

采用AEI源配置的TSQ 9610 测定尼索地平原料药中的基因毒性杂质邻硝基苯甲醛

王仁萍

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

邻硝基苯甲醛，基因毒性杂质，TSQ 9610，AEI，制药

摘要

本文采用赛默飞AEI源配置的TSQ 9610三重四极杆气质联用仪建立了基因毒性杂质邻硝基苯甲醛的分析方法。实验结果证明方法线性良好，准确可靠，灵敏度高，可将其应用于制药行业中痕量邻硝基苯甲醛的检测。

概述

药品的质量特性包括了安全性和有效性，而基因毒性杂质的控制是保证药物安全性的重要一环。ICH M7定义遗传毒性杂质，较低水平即可直接造成DNA损伤，进而导致DNA突变，因此可能引发癌症的DNA反应性物质。证实具有遗传毒性的杂质一般称为基因毒性杂质；具有遗传毒性警示结构的杂质，但并未经实验测试模型验证的通常也作为基因毒性杂质来评估。

基因毒性杂质的来源主要是原料药或制剂的生产过程，比如起始原料、反应物、催化剂、中间体、副产物、降解产物等。邻硝基苯甲醛作为常见的药物合成原料与中间体，市场需求量巨大，可以将其用于制造抗心绞痛药硝基吡啶（心痛定）、尼莫地平、尼索地平、氨溴索口服液、恩卡胺等新型心血管药物，而心血管药物对于患有心血管疾病的中老年人至关重要。此外将邻硝基苯甲醛的硝基还原成氨基后成为邻氨基苯甲醛，由它可合成喹啉环类药物。根据ICH和EMA规定，醛类化合物均被列为潜在的基因毒性杂质，因此需要根据不同药物的不同工艺评估是否需要对其进行严格的质量控制。

基毒的控制措施，一种是采用可接受摄入量（AI）方法针对TD50明确的化合物，CPDB数据库中即列明了1574种致癌物质的TD50值，第二种是采用允许的日接触量（PDE）方法，以上两种方法均可以通过毒理学数据库或者文献检索得到相关的毒理学数据后然后



根据公式计算得到限度，第三种是采用毒理学关注阈值（TTC）方法，值为 $1.5\mu\text{g}/\text{day}$ ，根据服药周期、试验阶段、基毒数量，TTC值需要综合考虑来具体确定。随着2020版中国药典新增9306遗传毒性杂质控制指导原则，法规更加健全，国家对基因毒性杂质监管必然越来越严苛，对于制药企业来说需要灵敏度更高的仪器来开发相应的检测方法。

赛默飞全新一代AEI源配置的TSQ 9610三重四极杆质谱仪系统具有灵敏度高，抗污染能力强，稳定性好的特点，此外该系统还可以实现不卸真空维护离子源及更换色谱柱，不卸真空更换 NV-AEI 灯丝，不卸真空实现EI/CI任意切换的功能，对于需要经常进行基因毒性杂质方法开发的制药研发实验室，可以大大节省仪器放真空与抽真空的时间，提升实验室的生产效率。

1. 实验部分

1.1 仪器与色谱条件

Thermo Scientific™ AS1610自动进样器；Thermo Scientific™ TRACE 1610气相色谱仪；Thermo Fisher Scientific™ TSQ 9610三重四极杆质谱仪；Chromeleon 7.3数据处理系统。

表1 气相与质谱参数

TRACE 1610 GC气相参数	
进样体积	1.0 μ L
衬管	分流衬管 PN:453A2265
进样口温度	280 $^{\circ}$ C
进样模式	分流进样, 分流比5:1, 恒流模式: 1 ml/min, 载气: 高纯氦气 (99.999%)
色谱柱	TG-624SiIMS (30*0.25*1.4) PN: 26085-3320
程序升温	80 $^{\circ}$ C (保持2 min), 20 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C (保持5 min)
TSQ 9610质谱参数	
传输线温度 ($^{\circ}$ C)	250
离子源温度 ($^{\circ}$ C)	300
数据采集模式	T-SRM
采集离子对 (eV)	121>65.1 (10), 121>39.1 (20), 93>65.1 (6)

1.2 溶液配制

标准曲线工作溶液:

准确称取邻硝基苯甲醛适量, 以二氯甲烷为溶剂配制系列标准曲线工作溶液, 浓度分别为: 1.25 ng/mL, 6.25 ng/mL, 12.50 ng/mL, 62.50 ng/mL, 100.00 ng/mL。灵敏度溶液: 取以上1.25 ng/mL溶液以二氯甲烷为溶剂稀释得0.125 ng/mL标准品溶液, 1.25 ng/mL与0.125 ng/mL作为灵敏度溶液。

样品溶液:

取尼索地平原料药约20 mg, 精密称定, 加二氯甲烷2 mL溶解, 混匀, 平行配制两份。

加标样品:

取尼索地平原料药约20 mg, 精密称定, 加6.26 ng/mL的标准品溶液2 mL, 混匀, 平行配制三份。

2. 数据处理

采用Thermo Scientific™ Chromeleon 7.3数据处理系统对仪器进行控制, 完成数据采集、处理、报告分析。该软件具有超强的数据审计追踪功能, 能够保证数据的完整性安全性, 确保制药行业合规性的要求。

3. 方法学验证

3.1 灵敏度考察

取1.25 ng/mL与0.125 ng/mL的标准品溶液进样分析考察其灵敏度, 提取离子谱图结果见图1, 按照定量限S/N=10计算, 邻硝基苯甲醛的定量限约为0.47 ng/mL, 另0.125 ng/mL信噪比为3.5可作为其检出限。结果表明在分流模式下, 该方法依然具有较高的灵敏度, 对于污染比较大的原料药或者制剂, 可以大幅度降低样品浓度同时减少对仪器的污染。

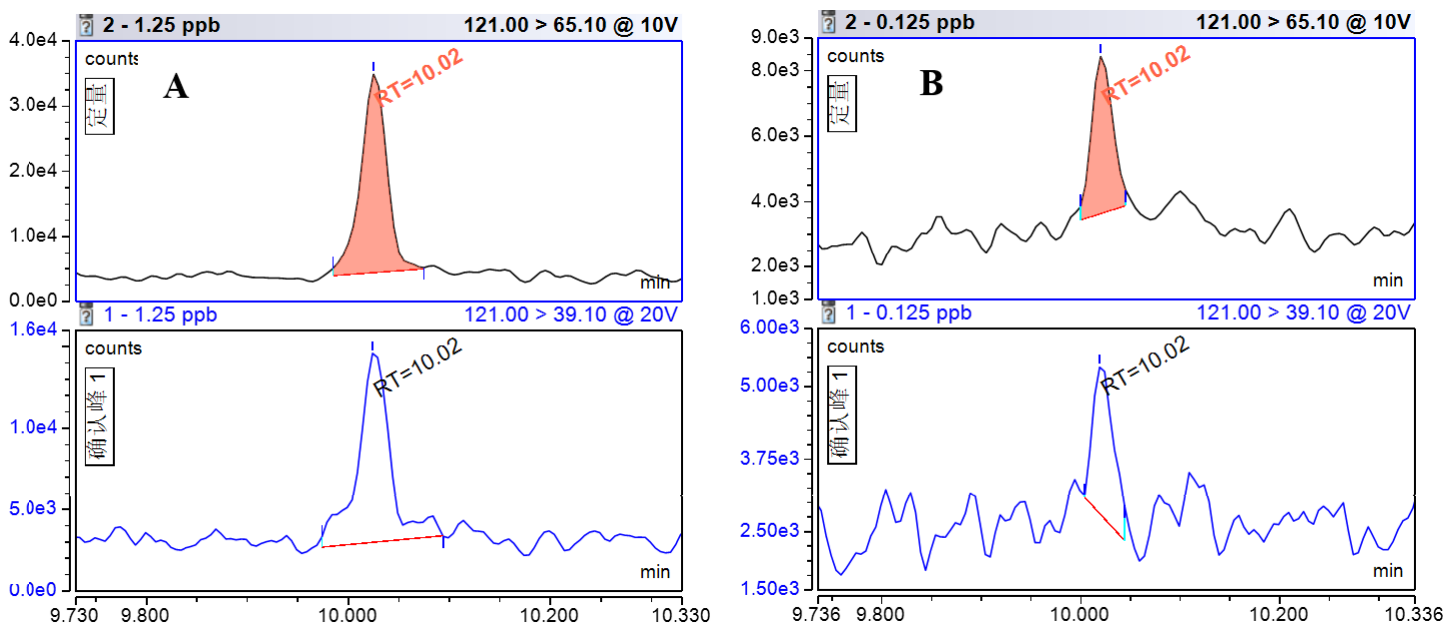


图1 1.25 ng/mL (A) 与0.125 ng/mL (B) 标准品溶液提取离子谱图

3.2 重复性

取浓度为1.25 ng/mL与6.25 ng/mL的标准品溶液分别连续进样六次，其峰面积的RSD分别为3.15%和1.50%。6.25 ng/mL重叠谱图如图2，RSD结果见表 2。

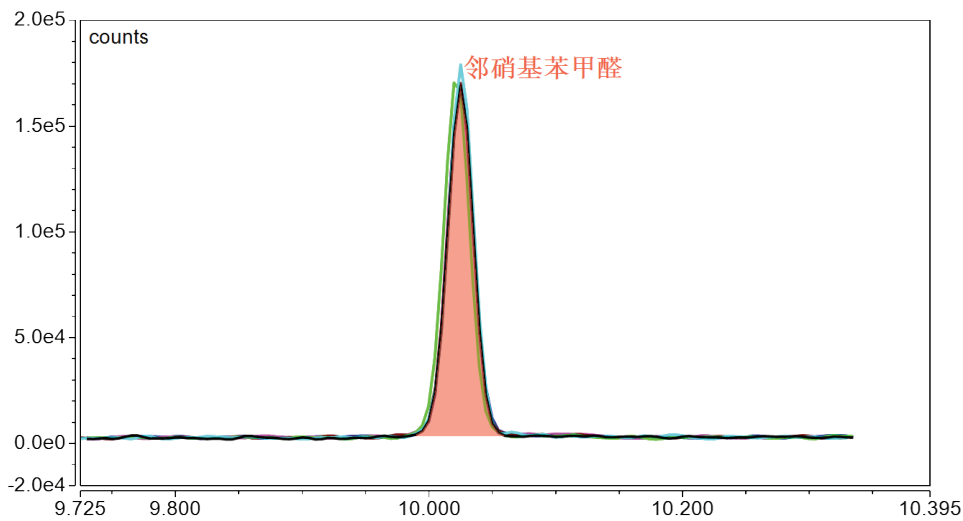


图2 6.25 ng/mL标准品溶液连续进样六次重叠谱图

表2 1.25 ng/mL与6.25 ng/mL标准品溶液重复性结果

No.	1.25 ng/mL标准品峰面积	6.25 ng/mL标准品峰面积
1	835	4033
2	810	3973
3	831	4047
4	766	4139
5	824	4105
6	827	4013
RSD(%)	3.15	1.50

3.3 线性

取标准曲线溶液（1.25 ng/mL, 6.25 ng/mL, 12.50 ng/mL, 62.50 ng/mL, 100.00 ng/mL）进样，以外标法计算邻硝基苯甲醛线性，标准曲线与线性方程见图3，判定系数 R^2 为0.9995。

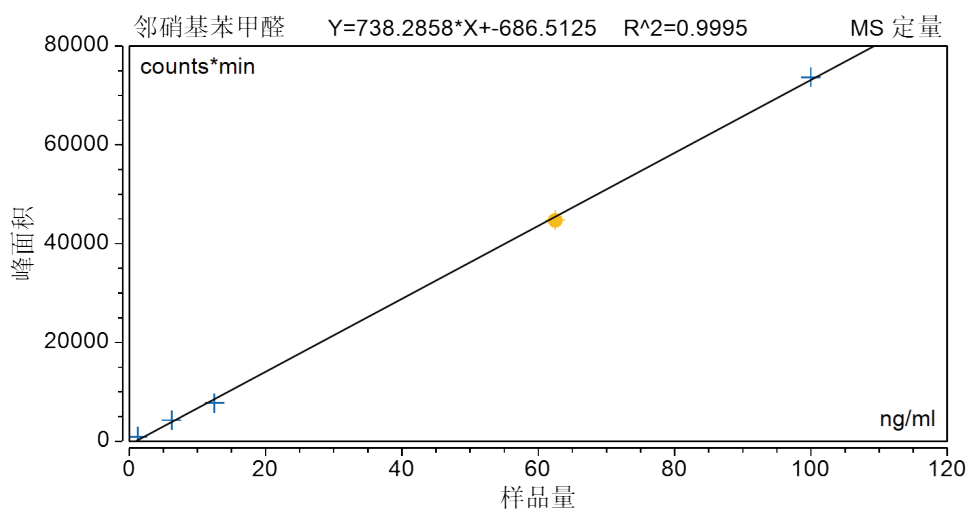


图3 邻硝基苯甲醛标准曲线（1.25~100 ng/mL）

3.4 溶液稳定性

溶液稳定性是方法开发过程中需要考察的一项重要内容，对于方法学验证至关重要。本实验以6.25 ng/mL标准品溶液考察了邻硝基苯甲醛的溶液稳定性，结果表明0 h与24 h邻硝基苯甲醛的峰面积保持一致（图4），证明该标准品溶液稳定性良好。

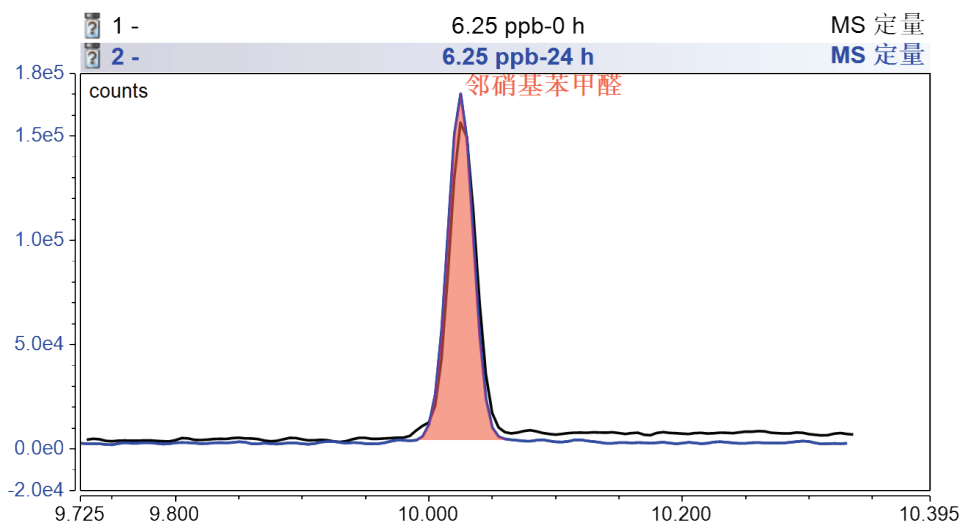


图4 0 h与24 h进样邻硝基苯甲醛重叠谱图

3.5 样品检出情况与回收率

取样品溶液和加标溶液进样，分析样品检出情况与回收率。样品中无检出，回收率分别为104.40%，106.10%，103.80%，结果均在80~120%之间，满足方法学验证要求，谱图见图5。

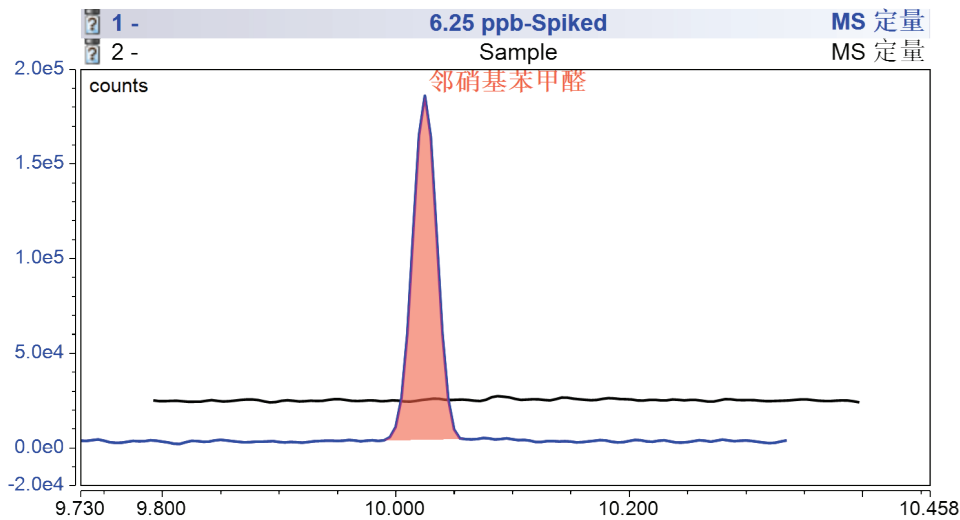


图5 样品、加标样品溶液重叠谱图

4. 结论

本文采用配置AEI源的TSQ 9610三重四极杆气质联用仪对基因毒性杂质邻硝基苯甲醛进行了方法学验证，结果表明，在邻硝基苯甲醛1.25~100 ng/mL浓度范围内， R^2 大于0.999，线性关系良好，在1.25 ng/mL与6.25 ng/mL浓度下，连续进样六次邻硝基苯甲醛峰面积RSD均小于5%，重复性良好，回收率在80~120%之间，以上方法学均满足法规要求。定量限0.87 ng/mL，检出限0.125 ng/mL，灵敏度高。可将该方法应用于制药中邻硝基苯甲醛的检测。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC