

## 磷酸盐流动相体系下头孢唑肟钠注射用药品中杂质的鉴定 ——应用二维ACQUITY UPLC技术/Xevo G2-S QTof系统

王志英

沃特世科技（上海）有限公司

### 应用优势

- 在使用磷酸盐等不挥发盐做流动相时，能有效解决杂质鉴定的难题。
- 一维和二维同时使用亚2 μm的色谱柱，提高分析效率。
- 借助软件快速对药品中所有杂质进行鉴定及解析。

### 沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® 2D技术

Xevo® G2-S QTof质谱仪

ACQUITY® HSS T3色谱柱, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm

### 关键词

二维, UPLC®, QTof, 杂质鉴定, 头孢唑肟, HSS T3

### 简介

在各国的药典中，有很多药品的有关物质检测项使用磷酸盐缓冲试剂、离子对试剂等不挥发性缓冲盐。磷酸盐缓冲体系，因其背景吸收比较低、所调pH范围较广、对化合物峰形影响较大等优势，被广泛应用于化合物的纯度检测。虽然磷酸缓冲盐体系或者离子对试剂会对杂质的保留及峰形有很好的作用，但对化合物杂质的鉴定却带来了困难。杂质鉴定最常用的方法是使用LCMS。如果流动相是不挥发盐类，如磷酸盐、离子对试剂等，会大大降低质谱的灵敏度并污染质谱仪，所以这类流动相统称为质谱不兼容流动相。

沃特世推出二维ACQUITY UPLC技术，能在使用磷酸盐等不挥发盐做流动相时，有效解决杂质鉴定的难题。即在一维体系中，使用质谱不兼容流动相对化合物进行正常分离，在二维体系中使用质谱兼容型流动相，二维体系连接质谱检测器。通过软件控制阀切换，使一维体系中的目标峰切入二维体系中（中心切割法），再进一步进行杂质鉴定。

头孢唑肟钠（Ceftizoxime sodium）属第三代头孢菌素，具广谱抗菌作用。中国药典中使用磷酸盐缓冲液作为流动相。在本方案中采用二维ACQUITY UPLC系统，一维使用药典中规定的磷酸盐缓冲液，并采用亚2 μm小粒径的色谱柱进行分离，以提高分离效率、增加分离度、缩短分析时间。二维采用质谱兼容的甲酸体系，连接飞行时间质谱仪（Xevo G2-S QTof）进行检测鉴定。本文使用二维ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QTof对头孢唑肟钠注射用市售样品及系统适用性样品中杂质进行鉴定。

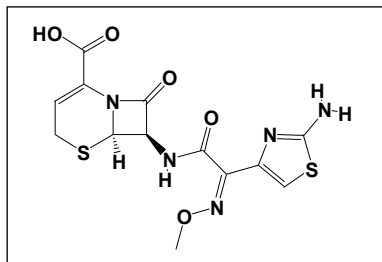


图1. 头孢唑肟 (Ceftizoxime)  $C_{13}H_{13}N_5O_5S_2$

实验

UPLC 条件

LC系统：  
二维ACQUITY UPLC H-Class系统  
ACQUITY UPLC H-Class四元溶剂管理器 (1D)  
ACQUITY UPLC H-Class样品管理器 (FTN)  
ACQUITY UPLC色谱柱管理器  
ACQUITY UPLC二元溶剂管理器 (二维)  
ACQUITY UPLC UV检测器  
515泵 (柱前稀释用)

一维液相条件

色谱柱：HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm  
柱温：40 °C  
进样量：2 μL  
流速：0.40 mL/min  
流动相A：pH3.6缓冲液  
(枸橼酸1.42 g, 磷酸氢二钠2.31 g, 水1000 mL)  
流动相B：ACN  
波长：254 nm  
梯度表：

时间	流速	%A	%B	曲线
0	0.400	94	6	初值
2.5	0.400	90	10	6
4.0	0.400	85	15	6
5.0	0.400	70	30	6
8.0	0.400	70	30	6
10.0	0.400	94	6	1

样品制备

头孢唑肟钠样品溶液（编号522）：称取25 mg头孢唑肟钠注射用样品于25 mL量瓶中，用水定容至刻度，即浓度为1.0 mg/mL。

系统适用性溶液：取头孢唑肟钠约10 mg置于10 mL量瓶，加0.1 mol/L的NaOH溶液1 mL，室温放置30 min，加pH7.0磷酸盐缓冲液至刻度，摇匀。将该溶液于室温放置24 h即可。

