

The Application of High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Heterocyclic Compounds

You Li

Pharmaron (Beijing) Co. Ltd, Beijing
Email: liyou511@hotmail.com

Received: May 9th, 2013; revised: May 30th, 2013; accepted: Jun. 7th, 2013

Copyright © 2013 You Li. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology is widely applied in many areas. Chemical production of many organic compounds can be analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry can provide structural information of the substance. LC-MS is used in many new types of compounds analysis. This paper first introduces the basic principles and the development of LC-MS; then heterocyclic organic qualitative research of the API for the detection of chemical production and the problems encountered are introduced, and mainly discusses retention time control and trailing factors improvement. Specific studies and the results are as follows: 1) Improve chromatographic retention of polar compounds; 2) Peak tailing factor improvement; 3) Study of the chromatographic separation methods.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; Chromatographic Separation; Tailing Factor

高效液相色谱 - 质谱联用技术在杂环化合物分析中的应用

李 柚

康龙化成(北京)新药技术有限公司, 北京
Email: liyou511@hotmail.com

收稿日期: 2013年5月9日; 修回日期: 2013年5月30日; 录用日期: 2013年6月7日

摘 要: 高效液相色谱 - 质谱联用(LC-MS)技术的应用领域极为广阔, 化工生产中许多有机物可以用液相色谱法来进行分析, 而质谱能够提供物质的结构信息, 应用于许多新类型化合物的分析。本文首先介绍了 LC-MS 联用的基本原理以及发展情况; 之后针对原料药化工生产中的检测和遇到的问题介绍了杂环类有机物的定性研究, 主要针对保留时间的控制和拖尾因子的改善方法作出讨论。具体研究内容及成果如下: 1) 提高大极性化合物的色谱保留性; 2) 色谱峰拖尾因子的改善; 3) 色谱分离方法的研究。

关键词: 高效液相色谱 - 质谱联用; 色谱分离; 拖尾因子

1. 引言

液质联用(HPLC-MS)又叫液相色谱 - 质谱联用技术, 它以液相色谱作为分离系统, 质谱为检测系统。

样品在质谱部分和流动相分离, 被离子化后, 经质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开, 经检测器得到质谱图。液质联用体现了色谱和质谱优势的互补, 将色谱对复杂样品的高分离能力, 与质谱具有高选择

性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来,在药物分析、食品分析和环境分析等许多领域得到了广泛的应用。LC 和 MS 的联用,使得液相色谱可以获得比紫外检测更多的信息。HPLC 可以直接分离不挥发性化合物、极性化合物和大分子化合物(包括蛋白质、多肽、多糖和多聚物等);MS 灵敏度高,样品用量少,分析速度快,可得到更多的化合物的结构信息。目前先进的质谱仪,还同时具备了分析分子结构的能力,即通过应用母离子扫描、子离子扫描、中性丢失等先进技术,对待测样品的结构进行分析判定^[1,2]。

近年来,液相色谱 - 质谱联用在技术及应用方面取得了很大进展,在环境、医药研究的各领域应用越来越广泛,且随着现代化高新技术的不断发展及液相色谱质谱联用技术自身的优点,液相色谱质谱联用技术不断发展且发挥越来越重要的作用。

在原料药研发和生产中产品及中间体的液质联用定性分析是关键环节,需要准确分析目标化合物的纯度,用以监控反应和产品结构初步确认。随着液质技术日新月异的发展,化工分析已不局限于单纯依靠紫外保留时间判断产物和纯度,而是将多波长紫外检测器与高分辨的质谱检测器结合使用,使得到的分析结果更准确可信。对于较常见的杂环类化合物的液质分析,难点主要在于随着化合物结构的改变,分析方法需要作出灵活的调整。在分析过程中,对于结构新颖的化合物,首先尝试经典的分析方法测试,之后根据得到的紫外峰型和质谱信号判断分析方法是否合适,调整分析方法中的一项或多项参数,在不断探索中得到最适合该类化合物的分析方法。

