

赛默飞色谱及质谱客户解决方案系列

遗传毒性杂质应用文集

目录

前言	1
遗传毒性杂质解决方案 GC/GCMS 篇.....	2
采用 AEI 源配置的 TSQ 9000 气质联用直接进样法分析十二种亚硝胺.....	3
气相色谱质谱技术同时分析药品中八种磺酸酯类基因毒性物质.....	7
赛默飞三重四极杆气质联用仪 TSQ 8000 Evo 应用于药物中低含量基因毒性杂质分析研究	10
药品中水合肼的分析.....	15
基于 GC Orbitrap/MS 技术的高效基因毒性杂质筛查分析.....	19
遗传毒性杂质解决方案 LC/LCMS 篇.....	23
基于 HPLC-CAD 联用技术测定阿罗洛尔中的遗传毒性杂质 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇	24
液相色谱法测定药品中基因杂质对甲苯磺酸乙酯	28
柱后碘衍生法液相色谱法检测黄曲霉毒素	31
UHPLC-紫外检测器与单四极杆质谱检测器联用进行药物活性成分中基因毒性杂质定性及定量分析.....	33
基因毒性杂质 N-亚硝基化合物的液相色谱质谱检测分析.....	38
全新三重四极杆 TSQ Fortis 测定非衍生芳基磺酸酯类基因毒杂质	42
药典中黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 的液相色谱质谱检测分析	46
Q Exactive 高分辨质谱检测分析药物中 6 种亚硝胺类基因毒性杂质	50
DGLC-Q Exactive 在线除盐高分辨液质联用在药物杂质鉴定中的应用	54
遗传毒性杂质解决方案 IC 篇.....	60
柱切换离子色谱法测定厄贝沙坦中的叠氮根离子	61
离子色谱法电导检测考来维仑中有机胺杂质.....	64
拓展应用：硼酸及其衍生物潜在遗传毒性研究.....	68
离子色谱 - 电感耦合等离子体光谱联用检测硼砂（硼酸）	69

前言

遗传毒性杂质 (也叫基因毒性杂质, GTIs), 通常是指能够引起 DNA 突变、染色体断裂或者 DNA 重组的物质, 可经适当基因毒性试验模型验证 (如 Ames 试验), 与此同时, 这类物质还可能导致肿瘤的发生。来源主要为原料药合成过程中的起始物料、中间体、试剂和反应副产物, 此外, 药物在合成、储存或者制剂过程中也可能因降解而产生基因毒性杂质。

遗传毒性杂质检测存在性质差异大, 灵敏度需求高等难题, 实验室需要配备多种分析技术设备, 比如胍类物质主要有液相法 (LC)、液质法 (LC-MS) 及气质法 (GC-MS); 叠氮类化合物目前中国药典 2020 版采用离子法 (IC) 检测; 基于赛默飞变色龙软件的分析平台, 可以搭建网络版环境, 可控制液相、气相、离子色谱、液质、气质等硬件, 为客户提供一站式的愉悦服务体验, 具有兼容性广、合规性好、操作便捷性高以及管理培训成本低等优点。与此同时, 赛默飞作为科学仪器服务行业引领者, 致力于解决各类分析技术难题, 本文集收集了赛默飞近几年代表性的遗传毒性应用案例并按照产线进行了分类整理, 期望能为广大分析工作者提供借鉴。



赛默飞遗传毒性杂质解决方案 GC/GCMS 篇



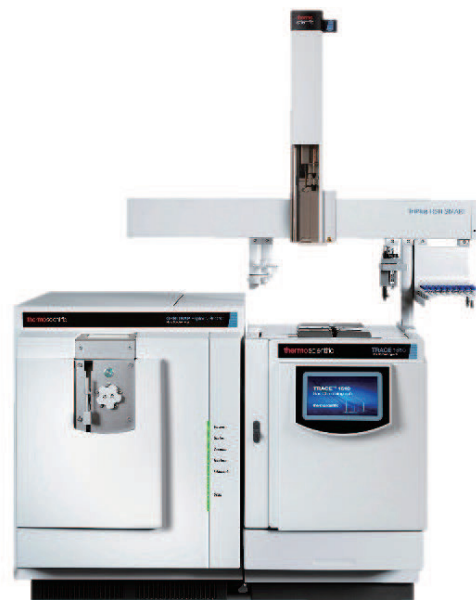
Trace 1610



ISQ 7610



TSQ 9610



Orbitrap Exploris GC 240

采用 AEI 源配置的 TSQ 9000 气质联用直接进样法分析十二种亚硝胺

摘要

本文采用赛默飞 AEI 源配置的 TSQ 9000 三重四极杆质谱仪建立了一种选择性强，灵敏度高的检测十二种亚硝胺的方法。验证结果表明该方法线性良好，重复性好，灵敏度高，可将其应用于制药领域中痕量亚硝胺的检测。

关键词

AEI; GC/MS/MS; 基因毒性杂质; 亚硝胺; 缬沙坦

引言

亚硝胺类化合物指含有亚硝基上氮原子与氨基上氮原子直接相连的化合物，目前已知的不同烷基取代的亚硝胺类化合物有 300 多种，约 90% 具有不同肿瘤诱导作用。近两年在制药领域亚硝胺事件层出不穷，亚硝胺的分析检测成为制药人关注热点之一。但鉴于亚硝胺限度低，种类多的现状，故方法开发过程中灵敏度是首要考虑要素，其次是在灵敏度的基础上尽可能提高制药分析人员的分析效率。赛默飞 AEI 源具有独特的结构设计，是一种新型的，具备超高稳定性与灵敏度的离子源。AEI 源灯丝位置不同于普通 EI 源，其灯丝采用与离子传输路径同向设计，此外专利 RF 透镜，全新电子束聚焦设计均保证了更聚焦的离子束，同时提高了离子化效率，从而大幅度提高仪器长久稳定性与灵敏度，长期稳定的实现痕量物质的检出。基于上述亚硝胺类化合物在制药领域的检测方法需求，结合赛默飞 AEI 源的技术特点，参考前期在 EI 源仪器配置下缬沙坦中十二种亚硝胺的检测方法，本文即采用 AEI 源配置的 TSQ 9000 分析了十二种亚硝胺，进行了系统进样精密度、线性、灵敏度考察，结果表明方法重复性好，灵敏度高，可将其应用于制药领域缬沙坦中亚硝胺的检测。

实验部分

1 仪器与试剂

Thermo Fisher Scientific™ AS1310 液体自动进样器；Thermo Fisher Scientific™ TRACE 1310 气相色谱仪；Thermo Fisher Scientific™ TSQ 9000 三重四极杆质谱仪；Chromeleon 7.2 数据处理系统；二氯甲烷（DCM）色谱纯。

2 溶液配制

标准曲线工作溶液：

准确称取十二种亚硝胺类化合物适量，用 DCM 配制到一定浓度作为标准品储备液。取以上标准品储备液适量，用 DCM 逐级稀释得系列标准曲线工作溶液，浓度分别为：5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0ng/mL（NPyr 标准曲线工作溶液的浓度分别为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、400.0ng/ml）。

灵敏度溶液：

取上述标准曲线工作溶液中 5ng/ml 溶液作为灵敏度溶液。

样品溶液：

精密称取缬沙坦样品 0.5g，加 DCM 溶液 5ml，涡旋 1min，超声 15min，4000rpm 离心 5min，取上清液适量，过 0.45 μm 滤膜后溶液作为样品溶液；

加标溶液：

精密称取缬沙坦样品 0.5g，加 25ng/ml 的标准品溶液 5ml，涡旋 1min，超声 15min，4000rpm 离心 5min，取上清液适量，过 0.45 μm 滤膜后溶液作为加标溶液。

3 仪器方法

表 1 气相与质谱参数

TRACE 1310 GC 气相参数	
进样体积 (μL)	1.0
衬管	超惰性不分流 PN:453A1925-UI
进样口温度 (°C)	230
进样模式	不分流进样 不分流时间 1 min 分流流量 10 mL/min, 恒压模式: 18.5psi
色谱柱	TG-WaxMS 30 m*0.25 mm*0.25 μm P/N: 26088-1420
程序升温	50 °C (保持 3.0 min), 15°C/min 升温至 130°C (保持 5.0 min), 20 °C/min 升温至 250°C (保持 11 min)
TSQ 9000 质谱参数	
传输线温度 (°C)	240
离子源温度 (°C)	280
数据采集模式	Timed-SRM
采集离子	各化合物的采集离子见表 1.2

表 2 亚硝胺类化合物 Timed-SRM 参数

化合物简称	中文全称	CAS	保留时间 (min)	定量离子对 (eV)	定性离子对 (eV)
NDMA	N- 亚硝基二甲胺	62-75-9	6.34	74.0>44.1 (6)	74.0>42.0 (14)
NMEA	N- 亚硝基甲基乙基胺	10595-95-6	6.90	88.1>71.0 (4)	88.0>42.1 (14)
NDEA	N- 亚硝基二乙胺	55-18-5	7.20	102.1>85.1 (4)	102.1>29.1 (6)
NEIPA	N- 亚硝基乙基异丙胺	16339-04-1	7.56	116.0>99.0 (6)	116.0>44.0 (10)
NDIPA	N- 亚硝基二异丙胺	601-77-4	7.85	130.0>88.0 (6)	130.0>42.0 (8)
NDPrA	N- 亚硝基二丙胺	621-64-7	8.62	130.1>113.1 (4)	70.0>43.1 (6)
NDBuA	N- 亚硝基二丁胺	924-16-3	11.09	116.1>99.1 (4)	116.1>74.1 (8)
NPIP	N- 亚硝基哌啶	100-75-4	11.48	114.0>84.1 (6)	114.0>41.0 (10)
NPyr	N- 亚硝基 - 吡咯	930-55-2	12.19	100.0>55.0 (6)	100.0>43.1 (8)
NMorph	N- 亚硝基吗啉	59-89-2	13.48	116.0>86.0 (4)	116.0>56.0 (10)
NDPhA	N- 亚硝基二苯胺	86-30-6	19.97	168.1>167.1 (12)	168.1>166.1 (26)
NDBeA	N- 亚硝基二苄胺	5336-53-8	22.64	91.0>65 (12)	91.0>39.0 (24)

4 实验结果

4.1 系统进样精密度、检测限与定量限

取 25ng/ml 的标准曲线工作溶液连续进样六次, 十二种亚硝胺的 T-SRM 谱图参见图 1, 可以看出, 十二种亚硝胺峰型良好。按外标法以定量离子对峰面积计算六次连续进样的相对标准偏差 RSD% 均小于 3% (表 3), 远小于 FDA 要求 (40ng/ml 六次重复进样精密度 RSD≤5%)。

取灵敏度测试溶液 (5ng/mL) 液体自动进样器进样, 各化合物信噪比如图 1 所示, 从实验数据可以看出, 在 5ng/mL 浓度下, 各亚硝胺类化合物的信噪比在 62.7-3228 之间, 远远优于 FDA 规定的系统适应性灵敏度测试溶液 (5ng/mL) 信噪比大于 10 的要求。按 S/N=10 为定量限, S/N=3 为检测限线性外推计算得各亚硝胺类化合物的检测限与定量限浓度见表 3。

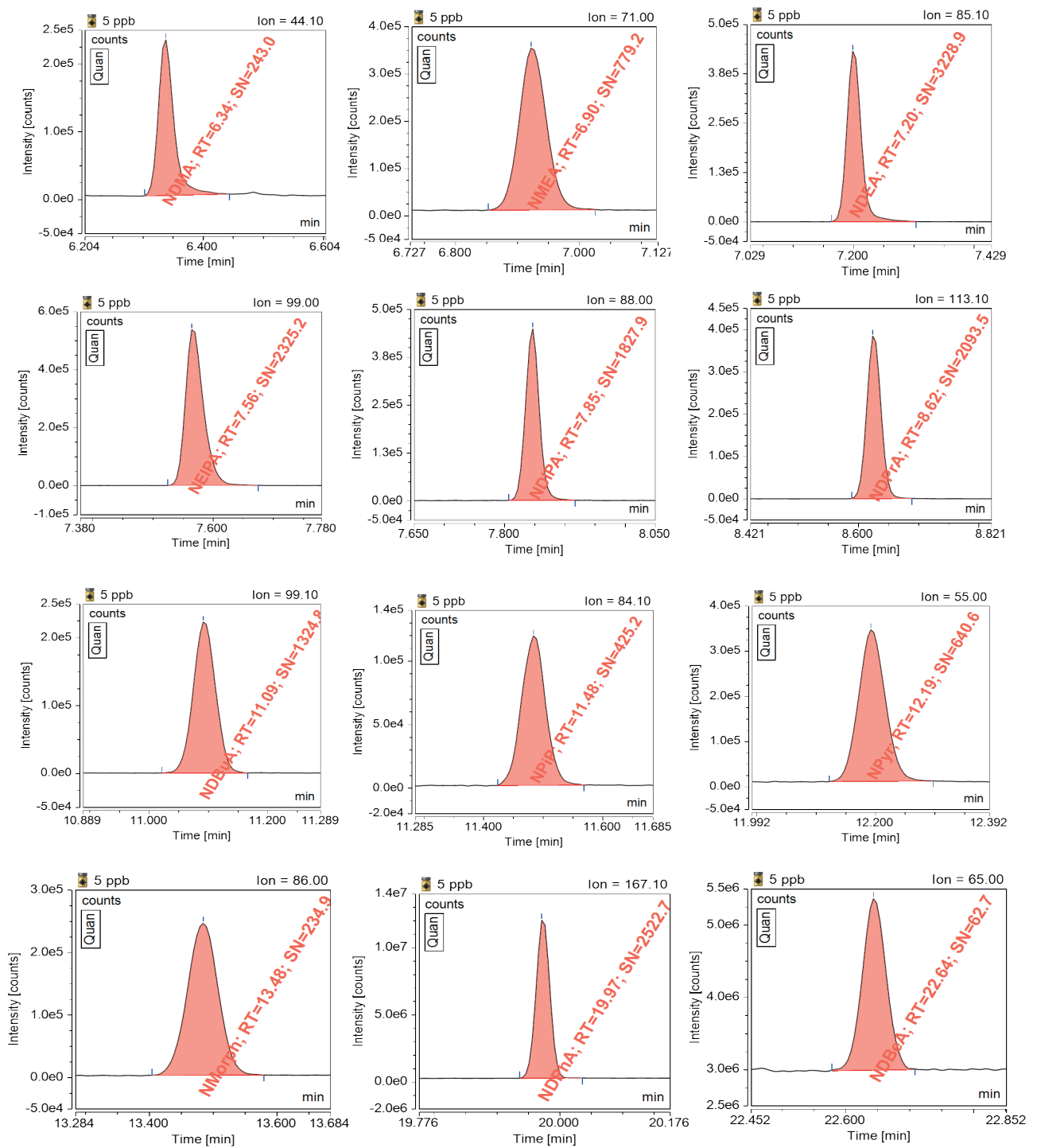


图 1 T-SRM 模式下 5ng/mL 十二种亚硝胺谱图

4.2 线性

取“2 溶液配制”项下标准曲线工作溶液进样，每个浓度点平行进样两次，以外标法计算亚硝胺线性，部分亚硝胺的线性曲线见图 2。十二种亚硝胺类化合物的标准曲线方程及相关系数见表 3。从实验数据可以看出，各亚硝胺在 5-200ng/ml (NPy 浓度范围在 10-400ng/ml) 浓度范围内，线性判定系数 R^2 均大于 0.9980，满足 FDA 要求。

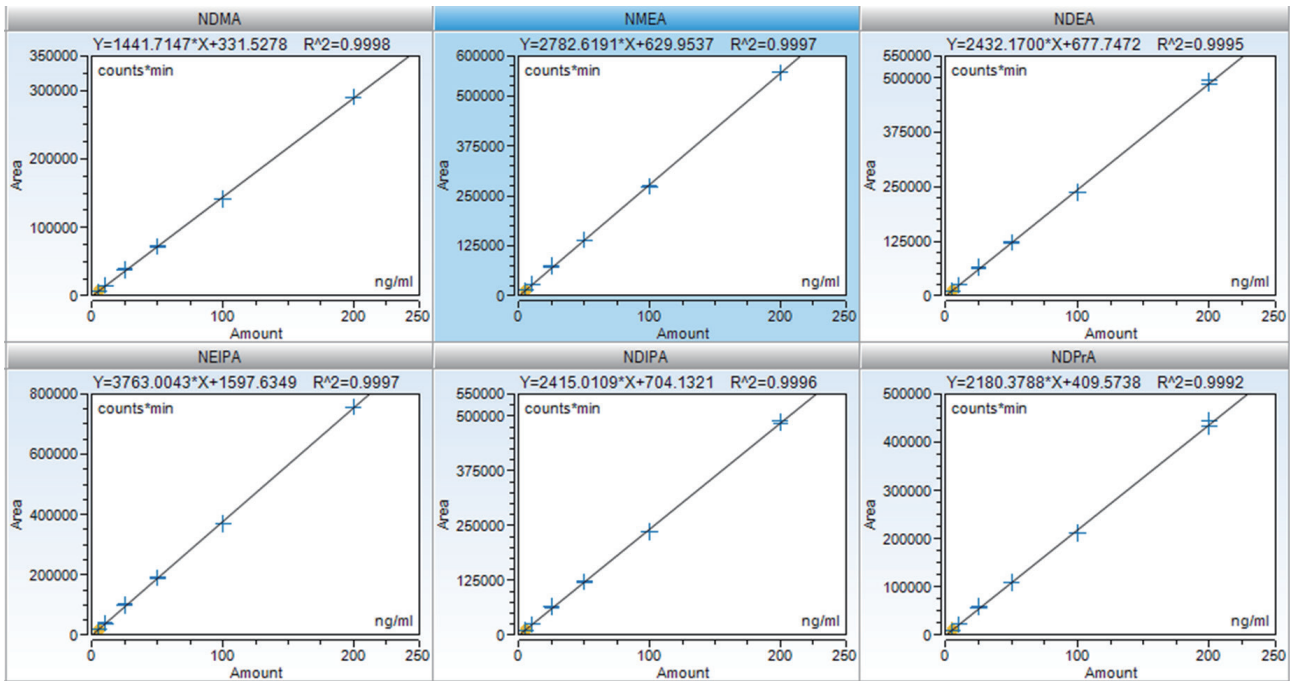


图 2 部分亚硝胺的线性曲线（5-200 ng/mL 范围）

表 3 亚硝胺类化合物的标准曲线、检测限与定量限、系统进样精密度结果

化合物名称	线性范围 ng/ml	线性方程	相关系数 R ²	5ng/ml 信噪比	检测限 (ng/ml)	定量限 (ng/ml)	RSD(% (n=6)
NDMA	5-200	Y=1441.71478*X+331.5278	0.9998	243.0	0.062	0.206	2.15
NMEA	5-200	Y=2782.6191*X+629.9537	0.9997	779.2	0.019	0.064	2.90
NDEA	5-200	Y=2432.1700*X+677.7472	0.9995	3228.9	0.005	0.015	0.93
NEIPA	5-200	Y=3763.0043*X+1597.6349	0.9997	2325.2	0.006	0.022	2.67
NDIPA	5-200	Y=2415.0109*X+704.1321	0.9996	1827.9	0.008	0.027	2.57
NDPrA	5-200	Y=2180.3788*X+409.5738	0.9992	2093.5	0.007	0.024	1.11
NDBuA	5-200	Y=2011.8489*X-409.1082	0.9983	1324.8	0.011	0.038	1.02
NPIP	5-200	Y=1160.9156*X-11.0078	0.9990	425.2	0.035	0.118	2.10
NPyr	10-400	Y=3812.12938*X+2381.0806	0.9989	640.6	0.023	0.078	2.02
NMorph	5-200	Y=2860.4133*X-479.8868	0.9989	234.9	0.064	0.213	1.98
NDPhA	5-200	Y=58222.3492*X-46246.5293	0.9981	2522.7	0.006	0.020	2.97
NDBeA	5-200	Y=19326.5701*X+3894.2971	0.9986	62.7	0.239	0.797	2.10

结论

本文中赛默飞 AEI 源大幅度提升了灵敏度。灵敏度提升在药物基因毒性杂质亚硝胺分析中的优势：首先对于溶解性差或对进样口有污染的原料药及制剂，在亚硝胺限度一定的条件下，可以大幅度降低样品浓度或简化样品前处理过程，从而一方面节约样品使用量，减少样品对于仪器进样口以及色谱柱的污染，另一方面降低的标准品浓度依然能够满足方法学验证要求；其次灵敏度的提升能够保证原料药或制剂中亚硝胺更低的检出量，从而保证药物质量安全；亚硝胺致癌风险较高，法规对其控制的关注也持续增长。灵敏度提升可以应对法规中其限度降低的风险。

气相色谱质谱技术同时分析药品中八种磺酸酯类基因毒性物质

摘要

烷基磺酸酯和芳基磺酸酯类化合物作为潜在性基因毒性杂质严重威胁人类健康，而其做为药品生产原料使用广泛，因此对于药品中磺酸酯的控制至关重要。本文采用乙酸乙酯提取，通过液体直接进样法分析药品中 8 种磺酸酯的分析方法开发。

关键词

基因毒性物质；药物；磺酸酯；GC-ISQ

引言

近年来基因毒性杂质成为人们关注的焦点，甲磺酸酯、苯甲磺酸等磺酸类物质与微量的低级醇在合成反应中生成烷基磺酸如甲磺酸甲酯（MMS）、甲磺酸乙酯（EMS）、异丙基甲磺酸酯（IMS）、正丁基甲磺酸酯（NBMS），以及芳基磺酸酯如苯磺酸甲酯（MBS）、苯磺酸乙酯（EBS）、对甲苯磺酸酯（MP-TS），这些物质可与 DNA 发生烷基化反应，从而可能成为引发癌症的诱因，因此控制药物中该类杂质的毒理学关注阈值（TTC）水平非常重要，欧洲医药评价署（EMA）发布了关于基因毒性杂质的最大摄取量为 1.5 $\mu\text{g}/\text{d}$ 。这些潜在基因毒性的存在引起管理机构的高度重视，为防止奈非那韦事件的发生，EMA 首先实施详细指南控制杂质限度，美国食品和药物管理局（FDA）随后颁布指南草案，国际药品注册协调会议（ICH）也对基因毒性杂质做出限度规定，《欧洲药典》增补版 7.3 明确指出采用衍生化法检测药物中 MMS、EMS、IMS (2.5.38)。甲磺酸酯基的存在可以使 C—O 键之间变的活泼，发生断裂后生成碳正离子而具有烷化作用。基于对此认识，人们开始研究磺酸酯类化合物，希望找到有效的抗肿瘤药物，从中发现了白消安（Busulfan，马利兰），其结构中含有 2 个甲磺酸基团，为双功能的烷化剂，可以与 DNA 中的鸟嘌呤集合，产生分子内交联，从而使肿瘤细胞死亡。临床上对慢性粒细胞白血病的疗效显著，主要的不良反应为消化道反应及骨髓抑制。

目前因基因毒性物质的概念广泛，所含种类繁多，对于磺酸酯类的物质除去其治癌作用外，其它的性质尚未探知，而其致癌致畸的作用却是不可否认的。对于欧洲药典中采用衍生化法测定 MMS、EMS、IMS，如果某药品中含有甲基、乙基、异丙基类物质，则该方法不可避免的存在其测定局限性，本方法主要提出了一种采用液体直接进样法分析药物中 8 种磺酸酯的 GCMS 方法，方法快速、有效，灵敏度满足对微量分析的要求。

实验部分

1 仪器与试剂

Thermo Scientific™ Trace 1310-ISQ, SSL 进样口, AS1310 自动进样器；HPLC 级乙酸乙酯、甲醇、无水硫酸钠、8 种甲基磺酸酯标准品。

2 溶液配制

标准溶液：0.05 g 8 种磺酸酯于 50 mL 乙酸乙酯定溶制得标准储备液。

标准工作液：取以上标准储备液稀释至 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

样品前处理：称取某药品 0.05 g 于试管中，准确加入 2 mL 乙酸乙酯充分振荡，超声提取 10 min。

水溶性药品：

称取某药品 0.05 g 于试管中，准确加入 2 mL 甲醇:水(5:1)充分振荡，超声提取 10 min，再以 2 mL 乙酸乙酯充分超声提取，过无水硫酸钠，以 55 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹致尽干，以 2 mL 乙酸乙酯定容。将以上处理液，过滤膜上 GCMS 分析。

加标样品的制备：

将药品研磨制成粉末，称取该药品 0.5 g，加入 40 μL 的 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准稀释液，混均，制得含 8 种磺酸酯 0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的加标样品。

3 仪器方法

进样口温度：250℃；进样模式：splitless，不分流时间：1min；进样体积：1 μL，载气：氦气，1.0mL/min；

色谱柱：TG-35 MS, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μm P/N: 26094-1420; S/N: 1082682;

柱温：50℃（1 min），10℃ /min 到 280℃（5 min）；离子源：温度 280℃，Transfer line : 280℃；扫描方式：SIM 模式。

4 实验结果

4.1 标准品色谱图及样品加标色谱

磺酸酯为药物生产中的副产物，本方法的分析目标物及其定性、定量离子如下表 1。本方法选择某样品测定，其中未含有 8 种磺酸酯，且该药品中无其它物质对所分析物质干扰，如下图 1 为空白、某样品及其加标色谱图。

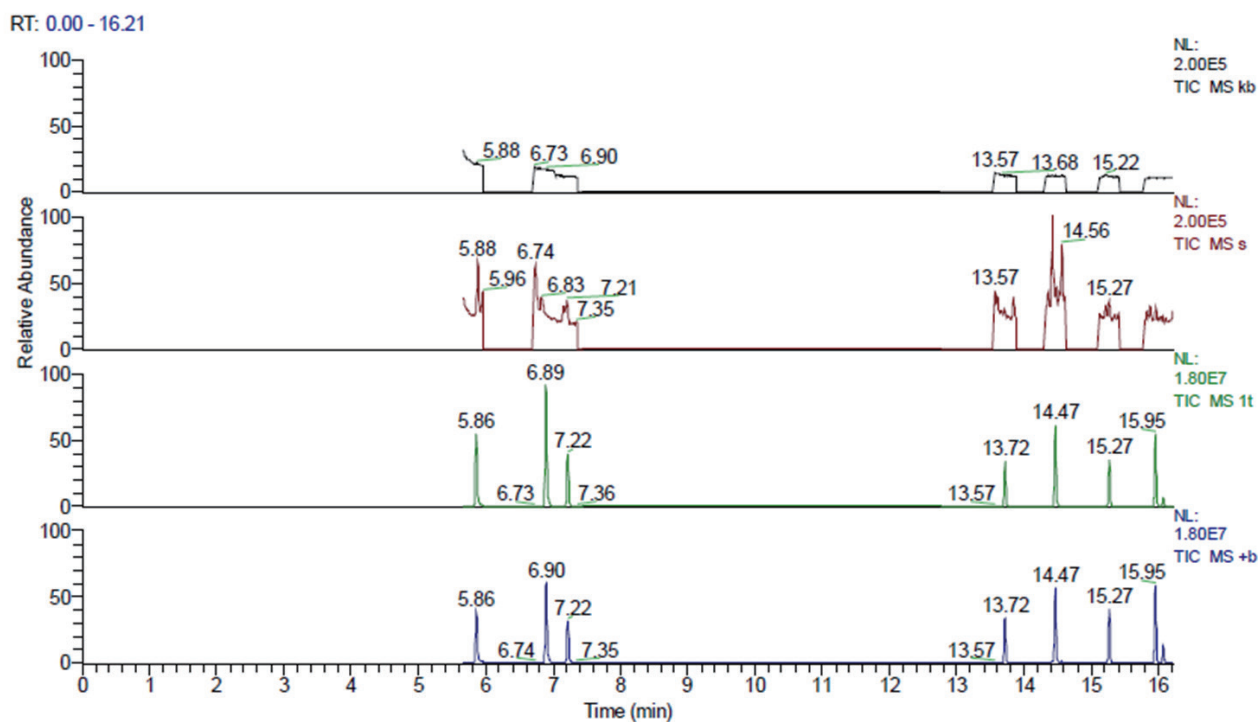


图 1 空白（上）、样品（中上）、标准品（中下）、样品加标浓度为 20 μg/g 的 TIC 图（下）

表 1. 分析物保留时间及定性定量离子

编号	化合物	CAS	保留时间	定量离子	定性离子
1	甲基磺酸甲酯	66-27-3	5.81	79	65\80
2	甲基磺酸乙酯	62-50-0	6.87	79	59\97
3	甲基磺酸异丙酯	926-06-7	7.20	123	59\79
4	苯磺酸甲酯	80-18-2	13.72	77	141\172
5	苯磺酸乙酯	515-46-8	14.47	77	141\186
6	对甲苯磺酸甲酯	80-48-8	15.27	91	155\186
7	对甲苯磺酸乙酯	80-40-0	15.96	155	91\200
8	对甲苯磺酸异丙酯	2307-69-9	16.07	214	155\172\91

4.2 线性、检出限及 RSD

配制浓度分别为：

10.0、20.0、50.0、100.0、200、500 μg/L 的校准溶液，采用上述方法分别进样分析，考察各组分在 10.0-500 μg/L 浓度范围内的线性。实验结果表明 8 种组分在 10.0-500.0 μg/L 线性关系良好，线性相关系数均大于 0.995（见表 2）。

对某样品添加混合标准溶液（加标浓度为 0.8 $\mu\text{g/g}$ 、20 $\mu\text{g/g}$ ），考察 8 种磺酸酯的加标回收情况。实验结果表明各组分的加标回收率均在 83.2-99.5% 之间，符合日常分析检测的要求。对 0.8、20 $\mu\text{g/g}$ 加标水平平行测定 6 次，平均 RSD 值在 4.7-9.3%，符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算各组份检出限，各组份仪器检出限在 5.0-12.0 $\mu\text{g/L}$ （见表 2）。

本方法能够满足欧洲药典中对甲基磺酸甲酯、乙酯、异丙酯的限量要求，同时对于其它 5 种磺酸酯也可以做到 0.24 $\mu\text{g/g}$ 。

表 2. 线性、检出限及 RSD 数据 (n=6)

化合物	线性方程	R^2	加标 ($\mu\text{g/g}$) 回收率 /%		仪器检出限 / $\mu\text{g/L}$	方法检出限 / $\mu\text{g/g}$	RSD /%
			0.8	20.0			
甲基磺酸甲酯	$Y=199269+7825.1X$	0.9996	96.5	98.7	5	0.1	7.4
甲基磺酸乙酯	$Y=-84075.5+15711.8X$	0.9996	94.8	91.5	10	0.2	5.9
甲基磺酸异丙酯	$Y=-27662.5+6271.33X$	0.9996	93.5	96.4	10	0.2	8.0
苯磺酸甲酯	$Y=4418.25+6552.98X$	0.9956	88.7	93.2	12	0.24	6.5
苯磺酸乙酯	$Y=-96426.9+11213.4X$	0.9971	89.0	94.2	10	0.2	4.7
对甲苯磺酸甲酯	$Y=75682.9+6650.87X$	0.9990	90.5	99.5	12	0.24	7.3
对甲苯磺酸乙酯	$Y=-148887+9801.48X$	0.9974	94.6	92.7	10	0.2	5.5
对甲苯磺酸异丙酯	$Y=-680.967+94.0094X$	0.9985	83.2	90.5	10	0.2	9.3

4.3 方法的优势

在 EP 的方法中对于甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、异丙基甲磺酸酯 (IMS) 采用衍生化法得到碘甲烷、碘乙烷、碘异丙烷，通过顶空方式进行分析衍生产物来对原药品中 MMS、EMS、IMS 的量。此方法存在一定的局限性，当药物中含有易与碘形成碘代烷的其他类型化合物时造成假阳性，如下图 2，某药品中并未检出甲基磺酸酯，采用 EP 方法测得其中含中甲基磺酸乙酯 (0.8 $\mu\text{g/g}$)、异丙酯 (2.6 $\mu\text{g/g}$)，均已超过本方法的定量限，因药品中可能含有某种乙基、异丙基化合物而使其测得结果含有碘乙烷、碘异丙烷。

另外对于 EP 方法中采用顶空衍生化法，其衍生过程需配制衍生化试剂进行衍生，过程繁多复杂，易造成偏差。本方法采用液体法直接进样法，前处理简单也是此方法的一个优势。