二维UPLC流路示意图

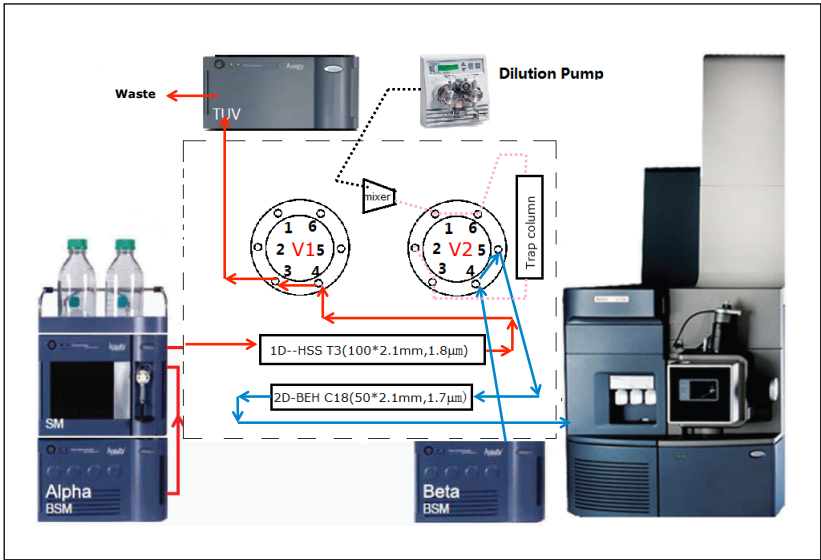


图2. Step1.作为一维液相时的流路。

## 二维液相条件

色谱柱: BEH C<sub>18</sub>, 50 × 2.1 mm, 1.7 μm  
柱温: 40 °C  
流速: 0.5 mL/min  
流动相A: 0.1% FA/H<sub>2</sub>O  
流动相B: 0.1% FA/ACN  
梯度: 切峰后开始B相在3 min内由5%增至90%

## 柱前稀释条件

稀释泵: 515泵  
稀释流速: 2 mL/min  
稀释溶剂: 0.1% FA/H<sub>2</sub>O  
捕集柱: XBridge® C<sub>18</sub> 2.1 × 30 mm

## MS条件

MS系统: Xevo G2-S QTof  
离子化模式: ESI+  
毛细管电压: 1.0 kV  
源温度: 100 °C  
雾化气温度: 550 °C  
雾化气流速: 800 L/h  
采集模式: MS<sup>E</sup>

