

市售头孢地尼 (Cefdinir) 药品中杂质快速自动鉴定 ——应用ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QToF 系统及UNIFI软件

王志英

沃特世科技（上海）有限公司

应用优势

- 使用亚2 μm色谱柱，提高分析效率。
- 通过UNIFI软件快速自动进行杂质鉴定、解析及报告，节省人力及时间。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®

Xevo® G2-S QToF质谱仪

UNIFI® 软件

ACQUITY BEH C₁₈, 100×2.1 mm, 1.7 μm色谱柱

关键词

UPLC®, QToF, 杂质鉴定, UNIFI, 头孢地尼

简介

头孢地尼 (Cefdinir) 属第3代头孢，日本藤泽药品工业公司原研，1991年首次在日本上市，商品名Cefzon。1997年12月在美国上市，2001年国产头孢地尼获准在中国上市。该品具有抗菌谱广、抗菌作用强、临床疗效高、毒性低、过敏反应少、方便使用等特点。近年来，国内已准备开发其仿制药。但如今基于药品安全的考虑，仿制药中的有关物质的检测越发引起注意，中国药典上也明确规定，药物中杂质含量高于0.1%的所有杂质均需对其杂质结构进行鉴别（毒性药物限度则更低）。所以，如何高效快速地测定药物中的杂质，这一课题逐渐成为药物研究过程中亟待解决的难题。

中国药典中头孢地尼有关物质检测方法所用的流动相为四甲基氢氧化铵——磷酸 (pH5.5) 体系，无法进MS系统；采用普通HPLC色谱柱检测方法时间长，约需60 min，且杂质较多。这都给头孢地尼杂质鉴定带来挑战。

本文采用沃特世 (Waters®) 超高效液相色谱飞行时间质谱联用 (ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QToF) 技术对市售头孢地尼样品杂质进行分析，开发与质谱兼容的UPLC方法，使整个分离时间缩短至14分钟，且杂质得到有效分离；应用UNIFI软件，自动得到包含各个杂质分子量、分子式及结构信息的杂质列表，使整个杂质鉴定过程高效快速、节省人力。

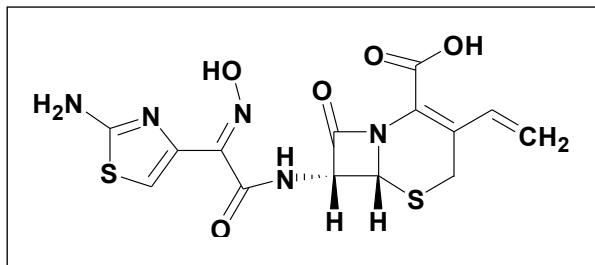


图1. 头孢地尼 (Cefdinir) C₁₄H₁₃N₅O₅S₂e

实验

样品制备

称取cefzon样品40 mg于25 mL容量瓶中，用醋酸铵溶液（流动相A相）溶解。超声后离心，去上层清液进液质系统。

色谱条件

LC系统： ACQUITY UPLC
 色谱柱： BEH C₁₈, 100×2.1 mm, 1.7 μm
 (部件号：186002352)
 柱温： 25 °C
 进样量： 4 μL
 流速： 0.40 mL/min
 流动相A： 10 mM醋酸铵
 (醋酸调pH4.6) 水溶液
 流动相B： MeOH/ACN (1/1)
 梯度表：

时间	流速	%A	%B	曲线
0	0.400	95.0	5.0	初值
6.17	0.400	87.0	13.0	6
9.29	0.400	75.0	25.0	6
11.38	0.400	30.0	70.0	6
11.59	0.400	95.0	5.00	6
14.00	0.400	95.0	5.00	1

MS条件

MS系统： Xevo G2-S QTof
 离子化模式： ESI+
 毛细管电压： 2.0 kV
 源温度： 120 °C
 雾化气温度： 500 °C
 雾化气流速： 900 L/h
 锥孔气流速： 50 L/h
 采集模式： MS^E
 采集质量范围： 100~1200

