

LC-MS/MS 法测定甲磺酸伊马替尼中杂质 F 含量

LCMSMS-384

摘要：本文建立了三重四极杆液相色谱质谱联用仪（LCMS-8050）测定甲磺酸伊马替尼中潜在基因毒性杂质 F 的方法。结果表明：杂质 F 标液浓度在 0.1~25 ng/mL 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 均在 0.999 以上。取校准曲线最低浓度点的杂质 F 标准溶液进行重复性实验，计算浓度的相对标准偏差（RSD%）为 5.71 % ($n=6$)，方法最低检出限（LOD）为 0.093 ng/mg，定量限为 0.281 ng/mg。在对应的加标浓度下（加标后杂质 F 理论浓度为 0.5 ng/mL），回收率为 93.5%。本文可对甲磺酸伊马替尼中杂质 F 的准确测定提供帮助。

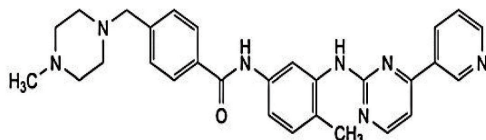
关键词：LC-MS/MS 甲磺酸伊马替尼 杂质 F

药物生产过程中残留或引入的具有人体 DNA 结构直接或间接损伤，进而产生基因突变或体内诱变而具有致癌可能或者倾向的物质称为基因毒性杂质（Genotoxic Impurity, GTI）。因此近年来各国的法规机构如 ICH、FDA、EMA 等都对基因毒性杂质控制建立明确的要求，越来越多的药企在新药开发过程中就着手重点关注基因毒性杂质的检测及控制。

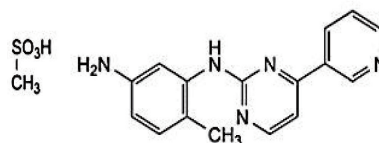
甲磺酸伊马替尼是一种酪氨酸酶受体抑制剂，临床主要用于治疗慢性髓性白血病急变期、加速期或 α -干

扰素治疗失败后的慢性患者和治疗不能切除和发生转移的恶性胃肠道间质肿瘤的成人患者。在该药合成过程中，会产生具潜在基因毒性结构的杂质 F；因此，在此过程中，需要对杂质 F 进行定量监控，从而获得符合质量要求的原料药。

本文基于岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8050，建立了定量测定甲磺酸伊马替尼中杂质 F 的方法。此方法灵敏度高，结果准确，可为甲磺酸伊马替尼质量控制提供参考。



甲磺酸伊马替尼结构式



杂质F结构式

实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A、三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18, 2.1×50 mm,
1.9 μ m

流动相：A 相 -0.2% 甲酸水；

B 相 -0.2% 甲酸乙腈

流速：0.40 mL/min，B 相初始比例为 5%

表1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	Pumps	Pump B Conc.	10
0.60	ColumnOven	CTO.RVR	1
3.50	ColumnOven	CTO.RVR	0
4.50	Pumps	T.Flow	0.4
4.51	Pumps	T.Flow	0.8
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	T.Flow	0.8
7.01	Pumps	Pump B Conc.	10
7.01	Pumps	T.Flow	0.4
8.00	Controller	Stop	

* CTO.RVR为色谱柱后流路切换阀指令，Value值为“0”时流路与废液管相连，Value值为“1”时流路与质谱相连。

质谱条件

离子化模式：ESI(+)

雾化气流量：3.0 L/min

接口电压：4.5 kV

加热气流量：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

加热块温度：400°C

干燥气流量：10.0 L/min

MRM 参数：见表 2

驻留时间：10 ms

表2 MRM参数

ID	化合物名称	CAS号	监测离子对	Q1 pre (V)	CE (V)	Q3Pre (V)
1	甲磺酸伊马替尼	220127-57-1	494.25>394.15*	-11.0	-27.0	-14.0
	Imatinib Mesylate		494.25>217.10	-18.0	-26.0	-15.0
2	杂质F	571186-91-9	278.05>262.05*	-10.0	-34.0	-30.0
	Imatinib (Piperidine)-N-oxide		278.05>106.10	-10.0	-25.0	-20.0

注：带“*”表示定量离子对。

1.3 样品前处理

精密称定甲磺酸伊马替尼对照样品于离心管中，加入 50% 甲醇 - 水溶液，旋涡震荡直至溶解完全后，在 13000 r/min 的转速下离心 5 min，取上清液至 1.5 mL 的样品瓶中，5 μ L 进样分析。

