

# 使用 2D-LC 方法实现阿莫西林杂质分析中质谱兼容流动相的替换

## 应用简报

药品

### 作者

肖尧, 李浪  
安捷伦科技(中国)有限公司  
北京, 100102

### 摘要

**目的:** 利用基于阀切换的 2D-LC 技术实现在不改变阿莫西林杂质分析原始条件的情况下, 将某些质谱不兼容的流动相替换为质谱兼容的流动相, 从而实现杂志的质谱定性分析。

**方法:** 采用 Agilent Zorbax Extend C18 柱 (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) 按照药典方法对阿莫西林进行杂质分析, 并且使用 Agilent Zorbax Extend C18 保护柱柱 (4.6 x 12.5 mm, 5  $\mu$ m) 作为捕集柱对目标杂质进行捕集, 第二维使用 Agilent Zorbax XDB C18 (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m) 色谱柱, 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A), 乙腈 (B) 梯度分析, 流速 0.4 mL/min。

**结果:** 使用上述方法可以准确的将阿莫西林样品中的 2 个杂质切换入质谱进行分析, 并且完全排除了第一维流动相中质谱不兼容添加剂的干扰, 结果稳定重现。**结论:** 此方法可以在完全不改变原有分析方法选择性的情况下, 实现把质谱不兼容流动相替换为兼容流动相的功能, 方法设置简单, 为此类情况的应用提供了良好的解决方案。



Agilent Technologies

## 引言

在液相色谱方法的开发中，常会用到一些添加剂以提高色谱行为表现，但是这些添加剂经常无法兼容质谱方法，而在某些分析中，如杂质分析，代谢分析等经常需要某些新产生的杂质或代谢产物进行质谱鉴定，但是同时又不希望改变方法选择性以便通过保留时间对未知物进行定性，但是如果将原有方法中不能兼容质谱条件的添加剂改变的话，很可能造成选择性变化，从而无法定位欲分析的未知化合物的位置。另外有一些方法，如果仅仅使用质谱兼容的流动相体系，某些化合物很难取得良好的分离效果或峰，如果希望使用得到良好色谱表现并同时使用质谱检测的情况下，方法开发将异常困难。

为解决此类为题，我们开发了一个基于阀切换的 2D-LC 方法，保证了在各个峰的保留行为不发生变化的情况下（即原始色谱条件不变），通过 2D-LC 方法将原始条件中的质谱不兼容流动相变为兼容流动相，从而实现液质联用方法对未知杂质进行定量分析。

建立方法后，我们使用阿莫西林作为测试样品对方法的可行性和效果进行了验证，取得了良好的效果。阿莫西林为一种常见抗生素药品，在药典中需要进行液相色谱分析，流动相中使用到磷酸盐<sup>[1]</sup>。选择此此类样品和应用的意义在于：在药品质量控制中，需要进行杂质分析以保证工艺稳定和产品质量，如果出现新的未知杂质，可能提示产品工艺或其他条件收到影响，需要对此杂质进行进一步分析。此时需要一个快速简便的方法将原有的 HPLC 方法迅速转移到液质联用系统上，同时不能改变原方法选择性，无需根据色谱柱规格变化调整和验证方法，而此方法恰好为此类情况提供了良好的解决方案。

## 实验部分

### 仪器和试剂

Agilent 1200 Infinity 2D-LC 液相色谱-质谱联用系统，1290 二元泵，1260 四元泵，自动进样器，柱温箱（内置二位六通阀），二极管阵列检测器，6120B 单四极杆质谱。色谱柱为 Agilent Zorbax Extend C18 柱（4.6 x 150 mm, 5 μm），Agilent Zorbax Extend C18 保护柱（4.6 x 12.5 mm, 5 μm）和 Agilent Zorbax XDB C18 柱（2.1 x 50 mm, 1.8 μm），数据处理软件为 Agilent OpenLab CDS ChemStation（Agilent Technologies, Inc. 美国）。磷酸，磷酸二氢钾，甲酸（色谱纯，Sigma 公司，美国）；甲醇，乙腈，磷酸，盐酸（色谱纯，迪马科技，北京）；超纯水由 MiliQ 纯水机制备（Merck-Millipore，德国）；阿莫西林胶囊样品购买自本地药店。

