

# Waters™

应用纪要

## 将Waters ACQUITY UPLC H-Class与ACQUITY QDa质谱检测器联用，创建高灵敏度的清洁验证专用解决方案

Chris Henry, Mark Wrona, Jayne Kirk, Richard Ladd

Waters Corporation



### 摘要

本应用纪要证明Waters ACQUITY UPLC H-Class与PDA（光电二极管阵列检测器）和ACQUITY QDa质谱检测器联用能够在清洁验证中实现可靠确证，并对紫外吸收能力较差或不含发色团的化合物进行高专属性且高灵敏度的定量分析。配合使用业内领先的CDS软件Empower执行控制时，此解决方案能够有效满足严格监管环境的要求，尤其适用于对数据完整性、SOP遵从性以及合规管理有较高要求的领域。

## 优势

- 使用ACQUITY QDa实现低浓度分析物的高灵敏度定性和定量分析
- 将真正的UPLC分离与易于操作的质谱检测相结合，提升化合物鉴定的可靠性
- 简单、便捷的质谱检测功能可提高灵敏度并改善检测缺乏强发色团化合物的能力，弥补UV方法的不足
- 采用集成化的UV-PDA-UPLC系统，配备业内领先的合规环境(GMP)专用CDS软件

## 简介

清洁验证是制药、生物、营养补充剂和医疗设备等行业的众多企业都必须开展的一项验证活动。无论是从监管还是行业角度出发，清洁验证都是防止产品交叉污染对患者安全和产品质量产生负面影响的重要手段<sup>1</sup>。

作为制药行业质量控制(QC)工作流程的重要组成部分，清洁验证是指如下过程：提供书面证据，证明清洁设施时所采用的清洁方法对进入后续产品批次的潜在残留产物（包括中间体和杂质）、清洁剂和异物进行了持续监控，将其控制在已确立的安全水平以下<sup>2</sup>。务必确保反应器或容器内不含任何会污染后续产品批次的物质，这一点至关重要，因为这会导致安全问题并造成经济损失。

根据工艺需要，清洁验证将采用不同的分析方法进行，包括HPLC-UV检测和/或总有机碳分析(TOC)，每种方法各有利弊。HPLC-UV只能检测含发色团的化合物，是一种局限于方法目标化合物范围的靶向方法，因此可能无法检出其它污染源，还可能易受基线漂移/干扰的影响。此外，HPLC-UV方法的灵敏度还有可能不足以进行低浓度分析。与之相反，TOC是一项非专属性技术，可检出任何来源的有机碳。

尽管采用TOC方法可检出多种污染源，但它无法提供任何定量数据，且通常需要通过进一步检测（例如LC-MS）来鉴定物质<sup>3</sup>，才能制定适用的清洁方案。这个附加的结果检测环节进一步延长了生产工厂的停机时间，导致成本增加。

为了在清洁验证过程中检出药物残留，通常必须具备检出低至纳克甚至皮克级痕量药物的能力<sup>4</sup>。

ACQUITY UPLC H-Class系统与ACQUITY QDa质谱检测器（以及PDA）联用，为分析化学家带来了一款强大的定量和定性分离协同工具。Waters ACQUITY UPLC H-Class系统可配合多款亚2 μm色谱柱填料使用，这类填料适用

于分析多种化合物及混合物，可获得出色的峰形、峰容量，并显著缩短运行时间。

ACQUITY QDa质谱检测器可作为补充技术集成到UV检测中。质谱技术能够进行痕量检测，其检测限至少比UV检测低10倍。这大幅降低了定量限和检测限，而这两个参数对于各个分析领域都非常重要，在对最大允许残留量(MACO)有严格限制的高毒性药物清洁验证方案中尤其如此。此外，基于质谱结果快速鉴定组分有助于分析人员根据需要尽快采取纠正措施，或对工艺进行回顾和优化。

上述技术均由色谱数据软件Empower 3控制，该软件符合法规要求，可确保从数据采集到报告/分配过程的数据安全性。

## 结果与讨论

在实际操作中，清洁验证程序包括擦拭步骤（例如在提取操作之后擦拭反应容器）。本应用纪要将介绍提取步骤之后的方法，即提取产物已转移到样品瓶中之后的操作。

我们将PDA检测器与ACQUITY QDa质谱检测器联用，并配合Empower 3 CDS软件执行数据采集和仪器控制，开发了针对五种常见化合物（盐酸萘甲唑林、盐酸利多卡因、盐酸阿米替林、盐酸洛哌丁胺和妥拉磺脲）的5 min快速检测方法（表1）。