PDA检测器

紫外检测波长： 254 nm

软件

UNIFI 1.7版本

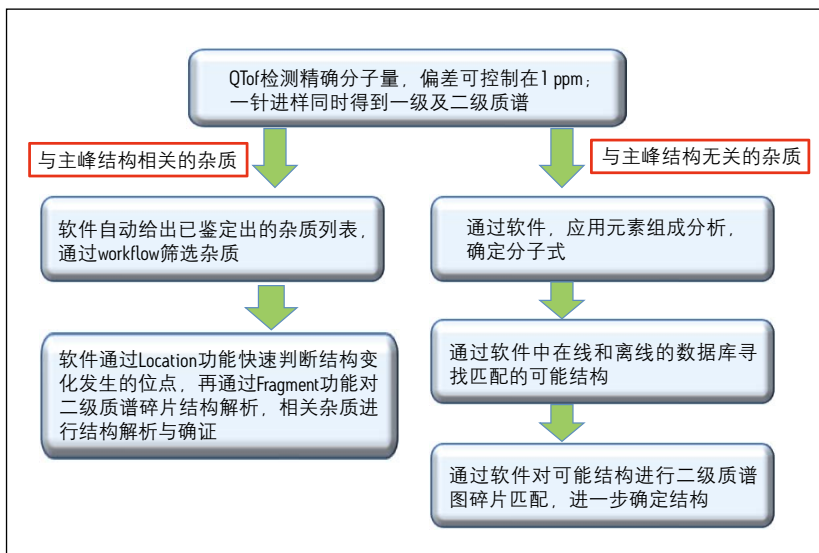


图2. 实验流程图。

结果与讨论

1. 本文使用UPLC亚2 μm C₁₈色谱柱，流动相用质谱兼容的醋酸铵体系。本方法将药典中约60分钟的方法缩短至14分钟，且杂质分离度较好。采用MS^E这种简单实用的专利技术采集样品，可以实现进样一次便可同时得到一级质谱图和丰富的离子碎片信息，其中包括母离子扫描、子离子扫描和中性丢失扫描的结果，并且避免了杂质信号的丢失。图3为一针进样同时得到cefzon样品紫外光谱图、一级质谱总离子流图、二级质谱总离子流图。

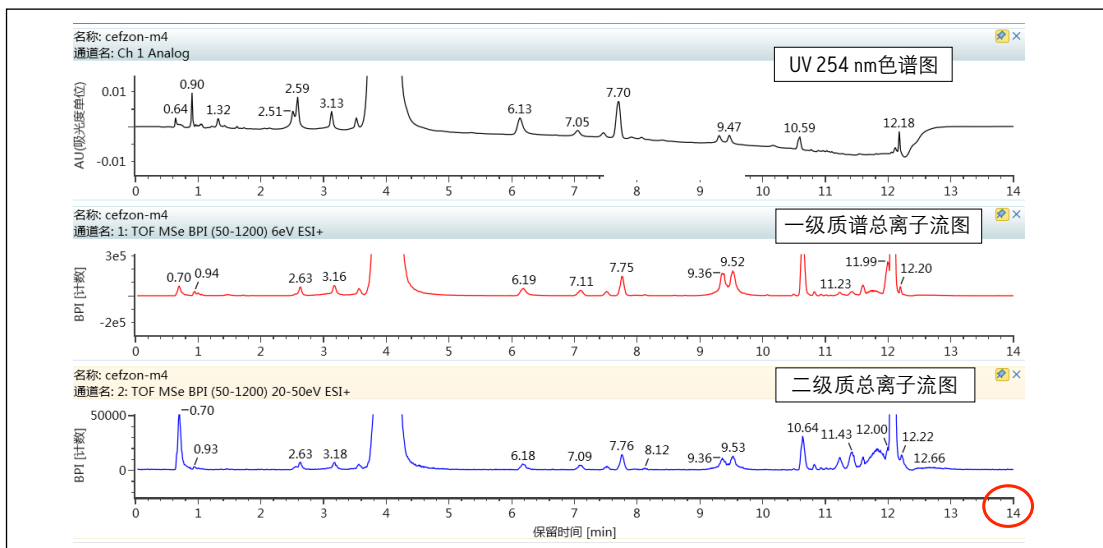



图3. 一针进样即可得到头孢地尼cefzon样品的紫外光谱图、一级质谱及二级质谱总离子流图。

2. 使用UNIFI软件将数据进行自动处理后，直接得到各杂质的提取离子流图、一级和二级质谱图。图4为主峰的分子量、分子式信息、提取离子流图、一级和二级质谱图。UNIFI软件自动对二级碎片进行匹配解析，鼠标放置于  标志上，即可查看碎片结构。图5为主峰的二级碎片解析情况。

