

药品中潜在致突变性杂质的痕量水平定量分析

使用 Agilent Ultivo LC/TQ 的混合模式数据采集功能

作者

Theresa Sosienski 和
Kyle Covert
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报重点介绍了一种分析方法，用于精确定量两种潜在致突变性杂质 3-氨基吡啶和异烟酰胺，这两种杂质可由达伐吡啶中的活性药物成分 (API) 4-氨基吡啶形成。Agilent Ultivo LC/TQ 具有混合模式采集功能，通过该功能可以同时采集样品的定量 (SIM 和 MRM) 及定性信息 (全扫描和产物离子扫描)。混合模式的工作原理是将扫描功能与目标分析物的 SIM 或 MRM 整合到同一时间段内。实验表明该方法具有优异的灵敏度和精度，潜在致突变性杂质的定量限远低于法规要求。

前言

在 API 的生产过程中，具有致突变性的原料或副反应产物可能会存在于生产批次中。这些致突变性杂质可能会被引入到最终产品中，因此，必须对生产批次中的潜在致突变性杂质 (PMI) 进行筛查。在本分析方法中，我们分析了达伐吡啶中的 API，即 4-氨基吡啶产生的 3-氨基吡啶和异烟酰胺。达伐吡啶的标准剂量为 20 mg/天，意味着总 PMI 需要精确检测到低于 75 ppm（毒理学关注的 PMI 阈值 = 1.5 µg/天）^[1,2]。本应用简报展示了在高浓度的 API 中，使用具有混合模式采集功能的 Ultivo LC/TQ 分析的两种 PMI — 3-氨基吡啶和异烟酰胺的定量分析。

通常，这种类型的分析需要用到 LC/UV 或单四极杆 LC/MS。然而，使用 LC/TQ 可以更精确地定量分析，因为该系统提高了寻找已知杂质的特异性，且因为降低了化学噪音而具有更高的灵敏度。Ultivo 的混合模式采集功能允许在同一时间段内同时采集 MRM、SIM、产物离子扫描、母离子扫描和中性丢失扫描数据。这种混合模式功能允许用户收集更多信息，并可在一次进样中精确定量目标化合物。根据法规的灵敏度要求，标准 ESI 离子源是本应用经济合理的选择。

这种方法的一个难题是需要从相对高浓度的 API 中检测 PMI 化合物。分离度在此方法中非常重要，因为杂质后洗脱的 API 浓度很高。由于此方法中的分析物具有亲水性，故它们在传统反相色谱柱上的保留性较差。因此，我们采用极强的亲水相互作用液相色谱柱 (Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱) 分离分析物。最后，当 API 从色谱柱中洗脱时，液相色谱流路被移出 MS，避免了离子源的潜在污染和质谱检测器的饱和。

实验部分

试剂与化学品

本应用简报中使用的所有试剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 终端膜式过滤器 (Merck, Darmstadt, Germany) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。甲酸购自 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)，5 mol/L 甲酸铵溶液购自安捷伦科技公司 (Santa Clara, CA, USA) (部件号 G1946-85021)。药物和杂质标准品购自 Millipore-Sigma (Merck, Darmstadt, Germany)。

样品前处理

使用 20 mg/mL 的 4-氨基吡啶溶液作为杂质的基质。用乙腈将 4-氨基吡啶稀释至 20 mg/mL。用乙腈将 3-氨基吡啶和异烟酰胺溶解并稀释到 10 µg/mL 的储备液浓度。用 20 mg/mL 的 4-氨基吡啶储备液进行连续稀释，得到 3-氨基吡啶和异烟酰胺的校准曲线。

仪器和实验参数

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统

- 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)
- 1260 Infinity II 样品瓶进样器，带有集成式柱温箱 (G7129A)
- 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 HS (G7117C)

Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统

- 电喷雾离子源 (G1948B)

