

Zastosowanie spektrometrii mas w analizie farmaceutycznej zanieczyszczeń organicznych

Elżbieta U. Stolarczyk¹, Andrzej Kutner²

¹ Instytut Farmaceutyczny, Zakład Analityki Badawczej

² Instytut Farmaceutyczny, Zastępca Dyrektora ds. Badawczych

Adres do korespondencji: Elżbieta Stolarczyk, Instytut Farmaceutyczny, Zakład Analityki Badawczej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, tel. 022 456 39 19; faks. 022 456 38 38, e.stolarczyk@ifarm.waw.pl

Application of mass spectrometry in pharmaceutical analysis of organic impurities

Pharmaceutical manufactures are responsible for the quality of their products. The quality assessment criteria concern identification, assay and impurity determination.

Impurity profile determination is often limited to the analysis of known or potential compounds (impurities which can be theoretically predicted). On the other hand, the analysis of unknown impurities is much more complicated and requires instrumental methods providing structural information. Therefore it is important to use new techniques solutions allowing to perform not only the detection, resolution and quantitative determination of studied compounds, but also structural elucidation and identification. Nowadays it has become possible due to the use of hyphenated techniques. Among those the most common in the analysis of organic impurities are chromatographic methods coupled with mass spectrometry (GC-MS, LC-MS). They allow direct analysis of even trace amount of compound in mixtures without the necessity of isolation, preparative purification or fractional enrichment. Additionally, as a result of chromatographic analysis important structural information can be obtained despite the similarities in structure between the impurity and the main compound.

The article presents theory and application of mass spectrometry in structural elucidation and identification of organic impurity. The usefulness of HPLC coupled with mass spectrometry was described.

Keywords: mass spectrometry, impurity, identification, structural elucidation, hyphenated techniques.

Wstęp

Do badania zanieczyszczeń środków farmaceutycznych stosuje się wiele technik analitycznych [1]. Obok najprostszych analiz klasycznych, również chromatografię cienkowarstwową (TLC) oraz nowoczesne techniki analityczne [2]. Najczęściej stosuje się techniki separacyjne, takie jak: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię gazową (GC), a także elektroforeza kapilarna (CE) [3–5]. Wśród technik bezpośrednich szczególnie istotne są metody spektroskopowe. Zastosowanie znalazły takie metody jak: spektrofotometria w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego (UV-Vis), spektrofotometria w podczerwieni (IR), fluorymetria, spektrometria mas (MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i inne [6].

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpiła bardzo istotna zmiana w sposobie badania zanieczyszczeń w środkach farmaceutycznych oraz w charakteryzowaniu ich jakości [7, 8]. Przede wszystkim nastąpiło znaczące podwyższenie wymagań dotyczących czystości środków farmaceutycznych, co powoduje konieczność stosowania bardziej czułych, selektywnych i specyficznych technik analitycznych służących do monitorowania zanieczyszczeń. Taką czułą i specyficzną metodą można uzyskać stosując detektor spektrometrii mas, który w połączeniu z rozdziałem chromatograficznym nabiera coraz większego znaczenia w badaniu zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych i produktów leczniczych.

Techniki spektrometrii mas (MS)

Spektrometria mas od dłuższego czasu używana jest w analizie próbek biologicznych i w badaniach farmakokinetycznych, jednakże dopiero ostatnio zauważono obiecujące cechy tego detektora w laboratoriach kontroli jakości, jako narzędzia do identyfikacji i monitorowania zanieczyszczeń [9–13].

W spektrometrze mas substancja ulega reakcjom chemicznym. W przypadku każdej reakcji chemicznej jej wynik jest zależny od wielu czynników, takich jak stężenie, matryca, temperatura itp. [14]. Czynniki te decydują o stopniu komplikacji tej metody i tworzeniu nowych rozwiązań konstrukcyjnych w celu uzyskania jak najlepszych wyników oznaczeń. Nowe metody wytwarzania, rozdzielania i detekcji jonów, zbierania i przetwarzania danych stanowią o szybkim postępie w dziedzinie spektrometrii mas oraz prowadzą do rozwoju nowych instrumentów [15].

Metody jonizacji

Pierwszym etapem analizy w spektrometrze mas jest wytworzenie jonów analitu w źródle, a poprzez określenie stosunku masy do ładunku (m/z) jonów następuje ich detekcja. W analizie MS nieznanymi związków ważną rolę odgrywa odpowiednie dobranie metod jonizacji, ponieważ od sposobu jonizacji zależy skuteczność jonizacji badanego związku, tzn. ile zanieczyszczeń zostanie wykrytych i na jakim poziomie stężeń. Wyróżnić można jonizację „miękką”, podczas której tworzy się jon molekularny, a fragmentacja występuje w niewielkim stopniu lub w ogóle nie występuje. Następnym rodzajem jonizacji jest jonizacja „twarda”, podczas której cząsteczka rozpada się na fragmenty i powstaje mieszanina jonów cząsteczkowych i fragmentów cząsteczek. W technice MS istotne jest więc dobranie odpowiedniego rodzaju jonizacji, np. jeżeli zanieczyszczenie jest niestabilne należy zastosować miękką metodę jonizacji, żeby możliwe było zarejestrowanie m/z jonu pochodzącego od związku, a nie tylko jego fragmentów.

