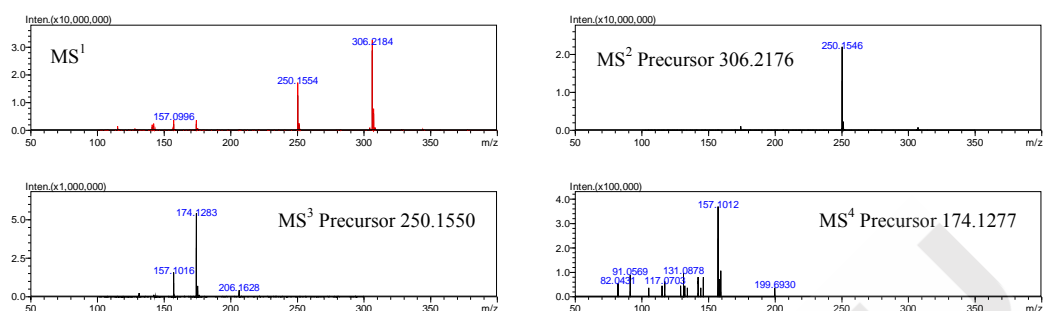


图5 1号杂质的多级质谱图

分子式预测结果表明，杂质1分子式是 $C_{17}H_{27}N_3O_2$ ，比主成分多了六个H，即少了三个不饱和度。从碎片离子上分析，杂质1出现以下碎片： $m/z$  250.1550和 $m/z$  174.1277均可以在主成分的质谱图中找到相应的减去六个H的离子响应。 $m/z$  157.1012为 $m/z$  174.1277丢失 $NH_3$ 的碎片，从而可以推断杂质1为主成分含氮杂环还原的副产物，还原没有发生在苯环上。推导出的碎裂途径如图6所示。

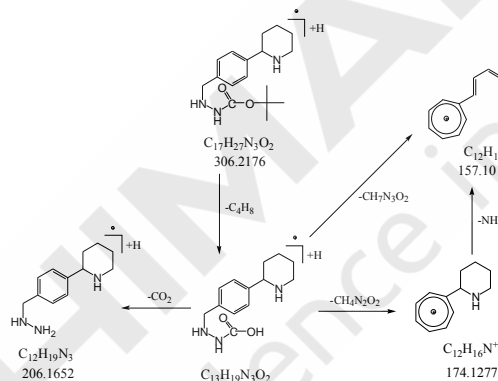


图6 杂质1（分子式 $C_{17}H_{27}N_3O_2$ ）的裂解规律

### (2) 2号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如图7所示。

分子式预测结果表明，杂质2分子式是 $C_{14}H_{15}N_3O_2$ ，比主成分少了 $C_3H_6$ 。杂质峰与样品峰的后2级质谱图类似，从质谱图的角度上只能判断亚甲基不在苯环或氮杂环上，但是无法进一步推测亚甲基的位置。杂质2可能的结构式有以下四种，从色谱出峰时间上推测第四种结构的可能性更大些。因此以结构四推导出杂质2的碎裂途径如图8。

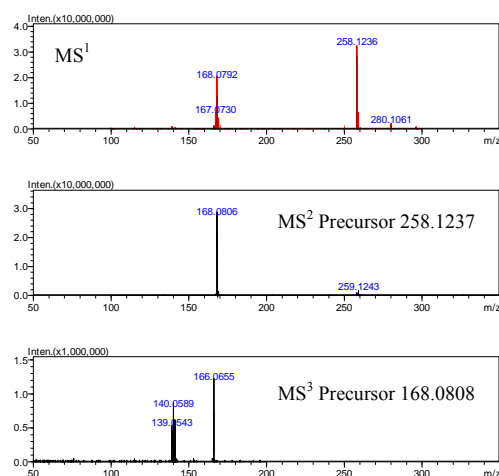


图7 2号杂质的多级质谱图

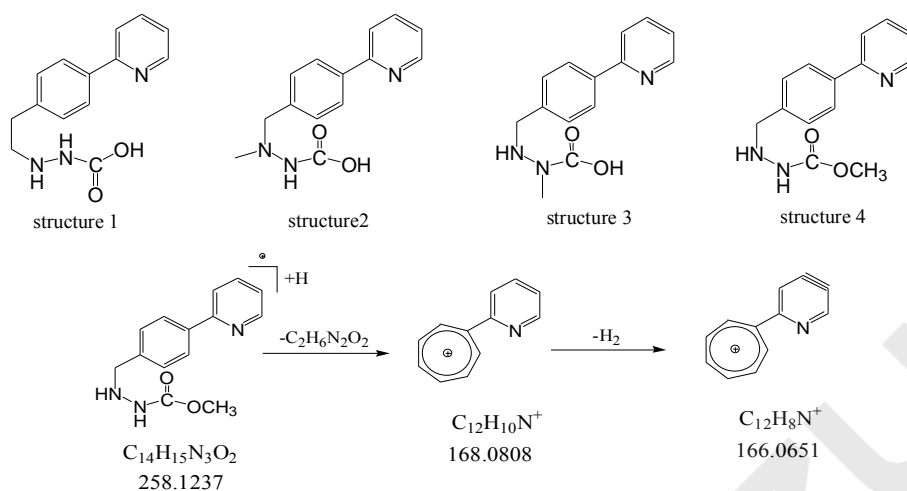


图 8 杂质 2 (分子式  $C_{14}H_{15}N_3O_2$ ) 的裂解规律

### (3) 3 号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如图 9 所示。

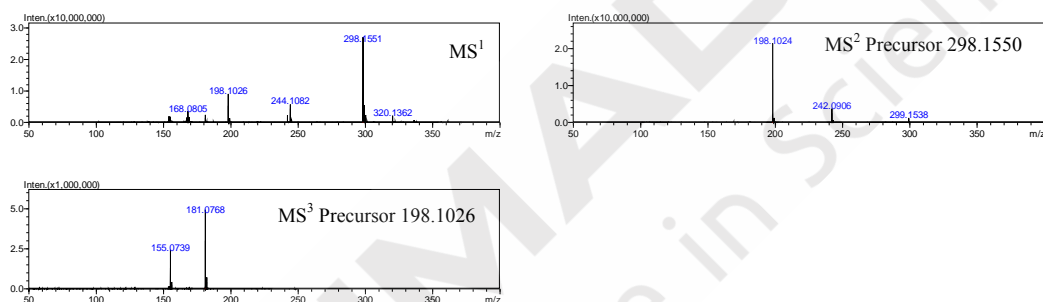


图 9 3 号杂质的多级质谱图

分子式预测结果表明, 杂质 3 的分子式是  $C_{17}H_{19}N_3O_2$ , 比主成分少两个 H。推断杂质 3 可能为如下结构, 并推导出其碎裂途径如图 10 所示。

