

LC-MS 在药物有关物质分析中的应用

高明¹, 颜晓丹¹, 金松子², 蒋庆峰^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

摘要: 液质联用技术以其高分离能力、高分辨率和专属性强的优势, 在药物分析等方面得到广泛的应用。主要从串联四极杆质谱仪、四极离子阱质谱仪、四极杆-飞行时间质谱仪方面总结近年来液质联用技术在药物有关物质分析方面的应用。

关键词: 液质联用技术; 质谱; 药物分析; 有关物质

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)01-0063-04

Application of liquid chromatography-mass spectrometry in drug related substances analysis

GAO Ming¹, YAN Xiao-dan¹, JIN Song-zi², JIANG Qing-feng²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Liquid chromatography-mass spectrometry is regarded as an important technology for many advantages such as high separating efficiency, good sensitivity, and strong specificity. So it is widely used in analysis of drugs and metabolites, chemical medicine mixed illegally in Chinese medicine and drug residues. This paper briefly reviewed its application in drug related substances analysis from Quadrupole Mass Spectrometer, Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer, and Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometer.

Key words: liquid chromatography-mass spectrometry; mass spectra; drug analysis; related substances

药品是一类特殊商品, 是用来诊断、预防及治疗疾病的一类特殊物质, 与人们的健康和生命安危有极其密切的关系, 其质量控制极为重要。药物安全性评价的一个重要内容是药物中有关物质的质量分数控制。液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)是目前最重要的分离和鉴定分析方法^[1]。LC可以直接分析不挥发性化合物、极性化合物、热不稳定化合物和大分子化合物(包括蛋白、多肽、多糖、多聚物等), 分析范围广, 而且不需衍生化步骤。MS是强有力的结构解析工具, 能为结构定性提供较多的信息, 作为理想的色谱检测器, 不仅特异性强, 而且具有极高的检测灵敏度。液质联用技术集HPLC的高分离能力和MS的高灵敏度、高性能于一体, 成为现代药学研究领域最强有力的分析工具之一。

1 药物中的有关物质

有关物质是指药物中的有机杂质, 主要来源于药物活性物质的制备和贮存过程。通过对这些有关

物质的测定, 可以设法改变其合成路线、实验条件等因素, 避免产生有关物质或使其降到最低限度^[2]。人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)提出的药物质量研究技术要求^[3]及多国倡导的药物杂质分析指导原则^[4-6]中均明确指出:“新药中存在的表观质量分数在0.1%及其以上的杂质, 须予以定性。”根据FDA的指南“药物中的杂质”质量分数低于0.1%的杂质一般不必进行鉴定。然而, 对于那些可能有异常作用、0.1%以下也可产生毒性或药理作用的潜在杂质就应当进行鉴定。

2 液质联用(HPLC-MS)技术

液质联用仪由HPLC、接口装置及MS三大单元组成。从MS的离子源角度来划分, 主要包括热喷雾(TSP)、等离子体喷雾(PSP)、粒子束(LINC)、大气压电离(API)和动态快原子轰击(FAB)。API技术是当今质谱界最活跃的领域, 它是一种常压电离技术, 不需要真空, 减少了许多设备, 使用

收稿日期: 2011-10-11

作者简介: 高明, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: gaomingb250@163.com