Najbardziej powszechne metody jonizacji w połączeniu MS z HPLC to jonizacja poprzez elektrorozpraszanie (ESI), jonizacja chemiczna (APCI) i fotojonizacja (APPI). Wspomniane źródła jonów mogą pracować pod ciśnieniem atmosferycznym, co zmniejsza problemy związane z usunięciem rozpuszczalnika i przeprowadzeniem analitu do fazy gazowej. Ponadto charakteryzują się wysoką czułością, łatwością w użyciu, szerokim zakresem zastosowań oraz możliwością pracy przy wysokich przepływach fazy ruchomej, nawet do 3 ml/min [16]. ESI i APCI (stosowane do badania związków o małej masie cząsteczkowej) są względem siebie komplementarnymi metodami jonizacji, ponieważ ESI pozwala na oznaczanie analitów o średniej lub dużej polarności o masach do 10^5 g/mol, a APCI na oznaczanie analitów o małej lub

średniej polarności o masach rzędu 10^2 – 10^3 g/mol [17]. Chociaż ESI/MS jest jedną z najszersze stosowanych technik spektrometrii mas, ciągle prowadzone są dyskusje dotyczące mechanizmu tworzenia jonów w fazie gazowej [18]. Proces tworzenia jonów w fazie gazowej jest bowiem uzależniony od natury chemicznej analitu. Powoduje to, że nie ma dobrze zdefiniowanych reguł fragmentacji dla jonów pseudomolekularnych, jakie powstają w ESI czy APCI, co ma miejsce w przypadku techniki GC-MS z jonizacją strumieniem elektronów (EI). Wiele czynników wpływa na kształt widma masowego, dlatego też brak jest ogólnodostępnych, komercyjnych bibliotek widm, które mogłyby ułatwić identyfikację nieznanymi zanieczyszczeń.

W technice GC, jako metody jonizacji stosuje się jonizację strumieniem elektronów (EI) i jonizację chemiczną (CI). Podczas jonizacji strumieniem elektronów (70 eV) następuje zazwyczaj intensywna fragmentacja. Jest to więc twarda metoda jonizacji. EI i CI są względem siebie komplementarnymi metodami jonizacji, a o ich uniwersalności świadczy wysoka czułość, łatwość w użyciu i szeroki zakres zastosowań. W przypadku EI dodatkową zaletą jest powtarzalność procesu jonizacji, więc widma są prawie zawsze takie same, co umożliwia korzystanie z komercyjnie dostępnych bibliotek widm masowych, a tym samym umożliwia automatyzację procesu identyfikacji nieznanymi zanieczyszczeń.

Uniwersalną metodą jonizacji próbek jest jonizacja za pomocą plazmy indukcyjnie sprzężonej (ICP). Metoda ta różni się istotnie od metod poprzednio opisanych, ponieważ nie pozwala ona na dokładne określenie struktury cząstek, ale pozwala na dokładne określenie jej składu pierwiastkowego. Aparaturę ICP/MS można łączyć prawie z każdą techniką rozdzielania. Charakteryzuje się ona wysoką czułością, dla niektórych pierwiastków nawet na poziomie fg.

Analizatory

Kolejnym elementem spektrometru mas jest analizator, w którym, dzięki oddziaływaniu zarówno pola elektrycznego, jak i magnetycznego na poruszające się jony, można rozdzielić jony na podstawie ich stosunku m/z i następnie zarejestrować za pomocą detektora. Ilość informacji jakie można uzyskać o strukturze związku zależy właśnie od rodzaju analizatora mas i detektora.

Analizatory można podzielić na kwadrupolowe (Q – ang. *quadrupole*), pułapki jonowe (IT – ang. *ion trap*), analizatory czasu przelotu (TOF – ang. *time-of-flight*) i sektorowe. Dodatkowo w jednym spektrometrze

Spektrometria mas od dłuższego czasu używana jest w analizie próbek biologicznych i w badaniach farmakokinetycznych, jednakże dopiero ostatnio zauważono obiecujące cechy tego detektora w laboratoriach kontroli jakości, jako narzędzia do identyfikacji i monitorowania zanieczyszczeń.

Spektrometria mas jest metodą identyfikacji czystych substancji, natomiast widma masowe mieszanin zwykle są zbyt skomplikowane, aby mogły być przydatne.

znajdować się może więcej niż jeden analizator mas. Najpopularniejsze to: spektrometry typu potrójny kwadrupol (QqQ), w którym dwa kwadrupolowe analizatory są rozdzielone kwadrupolową komorą zderzeń (lub jej odpowiednikiem), TOF/TOF lub hybrydowe: pułapka jonowa i analizator czasu przelotu (IT-TOF), kwadrupol i analizator czasu przelotu rozdzielony kwadrupolową komorą zderzeń (QqTOF), kwadrupol i kwadrupol, który może dodatkowo pracować jako liniowa pułapka jonowa, rozdzielone kwadrupolową komorą zderzeń (QTRAP).

Połączone układy analizatorów, w których wybrany w analizatorze mas jon (M_1) ulega powtórnej analizie mas (M_2) to tandemowa spektrometria mas (MS/MS, Tandem MS, MS^n). Polega ona na odseparowaniu interesującego jonu, przeprowadzeniu kontro-

lowanego rozpadu na fragmenty oraz analizie jonów powstałych w wyniku fragmentacji. Przy pomocy tandemowych spektrometrów mas, możliwe jest badanie reakcji fragmentacji wybranych jonów i na tej podstawie wyciąganie wniosków na temat struktury badanych związków oraz określenie par jonów do oznaczeń ilościowych nawet w bardzo skomplikowanych mieszaninach.

