

# GC-MS/MS 法测定药品中对甲苯磺酸酯基因毒性杂质

## 1 前言

基因毒性杂质（或遗传毒性杂质）是指化合物本身能够直接或间接损伤细胞 DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能或者倾向的一类物质。近年来，已经上市的药品中由于存在痕量的基因毒性杂质而引发大规模医疗事故，继而药品被召回的事件时有发生。FDA、EMA、ICH 先后发布了对基因毒性杂质的指导原则，推荐使用毒理学关注阈值 TTC(1.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) 作为基因毒性杂质的可接受限度。我国 2020 版《中国药典》新增了《遗传毒性杂质控制指导原则》，药企在研发过程中越来越关注基因毒性杂质的控制和检测。

磺酸酯类化合物作为一类典型的基因毒性杂质，可以直接或代谢活化后间接地烷基化 DNA。现有的磺酸酯类化合物气相和气质检测方法通常需要进行衍生，操作繁琐。运用 GC 进行检测，方法定性能力差且灵敏度低，GC-MS 方法虽然可以提高检测灵敏度，但对于一些基质复杂的药物抗干扰能力较差。相比之下，GC-MS/MS 方法具有较高的抗干扰能力且检测灵敏度高。

本文针对三种对甲苯磺酸酯基因毒性杂质，基于自主研发的 GC-MS/MS 平台建立了三种对甲苯磺酸酯的快速且高灵敏度的检测方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器配置设备

GC2000 气相色谱、EXPEC 5231 三重四极杆串联质谱仪、液体自动进样器



## 2.2 标准品和试剂

标准品：对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸异丙酯均购自 Stanford Analytical Chemicals，于 4℃冰箱保存。

试剂：丙酮和乙酸乙酯均为色谱级。

## 2.3 测试方法

|       |        |                               |        |           |
|-------|--------|-------------------------------|--------|-----------|
| GC 条件 | 载气     | 氦气                            |        |           |
|       | 恒流     | 1.2 mL/min                    |        |           |
|       | 色谱柱    | DB-5MS (30 m*0.25 mm,0.25 μm) |        |           |
|       | 进样口温度  | 250 °C                        |        |           |
|       | 进样量    | 1 μL                          |        |           |
|       | 是否分流   | 不分流                           |        |           |
|       | 运行时间   | 18.33 min                     |        |           |
|       | 升温程序   | 升温速率(°C/min)                  | 温度(°C) | 保持时间(min) |
|       | /      | 50                            | 1      |           |
|       | 15     | 280                           | 2      |           |
| MS 条件 | 电离能量   | 70 eV                         |        |           |
|       | EI 源温度 | 250 °C                        |        |           |

|        |             |
|--------|-------------|
| 传输线温度  | 280 °C      |
| 数据采集   | 选择离子扫描(SIM) |
| 溶剂延迟时间 | 6 min       |

三种对甲苯磺酸酯监测离子对、驻留时间等参数见下图 1。

| 化合物名称      | 母离子质量 | 子离子质量 | 驻留时间(s) | 碰撞能量 | 分辨率       |
|------------|-------|-------|---------|------|-----------|
| 1 对甲苯磺酸甲酯  | 155   | 91.1  | 0.03    | 10   | Unit-Unit |
| 2 对甲苯磺酸甲酯  | 186   | 91.1  | 0.03    | 15   | Unit-Unit |
| 3 对甲苯磺酸甲酯  | 186   | 155   | 0.03    | 5    | Unit-Unit |
| 4 对甲苯磺酸乙酯  | 155   | 91.1  | 0.03    | 10   | Unit-Unit |
| 5 对甲苯磺酸乙酯  | 200   | 91.1  | 0.03    | 20   | Unit-Unit |
| 6 对甲苯磺酸乙酯  | 155   | 65.1  | 0.03    | 20   | Unit-Unit |
| 7 对甲苯磺酸异丙酯 | 172   | 108.1 | 0.03    | 5    | Unit-Unit |
| 8 对甲苯磺酸异丙酯 | 155   | 91.1  | 0.03    | 10   | Unit-Unit |
| 9 对甲苯磺酸异丙酯 | 155   | 65.1  | 0.03    | 20   | Unit-Unit |

图 1 三种对甲苯磺酸酯监测离子对等质谱参数

## 2.4 样品前处理

### (1) 水溶性药品

准确称取 0.1 g 药品粉末，加入 2 mL 水，振摇均匀，超声 10 min，再加入 2 mL 乙酸乙酯，振摇混匀后充分超声提取，取上层有机相经无水硫酸钠除水后，过滤膜，上机测试。

