

二维杂质鉴定系统在头孢曲松钠聚合物杂质定性分析中的应用

LCMS-IT-TOF-043

摘要： 本文使用 2D LC/LCMS-IT-TOF 杂质鉴定系统对一种 β -内酰胺类抗生素 - 头孢曲松钠的聚合物杂质进行定性分析。通过 1stD GFC 的分离获得杂质馏分，再经过 2nd LC 反相色谱分离脱盐后进入离子阱飞行时间质谱分析，多级质谱结果显示杂质同主药在质谱上有相同的离子和碎片信息，综合液相分离和质谱结果，可以准确认定 GFC 分离的杂质为头孢曲松钠的聚合物，为该类物质的定性鉴定提供准确可靠的方法。

关键词： 头孢曲松钠聚合物杂质 2D LC LCMS-IT-TOF

头孢菌素属于 β -内酰胺类抗生素，研究表明其高分子杂质是引发药物临床速发型过敏反应的主要因素。高分子杂质主要为内源性杂质，又称自身聚合类高分子杂质，目前质量控制也以高分子聚合物为主，现行中国药典已收载该类药物的质量标准，对其中的聚合物杂质进行凝胶过滤色谱分析。然而传统液相方法进行定性确认往往可靠性不足，由于流动相的因素也不能与质谱联

用进行疑似杂质的准确判定。

岛津 2D LC/LCMS-IT-TOF 杂质鉴定系统可在不改变 1stLC 流动相条件的基础之上进行液质联用分析，并且通过多级高分辨质谱信息为杂质定性提供准确的结果。本文以头孢曲松钠为例，介绍了聚合物杂质的分析方法，可为该类型样品的定性分析提供参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 2D LC/LCMS-IT-TOF 杂质鉴定系统。具体配置为 LC-20AD \times 4(输液泵), SIL-20AC(自动进样器), CTO-20AC(柱温箱), CBM-20A(系统控制器), DGU-20A₅(在线脱气机), SPD-M20A(二极管阵列检测器), SPD-20A(UV 检测器), FCV-12AH \times 3(流路选择阀), FCV-14AH \times 2(色谱柱切换阀), LCMS-IT-TOF(离子阱-飞行时间质谱仪)和 LCMSsolution Ver.3.70(色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

<1stD LC >

色谱柱: TSKgel G2500PW_{XL}, 7.8 mm I.D. \times 30 cm, 7 μ m

保护柱: TSK guardcolumn PW_{XL}, 6.0 mm I.D. \times 4.0 cm, 7 μ m

流动相: 0.03 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (61:39)

磷酸盐缓冲液

流速: 0.6 mL/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L

检测波长: 254 nm

时间程序: 等度洗脱

<2ndD LC >

色谱柱: InertSustainTM C18, 2.1 mm I.D. \times 50 mm, 2 μ m

流动相: A 相 -0.1% 甲酸 - 水溶液;

B 相 -0.1% 甲酸 - 乙腈;

流速: 0.3 mL/min

柱温: 35 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L(Loop 环体积)

检测波长: 254 nm

时间程序: 见下表 (1.5 min 后阀切换流路进质谱)

表1 2nd LC梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.5	Option Box vp	Valve A Position	1
3.00	Pumps	B.Conc3	5
8.00	Pumps	B.Conc3	30
10.00	Pumps	B.Conc3	30
10.10	Pumps	B.Conc3	5
12.00	Controller	Stop	

1.3 质谱条件

分析仪器：LCMS-IT-TOF

离子源：ESI(+)

