Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用UPC²/MS进行杂质分析

Michael D. Jones 和 Warren Potts
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- 解决复杂杂质分析所面临的难题
- 帮助做出最终方法开发决策的方法

沃特世解决方案

ACQUITY UPC² 系统

Empower® 3 软件

ACQUITY SQD 质谱仪

KEY WORDS

UPC²，药物杂质，稳定性指示法，降解分析，方法开发，甲氧氯普胺，合相色谱

简介

UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²™)充分利用亚2 µm颗粒固定相的优势，采用二氧化碳作为主要流动相成分。合相色谱作为液相色谱的补充性分析技术，可提供正交的选择性，所以它能够大大提高鉴定出样品中所含杂质的几率。质谱信息有助于分析人员确证、鉴定和定义药物成分的质量。相比于之前发布的反向液相色谱(RPLC)纯度分析法，UPC²与质谱仪联用可为药物分析提供一款重要的分析工具。[1-3]

本实验在方法开发的筛选过程中观察到一些异常现象。[4]在一个实例中，假设杂质F的标准溶液在几天后将变得不稳定。在本应用纪要中，我们将ACQUITY UPC²™系统与ACQUITY® SQD联用，对方法开发标准品和过期甲氧氯普胺样品分析中出现的未知峰进行鉴定，并分析它们之间的关系。通过相应MS质谱数据推测和确证API的杂质关系。最后，通过甄别杂质分析的MS数据，确保存在未知峰时的方法学专属性，从而进一步调节最终的方法。

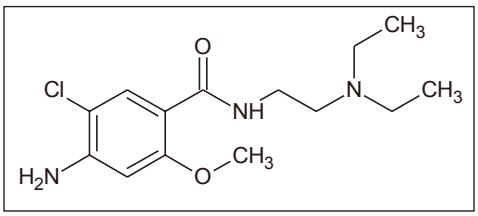

图1. 甲氧氯普胺的化学结构。

实验

UPC² 条件

系统:	ACQUITY UPC²，配备PDA和SQD检测器
色谱柱:	ACQUITY UPC² BEH 2-EP 3.0 × 100 mm，1.7 µm
流动相A:	CO_2
流动相B:	含1 g/L甲酸铵的甲醇/乙腈(50:50)溶液，加标有3%甲酸
清洗溶剂:	70:30的甲醇/异丙醇
分离模式:	梯度；流动相B在5 min内从5%增加至30%；达到30%后，保持1 min
流速:	2.0 mL/min
CCM 反压:	1500 psi
柱温:	50 ℃
样品温度:	10 ℃
进样体积:	0.5 µL
运行时间:	6.0 min
检测条件:	PDA 3D通道：PDA，200到410 nm；20 Hz PDA 2D通道：275 nm，4.8 nm分辨率(补偿500到600 nm) SQD MS：150至1200 Da；ES PosNeg
补液流速:	无；(分流器中未配置补充泵)
数据管理:	Empower 3软件

样品描述

使用甲醇配制杂质C和杂质F标准溶液，在0.1 mg/mL浓度下进行分析。采用甲醇提取制备过期样品，配成浓度为2 mg/mL的相关甲氧氯普胺活性成分溶液。

结果与讨论

在分析甲氧氯普胺降解物前，需分析相应MS数据，以解决杂质参比标准品“杂质C”(4-氨基-5-氯-2-甲氧基苯甲酸)和“杂质F”(4-氨基-5-氯-N-[2-(二乙氨基)乙基]-2-羟基苯甲酰胺)色谱图的相关问题。

参比标准品杂质C的MS研究

在筛选过程中，采用 ACQUITY UPC² CSH™氟-苯基色谱柱分析杂质C标准品，可获得两个相互分离的色谱峰。采用其它固定相的色谱柱时，未获得上述结果。两个色谱峰的MS谱图分析表明二者谱图类似。MS谱图提示分析物可能存在二聚作用。根据上述信息，可以确定两峰之间存在相互关联性，第二个峰并非污染物。这一关系的快速确定为进一步采用MS/MS和准确质量数进行分析提供了方向。同时，这些技术所生成的数据在标准品的纯度测定中将发挥更大作用。