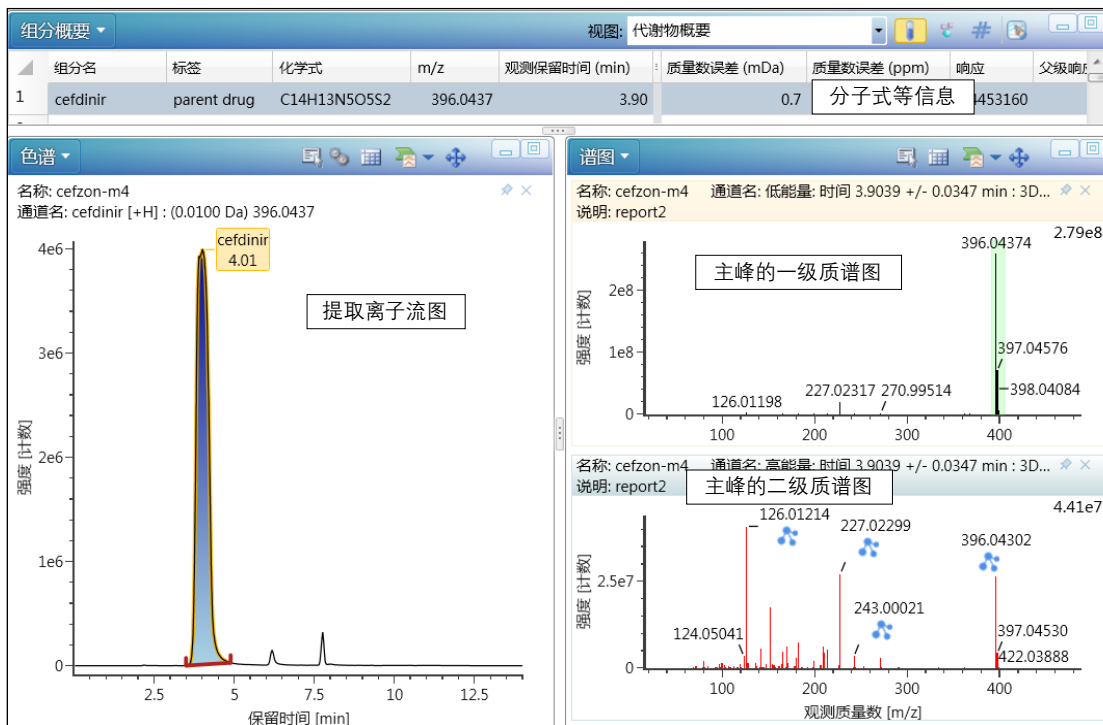


图4. UNIFI软件处理后直接得到主峰头孢地尼的提取离子流图、一级及二级质谱图。

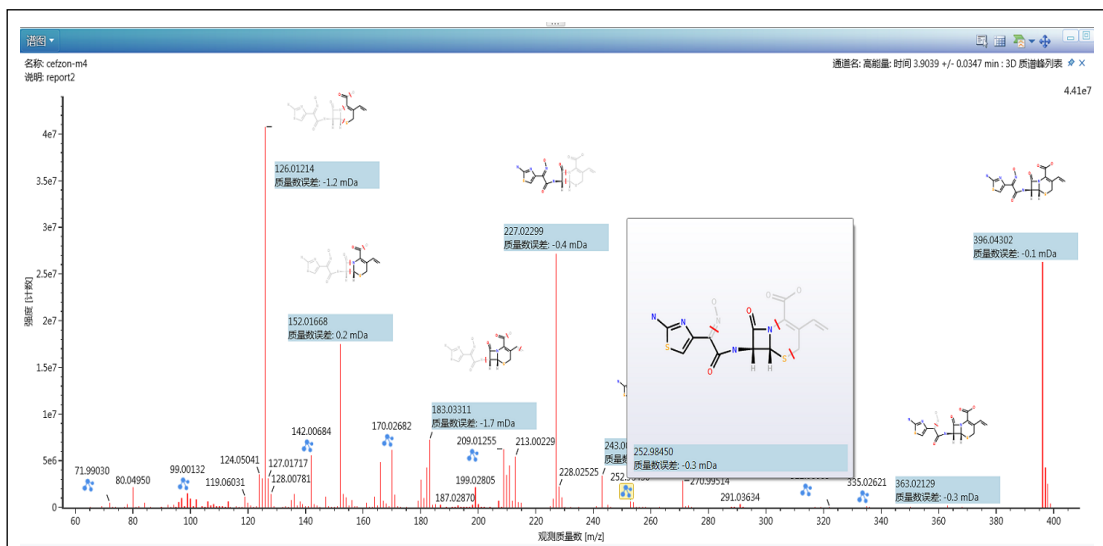




图5. UNIFI软件自动对主峰二级碎片进行解析, 鼠标放置于  标志上, 即可查看碎片结构。

3. UNIFI会自动给出已鉴定出的杂质列表,可通过左侧的工作流程 (workflow) 快速筛选出与主峰相关的杂质。如图6是UNIFI软件界面, 软件中质谱图上  标志处均对应应有结构式, 将鼠标放在标志上即可显示。图7为快速确定的杂质列表, 里面包含有 m/z 、保留时间、分子量、分子式、质量偏差、响应、响应百分比及具体的结构信息等。图7中显示出质量偏差均小于0.7 mD, 说明了Xevo G2-S QToF优良的准确性。另外, UNIFI最大的特点就是比较人性化, 其每一行列均可根据客户需求进行自定义增减。它还有多种视图方式使结果看起来更直观。如图8所示, 软件可对两针样品进行对比, 寻找差异组分或共同组分, 也可显示整个谱图的对比和某一组分在两针样品中的质谱图对比。

