

应用SCIEX Triple Quad™系统建立注射液中氨基酸类杂质测定方法

Determination of amino acid impurities in injection by SCIEX Triple Quad™ System

王玉; 钟晨春; 龙志敏; 郭立海

Wang Yu ; Zhong Chenchun ; Long Zhimin ; Guo Lihai

SCIEX应用支持中心 (上海)

SCIEX Application and Support Center (Shanghai)

Key word: Impurities, Methionine sulfoxide, Cysteine, SCIEX Triple Quad™, MRM

引言

复方氨基酸注射液作为重要的肠外营养药，广泛应用于临床，满足患者体内氨基酸需要^[1]。其处方中含有甲硫氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸等几种到几十种氨基酸。其中，甲硫氨酸作为人体内必需氨基酸，因其结构中含有巯基，易被氧化降解成甲硫氨酸亚砷，对人体健康有害，被作为氨基酸注射液中的药物杂质。此外复方注射液（20AA）中的N-乙酰-半胱氨酸的也存在药物杂质半胱氨酸。虽然现行药典上并未对二者的含量有明确的规定，但甲硫氨酸砷和半胱氨酸杂质的存在对方氨基酸注射液的临床用药安全构成了潜在的威胁^[2]。

由于复方氨基酸类产品处方成分较复杂，并且大多数成分结构近似，很容易干扰杂质的测定，并且半胱氨酸和甲硫氨酸亚砷的化学性质不稳定，很容易发生氧化，也为其准确测定含量带来相当的挑战。因此，需建立一种专属性强、简便可行的检测方法，用于准确测定复方氨基酸产品中氨基酸杂质的含量。本文通过定量分析复方氨基酸注射液中杂质甲硫氨酸亚砷、半胱氨酸的灵敏度、重现性、加标回收率等，建立了复方氨基酸注射液中甲硫氨酸亚砷、半胱氨酸两种杂质的准确测定方法。

仪器设备

ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 系统



液相条件

色谱柱：BEH Amide (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)

柱温：40°C

流动相：A为水（含0.2%甲酸，v/v），

B为乙腈（含0.2%甲酸，v/v）

流速：0.4 mL/min

质谱条件

本土化SCIEX Triple Quad™ 质谱条件

离子源为ESI源；

扫描方式为MRM采集模式，正离子扫描；

表1. 液相梯度洗脱，液相总运行时间为9 min

Time (min)	%A	%B
0.0	10	90
1.0	10	90
4.0	40	60
5.0	60	40
6.0	60	40
6.1	10	90
9.0	10	90

IS电压: 5500 V; 气帘气CUR: 35 psi;
 雾化气GS1: 50 psi; 辅助气: 50 psi;
 离子源温度: 550 °C; 碰撞气: 9
 各化合物质谱参数见表2

表2. 质谱参数

No	Compound	Q1	Q3	DP	CE
1	甲硫氨酸亚砷 (Methionine sulfoxide)	166.2	74*	30	17
2	甲硫氨酸亚砷 (Methionine sulfoxide)	166.2	102.0	30	19
3	半胱氨酸 (Cysteine)	122.2	76*	55	18
4	半胱氨酸 (Cysteine)	122.2	59.1	55	32

*定量离子MRM通道

实验结果

1. 稳定性考察

甲硫氨酸亚砷的二硫键在会受到温度或光照的影响，被氧化成甲硫氨酸砷；半胱氨酸的巯基也不稳定，易被氧化成胱氨酸或存在分解。因此，对两种化合物的稳定性进行考察。分别在溶剂中加入1.25%抗氧化剂维生素C、0.1%甲酸，考察甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸在进样室15°C下放置15h的稳定性（图1）。从图中可以看出，在加入1.25%维生素C的条件下甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的峰面积

