

应用SCIEX Triple Quad™ 3500系统检测利福平中基因毒性杂质 1-甲基-4-氨基哌嗪

Determination of 1-methyl-4-aminopiperazine in Rifampicin by SCIEX Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS system

陈金梅, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Chen Jinmei, Si Dandan, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS System,
Genotoxic Impurities, 1-methyl-4-aminopiperazine, Rifampicin

前言

利福平为利福霉素类半合成广谱抗菌药, 对多种病原微生物均有抗菌活性。该药对结核分枝杆菌和部分非结核分枝杆菌(包括麻风分枝杆菌等)在宿主细胞内外均有明显的杀菌作用, 应用广泛。1-甲基-4-氨基哌嗪是利福平中具有警示结构的基因毒杂质, 杂质限度低, 为0.08 µg /g, 本文使用LC-MS/MS建立高效和高灵敏度的方法用于利福平类产品的评估。

本文实验方法特点

本文展示了使用SCIEX Triple Quad™ 3500系统对基因毒性杂质进行1-甲基-4-氨基哌嗪定量测定, 方法具有以下特点:

1. 仪器的灵敏度高, 方法定量下限可低至0.5 ng/ml, 满足基因毒性杂质限度低的要求。
2. 仪器和方法的特异性好, 7min的方法即可准确定量, 检测效率高。
3. 最低定量下限 (LLOQ) 的RSD为5.89%, 仪器和方法的重现性好。
4. 该方法对利福平这类产品评估有很好的参考意义。

仪器设备

SCIEX ExionLC™液相系统 + SCIEX Triple Quad™ 3500质谱系统



SCIEX ExionLC™液相系统 + SCIEX Triple Quad™ 3500质谱系统

液相方法

色谱柱: InfinityLab Poroshell HPH-C18 (150 × 4.6 mm, 2.7 µm)

流动相: A相: 水 (0.1%甲酸) B相: 乙腈 (0.1%甲酸)

流速: 0.8 ml/min

柱温: 40 °C

进样量: 2 µL

表1. 液相梯度

Time(min)	A (%)	B (%)
0.5	95	5
1.5	2	98
4.5	2	98
5.1	95	5
7.0	95	5

质谱方法

离子源: ESI源, 正离子模式

离子源参数:

IS电压: 5500 V

气帘气 CUR: 25 psi

雾化气 GS1: 50 psi

辅助加热气 GS2: 45 psi

碰撞气 CAD: Medium

源温度 TEM: 650 °C

表2. 1-甲基-4-氨基吡嗪的质谱参数

Q1	Q3	DP	CE
116.2	56.2	29	23

实验结果

- 特异性:** 甲醇溶液作为空白溶剂; 取1-甲基-4-氨基吡嗪标准品, 加入甲醇溶液溶解, 并稀释至浓度为5 ng/ml的溶液。称取一定量的利福平原料药, 用甲醇溶解并稀释, 判断原料药出峰位置; 进样分析, 色谱图如下, 在待测物保留时间处无干扰, 见图1。

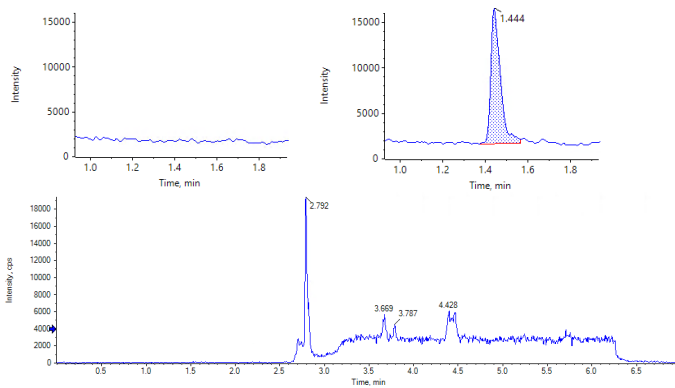


图1. 空白溶剂, 浓度为5 ng/ml的溶液和原料药出峰位置谱图

- 线性范围:** 用甲醇逐级稀释1-甲基-4-氨基吡嗪标准工作液至0.5-100 ng/ml, 以峰面积对浓度做标准曲线。图2为1-甲基-4-氨基吡嗪线性范围、线性方程和相关系数。

