

# Пролить свет на темные области

Подразделение, занимающееся разработкой методов анализа, в отделах СМС (Химия, производство и контроль) фармацевтических компаний принимает непосредственное участие в процессе создания фармацевтических препаратов, который связан с физической природой лекарственного вещества и лекарственного препарата, например, с тем, как препарат изготавливается, а также с контролем технологического процесса в целях получения надежного и воспроизводимого продукта. Системы ВЭЖХ в данных областях применяются для характерных испытаний активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в целях обеспечения качества продукта, а также нужного уровня примесей.

Традиционно в рамках методов испытания на основе ВЭЖХ в целях оценки качества/контроля качества применялись нелетучие подвижные фазы, содержащие фосфатно-буферные растворы. При проведении ЖХ/МС анализа, необходимо переходить с подвижной фазы, содержащей нелетучие добавки, к полностью летучей подвижной фазе, пригодной для технологий ионизации при атмосферном давлении.

Такие изменения в условиях проведения анализа могут вызывать преобразования порядка элюирования анализируемых веществ, а также появление возможных примесей, затрудняющих анализ из-за непосредственной близости к хроматографическим пикам основных компонентов.

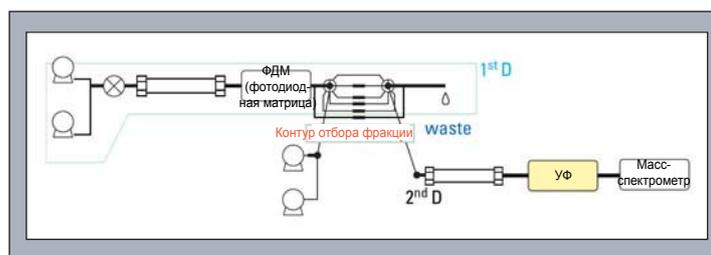


Рисунок 1: Общая блок-схема системы 2-D ЖХМС без ловушек для идентификации примесей

Изменение в условиях метода требует пристального внимания к деталям и приложения больших усилий со стороны пользователя. Кроме того, последние изменения в области регулирования содержания примесей наряду с глобализацией системы поставок привели к возрастанию потребности в идентификации примесей. Несомненно, это вызывает определенные затруднения в связи с необходимостью изменения условий ВЭЖХ таким образом, чтобы они соответствовали существующим, прошедшим валидацию методам испытаний, и чтобы удовлетворяли потребности производственного сектора в отношении идентификации примесей. На этом фоне нетерпеливое ожидание появления

новой аналитической системы не вызывает удивления.

Чтобы решить проблему ЖХ/МС анализа, позволяющего применять существующие условия с нелетучей подвижной фазой, компания «Шимадзу» разработала установку нового типа, принцип действия которой не основан на методе колонок с ловушкой.

Преимущество, полученное в результате упрощения пути движения, заключается в возможности сокращения времени и усилий, затрачиваемых на оптимизацию условий. Такой полный анализ системы привел к созданию системы ЖХ/МС Co-Sense с измененным путем движения. Обессоливание проводится при помощи отводного клапана,

установленного непосредственно перед впускным отверстием масс-спектрометра. Добавление УФ датчика ко второму измерению значительно облегчает детекцию примесей. В ходе реального процесса обработки проб удается получить и данные о примесях, и соответствующие нулевые данные. Пики примесей идентифицируются путем сравнения соответствующих хроматограмм. Выделение и фракционирование пиков осуществляется при помощи множественных клапанов, организованных в специфических комбинациях. Макропрограмма существенно упрощает процесс создания программы выделения пиков. Макропрограмма автоматически указывает наилучшую последовательность расположения клапанов, от пользователя требуется только установка времени удерживания разделения первого измерения. Чтобы еще больше упростить операцию, предлагается отдельная макропрограмма, которая автоматизирует процесс построения графика партий для получения данных о множестве примесей и нулевых данных. Затем отдельно отобранные примеси анализируются в LCMS-IT-TOF. Генерирование спектров фрагментов может быть реализовано очень быстро и эффективно, их дальнейшее применение вместе с точными массами позволяет определить элементный состав примесей. В дополнительных программных пакетах, таких как MS fragmenter от компании «ЭйСиДи Лабс», может применяться