Oczekiwane informacje można uzyskać stosując różne tryby skanowania. I tak spektrometr mas z potrójnym kwadrupolem (QqQ) ma unikalne tryby skanowania: obserwowania reakcji fragmentacji, w których powstaje obojętna cząsteczka (NL – ang. *neutral loss scan*) i obserwowania jonów macierzystych, z których powstaje wybrany fragment (PI – ang. *precursor ion scan*), oraz bardzo czuły i selektywny tryb do analizy ilościowej – obserwowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM – ang. *multiple reaction monitoring*), natomiast wykazuje słabą czułość przy skanowaniu [16]. Dlatego spektrometr ten nie jest dedykowany do identyfikowania nieznanymi zanieczyszczeń, kiedy istnieje konieczność identyfikacji za pomocą widma fragmentacyjnego. Natomiast jest bardzo dobry do badań ilościowych, do badań przesiewowych dzięki trybowi MRM. Spektrometr mas z analizatorem typu pułapka jonowa (QTRAP, IT) jest bardzo czuły w trybach skanowania (MS, MS^n), a więc jest bardzo dobry do identyfikowania nieznanymi substancji w szczególności za pomocą widma fragmentacyjnego. Spektrometr mas z analizatorem czasu przelotu (TOF) charakteryzuje się dobrą rozdzielczością i dokładnym pomiarem masy. Zważywszy na to, że masa pierwiastków występujących w przyrodzie jest znana, kombinacja wszystkich występujących w danym związku izotopów daje charakterystyczną i bardzo indywidualną masę cząsteczkową, stanowiącą pewnego rodzaju niepowtarzalny „odcisk palca”. Uzyskane informacje o dokładnej masie można

w prosty sposób przełożyć na wzory sumaryczne badanych związków. Odmianą spektrometru z analizatorem czasu przelotu jest spektrometr hybrydowy QqTOF, który stanowi połączenie potrójnego kwadrupola ze spektrometrem typu TOF, a dokładniej trzeci kwadrupol został w tym przypadku zastąpiony analizatorem czasu przelotu. Spektrometry typu QqTOF są szczególnie przydatne przy identyfikacji zanieczyszczeń, ponieważ oprócz widma fragmentacyjnego dostarczają jeszcze informacji o dokładnej masie związku, więc mogą dodatkowo potwierdzić wzór sumaryczny badanych substancji.

Spektrometria mas połączona z chromatografią ciekłą

Spektrometria mas jest metodą identyfikacji czystych substancji, natomiast widma masowe mieszanin zwykle są zbyt skomplikowane, aby mogły być przydatne. Przykładowo, jonizacja ESI umożliwia identyfikację 3–5 substancji w mieszaninie [19]. Dlatego też połączenie spektrometrii mas z chromatografią ciekłą dostarcza bardzo skutecznego narzędzia do analiz jakościowych i ilościowych złożonych mieszanin. W tym celu korzysta się najpierw ze zdolności rozdzielczej chromatografii do skutecznej separacji składników, a następnie zdolność spektrometrii mas do otrzymania danych dotyczących struktury badanych związków i ich zawartości w próbce. Metodę LC-MS stosuje się do badania polarnych, jonowych, termicznie nietrwałych i nielotnych związków.

W połączeniu z chromatografią ciekłą stosowane są następujące rodzaje spektrometrów mas:

- pojedynczy kwadrupol Q, który dostarcza przede wszystkim informacji o masie związku, a w mniejszym stopniu o stężeniu związku;
- potrójny kwadrupol QqQ, który dostarcza przede wszystkim informacji o masie i stężeniu związku, a w mniejszym stopniu o budowie cząsteczki;
- pułapka jonowa IT, która dostarcza przede wszystkim informacji o masie związku i budowie cząsteczki, a w mniejszym stopniu o stężeniu związku;
- analizator czasu przelotu TOF, który dostarcza przede wszystkim informacji o dokładnej masie związku – wzorze sumarycznym, a w mniejszym stopniu o stężeniu związku;
- urządzenie hybrydowe QqTOF, które dostarcza przede wszystkim informacji o dokładnej masie związku – wzorze sumarycznym i budowie cząsteczki, a w mniejszym stopniu o stężeniu związku;
- urządzenie hybrydowe QTRAP, które pozwala na określenie masy, stężenia związku i budowy cząsteczki.

Połączenie chromatografii ciekłej ze spektrometrią mas ma wiele istotnych zalet w porównaniu

do HPLC z detekcją UV-Vis. Przykładowo, detektor UV-Vis wymaga obecności chromoforów w strukturze, często długiego czasu analizy ze względu na konieczność rozdzielenia analizowanych związków do linii bazowej. Podstawowe ograniczenia stosowania LC-MS związane są z jonizacją [17]. Dla pewnych związków wytworzenie jonu pseudomolekularnego może być niemożliwe z powodu ich budowy chemicznej (braku grup mogących ulec jonizacji). Natomiast główne zalety wynikające z połączenia chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas to: wysoka selektywność (specyficzność masy cząsteczkowej), szybkość analiz, wysoka czułość (rozumiana jako dolna granica oznaczalności ilościowej, około 10 razy wyższa niż w LC-UV/Vis), powtarzalność, wysoka rozdzielczość metody, identyfikacja (masa), określenie struktury (fragmentacja), możliwość analizy ilościowej, uniwersalność zastosowania, możliwość automatyzacji [19, 20].

Specyficzność techniki LC-MS może być poprawiona przez optymalizację procedur selekcji jonów lub zastosowanie kolizyjnie indukowanej fragmentacji (CID) w układzie tandemowym. Chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykazuje wysoką selektywność (specyficzność masy cząsteczkowej i struktury), wysoką czułość (100–1000 razy wyższą niż LC-UV/Vis) i wysoką przepustowość ze względu na szybsze analizy bez konieczności rozdzielania wszystkich substancji badanych. Połączenie chromatografii z tandemową spektrometrią mas daje szczególnie korzystne rezultaty w analizie skomplikowanych mieszanin i umożliwia uzyskanie informacji o strukturze składników. W optymalnym przypadku możliwa jest identyfikacja wszystkich rozdzielonych składników oraz pełna dekonwolucja pików chromatograficznych, tzn. rozłożenie na składniki pików nierozdzielnych. Ma to ogromne znaczenie przy wykazywaniu specyficzności i selektywności „klasycznych” metod chromatograficznych [16].

