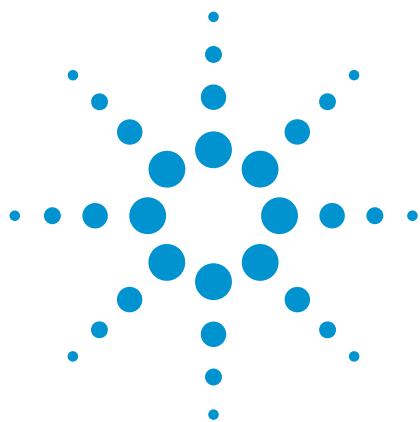




# 安捷伦 Q-TOF LC/MS 和先进的 MassHunter 数据处理软件结合使用进行药物杂质的鉴定和分析

## 应用简报

### 作者

Siji Joseph  
安捷伦科技  
LSCI 班加罗尔, 印度

Yuqin Dai  
安捷伦科技有限公司  
圣克拉拉, 加利福尼亚州, 美国

### 摘要

本文介绍了一种使用高分辨精确质量 (HRAM) 四极杆飞行时间 (Q-TOF) LC/MS 系统鉴定和分析原料药 (API) 中杂质的高效软件辅助工作流程。该工作流程包括如下两个步骤：一是在线 LC-UV 检测以及其后的 MS 和自动 MS/MS 分析；二是采用先进的 MassHunter 定性分析数据处理算法如分子特征提取 (MFE)、分子式生成 (MFG) 以及分子结构相关器 (MSC) 软件对杂质进行鉴定和结构解析。采用 Agilent 6540 超高精度精确质量 Q-TOF LC/MS 系统, 可实现药物中痕量杂质亚 ppm 级质量准确度的高灵敏度 MS 和 MS/MS 分析。本文通过对阿替洛尔及其 8 种欧洲药典 (EP) 中列出的杂质 (包括相对于阿替洛尔 UV 检测峰面积含 0.02-0.07% 的遗传毒性杂质 D 和杂质 F 的两种异构体) 的快速鉴定和结构解析, 证明了该杂质分析工作流程的高效性。



**Agilent Technologies**

## 前言

在药物研发和 API 生产阶段，杂质的鉴定和分析对于保证患者的安全和药物的有效性至关重要。监管部门已经建立了明确和严格的准则，规定要根据剂量对低含量杂质进行鉴定。按照美国食品药品监督管理局 (FDA) 的建议，API 中峰面积百分比 >0.05 的任何杂质都要报告。<sup>1</sup> 当前，有多种分析技术可用于药物杂质的鉴定和定量分析。然而，痕量杂质的鉴定仍然极具挑战性，因为常规的分析方法常常涉及多种仪器平台和复杂的样品处理步骤，如一个特定的杂质要通过制备 LC 进行纯化/收集，然后还要进行冻干和 NMR 分析，费时费力。

本文的目的是采用安捷伦 LC UV/Q-TOF MS 系统和先进的数据处理软件，开发一个精简的工作流程，实现杂质的高效鉴定。通过对含量在 0.02 - 0.07% 的 8 种阿替洛尔杂质进行鉴定和结构解析的实例进行了说明。

## 实验部分

图 1 展示了一个用于杂质鉴定和分析的新工作流程。与需要多种平台和许多天才能完成的常规杂质分析相比，该工作流程更加精简，可实现可靠性高、准确度好的鉴定和更快的结构解析。

## 仪器

LC/MS 系统包括配备喷射流离子源的 Agilent 6540 UHD Q-TOF 和 Agilent 1200 系列二元 LC 系统，该二元 LC 系统由以下模块组成：Agilent 1200 系列脱气机（部件号 G1379B）、Agilent 1200 系列二元泵（部件号 G1312B）、Agilent 1200 系列高性能自动进样器（部件号 G1367D）、Agilent 1200 系列柱温箱（部件号 G1316B）

以及配备体积 4.0  $\mu\text{L}$ 、光程 60 mm 的最大光强流通池（部件号 G4212 A）的 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器（部件号 G4212A）。软件包括用于数据采集的安捷伦 MassHunter 工作站（B.04.00 版）、用于数据分析的 MassHunter 定性分析软件（B.04.00 版）和帮助进行杂质结构解析的 MassHunter MSC 软件（B.05.00 版）。

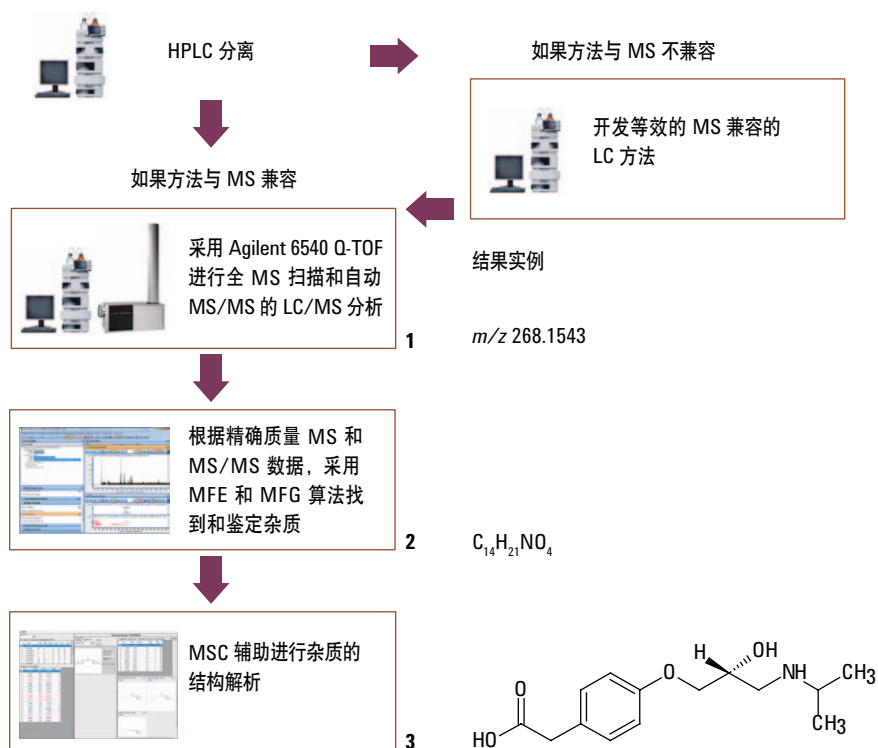


图 1. 采用 Agilent 6540 UHD Q-TOF LC/MS、MassHunter 定性分析和 MSC 软件进行药物中杂质鉴定和分析的软件辅助工作流程

## 试剂与材料

LC/MS 级甲醇和甲酸购自 Fluka 公司（德国）。流动相制备所用高纯水来自 Milli Q 系统（Millipore Elix 10 型，美国）。所有其它用来执行药典中阿替洛尔 HPLC 方法的试剂购自奥德里奇公司（印度）。阿替洛尔 API 及其 8 种杂质 (A-H) 的标准品购自 LGC Promochem 公司（德国）。阿替洛尔及其 8 种杂质的结构见图 2，其分子详情列于表 1。

## LC/MS 条件

优化的 LC/MS 条件总结于表 2 和 3。

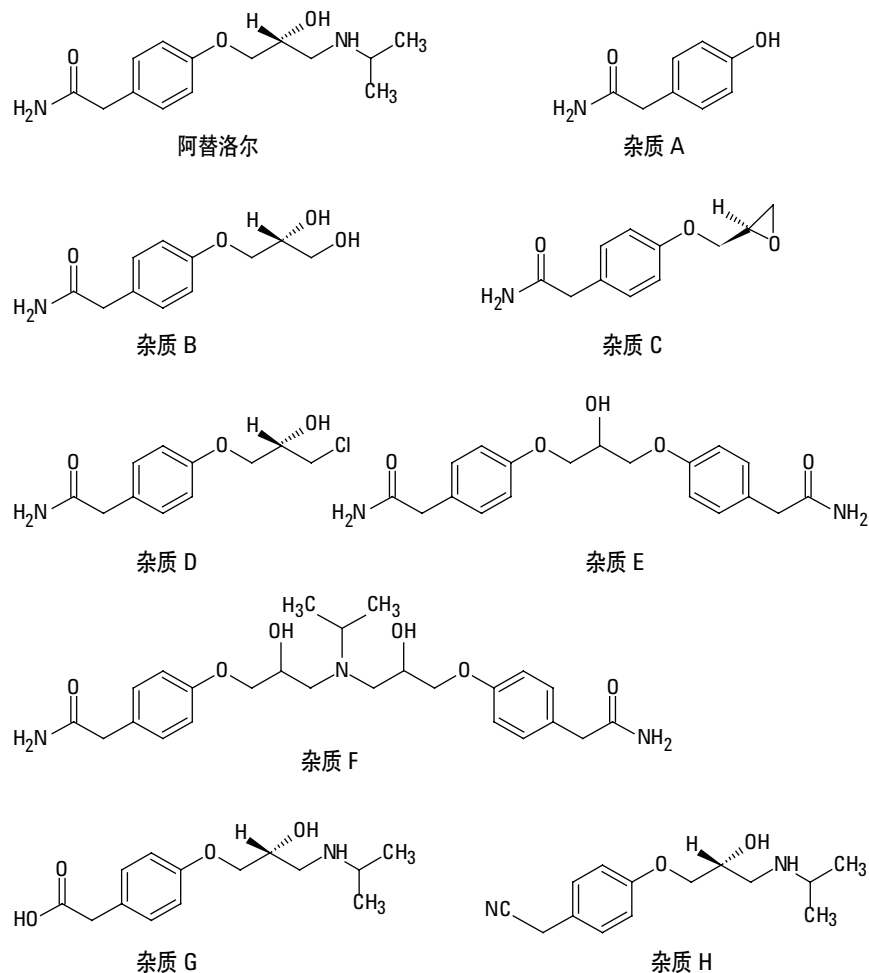


图 2. EP (6.0) 上收载的阿替洛尔及其 8 种杂质的分子结构

表 1. 阿替洛尔及其 8 种杂质的分子详情

| 名称   | 分子式                                                           | 分子量      | (M+H) <sup>+</sup> |
|------|---------------------------------------------------------------|----------|--------------------|
| 阿替洛尔 | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 266.3361 | 267.1703           |
| 杂质 A | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | 151.1626 | 152.0706           |
| 杂质 B | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>               | 225.2411 | 226.1074           |
| 杂质 C | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>               | 207.2258 | 208.0968           |
| 杂质 D | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>             | 243.6868 | 244.0735           |
| 杂质 E | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 358.3884 | 359.1601           |
| 杂质 F | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | 473.5619 | 474.2599           |
| 杂质 G | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>               | 267.3208 | 268.1543           |
| 杂质 H | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 248.3208 | 249.1598           |