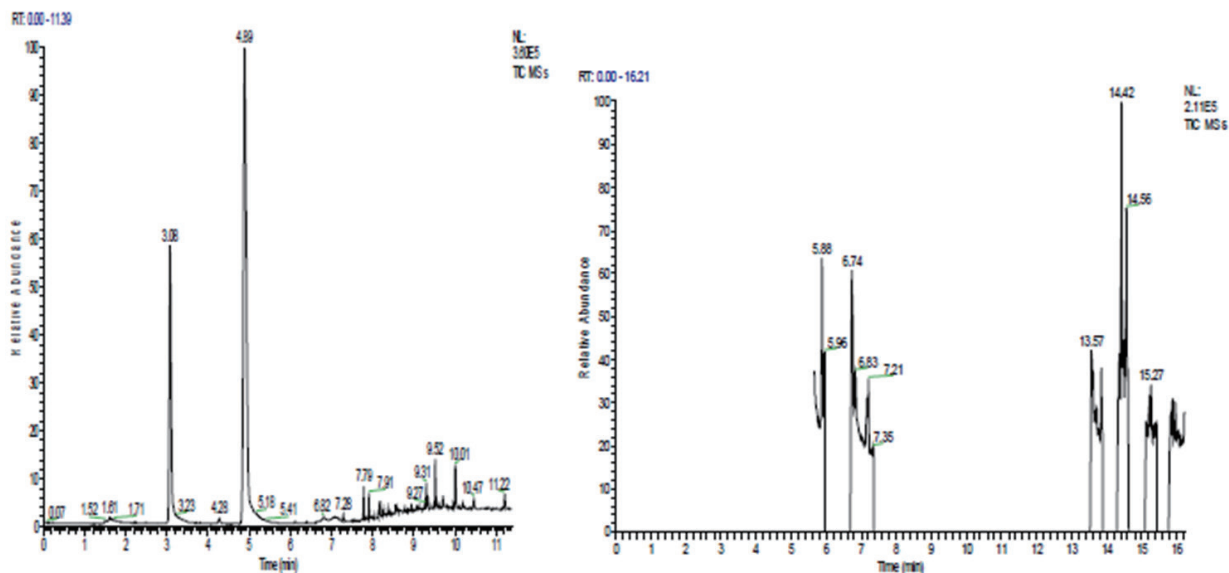


图 2. 同一样品 EP 方法测得其含碘甲烷、碘乙烷（左图），本法测得并未含有甲基磺酸甲酯、甲基磺酸乙酯（右图）

结论

本实验采用赛默飞世尔科技 Trace1300GC 配 ISQ 质谱检测器分析药品中的 8 种基因毒性物质——磺酸酯，样品通过乙酸乙酯超声提取可以完成药品中磺酸酯的萃取。同时对于 EP 方法中提出的顶空衍生化方法，其本身存在一定的局限性，本方法通过直接进样分析目标物，可以去除假阳性的影响，满足检测要求，本方法准确，灵敏度高。

赛默飞三重四极杆气质联用仪 TSQ 8000 Evo 应用于药物中低含量基因毒性杂质分析研究

摘要

本文应用赛默飞三重四极杆气质联用仪 TSQ 8000 Evo 建立了药物中三种常见杂质（4-硝基卞醇、氨基乙腈盐酸盐及 4-氯乙酰乙酸乙酯）的分析方法。以 4-硝基卞醇为例，其是合成抗生素亚胺培南的主要原料。而 4-硝基卞醇对眼睛、呼吸系统和皮肤有刺激性，甚至部分毒理学数据表明其具有一定的致突变性。

关键词

TSQ 8000 Evo; GC/MS/MS; 基因毒性杂质; 4-硝基卞醇; 氨基乙腈盐酸盐; 4-氯乙酰乙酸乙酯

引言

药品安全直接关系人类健康，近年来成为研究热点。以抗生素类药物为例，它的使用挽救了无数人的生命。与此同时，临床不良反应也客观存在，每年有数以万计患者的健康乃至生命与相关药源性疾病有关。这些不良反应的发生除与药物本身的药理活性有关外，与药品中的杂质尤其是毒性杂质也有很大关系。而药物的生产工艺决定了其杂质来源各异、种类繁多、成份复杂且含量较低。基因毒性杂质是指直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌作用的物质。常用的缩写为 PGLs 和 GTLs。可能产生基因毒性杂质的环节为：1) 新药合成；2) 原料纯化；3) 存储运输（与包装物接触）等。有关基因毒性杂质的问题，通常使用相关指南，如 2007 年实施的 EMEA（欧洲药品局），该指南为限制新活性物质中的基因毒性杂质提供了解决问题的框架和具体作法。2008 年 12 月 FDA 发布的 Guidance for industry--Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products:Recommended Approaches. 主要内容：1) 指南发布的背景；2) 原料药和制剂中的基因毒性杂质生成的预防方法；3) 基因毒性杂质的分析方法、处理方法和减少方法等；4) 上市申请和临床研究申请的可接受限度；5) 草药原料药和制剂中基因毒性杂质的评估指南。这里有必要引入 TTC 概念，TCC Threshold of Toxicological Concern: 毒性物质限量，也叫做毒理学关注门槛。一个未知基因毒性数据杂质的 TTC=1.5 微克/天。因此，有必要建立一种高灵敏度、高选择性的基因毒性杂质分析方法。

实验部分

1 仪器与试剂

质谱仪：TSQ 8000 Evo 质谱仪（赛默飞世尔科技，美国）；

气相色谱仪：Trace 1310 气相色谱配 AI 1310 自动进样器（赛默飞世尔科技，美国）；

试剂：甲醇；

2 溶液配置

甲醇配制混标，记为“母液”。4-硝基卞醇、4-氯乙酰乙酸乙酯及氨基乙腈盐酸盐浓度分别为 2.56 ppm、10 ppm、3.75 ppm。甲醇稀释母液，分别稀释 450 倍（记为 Std-1）及 2500 倍（记为 Std-2）

表 1 混标浓度 (µg/L)

浓度	4-硝基卞醇	4-氯乙酰乙酸乙酯	氨基乙腈盐酸盐
Std-1	5.69	22.22	8.33
Std-2	1.02	4.00	1.50

3 仪器方法

色谱柱：TG-WAX MS 30 m*0.25 mm*0.25 µm 毛细管色谱柱；

柱温箱：50 °C (1 min) _10 °C /min_220 °C _20 °C /min_250 °C (3 min) ；

进样口：不分流进样 (1 min)，进样口温度 200 °C；

载气流速：1.2 mL/min (恒流)

进样体积: 1.0 μ L

传输线温度: 250 $^{\circ}$ C; 离子源温度: 300 $^{\circ}$ C

扫描方式: 定时扫描 -SRM 模式 (Timed-SRM)

4 实验结果

4.1 AutoSRM 优化方法

AutoSRM 是赛默飞独有的方法优化功能。在进行二级离子对优化时, 一般会涉及到多种仪器方法编辑 (全扫描、子离子全扫描、选择反应监测扫描)、进样序列编辑、最佳离子与碰撞电压的选择。这个过程相当繁琐和复杂, 如果不能实现自动化, 实验人员工作量会大大增加。AutoSRM 功能将所有过程完全实现自动化衔接, 实验人员无需编辑复杂的仪器方法和序列, 只需在已给出的一级离子或二级离子中选择合适的即可。甚至一针进样可以同时优化 10 个不同碰撞电压, 大大提高实验效率。一般来讲, 实验人员只需对混标进样三次, 即可完成全部化合物的质谱方法参数, 包括离子对信息及碰撞能量的优化。

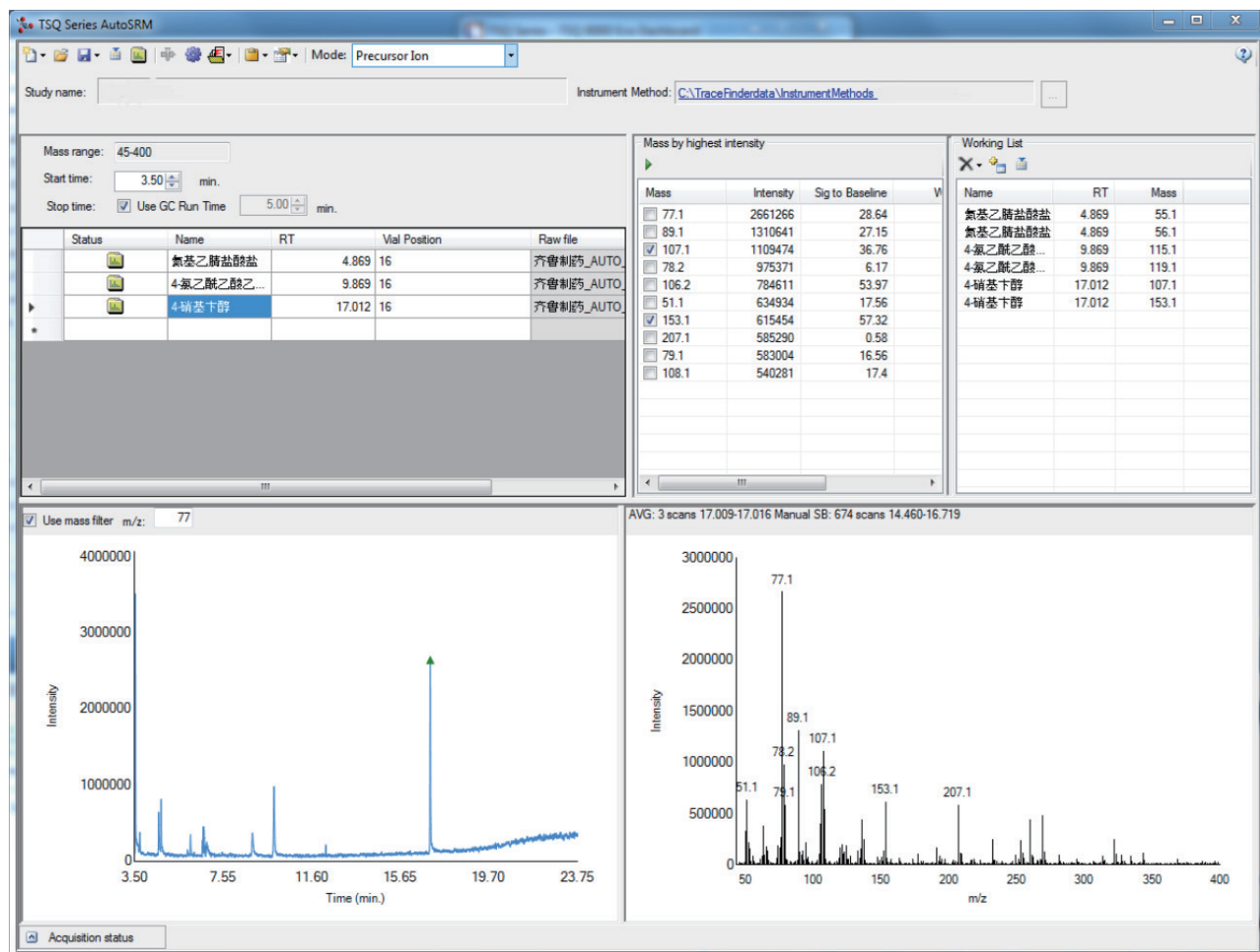


图 1 前体离子优化

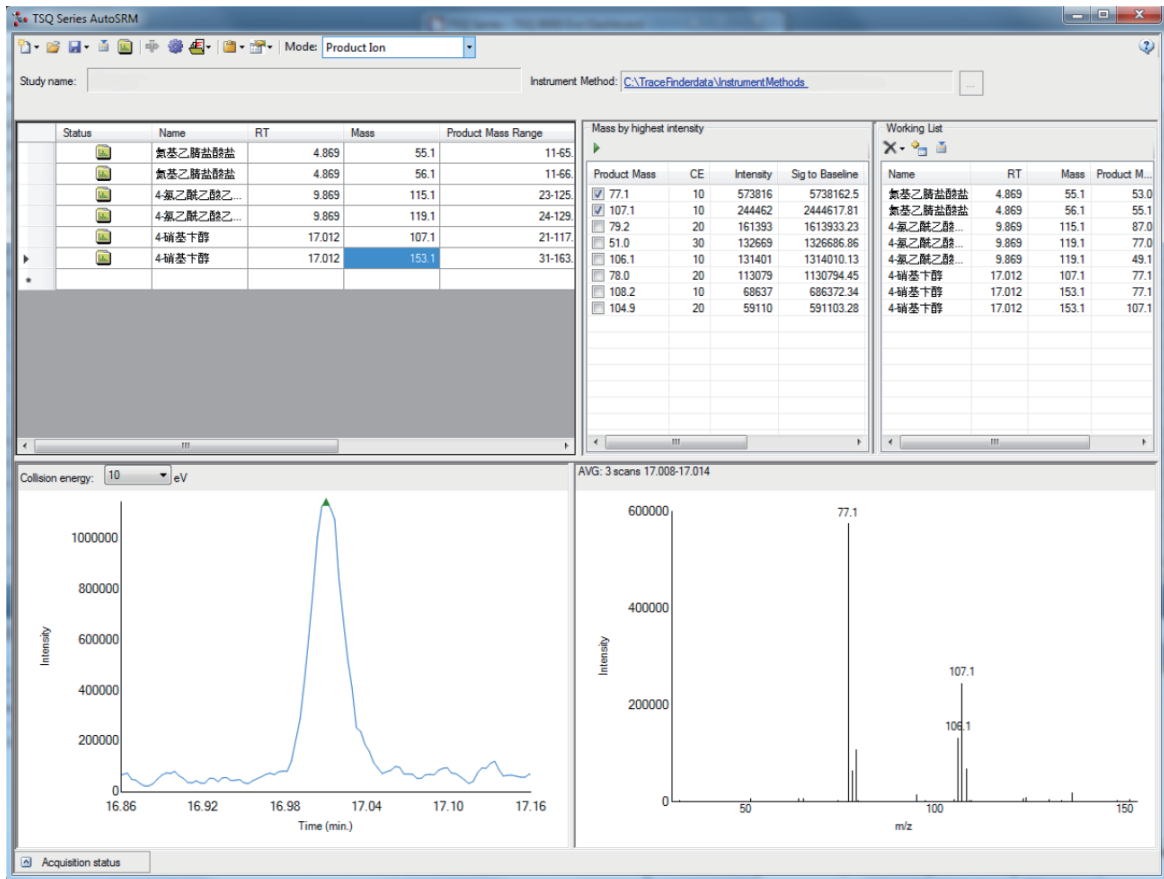


图 2 子离子优化

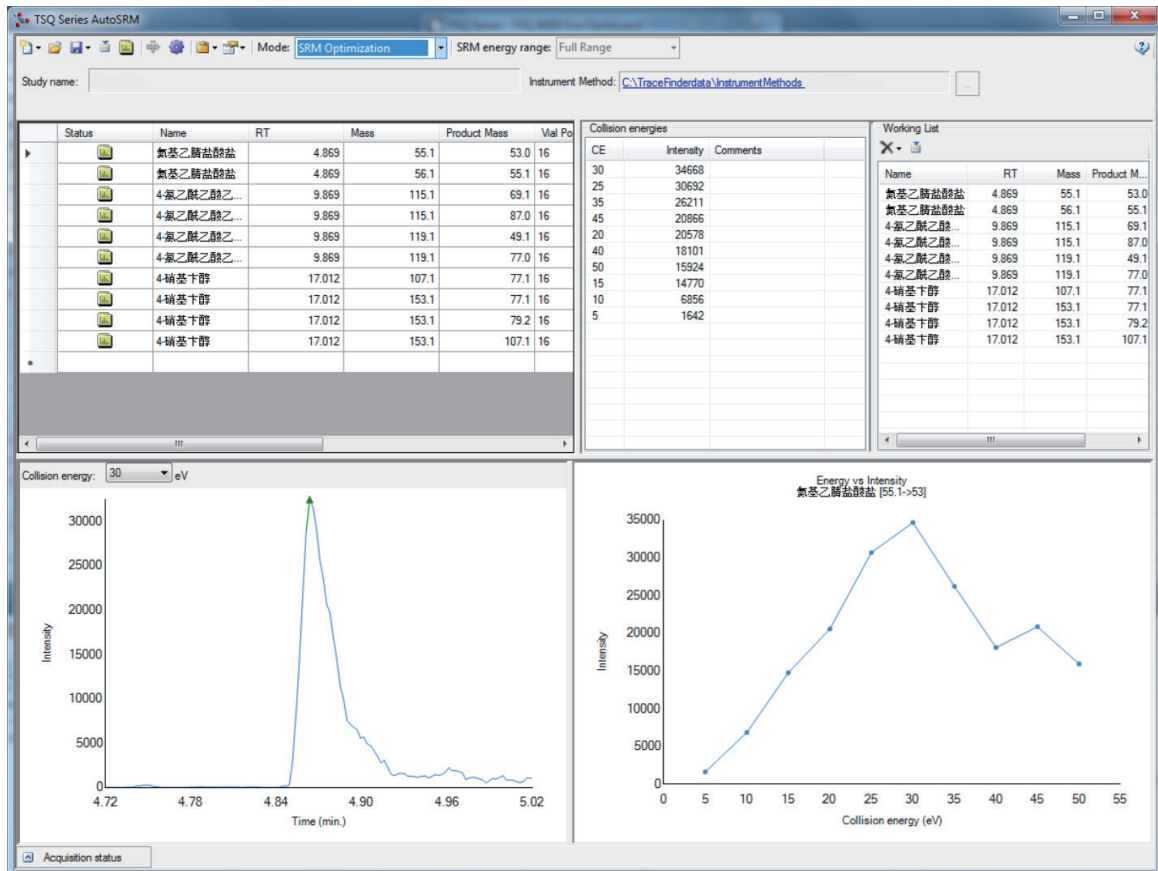


图 3 碰撞电压优化

4.2 灵敏度测试

表 2 灵敏度实验结果

混标	化合物名称	峰面积	信噪比
Std-1	4- 硝基卞醇	121954.89	546.08
Std-2	4- 硝基卞醇	17221.03	213.81
Std-1	4- 氯乙酰乙酸乙酯	45645.13	277.98
Std-2	4- 氯乙酰乙酸乙酯	5966.91	195.03
Std-1	氨基乙腈盐酸盐	97176.22	616.99
Std-2	氨基乙腈盐酸盐	18819.50	215.91

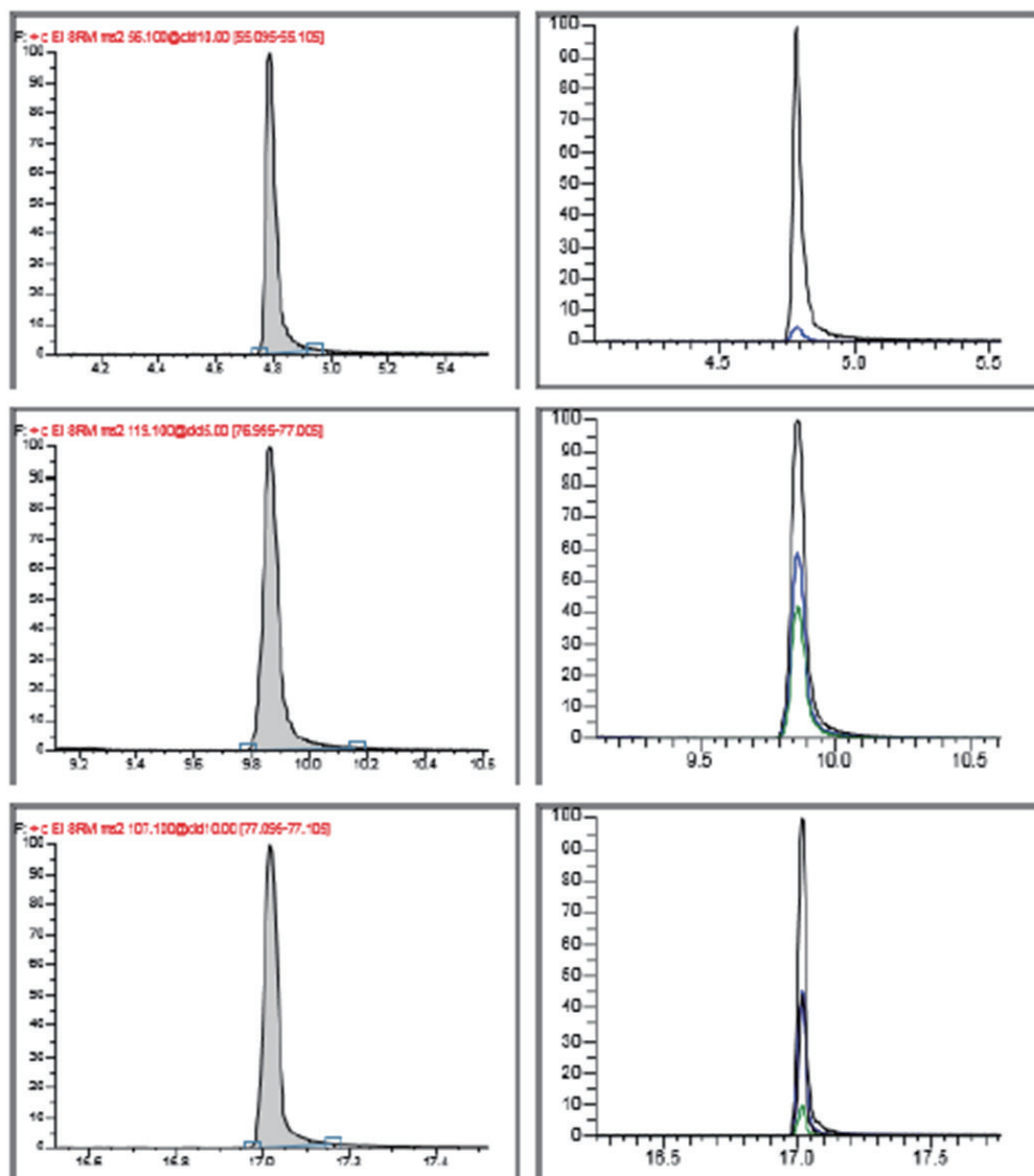


图 4 混标 Std-2 的色谱图

4.3 非目标物分析

气质进行非目标物分析时，往往是全扫描结合 NIST 等商业谱库进行。去卷积功能可以发现更多化合物，但从其中筛出特征性组分的难度随着化合物数量的增加而显著增加。Tracefinder 工作站的 unknown screening 插件，在去卷积及谱库检索功能的基础上可对样品进行差异分析。

采用分流进样，Fullscan 全扫，分别采集仪器空白、溶剂空白以及不同样品。利用该软件进行峰对齐并做热图分析。组分的响应越大，热图显示的颜色越深。而颜色相差越大代表该组分在不同样品之间的差异也越大。也可将峰对齐结果直接导出，利用第三方统计学软件进行相关分析。由此，可快速找出样品特征组分，大大提高了工作效率。

Peak ID	Retention Time	M/Z	blank-1 MS Area	blank-2 MS Area	methanol-1 MS Area	methanol-2 MS Area	sample1 MS Area	sample2 MS Area
1	6.04	58.08	0	0	0	6,110	136,060	1,239,195
2	6.12	103.12	0	0	0	13,292	224,852	192,740
3	6.32	58.08	0	0	0	5,662	136,060	268,039
4	6.79	89.08	0	0	0	4,724	13,806,654	17,414,163
5	6.94	82.10	0	0	0	11,588	542,434	546,421
6	6.94	83.11	0	0	0	9,601	746,969	929,137
7	7.00	89.08	0	0	0	5,051	1,125,051	28,590
8	6.97	83.11	0	0	0	5,860	746,969	929,137
9	7.32	53.07	0	0	0	4,679	698,562	1,299,397
10	7.28	67.07	0	0	0	6,541	213,171	31,618
11	7.39	53.07	0	0	0	4,679	664,956	1,580,774
12	7.40	69.11	0	0	0	13,383	842,179	1,447,577
13	7.45	83.11	0	0	0	5,931	19,815,564	16,826,878
14	7.41	82.10	0	0	0	28,725	6,114,599	7,150,389
15	7.44	85.11	0	0	0	7,485	1,110,945	1,241,661
16	7.49	97.14	0	0	0	8,645	242,804	514,862
17	7.51	73.12	0	0	0	48,258	551,855	782,380
18	7.53	68.09	0	0	0	5,804	4,973,092	6,460,458
19	7.54	82.10	0	0	0	40,871	7,069,760	8,579,637
20	7.54	58.09	0	0	0	4,893	7,813,805	10,111,817
21	7.55	73.12	0	0	0	65,228	551,855	782,380
22	7.58	45.19	0	0	0	22,518	66,139	270,288
23	7.59	124.13	0	0	0	3,111	172,205	528,399
24	7.96	97.13	0	0	0	8,545	7,078,995	8,233,751
25	7.97	94.11	0	0	0	3,405	386,046	521,716
26	7.98	82.10	0	0	0	8,656	7,869,724	10,024,705
27	7.99	69.11	0	0	0	7,992	1,187,011	1,504,128
28	7.99	71.10	0	0	0	5,292	3,292,079	3,936,211
29	8.00	100.11	0	0	0	1,144	40,580,491	45,058,198
30	8.01	99.11	0	0	0	2,521	46,621	505,534
31	8.02	82.09	0	0	0	8,495	7,869,724	10,024,705
32	8.03	89.08	0	0	0	6,337	27,162,764	5,929,092
33	8.04	113.10	0	0	0	2,264	454,135	750,692
34	8.05	99.11	0	0	0	3,716	46,621	359,125
35	8.08	99.12	0	0	0	3,716	20,742,784	359,125
36	8.09	113.07	0	0	0	1,782	454,135	605,651

图 5 热图分析部分结果

表 3. 部分化合物定性检索结果

Peak ID	Compound Name	SI	RSI
peak @ 7.44 85.11	Isothiazole	905	971
peak @ 7.49 97.14	1-Butyne, 3-ethoxy-3- methyl-	875	999
peak @ 7.55 73.12	Formamide, N,N- dimethyl-	892	995
peak @ 7.96 97.13	1H-1,2,3-Triazole-4- carboxaldehyde	818	948
peak @ 8.05 99.11	1,3-Propanediamine, N,N',2,2-tetramethyl-	986	999

4. 结论

三重四极杆气质联用仪以出色的选择性及高通量等特点，正逐步应用于药物中杂质尤其是具有基因毒性的杂质分析中。TSQ 8000 Evo 具有业界最高的灵敏度，其设计与推出旨在提高实验室效率。独特的 AutoSRM 功能，能够快速优化方法参数。Unknown Screening 插件能够在去卷积的基础上执行峰对齐及差异分析，可快速找出差异性或特征性组分。因此，TSQ 8000 Evo 非常适合药物中目标物定量及非目标物的定性分析。

药品中水合肼的分析

摘要

采用顶空法及直接进样法分析衍生产物，完成对药品中水合肼的分析方法开发，该方法通过气相色谱质谱法结合顶空进样方式分析不同溶解性药品中的水合肼，采用质谱法可以进一步对药品中的水合肼进行确证。

关键词

水合肼；气相色谱质谱法；Trace 1310-ISQ

引言

肼是一种无色发烟的、具有腐蚀性和强还原性的液体化合物，它是比氨弱的碱，通常由水合肼脱水制得。它是常用作制药原料，如合成氨基尿、异烟肼、呋喃西林盐酸阿齐利特，硫酸阿米卡星和他唑巴坦酸等，同时在肼还常用于生产多种农药，如植物生长调节剂，落叶剂及除草剂等。肼可对肝、肼可对肝、肾、血液等系统产生毒副作用。有数据显示，肼可能具有致癌作用。因此，要求药品中肼的残留量越来越低，如何快速、简便、高灵敏地监测生产过程中肼的残留量，一直是药物溶剂残留检测研究的一个问题。目前水合肼的气相色谱法一般采用直接和衍生化法。直接法是采用热导检测器分析，但其灵敏度低，另外水合肼是强碱性化合物，对柱子要求较高。衍生化法一般采用 2, 4-二硝基苯甲醛或乙酰丙酮来进行，此方法需要加额外的衍生化试剂。James R. Holtzelaw 采用丙酮作为衍生化试剂，对空气中存在的胍类化合物（胍、甲基胍、偏二甲胍）进行了分析，收到了良好的效果。本文用丙酮乙酸作为衍生化试剂，通过衍生化法完成对水合肼的衍生，采用顶空进样及液体直接进样法结合气相色谱质谱法药品中水合肼进行了分析，另外本文采用 Time-SIM 方式定量，灵敏度高，选择性好，样品前处理简单。

实验部分

1 仪器与试剂

Trace 1310-ISQ, SSL 进样口, Triplus-300 顶空自动进样器, 乙酸丙酮

2 溶液配置及样品前处理

2.1 顶空法进样

标准储备溶液:

取 0.03 g 肼溶于 10 mL (1:10) 乙酸丙酮, 制备 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。

标准溶液的配制:

配制 0.01、0.02、0.04、0.1、0.4 五个浓度水平, 称取标准储备液采用饱和 NaCl 水溶液稀释至 5mL, 其中加入 50 μL 50% NaOH 水溶液。

样品的前处理:

称取样品 0.01g, 溶于 4.85 mL 饱和 NaCl 水溶液中溶解后加入 100 μL 乙酸丙酮 (1:10) 超声 15min, 再加入 50 μL 50% NaOH 水溶液, 上 HS-GCMS 分析。

2.2 液体直接进样法

标准储备溶液: 标准品衍生化: 取 0.04 g 肼溶于 10 mL (1:10) 乙酸丙酮, 制备 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。

标准溶液的配制: 配制 0.01、0.02、0.04、0.1、0.4 五个浓度水平。

样品的前处理: 称取样品 0.01g, 加入 100 μL 乙酸丙酮 (1:10) 再溶于 2 mL 乙酸乙酯超声提取 10 min, 过滤膜, 上 GCMS 分析。

3 仪器方法

色谱柱: TG-wax MS B, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μm , P/N: 26086-1420; S/N: 1125129

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 220 $^{\circ}\text{C}$ (1min)

载气流速: 氦气, 恒流模式, 流速: 1.2 mL/min

3.1 顶空进样

Oven:90 $^{\circ}\text{C}$,manifold:120 $^{\circ}\text{C}$,Transfer line: 130 $^{\circ}\text{C}$ 平衡时间: 15min

Pressure mode: standard

Pressure:100kpa,pressure equilibration time :0.2min Loop mode: standard, loop fill time: 0.2min,loop equilibration time:0.2min

Purge parameters, purge time:1min, purge flow:20mL/min

进样模式: split, 分流比: 5: 1, 进样口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$;

进样体积: 1 mL

3.2 液体进样

splitless, 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 1 μL

4 实验结果

4.1 标准品色谱图及样品加标色谱图

水合肼为药物生产中的副产物, 本方法采用不同的方法分析水合肼, 如下图 1-2 分别为液体及顶空进样方式水合肼的 TIC 谱图, 由此图发现, 当采用顶空进样时干扰更少且灵敏度较好。本法采用 T-SIM 方式定量, 如图 3 为标准物质 T-SIM 谱图及空白样品加标色谱图, 其中下图为样品加标色谱图。

