

# LCMS-8050 应用于单抗包材中浸出物的测定

## LCMSMS-531

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统分别建立了单抗包材浸出物己内酰胺、2- 巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物的测定方法。得到相应检测限和定量限，且线性良好，定量限重复性实验结果显示，其保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD%）分别小于 1% 和 10%，表明重复性良好。

**关键词：** LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 单克隆抗体 包材浸出物

药用包材在药品货期过程中起到保护作用，为制剂质量提供一定保护作用，此外药用包材与制剂相容性尤为重要，不能与制剂相互作用而引起制剂质量的变化，比如包材浸出物引起活性成分的降解等。因此，针对包材浸出物的研究为证明药用包材相容性和安全性提供理论依据。

包材浸出物是指在正常的存储和使用条件下从包装部件迁移进入实际药品的化合物，在生物药行业，尤其是单克隆抗体药物，其包材浸出物的相关测定也

尤为重要，其中橡胶制品硫化过程中，以伯胺为基础的硫化剂和氮氧化物反应生成致癌性 N-亚硝胺类化合物，故需对此类浸出物进行测定，为单抗包材相容性研究提供依据。

本文针对单抗包材的相关浸出物己内酰胺、2- 巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物，采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统，建立了相关分析检测方法，供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A<sub>5R</sub>

输液泵：LC-30AD

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

质谱仪：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions LCMS Ver. 5.93

### 1.2 分析条件

液相色谱条件（己内酰胺、2- 巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A）：

色谱柱：Shim-pack GIST, 100 mm x 2.1 mm I.D., 2 μm

P/N 227-30001-04 岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液 B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min 柱温 : 40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pump	B.Conc	20
5.50	Pump	B.Conc	98
7.50	Pump	B.Conc	98
7.51	Pump	B.Conc	20
10.00	Controller	Stop	

LCMS-8050 质谱条件 (己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A):

离子源: ESI(+/-)

接口电压: 4.0 kV

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 350°C

DL 温度: 200°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

接口温度: 300°C

干燥气流速: 5.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	名称	电离模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	己内酰胺	+	114	44*	-13	-26	-14
				79	-13	-19	-12
2	2-MBT	-	166	134*	11	22	15
				58	12	33	11
3	全氟辛酸	-	413	369*	12	10	14
				169	10	17	13
4	双酚 A	-	227	133*	11	18	15
				212	11	23	15

注: \* 表示定量离子

液相色谱条件 (氮亚硝胺类):

色谱柱: ACE Excel 3 C18-AR, 150 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水溶液 B 相 -0.1% 甲酸甲醇溶液

流速: 0.8 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 30%, 时间程序见表 3。

表 3 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pump	B.Conc	30
8.50	Pump	B.Conc	70
13.00	Pump	B.Conc	75
14.00	Pump	B.Conc	98
16.00	Pump	B.Conc	98
16.10	Pump	B.Conc	30
20.00	Controller	Stop	

LCMS-8050 质谱条件 (氮亚硝胺类):

离子源: APCI (+)

雾化气流速: 3 L/min

DL 温度: 180°C

接口温度: 300°C

MRM 参数: 见表 4

接口电压: 4.0 kV

加热模块温度: 200°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 5.0 L/min

表 4 MRM 参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	75	58	-14	-14	-17
			43	-14	-16	-24
2	N-亚硝基吗啉 (NMOR)	117	87	-25	-15	-28
			86	-24	-14	-28
3	N-亚硝基甲乙胺 (NEMA)	89	61	-17	-15	-28
			43	-10	-15	-14
4	N-亚硝吡咯烷 (NPYR)	101	55	-20	-19	-26
			59	-12	-17	-28
5	N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	103	75	-20	-15	-27
			42	-20	-19	-19
6	N-亚硝基哌啶 (NPIP)	115	69	-26	-14	-30
			42	-23	-15	-27
7	N-亚硝基二丙胺 (NDPA)	131	89	-28	-15	-29
			43	-23	-11	-29
8	N-亚硝基二丁胺 (NDBA)	159	57	-12	-15	-24
			103	-12	-14	-11
9	N-亚硝基二苯胺 (NNPA)	199	169	-19	-14	-29
			74	-13	-19	-28

注: \* 表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制

取相应标准贮备液(100 mg/L),用纯水做溶剂逐级稀释为 0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液,待上机分析。

