

高效药物清洁验证的通用 UHPLC/UV/MS 方法

应用简报

药物质量控制 (QC)、原料药和药品生产、GMP 清洁验证

作者

Syed Salman Lateef

Vinayak AK

安捷伦科技公司

Michael W. Dong、Christine Gu
小分子分析化学与质量控制
Genentech, South San Francisco

摘要

清洁验证 (CV) 是药品生产质量管理规范 (GMP) 对原料药和药品生产的要求。大多数药物的清洁验证研究通常选用配备紫外检测器的液相色谱仪，其灵敏度水平约为 20-50 ng/mL。对于高效药物，应用配备扩展光程流通池的紫外检测或质谱检测可实现灵敏度水平低至 ng/mL 的清洁验证方法。在 Agilent 6150 系列单四极杆液质联用系统上使用安捷伦喷射流离子源的 UHPLC/MS 方法具有更高的灵敏度，其显示出更低（约 0.5 ng/mL）的定量限 (LOQ)。此外，采用更高的进样量可进一步降低 LOQ。本研究介绍了对浓度范围为 0.5 ng/mL 至 1000 ng/mL 的五种模型药物的 2 分钟通用清洁验证方法。该通用清洁验证检测方法通常可适用于许多不同的药物，只需极少的方法开发、认证和转换工作。本应用简报还介绍了采用用户补充的 NIST 质谱库搜索程序鉴定未知化合物。



Agilent Technologies

前言

必须进行清洁验证 (CV) 以证明生产链 (容器和加工设备) 的清洁度，确认活性药物成分 (API) 已被充分去除，达到预先确定的可接受限值。开发针对高效药物 (SafeBridge 类别 3B 或 4¹) 或具有弱发色团的药物的高灵敏度 CV 方法极具挑战性。对于高效药物而言，可接受标准通常要求检测限低至 ng/mL 级。利用长光程 UV 流通池或质谱检测器能够提高传统 LC-UV 方法的灵敏度²。此外，偶尔观察到未知化合物，应当在 CV 研究中进行鉴定。本研究的目的是展示一种快速、灵敏、通用的 UHPLC/UV/MS 方法，用于对高效药物进行清洁验证，并建立一种更简单的鉴定未知化合物的方法。

配备 UV 最大光强流通池的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统由于光程扩展而表现出更高的信号强度。在早期研究中，使用传统 HPLC 色谱柱所进行的清洁验证研究表明，60 mm 最大光强

流通池的灵敏度相比于标准 10 mm 流通池提高了约 2-5 倍^{3,4}。在此研究中我们证实了采用更快速的 UHPLC 方法获得了相似的结果。

Agilent 6150 系列单四极杆质谱仪也同样适用于高灵敏度 CV 检测。安捷伦喷射流离子源 (AJS) 通过使用热鞘气将喷雾集中防止离子源中的进一步柱外电喷雾带展宽，与标准电喷雾离子源 (ESI) 相比，灵敏度提高多达 10 倍。AJS 离子源还适用于更宽的流速范围 (20–2000 μL/min)。CV 方法所用的高流速可缩短分析时间，且不影响峰容量。AJS 离子源相比于常规 ESI 源，还能够使不同类别的化合物实现更有效的离子化。单一通用的 UHPLC/UV/MS CV 方法提高了中试规模或制造工厂的实验室工作效率⁵，对快速样品周转提出了更高的要求。

在 CV 样品中，可能存在不同的残留化合物，例如来自当前或之前批次的 API、副产物、降解物、赋形剂或清洁剂。借助用户创建的质谱库，

LC/UV/MS 检测还可鉴定色谱图中的未知峰。Agilent OpenLab ChemStation 有利于在 NIST 质谱库搜索程序中创建附加的自定义谱库。