## 软件

MassLynx® 4.1 和 MassFragment™

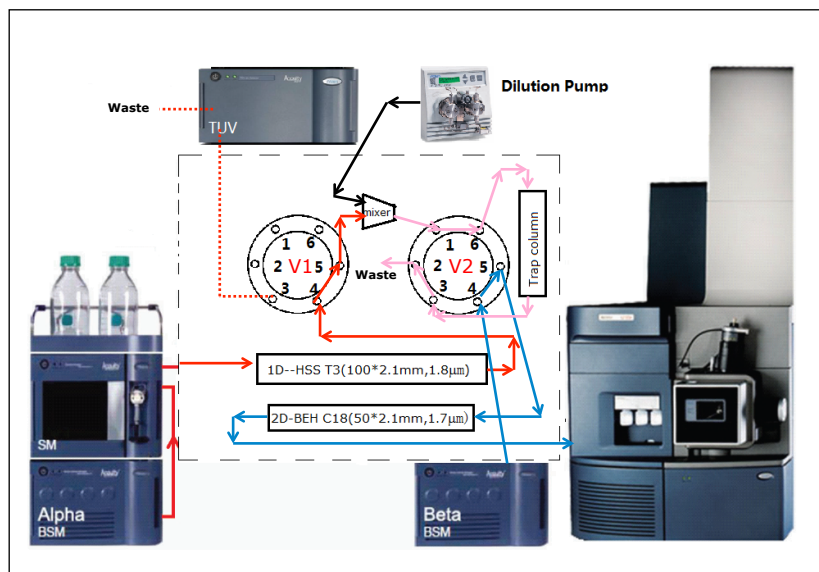


图3. Step2. 将一维中的目标峰切出，进行柱前稀释，将目标峰捕集至捕集柱上，并进行脱盐。

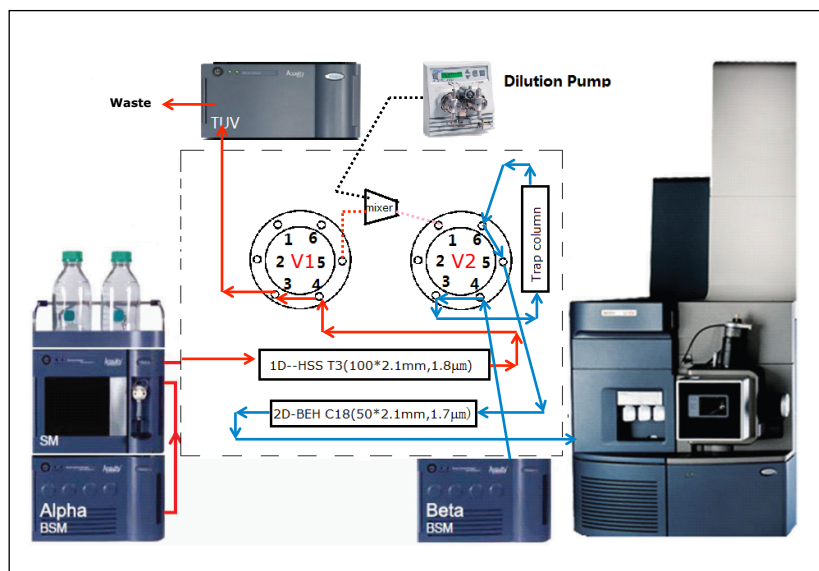


图4. Step3. 将捕集柱上样品反冲至二维色谱柱上进行分离后进入质谱系统。  
注: 红色代表一维液体流向, 蓝色代表二维液体流向, 虚线代表有流路连接但无液体。

## 结果与讨论

1. 图5和图6显示了系统适用性样品和头孢唑肟钠样品溶液（编号522）的一维紫外图。从谱图上可看出，杂质均得到有效分离，比较图6和图7可看出，应用UPLC亚2  $\mu\text{m}$ 小颗粒色谱柱大大提高了分析效率，只需约8 min即可完成有关物质的检测，分离出的杂质更多。