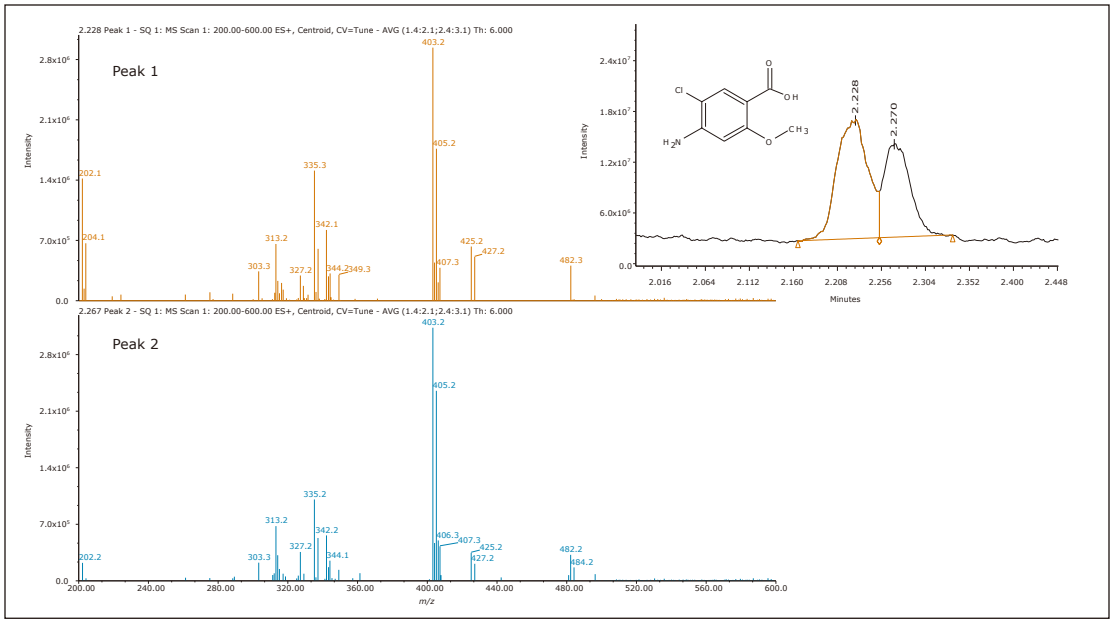

图2. 采用UPC²CSH 氟-苯基固定相分析所得的EP杂质双峰图及相应MS谱图分析。

杂质F工作标准品溶液稳定性研究

在方法开发过程中，杂质F的峰形随着时间的推移逐渐降解。一周的时间内，色谱图中出现了相关未知峰。另外，标准溶液的颜色从澄清渐变为褐色。MS分析所得质量数列表见表1。这些质量数与保留时间2.0-3.5min之间的UV迹线(未示出)中显著的谱峰相关联。*m/z* = 330到296的XIC形成了多个峰。

工作标准溶液采用甲醇制备。多数杂质峰均为甲基化或甲氧基化的产物。基于上述信息，本实验将对备用稀释剂进行考察，抑制此类转化的发生。目前，在进行适用稀释剂研究之前，工作标准溶液的保质期已缩短至3天。表1中第8个未知峰(*m/z*=258)与4-乙酰氨基-5-氯-2-甲氧基苯甲酸酯(通常被称为“杂质B”)的质量数相同。由于保留时间存在差异，杂质F工作标准品中发现的此未知峰经确定与EP杂质B不同，杂质B的洗脱时间大约为0.48 min。其它杂质的来源仍未能确定。它们可能来自溶液的降解产物或参比物质。

名称	Rt (min)	实测 *m/z*	Δ 质量数	推测转化途径
EP 杂质 F	2.924	286		
未知物 1	2.268	344	+ 58 Da	甲氧基化+甲基化
未知物 2 和 4	2.303 和 2.614	330	+ 44 Da	甲氧基化
未知物 3 和 6	2.680 和 2.886	296	+ 10 Da	水解+两次甲基化
未知物 5	2.864	356	+ 70 Da	?
未知物7	3.113	252	- 34 Da	脱 Cl-
未知物 8	3.288	258	- 28 Da	脱两个 CH_3 基团