Ze względu na wspomniane zalety, technika spektrometrii mas połączonej z chromatografią cieczową stała się dominującą techniką w identyfikowaniu i określaniu struktur zanieczyszczeń i produktów degradacji środków leczniczych [21–25].

Dobór faz ruchomych i czynniki wpływające na wygląd widma

Wybór fazy ruchomej, która jest czynnikiem aktywnym, ma znaczny wpływ na proces chromatograficzny. Przy jej wyborze należy kierować się rodzajem i składem rozdzielanej próbki, rodzajem zastosowanego wypełnienia kolumny oraz rodzajem detektora. Najpopularniejsze fazy ruchome opisane w monografiach farmakopealnych to fazy normalne, fazy oparte na buforze fosforanowym, fazy z dodatkiem trietyloaminy, czy też z dodatkiem umożliwiającym

tworzenie par jonowych. Fazy te nie są odpowiednie do detekcji MS. Spektrometria mas stawia przed metodami chromatografii cieczowej (LC-MS) wymagania, powodujące inne podejście do opracowywania metody HPLC. Często również występują sytuacje, gdy konkretną zwalidowaną metodą HPLC-UV/Vis należy zaadoptować do detekcji MS, a ma to miejsce gdy:

- istnieje konieczność wykazania profilu zanieczyszczeń w opracowanej metodzie badania zawartości i czystości środka farmaceutycznego;
- istnieje konieczność wykazania, że zwalidowana metoda jest specyficzna i selektywna (badanie czystości pików chromatograficznych);
- w badaniach stresowych i stabilnościowych pojawiły się nowe piki (nowe zanieczyszczenia).

Dlatego zazwyczaj zaleca się opracowywanie metod HPLC z eluentami kompatybilnymi do detekcji MS, chyba że w opracowywaniu metody wykaże się, że jest to niemożliwe.

Optymalizacja warunków pomiaru w metodzie LC-MS składa się z dwóch etapów. Pierwszy to optymalizacja parametrów źródła jonów i interfejsu zależnych od rodzaju związku (np. wartości napięć przyłożonych do poszczególnych elementów optyki jonowej), drugi to optymalizacja parametrów źródła jonów zależnych od warunków analizy HPLC, tzn. od przepływu i składu fazy ruchomej (np. położenie wylotu igły, z której wydostaje się faza ruchoma, temperatura). Optymalne warunki pracy spektrometru mas to minimalna temperatura, przy której następuje całkowite odparowanie rozpuszczalnika. Faza ruchoma w LC-MS musi być więc lotna, ponieważ istotnym etapem analiz jest jej odparowanie. To między innymi powoduje, że bardzo popularny bufor fosforanowy, który jest stosowany w technice LC-UV/Vis, nie powinien być używany. Ponadto bufor fosforanowy daje wysokie tło niepożądane w LC-MS.

W technice LC-MS zaleca się stosowanie rozpuszczalników (lub mieszaniny rozpuszczalników) o wysokiej lotności, wysokiej polarności oraz zdolności rozpuszczania wielu różnych związków. Są to przede wszystkim: acetonitryl, metanol, 2-propanol, woda. Jako lotne sole do przygotowania buforów [26] zaleca się używać mrówczanu amonu, octanu amonu, wodorowęglanu amonu, węglanu amonu, jako lotne zasady – wodorotlenku amonu oraz następujących modyfikatorów fazy ruchomej:

- a) w trybie jonów dodatnich:
 - kwas mrówkowy (0,1–1%),
 - kwas octowy (0,1–1%),
 - kwas propionowy;
- b) w trybie jonów ujemnych:
 - amoniak (0,1–1%),

Połączenie spektrometrii mas z chromatografią cieczową dostarcza bardzo skutecznego narzędzia do analiz jakościowych i ilościowych złożonych mieszanin.

Standardowo stężenie wymienionych soli amonowych powinno mieścić się w zakresie 2–10 mmol/l w jonizacji dodatniej i w zakresie 2–50 mmol/l w jonizacji ujemnej. Stężenie kwasów organicznych powinno być zazwyczaj w zakresie 0,1–1%, w celu zwiększenia protonowania w jonizacji dodatniej, czy

zwiększenia deprotonacji w jonizacji ujemnej. W technice LC-MS nie powinno się używać trietyloaminy (TEA), kwasu trifluorooctowego (TFA), dodecylosiarczanu sodu (SDS) jako modyfikatorów fazy ruchomej, ponieważ zmniejszają czułość, tłumią jonizację lub bardzo komplikują widmo. Użycie kwasu trifluorooctowego powoduje, że na widmie masowym pojawia się bardzo silny sygnał pochodzący od jonu m/z 113 w jonizacji ujemnej. Ponadto tworzenie trwałych par jonowych przy zastosowaniu np. TFA (dla ładnego kształtu piku chromatograficznego) powoduje, że para jonowa jest obojętna i nie powstają naładowane jony potrzebne do detekcji MS. Użycie trietyloaminy powoduje powstanie bardzo silnego sygnału pochodzącego od jonu m/z 102 w jonizacji dodatniej, ponadto uniemożliwia obserwację innych sygnałów, ponie-

waż TEA zabiera prawie cały ładunek dostarczany w trakcie procesu jonizacji. Ponadto TFA i TEA pozostają długo w systemie HPLC i są dopiero wymywane w kolejnych analizach.

Najbardziej czuła na warunki fazy ruchomej jest jonizacja poprzez elektrorozpraszanie, ponieważ w tego typu jonizacji następuje przeniesienie jonów z roztworu do fazy gazowej [27]. Bardzo ważną rolę w tym przypadku odgrywa etap desolwatacji jonów w fazie gazowej. Ma to odzwierciedlenie w widmie masowym, ponieważ jego wygląd zależy od:

- czynników wpływających na proces desolwatacji jonów w fazie gazowej (wpływ napięcia przykładanego do kapilary, rozpuszczalnika i gazu rozpylającego);
- stężenia analitu i towarzyszących elektrolitów;
- reakcji elektrochemicznych zachodzących w kapilarze [28].