本文就工作中使用高效液相色谱 - 质谱分析仪器对部分原料药研发和化工生产中的测试方法开发做出讨论,测试目标化合物主要为氮杂环类有机物,分析的样品来自化学原料药研发实验室以及原料药生产车间。

2. 液质联用技术基本术语

死时间(dead time): 不保留组分的保留时间,即流动相(溶剂)通过色谱柱的时间。在反相 HPLC 中可用苯磺酸钠来测定死时间^[3]。

保留时间(retention time): 从进样开始到某个组分

在柱后出现浓度极大值的时间。

分离度(resolution): 相邻两峰的保留时间之差与平均峰宽的比值。也叫分辨率,表示相邻两峰的分离程度。

拖尾因子(tailing factor): 用以衡量色谱峰的对称性。也称为不对称因子(asymmetry factor)。

3. 仪器与试剂

1) 岛津高效液相色谱 - 质谱联用仪(LCMS-2020 EV)

2) 色谱柱: Sunfire C18 3.5 μm 2.1 \times 50 mm;
Waters Atlantis T3 C18 3 μm 4.6 \times 100 mm;
Waters Sunfire 3.5 μm 3.0 \times 150 mm;
Waters X-bridge C18 3.5 μm 3.0 \times 50 mm。

3) USP 纯化水

4) 乙腈(ACN): 色谱级, HPLC grade

甲醇(MeOH): 色谱级, HPLC grade

甲酸(FA): 色谱级, HPLC grade

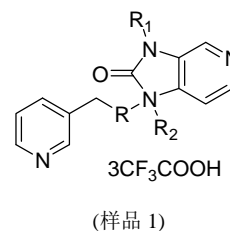
5) 洗针液: 甲醇和水 1:1 混匀

4. 实验部分

杂环化合物是分子中含有杂环结构的有机化合物。构成环的原子除碳原子外,还至少含有一个杂原子。杂原子包括氧、硫、氮等。从理论上讲,可以把杂环化合物看成是苯的衍生物,即苯环中的一个或几个 CH 被杂原子取代而生成的化合物。杂环化合物可以与苯环并联成稠环杂环化合物。此类化合物在原料药的研发和生产中有广泛应用。

杂环化合物的 LC-MS 分析检测主要使用反相液相色谱 - 质谱联用,反相色谱是液相色谱中应用最广泛的一种模式,通过物质疏水性的不同而实现分离,属于一种液 - 液分配色谱^[4,5]。此类化合物分析的主要问题和解决方法分述如下:

4.1. 大极性化合物的分析(样品 1)



4.1.1. 方法一

色谱柱: Sunfire C18 3.5 μ m 2.1 \times 50 mm (死时间约为 0.5 min)

流动相 B: 乙腈/0.1%FA

流动相 A: 水/0.1%FA

流速: 0.9 ml/min 柱温: 45 $^{\circ}$ C

梯度洗脱表:

时间(分钟)	%流动相 A	%流动相 B
0.0	95	5
2.0	0	100
3.1	0	100
3.2	90	10

分析结果:

保留时间: 0.161 min

拖尾因子: 1.334

采用方法一分析时, 样品出峰时间在死时间内, 即化合物没有很好的保留, 并且色谱峰拖尾因子较大(图 1)。

观察样品的结构发现, 样品的极性比较大, 并且是三氟乙酸盐的形式, 于是更换液相色谱柱、流动相和梯度洗脱的条件(方法二), 得到图 2。

4.1.2. 方法二

色谱柱: Waters Atlantis T3 C18 3 μ m 4.6 \times 100 mm (死时间约为 1.6 min)