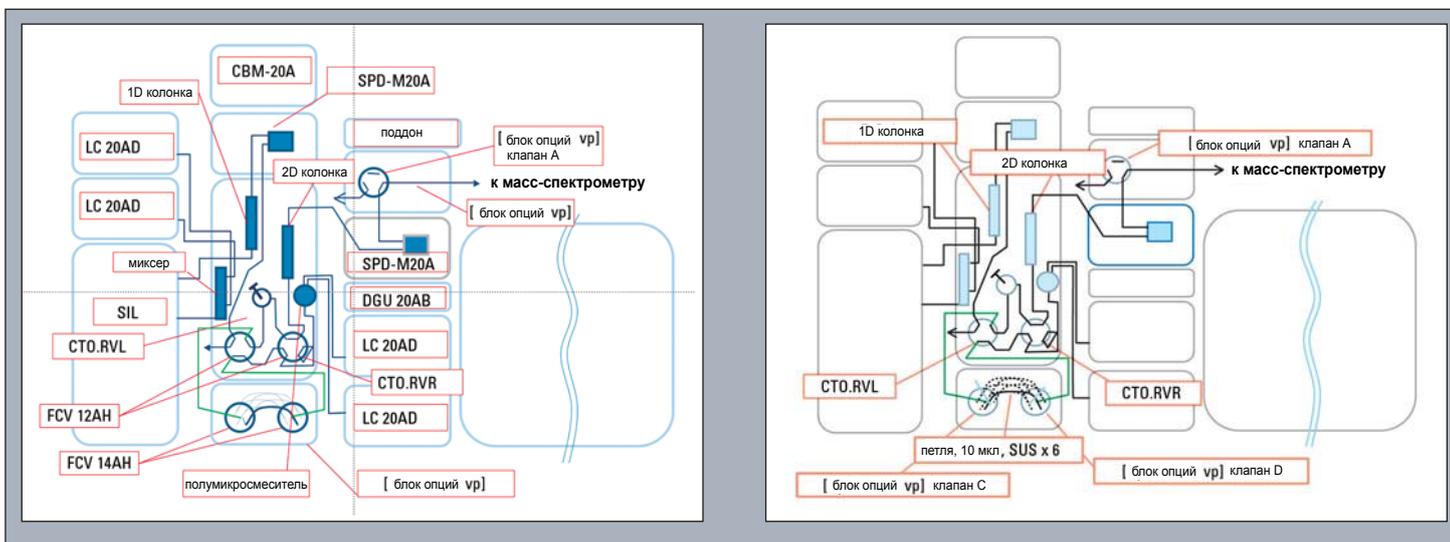


Рисунок 2: Используемые модули ВЭЖХ и блок-схема системы

## 2-D ЖХ и ЖХМС-ИЛ-ВМС – повышенная эффективность идентификации примесей

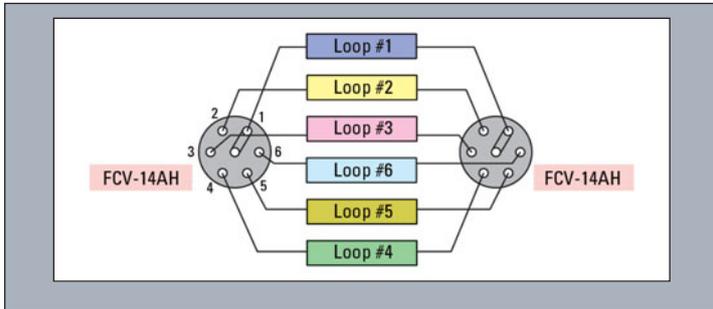


Рисунок 3: Контуры фракционирования, доступны для объемов 5 мкл, 10 мкл, 20 мкл и 50 мкл

информация о распределении точных масс фрагментов, и может проводиться поиск гомологий между примесью и основным соединением.