表1. 甲氧氯普胺EP杂质F标准溶液降解物的质量数。

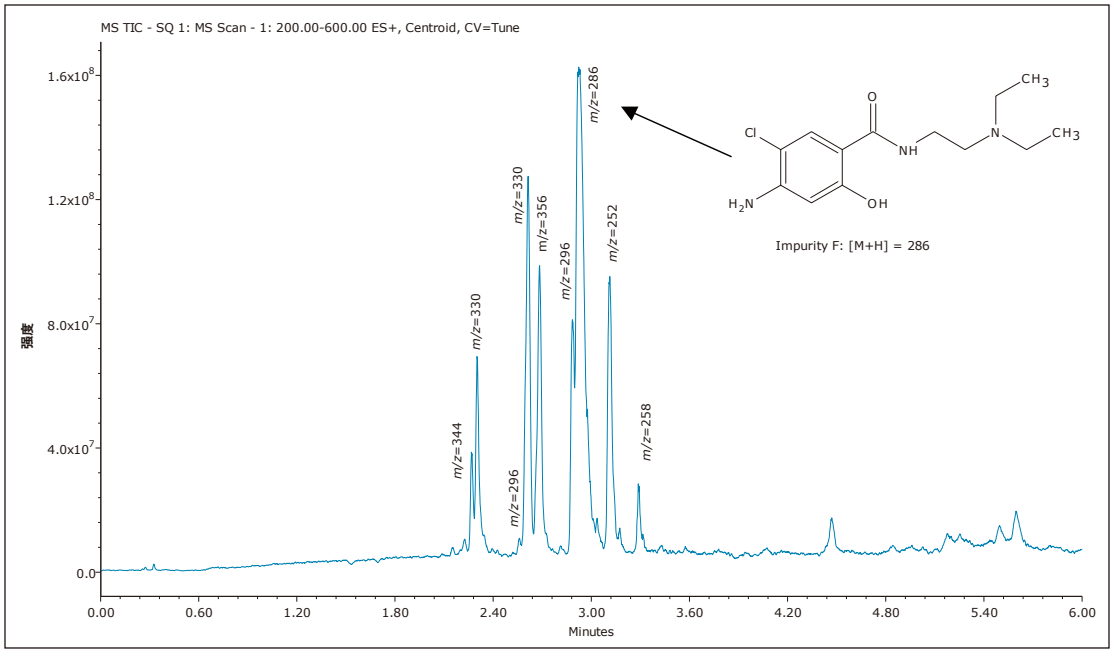

图 3. 甲氧氯普胺EP杂质F标准溶液降解物的MS ES+ TIC。

过期甲氧氯普胺样品研究

本实验采用Empower 3软件控制ACQUITY UPC²系统联用ACQUITY SQD质谱仪，为过期甲氧氯普胺样品中的杂质检测提供了一个简单的解决方案。右键单击查看窗口即可提取UV色谱基线中峰的MS谱图，快速确证已知杂质以及鉴别12种未知杂质，如表2所示。UPC²可为杂质检测提供S/N≥10和UV色谱基线中面积%≥0.05%的检测灵敏度。实验对过期甲氧氯普胺样品进行了分析，确定其中是否存在表1中所示的质量数。经MS数据确证，存在与EP F相关的4种杂质(共8种)；*m/z*=296、344、252和258。除已知杂质外，共检出7种未知杂质。质量数、保留时间、UV信噪比见表2。

