

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定药物中对甲苯磺酸甲酯的含量

LCMSMS-545

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相三重四极杆质谱仪联用系统测定药物中基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯含量的方法。此方法在 5 min 内可完成对甲苯磺酸甲酯的分析，校准曲线的相关系数在 0.998 以上，线性范围为 0.2 -200 ng/mL。对 0.2 ng/mL 标准溶液平行测定 6 次，对甲苯磺酸甲酯标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 0.365% 和 4.00%，仪器精密度良好。对于加标浓度为 0.5 ng/mL，50 ng/mL 和 150 ng/mL 的样品，各平行测定 3 次，回收率在 94.8% - 101.75% 之间。该方法可应用于药品中对甲苯磺酸甲酯含量的快速检测。

关键词： 三重四极杆液质谱仪 对甲苯磺酸甲酯 遗传毒性杂质

基因毒性杂质 (genotoxic impurity, GTI) 又称遗传毒性杂质，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，具有致癌可能性。对甲苯磺酸甲酯 (methyl p-toluenesulfonate, MTS) 是一种具有潜在基因毒性的杂质 (图 1)。主要由于在药物的合成中使用的对甲苯磺酰氯或对甲苯磺酸在工艺中未完全除去，导致易与后续合成反应中使用的有机溶剂甲醇反应生成对甲苯磺酸甲酯物质。近几年来各国的法规机构如人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH)、FDA、EMA 等均对基因毒性杂质有了更明确要求，严格控制基因毒性杂质的毒理学关注阈值 (threshold of toxicological concern, TTC) 限度为 1.5

μg/d，因此在药品生产过程中对甲苯磺酸甲酯基因毒性杂质的含量监测具有重要的意义。

液相色谱串联质谱法技术具有灵敏度高、分析速度快、结果准确可靠的优点，可满足痕量毒性杂质的检测要求。本研究使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定卡培他滨样品中基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯的含量。

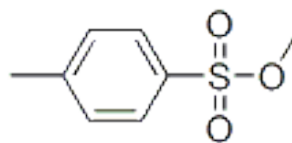


图 1 对甲苯磺酸甲酯 (Methyl p-toluenesulfonate)

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-20ADXR×2

自动进样器：SIL-20ACXR

柱温箱：CTO-20AC

液相检测器：SPD-M20A

色谱工作站：LabSolutions Ver.6.84

质谱仪：LCMS-8050

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH 2.1 mm I.D.× 50 mm L., 1.7 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

洗脱方式：等度洗脱，45% B (v/v)。

质谱条件

离子源: ESI⁺

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10 L/min

接口温度: 200°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10 L/min

喷针位置: +4 mm

驻留时间: 100 ms

MRM 参数: 见表 1

表 1 MRM 优化参数

编号	名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	对甲苯磺酸甲酯	80-48-8	187.00	65.00*	-13.0	-20.0	-15.0
				91.00	-13.0	-39.0	-28.0

注: * 表示定量离子

1.3 标准溶液的配置

称取对甲苯磺酸甲酯标准品适量, 用甲醇溶解、配制成 1.0 mg/mL 的标准储备液, 置于 -18°C 冰箱中保存。取准确体积的标样储备液, 使用初始流动相依次配制成 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL 浓度的标准工作液。

1.4 样品前处理方法

精确称取试样 5.0 g (精确到 0.1 g), 加入 45% 甲醇水溶液 (v/v) 溶解, 后置于 50 mL 容量瓶中定容, 并逐级稀释至浓度为 5 mg/mL 的溶液, 溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后得待测溶液, 然后将待测溶液进液相色谱 - 串联质谱进行测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

对甲苯磺酸甲酯, 按照常规质谱条件, M+H 峰很难出现, 加钠峰很高, 当喷针位置调到 +3 mm 以上时, 以 M+H 峰为主。如下图 2 所示, MS¹ 图和 MS² 的碎片谱图。

