Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用ACQUITY QDa检测器对潜在的基因毒性杂质进行高选择性、高灵敏度的定量分析

Janet Hammond
沃特世公司(英国威姆斯洛)

应用优势

- 使用ACQUITY® QDa®检测器进行高选择性、高灵敏度的稳定分析
- ACQUITY UPLC® H-Class系统可实现高分离度和通量，且分析时间仅3分钟
- 可灵活选用MassLynx®质谱软件或Empower®色谱数据软件作为控制软件，因此该系统在各种不同的分析实验室中均可轻松部署
- 配备可将LC液流导入废液的装置，可有效防止高浓度API引起的源污染

沃特世解决方案

配备ACQUITY UPLC色谱柱管理器的ACQUITY UPLC H-Class系统

ACQUITY QDa检测器

Empower或MassLynx软件

关键词

UPLC®，QDa，基因毒性杂质，定量

简介

基因毒性杂质(GTI)是指具有潜在危害、能改变DNA序列并引发癌症的一类化合物。药物制造商必须在早期药物开发过程中识别出这些杂质，那么开发出灵敏度和特异性足以准确定量原料药和制剂中这些杂质水平的分析方法显得尤为重要。

GTI的最高允许量，根据1.5 µg/天的毒理学关注阈值(TTC)，被设定为1 ppm或更低，这比一般药物杂质分析的最高允许含量水平(500 ppm左右)低了好几个数量级。

在药物分析中，常用的分析仪器如结合紫外(UV)检测器的液相色谱(LC)(用于分析非挥发性化合物)，或结合火焰离子化检测器(FID)的气相色谱(GC)(用于分析挥发性化合物)。然而，基因毒性杂质分析需要达到极低的检测限，这是一项很大的挑战。在这种情况下，需要利用MS检测才能达到所需的灵敏度、特异性和稳定性。从药物早期研发到生产质控整个过程都可能需要这些分析方法进行支持。

本文将介绍定量测定活性药物成分(API)中一种GTI(1-苯基哌嗪)的分析方法，其中，该GTI相对于API的定量限(LOQ)为0.5 ppm。此方法使用的是设计小巧、性能稳定且简单易用的ACQUITY QDa质谱检测器，以及配备色谱柱管理器的ACQUITY UPLC H-Class系统。

实验

UPLC方法条件

LC系统:	配备ACQUITY UPLC色谱柱管理器的 ACQUITY UPLC H-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS, 1.8 µm, 2.1 x 50 mm
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	0.05%甲酸水溶液
流动相B:	0.05%甲酸的乙腈溶液
梯度:	1.5 min时，流动相B从5%增加至95%，保持至2.1 min，然后返回5%流动相B
运行时间:	3 min

MS条件

MS系统:	ACQUITY QDa检测器
电离模式:	ESI正离子模式
单离子记录 (SIR):	m/z 163.1 Da [M+H]+
毛细管电压:	0.8 kV
采样频率:	5 Hz
探头温度:	600 °C
锥孔电压:	10 V

数据管理

MassLynx软件 (4.1版)

样品制备

采用10%乙腈:90%水配制10、5、1、0.5和0.1 ppm的1-苯基哌嗪标准品 (相对于1 mg/mL API)。

结果与讨论

1-苯基哌嗪的结构如图1所示。其摩尔分子量为162 Da。使用ACQUITY QDa检测器全扫描分析1-苯基哌嗪，在163.1 Da处检测到了预期的[M+H]+离子。