### Пример анализа

В рамках конкретного примера использовалась проба, содержащая сульфадиметоксин в качестве основного вещества (Рисунок 4) и четыре сульфамидных лекарственных препарата со схожей структурой, которые служили в качестве примесей (Рисунок 5). Каждая из примесей смешивалась с основным соединением в процентном соотношении 0,1% относительного основного соединения, которое составляло концентрацию 500 мкг/л.

На основании времени элюирования примеси были отобраны и фракционированы в контурах (Рисунок 6). Ниже приведены структуры соответствующих веществ, а результаты измерений показаны на рисунке 7.

Результаты подтвердили наличие всех «примесей».

### Условия анализа при LC первого измерения

**Колонка:** Shim-pack VP-ODS, 150 мм (длина) x 4,6 мм (внутренний диаметр), 5 мкм  
**Подвижная фаза:** 0,01 моль/л фосфатный буфер, раствор (рН 2,6), метаноловая смесь (7:3)  
**Скорость потока подвижной фазы:** 1 мл/мин  
**Температура колонки:** 40 °С  
**Объем вводимой пробы:** 10 мкл  
**Длина волны детекции ФДМ:** 200 - 350 нм (270 нм контролируемая)

### Условия анализа при LC второго измерения

**Колонка:** Shim-pack XR-ODS 75 мм (длина) x 2,0 мм (внутренний диаметр), 2,2 мкм  
**Подвижная фаза А:** Shim-pack XR-ODS 75 мм (длина) x 2,0 мм (внутренний диаметр), 2,2 мкм  
**Подвижная фаза В:** метанол  
**Соотношение компонентов**

**подвижной фазы:** 10 % В (0 мин)  
 -50 % В (10 мин) -10 % В (10,01 – 20 мин)  
**Скорость потока подвижной фазы:** 0,3 мл/мин  
**Температура колонки:** 40 °С  
**Объем вводимой пробы:** 0,3 мл/мин  
**Длина волны УФ детекции:** 270 нм

### Условия проведения масс-спектрометрии

**Режим ионизации:** ESI+  
**Скорость потока газа-распылителя:** 1,5 л/мин  
**Давление газа для просушки:** 0,15 МПа  
**Подаваемое напряжение:** 4,5 кВ  
**Температура кривой растворения:** 200 °С  
**Температура нагревательного блока:** 200 °С  
**Диапазон сканирования:** m/z 100 – 1000

### Применение браузера данных

Браузер данных, предусмотренный в программе LCMSsolution, обеспечивает дополнительные функциональные возможности, повышающие эффективность решения задач, связанных с анализом примесей. Шаблон компоновки для отображения данных может быть адаптирован в соответствии с индивидуальными требованиями и сохранен предварительно. Как показано на рисунке 8, сохраненная компоновка была спроектирована таким образом, чтобы обеспечить отображение УФ хроматограммы и MS спектров, относящихся к примесям (2-D LC), в верхнем



Рисунок 4: Структура сульфадиметоксина

ярусе, и вывод УФ хроматограммы и MS спектра для нулевых данных, соответствующих пику примеси (2-D LC), в нижнем ярусе. В данном случае, данные для неизвестного вещества-1 (сульфамеразин) и нулевые данные представлены посредством функции «перетаскивания» на основе программы анализа данных для отображения в браузере данных.

Различия между значениями времени удерживания, полученными на УФ датчике и масс-спектрометре, были синхронизированы при помощи функции коррекции времени удерживания, предусмотренной в браузере. Значения времени удерживания хранятся в файле описания метода, и поскольку данная функция усреднения времени удерживания может быть установлена заранее, обеспечивая тем самым ее автоматическое исполнение, то необходимость в ее ручном запуске каждый раз, когда отображается новый комплект данных, отсутствует.