Calibration for 116.2 / 56.2: $y = 14045.51611x + -4353.90070$ ($r = 0.99667$, $r^2 = 0.99335$) (weighting: $1/x^2$)

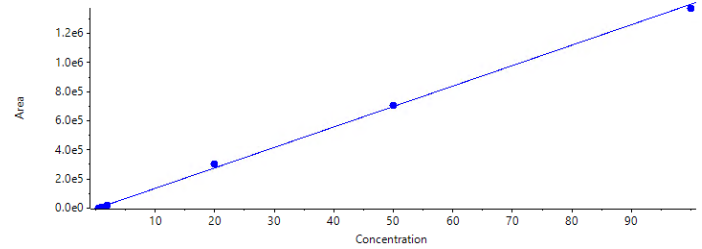


图2. 1-甲基-4-氨基吡嗪标准曲线, 线性回归系数 $r^2 = 0.99335$

- LLOQ的重现性:** 平行制备六份LLOQ溶液, 进样分析, 测定结果如下所示。六份平行样品中, 1-甲基-4-氨基吡嗪的重现性RSD%为5.89%, 重现性好。

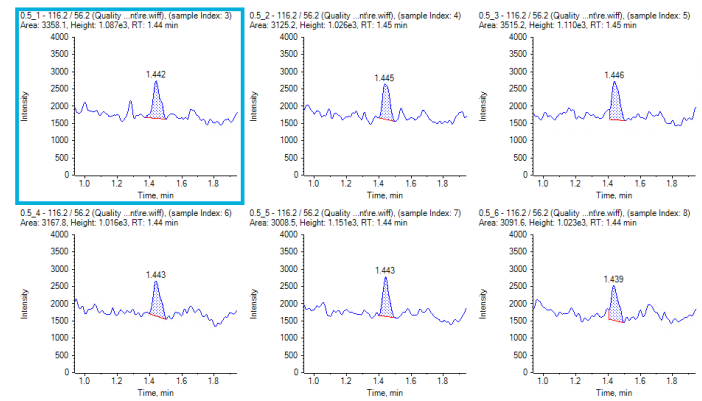


图3. LLOQ浓度下重现性色谱图展示

- 原料药检测结果和加标回收率实验:** 分别称取批号为20200702、25J2001015、HN05J、207J2005035、20200703和HN07J六批原料药, 约12.5 mg, 使用1 mL甲醇溶解, 由于杂质含量过高, 用甲醇稀释200倍进样分析, 带入标准曲线计算含量, 根据称药量折合计算出杂质含量如表3所示, 超出限度要求, 由于无不含1-甲基-4-氨基吡嗪的利福平原料药, 故选取三批样品加入5 ng考察加标回收率, 均在85-115%范围内, 满足要求。

表3. 原料药检测 results 和加标回收率实验

批号	称药量 (g)	杂质含量 (µg/g)
20200702	0.01251	44.8
205J2001015	0.01259	25.4
HN05J	0.01272	31.4
207J2005035	0.01280	54.7
20200703	0.01247	38.5
HN07J	0.01255	60.6

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Calculated Concentration	Accuracy
xs200_20200702	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	2.8	N/A
xs200_205J2001015	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	1.6	N/A
xs200_HN057	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	2.0	N/A
xs200_207J2005035	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	3.5	N/A
xs200_20200703	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	2.4	N/A
xs200_HN07J	Unknown	116.2 / 56.2	N/A	3.8	N/A
xs200_205J2001015	Quality Control	116.2 / 56.2	6.60000	5.8	87.44
xs200_HN057	Quality Control	116.2 / 56.2	7.00000	6.3	89.76
xs200_HN07J	Quality Control	116.2 / 56.2	8.80000	9.8	110.97

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 3500系统建立了LC-MS/MS方法测定利福平原料药中基因毒性杂质1-甲基-4-氨基哌嗪的含量。方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.5 ng/ml-100 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好，且灵敏度高；最低定量下限LLOQ为0.5 ng/ml，相当于原料药中（12.5 mg/ml）的含量为0.04 µg/g，低于限度要求，基质加标的回收率满足要求，可为检测利福平原料药中基因毒性杂质1-甲基-4-氨基哌嗪提供参考。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13211-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)