

安捷伦科技 2D-LC/MS 在线脱盐技术在药物杂质鉴定中的应用

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

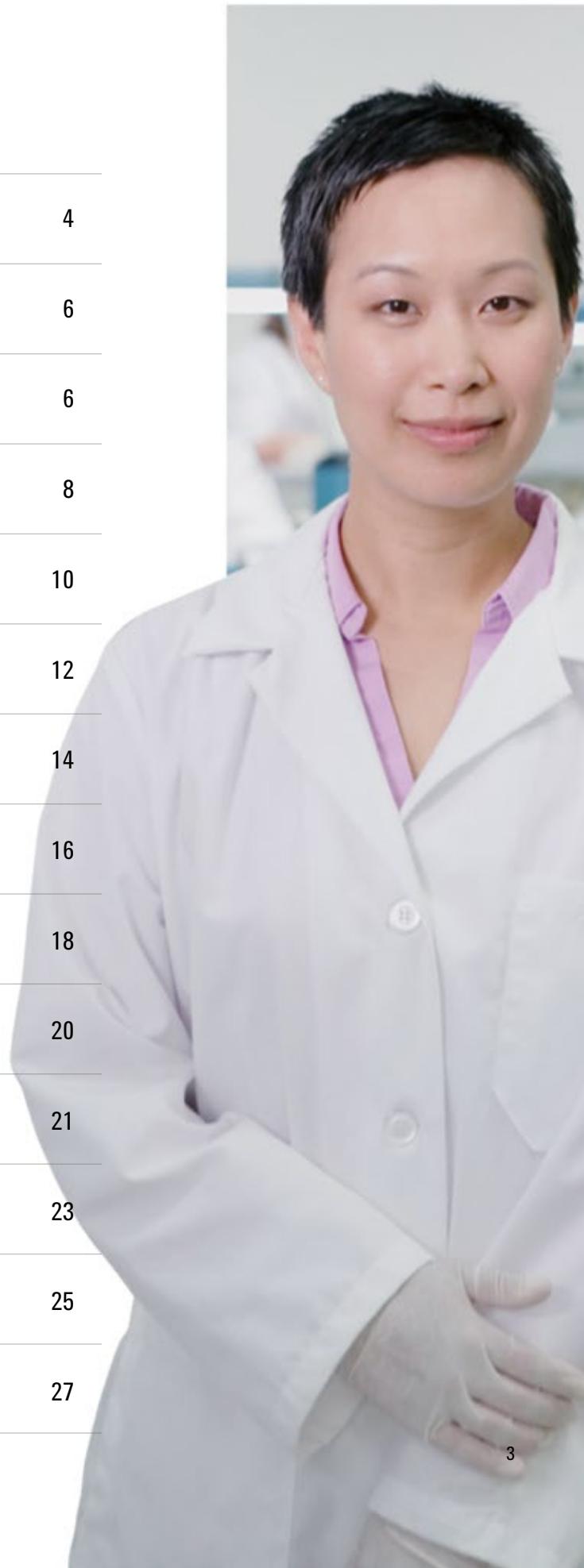
前言：

在液相色谱方法的开发中，常会用到一些添加剂以提高色谱行为表现，但是这些添加剂经常无法兼容质谱检测，而在某些分析中，如杂质分析、代谢分析等，经常需要对某些新产生的杂质或代谢产物进行质谱鉴定，同时又不希望改变方法选择性以便通过保留时间对未知物进行定性。但是如果将原有方法中不能兼容质谱条件的添加剂改变的话，很可能造成选择性变化，从而无法定位欲分析的未知化合物的位置。

针对此类问题，安捷伦开发了一个基于阀切换的 2D-LC 方法，保证了在各个色谱峰的保留行为不发生变化的情况下（即原始色谱条件不变），通过二维液相的方式将原始条件中的质谱不兼容流动相变为兼容流动相，从而实现用液质联用方法对未知杂质进行定量分析的目的。

目录

Heart-Cutting 2D-LC/MS 技术特点简介	4
应用实例	6
实例 1：亚叶酸钙	6
实例 2：5'-鸟嘌呤核苷三磷酸三钠盐	8
实例 3：达托霉素	10
实例 4：钆贝酸	12
实例 5：色瑞替尼	14
实例 6：倍他司汀	16
实例 7：糠酸氟替卡松	18
实例 8：阿莫西林	20
实例 9：磷脂	21
实例 10：胰岛素	23
实例 11：蛋白质	25
结语	27



HEART-CUTTING 2D-LC/MS 技术特点简介

2D-LC 系统：中心切割法去除非挥发性缓冲液对质谱的影响

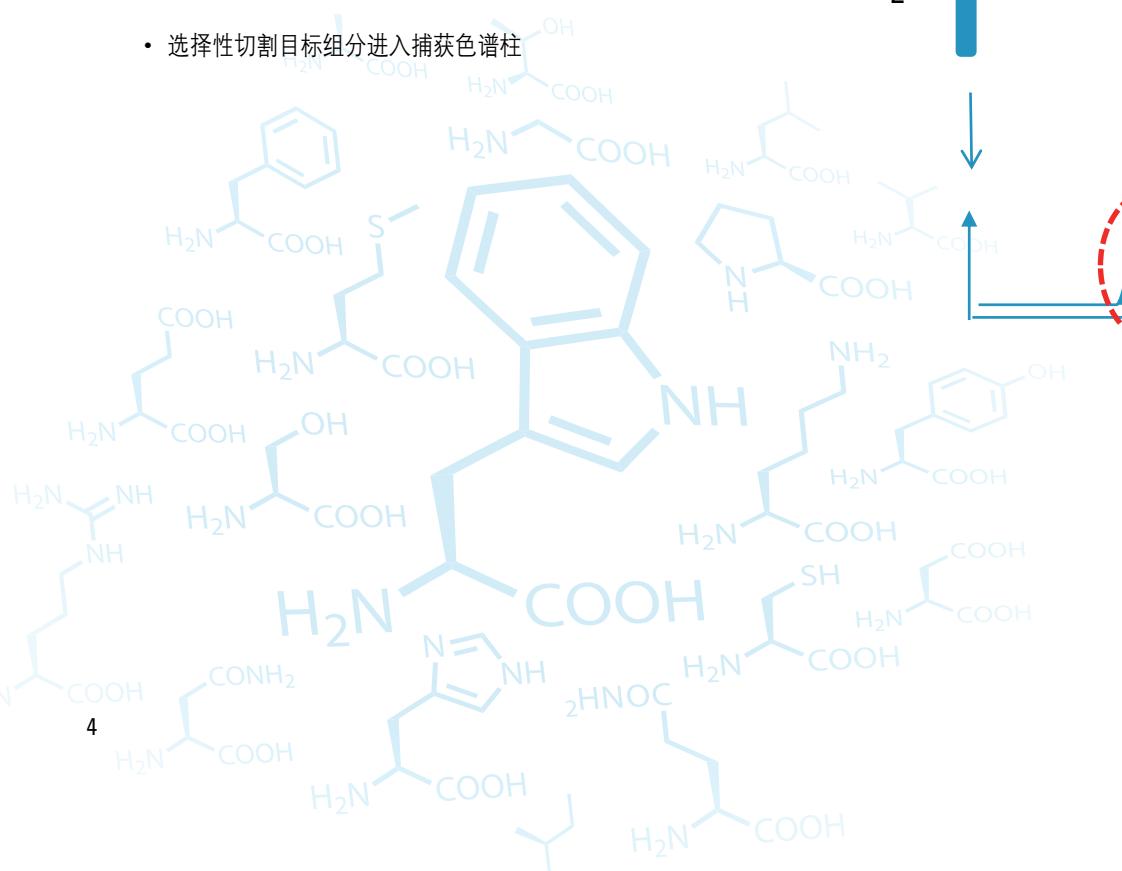
Heart-cutting 2D-LC (LC-LC):

简单原理

第一维使用原始液相色谱流动相（如非挥发性流动相）及方法对目标样品进行分离。当目标组分出峰时，通过阀切换将目标组分准确切割并捕获后，第二维色谱泵将捕获的组分洗脱进行质谱检测。

特点

- 无需改变原始液相色谱分离方法，确保相同的分离选择性，便于准确选择目标组分，降低方法重新开发的繁复工作，简化色谱峰确认流程
- 选择性切割目标组分进入捕获色谱柱



仪器配置

第一维



一维色谱柱

一维 DAD



二维泵



阀



二维色谱柱



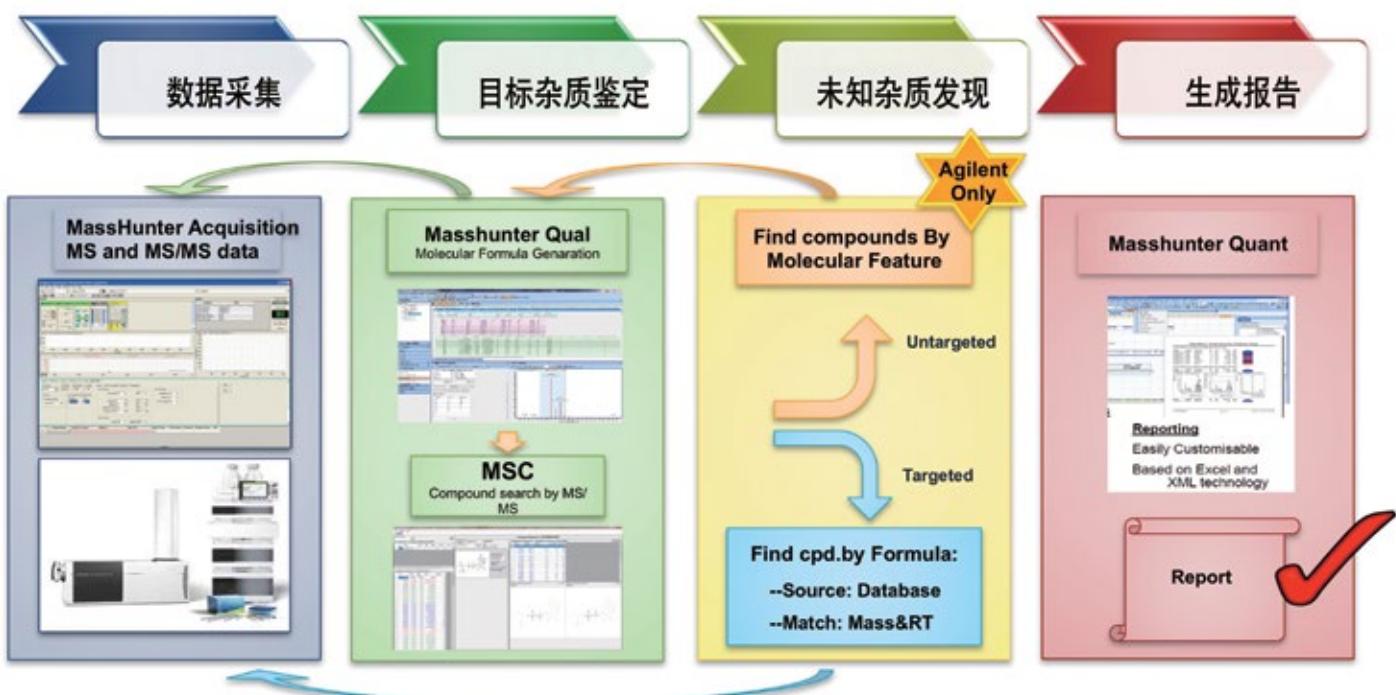
二维 DAD



质谱
(推荐使用 QTOF)

- 一维色谱柱: 常规 LC 色谱柱,
- 二维色谱柱: 色谱柱, 小内径色谱柱

Agilent 杂质鉴定工作流程

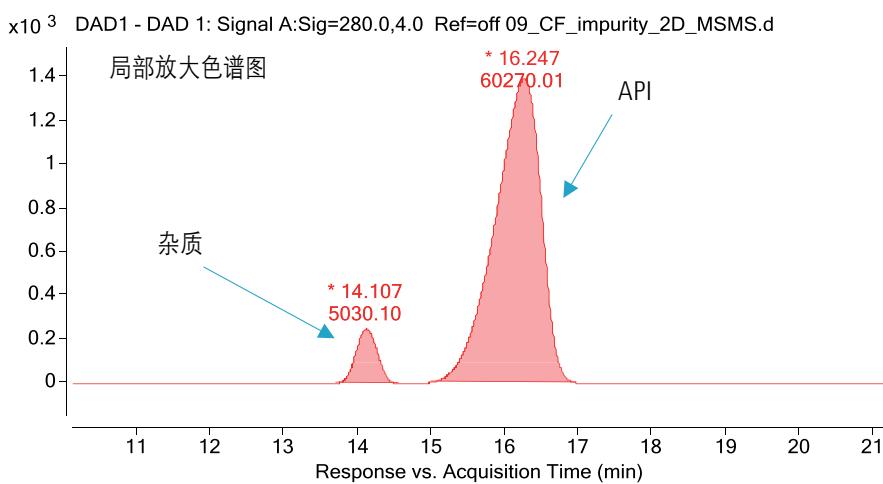
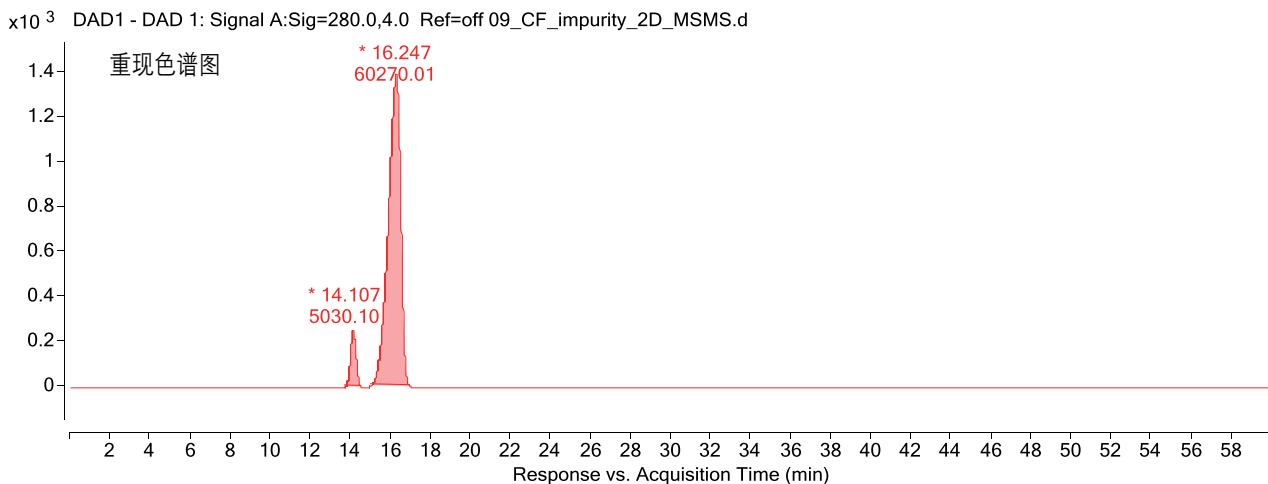


