

药典方法磷酸盐流动相体系下注射用头孢噻吩钠药品中杂质的鉴定

——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

解决使用磷酸盐等不挥发盐做流动相时，杂质鉴定的难题。

沃特世解决方案

二维ACQUITY UPLC® 技术

Xevo® G2-S QToF质谱仪

Symmetry® C₁₈ 150×4.6 mm, 3.5 μm

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 50×2.1 mm, 1.7 μm色谱柱

关键词

二维、UPLC、QToF、杂质鉴定、头孢噻吩、药典

背景介绍

在我国的药典中，有很多药品的有关物质检测项使用的为磷酸盐缓冲试剂、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、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LC/MS。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，污染质谱仪，所以统称这类流动相为质谱不兼容流动相。

沃特世(Waters®)推出二维ACQUITY UPLC 技术，可有效解决在使用质谱不兼容流动相，用质谱来鉴定杂质的问题。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，使一维体系中感兴趣的峰切入二维体系中(中心切割法)，再进一步进行杂质鉴定。

头孢噻吩钠(Cefalotin Sodium)为第一代头孢菌素，抗菌谱广。中国药典中使用的为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、色谱柱及其他液相条件进行分离；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。本文采用二维ACQUITY UPLC /Xevo G2-S QToF对注射用头孢噻吩钠市售样品中杂质进行鉴定。

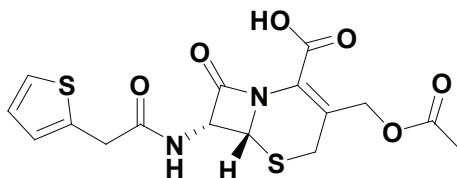


图1. 头孢噻吩(Cefalotin)C₁₆H₁₆N₂O₆S₂。

UPLC 条件

LC系统: Waters ACQUITY UPLC H-Class 系统
二维技术

- 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)

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: 500 °C
 雾化气流速: 800 L/h
 锥孔气流速: 50 L/h
 采集模式: MS^E

软件

MassLynx® 4.1

实验

样品制备

一维液相条件

流动相A: 磷酸盐缓冲液(pH2.5)-乙腈(970: 30)
 流动相B: 磷酸盐缓冲液(pH2.5)-乙腈(600: 400)
 色谱柱: Symmetry C₁₈ 150×4.6 mm, 3.5 μm
 柱温: 40 °C
 样品室温度: 5 °C
 流速: 0.80 mL/min
 进样量: 10 μL

梯度表

时间	流速	%A	%B	曲线
0	0.800	100	0	初始
30.0	0.800	0	100	6
35.0	0.800	0	100	6
36.0	0.800	100	0	6
41.0	0.800	100	0	6

二维液相条件

流动相A: 0.1% FA H₂O
 流动相B: 0.1% FA ACN
 柱温: 40 °C
 流速: 0.45 mL/min
 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 50×2.1 mm, 1.7 μm
 梯度: 切峰后开始B相5 min由5到70%

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/H₂O
 捕集柱: HLB C₁₈ 2.1×30 mm

