# Идентификация примесей в фармацевтической продукции посредством двумерной ЖХ-МС с переносом пиков: пример использования квадрупольно-времяпролетной системы ЖХ-МС Agilent 6540

## Методическая информация

Фармацевтическая промышленность

## Автор

Сиджи Джозеф (Siji Joseph)
Agilent Technologies, Inc.
Бангалор, Индия



## Резюме

В данном документе описан метод двумерной ЖХ-МС с переносом пиков для идентификации близко элюируемой примеси в лекарственном препарате дулоксетине с применением несовместимого с МС обратнофазового метода ЖХ. Анализ выполнен с помощью системы ЖХ Agilent 1260 Infinity в сочетании с квадрупольно-времяпролетной системой ЖХ-МС высокого разрешения Agilent 6540. Для первого и второго пространственного разделения использовались колонки Agilent ZORBAX Eclipse Plus. В первом пространстве была использована методика несовместимой с МС жидкостной хроматографии (ЖХ). С помощью клапана переключения колонок специфическая неизвестная примесь направлялась во вторую колонку ЖХ и отделялась с помощью совместимой с МС подвижной фазы, поступающей из насоса 2. Точные данные МС и МС-МС примеси были получены с помощью квадрупольно-времяпролетного детектора сверхвысокого разрешения Agilent 6540. Обработка данных выполнена с помощью ПО Agilent MassHunter и Agilent Molecular Structure Correlator (MSC), которое позволило быстро идентифицировать неизвестную примесь. Данный метод позволяет эффективно и однозначно определять профиль примесей при минимальном вмешательстве пользователя.


Agilent Technologies

## Введение

Обнаружение и идентификация примесей в активных фармацевтических ингредиентах (АФИ) имеют решающее значение в фармацевтической промышленности. Строгость нормативных требований постоянно растет, поэтому необходимы все более чувствительные и убедительные аналитические методы для определения примесей в АФИ. Согласно требованиям Международной конференции по гармонизации (ICH), идентификации подлежат примеси в лекарственных субстанциях с содержанием 0,1% и выше[1]. Имея точное представление о составе примесей, можно наладить контроль процесса химической реакции и обеспечить высокую степень очистки АФИ. Иногда примеси могут быть структурно похожи на АФИ, и в таких случаях требуются сложные и селективные аналитические методы. Общепринятый аналитический подход к определению профиля примесей часто связан с использованием нескольких аппаратных платформ. Такой анализ может быть долгими и трудоемкими.

Для идентификации примесей в фармацевтической промышленности широко используются такие методы, как ЖХ-МС-МС, для которых характерны высокие чувствительность, избирательность и скорость анализа. Сочетание системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и квадрупольно-времяпролетного детектора (Q-TOF) позволяет точно измерять массу родительских и фрагментных ионов. Обработка данных с использованием таких передовых алгоритмов, как выделение молекулярных признаков (MFE) и создание молекулярной формулы (MFG), применяемых в программном обеспечении Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis и MassHunter Molecular Structural Correlator (MSC), позволяет идентифицировать примеси и уточнять их структуру. Определение восьми примесей в атенололе в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи достаточно подробно описано в публикации Agilent 5991-1375EN[2].

Для ЖХ-МС существуют ограничения в отношении использования нелетучих буферов в качестве подвижных фаз. Если оригинальная методика ЖХ разработана с нелетучими буферами, то специалисту придется потратить время на разработку эквивалентной методики ЖХ с использованием совместимой с МС подвижной фазы. Более того, возможны дополнительные сложности и неопределенности, если в разрабатываемой новой методике ЖХ, совместимой с МС, изменяется порядок элюции примесей. Это ограничение можно исключить с помощью подхода с переносом пиков, использующего условия ЖХ с двумя обратными фазами. В настоящем методическом документе описан подход с использованием методики двумерной ЖХ. Исследуемая примесь передается из первой колонки, в которой она элюирует с несовместимой с МС подвижной фазой, во вторую колонку, находящуюся в совместимом с МС состоянии. Этот подход можно распространить на анализ многих фармацевтических ингредиентов и связанных с ними примесей.

## Экспериментальная часть

### Приборы

Применена система ЖХ-МС, состоящая из квадрупольно-времяпролетного детектора сверхвысокого разрешения Agilent 6540 с источником Jet Stream и бинарной системы ЖХ Agilent 1260 Infinity. Использованы следующие отдельные модули и колонки:

- дегазатор Agilent 1260 Infinity Series (G1379B) для первого и второго пространств;
- два насоса Agilent 1260 Infinity Binary (G1312B) для первого и второго пространств;
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1260 Infinity (G1367D);
- термостатированное отделение для колонок в Agilent 1260 Infinity с двухпозиционным/шестипортовым клапаном переключения колонок (G1316B);
- диодно-матричный детектор Agilent 1290 Infinity (G4212A) с проточной кюветой Max-Light (объем 4,0 мкл, длина пути 60 мм) (G4212 A);
- колонка 1: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 4,6 × 250 мм, 5,0 мкм (кат. номер 959990-902);
- колонка 2: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 4,6 × 75 мм, 3,5 мкм (кат. номер 959933-902).

