

## 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 API™ 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 + API™ 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

雾化气 GS1: 65 psi

源温度 TEM: 600°C

气帘气 CUR: 35 psi

辅助气 GS2: 65 psi

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 5 μl 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。

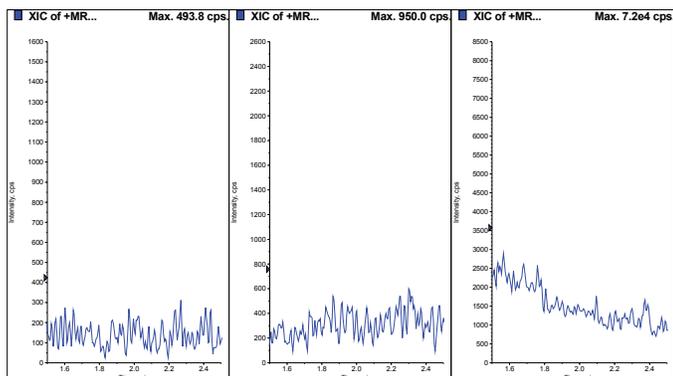


图1. 样品空白溶液中的提取离子流图，分别为樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯。

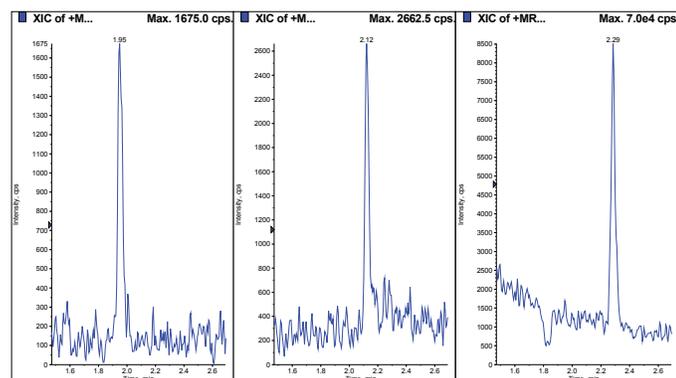


图2. 样品加标溶液中各物质的提取离子流图（20 pg/ml），分别为樟脑磺酸甲酯、樟脑磺酸乙酯和樟脑磺酸异丙酯。

### 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。

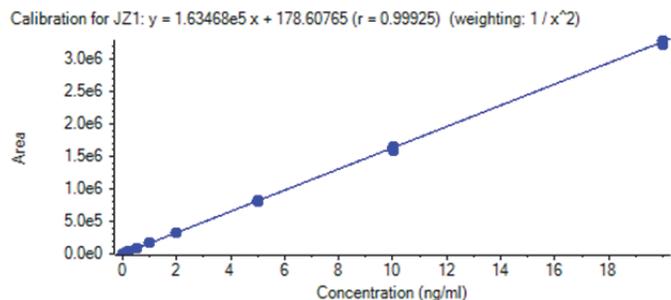


图3. 樟脑磺酸甲酯标准曲线，线性回归系数 $r=0.99925$ 。

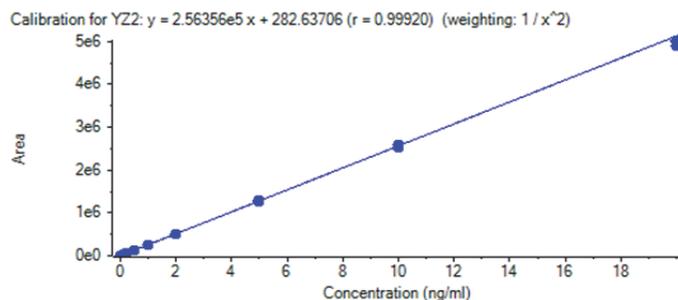


图4. 樟脑磺酸乙酯标准曲线，线性回归系数 $r=0.99986$ 。

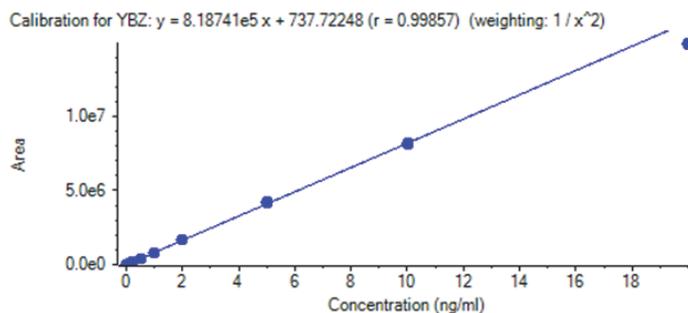


图5. 樟脑磺酸异丙酯标准曲线，线性回归系数 $r=0.99857$ 。

### 3. 加标回收率和重现性：

取 20 µg/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 pg/mL 加标溶液平行制备六份，500 pg/mL 和 10 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 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 pg/mL (n=6)		500 pg/mL (n=3)		10 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 API4500 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 pg/ml-50 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 µg/ml）的含量为 1 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.

Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2017 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-7835-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：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-85100200  
传真：020-38760835

微博：@SCIEX