二维UPLC流路示意图

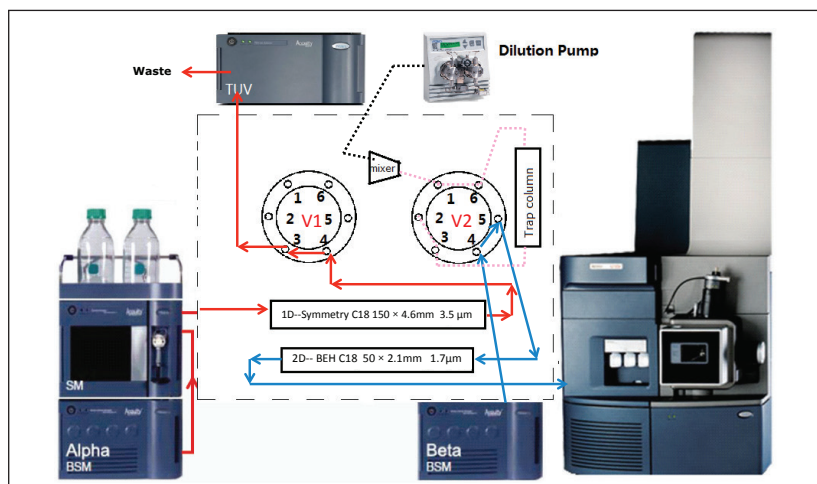


图2. Step1. 作为一维液相时的流路。

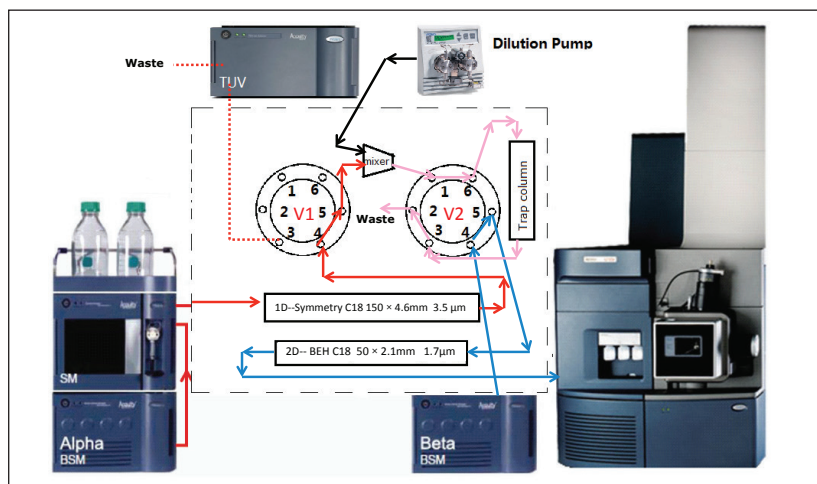


图3. Step2. 将一维中感兴趣的峰切出, 进行柱前稀释, 将感兴趣峰捕集至捕集柱上, 并进行脱盐。

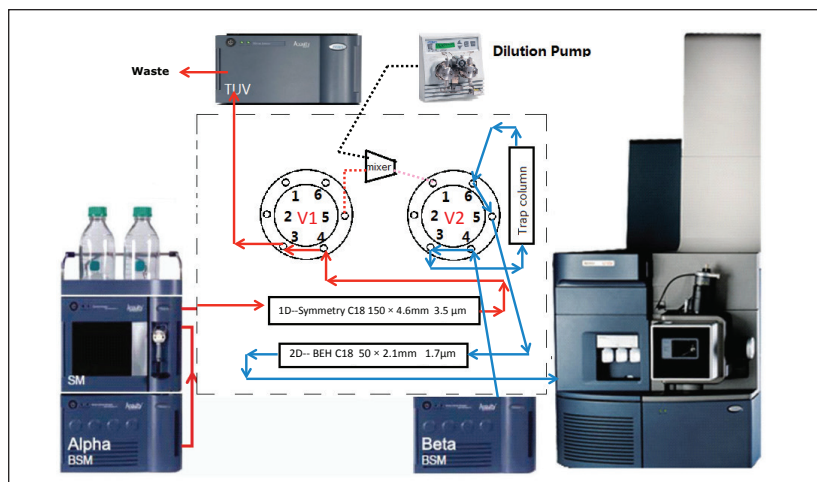


图4. Step3. 将捕集柱上样品反冲至二维色谱柱上进行分离后进入质谱系统。

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) 头孢噻吩钠样品溶液的一维紫外图。即药典上规定的方法得到的谱图。

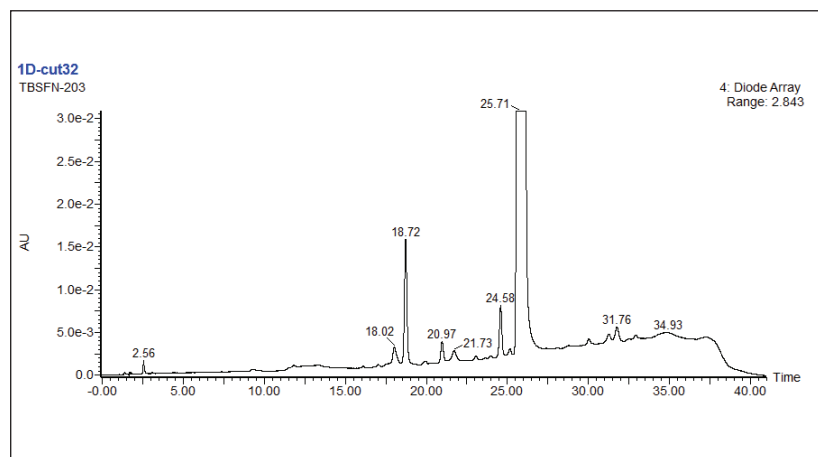


图5. 按照中国药典规定, 使用磷酸盐做流动相、HPLC的 C_{18} 色谱柱得到的紫外色谱图。

(2) 因头孢噻吩钠样品中较大峰如RT 18.72 min、RT 24.58 min杂质在中国药典中已有阐述, 现以难度较大的低含量杂质鉴定作为研究的目标。如鉴定RT 31.76 min杂质, 其鉴定过程如下: 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6最上面谱图中蓝色区间, 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6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6下, 为RT 31.76 min杂质切入质谱后得到的一级总离子流图。QToF质谱采用 MS^E 的采集方式, 同时得到一级质谱和二级质谱(如图7), 可通过软件自动进行元素组成分析确定分子式(如图8), 自动进行二级质谱碎片匹配, 确定可能结构(如图9)。

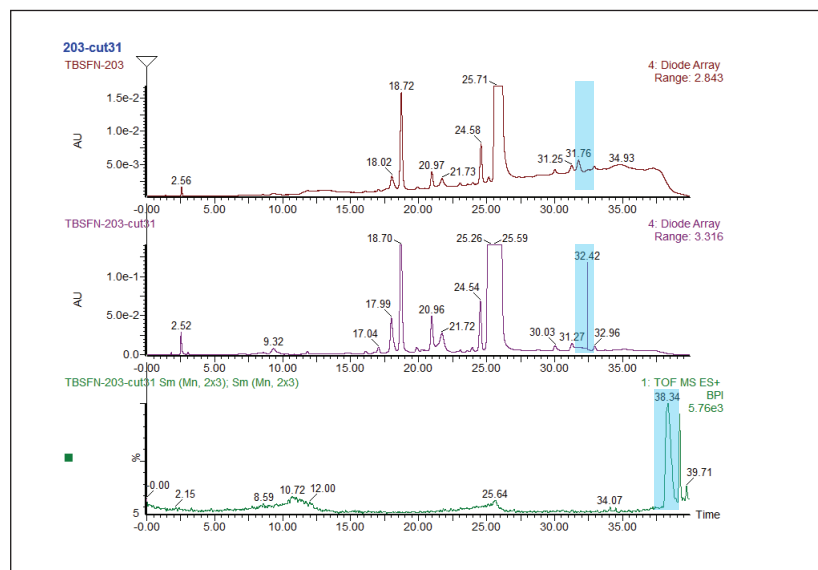


图6. 从上至下: 1为样品一维的紫外色谱图; 2为将RT 31.76 min的杂质切至二维后的一维紫外色谱图; 3为RT 31.76 min杂质切入二级质谱后得到的总离子流图。

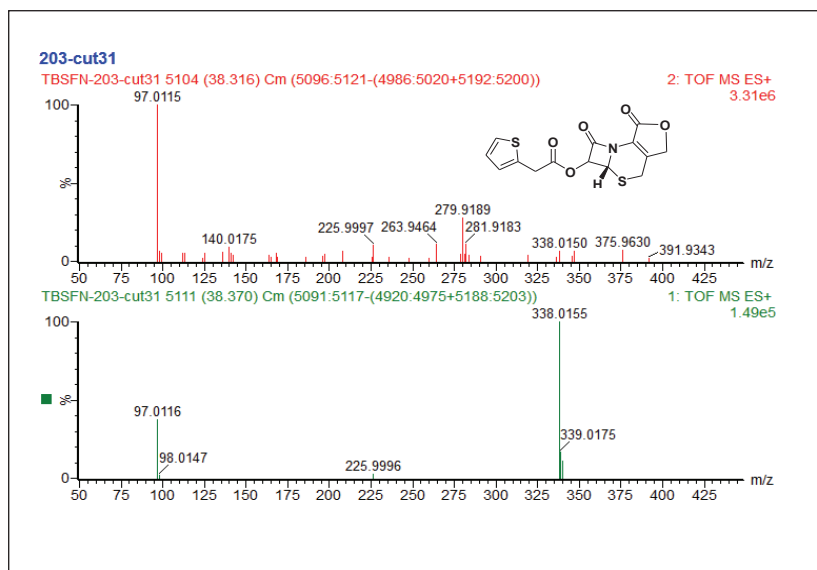


图7. RT 31.76 min杂质的一级(下)及二级(上)质谱图, 及其可能结构。

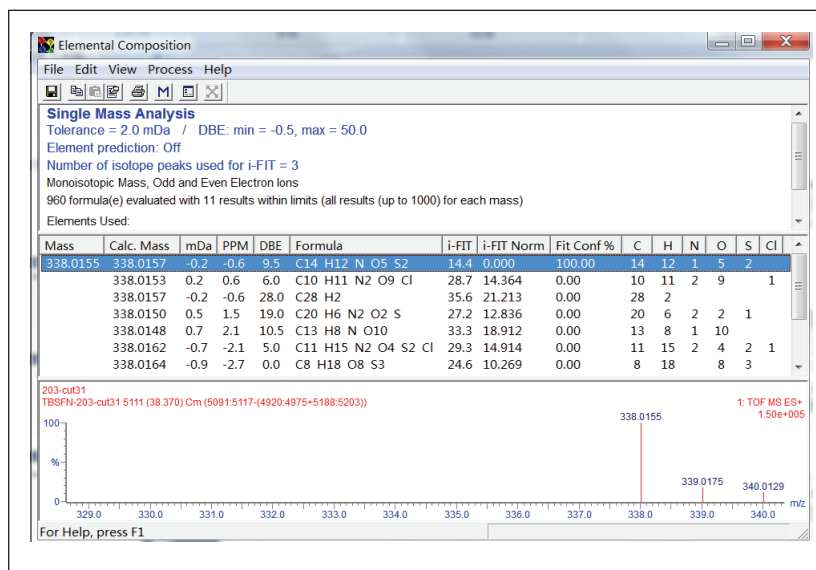


图8. 软件自动确定RT 31.76 min杂质最可靠的分子式(通过质量偏差和同位素分布)。

(3)使用二维系统还可以一次切几个峰进入二维系统, 以提高效率, 如图9所示, 将RT 18.02 min、RT 31.25 min杂质依次切入到二维系统。在切RT 18.02 min时, 由于时间设置稍宽将一部分的RT 18.72 min的杂质同时切入了二维系统中, 使二维质谱图中RT 21.92 min峰较宽, 如适当调整二维液相梯度, 可将两个峰分开, 此处目的为杂质鉴定, 即使杂质未完全分开, 也可进一步对数据进行分析。图10为二维质谱图中RT 21.92 min杂质的一级和二级质谱图(即一维紫外谱图中RT 18.02 min的杂质), 及其可能结构。

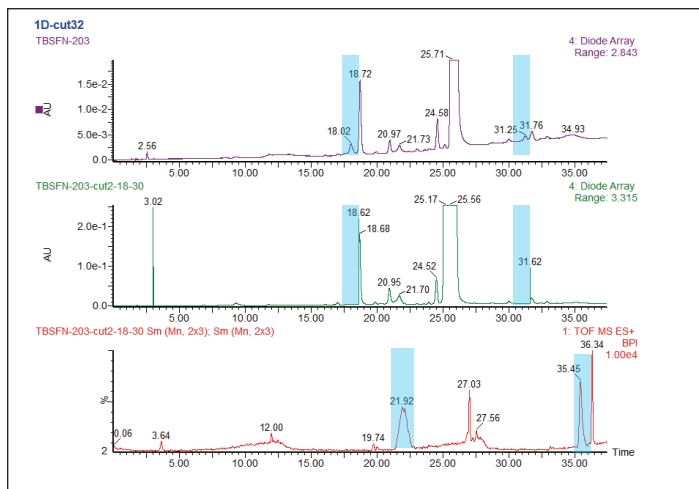


图9. 将RT 18.02 min、RT 31.25 min杂质依次切入到二维系统得到相应质谱图。从上至下: 1为样品一维的紫外色谱图; 2为将RT 18.02 min、RT 31.25 min的杂质切至二维后的一维紫外色谱图; 3为RT 18.02 min、RT 31.25 min杂质切入二维质谱后得到的总离子流图。蓝色部分为色谱峰改变处。