### 样品处理

取阿莫西林胶囊内容物，用流动相 A 相溶解制成约 1 mg/mL 的溶液，过 0.22 μm 滤膜，即得。

### 色谱条件

仪器配置如图 1 所示，通过阀分别连接两维流路中的分析柱和捕获柱，样品先由泵 A 在第一维分析柱上进行分析，当欲检测的杂质流出时，通过阀切换流路将杂质品从第一维分析柱洗脱到捕获柱上，当杂质完全切割到捕获柱上之后阀切换回原位置，样品在分析柱上继续进行分析，同时泵 B 将捕获柱上捕集的杂质反冲到第二维分析柱上进行流动相替换并进行质谱分析。

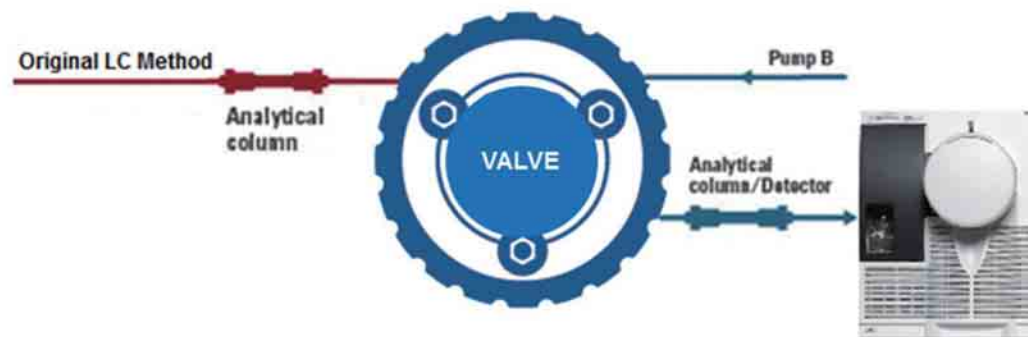


图 1. 流路连接示意图

色谱条件：第一维：色谱柱 Agilent Zorbax Extend C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm) 流动相：A= 15 Mmol/L 磷酸二氢钾, 5 Mmol/L 磷酸水溶液, B=乙腈, 梯度时间见表 1, 流速 1 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 30 度, 检测波长 254 nm;

表 1. 阿莫西林分析梯度时间表 (第一维)

时间 (min)	0	15	16
B%	2	15	60

第二维:捕获柱:Agilent Zorbax Extend C18 保护柱(4.6 x 12.5 mm, 5 μm), 分析柱:Agilent Zorbax XDB C18(2.1 x 50 mm, 1.8 μm), 流动相 A=0.1% 甲酸水溶液; B=乙腈, 梯度时间见表 2, 流速 0.4 mL/min, 柱温 30 度, 检测波长 254 nm, 质谱参数: SCAN 正离子模式, Fragment: 100。

表 2. 阿莫西林杂质 1 分析梯度时间表 (第二维)

时间 (min)	0	5	6	9	10
B%	2	2	80	80	2

## 实验结果

### 阿莫西林原始分析结果

首先在不切换阀的情况下仅在第一维对阿莫西林样品进行分析, 确定目标杂质的保留时间, 以确定阀切换的时间, 结果见图 2, 选择了主峰附近的两个杂质作为考察目标, 进行二维切换置换流动相并进入质谱分析:

之后, 根据杂质 1 的出峰时间确定了阀切换时间, 并且编辑第二维分析的梯度条件, 对杂质 1 进行了测试, 结果见图 3, 可以看出, 与空白进样比较, 未见任何明显干扰, 同时可以看到阀切换设置对于第一维分析结果无任何影响, 此方案可以在完全不改变方法选择性的情况下, 将目标杂质切换入质谱进行分析, 比较了 1D 和 2D 分析后杂质 1 的光谱图, 结果一致, 证明峰切割定位准确。杂质 2 分析结果见图 4。