注：(M+H)<sup>+</sup> 值采用 MassHunter Mass Calculator 计算得到

表 2. LC 条件

| LC (MS 兼容) 条件 |                                                                     | LC (EP) 条件                                                                                                                                           |
|---------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 色谱柱           | Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 693975-302) | Agilent ZORBAX ODS, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 883952-702)                                                                                              |
| 流速            | 0.4 mL/min                                                          | 1 mL/min                                                                                                                                             |
| 流动相 A         | 0.1% 甲酸水溶液                                                          | 1 g 辛烷磺酸钠 + 0.4 g 硫酸氢四丁基胺, 溶于四氢呋喃:甲醇:缓冲液为 2:18:80 的溶液中。缓冲液 3.4 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 溶液, 用 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 将 pH 值调到 3.0 |
| 流动相 B         | 0.1 % 甲酸的甲醇溶液                                                       | 不适用                                                                                                                                                  |
| 检测            | 226 nm                                                              | 226 nm                                                                                                                                               |
| 进样体积          | 2 μL                                                                | 10 μL                                                                                                                                                |
| 针头清洗          | 用甲醇清洗 5 秒钟                                                          | 用甲醇清洗 6 秒钟                                                                                                                                           |
| 泵模式           | 梯度程序                                                                | 等度                                                                                                                                                   |
|               | 时间      % B                                                         | 从 0 到 30 min 均为 100 % A                                                                                                                              |
|               | 0          11                                                       |                                                                                                                                                      |
|               | 25        30                                                        |                                                                                                                                                      |
|               | 26        30                                                        |                                                                                                                                                      |
|               | 36        11                                                        |                                                                                                                                                      |
| 后运行           | 5 分钟                                                                | 不适用                                                                                                                                                  |
| 柱温            | 43 °C                                                               | 未保持                                                                                                                                                  |

表 3. Agilent 6540 UHD Q-TOF 参数

| Q-TOF MS 与自动 MS/MS 条件 |               |
|-----------------------|---------------|
| 离子源                   | AJS ESI       |
| 采集模式                  | 2 GHz, 扩展动态范围 |
| 离子极性                  | 正离子模式         |
| 数据存储                  | 棒图和曲线         |
| 干燥气温度                 | 350 °C        |
| 干燥气流速                 | 10 L/min      |
| 雾化器压力                 | 45 psig       |
| 鞘气温度                  | 400 °C        |
| 鞘气流量                  | 12 L/min      |
| 毛细管电压                 | 4000 V        |
| 喷嘴电压                  | 500 V         |
| 碎裂电压                  | 150 V         |
| 截取锥电压                 | 75 V          |
| 八极杆射频峰间电压             | 750 V         |
| 采集                    | MS 接续自动 MS/MS |
| MS 采集速率               | 5 张谱图/秒       |
| MS/MS 采集速率            | 4 张谱图/秒       |
| 隔离宽度                  | 中等 (约 4 m/z)  |
| 碰撞能量, 使用公式            | 斜率 4, 截距 10   |

样品制备和分析

将 8 种 EP 列出的杂质加标到阿替洛尔中。加标样品中阿替洛尔的浓度约为 2000 ppm，阿替洛尔中这些杂质的百分含量在 0.02 - 0.07 % 范围内。加标样品首先采用 EP 方法<sup>2</sup> 进行分析，测定了每个杂质的峰面积百分比。由于药典 HPLC 方法使用与质谱 (MS) 分析不兼容的非挥发性缓冲液，故我们开发了一个与 MS 兼容的 LC 方法，采用包含 0.1% 甲酸的水/甲醇作为流动相。首先对样品进行在线 UV 检测分析，随后采用 6540 UHD Q-TOF LC/MS 系统对样品进行全 MS 扫描和自动 MS/MS 分析。

结果与讨论

LC-UV 和 LC-UV/6540 UHD Q-TOF MS 分析

采用 EP 方法对加标阿替洛尔样品进行色谱分离的结果见图 3。图 4 展示了采用 MS 兼容的 LC 方法分离相同样品的结果，图中所有 8 个杂质均实现了良好分离。虽然采用 LC/MS 方法与采用 EP 方法时每个杂质的流出顺序不同，但两种方法得到的所有杂质峰的面积百分比是类似的。表 4 总结了采用 LC/MS 方法得到的阿替洛尔及其杂质的峰面积百分比。

