

LCMS-8050 检测门冬氨酸鸟氨酸中遗传毒性杂质丙烯酰胺含量

LCMSMS-483

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用检测门冬氨酸鸟氨酸中遗传毒性杂质丙烯酰胺的方法。原料药以超纯水溶解定容，滤膜过滤后上机分析。采用外标法定量，在 0.02~20 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.20% 和 0.94~3.70% 之间。丙烯酰胺定量限为 0.02 ng/mL。原料药三个不同浓度样品加标回收率在 96.8~101% 之间。残留实验结果为阴性。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 丙烯酰胺 门冬氨酸鸟氨酸 遗传毒性杂质

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurity, GI) 是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能。其在极低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤，导致基因突变并促使肿瘤发生。因其毒性很强，对药物的安全性造成巨大威胁。

门冬氨酸鸟氨酸药物适用于治疗因急、慢性肝病如肝硬化、脂肪肝、肝炎所致的高血氨症，特别适用于因肝脏疾患引起的中枢神经系统症状的解除及肝昏迷的抢救。在其生产工艺中可能引入丙烯酰胺杂质。

丙烯酰胺已被证实具有遗传毒性。故有必要建立高灵敏度的分析方法对门冬氨酸鸟氨酸原料药中可能存在的痕量丙烯酰胺杂质进行检测和监控。

目前尚无门冬氨酸鸟氨酸中遗传毒性杂质丙烯酰胺定量检测的相关文献报道。本文建立了一种全新的采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 定量检测门冬氨酸鸟氨酸中遗传毒性杂质丙烯酰胺的分析方法，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions (Version 5.97) 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱： Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18-AQ 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm;
P/N: 227-30807-02; 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流 动 相： A-0.1% 甲酸水溶液; B- 甲醇

洗 针 模 式： 进样前后洗针, External only (进样针外壁清洗), Rinse Port

流 速： 0.2 mL/min 柱 温： 40°C

进 样 体 积： 10 μL 洗 针 液： 甲醇 / 水 = 1/1 (v/v)

洗 脱 方 式： 梯度洗脱, B 相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	0
2.40	Oven	CTO.RVR	1*
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
5.00	Oven	CTO.RVR	0**
8.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.01	Pumps	Pump B Conc.	0
11.00	Controller	Stop	

注：* “1” 表示流路切换至质谱；** “0” 表示流路切换至废液。

质谱条件

离子化模式：	ESI, 正离子模式	加热气流速：	15 L/min
雾化气流速：	3 L/min	干燥气流速：	5 L/min
加热模块温度：	400°C	接口电压：	0.4 KV
接口温度：	300°C	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
D L 温度：	250°C	驻留时间：	222 ms
碰撞气：	氦气 270 kPa	MRM 参数：	见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	丙烯酰胺	Acrylamide	79-06-1	72.05	55.05*	-10.0	-15.0	-10.0
					27.10	-10.0	-24.0	-28.0

* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液配制

取丙烯酰胺标准贮备液 (1 mg/mL), 以超纯水逐级稀释为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 十个标准系列工作溶液, 待测。

1.4 样品前处理

准确称取 10 mg 原料药样品至 10 mL 容量瓶中, 加入超纯水, 摇匀至原料药溶解, 定容至刻度, 过 0.22 μm 尼龙滤膜后, 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 接口电压优化

