

应用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统检测基因毒性杂质甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯

Determination of Genotoxic Impurities Methyl Methanesulfonate and Ethyl Methanesulfonate on SCIEX Triple Quad™ 4500 system

陈金梅, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海
Chen Jinmei, Si Dandan, Long Zhimi, Guo Lihai
SCIEX China

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 4500, Genotoxic Impurities, Methyl Methanesulfonate, Ethyl Methanesulfonate, MMS, EMS

前言

基因毒性杂质 (GTIs, Genotoxic Impurities) 是指化合物本身直接或间接损伤细胞DNA, 产生基因突变或体内诱变, 具有致癌可能或者倾向。甲磺酸烷基酯做为常见的基因毒性杂质之一, 临床研究发现甲磺酸酯的DNA烷基化作用会导致诱变效应, 其中甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯已有这方面报道, 甲磺酸甲酯 (MMS) 和甲磺酸乙酯 (EMS), 是甲磺酸与甲醇, 乙醇, 或其它低级醇形成的酯。特别是在以甲磺酸盐或甲磺酸酯形式存在的药物活性成分中, 或者其合成过程中甲磺酸的药物活性成分中, 甲磺酸烷基酯会被视为潜在杂质。EMA (欧洲药物评审组织) 推出《遗传毒性杂质限度指导原则》, 引入了可接受风险的摄入量, 即毒性物质限量, 限度值 TTC (1.5 µg/day), 即相当于每天摄入1.5 µg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, 某品牌药物每日最大剂量为100 mg, TTC水平为1.5 µg/day/100 mg=15 µg/g。想要从活性药物成分中完全的除去基因毒性杂质经常是很难做到, 这就要求我们建立一个高灵敏度的LC-MS/MS方法评估这些产品是否存在甲磺酸甲酯 (MMS) 和甲磺酸乙酯 (EMS)。

仪器设备

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

液相方法

色谱柱: HSS T3 (150 × 2.1 mm, 2.5 µm)



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

流动相: A相: 水 (0.2%甲酸)
B相: 甲醇 (0.2%甲酸)
流速: 0.4 mL/min
柱温: 40 °C
进样量: 50 µL

表1. 液相梯度

| Time(min) | A (%) | B (%) |
|-----------|-------|-------|
| 0.0 | 95 | 5 |
| 1.5 | 95 | 5 |
| 2.0 | 60 | 40 |
| 5.0 | 5 | 95 |
| 6.0 | 5 | 95 |
| 6.1 | 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: 15 psi

雾化气 GS1: 55 psi

辅助气 GS2: 55 psi

碰撞气 CAD: Medium

源温度 TEM: 200 °C

表2. N-亚硝基-N-甲基-4-氨基丁酸的质谱参数。

| Compound | Q1 | Q3 | DP | CE | CXP |
|----------|-------|------|----|----|-----|
| MMS | 111.1 | 79.2 | 35 | 14 | 9 |
| EMS | 125.1 | 97.0 | 35 | 10 | 9 |

实验结果

1. 特异性:

配置水溶液, 作为溶剂空白; 称取一定量的某品牌药品, 溶解并稀释至4.0 mg/mL浓度, 作为基质空白溶液; 取甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯标准品, 加入一定量空白基质溶液溶解, 并稀释至浓度为20 ng/mL的溶液。分别取50 μ L进样, 提取离子流图如下, 在待测物保留时间处无干扰, 见图1。

2. 线性范围:

用水逐级稀释甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯标准工作溶液分别至10-1000 ng/mL, 2-1000 ng/mL, 以峰面积对浓度做标准曲线。图2为甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯线性范围、线性方程和相关系数。

