

使用高分辨率液质联用系统对潜在的遗传毒性化合物进行筛查、鉴定和定量分析

使用 Agilent 6545 精确质量数 Q-TOF 系统和 MassHunter Mass Profiler 软件对洗必泰原料药进行分析

应用简报

制药

作者

Syed Salman Lateef
安捷伦科技公司
Bangalore, India

摘要

本研究展示了如何通过对药物进行常规筛查，对潜在的遗传毒性化合物进行鉴定和定量分析。在本应用简报中，我们使用 Agilent 6545 Q-TOF 液质联用系统采集含洗必泰成分的药品样品的精确质量数据。利用 Agilent MassHunter Mass Profiler 软件挖掘数据并比较不同样品，以生成化合物差异列表。在精确质量数据库中根据差异列表搜索鉴定出的潜在遗传毒性化合物 4-氯苯胺。采用全离子 MS/MS 采集模式通过 MS/MS 谱库匹配确认 4-氯苯胺，并使用外标对该物质进行定量分析。该工作流程适用于批次间样品分析，可对已知的潜在遗传毒性化合物进行检测和定量分析。



Agilent Technologies

前言

原料药在长期储存或储存不当时，可能产生潜在的遗传毒性化合物。对遗传毒性化合物进行检测、鉴定和定量分析是一个耗时的过程。监管机构¹要求对遗传毒性化合物的形成进行报告。软件工具经过最新升级后，支持对复杂样品中的潜在遗传毒性化合物进行快速的高性价比检测。Agilent MassHunter Mass Profiler (MP) 软件能够对两组样品进行比较，并测定它们之间的任何显著差异。MP 中的主成分分析 (PCA) 工具可根据鉴定出的差异标记物对化合物进行分类。差异标记物指的是与对照品相比，浓度超出指定值的化合物。定制的精确质量数据库可用于鉴定样品之间的差异。在本研究中，通过对降解和未降解洗必泰样品的 MP 分析，得到了样品间有统计学差异的化合物的列表。使用 MP 软件中的安捷伦 ID 浏览器功能，在包含潜在遗传毒性化合物的定制数据库中对这些化合物进行搜索。利用精确质量谱库匹配进一步确认这些化合物，然后对其进行定量分析。图 1 是本研究所采用的工作流程。

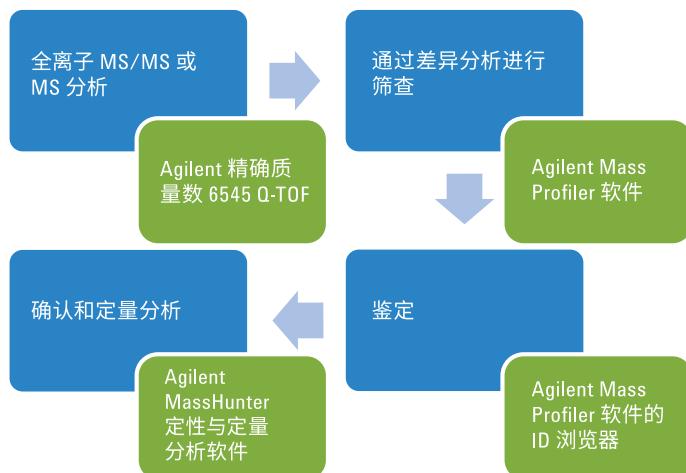


图 1. 遗传毒性化合物分析工作流程

实验部分

试剂与材料

洗必泰和 4-氯苯胺购自 Sigma-Aldrich (印度)。甲醇为 LC/MS 级 (Lab Scan, Bangkok)。纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore, USA)。

样品前处理

测试样品

取 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洗必泰的甲醇溶液，向其中加入等量的 100% 甲酸，使洗必泰发生降解。将该溶液加热至 80 °C 并恒温 1 小时。然后用 50/50 甲醇/水溶液将该溶液稀释至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。在 LC/MS 分析过程中，通过集成式分流阀将洗必泰峰切换至废液瓶。配制四个测试样品。