制备12种浓度的化合物(n=6)，浓度范围为0.01~1000.0 ng/mL。稀释液成分为50%去离子水加50%甲醇。

在此以盐酸利多卡因的数据为例说明ACQUITY QDa在分析紫外吸收能力较差的化合物时的重要作用。首先在全扫描模式下运行ACQUITY QDa数据采集(200~1000 m/z)，得到质子化物。接下来，在SIR（单离子记录）模式下运行ACQUITY QDa，将四极杆的DC（直流）和RF（射频）参数设置为仅允许具有特定m/z值的离子通过并到达检测器，从而大幅降低噪音并提高灵敏度。该分析方法在0.01~1000.0 ng/mL范围内呈线性，且R2值达0.997（图1）。基于ICH Q2(R1)指导原则“Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”（分析方法验证：正文和方法学）中给出的信噪比标准，使用SIR时盐酸利多卡因的检测限约为0.005 ng/mL，相当于柱上进样量0.025 pg（图2/表2）。

表3展示了其它四种化合物的结果汇总。

根据ICH Q2(R1)给出的信噪比指导原则，PDA检测（在220 nm处采集数据）对盐酸利多卡因的检测限< 1000.0 ng/mL，相当于柱上进样量< 5000 pg。因此，未计算线性。与PDA检测相比，ACQUITY QDa的动态范围更宽，在低浓度水平仍可保持出色的精度，因此是一款强大的低浓度分析工具，使得盐酸利多卡因的线性范围至少覆盖了五个数量级（图1/表4）。

## 线性和精度

ACQUITY QDa质谱检测器能够可靠测定浓度低至0.02 ng/mL的盐酸利多卡因，相比之下，UV检测的LOQ仅为1000 ng/mL（表3）。采用质谱法分析紫外吸收极低的利多卡因时，其灵敏度比220 nm下的UV分析高50000倍，且由于质谱法可通过质量数确认正确测定色谱峰，结果可信度极高（图6）。

我们测定了此方法分析0.01 ng/mL~1000 ng/mL (n=6)的盐酸利多卡因的精度。所用系统在上述范围内的精度非常出色，%RSD在0.7~10.6之间（表4）。

浓度为0.01 ng/mL时，信噪比(s/n)值为5.28。根据ICH Q2(R1)指导原则，检测限为 $3 \times s/n$ 。基于此标准，可根据以上数据确定检测限为略高于0.005 ng/mL。根据上述结果可估算出定量限( $10 \times s/n$ )约为0.02 ng/mL。

在分析序列最后运行空白样品以评估潜在残留。结果表明，空白样品中无浓度显著的分析物（0.006% wrt 1000 ng/mL样品 - 接近检测限）。

参数	值		
流动相A (MPA)	2 mM甲酸铵/0.1%甲酸		
流动相B (MPB)	乙腈/0.1%甲酸		
流速	0.5 mL/min		
进样体积	5 $\mu$ L		
梯度条件	时间(min)	% MPA	% MPB
	0	95	5
	1.5	5	95
	3.0	5	95
	3.6	95	5
5.0	95	5	
色谱柱	ACQUITY BEH 75 mm x 2.1 mm内径, 1.7 $\mu$ m		
柱温	40 $^{\circ}$ C		
PDA ( $\pm$ 1 nm)	220 nm(盐酸利多卡因, 盐酸洛哌丁胺) 225 nm(盐酸萘甲唑林, 妥拉磺脲) 254 nm(盐酸阿米替林) 全扫描210 - 400 nm		
ACQUITY QDa质谱检测 ESI+(电喷雾电离) SIR正离子模式 $m/z$ (M+H) <sup>+</sup>	211(盐酸萘甲唑林) 235(盐酸利多卡因) 278(盐酸阿米替林) 312(妥拉磺脲) 477(盐酸洛哌丁胺) 全扫描200 - 1000 $m/z$		