本应用简报记录了使用 Agilent Poroshell C18 色谱柱 (3.0 × 30 mm, 2.7 μm) 针对五种常见药物开发的通用高通量 UHPLC/UV/MS 方法。相比于那些全多孔颗粒填料色谱柱，这种以表面多孔颗粒填料填充的快速液相色谱柱可改善动力学性能，并且能够在 1 mL/min 流速下运行 2 分钟。使用该程序，采用 UV 和 MS 相结合的方法能够对浓度范围为 0.5 ng/mL 至 1000 ng/mL 的五种模型药物的混合物进行测量。对此方法的方法性能（例如特异性、精密度、准确度、检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和线性）进行测定，结果发现其能够满足预期用途要求。还展示了自定义质谱库的创建及其搜索功能。该方法可能适用于各种药物的 CV，且所需的方法开发、认证和转换工作极少。

实验部分

开发出一种通用的 LC-UV/MS 方法并应用于五种模型药物：磺胺甲恶唑、磺胺甲恶唑、心得安、丙咪嗪和阿米替林。尽管这些药物并不具有很高的药效，但是选择它们足以说明方法性能和系统功能。本文还展示了采用标准流通池和扩展光程 UV 流通池以及 MS-SIM/SCAN 模式对上述药物进行分析所获得的各种浓度下的线性。

本研究还使用大体积进样对磺胺甲恶唑的信噪比 (S/N) 的改善程度进行了探究。表 1 显示了所开发的通用方法的仪器参数详情。

试剂与材料

使用的所有溶剂和添加剂均为 LC/MS 级，购自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA)。纯水来自 Millipore 公司的 Millipore Milli-Q 水净化系统 (Billerica, MA, USA)。

标样的前处理

在 100% 甲醇中配制浓度为 1000 µg/mL 的磺胺甲恶唑、磺胺甲恶唑、心得安、丙咪嗪和阿米替林储备液。使用 50:50 [甲醇:流动相 A (MPA)] 将储备液稀释为 10 µg/mL 的工作溶液。通过连续稀释配制各种浓度的线性溶液。浓度 (ng/mL) 分别为：0.2、0.3、0.5、1、5、10、20、30、50、100、500、1000、2000、5000 和 10000。

表 1. LC-UV/MS 通用方法中所用的实验参数和仪器

安捷伦液质联用系统	参数	设定值
Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)	流动相 A	10 mM 甲酸铵 + 0.1% 乙酸水溶液
	流动相 B	75/25 MeOH/ACN, 10 mM 甲酸铵, 0.1% 乙酸
	流动相梯度	0 min 10% B, 1.5 min 90% B, 1.6 min 10% B, 2.0 min 10% B
	流速	1 mL/min
Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A) 保持在 4 °C 下	进样量	5 µL (使用 70/30 的 ACN/水溶液对进样针清洗 10 s)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	温度	40 °C
	色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 30 mm, 2.7 µm
Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器	检测	280±4 nm, 270±4 nm, 260±4 nm, 240±4 nm 参比 400±20 nm
配备 AJS 的 Agilent 6150 四极杆液质联用系统 (G6150BA)	正离子模式	SIM 模式 (M+H) ⁺ : 271.1、254.1、260.2、281.2、278.2 扫描模式: 200–700
	干燥气流速	10 L/min
	雾化器压力	45 psig
	干燥气温度	300 °C
	鞘气温度	200 °C
	鞘气流速	10 L/min
	毛细管电压	3000 V
	喷嘴电压	1500 V
	驻留时间	47 ms
	碎裂电压/峰宽	100/0.1 min
OpenLAB CDS ChemStation 版工作站 (M8301AA)	版本	C.01.05[36]
NIST 质谱库搜索程序	版本	2.0 g

结果与讨论

UHPLC/UV 检测

在该通用 UHPLC/UV 方法中使用配备高灵敏度最大光强 60 mm 流通池或标准 10 mm 流通池的 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器（表 1）。在使用 10 mm 流通池的情况下，将五种化合

物的混合物重复进样六次所获得的色谱图进行叠加（图 1）。使用两种流通池进行浓度最高为 10000 ng/mL 的线性实验。就磺胺甲二唑而言，使用高灵敏度流通池和标准流通池分别得到 5 ng/mL 和 20 ng/mL 的 LOQ。正如预料，采用高灵敏度流通池得到的检测限比采用 10 mm 流通池得到的检测限