应用实例

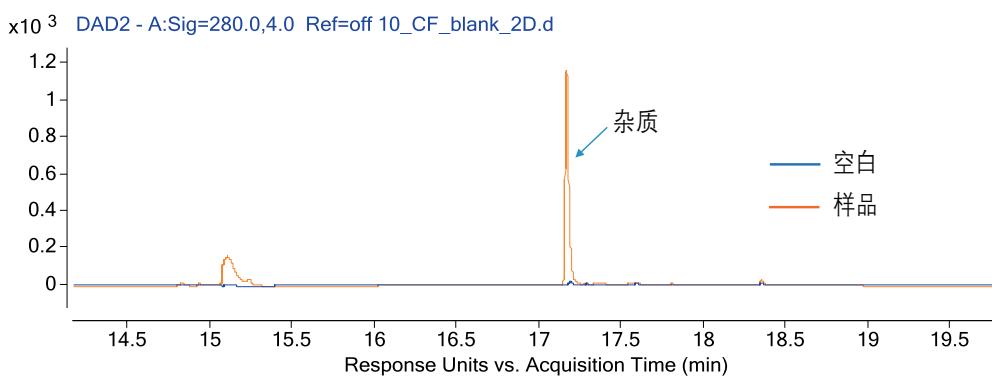
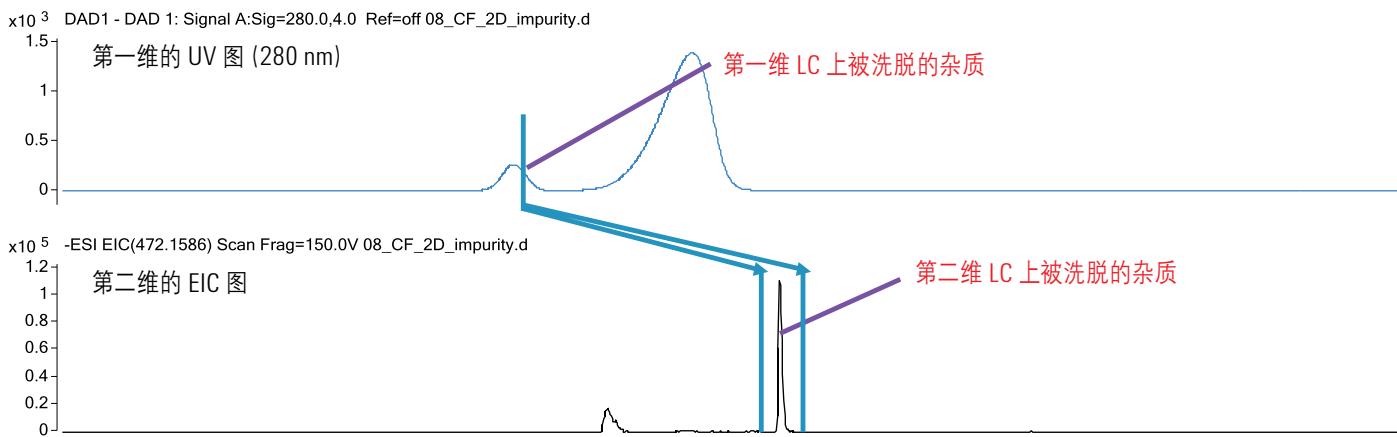
实例 1：亚叶酸钙

用户提供的液相色谱条件

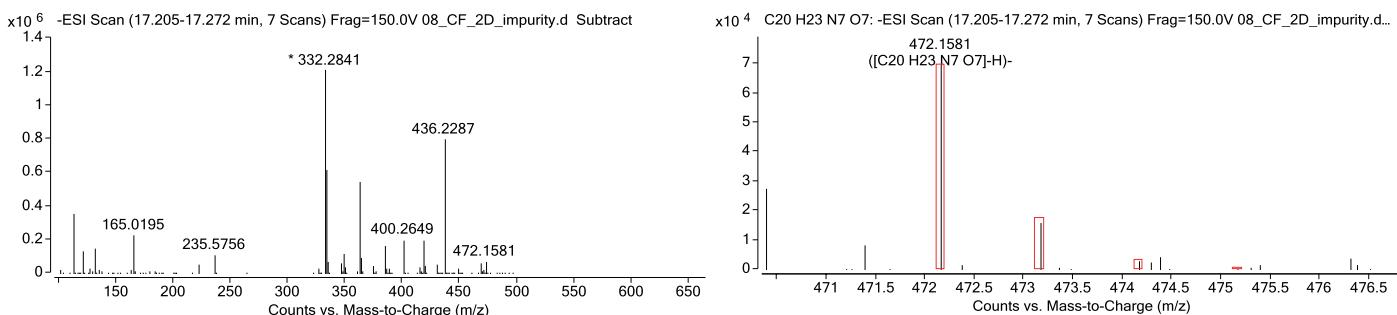
- 色谱柱: Kromasil 100-5 C18, 4.6 × 250 mm, 2.6 μ m
- 流动相 A: 0.1% 四丁基氢氧化铵的磷酸氢二钠缓冲液 (pH=7.8)
- 流动相 B: 甲醇
- 流速: 1.0 mL/min
- 柱温: 40 °C
- 等度洗脱: A:B (78:22, v/v)



杂质的分析



样品和空白第二维的 UV 叠加色谱图。
第二维在使用快梯度 (梯度变化时间小于 3 min) 时, 可能导致梯度溶剂峰与样品峰保留时间接近, 但是根据峰高及面积的大小很容易定位到目标峰。



杂质的质谱图及局部放大图

Best	ID	Source	Name	Formula	Species	m/z	Score	RT	Diff	Diff (ppm)	Score (MFG)	R	Precursor (A)	Find by MRM	Mass (MFG)	DBE
	MFG			C20 H23 N7 O7	(M-H)-	472.1581	98.93		0.91	98.93					473.1659	13
		Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height					Ion Formula	
		(M-H)-	472.1581	97.83	99.15		98.93	98.93	99.81		69731.5				C20 H22 N7 O7	

杂质分子式生成结果

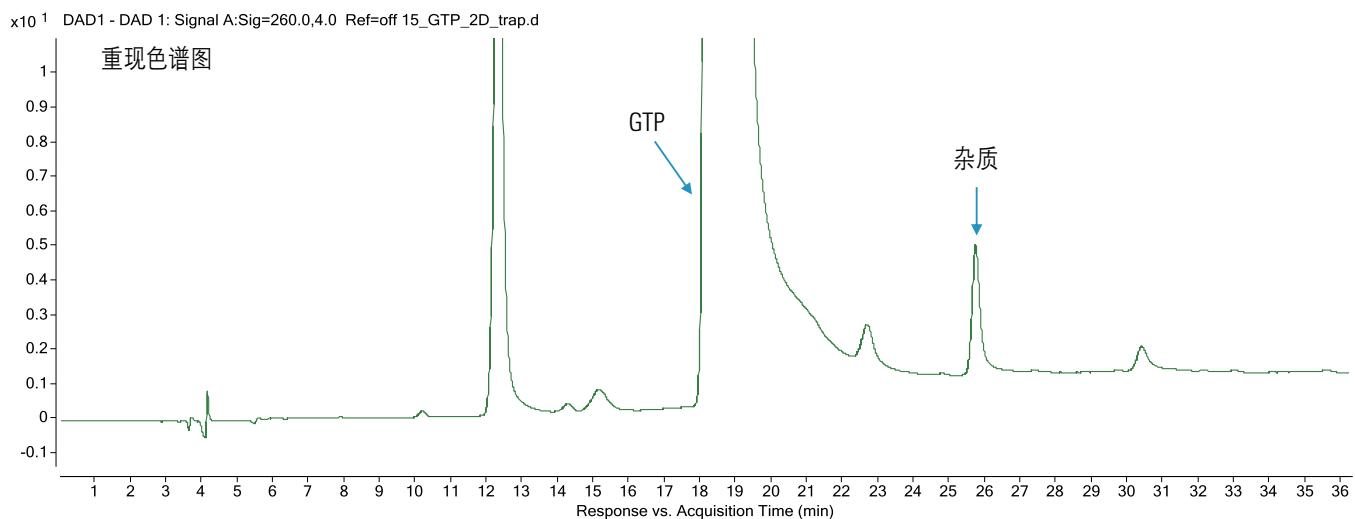
实例 2: 5'-鸟嘌呤核苷三磷酸三钠盐

第一维色谱条件

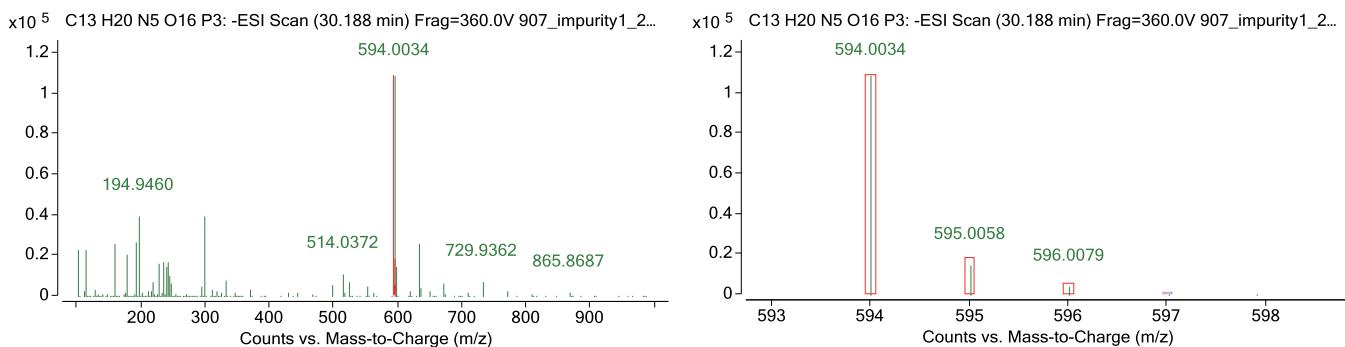
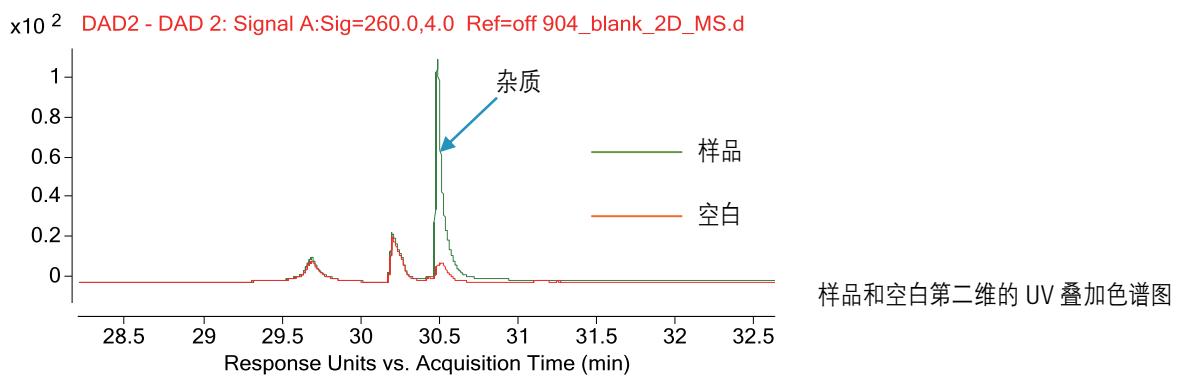
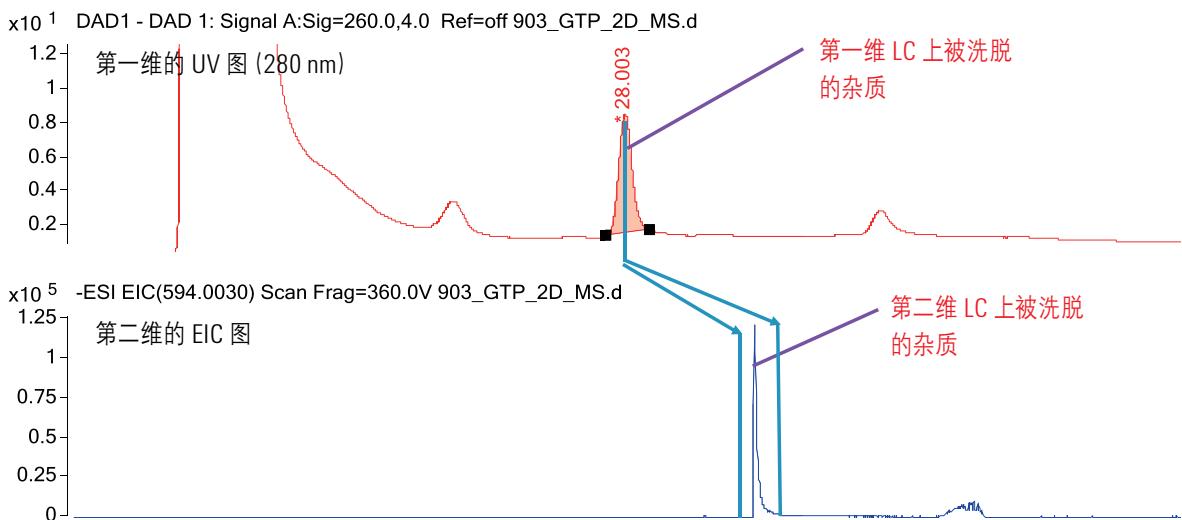
- 色谱柱: Luna C18(2) RP, 250 × 4.6 mm
- 流动相 A: 0.1M TEAA 的水溶液 (pH=6.0)
- 流动相 B: 0.1M TEAA 的水溶液/ACN (95:5, v/v)
- 流速: 0.8 mL/min