接口电压：4.5 kV

扫描范围：一级质谱：m/z 200 ~1500；

自动多级：m/z 100 ~1000；

雾化气：氮气 1.5 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200℃

加热模块温度：200℃

检测器电压：1.6 kV

校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

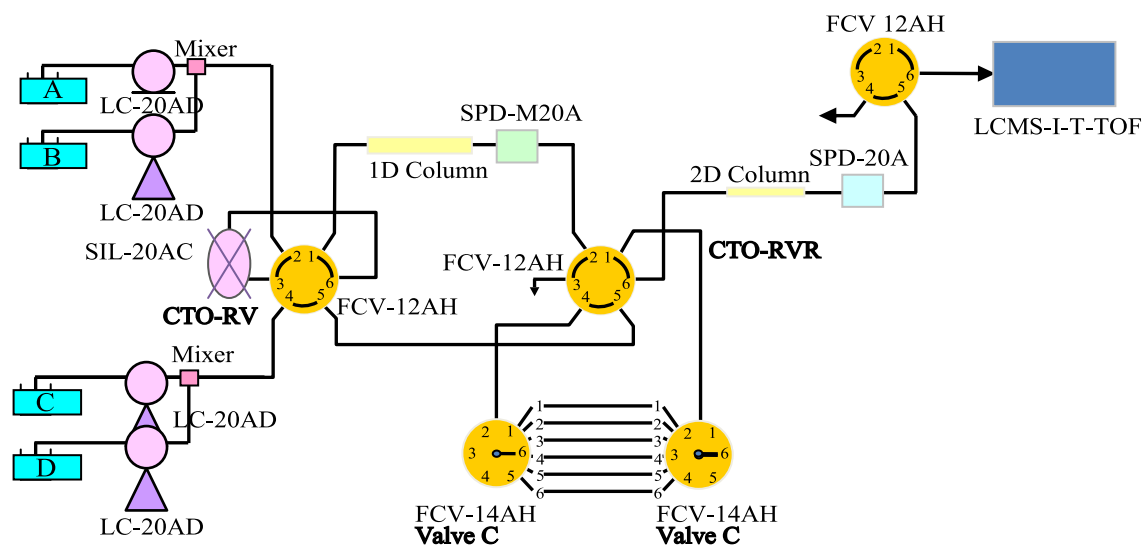


图1 2D LC/LCMS-IT-TOF杂质鉴定系统流路图

分析结果

2.1 不同来源样品 GFC 分析

参考《中国药典(2010版)》等相关文献，对头孢曲松钠进行GFC分离，主成分及聚合杂质的分离结果如下图所示。