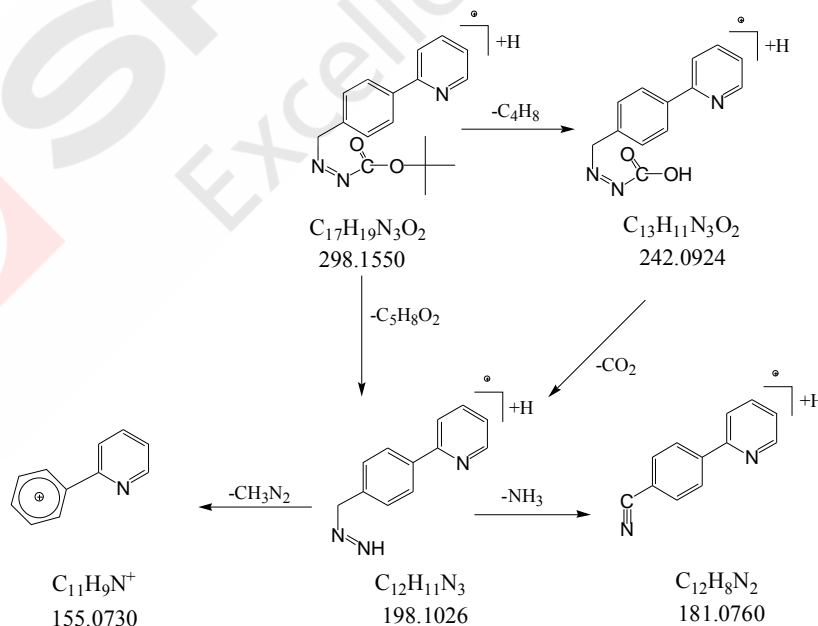


图 10 杂质 3 (分子式  $C_{17}H_{19}N_3O_2$ ) 的裂解规律

### (4) 4 号杂质峰质谱图信息

多级质谱图如图 11 所示。

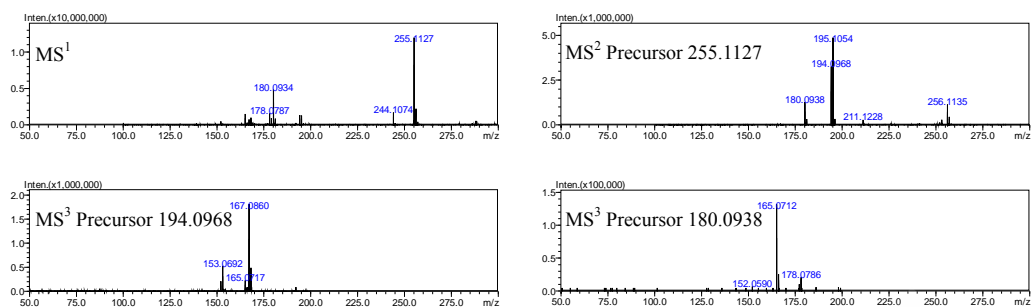


图 11 4 号杂质的多级质谱图

分子式预测结果表明，分子式是  $C_{15}H_{14}N_2O_2$ ，参考前述三个杂质的裂解规律，推导出其碎裂途径如图 12 所示。

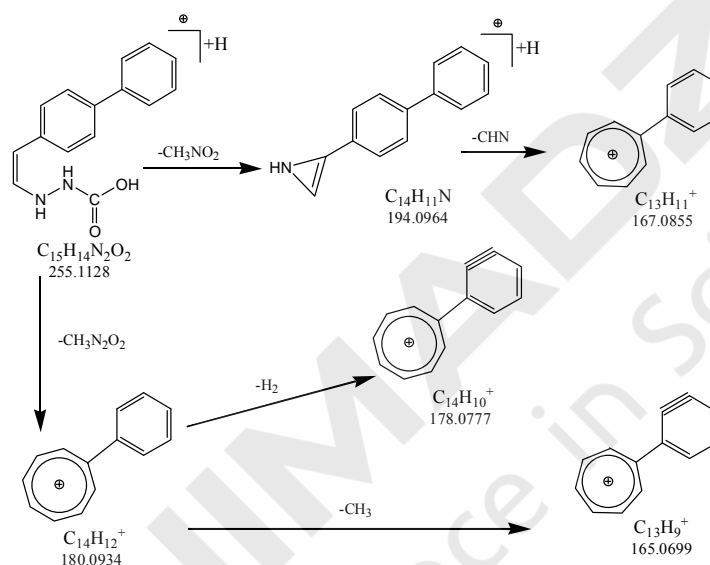


图 12 杂质 4 (分子式  $C_{15}H_{14}N_2O_2$ ) 的裂解规律

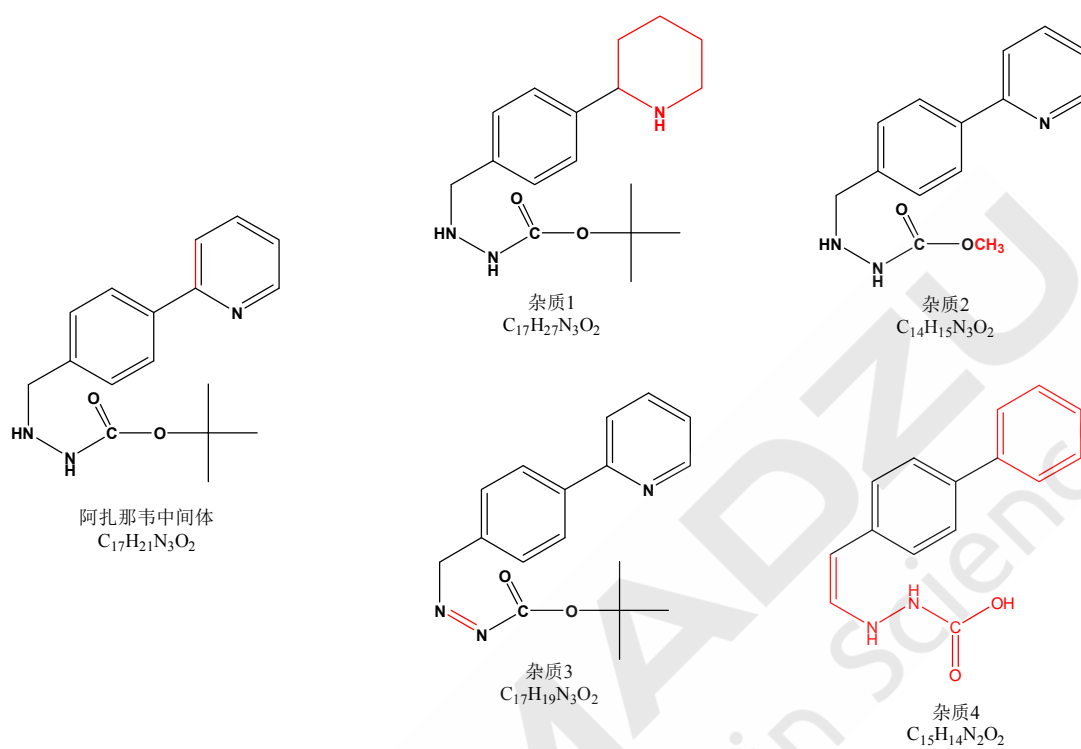
#### (5) ATA 中间体及四杂质分子式预测结果列表

样品名	Formula	Ion	Meas.m/z	Pred.m/z	Diff(mDa)	Diff(ppm)
ATA 中间体	$C_{17}H_{21}N_3O_2$	$[M+H]^+$	300.1718	300.1707	+1.1	+3.66
1 号杂质	$C_{17}H_{27}N_3O_2$	$[M+H]^+$	306.2184	306.2176	+0.8	+2.61
2 号杂质	$C_{14}H_{15}N_3O_2$	$[M+H]^+$	258.1236	258.1237	-0.1	-0.39
3 号杂质	$C_{17}H_{19}N_3O_2$	$[M+H]^+$	298.1551	298.1550	+0.1	+0.34
4 号杂质	$C_{15}H_{14}N_2O_2$	$[M+H]^+$	255.1127	255.1128	-0.1	-0.39

### 3 结论

本文使用离子阱飞行时间质谱 (LCMS-IT-TOF) 定性检测出了阿扎那韦中间体中的四种杂质。药物中间体在合成过程中原料已知，反应步骤已知，因此生成产物的元素组成已知。所以杂质的分子式预测较简单，用一般的高分辨质谱都能满足要求。但是对于杂质结构推断来说，仅仅使用二级质谱功能并不能很好地满足要求。因为仅仅依靠二级质谱并不能给出清晰的离子裂解规律，在二级质谱图上前体离子和子离子之间的关系不清晰，对于依靠裂解规律来推断结构的过程就会产生不利影响。而离子阱飞行时间质谱的  $MS^n$  功能和每一级都具备

高质量准确度的特点就可以很好地描述裂解规律并推导出结构式,是药物杂质定性分析的强有力工具。



# 阿莫西林原料药目标杂质的结构鉴定

**摘要:** 阿莫西林原料药在生产过程中可生成多种结构类似物或聚合物, 具有潜在的危害, 影响产品质量及用药安全性。本文制备分离阿莫西林原料药中的 4 个目标杂质组分, 通过 LCMS-IT-TOF 获得目标杂质的多级质谱数据, 根据碎片信息对目标杂质结构进行推测, 鉴别了阿莫西林原料药中的 4 个杂质的化学结构并总结其裂解规律, 为阿莫西林原料药质量控制提供可靠的依据。

**关键词:** 阿莫西林原料药; 目标杂质; LCMS-IT-TOF; 化学结构; 裂解规律

阿莫西林是一种常用的青霉素类广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 为一种白色粉末, 半衰期约为 61.3 分钟。在高温、光照、酸、碱和氧化条件下会发生降解。临床上证实阿莫西林的聚合物会引起过敏反应, 所以在生产和贮存过程中产生的有关物质, 直接影响产品质量和临床用药的安全性。为了控制有关物质、提高产品质量, 必须建立有效的分析检测手段。对于阿莫西林中有关物质的研究, 主要以高效液相色谱法为主, 液质联用技术为辅, 此外还有胶束电动毛细管色谱法, 高效毛细管电泳法, 离子交换树脂法等。

欧洲药典与美国药典都收载了该品种, 有关物质检查采用了高效液相色谱法 (HPLC), 由于流动相中有不挥发性磷酸盐, 该方法不能直接用于液质谱联用技术 (LC-MS), 因此, 我们用甲酸体系替代了磷酸盐, 采用改良的色谱条件, 通过 LCMS-IT-TOF 法分析阿莫西林原料药中的目标杂质, 并根据质谱图初步推测其结构, 为阿莫西林原料药进行质量控制提供了技术保证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱系统, Shimadzu LCMS-IT-TOF 系统, 包括 LC-20AD $\times$ 2(输液泵), SIL-20AC (自动进样器), CTO-20AC(柱温箱), CBM-20A(控制器), DGU-20A<sub>3</sub>(在线脱气机), SPD-M20A (二极管阵列检测器), LCMS-IT-TOF(电喷雾—离子阱—飞行时间质谱)

阿莫西林原料药(某药厂提供, 批号100605), 甲醇、乙腈(Finnigan公司)均为色谱纯试剂, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 分析型液相制备阿莫西林原料药中的目标杂质

#### 1.2.1 样品处理

取样品约 50 mg, 精密称定于 25 mL 量瓶中, 用流动相 A 超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经微孔滤膜过滤, 待用。(样品不稳定, 每日实验需新鲜配制)

#### 1.2.2 实验方法

1.2.2.1 HPLC 色谱条件: 色谱柱 ZORBAX SB-C<sub>18</sub>4.6 $\times$ 250mm5 $\mu$ m, 梯度洗脱(见表 1); 流速 1.0mL/min, 检测波长 254nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 100 $\mu$ L; 流动相体系: 量取 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0)与乙腈按 99: 1 的比例混匀, 经微孔滤膜过滤, 待用; 流动相体系 1-B: 量取 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0)与乙腈按 80: 20 的比例混匀, 经微孔滤膜过滤, 待用。

表1 梯度洗脱程序1

Time (min)	Mobile phase A(%)	Mobile phase B(%)
0	92	8
7	92	8
32	0	100
47	0	100

### 1.2.2.2 目标杂质的馏分收集

手动收集保留时间分别为 4.1 min(Fraction 1) , 24.8 min(Fraction 2) , 31.6min(Fraction 3) , 35.7min(Fraction 4)的目标杂质峰, 用于 LCMS-IT-TOF 测定。见附图 1。

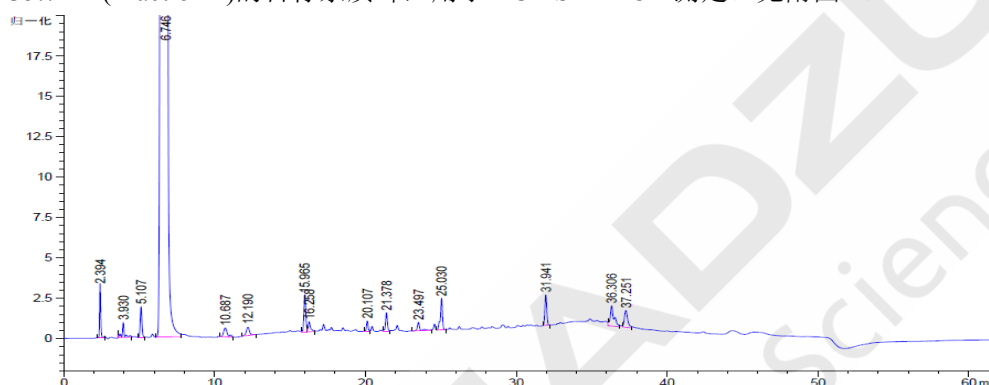


图1 HPLC测定阿莫西林原料药中的有关物质

## 1.3 LCMS-IT-TOF 自动分析模式对目标杂质进行分析测定

1.3.1 LC-MS条件: 色谱柱Shim-pack XR-ODS, 2.0×75 mm, 2.2μm (岛津公司); 柱温30℃, 流动相为甲酸体系, 流速0.2 mL/min, 检测波长UV254nm; 质谱条件: 电喷雾电离源, 正、负离子检测, 雾化气流速1.50L/min, CDL温度200℃, 加热模块温度200℃, 检测器电压1.70kv, 碰撞能量50%, 采集范围m/z 100-1000, 自动调谐优化质谱条件, 外标法校正质量数, 母离子选择方式为自动模式。流动相体系: 流动相A: 水+0.1%甲酸; 流动相B: 乙腈。梯度洗脱条件见表2与表3。

表2 梯度洗脱程序2

时间	单元	操作	值
0.00	Pumps	B.Conc	2
2.00	Pumps	B.Conc	2
7.00	Pumps	B.Conc	95
7.20	Pumps	B.Conc	2
10.00	Pumps	B.Conc	2
10.00	Controller	Stop	

表3 梯度洗脱程序3

时间	单元	操作	值
0.00	Pumps	B.Conc	2
3.00	Pumps	B.Conc	2
7.00	Pumps	B.Conc	80
13.00	Pumps	B.Conc	80
13.20	Pumps	B.Conc	2
17.00	Controller	Stop	

### 1.3.2 样品测定

对制备分离得到的目标杂质 F1, F2, F3, F4 进行测定。其中样品 F1、F2 使用梯度 1 进行分析 样品 F3、F4 使用梯度 2 进行分析

## 2 结果

### 2.1 实验结果分析

#### 2.1.1 目标杂质 F1 检测结果

### 2.1.1.1 RT=3.9min 谱峰的多级质谱数据分析

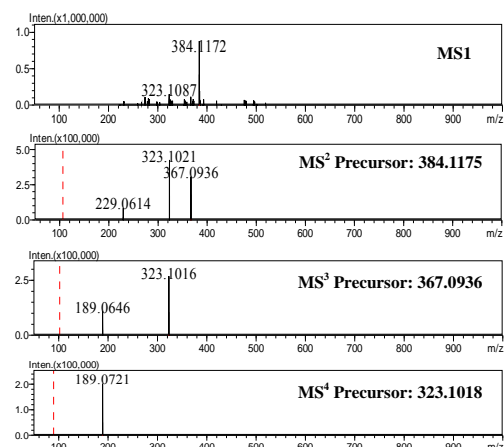


图 2 RT = 3.9 min 谱峰的多级质谱数据

根据分子式预测结果，目标杂质 F1 的分子式为  $C_{16}H_{21}N_3O_6S$ 。根据此分子式并对照参考文献<sup>[1]</sup>，推测 F1 为图 3 所示：

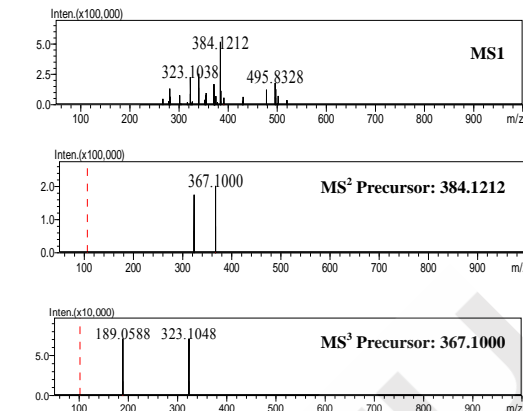
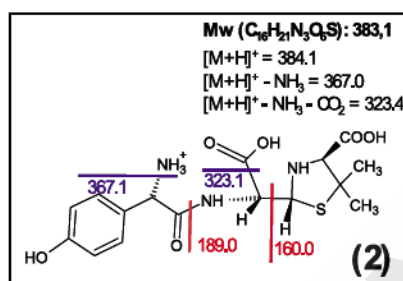


图 4 RT = 5.4 min 谱峰的多级质谱数据

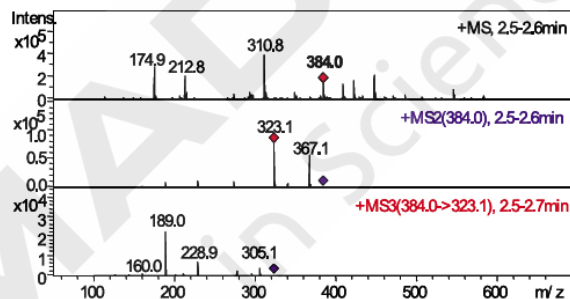


图 3 文献报道的结构及裂解规律

### 2.1.1.2 RT=5.4min 谱峰的多级质谱数据分析

RT = 5.4 min 谱峰的多级质谱图见图 4。RT = 5.4 min 谱峰与 RT = 3.9 min 的谱峰具有一致的多级质谱碎片结合分子式预测结果，推测为互为异构体，结合文献<sup>[1]</sup>，推测该化合物为欧洲药典中的 D 杂质。其裂解方式见图 5。

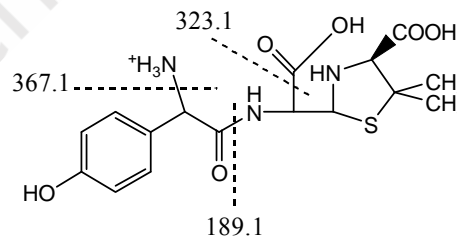


图 5 F1 的多级质谱裂解方式

### 2.1.2 目标杂质 F2 的检测结果

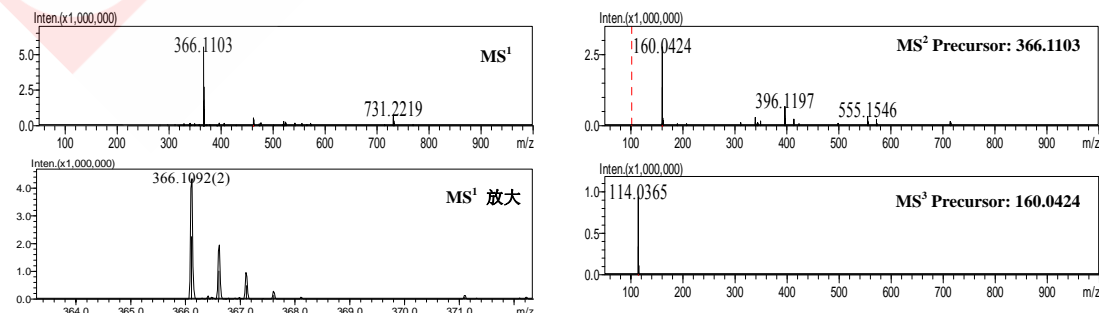


图 6 m/z 366 离子的多级质谱图

目标杂质 F2 的多级质谱图见图 6。从一级质谱图的放大谱图可以看出，m/z 366 离子为双电荷离子，且二级碎片中具有较多大于 366 的碎片离子，因此，推测目标杂质

F2 为二聚体。

$m/z$  366 (2+) 离子的预测分子式可能为  $C_{32}H_{38}N_6O_{10}S_2$ ，其二聚体的分子量为 731，其单体多级碎片与下图一致，推测  $m/z$  366 具有下图 7 所示的结构。

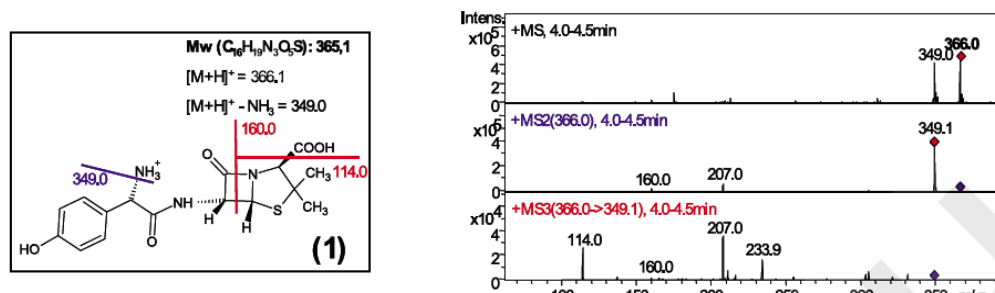


图 7 文献报道的结构及质谱裂解规律

多级质谱图中 MS2 质谱图除  $m/z$  160 离子外，显示多个质量数较大碎片，我们进行了推测（见下图 8、9、10），结合文献<sup>[1,2]</sup>确定该目标杂质为欧洲药典中的 J 杂质(n=1)即为 F2。

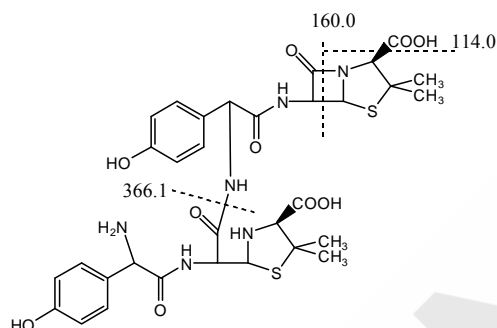


图 8 质量较小碎片的多级质谱图

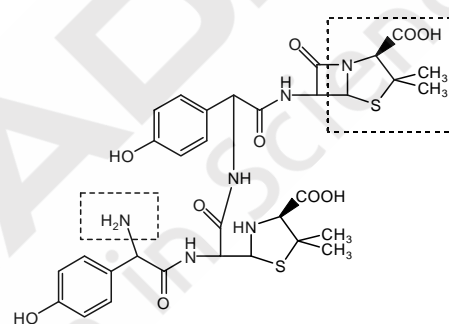


图 9 MS 555 碎片形成时丢失的部分

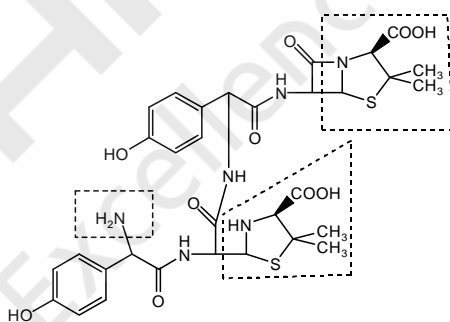


图 10 MS 396 碎片形成时丢失的部分

### 2.1.3 目标杂质 F3 检测结果

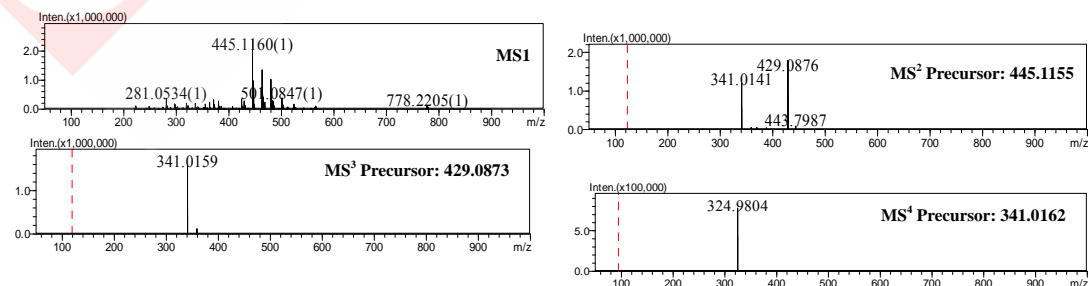


图 11  $m/z$  445 离子的多级质谱图

经预测， $m/z$  445 离子的分子式，为  $C_{22}H_{28}N_4O_4S$ ，结合多级质谱图（图 11），推测结构如下图 12，未见报道。同时我们推测了 F3 的生成途径，如图 13 所示。

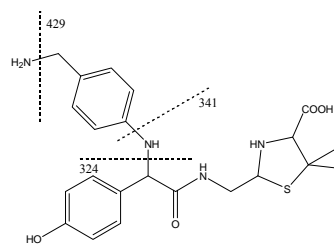


图 12 F3 的质谱裂解方式

#### 2.1.4 目标杂质 F4 检测结果

根据分子式预测软件的计算，推测  $m/z$  450 离子分子式为  $C_{21}H_{27}N_3O_6S$ ，结合多级质谱碎片（图 14），推测结构、裂解方式（图 15、16、17）及 F4 的生成途径（图 18）。

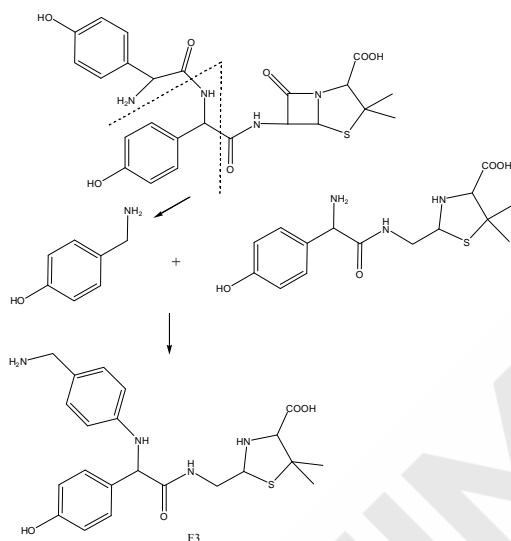


图 13 F3 的生成途径

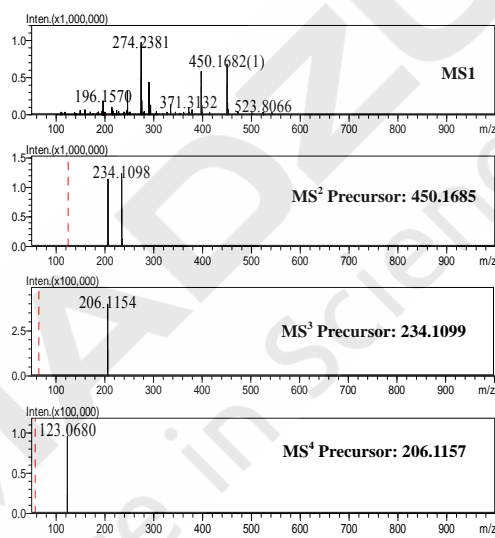


图 14  $m/z$  450 离子的多级质谱图

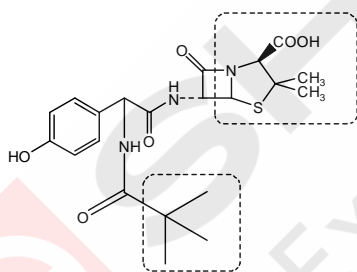


图 15 MS 234 的碎片形成时丢失的部分

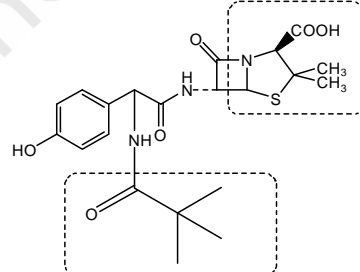


图 16 MS 206 的碎片形成时丢失的部分

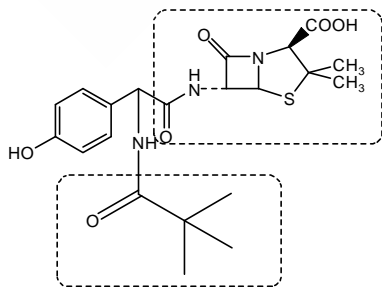


图 17 MS 123 的碎片形成时丢失的部分

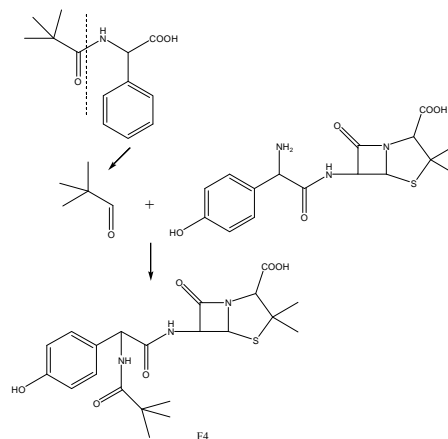
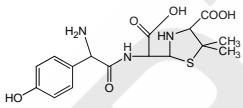
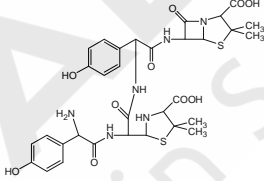
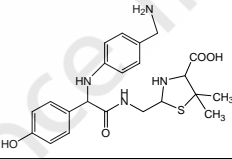
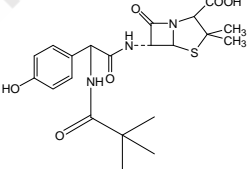


图 18 F4 的生成途径

## 2.2 实验结论

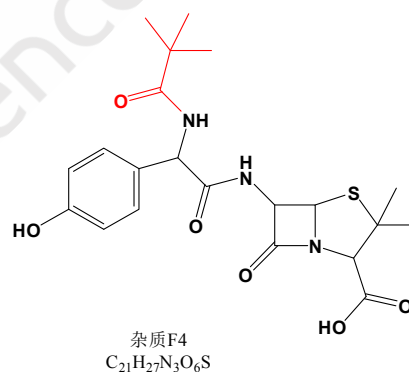
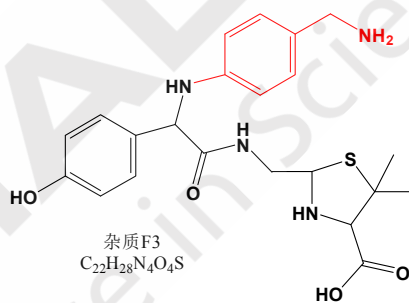
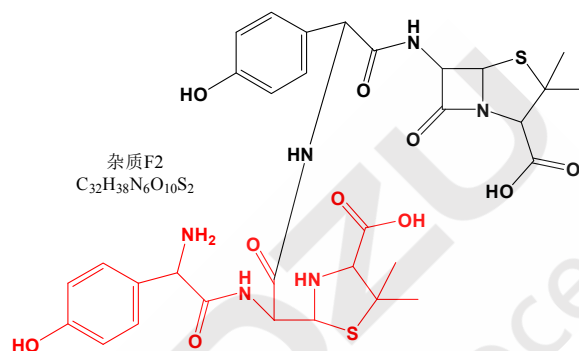
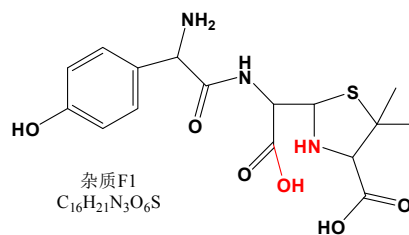
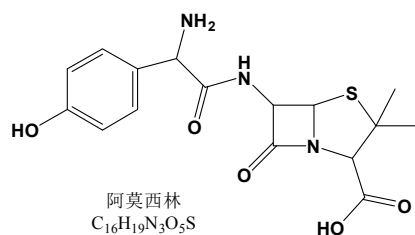
采用 LCMS-IT-TOF 系统对 4 个目标杂质进行质谱分析, 获得其多级质谱图, 结合文献推测分子式如下表 4 所示。其中, F1 与 F2 为已知杂质, F1 多级质谱裂解特征与文献<sup>[1]</sup>报道一致; F2 为二聚体, 其单体裂解规律与文献<sup>[1]</sup>报道一致, 二聚体的裂解的碎片我们也进行了简单的推导; F3 与 F4 为未知杂质, 结合阿莫西林有关物质的质谱裂解规律文献<sup>[1,2]</sup>报道, 推导出了结构, 而且推测了它们的生成途径。虽然利用 LCMS-IT-TOF 液质联用仪提供的准确质量数、多级质谱碎片对它们的结构进行了推测, 但是它们的结构还需要其它手段去进一步确证。

表 4 四个杂质的分子式

杂质名称	分子式	结构式
F1	$C_{16}H_{21}N_3O_6S$	
F2	$C_{32}H_{38}N_6O_{10}S_2$	
F3	$C_{22}H_{28}N_4O_4S$	
F4	$C_{21}H_{27}N_3O_6S$	

## 3 讨论

LCMS-IT-TOF 技术将离子阱和飞行时间质谱起来, 同时实现了多级质谱功能和精确质量测定, 非常有利于未知化合物的结构推测与鉴定。在本实验中, 对阿莫西林原料药中的 4 个微量目标杂质进行了检测与鉴定, 为阿莫西林原料药进行质量控制提供了保证。



参考文献：

- [1] Edgar Nägele, Ralf Moritz. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16:1670-1676.
- [2] Lu Chi-Yu, Feng Chia-Hsien. Identification of dimer impurities in ampicillin and amoxicillin by capillary LC and tandem mass spectrometry [J]. J. Sep. Sci. 2007, 30:329-332.

## 第三部分 Co-sense for Impurity 分析系统在药物杂质鉴定中的应用

### Co-sense for Impurity 分析系统工作原理

2000 年，岛津公司与 Eisai 制药公司合作研发了 Co-Sense for Impurity 分析系统（Co-Sense: Collaboration of Shimadzu and Eisai for New Systematic Efficiency）。该系统的研发目的，一方面是为了满足 FDA 对微量药物杂质鉴定的要求，另外一方面是为了满足使用非挥发性缓冲盐作为分析条件进行药物 LC/MS 分析的需求。

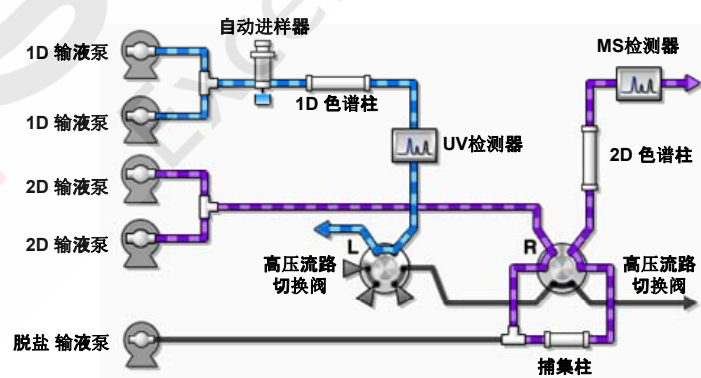
相比常规 LCMS-IT-TOF 系统，Co-sense for Impurity 系统具有以下优势：

1. 首先，该系统可以使用非挥发性缓冲盐作为流动相。
2. 相比常规系统，该系统具有富集的功能，富集倍数可达 10~20 倍，因此，大大提高了杂质鉴定的灵敏度；
3. 由于富集的杂质在 2D 上进一步分离，因此，目标杂质的分离度大大改善，同样提高了杂质鉴定的灵敏度。

该系统的分析流程示意图如下：

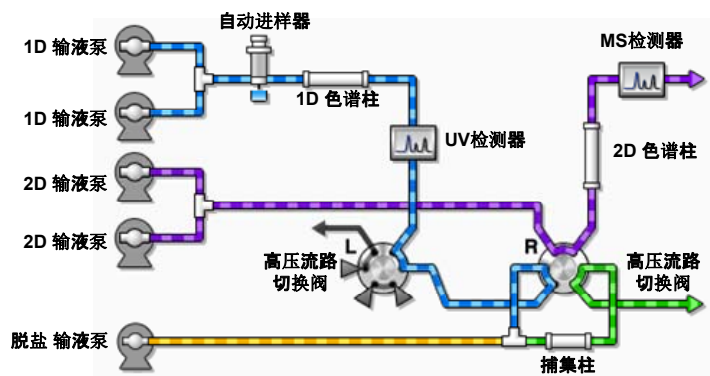
Step 1: 1D 分离。

样品由 1D 的自动进样器进入系统，经过 1D 色谱柱进行分离，UV 检测器检测，确定目标杂质的保留时间。此时，1D 使用的方法可以与药典的相同；2D 处于捕集等待平衡状态。



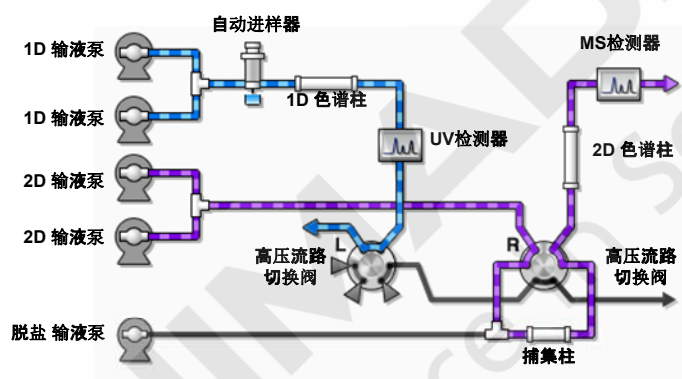
Step 2: 捕集及富集

再次进样，根据 Step1 获取的目标杂质保留时间，切换高压流路切换阀 L 和 R 的阀位置，将目标杂质通过流路切换，富集到捕集柱上。此时：脱盐输液泵（高水相）对 1D 流路过来的样品进行稀释脱盐，以便目标杂质很好的富集到捕集柱上而不随着 1D 的流动相洗脱下来；2D 输液泵处于平衡 2D 色谱柱的输液状态。



### Step 3: 2D 分离和检测

待目标杂质捕集完毕，切换高压流路切换阀 R 位置，2D 输液泵将捕集柱上的目标杂质冲洗下来，并通过 2D 色谱柱进行进一步的分离，MS 检测器进行检测。此时，1D 输液泵处于平衡 1D 色谱柱、等待再次进样分析的输液状态。



# 使用 HPLC 高灵敏度定量分析痕量杂质和活性组分

## 1. 高灵敏度定量分析痕量物质

随着对分析物浓度的要求越来越低，能够解决痕量分析的传统分析方法变得越来越少。例如，不仅产品的杂质影响产品质量，而且影响产品安全的实例也愈来愈多。由此导致更多的企业对杂质控制的要求更加严格，其中，低含量杂质的定量分析是关注的焦点。另外，当分析物是活性成分本身时，建立一个痕量浓度的定量方法就更加困难。

在这种情况下，典型的方法是增加分析物质的浓度以增加其灵敏度。然而主成分的溶解度可能受到影响，或者分析物因基质中大量的阻碍物而无法得到充分的分离（见图 1）。这种情况下必须进行提取和浓缩等前处理操作，但是，复杂的前处理操作占用了额外的时间和劳动力，从而影响了工作效率。

因此，痕量的定量分析需要在两个不同的需求上寻找平衡：增加检测灵敏度和加快操作速度。要实现这一目的的关键点是：使馏分收集（分离）和分析物的浓缩到最后的定量分析的整个过程自动化（见图 2）。

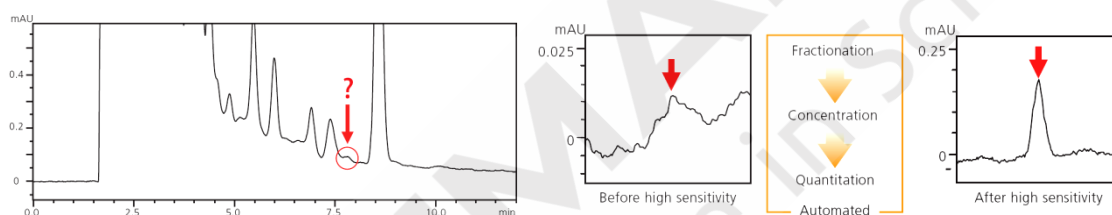


图 1 杂质峰实例

图 2 痕量杂质的自动定量分析

## 2. 痕量物质的自动定量

如果将功能内置到传统的 HPLC 和 UHPLC (ultra high performance HPLC) 可以扩展到实现如图 2 所示的 3 个步骤的自动化 ((1) 分离, (2) 浓缩, (3) 定量)), 这将大大降低成本以及操作和维护的时间。

而这, 正是 Co-sense for impurity 分析系统目的所在, 该系统可利用 HPLC 和 UHPLC 固有的灵活性进行轻松的搭建。

## 3. Co-sense for Impurity 分析系统

通过柱切换技术和二维分离技术的融合, Co-sense for Impurity 分析系统自动化分析过程分为 3 步, 包括分离、浓缩和定量。详细过程如前所述。

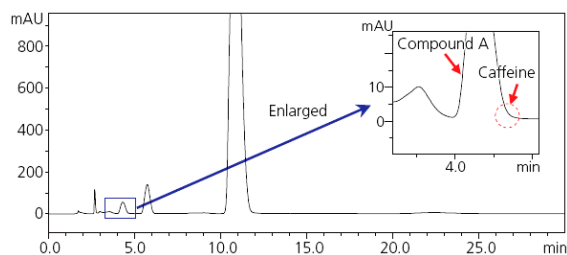
## 4. Co-sense for Impurity 分析系统应用实例

图 3 和图 4 均为使用 Co-sense for Impurity 分析系统分析痕量物质的应用实例。

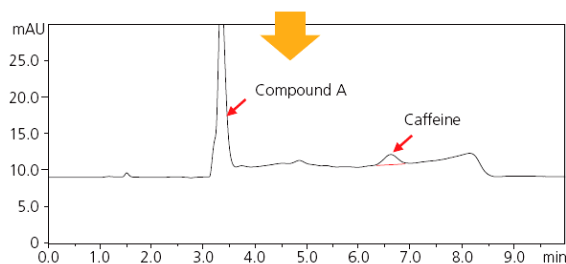
图 3 为药物(头孢唑啉 0.5 mg/mL)中添加虚拟的杂质咖啡因(相当于 0.0008%的杂质含量)。在这里, 定量时 (Step 3) 我们使用快速柱以加快分析的时间。图 4 为药物(利托君注射液, 10 mg/mL)中添加虚拟杂质对羟基苯甲酸甲酯(相当于 0.00001%的杂质含量)。

图 3 和图 4 的分析例中, 高分离度源于两种分离模式 (Step 1 和 Step 3) 使用了不同的流动

相，以及具有不同分离特性的色谱柱。这些措施使得痕量物质的定量分析成为可能，而使用传统的方法则难以实现。



传统方法分析结果（使用检测器 A 得到的色谱图）



Co-sense for Impurity 系统分析结果

<<Step (1) - 分离条件>>

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 10.0 mmI.D., 5 μm)

流动相: A—20 mmol/L phosphate buffer solution (pH 2.5)