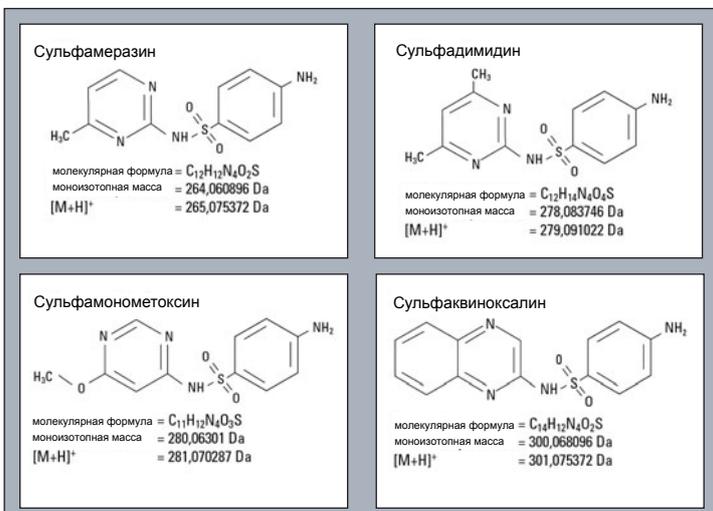


Рисунок 5: Соединения, структура которых близка к структуре сульфадиметоксина, выступающие в роли примесей в данном примере

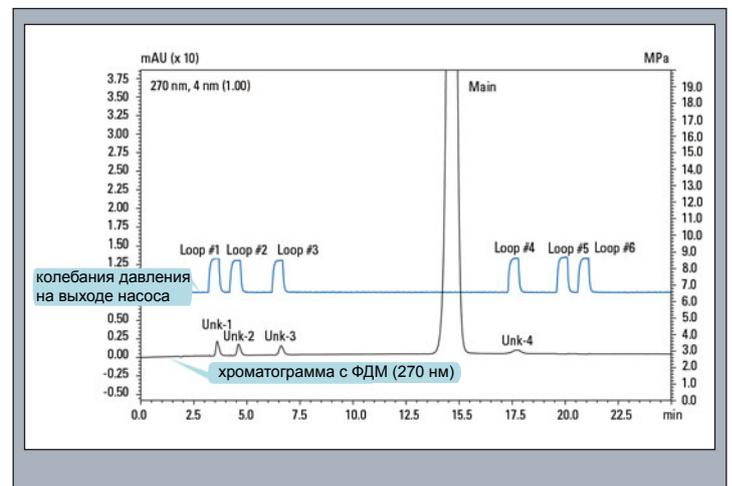


Рисунок 6: Хроматограмма первого измерения с ФДМ: Синяя кривая отображает давление в системе, а черная кривая – сигнал с УФ датчика 270 нм. Два сигнала находятся в идеальном соотноении друг с другом, что указывает на надежность фракционирования элюируемых пиков в контуре.

