

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法用于甲苯磺酸拉帕替尼的基因毒性杂质分析

LCMSMS-247

**摘要：** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用仪用于甲苯磺酸拉帕替尼的基因毒性杂质分析的方法。该方法以 0.1% 甲酸水溶液和甲醇为流动相，在 Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm I.D.×75 mm L. 色谱柱上 6.5 min 内完成样品分析，基因毒性杂质 4-(3- 氟苯甲氧基)-3- 氯苯胺在 0.5~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好，低中高浓度重复性显示峰面积相对标准偏差在 0.84~1.25% 之间、相对回收率在 94.2~97.3% 之间，可供甲苯磺酸拉帕替尼中 4-(3- 氟苯甲氧基)-3- 氯苯胺的检测及药物中相关基因毒性杂质定量研究参考使用。

**关键词：** 基因毒性杂质 甲苯磺酸拉帕替尼 三重四极杆质谱 4-(3- 氟苯甲氧基)-3- 氯苯胺

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)。其特点是毒性较强，在极低浓度便可造成人体遗传损伤，对用药安全产生强烈威胁。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。

基因毒性杂质常用分析方法根据所测杂质的限量而又有不同的选择，如 HPLC-UV/FL、UHPLC、LCMS 及

LCMSMS。LCMSMS 由于选择性高、抗干扰能力强、同 UHPLC 联用后分析速度快、灵敏度高等特点，对于痕量或超痕量的基因毒性杂质分析具有显著的优势而得到相关领域的广泛使用。

本文中使用了岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8040，建立了甲苯磺酸拉帕替尼的基因毒性杂质 4-(3- 氟苯甲氧基)-3- 氯苯胺的分析方法，该方法具有灵敏、快速、高效等特点，可为该类药物中基因毒性杂质的检测提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵), DGU-20A<sub>3</sub>(在线脱气机), SIL-30AC(自动进样器), CTO-20AC(柱温箱, 含 FCV-20AH<sub>2</sub> 流路切换阀), CBM-20A(系统控制器), LCMS-8040(三重四极杆质谱仪), LabSolutions Ver. 5.8(色谱工作站软件)。

### 1.2 化合物信息

表1 化合物信息

#	化合物名	英文名	CAS#	分子式	分子量	备注
1	甲苯磺酸拉帕替尼	Lapatinib	231277-92-2	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	581.1	主药
2	4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺	4-(3-fluorobenzyloxy)-3-chlorobenzeneamine	202197-26-0	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> ClFNO	251.5	基因毒性杂质

### 1.3 分析条件

液相色谱条件:	流速: 0.4 mL/min
色谱柱: Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm I.D. ×75 mmL., 2.2 μm	柱温: 40°C
流动相: A 相 -0.1% 甲酸水溶液; B 相 - 甲醇	进样量: 5 μL
	洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 45%, 洗脱程序见表 2

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	55
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
4.50	Pumps	Pump B Conc.	45
6.50	Controller	Stop	

### 质谱条件:

离子源: ESI	雾化气流速: 3.0 L/min
接口温度: 400°C	干燥气流速: 15.0 L/min
DL 温度: 280°C	扫描模式: 多反应监测 (MRM+)
MRM 参数 : 见表 3	驻留时间: 100 ms

表3 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺	252.0	143.0*	-13	-23	-26
		80.0	-13	-46	-27

### 1.4 样品制备

#### 标准溶液配制:

称取 4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺适量, 以乙腈 - 水 (1/1, v/v) 溶解, 并逐级稀释使浓度依次为 1000、100、10、5、1 和 0.5 ng/mL 系列标准溶液。

## 结果讨论

### 2.1 色谱条件选择

基因毒性杂质在主药中含量微小, 多数在 ppm 级别甚至以下, LCMS 分析过程中为了确保具有足够的灵敏度, 不可对主药过份稀释。为避免一次进样分析中大量的主药对 LC-MS 系统造成污染, 可采用流路切换阀对主药的洗脱液进行切除, 只需将待测杂质切入质谱进行分析。FCV-20AH2 是岛津 HPLC/UHPLC 系统专用 2 位 6 通流路切换阀, 耐压 34.3MPa, 可安装于 CTO-20A/AC 柱温箱内, 也可独立使用; 该阀提供两种控释模式, Remote 模式时可通过 LC 时间程序或者 MS 时间程序进行控制, Local 模式下则可以手动一键轻触实现流路切换。