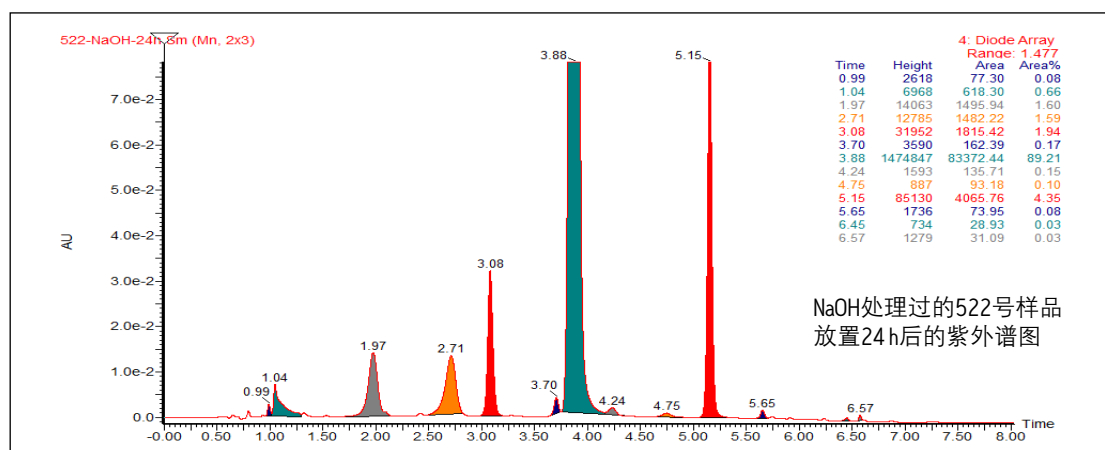


图5. 系统适用性样品的一维紫外色谱图。

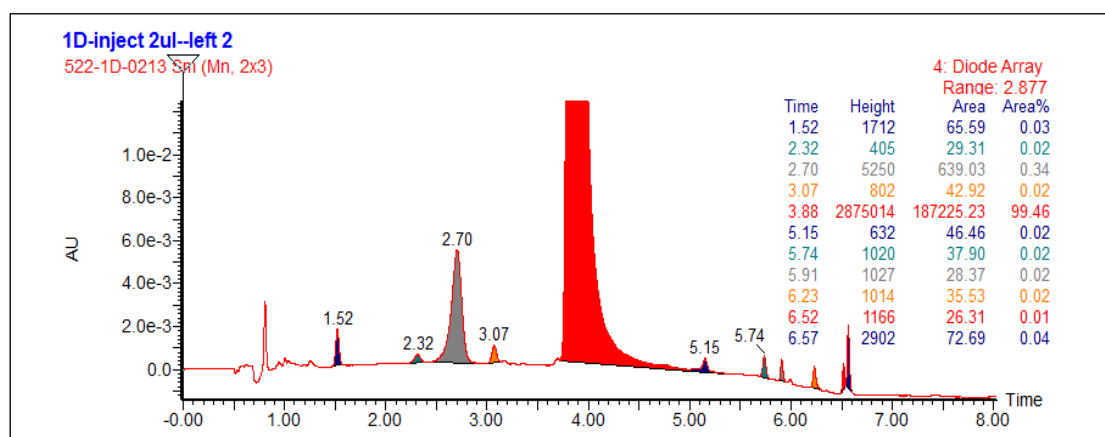


图6. 头孢唑肟钠样品溶液（编号522）的一维紫外色谱图。

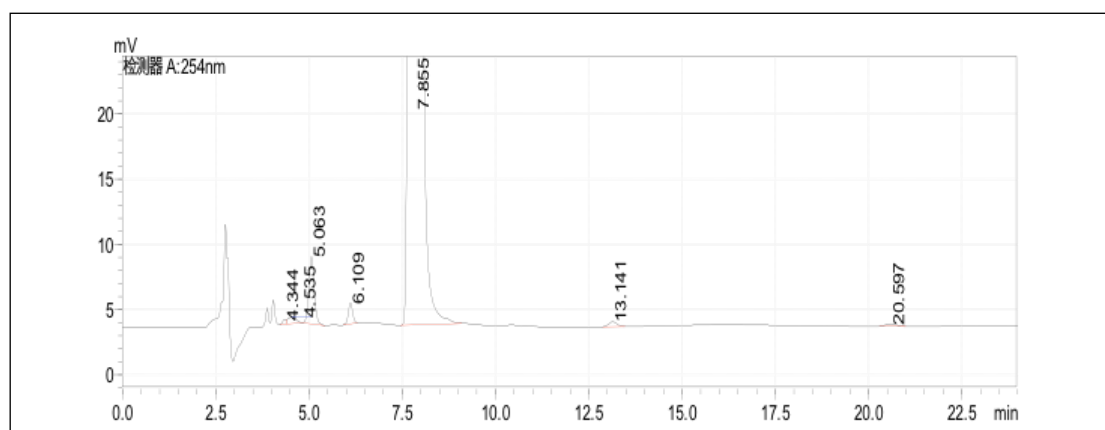


图7. 应用药典方法（等度）和5  $\mu\text{m}$ 粒径的HPLC色谱柱得到的头孢唑肟钠样品溶液（编号522）紫外色谱图。



2. 先将头孢唑肟钠样品溶液的主峰切至二维中得到，质谱采用MS<sup>E</sup>的采集方式，同时得到一级质谱和二级质谱，可通过软件自动进行元素组成分析确定分子式，自动进行二级质谱碎片匹配。

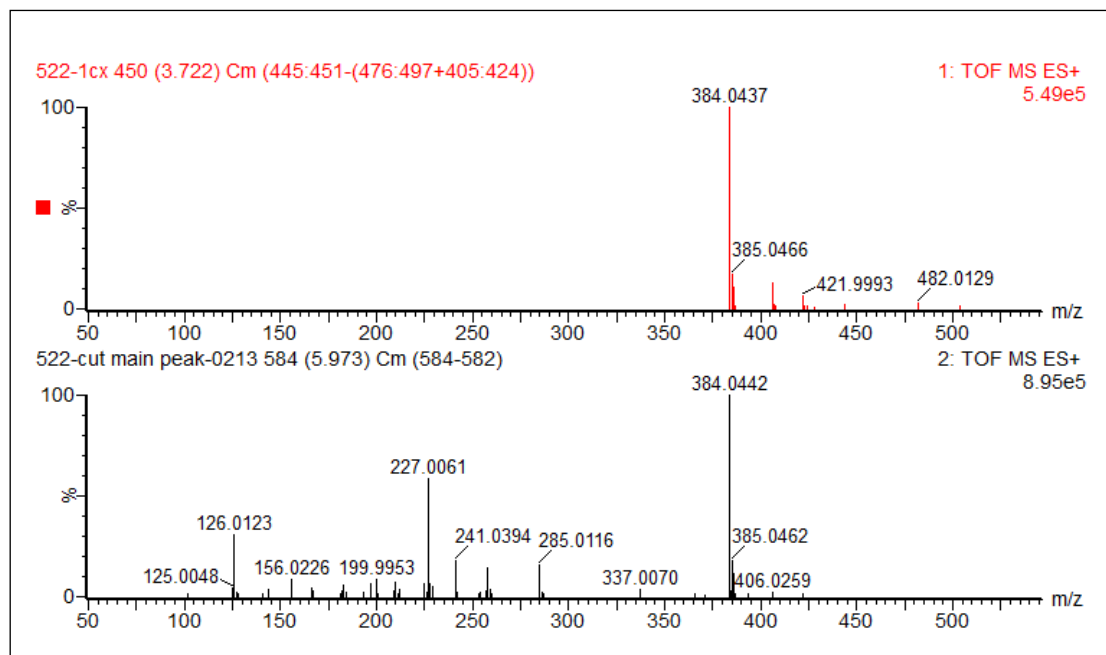


图8. 主峰头孢唑肟钠的一级（上）及二级（下）质谱图。

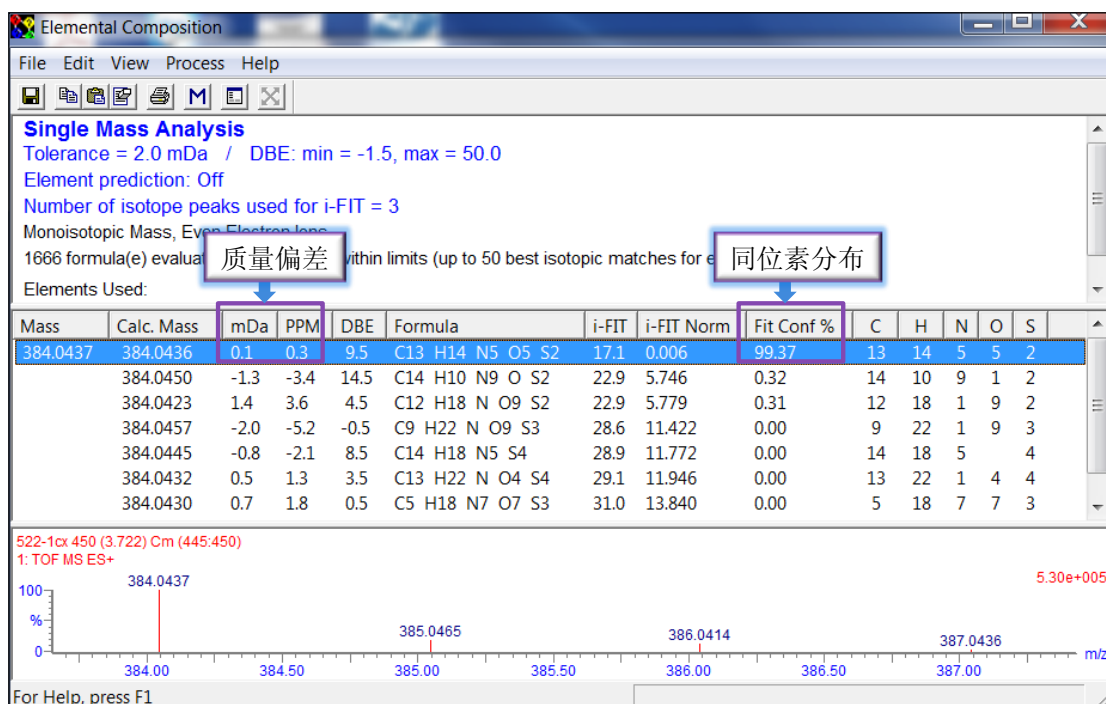


图9. 软件自动确定最可靠的分子式（通过质量偏差和同位素分布）。

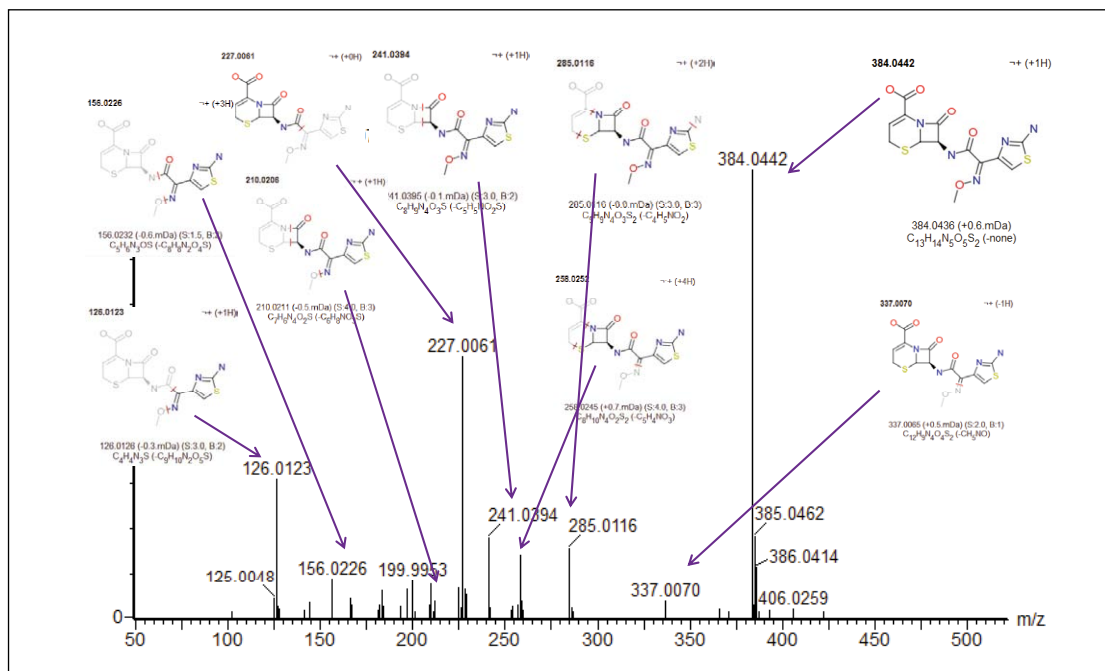


图10. 软件对二级质谱碎片信息进行自动归属。

3. 将头孢唑肟钠样品溶液和系统适用性溶液中杂质分别切入二维质谱中，得到各个杂质的一级和二级质谱图。以系统适用性溶液中RT 1.94 min杂质为例，说明具体的杂质鉴定过程。