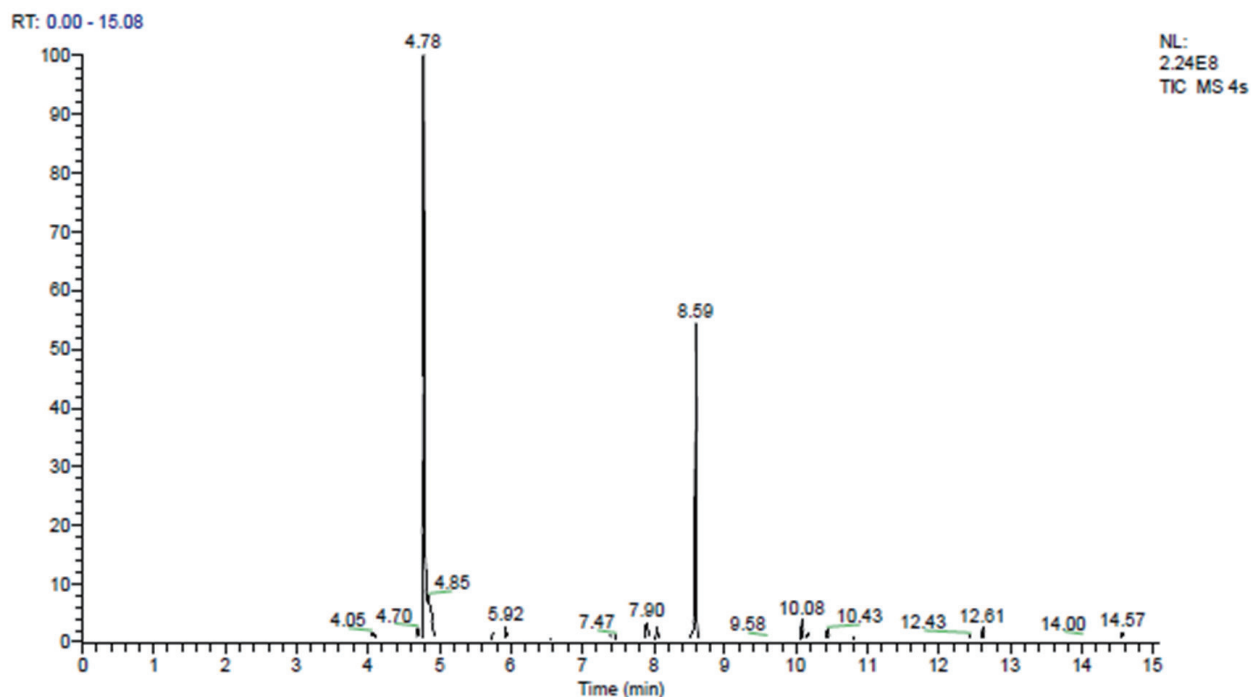


图 1 液体进样方式—2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水合肼衍生后 TIC 色谱图

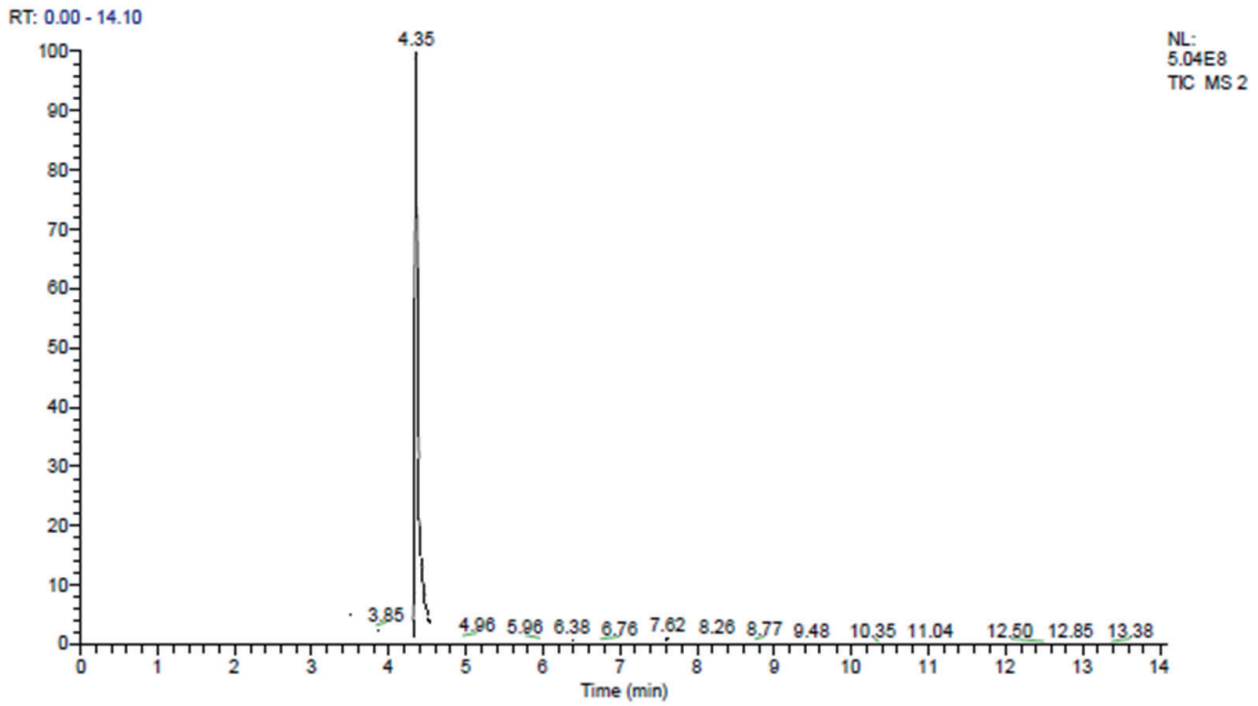


图 2 顶空进样方式—2.0µg/mL 水合肼衍生后 TIC 色谱图

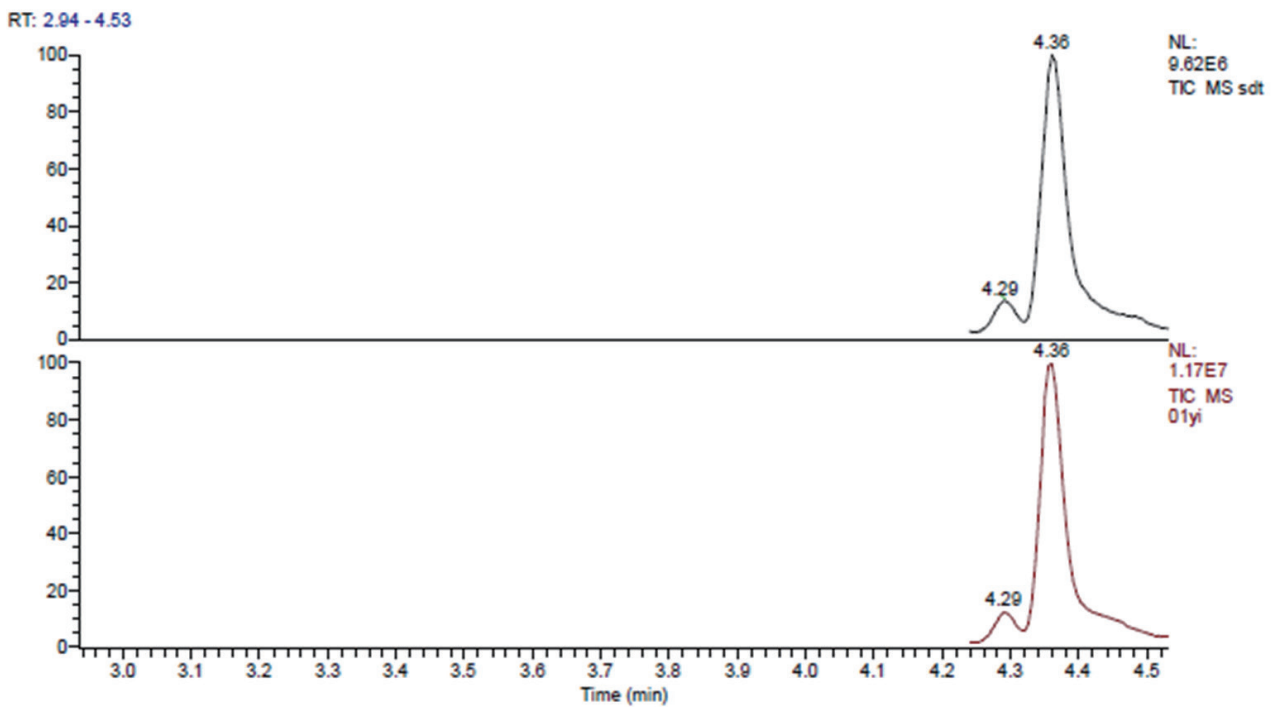


图 3 标准品、样品加标水合肼的 T-SIM 色谱图

4.2 线性、检出限及 RSD

4.2.1 液体进样法

配制浓度分别为：0.01、0.02、0.04、0.1、0.2µg/mL 的校准溶液，采用上述液体进样方法进样分析，考察各组分在 0.01-0.2 µg/mL 浓度范围内的线性。实验结果表明该衍生物在 0.01-0.2 µg/mL 内线性关系良好，线性相关系数为 0.9956，见下图 4。

对某样品添加混合标准溶液（加标浓度为 5.0 µg/g、50 µg/g），考察的加标回收情况。实验结果表明加标回收率为 82.0-93.0% 之间，符合日常分析检测的要求。对 5.0、50 µg/g 加标水平平行测定 6 次，平均 RSD 值在 4.8-8.3%，符合稳定性

要求。同时以三倍信噪比计算水合肼的检出限，测得仪器检出限在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

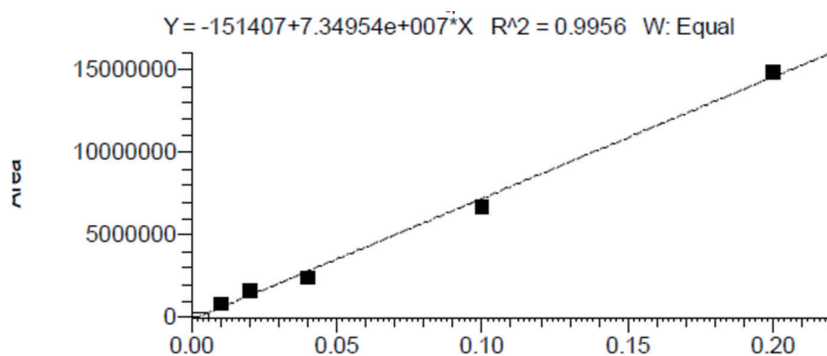


图 4 水合肼的液体进样方式线性

4.2.2 顶空进样法

配制浓度分别为：0.02、0.04、0.2、0.4、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的校准溶液，采用上述方法分别进样分析，考察各组分在 0.02-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的线性。实验结果表明该衍生物在 0.02-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性关系良好，线性相关系数均大于 0.999，见下图 5。

对某样品添加混合标准溶液（加标浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{g}$ ），考察的加标回收情况。实验结果表明加标回收率为 78.0-88.0% 之间，符合日常分析检测的要求。对 2.0、40 $\mu\text{g}/\text{g}$ 加标水平平行测定 6 次，平均 RSD 值在 4.9-9.3%，符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算水合肼的检出限，测得仪器检出限在 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

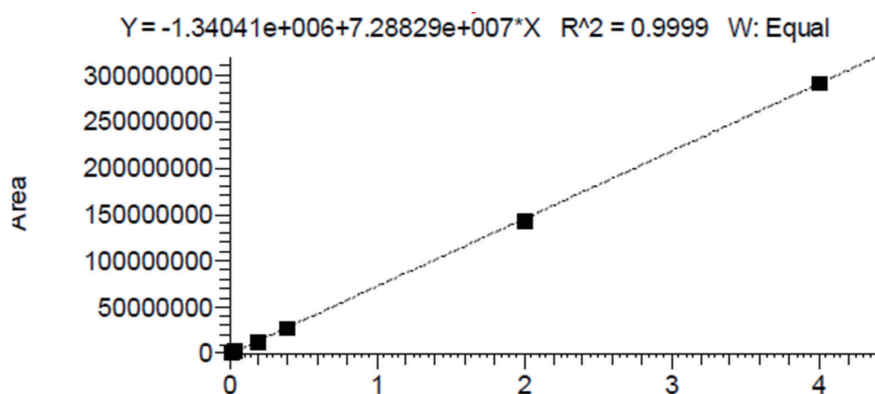


图 5 水合肼的顶空进样方式线性

4.3 实际样品测试结果

采用如下顶空进样法条件测定了几个市售药品，其中某药品中检测出含有该成份水合肼，测试谱图如下，含量为 37.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。如下表为测定三个样品结果。

表 1 未知样品测试结果

样品 AFTN-1	保留时间	测得值浓度 / $\mu\text{g}/\text{mL}$	样品中含量 / $\mu\text{g}/\text{g}$
20130202	4.37	<0.01	<5
20130204	4.37	0.075	37.5
20130201	4.37	<0.01	<5

结论

本实验采用赛默飞世尔科技 Triplus 300 顶空自动进样器结合 1300GC 配 ISQ 质谱检测器分析药品中的水合肼，样品通过衍生法分别采用顶空进样方式及液体直接进样方式，方法准确，灵敏度高，满足检测要求。

基于 GC Orbitrap/MS 技术的高效基因毒性杂质筛查分析

摘要

利用超高分辨气质联用 GC Orbitrap/MS 技术的高灵敏度特点，结合基因毒性物质专属谱库建立了药物中微量基因毒性物质的非靶向筛查方法。方法高效，高分辨过滤技术（HRF）能够快速锁定可疑物质；同时方法准确，通过 EI 及 CI 数据可锁定分子离子峰，结合小于 1ppm 的质量精度，可实现准确性。通过该方法对某原料药进行筛查，最终在 324 个峰里快速筛查出 N,N-二甲苯胺、抗氧化剂 264 以及邻苯二甲酸二烯丙酯三种基因毒性杂质。

关键词

GC Orbitrap/MS；HRF；基因毒性杂质

引言

基因毒性，是指污染物能直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌作用的程度。西药往往因工艺、包材等原因可能在新药合成、原料纯化及储存运输过程中产生或迁移基因毒性物质，例如甲磺酸奈非那非事件及亚硝胺事件。药物中基因毒性物质的检测，是药品质量的重要指标之一。因其危害之大，含量及限量之低，加之种类繁多，需要跨技术平台进行高灵敏度的综合分析。对于气质联用技术而言，中国药典及美国 FDA 出台了 HS-GCMS 及 GCMSMS 方法检测药物中亚硝胺的方法标准。新加坡政府更是推出二甲双胍中 NDMA 的 GC Orbitrap/MS 方法标准《Determination of N-nitrosodimethylamine(NDMA)in Metformin Products by HRAM-GCMS》。其中，低分辨气质联用检测微量基因毒性物质为靶向分析，需要特征离子/离子对信息，开展大规模基毒的筛查需要不断扩充数据库，且无法进行数据库之外的溯源分析。

GC Orbitrap/MS 低至 fg 级别的灵敏度，结合全扫描的无偏向性分析无疑是同时定性与定量完美解决方案。除此之外，赛默飞在美国国立卫生院（NIH）提出的共计 1547 种具有直接或潜在基因毒性的物质基础上，开发了适合气相分析的 927 种基毒 5841 张谱图的谱库，增强了检索的专一性和指向性，能够更好地锁定化合物。而非通过 NIST、Wiley 等谱库的“海底捞针”式检索。本文利用赛默飞超高分辨质谱 GC Orbitrap/MS 结合基因毒性物质的专有谱库，对某原料药进行了基因毒性物质的筛查和鉴定，为药物中基因毒性物质的检测提供了又一有力、可靠的方法。

实验部分

1 仪器

质谱仪：Exactive GC；

气相色谱仪：Trace 1310 GC；

自动进样器：Triplus RSH

2 样品前处理

精密称取某原料药 0.5g，加 DCM（二氯甲烷）5ml，涡旋 1min，超声 15min，4000rpm 离心 5min，取上清液适量，过 0.45μm 滤膜后直接进样分析。

3 仪器方法

色谱柱：TG-1MS(30 m×0.32mm×0.25μm)

进样口：SSL 进样口恒流模式：1.5mL/min

进样体积：1μL

升温程序：40℃ (6min) _ 22℃ / min _ 200℃ (5min) _ 25℃ / min _ 310℃ (5min)

传输线温度：250℃ 离子源温度：280℃

采集方式：分辨率 R=60000(FWHM, m/z 200) Full Scan 全扫描；50-500m/z

4 实验结果

4.1 筛查流程

依据建立的方法，分别采用 EI 及 PCI 采集样品（TIC 图见图 1），EI 源采集的原始数据经 Deconvolution plugin 软件进行基于质谱优先的解卷积，而后进行谱库搜索。HRF 技术可将实际采集的碎片离子与检索出化合物的理论碎片离子进行比较。如果实测图谱里面可以被解释的离子越多，高分辨质谱图过滤检索值（HRF）值越高，即此化合物可能性越大（HRF 计算公式如下）。PCI 源采集的数据则用于辅助确认。

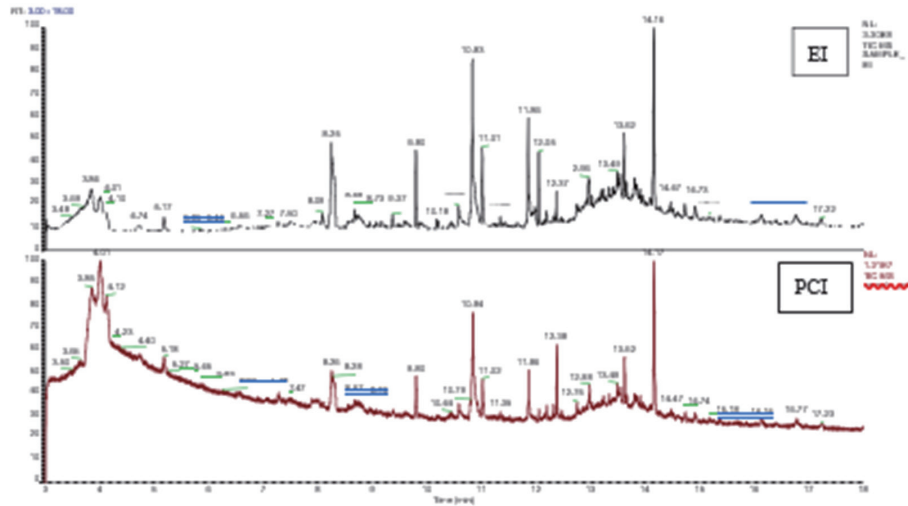


图 1 EI 及 PCI 下的全扫描质谱图

由图 1 可看出，样品基质相对复杂，经过解卷积、NIST 谱库检索后获得 324 个峰，即便以 $SI > 700$ 、 $HRF > 90$ 对结果进行过滤，仍有 72 个峰，基毒筛查工作量巨大。而以基因毒性物质专属谱库进行检索，并以同样过滤条件筛选峰，仅有 3 个结果，如图 2。

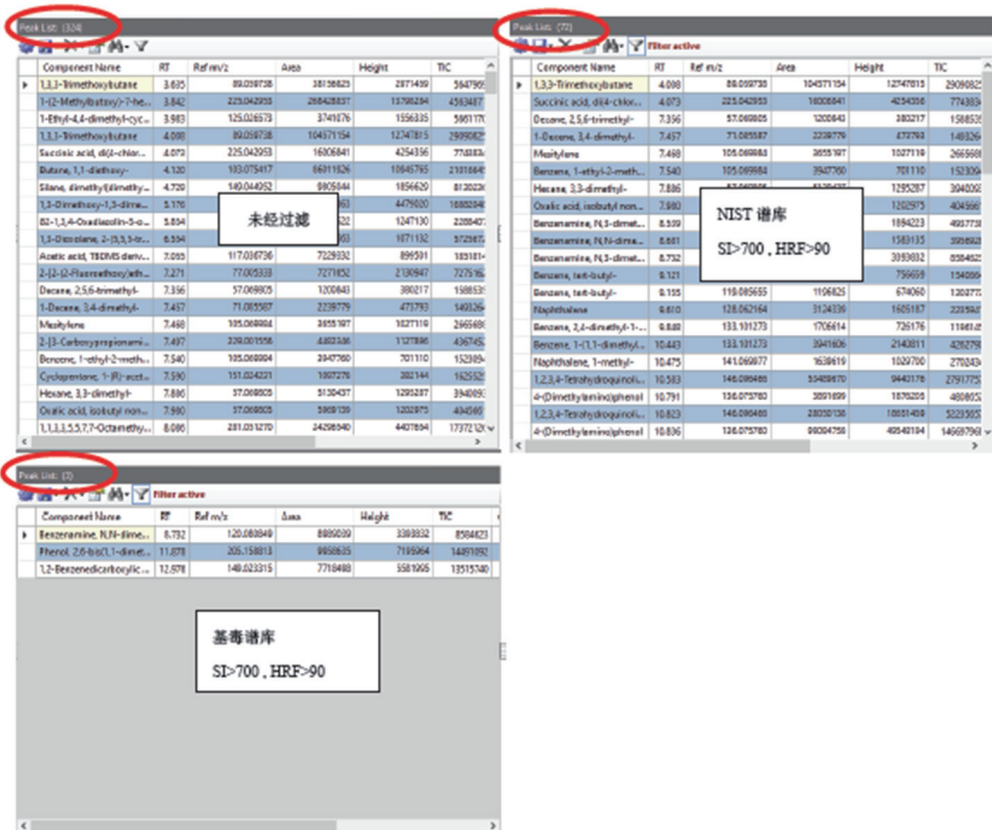


图 2 检索结果对比

4.2 结果讨论

Peak@RT8.732 的定性

基于基毒谱库的首个检索结果为N,N-二甲苯胺(CAS#: 121-69-7), 而该化合物在以NIST 谱库检索时, 并非最高匹配度。通过对比其EI 及PCI 质谱图信息, 可确认M+ 为121.08865, 并且其与C₈H₁₁N 理论分子离子峰质量偏差仅为0.36787ppm, M+ 与同位素 M+2 的比值也与软件计算的理论值相似。

Component Name	RT	Ref m/z	Score	Matched Compound	Formula	CAS	SI	HRF Score	RSI	RHRF Score	M+ m/z	Empirical M+	M+ Lib	% Elements
Benzenamine, N,N-dime...	8.732		90	Benzenamine, N,N-dim...	C8H11N	121-69-7	848	97.478	870	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimet...	11.870		95.6	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	830	97.478	850	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
1,2-Benzenedicarboxylic ...	12.976		95.5	BENZENAMINE, N,N-DI...	C8H11N	121-69-7	823	97.478	847	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95.4	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	821	97.478	845	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95.4	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	818	97.478	842	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95.4	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	821	97.478	845	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95.3	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	814	97.478	854	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95.2	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	812	97.478	912	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			95	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	802	97.478	838	99.287	121.088600	121.088631	Yes	100
			94.9	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	797	97.478	824	99.2822	121.088600	121.088631	Yes	100
			94.6	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	782	97.478	832	100	121.088600	121.088631	Yes	100
			94	Benzenamine, 2,6-dimet...	C8H11N	87-62-7	750	97.478	768	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
			93.7	Benzenamine, 2,6-dimet...	C8H11N	87-62-7	735	97.478	731	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
			93.6	Diazosulfonic acid, (4-c...	C8H11N3NaO3S	140-56-7	718	96.1747	737	100	252.041332	NF	No	100
			93.5	Benzenamine, 2,6-dimet...	C8H11N	87-62-7	726	97.478	743	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
			93.4	Benzenamine, 2,6-dimet...	C8H11N	87-62-7	721	97.478	738	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100

图 3 peak@RT8.732 基毒谱库检索结果

Component Name	RT	Ref m/z	Score	Matched Compound	Formula	CAS	SI	HRF Score	RSI	RHRF Score	M+ m/z	Empirical M+	M+ Lib	% Elements
1,3,3-Trimethoxybutane	4.000		95.3	Benzenamine, N,N-dim...	C8H11N	696-44-6	816	97.478	840	100	121.088600	121.088631	Yes	100
Succinic acid, di(6-chlor...	4.073		94.9	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	121-69-7	797	97.478	824	99.2822	121.088600	121.088631	Yes	100
Decane, 2,5,6-trimethyl...	7.356		94.8	Benzenamine, N,N-dime...	C8H11N	623-09-5	789	97.478	809	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
1-Decene, 3,4-dimethyl...	7.457		94.4	5,6,7,8-Tetrahydroindol...	C8H11N	13618-88-7	769	97.478	791	100	121.088600	121.088631	Yes	100
Mesitylene	7.468		93.8	1-Propanone, 1-phenyl-2...	C13H13NO	42787-38-2	727	96.1747	747	100	225.14615	NF	Yes	100
Benzene, 1-ethyl-2-methyl...	7.540		93.7	4-Nitro-N-(2,6-xylyl)ben...	C14H14N2O4S	109508-84-1	723	96.1747	752	100	306.066878	NF	Yes	100
Hexane, 3,3-dimethyl...	7.886		93.6	Benzenemethanamine, N...	C8H11N	103-67-3	720	97.478	751	100	121.088600	121.088631	Yes	100
Quinic acid, isobutyl non...	7.980		93.6	Benzenamine, 2,4-dimet...	C8H11N	95-88-1	731	97.478	747	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
Bicyclo[2.2.2]octa-2,3-di...	8.599		93.5	Benzenemethanol, α-(1-...	C15H17NO	42787-02-2	712	96.1747	731	100	227.120405	NF	Yes	100
Benzenamine, N,N-dime...	8.681		93.4	2-Butanone, 3-amino-4-...	C10H13NO	40513-35-7	705	96.1747	723	100	163.099165	NF	Yes	100
Benzenamine, N,N-dime...	8.732		93.2	1,2-Ethanediamine, N,N...	C10H20N2	7630-60-6	712	97.478	739	100	240.162100	NF	Yes	100
Benzene, tert-butyl-	9.121		93.2	Pyridine, 2-ethyl-5-meth...	C8H11N	1122-69-6	712	97.478	731	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
Benzene, tert-butyl-	9.155		93.2	Benzenamine, 3,4-dimet...	C8H11N	65-64-7	709	97.478	725	99.2903	121.088600	121.088631	Yes	100
1-(2-Phenyl-2,2-dimethyl...	9.610													

图 4 peak@RT8.732 NIST 谱库检索结果

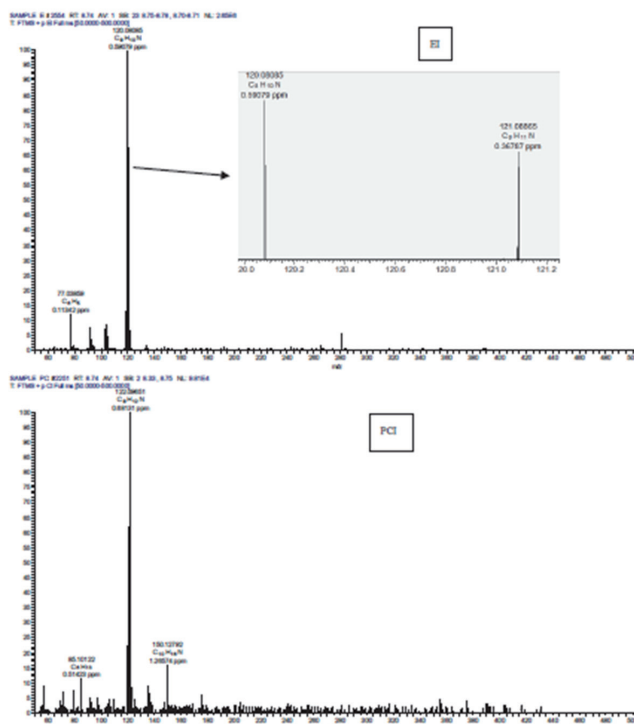


图 5 EI 及 PCI 质谱图对比

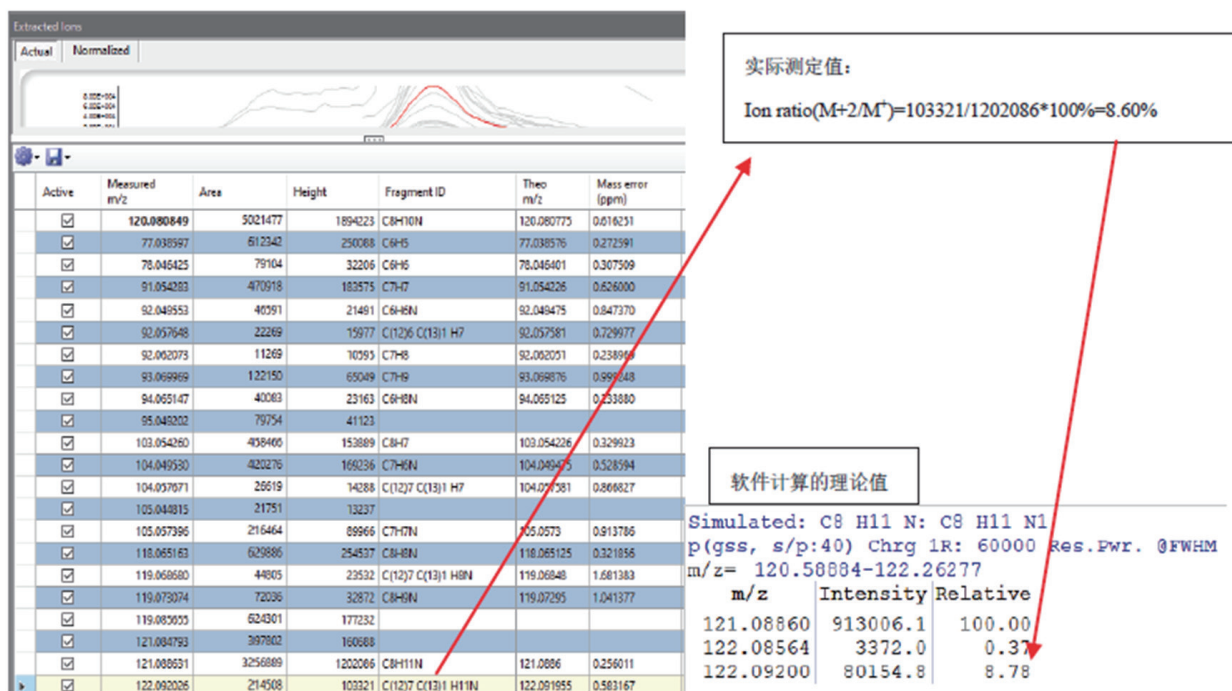


图 6 同位素峰丰度对比

Peak@RT11.878 的定性

基于基毒谱库的首个检索结果为抗氧化剂 264 (CAS#: 128-37-0)，而该化合物在以 NIST 谱库检索时，排名第四。通过对比其 EI 及 PCI 质谱图信息，可确认 M_n 为 220.18235，并且其与 $C_{15}H_{24}O$ 理论分子离子峰质量偏差仅为 0.84629ppm， M_n 与同位素 $M+1$ 比值也与软件计算的理论值相似。

Peak@RT12.976 的定性

该峰检索结果为邻苯二甲酸二烯丙酯 (CAS#: 131-17-9)。方法与前述类似，本文不再赘述其定性过程。

结论

药物中微量基因毒性物质的非靶向筛查分析具有基质干扰大、化合物种类多，含量低等分析难点。而 GC Orbitrap/MS 技术在全扫描分析下，能够同时实现高分辨率、高质量精度以及最低低至 fg 级别的灵敏度等特点。结合基毒专属谱库可同时实现上百种具有直接或潜在基因毒性物质的无偏向性筛查分析，非常适合相关行业进行药物或包材中基毒的筛查分析工作。

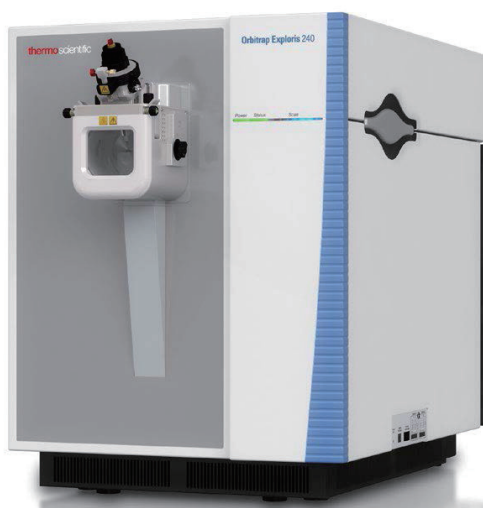
赛默飞遗传毒性杂质解决方案 LC/LCMS 篇



Vanquish



TSQ fortis



Orbitrap Exploris 240

基于 HPLC-CAD 联用技术测定阿罗洛尔中的遗传毒性杂质 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇

摘要

本文建立了阿罗洛尔中的遗传毒性杂质 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇的液相-电雾式检测器方法 (HPLC-CAD)，该方法检测下限可达到 1ppm，并能将该遗传毒性杂质的同分异构体实现良好分离。

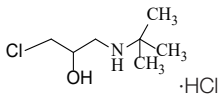
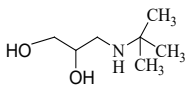
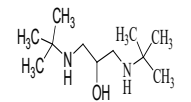
关键词

阿罗洛尔；1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇；HPLC-CAD

引言

遗传毒性杂质 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇现有检测方法主要是液相色谱-串联三重四极杆质谱法 (LC-MS/MS)，具有灵敏度高的优点，但购置成本高、对操作人员要求高；为了开发更便捷的质控方法，同时考虑 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇结构可知是弱紫外吸收物质见表 1，本文基于赛默飞液相电雾式检测器平台开发了适合 QC 实验室人员使用的 HPLC-CAD 方法。

表 1 1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇及异构体

杂质代号	中文名称	结构式	CAS 号	备注
041-CP-E (E)	1-叔丁胺基-3-氯-2-丙醇		41052-94-2	遗传毒性杂质
041-CP-F (F)	1-叔丁胺基-2,3-丙二醇		22741-52-2	/
041-CP-G (G)	1,3-二叔丁胺基-2-丙醇		15046-09-0	/

实验部分

1. 仪器与试剂

U3000 液相色谱仪，Corona VEO CAD，DAD-3000，乙腈，异丙醇及三氟乙酸

2 溶液配制

分离度考察样品制备：精密称取 API 及四个有关物质，使用甲醇溶解至约 1 mg/ml 的浓度水平，待测备用；

检出限样品制备：将上述 3 个物质各取 100 微升混合，并定容至 1 毫升，得到 0.1 mg/ml 的浓度水平，然后稀释 10 倍得到 0.01 mg/ml 的浓度水平，待测备用；

供试品考察：称取上述四个物质浓度在 1 mg/ml 的单标样品，考察单标样品测试谱图

3 仪器方法

色谱柱：Accucore C30 (150 x 4.6, 2.6 um)，柱温：30 °C

流速：1.0 ml / min (流动相条件见下表 2)

DAD 检测器波长：210, 266 nm

CAD：雾化温度 35 度 (Low)

表 2 流动相条件

时间 (min)	A (异丙醇)	B (0.1% TFA 水溶液)	C (乙腈)
0	0	100	0
8	20	80	0
12	20	10	70
12.1	0	100	0
17	0	100	0

4 实验结果

4.1 供试品单标样品色谱图 (1 mg / ml)