对照品

洗必泰标准溶液无需经过酸处理或加热。使用四个对照品。

标准储备液

洗必泰 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 100% 甲醇溶液，以及 4-氯苯胺 (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 100% 甲醇溶液

校准稀释溶剂

溶于 50/50 甲醇/水溶液中的 1000 ng/mL 洗必泰溶液

校准品

配制浓度为 0.12、0.6、1.2、2.4、3、4、5、9、15、27、54、75、150 和 300 ng/mL 的 4-氯苯胺标样。选择这些浓度是因为它们相对待检测的遗传毒性化合物足够低。每个浓度平行配制三次。

仪器与软件

液相色谱参数

利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统（二元）对分析物进行色谱分离。采用时间较长的液相色谱方法（12 分钟）筛查样品中形成的新杂质。将时间较短的全离子 MS/MS（5 分钟）定量分析方法针对 4-氯苯胺的定量分析进行优化。

质谱参数

采用 Agilent MassHunter 数据采集软件 (B.05.01)、定性分析软件 (B.07.00)、Mass Profiler 软件和定量分析软件 (B.07.00) 进行数据采集和分析。

使用配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6545 Q-TOF 在正离子模式下，通过 Swarm 自动调谐进行调谐。Swarm 自动调谐采用粒子群优化技术，最多支持同时调节 21 个参数，可实现更稳定的仪器调谐和优化。对 4-氯苯胺 (m/z 127.0189) 进行定量分析时，针对 m/z 50-250 的目标质量范围选择调谐参数。

表 1. 液相色谱参数

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 3.0 × 50 mm, 1.8 μ m (部件号 959757-302)
柱温	40 °C
进样量	5 μ L
自动进样器温度	6 °C
进样针清洗	针冲洗口 (100% 甲醇) 5 秒
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸的甲醇溶液
流速	0.5 mL/min
梯度	全离子 MS/MS 定量分析方法 时间 (min) %B 0.0 40 3.0 60 4.0 60 4.1 40 5.0 40 停止时间：5.0 min 后运行时间：0.5 min 质谱筛查方法 时间 (min) %B 0.0 20 1.0 20 7.0 40 8.0 95 10.0 95 11.0 20 停止时间：12.0 min

表 2. Q-TOF 参数

参数	值
离子源条件	
干燥气温度	250 °C
干燥气 (氮气) 流速	11 L/min
雾化器气体 (氮气) 压力	40 psig
鞘气温度	200 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	40 V
Oct 1 RF Vpp	700 V
采集速率/时间	5 质谱图/秒
参比质量	64.0158 和 922.0098
调谐	高灵敏度限幅器位置 2 GHz 扩展动态范围模式
碰撞能量	0、10 和 20 eV

结果与讨论

通过差异分析进行筛查

使用 Mass Profiler 软件的递归分子特征提取算法对 LC/MS 分析的降解对照样品所得的数据文件进行处理。采用适合提取化合物特征的响应值达 4000 的峰高过滤器、100 的质量得分和 4 倍以上的变化进行统计分析。利用高于

4 倍的变化检测与对照样品显著不同的特征。图 2 显示了使用该筛查方法得到的丰度比对数值相对于保留时间的特征图的统计分析结果。图 C 中圆点的相对大小与特征丰度成正比。可使用数据库搜索对每个圆点进行单独鉴定，并与提取离子色谱图共同可视化。