通过一维紫外色谱确定各杂质的出峰位置后，将杂质进行中心切割，如图11上图的蓝色区间；通过在液相方法中设置阀切换时间，柱前稀释，将杂质捕集至捕集柱上，切后的谱图如图11中间谱图；最后再通过阀切换将杂质从捕集柱上反冲至二维色谱柱上分离，最后进入质谱，如图11下图，为RT 1.94 min杂质切入质谱后得到的一级总离子流图。图12为RT 1.94 min杂质的一级和二级质谱图。

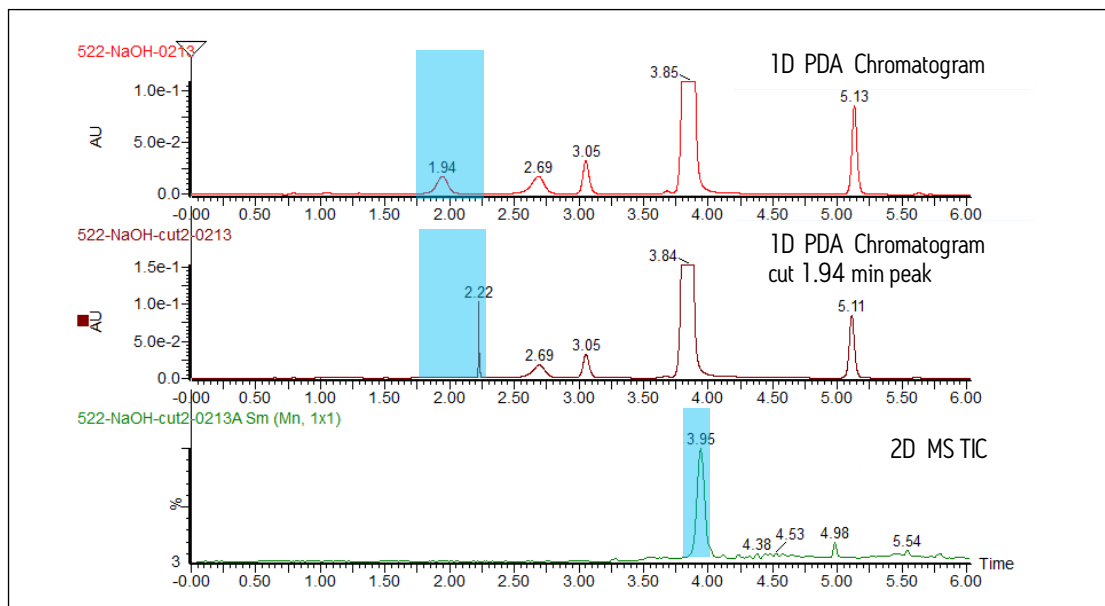


图11. 从上至下：上图为系统适用性溶液一维的紫外色谱图；中图为将RT 1.94 min的杂质切至二维后的一维紫外色谱图；下图为RT 1.94 min杂质切入二级质谱后得到的总离子流图。