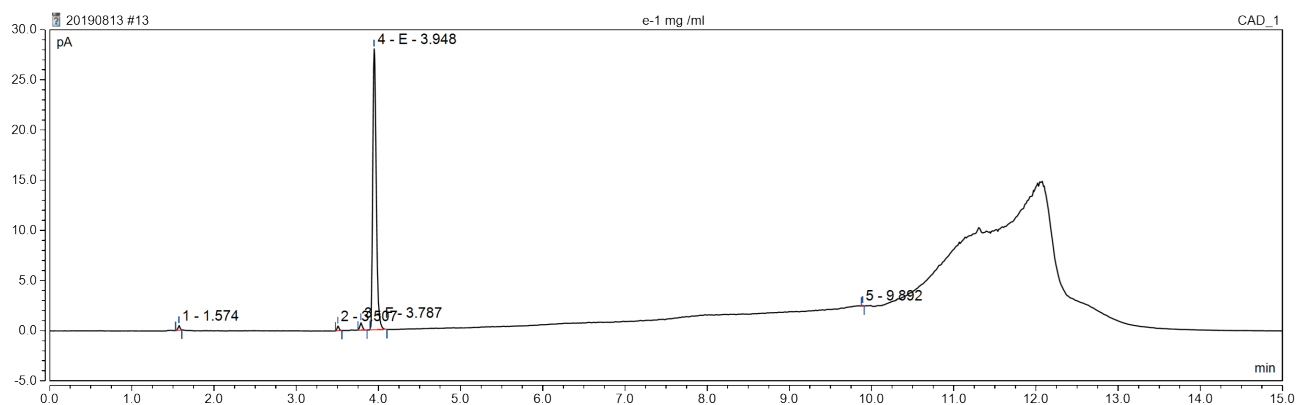


图 1 供试品 E 色谱图

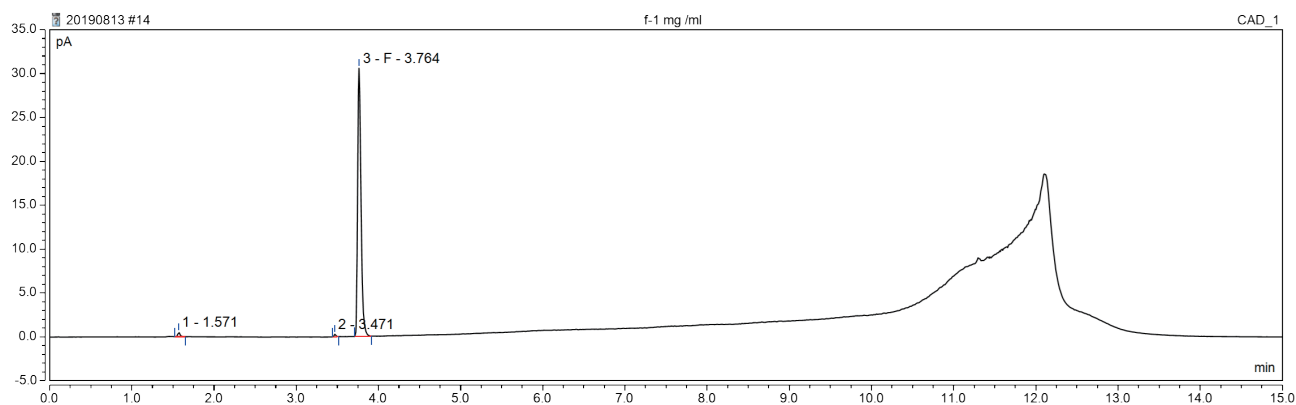


图 2 供试品 F 色谱图

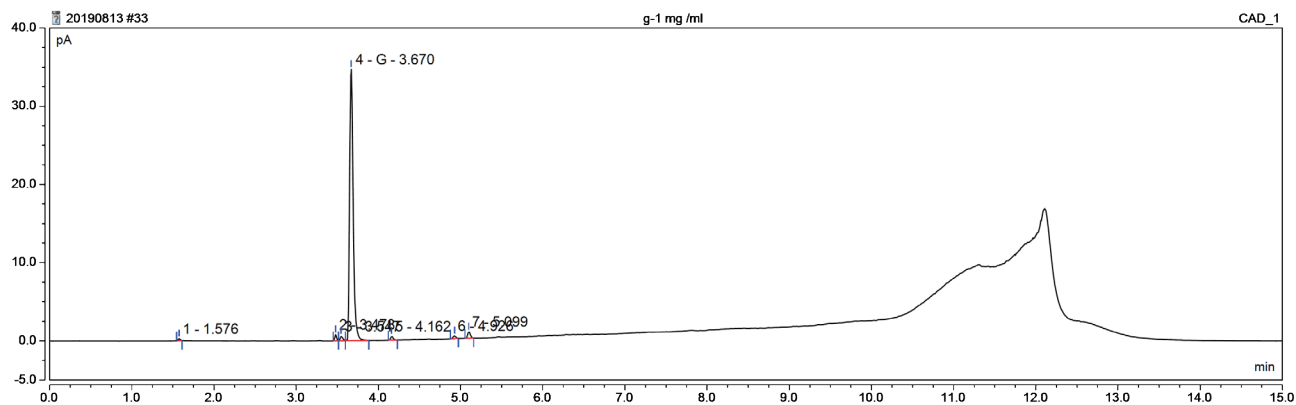


图 3 供试品 G 色谱图

4.2 分离度考察

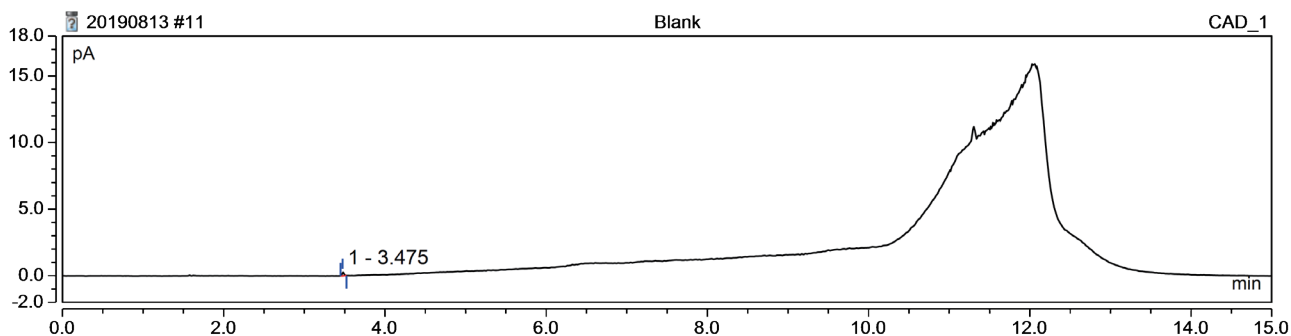


图 4 空白溶液

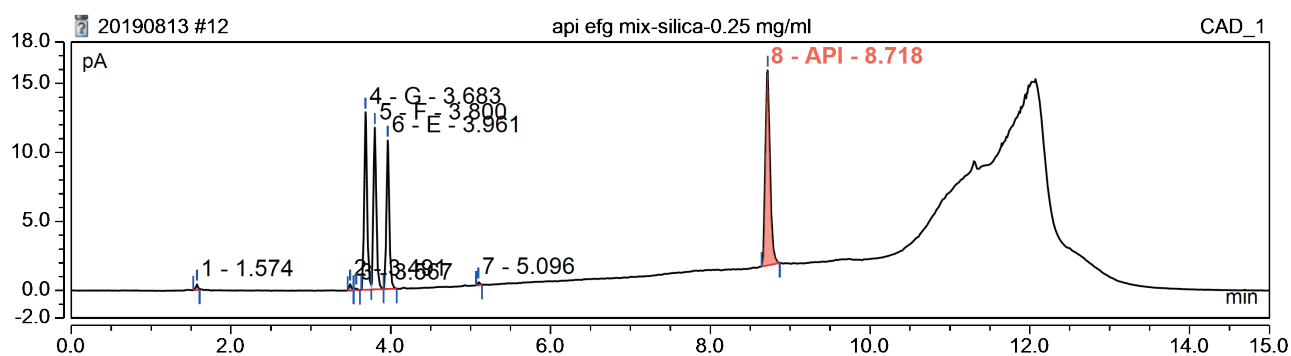


图 5 混标分离图谱

PS: G 与 F 的分离度为 1.81, F 与 G 的分离度 2.53

4.3 检出限考察

本次考察了 0.001 mg/ml (1 ppm) 样品进样图谱, 进样体积 5ul

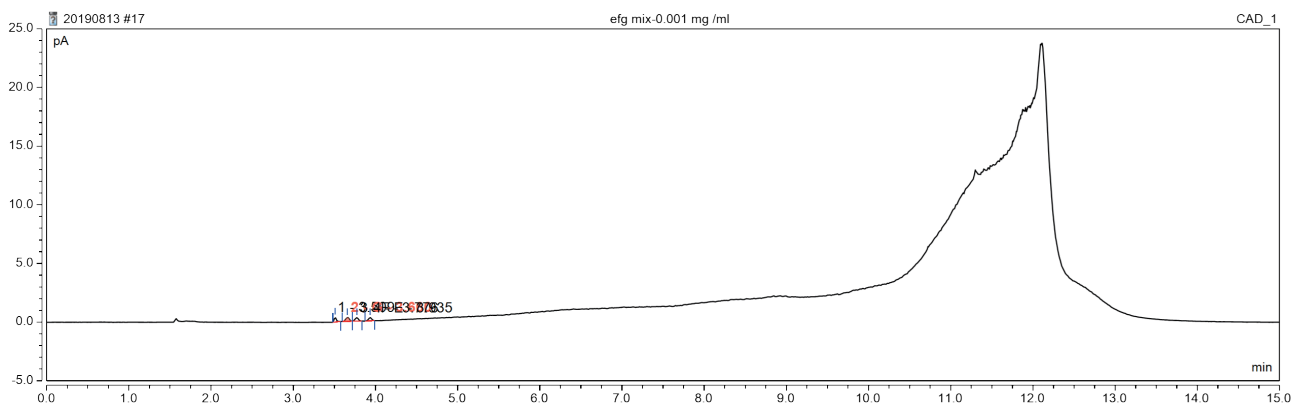


图 6 混标 (1ppm) 测试图谱

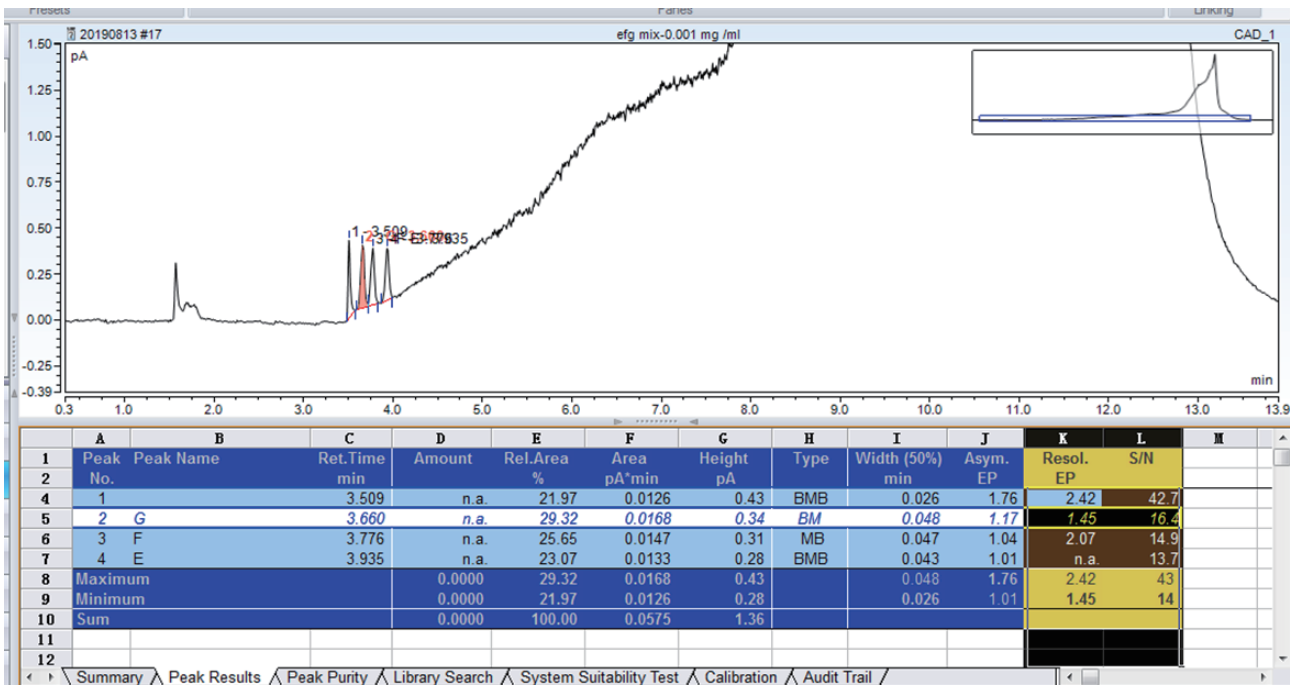


图 7 混标 (1ppm) 测试图谱 (放大) 及信噪比展示

4.4 CAD 及 DAD 通道对比

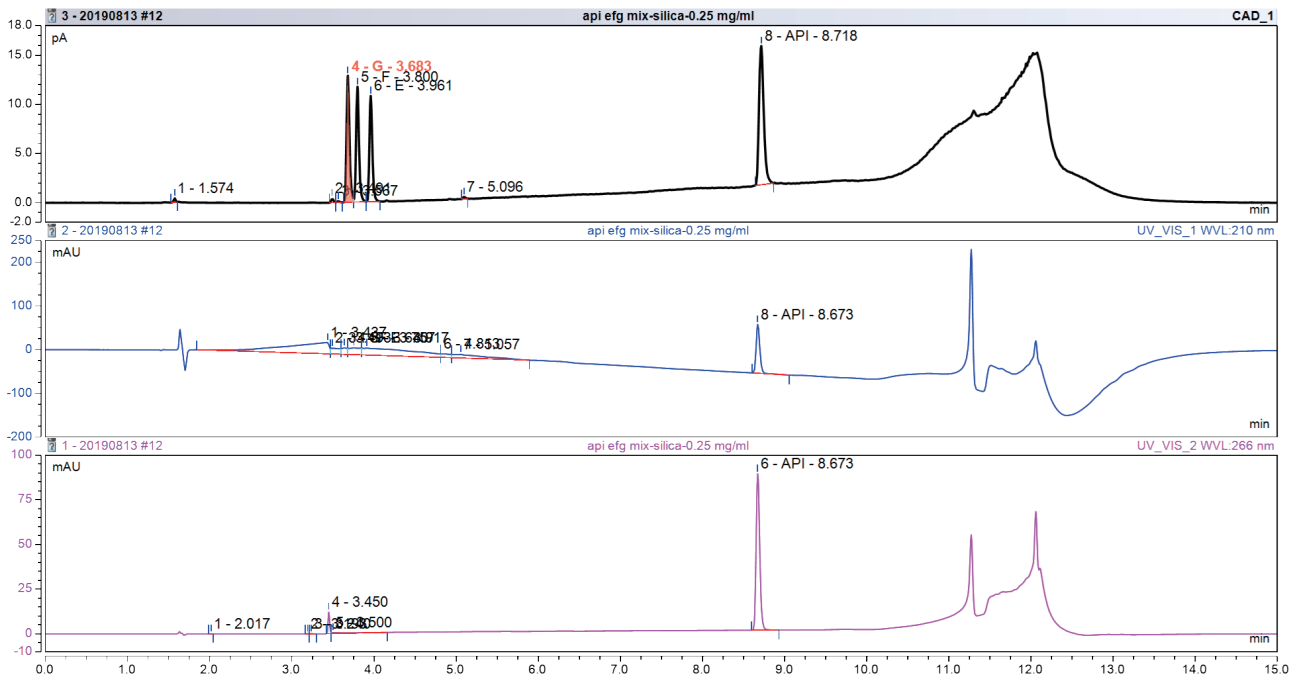


图 8 CAD (上) 及 DAD (210 nm, 266 nm) 通道

结论

本文基于 HPLC-CAD 检测器平台, 建立了 1- 叔丁胺基 -3- 氯 -2- 丙醇的分析检测方法, 该方法具有重复性好、操作便捷的优点。

液相色谱法测定药品中基因杂质对甲苯磺酸乙酯

摘要

本文建立了对甲苯磺酸乙酯液相色谱分析方法，检出限可达到 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，考察了样品加标回收率为 100.9%，6 针进样重复性结果为 0.13%。

关键词

对甲苯磺酸乙酯；HPLC-UV

引言

基因毒性杂质是指能直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌作用的物质。常用的缩写：PGLs（potentially genotoxic impurities 有潜在基因毒性的杂质）或 GTIs（genotoxic impurities 基因毒性杂质）。常见的基因毒性物质有：甲磺酸烷基酯，如甲磺酸甲酯（MMS）和甲磺酸乙酯（EMS）；在以羟乙基磺酸盐，苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐形式存在的药物活性成分中也会发现类似的磺酸烷基酯或芳基酯污染。在 <http://potency.berkeley.edu> 里面有 1574 种致癌物质的列表，结构式，CAS 号，作用部位，TTC 值等一系列信息。药物生产中可能产生基因毒性杂质的环节：新药合成；原料纯化；储存运输（与包装物接触）等。欧洲药品局（EMA）2006 年首先颁布了《基因毒性杂质限度指南》，并自 2007 年 1 月 1 日起正式实施。该指南为限制新活性物质中的基因毒性杂质提供了解决问题的框架和具体做法。2006 年，ICH 也公布了相应的要求，具体内容参见 ICH Q3A(R2) 新药原料药中的杂质，Q3A(R2), 步骤 4（06 年 10 月 25 日）版。FDA 于 2008 年 12 月正式签发了类似指南：Guidance for Industry—Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches。主要内容包括：指南发布的背景；原料药和制剂中的基因毒性杂质生成的预防办法；基因毒性杂质的分析方法、处理方法和减少方法；上市申请和临床研究申请的可接受限度；草药原料药和制剂中基因毒性杂质评估指南。

近几年，临床研究发现甲磺酸酯的 DNA 烷基化作用会导致诱变效应，其中甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯已有这方面报导，因此有理由怀疑其它低分子量磺酸（如对甲苯磺酸）的烷基酯可能也存在着类似的毒性影响。磺酸酯类杂质检测方法，通常有 GC-FID 法或衍生化 GC-MS 法，本文参照文献使用 HPLC-UV 法分析了对甲苯磺酸乙酯，以期对相关分析者有一定的借鉴作用。

实验部分

1. 仪器与试剂

U3000 液相色谱仪，DAD-3000 二极管阵列检测器，乙腈，三乙胺，磷酸

2 溶液配制

标准溶液配制：

准确称取对甲苯磺酸乙酯，用 ACN:H₂O（1:1）稀释配制成 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液，供高效液相色谱测定。

样品前处理：

称取药品，分别为 BLF 和 LDWP，用初始流动相配制成 2000 $\mu\text{g/mL}$ ，超声 10 min，取上清液用滤膜过滤，供高效液相色谱测定。

3 仪器方法

色谱柱：Accucore C18, 150 × 4.6mm, 2.6 μm ，P/N:17126-154630，S/N:10018404；

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

流速：1.0 ml / min（流动相条件见下表 1）

DAD 检测器波长：220nm

表 1 流动相条件

时间 (min)	A (乙腈)	B (1% TEA, 用磷酸调节 pH 至 3.0)
0	25	75
5	25	75
17	60	40
25	60	40
30	25	75

4 实验结果

4.1 标准溶液图谱

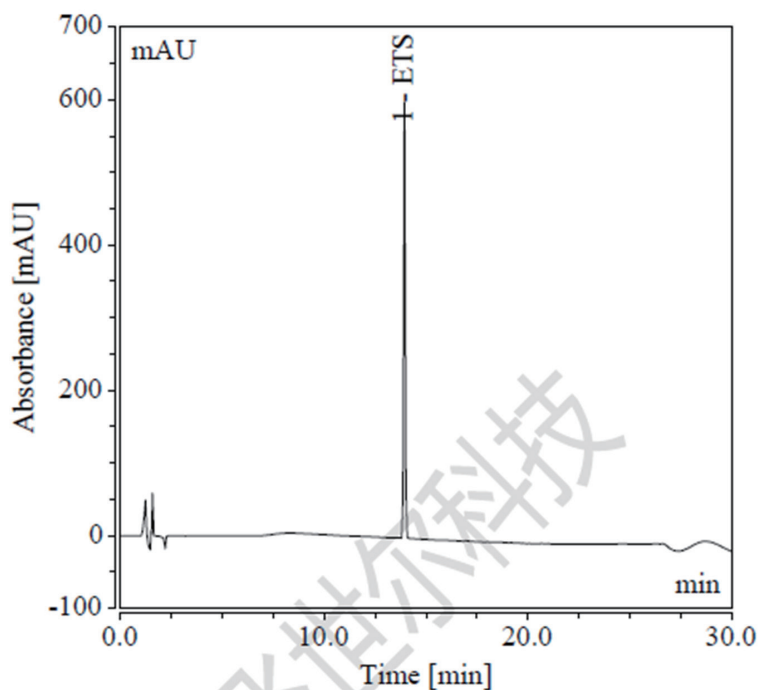


图 1 对甲苯磺酸乙酯标准溶液图谱

4.2 线性方程

以测得峰面积为纵坐标 (Y)，对应的标准溶液浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线。对甲苯磺酸乙酯回归方程分别为： $Y=0.1927X+0.5203$ ，相关系数 $r=99.9\%$ 。

4.3 重现性

从以下表 2 可以看出，对浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液连续进样 6 次，重现性较好，浓度与峰面积值 RSD 均在 2.0 % 以内。

表 2 标准溶液重现性分析结果

Sample No.	Sample Name	Amount ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Area ($\text{mAU}\cdot\text{min}$)
1	对甲苯磺酸乙酯	10.288	5.5453
2	对甲苯磺酸乙酯	10.294	5.5485
3	对甲苯磺酸乙酯	10.316	5.5598
4	对甲苯磺酸乙酯	10.308	5.5557
5	对甲苯磺酸乙酯	10.302	5.5525
RSD%		0.13%	0.13%

4.4 检出限

对最低浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行了分析, 根据信噪比进行计算检出限 LOD, 以 $S/N=3$ 计, LOD 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4.5 回收率

样品加标回收率实验: 对甲苯磺酸乙酯的平均回收率为 100.9%, 回收率较好。

4.6 实际样品测试

两种样品分析图谱见图 2, 结果表明 BLF 与 LDWP 两种药品中均未检出对甲苯磺酸乙酯, 即低于检出限 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

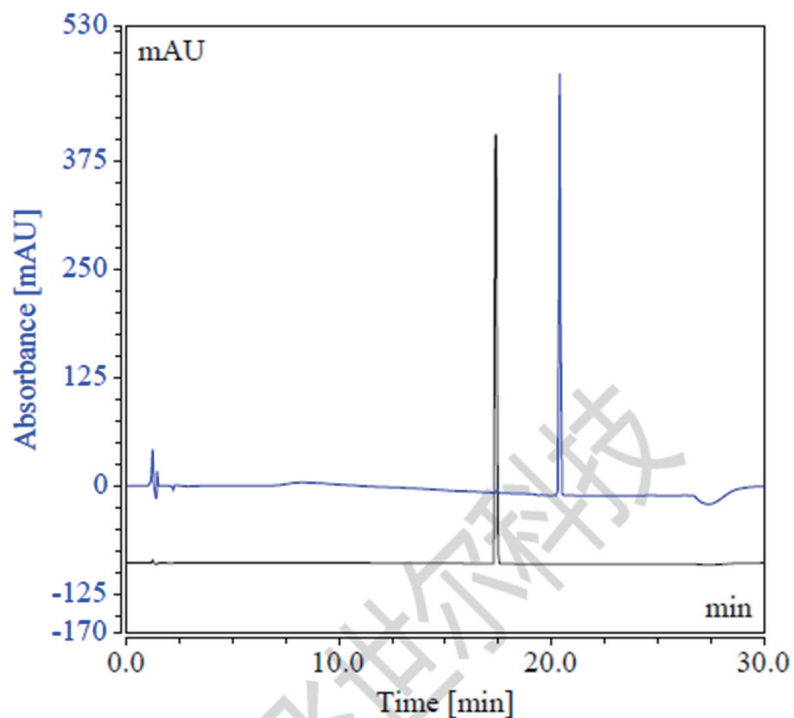


图 2 实际样品测试图谱

结论

由于磺酸酯类物质具有基因毒性, 除经常研究的甲磺酸酯、苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯以外, 其他具有磺酸基的物质是否会威胁人类健康, 有待于进一步研究; 目前有各种分析技术手段用于研究检测磺酸酯类物质的限度, 如 GC-MS、HPLC-MS、NMR 和手性色谱法等, 本方法采用最常用的 HPLC+UV 的方法对对甲苯磺酸乙酯进行了分析, 仪器检出限与方法考察学均达到了相关要求。

柱后碘衍生法液相色谱法检测黄曲霉毒素

摘要

本文按照药典方法采用双三元液相柱后碘衍生进行黄曲霉毒素分析，本法最低浓度点信噪比远高于 S/N=10 得定量限要求，分离度良好。

关键词

黄曲霉毒素；双三元液相；黄曲霉毒素；中国药典

引言

黄曲霉毒素具有极强得毒性，具有极强得致畸及致癌作用，是食品中危害极大得一类毒素，因其毒性强，目前中国药典一部中药有越来越多得品种项下需要检测该类毒素，本文利用赛默飞专利得双三元泵技术进行柱后碘衍生检测，实现了无需购置三方得柱后衍生装置，即可轻松实现黄曲霉柱后碘衍生分析工作。

实验部分

1 仪器与试剂

U3000 双三元泵，FLD-3100 荧光检测器，甲醇，乙腈

2 溶液配置

4 种黄曲霉毒素对照品溶液：分别取含黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 标准液适量，以 50% 甲醇稀释定容为浓度分别为 0.86ppb、2.12ppb、0.78ppb、2.04ppb 的混合对照液。取该混合对照液，分别进样 5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l。（依照药典规定）

3 仪器方法

色谱柱：Hypersil Gold (4.6 \times 250mm, 5 μ m)；柱温：35 $^{\circ}$ C

流动相：甲醇 - 乙腈 - 水 (30:10:60)；流速：0.8mL/min；采集时间 20min

FLD 3100 检测条件：波长 Ex 360nm / Em450nm；灵敏度：5；采集频率：5Hz；响应时间：2s；流通池温度：42 $^{\circ}$ C；氙灯模式：0~9min 为 longlife，9min 以后为 highpower

碘衍生条件：衍生液：0.05% 碘溶液；流速：0.3ml/min；温度：70 $^{\circ}$ C

4 实验结果

4.1 混合对照溶液测定谱图见图 1

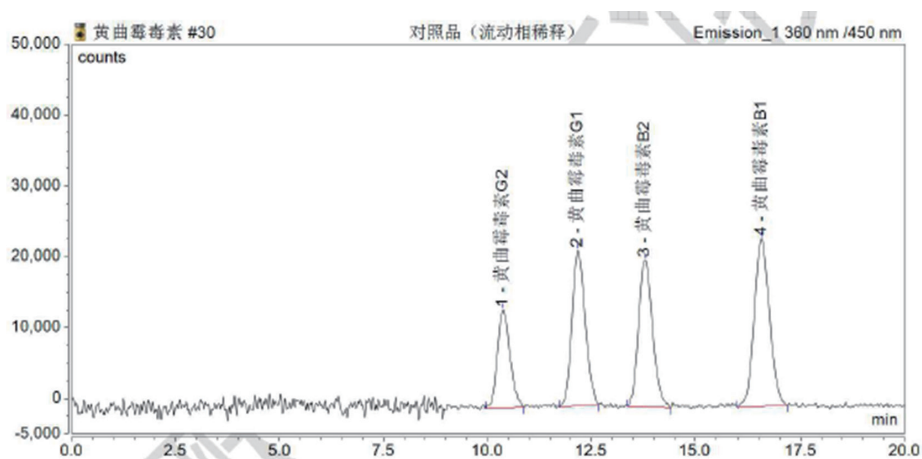


图 1 混合对照溶液（进样量 5 μ l）

4.2 线性

表 1 黄曲霉线性考察结果

峰名称	校正类型	评估类型	数据点	判定系数	C0	C1
G2	Lin, WithOffset	Area	5	0.99991	217.56	5437.75
G1	Lin, WithOffset	Area	5	0.99995	-66.9	3897.13
B2	Lin, WithOffset	Area	5	1.00000	129.07	10233.8
B1	Lin, WithOffset	Area	5	0.99993	76.67	4952.41

4.3 信噪比

表 2 混合溶液 5 μ l 进样信噪比

黄曲霉	G2	G1	B2	B1
信噪比	30.8	48.9	46.1	52.7

结论

使用 U3000 FLD3100 完全满足中国药典附录 2351 的相关规定，最低浓度点信噪比远高于定量限要求，线性良好；且各色谱峰采用 Hypersil Gold 色谱柱分离良好；为降低溶剂效应，本方法对药典方法进行了适当调整，对照品溶液采用流动相或 50% 甲醇溶解色谱峰型更好。

UHPLC- 紫外检测器与单四极杆质谱检测器联用进行药物活性成分中基因毒性杂质定性及定量分析

Identity confirmation and accurate quantitation of a genotoxic impurity in an active pharmaceutical ingredient by UHPLC-UV coupled to a single quadrupole mass detector

Goal

Confirm the identity of related impurities and a genotoxic impurity in a drug substance by single quadrupole mass detector. Accurately quantify the genotoxic impurity by UV detection.

Keywords

Genotoxic impurities; methyl-p-toluenesulfonate; aprepitant; ISQ EM; single quadrupole; mass detection; UV detection; Autospray

Introduction

Genotoxic impurities are a special group of impurities that pose a greater risk to patient health, since they are carcinogenic. The genotoxic impurities identified as potential contaminants of the drug must be monitored and accurately quantified according to rules which are stricter than for other impurities. The United States Food and Drug Administration (U.S. FDA) as well as the European Medicines Agency (EMA) have established a threshold of toxicological concern (TTC) of 1.5 µg/day for long-term treatments with the drug product. Additionally, the international conference on harmonization (ICH) M7 suggested a staged TTC based on the duration of drug exposure as described in Table 1. From the TTC value, the concentration limit can be calculated based on the expected daily dose of the drug administered to the patient using the following equation¹: Concentration limit (ppm) = TTC (µg/day) / dose (g/day) P-toluenesulfonates, are an example of genotoxic impurities. They can occur as by-products of the drug synthesis where p-toluenesulfonic acid reacts with alcohols such as methanol, ethanol or isopropanol. Since p-toluenesulfonic acid is frequently used as a counterion for salt formation, p-toluenesulfonates are common genotoxic impurities. The identification of a p-toluenesulfonate is straightforward as standards are readily available. However, it is practical and desirable that HPLC methods, during the early stage of drug development, are capable of identifying both genotoxic and other related impurities in a single run without the need for separate injections of standard. This can be achieved by coupling the HPLC to UV and a mass detector, where the UV detection provides the quantitative information and the mass detector the identity information. The understanding of the synthetic pathways is typically sufficient to deduct many expected impurities, which can be compiled in a list of intact masses. These can then be screened in SIM mode by a single quadrupole MS, allowing for putative identity assignments. The aim of this study was to develop a method for monitoring and quantifying methyl-p-toluenesulfonate along with other related impurities in a drug substance.

Table 1. Acceptable daily intakes for individual and multiple impurities

	Duration of exposure			
	<1 month	>1–12 months	>1–10 years	>10 years
Acceptable daily intakes for an individual impurity (µg/day)	120	20	10	1.5
Acceptable total daily intakes for multiple impurities (µg/day)	120	60	30	5

Experimental

1 Equipment & Chemicals

A Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex Quaternary UHPLC system equipped with a Thermo Scientific™ ISQ™ EM single quadrupole mass spectrometer was used for the analysis;

Acetonitrile, Methanol, Ammonium acetate and Methyl-p-toluenesulfonate were purchased from Fisher Scientific; Two aprepitant samples were purchased from commercial vendors.

2 Sample preparation

2.1 Preparation of standards

A stock solution of methyl-p-toluenesulfonate (methyl-TSF) was prepared in acetonitrile at a concentration of 1 mg/mL. A standard solution with 10 µg/mL was prepared by transferring 100 µL of the stock solution into a 10 mL volumetric flask and filling up to volume with water/ acetonitrile 50/50 (v/v). Based on this solution calibration standards were prepared with concentrations of 0.01 µg/mL, 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.075 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.75 µg/mL, 1 µg/mL, and 2.5 µg/mL. Additionally, a standard solution at 0.005 µg/mL was prepared for the determination of the limit of detection (LOD).

2.2 Preparation of samples

Solutions of 1 mg/mL of each aprepitant sample (aprepitant I and aprepitant II) were prepared in water/acetonitrile 50/50 (v/v). Aprepitant I sample contained methyl-TSF as an impurity and was used for the impurity screening experiments and quantitation. Aprepitant II sample was found to be a methyl-TSF free sample and was therefore used for the determination of recovery rates by spiking methyl-TSF into the aprepitant II sample (1 mg/mL) with 0.01 µg/mL, 1 µg/mL and 2.5 µg/mL.

3 Analytical condition

3.1 LC condition

Column: Thermo Scientific™ Acclaim™Polar Advantage II, 150 × 2.1 mm, 2.2 µm

Mobile phase: A: 15 mM ammonium acetate B: methanol, Flow rate: 0.3 mL/min

Gradient: Time [min] % 0-4.5 min_60%B_6 min_73%B_21 min_73%B_21.5 min_60%B_35 min_60%B

Column temp.: 35 °C (forced air mode, fan speed 5)

Autosampler temp.: 4 °C

UV wavelength: 225 nm; collection rate: 10 Hz, 3D scan: 190–280 nm

Injection volume: 10 µL

3.2 Mass condition

Sheath gas pressure: 35.8 psig, Aux gas pressure: 4 psig, Sweep gas pressure: 0.5 psig

Vaporizer temperature: 172 °C, Ion transfer tube temp.: 250 °C, Source voltage: 3000 V

Ion polarity: Positive, Scan type: Full scan with six targeted, SIM scans, Spectrum data type: Profile (full MS), Full scan mass range: m/z 100–650, SIM width: 0.5 amu, Dwell time: 0.1 s, Source CID voltage: 10 V

4 Results and discussion

4.1 Impurity screening

Genotoxic impurity methyl-TSF, and several known nongenotoxic impurities of aprepitant^{6,7} were investigated in the study and qualitatively monitored (Table 1). Chemical structures of the analytes are presented in Figure 1.