Intensywność sygnałów w widmie masowym zależy od wielu czynników. Do najważniejszych należy zaliczyć właściwości roztworu (stężenie, właściwości fizykochemiczne i reaktywność jego składników, oddziaływanie pomiędzy jonami analitu i rozpuszczalnika oraz skuteczność desolwatacji jonów) oraz warunki doświadczalne (szybkości przepływu roztworu, rozwiązania konstrukcyjne źródła jonów). Intensywność sygnałów w widmie fragmentacyjnym zależy przede wszystkim od energii kolizyjnej.

Najbardziej popularną techniką separacji w połączeniu z MS jest układ odwróconych faz (RP). Przy zastosowaniu odpowiednich warunków możliwe jest jednak użycie dodatku rozpuszczalników niepolarnych, takich jak np. heksan, heptan. Umożliwia to badanie związków o charakterze lipofilowym. Przykładem może być publikacja Skorupińskiej i współpracowników, w której opisano badanie dolicholanów i prenolanów przy zastosowaniu nawet 70% zawartości heksanu [29].

Strategie określania struktur i identyfikacji zanieczyszczeń

Proces identyfikacji zanieczyszczeń i produktów degradacji powinien zaczynać się na wczesnym etapie rozwoju leku. Zebranie informacji o prawdopodobnych zanieczyszczeniach, ich rodzajach, poziomie występowania, czy też informacji o możliwości uzyskania próbki wzbogaconej, pozwoli na wybór odpowiedniej metody do kontroli i identyfikacji istotnych zanieczyszczeń [30]. Wymienić można wiele przypadków, w których identyfikacja struktur może mieć ogromne znaczenie. Do najważniejszych należą:

- punkty krytyczne w syntezie substancji farmaceutycznej,
- identyfikacja zanieczyszczeń występujących powyżej dopuszczalnych limitów [31, 32],
- występowanie zanieczyszczeń genotoksycznych,
- identyfikacja zanieczyszczeń nierozdzielnych (czystość piku chromatograficznego),
- identyfikacja produktów degradacji (badania stabilności i stresowe, określenie mechanizmów degradacji).

Określenie struktury i identyfikacja zanieczyszczeń z zastosowaniem techniki LC-MS/MS

W literaturze spotyka się zastosowanie techniki LC-MS/MS zarówno do poszukiwania nieznaną substancji, do analizy wybranych związków, jak i do potwierdzania obecności substancji stosując identyfikację na podstawie charakterystycznych danych strukturalnych. W analizie wybranych związków stosuje się tryb MRM i tryb PI, natomiast w analizie nieznaną substancji korzysta się ze skanowania i trybu PI, które umożliwiają poszukiwanie znanych i nieznaną związków. Tego typu działania stosowane są w szerokim zakresie w toksykologii, medycynie sądowej, w badaniu żywności i próbek środowiskowych. Istnieją biblioteki ułatwiające identyfikację nieznaną związków, ponieważ poszukiwania są bardziej skonkretyzowane, np. analiza pestycydów, analiza antybiotyków, analiza Sudanu, badanie substancji zaburzających działanie układu dokrewnego [33–35].

Proces identyfikacji zanieczyszczeń można podzielić na dwa etapy. Pierwszy etap polega na znalezieniu istotnych zanieczyszczeń, natomiast etap drugi na ich identyfikacji. Najprostszą metodą poszukiwania zanieczyszczeń jest porównanie chromatogramu LC-MS/MS wykonanego dla rozpuszczalnika i próbki związku. Poprzez porównanie chromatogramów, można znaleźć wszystkie piki pochodzące od zanieczyszczeń.

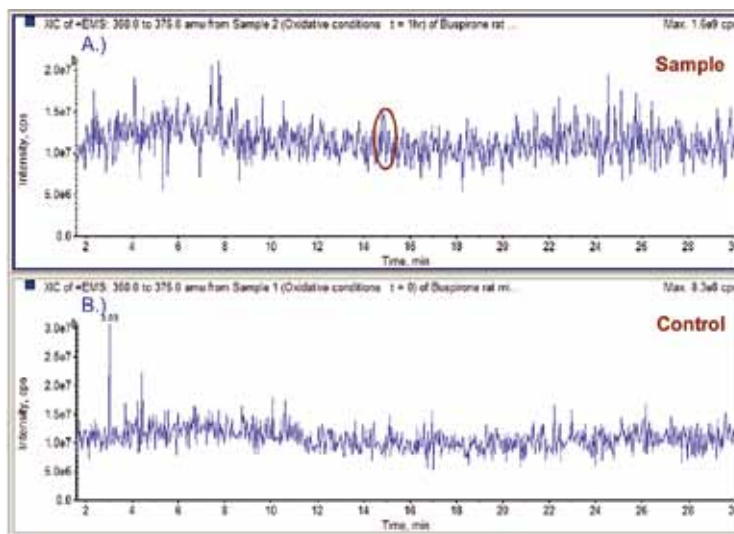
Sytuacja jest bardziej skomplikowana w przypadku badania zanieczyszczeń środków farmaceutycznych, dla których nie można stworzyć komercyjnych bibliotek ze względu na różnorodność zanieczyszczeń w zależności od technologii produkcji. Wówczas cały proces identyfikacji bazuje na kwalifikacjach personelu.