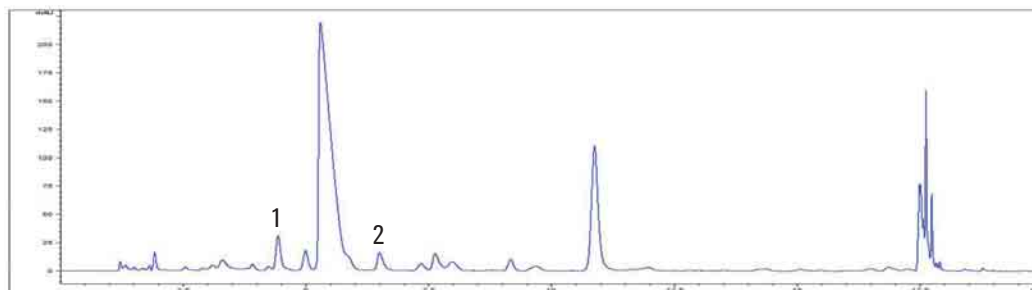


图 2. 阿莫西林的液相分析结果

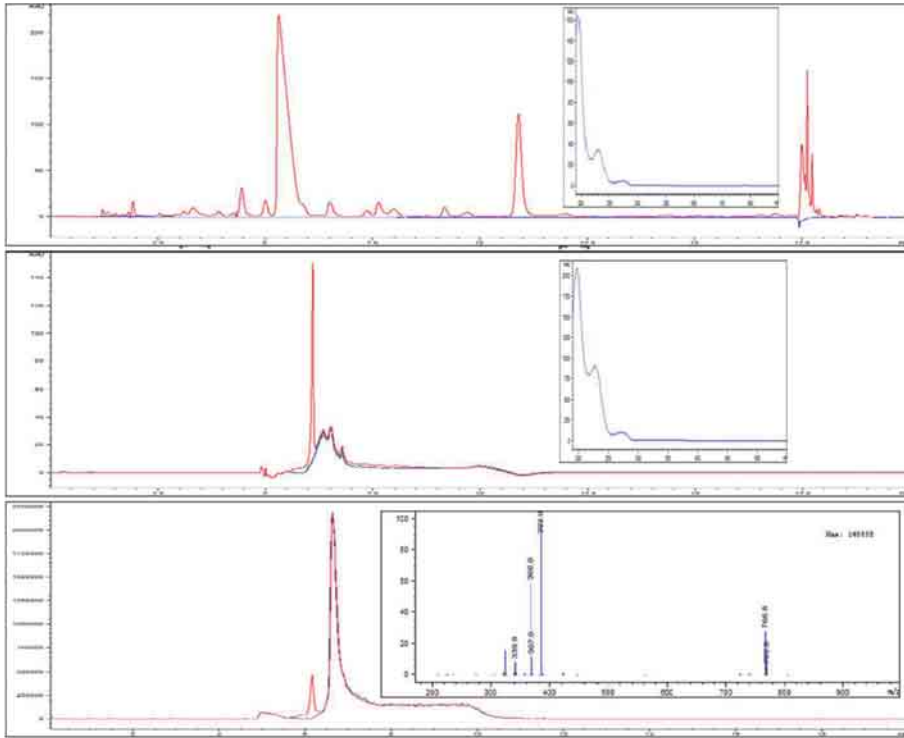


图 3. 杂质 1 2D-LC 分析结果  
A: 1D 色谱图及杂质 1 光谱图; B: 2D 色谱图及杂质 1 光谱图; C: 杂质 1 2D 质谱图及质谱棒状图

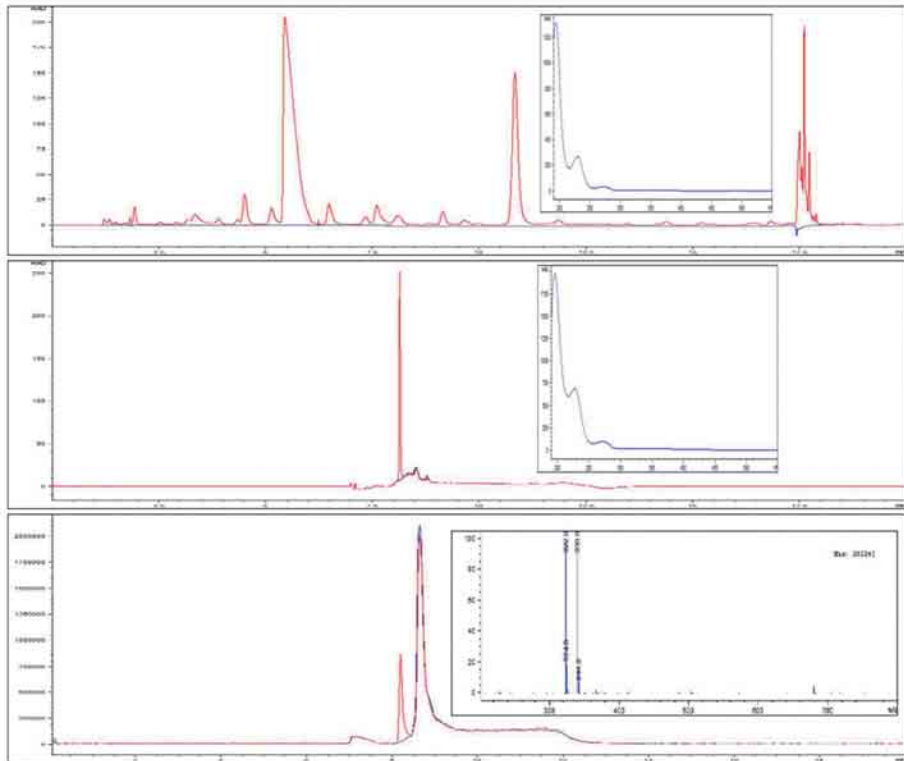


图 4. 杂质 2 2D-LC 分析结果  
A: 1D 色谱图及杂质 2 光谱图; B: 2D 色谱图及杂质 2 光谱图; C: 杂质 2 2D 质谱图及质谱棒状图