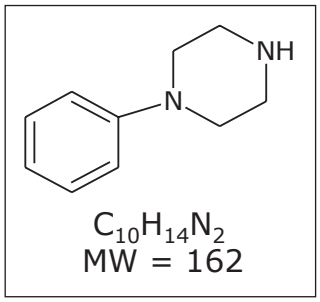

图1. 1-苯基哌嗪的结构。

重新配置ACQUITY UPLC色谱柱管理器

为了避免污染和MS痕量分析中回收率较低的问题，我们需要尽可能地防止基质和API进入MS源。重新配置ACQUITY UPLC色谱柱管理器是一种可行的选择，通过这种方法能够引导液流绕开ACQUITY QDa检测器。利用ACQUITY UPLC H-Class系统的色谱柱管理器，用户可以通过软件，控制阀切换时间，将溶剂流导入废液。如图2所示，ACQUITY UPLC样品管理器的出口直接连接至色谱柱。色谱柱的出口连接至出口切换阀 (OSV) 的中心。OSV上的“W”端口 (位置1) 连接至废液。OSV上的“1”端口 (位置2) 连接至检测器。在运行过程中，我们利用软件控制OSV按照预定的时间间隔在位置1 (废液) 和位置2 (检测器) 之间切换。

方法开发

我们对UPLC方法进行了优化，确保1-苯基哌嗪在API之前洗脱。在最终确定的方法中，1-苯基哌嗪的洗脱时间为1.2 min，而API的洗脱时间为1.5 min，因此在1.3 min处设定一个事件，将API导入废液（如图3所示）。

此外，我们还优化了ACQUITY QDa检测器的探头温度和锥孔电压条件，以使1-苯基哌嗪标准品的检测达到最佳灵敏度。

基质效应

由于目标分析物（GTI）的含量非常低，但其周围又存在高浓度的API或是药品其他成分及辅料，对离子化产生竞争，放大离子选择性问题。在进行这类分析时，分析一系列添加有相应GTI的API样品或药物非常重要。分析这些样品有助于我们了解是否存在任何与稳定性、离子抑制或离子增强效应相关的问题。在本次分析中，我们在样品制备过程中向API中添加了0.1、0.5和10 ppm的1-苯基哌嗪，并对样品进行分析。实验结果表明，五次重复进样得到的峰面积比未加标标准品的峰面积低28%。这说明基质确实对1-苯基哌嗪的响应有影响。加标浓度为0.5 ppm的API样品和未用于加标的标准品峰面积如图4所示。