图1 FCV-20AH2

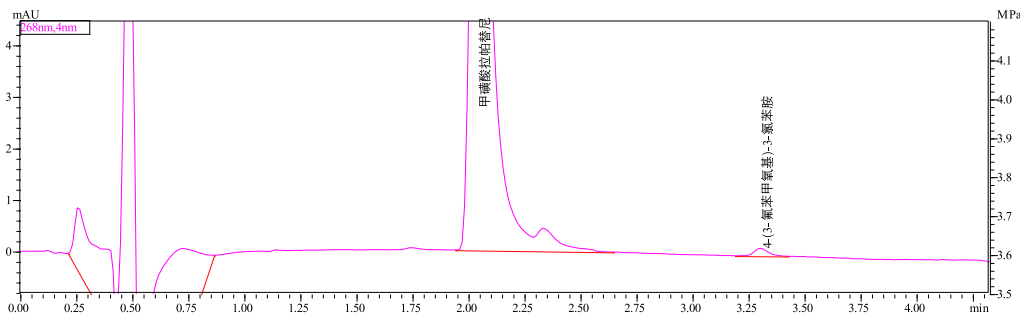


图2 甲苯磺酸拉帕替尼与基因毒性杂质4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺HPLC色谱图(波长: 268 nm)

本例在样品分析时,使用流路切换阀在 2.9 min 后将 HPLC 洗脱组分导入后端质谱,进行 LC-MS/MS 分析。

另据相关文献报道,甲苯磺酸拉帕替尼溶液态不稳定,常温放置短时间内会发生明显降解,降解产物影响基因毒性杂质的测定结果。本例使用 UHPLC 进行超快速分析,减小样品溶液放置时间和控制样品降解发生的程度,以提供真实可靠的分析结果。

### 2.2 专属性考察

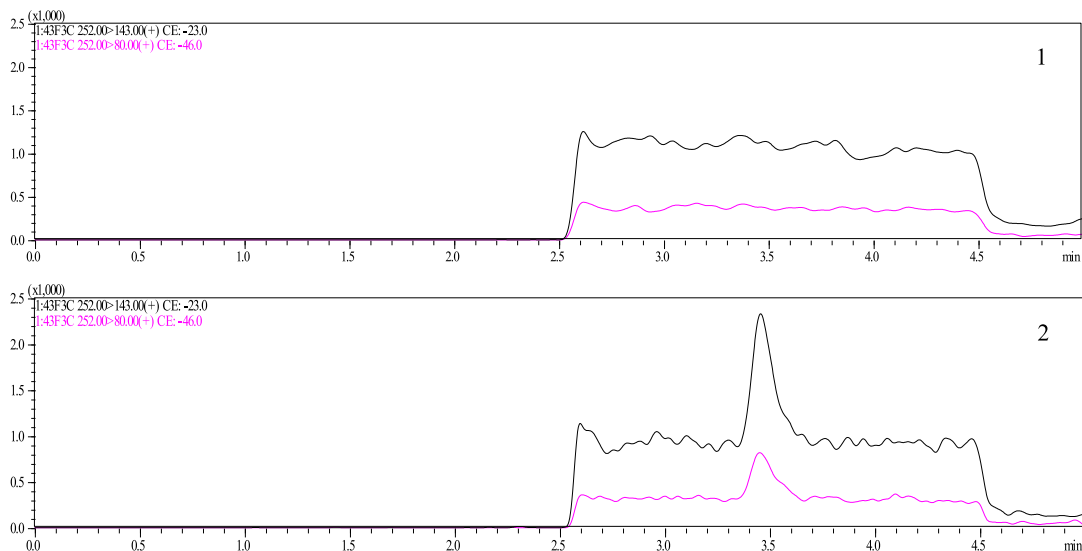


图3 基因毒性杂质4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺MRM色谱图  
1. 空白溶剂 2. 浓度0.5µg/L的杂质溶液