Proces identyfikacji zanieczyszczeń można podzielić na dwa etapy [16]. Pierwszy etap polega na znalezieniu istotnych zanieczyszczeń, natomiast etap drugi na ich identyfikacji. Najprostszą metodą poszukiwania zanieczyszczeń jest porównanie chromatogramu LC-MS/MS wykonanego dla rozpuszczalnika i próbki związku (**rycina 1**). Poprzez porównanie chromatogramów, można znaleźć wszystkie piki pochodzące od zanieczyszczeń. Jest to dość żmudny i pracochłonny proces i nie zawsze kończy się sukcesem. Dużym ułatwieniem jest zastosowanie odpowiedniego programu np. Lightsight™, który za pomocą specjalnego algorytmu, porównuje chromatogramy i automatycznie wyszukuje wszystkie zanieczyszczenia (**rycina 2**). Następnie program przygotowuje metodę MS/MS w celu identyfikacji znalezionych zanieczyszczeń. Ponadto program ten ułatwia porównywanie widm fragmentacyjnych zanieczyszczeń i związku głównego, dzięki czemu znacznie przyspiesza i ułatwia proces profilowania zanieczyszczeń.

Możliwości łączenia różnych trybów skanowania zanieczyszczeń można poszukiwać również przy zastosowaniu metod „inteligentnego” zbierania danych – IDA (IDA – ang. *Information Dependent Acquisition*). W IDA dostępnych jest kilka możliwych trybów poszukiwania zanieczyszczeń, które zostały szczegółowo opisane w artykule Stolarczyk [16].

Czułość trybów skanowania jest szczególnie istotna, gdy analiza jest wykonywana w warunkach, które nie są optymalne dla systemu LC-MS/MS, np. wtedy, gdy w fazie ruchomej znajduje się bufor fosforanowy, albo gdy wykonywane są pomiary w układzie faz normalnych. Również w tym przypadku dużym ułatwieniem może być zastosowanie programu Lightsight™ [16].

Etap drugi, to użycie widm masowych i widm fragmentacyjnych do identyfikacji zanieczyszczeń. Wyróżnić można kilka kroków interpretacji widm masowych. Pierwszym krokiem jest identyfikacja jonów pseudomolekularnych, które powstają w wyniku protonowania i deprotonowania cząsteczki. Istotne są również pojawiające się jony będące produktami przyłączenia np. jonu amonowego $[M+NH_4]^+$, jonu sodowego $[M+Na]^+$, lub jonu potasowego $[M+K]^+$ w jonizacji dodatniej, zaś w warunkach tworzenia jonów ujemnych może powstać jon $[M+Cl]^-$ lub $[M+COOH]^-$, który zazwyczaj pojawia się w obecności np. kwasu mrówkowego czy też mrówczanu amonu. Są to tzw. jony addycyjne, które dodatkowo potwierdzają tożsamość jonu pseudomolekularnego. W widmie masowym



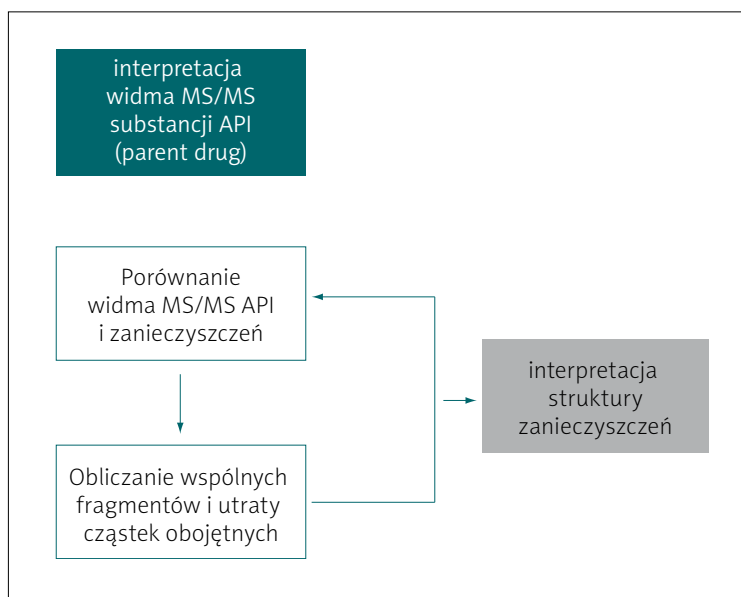
Ryc. 1. „Ręczna” metoda poszukiwania zanieczyszczeń: A) próbka badana; B) próbka kontrolna bez zanieczyszczeń [36]



Ryc. 2. Zastosowanie programu Lightsight™ dla przypadku zarejestrowanego na ryc. 1 [36]

zaobserwować można jony klasterowe, np. $[2M+H]^+$, $[3M+H]^+$ oraz jony klasterowe z użytymi rozpuszczalnikami [37]. Drugim krokiem jest zastosowanie obowiązujących reguł, np. reguły azotowej, określającej miejsca nienasylenia [38]. Również informacje chromatograficzne, tj. czas retencji, stają się przydatne w uzyskaniu danych elementarnych o strukturze badanego związku, poprzez porównanie kolejności eluowania zanieczyszczeń w stosunku do związku głównego.

Najbardziej przydatne w określaniu struktury jest widmo fragmentacyjne (MS/MS). Można je uzyskać w różnorodnych spektrometrach tandemowych (potrójny kwadrupol, QqTOF, pułapka jonowa, QTRAP). Wykonując widmo fragmentacyjne w spektrometrze tandemowym, w pierwszym etapie izolowany jest



Ryc. 3. Schemat postępowania w procesie identyfikowania struktur nieznanymi zanieczyszczeń

jon prekursora, a następnie wykonywana jest jego fragmentacja. Dzięki temu uzyskuje się pewność, że uzyskane fragmenty pochodzą z jonu o zdefiniowanym m/z. Wyróżnić można kilka kroków interpretacji widm fragmentacyjnych. Na rycinie 3 przedstawiono ogólny schemat postępowania podczas identyfikacji zanieczyszczeń z zastosowaniem widm fragmentacyjnych (MS/MS).