软件

具有 Quant-My-Way 功能的 Agilent MassHunter 定量分析软件 B.09

使用混合模式采集功能进行 MRM 和扫描方法设置

表 1. Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪参数

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm, 带 PEEK 内衬 (部件号 673775-924)
柱温	35 °C
进样量	1 μL
流动相	A) 10 mmol/L 甲酸铵 + 0.02% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.5 mL/min
梯度	时间 (min) %B 0 95 2 90 4 60 8 60
停止时间	8.0 min
后运行时间	6.0 min
检测 UV	[265, 10/参比波长 360, 80] nm

表 2. ESI 离子源参数

参数	值
气体温度	350 °C
气体流速	10 L/min
雾化器压力	40 psi
毛细管电压	4000 V(+)
液相流转移至废液	3 min

Acquisition Parameters

Scan type	Polarity	Compound/Segment name	Precursor (m/z)	MS1 res	Product (m/z)	MS2 range start (m/z)	MS2 range end (m/z)	MS2 res	Scan/Dwell time (ms)	Frag (V)	ISTD?	CE (V)	Threshold	
Scan	Positive					70	400		300	110	☐		0	
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	68.1			Unit	100	110	☐	20		
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	44		
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	41.1			Unit	100	110	☐	28		
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	80			Unit	100	110	☐	20		
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	53			Unit	100	110	☐	32		
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	52		

图 1. 设置混合模式扫描与将扫描行添加到 MRM 列表一样简单

结果与讨论

方法线性、灵敏度和精度

配备标准 ESI 离子源的 Ultivo LC/TQ 对测量的两种杂质显示出优异的灵敏度。3-氨基吡啶可准确定量为 5 ng/mL，异烟酰胺在 4-氨基吡啶基质 (20 mg/mL) 中最低可定量为 0.5 ng/mL。该分析方法对每种分析物的精度都很高，在定量限下进行的六次重复进样中，3-氨基吡啶和异烟酰胺的 RSD% 分别为 4.25% 和 0.23% (图 3)。分析结果观察到极好的线性，6 点校准曲线中两种杂质的 R^2 均大于 0.99 (图 2)。