### (2) 脂溶性药品

准确称取 0.1 g 药品粉末，加入 2 mL 乙酸乙酯，振摇均匀，超声 10 min，过滤膜，上机测试。

## 3. 结果

### 3.1 线性和检出限

配制系列梯度对甲苯磺酸酯类化合物的混合标样溶液(5.0  $\mu\text{g/L}$ 、10.0  $\mu\text{g/L}$ 、20.0  $\mu\text{g/L}$ 、50.0  $\mu\text{g/L}$ 、100.0  $\mu\text{g/L}$ 、200.0  $\mu\text{g/L}$ )，以各目标物的定量离子色谱峰面积为纵坐标，目标物标准溶液的质量浓度( $\mu\text{g/L}$ )为横坐标，建立标准曲线，拟合后的标准曲线如图 2 所示，在对应的线性范围内，3 种对甲苯磺酸酯类化合物的线性系数  $r$  均在 0.995 以上，线性良好。以 5  $\mu\text{g/L}$  标准溶液进样，按照  $S/N=10$  和  $S/N=3$  计算定量限和检出限，检出限为 0.4~0.8  $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 1.3~2.7  $\mu\text{g/L}$ ，具体结果见表 1。对甲苯磺酸酯类化合物总离子流图如图 3 所示。

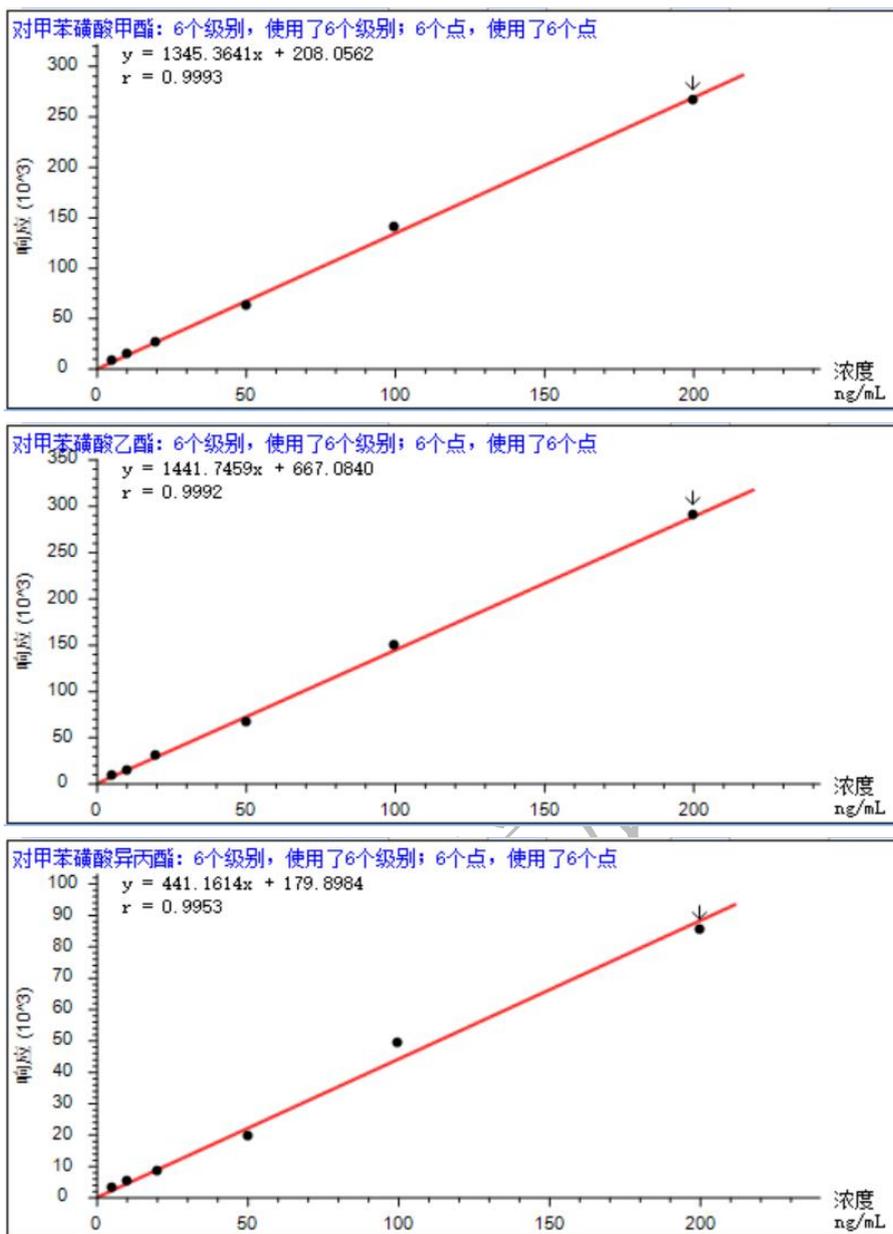


图 2 对甲苯磺酸酯类化合物标准曲线

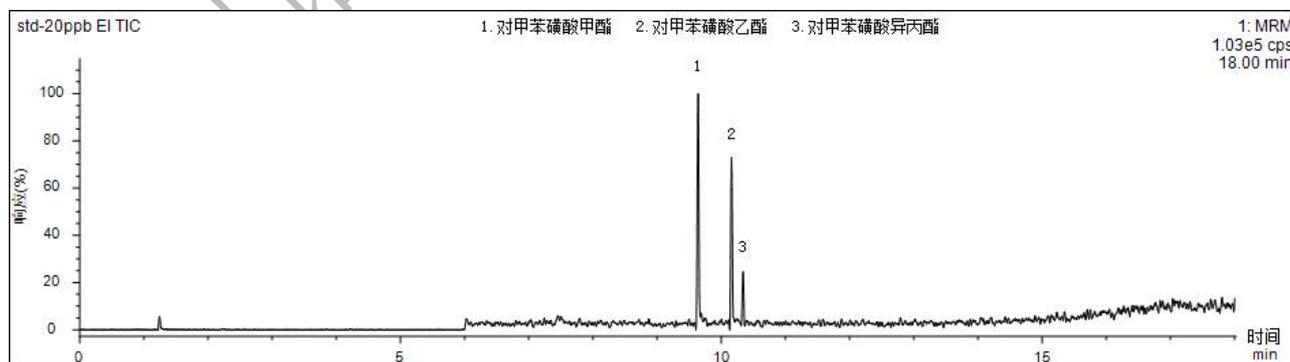


图 3 20.0 µg/L 对甲苯磺酸酯类化合物总离子流图

表1 对甲苯磺酸酯各组分信噪比（5  $\mu\text{g/L}$  浓度水平下）以及检出限和定量限

| 名称       | 信噪比 (S/N) | 检出限 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量限 ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|----------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 对甲苯磺酸甲酯  | 38.6      | 0.4                     | 1.3                     |
| 对甲苯磺酸乙酯  | 31.5      | 0.5                     | 1.6                     |
| 对甲苯磺酸异丙酯 | 18.6      | 0.8                     | 2.7                     |

### 3.2 重复性

选取 20  $\mu\text{g/L}$  的对甲苯磺酸酯类化合物混合标准溶液，连续进样 6 次，考察保留时间、峰面积的重复性，其结果的相对标准偏差如下图所示。各组分保留时间的相对标准偏差 RSD 均小于等于 0.05%，峰面积的 RSD 均小于 5%。

|       | 样品信息        |           |      | 对甲苯磺酸异丙酯 |         | 对甲苯磺酸甲酯 |          | 对甲苯磺酸乙酯 |          |
|-------|-------------|-----------|------|----------|---------|---------|----------|---------|----------|
