

LC-MS/MS 法测定磷酸肌酸钠中肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯含量

LCMSMS-385

摘要：本文建立了三重四极杆液相色谱质谱联用仪（LCMS-8050）测定磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯以及肌酸酐磷酸酯二乙酯的方法。结果表明：肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯标液浓度在 0.2~40 ng/mL 范围内线性良好，肌酸磷酸酯二乙酯标液浓度在 0.5~100 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四种杂质标准溶液进行重复性实验，各组分计算浓度的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 2.25 %~9.27 % ($n=6$)，最低检出限 (LOD) 分别为肌酸磷酸酯二甲酯 0.027 ng/mg、肌酸酐磷酸酯二甲酯 0.039 ng/mg、肌酸磷酸酯二乙酯 0.097 ng/mg、肌酸酐磷酸酯二乙酯 0.033 ng/mg。在对应的加标量下（肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯：2 ng/mg），各组分的回收率为 89.3 %~107.5%。本文可为磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯的准确测定提供一种参考。

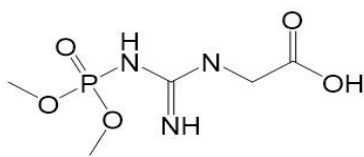
关键词：LC-MS/MS 肌酸磷酸酯二甲酯 肌酸酐磷酸酯二甲酯 肌酸磷酸酯二乙酯 肌酸酐磷酸酯二乙酯

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。

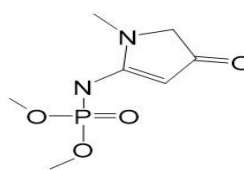
磷酸肌酸是人体内自有的活性物质，专为 ATP 补充能量。而 ATP 是细胞代谢过程中最主要的能量源，在肌肉收缩代谢（如平滑肌、横纹肌）中充当重要的供能物质。磷酸肌酸钠 (Phosphocreatine disodium) 是其药用形式，在心脏手术全程中，可作为减少缺血性心肌损害、室性心律失常以及改善心衰的重要辅助药物。广泛应用于心肌梗塞溶栓疗法和经皮冠状动脉

腔内成形术（冠脉内支架）及冠脉搭桥等治疗方案中。在合成磷酸肌酸钠原料药的过程中，会产生肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯四种具基因毒性警示结构（下图结构式中红色标注部分）的杂质；因此，在此过程中，需要对四种杂质进行定量监控，从而获得符合质量要求的原料药。

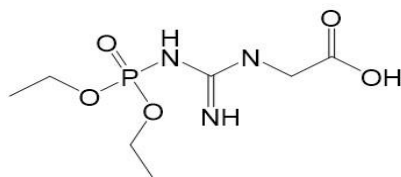
本文基于岛津公司三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8050，建立了定量测定磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酸酯二甲酯、肌酸酐磷酸酯二甲酯、肌酸磷酸酯二乙酯、肌酸酐磷酸酯二乙酯的方法。此方法灵敏度高，结果准确，可为磷酸肌酸钠质量控制提供参考。



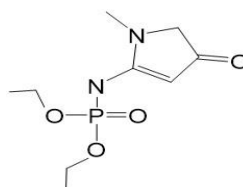
肌酸磷酰二甲酯结构式



肌酸酞磷酰二甲酯结构式



肌酸磷酰二乙酯结构式



肌酸酞磷酰二乙酯结构式

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: InertSustainBio C18, 2.1×100 mm, 1.9 μm

流动相: A 相 -0.05% TFA 水; B 相 - 甲醇

流速: 0.35 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.	5
1.10	Column Oven	CTO.RVR	1
5.00	Column Oven	CTO.RVR	0
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
8.50	Pumps	Pump B Conc.	95
8.51	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	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)	Q3 Pre (V)
1	磷酸肌酸钠	71519-72-7	256.25>256.25*	-10.0	-1.0	-10.0
	Creatine phosphate disodium		212.25>212.25	-10.0	-1.0	-10.0
2	肌酸磷酰二甲酯	--	240.05>109.00*	-12.0	-31.0	-21.0
	Creatine dimethyl phosphate		240.05>152.00	-12.0	-20.0	-15.0
3	肌酸酞磷酰二甲酯	--	222.00>151.00*	-11.0	-17.0	-15.0
	Creatinine dimethyl phosphate		222.00>109.00	-10.0	-30.0	-20.0
4	肌酸磷酰二乙酯	--	268.05>124.00*	-10.0	-29.0	-23.0
	Creatine diethyl phosphate		268.05>122.80	-13.0	-20.0	-21.0
5	肌酸酞磷酰二乙酯	--	250.05>114.05*	-12.0	-21.0	-21.0
	Creatinine diethyl phosphate		250.05>222.05	-12.0	-16.0	-20.0