*通讯作者 蒋庆峰, 研究员。Tel: (022)23006881 E-mail: jiangqf@tjipr.com

方便,因而近年来得到了迅速的发展。API 目前主要包括电喷雾电离 (ESI)、大气压化学电离 (APCI) 及大气压光离子化电离 (APPI) 三大类。

HPLC-MS 技术可分为单级的 HPLC-MS 和多级的 HPLC-MS/MS, 即液相色谱串联质谱。相对于 HPLC-MS, HPLC-MS/MS 技术可产生较多的碎片离子, 提供更多的结构信息, 更能体现 MS 检测的灵敏度及专属性特征, 特别适合进行复杂体系中的未知组分的定性及定量分析。串联质谱按照分析模式的不同可分为“空间串联”和“时间串联”两种。空间串联是两个以上的质量分析器联合使用, 两个分析器间有一个碰撞活化室, 目的是将前级质谱仪选定的离子打碎, 由后一级质谱仪分析, 四极杆质谱仪 (QMS)、四极杆-飞行时间质谱仪 (Q-TOF) 是典型的空间串联质谱分析器。而时间串联质谱仪只有一个分析器, 前一时刻选定目标离子, 在分析器内打碎后, 后一时刻再进行分析, 四极离子阱质谱仪 (QIT)、傅立叶变换离子回旋共振质谱仪 (FT-ICR)、静电轨道阱质谱 (Orbitrap) 是典型的时

间串联质量分析器。

按照质谱检测器进行分类, 目前比较常用的 HPLC-MS/MS 仪器有 QMS、QIT、Q-TOF 和傅立叶变换质谱仪 (FTMS)。

3 LC-MS 应用于药物有关物质分析和结构鉴定

在传统药物分析中有关杂质检测方法包括 HPLC 色谱峰比较法、薄层色谱法等^[7]。LC-MS 联用技术分析样品不需要进行繁琐和复杂的前处理, 同时得到化合物的保留时间、相对分子质量及特征结构碎片等丰富的信息, 具有高效快速和高灵敏度的特点, LC-MS 可以在不得到纯杂质的情况下获得该杂质的质谱信息, 因此是获得杂质信息的有效手段, 也为定性分析提供必要的证据。通过 LC-MS 可以获得各个杂质的可能相对分子质量, 或进一步通过二级质谱获得各杂质的裂解情况, 为解析化合物的结构提供直接证据。近年来国内外相关研究实例的报道不断增多, 一些药物的分析方法见表 1。

3.1 QMS 在药物有关物质分析中的应用

目前 QMS 应用最为广泛。四极杆由带有直流

表 1 若干药物有关物质分析的实验仪器和方法

Table 1 Several drug related substances analysis experiment instrument and methods

被测药物	实验仪器	实验方法	参考文献
卡德沙星	Agilent 1100 LC/MSD 系统	LC-ESI (+)-MS	[8]
阿比朵尔	API4000 型液相色谱-三重四极杆质谱联仪	LC-ESI (+)-MS	[9]
乙酰吉他霉素	液相色谱-质谱联用仪 (Thermo Finniga 公司)	LC-ESI (+)-MS	[10]
头孢他啶	Agilent 1100 高效液相色谱-质谱联用系统	LC-ESI (+)-MS	[11]
比阿培南	Waters Quattro micro API 三重四极杆质谱仪	LC-ESI (+)-MS/MS	[12]
富马酸福莫特罗	ZMD 型质谱检测器 (Waters 公司)	LC-ESI (+)-MS/MS	[13]
厄贝沙坦氢氯噻嗪片	Surveyor LC-TSQ Quantum Ultra AM 液相色谱-三重四极杆质谱系统 (美国 Thermo-Finnigan 公司)	LC-ESI (-)-MS/MS	[14]
莫沙必利	API 3000 PE 质谱仪	LC-ESI (+)-MS/MS	[15]
双氯青霉素	Perkin-Elmer 三重四极杆质谱仪 (API 2000, PE SCIEX)	LC-ESI (+,-)-MS	[16]
双醋瑞因	MDS Sciex 型 API 2000 三重四极杆质谱仪	LC-ESI (-)-MS	[17]
头孢硫脒	LCQ DECA XP plus 离子阱质谱检测器	LC-ESI (+)-MS/MS	[18]
磷酸哌喹	LCQ-Advantage (Thermo Electron, San Jose, CA) 离子阱质谱仪	LC-ESI (+,-)-MS/MS	[19]
地红霉素	LCQ 离子阱质谱仪 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)	LC-ESI (+, -)-MS ⁿ	[20]
妥布霉素	Finnigan LCQ 离子阱质谱仪 (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)	LC-ESI (+)-MS/MS	[21]
阿普唑仑	Finnigan Advantage 离子阱质谱仪	LC-ESI(+, -)-MS/MS	[22]
克林霉素	Agilent 1100 series 和 Bruker Esquire 3000plus 质谱仪	LC-ESI (+)-MS ⁿ	[23]
雷特格韦	Waters/Micromass QTof API Ultima US 质谱仪	LC-ESI (+)-MS/MS	[24]
炎琥宁	Agilent 6210 TOFMS 质谱仪	LC-ESI (+)-MS ⁿ	[25]
	Agilent LC-MSD-Trap-SL 质谱仪	LC-ESI (+)-TOFMS	
克林霉素磷酸酯	Waters Micromass ZQ4000 型和 SYNAPTTM MS 质谱仪	LC-ESI (-)-MS TOF-MS	[26]