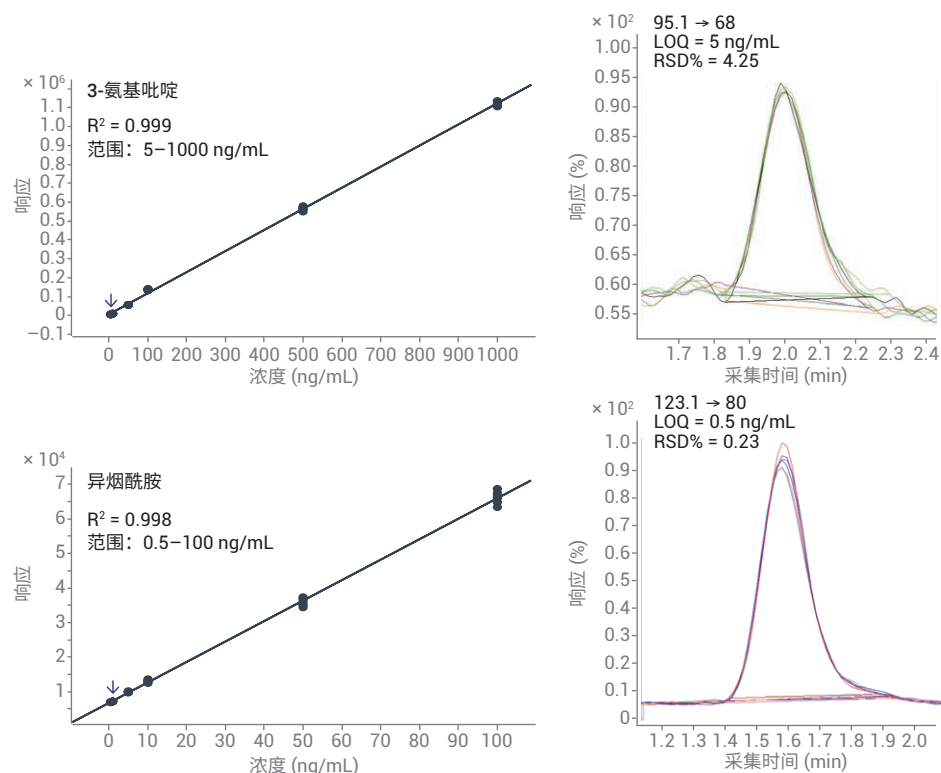


图 2. 在 API 基质中测定的 3-氨基吡啶和异烟酰胺的 6 点标准曲线，在定量限下进行六次重复进样的叠加图

使用混合模式采集功能为分析获得更多信息

混合模式采集允许 MS 用户同时采集扫描数据和 MRM 数据，操作人员可能在同一样品中发现其他洗脱化合物。针对目标化合物的 MRM 提供了比扫描数据更具选择性、更灵敏且更精确的定量。扫描数据可以提供样品中存在的意外分析物的信息。DAD 模块也可以很容易地集成到液相色谱堆栈中，可提供额外优势，可以检测到高浓度 API，从而及时将流向质谱仪的液相流转移到废液中（图 3）。使用混合模式扫描不会改变 MRM 离子对的峰形或面积（图 4）。