注：带“*”表示定量离子对。

1.3 样品前处理

精密称定磷酸肌酸钠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 5min，取上清液至 1.5 mL 的样品瓶中，以 2 μ L 进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 结果视图

磷酸肌酸钠、四种杂质标准溶液 MRM 色谱图（如图 1~2 所示）；

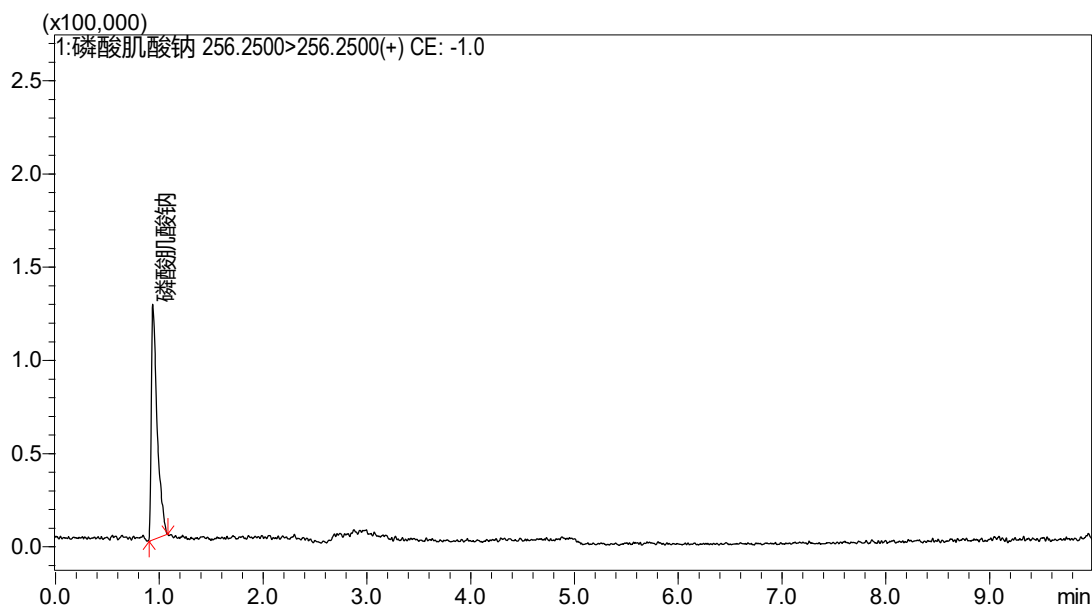


图 1 磷酸肌酸钠标准溶液 MRM 图 (200 ng/mL)

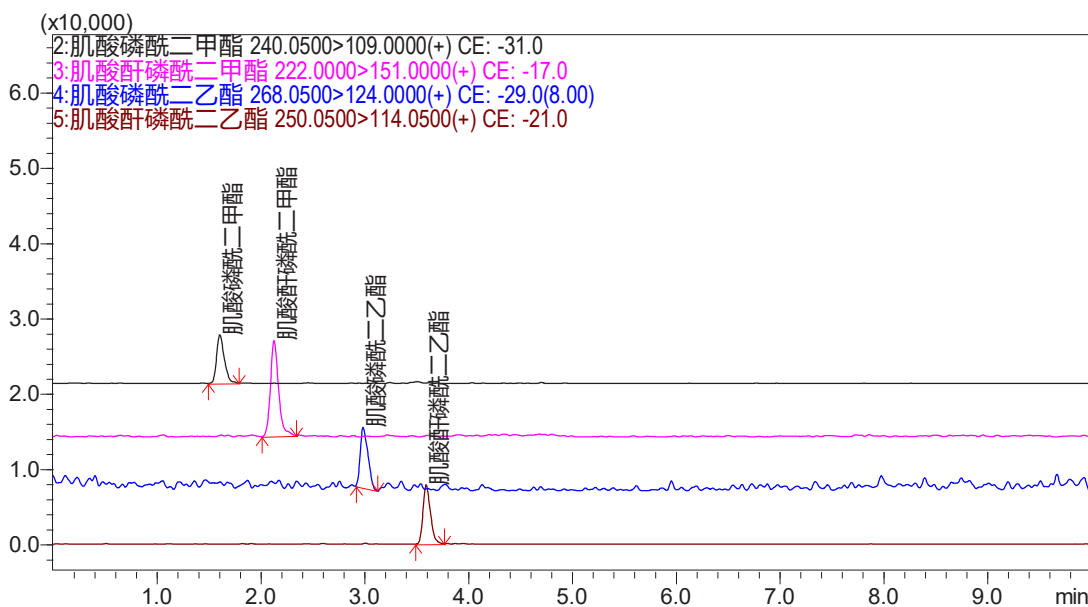


图 2 四种杂质标准溶液 MRM 图 (STD 1)