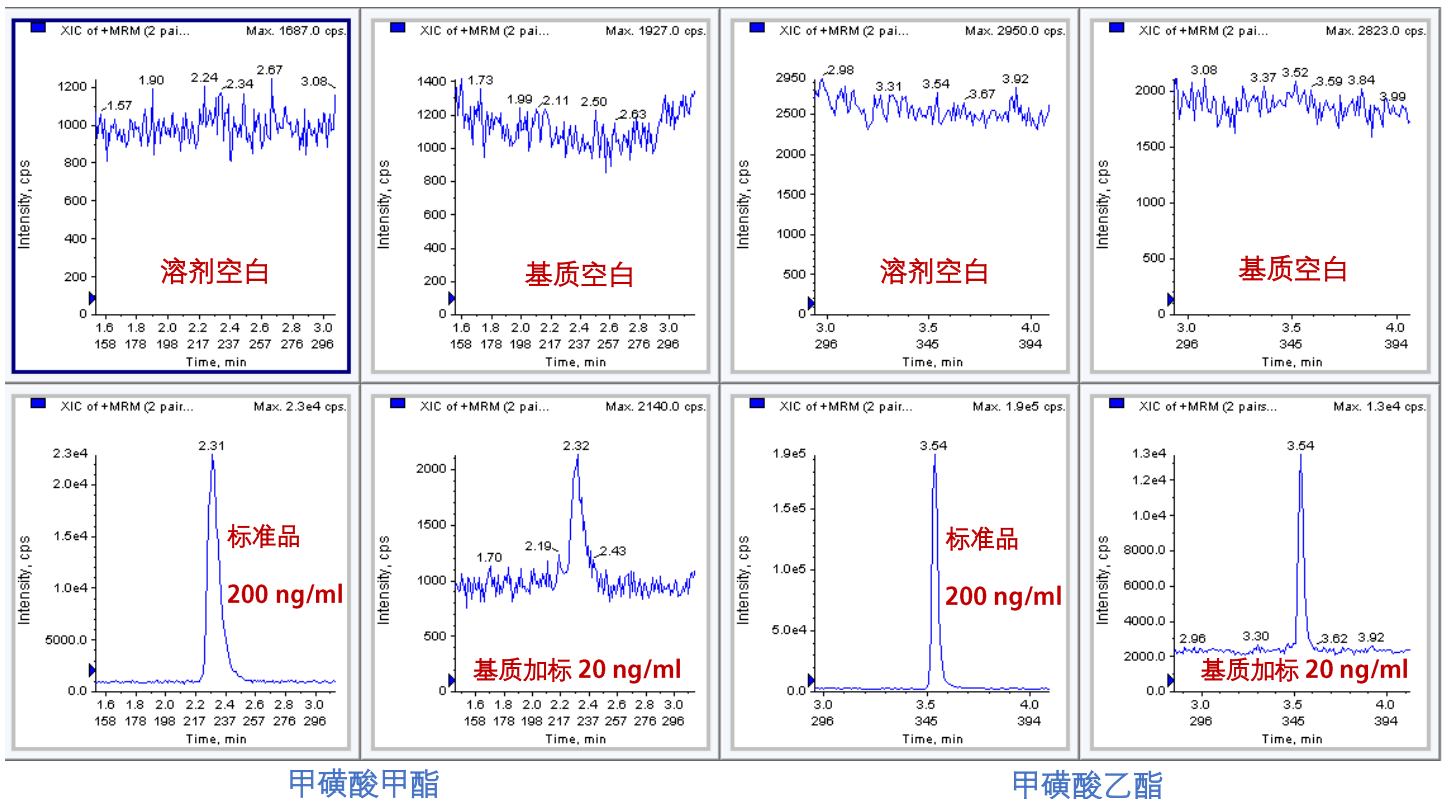


图1. 空白溶剂, 空白基质和浓度为200 ng/mL标准品溶液和基质加标20 ng/mL的提取离子流图。

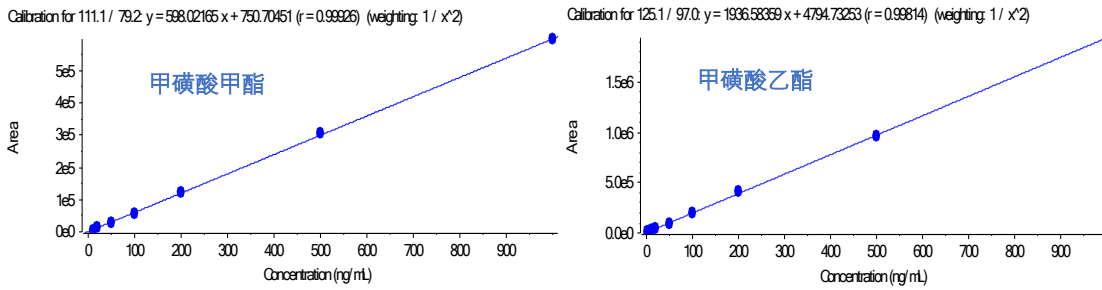


图2. 甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯标准曲线。

3. 加标回收率, 重现性和LLOQ重现性:

