

LCMS-8060 液质联用系统测定甲磺酸伊马替尼中芳香胺类遗传毒性杂质含量

LCMSMS-412

摘要：本文建立了岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8060 测定甲磺酸伊马替尼中潜在芳香胺类遗传毒性杂质 2- 甲基 -5- 硝基苯胺含量的方法。2- 甲基 -5- 硝基苯胺在 5~60 ng/mL 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 值在 0.999 以上，且精密度实验结果良好，低中高浓度加标回收率在 94.1%~95.7%。该方法简单、快速、且灵敏度和准确度高，实用性强，可用于甲磺酸伊马替尼中 2- 甲基 -5- 硝基苯胺遗传毒性杂质的检测。

关键词：三重四极杆质谱 甲磺酸伊马替尼 遗传毒性杂质

甲磺酸伊马替尼是瑞士诺华制药公司研发的 Bcr-Ab1 酪氨酸激酶受体抑制剂，属苯胺唑啉类化合物，商品名为格列卫。该药物通过抑制酪氨酸激酶来有效治疗胃肠基质肿瘤和慢性骨髓性白血病，是世界上第一个分子靶向治疗药物。

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurities, GTIs) 是指能引起遗传毒性的杂质，包括致突变性杂质和其它类型的无致突变性杂质，其主要来源于原料药的生产过程，如起始原料、反应物、催化剂、中间体、副产物、降解产物等。欧洲药品管理局 (EMA)，人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 和美国食品与药品

监督管理局 (FDA) 都出台了相应的遗传毒性杂质的指导原则要求。近期，中国国家药典委员会发布了关于《中国药典》2020 年版四部通则增修订内容的公示，其中包括了“遗传毒性杂质控制指导原则审核稿”，遗传毒性杂质的研究变得越来越重要。

本文使用岛津 LCMS-8060 三重四极杆液质联用系统，建立了测定甲磺酸伊马替尼中潜在芳香胺类遗传毒性杂质 2- 甲基 -5- 硝基苯胺含量的方法。此方法灵敏度高，检测时间短，结果准确，可供甲磺酸伊马替尼质量控制参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 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，二极管阵列检测器 (PDA)，CBM-20A 系统控制器，流路切换阀 FCV-20AH₂，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (2.1×100 mm L., 2 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 -0.1% 甲酸甲醇

等度洗脱：A/B = 45/55 (v/v)

流 速：0.30 mL/min

进样体积：10 μL

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：450°C

接口温度：350°C

干燥气：氮气 10 L/min
 加热气：空气 10 L/min
 碰撞气：氩气

扫描模式：多反应监测 (MRM)
 MRM 参数：见表 1
 驻留时间：80 ms

表 1 MRM 参数

化合物名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
2- 甲基 -5- 硝基苯胺	99-55-8	153.0>107.1*	-30	-20	-10
		153.0>89.1	-30	-33	-16
甲磺酸伊马替尼	220127-57-1	494.0>394.1*	-12	-28	-28
		494.0>217.1	-12	-25	-14

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理

对照品溶液：取 2- 甲基 -5- 硝基苯胺对照品适量，精密称定，加入 30% 甲醇水溶液 (v/v) 溶解并稀释成 5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL 不同浓度的对照品溶液。

供试品溶液：取甲磺酸伊马替尼供试品大约 500 mg，精密称定，置于 10 mL 容量瓶中，加入 30% 甲醇水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得供试品溶液。

结果与讨论

2.1 分析流路优化

遗传毒性杂质在主药中含量很低，为了确保遗传毒性杂质具有足够的响应，不宜对主药稀释太多。为避免一次进样中大量的主药对 LC-MS/MS 系统造成污染，可在分析过程中使用流路切换阀 FCV-20AH₂，设置 MS 时间程序切除主药，只需将待测杂质引入质谱进行分析。同时，实现系统自动化分析，确保数据可靠，重复性好。本实验中，LC 系统配置 PDA 检测器，可根据主药的出峰位置（见图 1）确定切阀时间。使用 FCV-20AH₂ 在 3.2 min 后将 LC 洗脱组分切入质谱，进行 LC-MS/MS 分析。



图 1 甲磺酸伊马替尼样品 HPLC 色谱图 (268nm)