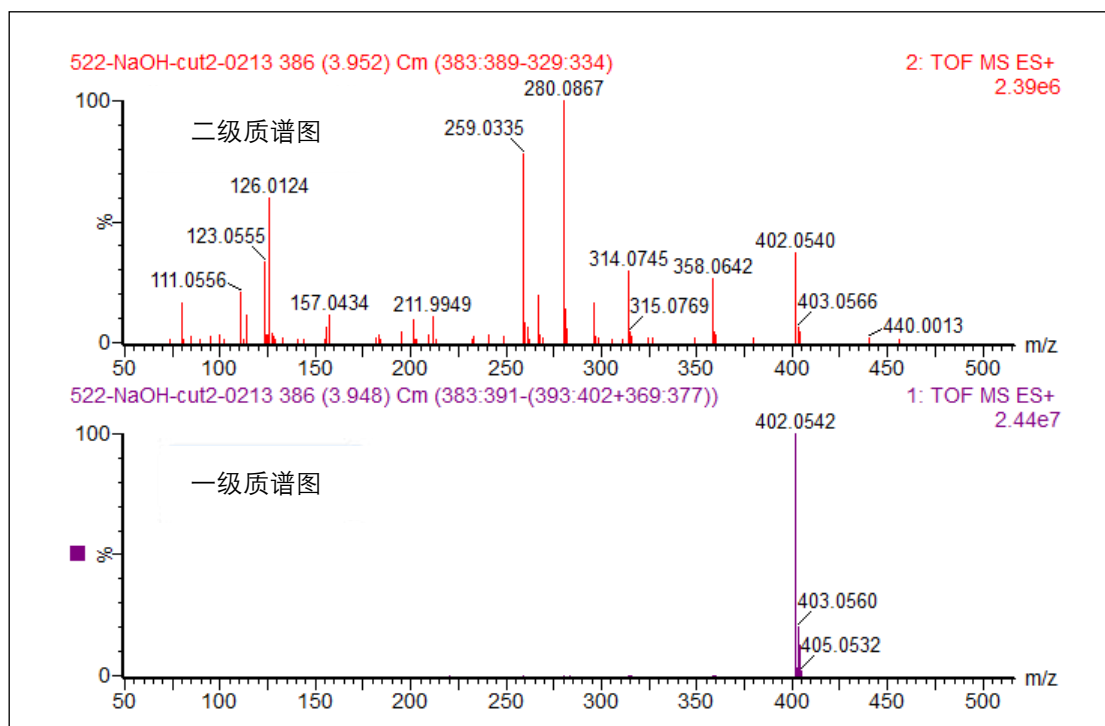


图12. 系统适用性溶液中RT 1.94 min杂质的一级 (下) 和二级 (上) 质谱图。

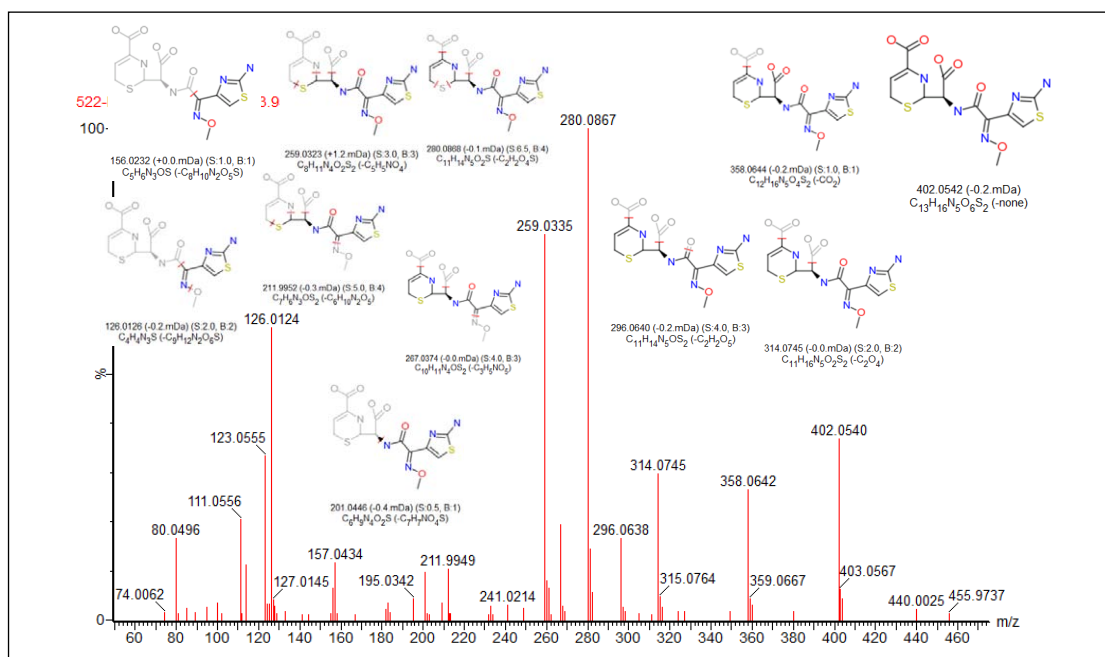


图13. 软件自动对系统适用性溶液中RT 1.94 min杂质的二级质谱碎片归属。

4. 通过二维ACQUITY UPLC/Xevo® G2-S QToF系统对磷酸盐流动相体系下头孢唑肟钠注射用市售样品及系统适应性样品中的杂质进行检测，软件鉴定结果如图14和图15所示。

