

# LC-MS/MS 用于对甲苯磺酰肼基因毒性杂质测定

## LCMSMS-1070

**摘要：** 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了哌甲酯原料药中对甲苯磺酰肼基因毒性杂质的测定方法。方法学实验表明，对甲苯磺酰肼在 0.2-100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.999；灵敏度高，定量限为 0.2 ng/mL；0.2 ng/mL 低浓度的标准品溶液，连续进样 6 次，保留时间 RSD 为 0.124%，峰面积的 RSD 为 2.02%，表明仪器精密度良好；对甲苯磺酰肼在低、中、高不同加标回收率均大于 92%，方法准确可靠。该方法可为相关从业人员提供参考。

**关键词：** 三重四极杆液质联用仪 对甲苯磺酰肼 基因毒性杂质

### 技术特点：

- ❖ 灵敏度高，定量下限至 0.05 mg/kg，远优于目前 EMA 1.5 µg/天（3.75 mg/kg）肼类物质检测要求。
- ❖ 优化色谱条件，解决对甲苯磺酰肼柱上残留问题。

肼类化合物（如肼、酰肼、脞）具有明确的基因毒性警示结构，形成碳正离子、碳中心自由基和氧中心自由基等高活性的中间体，导致 DNA 发生烷基化或者其他损伤，药品中如果含有肼类化合物残留，药品就会存在质量缺陷并对人类健康造成威胁，建立快速、灵敏、准确、可靠的分析方法控制药物中肼类化合物的含量尤为重要。

对甲苯磺酰肼 (p-Toluenesulfonyl hydrazide) 是一种含有肼基 (-NH-NH<sub>2</sub>) 警示结构的有机化合物，在制药工业中作为哌甲酯等药物的合成中间体使用。根据 ICH M7(R2) 指导原则，该化合物因具有 DNA 损伤毒性而被归类为潜在基因毒性杂质，需严格控

制。FDA 在 ICHM7 指南中明确，肼类化合物属于“高关注队列”，其致癌风险显著高于普通 GTI。根据 ICH M7 指南，肼类化合物的基因毒性杂质限度通常以终生允许摄入量（终生 AI）表示：以 1.5 µg/天计算。

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045RX，基于其稳健的离子源性能，建立了哌甲酯原料药中对甲苯磺酰肼杂质含量测定方法，该方法前处理简便，灵敏度高，稳定性好，可用于潜在基因毒性杂质对甲苯磺酰肼的含量测定，供相关实验人员参考使用。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8045RX。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	在线脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40BX3	质谱仪：	LCMS-8045RX
自动进样器：	SIL-40CX3	色谱工作站：	LabSolutions Version 5.128
柱温箱：	CTO-40S		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Claris C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2 µm),  
岛津（上海）实验器材有限公司，P/N:227-30001-04

流 动 相 : A相 -0.1% 甲酸水; B相 - 乙腈  
流 速 : 0.3 mL/min 进 样 体 积 : 5  $\mu$ L  
柱 温 : 40°C 洗 脱 方 式 : 梯 度 洗 脱  
初 始 浓 度 : B相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Oven	Oven Valve 1	1*
5.00	Oven	Oven Valve 1	0
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.10	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

\* 表示柱温箱柱后切换阀位置, 0 代表进入质谱, 1 代表进入废液

质谱条件:

离 子 源 : ESI (+) DL 温 度 : 200°C  
接 口 电 压 : 2 kV 聚 焦 电 压 : 2 KV  
喷 针 位 置 : +3 mm 加 热 模 块 温 度 : 150°C  
雾 化 气 流 速 : 3.0 L/min 接 口 温 度 : 250°C  
加 热 气 流 速 : 15.0 L/min 干 燥 气 流 : 5.0 L/min  
扫 描 模 式 速 : 多 反 应 监 测 (MRM) MRM 参 数 : 见 表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	对甲苯磺酰肼	p-Toluenesulfonyl hydrazide	1576-35-8	187.00	157.00* 139.00	-21.0 -20.0	-9.0 -16.0	-27.0 -23.0

注: \* 表示定量离子

### 1.3 标准品及样品制备

准确称取对甲苯磺酰肼标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解, 得到 1 mg/mL 标准储备溶液。

校准曲线配制: 以纯水为溶剂, 将标准中间液逐级稀释至浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准点, 上机分析。