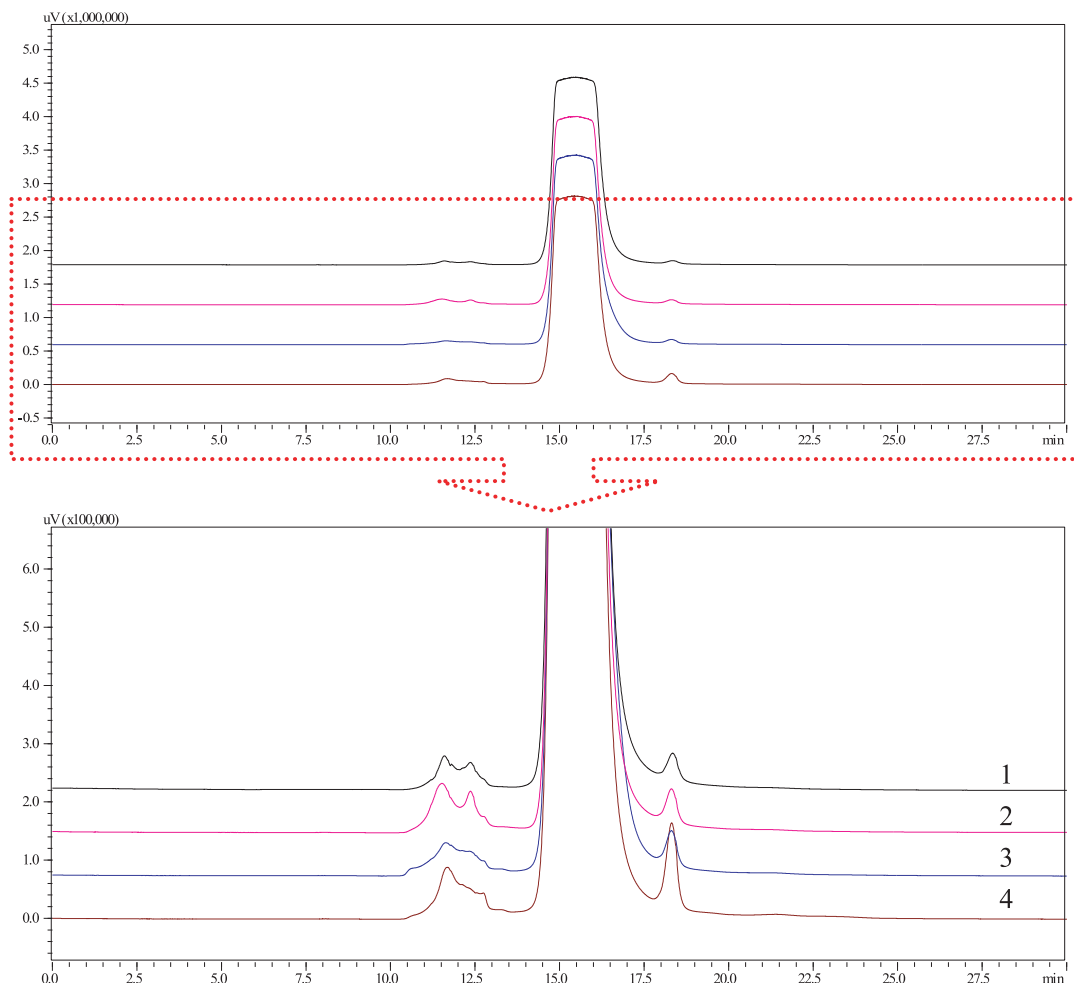


图2 不同来源头孢曲松钠GFC色谱图(检测波长254 nm)

(1. 商品头孢曲松钠粉针剂 2. 头孢曲松钠对照品 3. 光破坏头孢曲松钠 4. 高温破坏头孢曲松钠)

如图2所示，保留时间 11-12.5 min 内有相对明显两个色谱峰，文献中认定该处为头孢曲松钠聚合物，不同来源样品中均含有相同杂质。

2.2 2nd LC 聚合物色谱分析

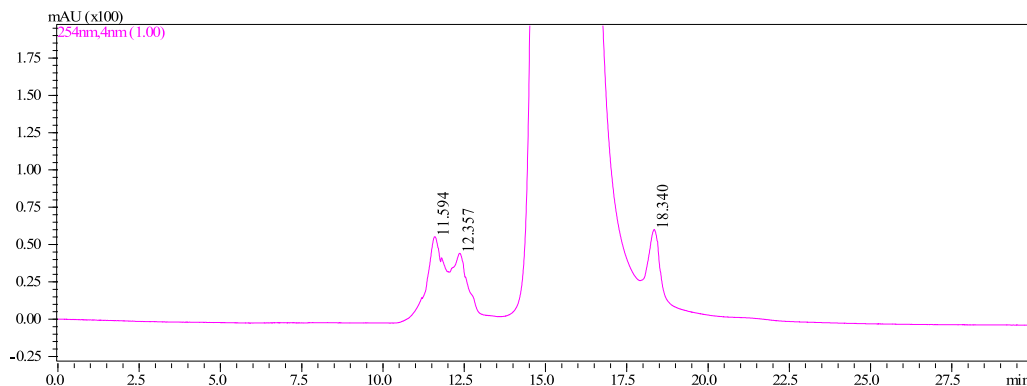


图3 商品头孢曲松钠粉针剂GFC色谱图

以商品头孢曲松钠粉针剂为例，通过 2nd LC 对聚合物杂质定性分析。图3中保留时间为 11.594, 12.357 和 18.340 min 的杂质 1、2、3 分析条件参见“1.2 液相色谱条件”项下。