第二维色谱条件

- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 10 mM AA 的水溶液
- 流动相 B: 甲醇
- 流速: 0.3 mL/min
- 梯度洗脱



杂质的分析



杂质的质谱图及局部放大图

Best	ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Score	RT Diff	Diff (ppm)	Score (MFG)	RT (Tg)	Precursor (Aq)	Find by MRM Product Ion	DBE
	MFG		C13 H20 N5 O16 P3 (M-H) ⁻		594.0034	95.83	19	95.83					8
	Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height	Ion Formula			
	(M-H) ⁻	594.0034	93.13	95.6		95.83	95.83	99.54		108564.3	C13 H19 N5 O16 P3		

杂质分子式生成结果

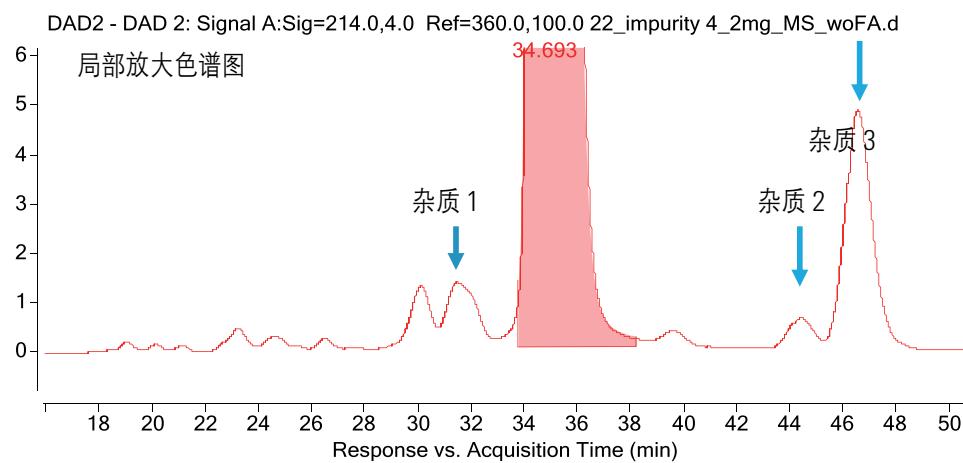
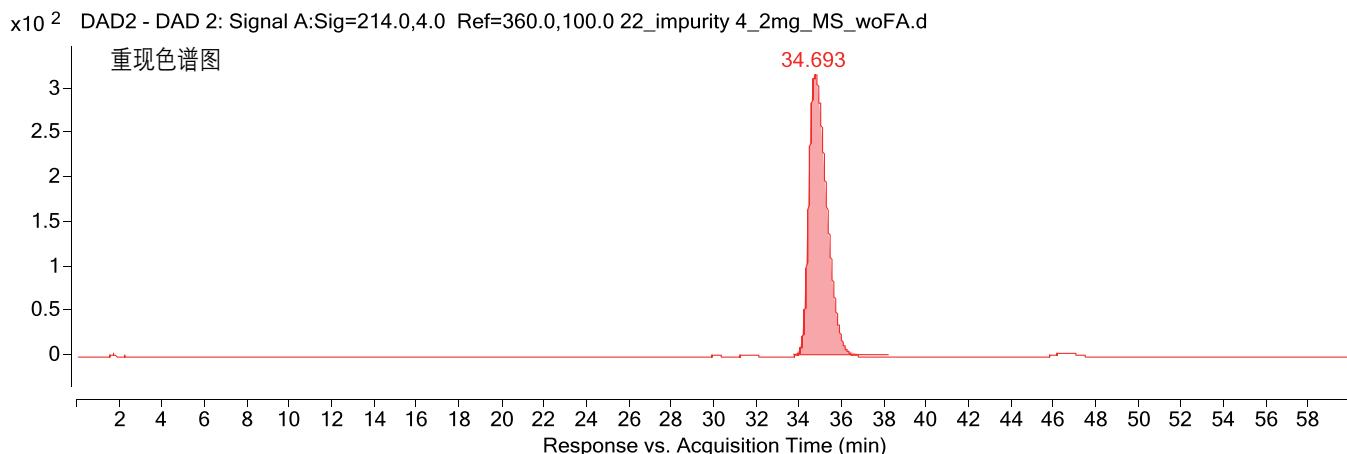
实例 3：达托霉素

第一维色谱条件

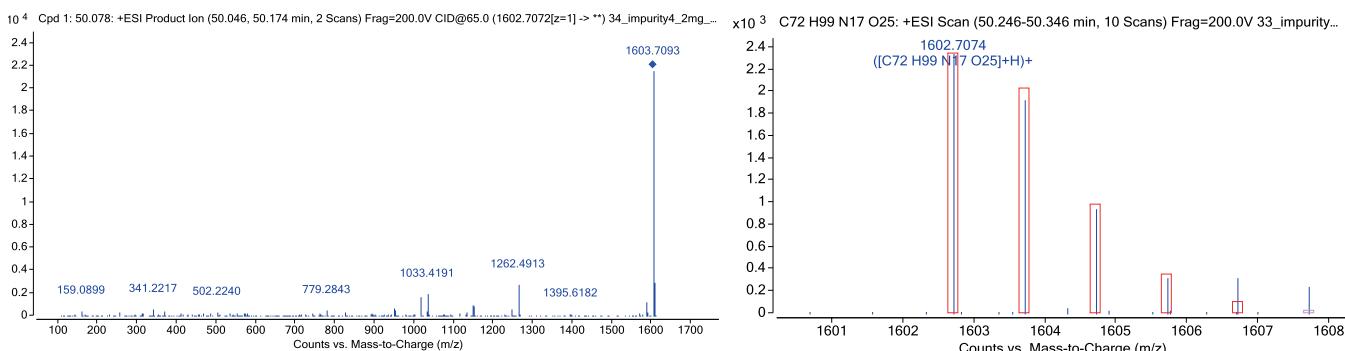
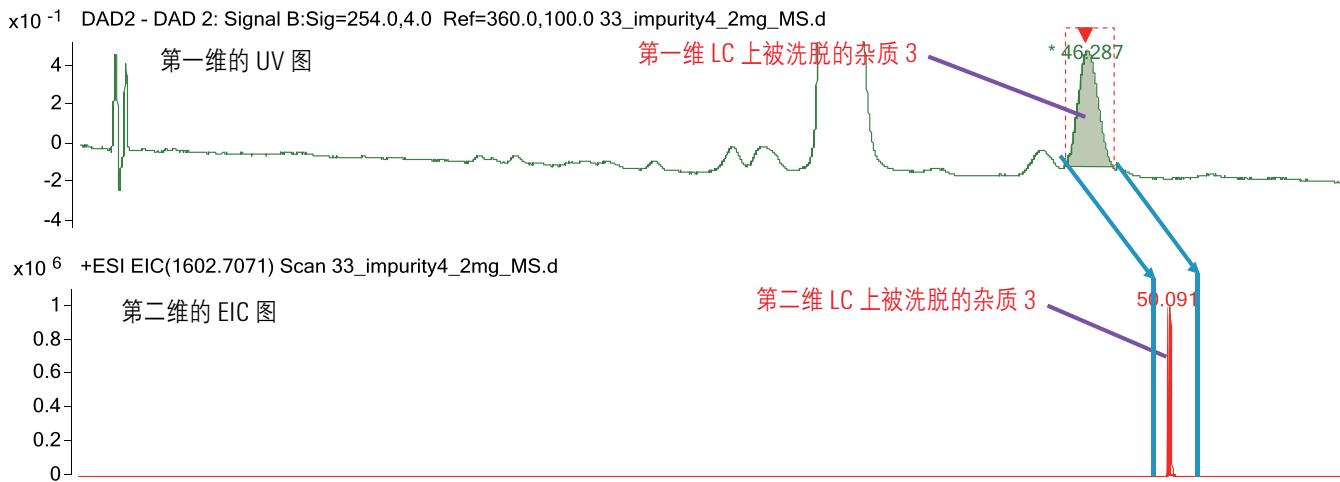
- 色谱柱: Phenomenex Ib-sil C8, 4.6 × 250 mm, 5 μ m
- 流动相 A: 磷酸二氢铵缓冲液 (pH = 3.25)
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.5 mL/min
- 等度洗脱: A:B (33:67, v/v)

第二维色谱条件

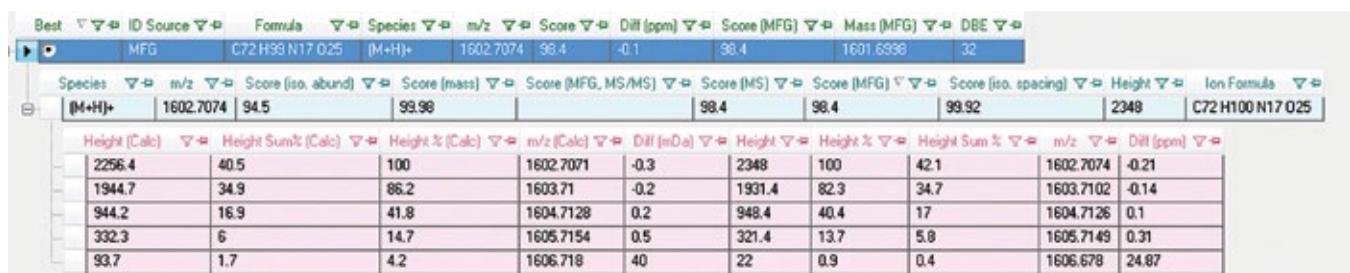
- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 0.1% FA 的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 梯度洗脱



杂质 3 的分析



杂质 3 的质谱图及局部放大图



杂质 3 分子式生成结果

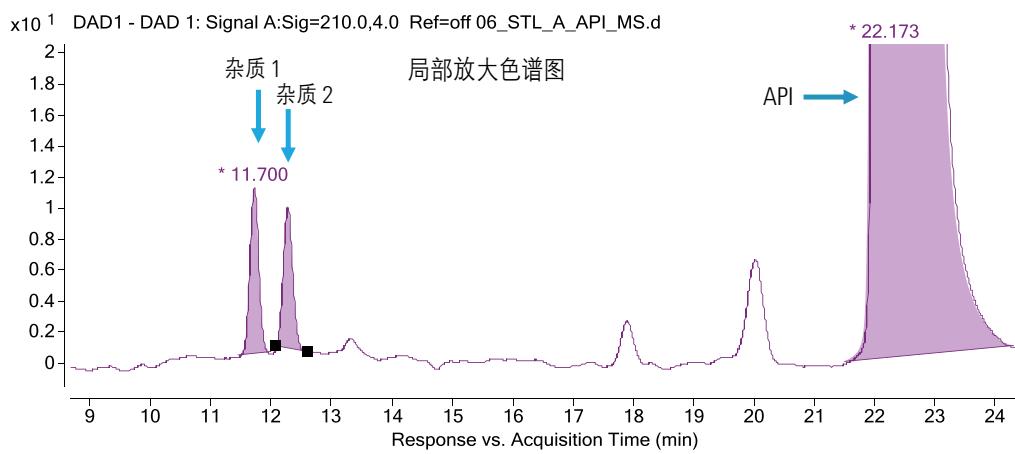
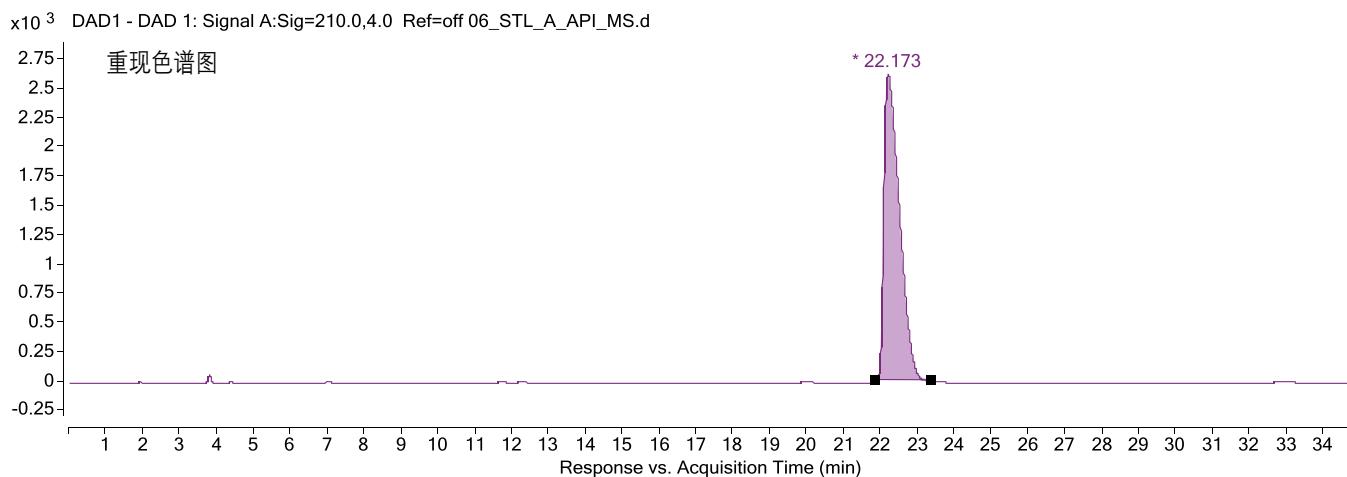
实例 4：钆贝酸