流动相 B: MeOH

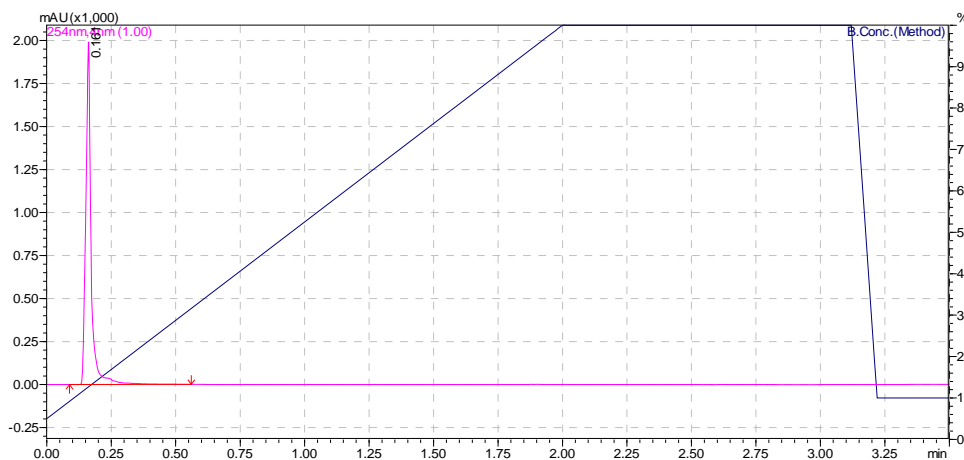


Figure 1. Sample 1 under the condition of the method 1 at a wavelength of 254 nm UV spectra
图 1. 样品 1 在方法一条件下于 254 nm 波长的紫外谱图

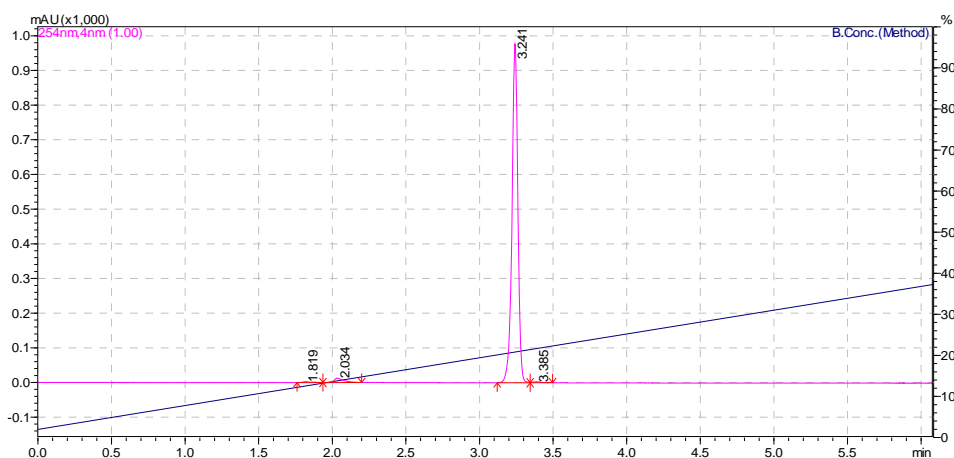


Figure 2. Sample 1 under the condition of the method 2 at a wavelength of 254 nm
图 2. 样品 1 在方法二条件下于 254 nm 波长的紫外谱图

流动相 A: Water/0.1%FA

流速: 0.9 ml/min 柱温: 45°C

梯度洗脱表:

时间(分钟)	%流动相 A	%流动相 B
0.0	98	2
10.0	40	60
15.0	40	60

分析结果:

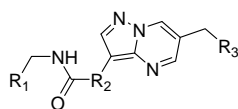
保留时间: 3.241 min

拖尾因子: 0.926

方法二改换了分析色谱柱和流动相 B 后, 样品的紫外出峰位置在保留时间内, 并且峰形对称, 拖尾因子明显减小, 能够较真实的反映样品的纯度。Waters Atlantis T3 色谱柱采用优化的孔径、C18 烷基键的键合密度以及端基封尾技术, 因此成为保留和分析极性化合物的重要选择。

流动相 B 由方法一中的乙腈/0.1%FA 更换为甲醇是由于: 虽然通常乙腈作为流动相有较好的峰型, 但甲醇的洗脱能力较弱, 在样品保留性不好的情况下能够起到提高保留效果的作用。色谱柱型号改变后, 洗脱梯度做出相应调整对于保留时间和峰型的优化也有重要影响。