### Программное обеспечение

ПО Agilent ChemStation (версия B.04.03) использовалось для получения данных ЖХ-УФ и измерения процентной доли площади пиков примесей. ПО MassHunter Workstation (версия B.04.00) использовалось для получения данных ЖХ-МС. Для обработки данных использовалось ПО MassHunter Qualitative Analysis (версия B.04.00). ПО MassHunter MSC (версия B.05.00) использовалось для уточнения структуры примесей.

### Реагенты и материалы

Ацетонитрил, метанол и муравьиная кислота класса ЖХ-МС были приобретены у компании Fluka (Германия). Для подготовки подвижной фазы использовалась вода высокой очистки, полученная на системе Milli Q (модель Millipore Elix 10, США). Калия дигидрогенфосфат был приобретен у компании Fluka (Германия). Стандартные образцы дулоксетина и его примесей были приобретены у компании Varda Biotech (Индия).

### Блок-схема процесса

На рисунке 1 приведена блок-схема оборудования, использованного в эксперименте. Анализ примесей АФИ дулоксетина выполнялся в соответствии с методикой ВЭЖХ, описанной в публикации [3]. Был проведен анализ общего хроматографического профиля элюции с использованием колонки Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 4,6 × 250 мм, 5,0 мкм.

Примесь элюировалась в течение 8,7 минуты по методике ВЭЖХ 1 (см. таблицу 1). Далее путем отдельной инжекции неизвестную примесь передавали в колонку 2 посредством изменения положения клапана в интервале от 8,2 до 9,0 минут (используя двухпозиционный/шестипортовый клапан переключения). Во время этого переноса пиков колонку 2 также соединяли посредством Т-образного соединителя с насосом 2, прокачивающим 95%-ную водную подвижную фазу, совместимую с МС. Совокупный поток через колонку 2 в это время представлял собой сумму потоков из насосов 1 и 2. Поток из насоса 2 имеет высокое процентное содержание водного компонента, который снижает общее содержание органических веществ в подвижной фазе (этим обеспечивалось сохранение примеси в колонке 2). Через девять минут клапан переключения колонок переводили в исходное положение. Элюент из колонки 1 с помощью насоса 1 перенаправлялся в диодно-матричный детектор для УФ-анализа.

По истечении 9 минут поток в колонке 2 полностью зависел от насоса 2. Насос 2 продолжал работать с 95%-ной водной фазой в течение 12 минут. Обнаружено, что этого достаточно для вымывания всех буферов из колонки 2. Все это время поток колонки 2 направлялся на слив через фильтр Rheodyne квадрупольно-времяпролетного испарителя. По истечении 12 минут для градиентной элюции захваченной примеси из колонки 2 использовался насос 2. Элюент направлялся в квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр, а данные собирались в режиме автоматизированной МС-МС.

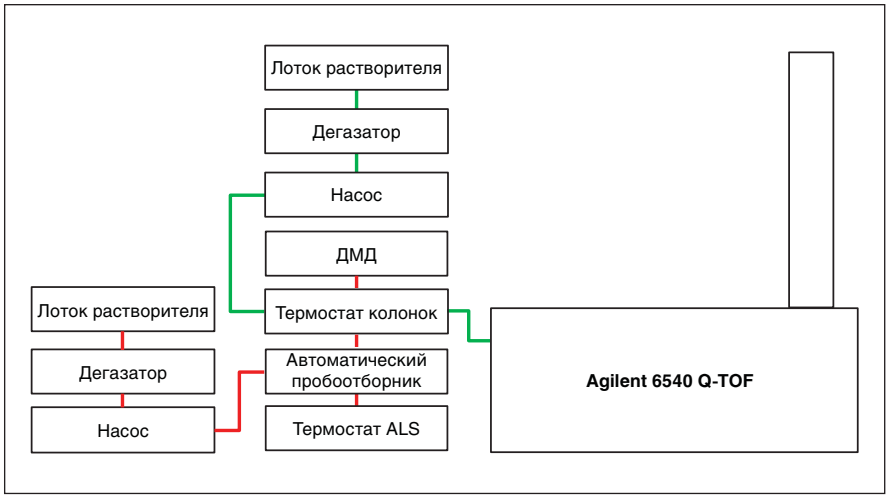



**Рисунок 1**
**Блок-схема прибора, использованного в эксперименте. Отсек для колонок содержит две колонки и соединен с шестипортовым клапаном переключения.**

Положения клапана при переносе пиков схематично представлены на рисунке 2. Весь рабочий процесс схематично представлен на рисунке 3.