结果与讨论

2.1 结果视图

甲磺酸伊马替尼、杂质 F 标准溶液 MRM 色谱图（如图 1~2 所示）；

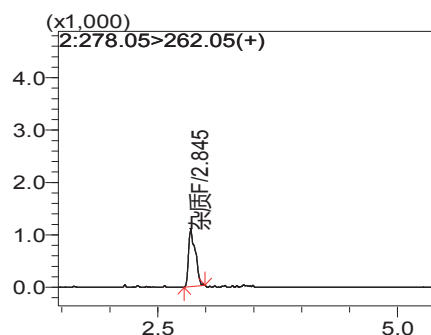
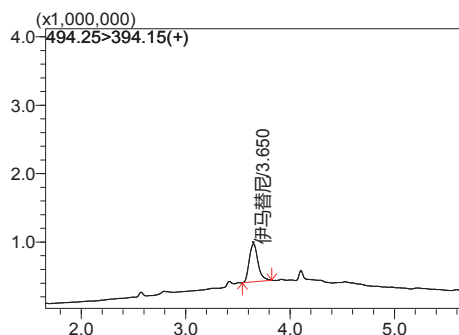


图1 甲磺酸伊马替尼标准溶液MRM图 (100 ng/mL) 图2.杂质F标准溶液MRM图 (STD 1)

2.2 标准曲线和检出限

用 10%DMSO-乙腈溶液溶解杂质 F，以乙腈稀释成浓度为 0.1、0.2、0.5、2、5、10、25 ng/mL，取 5 μ L 进样，以目标组分的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线如图 3 所示；标准曲线方程、线性相关系数、检出限、定量限及重复性见表 3。

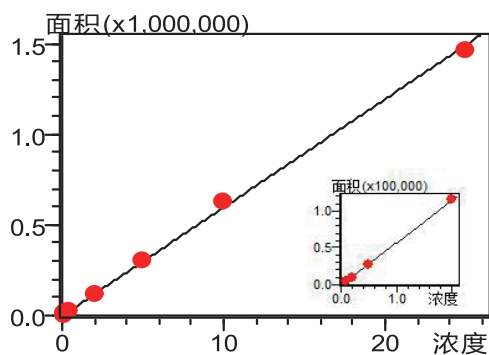


图3 杂质F标准曲线图

表3 标准曲线方程、线性相关系数及重复性

ID	组分名称	标准曲线方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (R)	重复性 (0.1 ng/mL, n=6) RSD%	准确度%
1	杂质F	$Y=59734.9X-1183.42$	0.1~25.0	0.9996	5.71	93.7~109.7

2.3 重复性实验

取杂质 F 浓度为 0.1 ng/mL 的标液连续进样 6 针，考察重复性，结果见表 3 中回算浓度值 RSD% 及准确度。

2.4 加标回收率

在待测样品中杂质 F，加标样品平行处理 3 份；在对应的加标浓度下 (0.5 ng/mg)，加标回收率结果见 4。

表4 回收率结果

ID	化合物名称	加标浓度 (ng/mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	杂质F	0.5	93.5	7.36

2.5 样品分析结果

取甲磺酸伊马替尼样品适量，按 1.2 项下样品前处理方法配制成样品浓度为 500 μ g/mL 溶液，LCMS-8050 测定其中杂质 F，样品定量结果如图 4 和表 5 所示。

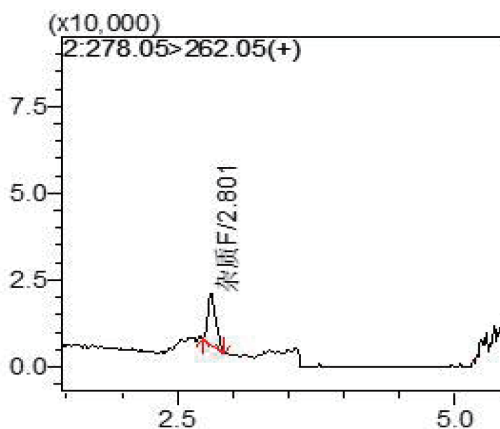


图4 甲磺酸伊马替尼样品MRM图

表5 甲磺酸伊马替尼样品定量结果

化合物名称	测定次数	含量 (ng/mg)	方法检出限 (ng/mg)	方法定量限 (ng/mg)
杂质F	1	1.277	0.093	0.281
	2	1.256		
	3	1.214		
平均值		1.249		

*根据FDA基因毒性杂质限度指导原则，甲磺酸伊马替尼中杂质F含量要求限度低于1.875 ppm。

■ 结论

采用岛津公司三重四极杆液相色谱质谱联用仪 (LCMS-8050) 对甲磺酸伊马替尼中杂质 F 进行测定；结果表明：杂质 F 标液浓度在 0.1~25 ng/mL 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 均在 0.999 以上。取校准曲线最低浓度点的杂质 F 标准溶液进行重复性实验，计算浓度的相对标准偏差 (RSD%) 为 5.71 % (n=6)。在对应的加标浓度下 (加标后杂质 F 理论浓度为 0.5 ng/mL)，回收率为 93.5 %。根据 FDA 颁布的基因毒性杂质限度指导原则，不高于 1.5 µg/Day 的毒性阈值水平的杂质摄入量被认为是可接受的风险。参考甲磺酸伊马替尼每日最高 800 mg 给药剂量，计算出本品中杂质 F 的含量应在 1.875 ng/mg 以下。本方法中杂质 F 的方法检出限为 0.093 ng/mg，定量限为 0.281 ng/mg；因此，可对甲磺酸伊马替尼中杂质 F 的准确测定提供帮助。