PCA 图

PCA 图显示降解的洗必泰样品与对照品不同（图 3）。这表明降解的洗必泰样品中包含不同于对照组的特征。对照组未表现出明显分离，说明样品之间无差异（蓝色圆点）。

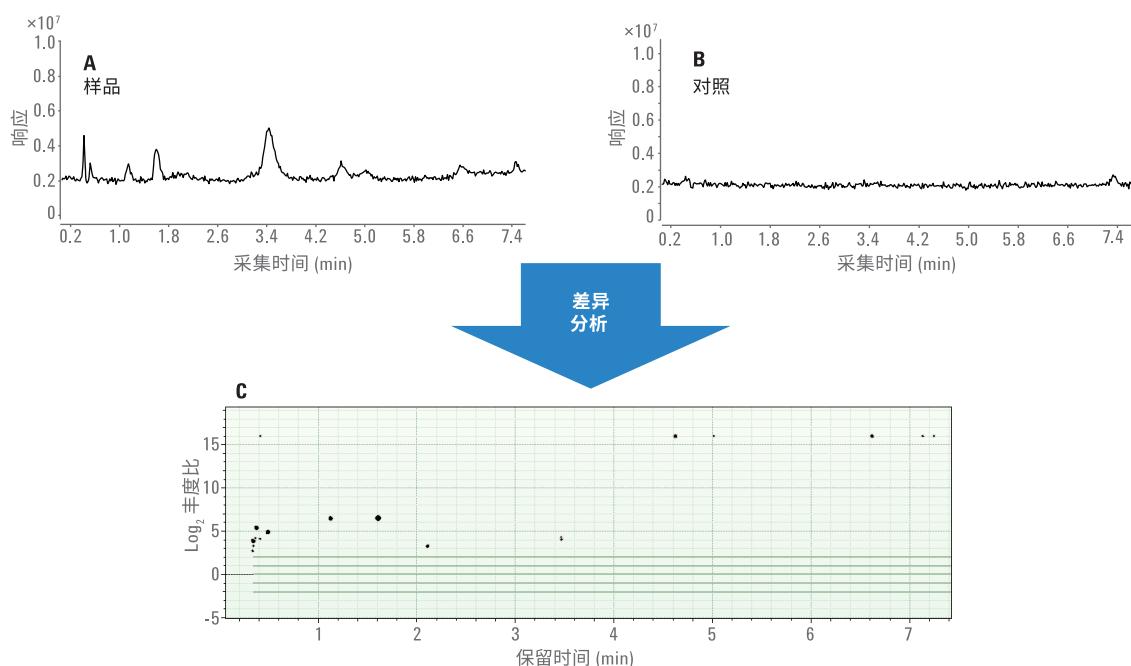


图 2. 样品和对照品的输入文件分别如图 A 和 B 所示。洗必泰峰在 7.4 分钟后洗脱，因此该图中未示出。图 C 显示了在差异分析后得到的丰度比对数与保留时间关系图

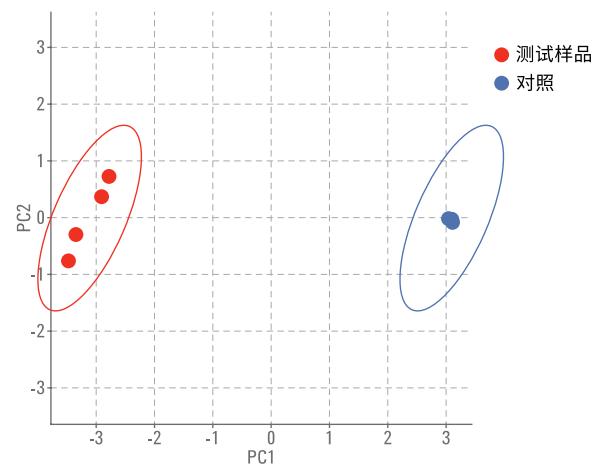


图 3. 显示不同样品组的 PCA 图。红色圆点代表测试样品，蓝色圆点代表对照样品

化合物鉴定

使用标准化合物创建定制的精确质量数据库和谱库。数据库还包括洗必泰杂质的文献报道质量数、分子式和结构。使用 Mass Profiler 的 ID 浏览器在精确质量数据库中搜索化合物的差异列表，进行统计后分析。结果表明降解样品中存在具有潜在遗传毒性的 4-氯苯胺（图 4）。

化合物特征总结

表 3 汇总了差异分析和数据库搜索结果。使用学生 t 检验计算差异得分。用 0-100 之间的数值表明数据组是否存在显著差异。数值越大，说明两组数据集之间存在差异的可能性更大。4-氯苯胺以微量浓度存在于对照品中，其浓度明显低于降解样品中检出的浓度。利用 ID 浏览器内置的分子