实验中发现接口电压显著影响丙烯酰胺灵敏度, 故对其进行了系统的考察, 实验结果见图 1。

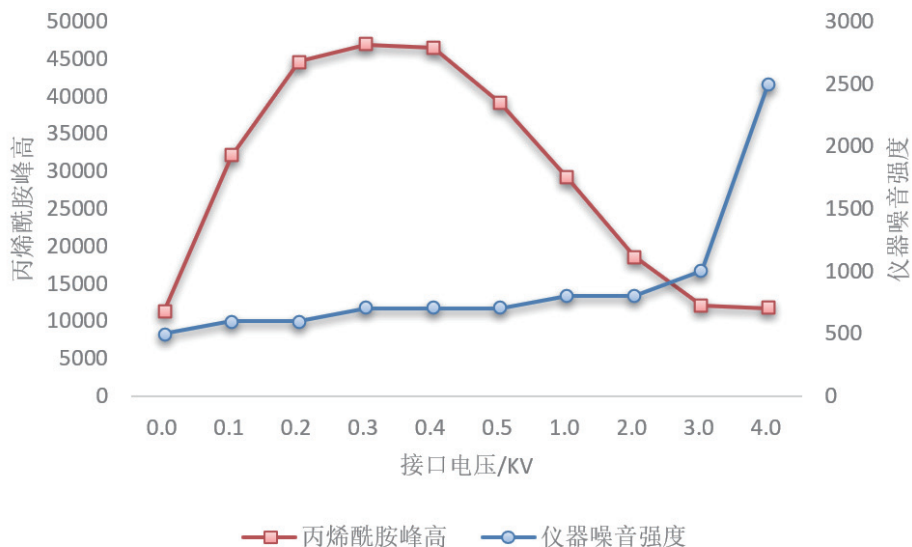


图1 接口电压对丙烯酰胺灵敏度的影响

由上图可知，当使用仪器默认接口电压 4 KV 进行分析，丙烯酰胺峰高而仪器噪音高，导致灵敏度较低。减小接口电压，丙烯酰胺峰高增加而仪器噪音降低，灵敏度逐渐提升。当接口电压低至 0.5 KV 时，仪器噪音强度趋于稳定。当接口电压低于 0.2 KV 时，丙烯酰胺峰高明显降低。故综合考虑灵敏度和分析稳定性，最终确定接口电压为 0.4 KV。推测可能的原因是，减小接口电压，可以抑制干扰物电离，从而降低仪器噪声，并促进丙烯酰胺离子化，提升灵敏度。

2.2 色谱条件优化

门冬氨酸鸟氨酸在水溶液中分解为门冬氨酸和鸟氨酸，与杂质丙烯酰胺均为极性较强的化合物。本次选择了三种色谱柱进行评估，分别是“Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm”、“SUPELCO Discovery HS-F5 150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm”和“Shimadzu Shim-pack GIST-HP C18-AQ 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm”，以下分别简称为“Velox SP-C18”、“HS-F5”和“C18-AQ”。

Velox SP-C18 为常规 C18 核壳柱，主成分门冬氨酸、鸟氨酸几乎无保留，先于杂质丙烯酰胺出峰，丙烯酰胺保留较弱，与主成分分离度较其他两根色谱柱差，导致基质效应严重，回收率低。为了改善分离度，将有机相比例降为 2%，丙烯酰胺保留增强，与主成分分离度增加，但是分析重复性差。

HS-F5 为五氟苯基柱，可增强极性化合物保留，三种化合物的保留明显增加，丙烯酰胺在门冬氨酸和鸟氨酸之间出峰，导致丙烯酰胺出峰前后均需要切阀，而分离度不足以支持切阀后需要的稳定时间，并且丙烯酰胺也同样存在低有机相比例下分析重复性差的问题。

C18-AQ 也适合极性化合物分析，并在高比例水相条件下也可以保持良好的耐用性。主成分门冬氨酸、鸟氨酸在该色谱柱上保留很弱，先于杂质丙烯酰胺出峰，但丙烯酰胺相比 Velox SP-C18 保留增强，与主成分分离度得到提高，回收率好。在初始流动相为纯水相的条件，长时间运行下，丙烯酰胺分析重复性佳。故最终确定分析色谱柱为 C18-AQ。