2.2 标准曲线和检出限

用 50% 甲醇 - 水溶液配制四种杂质混合标准溶液（肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二乙酯浓度为 0.2、0.5、1、2、4、10、20、40 ng/mL，肌酸磷酸二乙酯浓度为 0.5、1、2、4、10、20、40、100 ng/mL），取 2 μ L 混合标准溶液进样，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。标准曲线及 MRM 色谱图如图 3~10 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。

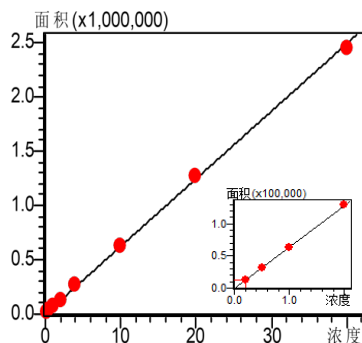


图 3 肌酸磷酸二甲酯标准曲线图

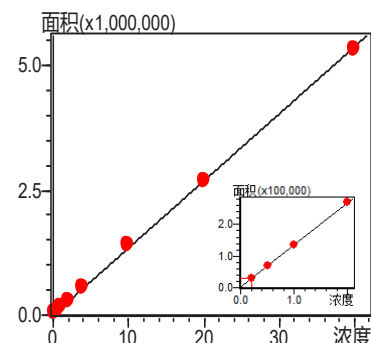


图 4 肌酸酞磷酸二甲酯标准曲线图

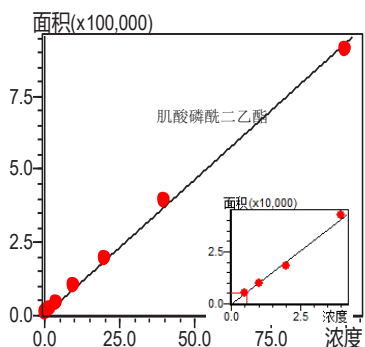


图 5 肌酸磷酸二乙酯标准曲线图

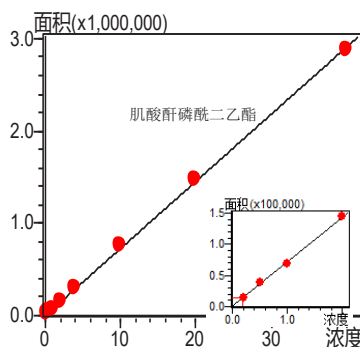


图 6 肌酸酞磷酸二乙酯标准曲线图

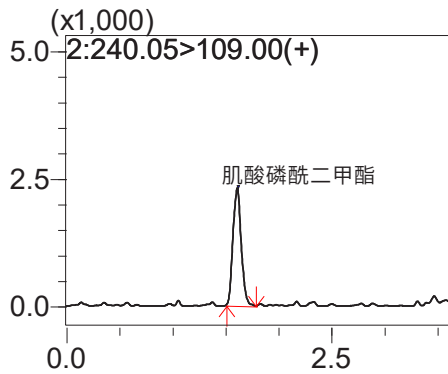


图 7 肌酸磷酸二甲酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

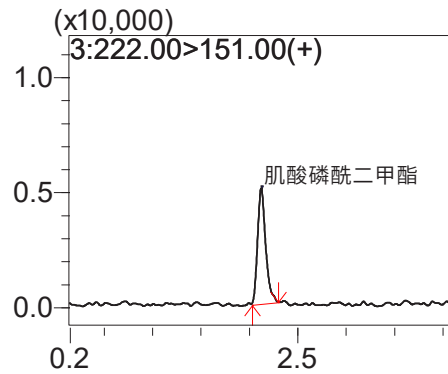


图 8 肌酸酞磷酸二甲酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

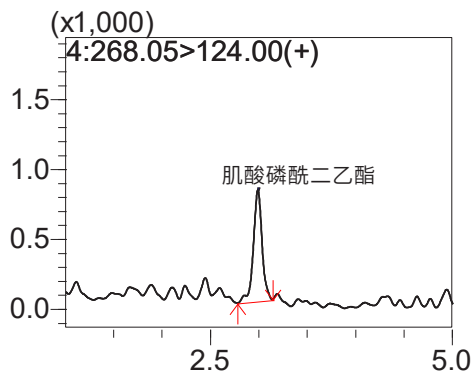


图 9 肌酸磷酸二乙酯 MRM 色谱图 (0.5ng/mL)