如上 MRM 色谱图结果显示基因毒性杂质 4-(3- 氟苯甲氧基 )-3- 氯苯胺保留时间处,空白溶剂无干扰。

### 2.3 标准曲线

表4 基因毒性杂质4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺校准曲线结果

化合物	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度	LOQ(ng/mL)	LOD(ng/mL)
4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺	Y=19667.3X-128.69	0.9997	0.5-1000	98.3-103.0%	0.44	0.15

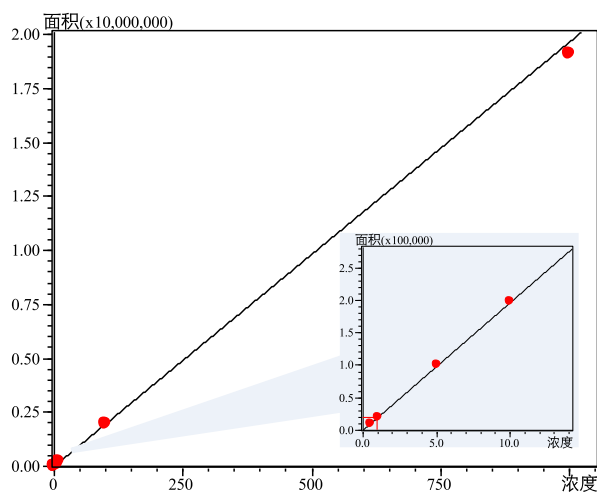


图4 基因毒性杂质4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺校准曲线

## 2.4 重复性分析结果

重复性分析结果表明，该方法快速可靠，可在甲苯磺酸拉帕替尼发生明显降解前完成样品分析而得到准确结果。

表5 低、中、高三浓度重复性分析结果(n=6)

#	QC 浓度	保留时间(RSD%)	峰面积(RSD%)	回收率(%)
1	1 ng/mL	0.08	1.24	97.3
2	10 ng/mL	0.15	0.84	96.0
3	100 ng/mL	0.06	1.25	94.2

## 2.5 实际样品分析结果

称取某甲苯磺酸拉帕替尼样品 10 mg，以乙腈 - 水 (1/1, v/v) 溶解并定容至 5 mL，分析结果表明该样品中 4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺杂质的含量为 23.26 mg/Kg。

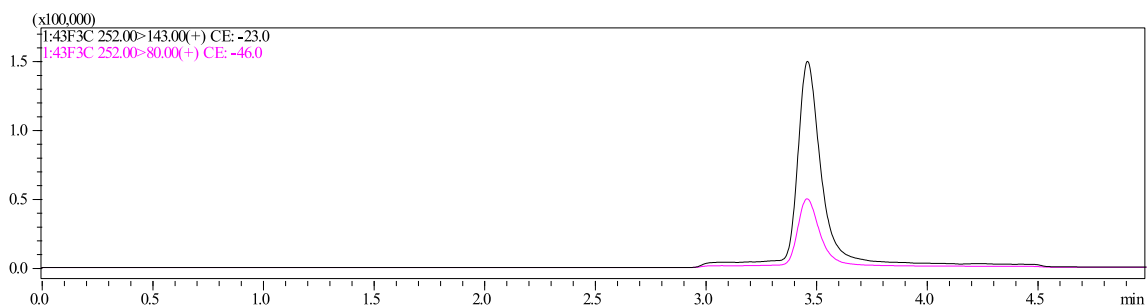


图5 甲苯磺酸拉帕替尼样品中4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺的分析结果

## 结论

本文使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 建立了甲苯磺酸拉帕替尼中基因毒性杂质 4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺的定量方法。该方法分析速度快，重复性、精密度及回收率良好，在 0.5~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好。该方法可供甲苯磺酸拉帕替尼中 4-(3-氟苯甲氧基)-3-氯苯胺的检测及药物中相关基因杂质定量研究参考使用。