低 3-4 倍。这些结果与早期研究相差无几²。采用两种流通池得到的 LOD/LOQ 浓度范围如表 2 所示。使用 UV 检测器和标准流通池可获得 20-50 ng/mL 的 LOQ。在该线性范围研究中，处于实验浓度水平的化合物的线性表明相关系数 $R^2 > 0.99$ （图 2）。

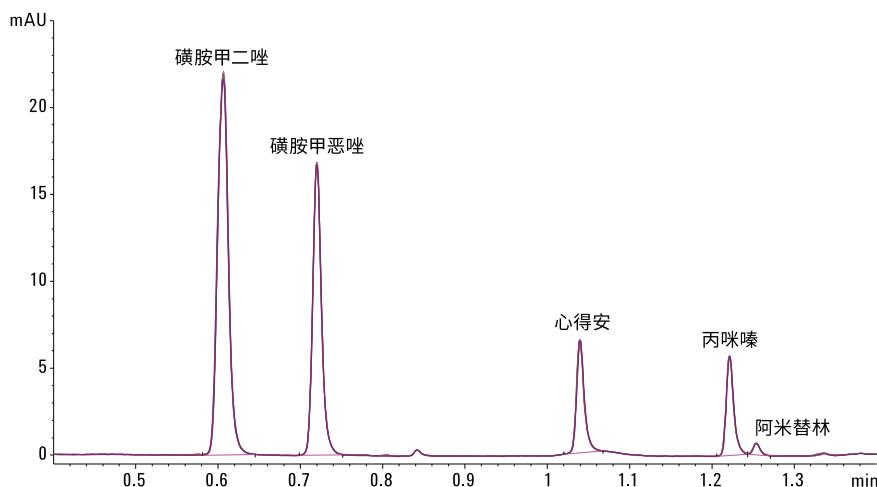


图 1. UHPLC/UV 结果。用标准 10 mm 流通池在 280 nm (1000 ng/mL) 下重复进样获得的六幅色谱图的重现性叠加。阿米替林的峰高较小，因为 280 nm 并非该化合物的最佳波长

表 2. 使用最大光强高灵敏度流通池 (60 mm) 和标准流通池 (10 mm) 的 UHPLC/UV 方法验证结果

化合物	LOD 10 mm	LOD 60 mm	LOQ 10 mm	LOQ 60 mm		峰面积精度 60 mm	RT 精度 60 mm	相关系数 10 mm	相关系数 60 mm
	浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/mL)	S/N	浓度 (ng/mL)	S/N			
磺胺甲二唑	10	1	20	27	5	23	5.8	0.15	1
磺胺甲恶唑	10	1	20	17	5	16	3.3	0.07	1
心得安	20	5	30	10	10	12	2.0	0.09	1
丙咪嗪	20	5	30	13	10	19	1.7	0.05	0.999
阿米替林	30	20	50	19	30	17	2.0	0.03	1
									0.999

