

# Application News

## No. C97

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### 使用 Trap-Free 二维 HPLC 和 LC/MS/MS 测定药物中的杂质

Analysis of Impurities in Pharmaceutical Ingredients Using Trap-Free Two-Dimensional HPLC and Triple Quadrupole LC/MS/MS [LCMS-8040]

在药物（如原料、最终制剂和仿制药）、食品（如健康食品和营养辅助食品）、精细化工产品（如溶剂、涂料、表面活性剂和其他多种合成品）等广泛领域，需要对产品中所含微量杂质的种类、数量及安全性进行管理和检查，从而提高产品质量。目前，使用 LC/MS/MS 质谱仪对微量杂质进行测定与分析已成为备受瞩目的方法。通常，采用 HPLC-UV 法进行杂质测定，但该方法无法将 HPLC 中使用的不挥发性流动相直接应用到 LC/MS 分析中。因此测定时需要将其替换成挥发性流动相。该操作不仅步骤繁琐，而且会导致洗脱顺序变化和丢失主成分生成的杂质，因此测定时需要谨慎操作。

本文向您介绍使用 Trap-Free 二维 HPLC，对不挥发性流动相中检测到的杂质，在不进行预处理的条件下在线转换为挥发性流动相，并使用三重四极杆液质联用仪 LCMS-8040 进行分析的示例。

#### ■ 使用不挥发性流动相的 HPLC 分析（第一维） HPLC Analysis Using Non-Volatile Mobile Phase (1st Dimension)

本次分析将市售的雷贝拉唑钠作为试验药物，制备 1 mg/mL 的试验溶液，根据日本药典中规定的分析条件（表 1）进行了测定。使用磷酸缓冲液作为流动相，该溶液无法直接注入到 LC/MS。

表 1 分析条件（第一维）  
Analytical Conditions (1st Dimension)

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

使用图 1 所示仪器配置 Trap-Free 二维 HPLC 与 LC/MS/MS 进行了分析。流动相的流路取决于每次操作关联的阀位置，图 1 中的不挥发性流动相的流路用红色表示，挥发性流动相的流路用蓝色表示，馏分杂质的峰捕捉样品环用绿色表示。

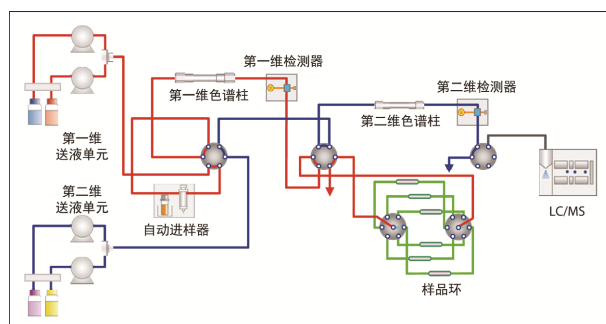


图 1 流路图  
Flow Diagram

使用本系统分析雷贝拉唑钠 1 mg/mL 溶液，图 2 为得到的 UV 色谱图。由图可知，在 5.3 分钟处主成分的雷贝拉唑被洗脱下来，并在其前后可以确认到多个杂质峰。将图中的 4 种杂质馏分捕集到峰捕捉样品环中。

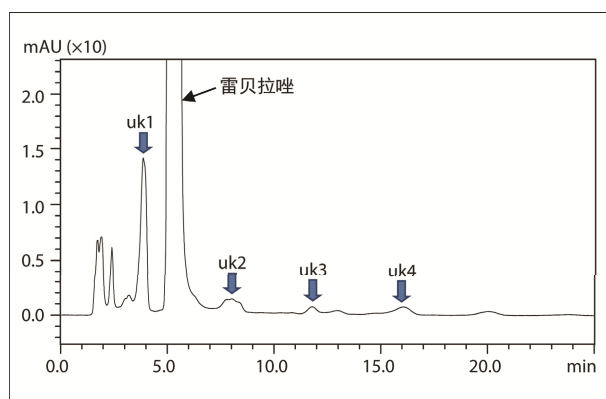


图 2 雷贝拉唑钠的 UV 色谱图（第一维）  
UV Chromatogram of Rabeprazole Sodium (1st Dimension)

■ 使用挥发性流动相的 LC/MS 分析（第二维）  
LC/MS Analysis Using MS Compatible Mobile Phase (2nd Dimension)

收集到样品环的杂质（uk1~uk4）通过阀的切换被二维输液单元输送的挥发性流动相排出，并分别导入到 LC/MS。表 2 为第二维分析条件。

表 2 分析条件（第二维）  
Analytical Conditions (2nd Dimension)

