

寻求科学的答案，探索生命的奥秘。™



# 药物分析解决方案

## —— 化药杂质研究专辑



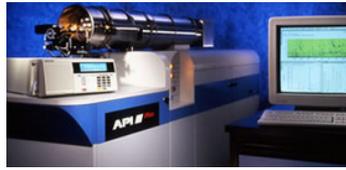
# 我们的历史 – 超过四十年的创新



在多伦多大学由Barry博士和其他人共同创立

1973

研制出第一款商用的三重四极杆仪器

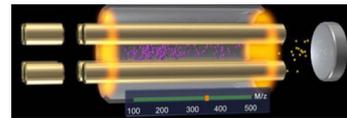


发布了API III，第一款商业化的、专用的液质联用系统，成为行业金标准

1981

1989

2001



发布了QTRAP®液质联用系统，第一次把三重四极杆和线性离子阱结合起来

2002

开发了API 5000™系统，在当年是业界最为灵敏的系统

2005

发布了API 4000™液质联用系统，成为了生物分析的标准手段



2008



发布了当时最为先进、灵敏的5500系列





和illumina合作，开发了第一个跨组学云端计算平台



推出“X系列”最新款X500B QTOF系统



在一年内发布了超过10款新品，成为历史上单年度内发售新品最多的年份，包括4500和6500系列，以及TripleTOF®高分辨质谱系列



针对临床诊断的Triple Quad™ 4500MD液相色谱串联质谱检测系统

2010

2012

2013

2014

2015

2017

2018

成为丹纳赫集团的一员，  
同年收购Eksigent公司



宣布了首款医疗仪器 and 体外诊断的解决方案；整合了贝克曼的毛细管电泳业务



发布多款解决方案如 Lipidizer™, BioBA和公司历史上最大研发项目 X500R QTOF系统



发布高灵敏度的定量解决方案，OptiFlow™ Turbo V 离子源和M5 Micro LC



## 药物杂质（有关物质）

任何影响药物纯度的物质统称为杂质，人用药物注册技术要求国际协调会（简称 ICH）对杂质的定义为药物中存在的，化学结构与该药物不一致的任何成分。药物中含有杂质会降低疗效，影响药物的稳定性，有的甚至对人体健康有害或产生其他毒副作用。因此，检测有关物质，控制纯度对确保用药安全有效，保证药物质量是非常重要的。

不同日摄入量的原料和制剂，有不同的杂质报告限度、鉴定限度和质控限度。以日摄入量不大于 2 g/ 天的原料药为例，当有关物质含量超过 0.10% 或者 1.0 mg（取较小值），该杂质就需要得到鉴定（详见 ICH Q3A/Q3B）。

最大日剂量	报告限度	鉴定限度	质控限度
≤2 g/day	0.05%	0.10% or 1.0 mg	0.15% or 1.0 mg
>2 g/day	0.03%	0.05%	0.05%

## 药物基因毒性杂质

遗传毒性杂质（也叫基因毒性杂质，GTIs），通常是指能够引起 DNA 突变、染色体断裂或者 DNA 重组的物质，可经适当基因毒性试验模型验证（如 Ames 试验），与此同时，这类物质还可能导致肿瘤的发生。而基因毒性杂质的来源主要为原料药合成过程中的起始物料、中间体、试剂和反应副产物，此外，药物在合成、储存或者制剂过程中也可能因降解而产生基因毒性杂质。

2006 年，美国药物研究和制造商协会（PhRMA）发布白皮书，首次提出了阶段化 TTC（毒理学关注阈值）概念，随后 EMEA，FDA 和 ICH 也分别对阶段化 TTC 及 API 中 GTIs 的控制方法进行了定义。

疑似基因毒素 的日摄入量 (µg/ 日)	用药期限						
	Single dose	< 14 天	14 天 - 1 月	1-3 月	3-6 月	6-12 月	> 12 月
EMEA	120	60	60	20	10	5	1.5
FDA	120	120	120	20	10	5	1.5
PhRMA	120	120	120	40	20	10	1.5

## 基于 SCIEX 质谱的药物杂质解决方案提供以下优势：

- 久经考验的高性能离子源 Turbo V™ 在多批次高通量的分析中保持极佳的耐用性和重现性；
- 针对中间体、原料和制剂各种基质的痕量基因毒杂质分析，满足检测要求的高灵敏度和快速的分析速度；
- QTRAP® 独特的 MRM<sup>3</sup> 功能，通过选择三级碎片离子进一步提升分析选择性，实现杂质的同时定量和定性；
- 卓越性能的高分辨飞行时间质谱技术，为完全未知杂质的鉴定提供了充分的可能性；
- Analyst®, MultiQuant™ 符合 21 CFR PART 11 法规标准，增强数据安全性，满足制药合规要求；

# 目 录

1. SCIEX Triple Quad™ 3500测定基因毒性杂质对硝基苯酚 .....	2
2. SCIEX Triple Quad™ 3500测定基因毒性杂质苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯 .....	4
3. LC-MS/MS法快速测定基因毒性杂质亚硝胺类化合物 .....	7
4. LC-MS/MS快速测定基因毒性杂质对甲基苯磺酸酯类化合物.....	10
5. LC-MSMS快速测定基因毒性杂质樟脑磺酸酯类化合物.....	13
6. LC-MS/MS测定甲磺酸伊马替尼中的基因毒性杂质伊马胺 .....	16
7. 2D-LC-QTRAP®在药物杂质分析中的应用.....	19
8. SCIEX 2D-LC-X500R高分辨质谱系统用于西罗莫司中的杂质分析 .....	23



# SCIEX Triple Quad™ 3500测定基因毒性杂质对硝基苯酚

## Determination of Genotoxic Impurities 4-nitrophenol on SCIEX Triple Quad™ 3500

雷敏 (Lei Min), 郭立海 (Guo Lihai)  
SCIEX, 亚太应用支持中心 (广州), 中国

**关键词:** Triple Quad™ 3500, 基因毒性杂质, 对硝基苯酚

**Key Words:** Triple Quad™ 3500, Genotoxic Impurities, 4-nitrophenol

### 引言

在制药行业中, 基因毒性杂质(GTIs, Genotoxic impurities)是药物合成、配置或者储存过程中可能形成的中间体, 反应产物或降解物。基因毒性化合物可能与DNA发生反应, 从而导致致癌反应和肿瘤发展。潜在基因毒性杂质包括如磺酸酯类, 氯代烷烃类, 苯胺类, 硝基苯类等。

按照美国FDA和EMA指南的要求, 必须对原料药或药品中任何可能存在、未在早期合成步骤中清除的所有基因毒性杂质进行监测。对于基因毒性杂质来说, 限度则需控制到ug/g级别, 所以基因毒性杂质的标准比普通杂质严格了近百倍乃至千倍, 因此基因毒性杂质的测试对于仪器的灵敏度有很高的要求。

目前已有HPLC方法测定对硝基苯酚的含量, 但是由于原料药中杂质较多, HPLC方法需要分离原料药中多个干扰杂质才能准确定量, 测试时间长, 所以有必要使用LC-MS/MS建立高效和高灵敏度的方法, 用于该类化合物的定量分析, 以实现良好的控制原料药质量的目的。

### 本文实验方法特点

本文展示了使用SCIEX Triple Quad™ 3500对基因毒性杂质进行对硝基苯酚测定, 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0.2 ng/mL, 远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, 仅5min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4.8%, 仪器和方法的重现性好。
4. 该方法对该类基因毒性杂质测试有很好的参考意义。

### 仪器设备

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

#### 液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5  
100 × 3.0 mm, 2.6 μm

流动相: A相: 水  
B相: 乙腈

流速: 0.6 ml/min

柱温: 40°C;

进样量: 5 μL

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	70	30
2.20	5	95
2.80	5	95
2.81	70	30
5.00	70	30

### 质谱方法

离子源：ESI源，负离子模式

离子源参数：

IS电压：-4500V                      气帘气 CUR: 30 psi  
 雾化气 GS1: 55 psi                辅助气 GS2: 55 psi  
 源温度 TEM: 550°C                碰撞气 CAD: 6

表1. 对硝基苯酚的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE
对硝基苯酚	137.9	107.9	-65	-25
	137.9	92.0	-65	-32

## 实验结果

### 1. 特异性：

配制50%乙腈溶液，作为空白溶液；取对硝基苯酚标准品，加入一定量空白溶液溶解，并稀释至浓度为0.2 ng/mL的标准工作溶液，作为最低定量下限溶液(LLOQ溶液)。分别取5 μL进样，提取离子流图如下，在待测物保留时间出无干扰，分别见图1和图2。

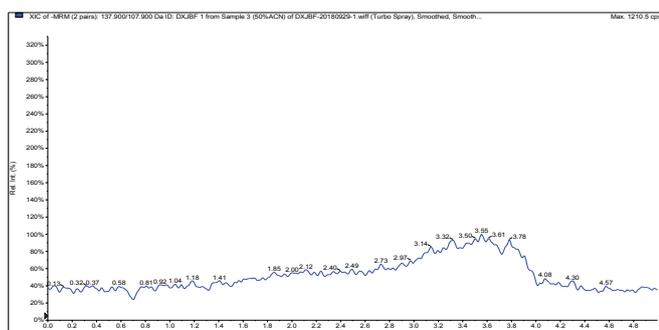


图1. 空白溶液中的提取离子流图。

### 2. 线性范围：

用空白溶液逐级稀释对硝基苯酚的标准工作溶液至

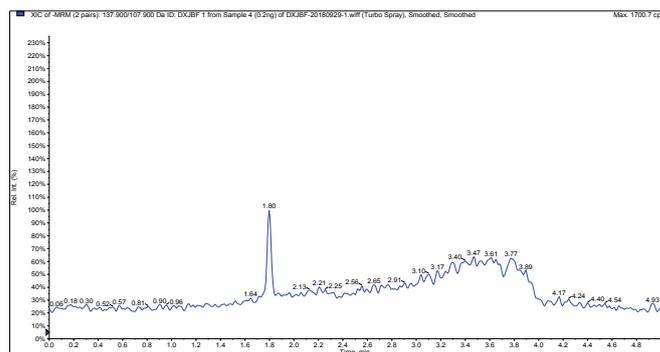


图2. LLOQ溶液的提取离子流图。

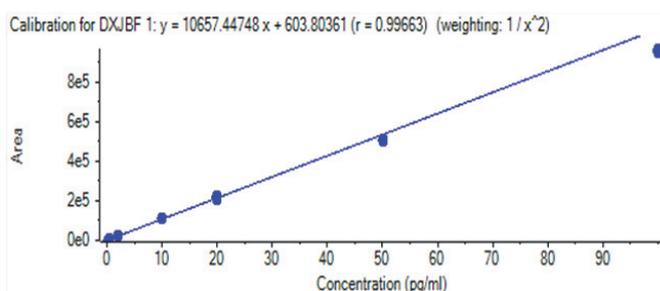


图3. 标准曲线，线性回归系数r=0.99663。

0.2ng/mL, 0.5ng/mL, 2ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 每个浓度分别进样3次，以峰面积对浓度做标准曲线。图3为对硝基苯酚的线性范围、线性方程和相关系数。

### 3.LLOQ的准确度和重现性：

平行制备六份LLOQ溶液，进样分析，测定结果如下表格。六份平行样品中，对硝基苯酚的准确度为96.0%，准确度良好；RSD%为4.8%，RSD均满足测试要求，表明重现性良好。

表2. 重现性测试结果。

Compound	0.2 ng/mL	
	Accuracy(Average, %)	RSD (%)
苯磺酸甲酯	96.0	4.8

## 总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 3500建立了LC-MS/MS方法测定基因毒性杂质对硝基苯酚的含量。方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.2 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的RSD为4.8%，表明方法和仪器的重现性良好。该方法为测试该类基因毒性杂质提供了参考。

# SCIEX Triple Quad™ 3500测定基因毒性杂质苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯

## Determination of Genotoxic Impurities Methyl benzenesulfonate and Ethyl benzenesulfonate on SCIEX Triple Quad™ 3500

雷敏 (Lei Min), 郭立海 (Guo Lihai)

SCIEX, 亚太应用支持中心 (广州), 中国

**关键词:** Triple Quad™ 3500, 基因毒性杂质, 苯磺酸甲酯, 苯磺酸乙酯

**Key Words:** Triple Quad™ 3500, Genotoxic Impurities, Methyl benzenesulfonate, Ethyl benzenesulfonate

### 引言

在制药行业中, 磺酸或磺酰卤类试剂常被用作烷基化试剂和催化剂, 还应用于药物化学合成的纯化或成盐步骤。合成反应或重结晶步骤中任何残留醇的存在都可能导致形成磺酸酯。临床研究发现磺酸酯能够直接与生物大分子 (DNAs、RNAs及蛋白质) 发生烷基化反应, 可能会导致DNA的突变。芳基磺酸酯, 包括苯磺酸甲酯 (MBS)、苯磺酸乙酯 (EBS) 等, 被视为潜在的基因毒性杂质。