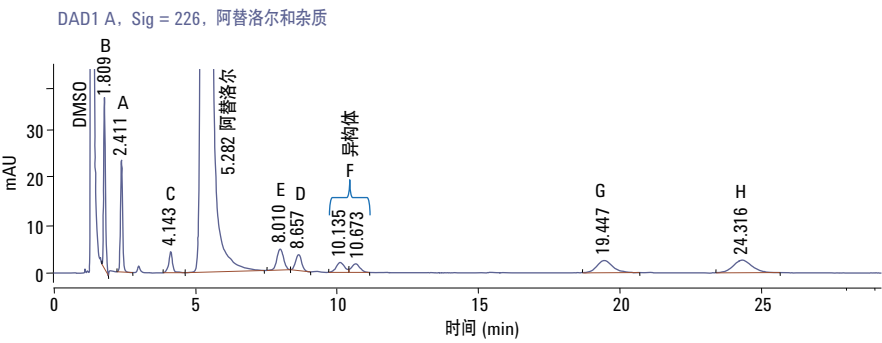


图 3. 采用 EP 方法进行的阿替洛尔及其 8 种杂质的色谱分离

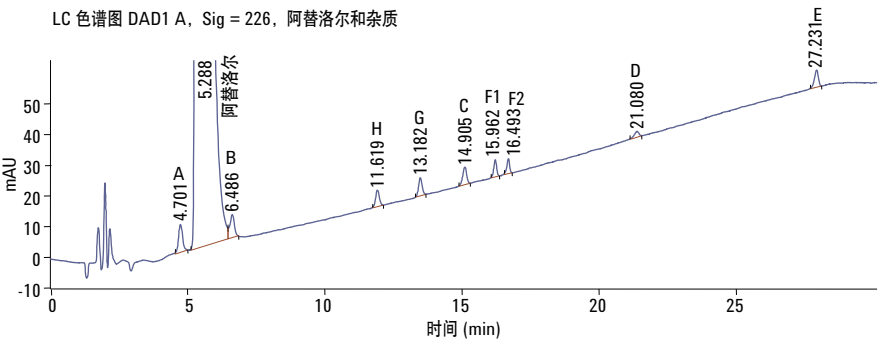


图 4. 采用自行开发的 MS 兼容方法进行的阿替洛尔及其 8 种杂质的色谱分离

表 4. 基于 UV 信号的峰面积百分比

| 峰序号 | 时间    | 面积%   | 名称       |
|-----|-------|-------|----------|
| 1   | 4.70  | 0.07  | A        |
| 2   | 5.28  | 99.61 | 阿替洛尔 API |
| 3   | 6.48  | 0.07  | B        |
| 4   | 11.61 | 0.04  | H        |
| 5   | 13.18 | 0.04  | G        |
| 6   | 14.90 | 0.04  | C        |
| 7   | 15.96 | 0.03  | F1       |
| 8   | 16.49 | 0.03  | F2       |
| 9   | 21.08 | 0.02  | D        |
| 10  | 27.23 | 0.05  | E        |

图 5 是其总离子流图 (TIC)。从 0 到 3.5 min 和从 5.5 到 6.0 min 的 LC 流出液被转移至废液中。

### 采用安捷伦 MassHunter 定性分析软件进行数据分析

采用 MassHunter 定性分析软件的 MFE 和 MFG 算法进行数据分析。MFE 算法可采用非靶向的方式自动定位所有样品组分，并能提取出痕量杂质成分所有相关的光谱和色谱信息。MFG 算法可充分利用数据的质量准确度。在用户根据对样品组成的了解输入相关信息（允许元素、偶数/奇数个电子和载荷子等）后，MFG 可

利用 MS 水平（主要同位素的质量数、同位素丰度和同位素间距），以及 MS/MS 水平（MS/MS 碎片离子和可能的中性丢失的质量数）的信息计算生成经验分子式。利用所有这些精确质量信息，可以得到每个杂质范围更小、相关性更高的候选分子式列表，并能按照相关性得分（最大得分是 100%）将它们进行排序。

图 6 展示了杂质 B 的同位素测定结果与其理论结果（后者以矩形框展示）以及每个同位素的 MFG 得分和精确质量，图中显示了精准的同位素的质量数、同位素丰度和同位素间距，相应匹配得分超过 99%。这些结果提供了高度可靠的分子式生成和杂质鉴定。

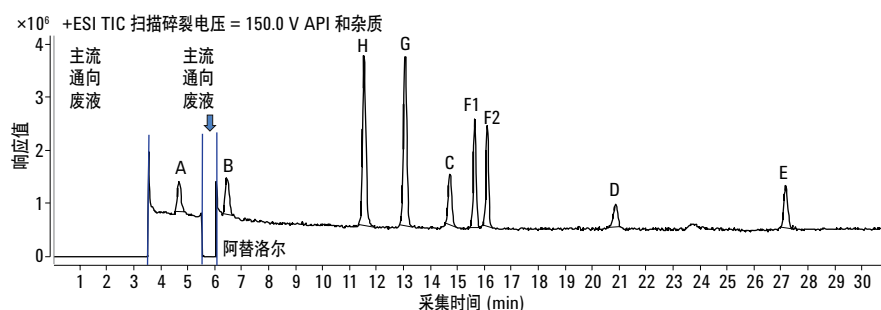
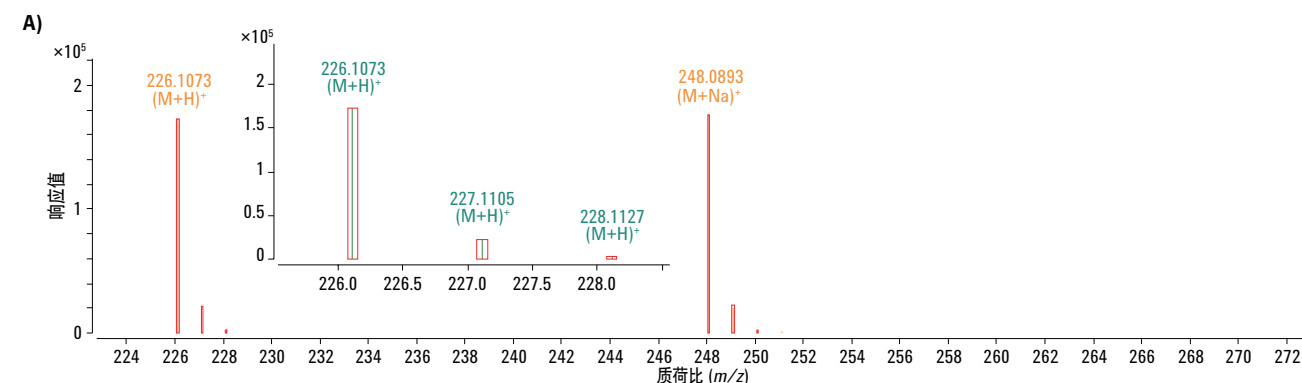