电压(DC)和叠加射频电压(RF)的四根准确平行杆构成。当一组荷质比不同的离子进入由DC和RF组成的电场时,只有满足特定条件的离子作稳定振荡才能通过四极杆,到达检测器而被检测。

马仁玲等^[8]用LC-MS分离并鉴定卡德沙星原料药中的主要相关杂质,并合成了该化合物。确证了该相关杂质的结构为1-环丙基-8-二氟甲氧基-6-氟-1,4-二氢-7-(1-哌嗪基)-4-氧代-3-喹啉羧酸(DMCA)。王金成等^[9]建立了LC-MS/MS法测定阿比朵尔的有关物质,采用一级全扫描及二级全扫描模式,初步推测了5种有关物质的化学结构。胡敏等^[10]应用LC-MS鉴定乙酰吉他霉素中组分及其水解产物,乙酰吉他霉素各组分可基本分离,根据所得到的有关相对分子质量以及碎片峰的信息,对乙酰吉他霉素各组分及其水解产物的结构进行了鉴别。欧贝丽等^[11]应用液相色谱-电喷雾离子化质谱法分析头孢他啶原料药中的杂质,并初步确定了一未知杂质的结构。对谱图进行分析归纳,推测头孢他啶样品中未知杂质的结构为头孢他啶中羧酸的甲酯化产物。黄金龙等^[12]用HPLC方法研究了加替沙星氯化钠注射液的稳定性。Xia等^[13]研究比阿培南水溶液的稳定性。刘延奎等^[14]建立了LC-MS/MS法测定富马酸福莫特罗中的有关物质,初步推测了富马酸福莫特罗中质量分数大于0.1%的杂质的化学结构。惠芳等^[15]建立厄贝沙坦氢氯噻嗪片质量分数测定方法并对有关物质进行研究。

Kumar等^[16]应用LC-MS/MS鉴定一种胃动力促进药莫沙必利中的有关物质。通过LC-MS/MS分析获得的相关质谱数据得出杂质结构。Raj等^[17]对双氯青霉素原料药和制剂的降解产物进行鉴定和结构确证。双氯青霉素原料药和制剂的降解产物的杂质研究在稳定性研究之后进行评估。Ashok等^[18]对双醋瑞因的两个杂质进行分离和鉴定。醋酸瑞因粗品中发现两种杂质。通过等度反相HPLC得出两种杂质的限度分别为1.14%和1.24%。通过LC-MS确定杂质的相对分子质量。利用反相制备液相色谱法将杂质进行分离。通过MS、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、NOESY等对杂质结构进行鉴定。

3.2 QIT在药物有关物质分析中的应用

传统的QIT由一对环形电极和两个呈双曲面形的端盖电极组成,呈旋转对称的双曲面三维离子阱形状。离子阱的环形电极上加射频电压或再加直流电压,上下两个端盖电极接地。通过逐渐改变射频