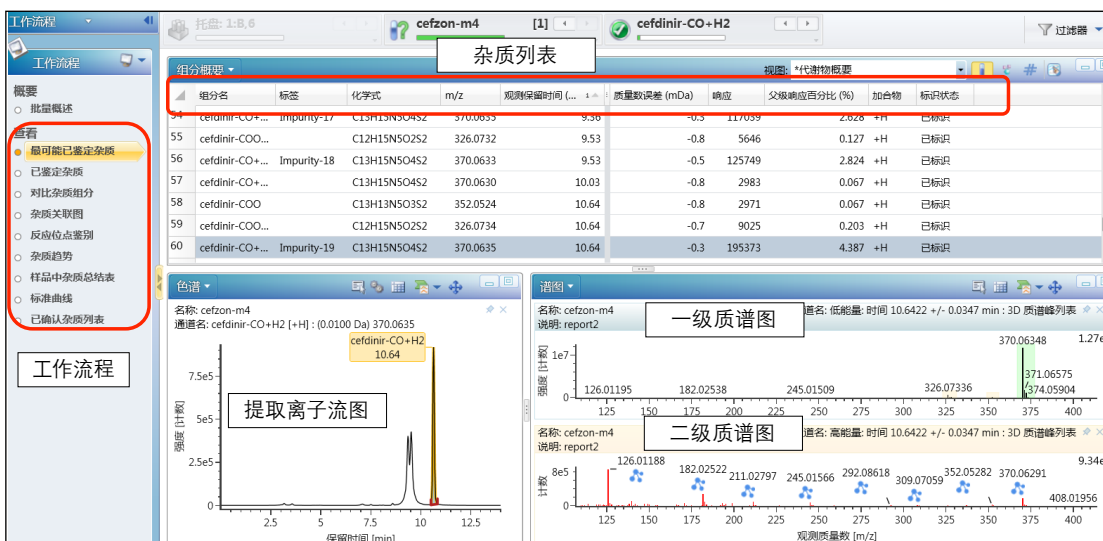


图6. UNIFI软件的人性化界面, 应用左侧工作流程快速得到杂质列表。

组分名	标签	化学式	m/z	观测保留时间 (min)	质量数误差 (mDa)	响应	父级响应百分比 (%)	加合物	标识状态	
1	cefdirinir-H2O-C7H3NOS	Impurity-1	C7H8N4O3S	229.0387	0.96	-0.3	6890	0.155	+H	已标识
2	cefdirinir-C7H5NOS	Impurity-2	C7H8N4O4S	245.0336	1.06	-0.3	2714	0.061	+H	已标识
3	cefdirinir-H2O-C7H3NOS	Impurity-3	C7H8N4O3S	229.0388	1.48	-0.1	6953	0.156	+H	已标识
4	cefdirinir+H2O	Impurity-4	C14H15N5O6S2	414.0533	2.55	-0.4	10387	0.233	+H	已标识
5	cefdirinir-CH2O+H2O	Impurity-5	C13H13N5O5S2	384.0429	2.63	-0.2	37223	0.836	+H	已标识
6	cefdirinir+H2O	Impurity-6	C14H15N5O6S2	414.0535	3.17	-0.2	46155	1.036	+H	已标识
7	cefdirinir+H2O	Impurity-7	C14H15N5O6S2	414.0534	3.57	-0.3	36649	0.823	+H	已标识
8	cefdirinir	parent drug	C14H13N5O5S2	396.0437	3.90	0.7	4453160	100.000	+H	已标识
9	cefdirinir+H2O	Impurity-8	C14H15N5O6S2	414.0531	4.63	-0.6	4589	0.103	+H	已标识
10	cefdirinir+H2O	Impurity-9	C14H15N5O6S2	414.0531	4.95	-0.6	4830	0.108	+H	已标识
11	cefdirinir-isomer	Impurity-10	C14H13N5O5S2	396.0426	6.18		49500		+H	已标识
12	cefdirinir+H2O	Impurity-11	C14H15N5O6S2	414.0533	7.10	-0.3	35293	0.793	+H	已标识
13	cefdirinir+H2O	Impurity-12	C14H15N5O6S2	414.0532	7.51	-0.5	20121	0.452	+H	已标识
14	cefdirinir-NH	Impurity-13	C14H12N4O5S2	381.0315	7.72	-0.6	10890	0.245	+H	已标识
15	cefdirinir-H2O+H2O	Impurity-14	C14H13N5O5S2	396.0427	7.76	-0.4	78788	1.769	+H	已标识
16	cefdirinir+H2O	Impurity-15	C14H15N5O6S2	414.0533	7.95	-0.4	4202	0.094	+H	已标识
17	cefdirinir+H2O	Impurity-16	C14H15N5O6S2	414.0532	8.13	-0.5	6012	0.135	+H	已标识
18	cefdirinir-CO+H2	Impurity-17	C13H15N5O4S2	370.0635	9.36	-0.3	117039	2.628	+H	已标识
19	cefdirinir-CO+H2	Impurity-18	C13H15N5O4S2	370.0633	9.53	-0.5	125749	2.824	+H	已标识
20	cefdirinir-CO+H2	Impurity-19	C13H15N5O4S2	370.0635	10.64	-0.3	195373	4.387	+H	已标识
21	cefdirinir-NH-CO+H2	Impurity-20	C13H14N4O4S2	355.0524	10.83	-0.5	11148	0.250	+H	已标识