按照美国FDA和EMA指南的要求, 必须对原料药或药品中任何可能存在、未在早期合成步骤中清除的所有基因毒性杂质进行监测。对于基因毒性杂质来说, 限度则需控制到 $\mu\text{g/g}$ 级别, 所以基因毒性杂质的标准比普通杂质严格了近百倍乃至千倍, 因此基因毒性杂质的测试对于检测仪器的灵敏度有很高的要求。而且, 因苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯沸点在147-150度, 目前在GC上的测试方法不太理想; 而HPLC的灵敏度相对较低, 且需要分离原料药中多个干扰杂质才能准确定量, 测试时间长, 所以有必要使用LC-MS/MS建立高效和高灵敏度的方法, 用于该类化合物的定量分析, 以实现良好的控制原料药质量的目的。



### 本文实验方法特点

本文展示了使用SCIEX Triple Quad™ 3500对基因毒性杂质进行苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯定量测定, 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 $2\text{ng/ml}$ , 远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, 仅4.5 min的方法即可准确定量, 检测效率高。
3. 最低定量下限 (LLOQ) 的RSD分别为5.5%和1.8%, 仪器和方法的重现性好。
4. 该方法对该类基因毒性杂质测试有很好的参考意义。

### 仪器设备

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

### 液相方法

色谱柱：Phenomenex Kinetex F5  
 100 × 3.0 mm, 2.6 μm  
 流动相：A相：水（0.1%甲酸）  
 B相：乙腈（0.1%甲酸）  
 流速：0.6ml/min  
 柱温：40℃；  
 进样量：20 μL

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	60	40
2.50	5	95
3.00	5	95
3.01	60	40
4.50	60	40

### 质谱方法

离子源：ESI源，正离子模式  
 离子源参数：  
 IS电压：5500V  
 雾化气 GS1: 55 psi  
 源温度 TEM: 300℃  
 气帘气 CUR: 35 psi  
 辅助气 GS2: 50 psi  
 碰撞气 CAD: 8

表1. 苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE
苯磺酸甲酯	173.1	77.0	70	23
苯磺酸乙酯	187.0	159.1	60	13

## 实验结果

### 1. 特异性：

配制含0.1%甲酸的50%乙腈溶液，作为空白溶液；取苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯标准品，加入一定量空白溶液溶解，并稀释至浓度分别为2 ng/mL的标准工作溶液，作为最低定量下限溶液(LLOQ溶液)。分别取20 μL进样，各杂质提取离子流图如下，在各待测物保留时间出无干扰，分别见图1和图2。

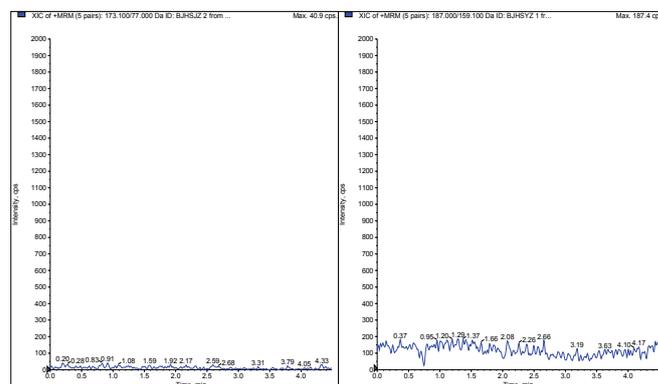


图1. 空白溶液中的提取离子流图，分别为苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯。

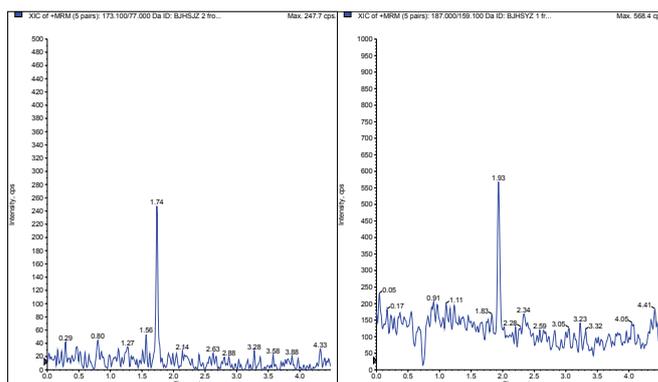


图2. LLOQ溶液的提取离子流图，分别为苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯。

### 2. 线性范围：

用空白溶液逐级稀释苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯标准工作溶液至2 ng/mL, 4 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL, 4000 ng/mL, 每个浓度分别进样3次，以峰面积对浓度做标准曲线。图3，图4分别为苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯的线性范围、线性方程和相关系数。

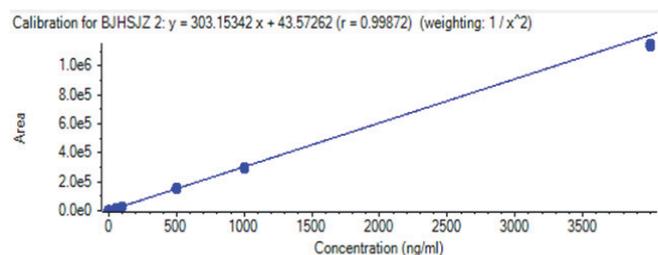


图3. 苯磺酸甲酯标准曲线，线性回归系数r=0.99872。

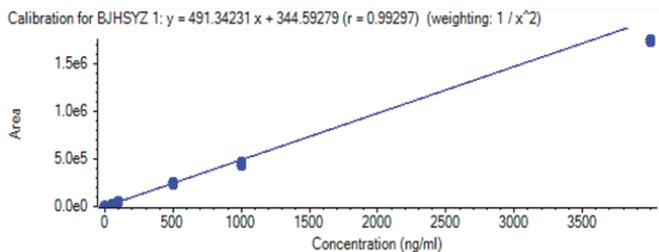


图4. 苯磺酸乙酯标准曲线，线性回归系数 $r=0.99276$ 。

### 3. LLOQ的准确度和重现性：

平行制备六份LLOQ溶液，进样分析，测定结果如下表格。六份平行样品中，苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯的准确度分别为87.2%和92.3%，准确度良好；RSD%分别为5.5%和1.8%，RSD均满足测试要求，表明重现性良好。

表2. 重现性测试结果。

Compound	2ng/mL	
	Accuracy (Average, %)	RSD (%)
苯磺酸甲酯	87.2	5.5
苯磺酸乙酯	92.3	1.8

### 总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 3500建立了LC-MS/MS方法测定基因毒性杂质苯磺酸甲酯和苯磺酸乙酯的含量。方法的特异性好，无干扰；两个化合物的线性范围均为2 ng/mL-4000 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的RSD分别为5.5%和1.8%，表明方法和仪器的重现性良好。该方法为测试该类基因毒性杂质提供了参考。

## LC-MS/MS法快速测定基因毒性杂质亚硝胺类化合物

冷向阳, 龙志敏, 郭立海

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic impurities) 是药物合成、配置或者储存过程中可能形成的中间体, 反应产物或降解物, 基因毒性杂质的特点是在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 进而导致基因突变并可能促使肿瘤的发生。因其毒性较强, 对用药的安全性产生了极大的威胁, 2005 年发生了甲磺酸萘非维拉事件, 为防范此类事件再度发生, 监管机构 (包括欧洲药品管理局 (EMA)、美国 FDA 和国际协调会议 (ICH M7)) 陆续发布了关于药物成分中基因毒性杂质允许限值的指导原则, 以确保药品的安全。指导原则要求药物或药品中的所有潜在基因毒性杂质 (GTIs) 均必须低于每日 1.5  $\mu\text{g}$  的毒理学关注阈值 (TTC, Threshold of Toxicological Concern), 即相当于每天摄入 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质, 被认为对于大多数药品来说是可以接受的剂量。

亚硝胺类化合物是强致癌物, 是最重要的化学致癌物之一, 亚硝胺类化合物普遍存在于谷物、烟酒、熏肉以及饮水中, 也常被用作有机合成的中间体, 由于其强大的基因毒性, 因此在药物研发过程中准确测定其含量就显得非常重要。但由于其分子量小, 亲水性强, 对灵敏度要求高, 这都加大了检测的难度。

某品牌缬沙坦胶囊每日最大剂量为 80 mg, 那么药物中所含有的对亚硝胺类基因毒性杂质的分析结果都必须小于 TTC 水平, 即  $1.5 \mu\text{g}/\text{day}/0.08 \text{g} = 18.75 \mu\text{g}/\text{g}$  (0.001875%)。本文首次展示使用 LC-MS/MS 同时测试缬沙坦中 8 种亚硝胺类化合物的含量, 仅 6.5 min 的方法完全满足 EMA 和 FDA 灵敏度要求, 与 HPLC 和 GC 方法相比有效的节省了时间成本。本方法定量下限可低至 0.1 ng/mL (相当于 2.0 mg/mL 样品中含亚硝胺的含量为 0.05  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 远低于 TTC 水平), 仪器的灵敏度高, 重现性好, 且拓宽了亚硝胺类基因毒性杂质测试范围。



### 仪器设备

SCIEX ExionLC™ 液相系统 + Triple Quad™ 4500 质谱系统

### 液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  F5 100A

流动相: A 相: 水 (0.1% 甲酸)

B 相: 甲醇

流速: 0.5 ml/min

柱温: 40°C;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	85	15
0.50	85	15
5.00	5	95
5.10	85	15
6.00	85	15

## 质谱方法

离子源：APCI 源，正离子模式

离子源参数：

NC 电流：3  $\mu$ A                      气帘气 CUR：30 psi

雾化气 GS1：35 psi                碰撞气 CAD：8

源温度 TEM：350  $^{\circ}$ C

表1. 8种亚硝胺类化合物的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE
N- 亚硝基二甲胺 (NDMA)	75.1	58.1	40	16
N- 亚硝基二乙胺 (NDEA)	103.1	75.0	40	15
N- 亚硝基二丙胺 (NDPA)	131.1	89.1	40	20
N- 亚硝基二丁胺 (NDBA)	159.1	103.1	40	21
N- 亚硝基吡咯烷 (NPYR)	101.1	55.1	40	21
N- 亚硝基哌啶 (NPIP)	115.1	69.0	40	28
N- 亚硝基吗啉 (NMOR)	117.1	87.1	40	23
N- 亚硝基二乙醇胺 (NDELA)	135.1	104.1	40	8

## 实验结果

**1. 特异性：**取缬沙坦标准品配制成 2.0 mg/mL 溶液，加入 8 种混合亚硝胺的标准工作溶液至缬沙坦标准溶液中，浓度分别为 0.5ng/mL，5.0 ng/mL 和 15.0 ng/mL，做为加标样品，此溶液相当于样品中含亚硝胺的含量分别为 0.25  $\mu$ g/g，2.5  $\mu$ g/g 和 7.5  $\mu$ g/g；称量一定量的某品牌缬沙坦药品，溶解并稀释至 2.0mg/mL，做为实际样品溶液；进样分析后，各杂质提取离子流图如下，实际样品中检测到 NDMA 的浓度约为 0.2 ng/mL（相当于样品中含亚硝胺的含量为 0.1  $\mu$ g/g，低于 TTC 水平），其余 7 种亚硝胺均未检出；空白溶剂中 8 种亚硝胺化合物均未检出；空白溶剂、加标样品和实际样品结果分别见图 1、图 2 和图 3。

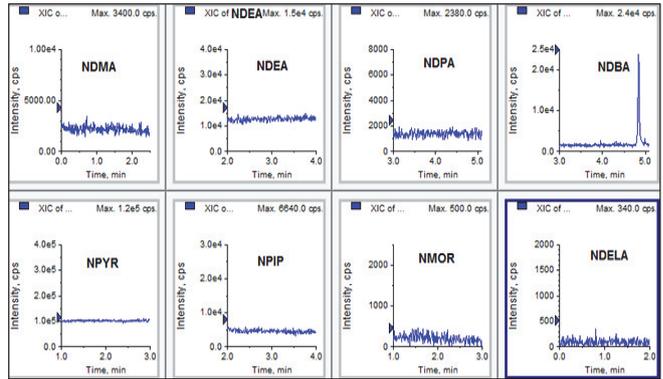


图1. 空白溶剂中各物质的提取离子流图。

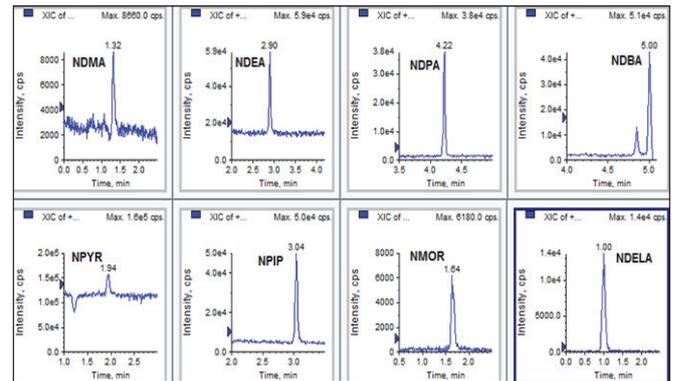


图2. 0.2ng/ml样品加标溶液中各物质的提取离子流图。

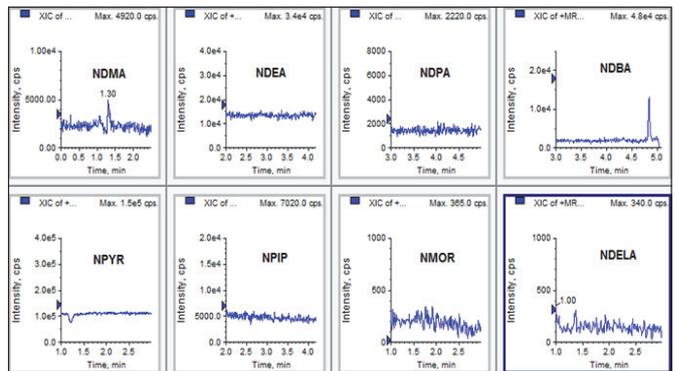


图3. 实际样品溶液中各物质的提取离子流图。

**2. 线性范围：**用纯水逐级稀释亚硝胺类标准工作溶液至 0.1ng/mL, 0.2ng/mL, 1.0ng/mL, 2.0ng/mL, 5.0ng/mL, 10.0ng/mL 和 20.0ng/mL 分别进样分析，以峰面积对浓度做标准曲线。图 4 为 8 种亚硝胺类化合物的标准曲线和相关系数。