2.3 门冬氨酸鸟氨酸加标样品紫外色谱图

门冬氨酸鸟氨酸在水溶液中分解为门冬氨酸和鸟氨酸，先于丙烯酰胺出峰。杂质丙烯酰胺与主成分分离良好。本方法中通过设置阀切换程序将 2.4~5 min 切入质谱进行分析，其余时间切入废液，避免高浓度主成分进入质谱，污染仪器。门冬氨酸鸟氨酸原料药加标样品紫外色谱图见图 2。

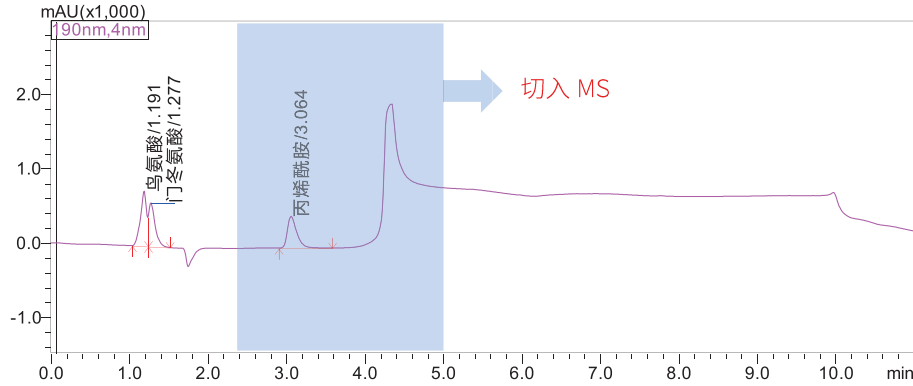


图 2 门冬氨酸鸟氨酸原料药加标样品紫外色谱图（原料药浓度 1 mg/mL，丙烯酸酯浓度 10 μg/mL）

2.4 专属性

除不加原料药外，与原料药样品进行相同前处理，得到基质空白样品。以超纯水配制浓度为 0.1 ng/mL 的丙烯酸酯标准溶液，进样分析，MRM 色谱见图 3。

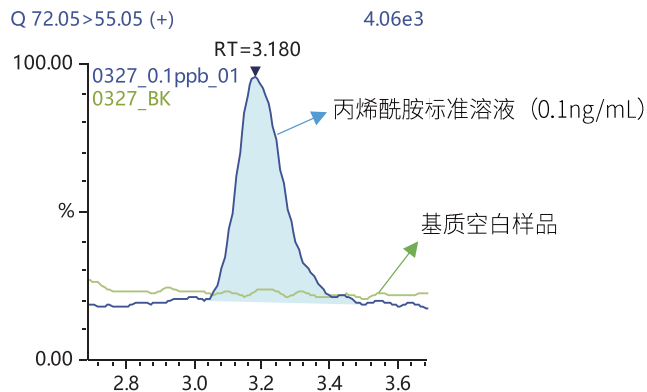


图 3 基质空白和丙烯酸酯标准溶液 (0.1 ng/mL) MRM 重叠色谱图

由上图可知，基质空白不干扰丙烯酸酯定量检测。

2.5 线性关系

按照 1.3 配制十个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制标准曲线。丙烯酸酯标准曲线和 MRM 色谱图见图 4、图 5，线性方程、相关系数和定量限见表 3。

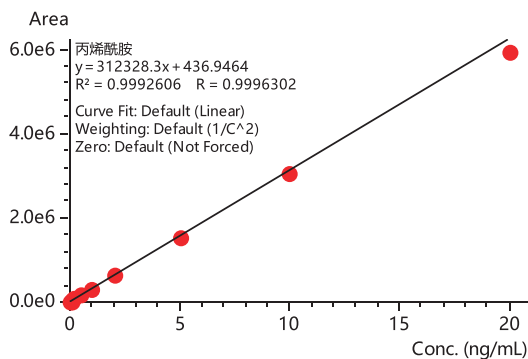


图 4 丙烯酸酯标准曲线

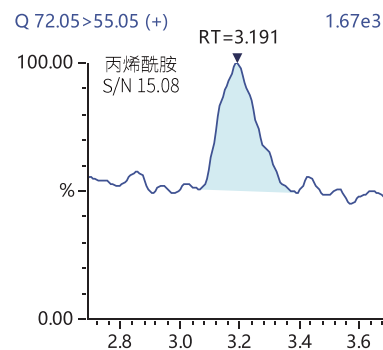


图 5 丙烯酸酯 MRM 色谱图 (0.02 ng/mL)