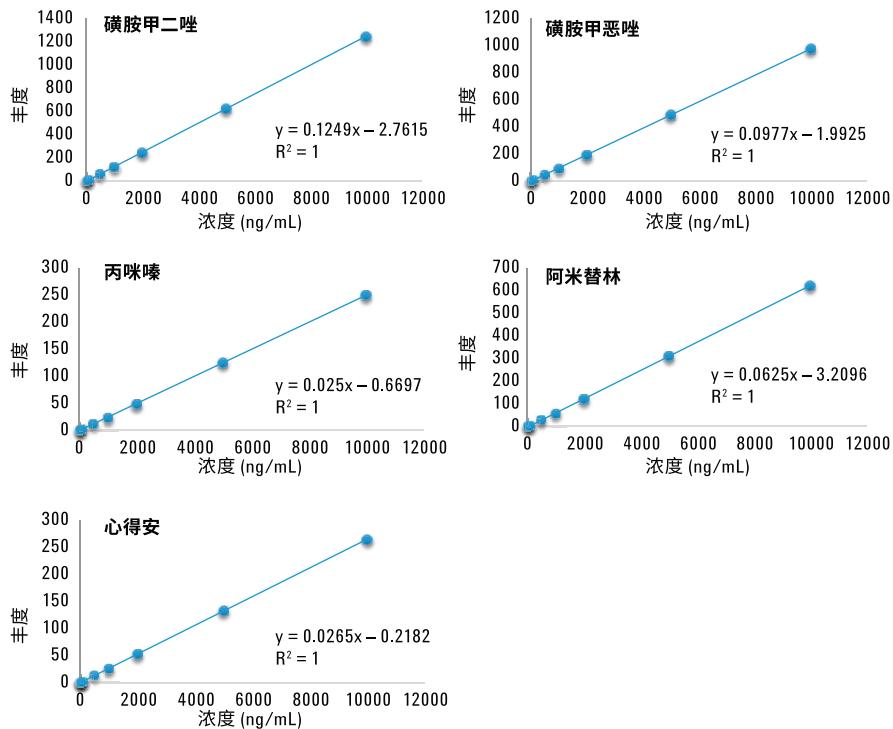


图 2. 使用高灵敏度 60 mm 流通池进行的 UHPLC/UV 线性研究

单四极杆质谱仪 (SQMS) 检测

如表 1 所述的 2 分钟通用梯度方法采用配备 AJS 离子源的 Agilent 6150 单四极杆质谱仪开发得到。30 ng/mL 的混合物的色谱图如图 3 所示。采用浓度为 0.5 ng/mL 至 100 ng/mL 的溶液进行的线性实验，结果表明上述溶液在该范围内表现出良好的线性。在该 UHPLC/MS 方法中获得 0.5 ng/mL 的 LOQ，这与 Liu 等人所述的用于高效药物的时间较长的 LC/MS 方法的灵敏度性能⁶相当或更出色。

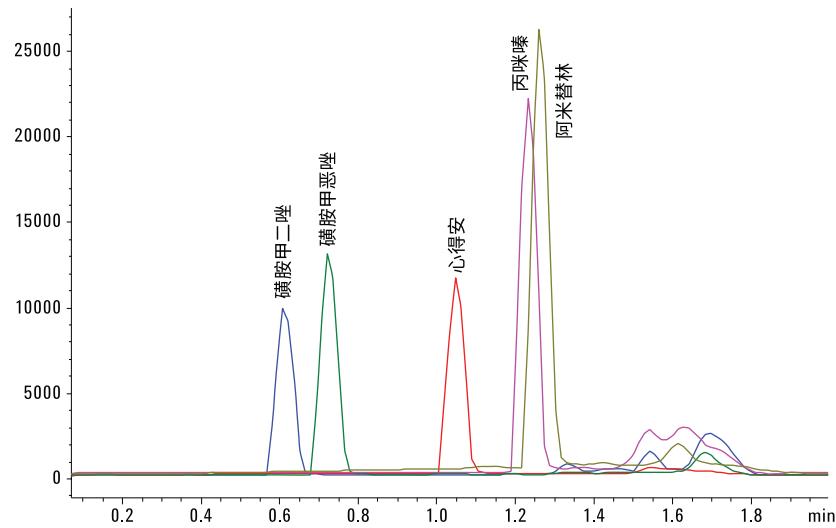


图 3. 30 ng/mL 混合溶液的 UHPLC/MS (SIM) 结果

发现 LOQ 下的峰面积和保留时间的 RSD 分别小于 5% 和 0.1% (表 3)。实验浓度下所有化合物的线性均表现出线性相关系数或 $R^2 > 0.98$ (图 4)。采用 $1/x$ 的加权因子² 由线性方程推算出的准确度值处于 15% 以内 (表 4)。还将单离子监测 (SIM) 方法所获得的 LOQ 同 MS 扫描数据进行了比较，其中 SIM 和全扫描数据在同一次运行中进行采集。来自全扫描数据的化合物提取离子色谱图 (EIC) 的 LOQ 对于所有化合物均为 5 ng/mL (数据未示出)，表明 SIM 模式的灵敏度比全扫描模式高大约 10 倍。