取某品牌药品溶液, 配置成浓度为5 µg/g的甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯做为加标样品, 平行制备六份, 进样分析, 测试结果如下表格, 不同浓度的回收率在98.68-113.96%, 平行样品的RSD%均<10%, 平行制备六份LLOQ溶液, 进样分析, 平行样品的RSD%均<10%, 均满足要求。

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500系统建立了LC-MS/MS方法测定基因毒性杂质甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯的含量。方法的特异性好, 无干扰; 线性范围分别为10-1000 ng/mL, 2-1000 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分别为10 ng/ml和2 ng/ml, 相当于原料药中的含量为2.5 µg/g和0.5 µg/g, 低于TTC水平, 灵敏度高。该方法为检测该类基因毒性杂质提供了参考。

表3. 甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯的加标回收率。

| Component Name | IS Name | Outlier Reasons | Actual Concentration | Area | IS Area | Area Ratio | Retention Time | Signal / Noise | Used | Calculated Concentration | Accuracy |
|----------------|---------|-----------------|----------------------|---------|---------|------------|----------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------|----------|
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 6.526e3 | N/A | N/A | 2.31 | 40.6 | <input checked="" type="checkbox"/> | 22.7686 | 113.84 |
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 6.502e3 | N/A | N/A | 2.31 | 44.1 | <input checked="" type="checkbox"/> | 22.6796 | 113.40 |
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 6.184e3 | N/A | N/A | 2.32 | 39.5 | <input checked="" type="checkbox"/> | 21.5149 | 107.57 |
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 5.927e3 | N/A | N/A | 2.31 | 40.8 | <input checked="" type="checkbox"/> | 20.5736 | 102.67 |
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 6.291e3 | N/A | N/A | 2.31 | 40.0 | <input checked="" type="checkbox"/> | 21.9060 | 109.53 |
| 111.1 / 79.2 | (No IS) | | 20.0000 | 5.695e3 | N/A | N/A | 2.32 | 33.3 | <input checked="" type="checkbox"/> | 19.7369 | 98.68 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.205e4 | N/A | N/A | 3.54 | 89.1 | <input checked="" type="checkbox"/> | 20.4041 | 102.02 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.436e4 | N/A | N/A | 3.54 | 106.4 | <input checked="" type="checkbox"/> | 22.6671 | 113.34 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.262e4 | N/A | N/A | 3.54 | 115.7 | <input checked="" type="checkbox"/> | 20.9649 | 104.82 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.451e4 | N/A | N/A | 3.54 | 97.4 | <input checked="" type="checkbox"/> | 22.7915 | 113.86 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.339e4 | N/A | N/A | 3.54 | 94.9 | <input checked="" type="checkbox"/> | 21.7653 | 108.53 |
| 125.1 / 97.0 | (No IS) | | 20.0000 | 2.439e4 | N/A | N/A | 3.54 | 139.1 | <input checked="" type="checkbox"/> | 22.6728 | 113.36 |

表4. 甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯的基质加标和LLOQ重现性。

| Row | Component Name | Sample Name | Num. Values | Mean | Standard Deviation | Percent CV |
|-----|----------------|-------------|-------------|---------|--------------------|------------|
| 1 | 111.1 / 79.2 | iqib_5ug_g | 6 of 6 | 6.265e3 | 3.749e2 | 5.98 |
| 2 | 111.1 / 79.2 | std_1 | 6 of 6 | 2.535e3 | 2.429e2 | 9.58 |
| Row | Component Name | Sample Name | Num. Values | Mean | Standard Deviation | Percent CV |
| 1 | 125.1 / 97.0 | iqib_5ug_g | 6 of 6 | 2.438e4 | 1.133e3 | 4.65 |
| 2 | 125.1 / 97.0 | std | 6 of 6 | 2.420e3 | 1.802e2 | 7.45 |

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

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.
RUO-MKT-02-10216-ZH-A
AB SCIEX™ is being used under license.
© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



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: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333
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: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835
微博: @SCIEX