第一维色谱条件

- 色谱柱: WondaSil C18, 4.6 × 250 mm, 3 μ m
- 流动相 A: 磷酸氢二钠/EDTA/四己基硫酸氢铵缓冲液 (pH=5.0)
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.0 mL/min
- 等度洗脱: A:B (70:30, v/v)

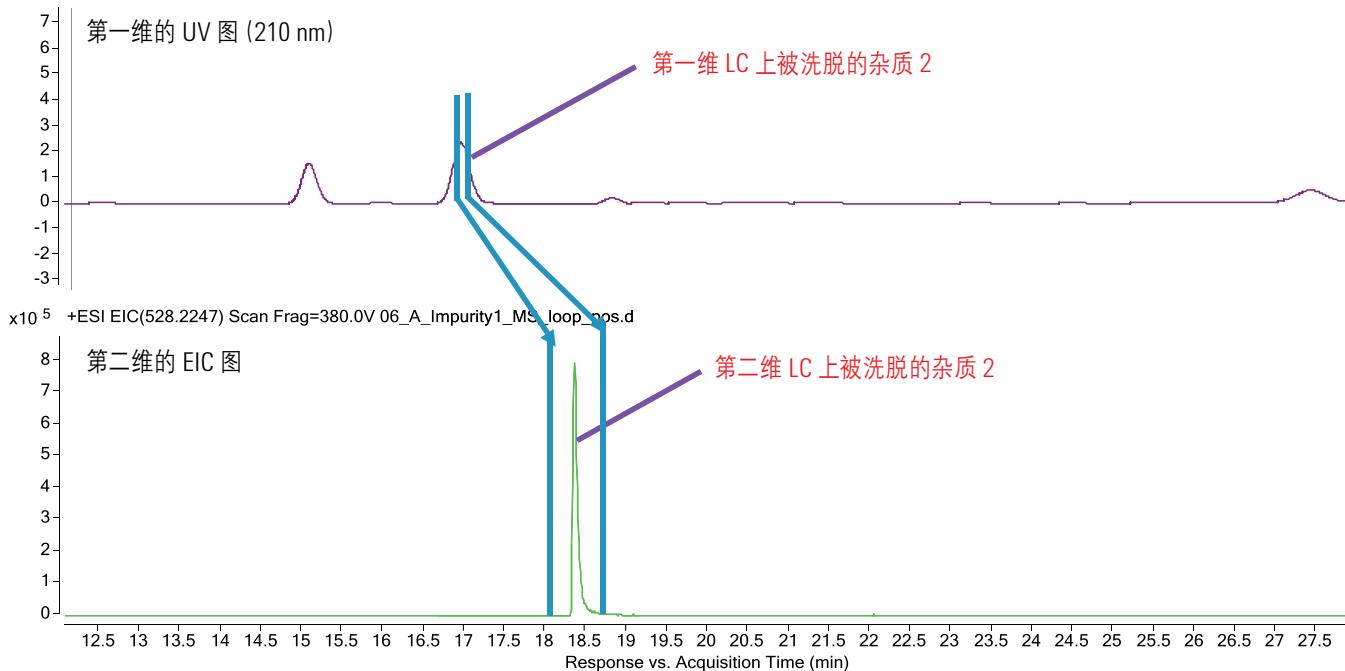
第二维色谱条件

- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 1% FA 的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 梯度洗脱

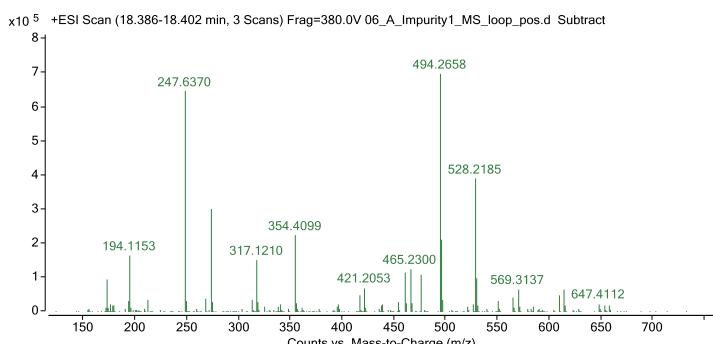


杂质 2 的分析

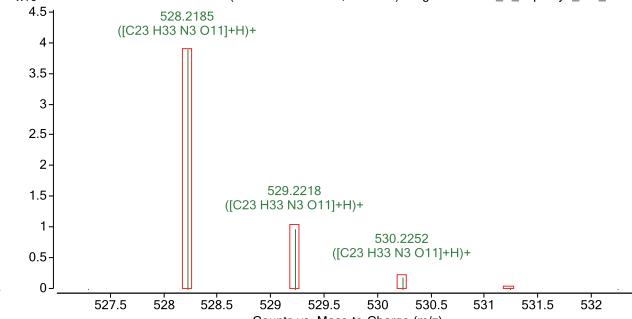
x10¹ DAD1 - DAD 1: Signal A:Sig=210.0,4.0 Ref=off 06_A_Impurity1_MS_loop_pos.d



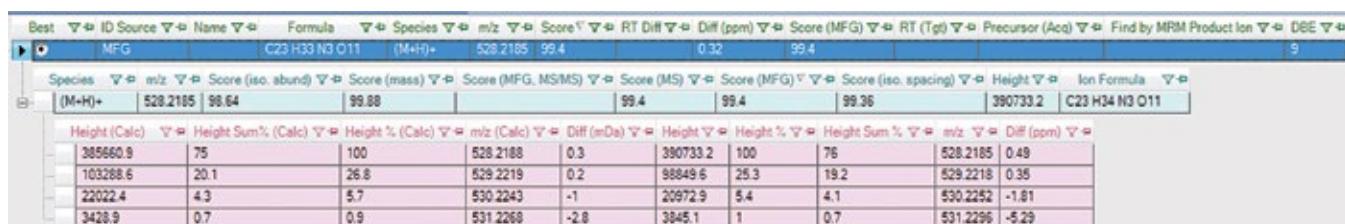
x10⁵ +ESI Scan (18.386-18.402 min, 3 Scans) Frag=380.0V 06_A_Impurity1_MS_loop_pos.d Subtract



x10⁵ C23 H33 N3 O11: +ESI Scan (18.386-18.402 min, 3 Scans) Frag=380.0V 06_A_Impurity1_MS_Loo...



杂质 2 的质谱图及局部放大图



杂质 2 分子式生成结果

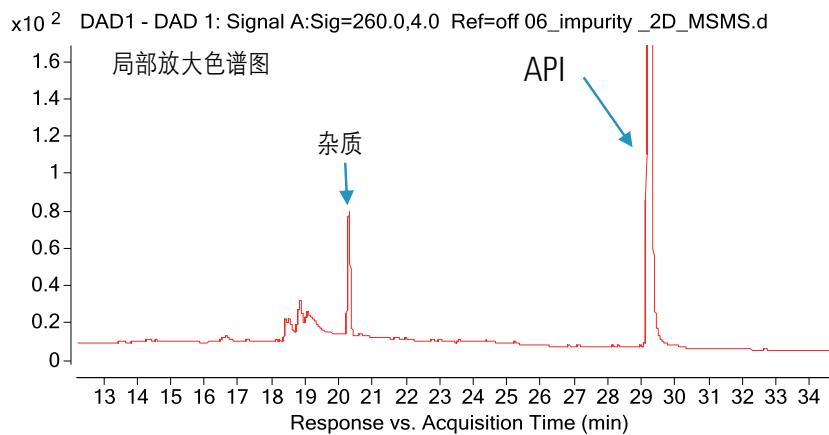
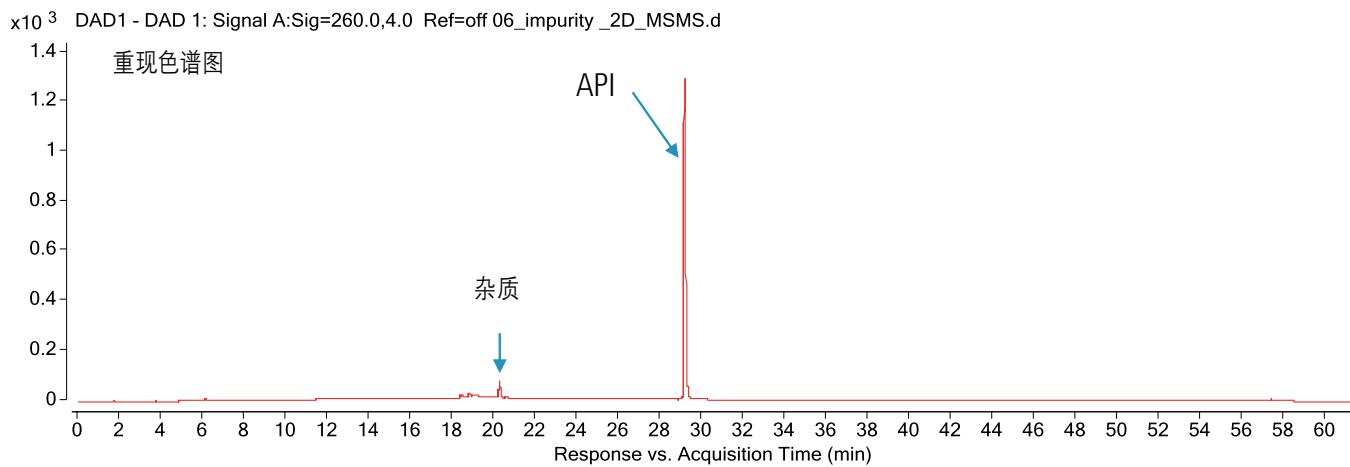
实例 5：色瑞替尼