**3. 加标回收率和重现性：**取样品加标溶液（加标溶液平行制备六份，浓度分别为 0.5ng/mL, 5.0ng/mL 和 15.0ng/mL），进样分析。测定结果如下表格。8 种亚硝胺类化合物的三个不同浓度样品的回收率在 89.5-112.0%，平行样品的 RSD% 在 0.61-4.42%，回收率和 RSD% 均满足测试求，结果见表 2；最低定量下限样品（0.1ng/mL）连续进样 6 针，RSD 在 1.53%-2.48% 之间，表明重现性良好，结果见表 3。

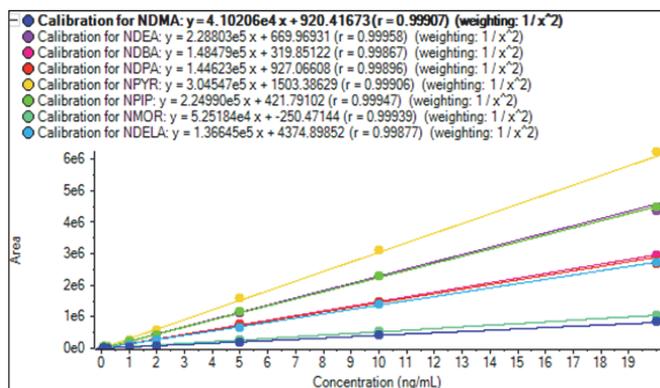


图4. 8种亚硝胺类化合物的标准曲线图。

表2. 回收率测试结果。

Compound	0.5ng/ml		5.0ng/ml		15ng/ml	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
NDMA	92.9	2.34	90.4	2.68	89.5	1.44
NDEA	104.4	2.31	108.5	1.22	109.8	1.06
NDPA	100.0	2.67	104.6	2.91	104.5	2.78
NDBA	102.2	2.37	99.9	2.34	98.4	2.26
NPYR	106.2	2.68	111.1	1.84	112.0	0.69
NPIP	101.7	3.49	105.9	2.03	106.0	0.61
NMOR	96.2	3.75	99.2	3.33	100.1	1.31
NDELA	100.6	4.42	92.3	4.12	95.9	1.37

表3. 重现性结果。

Compound	%RSD (n=6)	Compound	%RSD (n=6)
NDMA	2.11	NPYR	1.67
NDEA	1.53	NPIP	1.91
NDPA	2.48	NMOR	1.78
NDBA	1.62	NDELA	1.62

### 总结

本文使用 SCIEX Triple Quad™ 4500 建立了 LC-MS/MS 方法测定药物中 8 种亚硝胺类化合物的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；8 种亚硝胺类化合物的线性范围为 0.1ng/mL-20ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于 0.998。8 种亚硝胺类化合物其最低点浓度分别相当于原料药中（2.0 mg/mL）的含量为 0.05 μg/g，均低于 TTC 水平，说明灵敏度较高；低、中、高浓度加标回收率以及定量下限重现性良好。

# LC-MS/MS快速测定基因毒性杂质对甲基苯磺酸酯类化合物

冷向阳, 严阳, 刘婷, 雷敏

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic impurities) 是药物合成、配置或者储存过程中可能形成的中间体, 反应产物或降解物。基因毒性化合物可能与 DNA 发生反应, 从而导致致癌反应和肿瘤发展。因此, 监管机构 (包括欧洲药品管理局 (EMA)、美国 FDA 和国际协调会议 (ICH M7)) 发布了关于药物成分中基因毒性杂质允许限值的指导原则, 以确保药品的安全。指导原则要求药物或药品中的所有潜在基因毒性杂质 (PGI) 均必须低于每日 1.5  $\mu\text{g}$  的毒理学关注阈值 (TTC, Threshold of Toxicological Concern), 即相当于每天摄入 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质, 被认为对于大多数药品来说是可以接受的剂量。

对甲基磺酸酯类化合物, 是常见的基因毒性杂质, 作为已经被确定的基因毒性化合物, 准确测定其含量就显得非常重要。当前, 文献中用于分析对烷基磺酸酯的方法包括液相色谱以及 GC-MS, 和少量的 LC-MS 方法。这些技术操作有些复杂或者需要柱前衍生步骤以提高分析物的可检测性, 加大了检测的难度<sup>[1-3]</sup>。

某 X 药物每日最大剂量为 100 mg, 那么原料药中所含有的对甲基苯磺酸类基因毒性杂质的分析结果都必须小于 TTC 水平, 即 1.5  $\mu\text{g}/\text{day}/0.1\text{g}=15 \mu\text{g}/\text{g}$  (0.0015%)。本文首次展示使用 LC-MS/MS 同时测试 X 原料药中对苯磺酸甲酯、对苯磺酸乙酯和对苯磺酸异丙酯的含量, 仅 6 min 的方法完全满足 EMA 和 FDA 灵敏度要求。方法定量下限可低至 0.1-1 ng/mL, 仪器的灵敏度高, 重现性好, 且拓宽了磺酸酯类基因毒性杂质测试范围。

## 仪器设备

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



## 液相方法

色谱柱: Waters BEH C18  
(50 × 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )

流动相: A 相: 水 (0.1% 甲酸 + 1 mmol/L 甲酸铵)  
B 相: 甲醇

流速: 0.25 mL/min

柱温: 40°C;

进样量: 5  $\mu\text{L}$

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	60	40
0.50	60	40
3.00	15	85
4.00	10	90
4.10	60	40
6.00	60	40

## 质谱方法

离子源: ESI 源, 正离子模式

离子源参数:

IS 电压: 5500V  
 雾化气 GS1: 60 psi  
 源温度 TEM: 500°C  
 气帘气 CUR: 35 psi  
 辅助气 GS2: 50 psi  
 碰撞气 CAD: Low

表1. 对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP	EP
对甲基苯磺酸甲酯	187.1	90.9	62	24	8	10
对甲基苯磺酸乙酯	201.0	172.9	58	11	8	10
对甲基苯磺酸异丙酯	232.0	91.0	18	39	9	10

### 实验结果

**1. 特异性:** 称量一定量的X原料药, 溶解并稀释至2.0 mg/mL, 做为样品空白溶液; 另取一份2.0 mg/mL 样品空白溶液, 加入对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯标准工作溶液至原料药空白溶液中, 浓度分别为10.0 ng/mL, 2.0 ng/mL 和5.0 ng/mL, 做为样品加标溶液, 此溶液相当于样品中含对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯的含量分别为5 µg/g, 1 µg/g 和2.5 µg/g。分别取5 µL 进样分析, 各杂质提取离子流图如下, 空白样品中未检测到对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯, 结果分别见图1和图2。

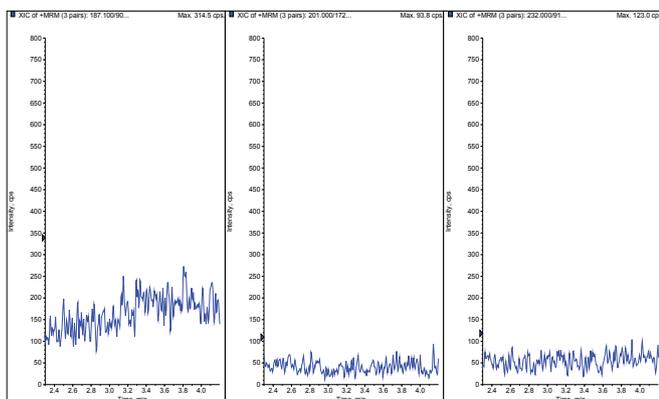


图1. 样品空白溶液中的提取离子流图, 分别为对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯。

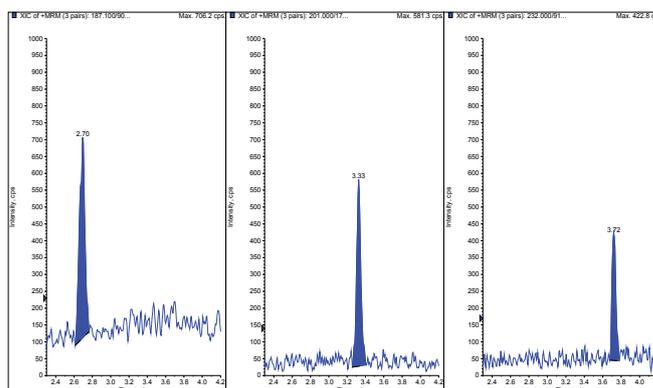


图2. 样品加标溶液中各物质的提取离子流图 (10.0 ng/mL, 2.0 ng/mL 和5.0 ng/mL), 分别为对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯。

**2. 线性范围:** 用50% 甲醇逐级稀释对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯标准工作溶液至1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10.0 ng/mL, 20.0 ng/mL, 50.0 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL 和1000 ng/mL 分别进样分析, 以峰面积对浓度做标准曲线。图3, 图4和图5分别为对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯的标准曲线、线性范围和相关系数。

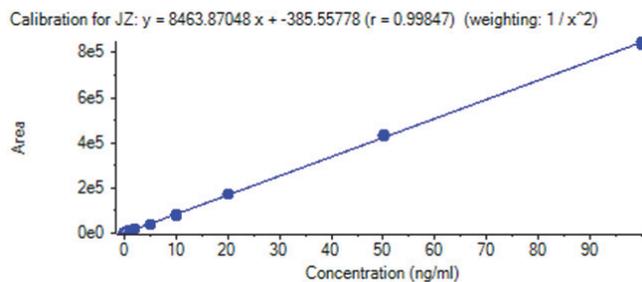


图3. 对甲基苯磺酸甲酯标准曲线, 线性范围: 10~1000 ng/mL, 线性回归系数r=0.99847。

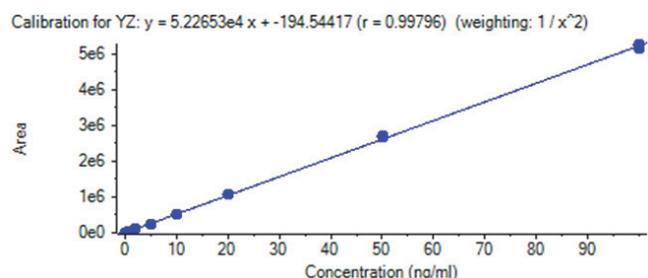


图4. 对甲基苯磺酸乙酯标准曲线, 线性范围: 1~1000 ng/mL, 线性回归系数r=0.99796。

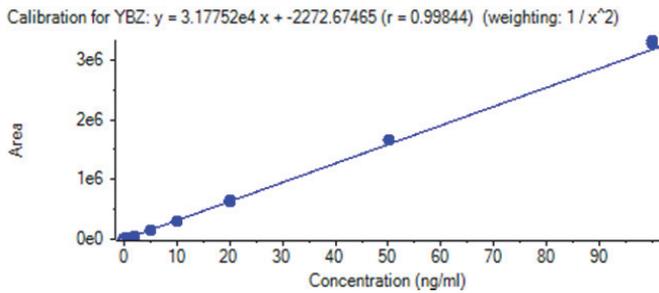


图5. 对甲基苯磺酸异丙酯标准曲线, 线性范围5~1000 ng/mL, 线性回归系数 $r=0.99844$ 。

**3. 加标回收率和重现性：**取 2.0 mg/mL X 样品空白溶液，以及 X 样品加标溶液（加标溶液平行制备六份），进样分析。测定结果如下表格。不同浓度样品的回收率在 92.4-108.9%，平行样品的 RSD% 在 1.1-5.7%，回收率和 RSD% 均满足测试求，结果见表 2；最低定量下限样品连续进样 6 针，RSD 在 3.75%-6.15% 之间，表明重现性良好，结果见表 3。