电压,使质荷比不同的离子逐次排除并被记录而获得质谱图。

胡敏等^[19]通过电喷雾串联质谱技术快速鉴定头孢硫脒中的降解产物,在所建立条件下,头孢硫脒及其降解产物得到有效分离,两个主要降解产物分别为去乙酰基头孢硫脒和头孢硫脒内酯。利用LC-MS技术可推测头孢菌素降解产物的结构。Dongre等^[20]应用HPLC和LC-MS/MS对磷酸哌嗪的杂质进行研究。Diana等^[21]采用HPLC串联离子阱质谱法对地红霉素的杂质进行鉴定。Li等^[22]应用LC-MS对妥布霉素中的杂质进行鉴定。Gonsalves等^[23]应用LC-MS/MS对阿普唑仑及其降解产物进行鉴定。Zhou等^[24]应用HPLC电喷雾串联质谱法对克林霉素和原料药的有关物质进行分离和鉴定。

3.3 Q-TOF在药物有关物质分析中的应用

Q-TOF是由四极杆和飞行时间质谱组合而成的串联式质谱。它结合了四极杆质谱的高灵敏度和飞行时间质谱的高分辨率,可以看作将三重四极杆质谱仪最后一级四极杆换成飞行时间质量分析器。

Novak等^[25]应用LC-MS合并四极杆飞行时间质谱仪鉴定一种新型整合酶抑制剂雷特格韦生产过程中产生的杂质。刘小玮等^[26]为了对抗病毒药炎琥宁中3个主要有关物质的结构进行鉴定,采用制备HPLC分离杂质,并应用LC-ESI/TOF-MS、LC-ESI/MSⁿ、NMR、UV、IR等对主要有关物质进行结构鉴定,发现其中一个杂质是炎琥宁的水解氧化产物,另外两个杂质是炎琥宁水解掉不同琥珀酸形成的单酯。陈述增等^[27]通过强制降解并用LC-MS法测定,研究了克林霉素磷酸酯的降解物质。

4 结语

LC-MS体现了色谱和质谱优势的互补,将色谱的高分离性能和质谱鉴别力强的特点相结合,组成了较完善的现代分析技术。LC-MS在药物分析方面存在极大优势:(1)LC-MS突破了过去对质量分数低、不易分离,或缺乏紫外吸收的物质难于检测的瓶颈,成为药物鉴定分析的重要研究手段;(2)LC-MS无需复杂的样品前处理过程,选择性好,分析时间短,灵敏度高,极大促进药物和药物代谢机制研究。

质谱技术本身在结构鉴定中存在弱点,LC-MS用于结构鉴定并非万能^[28]。通常对结构完全未知的化合物,仅凭碎片峰很难判断其结构;但却容易判断出一个未知化合物是否为一个特定的结构。

LC-MS技术在药物分析中有关物质和结构鉴

定方面的应用越来越广泛,尤其是这几年关于应用方面的论文大量出现,本文对于其中的一些应用进行了综述。文献中大多采用四极杆质谱检测器,离子源一般是选择ESI源,正离子模式。国内主要以串联QMS为主,尤其是对抗生素有关物质的分析,多采用LC-QMS。国外采用QIT比较多,QIT属于时间串联质谱,避免了离子空间传输的损失,所以它可以实现10级的多级质谱功能,且能够通过多级的全扫描得到更多的碎片信息,这种特点非常适用于药物中有关物质的结构推测。

随着科学技术的日益发展,LC-MS技术将应用到更多领域,发挥更大的作用。可以预见在未来的几年内,随着LC-MS仪器的普及,其应用会有更飞速的发展,必将对我国的药物研究起到很大的推动作用。