表1.方法条件。

Processing Method:	Lidocaine SIR	Project Name:	H-Class Clean Val
Processing Method ID:	10159	System:	HClass_PDA_QDA
Calibration ID:	10353	Channel:	QDa 2: SIR Ch1
Date Calibrated:	22-Nov-16 3:33:31 PM GMT	Proc. Chnl. Descr.:	2: QDa Positive(+) SIR Ch2

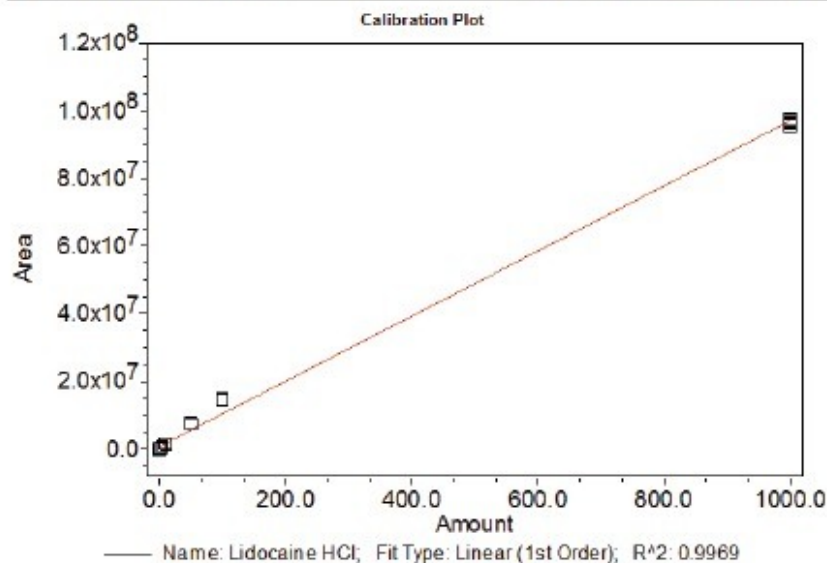
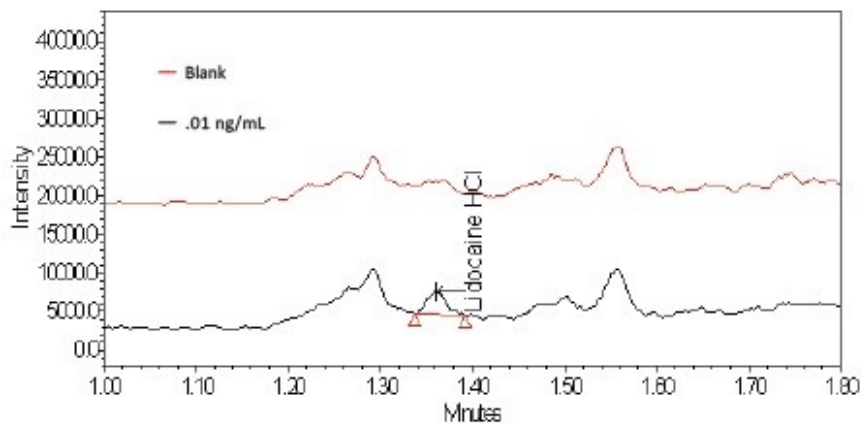


图1.0.01~1000.0 ng/mL (n=6)范围内的校准曲线。在5个数量级范围内的线性非常出色，即 $R^2 = 0.997$ （采用线性拟合，非加权）。



System Suitability Separation Results

Name	Mid	RT	Concentration	USPsh
1. Lidocaine HCl	1.42	1.36	0.01 ng/mL LOD	5.8
2. Lidocaine HCl	1.41	1.36	Blank	

图2/表2. 进样浓度接近LOD的盐酸利多卡因，使用ACQUITY QDa质谱检测器在SIR模式下进行分析所得的结果。



化合物	线性范围 (ng/mL)	数量级	R <sup>2</sup>	柱上进样当量 (pg)	%RSD范围	LOD 估计值 (ng/mL)	LOQ 估计值 (ng/mL)
盐酸利多卡因	0.01 - 1000	5	0.997	0.05 - 5000	0.7 - 10.6	0.005	0.02
盐酸萘甲唑林	0.01 - 1000	5	0.997	0.05 - 5000	0.6 - 17.3	0.005	0.02
盐酸阿米替林	0.1 - 1000	4	0.996	0.5 - 5000	0.5 - 2.9	0.2*	0.6*
盐酸洛哌丁胺	0.01 - 1000	5	0.998	0.05 - 5000	0.9 - 21.2	0.01	0.03
妥拉磺脲	0.01 - 1000	5	1	0.05 - 5000	0.6 - 9.9	0.005	0.02