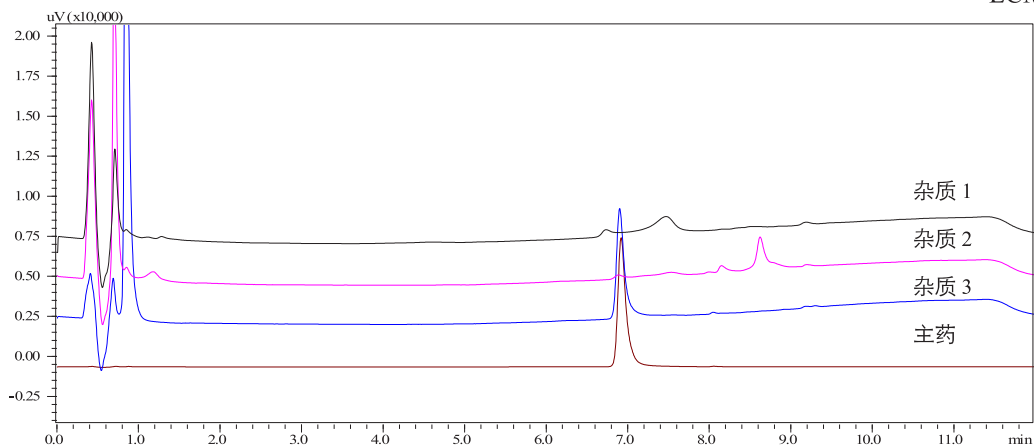


图4 商品头孢曲松钠粉针剂中主药及杂质1、2、3色谱图比较(检测波长 254 nm)

以上结果显示，1st LC 分析结果中头孢曲松钠的聚合物同主药在反相 C18 色谱上有不同的保留行为，保留时间 11.594 min 的杂质 1 在 C18 柱上保留时间长于主药符合相关文献中聚合物的表述；杂质 3 同主药保留时间相同。