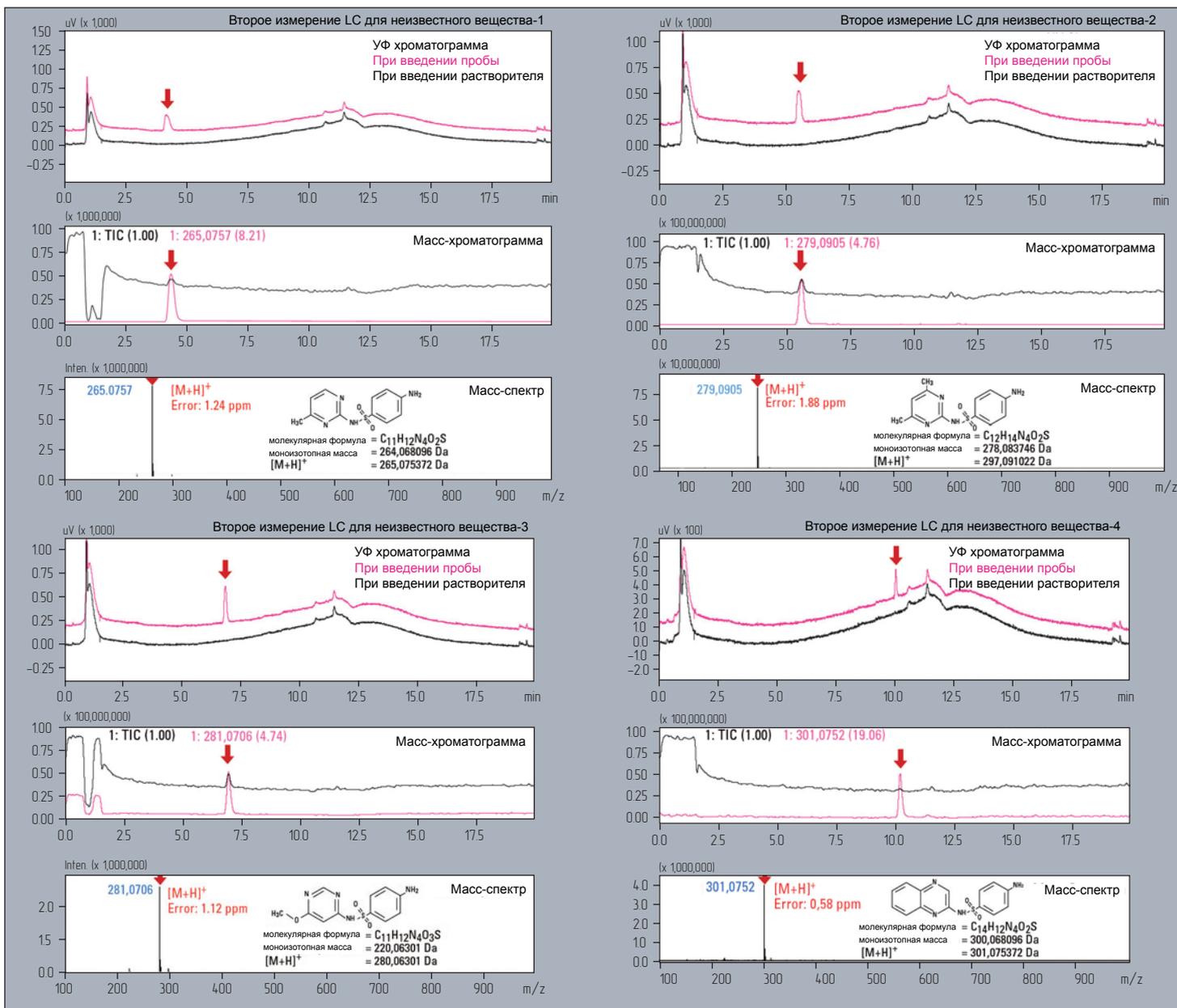


Рисунок 7: УФ хроматограммы, МС хроматограммы и МС спектры четырех фракционируемых примесей

Кроме того, реализация данной функции позволяет проводить автоматическую детекцию пика примеси на УФ хроматограмме детектора и соответственно отображать МС спектр. И поскольку обработка всех файлов с данными осуществляется автоматически, идентификация примеси на хроматограмме с УФ детектора позволяет не только синхронно отображать спектр соответствующей примеси, но также синхронно представлять масс-спектр нулевых данных.

В действительности для выполнения данной операции достаточно перетащить кнопкой мыши из начала пика примеси на

УФ хроматограмме в конец пика. При отпускании кнопки будет показан усредненный спектр соответствующей примеси и спектр нулевых данных.

При применении представленной здесь двумерной системы LC особое значение имеет воспроизводимость времени удерживания в первом измерении, поскольку фракционирование пика примеси проводится в конкретные регулируемые временные интервалы. Иными словами, данный метод нельзя применять, если значения времени удерживания не постоянны.

И, тем не менее, есть основания предполагать, что воспроизво-

димость времени удерживания уже была определена, поскольку данная характеристика является фундаментальной для разработки специфического метода тестирования.

Если метод разделения для первого измерения уже установлен, то измерения можно проводить и без повторной оценки представленного здесь метода, что исключает необходимость ЖХ/МС измерений в сложных условиях летучести, которые были бы необходимы в ином случае. Возможность подтверждать наличие примесей путем сравнения с нулевыми данными должна значительно

способствовать повышению эффективности идентификации примесей СМС.

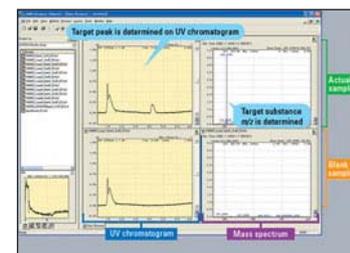


Рисунок 8: Неизвестное вещество-1 и нулевые данные, отображаемые в браузере данных