## Параметры прибора

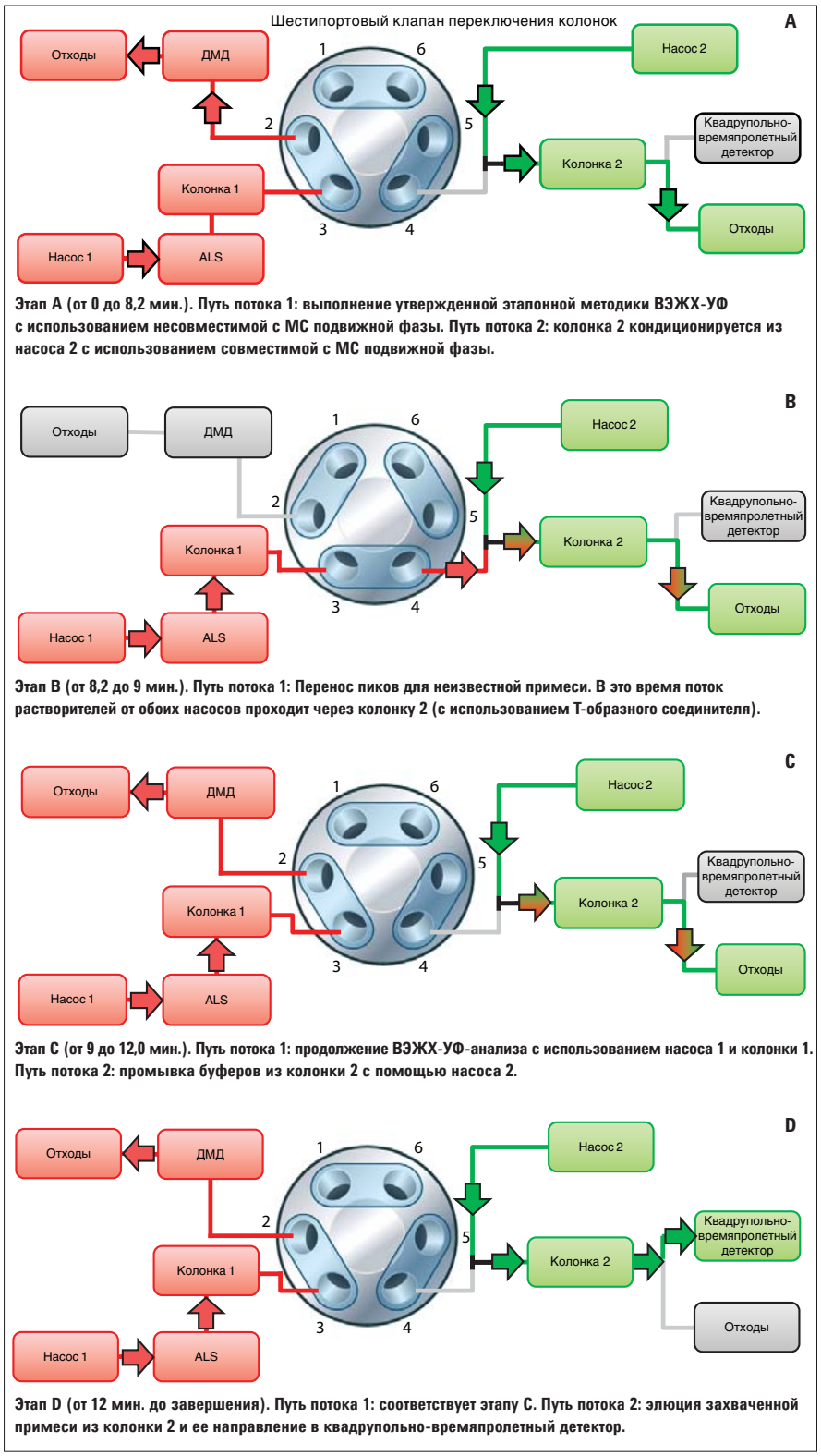



**Рисунок 2**
**Положения клапана до, во время и после процесса переноса пиков. Красным цветом обозначен путь потока (1) с несовместимой с МС подвижной фазой. Зеленым цветом обозначен путь потока (2) с совместимой с МС подвижной фазой.**

**Рисунок 3**
**Блок-схема идентификации примесей с использованием подхода, основанного на переносе пиков.**

Параметры приборов представлены в таблицах 1 и 2.