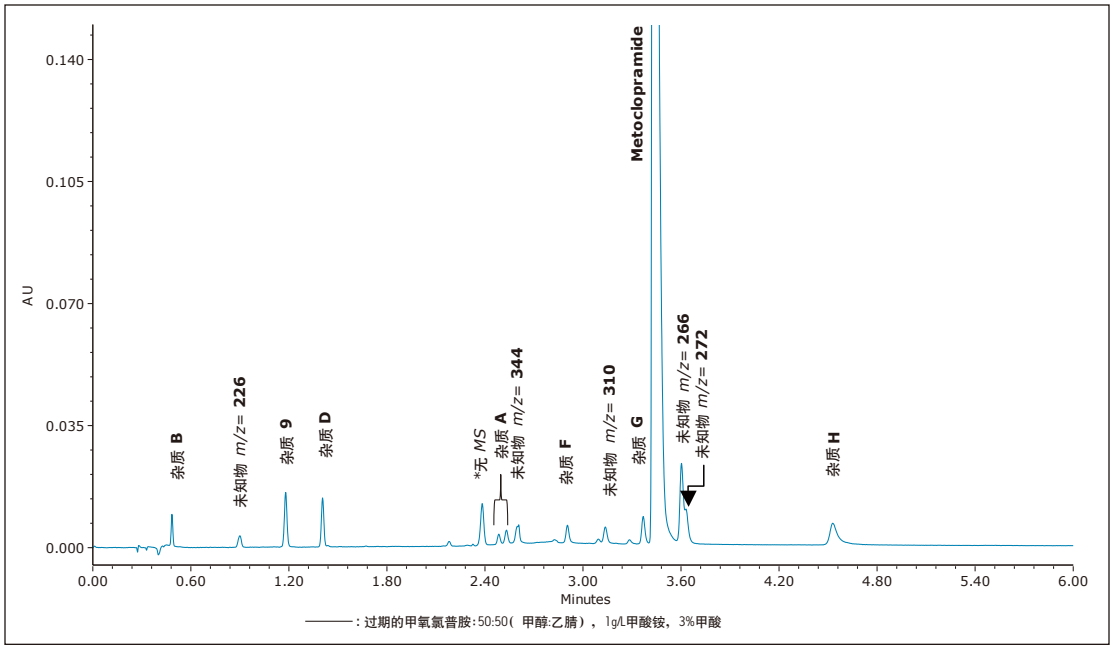

图 4. UV 275 nm波长下甲氧氯普胺降解样品的色谱图。主要杂质已标记。

	Rt	% 面积	USP s/n	*m/z*
杂质 B	0.49	0.48	148	258
未知物 #1	0.90	0.34	54	226
杂质 “9”	1.18	1.34	255	(ESI-) 180
杂质 D	1.41	1.14	229	224
未知物 #2	2.18	0.12	22	306
未知物 #3	2.33	0.02	8	358
未知物 #4	2.38	1.29	195	n/a
杂质 A (同分异构体 1)	2.49	0.28	48	342
杂质 A (同分异构体 2)	2.53	0.41	65	342
相关杂质 F (未知物1)	2.61	0.69	87	344
相关杂质 F (未知物6)	2.83	0.06	10	296
杂质 F	2.91	0.51	82	286
相关杂质 F (未知物7)	3.09	0.14	20	252
未知物 5	3.14	0.55	77	310
相关杂质 F (未知物8)	3.28	0.14	20	258
杂质 G	3.37	0.87	130	316
甲氧氯普胺	3.43	86.07	8186	300
未知物 6	3.60	2.83	380	266
未知物 7	3.63	1.09	165	272
杂质 H	4.53	1.62	101	(ESI-) 194

表2. 过期甲氧氯普胺样品进样后的UV 275 nm色谱迹线峰列表。

结论

ACQUITY UPC²系统联用MS为杂质分析提供了一个全面的解决方案。此配置能够科学、快速地解答参比标准品杂质的相关问题，如上述杂质C参比标准品的相关内容所示。UPC²/MS可为杂质F工作标准品的稀释剂选择提供指导，并可相应调整工作标准溶液的保质期。另外，通过杂质F的稳定性研究可深入了解药物样品中可能存在的其它潜在杂质。此外，过期甲氧氯普胺中还检测到7种未知杂质。通过Empower 3软件可轻松实现对UV和MS数据的分析。总之，采用UPC²/MS系统增加了药物质量方面的知识储备，可改善实现分析目标的方法学步骤。

参考文献

1. Ahuja S, Alsante K. Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceutical Compounds. *Elsevier*. 2003.
2. Jones MD *et al.* Identification and Characterization of an Isolated Impurity Fraction: Analysis of an Unknown Degradant Found in Quetiapine Fumarate. Waters Application Note 720003079EN. 2009 Oct.
3. Jones MD *et al.* A Workflow Approach for the Identification and Structural Elucidation of Impurities of Quetiapine Hemifumarate Drug Substance. Waters Application Note 720003081EN. 2009 Oct.
4. Jones MD, Potts W. UPC² Method Development for Achiral Impurity Analysis. Waters Application Note 720004577. 2013 Jan.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、Empower、和ACQUITY是沃特世公司的注册商标。Ultra Performance Convergence Chromatography、UPC²、CSH和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 沃特世公司。印制于中国

2013 年 2 月 720004575ZH AG-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com