色谱柱	: Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
流动相 A	: 5mmol/L 醋酸铵 - 纯水
流动相 B	: 甲醇
流速	: 0.2 mL/min.
柱温	: 30 °C
进样体积	: 20 μL (样品环体积)
检测器	: UV 290 nm, MS Q3 扫描 (正极和负极模式)

如图 3 所示，使用 LabSolutions LCMS 的数据浏览器功能，对空白测定与样品测定得到的 UV 色谱图进行比较，可以确认第二维色谱柱中目标成分的洗脱位置。根据 Q3 扫描分析结果，分析该峰洗脱时间观测到的离子，可推测目标杂质的分子量。uk-1 中作为空白数据没有的峰，可知正模式的  $m/z$  为 376，负模式的  $m/z$  为 374，从而得知 uk-1 为具有分子量 375 的杂质。以同样方法分析每次循环的 LC/MS 分析数据，表 3 为分析结果。

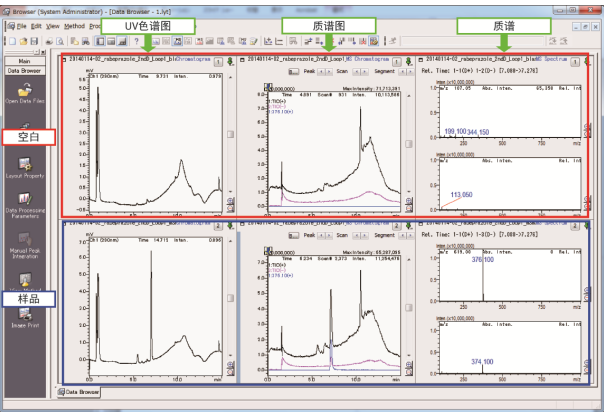


图 3 数据浏览器显示的分析示例 (uk-1)  
Analysis Example Using Data Browser (uk-1)

表 3 各杂质的 LC/MS 测定结果  
Analytical Results of Respective Impurities by LC/MS

compounds	content percentage (%)	m/z		Deduced MW
		positive	negative	
rabeprazole	99.045	360.20	358.15	359
uk-1	0.433	376.15	374.15	375
uk-2	0.081	394.15	392.10	393
uk-3	0.023	344.20		343
uk-4	0.046	270.20		269

利用 LC/MS/MS 进行分析，不仅可获得杂质的分子量信息，还可以使用产物离子扫描对主成分和杂质的碎片图谱进行比较，从而预测杂质的结构。图 4 为主成分与 uk-1 的产物离子扫描结果示例。根据 Q3 扫描的结果，可将 uk-1 的分子量判断为 375，与主成分雷贝拉唑的质量差为 16Da。另外，比较两者的产物离子扫描图，发现有很多相同的碎片。由此可知，uk-1 的结构与主成分非常相似。而且，图 4 红框中的碎片离子分子量相差 16Da。由此可推测在该离子所示位置产生了结构差异。图 4 为 uk-1 的推测结构。

综上所述，通过 Trap-Free 二维 HPLC 和 LC/MS/MS 进行测定，在保持不挥发性流动相的条件下，可以高精度识别杂质峰，并推测其结构。

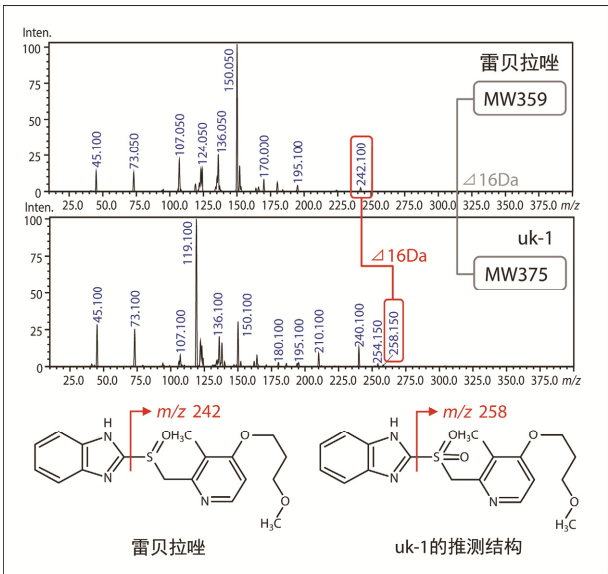


图 4 雷贝拉唑与 uk-1 的 MS/MS 分析结果  
MS/MS Analysis of Rabeprazole and uk-1