表3.全部五种化合物的分析结果汇总。

\*由于存在背景干扰，因此计算时扣除了空白样品值。

盐酸萘甲唑林、盐酸洛哌丁胺和妥拉磺脲的线性范围为0.01~1000 ng/mL，LOQ介于0.02~0.03 ng/mL之间。

盐酸阿米替林的线性范围为0.1~1000 ng/mL，使用该方法计算所得的LOQ约为0.6 ng/mL。

采用表1中指定的波长通过UV方法分析所有化合物得到的LOD均大于20 ng/mL，其中盐酸阿米替林的分析灵敏度最高。由于此方法在整个浓度范围内灵敏度不佳，我们无法准确确定其线性。

浓度 (ng/mL)	平均值 (n=6)	%RSD
0.01	5418	10.6
0.05	34778	2.6
0.1	28609	6.1
0.2	50008	2.4
0.5	79997	1.4
1.0	151201	1.3
2.0	297201	1.4
5.0	817375	1.4
10	1538119	1.5
50	7469796	0.7
100	14634333	1.1
1000	96601107	0.7

表4.目标范围内的精度(n=6)介于0.7~10.6 %RSD之间。

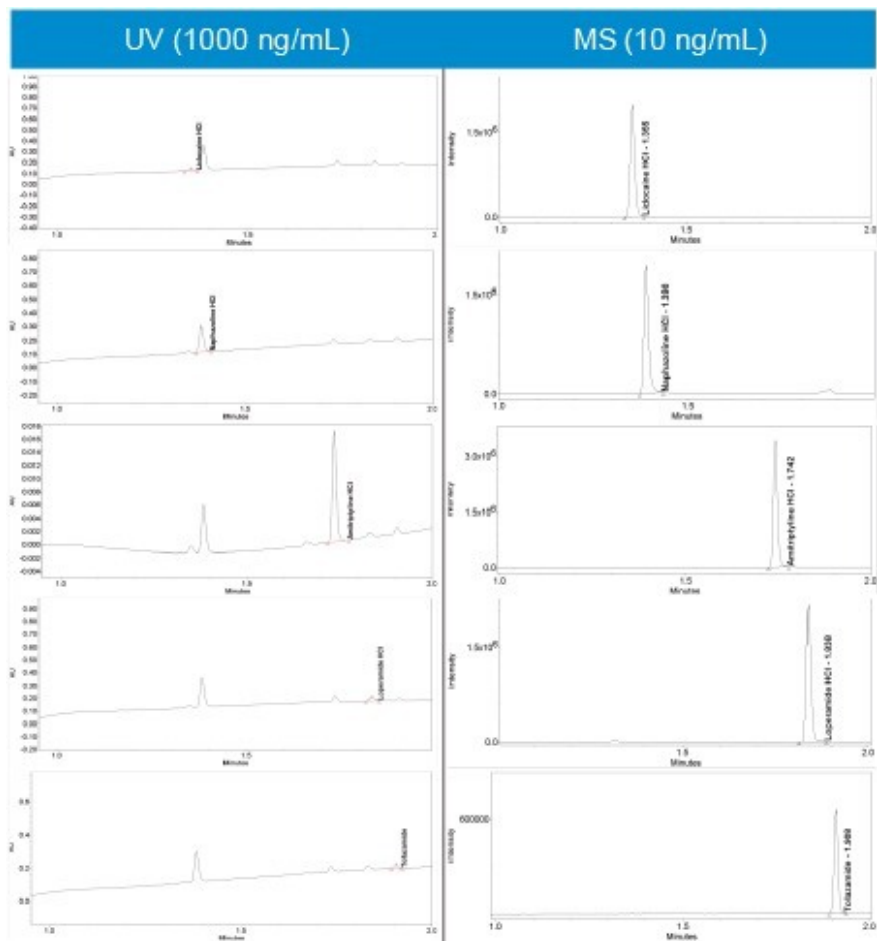


图3.采用五种化合物各自的最佳UV检测波长所得的UV分析结果与相应的SIR分析结果对比。

## ACQUITY QDa质谱检测

所有五种化合物都在全扫描模式下运行，目的是确认其质子化物(M+H)<sup>+</sup>（图4）。

得到各化合物的质子化物后，在Empower中设置适用的SIR采集方法。

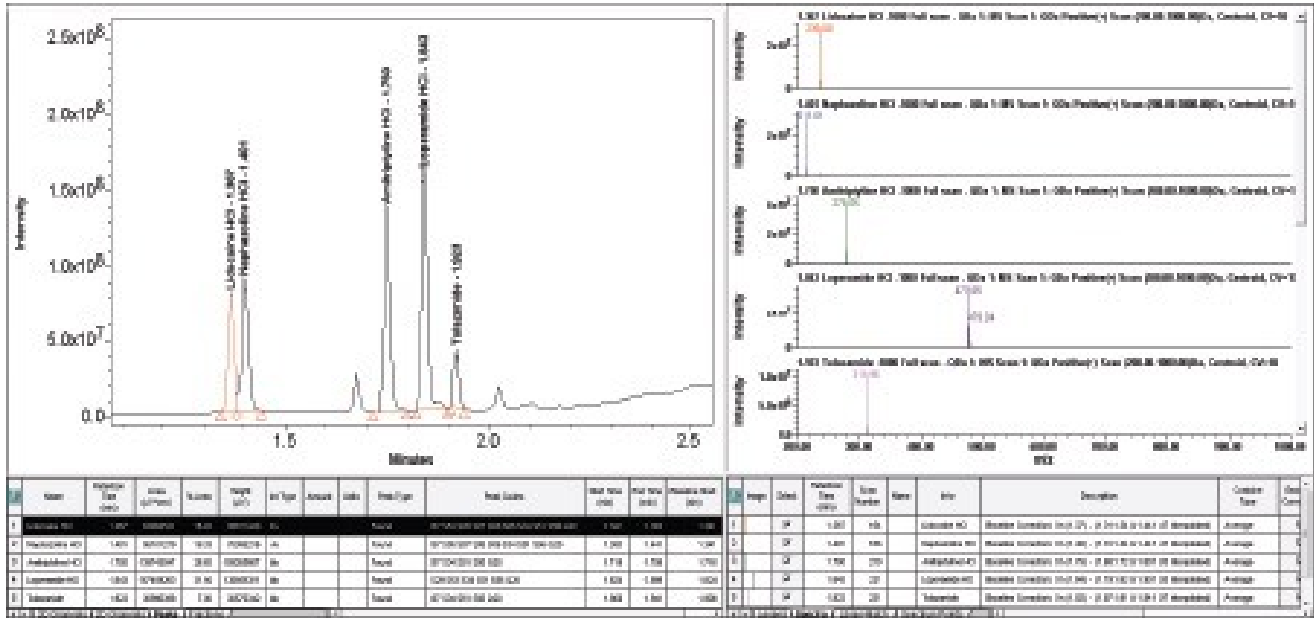


图4. Empower的主查看窗口，显示了全扫描数据。

虽然盐酸利多卡因与盐酸萘甲唑林之间明显存在轻微的共洗脱现象，但ACQUITY QDa的SIR功能可在整个浓度范围内对这两种分析物进行专属性的精准定量（通过单独的数据通道采集数据）（表3）。