用于 LC/MS 运行的大体积进样

研究了在高灵敏度 CV 方法中使用大体积进样获得更低 LOQ 的可能性。这对于需要更高灵敏度的情况十分有用。大体积进样可提高峰面积和 S/N，但是可能增加谱峰展宽。这可能并非 CV 测定中主要关心的问题，因为在实际 CV 样品溶液中很少观察到与多种 API 相关的峰。使用该通用方法获得的三种不同浓度的磺胺甲恶唑的大体积进样结果如表 5 所示。结果表明，在 30 mm 色谱柱上，当进样量由 5 μL 增加至 12 μL 时，峰面积、峰宽和 S/N 分别提高了 57%、31% 和 41%。磺胺甲恶唑研究表明，采用更高体积的进样 (10 μL) 能够使灵敏度再提高 2 倍。在本研究所用的 3 mm 色谱柱上，采用 12 μL 以上的大体积进样将导致谱峰分裂。

表 3. UHPLC/MS (SIM) 方法验证结果

化合物	[M+H] ⁺	线性范围 (ng/mL)	LOD	LOQ	S/N	LOQ 下的峰 面积 RSD (%) (n = 6)	LOQ 下的 RT RSD (%) (n = 6)
			浓度 (ng/mL)	浓度 (ng/mL)			
磺胺甲二唑	271.1	0.5-100	0.30	0.5	10	4.0	0.03
磺胺甲恶唑	254.1	0.5-100	0.20	0.5	11.3	3.5	0.02
心得安	260.2	0.5-100	0.20	0.5	24.3	2.3	0.02
丙咪嗪	281.2	0.5-100	0.20	0.5	13.3	3.1	0.01
阿米替林	278.2	0.5-100	0.20	0.5	10.0	4.9	0.01