### 1.4 样品前处理方法

样品和甲醇按照 1: 4 (V/V) 的比例混合,漩涡 5 min, 10000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液, 上机分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 线性范围

按照 1.3 配制相应浓度标准溶液, 以各目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 线性相关系数大于 0.99, 准确度在 90.0%-110.0% 之间。曲线结果如下表 5 所示。

表 5 标准曲线

名称	标准曲线		
	线性方程	范围 (ng/mL)	相关系数 r
己内酰胺	$Y=12069.2X-963.675$	0.5-100	0.9987
2-巯基苯并噻唑	$Y=28562.1X+7625.91$	0.5-100	0.9955
全氟辛酸	$Y=7308.55X+2271.23$	0.5-100	0.9971
双酚 A	$Y=179627X+8754.57$	1.0-100	0.9985
NDMA	$Y=5180.70X+733.83$	1.0-100	0.9984
NMOR	$Y=5338.47X-687.383$	1.0-100	0.9992
NEMA	$Y=16807.6X-1874.47$	1.0-100	0.9979
NPYR	$Y=21059.9X+2271.26$	1.0-100	0.9983
NDEA	$Y=9771.63X+410.119$	1.0-100	0.9993
NPIP	$Y=23027.1X-5353.84$	1.0-100	0.9986
NDPA	$Y=14878.4X+817.259$	1.0-100	0.9988
NDBA	$Y=24052.7X+1089.32$	1.0-100	0.9997
NNPA	$Y=20532.1X+65.9848$	1.0-100	0.9987

## 2.2 灵敏度实验

配制 0.5 ng/mL 或 1.0 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试，其结果如图 1 所示。