式生成器生成所有化合物的分子式。

4-氯苯胺是一种潜在的遗传毒性化合物，因此通过谱库匹配予以进一步确认，并对其进行定量分析。其他某些化合物（如化合物 1）检出的浓度较高，但并未包括在定制遗传毒性数据库中。对于这类化合物，需要计算其分子式。

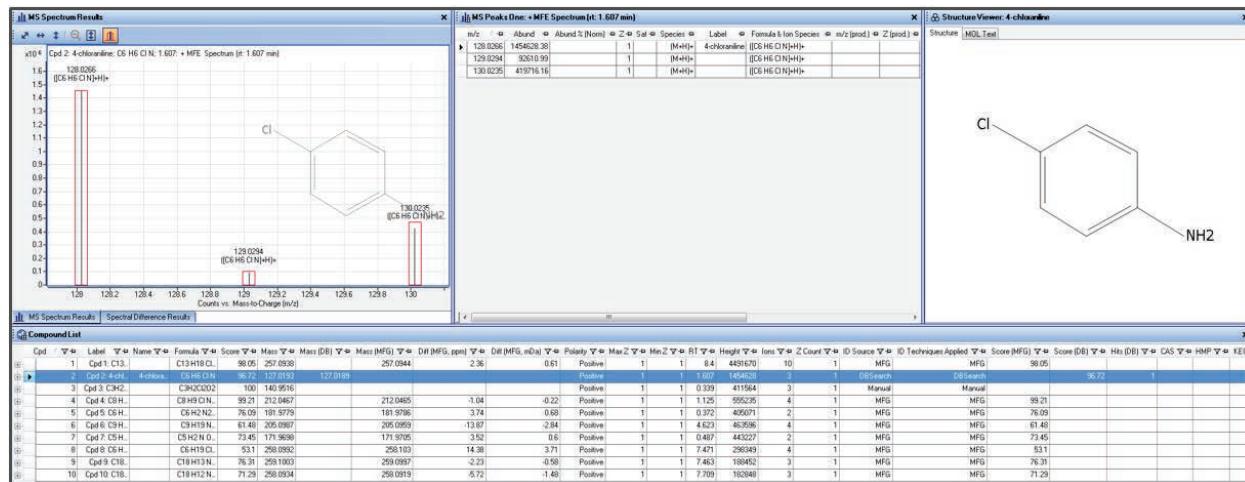


图 4. 使用数据库/谱库对潜在遗传毒性化合物的鉴定

表 3. 差异分析的特征总结，显示了样品和对照之间显著增加的化合物

MassProfiler 特征总结									
ID	分子式	名称	RT	质量数	丰度	0 得分值	Log2 (A1/A2)	表达	差异得分
1	C ₁₃ H ₁₈ ClO ₃		8.4	257.0942	4664291	100	7.86	上调	100
2	C ₆ H ₆ Cl N	4-氯苯胺	1.61	127.0192	1480334	100	6.51	上调	100
3	C ₃ H ₂ Cl ₂ O ₂		0.34	140.9516	592521	100	3.89	上调	99.9
4	C ₈ H ₉ CIN ₄ O		1.13	212.0464	551298	100	6.48	上调	100
5	C ₆ H ₂ N ₂ O ₃ S		0.37	181.9781	543519	100	5.4	上调	99.9
6	C ₈ H ₁₉ NS ₂		4.62	205.098	456724	100	16	上调	100
7	C ₈ H ₂ NO ₄ S		0.49	171.9698	429576	100	4.89	上调	100
8	C ₈ H ₁₉ CIN ₆ OS		7.47	258.1016	299708	100	5.68	上调	100
9	C ₁₈ H ₁₃ NO		7.46	259.1006	186491	100	6.35	上调	100
10	C ₁₈ H ₁₂ NO		7.71	258.0938	184274	100	16	上调	100