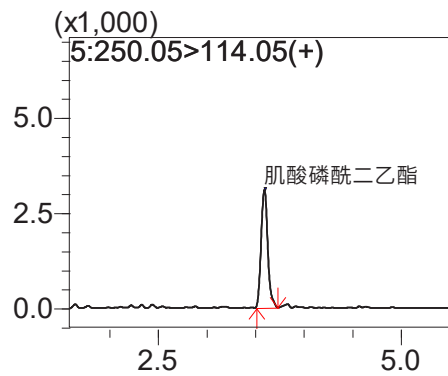


图 10 肌酸酞磷酸二乙酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

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 RSD% (LLOQ 浓度, n=6)	准确度 %
1	肌酸磷酸二甲酯	$Y=60816.5X+1320.52$	0.2~40	0.9998	5.05	92.3~105.0
2	肌酸酞磷酸二甲酯	$Y=7654.62X+4619.979$	0.2~40	0.9999	2.25	87.4~106.2
3	肌酸磷酸二乙酯	$Y=1862.23X+1058.92$	0.5~100	0.9992	9.27	91.4~111.6
4	肌酸酞磷酸二乙酯	$Y=14535.9X+1743.92$	0.2~40	0.9998	7.17	90.1~107.3

2.3. 重复性实验

取肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二乙酯浓度为 0.2 ng/mL，肌酸磷酸二乙酯浓度为 0.5 ng/mL 的混合标液连续进样 6 针，考察重复性，结果见表 3 中各组分定量限样品 (LLOQ) 回算浓度值 RSD%。

2.4 加标回收率

在待测样品中添加四种杂质，加标样品平行处理 3 份；在对应的加标量下（肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酸酞磷酸二乙酯：2 ng/mg），各组分的加标回收率结果见 4。

表 4 各组分添加回收率结果

ID	化合物名称	加标后理论浓度 (ng/mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	肌酸磷酸二甲酯	2	107.5	3.61
2	肌酸酞磷酸二甲酯	2	93.2	2.98
3	肌酸磷酸二乙酯	2	89.3	8.52
4	肌酸酞磷酸二乙酯	2	105.1	6.37

2.5. 样品分析结果

取磷酸肌酸钠样品适量，按 1.2 项下样品前处理流程方法配制成样品浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液，LCMS-8050 测定其中四种杂质，样品定量结果如图 11 和表 5 所示。

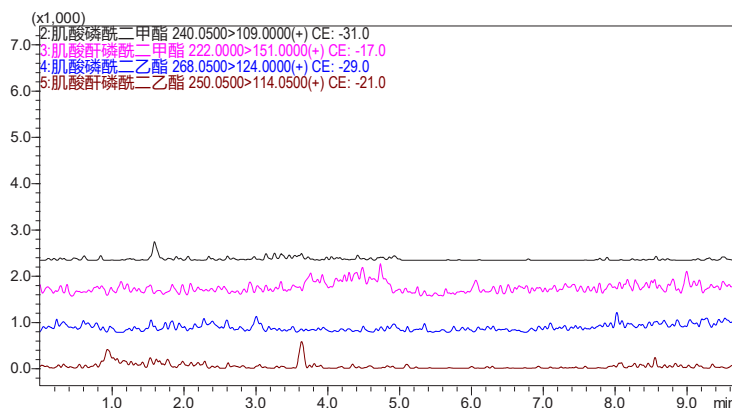


图 11 磷酸肌酸钠样品 MRM 图

表 5 磷酸肌酸钠样品定量结果

ID	化合物名称	含量 (ng/mg)	检出限 (ng/mg)	定量限 (ng/mg)
1	肌酸磷酸二甲酯	ND	0.027	0.085
2	肌酸酞磷酸二甲酯	ND	0.039	0.131
3	肌酸磷酸二乙酯	ND	0.097	0.290
4	肌酸酞磷酸二乙酯	ND	0.033	0.123

* ND 代表未检出，四种杂质含量要求限度低于 12 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) 对磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸磷酸二乙酯以及肌酸酞磷酸二乙酯进行测定；结果表明：肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二乙酯标液浓度在 0.2~40 ng/mL 范围内线性良好，肌酸磷酸二乙酯标液浓度在 0.5~100 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四种杂质标准溶液进行重复性实验，各组计算浓度的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 2.25 %~9.27 % ($n=6$)，最低检出限 (LOD) 分别为肌酸磷酸二甲酯 0.027 ng/mg 、肌酸酞磷酸二甲酯 0.039 ng/mg 、肌酸磷酸二乙酯 0.097 ng/mg 、肌酸酞磷酸二乙酯 0.033 ng/mg 。在对应的加标量下 (肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酸酞磷酸二乙酯：2 ng/mg)，各组分的回收率为 89.3 %~107.5%。本文为磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酸酞磷酸二乙酯的准确测定提供一种参考。