Ten sposób postępowania opiera się na założeniu podobnych struktur zanieczyszczeń i API tzn. znaczna część struktury substancji farmaceutycznej jest w strukturze zanieczyszczenia. Pierwszym krokiem jest interpretacja widma fragmentacyjnego API. Następnym krokiem jest porównanie widma fragmentacyjnego substancji aktywnej z widmem fragmentacyjnym badanego zanieczyszczenia w celu znalezienia fragmentów wspólnych i wspólnych różnic w utracie cząsteczek obojętnych. Następnie można interpretować strukturę zanieczyszczenia.

Nie zawsze jednak proces identyfikacji jest prosty. Problemy mogą pojawić się już podczas rejestracji widm (niekompatybilna do detekcji MS faza ruchoma, zanieczyszczenie słabo jonizujące), podczas identyfikacji jonów pseudomolekularnych, a więc określenia masy zanieczyszczeń (oddziaływania i reakcje w fazie gazowej w źródle jonów). Rozwiązaniem częściowym tych problemów może być zastosowanie wspomnianych powyżej algorytmów do automatycznego wyszukiwania zanieczyszczeń – Lighsight™, IDA. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że wiedza na temat fragmentacji jonów parzystoelektronowych jest nadal uboga. Mechanizmy powstawania fragmentów otrzymanych w wyniku jonizacji za pomocą technik ESI i APCI w układzie LC-MS, są mniej poznane niż za pomocą techniki EI (GC-MS). Inne zaawansowane

metody MS, jak np. znakowanie izotopowe, dokładny pomiar masy itp., mogą być pomocne w ustaleniu mechanizmów fragmentacji i identyfikacji struktur. Zastosowanie np. wymiany protonu na deuter (H/D) w układzie on-line przy zastosowaniu D_2O , jako fazy ruchomej, jest bardzo cenne do identyfikacji aktywnego protonu, co z kolei staje się istotną strategią do różnicowania struktur izomerów [39]. Metody te są jednak kosztowne, czasochłonne i nie zawsze konieczne. Zamiast nich, do jednoznacznego określenia struktury zanieczyszczeń, a w szczególności izomerów, można stosować komplementarne techniki spektroskopowe, np. NMR.

Wnioski

Środki farmaceutyczne nie są praktycznie nigdy jednorodnie analitycznie. Obok substancji aktywnej występują zanieczyszczenia o różnym charakterze. W ostatniej dekadzie pojawiła się konieczność precyzyjnego określania profilu zanieczyszczeń poprzez przewidywanie pewnych zanieczyszczeń w trakcie produkcji i ich usuwanie i/lub monitorowanie. Istotne jest również przewidywanie powstawania zanieczyszczeń degradacyjnych poprzez prowadzenie badań przyspieszonego starzenia i przeciwdziałanie procesowi rozkładu substancji farmaceutycznej przez odpowiednie przechowywanie. Możliwość badania tych zanieczyszczeń zależy od dostępnych technik analitycznych [40, 41]. W kontroli zanieczyszczeń najbardziej wartościowych wyników dostarczają metody analityczne, które umożliwiają rozdzielenie składników, ich analizę ilościową i jakościową jako kryterium tożsamości i identyfikacji zanieczyszczeń. Aby sprostać powyższym wymaganiom, spektrometr mas powinien charakteryzować się wysoką czułością, szerokim zakresem dynamicznym i wysoką selektywnością [42, 43]. Powinien umożliwiać wykonywanie fragmentacji cząsteczek w celu określenia ich struktury [22, 44, 45]. Uzyskane informacje o strukturze badanego zanieczyszczenia mogą pozwolić na zrozumienie natury i mechanizmu jego powstawania, co można zastosować do opracowania międzyoperacyjnej kontroli w procesie produkcji środków farmaceutycznych. Poprzez zmianę parametrów procesu syntezy i warunków przechowywania można zmniejszyć ilość lub usunąć powstające zanieczyszczenia.

Otrzymano: 2009.05.11 · Zaakceptowano: 2009.05.28

Piśmiennictwo

1. Görög S.: The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterising the quality of bulk pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 36, 931–937.
2. Ferenczi-Fodor K., Végh Z., Renger B.: Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals. *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 778–789.