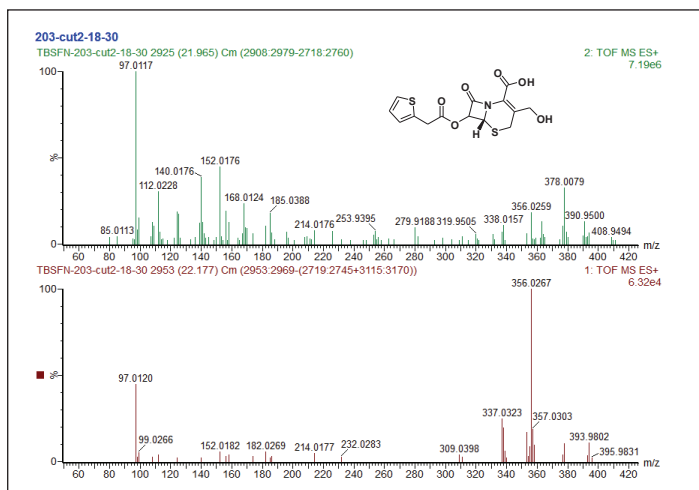


图10. 为二维质谱图中RT 21.92 min杂质的一级和二级质谱图, 及其可能结构。

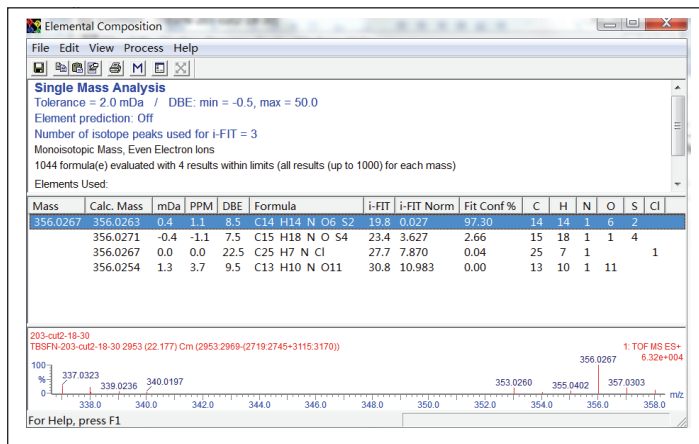


图11. 软件自动确定一维UV谱图中RT 18.02 min杂质最可靠的分子式(通过质量偏差和同位素分布)。

(4)通过二维系统,在系统运行稳定时,即使相距很近的峰也可以进行中心切割。或者同时将几个杂质峰切入二维体系,在二维体系再采用合适的方法将几个杂质分开再进行鉴定。

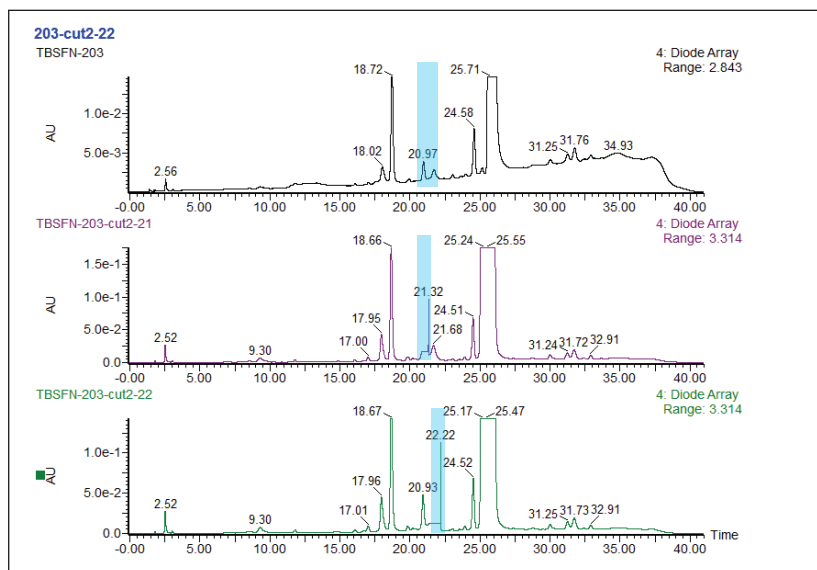


图12. 相距很近的峰也可以进行中心切割。上图为1D的紫外色谱图; 中图为切去RT 20.97 min杂质后的紫外色谱图; 下图为切去RT 21.68 min杂质的紫外色谱图。

(5)对含量很低的杂质,如RT 32.91 min,由于含量很低,直接切入二维后得到的质谱图如图13(4),响应较低,对这类杂质可采用加大进样量,或者连续进样多次,将多次的RT 32.91 min同时捕集到捕集柱上,再一次将其洗脱,提高灵敏度。如图13(3)。