潜在遗传毒性化合物的确认与定量分析

利用用时较短的数据非依赖型采集方法对 4-氯苯胺进行靶向确认和定量分析。在药物样品的数据非依赖型采集（全离子 MS/MS）中，同时获得了 MS 和 MS/MS 信息。利用个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 中 MS/MS 谱图的碎片离子，从高能量通道中提取离子色谱图。将低能量通道中获得的母离子的提取离子色谱图 (EIC) 与碎片离子/子离子 EIC 匹配，以获得共流出得分（图 5）。基于精确质量数碎片匹配结果以及母离子和子离子的共流出对 4-氯苯胺进行确认。在 MS/MS 谱库的三个认证谱图中发现了 4-氯苯胺，其中碎片离子选自高能量 MS 分析。所选的谱图与定性和定量离子共同用于定量分析方法。

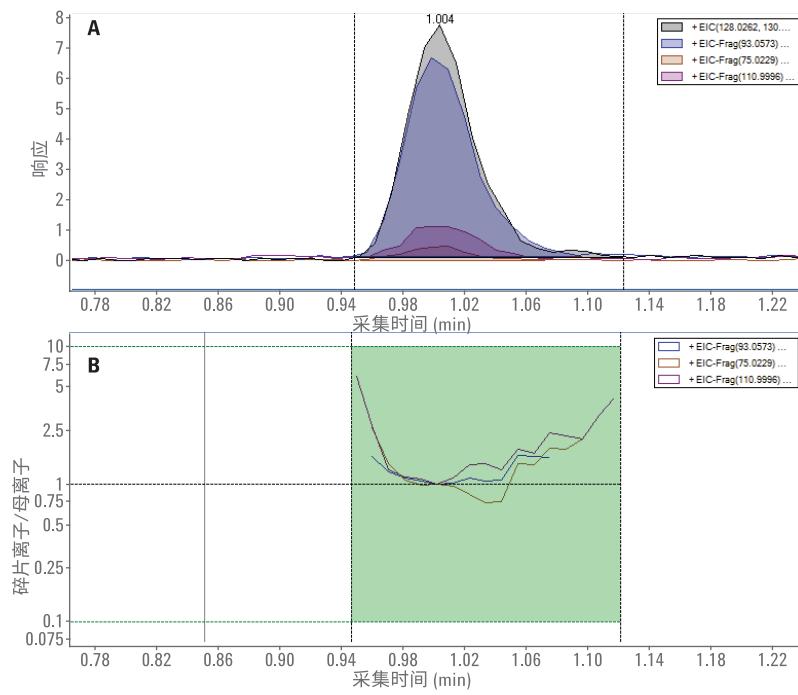


图 5. 高于离子色谱图所选阈值的色谱峰中的叠加提取离子迹线 (A)。共流出得分 (B) 显示峰纯度高于 98%

将定性和定量碎片离子以及化合物名称、保留时间、母离子、碎片离子、碰撞能量和相对丰度导出至 MassHunter 定量分析软件以设置定量分析方法，如图 6 所示。强度最高的离子用于绘制定量离子曲线，而强度较低的特征碎片离子则用作定性离子。

绘制浓度超过 3 个数量级 (0.1-300 ng/mL) 的校准曲线 (图 7)。在高灵敏度模式下对 6545 进行校准和调谐。此外，由于 4-氯苯胺的某些子离子具有低质量数，因此采用 Swarm 自动调谐进行低质量数 (50-250 m/z) 调谐。降解样品中的分析结果平均值为 29 ng/mL。潜

在的遗传毒性化合物通常具有 0.05% 的报告限。当 1 mg 洗必泰溶解于 10 mL 溶液时，0.05% 的限值要求仪器的定量限要低至 50 ng/mL。因此，任何分析方法都需要获得较低 LOQ。本研究中开发的方法可检测浓度低于 1 ng/mL 的杂质。