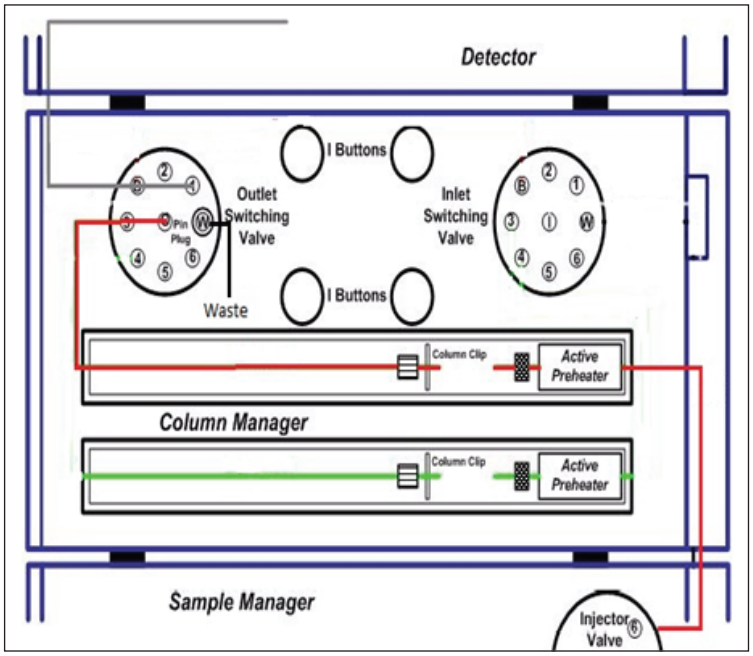

图2. 可将溶剂液流导入废液的ACQUITY UPLC色谱柱管理器配置。

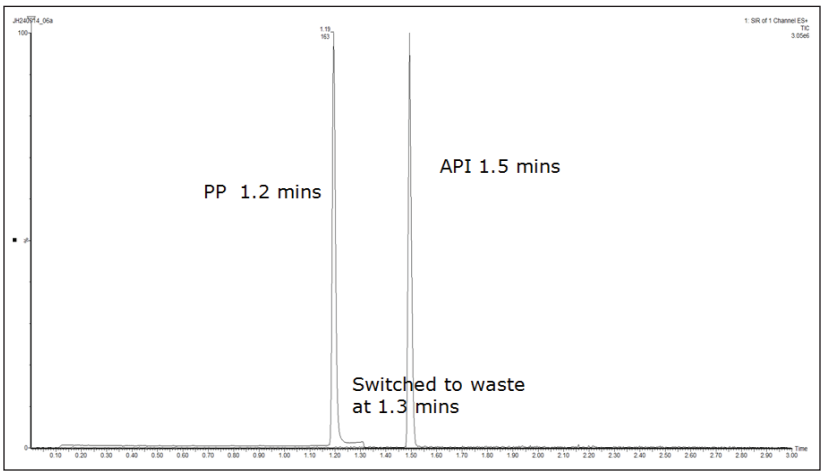

图3. 1-苯基哌嗪和API的MH+ SIR曲线。

Sample number	Area
1	802
2	791
3	847
4	827
5	810

A

Sample number	Area
1	1152
2	1182
3	1142
4	1139
5	1162

B

图4. A) API中添加0.5 ppm 1-苯基哌嗪标准品后执行五次进样所得的峰面积。B) 未用于加标的0.5 ppm 1-苯基哌嗪标准品五次进样所得的峰面积。

线性

实验使用溶于1 mg/mL API溶液中的五个浓度的1-苯基哌嗪标准品(0.1、0.5、1.0、5和10 ppm)评估该方法的线性。通过本方法所得的峰面积与ppm浓度之间的线性相关性良好(图5)。LOQ标准品的信噪比大于10:1，检测限(LOD)标准品的信噪比为3:1(图6A和图6B)。五种标准品六次单独进样的标准偏差百分比均小于4%。

API分析

我们分析了三个不同批次的溶于10%乙腈:90%水的1 mg/mL API溶液，结果表明其中的1-苯基哌嗪含量均低于0.5 ppm。其中一个典型批次的分析结果如图7所示。