2.2 方法专属性实验

在 1.2 分析条件下，对空白溶剂（30% 甲醇水溶液）和 2- 甲基 -5- 硝基苯胺对照品溶液（30 ng/mL）进行检测，考察方法的专属性，色谱图见图 2 和图 3。结果表明，在上述分析条件下，空白溶液不干扰 2- 甲基 -5- 硝基苯胺杂质的检测，专属性良好。

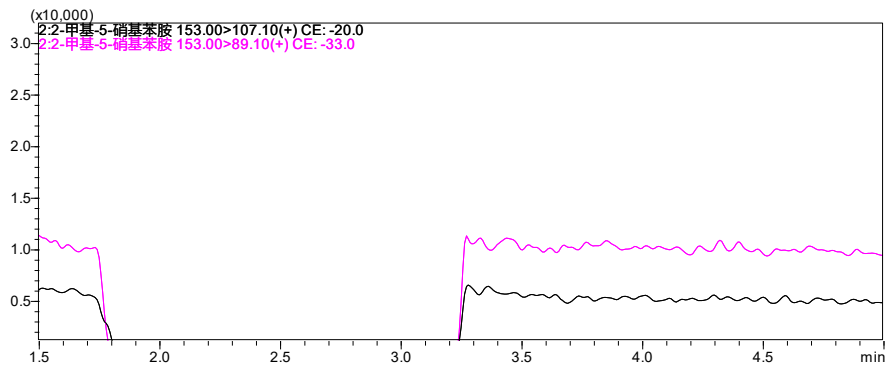


图 2 空白溶剂 MRM 色谱图

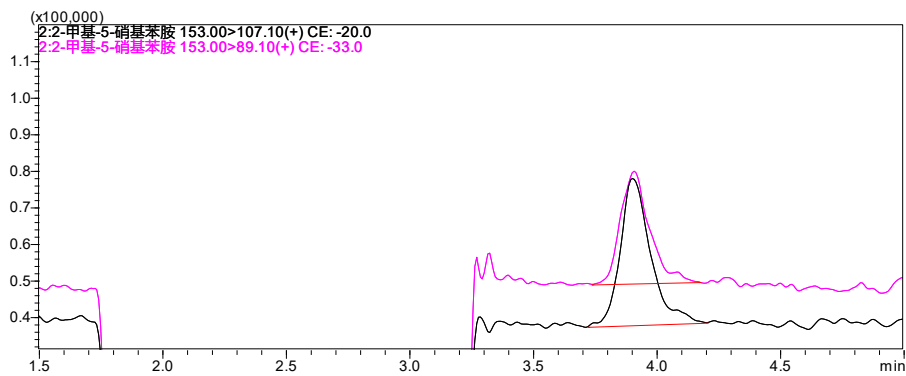


图 3 遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺的 MRM 图谱

2.3 标准曲线和检出限

将不同浓度 2-甲基-5-硝基苯胺的对照品溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 2。

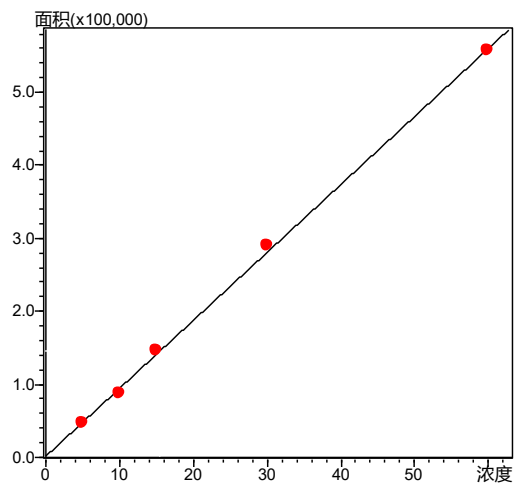


图 4 2-甲基-5-硝基苯胺的标准曲线

表 2 标准曲线与检出限信息

化合物	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度	定量限 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)
2- 甲基 -5- 硝基苯胺	$Y = (9307.32)X + (1616.36)$	0.9995	5~60	91.7-103.1%	5	1.6