我们对每种化合物进行六次重复分析以确定精度（图5）。

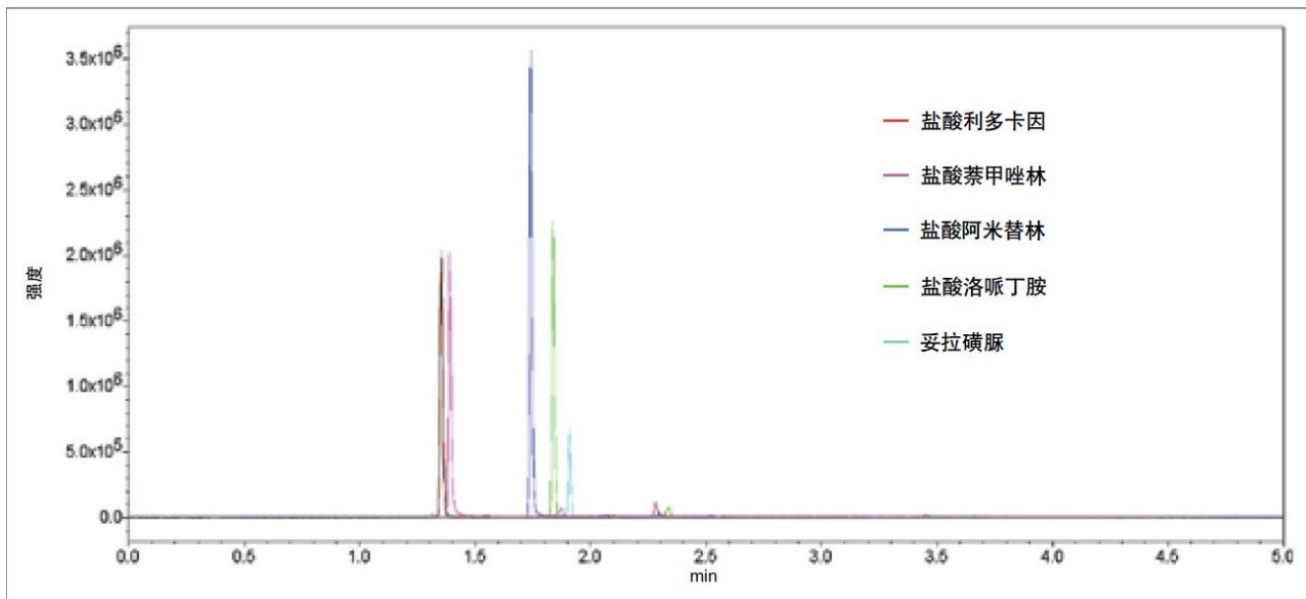


图5.浓度为10 ng/mL的五种化合物的SIR分析结果(n=6)叠加图。

## 正交检测的优势

PDA数据与质谱检测相结合，能够为分析人员提供强大的峰鉴定正交解决方案，同时扩展峰检测范围。ACQUITY



QDa质谱检测器可在UV检测的基础上显著提升灵敏度，从而确保分析物定量的可靠性和一致性。

将质谱检测集成到UV工作流程中不仅有助于提升灵敏度，还可轻松获取可置信度更高的峰鉴定结果。

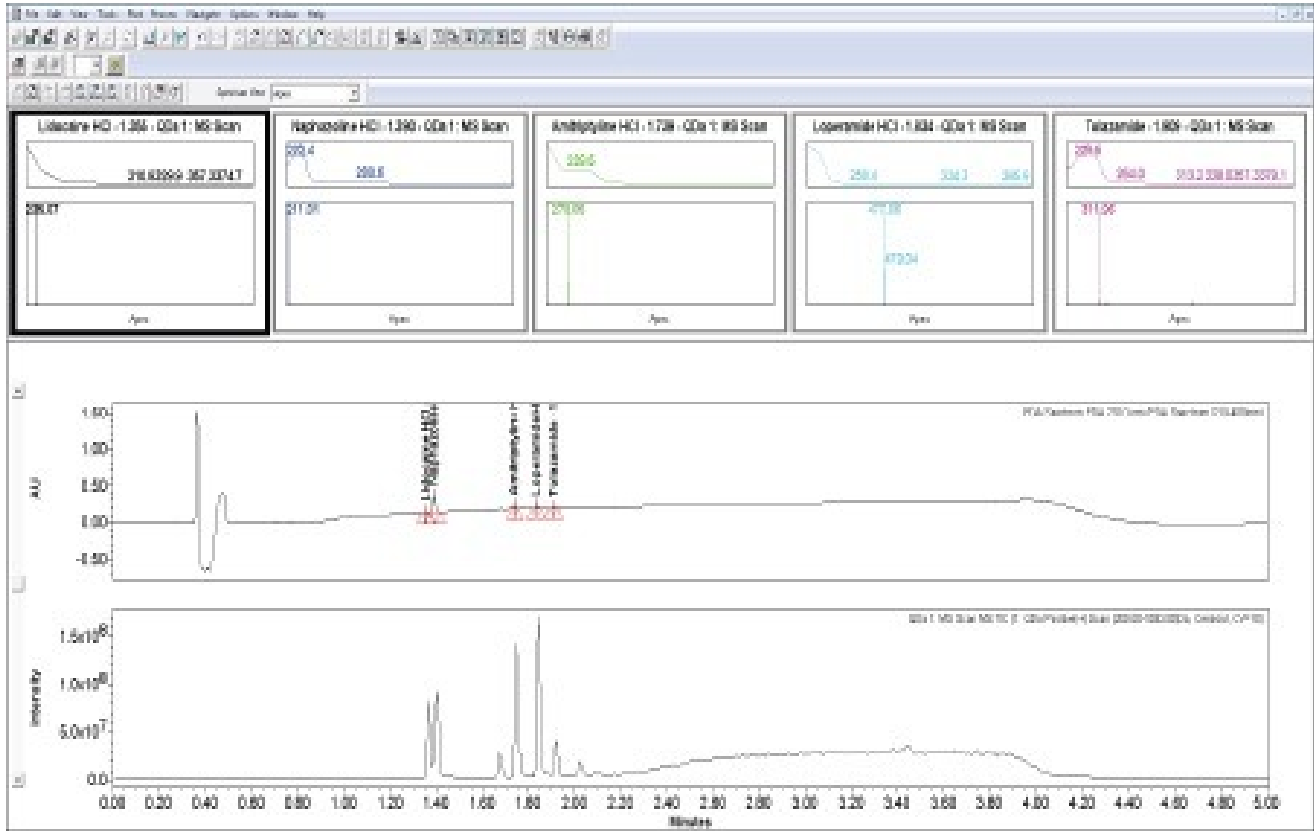


图6. Empower 3的“质谱分析窗口”功能。

Empower 3在同一个直观的界面内显示UV光谱数据和MS数据，便于分析人员通过质量数确认提高峰鉴定结果的可信度（图6）。盐酸洛哌丁胺质量数分析结果（浅蓝色）显示，其具有两种相差两个质量单位的同位素（477.06/499.09），这是含一个氯原子的化合物的典型表现。

## 结论

在清洁验证程序中引入ACQUITY QDa质谱检测能够为制药行业带来前所未有的灵敏度和选择性，使其满足越来越严格的药物生产监管标准，并提升分析通量、准确性和数据的可靠性。

- Waters ACQUITY UPLC H-Class与PDA和ACQUITY QDa质谱检测器联用可提高峰鉴定结果的可信度。
- QC分析人员现在可将ACQUITY QDa质谱检测器轻松整合到QC工作流程中以获取质量信息，从而在常规分析中

对紫外吸收能力差的化合物进行准确的痕量分析。

- 通过Empower 3控制集成的质谱检测可确保生成的结果完全符合QC环境的数据完整性要求。
- SIR质谱检测功能可执行低浓度定量分析，即使共洗脱峰也同样适用。
- 随着强效化合物和药物不断被开发出来，我们可应用ACQUITY QDa等技术来解决分析此类化合物时常常遇到的低检测阈值难题。

## 其它信息

除ACQUITY UPLC H-Class、ACQUITY QDa和Empower CDS外，沃特世还提供多种支持清洁验证的产品及消耗品，具体请参阅Waters ERA产品目录：

- <https://www.eraqc.com/Catalogs/catalogid/1-4GU8H7/categoryid/1-4GU8H8> <  
<https://www.eraqc.com/Catalogs/catalogid/1-4GU8H7/categoryid/1-4GU8H8>>
- <http://www.eraqc.com/LifeSciences/catalogid/1-4GU8H7> <  
<http://www.eraqc.com/LifeSciences/catalogid/1-4GU8H7>>

## 参考文献

1. Walsh A. *Cleaning Validation for the 21st Century: Overview of new ISPE Cleaning Guide*.
2. Active Pharmaceutical Ingredients Committee (APIC) *Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredients Manufacturing Plants*, September 1999.
3. McHale W, Wallace B, Lawson S. *Why Total Organic Carbon (TOC) Is Often Superior to HPLC for Cleaning Validation Sample Analysis: A Real World Example* (Teledyne Technologies).
4. Robert Harris, *Molecular Profiles*, 2012.

## 特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class](https://www.waters.com/10138533) <<https://www.waters.com/10138533>>
- [PDA检测器](https://www.waters.com/14225) <<https://www.waters.com/14225>>

- [Empower 3软件 <https://www.waters.com/513188>](https://www.waters.com/513188)

## 可在线购买

- [Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm, 75 mm x 2.1 mm, 1.7 μm色谱柱 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005604>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005604)

720005871ZH, 2016年12月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.