表2. 回收率测试结果。

Compound	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
对甲基苯磺酸甲酯	10.0 ng/ml		50.0ng/ml		500.0ng/ml	
	97.2	5.7	94.3	3.7	100.1	1.5
对甲基苯磺酸乙酯	2.0ng/ml		50.0ng/ml		500.0ng/ml	
	96.8	4.7	101.9	1.1	103.5	1.2
对甲基苯磺酸异丙酯	5.0 ng./ml		50.0ng/ml		500.0ng/ml	
	108.9	3.0	92.4	1.3	103.8	1.1

表3. 重现性结果。

重现性	对甲基苯磺酸甲酯 (10.0ng/ml)	对甲基苯磺酸乙酯 (1.0ng/ml)	对甲基苯磺酸异丙酯 (5.0ng/ml)
n	6	6	6
RSD (%)	6.15	5.28	3.75

## 总结

本文使用 SCIEX Triple Quad™ 3500 建立了 LC-MS/MS 方法测定 X 原料药中基因毒性杂质对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯线性范围分别为 10 ng/mL-1000 ng/mL，1 ng/mL-1000 ng/mL 和 5 ng/mL-1000 ng/mL，在线性范围内线性关系良好。对甲基苯磺酸甲酯、对甲基苯磺酸乙酯和对甲基苯磺酸异丙酯，其最低点浓度分别相当于原料药中（2.0 mg/mL）的含量为 5  $\mu$ g/g，1  $\mu$ g/g 和 2.5  $\mu$ g/g，均低于 TTC 水平，说明灵敏度较高；低、中、高浓度加标回收率以及定量下限重现性良好。

## 参考文献

- [1] Nageswari A, Reddy KV, Mukkanti K .A Sensitive and Simple HPLC-UV Method for Trace Level Quantification of Ethyl p-Toluenesulfonate and Methyl p-Toluenesulfonate, Two Potential Genotoxins in Active Pharmaceutical Ingredients[J]. Sci Pharm,2011,9(4): 865-876.
- [2] Colón I, Richoll SM. Determination of methyl and ethyl esters ofmethanesulfonic, benzenesulfonic and p-toluenesulfonic acids in active pharmaceutical ingredients by solid-phase microextraction (SPME) coupled to GC/SIM-MS[J]. J Pharm Biomed Anal.,2005,39(3-4 ) :477-485.
- [3] Graham E,Taylor M.G,Andrea P. Low level determination of p-toluenesulfonate and benzenesulfonate esters in drug substance by high performance liquid chromatography/ mass spectrometry[J]. J Chromatogr A. 2006 Jun 30;1119(1-2):231-237.

## LC-MSMS快速测定基因毒性杂质樟脑磺酸酯类化合物

严阳, 冷向阳, 刘婷, 郭立海

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

自从2007年甲磺酸奈非那韦事件以后, 基因毒性杂质 (Genotoxic impurities, 简称 GTIs) 成为了欧美新药研发关注的重点之一。基因毒性杂质是指能直接或间接损伤细胞 DNA, 产生致突变和致癌作用的物质。可能产生基因毒性杂质的环节包括新药合成, 原料纯化, 存储运输 (与包装物接触) 等。潜在基因毒性杂质: 结构基因毒性杂质, 如黄曲霉素, 亚硝胺, 甲基磺酸酯, 化疗药物。因此, EMEA (欧洲药品管理局) 以及 FDA (美国食品药品监督管理局) 相继颁布了基因毒性物质研究相关技术指导原则。

进行基因毒性杂质的毒理学评估和这些杂质在原料药中的可接受限度的确定是个难题, 并且在现有的 ICHQ3X 指南中并未详细规定。如果缺少风险评估方法所需要的数据, 比如, 致癌作用的长期研究数据, 或为基因毒性的阈值提供证据的数据, 一般建议使用通用的被定义为 Threshold of Toxicological Concern (TTC) 的方法。一个“1.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ ”的 TTC 值, 即相当于每天摄入 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质, 被认为对于大多数药品来说是可以接受的风险。

伏立康唑片每日最大剂量为 400 mg, 那么伏立康唑樟脑磺酸盐原料药中所含有的各种基因毒性杂质的分析结果都必须小于以下 TTC 水平, 即 1.5  $\mu\text{g}/\text{day}/0.4\text{g}=3.75 \mu\text{g}/\text{g}$  (3.75 mg/kg)。对于限度如此低的杂质的测定, 对仪器的灵敏度要求非常高。

有文献<sup>[1]</sup>报道, 使用 GC-MS 测定樟脑磺酸甲酯和樟脑磺酸乙酯基因毒性杂质, 但定量下限均为 500 ng/ml。本文首次展示了使用 Triple Quad™ 4500 同时测试伏立康唑樟脑磺酸盐原料药中樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯的含量。为了提高灵敏度, 因樟脑磺酸酯类化合物容易形成  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  母离子, 本方法首次使用  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  作为母离子建立 MRM 方法, 结果表明方法灵敏稳定, 定量下限可低至 20 pg/ml。仅 6 min 的方法梯度完全满足实验中高通量的要求。该方法灵敏度高, 重现性好, 适合快速测定樟脑磺酸酯类基因毒性杂质。



### 仪器设备

SCIEX ExionLC™ 液相系统 + Triple Quad™ 4500 质谱系统

### 液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5  
100  $\times$  3.0mm, 2.6  $\mu\text{m}$

流动相: A 相: 水 (0.01% 甲酸 + 0.1mmol/L 甲酸胺)  
B 相: 乙腈 (0.01% 甲酸 + 0.1mmol/L 甲酸胺)

流速: 0.4 ml/min

柱温: 40°C;

进样量: 5  $\mu\text{L}$

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	50	50
3.00	2	98
3.50	2	98
3.60	50	50
6.00	50	50

## 质谱方法

离子源：ESI 源，正离子模式

离子源参数：

IS 电压：5500V                      气帘气 CUR: 35 psi  
 雾化气 GS1: 65 psi                辅助气 GS2: 65 psi  
 源温度 TEM: 600°C                碰撞气 CAD: Medium

表1. 樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP
樟脑磺酸甲酯	264.1	151.1	40	24	11
		107.1	40	29	10
樟脑磺酸乙酯	278.1	151.1	41	23	11
		107.1	41	30	11
樟脑磺酸异丙酯	292.2	233.1	40	17	6

## 实验结果

### 1. 特异性：

称量一定量的伏立康唑樟脑磺酸盐，溶解并稀释至 20 µg/ml，做为样品空白溶液；另取一份 20 µg/ml 样品空白溶液，加入樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯标准工作溶液至各杂质浓度为 20 pg/ml，做为样品加标溶液，此溶液相当于样品中含樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯的含量为 1 mg/kg。分别取 5µl 进样分析，各杂质提取离子流图如下，在各待测物保留时间处无干扰，且样品中未检测到樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯，分别见图 1 和图 2。

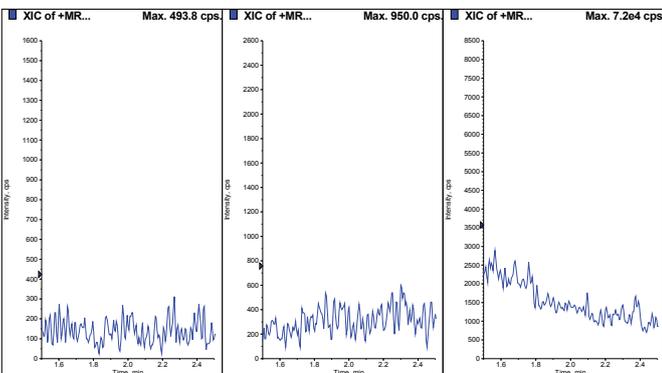


图1. 样品空白溶液中的提取离子流图，分别为樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯。

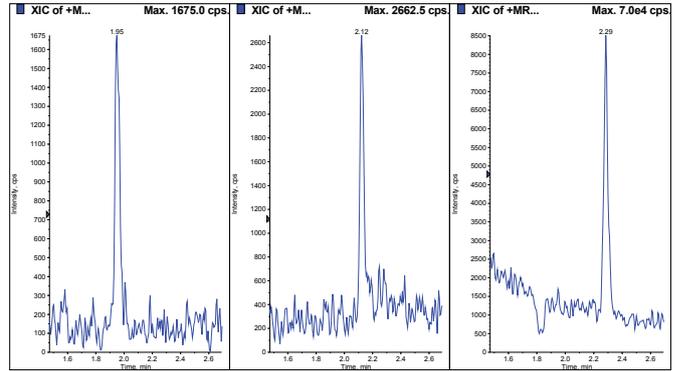


图2. 样品加标溶液中各物质的提取离子流图（20 pg/ml），分别为樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯。

### 2. 线性范围：

用 50% 甲醇水逐级稀释樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯标准工作溶液至 20 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml 分别进样分析，以峰面积对浓度做标准曲线。图 3，图 4 和图 5 分别为樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯的线性范围、线性和相关系数。

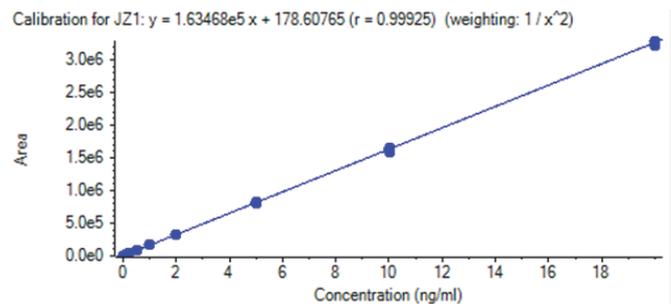


图3. 樟脑磺酸甲酯标准曲线，线性回归系数r=0.99925。

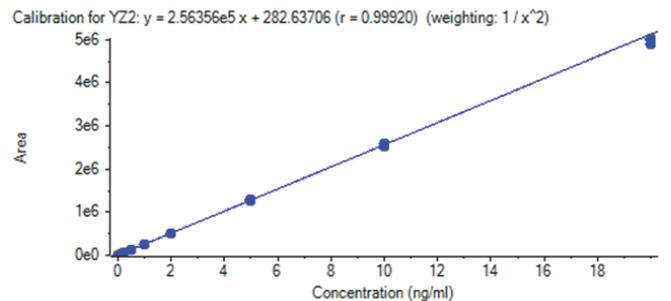


图4. 樟脑磺酸乙酯标准曲线，线性回归系数r=0.99986。

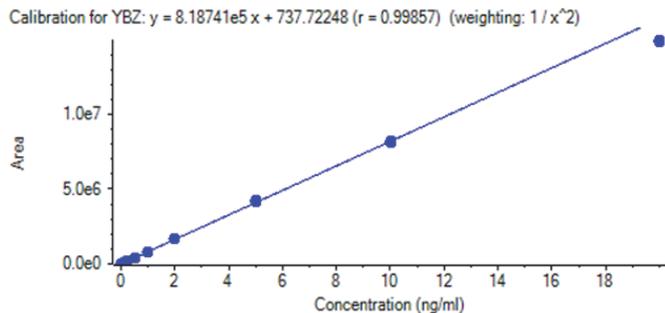


图5. 樟脑磺酸异丙酯标准曲线，线性回归系数 $r=0.99857$ 。

### 3. 加标回收率和重现性：

取 20  $\mu\text{g/ml}$  伏立康唑样品空白溶液，以及伏立康唑样品加标 3 个不同浓度的樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯标准溶液。20  $\text{pg/mL}$  加标溶液平行制备六份，500  $\text{pg/mL}$  和 10  $\text{ng/ml}$  加标溶液分别平行制备三份，进样分析。测定结果如下表格。不同浓度的回收率在 89.0-103.3%，平行样品的 RSD% 在 1.6-7.8%，回收和 RSD 均满足测试要求；6 份 20  $\text{pg/ml}$  的加标溶液 RSD 在 4.0-7.8%，表明重现性良好。

表2. 回收率和重现性测试结果。

Compound	20 $\text{pg/mL}$ (n=6)		500 $\text{pg/mL}$ (n=3)		10 $\text{ng/ml}$ (n=3)	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
樟脑磺酸甲酯	94.1	7.8	101.0	3.1	98.4	2.9
樟脑磺酸乙酯	98.3	5.4	101.5	1.9	102.2	2.0
樟脑磺酸异丙酯	89.0	4.0	103.3	1.8	97.8	1.6

## 总结

本文使用 SCIEX Triple Quad™ 4500 建立了 LC-MS/MS 方法测定伏立康唑樟脑磺酸盐原料药中基因毒性杂质樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯的含量。方法的特异性好，无干扰；线性范围 20  $\text{pg/ml}$ -50  $\text{ng/ml}$ ，线性范围宽，且线性关系良好。各杂质最低点浓度均相当于原料药中（20  $\mu\text{g/ml}$ ）的含量为 1  $\text{mg/kg}$ ，灵敏度高，且通过提高原料药溶液浓度可满足更低检测限度的要求；加标回收率以及重现性良好。

大量的文献报道，使用  $[M+H]^+$  作为母离子，建立樟脑磺酸酯类化合物的 MRM 方法。本实验发现：樟脑磺酸酯类化合物容易形成  $[M+NH_4]^+$  母离子，使用  $[M+NH_4]^+$  作为母离子建立 MRM 方法，灵敏度可提高 2-3 倍，故本方法采用  $[M+NH_4]^+$  作为母离子，测定樟脑磺酸酯类化合物。实验证明：方法灵敏稳定，可快速测定樟脑磺酸酯类化合物。

## 参考文献

- [1]. Raman N V V S S, Reddy K R, Prasad A V S S, et al. Development and validation of GC-MS method for the determination of methyl and ethyl camphorsulfonates in esomeprazole magnesium [J]. Chromatographia, 2008, 68 ( 7-8 ) : 675-678.