2.3 杂质和主药高分辨质谱对比

对图 3 中所获杂质进行多级质谱分析，结果如下图。

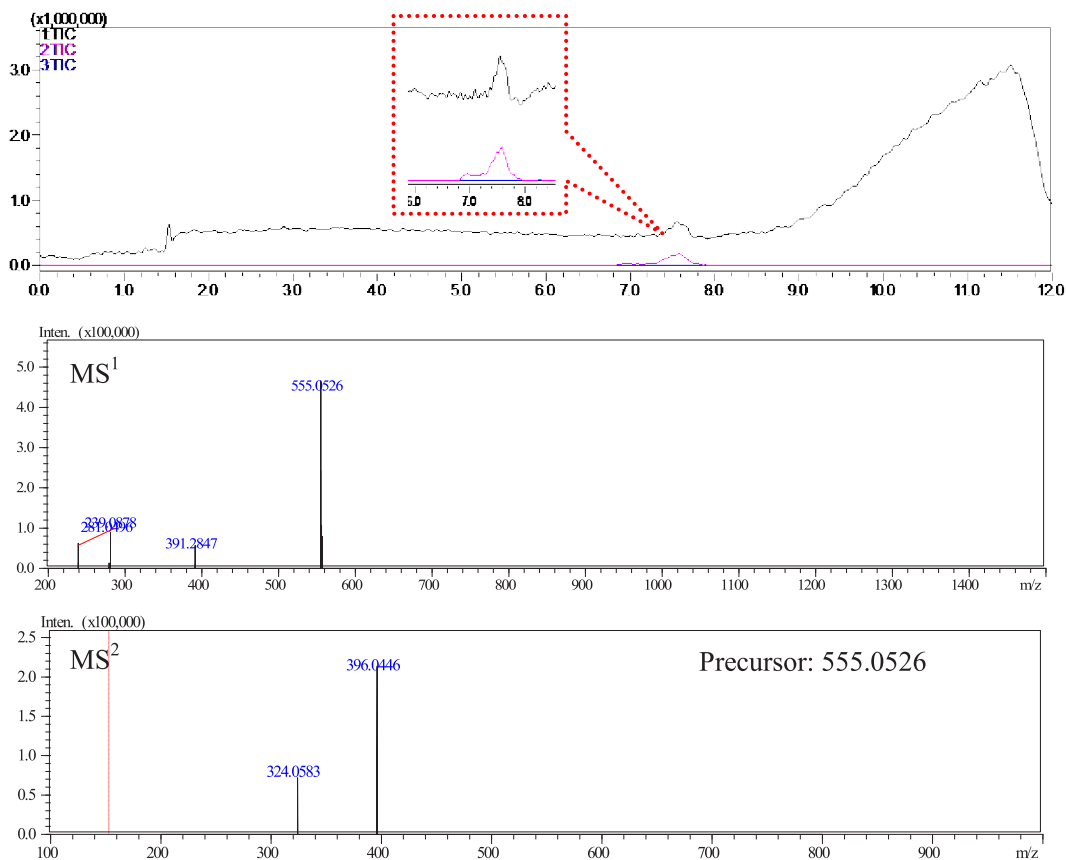


图5 杂质1的离子流图和多级高分辨质谱图

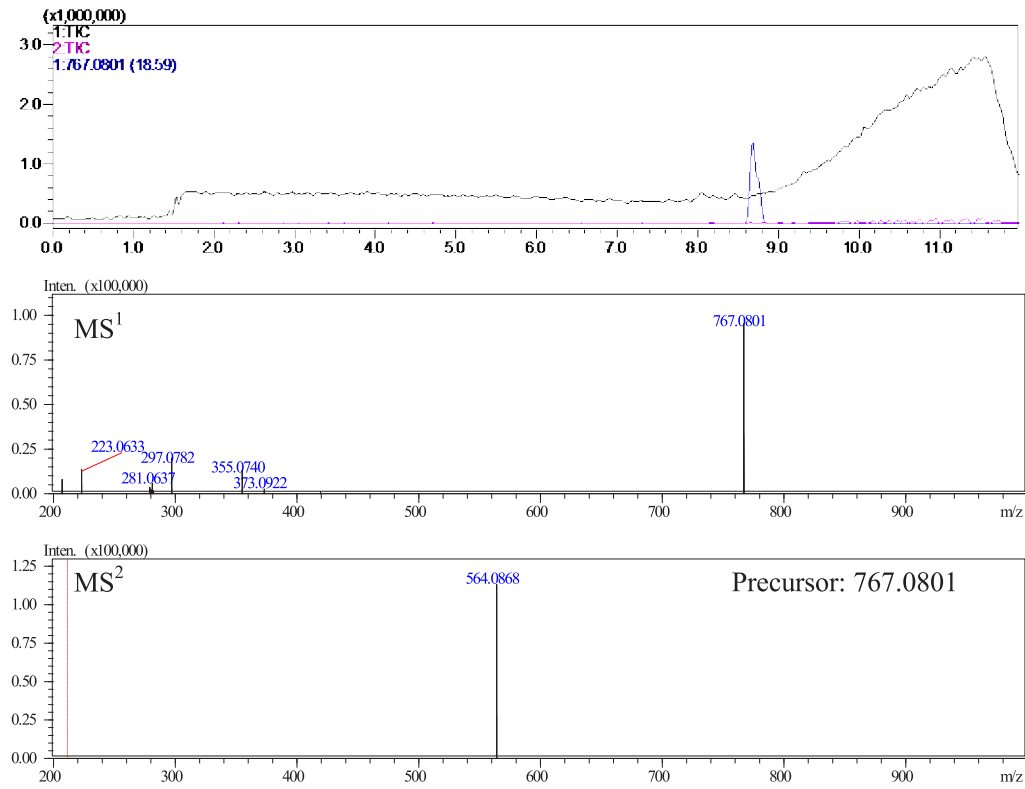


图6 杂质2的离子流图和多级高分辨质谱图

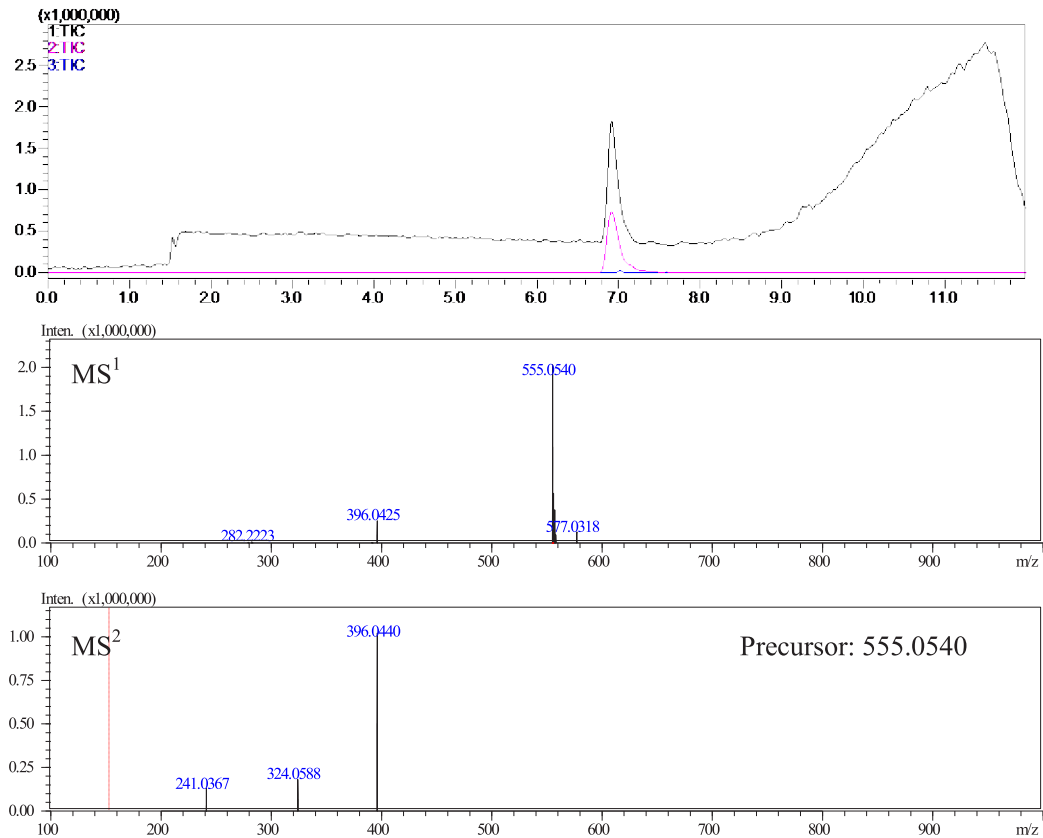


图7 杂质3的离子流图和多级高分辨质谱图

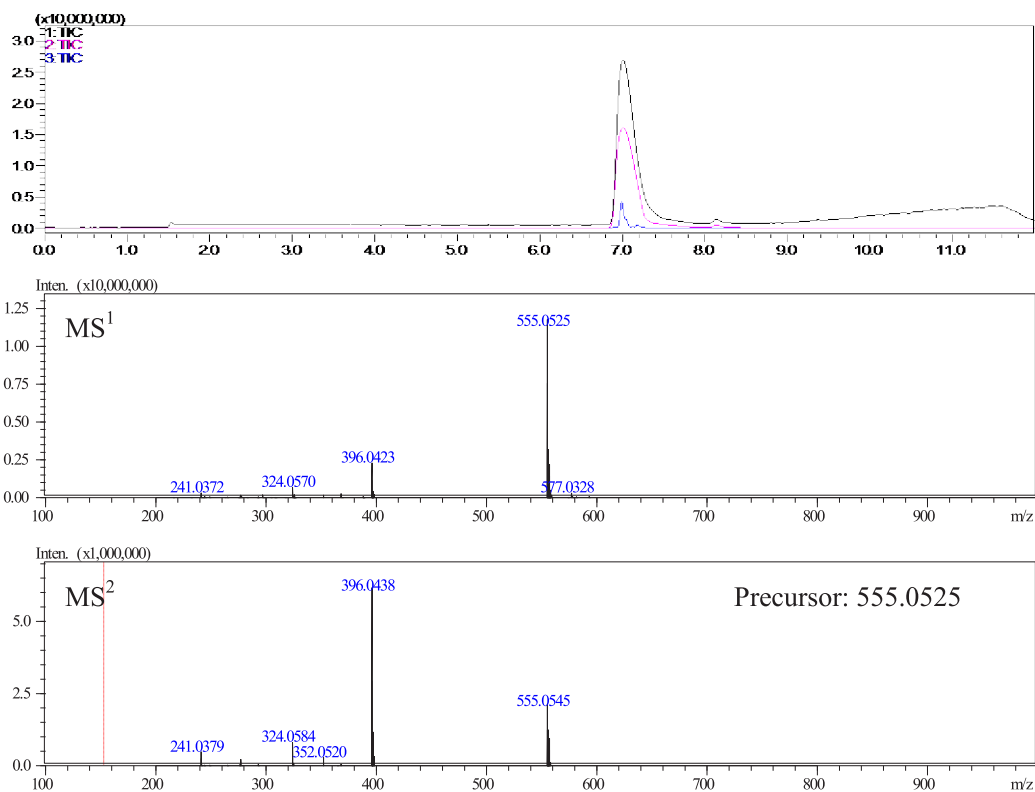


图8 主药头孢曲松钠的离子流和多级高分辨质谱图

Formula Predictor - 主药MSn_LCMS analysis_2ndD-Loop1-MSn.lcd

File Edit View Help

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.993 -> 7.260 - 6.373 -> 8.003 Measured m/z: 555.0525 Charge: 1

Active Min Max
 H 0 300
 C 0 100

+/- Adduct Use
 + CH4CN ✗
 + H ✓

Error Margin: 5 ppm