Table 1. Aprepitant and some of its related impurities with chemical formula

Compound	Aprepitant	Methyl- TSF	Impurity I	Impurity II	Impurity III	Impurity IV
Chemical formula	$C_{23}H_{21}FN_4O_3$	$C_8H_{10}O_3S$	$C_{23}H_{22}FN_4O_3$	$C_{20}H_{25}FN_4O_3$	$C_{20}H_{18}FN_4O_2$	$C_{24}H_{25}FN_4O_4$
SIM Scan m/z	535.2	204.1	517.2	611.2	438.1	567.2
Ion species	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$

Chemical names of impurities:
 Impurity I = Defluoro Aprepitant
 Impurity II = 4-Defluoro-4-(*p*-fluorophenyl)aprepitant
 Impurity III = Des-1,2,4-triazol-3-one-5-methyl-aprepitant
 Impurity IV = *N*-(Destriazolonomethyl) *N*-(Methylcarboxyacetamidohydrazono)aprepitant

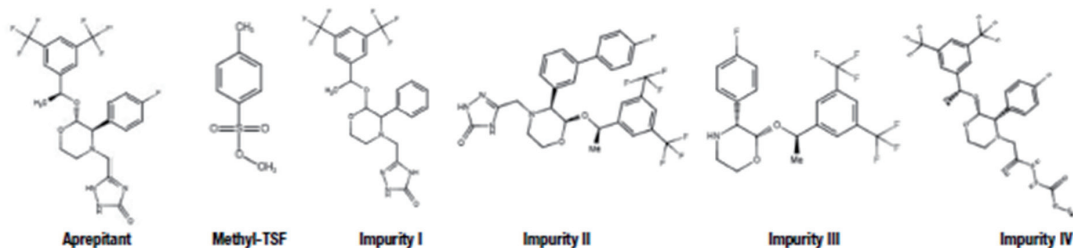


Figure 1. Chemical structures of API and its related impurities investigated in the study

The analysis of the API sample (aprepitant I) showed several peaks in the UV chromatogram (Figure 2). SIM scans according to Table 1 were performed to confirm the presence of expected impurities (Figure 3). Four impurities were confirmed by SIM scans including the genotoxic one, methyl-TSF. For impurity II, the SIM scan chromatogram provides only a very weak signal with a strong baseline effect and the UV trace did not show any peak at the retention time of the MS detected weak signals. Thus, the presence of impurity II in the sample could not be confirmed. Figure 4 demonstrates the full scan mass spectra of the methyl-TSF peak in the aprepitant sample compared with the spectra in the standard. Both spectra look similar, which indicates a methyl-TSF peak without co-elution of other compounds in the sample. Chromeleon CDS allows the accounting for the time delay between the UV and MS signals, which greatly facilitates mass assignment of peaks in the UV chromatogram.

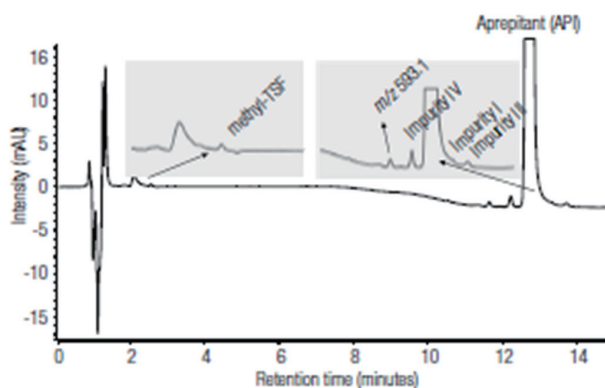


Figure 2. UV chromatogram acquired at 225 nm of aprepitant I sample with peak assignments based on MS data

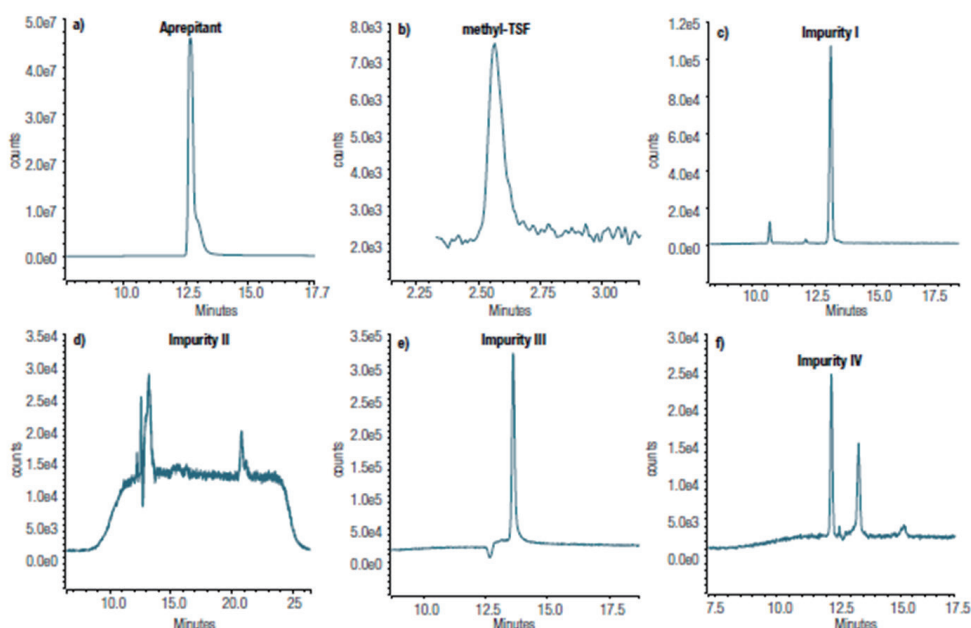


Figure 3. SIM scan chromatograms of aprepitant I (a) and related impurities (b-f) according to Table 1

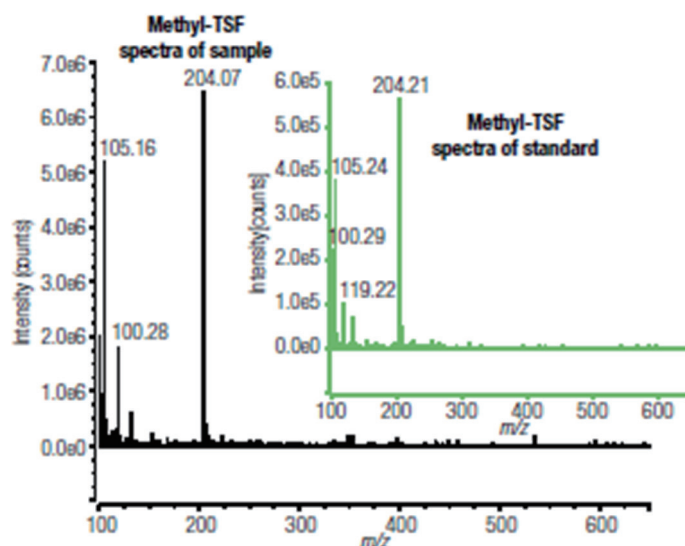


Figure 4. Full scan spectra of methyl-TSF Peak in the sample (black) compared to the spectra of the methyl-TSF standard injection (green)

4.2 Linearity, limit of quantification and recovery of methyl-p-toluenesulfonate using UV detection

The calibration curve for methyl-p-toluenesulfonate was obtained by triplicate injections of ten concentration levels (0.01 µg/mL–2.5 µg/mL). As shown in Figure 5, excellent linearity was obtained with a correlation coefficient (R^2) = 0.9999.

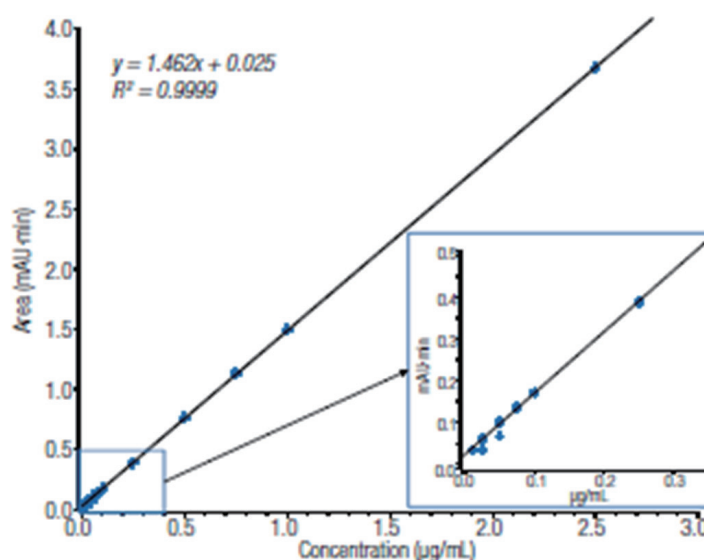


Figure 5. UV calibration curve of methyl-p-toluenesulfonate over the concentration range of 0.01 µg/mL to 2.5 µg/mL

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was determined by diluting the standard solution until a S/N ratio of ≥ 3 for LOD and ≥ 10 for LOQ, was observed. Five replicate injections were evaluated to examine LOD and LOQ values. The LOD was found to be 3.3 ng/mL (with standard deviation ± 0.7 ng/mL) and LOQ 9.4 ng/mL (with standard deviation ± 1.9 ng/mL).

The recovery rates were estimated by spiking the aprepitant II sample (methyl-TSF free sample) with 0.01 µg/mL (LOQ level), 1 µg/mL (concentration limit based on TTC value), and 2.5 µg/mL (highest calibration level) with methyl-p-toluenesulfonate standard solution. With 93–99%, excellent recovery could be achieved throughout the measurement range allowing for accurate quantification over a wide concentration range (Table 2).

Table 2. Recovery rates at different spike levels for methyl-p-toluenesulfonate

Spike Level	Recovery (%)
0.01 µg/mL	93
1 µg/mL	98
2.5 µg/mL	99

4.4 Quantitation of the genotoxic impurity methyl-TSF in the sample using UV detection

According to ICH M7 guidelines a TTC of 120 µg/day is allowed for aprepitant because the duration of medication is less than 1 month. Based on a 125 mg tablet dosage the calculated concentration limit is 960 ppm. With 1 mg/mL aprepitant sample this results in a concentration of 0.96 µg/mL using the described method.

Quantitative analysis was carried out with injecting the API sample (aprepitant I) three times. As shown in Table 3 the calculated amount corrected by the recovery rate resulted in 0.010 µg/mL with a relative standard deviation (RSD) of 5.05%. As a result, the genotoxic impurity found in the sample is far below the concentration limit based on the TTC value (0.96 µg/mL) and close to the LOQ of the method.

Table 3. Quantitation result of methyl-p-toluenesulfonate in aprepitant I sample

Measured amount (µg/mL)	Recovery (%)	Calculated amount (µg/mL)	RSD (%)
0.009	93	0.010	5.05

Conclusion

The combination of UV and a single quadrupole mass detector is a powerful tool for API analysis in early stages of development, enabling confirmation of expected impurities

The Autospray intelligent source settings allow a nonexperienced MS user an easy and fast adjustment of the MS ion source parameters

With a 10-fold lower LOQ value compared to the concentration limit based on the TTC value of 960 ng/mL, the UV method proved to be very sensitive to the determination of methyl-p toluenesulfonate

基因毒性杂质 N-亚硝基化合物的液相色谱质谱检测分析

摘要

赛默飞液相色谱串联三重四极杆质谱 TSQ Fortis 针对基因毒性物质 10 个 N-亚硝基化合物建立了稳定灵敏的分析方法。该方法在电喷雾离子化 (ESI) 条件下即可进行有效检测分析, 在适宜的浓度范围内所有组分线性关系良好 ($r^2 > 0.99$)。低中高三个浓度水平重复性试验结果优异。该方法稳定, 快速, 满足日常微量基因毒性物质 N-亚硝基化合物的分析要求。

关键词

基因毒性杂质; N-亚硝基; TSQ Fortis

引言

基因毒性杂质是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA, 产生致突变和致癌的物质。基因毒性杂质的特点是在很低的浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 进而导致基因突变并可能促使肿瘤发生。因其毒性较强, 对用药的安全性产生了强烈的威胁。

近年来, 已上市药品中发现痕量的基因毒性杂质残留而被召回的案例, 时有发生, 给药厂造成了巨大的经济损失。世界各国的法规机构如 ICH、EMA、FDA 等对基因毒性杂质做了相应的规定和要求。大部分 N-亚硝基化合物属于高基因毒性杂质, 强致癌物。毒理学关注门槛 (TTC, Threshold of Toxicological Concern), 限定值 1.5ug/day 不能直接用于 N-亚硝基化合物杂质的限量控制, 这类化合物属于“关注队列”, 即使摄入量低于 TTC 值, 从理论上来说也可能会导致显著癌症风险。基于上述原因, 应进行风险评估来决定是否需要采取进一步行动。缬沙坦事件后, FDA 对 N-二甲基亚硝胺 (NDMA) 基因毒性杂质的方法标准定量限是 0.3ppm。

本文建立了基于 Thermo Fisher Scientific TSQ Fortis 三重四极杆串联质谱仪分析 10 种 N-亚硝基化合物的高灵敏检测方法, 检测限小于 1ppb。本方法灵敏度高, 重现性好, 线性范围宽, 远优于药品中进行日常基因毒性杂质 N-亚硝基化合物的分析检测要求。

实验部分

1. 仪器与试剂

Thermo Fisher Vanquish Binary Flex 超高效液相色谱仪, Thermo Fisher TSQ Fortis 三重四极杆质谱仪, 甲醇 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司), 实验用水为 Milli-Q 去离子水, 醋酸 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司)

2. 化合物信息及溶液配制

2.1 10 个 N-亚硝基化合物信息 (表 1)

表 1 10 个 N-亚硝基化合物信息

化合物编号	化合物	英文名称	英文缩写	CAS	分子式	分子量
1	N-二甲基亚硝胺	N-Nitrosodimethylamine	NMDA	62-75-9	C ₂ H ₆ N ₂ O	74.05
2	N-亚硝基吗啉	N-Nitrosomorpholine	NMOR	59-89-2	C ₄ H ₈ N ₂ O ₂	116.06
3	N-亚硝基甲乙胺	N-Nitrosomethylethylamine	NMEA	10595-95-6	C ₃ H ₈ N ₂ O	88.06
4	1-亚硝基吡咯烷	N-Nitrosopyrrolidine	NPYR	930-55-2	C ₄ H ₈ N ₂ O	100.06
5	N-亚硝基二乙胺	N-Nitrosodiethylamine	NDEA	55-18-5	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	102.08
6	N-亚硝基哌啶	N-Nitrosopiperidine	NPIP	100-75-4	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	114.48
7	N-亚硝基二丙胺	N-Nitrosodi-n-propylamine	NDPA	621-64-7	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	130.11
8	N-亚硝基二正丁胺	N-Nitrosodi-u-butylamine	NDBA	924-16-3	C ₈ H ₁₆ N ₂ O	158.14
9	N-亚硝基二苯胺	N-Nitrosodiphenylamine	NDPhA	86-30-6	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	198.08
10	二乙醇亚硝胺	N-Nitroso-diethanolamine	NDELA	1116-54-7	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₃	135.13

2.2 标准品

化合物 1-9 是混标溶液，浓度 2mg/mL (Dr.Ehrenstorfer)，溶剂甲醇。化合物 10 N-Nitro-diethanolamine 纯度 98.5% (Dr. Ehrenstorfer)

2.3 标准品溶液配制

甲醇溶剂稀释配制 100ug/ml 的 10 个化合物混标溶液。水稀释得 0.1ng/ml, 0.2ng/ml, 0.5ng/ml, 1ng/ml, 2ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 500ng/mL 及 1000ng/mL 的各浓度标准品溶液。

3. 色谱条件

色谱柱：Thermo Hypersil GOLD aQ (1.9 μ m, 100 x 2.1 mm)；柱温：40 $^{\circ}$ C；

进样量：20 μ L；

流动相：A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为甲醇，梯度洗脱程序（表 2）

表 2 梯度洗脱程序

时间 min	A%	B%	流速 ml/min
0	85	15	0.4
1	85	15	0.4
5	5	95	0.4
5.6	0	100	0.4
5.7	85	15	0.4
7	85	15	0.4

4. 质谱条件

Table 3 SRM parameters of 10 compounds 可加热电喷雾电离源（HESI），正离子扫描模式；

扫描方式：SRM；喷雾电压 (+)：3700V；离子传输管温度：270 $^{\circ}$ C；鞘气压力 45 arb；辅助气压力 3arb；

离子源温度：320 $^{\circ}$ C；碰撞气压力：1.5 mTorr；选择反应监测离子对信息见表 3

表 3 10 个亚硝胺类化合物质谱采集参数

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	Tube Lens (V)
NDMA	75.05	43	17	109
	75.05	58*	13	109
NMEA	89.05	43.071	13.89	104
	89.05	61.071*	11.82	104
NPYR	101.038	55.054*	16.46	101
	101.038	59.071	18.56	101
NDEA	103.088	29.208	15.45	101
	103.088	75.054*	11.11	101
NPIP	115.088	41.054	22.1	103
	115.088	69.054*	15.24	103
NMOR	117.038	45	19.07	117
	110.038	87.125*	10.9	117
NDPA	131.088	43.071	14.44	104
	131.088	89.125*	9.93	104
NDELA	135.088	103.125*	5.25	101
NDBA	159.088	57.125	13.97	109
	159.088	103.125*	10.48	109
NDPhA	109.088	66.054	26.82	123
	109.088	169.125*	10.48	123

注：带 * 的为定量离子

5. 实验结果

5.1 谱图结果

采用上述仪器分析方法, 5ng/ml的混标溶液, 10个化合物均可获得良好的色谱峰, 图1为10个化合物的SRM采集的色谱图。

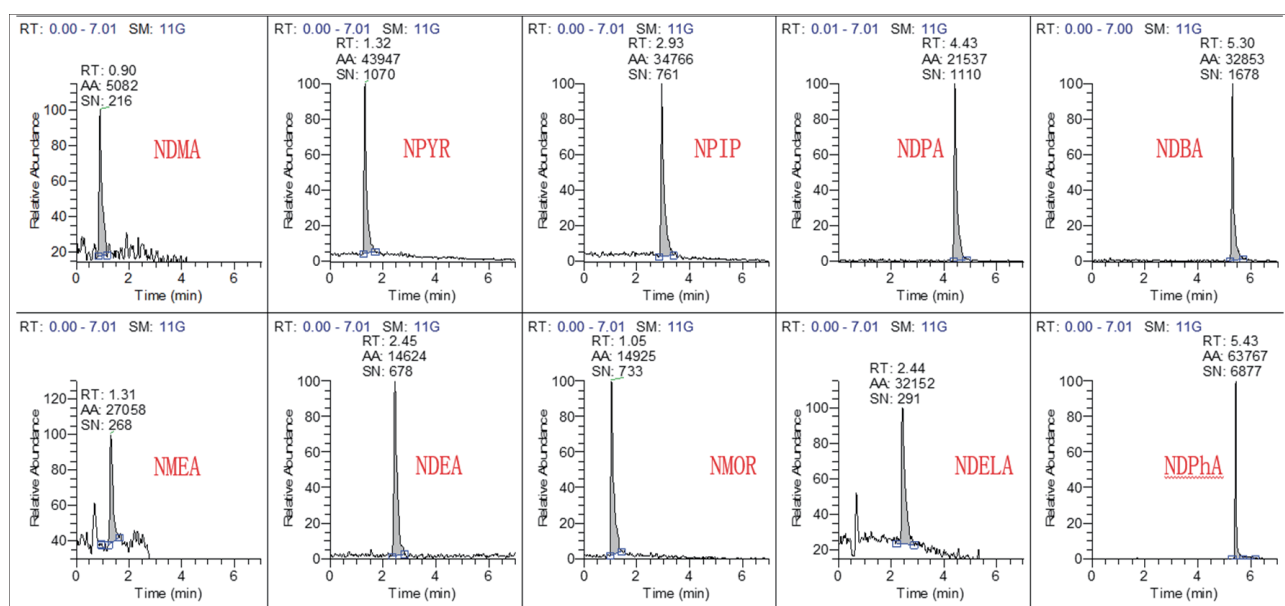


图1 十个化合物的SRM采集的色谱图

5.2 线性范围及重现性测试

采用上述仪器分析方法, 对10个化合物进行线性范围测试, 线性相关系数 r^2 均大于0.99, 线性关系良好。化合物线性范围、线性相关系数、检测限, 结果见表4, 所有化合物在三个浓度水平的相对标准偏差均小于5%。化合物线性方程图见图2。

表4 化合物线性范围、相关系数及检测限结果

化合物	简称	检测限 (PPB)	线性范围	5ppb RSD%	50ppb RSD%	500ppb RSD%
N- 二甲基亚硝胺	NDMA	1	2-1000ng/mL	3.77	1.76	1.28
N- 亚硝基甲乙胺	NMEA	1	2-1000ng/mL	3.58	1.06	1.15
1- 亚硝基吡咯烷	NPYR	0.2	0.5-1000ng/mL	2.87	2.33	1.69
N- 亚硝基二乙胺	NDEA	0.5	1-1000ng/mL	4.9	1.61	0.73
N- 亚硝基哌啶	NPIP	0.5	1-1000ng/mL	4.5	2.46	0.4
N- 亚硝基吗啉	NMOR	0.2	0.5-1000ng/mL	4.23	2.22	2.81
N- 亚硝基二丙胺	NDPA	0.1	0.5-1000ng/mL	4	2.07	1.39
N- 亚硝基二正丁胺	NDBA	<0.1	0.1-1000ng/mL	2.91	1.09	0.84
N- 亚硝基二苯胺	NDPhA	<0.1	0.1-1000ng/mL	4.35	1.1	1.71
二乙醇亚硝胺	NDELA	1	2-1000ng/mL	4.91	2.8	3.73

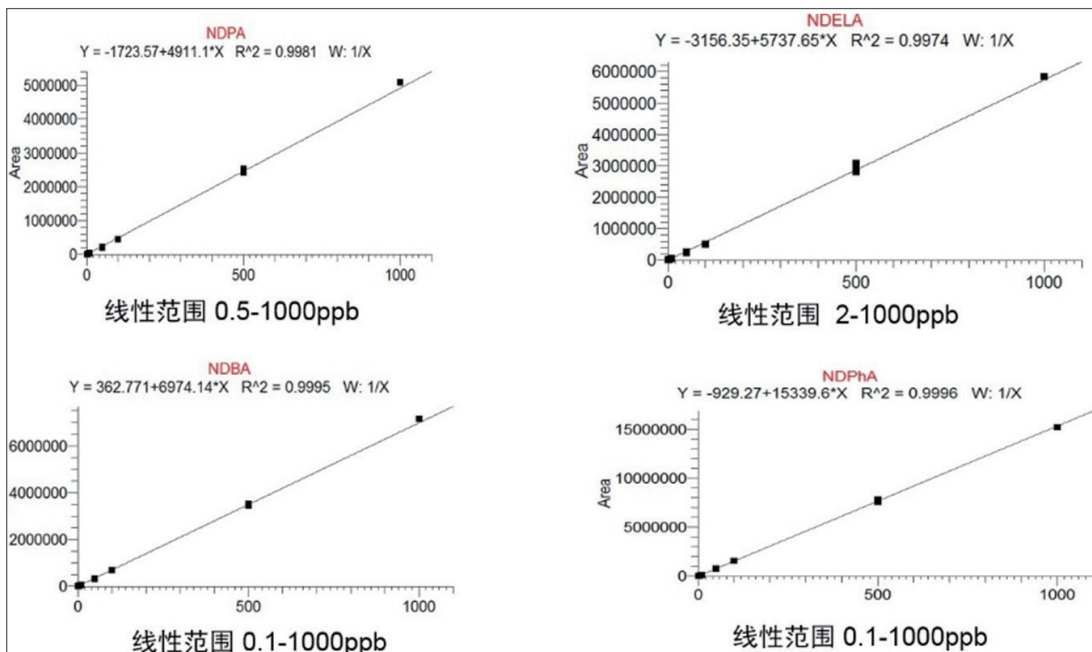
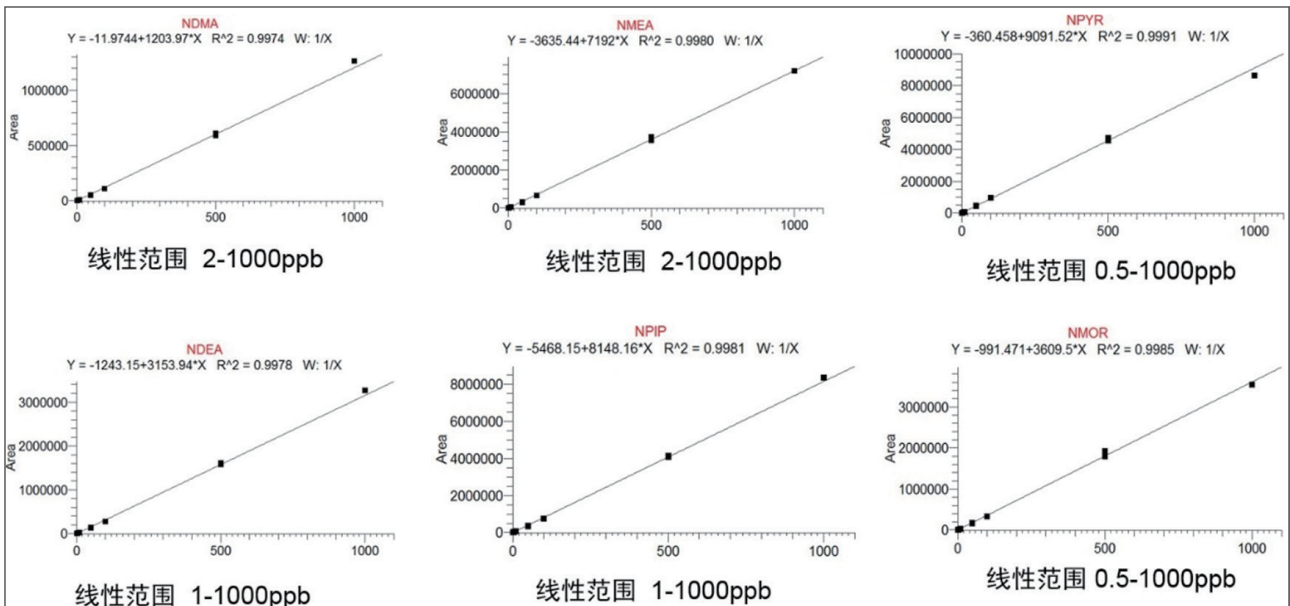


图 2 10 个 N- 亚硝基化合物线性方程图

总结

本文建立了三重四极杆液质联用仪 (TSQ Fortis) 分析基因毒性杂质 N- 亚硝基化合物的检测方法。建立的方法灵敏, 快速和稳定, 具备优异的重现性, 可以满足药品中日常分析基因毒性杂质的检测要求。

全新三重四极杆 TSQ Fortis 测定非衍生芳基磺酸酯类基因毒杂质

摘要

本文在 Thermo Scientific™ 全新液相色谱三重四极杆质谱 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ 平台建立了检测 8 种磺酸酯类的方法（苯磺酸酯类 3 个、对甲苯磺酸酯类 3 个、1,5-戊二醇单苯磺酸酯、1,5-戊二醇二苯磺酸酯）。选用 C18 柱（Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ 100x2.1mm, 1.9 μm），以 0.1% 甲酸水含 5 mM 乙酸铵溶液为流动相水相，以甲醇为流动相有机相，流速为 0.3 mL/min，柱温为 35°C。采用 ESI 源正离子模式进行 SRM 扫描。此 8 种化合物在 0.01-1000 ng/mL 浓度范围内线性关系良好 ($r^2 > 0.992$)，LOQ 在 0.01~50 ng/mL 之间，LOD 在 0.005~20 ng/mL 之间。本方法灵敏且专属性强，适用于非衍生芳基磺酸酯类基因毒性杂质的检测。

关键词

TSQ Fortis; 基因毒杂质; 非衍生磺酸酯类

引言

基因毒性杂质（Genotoxic Impurities, GTIs）指药物中能直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌作用的微量杂质；潜在基因毒性杂质（Potentially Genotoxic Impurities, PGIs）指结构中含有与基因毒性杂质反应活性相似的基团，如胍类、环氧化合物、N-亚硝胺类、磺酸酯类。基因毒性杂质主要来源于原料药生产过程中的起始原料、中间体、试剂、催化剂（元素残留如重金属）、溶剂（如醇类试剂易于与样品中的磺酸类化合物反应生产磺酸酯类化合物）、副反应产物等，以及储存过程中的降解产物如水解、氧化、异构化、聚合、潮解、发霉等。药物中如果基因毒性杂质控制不当，会造成临床隐患。

2007 年 Roche 生产研发的维拉赛特锭（用于治疗 HIV 的抗病毒药），因原料药和残留乙醇反应产生了甲磺酸乙酯基因毒性杂质，被 EMA 宣布召回。磺酸酯是一类潜在的基因毒性杂质，通常来源于药物合成中磺酸或其衍生物，因其在药物中的残留风险较常见而备受人们关注。2006 年，EMA 颁布了《基因毒性杂质限度指南》，首次提出了毒理学关注阈值（Threshold of Toxicological Concern, TTC）的概念，限度值为 1.5 μg/day，即相当于每天摄入 1.5 μg 的基因毒性杂质，被认为对于大多数药品来说是可以接受的风险。

本文建立了基于 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ 三重四极杆串联质谱仪针对 8 种芳基磺酸酯类的检测方法。本方法灵敏度高、专属性强、稳定性好，可以满足各药企对此类基因毒性杂质的检测要求，可为基因毒性杂质风险监控提供有效的技术支持。

实验部分

1. 仪器与试剂

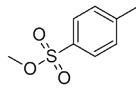
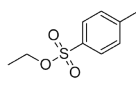
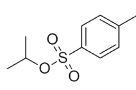
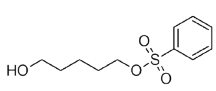
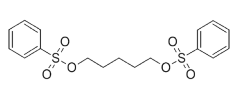
Thermo Scientific™ Vanquish™ Binary Horizon 超高效液相色谱仪 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ 三重四极杆质谱仪

甲醇（色谱纯，美国 Thermo Fisher 公司）；实验用水为 Milli-Q 去离子水；甲酸（色谱纯，SIGMA）乙酸铵（色谱纯，SIGMA）

2. 化合物信息及溶剂配置

2.1 8 种芳基磺酸酯类化合物信息（表 1）

名称	英文缩写	分子式	分子量	结构
苯磺酸甲酯	MBS	C ₇ H ₈ O ₃ S	172.02	
苯磺酸乙酯	EBS	C ₈ H ₁₀ O ₃ S	186.03	
苯磺酸异丙酯	IBS	C ₉ H ₁₂ O ₃ S	200.05	

对甲苯磺酸甲酯	MTS	C ₈ H ₁₀ O ₃ S	186.03	
对甲苯磺酸乙酯	ETS	C ₉ H ₁₂ O ₃ S	200.05	
对甲苯磺酸异丙酯	ITS	C ₁₀ H ₁₄ O ₃ S	214.28	
1,5- 戊二醇单苯磺酸酯	-	C ₁₁ H ₁₆ O ₄ S	244.08	
1,5- 戊二醇二苯磺酸酯	-	C ₁₇ H ₂₀ O ₆ S ₂	384.07	

2.2 储备液:

分别精确称取 1 mg 标准品粉末, 溶解于 1mL 甲醇中.