| Параметр | ВЭЖХ: условия 1 (несовместимые с МС) | ВЭЖХ: условия 2 (совместимые с МС) | | |
|---|---|---|---|---|
| Колонка | Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 4,6 × 250 мм, 5,0 мкм | Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18, 4,6 × 75 мм, 3,5 мкм | | |
| Расход | 1,0 мл/мин | По градиенту | | |
| Подвижная фаза A | Изократическая: фосфатный буфер 20 ммоль: ацетонитрил: метанол; 55:37:8 | 0,1% водный раствор муравьиной кислоты | | |
| Подвижная фаза B | Не применимо | 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле | | |
| Детектор | Диодно-матричный, 229 нм | Квадрупольно-времяпролетный | | |
| Объем инжекции | 5 мкл | Не применимо | | |
| Промывка иглы | Активируется на 8 секунд с использованием метанола | Не применимо | | |
| Режим насоса | Насос: 1, изократический, в течение 30 минут | Насос: 2, градиентный | | |
| | | Время | %B | Поток |
| | | 0 | 5 | 0,5 |
| | | 9 | 5 | 0,5 |
| | | 10 | 5 | 0,7 |
| | | 17 | 60 | 0,7 |
| | | 17,1 | 5 | 0,5 |
| | | 25 | 5 | 0,5 |

**Таблица 1**
**Параметры системы ЖХ Agilent 1200 Series.**

| Условия квадрупольно-времяпролетной МС и автоматической МС-МС | |
|---|---|
| Прибор МС | Квадрупольно-времяпролетный детектор Agilent 6540 |
| Источник ионов | Электроспрей AJS |
| Режим сбора данных | 2 ГГц, расширенный динамический диапазон |
| Полярность ионов | Режим положительной полярности |
| Температура сушильного газа | 325 °C |
| Сушильный газ | 10 л/мин |
| Распылитель | 3,10 бар |
| Температура защитного газа | 375 °C |
| Расход защитного газа | 12 л/мин |
| U-колп. | 4 000 В |
| Напряжение насадки | 500 В |
| Фрагментор | 90 В |
| Сбор данных | МС с последующей автоматизированной МС-МС |

**Таблица 2**
**Параметры квадрупольно-времяпролетной системы Agilent 6540.**

## Результаты и обсуждение

На рисунке 4 показан профиль элюции АФИ дулоксетина с анализом ЖХ-УФ. Процентная доля площади пика неизвестной примеси (время удерживания: 8,7 минуты) составила приблизительно 0,1%. На рисунке 5 приведена полная ионная хроматограмма (TIC), полученная на квадрупольно-времяпролетном детекторе во время анализа с переносом пиков.

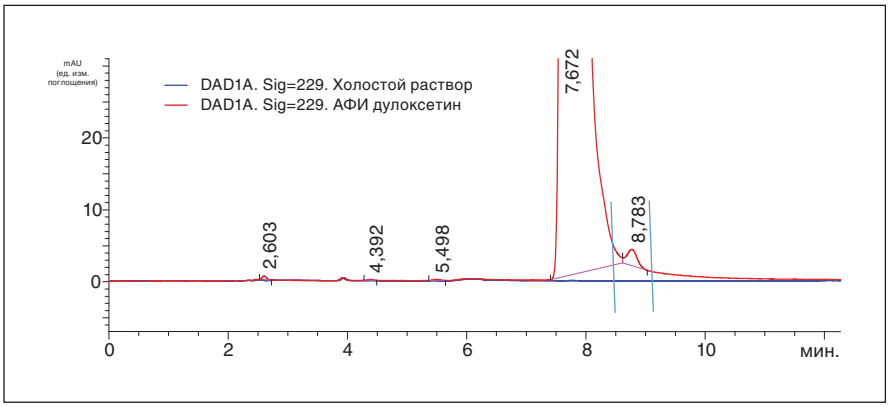



**Рисунок 4**
**Профиль элюции АФИ дулоксетина с использованием ЖХ-УФ анализа. (Обозначена область базовой линии, где производился перенос пиков.)**

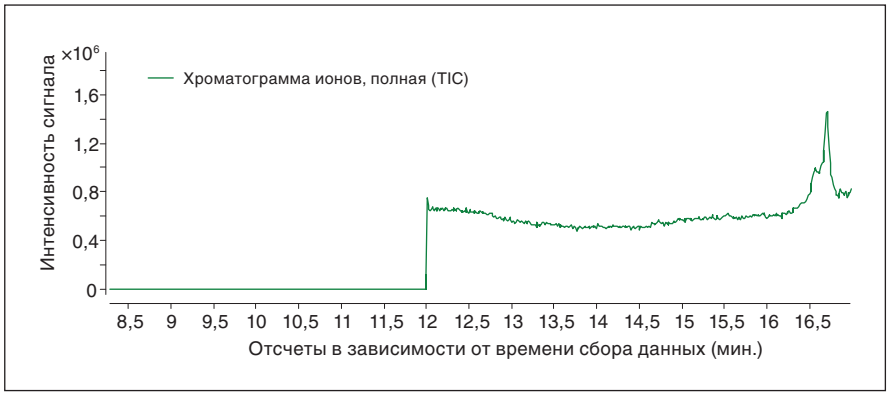



**Рисунок 5**
**Полная ионная хроматограмма (TIC), полученная по результатам анализа с применением квадрупольно-времяпролетного детектора.**