DBE Range: Fixed -2.0 - 1000.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule
 Use Fragment Info (MSn)
 500 Maximum Results
[Advanced Settings...](#)

Calculate

Measured region for 555.0525 m/z

C18 H18 N8 O7 S3 [M+H]⁺ : Predicted region for 555.0533 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Diff (mDa)	Diff (ppm)	Iso Score	DBE
1	98.90	C18 H18 N8 O7 S3	[M+H] ⁺	555.0525	555.0533	-0.8	-1.44	100.00	14.0
2	76.15	C30 H14 N6 S3	[M+H] ⁺	555.0525	555.0515	1.0	1.80	77.70	27.0
3	74.80	C29 H18 N2 O4 S3	[M+H] ⁺	555.0525	555.0501	2.4	4.32	81.57	22.0

Ready 16:31

图9 头孢曲松钠多级质谱分子式预测

通过图 5-8 发现，杂质 1 和主药具有相同的一级和多级质谱特征，经过分子式预测软件计算， m/z 555.0525 为头孢曲松 ($C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$) 的 $[M+H]^+$ 峰，质量数偏差 -1.44 ppm；杂质 2 为 m/z 767.0801；杂质 3 同主药具有相同的一级和多级质谱特征。

综合 2D LC/LCMS-IT-TOF 杂质鉴定系统液相分离结果和高分辨质谱结果可知，使用 1st LC 参考药典和文献头孢曲松钠聚合物杂质的 GFC 分析方法分离获得的杂质 1，同主成分头孢曲松在反相色谱上的保留行为的差异，满足头孢类抗生素聚合物的极性小于主药的一般特性；多级高分辨质谱分析结果表明，杂质 1 具有和主药头孢曲松钠相同的分子离子和碎片离子，以上结果可以确定杂质 1 为头孢曲松的聚合物杂质。但是并未从一级质谱上获得聚合类型的相关信息，考虑可能为头孢曲松钠由范德华力聚合而成的结构在 ESI 离子化过程中已经解离成为单体形式。

■ 结论

本研究以传统凝胶过滤色谱 (GFC) 分析头孢曲松钠中聚合物杂质分析方法为基础，通过使用 2D LC/LCMS-IT-TOF 杂质鉴定系统，在不改变一维非挥发缓冲体系流动相组成的情况下对聚合物杂质进行液质联用定性分析，实现了头孢曲松钠中聚合物杂质的质谱定性确认。该实验首次实现了非挥发性 GFC 流动相体系串接质谱分析聚合物；根据已有文献可知，为首次使用质谱手段进行的头孢曲松钠中聚合物研究，为该类及类似样品中聚合物的研究提供了新的思路和分析方法，具有广阔的应用前景。