4.2. 含有与样品极性相似的杂质的分离(样品 2)



(样品 2)

4.2.1. 方法三

色谱柱: Sunfire C18 3.5um 2.1 × 50 mm

流动相 B: Acetonitrile/0.1%FA

流动相 A: Water/0.1%FA

流速: 0.9 ml/min 柱温: 45°C

梯度洗脱表:

时间(分钟)	%流动相 A	%流动相 B
0.0	95	5
2.0	0	100
3.1	0	100
3.2	90	10

质谱检测条件: ESI 离子源, DL250°C, 检测电压 1.5 kV

分析结果:

分离度: 无

拖尾因子: 1.380

质谱信号: 样品[M + 1] = 456.05

杂质[M + 1] = 454.05

从质谱图可以看出, 样品中包含着分子量少 2 的且与样品极性相似的杂质没有分离, 因此造成紫外峰形对称性差(图 3), 尝试更换长度为 150 mm 的色谱柱并调整洗脱梯度以提高分离度(方法四), 得到图 4。

4.2.2. 方法四

色谱柱: Waters Sunfire 3.5 um 3.0 × 150 mm

流动相 B: Acetonitrile/0.1%FA

流动相 A: Water/0.1%FA

流速: 0.5 ml/min 柱温: 45°C

梯度洗脱表:

时间(分钟)	%流动相 A	%流动相 B
0.0	50	50
12.0	30	70
15.0	30	70

质谱检测条件: ESI 离子源, DL250°C, 检测电压 1.5 kV

分析结果:

分离度: 1.450

拖尾因子: 1.12

质谱信号: 样品[M + 1] = 456.25

杂质[M + 1] = 454.25

HPLC 纯度: 91.2%(面积百分比)

增加色谱柱长度相当于增加了理论塔板数, 达到提高分离度的效果。方法四通过改换为长色谱柱和洗脱梯度以及流动相洗脱流速, 使极性非常相似的杂质与样品的紫外峰完全分开, 分离度和拖尾因子得到较大改善, 谱图能够真实反映样品的纯度, 尤其在车间生产监控中非常重要。因此在分析的过程中需要了解样品和色谱柱的性质, 改变色谱柱长度和相应调整洗脱梯度对于分离度的改善有良好效果。