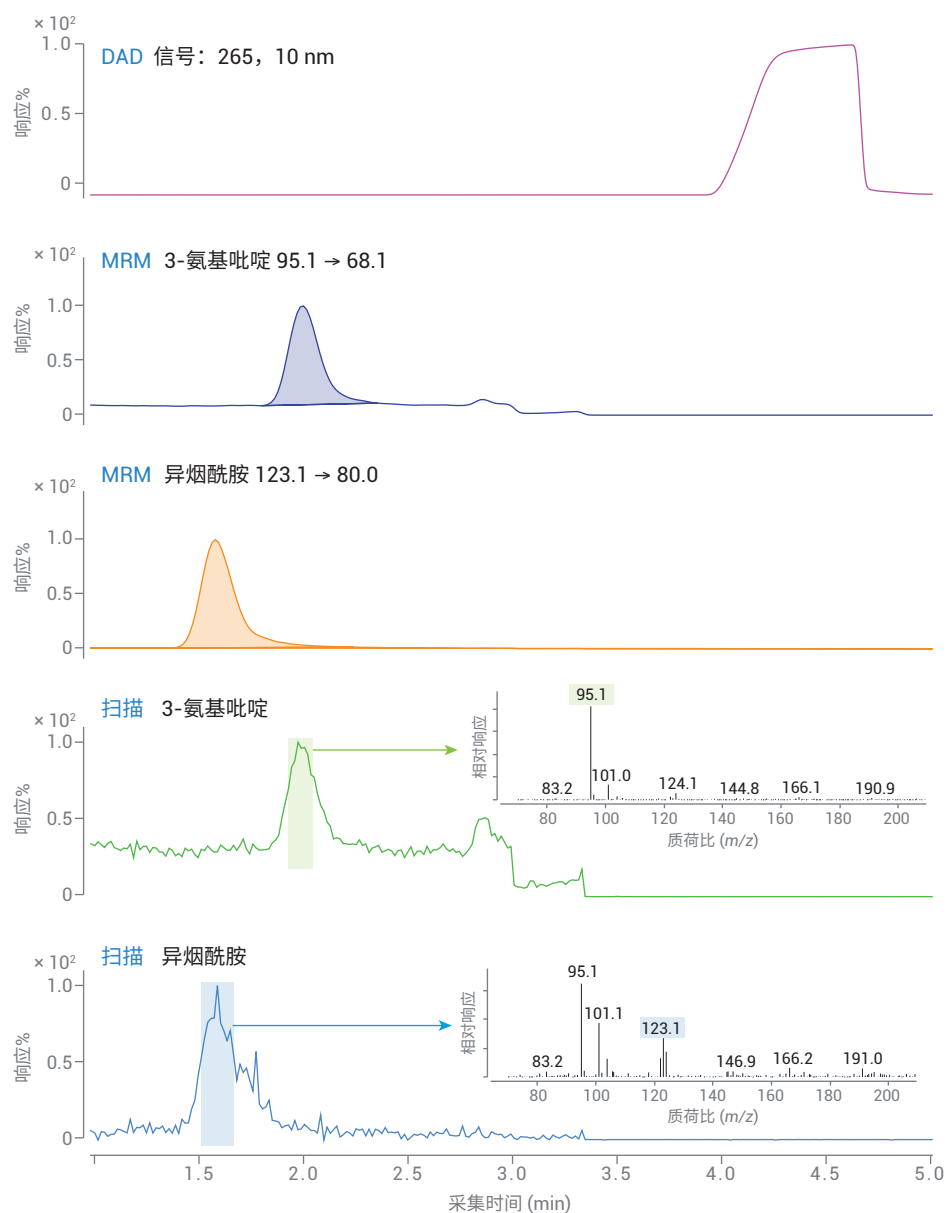


图 3. 混合模式采集功能可以同时使用扫描和 MRM。DAD 信号可以检测 API，从而及时将液相流转移到废液中，降低 MS 污染。DAD 信号未检出 MS 发现的杂质

结论

本应用简报证明了在所研究的 API 中，即 20 mg/mL 4-氨基吡啶中潜在致突变性杂质（3-氨基吡啶和异烟酰胺）灵敏、准确的定量。包含 MRM 的混合模式采集（Agilent Ultivo 的特有功能）允许从样品中采集额外的扫描信息，并可在同一时间段内用 MRM 准确定量 PMI 化合物。由于 Ultivo 具有与 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统联用的标准 ESI 离子源的优秀性能，因此建议使用这种经济的仪器组合，在保持潜在杂质准确定量的同时，使用少量 API 样品检测 PMI。

参考文献

1. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. ICH, March **2018**. 2
2. Jain, M. *et al.* Determination of Five Potential Genotoxic Impurities in Dalfampridine Using Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 133, 27–31
3. Covert, K. How to Catch a Potential Mutagenic Impurity Using an Agilent LC/MSD XT and Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Column for Sensitive and Reliable Detection of Dalfampridine Impurities（如何使用安捷伦 LC/MSD XT 和 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱采集潜在致突变性杂质，实现灵敏而可靠的达伐吡啶杂质检测），安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0864EN，**2019**

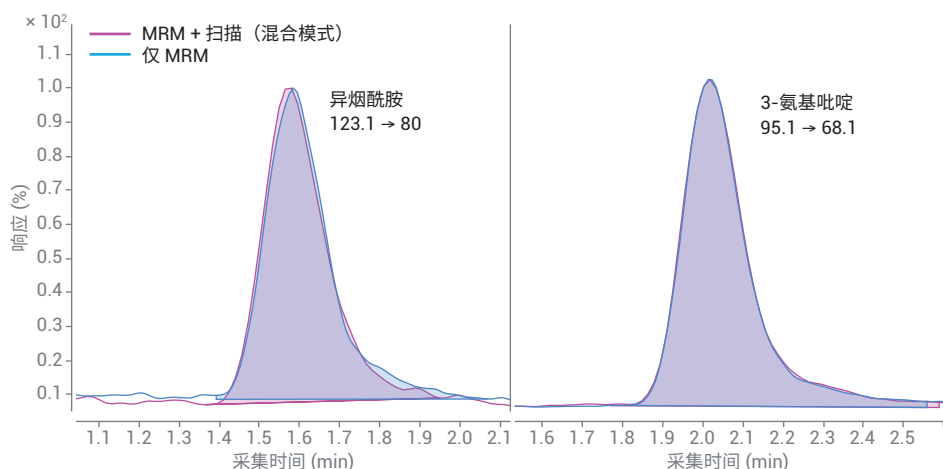


图 4. 使用混合模式和仅使用 MRM 扫描类型时，可以观察到几乎相同的峰形和峰面积

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，2019
2019 年 8 月 19 日，中国出版
5994-1238ZHCN

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

 **Agilent**
Trusted Answers