# LC-MS/MS测定甲磺酸伊马替尼中的基因毒性杂质伊马胺

刘婷, 冷向阳, 严阳, 郭立海, 陈薇

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic impurities) 是药物合成或者配置, 储存过程中可能形成的中间体, 反应产物或降解物。基因毒性化合物可能与 DNA 发生反应, 从而导致致癌反应和肿瘤发展。因此, 监管机构 (包括欧洲药品管理局 (EMA)、美国 FDA 和国际协调会议 (ICH M7)) 发布了关于药物成分中基因毒性杂质允许限值的指导原则, 以确保药品的安全。指导原则要求药物或药品中的所有潜在基因毒性杂质 (PGI) 均必须低于每日 1.5  $\mu\text{g}$  的毒理学关注阈值 (TTC, Threshold of Toxicological Concern), 即相当于每天摄入 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质, 被认为对于大多数药品来说是可以接受的剂量。

甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate) 每日服用剂量为 400mg, 那么甲磺酸伊马替尼胶囊和原料药中所含有的伊马胺的分析结果都必须小于以下 TTC 水平, 即 1.5  $\mu\text{g}/\text{day}/0.4\text{g}=3.75 \mu\text{g}/\text{g}$  (0.000375%), 对仪器的灵敏度有一定要求。

伊马胺, 化学名 N-(5-氨基-2-甲基苯基)-4-(3-吡啶基)-2-嘧啶胺, 是甲磺酸伊马替尼必检的基因毒性化合物, 准确测定其含量就显得非常重要。当前, 文献中用于分析伊马胺的方法包括 LC-UV 以及 LC-MS 方法, 但这两种方法, 由于专属性的限制, 干扰较大, 且当面对复杂处方时, 可能不得不通过富集等方式来完成。特别是当 LC-UV 方法和 LC-MS/MS 方法相互转化时, 由于液相和液质联用方法常用的流速不同, 增加了方法转化的复杂度。本方法为了提高 LC 方法的依存性, 在不改变 LC-UV 流动相和流速 (1 mL/min) 的前提下, 优化 MS 方法, 测定甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊中的伊马胺, 方法定量下限 (LOQ) 可低至 10 ng/mL, 仪器的灵敏度高, 重现性好。开拓了 LC-UV 方法直接移植 LC-MS/MS 测定的可能性。



## 仪器设备

Shimadzu 20AD™ 液相系统 + API 3200™ 质谱系统

## 液相方法

色谱柱: Waters Sunfire C18 (100 × 3.0mm, 3.5 $\mu\text{m}$ )

流动相: A 相: 0.1% 甲酸水

B 相: 甲醇

流速: 1 mL/min

柱温: 30°C;

进样量: 10  $\mu\text{L}$

## 质谱方法

离子源: ESI 源, 正离子模式

离子源参数:

IS 电压: 5500V

气帘气 CUR: 20 psi

雾化气 GS1: 70 psi

辅助气 GS2: 65 psi

源温度 TEM: 700°C

碰撞气 CAD: Medium

表1. 伊马胺的质谱参数。

Compound	Q1	Q3	Dwell Time	DP	CE	CXP
伊马胺	278.1	262.1	250	60	44	5
		106.1	250	60	38	5

## 实验结果

### 1. 伊马胺LOQ色谱图：

配置伊马胺标准溶液10 ng/mL 和 50%甲醇空白溶液；其色谱图，见图1。

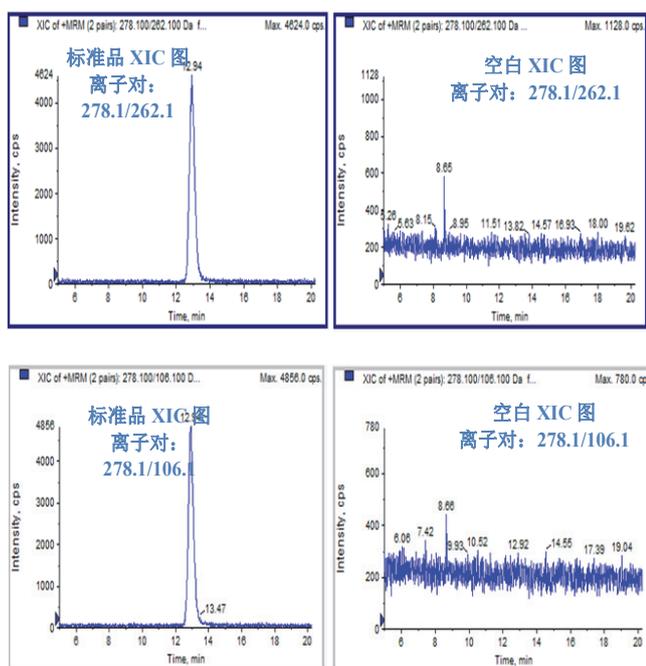


图1. 伊马胺标准品溶液和空白溶液的提取离子流图（10 ng/mL）。

### 2. 稳定性和准确性：

用50%甲醇逐级稀释标准工作溶液至10ng/mL, 20ng/mL, 40ng/mL, 60ng/mL, 每个样品进样3针，以峰面积对浓度做标准曲线，检查仪器的稳定性和准确性。图2为伊马胺LOQ 10ng/mL下的 S/N=70；图3为伊马胺各浓度3针进样稳定性（0.7%<CV%<4.5%）；图4为各浓度回归标曲的准确度（95%<Accuracy<105%）和线性。

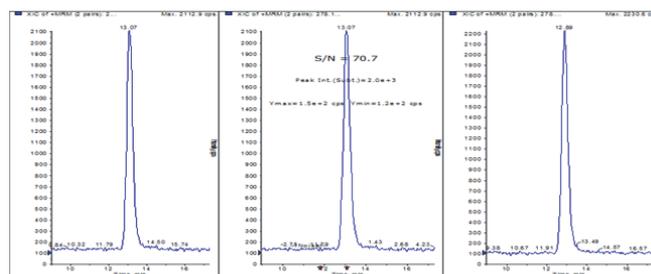


图2. 伊马胺（278.1/106.1）10ng/mL S/N=70。

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy	Value #1	Value #2	Value #3
1	278.1 / 106.1	10.00	3 of 3	10.026	0.437	4.36	100.26	9.626	9.962	10.492
2	278.1 / 106.1	20.00	3 of 3	19.511	0.305	1.56	97.55	19.269	19.409	19.854
3	278.1 / 106.1	40.00	3 of 3	40.913	0.241	0.59	102.28	41.083	40.638	41.017
4	278.1 / 106.1	60.00	3 of 3	59.550	0.415	0.70	99.25	59.071	59.765	59.814

图3. 伊马胺（278.1/106.1）各浓度3次进样稳定性展示：0.6%<CV%<4.5%。

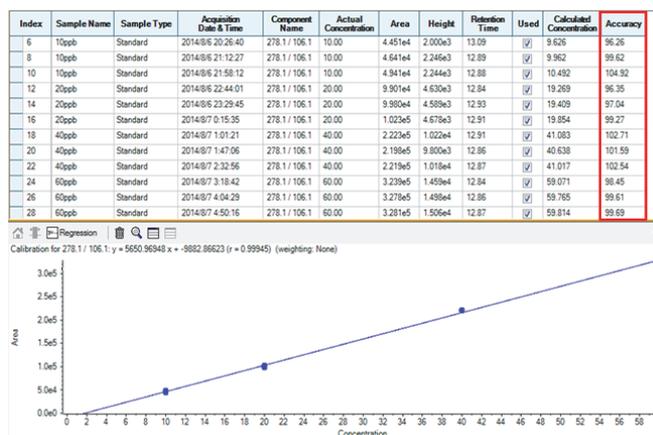


图4. 伊马胺（278.1/106.1）准确度展示：95%<Accuracy<105%。

### 3. 加标回收率：

平行称量一定量的甲磺酸伊马替尼原料药2份样品和胶囊2份样品，在冰浴中甲醇超声溶解并低温离心，取上清，50%甲醇稀释至20 mg/mL作为样品溶液；另取一份20 mg/ml样品溶液0.45 mL，加入60 ng/mL标准工作溶液0.05 mL，作为样品加标溶液。分别取10 μl进样分析。

样品溶液测定结果：甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊的样品溶液中分别含有伊马胺 28 ng/mL 和 17.9 ng/mL，根据伊马替尼含量( 20 mg/mL )，计算其限度分别为：0.00014% 和 0.00009%，均低于 0.0003% 的法规要求限度；测定结果见表 1。

表1. 甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊中的伊马胺均未超过限量。

样品	杂质伊马胺 测定浓度 ( ng/mL )		伊马胺与伊马替尼 ( 20mg/mL ) 质量 百分比 ( % )		伊马胺 限度 ( % )
	Sample 01	Sample 02	Sample 01	Sample 02	
甲磺酸伊马 替尼原料药	27.95	28.24	0.00014	0.00014	0.0003
甲磺酸伊马 替尼胶囊	17.94	17.9	0.00009	0.00009	0.0002

样品加标溶液测定结果：样品加标溶液浓度 = 样品浓度 + 加标浓度，故甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊的样品加标溶液浓度分别为：31.4 ng/mL 和 22.1 ng/mL；结果展示：其回归标准曲线的准确度偏差均 <7%，符合方法学要求。见图 5。

Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
278.1 / 106.1	31.42	1.677e5	7.841e3	12.75	<input checked="" type="checkbox"/>	31.422	100.01
278.1 / 106.1	22.14	1.067e5	4.953e3	12.65	<input checked="" type="checkbox"/>	20.623	93.15

图5. 甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊的样品加标溶液测定准确度偏差 <7%。

## 总结

本文使用 SCIEX API 3200™ 建立了 LC-MS/MS 方法测定甲磺酸伊马替尼原料药和胶囊中基因毒性杂质伊马胺的含量。方法为了增强 LC-UV 和 LC-MS/MS 方法相互转换的依存性，直接采用 LC-UV 的流动相和流速 ( 1 mL/min )，建立 MS 方法，方法未进行任何 LC 分流处理。测定定量下限为 10 ng/mL ( S/N=70 )，良好的重现性，准确度和线性。对原料药和胶囊样品测定，其伊马胺含量均未超过 0.0003% 的限量，和 LC-UV 测定一致；且样品加标检测测定结果正确，为 LC-UV 和 LC-MS/MS 联合测定基因毒性杂质分析提供了基础。

## 2D-LC-QTRAP<sup>®</sup>在药物杂质分析中的应用

### The application of 2D-LC-QTRAP<sup>®</sup> in the analysis of drug impurities

冷向阳 (Leng Xiangyang), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)  
SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国 (SCIEX, APAC Support Center, China)

**Key Words:** 2D-LC-QTRAP<sup>®</sup>, drug impurities

#### 前言

药物在合成、配置或者储存过程中可能会形成某些中间体、反应产物或降解物, 这些有关物质可能会对我们的用药安全产生极大影响, 因此对这些有关杂质的检测和鉴定是药品质量控制中的重要内容。

目前在各国的药典中, 很多药物的有关物质分析采用的是LC-UV的方法, 为了杂质具有更好的色谱峰形和分离度, 在流动相中往往会使用磷酸盐缓冲试剂、离子对试剂等非挥发性缓冲盐。

随着质谱技术 (MS) 的普及, LC-MS的方法越来越多的用于药物的杂质分析, 然而流动相中的非挥发性盐类会大大降低质谱的灵敏度并对质谱仪造成污染, 这给方法转移带来了很大的困难。使用质谱对杂质进行定性分析时, 通常需要将非挥发性缓冲盐体系置换成挥发性的添加剂, 有时将原有方法中质谱不兼容的添加剂替换, 可能造成杂质的保留时间变化, 从而无法对杂质进行定位。

针对这个问题, 本文建立了2D-LC-QTRAP<sup>®</sup>联用的方法, 采用QTRAP<sup>®</sup>质谱系统对目标杂质进行分析, 同时无需将含有非挥发性缓冲盐体系的流动相变为质谱兼容的流动相体系。大大节省了工作人员重新进行方法开发的时间, 并且保证了杂质定性的准确度。本文采用基于阀切换的2D-LC技术与QTRAP<sup>®</sup>质谱技术的联用方法, 实现一针进样同时对西罗莫司的几个主要杂质进行鉴定。

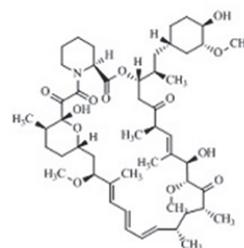


图1. 西罗莫司的结构 (NW: 913.5, 分子式: C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>13</sub>)。

#### 2D-LC原理与流路示意图

**原理:** 一维液相使用原始液相色谱流动相 (如非挥发性流动相) 及方法对母药和杂质进行分离。当目标杂质组分出峰时, 通过阀切换将目标杂质准确切割并捕获后, 第二维液相将捕获的组分洗脱进行质谱检测。

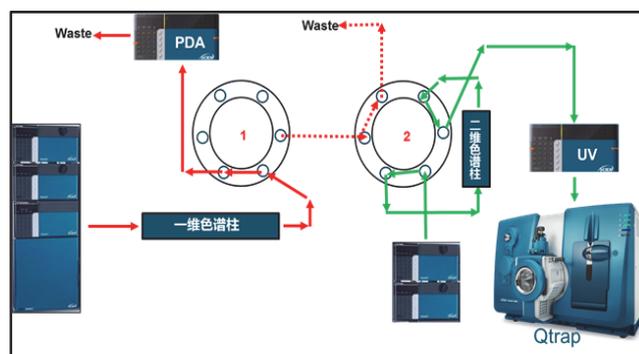


图2. Step1: 一维液相在分离分析; 二维液相在平衡色谱柱。

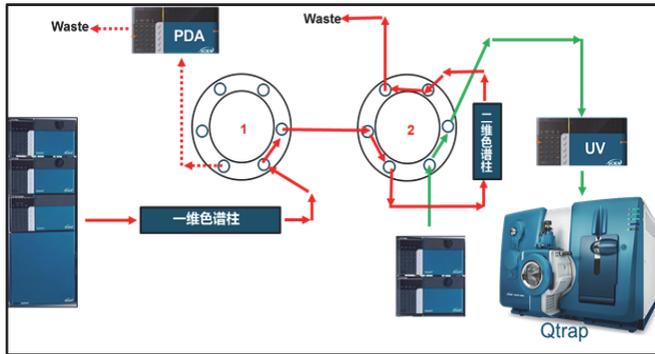


图3. Step2: 将一维中目标组分切入进二维色谱柱上。

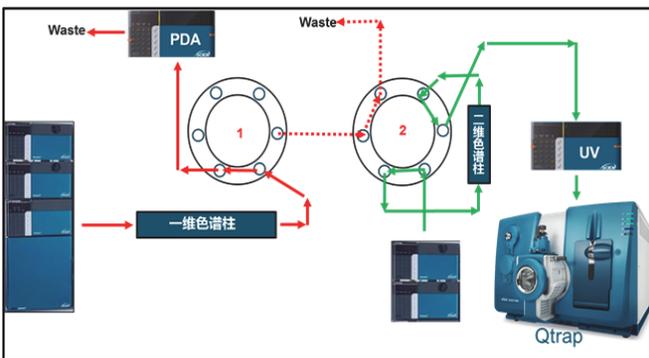


图4. Step3: 将捕获的目标组分在二维色谱柱上进行分离。

注: 红色代表一维液体流向, 绿色代表二维液体流向, 虚线代表有流路连接但无液体。

## 实验思路

SCIEX QTRAP®四极杆-线性离子阱复合质谱系统具有特有的信息相关采集模式 (IDA) 和智能化的DBS功能触发EPI 图谱采集的方式, 确保能够获得高质量的二级图谱, 从而帮助实现杂质分析。在杂质分析过程中, 根据一维色谱采集到的紫外信号对想要分析的目标杂质进行定位, 结合2D-LC的阀切换技术将目标杂质切到二维色谱柱上进行质谱分析, 得到目标杂质母离子的m/z和相应的二级质谱图, 与母药的二级碎裂方式进行比较从而实现结构解析。

## 实验条件

### 液相方法

一维液相色谱条件:

流动相: A: 水 (含2 mM磷酸二氢钠)

B: 甲醇:乙腈=70:15

等度洗脱: A:B=20:80

流速: 1 mL/min

柱温: 40°C

色谱柱: Eclipse XDB-C18, 150 × 4.6 mm, 5 μm;

二维液相色谱条件:

流动相: A: 水; B: 甲醇

流速: 0.6 mL/min

柱温: 40°C

色谱柱: Venusil MP C18, 100 × 2.1 mm, 5 μm;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	60	40
5.00	60	40
7.00	5	95
14.00	5	95
14.10	60	40
18.00	60	40

### 质谱方法

离子源: ESI源, 负离子模式; Q3-IDA-EPI采集模式

离子源参数:

IS电压: -4500V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 60 psi

碰撞气 CAD: 8

源温度 TEM: 350°C

辅助加热气 GS2: 60psi

## 实验结果

### 1. 一维液相分析结果

一维液相的分析的主要目的是确定目标杂质的保留时间（其中RT为4.63 min和8.80 min为目标杂质），以便将其准确切入到第二维色谱柱上进行分析，结果见图5。

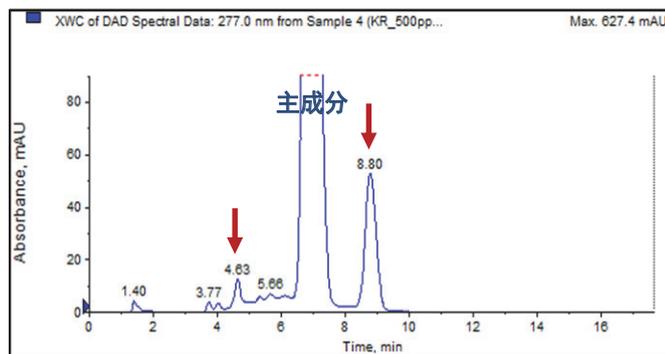


图5. 一维液相DAD图。

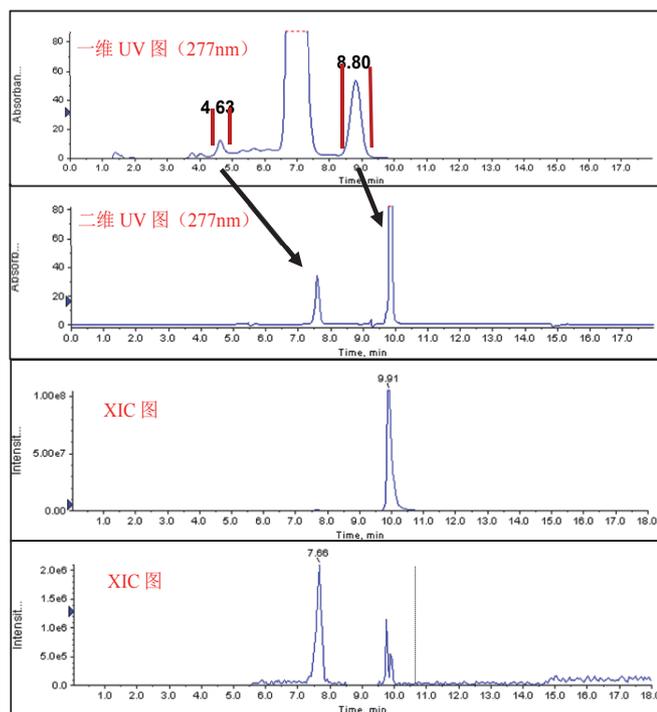


图6. 从上到下依次为一维紫外图（277 nm）；目标杂质切入到二维后的紫外色谱图；RT为4.63 min杂质切入二维后的XIC图；RT为8.80 min杂质切入二维后的XIC图。

### 2. 二维液相分析结果

根据一维液相的UV色谱结果，确定了目标杂质的保留时间，通过在液相方法中设置阀的切换时间，将RT为4.63 min和8.80 min的两个杂质依次切入到第二维色谱柱中，二维液相中的挥发性流动相依次将目标杂质冲入质谱中进行分析，目标杂质在进行质谱分析前，先经过第二维液相中的紫外检测器进行定位分析，从而确保杂质定性的准确性，结果见图6。QTRAP®质谱采用Q3-IDA-EPI的采集方式同时得到目标化合物的一级和二级质谱图，结合母药的二级碎裂方式（图7），从而实现目标杂质

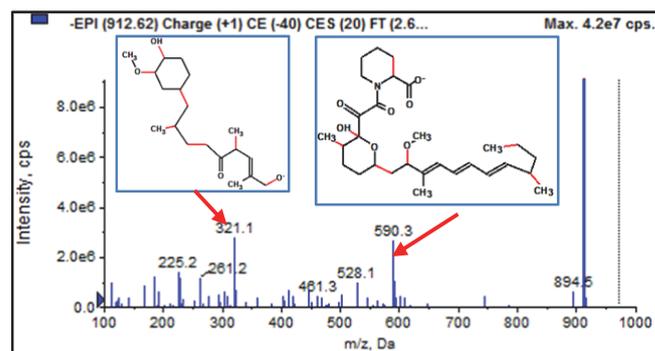


图7. 西罗莫司的二级谱图。

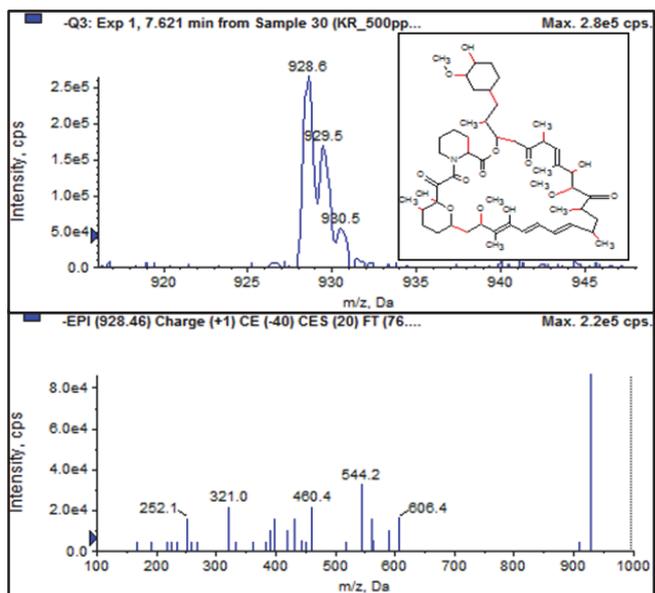


图8. RT为4.63 min杂质的一级和二级质谱图及可能结构。

的结构解析，确定其可能的结构；从MS质谱图中看出RT为4.63 min和RT为8.80 min的杂质的m/z分别为928.5和912.5，结合相应的二级谱图，推测杂质分别为西罗莫司的氧化结构（分子式： $C_{51}H_{80}NO_{14}$ ）和西罗莫司的异构体（分子式： $C_{51}H_{79}NO_{13}$ ），结果见图8和图9。

## 总结

本文建立的基于阀切换的2D-LC技术与QTRAP<sup>®</sup>质谱技术的联用方法，可有效解决前端液相色谱分离必须使用非挥发盐流动相系统与后端采用质谱检测器的兼容性问题，节省了工作人员在杂质检测和分析中重新方法开发液相方法的时间，同时QTRAP<sup>®</sup>四极杆-线性离子阱复合质谱系统具有特有的信息相关采集模式（IDA）和智能化的DBS功能触发EPI 图谱采集的方式，实现了一次进样分析，同时获得杂质的一级质谱和高质量的二级质谱信息，避免了二次采集，减少了分析时间，使得药物杂质鉴定变的简单、方便、准确。

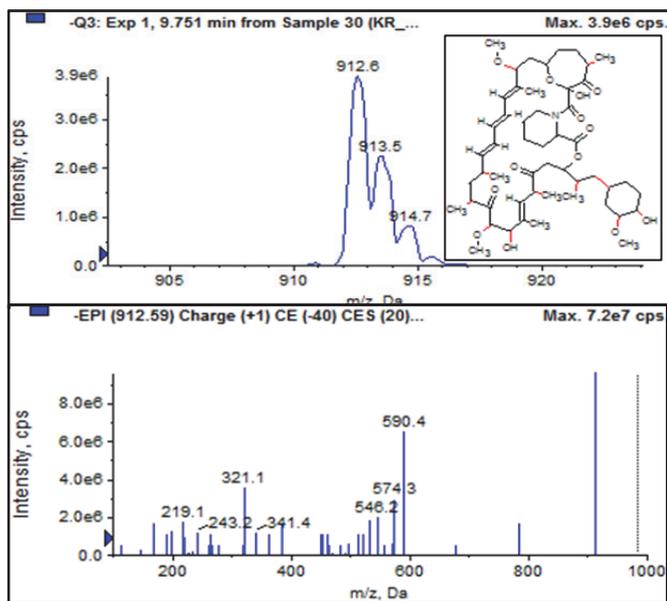


图9. RT为8.80 min杂质的一级和二级质谱图及可能结构。

# SCIEX 2D-LC-X500R高分辨质谱系统用于西罗莫司中的杂质分析

## The Application of 2D-LC-X500R in the Analysis of Drug Impurities in Sirolimus

冷向阳 (Leng Xiangyang), 龙志敏 (Long Zhimin), 郭立海 (Guo Lihai)

SCIEX, 亚太应用支持中心, 中国

SCIEX, APAC Support Center, China

**Key words:** 2D-LC-X500R, LC-MS/MS, IDA, TOF MS, TOF MS/MS, Drug Impurities, Sirolimus, SCIEX OS Software

**关键词:** 2D-LC-X500R, 药物杂质, 西罗莫司

### 前言

药物在合成、配置或者储存过程中可能会形成某些中间体、反应产物或降解物, 这些有关物质可能会对我们的用药安全产生极大影响, 因此对这些有关杂质的检测和鉴定是药品质量控制中的重要内容。

目前在各国的药典中, 很多药物的有关物质分析采用的是 LC-UV 的方法, 为了杂质具有更好的色谱峰形和分离度, 在流动相中往往会使用磷酸盐缓冲试剂、离子对试剂等非挥发性缓冲盐。

随着质谱技术 (MS) 的普及, LC-MS 的方法越来越多的用于药物的杂质分析, 然而流动相中的非挥发性盐类会大大降低质谱的灵敏度并对质谱仪造成污染, 这给方法转移带来了很大的困难。使用质谱对杂质进行定性分析时, 通常需要将非挥发性缓冲盐体系置换成挥发性的添加剂, 有时将原有方法中质谱不兼容的添加剂替换, 可能造成杂质的保留时间变化, 从而无法对杂质进行定位。

针对这个问题, 本文建立了 2D-LC-X500R 联用的方法, 采用二维液相色谱 2D-LC, 实现非挥发性缓冲盐体系与质谱兼容的流动相体系在线自动替换, 大大节省了工作人员重新进行方法开发的时间, 同时本实验中使用 SCIEX X500R QTOF 高分辨质谱仪进行数据采集, 利用其强大的信息依赖 (IDA) 采集和动态背景扣除 (DBS) 功能,

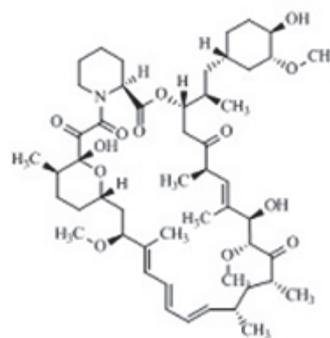


图1. 西罗莫司的结构 (NW: 913.5, 分子式:  $C_{51}H_{79}NO_{13}$ )。

一针进样, 同时获得高分辨的 TOF MS 和 TOF MS/MS 的数据, 更好的帮助实现杂质分析。本文采用基于阀切换的 2D-LC 技术与 X500R 质谱技术的联用方法, 实现一针进样同时对西罗莫司 (Sirolimus, RAPA) 的几个主要杂质进行鉴定。

### 2D-LC原理与流路示意图

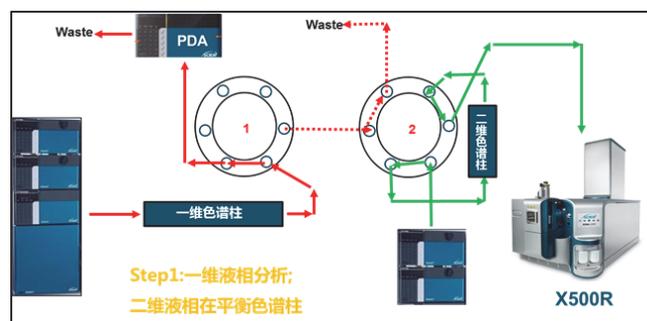


图2. Step1: 一维液相在分离分析; 二维液相在平衡色谱柱。

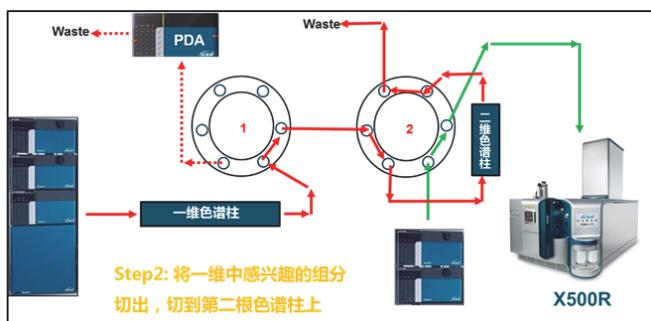


图3. Step2: 将一维中目标组分切入进二维色谱柱上。

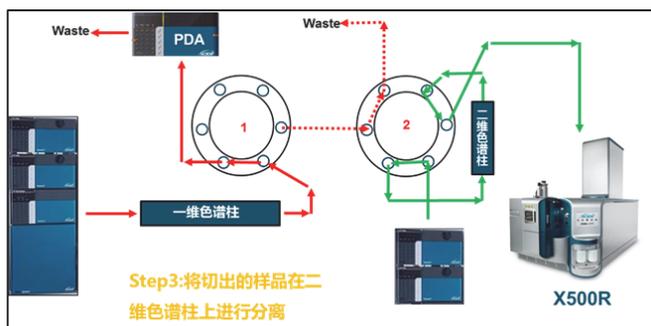


图4. Step3: 将捕获的目标组分在二维色谱柱上进行分离。

原理：一维液相使用原始液相色谱流动相（如非挥发性流动相）及方法对母药和杂质进行分离。当目标杂质组分出峰时，通过阀切换将目标杂质准确切割并捕获后，第二维液相将捕获的组分洗脱进行质谱检测。

注: 红色代表一维液体流向, 绿色代表二维液体流向, 虚线代表有流路连接但无液体。

## 实验思路

采用 SCIEX X500R QTOF 高分辨质谱仪进行数据采集, 利用其强大的信息依赖 (IDA) 采集和动态背景扣除 (DBS) 功能, 一针进样, 同时获得高质量的高分辨 TOF MS 和 TOF MS/MS 的数据。在杂质分析过程中, 根据一维色谱采集到的紫外信号对想要分析的目标杂质进行定位, 结合 2D-LC 的阀切换技术将目标杂质切到第二维色谱柱上进行质谱分析, 得到目标杂质母离子的  $m/z$  和相应的二级质谱图, 结合专业的 SCIEX OS 软件, 快速的完成杂质鉴定工作。

## 杂质鉴定及结构解析：

1. 根据一级质谱准分子离子峰精确质量数及同位素丰度推测元素组成
2. 结合二级质谱精确质量数及元素组成进一步确认母离子元素组成
3. 自动关联到 ChemSpider 数据库寻找该元素组成对应的结构
4. Fragment pane 可根据结构(数据库搜索到的)推断可能的碎裂, 结合 MS/MS, 进行相互验证

## 实验条件

### 液相方法

#### 一维液相色谱条件：

流动相：A：水（含 2 mM 磷酸二氢钠）

B：甲醇：乙腈 = 70:15

等度洗脱：A:B=20:80

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

色谱柱：Eclipse XDB-C18, 150 × 4.6 mm, 5 μm；

#### 二维液相色谱条件：

流动相：A：水；B：甲醇

流速：0.6 mL/min

柱温：40 °C

色谱柱：Venusil MP C18, 100 × 2.1 mm, 5 μm；

流动相梯度：

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	60	40
5.00	60	40
7.00	5	95
14.00	5	95
14.10	60	40
18.00	60	40

## 质谱方法

离子源：ESI 源，负离子模式；

TOF MS-IDA-MS/MS 采集模式

离子源参数：

IS 电压：-4500 V                      气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 60 psi                    碰撞气 CAD: 8

源温度 TEM: 550°C                    辅助加热气 GS2: 60psi

## 实验结果

### 1. 一维液相分析结果

一维液相的分析的主要目的是确定目标杂质的保留时间（其中 RT 为 4.633 min 和 8.804 min 为目标杂质），以便将其准确切入到第二维色谱柱上进行分析，结果见图 5

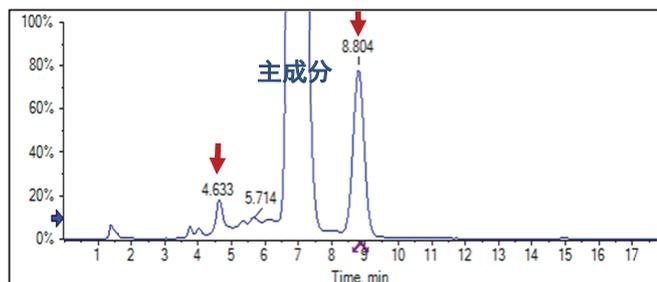


图5. 一维液相DAD图。

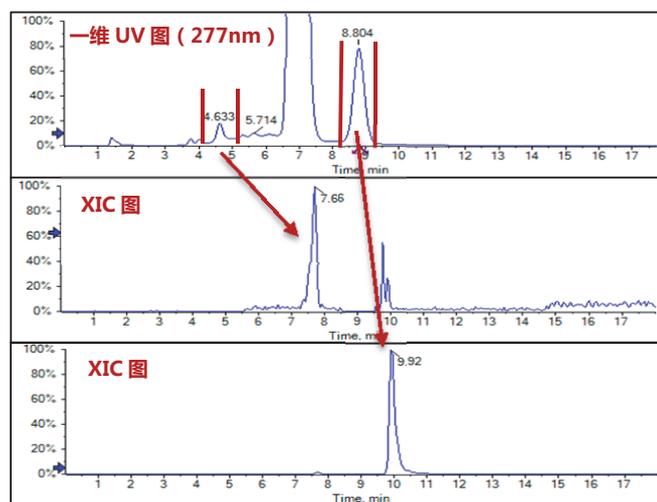


图6. 从上到下依次为一维紫外图（277 nm）；RT为4.634 min杂质切入二维后的XIC图；RT为8.8049 min杂质切入二维后的XIC图。

### 2. 二维液相分析结果

根据一维液相的 UV 色谱结果，确定了目标杂质的保留时间，通过在液相方法中设置阀的切换时间，将 RT 为 4.634 min 和 8.799min 的两个杂质依次切入到第二维色谱柱中，二维液相中的挥发性流动相依次将目标杂质冲入质谱中进行分析，结果见图 6。从 XIC 质谱图，找到一系列一级离子，排除空白溶剂中的干扰离子，对可能的杂质离子进行进一步分析鉴定。如在 RT 为 9.96 min 处发现 m/z 为 912.5489 的化合物，根据精确分子量和同位素丰度比，通过 OS 软件里面的 Formula Finder，自动计算分子式，列出可能的分子式（图 7），同时可以结合二级质谱精确质量数及元素组成进一步确认母离子元素组成（图 8），推测可能的分子式为 C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>13</sub>，同时软件中可自动关联到 ChemSpider 数据库寻找该元素组成对应的结构（图 9），针对可能的结构，可以通过 Fragmentation pane 结合相应的二级谱图进行结构确认（图

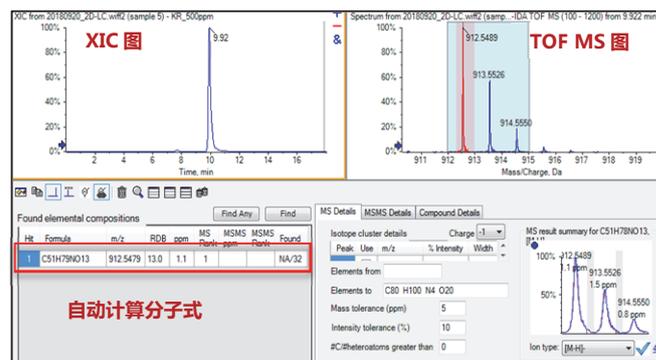


图7. 使用Formula Finder自动计算分子式。

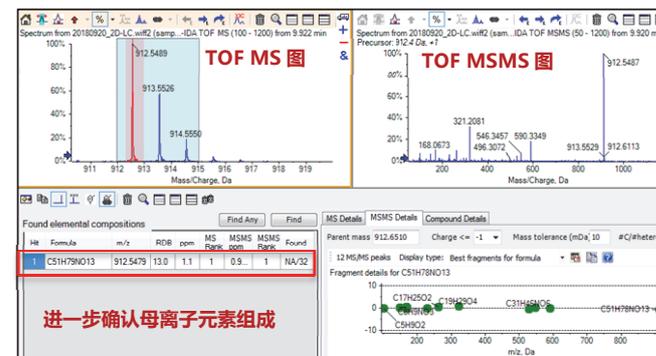


图8. 结合二级进一步确认母离子分子式。

10)，同时也可以结合母药的二级碎裂方式，辅助结构解析，确定其可能的结构；利用 OS 软件结合相应的二级谱图，推测 RT 为 4.634 min 和 8.804 min 杂质分别为西罗莫司的氧化杂质（分子式： $C_{51}H_{79}NO_{14}$ ）和西罗莫司的异构体杂质（分子式： $C_{51}H_{79}NO_{13}$ ），结果见图 11 和图 10。