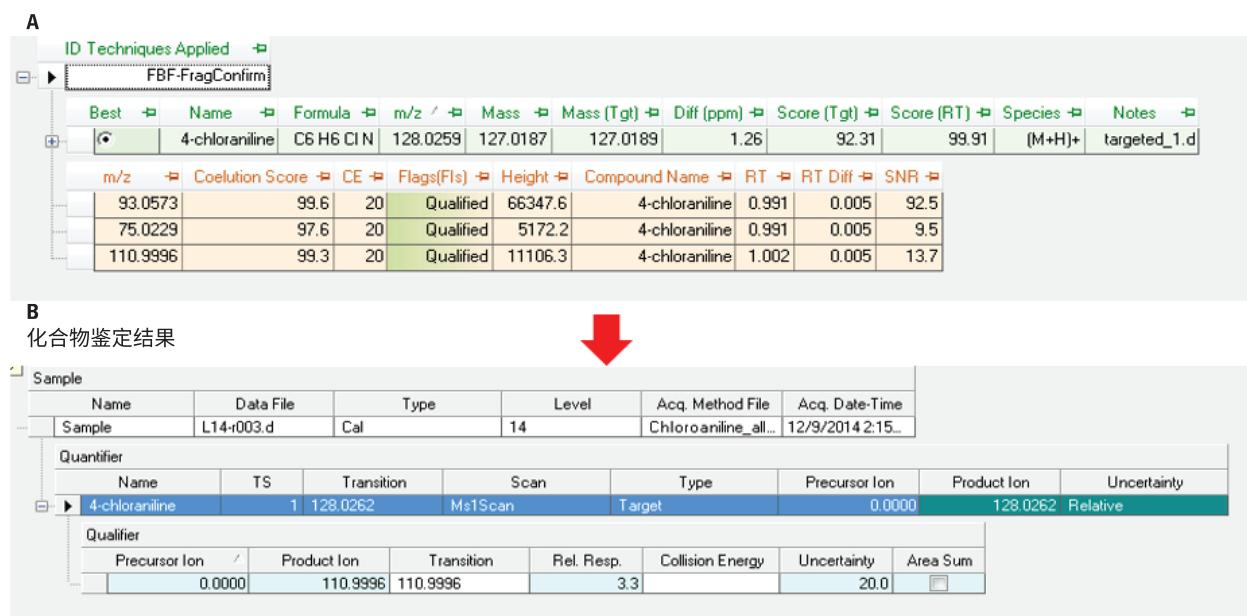


图 6. 使用化合物鉴定结果的定量分析方法。A) 定性分析软件的屏幕截图；(B) 方法创建界面视图

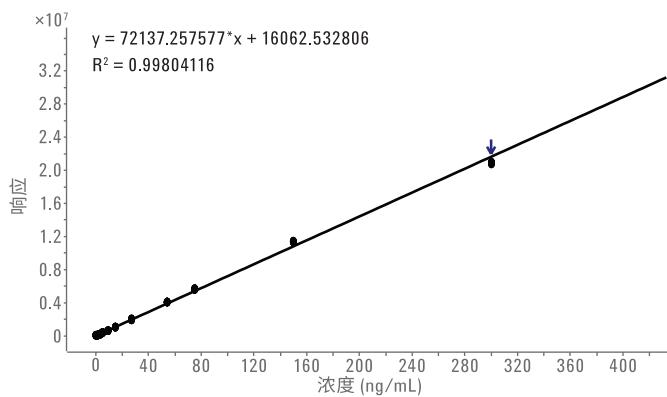


图 7. 使用全离子 MS/MS 计算得到的 4-氯苯胺校准曲线

结论

本应用简报表明，使用高分辨率 LC/MS 能够对潜在的遗传毒性化合物进行筛查、鉴定与定量分析。通过全离子 MS/MS 数据与 Agilent MassHunter Mass Profiler 软件（7.0 版）的结合，获得了简化的工作流程。自动化差异标记物分析显示样品与对照组之间存在显著差异。工作流程中还包括使用 PCDL 自动化检测和鉴定作为目标化合物的潜在遗传毒性杂质。利用全离子 MS/MS 方法可用于同时生成定量离子和定性离子。这样能够对目标化合物进行定量分析。在利用这项技术处理的测试样品中测得 4-氯苯胺的浓度约为 29 ng/mL 或 0.02%（分析线性范围为 0.1-300 ng/mL）。该工作流程可作为一种常规药物样品分析方法，对潜在的遗传毒性化合物进行鉴定和报告。

参考文献

1. EMA Guidance on the limits of genotoxic impurities, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf

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，2015

2015 年 11 月 1 日，中国出版

5991-6378CHCN



Agilent Technologies