Анализ данных выполнен с помощью алгоритмов MFE и MFG, применяемых в ПО MassHunter Qualitative Analysis. С помощью алгоритма MFE получена точная масс-спектральная информация высокого разрешения для всех компонентов пробы. На основании полученных данных алгоритм MFE выделил две субстанции со значениями отношения массы к заряду *m/z* 298,1257 и 312,1416 (рисунок 6). Субстанция со значением *m/z* 298,1257 соответствует АФИ дулоксетину, а вторая субстанция соответствует неизвестной примеси. С помощью алгоритма MFG получен список соответствующих молекулярных формул кандидатов для каждой субстанции. Каждая формула имеет рейтинг в соответствии с относительной вероятностью (рисунок 7).

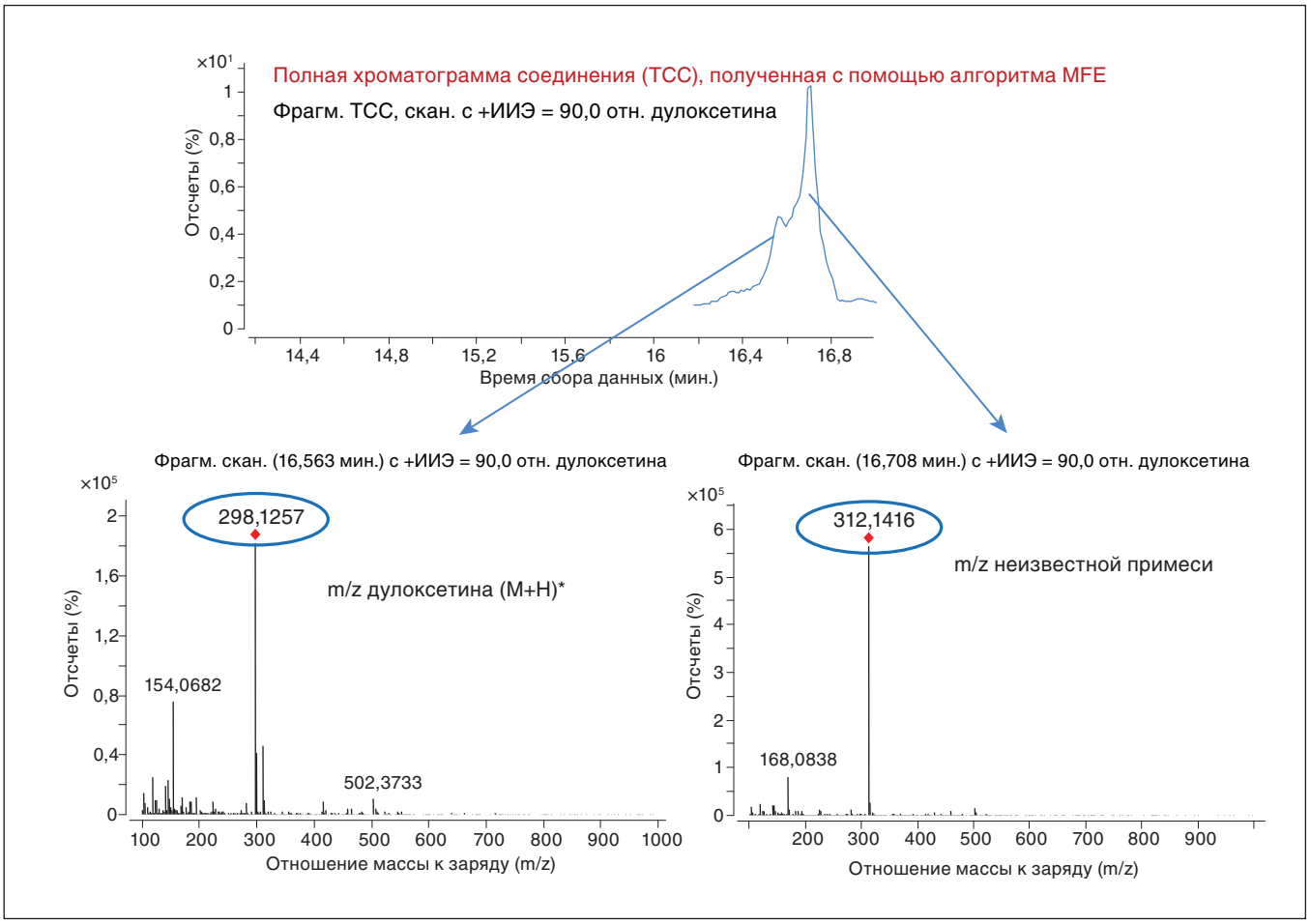



**Рисунок 6**
**Спектры масс АФИ (298,1257) и примеси (312,1416).**

MFE

| Показать/скрыть | Соед. | Обозначение | Формула | Показатель | Масса | Средняя масса | Масса (MFG) | Разница (MFG, ppm) | Разница (MFG, мДа) | Основной пик | Рейтинг |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ДЕЙСТВ. | 1 | Соед. 1: 16,555 | | | 297,1184 | 297,2948 | | | | 298,1257 | 16,557 |
| ДЕЙСТВ. | 2 | Соед. 2: 16,701 | | | 311,1343 | 311,3752 | | | | 312,1416 | 16,701 |

MFG

| Показать/скрыть | Соед. | Обозначение | Формула | Показатель | Масса | Средняя масса | Масса (MFG) | Разница (MFG, ppm) | Разница (MFG, мДа) | Основной пик | Рейтинг |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ДЕЙСТВ. | 1 | Соед.1: C18 H19 NOS | C18 H19 NOS | 98,18 | 297,1184 | 297,3848 | 297,1187 | 1,07 | 0,32 | 298,1257 | 16,557 |
| ДЕЙСТВ. | 2 | Соед. 2: C19 H21 NOS | C19 H21 NOS | 98,54 | 311,1343 | 311,3995 | 311,1344 | 0,29 | 0,09 | 312,1416 | 16,701 |

| Лучший | Формула | Показатель | Масса | Масса (MFG) | Показатель (MFG) | Разн. (абс., ppm) | Разн. (мДа) | Идентификатор источника | Разн. (ppm) | Рейтинг |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ДЕЙСТВ. | C19 H21 N O S | 98,54 | 311,1343 | 311,1344 | 98,54 | 0,29 | 0,09 | MFG | 0,29 | 16,701 |