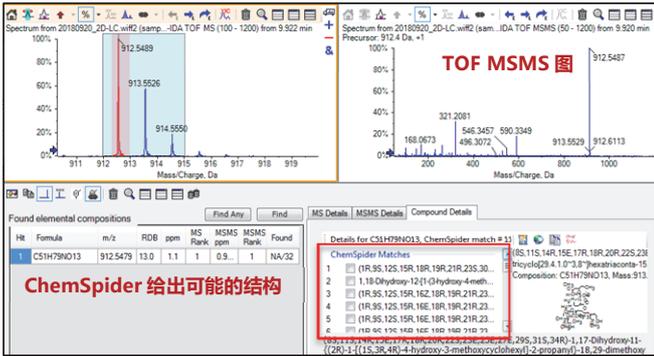


图9. 自动搜索ChemSpider寻找该元素组成对应的结构。

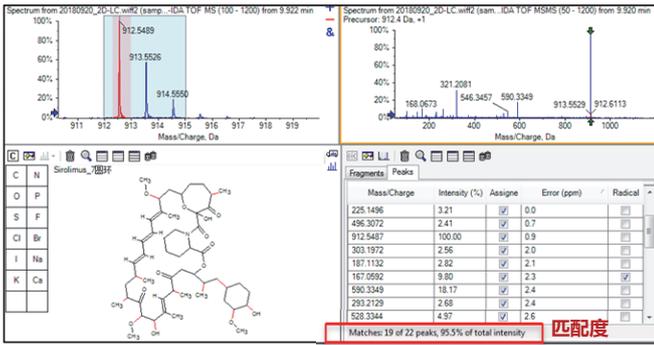


图10. 使用Fragmentation pane结合相应二级谱图进行结构确证。

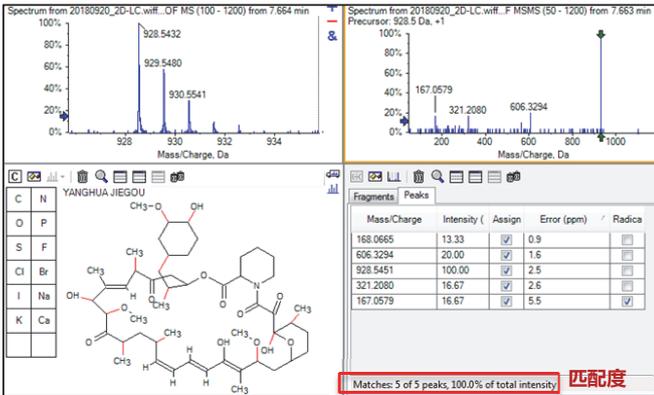


图11. 西罗莫司氧化杂质。

### 3. 杂质谱库的建立

SCIEX OS 软件的简便性可以很快速的帮助我们完成对已鉴定杂质化合物的谱库建立，方便我们在下次进行此类化合物鉴定时，可以简单、快速、准确的完成鉴定工作。

通过使用 SCIEX OS 软件里面的 Analytical 功能，导入已经鉴定到杂质的分子式和保留时间，OS 软件会快速的完成峰提取，获得相应的一级和二级谱图（图 12），对于获得二级谱图，可以右键直接添加到谱库中完成谱库的建立（图 13）。

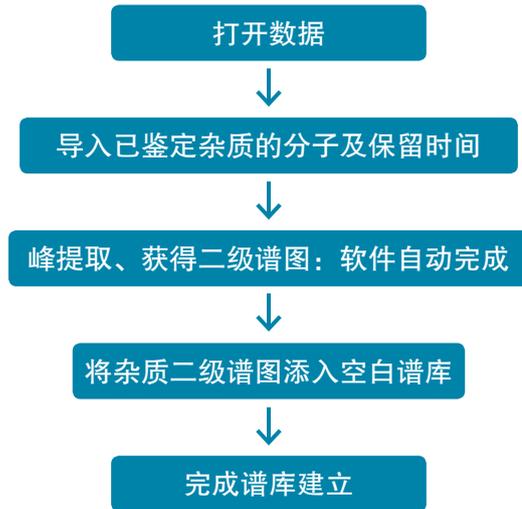


图12. 谱库建立的流程。

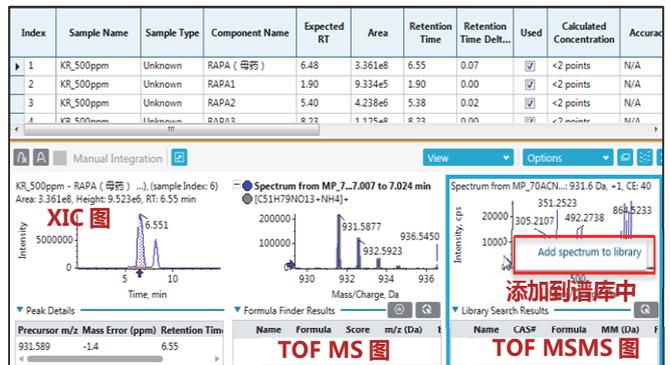


图13. 已鉴定杂质的谱库建立。

谱库建立后，软件可以快速靶向性的进行杂质分析工作，在 SCIEX OS 软件中导入鉴定列表，软件会根据一级质量准确度、同位素峰匹配以及 MS/MS 信息对目标化合物进行鉴定筛查，进行谱库检索，并且以绿、黄、红三种颜色表示，绿色结果最可信。如图 14 所示，根据筛查的结果，RAPA 甲基化的杂质在谱库中的 MS/MS 匹配结果良好。

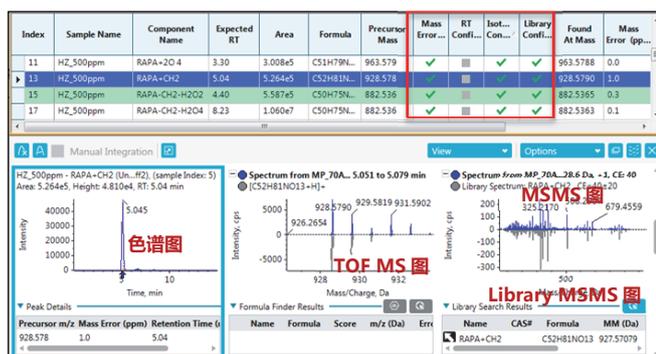


图14. 靶向性分析结果。

## 总结

本文建立的基于阀切换的 2D-LC 技术与 SCIEX X500R 台式高分辨质谱联用的方法，可有效解决前端液相色谱分离必须使用非挥发盐流动相系统与后端采用质谱检测器的兼容性问题，节省了工作人员在杂质检测和分析中重新方法开发液相方法的时间，同时 X500R QTOF 台式高分辨质谱具有特有的信息依赖采集模式 (IDA) 和智能化的动态背景扣除 DBS 采集方式，实现了一次进样分析，同时获得杂质的一级质谱和高质量的二级质谱信息，减少了数据采集和分析时间，结合专业的 SCIEX OS 软件使得药物杂质鉴定变的简单、方便、准确，同时 OS 软件的简便的建立谱库流程，简化了后续相关杂质鉴定流程，大大提高工作效率。

## 满足法规依从性的药物杂质分析质谱平台



**数据追踪 Audit Trail**

Project: API Instrument

Audit Map

- Default Audit Map
- Full Audit Map
- No Audit Map
- Quant Only Audit Map
- Silent Audit Map

Roles:

- Administrator
- Analyst
- Operator
- End User
- QA Reviewer
- Supervisor

Audit Map: Full Audit Map

Event	Audited	Reason Prompt
<b>INSTRUMENT EVENTS</b>		
Mass Calibration Table(s) replaced	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Mass Calibration Table added	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Resolution Table(s) replaced	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Resolution Table added	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Hardware Profile has been activated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hardware Profile has been deactivated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
An Instrument Maintenance Log has been entered	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Batch File submitted	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sample submitted for acquisition	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sample moved from position x to position y of Batch File	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Move batch	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Reacquiring sample(s)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Access to Analyst:

- Acquisition Method
  - Create/save acquisition methods
  - Open acquisition methods as read-only
  - Overwrite acquisition methods
- Analyst Application
- Audit Trail Manager
  - View Audit Trail Data
  - Change Audit Trail Settings
  - Maintenance log
  - Create or Modify Audit Maps
- Batch
- Compound Database
- Explore
- ExpressView
- Hardware Configuration

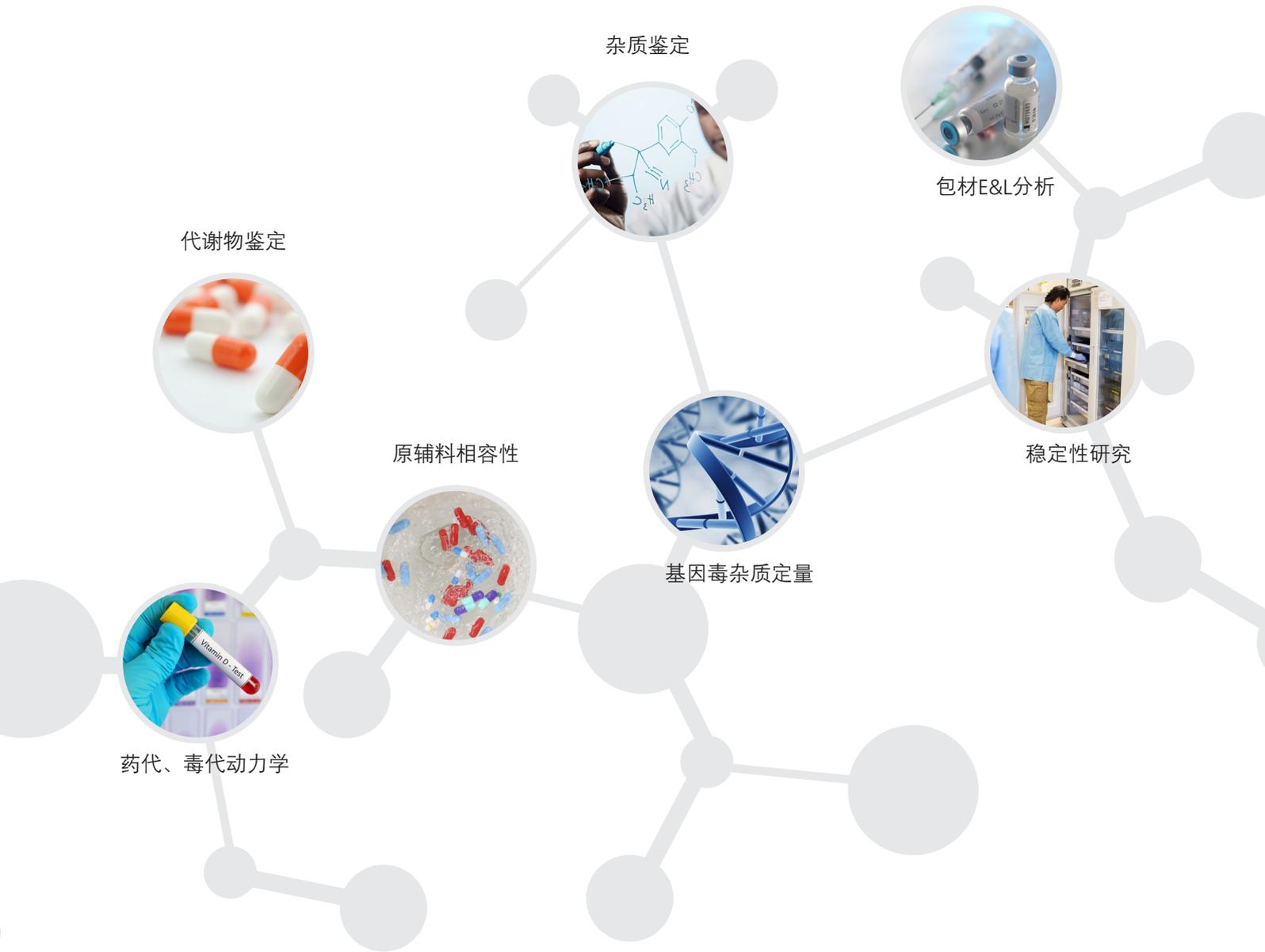


SCIEX提供高性能液相色谱质谱联用仪，结合仪器硬件和软件的合规性，帮助您准确、快速获得完全符合法规要求的数据结果

- 高灵敏度：SCIEX三重四极杆和QTRAP®质谱系列质谱仪实现对复杂基质中低浓度药物的定量分析。
- 高耐用性：确保复杂基质中低浓度分析物的优异重现性，以及提供分析通量。
- 高稳定性：确保批量样品结果的准确性。
- 软件的合规性：Analyst®可设置不同的账户，设定不同的权限，便于数据管理。

Analyst® & MultiQuant™软件中的数据追踪 ( Audit trail ) 界面友好，可简单直观的浏览，满足21 CFR Part 11 要求。

# 满足药物研发R&D到QA/QC质控的质谱检测需求



SCIEX  
官方微信



SCIEX  
客户服务



SCIEX  
毛细管电泳

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8766-ZH-A



## SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-24197200  
传真：021-24197333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-85100200  
传真：020-38760835

微博：@SCIEX