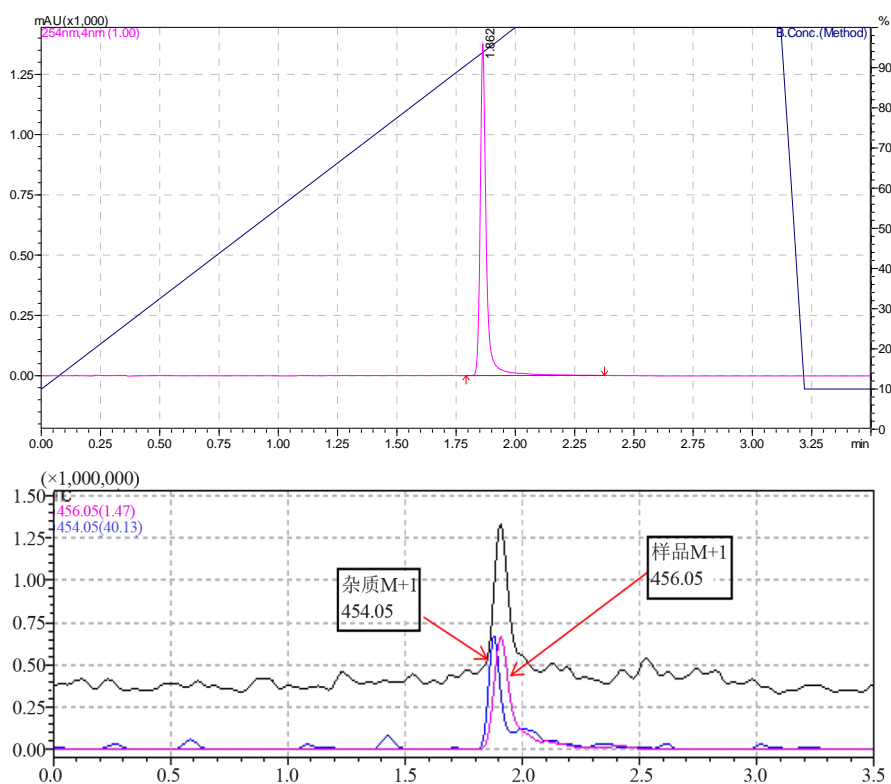


Figure 3. Sample 2 under the condition of the method 3 at a wavelength of 254 nm UV
图 3. 样品 2 在方法三条件下于 254 nm 波长的紫外谱图和质谱图

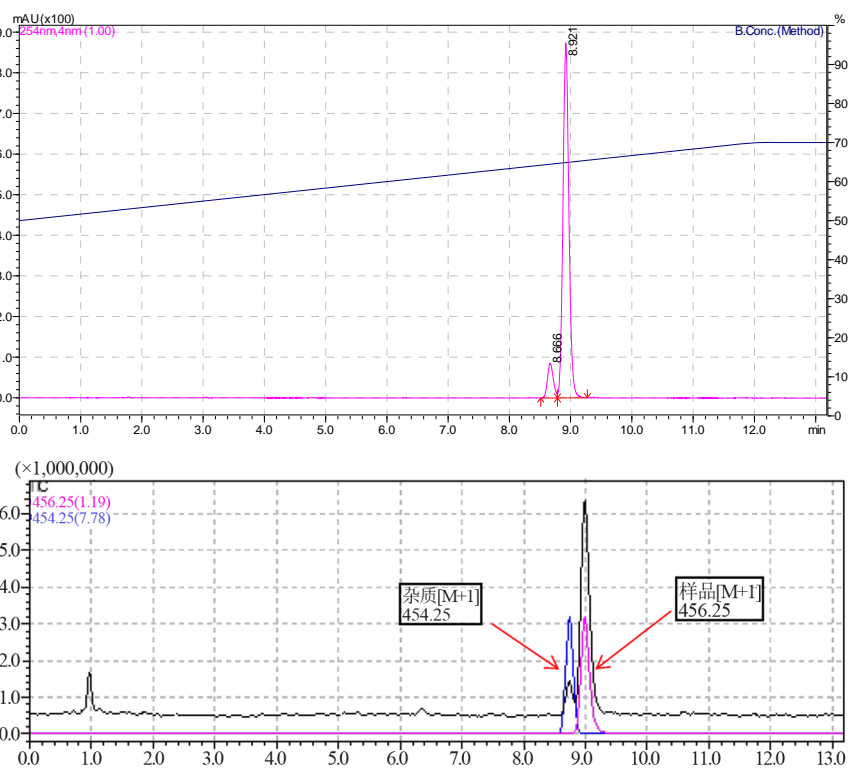


Figure 4. Sample 2 under the condition of the method 4 at a wavelength of 254 nm UV
图 4. 样品 2 在方法四条件下于 254 nm 波长的紫外谱图和质谱图

5. 结果与讨论

本文主要针对高效液相色谱 - 质谱联用检测原料药在研发和生产中的有机化合物过程中遇到的几种问题展开讨论, 在分析过程中需要针对不同化合物的物理化学性质进行分析方法的改变和优化。

对于杂环类化合物, 方法开发的重点在于保留时间的保证和杂质的分离, 通常采用选取合适的色谱柱和洗脱梯度的方法实现。

参考文献 (References)

[1] W. M. A. Niessen, A. P. Tinke. Liquid chromatography-mass

- spectrometry general principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*, 1991, 703(1-2): 37-57.
- [2] W. M. A. Niessen. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1999, 856(1-2): 179-197.
- [3] 傅若农. 色谱分析概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [4] J. G. Dorsey, W. T. Cooper. Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(17): 857A-967A.
- [5] A. M. Krstulovic, P. R. Brown. Reversed-phase liquid chromatography. New York: Wiley, 1982.
<http://www.cajcd.edu.cn/pub/wml.html>