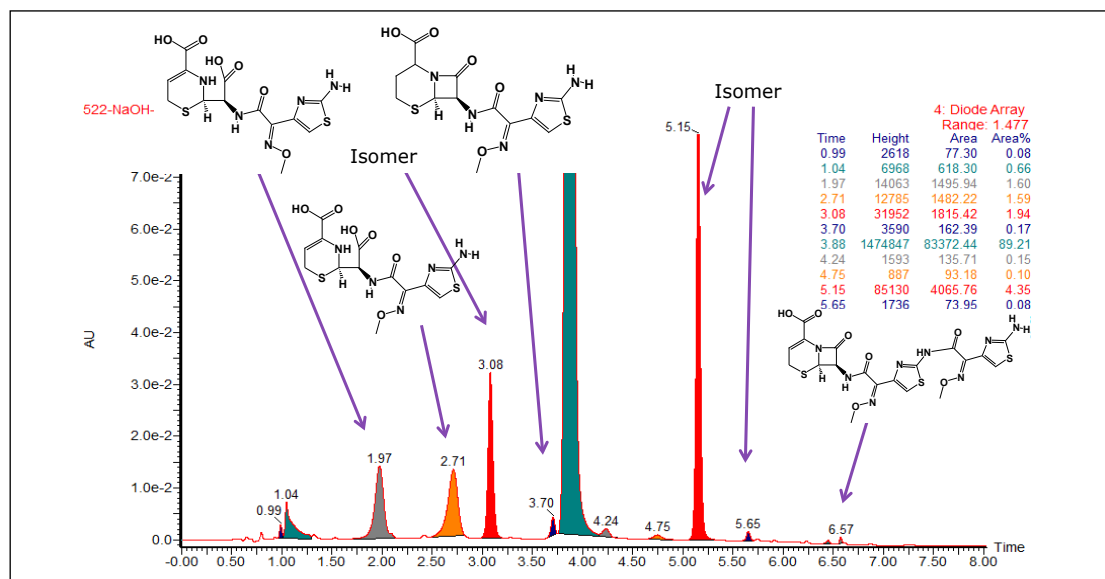


图14. 系统适用性样品中各杂质的具体结构。

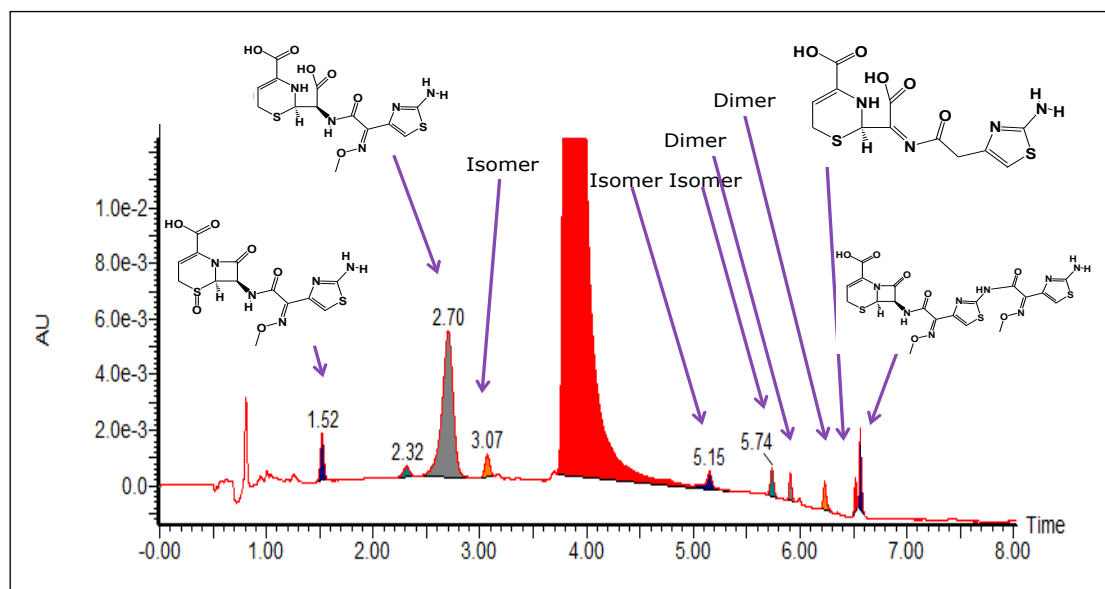


图15. 头孢唑肟钠注射用市售样品中各杂质的具体结构。



## 结论

在磷酸盐缓冲盐、离子对试剂等质谱不兼容流动相条件下，快速鉴定各种杂质结构一直是药物研究的一个难题。应用Waters® 二维ACQUITY UPLC技术结合Xevo G2-S QToF，可完美地解决这一难题。应用UPLC可快速高效地进行检测；应用二维的阀切换技术可通过软件轻松实现杂质在一维和二维之间的切换；Xevo G2-S QToF即使在杂质含量很低的情况下也可获得最准确的分子量；通过强大的软件功能，可将复杂的结构鉴定过程变得智能而快速。另外，应用二维ACQUITY UPLC技术还能实现对极微量杂质的富集。Waters二维ACQUITY UPLC技术与Xevo G2-S QToF的联用将对药物中有关物质的研究起到积极推动作用。

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, Xevo, UPLC, MassLynx, XBridge和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。MassFragment是沃特世公司的商标，其它所有商标均归各自拥有者所有。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。

沃特斯中国有限公司  
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866  
上海：021 - 6156 2666  
广州：020 - 2829 6555  
成都：028 - 6554 5999  
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676  
[www.waters.com](http://www.waters.com)