|       | 数据文件        | 文件路径      | 定量方法 | 保留时间     | 峰面积     | 保留时间    | 峰面积      | 保留时间    | 峰面积      |
| 1     | std-20ppb-1 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.33    | 5174.91 | 9.64    | 23247.35 | 10.16   | 19338.53 |
| 2     | std-20ppb-2 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.34    | 5728.38 | 9.65    | 22544.96 | 10.16   | 17779.92 |
| 3     | std-20ppb-3 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.33    | 5178.11 | 9.64    | 21795.72 | 10.17   | 17762.66 |
| 4     | std-20ppb-4 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.33    | 5752.84 | 9.64    | 23371.76 | 10.17   | 17415.95 |
| 5     | std-20ppb-5 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.35    | 5278.37 | 9.65    | 21335.54 | 10.17   | 17291.04 |
| 6     | std-20ppb-6 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.34    | 5340.31 | 9.65    | 22933.57 | 10.17   | 17463.80 |
| Min   |             |           |      | 10.33    | 5174.91 | 9.64    | 21335.54 | 10.16   | 17291.04 |
| Max   |             |           |      | 10.35    | 5752.84 | 9.65    | 23371.76 | 10.17   | 19338.53 |
| AVG   |             |           |      | 10.34    | 5408.82 | 9.64    | 22538.15 | 10.16   | 17841.98 |
| SD    |             |           |      | 0.01     | 264.62  | 0.00    | 818.75   | 0.01    | 758.67   |
| ▶ RSD |             |           |      | 0.05     | 4.89    | 0.04    | 3.63     | 0.05    | 4.25     |
| IDL   |             |           |      | 0.00     | 0.00    | 0.00    | 0.00     | 0.00    | 0.00     |