第一维色谱条件

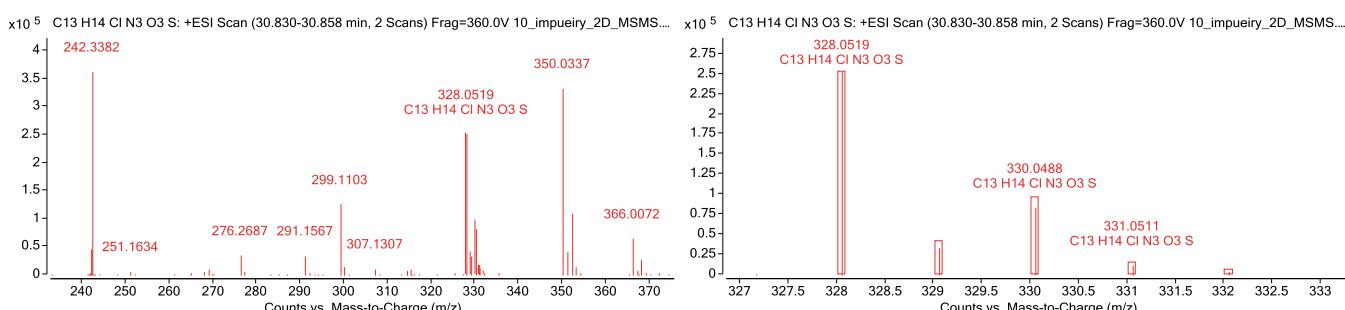
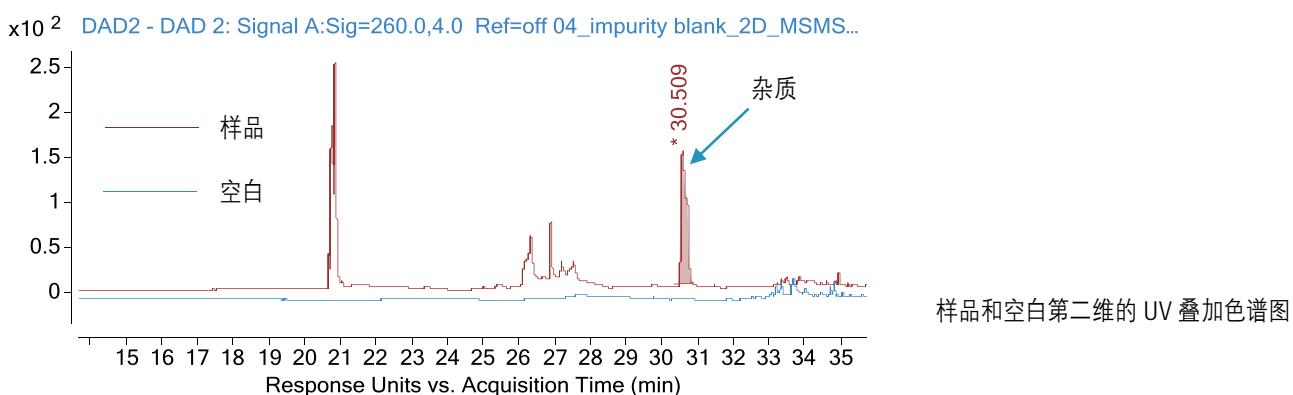
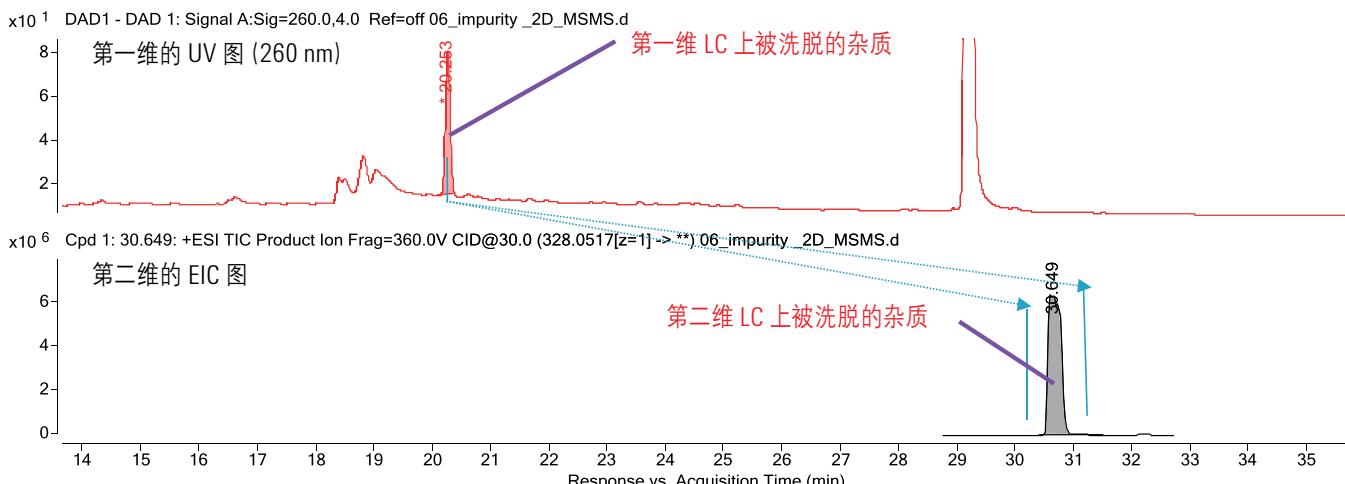
- 色谱柱: Kromasil 100-5 C18, 4.6 × 250 mm, 2.6 μ m
- 流动相 A: 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPo}_4$ +10 mM 四丁基氢氧化铵缓冲液 (pH=6.5)
- 流动相 B: 乙腈

第二维色谱条件

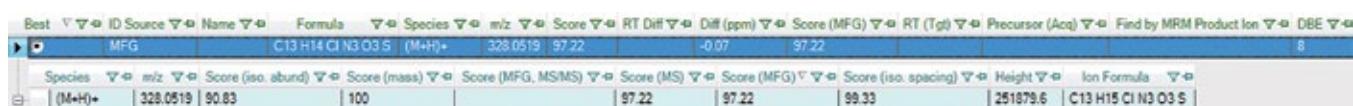
- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 水
- 流动相 B: 甲醇



杂质的分析



杂质的质谱图及局部放大图



杂质分子式生成结果

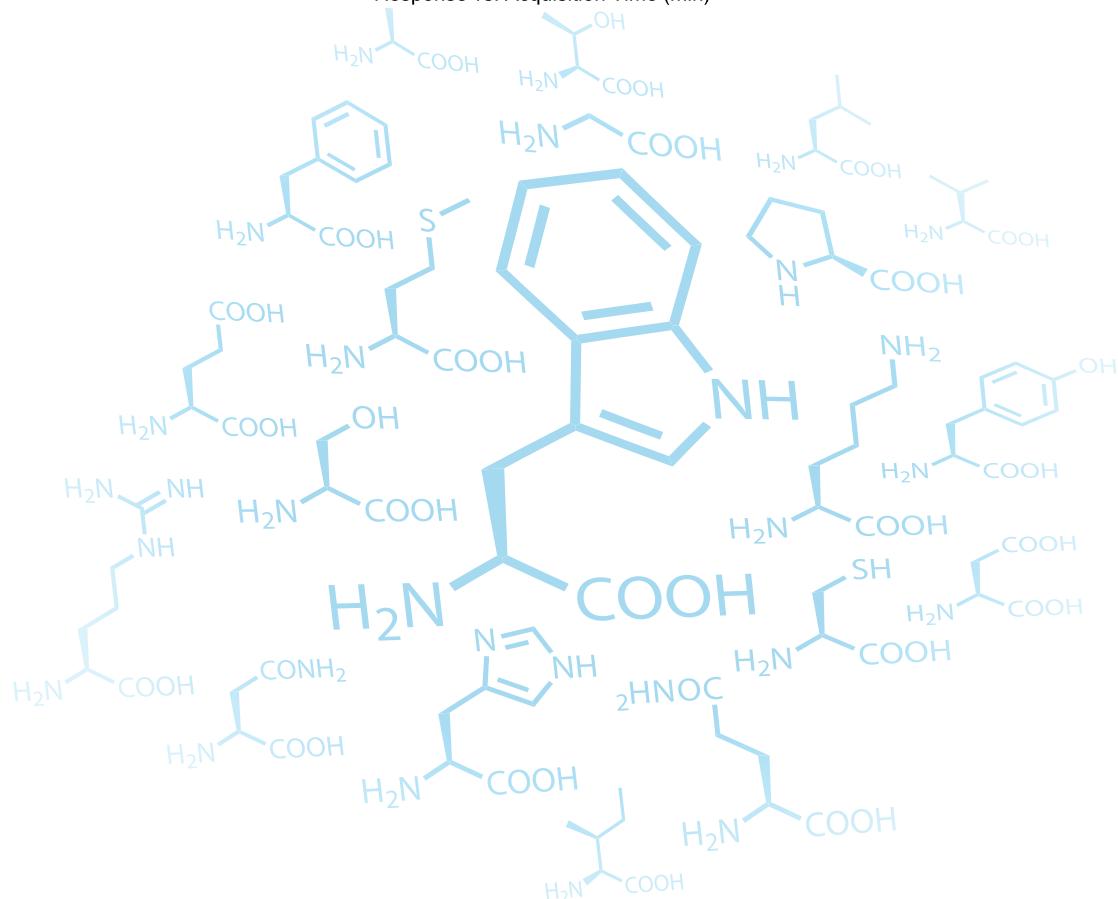
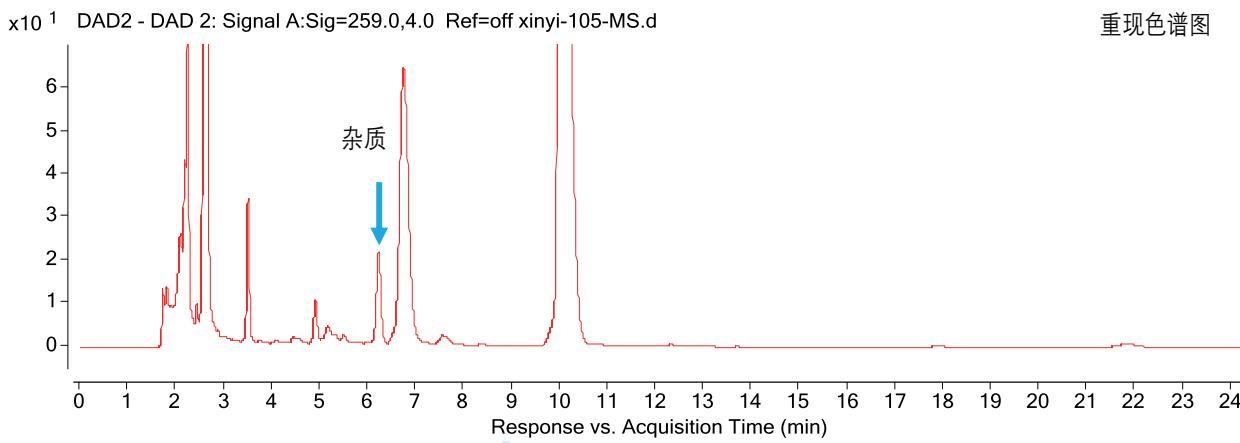
实例 6：倍他司汀

第一维色谱条件

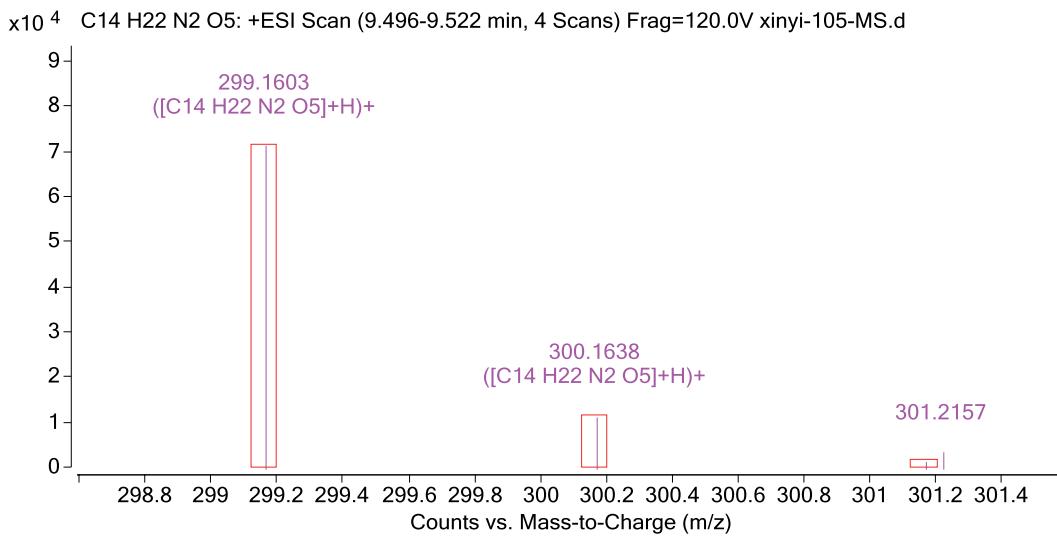
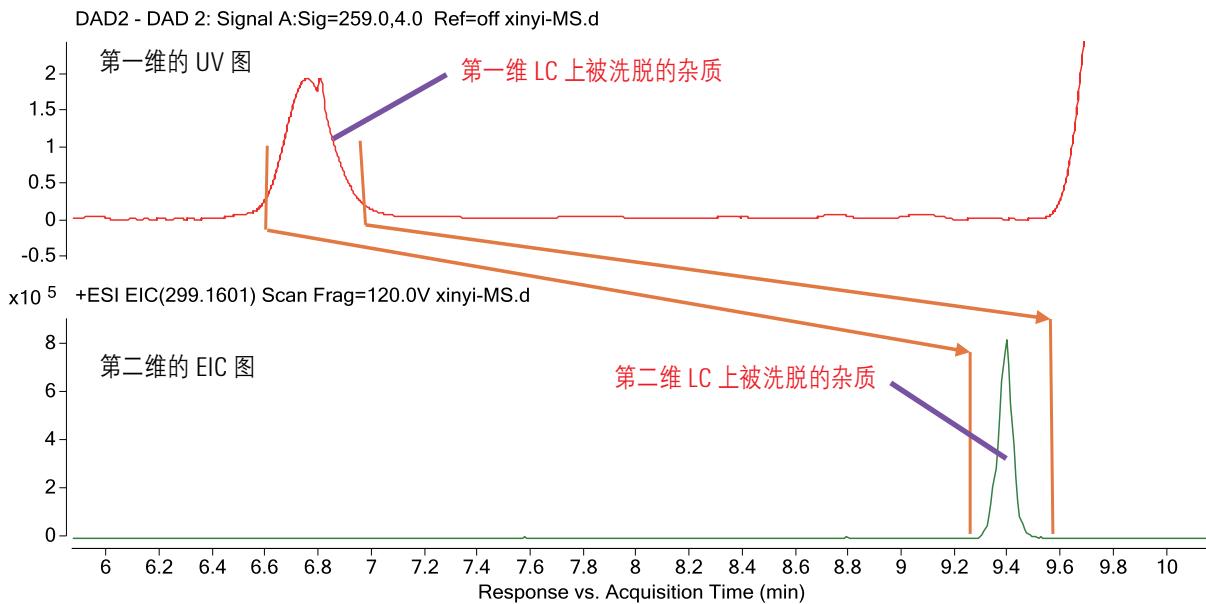
- 色谱柱: SHISEIDO C18, 4.6 × 250 mm, 5 μ m
- 流动相 A: 十二烷基硫酸钠 (pH=4.7)
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.0 mL/min
- 等度洗脱: A:B (60:40, v/v)

第二维色谱条件

- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 0.1% FA 的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 柱温: 40 °C
- 梯度洗脱