| Виды | Формула иона | m/z | Высота | Показатель (MFG) | Показатель (MFG, MC) | Показатель (MFG, масса) | Показатель (MFG, ур. сод.) | Показатель (MFG, изократ., разд.) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (M+H)+ | C19 H22 NOS | 312,1417 | 562137,9 | 98,54 | 98,54 | 99,94 | 95,18 | 99,79 |

| Высота (расчетная) | Высота, сумм. % (расчетная) | Высота, % (расчетная) | m/z (расчетн.) | Разн. (мДа) | Высота | Высота, % | Высота, сумм. % | m/z | Разн. (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 545200.1 | 76,8 | 100 | 312,1417 | 0,1 | 562137,9 | 100 | 79,2 | 312,1416 | 0,29 |
| 119921.6 | 16,9 | 22 | 313,1448 | 0,1 | 115726,6 | 20,6 | 16,3 | 313,1447 | 0,3 |
| 38075.8 | 5,4 | 7 | 314,1412 | -0,5 | 27089,3 | 4,8 | 3,8 | 314,1417 | -1,62 |
| 6252.5 | 0,9 | 1,1 | 315,1424 | 0,6 | 4925,6 | 0,9 | 0,7 | 315,1419 | 1,82 |
| 693.8 | 0,1 | 0,1 | 316,1441 | 0,9 | 264,4 | 0 | 0 | 316,1432 | 2,85 |

**Рисунок 7**
**Результаты выполнения алгоритмов MFE/MFG для дулоксетина и примеси.**

Точные данные о массе родительских и фрагментных ионов АФИ и неизвестной примеси, полученные посредством алгоритмов MFE/MFG, были загружены в ПО MSC. Далее был выполнен поиск по базе данных ChemSpider с целью получения всех возможных молекулярных структур. Подробные сведения об использовании ПО MSC и разных способах идентификации примесей приведены в публикации Agilent 5991-1375EN[2]. Для обеих субстанций получены структуры-кандидаты с рассчитанными показателями корреляции. Подтверждено, что одна из субстанций представляет собой АФИ дулоксетин. На рисунке 8 показан снимок экрана с результатами анализа неизвестной примеси в ПО MSC. Общий показатель MFG для выбранного родительского иона, рейтинг структуры, предложенный ПО MSC, и показатель корреляции примеси обведены красным. Структура с наиболее высоким показателем корреляции (93,26%) соответствует метилированному производному АФИ дулоксетина.