对结果的重现性进行了考察，两个杂质在第一维及第二维分析中，无论是保留时间还是峰面积均能取得较好的重现性，在第一维分析中各个待考察杂质的保留时间 RSD% 均小于 0.15%，峰面积 RSD 均小于 0.8%，第二维分析中各个待考察杂质的保留时间 RSD% 均小于 0.12%，紫外检测峰面积 RSD 均小于 1.0%，质谱检测峰面积 RSD 均小于 1.7%。

## 讨论

本方法当中，只需确定第一维 HPLC 条件，即可以根据杂质出峰位置任意编辑阀切换的时间，便于灵活控制以及应对不同样品的快速调整。

在第二维分析当中，加入 DAD 检测器，可以较好的对切割出来的杂质进行定位，如果该杂质的质谱参数不合适导致质谱无响应，可以很容易根据 DAD 谱图进行判断（主要是判断杂质是否成功切割入第二维），以确定是否需要调节质谱参数（本实验中未进行质谱参数优化）。

在实验当中，试图尝试先将第一维上的多个杂质峰切割到第二维色谱柱上，之后再用梯度缓慢洗脱，但是较早切割的峰会由于第二维洗脱强度不够导致很大扩散，峰型变差，灵敏度降低，所以放弃了该方案。

在以往一些文献中有类似的应用出现，样品在第一维按照原始条件进行分析，杂质出峰时，接在柱后的阀切换流路至质谱检测器流路，将杂质峰进行中心切割至第二维色谱柱，同时另外一台色谱泵通过三通输送质谱兼容流动相，进行流动相替换和质谱分析。

上述方法存在如下几个问题，而本方法可以很好的解决：

两维色谱柱兼容问题：第二维色谱由于要兼容质谱，只能使用小内径色谱柱（2.1 mm），如果第一维使用 HPLC 分析的常规色谱柱（4.6 mm 内径），在进行中心切割时，会有很大流速冲击第二维色谱柱，可能造成损坏，如果使用的是 UHPLC 色谱柱，还可能造成系统超压；如果第一维改用与第二维相同的小内径色谱柱，必然造成方法参数改变，需要进行方法的转换和重新验证，由于流速降低，仪器的延迟也可能对分析结果产生影响。

由于没有捕集柱，以及受到三通等额外配件的影响，杂质色谱峰可能会在中心切割时发生较严重的扩散，从而影响数据质量。另外，由于不使用捕集柱，为防止第二维色谱柱产生的反压对检测器造成损坏，切割杂质的动作需要在第一维检测器以前进行，所以如果进行中心切割，会使得第一维色谱图不完整，增加结果比较和确认的困难

此外，传统方法中第二维的泵通过三通与色谱柱相连，对流速的精确控制可能造成一定负面影响，在本方法中所有流路全部由阀控制，保证了精准度。

## 结论

在本文章中，我们开发了一个基于阀切换的 2D-LC 方法，保证了在各个峰的保留行为不发生变化的情况下（即原始色谱条件不变），通过 2D-LC 方法将原始条件中的质谱不兼容流动相变为兼容流动相，从而实现用液质联用方法对未知杂质进行定量分析，另外，可以根据检测目的，使用不同种类质谱检测器对样品进行分析，有极好的灵活性。使用此类解决方案，完全无需对原始分析方法进行任何调整，包括色谱柱规格，流动相种类及色谱分析条件，避免了重新开发方法的麻烦。同时，此方法简便，稳定，快速，方法设置简单，并且可以灵活的根据不同杂质的保留时间调整阀切换时间，并且可以将此 2DLC 配置连接于多种质谱设备前端，对于实现未知杂质的快速质谱定性分析提供了良好的解决方案。

## 参考文献

1. 中国药典 2010 版（第二部）
2. 安捷伦应用文献 5991-1873EN

## 更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013  
2013年9月3日，中国印刷  
5991-3175CHCN