2.3 系列标准曲线:

以 50:50 甲醇水作为溶剂, 稀释成系列标准曲线 0.01 –1000 ng/mL

3 色谱条件

色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ (1.9 μm, 100 x 2.1 mm) ; 柱温: 35℃;

进样量: 5 μL;

流动相: A 为水 (含 0.1% 甲酸和 5 mM 乙酸铵), B 为甲醇, 梯度洗脱程序 (表 2)

表 2 梯度洗脱程序

时间	A%	B%	流速 mL/min
0.00	90	10	0.3
0.50	90	10	0.3
5	5	95	0.3
7	5	95	0.3
7.10	90	10	0.3
10.00	90	10	0.3

4 质谱条件

可加热电喷雾电离源 (HESI), 正离子扫描模式; 扫描方式: SRM; 喷雾电压 (+): 3500V; 离子传输管温度: 300℃; 鞘气压力 50 arb; 辅助气压力 15 arb; 离子源温度: 350℃; 碰撞气压力: 2 mTorr; 选择反应监测离子对信息见表 3。

表 3 8 种化合物及质谱采集参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	Tube Lens (V)
苯磺酸甲酯	190.05	51.071	55	72
	190.05	77.125	35.83	72
苯磺酸乙酯	204.038	77.125	37.65	78
	204.038	159.113	16.63	78
苯磺酸异丙酯	218.1	159.042	14.6	102
	218.1	175.988	6.31	102

对甲苯磺酸甲酯	187.088	91.125	15.45	72
	187.088	155.113	18.1	72
对甲苯磺酸乙酯	218.088	91.125	32.67	63
	218.088	173.042	14.69	63
对甲苯磺酸异丙酯	232.112	173.042	12.58	71
	232.112	189.887	7.02	71
1,5- 戊二醇单苯磺酸酯	262.1	87.125	11.28	86
	262.1	245.113	7.36	86
1,5- 戊二醇二苯磺酸酯	402.075	69.083	17.38	105
	402.075	227.042	13.09	105

5. 实验结果

5.1 色谱图

采用上述仪器方法，此 8 种芳基磺酸酯类获得了良好的色谱峰，图 1 为此 8 种化合物的色谱图，浓度为 50 ng/mL（其中 MBS 为 200 ng/mL）。

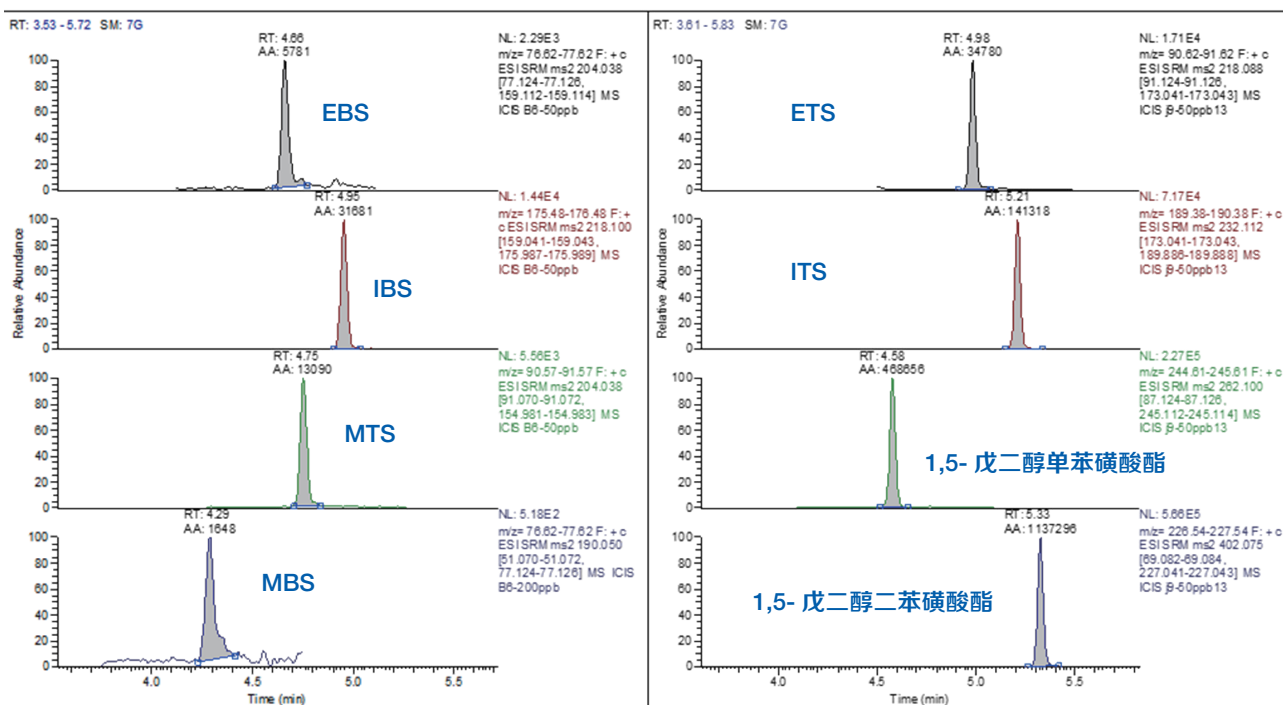


图 1. 8 种芳基磺酸酯提取离子流图

5.2 线性范围及重现性

采用上述仪器方法，对此 8 种芳基磺酸酯进行线性范围测试，线性相关系数 r^2 均大于 0.992，线性关系良好。8 种芳基磺酸酯线性范围、线性相关系数、LOQ ($S/N > 10$)、LOD 及 RSD 结果见表 4，部分化合物标准曲线图见图 2。

表 4 8 种化合物的线性范围、相关系数、LOQ、LOD 及 RSD

Compound Name	线性范围 /ng/mL	相关系数 (r^2)	LOQ/ng/mL	LOD/ng/mL	RSD%/ (n=6, c=50 ng/mL)
MBS	50-1000	0.992	50	20	8.6
EBS	2-1000	0.993	2	1	3.6
IBS	0.1-200	0.9993	0.1	0.1	2.2
MTS	2-500	0.993	2	2	2.3
ETS	1-100	0.9995	1	0.5	3.0
ITS	0.05-100	0.9998	0.05	0.02	2.7
BSA-A4	0.5-100	0.9999	0.5	0.2	1.97
BSA-A5	0.01-100	0.9955	0.01	0.005	1.68

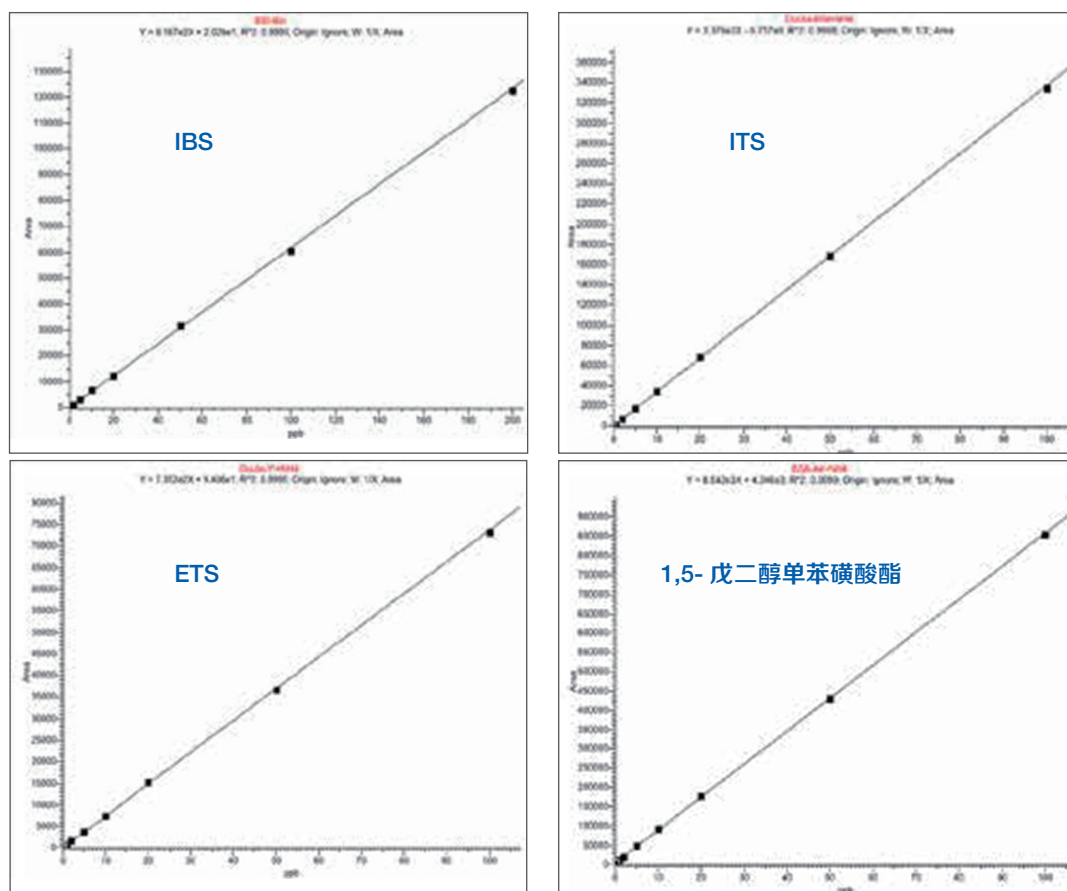


图 2 部分化合物标准曲线图

总结

本文建立了三重四极杆液质联用仪 (TSQ Fortis) 分析 8 种芳基磺酸酯类的检测方法。由实验结果可以看出, 基于 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ 建立的检测方法不仅具有优异的灵敏度和线性范围, 同时具备良好的重现性。本方法可用于芳基磺酸酯类基因毒性化合物的日常分析检测。

药典中黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 的液相色谱质谱检测分析

摘要

赛默飞全新液相色谱串联三重四极杆质谱 TSQ Altis 平台针对《中国药典》2015 版黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 分析要求建立了高灵敏的检测方法。在其适宜的浓度范围内线性关系良好($r^2>0.99$), 定量限远优于药典规定的检测要求, 并且重现性好。按照药典的前处理方法, 所得 70% 甲醇的样品溶剂, 可以直接运用本检测方法, 所得色谱峰形良好, 结果准确可靠。

关键词

黄曲霉毒素 B1,B2,G1,G2; TSQ Altis

引言

1993 年黄曲霉毒素被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 1 类致癌物, 是一种毒性极强的剧毒物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时, 可导致肝癌甚至死亡。黄曲霉毒素 (aflatoxins) 是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物, 特曲霉也能产生黄曲霉毒素, 但产量较少。产生的黄曲霉毒素主要有 B1, B2, G1, G2 以及其他代谢物。《中国药典》2015 版要求对药材, 饮片和制剂中黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、黄曲霉毒素 B2 (AFB2), 黄曲霉毒素 G1 (AFG1)、黄曲霉毒素 G2 (AFG2) 建立高灵敏度分析检测方法, 其中黄曲霉毒素 B2,G2 最低浓度点 0.04ng/ml, 黄曲霉毒素 B1,G1 最低浓度点是 0.12ng/ml。

本文建立了基于 Thermo Fisher Scientific TSQ Altis 三重四极杆串联质谱仪对 AFB1, AFB2, AFG1 和 AFG2 的高灵敏检测方法。本方法灵敏度高, 按照药典前处理后的 70% 甲醇的样品溶液, 可以直接运用本检测方法, 获得的色谱峰形良好, 稳定性和重现性优异, 远优于药典中对药材, 饮片, 及制剂中黄曲霉毒素的检测要求。

实验部分

1. 仪器与试剂

Thermo Fisher Vanquish Binary Flex 超高效液相色谱仪

Thermo Fisher TSQ Altis 三重四极杆质谱仪

甲醇 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 实验用水为 Milli-Q 去离子水; 醋酸铵 (色谱纯, SIGMA)

2. 化合物信息及溶液配置

2.1 黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 的信息 (表 1)

表 1 黄曲霉毒素化合物信息

化合物名	CAS	分子式	分子量
AFB1	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	312.1
AFB2	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.1
AFG1	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.1
AFG2	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.1

2.2 实验中配制的四个黄曲霉毒素化合物标准品溶液各浓度如下表 2:

表 2 黄曲霉毒素 B1,B2,G1 和 G2 配制的各浓度 (单位 pg/ml, 溶剂 70% 甲醇)

化合物	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	STD10	STD11
AFB1	0.545	1.09	2.18	5.45	10.9	27.25	54.5	109	545	1090	5450
AFB2	0.195	0.39	0.78	1.95	3.9	9.75	19.5	39	195	390	1950
AFG1	0.495	0.99	1.98	4.95	9.9	24.75	49.5	99	495	990	4950
AFG2	0.32	0.64	1.28	3.2	6.4	16	32	64	320	640	3200

3. 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil GOLD (1.9 μm , 100 x 2.1 mm) ; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$;

进样量: 5 μL ;

流动相: A 为水 (含 2 mmol/L 醋酸铵) , B 为甲醇 (含 2 mmol/L 醋酸铵) , 梯度洗脱程序 (表 3)

表 3 梯度洗脱程序

时间 min	A	B	流速
0	90	10	0.3
5	10	90	0.3
7	0	100	0.3
7.1	90	10	0.3
9	90	10	0.3

4. 质谱条件

可加热电喷雾电离源 (HESI) , 正离子扫描模式; 扫描方式: SRM; 喷雾电压 (+): 3100V; 离子传输管温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气压力 50 arb; 辅助气压力 5arb; 离子源温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞气压力: 2 mTorr; 选择反应监测离子对信息见表 4。

表 4 4 个黄曲霉素化合物质谱采集参数

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
AFB1	312.912	285*	23.72	84
AFB1	312.912	240.988	38.77	84
AFB1	312.912	269	32.25	84
AFB2	314.962	287.071*	26.42	84
AFB2	314.962	258.97	30.28	84
AFG1	329	243*	27.21	75
AFG1	329	310.97	22.17	75
AFG2	330.912	245*	30.89	88
AFG2	330.912	313	24.97	88

注: 带 * 的为定量离子

5. 实验结果

5.1 灵敏度测试

采用上述仪器分析方法, 70 % 甲醇溶剂的 AF B1, AF B2, AFG1, AFG2 标准品溶液, 四个化合物均可获得良好的色谱峰, 图 1 为化合物 LOQ 处的选择离子流提取图, 各化合物灵敏度测试结果见表 5。

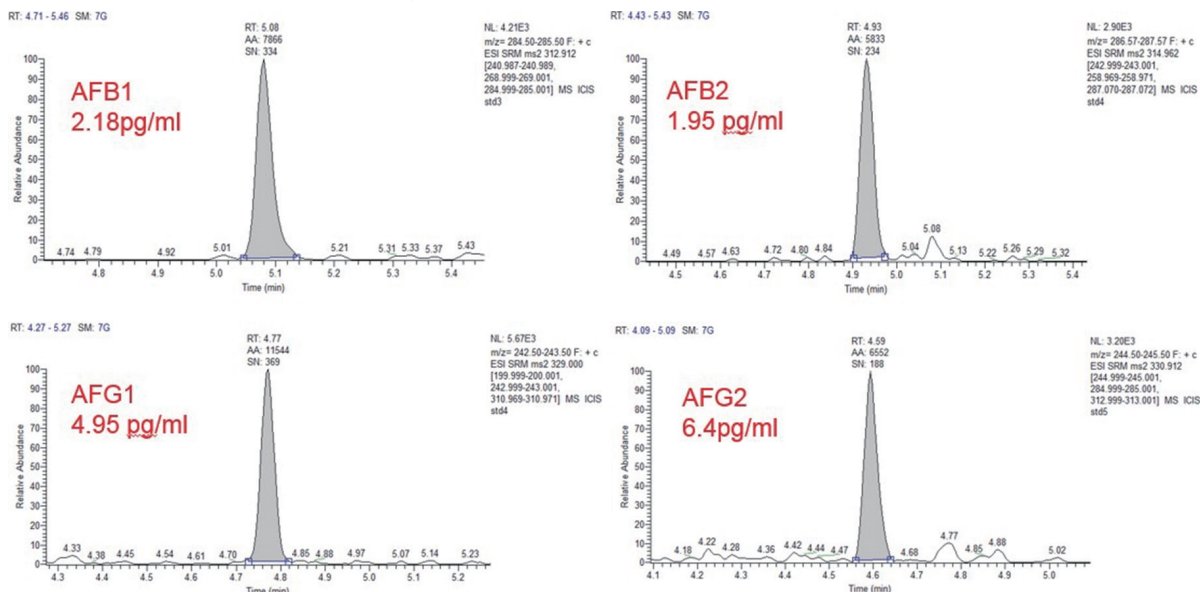


图 1 AFB1,AFB2,AFG1,AFG2 化合物的色谱图 (LOQ, 进样体积 5 μL)

表 5 4 种化合物的线性范围、线性相关系数及 LOD、LOQ、RSD

化合物	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (r^2)	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)	LOQ RSD% (n-6)
AFB1	2.18-5450	0.9994	0.5	2.18	2.98
AFB2	1.95-1950	0.9993	0.2	1.95	4.98
AFG1	4.95-4950	0.9996	0.5	4.95	4.05
AFG2	6.40-3200	0.9993	0.6	6.4	2.88

5.2 线性范围测试及重现性试验

采用上述仪器分析方法，对黄曲霉毒素 B1,B2,G1,G2 进行线性范围测试，线性相关系数 r^2 均大于 0.99，线性关系良好。对 4 种黄曲霉毒素化合物定量限 LOQ 标准品溶液重复进样六次，进行相对标准偏差 RSD 测试，实验结果证明 4 个化合物 RSD% 均小于 5%。化合物线性范围、线性相关系数、检测限，定量限及定量限的相对标准偏差结果见表 5，化合物线性方程图见图 2。

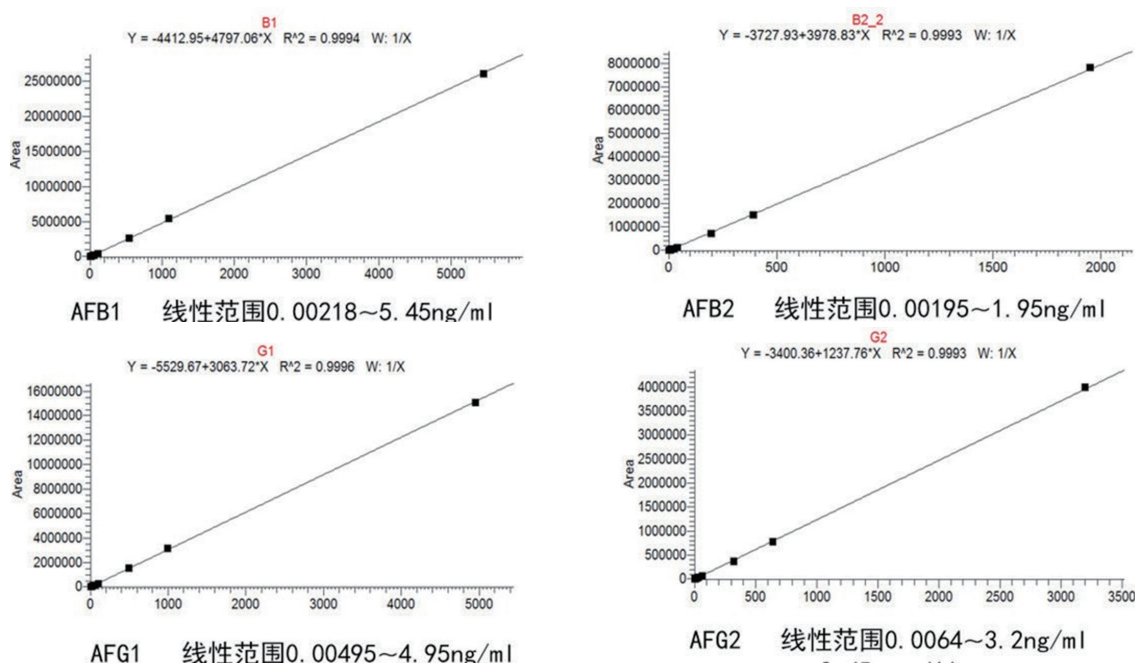
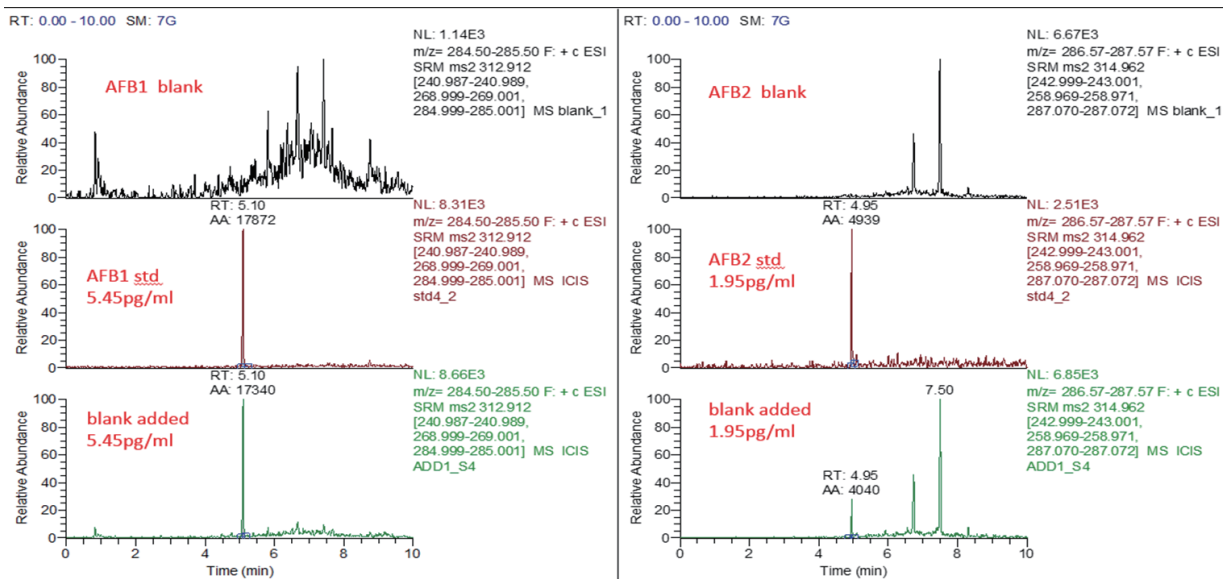


图 2 4 种化合物线性方程图

6. 基质效应

空白基质，低中高浓度标准溶液，以及空白基质加标溶液分别进样考察基质效应。结果见表 6。空白基质加低浓度标品溶液见图 3。



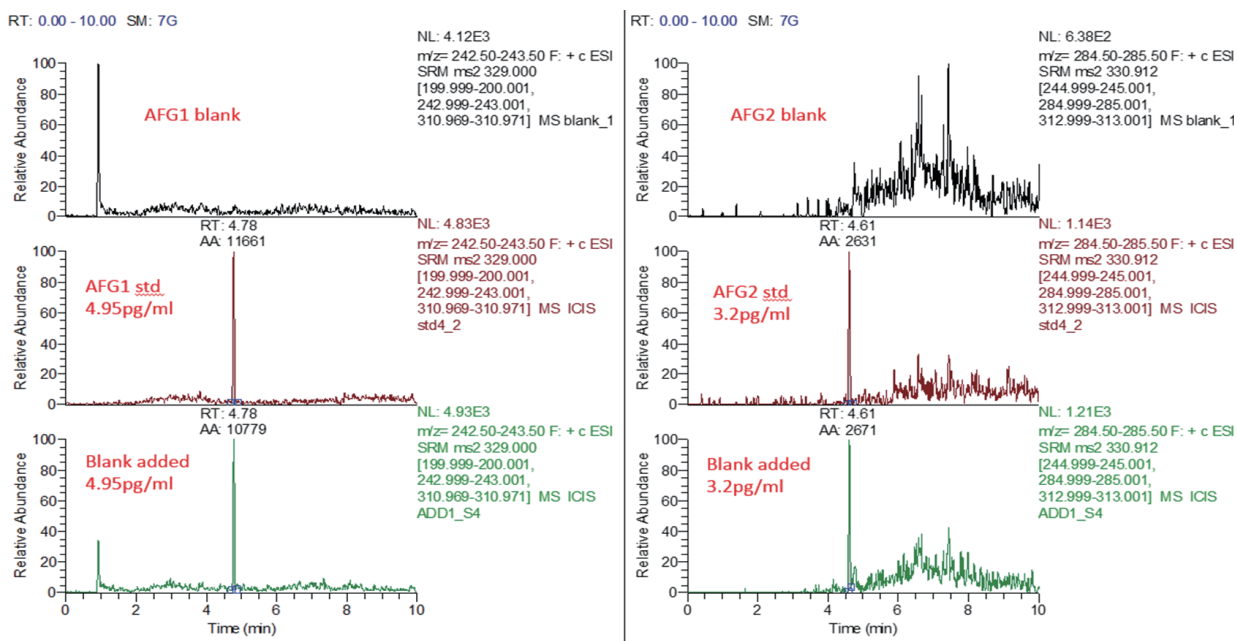


图3 基质效应考察 低浓度谱图

表6 基质效应考察 (低中高浓度)

基质加标峰面积 / 标准品峰面积	std4 低浓度	std7 中浓度	std10 高浓度	Average
AFB1 比值	97.40%	95.40%	94.20%	95.60%
AFB2 比值	81.80%	78.70%	77.10%	79.20%
AFG1 比值	92.40%	99.50%	97.40%	96.50%
AFG2 比值	101.50%	91.50%	91.40%	94.80%

由表格数据得出，此方法中 AFB1, AFG1, AFG2 基质效应在 10% 之内，AFB2 基质效应大约 20%。

总结

本文建立了三重四极杆液质联用仪 (TSQ Altis) 分析中国药典规定的黄曲霉毒素 B1, B2, G1 和 G2 的检测方法。建立的方法灵敏度高，检测限均小于 1ppt，色谱峰形良好，同时具备优异的重现性，远优于药典中对药材，饮片，及制剂中黄曲霉毒素的检测要求。

Q Exactive 高分辨质谱检测分析药物中 6 种亚硝胺类基因毒性杂质

摘要

本文基于 Q Exactive 超高分辨质谱仪建立了氯沙坦中 6 种亚硝胺 (NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA) 分析的高灵敏度检测方法。本方法可实现亚硝胺和氯沙坦主成分的有效分离, 定量下限低于目前的限度要求, 仪器的灵敏度高、重现性好, 完全可以满足日常亚硝胺类基因毒性杂质的检测需求。

关键词

Q Exactive; 亚硝胺; 基因毒性杂质; 氯沙坦

引言

亚硝胺的化学式是 NR_2NO (R 代表 H 或烃基)。大量的动物实验已确认, 亚硝胺是强致癌物, 并能通过胎盘和乳汁引发后代肿瘤。同时, 亚硝胺还有致畸和致突变作用。人群中流行病学调查表明, 人类某些癌症, 如胃癌、食道癌、肝癌、结肠癌和膀胱癌等可能与亚硝胺有关。

自 2018 年 7 月在缬沙坦原料药中检出 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 起, 陆续在其它沙坦类原料药中也检出了各类亚硝胺杂质, 如 N-亚硝基二甲胺 (NDMA)、N-亚硝基二乙胺 (NDEA) 等。进一步的调查发现, 在个别供应商的非沙坦类的药物中 (如雷尼替丁、二甲双胍), 亦有亚硝胺类杂质的检出。因此为了保证药品的安全和质量可控, 有必要对化学药品中亚硝胺类杂质进行全面的检测和控 制。

GCMS 和 LCMS 是药物中亚硝胺类杂质的常用分析测试方法, 美国 FDA 先后发布了多版关于检测药物中亚硝胺类杂质的参考方法。在 GCMS 检测方法中因为使用较高温度会加热雷尼替丁样品可能会导致 NDMA 生成, LC-QQQ 由于容易受到背景干扰难以完全排除检测过程中出现的假阳性, 因此 LC-HR MS 高分辨质谱已成为 FDA 推荐的亚硝胺类化合物检测的首选方法。

本文基于 Q Exactive 超高分辨质谱仪建立氯沙坦中 6 种亚硝胺分析的高灵敏度方法, 重现性好, 完全满足日常亚硝胺类基因毒性杂质的检测需求。

实验部分

1. 仪器与试剂

Thermo Fisher Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo Fisher Q Exactive 超高分辨质谱仪、Thermo Scientific Hypersil GOLD Phenyl 色谱柱 (P/N: 25903-104630), LCMS 级甲醇 (Fisher A456-4)、LCMS 级水 (Fisher W6-4)、LCMS 级甲酸 (Fisher A117-50)、Titan3, 17 mm PVDF 过滤器, 0.22 μm (P/N: 42213-PV)。

2. 样品前处理

2.1 亚硝胺标准品储备液

用纯甲醇配置标准品, 并用纯甲醇进行稀释, 最终得到混标中 6 种亚硝胺的浓度均为 100 ng/mL, 以此作为标准品储备液。

2.2 成品药样品制备

称取适量药片粉末至 15mL 离心管中, 加纯甲醇, 涡旋 1 min, 震荡 40 mins, 得到 API 浓度约为 10mg/mL 的溶液。提取后, 4500 rpm 离心 15 mins, 取上清液过 0.22 μm PVDF 滤膜, 滤液取至进样小瓶中供 LCMS 分析。

3. 色谱方法

超高效液相 UHPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) 系统进行色谱分离, 该系统由真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 和二元泵组成。采用 Thermo Scientific Hypersil Gold Phenyl 分析柱, 此柱基于高纯硅胶设计, 包含 C4 连接基团, 具备中等疏水性, 与芳香族化合物具有加强的 pi-pi 相互作用, 出众的保留能力和独特的选择性特别适合苯环和芳环化合物的分析。本实验中此柱对亚硝胺有较好的保留, 和氯沙坦可以做到有效分离。

表 1.6 种亚硝胺的色谱分离方法

色谱条件			
色谱柱	Hypersil Gold Phenyl (4.6*100mm, 3 μ m)		
柱温	40°C		
流速	0.6 mL/min		
洗脱相 A	0.1%甲酸-水		
洗脱相 B	0.1%甲酸-甲醇		
梯度条件	时间(min)	A%	B%
	0	90	10
	1.5	90	10
	7	45	55
	17	45	55
	17.1	10	90
	21	10	90
	21.1	90	10
	25	90	10
进样体积	5 μ L		
样品盘温度	6°C		
洗针液	甲醇: 水 = 80:20 (含0.1%甲酸)		

4. 质谱条件

仪器: Thermo Scientific™ Q Exactive™ 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨串联质谱, HESI 离子源参数: Spray Voltage+4.0KV/-3.2KV; Sheath Gas Pressure: 55arb; Aux Gas Pressure: 15arb; Capillary Temp: 300°C ; Heater Temp: 450°C ; S-Lens:50。正负离子切换及 t-SIM 和 PRM (平行反应监测) 扫描方式采集数据, 对于不同的化合物采用不同的扫描方式以降低背景干扰, 获得最佳的检测及定量效果。

表 2.6 种亚硝胺的质谱扫描方法

Impurity	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
Scan Type	PRM	t-SIM	PRM	PRM	t-SIM	PRM
Polarity	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive
Scan Start -End (min)	1.5 - 4.4	4.5 - 6.39	6.4 - 8.09	8.1 - 9.49	9.5 - 11.0	14.9 - 17.0
m/z Isolated for PRM/t-SIM	75.0553	145.0619	103.0866	117.1022	131.1179	159.1492
NCE	30	N/A	30	10	N/A	30
Isolation Window	1.5 m/z	1.5 m/z	1.5 m/z	1.5 m/z	1.5 m/z	1.5 m/z
Microscans	3	3	3	3	3	3
Resolution	35,000	70,000	35,000	35,000	70,000	35,000
AGC target	2.00E+05	1.00E+06	2.00E+05	2.00E+05	1.00E+06	2.00E+05

5. 实验结果

5.1 灵敏度测试

Q Exactive 具有超高分辨率及质量精度, 在亚硝胺定量检测的过程中可以排除背景离子的干扰, 有效的避免假阳性以获得准确的定量结果。图 1 和 2 分别为 6 种亚硝胺的 (NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA) 的检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ) 的检测结果。