图 5. 采用在线 LC/UV 检测和 6540 UHD Q-TOF MS 分析得到的总离子流色谱图 (TIC)



**B)**

| Compound Identification Results: Cpd 7: C11 H15 N O4 |            |              |             |                    |            |                 |                    |                      |          |
|------------------------------------------------------|------------|--------------|-------------|--------------------|------------|-----------------|--------------------|----------------------|----------|
| Best                                                 | ID Source  | Formula      | Score       | Diff (ppm)         | Score (MF) | Mass (MFG)      | DBE                |                      |          |
|                                                      | MFG        | C11 H15 N O4 | 99.8        | 0.33               | 99.8       | 225.1001        | 5                  |                      |          |
| m/z                                                  | Species    | Ion Formula  | Score (MFG) | Score (MFG, MS/MS) | Score (MS) | Score (mass)    | Score (iso. abund) | Score (iso. spacing) | Height   |
| 226.1074                                             | (M+H)+     | C11 H16 N O4 | 99.8        | 99.93              | 99.77      | 99.95           | 99.31              | 99.98                | 174362.9 |
| m/z                                                  | m/z (Calc) | Diff (ppm)   | Height      | Height (Calc)      | Height %   | Height % (Calc) | Height Sum %       | Height Sum% (Calc)   |          |
| 226.1073                                             | 226.1074   | 0.31         | 172901.1    | 174362.9           | 100        | 100             | 86.9               | 87.6                 |          |
| 227.1105                                             | 227.1106   | 0.53         | 23126.7     | 21968              | 13.4       | 12.6            | 11.6               | 11                   |          |
| 228.1127                                             | 228.1127   | -0.14        | 3006.9      | 2703.7             | 1.7        | 1.6             | 1.5                | 1.4                  |          |

图 6. (A) 为杂质 B 的 MS 谱图，(B) 为杂质 B 的 MFE/MFG 计算结果

表 5 总结了所有 8 个杂质和阿替洛尔的结果。根据杂质流出的保留时间 (RT) 顺序给化合物标号。我们得到两个阿替洛尔的结果，它们代表了阿替洛尔主峰开始时和结束时的残留物，之间的主峰被转移到了废液。我们色谱分离了杂质 F 的异构体，以杂质 F1 和 F2 列出。如表 5 所示，观察到的 (M+H)<sup>+</sup> 数值与理论 (M+H)<sup>+</sup> 数值高度吻合，所有鉴定出的杂质的质量误差小于 1 ppm。

## 安捷伦 MassHunter 分子结构相关器 (MSC) 软件

MSC 可将某目标化合物 MS/MS 碎片离子的精确质量与其一个或更多可能的分子结构关联起来。MSC 通过采用系统断键方法，将每个观察到的碎片离子与可能的结构相关联来实现这个目的。从每个碎片离子信号的单独得分算出一个总体相关性得分。对于每个碎片离子，可能有一个或多个候选亚结构（图 8），并且根据生成该亚结构需要断裂的键的数量和种

类，以及解释观察到的碎片离子质量需要加上或减去的氢原子数量来进行扣分。例如，断裂两个键或者一个双键，或甚至一个芳香环就会比仅断裂一个单键有更高的扣分。其它两个影响总体相关性得分的因素是观察到的碎片离子的质量准确性和能够用亚结构解释的碎片离子强度的总体百分率。<sup>3</sup> MSC 软件可用于确证某化合物的用户推测结构，还有助于鉴定真正的未知物。MSC 在杂质 E 和 F 结构解析中的应用见图 7 和 8。

表 5. 从 MFE/ MFG 计算结果得到的分子式

| 化合物     | EP 收录的分子式                                                     | MFG 计算的分子式                                                    | 得分 (MFG) | 理论 (M+H) <sup>+</sup> | 实验 (M+H) <sup>+</sup> | 质量误差 (ppm) |
|---------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|------------|
| 1 杂质 A  | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | 99.78    | 152.0706              | 152.0706              | 0.00       |
| 2 阿替洛尔  | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 98.68    | 267.1703              | 267.1704              | 0.37       |
| 3 阿替洛尔  | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 99.48    | 267.1703              | 267.1705              | 0.75       |
| 4 杂质 B  | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>               | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>               | 99.42    | 226.1074              | 226.1073              | 0.44       |
| 5 杂质 H  | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 99.79    | 249.1598              | 249.1599              | 0.40       |
| 6 杂质 G  | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>               | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>               | 99.39    | 268.1543              | 268.1545              | 0.75       |
| 7 杂质 C  | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>               | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>               | 99.01    | 208.0968              | 208.0966              | 0.96       |
| 8 杂质 F1 | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | 99.17    | 474.2599              | 474.2601              | 0.42       |
| 9 杂质 F2 | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> | 98.35    | 474.2599              | 474.2599              | 0.00       |
| 10 杂质 D | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>             | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>             | 98.23    | 244.0735              | 244.0736              | 0.41       |
| 11 杂质 E | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 98.36    | 359.1601              | 359.1604              | 0.84       |



图 7 展示了 MSC 软件如何辅助鉴定一个未知杂质。用杂质 F 母离子和碎片离子的精确质量来计算出最可能的分子式，然后将计算结果在 ChemSpider 数据库中检索，以得到所有可能的结构。数据库返回多种候选结构及其计算出的相关性得分。MSC 给出的最可能的、具有最高相关性得分 (99.14%) 的结构与杂质 F 准确

匹配。杂质 F 所选母离子的总体 MFG 得分、MSC 推测结构的排序号及其结构相关性得分用红圈突出显示。

图 8 表明了如何使用 MSC 软件来验证用户推测的结构。将杂质 E 的 MS/MS 谱图数据上传到 MSC 软件，其结构以“.mol”文件的形式载入。如图 9 所示，

推测的结构与杂质 E 的 MS/MS 谱图相关性很高，相关性得分 97.35% (用红圈突出显示)。

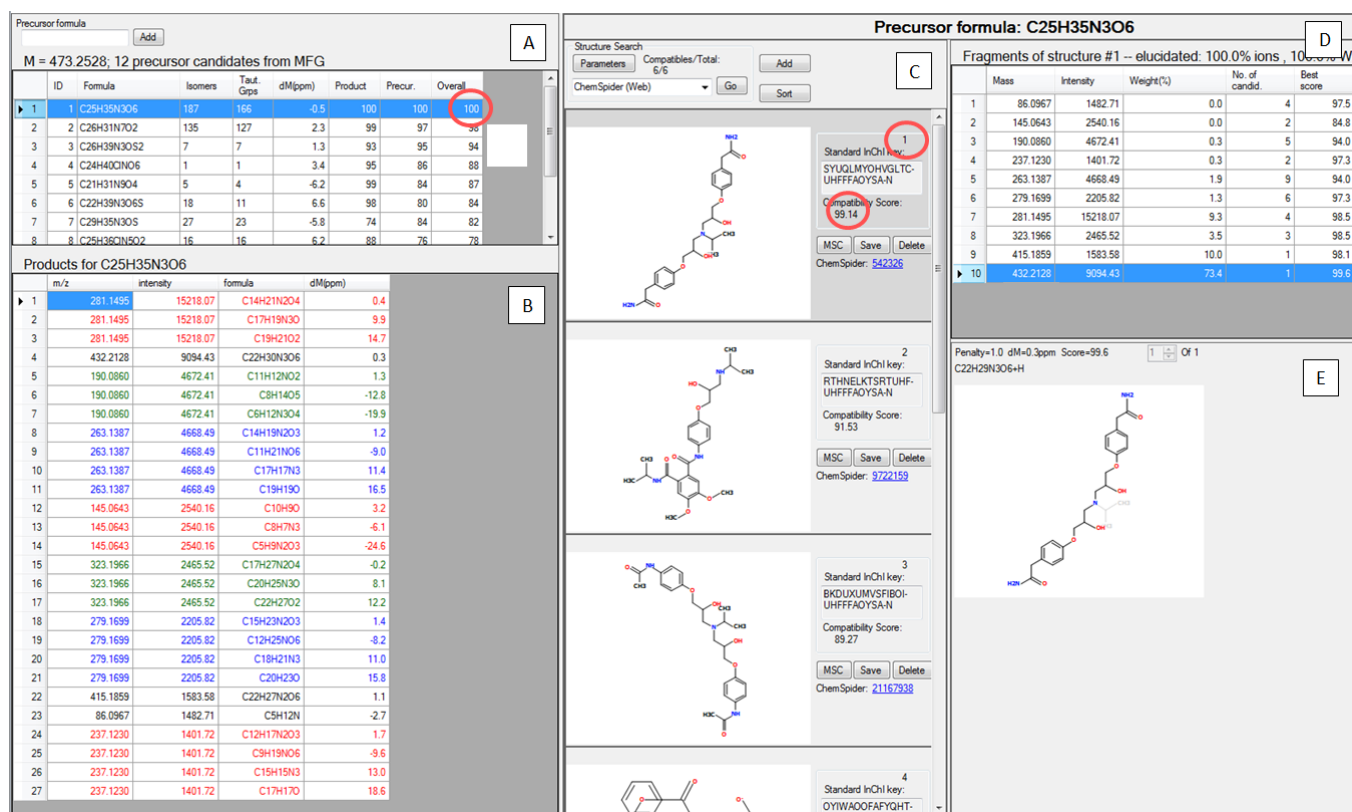


图 7. 一个未知杂质 (杂质 F) MSC 鉴定结果的屏幕截图。杂质 F 母离子可能的分子式列表 (A)，截图 A 中所选一个母离子的子离子的 MFG 结果 (B)，母体化合物的可能结构 (C)，截图 C 中所选可能结构的碎片离子 (D)，截图 D 中所选碎片离子的亚结构 (E)



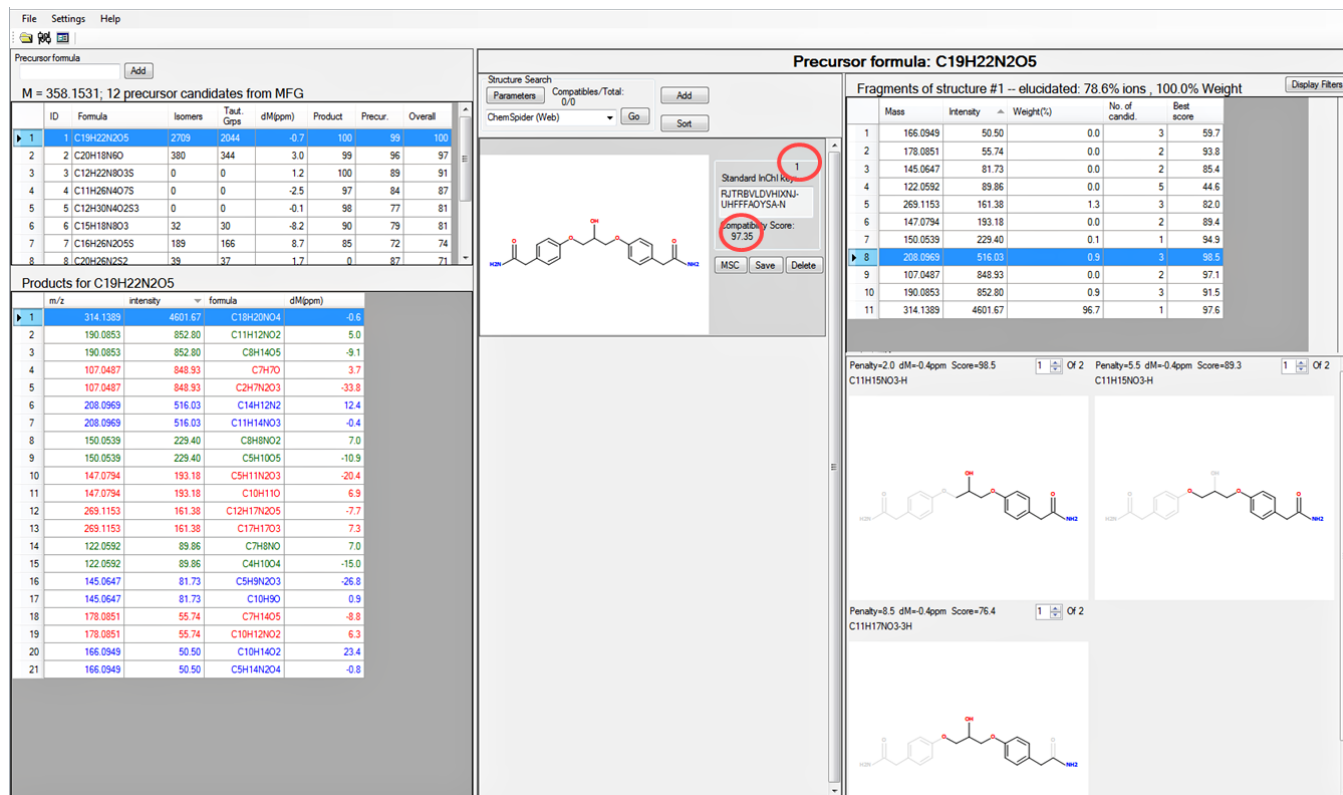


图 8. 一个推测结构（杂质 E）的 MSC 验证结果的屏幕截图

采用这些方法，对所有剩余的化合物/杂质进行了结构解析。使用 MSC 软件获得的阿替洛尔杂质的分子结构与药典中验证的结构一一对应（图 2）。表 6 总结了从 MSC 得到的结果。

表 6. 阿替洛尔及其杂质的 MSC 计算结果

| 编号 | 化合物      | 母离子质量数差异 (ppm) | 化合物相关性/一致性得分 (%) | % 权重* |
|----|----------|----------------|------------------|-------|
| 1  | 阿替洛尔 API | -1.1           | 94.97            | 100   |
| 2  | 杂质 A     | -0.6           | 96.0             | 99.4  |
| 3  | 杂质 B     | 0.4            | 94.93            | 100   |
| 4  | 杂质 C     | 0.6            | 92.18            | 99.8  |
| 5  | 杂质 D     | -2.1           | 90.83            | 98.7  |
| 6  | 杂质 E     | -0.7           | 97.35            | 100   |
| 7  | 杂质 F     | -0.5           | 99.14            | 100   |
| 8  | 杂质 G     | -0.6           | 96.20            | 100   |
| 9  | 杂质 H     | -0.6           | 97.73            | 100   |

\*由碎片离子质量解释、加权的总离子强度的百分数。  
(解释更高质量的碎片离子代表更有力的证据。)

图 9 展示了阿替洛尔和杂质 G 的 MS/MS 谱图。通过比较阿替洛尔和杂质 G 母离子和碎片离子的  $m/z$  数值，以及根据 MSC 软件推测出的每个化合物的亚结构，可以很容易地确定杂质 G 的裂解位点。

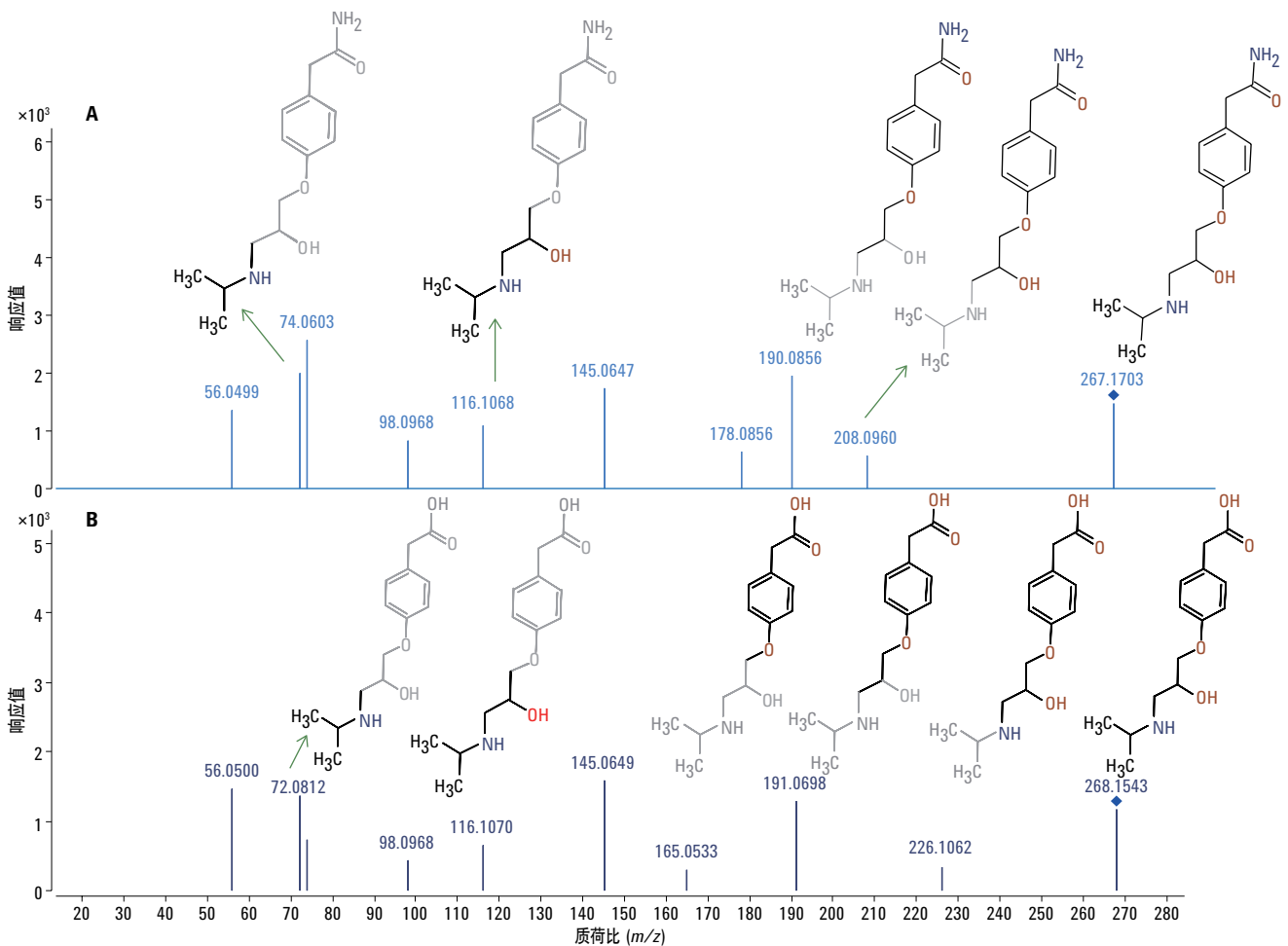


图 9. 由 MSC 软件辅助进行的杂质 G 的结构解析。阿替洛尔 (A) 和杂质 G (B) 的 MS/MS 谱图

## 结论

本文采用 Q-TOF 技术和先进的数据处理软件，开发了一个鉴定和分析痕量药物杂质的高效工作流程。Agilent 6540 UHD Q-TOF 的宽谱图内动态范围可实现对阿替洛尔 API 样品中所有 8 种痕量杂质的鉴定。该方法得到了超过 98.0 的高 MFG 得分和小于 1 ppm 的低质量误差，从而可获得高度可信的杂质鉴定结果。事实证明，MFE、MFG 和 MSC 是对杂质进行快速、高效鉴定和结构确定的必备手段。此外，采用 MSC 可有效减少未知杂质可能结构的数目、给出可能存在于未知分子中的亚结构或者对分子类型进行推测。

## 参考文献

1. Guidance for Industry Q3A Impurities in New Drug Substances, June 2008, Revision 2.
2. European pharmacopoeia 6.0, (2008), Volume 2, page 1228-1229(4).
3. Agilent MassHunter 分子结构相关器 (MSC) 软件快速入门指南，安捷伦出版物 G3335-90126

[www.agilent.com/chem/QTOF](http://www.agilent.com/chem/QTOF)

本信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012  
中国印刷，2012 年 12 月 14 日  
5991-1375CHCN



**Agilent Technologies**