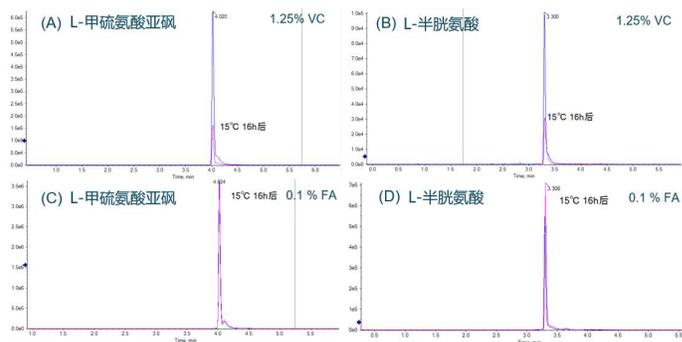


图1. 不同体系下氨基酸杂质的稳定性考察（图A、B分别表示1.25%维生素C条件下甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的提取离子流图；图C、D分别表示0.1%FA条件下甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的提取离子流图，其中粉色代表15°C放置16h后的色谱图）

15°C放置16h后下降了2/3左右，在0.1%甲酸条件下两种化合物相对稳定。此外，还考察了抗氧化剂二丁基羟基甲苯(BHT)和0.2%的盐酸条件下两种化合物的稳定性情况，峰面积均有所下降。

2. 灵敏度和重现性

SCIEX Triple Quad™系统的灵敏度高。甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的最低定量下限为0.1 ng/ml，色谱图见图2；在标准品最低定量下限连续进样6针，RSD为4.93%。

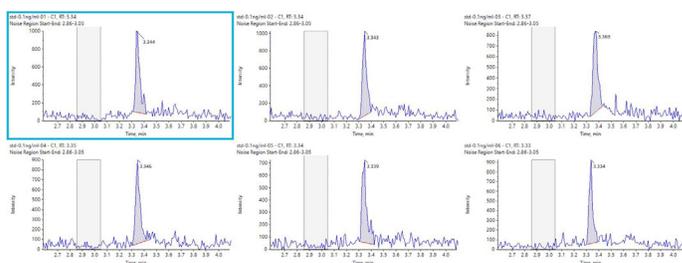


图2. 6针LLOQ色谱图

用90%乙腈逐级稀释甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸标准工作溶液至0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 125 ng/mL和250 ng/mL分别进样分析，以峰面积对浓度做标准曲线，线性范围内线性关系良好，相关系数 $R^2 > 0.99$ ，标曲各点准确度在90.83%-104.8%。表3、4及图3为测定甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的标准曲线和相关系数。

表3. 甲硫氨酸亚砷的标准曲线

Sample Name	Sample Type	Co... Na...	Mass Info	Actual Conce...	Area	Height	Ret... Time	Used	Accur...
std-0.1ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	0.10	7.268e4	2.438e4	4.03	<input checked="" type="checkbox"/>	100.52
std-1ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	1.00	1.465e5	4.831e4	4.02	<input checked="" type="checkbox"/>	94.45
std-25ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	25.00	2.387e6	7.967e5	4.02	<input checked="" type="checkbox"/>	106.16
std-50ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	50.00	4.582e6	1.555e6	4.01	<input checked="" type="checkbox"/>	103.24
std-125ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	125.00	1.153e7	3.804e6	4.02	<input checked="" type="checkbox"/>	104.80
std-250ng/ml-01	Standard	M1	166.0 / 74.0	250.00	1.994e7	6.025e6	4.01	<input checked="" type="checkbox"/>	90.83

表4. 半胱氨酸的的标准曲线

Sample Name	Sample Type	Co... Na...	Mass Info	Actual Conce...	Area	Height	Ret... Time	Used	Accur...
std-0.1ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	0.10	5.867e3	2.114e3	3.33	<input checked="" type="checkbox"/>	99.07
std-1ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	1.00	8.519e4	3.649e4	3.30	<input checked="" type="checkbox"/>	109.48
std-25ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	25.00	1.923e6	6.865e5	3.30	<input checked="" type="checkbox"/>	96.67
std-50ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	50.00	3.884e6	1.411e6	3.29	<input checked="" type="checkbox"/>	97.57
std-125ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	125.00	9.955e6	3.483e6	3.30	<input checked="" type="checkbox"/>	99.99
std-250ng/ml-01	Standard	C1	122.0 / 76.0	250.00	1.936e7	5.927e6	3.30	<input checked="" type="checkbox"/>	97.21