表3 线性关系、检出限和定量限 (权重: 1/C²)

名称	定量方法	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 (ng/mL)
丙烯酰胺	外标法	Y=312328.3X +436.9464	0.02~20	94.7~105.4	0.9996	0.02

2.6 精密度实验

对三个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.20% 和 0.94~3.70% 之间, 仪器精密度良好。

表4 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.05 ng/mL)		RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
丙烯酰胺	0.20	3.70	0.10	0.95	0.08	0.94

2.7 加标回收实验

在门冬氨酸鸟氨酸原料药样品中添加三个不同浓度的标准溶液, 每个浓度的加标样品平行处理两份, 加标回收结果见表 5。原料药中未检测出丙烯酰胺杂质。三个不同浓度加标回收率在 96.8~101% 之间, 方法准确可靠。

表5 样品加标回收率 (n=2)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	回收率 (%)		
		0.05 ng/mL	0.5 ng/mL	5.0 ng/mL
丙烯酰胺	未检出	101	97.9	96.8

2.8 残留实验

高浓度标准样品 (20 ng/mL) 分析完成后, 进样分析空白, 考察残留情况。结果表明, 空白样品丙烯酰胺检测通道中无干扰。

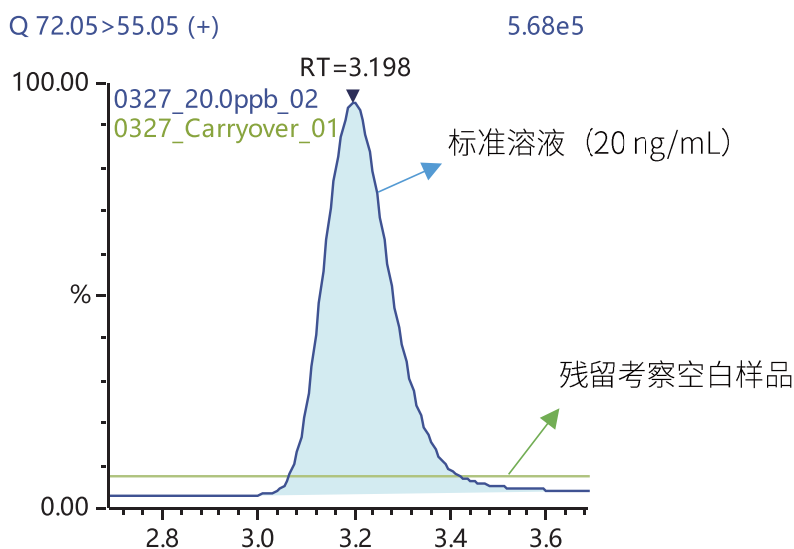


图6 残留考察空白样品色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用定量测定门冬氨酸鸟氨酸原料药中丙烯酰胺遗传毒性杂质的新方法。对接口电压进行了系统考察,低接口电压可以降低仪器噪音,提高丙烯酰胺灵敏度。对色谱柱进行了比较,优选 C18-AQ 色谱柱,在初始流动性为纯水相的情况下,提高了极性化合物丙烯酰胺与原料药中组分的分离度,改善了基质效应,获得了良好的回收率,并实现了长时间分析稳定性。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单,可实现门冬氨酸鸟氨酸原料药中痕量遗传毒性杂质丙烯酰胺的高灵敏度、快速检测。

岛津应用云