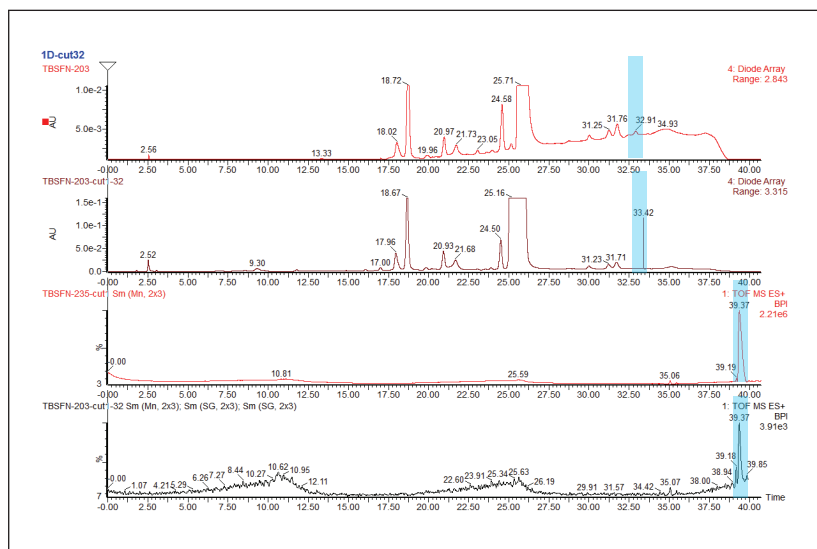


图13. 将RT 32.91 min杂质切入到二维系统得到相应质谱图。从上至下: 1为样品一维的紫外色谱图; 2为将RT 32.91 min的杂质切至二维后的一维紫外色谱图; 3为RT 32.91 min杂质多次进样捕集到捕集柱上后,一次洗脱至质谱后得到的总离子流图,灵敏度大大提高; 4为RT 32.91 min杂质直接切至二维质谱后得到的总离子流图。蓝色部分为色谱峰改变处。

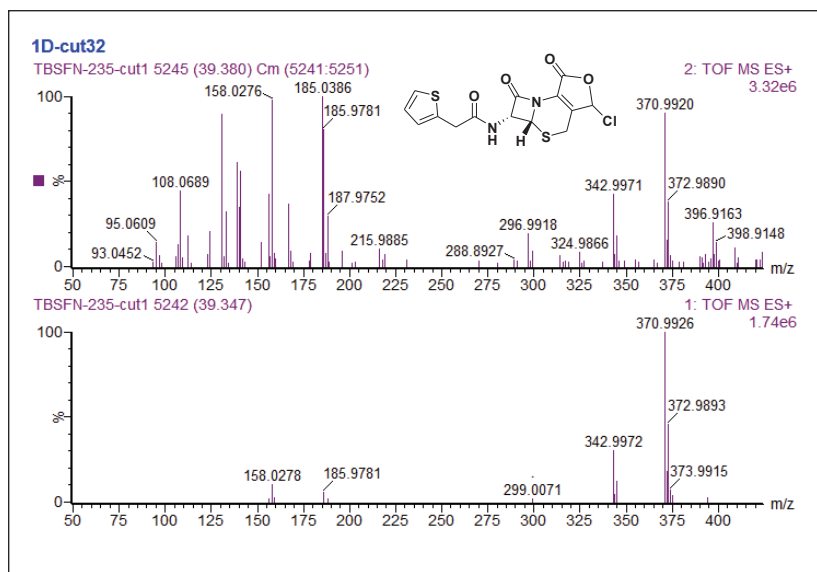


图14. RT 32.91 min杂质的一级质谱图(下)、二级质谱图(上)及可能结构。

讨论

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技术与Xevo G2-S QTof联用,可完美的解决这一难题。应用UPLC可快速高效的进行检测;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可获得最准确的分子量,即使是杂质含量很低时;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技术还实现对很微量的杂质进行富集。应用Waters二维ACQUITY UPLC技术与Xevo G2-S QTof联用将对药物的有关物质研究工作起到积极的推动作用。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、Symmetry、MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司

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 5999

成都: 028 - 6578 4990

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800(400)820 2676

www.waters.com