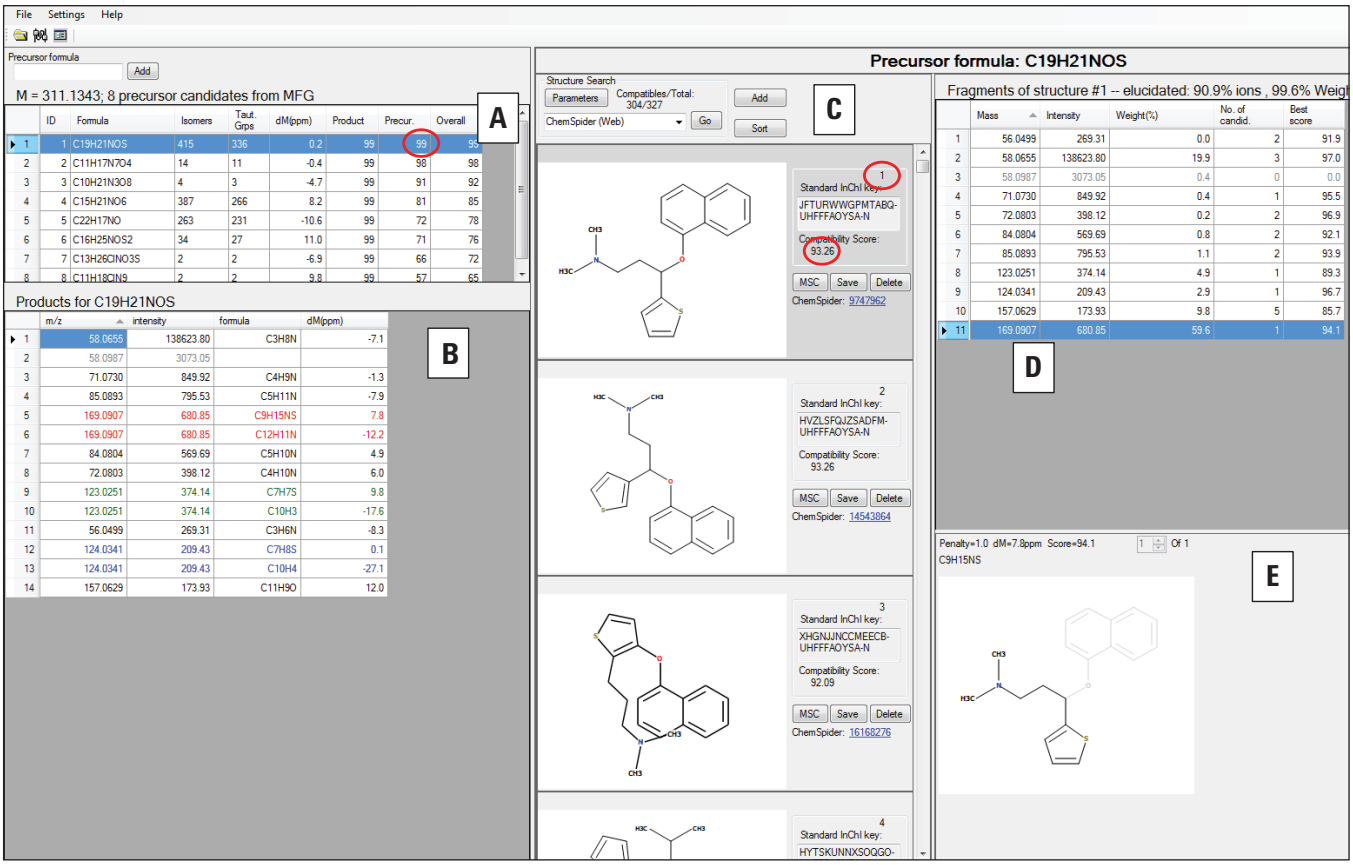



**Рисунок 8**

**Снимок экрана ПО MSC с результатами идентификации неизвестной примеси.**

**A. Список возможных молекулярных формул для родительского иона примеси.**

**B. Результаты алгоритма MFG для дочерних ионов примеси.**

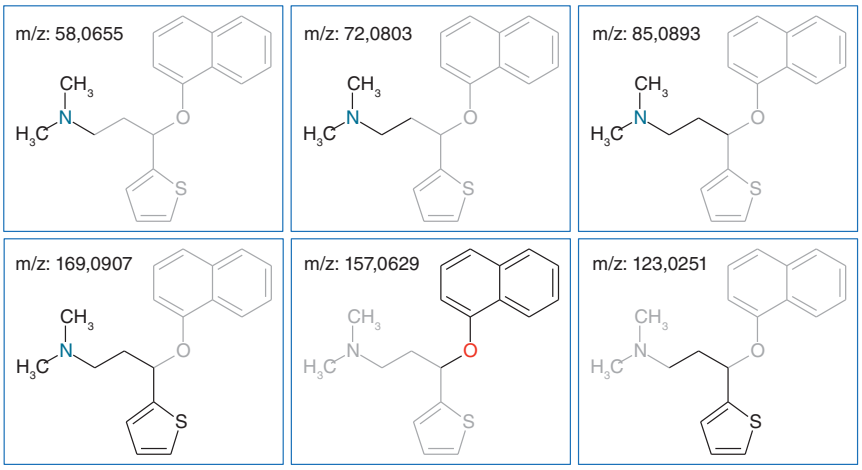
**C. Структуры-кандидаты для неизвестной примеси.**