B—乙腈; A/B = 85/15 (v/v)

流速: 4.7 mL/min 柱温箱: 40°C

进样体积: 1.5 mL 检测波长: 272 nm

收集间隔: 积分范围 (4.21 ~ 4.86 min)

<<Step (2) - 浓缩条件>>

色谱柱: Shim-pack GPRC-ODS (15 mmL. × 8.0 mmI.D., 5 μm)

流动相: 100 mmol/L 醋酸铵水溶液

流速: 12.0 mL/min 柱温箱: 40°C

<<Step (3) - 定量条件>>

色谱柱: Synergi Hydro-RP (100 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.5 μm)

流动相: A—100 mmol/L 醋酸铵水溶液; B—甲醇

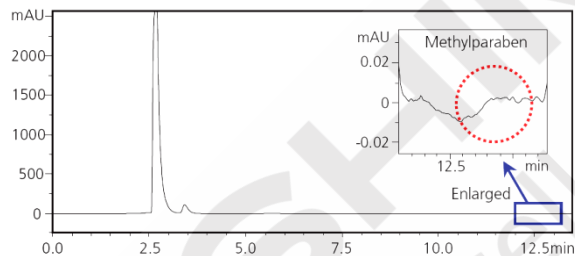
梯度洗脱程序: B 浓度: 20% (0 min) ~ 65% (5 min) ~ 20%

(5.01 ~ 10 min)

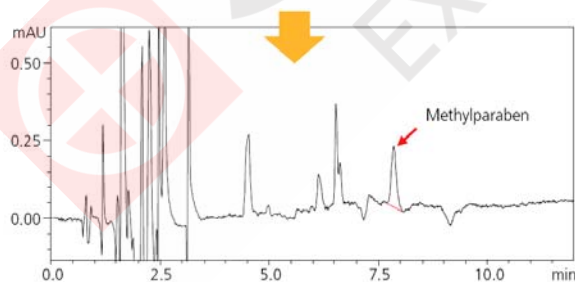
流速: 0.4 mL/min 柱温箱: 40°C

检测波长: 272 nm

图 3 Co-sense for Impurity 系统分析例 (1)



传统方法分析结果（使用检测器 A 得到的色谱图）



Co-sense for Impurity 系统分析结果

<<Step (1) - 分离条件>>

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 10.0 mmI.D., 5 μm)

流动相: A—20 mmol/L 磷酸 (钠) 盐缓冲液 (pH 2.5)

B—甲醇; A/B = 65/35 (v/v)

流速: 4.0 mL/min 柱温箱: 40°C

进样体积: 200 μL 检测波长: 254 nm

收集间隔: 积分范围(12.0 - 13.2 min)

<<Step (2) - 浓缩条件>>

色谱柱: Shim-pack GPRC-ODS (15 mmL. × 8.0 mmI.D., 5 μm)

流动相: 50 mmol/L 磷酸 (钠) 盐缓冲液 (pH 6.8)

流速: 8.0 mL/min 柱温箱: 40°C

<<Step (3) - 定量条件>>

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 4.6 mmI.D., 5 μm)

流动相: A—20 mmol/L 磷酸 (钠) 盐缓冲液 (pH 2.5)

B—乙腈

梯度洗脱程序: B.CONC 10% (0 min) - 55% (7 min)

流速: 1.0 mL/min 柱温箱: 40°C

检测波长: 254 nm

图 4 Co-sense for Impurity 系统分析例 (2)

## 5. Co-Sense for Impurity 分析系统的操作

为了使得 Co-Sense for Impurity 分析系统的操作与常规 HPLC 和 UHPLC 一样的便利，该系

系统的操作软件使用 GUI（graphical user interface）进行设计。如图 6 所示，不仅所有必须的设置条件均在一个窗口里，而且系统当前的操作状态也绘制出来，以便于系统的监控。这样的设计使得每个人均能很轻松的进行痕量物质的分析。



图 5 Co-Sense for Impurity 系统

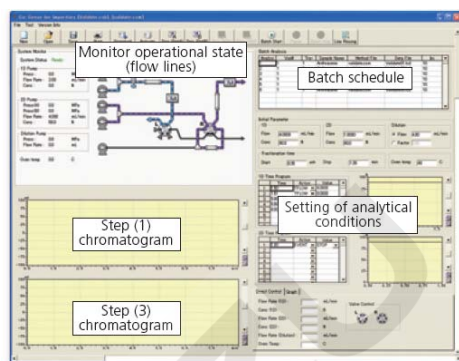


图 6 Co-Sense for Impurity 系统操作窗口

## 6. 使用质谱仪

Co-Sense for Impurity 系统用于痕量分析的另外一个方式是连接质谱仪。使用超高效液相色谱仪作为 LC 前端，使得定量分析更加快速。

由于 LCMS-8030/8040 三重四极杆质谱仪和 LCMS-2020 单四极杆质谱仪具有超快速的正负极切换速度（15 msec）和扫描速度（15000 u/sec），再配以 Nexera 作为前端 LC，使得超快速质谱成为可能，也最大利用了 Nexera 的超快速液相色谱的性能。

到底是选用最基本的连接 HPLC（或 UHPLC）的 Co-Sense for Impurity 系统？还是连接 LC/MS/MS（或 LC/MS）的 Co-Sense for Impurity 系统？用户可以根据预算、维护成本、分析频率和需要的灵敏来进行灵活的选择。



图7 三重四极杆LC/MS/MS系统  
Nexera + LCMS-8030



图 8 单四极杆 LCMS 系统  
Nexera + LCMS-2020

# Co-Sense for Impurity 系统对原料药中杂质的 LC/MS/MS 分析

原料药 (API) 中杂质的检测通常使用HPLC-UV的方法。但是杂质的定性和定量分析不仅需要将杂质与主成分分离, 而且需要杂质之间互相分离。另外, 杂质的来源, 无论是样品本身或者相关的外部因素, 都需要确定。因此, 为此类分析建立一种有效的分析条件所花费的时间和精力都是十分有意义的。

本文, 我们研究了使用具有二维LC/MS/MS特点的Co-Sense for Impurity系统分析一种原料药中的杂质。

## 1. 杂质峰的LC/MS分析

本文根据日本药典检测了雷贝拉唑钠 (Rabeprazole, 1 mg/mL) 溶液。分析条件见表1。

表1 分析条件

色谱柱 ( I ) : Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 4.6 μm)
流动相 : 甲醇/50 mmol/L的磷酸缓冲液 ( pH7.0 ) = 3/2 ( v/v )
流速 : 1.0 mL/min
柱温箱 : 30 °C
进样体积: 20 μL
检测器 ( A ) : UV 290 nm

Co-Sense for Impurity系统的具体配置见图1。图中红线所示为样品导入步骤, 得到的UV色谱图见图2。

质谱检测器需要使用挥发性的流动相。图1流路中蓝色和绿色的流路为挥发性流动相。

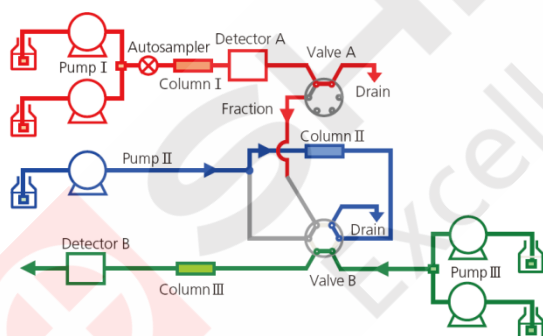


图1 系统流程图

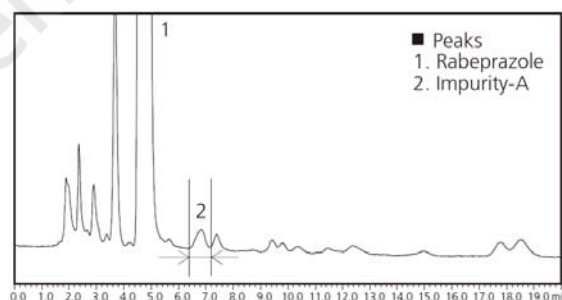


图2 雷贝拉唑钠的LC-UV色谱图

分析时, 当杂质峰从红线所示的流路中洗脱出来的时候, 阀A进行切换, 杂质则被导入到蓝线所示的流路中, 与挥发性流动相混合, 被富集在色谱柱 ( II ) 上。然后阀B切换, 绿色流路的挥发性流动相将柱 ( II ) 上的样品洗脱下来并在色谱柱 ( III ) 上进行分离。该过程的分析条件见表2。