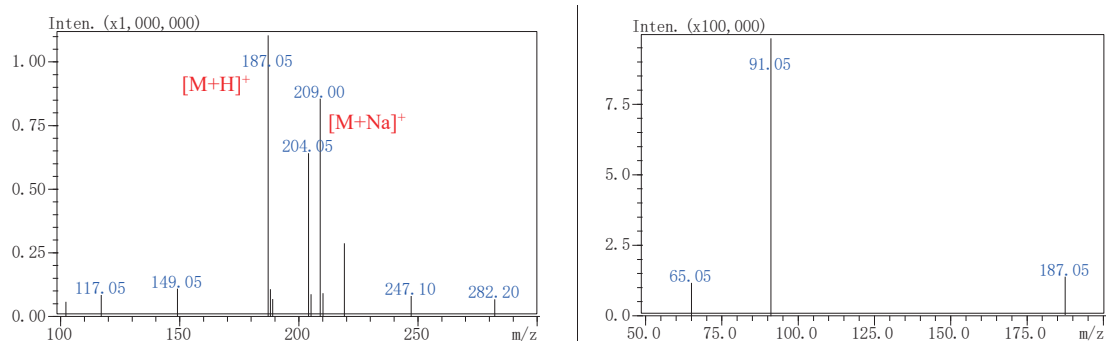


图 2 对甲苯磺酸甲酯 MS¹ 和 MS² 的质谱图

2.2 对甲苯磺酸甲酯标准溶液的 MRM 色谱图

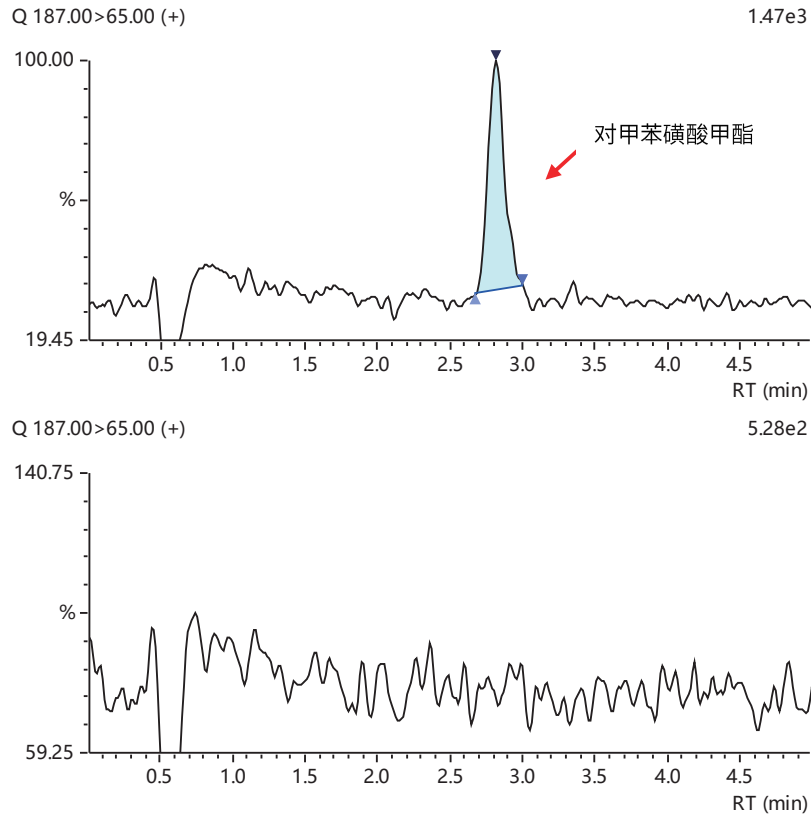


图3 0.2 ng/mL 对甲苯磺酸甲酯及空白溶液的 MRM 色谱图

2.3 线性范围

使用初始流动相依次配制成 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL 浓度的标准工作液。以工作溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线（见下图 5），所得校准曲线线性关系良好，相关系数大于 0.998，且准确度在 92.2%-103.4% 之间（见图 4）。

#	Data Filename	Sample Type	Level	Found RT	Area	Conc. (ng/mL)	S/N	Std. Conc. (ng...	Accuracy(%)
<input checked="" type="checkbox"/>									
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-0.2ng	Standard	1	2.836	3483	0.2068	20.75	0.2000	103.42
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-0.5ng	Standard	2	2.814	7964	0.4761	50.25	0.5000	95.22
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-1ng	Standard	3	2.829	15387	0.9221	62.58	1.0000	92.21
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-10ng	Standard	4	2.833	169487	10.1816	348.16	10.0000	101.82
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-50ng	Standard	5	2.842	837408	50.3151	438.83	50.0000	100.63
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-100ng	Standard	6	2.849	1718428	103.2533	501.04	100.0000	103.25
<input checked="" type="checkbox"/>	20190109-01-STD-200ng	Standard	7	2.833	3443351	206.8992	482.56	200.0000	103.45

图4 对甲苯磺酸甲酯 0.2-200 ng/mL 标曲数据及准确度

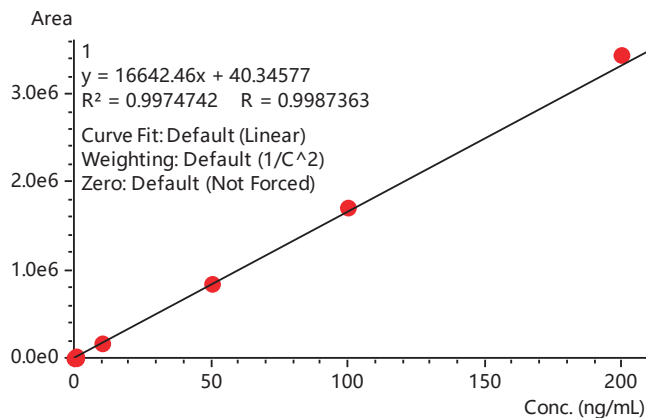


图5 对甲苯磺酸甲酯 0.2-200 ng/mL 线性方程

2.4 重复性考察

按照 1.3 步骤配制 0.2 ng/ml 浓度标准溶液, 连续进样 6 次, 考察保留时间和峰面积的重复性, 结果如下图 6 所示。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 0.365% 和 4.00%, 仪器精密度良好。