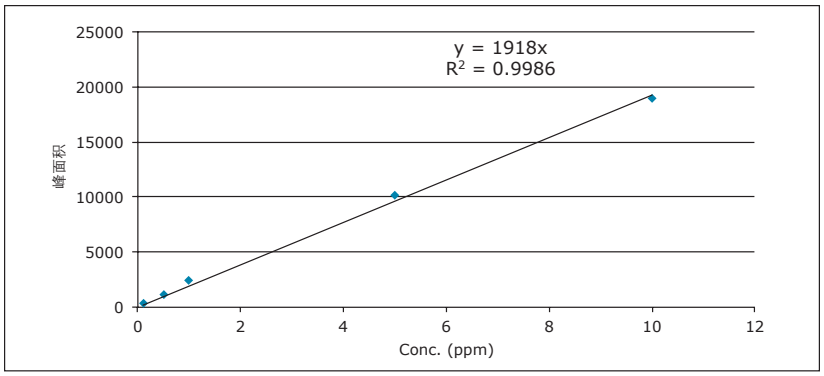

图5. 使用5个浓度的1-苯基哌嗪标准品获得的校准曲线表现出良好的线性关系。

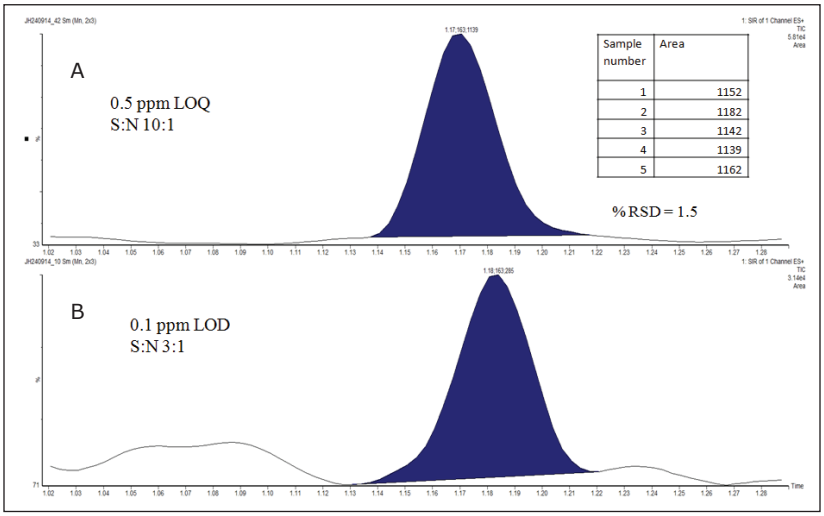

图6.A)1-苯基哌嗪LOQ标准品(0.5 ppm)的SIR曲线。B) 1-苯基哌嗪LOD标准品(0.1 ppm)的SIR曲线。

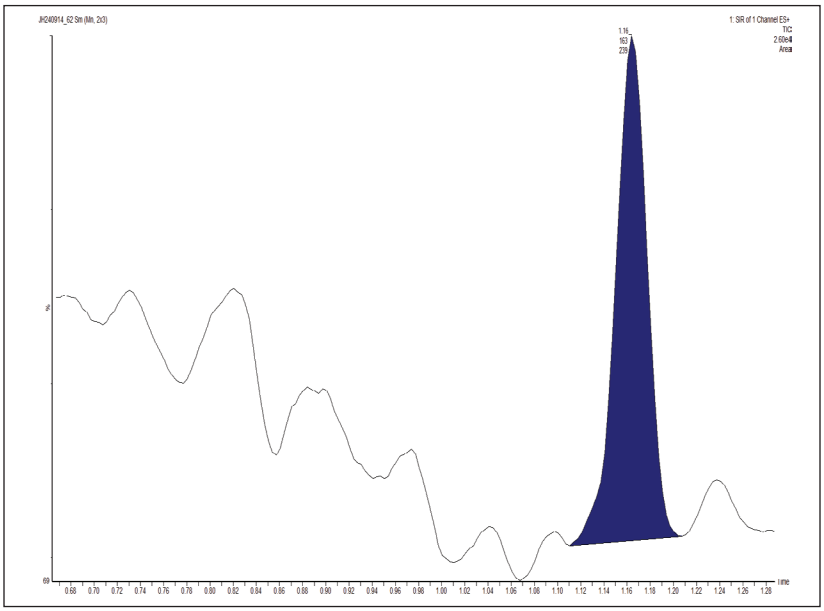

图7. 典型批次API样品的1-苯基哌嗪分析结果。

结论

ACQUITY UPLC H-Class系统和ACQUITY QDa检测器为API中1-苯基哌嗪的分析提供了完美的解决方案。

- ACQUITY QDa检测器的SIR功能可满足特异性和高灵敏度要求，为分析溶液中浓度相对于1 mg/mL API仅为LOQ水平(0.5 ppm)的1-苯基哌嗪提供了有效方法。
- UPLC具有高分离度、高通量的特点，分析时间仅3分钟，极大提高了分析效率。
- ACQUITY UPLC色谱柱管理器具有可在API洗脱前将溶剂液流切换至废液的独特设计，能有效防止源污染。
- 所有1-苯基哌嗪标准品的峰面积%RSD均小于4%，重现性良好。
- 浓度为0.1至10 ppm的一组1-苯基哌嗪标准品所得的校准曲呈线性。
- 可选用MassLynx或Empower软件进行控制操作，因此该系统在各种不同的分析实验室中均可轻松部署。
- 可在整个药物开发和QC环境的各个阶段使用。

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY, QDa, ACQUITY UPLC, MassLynx, Empower和UPLC是沃特世公司的注册商标。
其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年4月 720005372ZH AG-PDF

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 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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