样品前处理: 准确称取哌甲酯原料药 40 mg, 用 50% 甲醇水 10 mL 溶解, 摇匀, 静置 10 min 后, 取适量于塑料离心管中, 于 12000 r/min 离心 5 min 后, 上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上机。

## ■ 结果讨论

### 2.1 峰形及残留问题解决

对甲苯磺酰肼含有伯胺、仲胺和磺酸结构，易与常规色谱柱中金属材质发生非特异性吸附，标准溶液高点分析后，会部分吸附残留在色谱柱中，导致峰形及残留问题，如下图所示：100 ng/mL 高点分析后，左图为使用常规色谱柱，空白溶剂残留高于线性低点响应，同时低点峰形较差；右图为更换 Claris 色谱柱，因 Claris 色谱柱惰性化柱管对于因柱壁金属非特异性吸附导致的峰形拖尾等问题明显改善，同时残留显著降低，远低于线性低点 20% 响应。

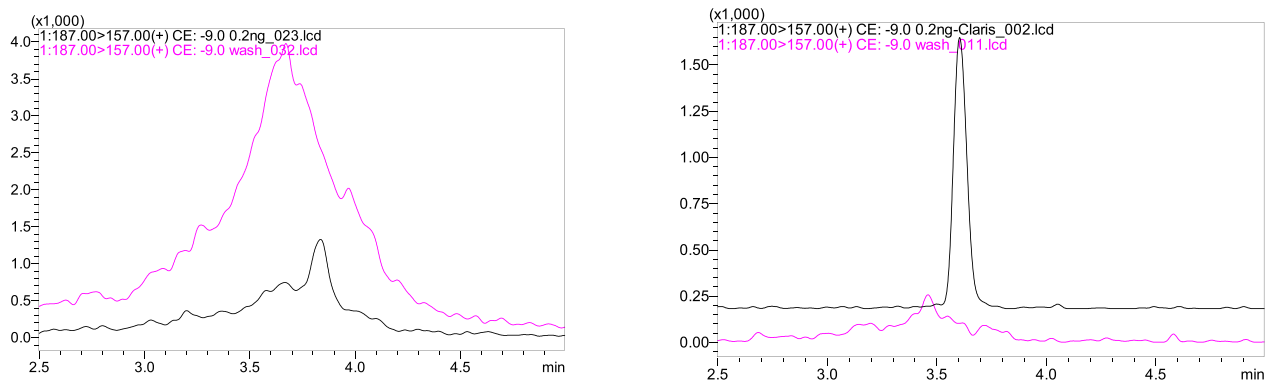


图 1 线性低点 0.2 ng/mL 溶液及空白残留色谱图峰形及响应  
(左图 常规色谱柱；右图 Claris 色谱柱)

## 2.2 主成分污染问题解决

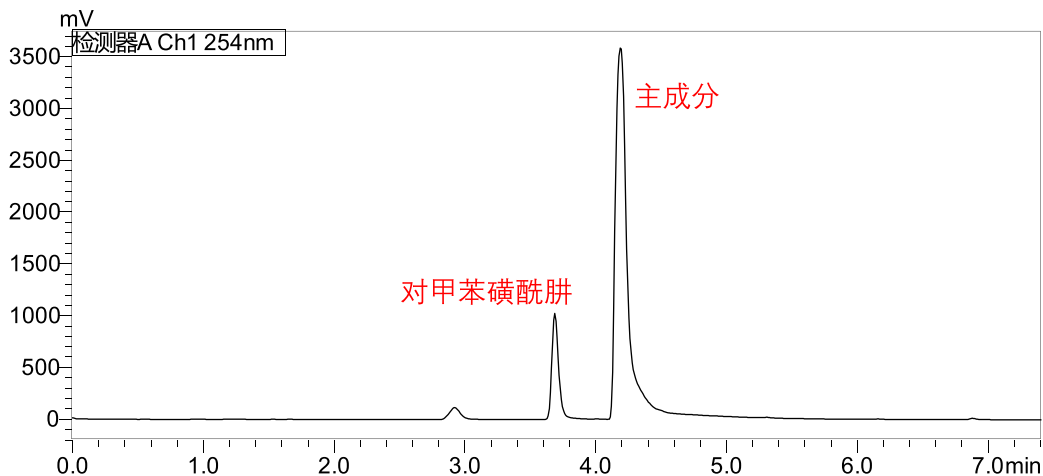


图 2 100 ppm 对甲苯磺酰肼样品加标色谱图

通过对色谱柱及梯度优化，加标溶液中色谱图可发现：对甲苯磺酰肼在 3.7 min 出峰，主成分在 4.1 min 后出峰，方法中设置 4.0 min 后切阀进质谱，可避免哌甲酯等主成分对目标基因毒性杂质分析检测的影响，减少主成分对仪器的污染，降低低点回收率不良的影响。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 专属性考察

溶剂空白与 0.2 ng/mL 标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处，未见明显干扰，方法专属性良好。

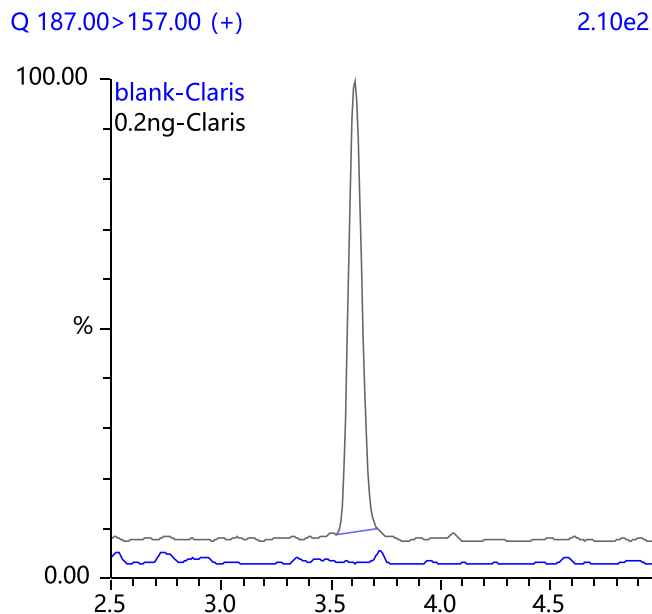


图3 溶剂空白和 0.2 ng/mL 对甲苯磺酰肼标准溶液 MRM 重叠色谱图

### 2.3.2 线性范围

按照 1.3 项下配制方法配制校准曲线溶液。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，对甲苯磺酰肼在 0.2~200 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。

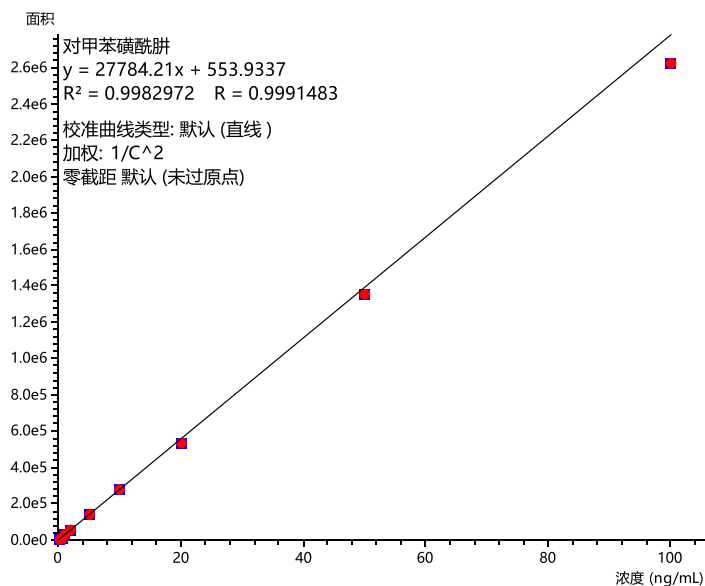


图4 对甲苯磺酰肼校准曲线

### 2.3.3 定量限和检出限

参考中国药典 2020 版《9101 分析方法验证指导原则》，定量限检出限的确定，采用信噪比方法，以信噪比约为 3:1 和 10:1 时对应浓度对照品溶液注入仪器，得到定量限为 0.05 ng/mL，检出限为 0.02 ng/mL，如下图 5 所示。

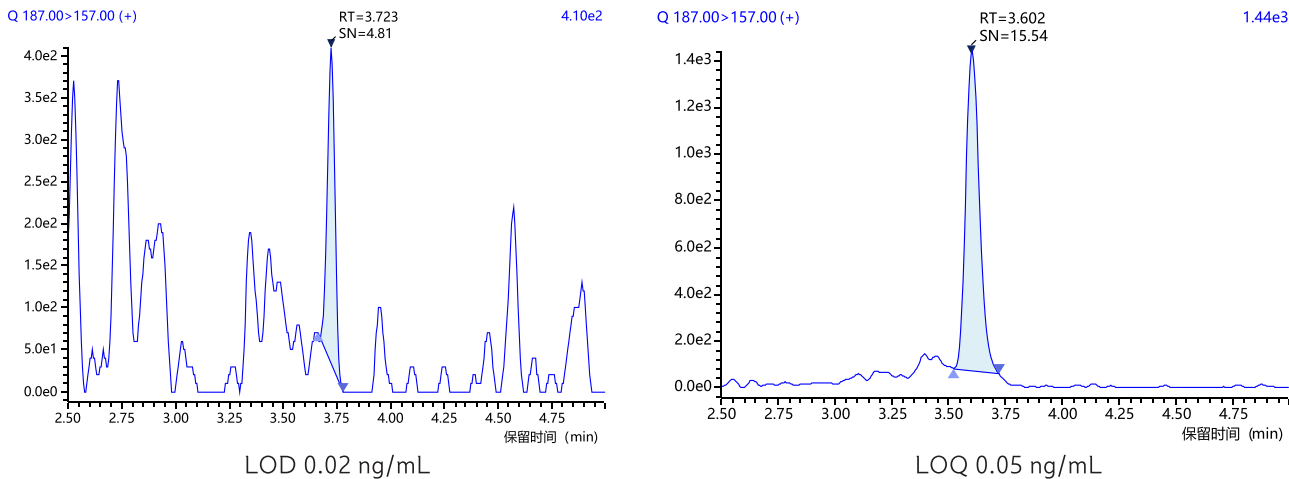


图 5 检出限 (LOD) 0.02 ng/mL 和定量限 (LOQ) 0.05 ng/mL 色谱图

### 2.3.4 精密度实验

对 0.2 ng/mL 低浓度的标准溶液连续分析 6 次，计算保留时间和峰面积的 RSD。保留时间 RSD 为 0.12%，峰面积的 RSD 为 2.02%，仪器精密度良好。

表 3 对甲苯磺酰肼重复性结果 (n=6)

No.	测试浓度 (ng/mL)	保留时间 (min)	保留时间 RSD%	峰面积	峰面积 RSD%
1	0.2	3.602	0.12	5746	2.02
2	0.2	3.602		5675	
3	0.2	3.609		5601	
4	0.2	3.599		5448	
5	0.2	3.610		5693	
6	0.2	3.607		5752	

### 2.3.5 加标回收率实验

称取哌甲酯原料药 40 mg，按照 1.3 前处理方式进行处理，样品中未检出对甲苯磺酰肼物质。根据 EMA 胍类药物 1.5 μg/ 天的最大摄入量要求，按 AI 10% 的常规控制要求，可接受的限度为 3.75 mg/kg(15 ng/mL)，本文进行低、中、高三浓度加标，结果如下表 4 所示。

表 4 对甲苯磺酰肼加标回收和精密度结果 (n=3)

化合物	样品含量 (mg/kg)	添加量 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
对甲苯磺酰肼	0.0	0.125 (0.5 ng/mL)	0.120	92.10	5.30
			0.108		
			0.119		
		2.500 (10 ng/mL)	2.465	97.20	1.25
			2.412		
			2.410		

对甲苯磺酰肼	0.0	18.75 (75 ng/mL)	18.096 17.880 18.158	96.20	0.81
--------	-----	---------------------	----------------------------	-------	------

## ■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8045RX 建立了检测哌甲酯药物中对甲苯磺酰肼的检测方法：1) 基于对甲苯磺酰肼含有伯胺、仲胺和磺酸结构，优化了色谱柱和梯度，改善了色谱峰形拖尾及残留问题；2) 通过对色谱柱及梯度优化，解决对甲苯磺酰肼和主成分分离问题，改善对回收率影响；3) 方法学表明：该方法分离度和专属性良好，灵敏度高，加标回收准确，可以用于相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