#	Data Filename	Sample Type	Level	Found RT	Area	Conc. (ng/mL)	S/N
<input checked="" type="checkbox"/>							
<input checked="" type="checkbox"/> 1	2019010-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.843	3790	0.2253	22.09
<input checked="" type="checkbox"/> 2	20190109-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.848	3579	0.2127	17.55
<input checked="" type="checkbox"/> 3	20190109-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.827	3744	0.2225	15.61
<input checked="" type="checkbox"/> 4	20190109-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.820	3961	0.2356	20.20
<input checked="" type="checkbox"/> 5	20190109-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.835	3817	0.2270	15.08
<input checked="" type="checkbox"/> 6	20190109-LOQ-0.2ng-re...	Control	1	2.829	3540	0.2103	17.98
Average	----	----	----	2.834	3739	0.2222	18.09
%RSD	----	----	----	0.365	4	4.2437	14.84
Maximum	----	----	----	2.848	3961	0.2356	22.09
Minimum	----	----	----	2.820	3540	0.2103	15.08
Std. Dev.	----	----	----	0.010	157	0.0094	2.68

图 6 0.2 ng/mL 重复性测试 (n=6)

2.5 灵敏度实验

配制 0.2 ng/mL 对甲苯磺酸甲酯标准溶液进样, 为考察仪器的灵敏度, 将低浓度标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 6.84 软件计算信噪比 (采用 RMS 计算方式), 检出限和定量限, 化合物的平均信噪比为 18.09, 平均定量限为 0.12 ng/mL, 平均检测限为 0.04 ng/mL。

2.6 回收率实验

按照 1.4 中样品制备方法, 加标浓度为 0.5 ng/mL、50 ng/mL 和 150 ng/mL, 各平行测定 3 次。测试结果显示: 对甲苯磺酸甲酯样品的加标回收率在 94.8% - 101.75% 之间, 结果如表 2。

表 2 回收率实验结果

名称	加标浓度 0.5 ng/mL		加标浓度 50 ng/mL		加标浓度 150 ng/mL	
	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)
Repeat-01	0.479	95.8	50.214	100.43	151.766	101.18
Repeat-02	0.497	99.4	50.865	101.73	152.581	101.72
Repeat-03	0.474	94.8	50.875	101.75	151.317	100.88

2.7 样品检测

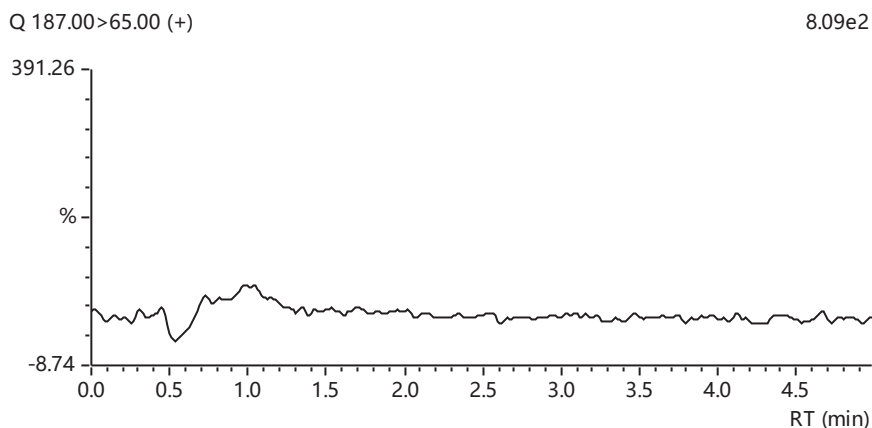


图 7 5 mg/mL 供试样品对甲苯磺酸甲酯含量色谱图 (5 min 后主成分切入废液)

取样品适量，精密称定，加入 45% 甲醇水溶液 (v:v) 溶解并稀释制成浓度约为 5 mg/mL 的溶液，作为待测的供试品溶液，如图 7 所示，样品中未检出对甲苯磺酸甲酯。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20ADXR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定药物中基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯的残留方法。该方法校准曲线的相关系数均在 0.998 以上。0.2 ng/mL 对甲苯磺酸甲酯标准溶液平行测定 6 次，保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.365% 和 4.000%，重现性良好。对于加标浓度为 0.5 ng/mL, 50 ng/mL 和 150 ng/mL 的样品，各平行测定 3 次，加标回收率在 94.8% -101.75% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，可用于药品中基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯的残留检测。

岛津应用云