- Olsen B.A., Castle B.C., Myers D.P.: Advanced in HPLC technology for the determination of drug impurities. *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 796–805.
- Snow N.H.: Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trend Anal. Chem.* 2002, 21, 608–616.
- Hilhorst M.J., Somsen G.W., De Jong G.J.: Capillary electrokinetic separation techniques for profiling of drugs and related products. *Electrophoresis*. 2001, 22, 2542–2564.
- Szántay C.Jr., Béni Z., Balogh G., Gáti T.: The changing role of NMR spectroscopy in off-line impurity identification: A conceptual view. *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 806–820.
- Görög S.: The changing face of pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 12–17.
- Koh H.-L., Yau W.-P., Ong P.-S., Hegde A.: Current trends in modern pharmaceutical analysis for drug discovery. *DDT*. 2003, 8, www.drug-discoverytoday.com
- Zhou S., Song Q., Tang Y., Naidong W.: Critical Review of Development, Validation, and Transfer for High Throughput Bioanalytical LC-MS/MS Methods. *Curr. Pharm. Anal.* 2005, 1, 3–14.
- Rudzi P.J., Ksycińska H., Kobylńska K., Sarosiek A.: Application of LC-MS in pharmacokinetic studies. *Acta Biochim. Pol.* 2008, 55, 42.
- Kauffman J.: Trends in Impurity Analysis: Determination of Extractables, Leachables, Residual Solvents, and Unknowns by Mass Spectrometry. *Pharma. Technol.* 2003, 24–30, <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard /pharmtech/342003/67142/article.pdf>
- Sahasrabudhhey B., Nautiyal R., Acharya H., Khyade S., Luthra P.K., Deshpande P.B.: Isolation and characterization of some potential impurities in ropinirole hydrochloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 1587–1593.
- Prasada Rao K.V.V., Rani A., Raghava Reddy A.V., Bharathi C.H., Dandala R., Naidu A.: Isolation, structural elucidation and characterization of impurities in Cefdinir. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 1476–1482.
- Johnstone R., Rose M.: *Spektrometria mas*. PWN, Warszawa, 2001.
- Rudzi P.J., Stolarczyk E.U.: I Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas. *Farm. Pol.* 2008, 64, 616–618.
- Stolarczyk E.U.: Najnowsze osiągnięcia techniczne w spektrometrii mas w badaniu profilu zanieczyszczeń. *Przem. Chem.* Sierpień 2007, Tom 8, nr 86, 800–803.
- Rudzi P.J., Kobylńska K.: Zastosowanie techniki LC-MS-MS do oznaczania stężeń substancji leczniczych w materiale biologicznym. *Przem. Chem.* 2006, 85, 360–362.
- Fernández de la Mora J., Van Berkel G.J., Enke C.G., Cole R.G., Martinez-Sanchez M., Fenn J.B.: Electrochemical process in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2000, 35, 939–952.
- Sudera P., Silberring J.: *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2006.
- Ardley B.: *Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction*. Wiley, Chippingham, UK, 2003.
- Bharathi Ch., Prabahar K.J., Prasad Ch.S., Kumar M.S., Magesh S., Handa V.K., Dandala R., Naidu A.: Impurity profile study of zaleplon. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 101–109.
- Chen Y., Brill G.M., Benz N.J., Leanna M.R., Dhaon M.K., Rasmussen M., Zhou C.Ch., Bruzek J.A., Bellettini J.R.: Normal phase and reverse phase HPLC-UV-MS analysis of process impurities for rapamycin analog ABT-578: Application to active pharmaceutical ingredient process development. *J. Chromatogr. B.* 2007, 858, 106–117.
- Reddy G.M., Bhaskar B.V., Reddy P.P., Sudhakar P., Babu J.M., Vyas K., Reddy P.R., Mukkanti K.: Identification and characterization of potential impurities of rabeprazole sodium. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 1262–1269.
- Dongre V.G., Karmuse P.P., Ghugre P.D., Salunke S.M., Panda N., Kumar A.: Preparative isolation and structural elucidation of impurities in fluconazole by LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 42, 334–340.
- Novak P., Tepeš P., Fistrčić I., Bratoš I., Gabelica V.: The application of LC-NMR and LC-MS for the separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40, 1268–1272.
- Dolan J.: A Guide to HPLC and LC-MS buffer selection. www.ace-hplc.com.
- Gaskell S.: *Electrospray: Principles and Practice*. *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 677–688.
- Schroeder G.: Syntetyczne receptory jonowe: Lyapchenko N., Schroeder G.: *Spektrometria mas – technika elektrorozpylania (ESIMS)*. BETAGRAF P.U.H., Poznań, 2005, rozdział 2.
- Skorupińska-Tudek K., Bieńkowski T., Olszowska O., Furmanowa M., Chojnacki T., Danikiewicz W., Świeżawska E.: Divergent pattern of polyprenols and dolichols in different organs in *Coluria geoides*. *Lipids*. 2003, 38, 981–990.
- Ahuja S., Alsante K.M.: *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*. Academic Press, Amsterdam, 2003.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Q3A-(R2): Impurities In New Drug Substances. October 2006.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Q3B(R2): Impurities In New Drug Product. June 2006.
- Nota aplikacyjna: 3200 QTRAP LC/MS/MS System: Simultaneous Quantitative Screening and Qualitative Confirmation of 300 Pesticides Using the New 3200 QTRAP LC/MS/MS System. www.applied-biosystems.com.
- Nota aplikacyjna nr 15: Detection of sudan dyes in tomato paste and chilli powder by LC/MS/MS. www.appliedbiosystems.com.
- Nota aplikacyjna: Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in River Water. www.appliedbiosystems.com.
- Bieńkowski T.: Identyfikacja metabolitów i profilowanie zanieczyszczeń przy pomocy spektrometru typu QTRAP. *Materiały seminaryjne firmy Applied Biosystems*, Warszawa, 2007.
- Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P.: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Levsen K., Preiss A., Spraul M.: Połączenie HPLC z NMR i MS jako technika pozwalająca na określenie struktury chemicznej nieznanych substancji chemicznych, obecnych w próbkach środowiskowych. *Centrum Doskonałości i Monitoringu Środowiskowego*, Wydział Chemii Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2003, rozdział 9.
- Silverstein R.M., Webster F.X., Kremling D.J.: *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007.
- Liu D. Q., Lianming W., Sun M., MacGregor P.A.: On-line H/D exchange LC-MS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 320–329.
- Bari S.B., Kadam B.R., Jaiswal Y.S., Shirkhedkar A.A.: Impurity profile: Significance in Active Pharmaceutical Ingredient. *Eurasian J. Anal. Chem.* 2007, 2(1), 32–53.
- Smith R.J., Webb M.L.: *Analysis of drug impurities*. Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
- Lim Ch.K., Lord G.: Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25(5), 547–557.
- Liu D.Q., Hop C.E.C.A.: Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography – tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 1–18.
- Mak M., Czira G., Brlik J.: Mass spectrometry in impurity profiling. *Prog. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 4, 97–108.
- Ermer J. Vogel M.: Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis. *Biomed. Chromatogr.* 2000, 14, 373–383.