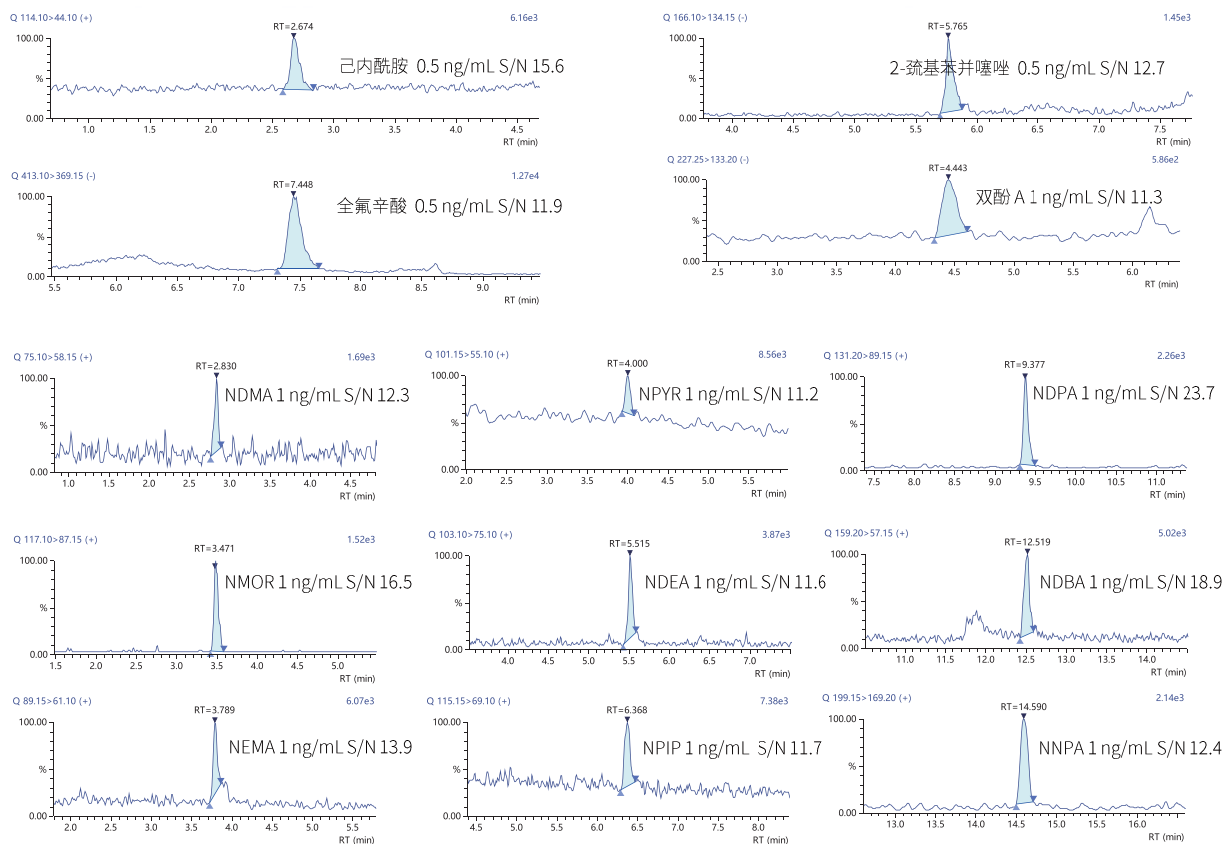


图 1 0.5 ng/mL 或 1.0 ng/mL 标准样品色谱图

### 2.3 重复性实验

按照 1.3 步骤配制灵敏度相关浓度标准溶液, 连续进样 6 次, 考察保留时间和峰面积的重复性, 结果如下表 6 所示。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 1% 和小于 10%, 满足方法要求, 表明仪器精密度良好。

表 6 重复性测试 (n=6)

名称	己内酰胺		2- 巯基苯并噻唑		全氟辛酸		双酚 A	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.685	23265	5.770	5706	7.553	74033	4.449	11531
2	2.687	23628	5.770	5415	7.565	69401	4.457	11113
3	2.679	21350	5.776	5501	7.562	74922	4.462	9855
4	2.674	23221	5.767	5008	7.540	76568	4.442	10829
5	2.692	20773	5.776	4901	7.536	73674	4.453	10407
6	2.679	21193	5.770	5513	7.540	68525	4.449	10589
AVG	2.683	22238	5.772	5341	7.549	72857	4.452	10721
RSD/%	0.24	5.6	0.06	5.9	0.16	4.3	0.15	5.4

名称	NDMA		NMOR		NEMA		NPYR	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.826	5498	3.470	5446	3.787	19764	3.997	24629
2	2.826	4738	3.485	5388	3.780	18456	3.986	23183
3	2.830	5247	3.471	5475	3.796	18423	3.988	22632
4	2.830	5452	3.477	5542	3.782	20730	3.988	23060
5	2.818	5054	3.481	4978	3.786	19419	3.998	23966
6	2.824	5800	3.473	4366	3.794	20149	3.992	21022
AVG	2.826	5298	3.476	5199	3.787	19490	3.992	23082
RSD/%	0.15	7.0	0.17	8.7	0.16	4.7	0.12	5.3

名称	NDEA		NPIP		NDPA		NDBA		NNPA	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	5.512	13856	6.365	24810	9.383	11096	12.514	22620	14.608	17864
2	5.515	13680	6.360	23960	9.381	11376	12.511	22000	14.601	16159
3	5.518	14353	6.364	25500	9.386	11238	12.512	22021	14.595	17024
4	5.513	16063	6.372	22813	9.374	9976	12.496	23387	14.603	17421
5	5.520	14651	6.363	28102	9.385	10956	12.520	25803	14.598	16286
6	5.528	15264	6.363	23111	9.372	10173	12.507	27079	14.603	14002
AVG	5.518	14645	6.365	24716	9.380	10803	12.510	23818	14.601	16459
RSD/%	0.11	6.1	0.06	7.8	0.06	5.4	0.06	8.9	0.03	8.3

## 2.4 实际样品测试

将样品按 1.4 步骤进行处理, 上机分析, 平行测定两次, 检测结果见表 7。

表 7 样品检测结果 (n=2)

名称	己内酰胺	2- 巯基苯并噻唑	全氟辛酸	双酚 A	N- 亚硝胺类
1	23.453	31.927	20.445	25.226	ND
2	23.059	30.745	20.555	27.844	ND
AVG	23.256	31.336	20.500	26.535	ND

注: 浓度单位: ng/mL

## ■ 结论

本实验建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-850 测定单抗包材中相关浸出物己内酰胺、2- 巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和 N- 亚硝胺类的方法, 用外标法定量, 定量限分为己内酰胺 0.5 ng/mL、2- 巯基苯并噻唑 0.5 ng/mL、全氟辛酸 0.5 ng/mL、双酚 A 1 ng/mL 和 N- 亚硝胺类 1 ng/mL; 定量限浓度溶液重复进样 6 针, 其保留时间和峰面积的 RSD% 分别为小于 1% 和小于 10%, 满足方法要求。建立的方法可应用于单抗包材相关浸出物的测试。

岛津应用云