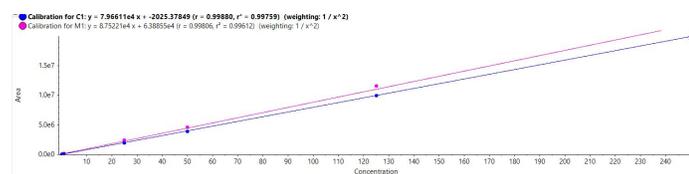


图3. 甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的线性曲线

3. 加标回收率

以复方氨基酸注射液作为基质溶液，稀释50倍，分别加入低浓度和高浓度的甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的标准品溶液，加标溶液平行制备三份，进样分析。测定结果如表5。加标低浓度和高浓度的甲硫氨酸亚砷回收率为97.21%、99.14%，半胱氨酸加标低浓度和高浓度的回收率分别为88.49%、93.16%。三针平行样品峰面积偏差RSD%<5%，甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的加标回收率和相对偏差均满足测试要求。

表5. 甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的加标回收率 (n=3)

化合物	低浓度加标		高浓度加标	
	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)
甲硫氨酸亚砷	97.21	1.72	99.14	2.58
半胱氨酸	88.49	3.54	93.16	4.17

符合合规性要求的 SCIEX OS 软件

SCIEX OS 软件需要以电子方式存储记录和签名，符合 21 CFR 第 11 部分中概述的规定。SCIEX OS 软件可以使用指定的处理工作站从封闭网络中的任何可见存储位置打开原始数据文件。图4 说明了 SCIEX OS 软件用于监控审计跟踪、执行采集、处理数据和配置用户访问的功能。审计跟踪功能使用户能够监控高风险事件并评估数据完整性。The Central Administrator Console (CAC) 功能允许用户将采集和处理集中在一个平台中，从而为多仪器实验室提供更高的效率，满足受监管和非受监管的合规标准。使用配置模块，用户可以为管理员、方法开发人员、分析人员和审阅者分配角色和访问权限。

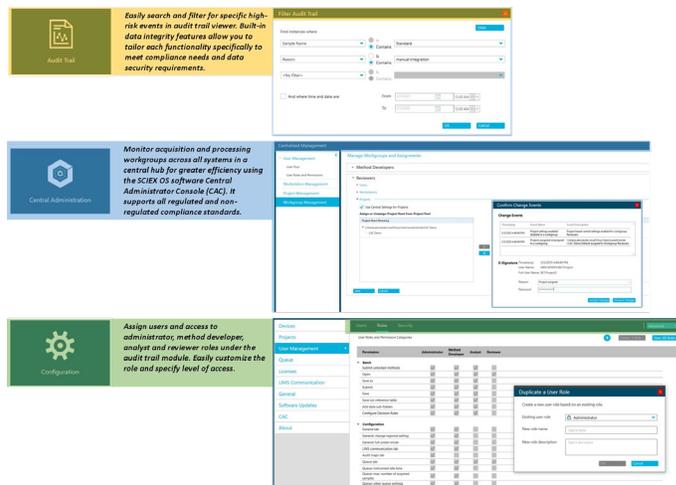


图4. SCIEX OS 软件上用于监控用户访问和评估审计跟踪的功能。审计跟踪视图允许用户轻松过滤高风险事件，并启用数据完整性功能以满足合规性要求。该软件具The Central Administrator Console (CAC) 可集中监控所有系统的采集和处理。CAC 功能支持受监管和不受监管的合规性标准。配置模块使用户能够轻松设置管理员、方法开发人员、分析人员和审阅者角色的角色和访问级别。

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 质谱系统建立了复方氨基酸注射液中杂质甲硫氨酸亚砷和半胱氨酸的分析方法。结果表明，该方法的特异性好，无基质干扰；两种化合物的线性范围为 0.1 ng/mL-250 ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.99。低、高浓度加标回收率以及定量下限重现性良好，方法稳定可靠。

参考文献

- [1] Shi Y, Song H, Liu J, Lin J, Fang L. Comprehensive Evaluation of Clinical Application of Balanced Compound Amino Acid Injection. *Front Nutr.* 2022 Jun 2.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part two. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2015: 811.

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-32538-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：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)