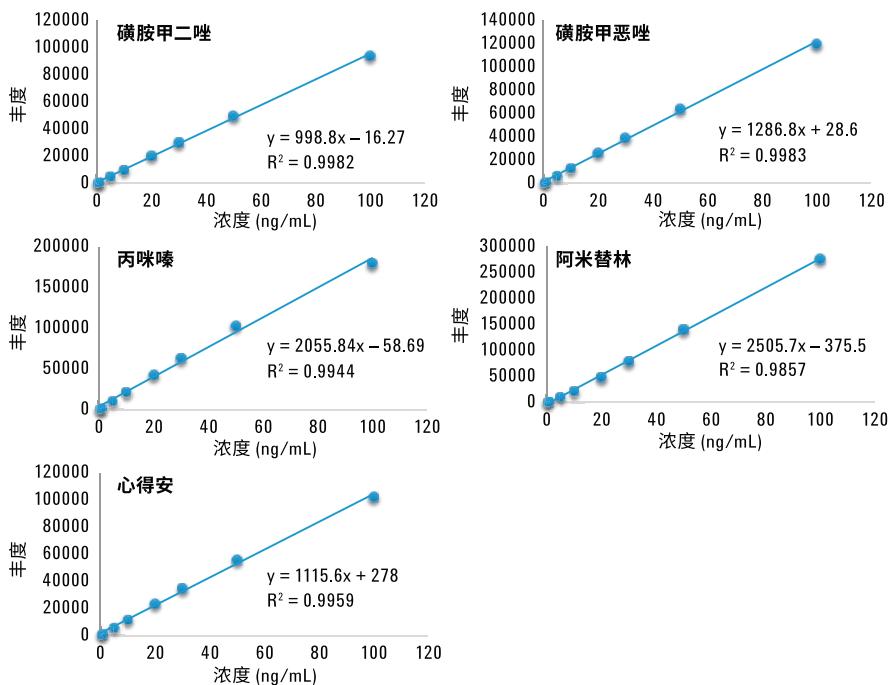


图 4. 药物化合物的 UHPLC/MS (SIM) 方法线性

表 4. UHPLC/MS (SIM) 方法准确度

浓度	ng/mL							
	0.5	1	5	10	20	30	50	100
磺胺甲二唑	100.9	97.5	102.7	100.8	103.0	100.8	99.9	94.4
% 平均准确度 (n = 6)								
磺胺甲恶唑	100.4	98.5	102.0	101.0	103.2	102.0	99.5	93.3
% 平均准确度 (n = 6)								
心得安	101.0	97.3	100.8	103.0	105.0	102.9	99.5	90.4
% 平均准确度 (n = 6)								
丙咪嗪	100.2	98.3	103.0	105.3	104.7	102.7	99.4	86.4
% 平均准确度 (n = 6)								
阿米替林	106.5	90.3	86.1	89.5	97.6	106.6	112.9	110.5
% 平均准确度 (n = 6)								

用户补充的 MS 单位质量谱库

利用 UHPLC/MS 方法进行 CV 时，能够在全扫描模式下对未知化合物进行检测。查找未知峰有待进一步研究。根据质谱图使用软件辅助化合物的鉴定有利于快速鉴定。开发出由用户创建的单位质量质谱库以扩充作为 OpenLab ChemStation 附加软件的 NIST 质谱库搜索程序，并将五种标准化合物的谱图加入到谱库中。进样分析磺胺甲恶唑，并在扫描模式下采集色谱图。在用户创建的谱库中搜索扫描模式谱图。结果（图 5）表明磺胺甲恶唑得到正确鉴定。因此，利用补充了参考标样中用户补充的光谱信息的 NIST 质谱库搜索程序可轻松鉴定未知峰。

表 5. 对磺胺甲恶唑溶液进行大体积进样得到的峰面积、峰宽和 S/N

浓度 (ng/mL)	进样量 (μ L)	峰面积	峰宽 (min)	S/N
10	5	4012	0.09	1787
	10	7746	0.11	3014
	12	9160	0.13	3031
20	5	7484	0.09	3508
	10	14642	0.11	5951
	12	17581	0.13	5985
30	5	10838	0.09	5152
	10	21658	0.11	8815
	12	25924	0.13	8885

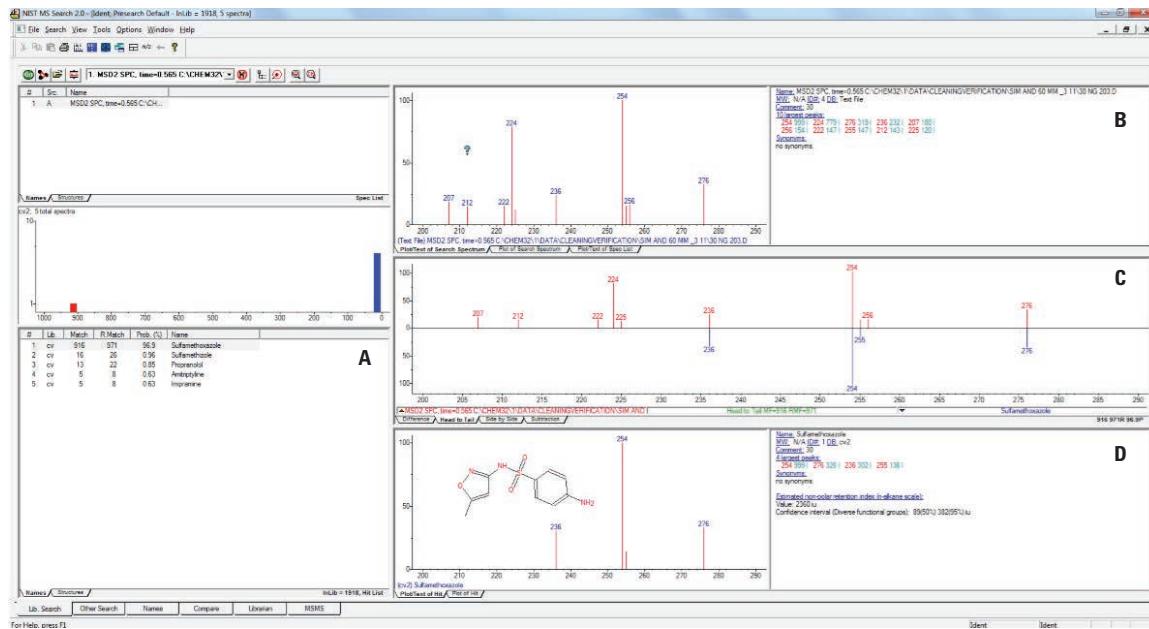


图 5. NIST 质谱库搜索程序。A) 所鉴定的化合物是磺胺甲恶唑的概率为 96.9%。B) 未知化合物的谱图 C) 谱库化合物和未知化合物的比较图 D) 标样的谱库谱图

结论

高效药物的 CV 需要采用高灵敏度和高通量方法。本研究开发出了一种用于 CV 的 2 分钟通用方法，并采用五种常见药物对其进行验证，结果展示了该方法在此应用中的性能。使用 UV 和 MS (SIM) 检测分别可获得 20-50 ng/mL 和 0.5 ng/mL 的 LOQ。使用最大光强 UV 流通池和大体积进样可进一步改善该方法，其灵敏度可分别提高 2-4 倍和 2 倍（使用 10 μL 的进样量）。Agilent 1290 Infinity UHPLC 与配备安捷伦喷射流离子源 (AJS) 的 Agilent 6150 单四极杆质谱仪在 SIM 或 SCAN 模式下运行，为 CV 研究提供了一种通用的工具，适用于对来自生产设备的冲洗溶液进行定量分析。此外，通过搜索用户补充的质谱库可轻松鉴定未知化合物。

参考文献

1. Farris, J.P., et.al. History, implementation and evolution of the pharmaceutical hazard categorization and control system. *Chemistry Today* **2006**, 24 (2), pp 5-10
2. Dong, M.W., et.al. A generic HPLC/UV platform method for cleaning verification. *Amer. Pharm. Rev.* **2012**, 15 (6), pp 10-17
3. Naegele, E., Kornetzky, K. Highly Sensitive UV Analysis with the Agilent 1290 Infinity LC System for Fast and Reliable Cleaning Validation – Part 1: Measurement of calibration curves, determination of LOD and LOQ and method validation using a DAD equipped with standard or high sensitivity flow cell (利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行高灵敏度紫外分析，可实现快速可靠的清洁验证 — 第 1 部分：使用配有关于标准或高灵敏度流通池的 DAD 测量校准曲线、测定 LOD 和 LOQ 以及进行方法验证)。安捷伦应用简报 **2010**, 出版号 5990-6930EN
4. Naegele, E., Kornetzky, K. Highly Sensitive UV Analysis with the Agilent 1290 Infinity LC for Fast and Reliable Cleaning Validation – Part 2: Monitoring a cleaning validation procedure using a DAD equipped with standard or high sensitivity flow cell (利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行高灵敏度紫外分析，可实现快速可靠的清洁验证 — 第 2 部分：使用配有关于标准或高灵敏度流通池的 DAD 监控清洁验证程序)。安捷伦应用简报 **2010**, 出版号 5990-6930EN
5. Dong, M.W., A Three-Pronged Template Approach for Rapid HPLC Method Development. *LCGC North America* **2013**, 31 (8), pp 612-621
6. Liu, L, Pack, B.W. Cleaning verification assays for highly potent compounds by high performance liquid chromatography mass spectrometry: Strategy, validation, and long-term performance. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2007**, 43, pp 1206-1212

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、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，2014

2014 年 6 月 1 日，中国出版

5991-4509CHCN



Agilent Technologies