**D. Фрагментные ионы для структуры-кандидата, выбранной на панели C.**

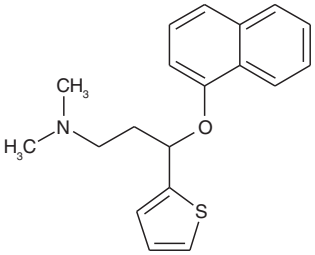
**E. Присвоение подструктур для фрагментного иона, выбранного на панели D.**

На рисунке 9 приведены сводные данные уточнения структуры неизвестной примеси с помощью ПО MSC. Эта примесь была в дальнейшем подтверждена посредством введения стандарта примеси.

| Основные фрагменты | Масса | dM (ppm) | Лучший показатель |
|---|---|---|---|
| 1 | 58,0655 | –7,1 | 97,0 |
| 2 | 72,0803 | 6,0 | 96,9 |
| 3 | 85,0893 | –7,9 | 93,9 |
| 4 | 123,0251 | 9,8 | 96,7 |
| 5 | 157,0629 | 12,0 | 85,7 |
| 6 | 169,0907 | 7,8 | 94,1 |




Окончательная структура примеси



| Молекулярная формула | $C_{19}H_{21}NOS$ |
|---|---|
| Расчетная масса | 311,1344 |
| Измеренная масса | 311,1343 |
| dM (ppm) | 0,3 |

**Рисунок 9**
**Уточненная структура примеси дулоксетина (m/z: 311,1344). Подтверждается широкая применимость ПО MSC для назначения структур каждому фрагментному иону.**

На рисунке 10 показана увеличенная процентная доля площади пика пробы АФИ, полученная введением стандарта.

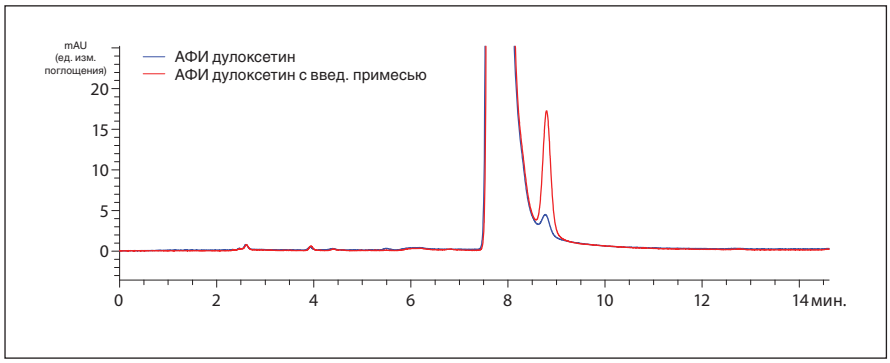



**Рисунок 10**
**Увеличение процентной доли площади пика примеси, обнаруживаемое диодно-матричным детектором при введении метилированного производного дулоксетина в АФИ.**

## Заключение

Настоящий документ иллюстрирует рабочий процесс селективной идентификации примеси. Использована методика двумерной ЖХ-МС с переносом пиков для идентификации примеси в АФИ дулоксетине. Эта методика исключает необходимость разработки совместимой с МС методики ЖХ для выполнения несовместимой с МС фармакопейной методики точного массового анализа исследуемой примеси. Методика обеспечивает специфическое выделение близко элюируемой неизвестной примеси с низким уровнем содержания в АФИ для МС анализа. Квадрупольно-времяпролетный детектор Agilent 6540 и передовые программные инструменты (MSC, MFE и MFG) позволяют быстро и надежно идентифицировать неизвестные соединения.

## Литература


1. Международная конференция по гармонизации технических требований при регистрации фармацевтических средств для человека (ICH). Руководящий комитет ICH, 30 марта **1995 г.**

2. Pharmaceutical Impurity Identification and Profiling Using Agilent Q-TOF LC/MS Combined with Advanced MassHunter Data Processing Software (Идентификация и определение профилей фармацевтических примесей с использованием системы ЖХ-МС Agilent с квадрупольно-времяпролетным детектором и программным обеспечением для обработки данных MassHunter). Публикация Agilent 5991-1375EN, 21 ноября **2012 г.**

3. Viriyala, R. K. et al. Validated reverse phase method for duloxetine (Вирияла, Р. К. и соавт. Валидизированный противофазный метод для дулоксетина). International Journal of Comprehensive Pharmacy (IJCP), **2010**, Т. 1, № 3.


**www.agilent.com/chem**


© Agilent Technologies, Inc., 2013.


Напечатано в США 1 марта 2013 г.
5991-1873RU


Agilent Technologies