2.4 精密度实验

精密量取浓度为 15 ng/mL 的 2- 甲基 -5- 硝基苯胺对照品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪，连续进样 6 次，记录色谱图和峰面积，见图 5。2- 甲基 -5- 硝基苯胺保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.13% 和 2.85%。结果表明，本品连续进样精密度良好。

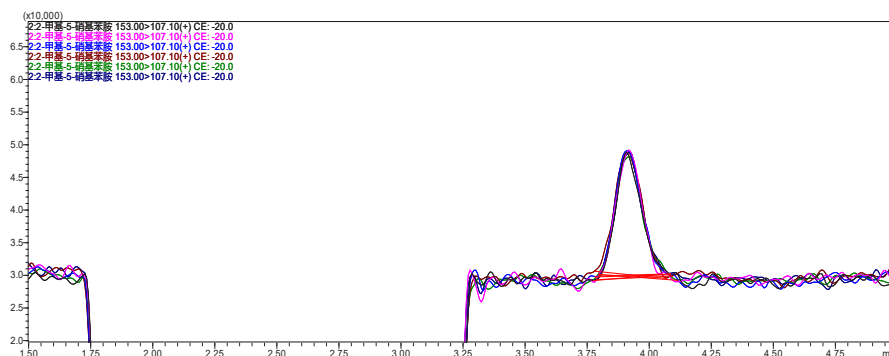


图 5 对照品连续 6 次进样图谱

2.5 回收率实验

取甲磺酸伊马替尼供试品，精密称定，置于 10 mL 容量瓶中，加入 30% 甲醇水溶液溶解，并加入适量 2- 甲基 -5- 硝基苯胺对照品，配制成低中高三个不同浓度水平的加标样品。将加标样品上机分析，计算回收率结果如表 3。

表 3 加标回收率结果 (n=3)

No.	加标浓度 (μ g/g)	回收率 (%)
1	0.3	95.7
2	0.6	94.1
3	0.9	95.5

2.6 实际样品分析结果

按照上述试验条件，对甲磺酸伊马替尼供试品中遗传毒性杂质 2- 甲基 -5- 硝基苯胺进行检测（见图 6），计算供试品中 2- 甲基 -5- 硝基苯胺的含量为 0.15 μ g/g。根据《中国药典》2020 年版四部通则增修订内容关于遗传毒性杂质控制的指导原则和甲磺酸伊马替尼成人最高日服用量 800 mg 计算，杂质 2- 甲基 -5- 硝基苯胺含量不应超出 1.875 μ g/g 的限量。

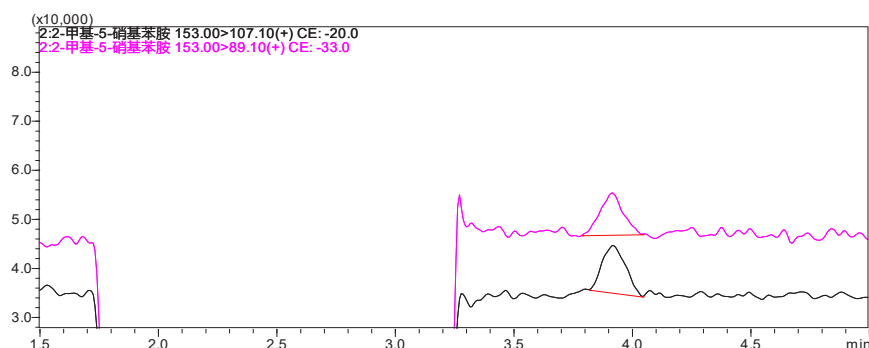


图 6 甲磺酸伊马替尼供试品中 2- 甲基 -5- 硝基苯胺分析图谱

■ 结论

采用 LC-MS/MS 法测定药物中的遗传毒性杂质具有选择性好，灵敏度高的优点，目前正越来越多的应用于新药研发中遗传毒性杂质的检测。本文使用岛津 LCMS-8060 三重四极杆液相色谱质谱联用系统建立了甲磺酸伊马替尼中潜在遗传毒性杂质 2- 甲基 -5- 硝基苯胺的测定方法。2- 甲基 -5- 硝基苯胺在 5~60 ng/mL 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法简单、快速、且灵敏度和准确度高，可为相关药品的检测工作提供快速准确的支持，进一步为药品安全提供技术保障。