图7. 应用工作流程快速得到的杂质列表，里面包含杂质峰m/z、保留时间、分子量、分子式、质量偏差、响应、响应百分比及具体的结构信息等。

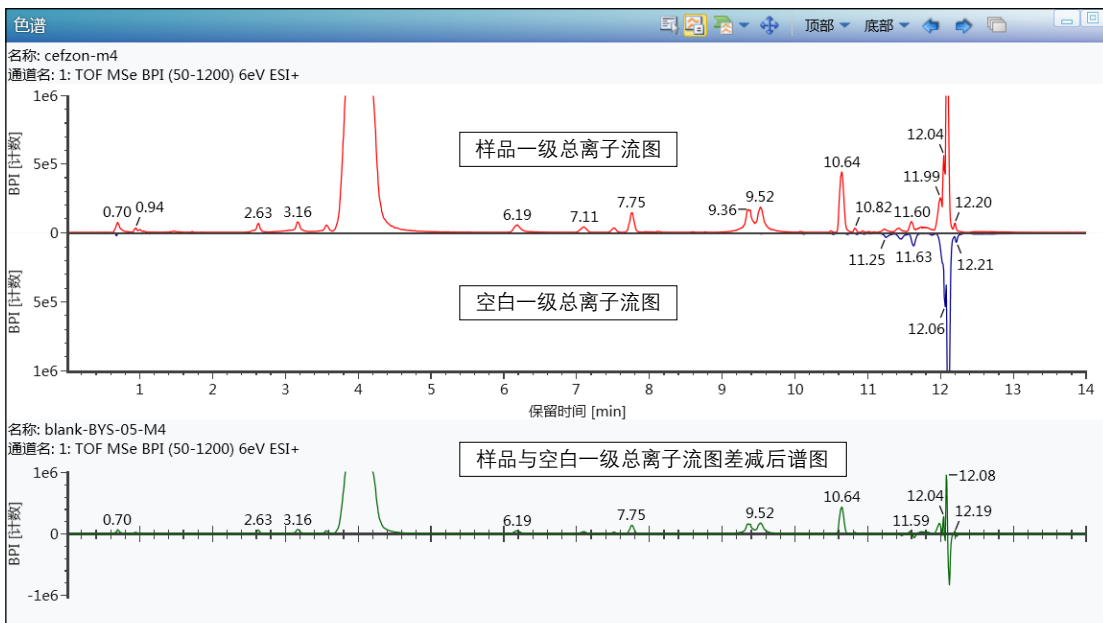


图8. UNIFI软件的谱图对比功能，可用来寻找差异组分或共同组分。

4. 对于与母药结构无关的组分，可通过手动鉴定出结构。思路为先由下拉框中“元素成分”判断出其分子式，再由“库搜索”或“ChemSpider搜索”得到其可能结构，最后通过“碎片离子匹配”确定可能结构，如图9。

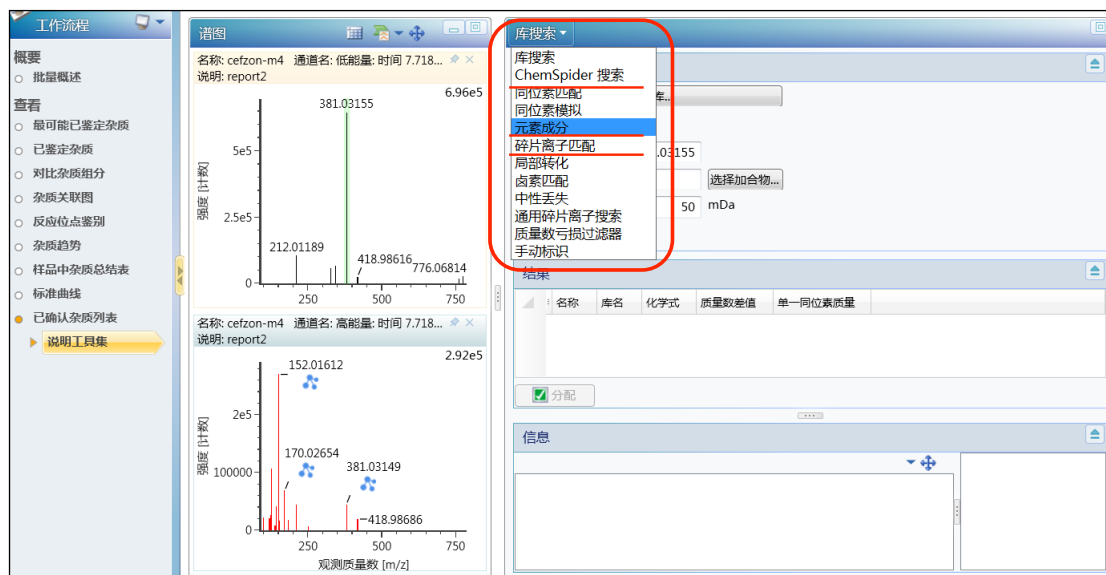


图9. 软件可以通过“说明”功能对杂质峰进行自定义结构确认，具体功能包括：库搜索、同位素匹配、元素成分、碎片离子匹配、局部转化、中性丢失、碎片搜索等功能。

UNIFI软件可通过“元素成分”功能确定最可靠的分子式。软件通过准确分子量、同位素分布及二级碎片信息三要素，得到最可能的分子式，如图10。再通过在线的或离线的数据库搜索分子式可能的结构，如图11。最后通过“碎片离子匹配”功能对可能结构进行确认。