表2 分析条件

色谱柱 ( II ) : STR-ODS II (10 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
流动相 : 100 mmol/L 醋酸铵
流速 : 5.0 mL/min
色谱柱 ( III ) : Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
流动相 : 甲醇/10 mmol/L醋酸铵= 3/2 ( v/v )
流速 : 0.2 mL/min
检测器 ( B ) : LCMS-8030 (ESI)

使用质谱检测器SCAN模式对保留时间为6.8 min的杂质峰A（峰面积约为原料药峰的0.06%）进行检测（见图2）。ESI负离子模式得到的色谱图见图3，提取得到三个质量数离子，分别为： $m/z$  394.1、 $m/z$  508.2和 $m/z$  569.2。如果使用LC/MS直接分析，这三个峰的洗脱峰型都差不多，而使用二维分离后，3个杂质峰（IM1-IM3）全部分离开来。

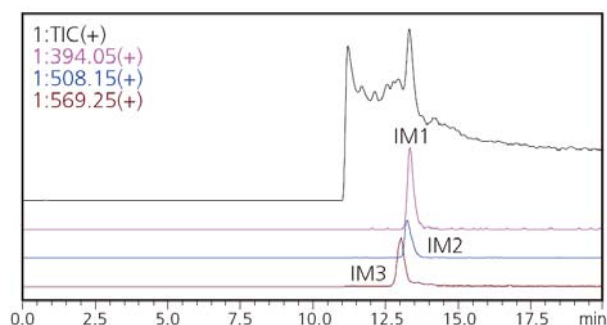


图3 杂质A的MS色谱图

## 2. 杂质的结构预测和MRM分析

对 $m/z$  508.2的离子进行产物离子扫描，对比原料药预测了杂质IM2的结构。图4为产物离子扫描的质谱图。分析结果显示，该杂质为原料药的苯并咪唑-2-巯基衍生物。

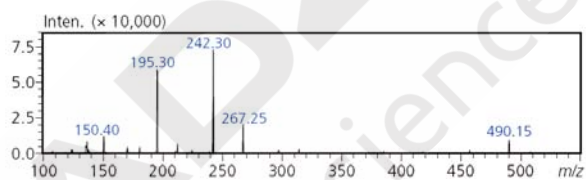
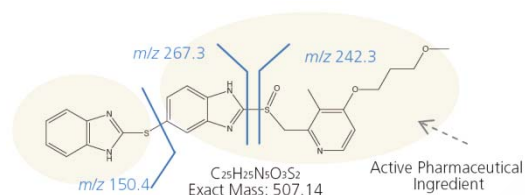
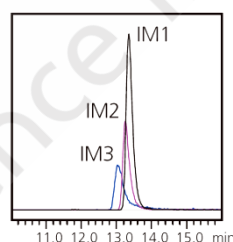


图4 杂质IM2的产物离子扫描质谱图

对于杂质IM1-IM3进行了MRM测试。使用该方法得到了很好的重复性和不同进样体积的线性，详细结果见图5。

MRM chromatograms  
 (2  $\mu$ L injection)

IM1:394.10>210.10(+)  
 IM2:508.20>242.20(+)  
 IM3:569.20>328.20(+)



	IM1( $m/z$ 394.2)		IM2( $m/z$ 508.2)		IM3( $m/z$ 569.2)	
	R.T.(min)	Area	R.T.(min)	Area	R.T.(min)	Area
1	13.353	520,894	13.258	273,084	13.047	167,315
2	13.381	512,177	13.284	259,097	13.075	164,805
3	13.47	507,981	13.393	260,198	13.165	161,516
4	13.486	521,671	13.432	263,336	13.182	161,514
5	13.428	521,411	13.37	271,433	13.112	170,422
Average	13.424	516,827	13.347	265,430	13.116	165,114
RSD(%)	0.42	1.23	0.55	2.43	0.44	2.33

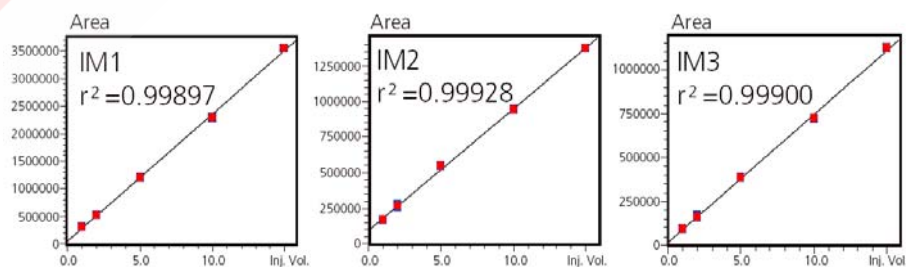


图5 杂质IM1-IM3的MRM结果

### 3. 杂质峰的二维分离

使用该LC/MS/MS系统，我们深入测试了UV检测器获得的杂质峰A（图6中的峰2）的分离情况，在之前的测试中，我们了解到该峰有3个杂质。

将二维的流动相从醋酸铵（图6中色谱图（2））更换为醋酸水溶液（图6中色谱图（1）），杂质得到了分离（分析条件见表3）。

将图6的 LC-UV色谱图的纵坐标统一尺寸。对比只经过一维分离的杂质峰A（左图），经二维分离的杂质峰（右图）的峰强度也大大加强。这说明使用Co-Sense for Impurity系统可以同时增加分离度和灵敏度。

表3 分析条件

色谱柱 ( II ) : STR-ODS II ( 10 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
流 动 相 : 10 mmol/L 醋酸铵
流 速 : 5.0 mL/min
色谱柱 ( III ) : Shim-pack XR-ODS ( 50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
流 动 相 : A—(1) 0.1 % 醋酸水溶液 (2) 10 mmol/L 醋酸铵 B—甲醇
时 间 程 序 : B CONC 40 % ( 0 min ) → 65 % ( 5 min )
混 合 器 : 180 μL
流 速 : 0.2 mL/min
检 测 器 ( B ) : UV 290 nm

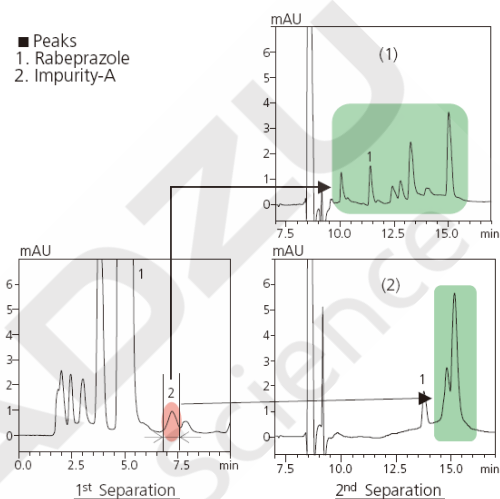


图6 杂质峰A的二维分离



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理 ( 中国 ) 有限公司 / 岛津 ( 香港 ) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F  
 邮政编码: 100020  
 电话: (010) 8525-2310/2312  
 传真: (010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市淮海西路 570 号红坊 E 楼  
 邮政编码: 200052  
 电话: (021) 2201-3888  
 传真: (021) 2201-3555

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层  
 邮政编码: 110001  
 电话: (024) 2383-6735  
 传真: (024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
 邮政编码: 610015  
 电话: (028) 8619-8421/8422  
 传真: (028) 8619-8420

### 武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室  
 邮政编码: 430022  
 电话: (027) 8555-7910  
 传真: (027) 8555-7920

### 广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼  
 邮政编码: 510010  
 电话: (020) 8710-8603  
 传真: (020) 8710-8698

### 西安

西安市南二环西段88号老三届世纪星大厦24层G座  
 邮政编码: 710065  
 电话: (029) 8838-6016  
 传真: (029) 8838-6497

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
 邮政编码: 830000  
 电话: (0991) 230-6271/6272  
 传真: (0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室  
 邮政编码: 650021  
 电话: (0871) 315-2987  
 传真: (0871) 315-2991

### 南京

南京市中山南路 49 号商茂世纪广场 23 层 A1 座  
 邮政编码: 210005  
 电话: (025) 8689-0278  
 传真: (025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室  
 邮政编码: 400010  
 电话: (023) 6380-6057/6058  
 传真: (023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区福华一路98号卓越大厦15楼1号  
 邮政编码: 518040  
 电话: (0755) 8340-2852  
 传真: (0755) 8389-3100

### 河南

郑州市郑东新区金水东路21号永和广场A区14层1405、1406室  
 邮政编码: 450046  
 电话: (0371) 8663-2981/2983  
 传真: (0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City.  
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
 电话: (00852) 2375-4979  
 传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439  
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知