杂质的分析



杂质的质谱图

Best	ID Source	Formula	Species	m/z	Score	Diff (ppm)	DBE		
Best	ID Source	Formula	Species	m/z	Score	Diff (ppm)	DBE		
MFG C14 H22 N2 O5 (M+H)+ 299.1603 99.59 -0.73 5									
Species	m/z	Height	Ion Formula						
(M+H)+	299.1603	71497.2	C14 H23 N2 O5						
Height (Calc)	Height Sum% (Calc)	Height % (Calc)	m/z (Calc)	Diff (mDa)	Height	Height %	Height Sum %	m/z	Diff (ppm)
71653.8	84.2	100	299.1601	-0.2	71497.2	100	84	299.1603	-0.54
11699.4	13.7	16.3	300.1633	-0.6	11753.4	16.4	13.8	300.1638	-1.89
1631.7	1.9	2.3	301.1655	-0.4	1656.4	2.3	1.9	301.1659	-1.44
162.6	0.2	0.2	302.1668	1.4	240.5	0.3	0.3	302.1667	4.56

杂质分子式生成结果

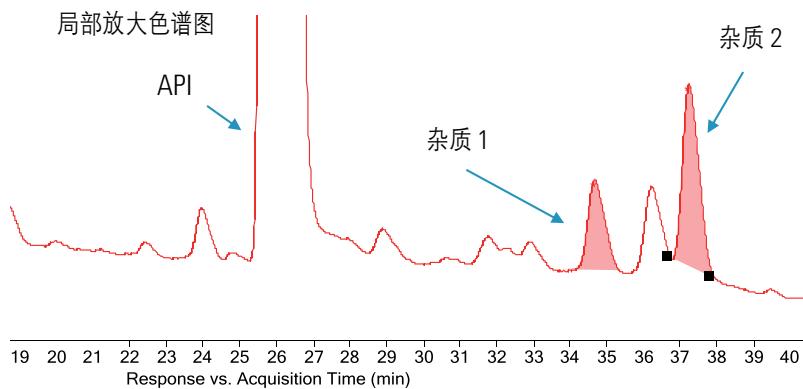
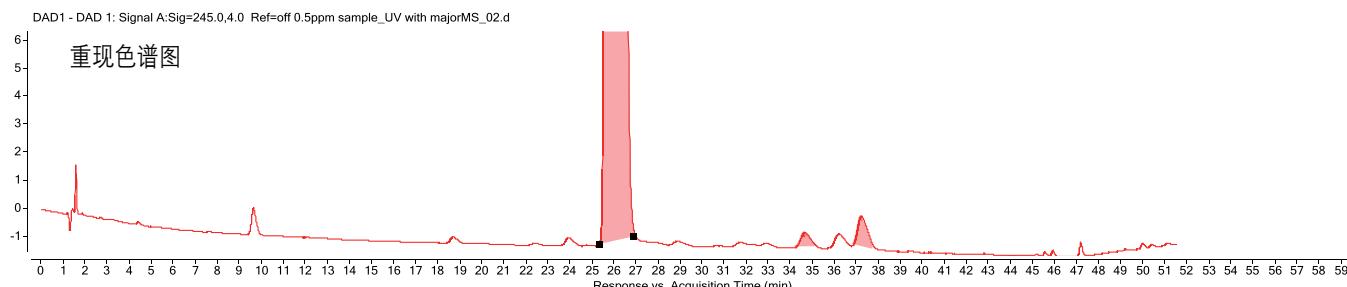
实例 7：糠酸氟替卡松

第一维色谱条件

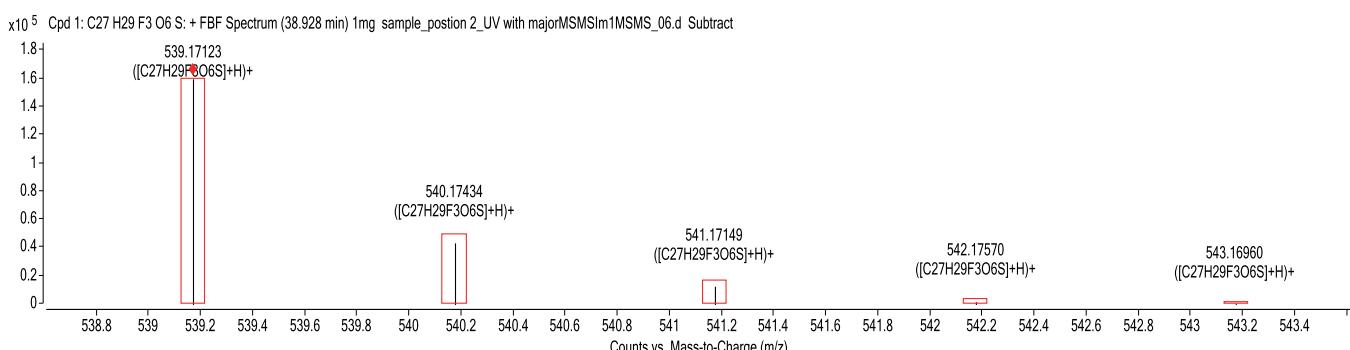
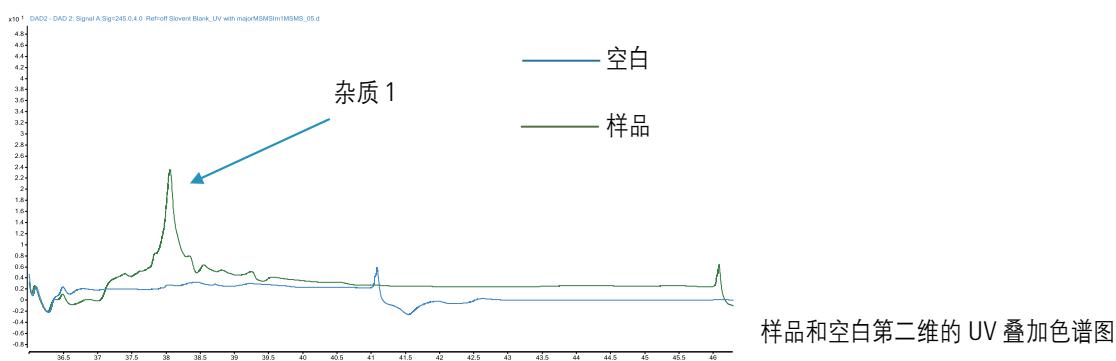
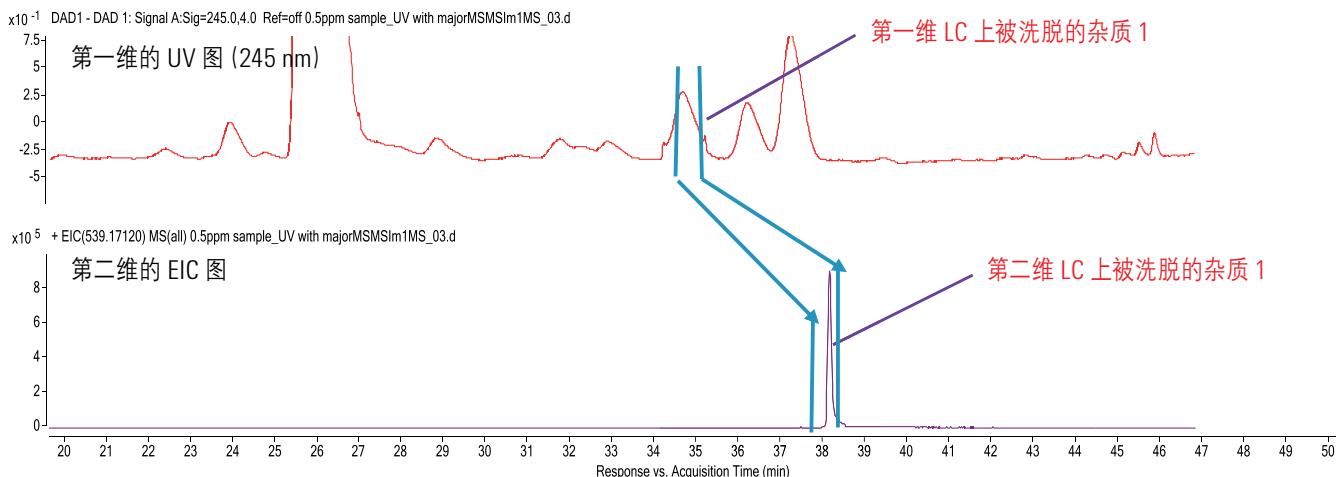
- 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μ m
- 流动相 A: 甲醇:水:磷酸 = 30:970:0.5
- 流动相 B: 甲醇:乙腈:磷酸 = 30:970:0.5
- 流速: 1.0 mL/min

第二维色谱条件

- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 水
- 流动相 B: 乙腈
- 梯度洗脱



杂质 1 的分析

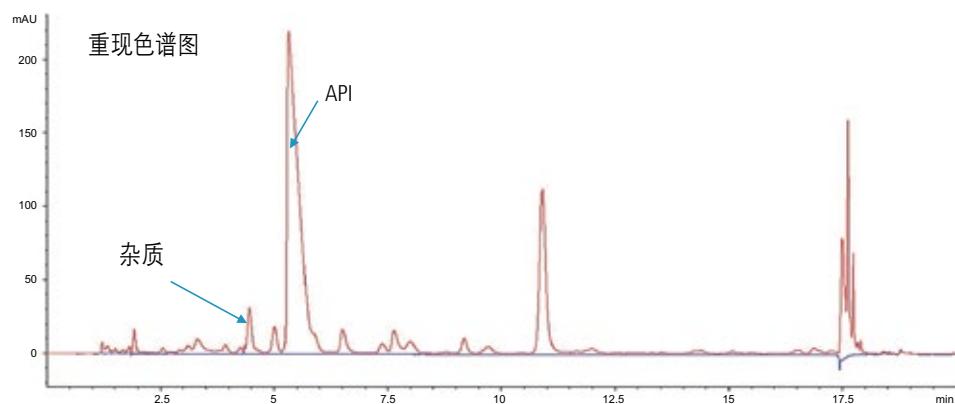


杂质 1 分子式生成结果

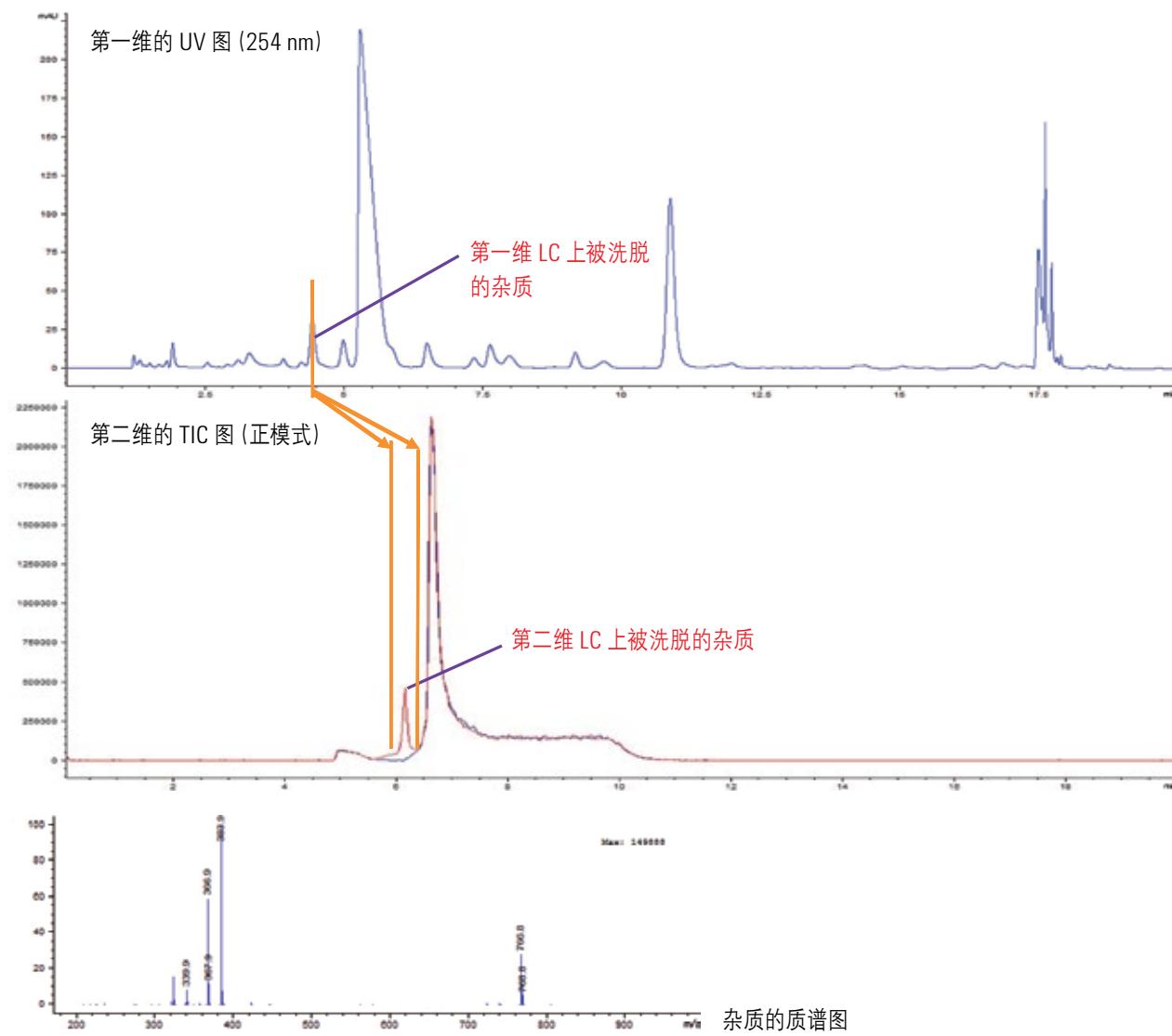
实例 8：阿莫西林

用户提供的液相色谱条件

- 色谱柱: Zorbax Extend C18, 4.6 × 150 mm, 5 μ m
- 流动相 A: 15 Mmol/L 磷酸二氢钾、5 Mmol/L 磷酸的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.0 mL/min
- 柱温: 40 °C
- 梯度洗脱