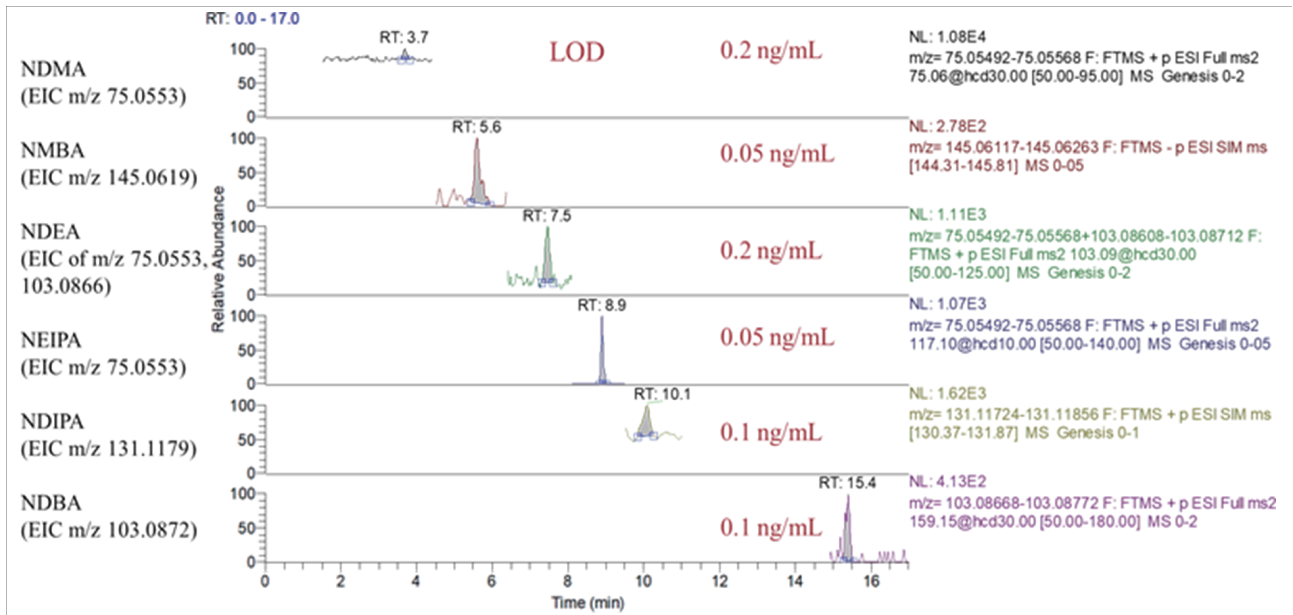


图 1. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA 的检测限 (LOD) 示例色谱图

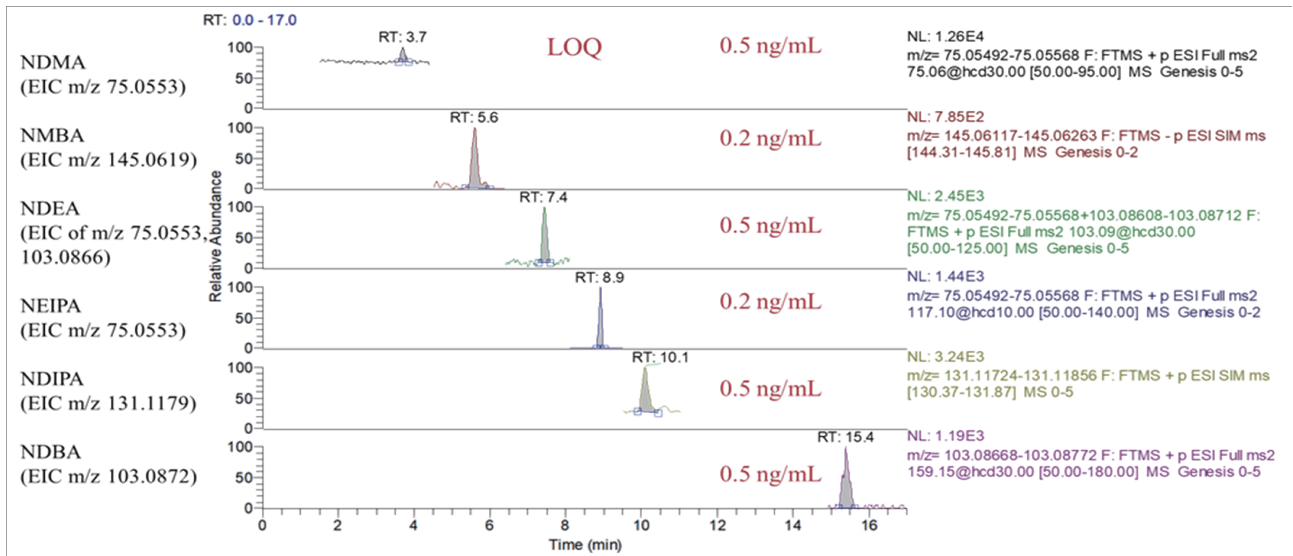
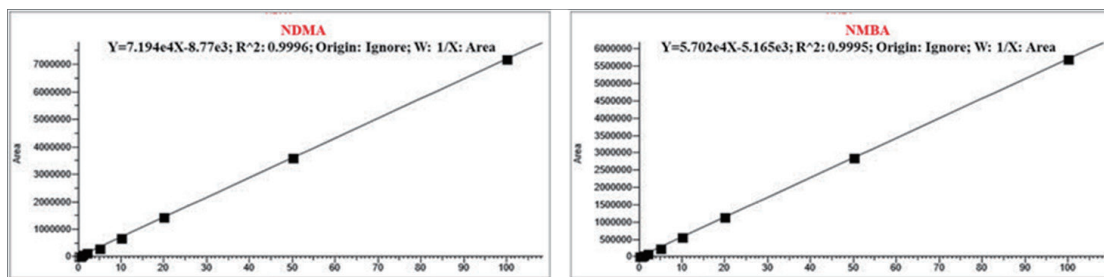


图 2. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA 的定量限 (LOQ) 示例色谱图

5.2 系统适应性及线性范围测试

根据 FDA 推荐方法进行进样顺序要求, 序列中初始 6 针标准品溶液 (2ng/ml) 6 个亚硝胺测试的相对标准偏差均小于 2%, 整个序列中标准品溶液相对标准偏差也小于 2%。采用上述仪器方法, NDMA 在 0.5 ng/mL-100ng/mL、NMBA 在 0.2 ng/mL-100ng/mL、NDEA 在 0.5 ng/mL-100ng/mL、NEIPA 在 0.2 ng/mL-100ng/mL、NDIPA 在 0.5 ng/mL-100ng/mL、NDBA 在 0.5 ng/mL-100ng/mL 浓度范围内, 线性相关系数 R^2 大于 0.999, 线性关系良好。



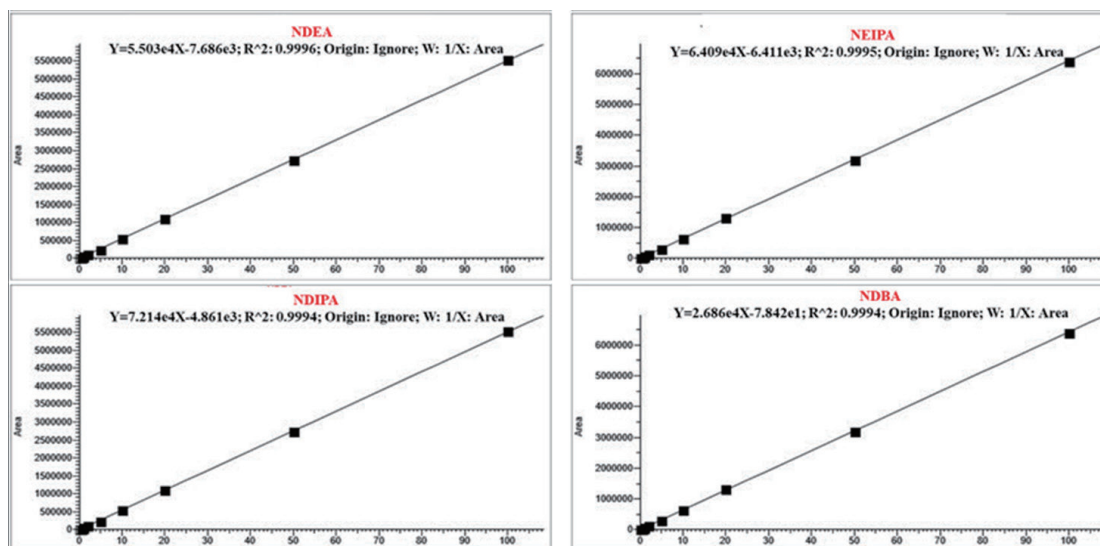


图 3. NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA 的标准曲线图

5.3 氯沙坦样品中亚硝胺的测试

通过对稀释的样品进行测定，可知 API 氯沙坦的出峰时间为 20.3 min，实际样品测定过程中色谱出峰 17min 以后的洗脱液均切入至 废中。通过对某品牌氯沙坦片剂进行测定，检测到 NDMA 的浓度约为 0.807 ng/ml（相当于样品中 NDMA 的含量为 0.04 ppm，未超出目前已有的关于 NDMA 的限度要求）。

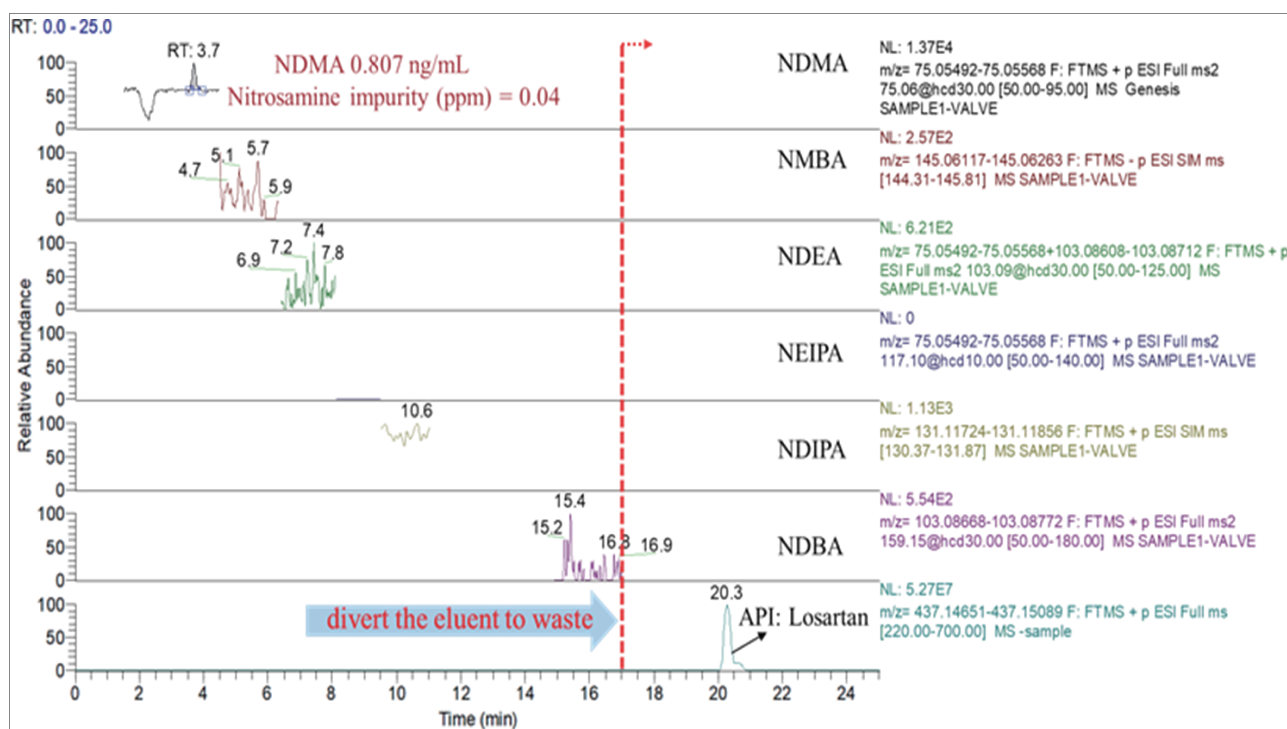


图 4. 氯沙坦样品中亚硝胺测定的色谱图

结论

本文建立了基于 Q Exactive 系列超高分辨质谱分析氯沙坦样品中基因毒性杂质 NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA, 和 NDBA 的检测方法，该方法的灵敏度及重现性完全可以满足 FDA 要求。同时，根据不同客户需求，我们可提供不同的仪器控制及数据处理软件，有适合常规检测需求的 Xcalibur 和 TraceFinder 软件，也有完全合规的 Chromeleon 软件，针对不同用户提供从仪器到软件的全面解决方案。

DGLC-Q Exactive 在线除盐高分辨液质联用在药物杂质鉴定中的应用

摘要

本文采用 DGLC 双三元液相，一维采用不挥发盐作为流动相添加剂以重现标准方法的分离与保留，二维进行杂质捕获和除盐。使用 DAD 检测器对一维和二维组分进行比对检测，Q Exactive 对除盐后杂质进行高分辨质谱分析，实现了杂质有效的分离和鉴定。

关键词

Q Exactive 高分辨质谱；DGLC 双三元液相；在线除盐；药物杂质

引言

质谱技术因其快速、高灵敏度和高专属性的分析能力，已经被广泛的应用于药物杂质鉴定，Q Exactive™ 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱具有超高的分辨率和长期稳定的高质量精度，可获得高质量的一级和二级高分辨质谱数据，保证了鉴定结果的可靠性，被越来越多的应用于杂质定性分析中。

为了获得更佳的杂质保留和分离，药典和标准方法中常会选择挥发盐或离子对试剂，而此类添加剂无法与电喷雾质谱兼容。为了解决色谱分离与质谱兼容的矛盾，本文采用 DGLC 双三元液相，一维采用不挥发盐作为流动相添加剂以重现标准方法的分离与保留，二维进行杂质捕获和除盐。使用 DAD 二极管阵列检测器对一维和二维组分进行比对检测，Q Exactive 对除盐后杂质进行高分辨质谱分析。双三元液相与高分辨质谱联用，实现了杂质有效的分离和鉴定。

实验部分

1. 液相色谱条件

仪器：Thermo Fisher UltiMate 3000 DGLC 双三元高效液相色谱仪

左泵条件：

色谱柱：C18 (150×4.6 mm, 3 μm)

流速：0.8 mL/min

流动相：A1: 10 mM KH₂PO₄ pH 6.0, B1: 乙腈

右泵条件：

色谱柱：Acclaim C18 (50×2.1 mm, 2.2 μm)

流速：0.4 mL/min

流动相：A2: 0.1% 甲酸, B2: 乙腈

梯度条件：

左泵时 (min)	A1 (%)	B1 (%)	右泵时 (min)	A2 (%)	B2 (%)
0	90	10	0	98	2
2	90	10	12	98	2
7	65	35	16	90	10
17	65	35	20	90	10
22	40	60	—	—	—
25	40	60	—	—	—

2. 质谱条件

仪器：Thermo Q Exactive 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨串联质谱

HESI 离子源参数：

Spray Voltage +3.5 KV/-2.8 KV，正负离子模式；Sheath Gas Pressure: 40 arb；Aux Gas Pressure: 10 arb；Capillary Temp: 300℃；Heater Temp: 350℃

质谱扫描参数：

全扫描范围 120-1500 m/z，分辨率 140,000 FWHM；二级：数据依赖自动触发；母离子隔离窗口 1.5 amu；分辨率 17,500 FWHM

3. 样品制备

取原料药粉末适量，加乙腈溶解，离心后取上清液适量，用乙腈：水（20:80）稀释至 0.2 mg/mL 后进样分析。

4. 实验结果

4.1 双三元液相二维在线除盐

双三元液相左泵采用非挥发性的流动相，连接长色谱柱，按标准方法实现杂质有效分离和保留时间重现。右泵采用质谱兼容的挥发性流动相，连接短色谱柱，以短梯度实现杂质捕获与非挥发性盐的脱除。液相部分采用双六通阀实现流路切换，左侧阀实现检测器的共用，右侧阀实现目标杂质的转移。当一维色谱柱连接 DAD 检测器时，根据待目标杂质出峰起止时间适时地将其切入 Loop 环收集，利用右泵质谱兼容的流动相反冲 Loop 环杂质进入二维色谱柱，经过分离后再次经过 DAD 检测器，最后通过质谱部分的六通环切换进入质谱检测（图 1）。

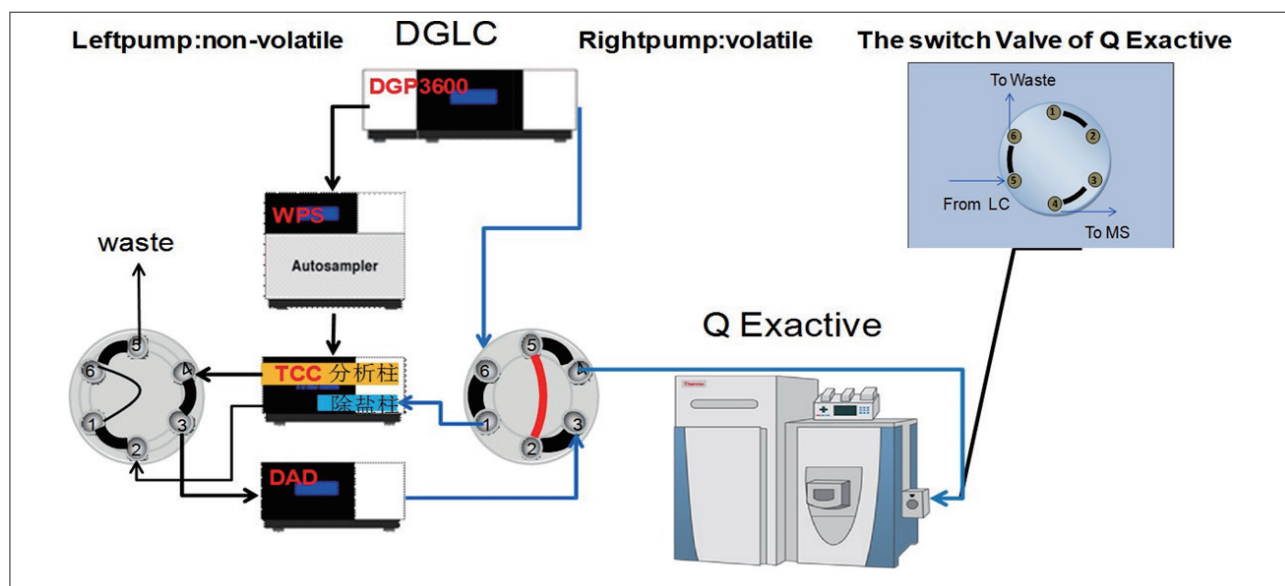


图 1. DGLC-Q Exactive 在线除盐高效液相 - 高分辨质谱联用示意图

图 2A 为药物经过一维色谱分离后，主要杂质的分离情况，图 2B 为 7 个主要杂质切入二维后的色谱峰保留情况。通过该方法，流动相中的磷酸盐得到了有效的去除，另外二维色谱能够提供额外的分离能力，例如杂质 5 在一维中呈现单色谱峰，经过二维的色谱分离，可以观察到两个杂质（5-1/5-2）的信号存在。

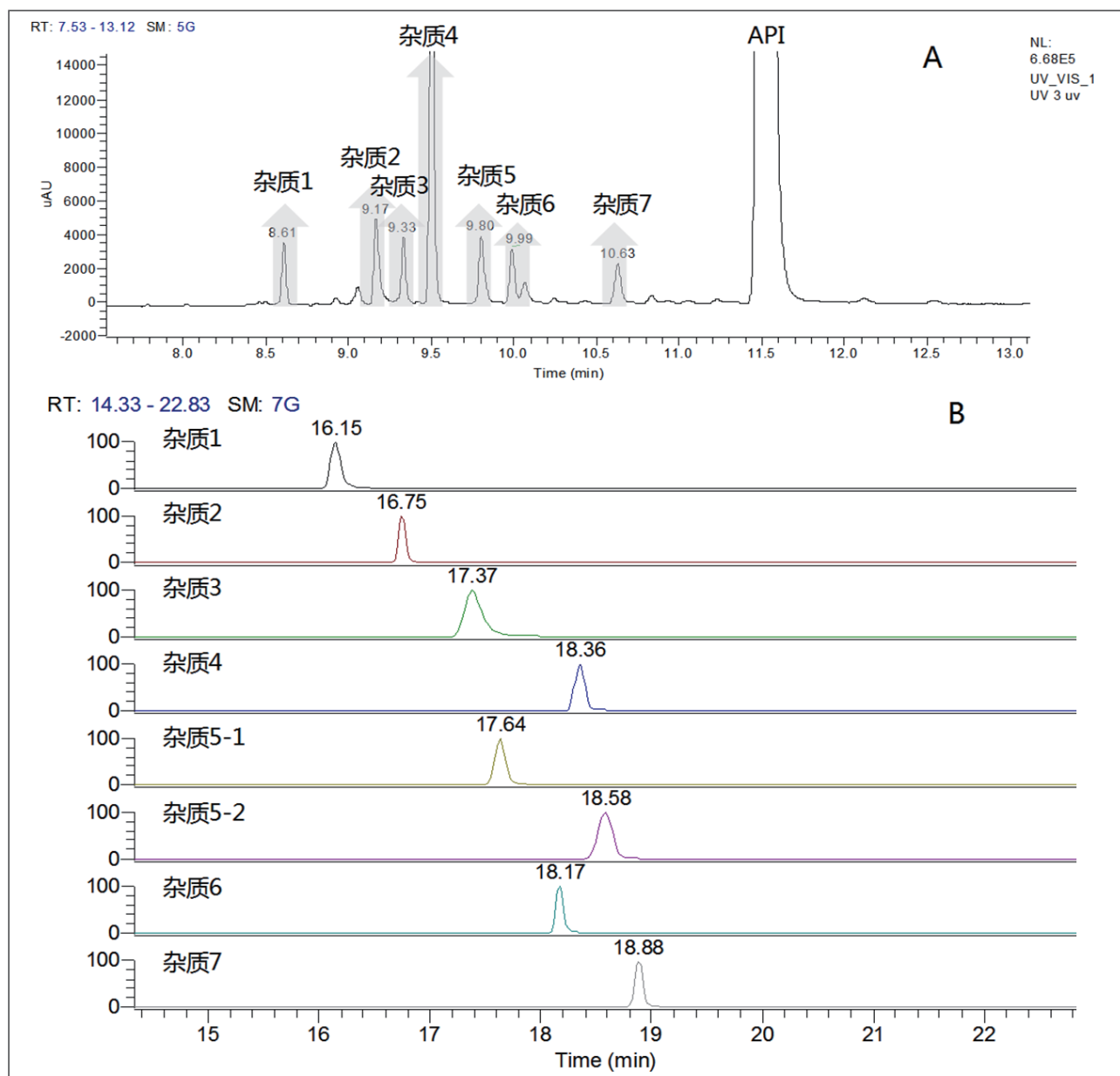


图 2. 一维 (A) 和二维 (B) 色谱中杂质保留情况

4.2 高分辨质谱杂质鉴定

4.2.1 未知杂质元素组成计算

Q Exactive 具有长期稳定的质量精度，利用精确质量数可以计算出未知杂质的元素组成。但即使具有超高的质量精度，也可能有多种元素组成的计算结果。在本例中，杂质 1 有 10 个偏差小于 2 ppm 的元素组成存在，准确元素组成排名第 7 (图 3A)。Q Exactive 同时具有超高的分辨率，能够获得细分同位素信息，由图 3B 可见，杂质 1 的 A2 同位素裂分为两个峰，根据精确质量数和同位素丰度计算可知，杂质 1 含有 2S。根据该信息，偏差小于 2ppm 的元素组成缩减为 3 个，准确元素组成排名第 2。二级质谱同样是判断元素组成的有用手段，通过杂质 1 负离子二级信息， $C_{11}H_{20}O_8NF_2S_2$ 可能性被排除，准确元素组成 $C_{15}H_{15}N_5O_3FS_2$ 排名第一。

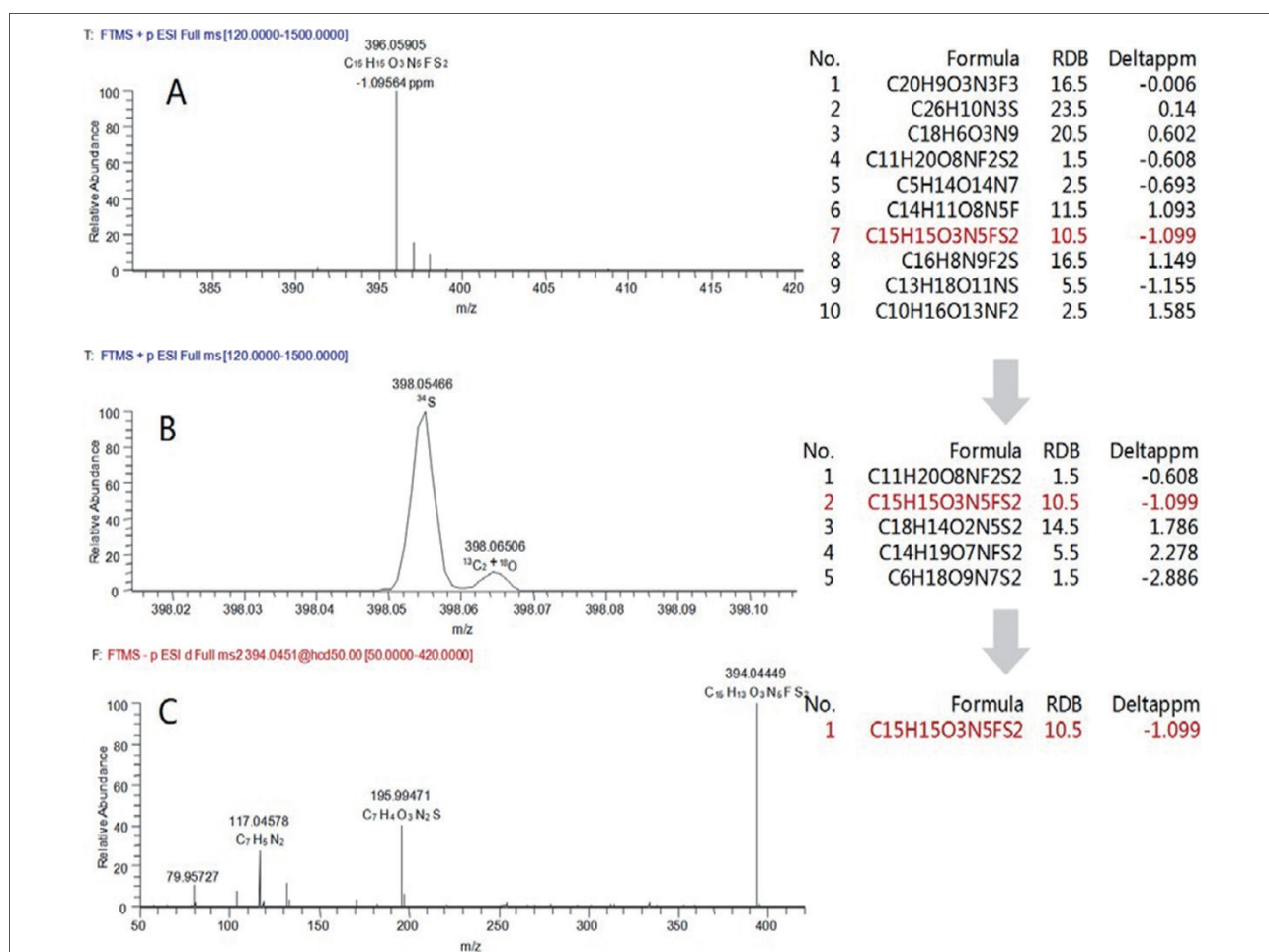


图 3. 精确质量数、细分同位素、二级高分辨提升元素组成准确性

4.2.2 快速正负切换准确锁定杂质结构

结构解析软件将调用碎裂数据库（Fragmentation Library）快速的对 API 的碎片结构进行归属，该数据库几乎涵盖了所有已发表的文献，保证了碎片解析的准确性。在获得差异杂质质谱信息后，对不同组分之间的二级质谱进行比对，进一步对杂质变化位点进行推测。

Q Exactive 具有快速、高效的正负切换能力，能够实现一针进样即获得正离子和负离子下的一级和二级信息。通过正离子二级质谱（图 4A）比对可知，m/z 298 部分碎片杂质 1 与 API 结构相同，通过负离子二级质谱（图 4B）比对可知，杂质与 API 结构差异部分存在于 m/z 196 的碎片。

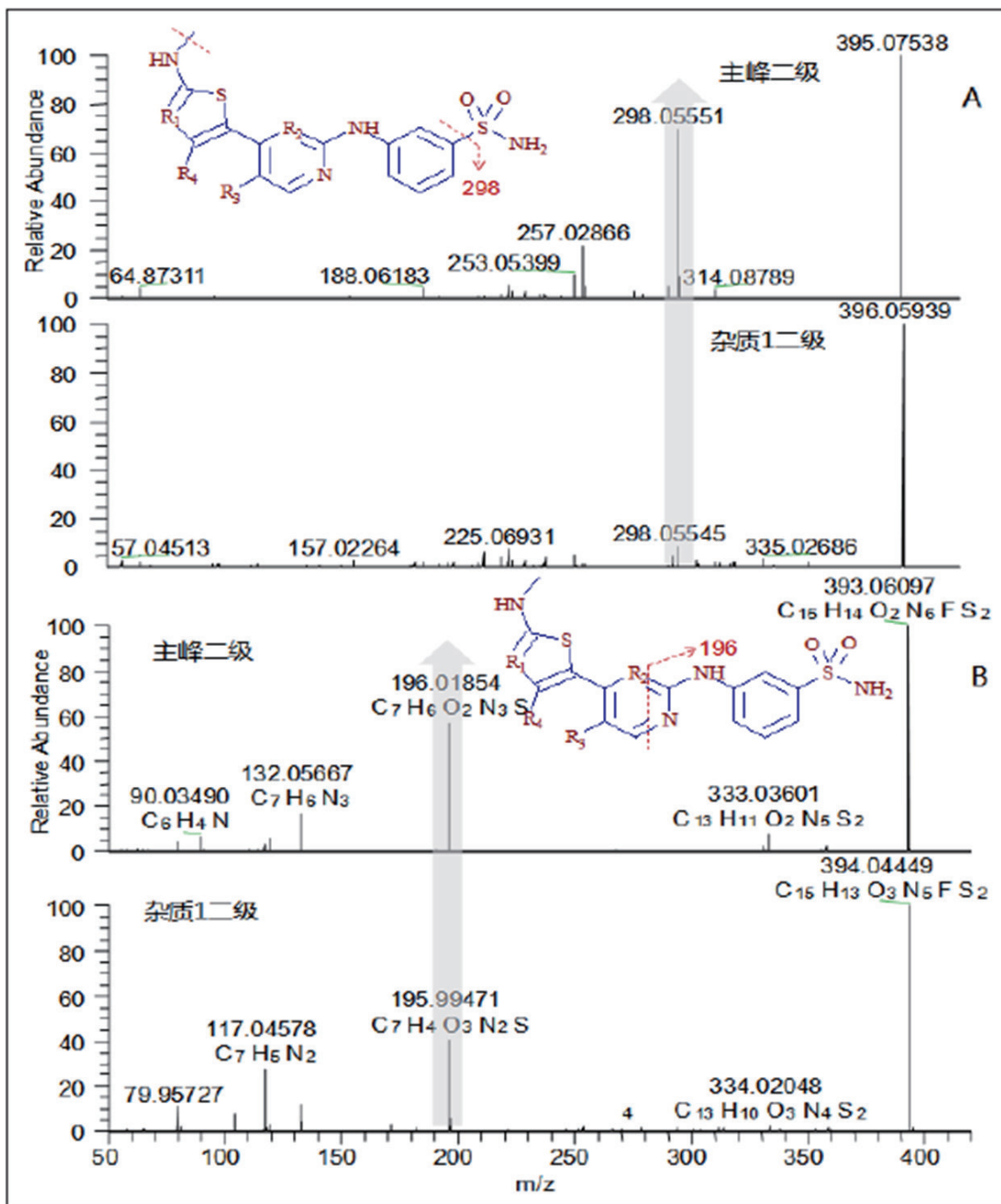


图 4. 正离子 (4A) 和负离子 (4B) 二级质谱比对

通过 Q Exactive 二级快速正负切换, 获得 API 与杂质不同官能团碎片信息, 有效锁定了置换位点 (图 5)。

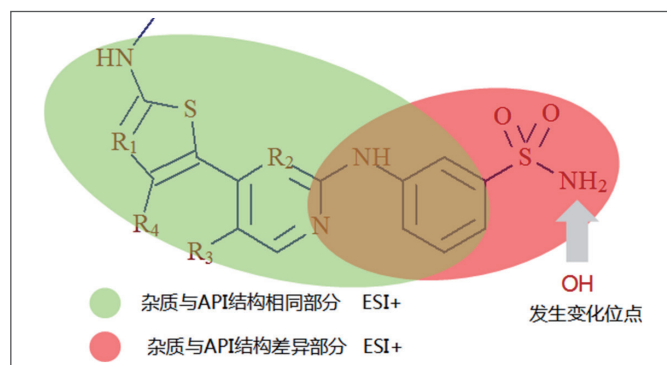


图 5. 二级质谱碎片归属比对结果

结论

采用双三元液相色谱（DGLC）的在线除盐技术，实现了非挥发性流动相与质谱的兼容，达到了杂质有效分离和保留时间重现的目的。利用高分辨质谱 Q Exactive 对除盐后杂质进行检测分析，结合精确质量数、超高分辨率下的细分同位素、二级高分辨数据准确生成未知杂质的元素组成，通过 Q Exactive 独有的快速正负切换能力，对杂质与 API 的二级质谱进行比对分析，进一步确定了未知杂质的结构。该方法自动化程度高，鉴定准确性强，能够广泛的试用于药物杂质分析中。

赛默飞遗传毒性杂质解决方案 IC 篇



ICS-6000

柱切换离子色谱法测定厄贝沙坦中的叠氮根离子

摘要

本文采用柱切换离子色谱法，通过预处理柱（NG1 柱）、富集柱（TAC-ULP1 柱）和分析柱（IonPac AS18 柱）以适当的方式与六通阀连接，快速测定脂溶性药物种的痕量叠氮根离子。

关键词

离子色谱；电导；厄贝沙坦；叠氮根离子

引言

厄贝沙坦（irbesartan），适用于治疗原发性高血压，是一种新型血管紧张素 II 受体拮抗剂，具有良好的降压作用和极少的不良反应。目前，该药已列入《国家基本医疗保险药品目录》，市场应用普遍。厄贝沙坦为 2-正丁基-3-[(2'-氰基联苯-4-基)甲基]-1,3-二氮杂螺[4,4]-壬-1-烯-4-酮（中间体）与叠氮化钠（NaN₃）经环加成制得。由合成工艺可知，产品中易引入叠氮根离子。叠氮化物为剧毒物质，因此，对厄贝沙坦原料进行叠氮根离子的控制是十分必要的。