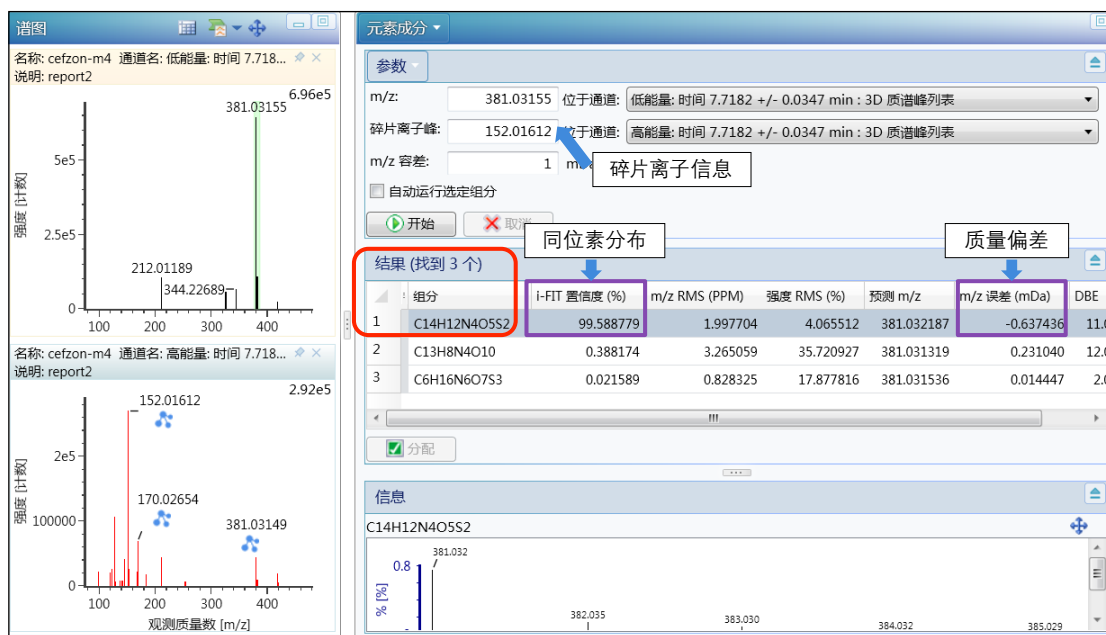


图10. UNIFI软件通过准确分子量、同位素分布及二级碎片信息三要素，得到最可能的分子式。

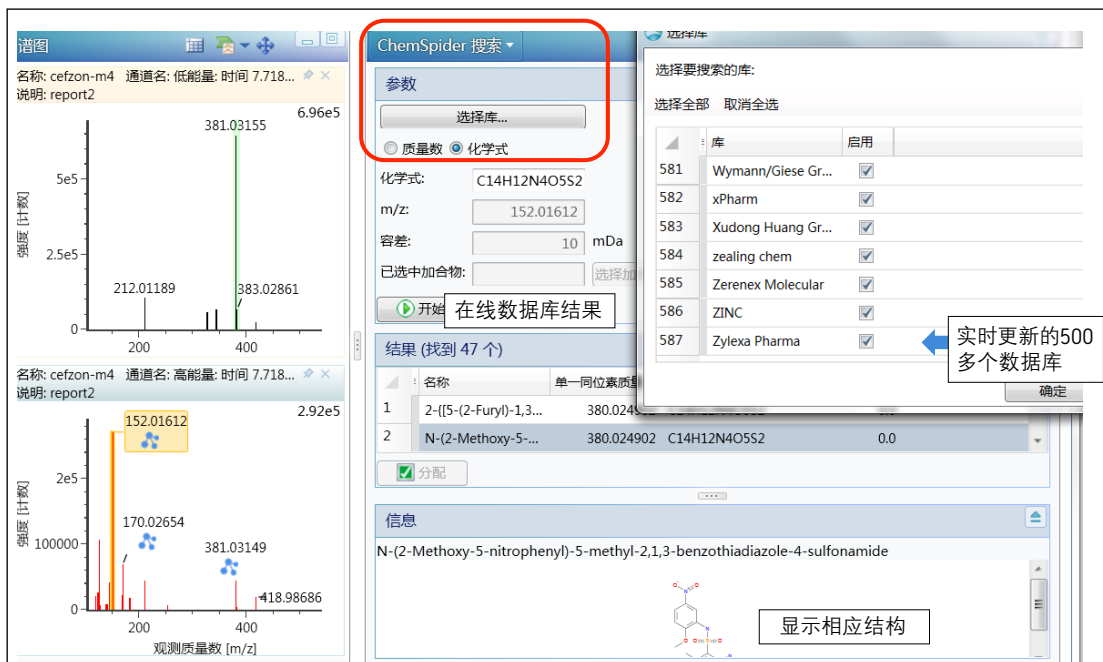


图11. UNIFI软件可通过离线的或实时更新的在线数据库搜索分子式可能的结构。

在图7的杂质列表上，给出的结构信息为母药加减某些官能团，但官能团加在哪里？如图12所示，“局部转化”功能会通过碎片对比，给分子式上可能的位置打分，分数越高，显示绿色处为最可能发生反应处。杂质为cefdinir+H₂O，H₂O加在什么地方，软件可根据碎片对比对各位点进行打分，分数约高处发生反应的可能性约大。