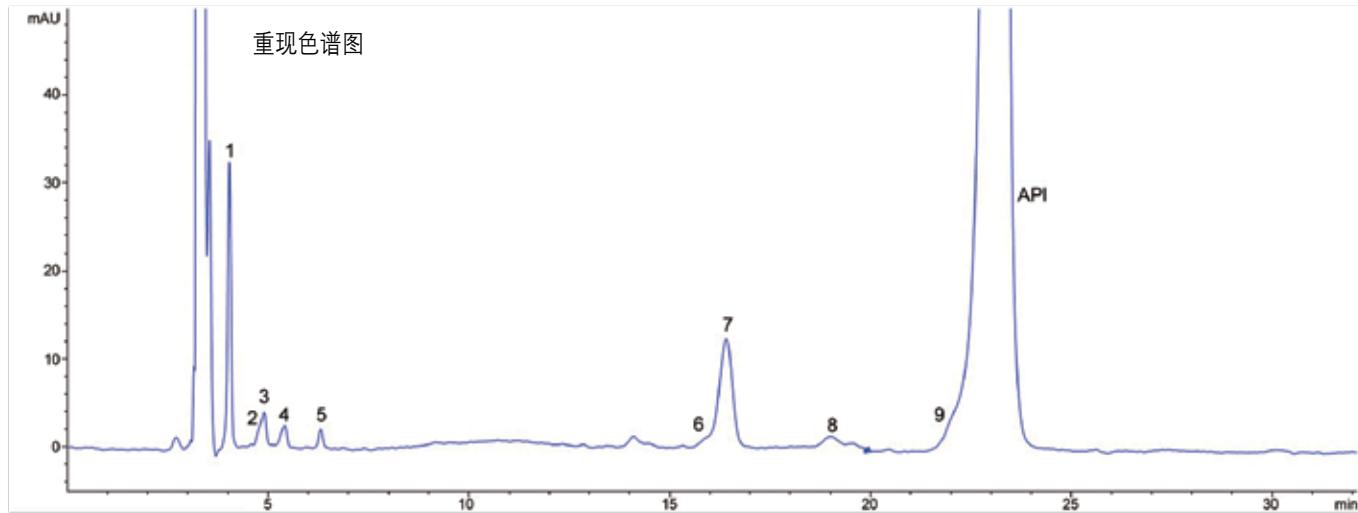
杂质的分析



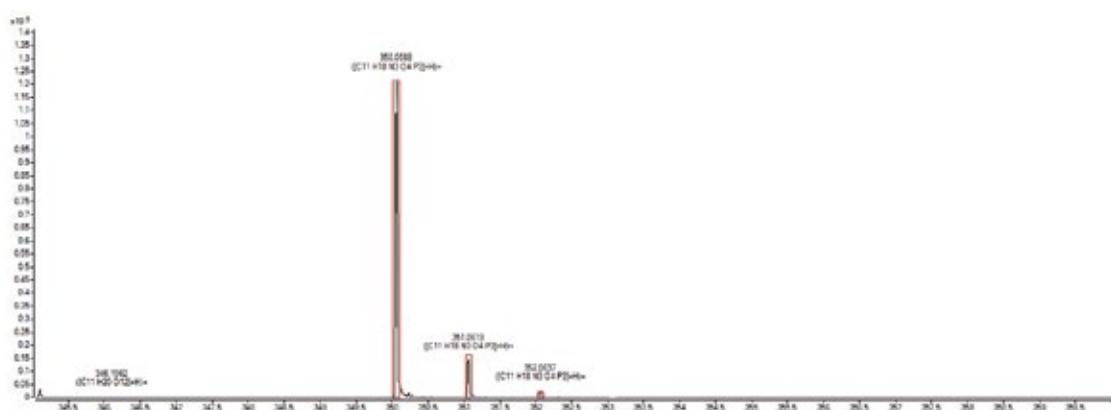
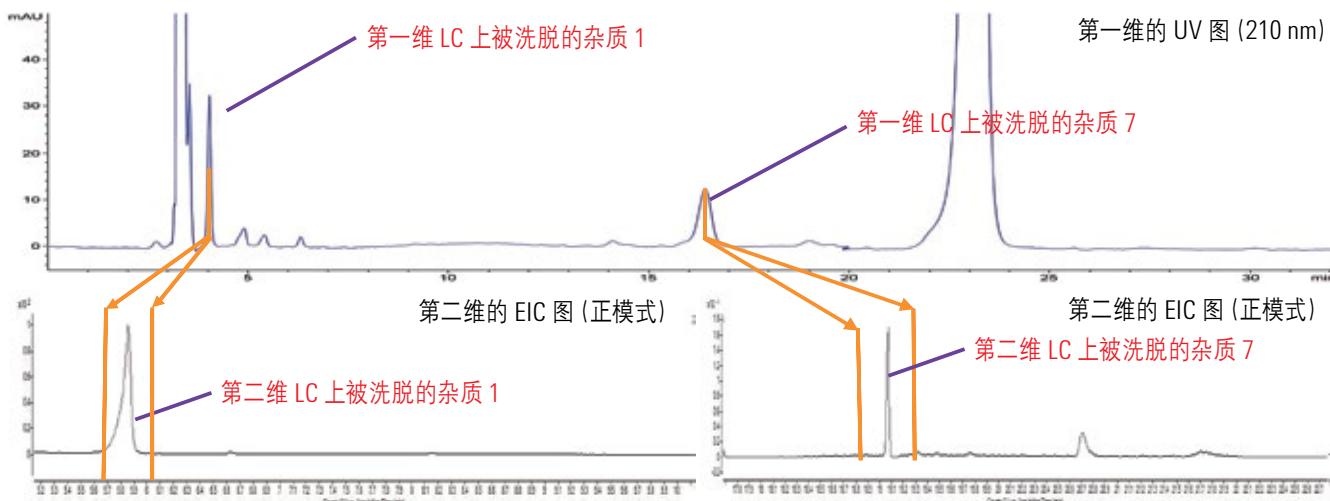
实例 9：磷脂

用户提供的液相色谱条件

- 色谱柱: YMC-Pack-CN, 6.0 × 150 mm, 5 μ m
 - 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸水溶液
 - 流动相 B: 乙腈
 - 流速: 1.0 mL/min
 - 柱温: 40 °C
 - 等度洗脱

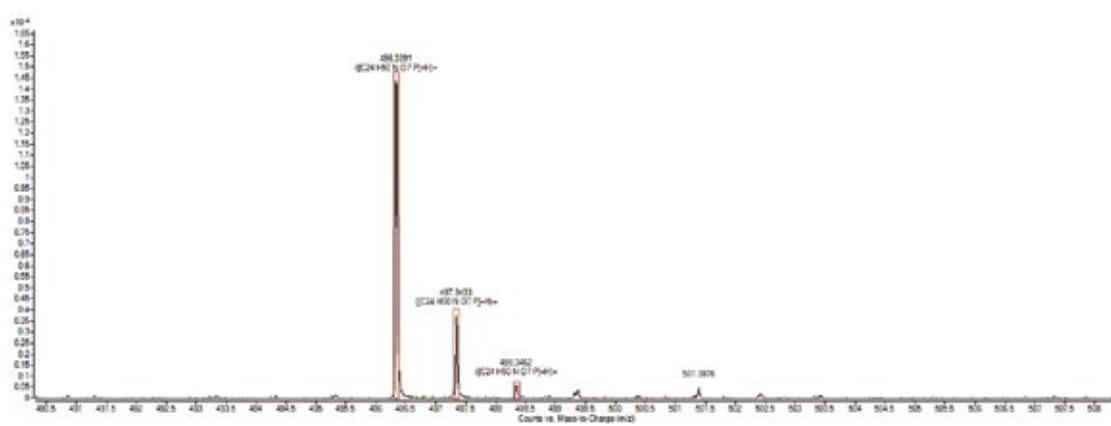


杂质 1 和 7 的同时分析 (一次进样分析 2 个杂质)



Best	ID	Source	Name	Formula	Species	m/z	Score	Score (RT)	RT Diff	Diff (ppm)	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Score (MFQ)
Best	MFG			C11H18N3O4P3	(M+H) ⁺	350.0588	98.34		-1.41		98.34			
					Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (iso. spacing)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Height	Ion Formula
①	(M+H) ⁺	350.0588	96.96		98.47	99.75				98.34	98.34	121509.4		C11H18N3O4P3

杂质 1 分子式生成结果



Best	ID	Source	Name	Formula	Species	m/z	Score	Score (RT)	RT Diff	Diff (ppm)	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Score (MFQ)
Best	MFG			C24H51N7O7P	(M+H) ⁺	496.3391	98.45		0.85		98.45			
					Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (iso. spacing)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Height	Ion Formula
①	(M+H) ⁺	496.3391	98.05		99.23	97.38				98.45	98.45	14784.9		C24H51N7O7P

杂质 7 分子式生成结果

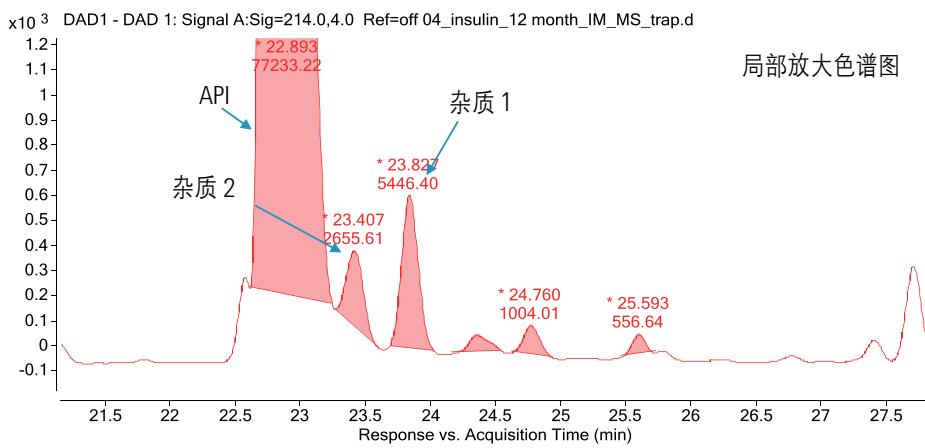
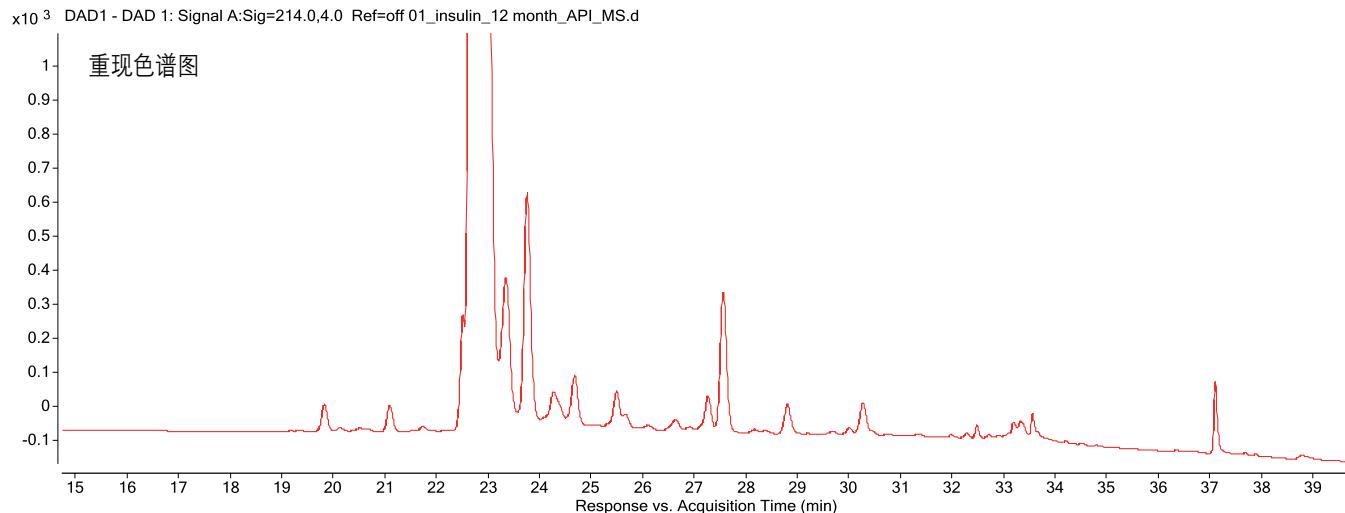
实例 10：胰岛素