参考文献

- [1] 胡紫艳,田稷馨,李小丽. LC-MS联用技术在中药非目标化学成分分析中的研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(1): 180-184.
- [2] 张哲峰. 药物杂质研究中风险控制的几个关键问题[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 327-333.
- [3] ICH. New drug substances [EB/OL]. (2002-02-07) [2007-06-26]. <http://www.ich.org>.
- [4] European Pharmacopoeia [S]. 5.0 Ed, 2004.
- [5] The United States Pharmacopoeia [S]. 27 Ed, 2004.
- [6] 中国药典 [S]. 二部, 2010.
- [7] 于清峰,倪坤仪,王志群. 药物中有关物质的色谱法分析[J]. 药学进展, 2000, 24(5): 270-274.
- [8] 马仁玲,周红华,刘荣,等. 卡德沙星主要相关杂质的分析和鉴定[J]. 药学学报, 2003, 38(12): 950-952.
- [9] 王金戌,王金龙,梁敏,等. 阿比朵尔有关物质的LC-MS/MS研究[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 34(6): 438-442.
- [10] 胡敏,胡昌勤. LC-MS分析乙酰吉他霉素组分及水解产物[J]. 药学学报, 2006, 41(5): 476-480.
- [11] 欧贝丽,曲斌,陈德英,等. 液相色谱-质谱联用技术测定头孢他啶中未知杂质的结构[J]. 海峡药学, 2008, 20(3): 48-50.
- [12] 黄金龙. 加替沙星氯化钠注射液稳定性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(4): 211-212.
- [13] Xia M, Hang T J, Zhang F, et al. The stability of biapenem and structural identification of impurities in aqueous solution[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 937-944.
- [14] 刘延奎,王颖,姚西玲. 富马酸福莫特罗有关物质的LC-MS/MS测定[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(6): 454-456.
- [15] 惠芳,宋敏,杭太俊. 厄贝沙坦氢氯噻嗪片的含量测定和有关物质研究[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(3): 236-242.
- [16] Kumar Y R, Moses Babu J, Sarma M S P, et al. Application of LC-MS/MS for the identification of a polar impurity in mosapride, a gastroprokinetic drug[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32(2): 361-368.
- [17] Raj T J, Bharati C H, Rao K R, et al. Identification and characterization of degradation products of dicloxacillin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4): 1470-1475.
- [18] Ashok C, Golak M, Adwait D, et al. Isolation and structural elucidation of two impurities from a diacerein bulk drug[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2): 525-528.
- [19] 胡敏,胡昌勤. LC-MS法分析头孢硫脒降解产物[J]. 药学学报, 2006, 41(10): 1015-1019.
- [20] Dongre V G, Karmuse P P, Ghugare P D, et al. Characterization and quantitative determination of impurities in piperazine phosphate by HPLC and LC/MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(1): 186-195.
- [21] Diana J, Govaerts C, Hoogmartens J, et al. Characterization of impurities in dirithromycin by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1125(1): 52-66.
- [22] Li B, Van Schepdael A, Hoogmartens J, et al. Characterization of impurities in tobramycin by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(18): 3941-3945.
- [23] Gonsalves A R, Pineiro M, Martins J M, et al. Identification of Alprazolam and its degradation products using LC-MS-MS[J]. *ARKIVOC*, 2010(v): 128-141.
- [24] Zhou H, Zheng Z G, Wu S H, et al. Separation and characterization of clindamycin and related impurities in bulk drug by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(4): 1116-1123.
- [25] Novak T J, Grinberg N, Hartman B, et al. LCMS using a hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer for impurity identification during process chemical development of a novel integrase inhibitor[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1): 78-83.
- [26] 刘小玮,方圆,王琦,等. 炎琥宁中主要有关物质的结构鉴定[J]. 药学学报, 2010, 45(5): 641-646.
- [27] 陈述增,李悦,吴彤. 克林霉素磷酸酯降解产物的LC-MS研究[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(9): 701-704.
- [28] Barbarin N, Tilquin B, de Hoffmann E, et al. Radio-sterilization of cefotaxime: Investigation of potential degradation compounds by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 929(1/2): 51-61.