图12. UNIFI软件自动对反应位点进行打分（“局部转化”功能）。

5. 通过UNIFI软件智能的工作流程、人性化设计及强大的杂质解析功能，可快速鉴定出各杂质的具体可能结构，如图13。

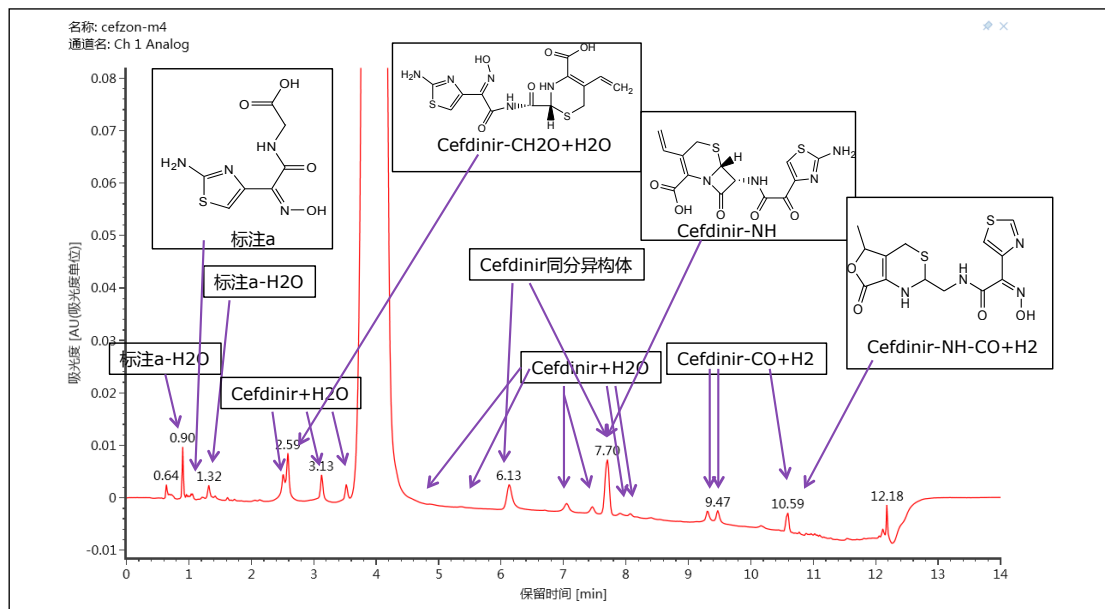


图13. 头孢地尼杂质的可能结构。

6. 杂质鉴定，应用QToF采集和软件鉴定过程得到的信息量巨大，如何出具信息最全面的报告是分析工作者一直比较头疼的问题。UNIFI软件支持审计追踪，可编辑、人性化的报告模板与其他同类软件相比，功能更加强大，更能满足需求。如图14，在报告模板中，从右边工具栏处，直接将需要的选项拖至左边图版上即可。UNIFI产生的报告中会显示您期望得到的任何信息，图15为报告中RT 2.627 min杂质的提取离子流图、一级和二级质谱图。

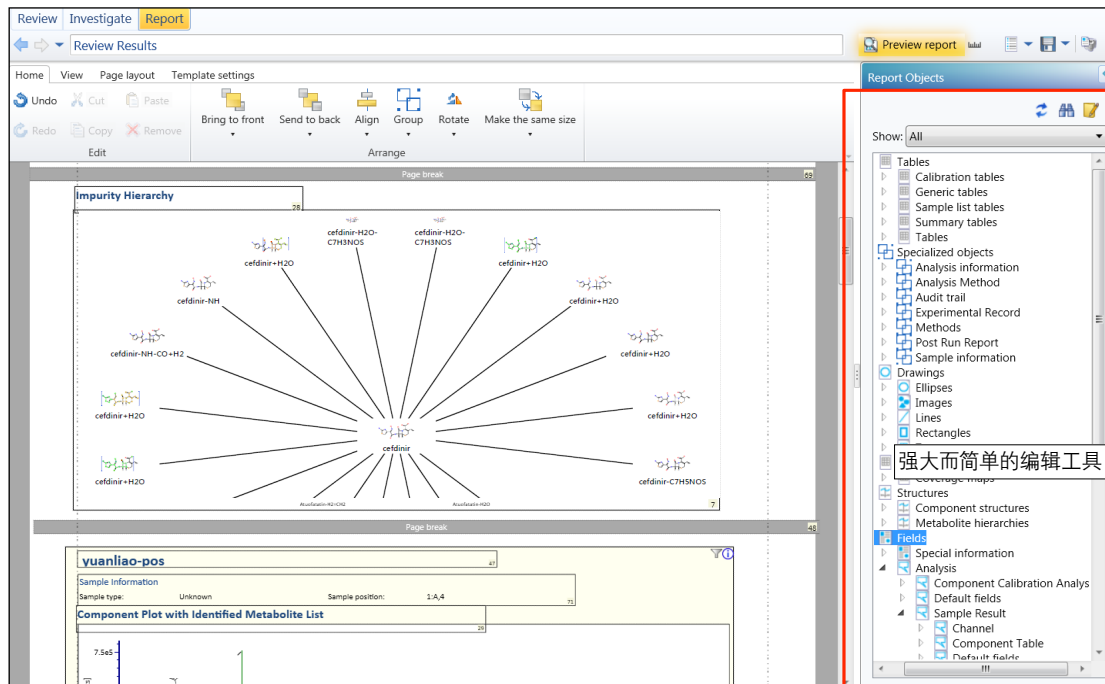


图14. UNIFI软件可编辑、人性化的报告模板。

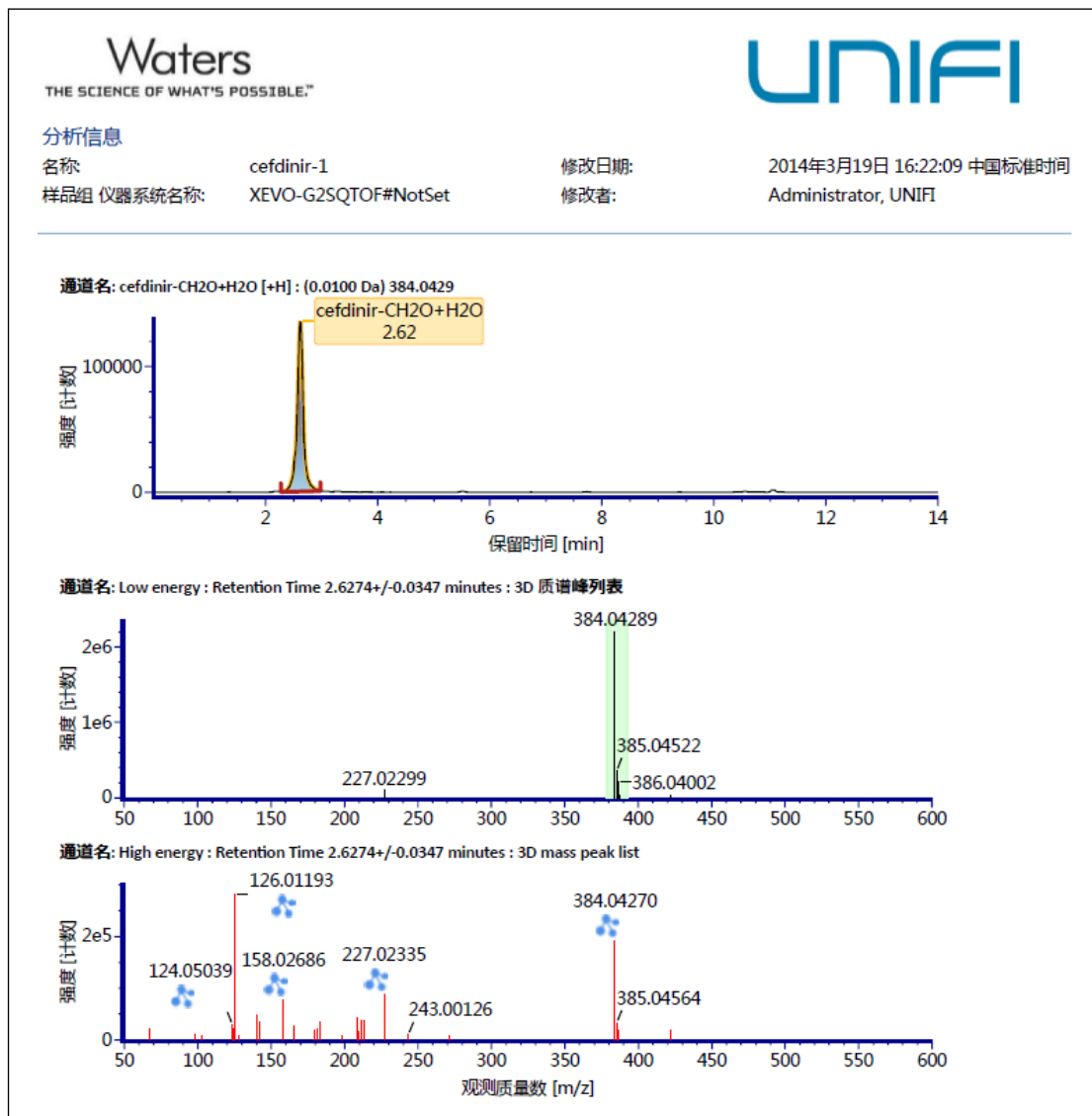


图15. 举例 UNIFI报告中RT 2.627 min杂质的提取离子流图、一级和二级质谱图。

结论

本实验采用亚2 μm 的UPLC色谱柱，应用质谱可兼容的醋酸盐体系对市售样品头孢地尼cefzon进行了检测，采集时间缩短至14分钟，且峰形和分离度较好，大大提高了分离效率。通过UNIFI软件分析了cefzon样品，共鉴定出20个杂质。由于Xevo G2-S QToF系统具有较高的准确性和稳定性，鉴定出的所有杂质质量偏差均小于0.7 mDa。软件能自动给出杂质列表，包括分子量、分子式、响应值及其结构信息。头孢地尼中的杂质多半为同分异构体，有的为位置异构，有的为光学异构。对比其二级质谱，差异都不大。这种情况下，通过质谱手段将具体手性结构与杂质峰一一对应可靠性不高。可借助分离纯化手段拿到对照品再进一步确定结构。

随着药物质量标准要求的提高，需要对药物中的有关物质进行定性分析。得到有关物质的可靠结构信息对药物质量控制和质量保证至关重要。本文采用沃特世ACQUITY UPLC/Xevo G2-S QToF系统，对药物头孢地尼样品有关物质进行结构鉴定，通过强大的软件功能，将复杂的结构鉴定过程变得智能而快速，大大节省了人力物力及时间成本，对于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, UPLC, Xevo, UNIFI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所有者所有。

©2014年沃特世公司。印制于中国。

沃特世中国有限公司
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