第一维色谱条件

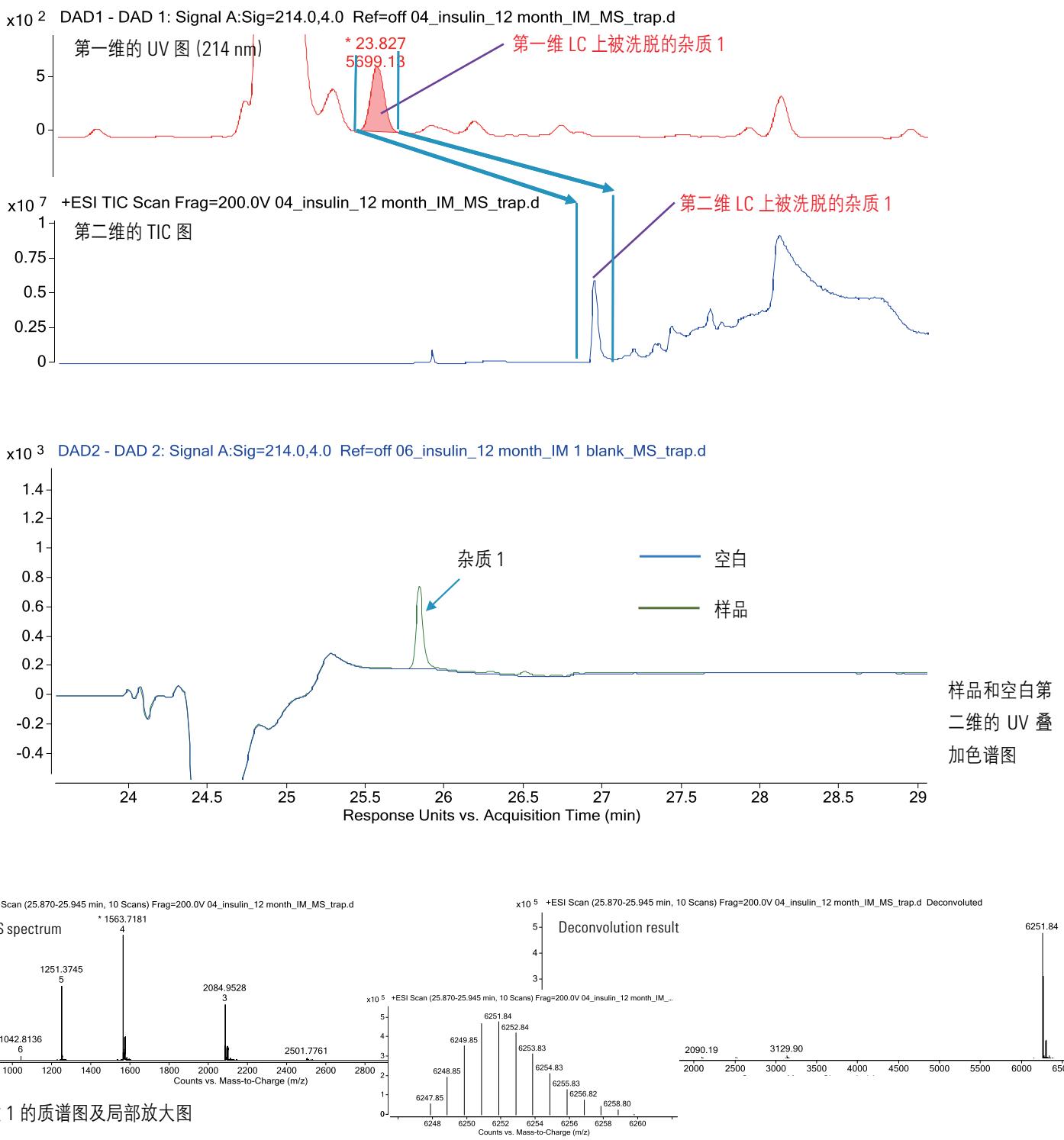
- 色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 100A, 4.6 × 100 mm, 2.6 μ m
- 流动相 A: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液-三乙醇胺 (100:1, pH=2.3)
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.0 mL/min
- 梯度洗脱

第二维色谱条件

- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 1% FA 的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 梯度洗脱



杂质 1 的分析



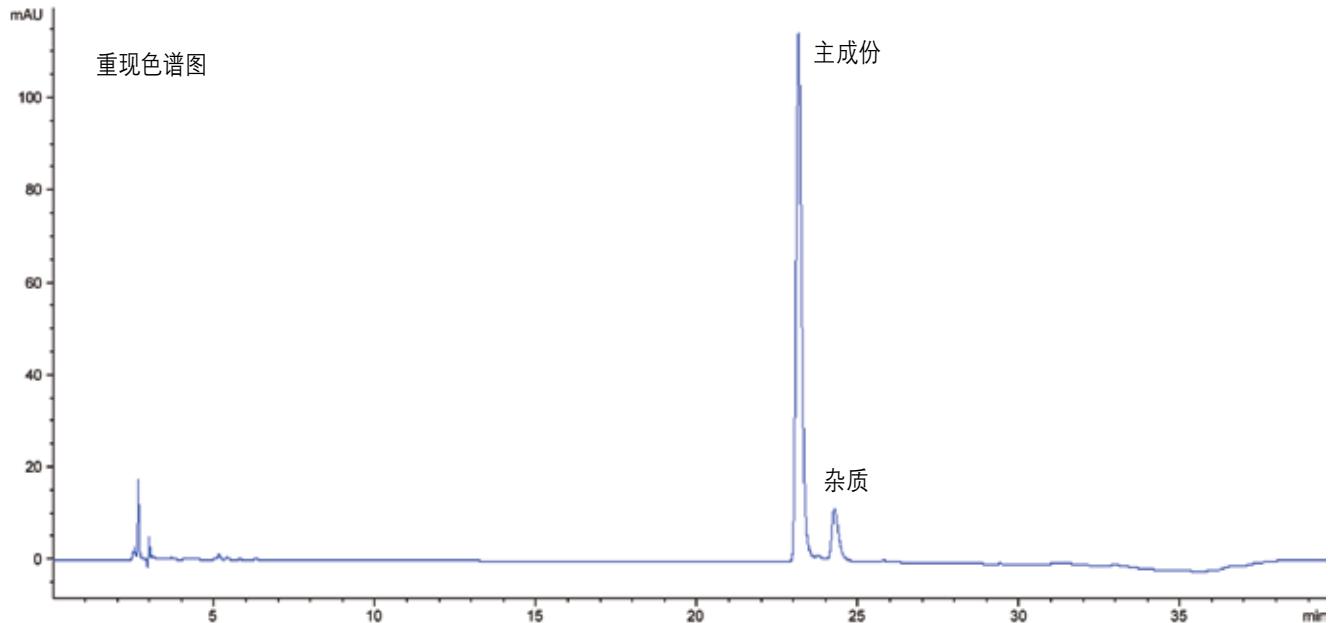
实例 11：蛋白质

第一维色谱条件

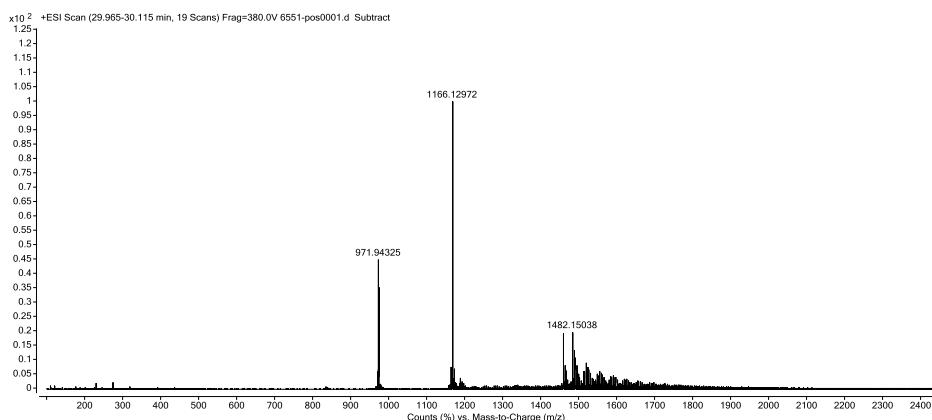
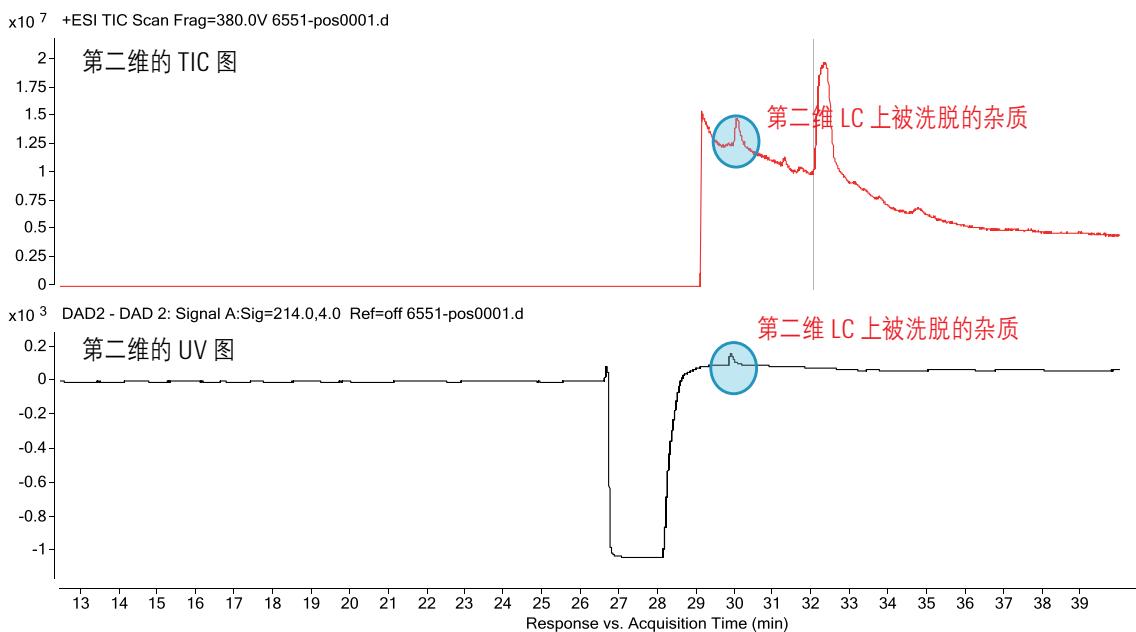
- 色谱柱: Zorbax 300 SB C18/C8, 4.6 × 250 mm, 5 μ m
- 流动相 A: 200 mM 硫酸钠, 40 mM 磷酸, NaOH 调 pH 值 (pH=3.6)
- 流动相 B: 乙腈
- 流速: 1.0 mL/min
- 梯度洗脱

第二维色谱条件

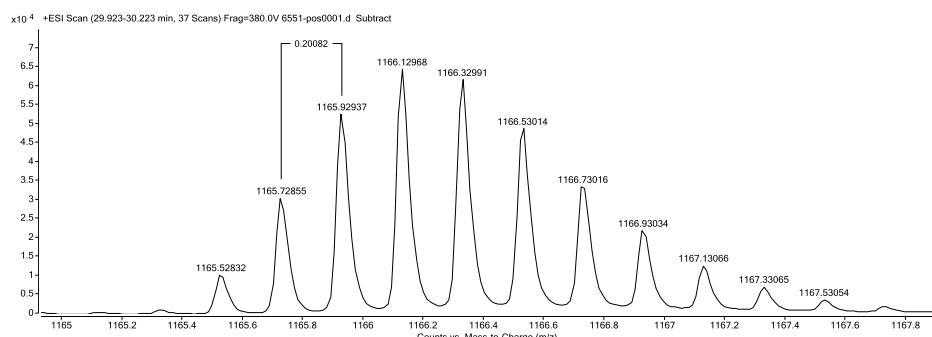
- 色谱柱: RP C18
- 流动相 A: 1% FA 的水溶液
- 流动相 B: 乙腈
- 梯度洗脱



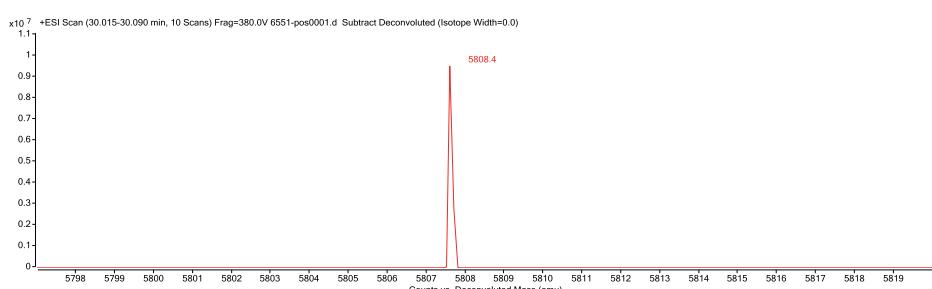
杂质的分析



杂质的质谱图



杂质质谱图的局部放大图



第二维色谱中二聚体副产物的
解卷积结果图

结语

安捷伦科技 2D-LC/MS 在线脱盐技术在药物杂质鉴定中具有很强的实用性，可有效的解决前端液相色谱分离必须使用非挥发盐流动相系统与后端采用质谱检测之间兼容性的矛盾；使用者无需进行 LC 方法转换，就可将质谱不兼容流动相体系的液相方法用于质谱检测；配合使用安捷伦杂质鉴定数据处理流程，可快速高效的完成特定杂质的鉴定工作。

目前该技术方法经验证，已成功的适用于无机盐（磷酸盐）流动相系统和有机离子对改性剂流动相系统（十二烷基磺酸钠、四丁基氢氧化铵等）。

此外，用户可根据具体实验需求，将该方法的应用进行拓展，如：分析方法流动相体系的替换、改善分析方法基质抑制效应等。

更多信息：

www.agilent.com.cn

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心：

免费专线：**800-820-3278**

400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2015

2015 年 3 月, 中国印刷

5991-5564CHCN



Agilent Technologies