### 3.3 加标回收率

对空白药品进行加标回收率测试，加标浓度为 1  $\mu\text{g/g}$ ，连续进样三针，各目标化合物计算浓度（单位为  $\mu\text{g/L}$ ）与回收率结果如下所示，3 种对甲苯磺酸酯平均回收率在 80%~110% 之间。

|       | 样品信息   |           |      | 对甲苯磺酸异丙酯 |       |       | 对甲苯磺酸甲酯 |       |        | 对甲苯磺酸乙酯 |       |       |
|-------|--------|-----------|------|----------|-------|-------|---------|-------|--------|---------|-------|-------|
|       | 数据文件   | 文件路径      | 定量方法 | 保留时间     | 计算浓度  | 回收率   | 保留时间    | 计算浓度  | 回收率    | 保留时间    | 计算浓度  | 回收率   |
| 1     | hs-2   | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.34    | 39.15 | 78.31 | 9.65    | 53.73 | 107.46 | 10.17   | 43.68 | 87.37 |
| 2     | hs-2-2 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.34    | 40.12 | 80.24 | 9.65    | 54.53 | 109.05 | 10.17   | 44.11 | 88.23 |
| 3     | hs-2-3 | D:\对甲苯磺酸酯 | 定量方法 | 10.34    | 41.52 | 83.04 | 9.65    | 55.86 | 111.71 | 10.17   | 41.15 | 82.29 |
| Min   |        |           |      | 10.34    | 39.15 | 78.31 | 9.65    | 53.73 | 107.46 | 10.17   | 41.15 | 82.29 |
| Max   |        |           |      | 10.34    | 41.52 | 83.04 | 9.65    | 55.86 | 111.71 | 10.17   | 44.11 | 88.23 |
| ▶ AVG |        |           |      | 10.34    | 40.26 | 80.53 | 9.65    | 54.70 | 109.41 | 10.17   | 42.98 | 85.96 |
| SD    |        |           |      | 0.00     | 1.19  | 2.38  | 0.00    | 1.07  | 2.15   | 0.00    | 1.60  | 3.21  |
| RSD   |        |           |      | 0.00     | 2.96  | 2.96  | 0.04    | 1.97  | 1.97   | 0.04    | 3.73  | 3.73  |
| IDL   |        |           |      | 0.00     | 10.29 | 10.29 | 0.14    | 6.84  | 6.84   | 0.13    | 12.99 | 12.99 |

### 3.4 样品测试

按照 2.3 中样品前处理方法处理实际药品，实际药品中三种对甲苯磺酸酯均未检出，色谱图见图 4。

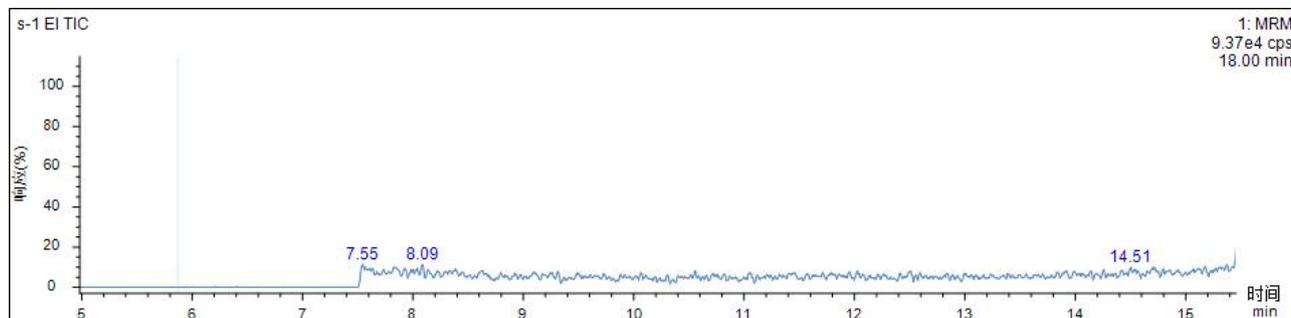


图 4 实际药品色谱图

### 4. 结论

本文建立了一种使用谱育科技三重四极杆气质联用仪 EXPEC 5231 测定药品中 3 种对甲苯磺酸酯类化合物的分析方法。本文考察了该方法的线性、精密度、灵敏度和准确度等，结果显示标准曲线线性良好，相关系数大于 0.995，方法精密度低于 10%，检出限低于 1  $\mu\text{g/L}$ ，定量限低于 3  $\mu\text{g/L}$ ，回收率在 80%~110%之间。因此，本方法可以对药品中 3 种对甲苯磺酸酯类化合物进行快速、准确、灵敏的定量分析。