美国药典（USP35-NF30）和欧洲药典（EP7.0）均采用离子色谱法测定叠氮根离子，以 100 mmol/L 的氢氧化钠为淋洗液，采用强保留离子色谱柱进行分离，叠氮根离子限度为不得过 10 mg/L。本方法采用柱切换离子色谱法测定厄贝沙坦中的叠氮根离子，以 90% 甲醇为溶剂溶解样品后直接进样，预处理柱（NG1 柱）、富集柱（TAC-ULP1 柱）和分析柱（IonPac AS18 柱）以适当的方式与六通阀连接，使之能并联、串联切换使用。预处理柱和富集柱作为前处理柱用于色谱柱前的样品处理，在去除样品基质的同时富集待测组分，又可保护分析柱，延长分析柱的寿命。该方法操作简便，并可在脂溶性药物的痕量离子测定中广泛应用。

实验部分

1. 仪器条件

仪器：ThermoFisher 公司 ICS 5000 系统（配等度泵 + 低压四元梯度泵）；

分析柱：IonPac AS 18, 250×4 mm (P/N: 060549)

保护柱：IonPac AG 18, 50×4 mm (P/N: 060551)

浓缩柱：IonPac TAC-ULP1, 23×5 mm, P/N: 061400)；

前处理柱：IonPac NG1, 35×4 mm, (P/N: 039567)；

柱温：30 °C；

流速：1.00 mL/min；

定量环：200 μL；

淋洗液源：带有 CR-ATC 的 EGC II KOH；

KOH 梯度淋洗液程序为：0 ~ 18 min, 9 mmol/LKOH（分离），18 ~ 26 min, 40 mmol/LKOH（冲洗），26 ~ 34 min, 9 mmol/LKOH（平衡）。

低压四元梯度泵：

流速：0.5 mL/min

流动相：0 ~ 4 min, 100%水（带动样品到浓缩柱中），4 ~ 14 min, 100%乙腈（将疏水性物质冲洗到废液），14 ~ 34 min, 100%水（平衡系统）。

检测方式：抑制型电导检测器，ASRS 300 型（4 mm）电化学自再生抑制器，自循环电抑制，电流为 99 mA。

2. 样品前处理

图 1- 图 3 给出了色谱系统的工作过程，在连接时尽量缩短仪器单元与单元之间的连接线，以减少死体积。图 1 中样品装载到定量环。六通阀切换至图 2 状态时，厄贝沙坦样品随去离子水进入 NG1 柱和 TAC-ULP1 中，疏水性厄贝沙坦被吸附在 NG1 柱中，N₃⁻ 离子在 NG1 柱中不保留，瞬间洗脱后被富集在 TAC-ULP1 中，废液排空。4 min 后，六通阀切换至图 3 状态，TAC-ULP1 柱与分离柱连接，被富集的 N₃⁻ 经淋洗液梯度洗脱进行分离测定；同时用乙腈洗脱 NG1 柱中截留的厄贝沙坦。图 2 切换至图 3 的时间（4 min）经方法摸索后确定，可以避免厄贝沙坦及溶剂甲醇的干扰，并保证 N₃⁻ 离子没有损失。

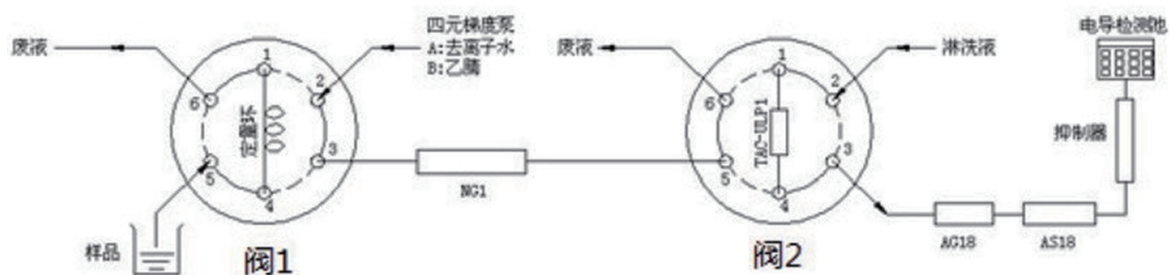


图 1 仪器连接图（装载到定量环）

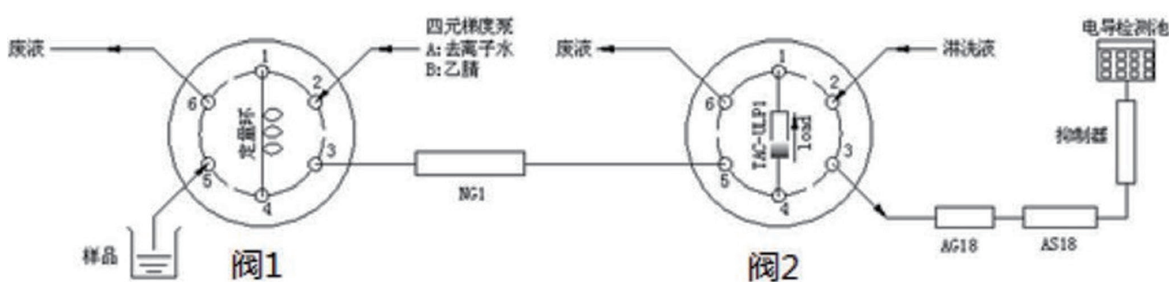


图 2 仪器连接图（0 ~ 4min）

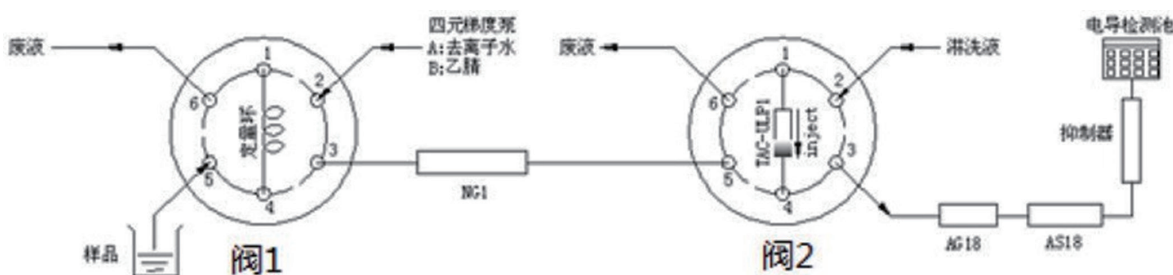


图 3 仪器连接图（4 ~ 34min）

3. 实验结果

3.1 分离条件的优化

考虑到 Br⁻ 和 NO₃⁻ 离子可能在实际样品中存在且容易对 N₃⁻ 离子的测定造成干扰，故配制系统适用性溶液，选用 AS18 阴离子分析柱在 9 mmol/L KOH 的淋洗液条件下各离子分离情况良好，保留时间合适，N₃⁻ 离子后出峰的杂质，用 40 mmol/L KOH 洗脱。结果如图 4 所示。

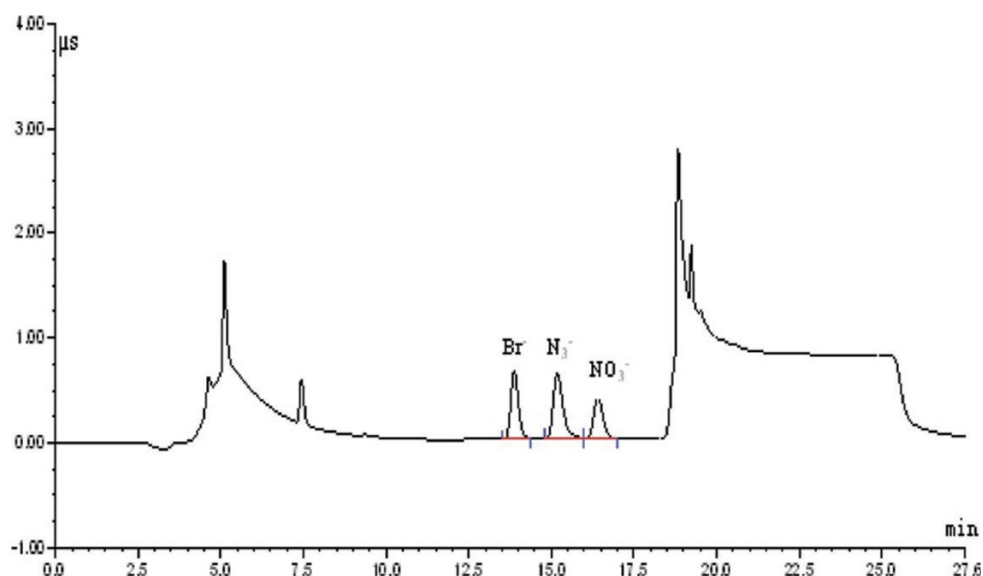


图 4 系统适用性溶液色谱图

3.2 样品溶解溶剂的选择

厄贝沙坦为脂溶性物质，在甲醇中的溶解性较好，在水或低浓度的 KOH 淋洗液中不溶。参照美国药典，厄贝沙坦样品溶液的浓度为 20 mg/mL，故首选甲醇为溶解溶剂。考虑到 100% 甲醇溶解样品可能会影响叠氮根的离子化，故分别选用 85%，90% 和 95% 的甲醇配制 20 mg/mL 的厄贝沙坦加标溶液进行试验。85% 甲醇可恰好溶解样品，但短时间放置厄贝沙坦即会析出；90% 和 95% 甲醇测定结果一致，均可行。本方法选用 90% 甲醇为溶剂。

3.3 柱切换时间的选择

ThermoFisher IonPac NG1 柱为苯乙烯 - 二乙烯苯键合的反相色谱柱，对疏水性的厄贝沙坦有较强的保留作用，对无机离子不保留。实验发现，将 NG1 柱与检测器直接相连，以水为流动相，经 10 min 未见厄贝沙坦洗脱，切换为乙腈冲柱，5 min 内厄贝沙坦洗脱完全，故选用 IonPac NG1 去除基质厄贝沙坦效果理想。

TAC-ULP1 为阴离子交换柱，对阴离子有较强的保留，将 TAC-ULP1 柱接于 NG1 柱和检测器之间，以水为流动相，取标准溶液进样后，观察 20 min，未见叠氮根离子被洗脱，表明 ULP1 柱对叠氮根离子的富集能力可行，但富集的时间（即柱切换的时间）有必要进行摸索。

取加标后的样品溶液，考察柱切换时间分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、10.0 min 时的出峰情况以及叠氮根离子峰面积的变化。柱切换时间在 3 min 内时，溶剂甲醇被带入分析柱中，在保留时间 5 min 附近出现较大的溶剂峰，干扰测定，叠氮根离子峰面积随着柱切换时间的延长而增加；柱切换时间大于 4 min 后，溶剂甲醇无干扰，叠氮根离子峰面积趋于稳定，故选择柱切换时间为 4 min。

3.4 线性、检出限和重现性

取标准溶液重复进样 6 针，保留时间的 RSD 为 0.12%，峰面积的 RSD 为 0.61%，表明本方法进样重现性良好。取 NaN₃ 适量，加 90% 甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 约含叠氮根 0.04、0.10、0.16、0.20、0.24、0.40 µg 的溶液，作线性考察，峰面积（A）与浓度（C）的线性关系为 $A = 1.0558 C - 0.0157$ ($R^2 = 0.9992$)。按叠氮根离子限度的 50%、100%、150% 浓度进行回收率试验，回收率在 95.4%~98.9% 之间，回收率良好。叠氮根离子的定量限和最低检出限（S/N 分别约为 10 和 3）分别为 10 ng/mL、3 ng/mL。

3.5 实际样品分析

取 2 个厂家 6 批样品进行测定，3 批样品未检出，其余样品叠氮根离子含量在 1 ~ 2 mg/L（不规范）之间。

结论

本方法采用在线基质去除及浓缩柱进样的方法，大大简化了样品的预处理过程，方法简便。随着药品质量控制要求的不断提高，很多在生产工艺中引入的有毒阴、阳离子均要求进行控制，而化学药品多为脂溶性物质，疏水性强，不适合离子色谱的直接进样分析，本文建立的方法可以在药物痕量离子的控制领域广泛应用。

离子色谱法电导检测考来维仑中有机胺杂质

摘要

本文采用离子色谱方法抑制电导检测，简单灵敏地测定出考来维仑中有机胺杂质的含量。方法操作简单便捷，且重现性好，回收率高，适用于此类样品分析。

关键词

有机胺；考来维仑；电导检测；离子色谱

引言

高血脂症与心脑血管疾病的发生直接相关，是动脉粥样硬化的主要发病因素，是心脑血管疾病临床监控的重要指标之一。临床常用的血脂调节药主要有他汀类、贝特类、烟酸类、胆酸螯合剂类。考来维仑是新型的胆酸螯合剂，它主要与胆酸结合，造成胆酸耗竭，促进胆固醇转化为胆酸，降低胆固醇。考来维仑用于降血脂、降血糖疗效明显，且因副作用低，在临床上具有广泛的应用。

有机胺的测定有顶空气相色谱法和液相离子对法，但因为考来维仑中的杂质是有机胺，是饱和氮杂环，碱性强，因此两种方式分离结果都不好，且灵敏度无法满足要求。在酸性条件下有机胺类可以形成阳离子，并在离子交换色谱柱中以离子交换方式被分离，分离后进入抑制器以抑制电导方式被检测。

实验部分

1. 仪器条件

Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000+ 离子色谱系统，包括

- 等度泵，四元梯度泵
- 电导检测器

2. 耗材

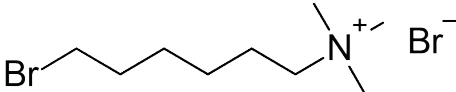
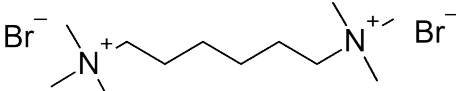
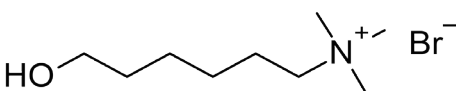
Thermo Scientific™ Target2™ Nylon Syringe Filters (0.45 μm, 30 mm, P/N F2500-1)

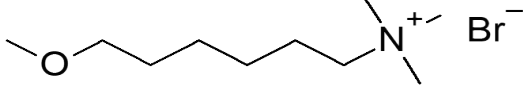
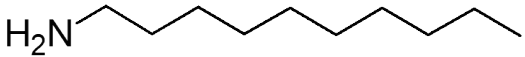
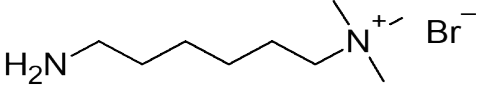
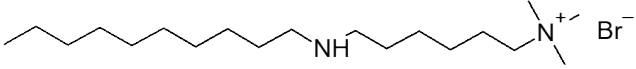
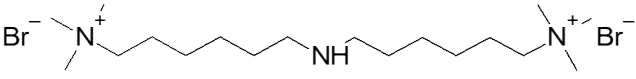
一次性使用无菌注射器，1 mL (上海双鸽实业有限公司)

3. 试剂与标准品

甲基磺酸 (Fisher Scientific, 99%)；八种有机胺标准品 (由客户提供)

附录：8种有机胺的结构

编号 (客户给定)	名称	结构
1	6-溴己基三甲基溴化铵	
2	六甲基己烷-1,6-二溴化铵	
3	6-羟基己基三甲基溴化铵	

4	6-甲氧基己基三甲基溴化铵	
5	癸胺	
7	Aminoquat	
8	Decylaminoquat	
9	Aminodihexylquat	

4. 标准溶液的制备

准确称取有机胺标准品，用甲基磺酸乙腈溶液 (20mM MSA- 乙腈 =60 : 40) 定容到适当体积，配制标准品储备液。以甲基磺酸乙腈溶液 (20mM MSA- 乙腈 =60 : 40) 逐级稀释成不同浓度的标准工作溶液。

5. 样品前处理

根据 USP 论坛中的方法，取本品约 0.1g，精密称定，加水溶解并定容至 10ml，搅拌 30 分钟，10000 转离心 10 分钟，过 0.22 μ m 滤膜，弃去初滤液，续滤液进样分析。

6. 实验条件

分析柱：IonPac CS17 分离柱，4 x 250 mm (P/N 060557)

保护柱：IonPac CG17 保护柱，4 mm x 50 mm (P/N 060560)

淋洗液：MSA/ 乙腈梯度洗脱

A 相：水

B 相：50mM MSA

C 相：乙腈

流速：1.0 mL/min

定量环：25 μ L

柱温：30 $^{\circ}$ C

检测器：电导检测

抑制器：阴离子自动电解连续再生微膜抑制器 CSRS300 -4 mm (P/N 064556)，抑制电流 59mA，外接水模式。

背景电导：0.8 μ S

时间 /min	A	B	C
0	62	10	28
3	62	10	28
14	52	20	28
28	20	40	40
33	20	40	40
33.1	62	10	28
38	62	10	28

7. 实验结果

有机胺类均可在色谱柱中有保留。由于碳链较长，吸附和离子交换两种机理同时发挥作用。CS17 柱比较适合用于分离有机胺。通过调整流动相，可以在 38 分钟内分离出所需检测的 8 种有机胺类。由于非极性吸附作用，有机胺类的保留较强，与常见的阳离子对其没有干扰。色谱图如图 1 所示。

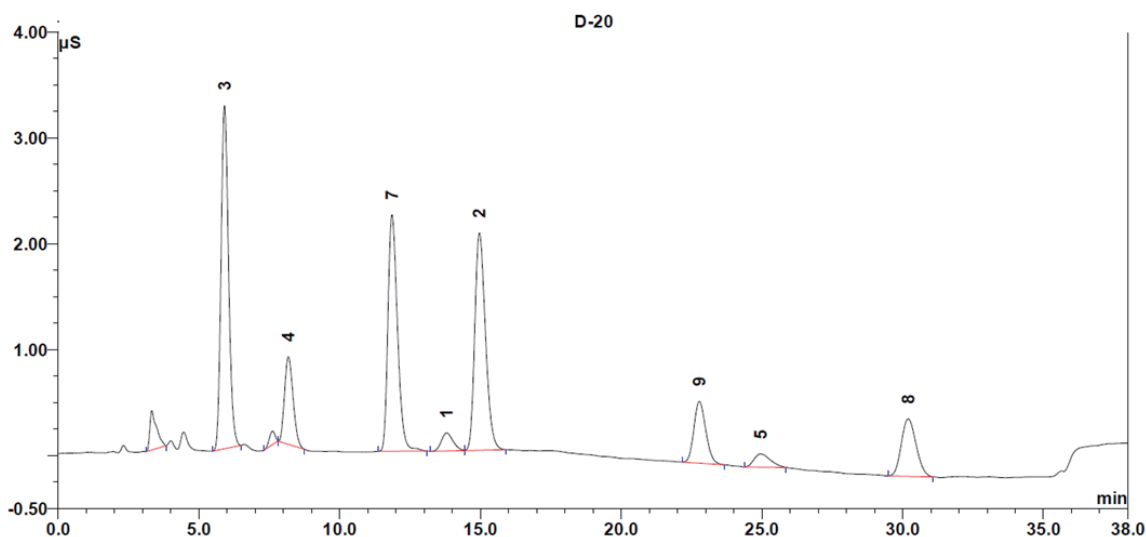


图 1. 8 种有机胺标准溶液色谱图

7.1 方法的线性范围、精密度、加标回收率

标准品依次进样，结果以浓度 (c, mg/L) 为横坐标，以色谱峰面积 (A) 的平均值为纵坐标，在一定浓度范围内各有机胺类的线性关系良好，结果见表 1。

表 1. 标准工作曲线、线性范围

Peak Name	Cal.Type	#Points	Coeff.Det.	Offset	Slope
3	QOff	5	99.7207	-0.0944	0.1039
4	QOff	5	99.8551	-0.0166	0.0277
7	QOff	5	99.2498	-0.062	0.0561
1	QOff	3	100.0000	-0.0659	0.0048
2	QOff	5	99.7479	-0.0576	0.0500
9	QOff	5	99.8030	-0.0091	0.0232
5	QOff	4	99.4544	-0.0079	0.0009
8	QOff	5	99.8650	-0.008	0.0155

连续进样 5 针，其峰面积 RSD 小于 4%，精密度良好。（见表 2）

表 2. 精密度结果

序号样品	Height 3	Height 4	Height 7	Height 1	Height 2	Height 9	Height 5	Height 8
1	3.24	0.8276	2.2351	0.1638	2.0487	0.5832	0.1176	0.5439
2	3.2104	0.8152	2.2133	0.1674	2.039	0.5802	0.1176	0.5331
3	3.1819	0.8101	2.1705	0.1687	2.0099	0.5777	0.1159	0.5264
4	3.1585	0.7988	2.1698	0.168	2.0137	0.5621	0.11	0.5131
5	3.1468	0.7849	2.1398	0.1554	1.9822	0.5675	0.1186	0.5078
Ave	3.1875	0.8073	2.1857	0.1647	2.0187	0.5741	0.116	0.5249
RSD,%	1.20%	2.01%	1.74%	3.36%	1.30%	1.56%	2.97%	2.79%

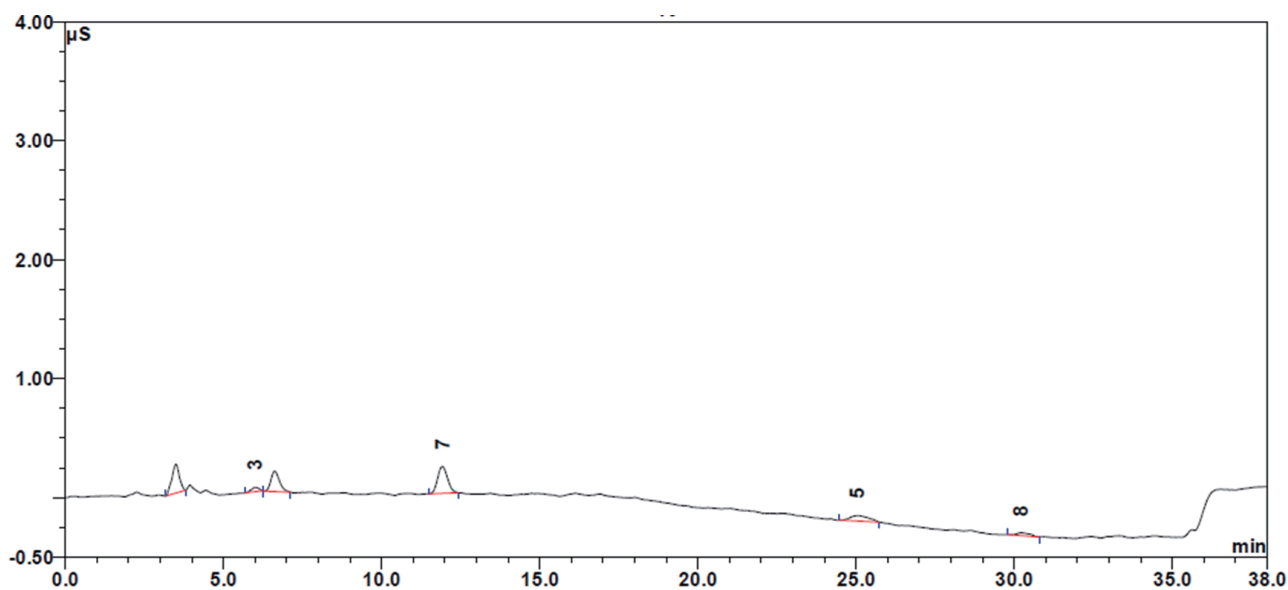
加标回收率结果显示，部分有机胺类回收率小于 90%，推测是由于吸附造成的。

表 3. 加标回收率结果

有机胺	测得的量, mg/L	加标的量, mg/L	回收率, %
3	5.552	6.37	87.16
4	5.4101	5.94	91.08
7	7.6109	9.00	84.57
2	8.2026	8.30	98.83
9	5.5703	5.62	99.12
5	50.7347	45.79	110.80
8	6.7774	7.70	88.02

7.2 样品测定

根据 USP 论坛中的方法, 取本品约 0.1g, 精密称定, 加水溶解并定容至 10ml, 搅拌 30 分钟, 10000 转离心 10 分钟, 过 0.22 μ m 滤膜, 弃去初滤液, 续滤液进样分析。样品谱图如下。



结论

本文采用离子色谱方法抑制电导检测, 简单灵敏地测定出考来维仑中有机胺杂质的含量。方法操作简单便捷, 且重现性好, 回收率高, 适用于此类样品分析。流动相中有较高的乙腈, 建议实验完成后用 MSA 冲洗色谱柱, 用水冲洗抑制器。

拓展应用：硼酸及其衍生物潜在遗传毒性研究

硼酸酯由于其温和的路易斯酸性及良好的稳定性，被广泛应用于制药工业中。虽然没有直接证据表明硼酸能够与DNA发生反应，但有文献报道（O'DONOVAN MR, MEE CD, FENNER S, et al. Boronic acids-A novel class of bacterial mutagen^[4]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2011, 724(1-2): 1. DOI:10.1016/j.mrgentox.2011.05.006）13种硼酸和硼酸酯衍生物中检测到12种物质具有致突变性。随着制药行业对硼酸及衍生物潜在遗传毒性的认识的提高，数家制药公司检测了17种硼酸衍生物，发现其中14种物质具有致突变性。硼酸作为警示结构的潜在基因毒性值得深入探索。

现有的检测方法有气相氢火焰离子化检测器色谱法（GC-FID）以及电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS），但气相色谱法难以实现痕量检测且易导致硼酸酯的水解，相比于气象色谱法，ICP-MS法更灵敏，本文收集了赛默飞特色的采用离子（IC）及（ICP）联用技术对食品中的硼酸进行分析，作为拓展应用收录在本文集，希望能给制药行业硼酸遗传毒性物质检测难点用户提供新思路。

离子色谱 - 电感耦合等离子体光谱联用检测硼砂（硼酸）

摘要

ICP-OES 或 ICP- MS 前端增加离子色谱分离单元可以准确分析样品中的游离硼，对于食品非法添加的硼砂分析更具意义。

关键词

离子色谱；电感耦合等离子体光谱；IonPac ICE-Borate；食品；硼酸

引言

硼虽是非植物结构组分元素，但是对植物体具有重要的生理功能。这一切生理功能与其能和富含羟基具有相邻顺式二元醇构型的糖和糖醇等络合形成硼酯化合物有关，这些化合物作为酶反应的作用物或生成物参与各种代谢活动。硼同样也为人和动物所需要，涉及胚胎发育、能量底物代谢、骨骼结构和功能、生长及炎症代谢调节等方面。但硼摄入量过高则会表现毒性，可致脑组织氧消耗受抑制，酶活力丧失活性。一些不良商贩在食品中非法添加硼砂或硼酸，以起到增筋、保水、改良口感和防腐等作用。国家食品整治办于 2008 年将硼酸、硼砂列为禁用添加剂第一批，明令严格查食品中硼违法添加等行为。

目前食品中硼的检测的方法主要有比色法、ICP-OES 法和 ICP-MS 法等，其中比色法操作非常繁琐，而 ICP- OES 法和 ICP-MS 则是总硼测试的良好解决方案。动植物体中的硼往往存在多种形态（主要有水溶游离态、半束缚态和束缚态），而外源性添加硼酸则主要以游离态存在，因此对于游离态的硼酸准确分析则更有意义。离子色谱柱的分离机理使其容易保留游离态的硼，因此在 ICP-OES 或 ICP- MS 前端增加分离单元可以准确分析样品中的游离硼。本文主要研究了离子色谱与 ICP-OES 联用技术用于食品中游离硼检测的可能性。

实验部分

1. 仪器条件

仪器：ICS 900 离子色谱仪

色谱柱：IonPac ICE-Borate 7.5 μm ，9mm \times 250 mm（P/N: 053945）；柱温：室温；

进样方式：手动进样；定量环：50 μL ；淋洗液：3 mmol/L HNO_3 +60 mmol/L 甘露醇，等度淋洗；流速：1 mL/min；

检测方式：iCAP 6300 电感耦合等离子体光谱仪；RF 功率：1250 kw；辅助气流量：0.5 L/min；雾化器流量：0.5 L/min；

观测方式：垂直观测；检测波长：249.773(135)；200 s 样品冲洗；短波 长波 3 s；数据采集：50 点。

2. 样品前处理

准确称取 1.000 g 粉碎后固体样品（面条，绿豆粉、红薯粉，腐竹，沙琪玛，肉丸），加入 40 mL 超纯水，50 摄氏度超声提取 20 min。腐竹，沙琪玛，肉丸等含油脂多样品溶液加入 10 mL 正己烷，震荡 10 分钟后，静置分层。取水相溶液经 6000 r/min 离心 10 分钟，上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜和 OnGuard RP（1cc）柱，弃去初始流出液 3 mL 后收集液体进样。

3. 实验结果

3.1 色谱条件的选择

硼酸常见可以选择两种分离方式，离子交换和离子排斥。其中离子交换方式所用流动相为氢氧化钠，出峰时间较短，但是流动相盐分对于 ICP-OES 系统影响较大。而离子排斥方式使用硝酸和甘露醇为流动相，分离效果和色谱峰形相对更好，且与 ICP-OES 具有更好的兼容性。因此选择以硼酸盐专用离子排斥柱 ICE-Borate 作为分离单元，排斥法对于流动相浓度不敏感，因此流动相选择最常用 3 mmol/L HNO_3 和 60 mmol/L 甘露醇混合溶液等度洗脱即可，图 1 为 20 mg/L 硼酸标准溶液所得谱图。

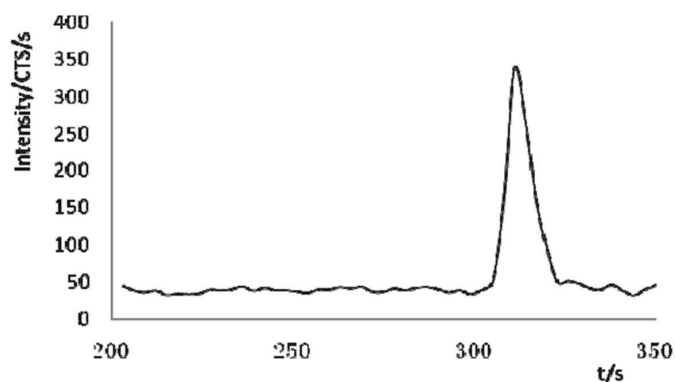


图 1. 20 mg/L 硼酸标准溶液谱图

3.2 标准曲线和方法检出限

硼酸在 5-100 mg/L 浓度范围内具有良好的线性，相关系数可达到 0.9996（以峰高计）。根据 3 倍信噪比（Signal/Noise=3）可估算出硼酸的检出限为 0.3 mg/L。

3.3 样品测试结果及方法回收率

以 10 mg/L 硼酸标准溶液为研究对象，连续 7 针进样，重现良好，峰高和峰面积则 RSD 均小于 2%。以选定条件测试了采集到的 5 种典型样品，如面条、薯粉、腐竹、沙琪玛和肉丸，其中面条、薯粉和腐竹中检测到 20~70 mg/kg 的硼酸存在，而采集到的沙琪玛和肉丸中则未检测到硼酸。

选择其中五个样品，均加标 10 mg/L，图 2 为某腐竹样品及其加标 10 mg/L 硼酸的色谱图对比，加标回收率在 85 ~ 98% 之间（参见表 1），表明常见食品基体组分对硼酸的测定不存在明显影响。肉丸和腐竹样品的回收率相对要略低，其样品基体和前处理都会相对更复杂一些。

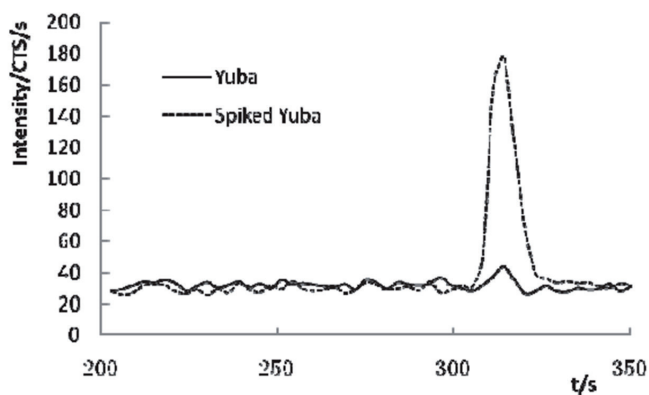


图 2. 某腐竹样品及加标 10 mg/L 硼酸谱图对比

表 1. 部分食品样品测定结果及加标回收率（含量以硼酸计）

样品	测得值 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标测得值 (mg/L)	回收率	原始含量 (mg/kg)
面条	1.02	10.00	10.84	98%	40.70
红薯粉	0.69	10.00	10.02	93%	27.69
腐竹	1.74	10.00	10.77	90%	69.67
沙琪玛	N.D.	10.00	9.70	97%	N.D.
肉丸	N.D.	10.00	8.49	85%	N.D.

结论

采用 IonPac ICE-Borate 离子排斥色谱柱，等度淋洗条件下即可良好保留游离态硼酸，而络合态硼酸不干扰测定。利用电感耦合等离子光谱仪作为检测手段则可大大增强检测的选择性，排除了食品中常见有机酸对于硼酸的干扰。但是由于离子色谱流动相的稀释效应，检出灵敏度会有一定损失。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息, 请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
中国技术培训中心
China Service Training Center

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC