

GC-MS/MS 测定索法酮中基因毒性杂质异亚丙基丙酮含量

丁文宇^{1a,2}, 雷勇胜^{1a,2*}, 傅琳^{1b}, 穆帅^{1a,2}, 陈蔚^{1a,2}, 潘毅^{1a,2}(1.天津药物研究院有限公司, a.原料药研发中心, b.分析测试中心, 天津 300193; 2.天津泰普制药有限公司技术研发中心, 天津 300193)

摘要: 目的 采用 GC-MS/MS 测定索法酮中基因毒性杂质异亚丙基丙酮的含量。方法 采用顶空进样法测定, 色谱柱为 Agilent DB-Heavy WAX(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 质谱检测器的离子源采用 EI 源, 采集方式为选择性离子监测模式(SIM)。结果 异亚丙基丙酮在 0.047 12~1.885 μg·mL⁻¹(LOQ~200%)内浓度与峰面积线性关系良好($n=6$), 相关系数(r)为 0.999 6, 定量限为 47.12 ng·mL⁻¹, 检测限为 18.85 ng·mL⁻¹, 精密度 RSD 为 1.43%。回收率为 84.45%~91.58%, RSD 为 2.88%, 溶液稳定性良好。结论 该方法简便准确, 灵敏度高, 耐用性好, 适用于索法酮中异亚丙基丙酮含量的测定。

关键词: GC-MS/MS; 索法酮; 异亚丙基丙酮; 基因毒性杂质

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)14-1686-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.14.004

引用本文: 丁文宇, 雷勇胜, 傅琳, 等. GC-MS/MS 测定索法酮中基因毒性杂质异亚丙基丙酮含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(14): 1686-1689.

Determination of Genotoxic Impurity Mesityl Oxide in Sofalcone by GC-MS/MS

DING Wenyu^{1a,2}, LEI Yongsheng^{1a,2*}, FU Lin^{1b}, MU Shuai^{1a,2}, CHEN Wei^{1a,2}, PAN Yi^{1a,2}(1.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., a.API R&D Center, b.Analysis and Testing Center, Tianjin 300193, China; 2.Technology R&D Center of Tianjin TaiPu Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an headspace sampling coupled with gas chromatography and mass spectrometry method for determination of genotoxic impurity mesityl oxide in sofalcone. **METHODS** The mesityl oxide in sofalcone was determined by HS-GC-MS with Agilent DB-Heavy WAX(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) as stationary liquid capillary chromatographic column. The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization(EI) fixed mode. The ion collection mode selected ion monitoring(SIM). **RESULTS** The linearity of the calibration curve was obtained by according peak area versus concentration of mesityl oxide within 0.047 12~1.885 μg·mL⁻¹(LOQ~200%) with a regression coefficient($r=0.999\ 6$), which had a good linear relationship. The limit of quantitation(LOQ) was 47.12 ng·mL⁻¹, the limit of detection was 18.85 ng·mL⁻¹. The RSD value of the precision was 1.43%. The recoveries with the range of 84.45%~91.58%, the RSD value was 2.88%. The sample solutions were very stability. **CONCLUSION** The method was convenient, accurate and had high sensitivity, good robustness, which was suitable for determination of mesityl oxide in sofalcone.

KEYWORDS: GC-MS/MS; sofalcone; mesityl oxide; genotoxic impurity

基因毒性杂质(或遗传毒性杂质)是指可与 DNA 反应, 在较低水平时即可能直接引起 DNA 损伤, 导致 DNA 诱变, 从而引发癌症的物质。随着法规的逐步健全, 对基因毒性杂质的监管越来越严格, 在研发阶段即需对其进行全面的研究及控制。对于已上市但在批准后进行变更的品种, 同样需要对相关诱变性杂质的安全性重新进行评估^[1]。

索法酮是一种含有异戊烯基骨架的查耳酮衍生物, 于 1984 年 3 月上市。该药可以抑制前列腺素代谢^[2], 抑制巨噬细胞及前脂肪细胞的变异, 抑制幽门螺旋杆菌, 具有抗炎、保护胃黏膜、抑制

胃溃疡等作用, 主要用于治疗胃溃疡、十二指肠溃疡及慢性胃炎^[3-5]。

丙酮是索法酮合成^[6]过程中使用的重要试剂, 在碱性环境下, 丙酮易发生缩合反应, 生成异亚丙基丙酮, 该物质含有的 α-不饱和酮结构是一种警示结构, 需作为基因毒性杂质对其含量进行控制。索法酮及异亚丙基丙酮结构式见表 1。

根据性质及限度不同, 基因毒性杂质应采用不同方法进行检测, 比如 LC 法、GC 法、LC-MS 法和 GC-MS 法等^[7-9]。本研究采用气质联用色谱法, 建立索法酮中异亚丙基丙酮含量的测定方法, 并进行全面的方法学研究, 证明方法的可行性。

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2009ZX09313-026)

作者简介: 丁文宇, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (022)23006878
研究员 Tel: (022)23006878 E-mail: leiys@tjpr.com

E-mail: dingwy@tjpr.com *通信作者: 雷勇胜, 男, 硕士, 副研

表 1 索法酮及异亚丙基丙酮的结构式

Tab. 1 Structure formula of sofalcone and mesityl oxide

名称	结构式	分子量
索法酮		450.52
异亚丙基丙酮		98.14

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 7890B & 7000D 三重四极杆气质联用系统(7697A 顶空进样器, MassHunter 工作站, 美国 Agilent 公司); Mettler XS205DU 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司)。

1.2 试剂与试剂

异亚丙基丙酮对照品(百灵威公司, 批号: LTB0R51; 纯度: 95%); 索法酮(天津药物研究院有限公司, 批号: 20180701, 20180801, 20180802, 20180803, 20190411, 20190412); 二甲亚砜(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 气相条件 色谱柱为 Agilent DB-Heavy WAX(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 以氦气为载气, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 50 °C, 保持 9 min; 进样口温度为 250 °C; 采用顶空进样, 顶空温度 80 °C, 平衡 30 min, 分流比为 5 : 1。

2.1.2 质谱条件 离子源采用 EI 源, 温度 230 °C, 电离能量 70 eV; 传输线温度 280 °C, 采集方式为选择性离子监测(SIM), 定性离子(*m/z*)为 55, 定量离子(*m/z*)为 83。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品储备液 精密称取异亚丙基丙酮对照品约 50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加二甲亚砜(空白溶剂)稀释至刻度, 摇匀; 精密量取上述溶液 1 mL 于 250 mL 量瓶中, 加二甲亚砜稀释至刻度, 得到 2 μg·mL⁻¹ 对照品储备液。

2.2.2 对照品溶液 精密量取对照品储备液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲亚砜稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 1 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密量取 1 mL 于 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 即得。

2.2.3 供试品溶液 精密称取索法酮样品(批号:

20180701)约 200 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 1 mL 二甲亚砜, 加盖密封, 即得。

2.2.4 样品加标溶液 精密称取索法酮样品(批号: 20180701)约 200 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 1 mL 对照品溶液, 加盖密封, 即得。

2.3 系统适用性试验

按“2.2.2”项下方法配制对照品溶液, 平行 6 份, 作为系统适用性溶液, 进样测定。检测结果表明, 异亚丙基丙酮保留时间 RSD 为 0.03%(*n*=6), 峰面积 RSD 为 3.76%(*n*=6), 方法系统适用性良好。

2.4 专属性试验

按“2.2”项下方法配制对照品溶液、供试品溶液和样品加标溶液, 作为专属性溶液。另精密量取 1 mL 二甲亚砜于 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 作为空白溶液。分别进样测定, 定量离子色谱图见图 1。检测结果表明, 空白基线稳定, 且样品热稳定性较好, 没有干扰检测的降解产物, 目标物与其他峰均能良好分离, 方法专属性良好。

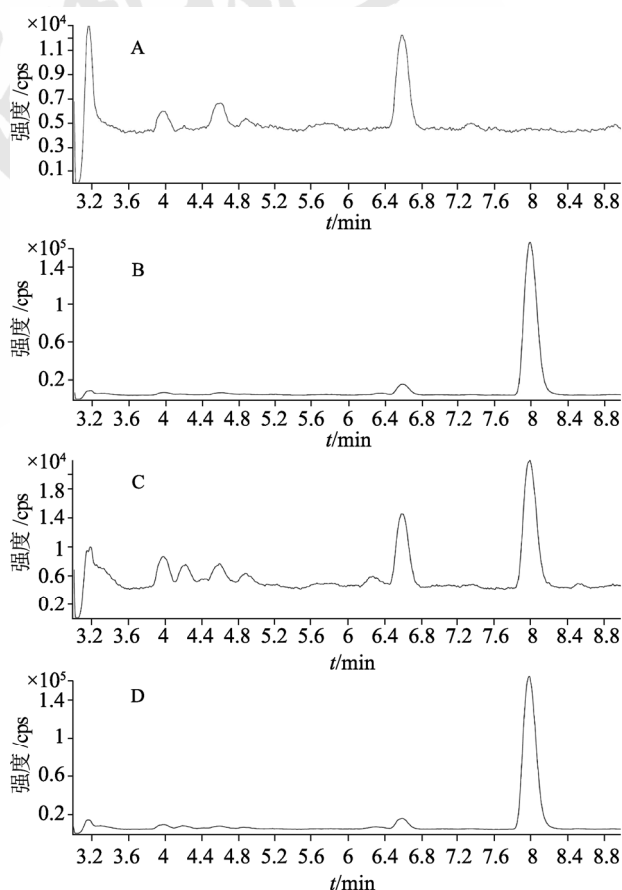


图 1 专属性色谱图(*m/z* 83)

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; D-样品加标溶液。

Fig. 1 MS chromatogram of specificity(*m/z* 83)

A-blank solution; B-standard solution; C-sample solution; D-spiked sample solution.

2.5 检测限与定量限试验

取“2.2.2”项下对照品溶液，加二甲亚砜逐级稀释并检测，当信噪比>10时作为定量限溶液，信噪比>3时作为检测限溶液。结果表明异亚丙基丙酮定量限浓度为47.12 ng·mL⁻¹，信噪比15.3，相当于限度浓度的4.7%；检测限浓度为18.85 ng·mL⁻¹，信噪比4.73，相当于限度浓度的1.9%，能够满足检测需求。

2.6 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品储备液，加二甲亚砜逐级稀释，分别得到浓度为0.05, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 μg·mL⁻¹的溶液，作为线性溶液。进样测定，结果表明在0.047 12~1.885 μg·mL⁻¹(LOQ~200%)内异亚丙基丙酮浓度与峰面积呈良好的线性关系(n=6)，线性方程为y=1 170 104.2x+15 371.4，相关系数r为0.999 6。

2.7 稳定性试验

按“2.2”项下方法，于同一时间配制对照品溶液及供试品溶液，分别在0, 3, 8, 11, 20, 24 h进样测定，考察溶液在一定时间内的稳定性。测定结果表明24 h内对照品溶液峰面积RSD为6.26%，供试品溶液中异亚丙基丙酮含量RSD为6.86%，溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

按“2.2.4”项下方法配制样品加标溶液，平行6份，作为精密度溶液。进样测定，结果显示精密度溶液中异亚丙基丙酮含量RSD为1.43%(n=6)，方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取索法酮样品(批号：20180701)约200 mg，精密称定，置10 mL顶空瓶中，共9份，分为3组，分别精密加入0.4, 0.5, 0.6 mL对照品储备液，再加入二甲亚砜至1 mL，加盖密封，得到低、中、高浓度的回收率溶液。进样测定并计算含量及回收率，结果见表2，回收率为80%~115%，RSD<6%，方法准确度良好。

2.10 方法耐用性考察

按“2.1”项下检测条件，分别改变离子源温度(230±2)℃、进样口温度(250±5)℃、顶空温度(80±2)℃及载气流速(1.0±0.05)mL·min⁻¹，进样“2.2.4”项下样品加标溶液，对方法耐用性进行考察。试验结果表明，各耐用性条件下溶液中异亚丙基丙酮含量RSD<8%(n=6)，证明试验条件的微小变化对样品检测无明显影响，方法耐用性好。

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Recovery test results(n=9)

待测 浓度/%	加入量/ μg·mL ⁻¹	样品含量/ μg·mL ⁻¹	测定量/ μg·mL ⁻¹	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
80	0.753 9	0.105 5	0.750 6	85.57	87.50	2.88
		0.105 5	0.796 0	91.58		
		0.105 8	0.757 0	86.37		
100	0.942 4	0.105 9	0.920 6	86.45	87.50	2.88
		0.104 4	0.928 7	87.47		
		0.105 6	0.938 0	88.33		
120	1.130 9	0.105 6	1.076 5	85.85	87.50	2.88
		0.105 7	1.139 5	91.42		
		0.105 1	1.060 2	84.45		

2.11 样品测定

对索法酮样品进行检测，按外标法计算含量，结果见表3。结果表明6批样品中异亚丙基丙酮含量均远低于限度，样品符合要求。

表3 样品含量测定结果

Tab. 3 Results of sample determination

批号	含量/μg·g ⁻¹	批号	含量/μg·g ⁻¹
20180701	0.54	20180803	0.69
20180801	0.51	20190411	0.68
	0.89		0.52
	0.89		0.52
20180802	0.48	20190412	0.76
	0.51		0.75

3 讨论

3.1 监测离子选择及限度的确定

在全扫描模式下对异亚丙基丙酮溶液进行测定，结果表明其主要碎片离子(m/z)为55, 83, 98, 考虑空白溶剂的干扰及检测灵敏度等因素，确定定量离子(m/z)为83，定性离子(m/z)为55。质谱图见图2。

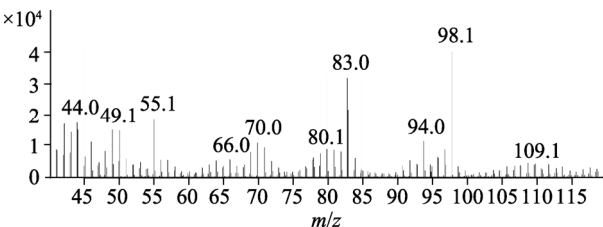


图2 异亚丙基丙酮质谱图

Fig. 2 MS chromatogram of mesityl oxide

根据ICH M7，异亚丙基丙酮中的α-不饱和酮结构为警示结构，且来源与原料药结构无关，无诱变性资料，研究后确定以可接受风险的摄入量

为 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 对其进行控制。索法酮的最大日剂量为 300 mg, 计算得到限度阈值为 $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 该限度可有效排除潜在基因毒性物质的危害。

3.2 色谱条件的选择

由于索法酮沸点为 650°C , 在气相体系中无法完全气化, 且待测物限度较低, 需较高的进样浓度以保证检测的准确性。经试验, 确定采用顶空进样法进行检测, 溶剂采用二甲亚砜, 样品浓度定为 $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 此时对照品溶液浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 能满足检测灵敏度要求。

对不同极性的毛细管色谱柱进行筛选, 试验结果表明, 异亚丙基丙酮在极性色谱柱(Agilent DB-Heavy WAX)上分离效果较好, 峰形对称, 响应较高, 确定采用该色谱柱。

对顶空平衡时间及平衡温度进行筛选, 异亚丙基丙酮沸点为 129°C , 采用不同顶空温度进行试验, 当顶空平衡温度为 80°C 时, 基线及目标物的响应较为理想; 对平衡时间进行考察, 目标物响应随平衡时间增大, 当时间 $>30 \text{ min}$ 后无明显变化, 因此采用 80°C , 30 min 的顶空平衡条件。

对升温程序进行筛选, 当柱温为 50°C 时, 异亚丙基丙酮峰即可与其他干扰峰完全分离, 且基线平稳, 保留时间适中。为保证样品完全洗脱, 设置 200°C 的后运行程序进行吹扫, 不影响后续样品测定。

本方法条件简单, 检测无干扰, 灵敏度高, 耐用性好, 结果准确可靠, 可用于索法酮中异亚丙基丙酮的测定, 以更好地控制产品质量。

REFERENCES

- [1] ICH HARMONISED GUIDELINE: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7(R1)[S]. 2017.
- [2] MURAMATSU M, TANAKA M, MURAKAMI S, et al. Effect of sofalcone on gastric mucosal prostaglandin metabolism in taurocholate induced gastritis in rats[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1986, 53(3): 289-300.
- [3] KIM W, LEE H, KIM S, et al. Sofalcone, a gastroprotective drug, covalently binds to KEAP1 to activate Nrf2 resulting in anti-colitic activity[J]. Eur J Pharmacol, 2019(865): 172722. Doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172722.
- [4] LI Y. A study on the safety and efficacy of sofalcone tablets in gastric ulcer treatment[D]. Dalian Medical University, 2011.
- [5] JING H Y. Effect and medical cost of sofalcone combined with pantoloc for the treatment of gastric ulcer[J]. Contemp Med Forum(当代医药论坛), 2017, 15(16): 48-49.
- [6] LU T, YU Y Q, CAO F. Synthesis of sofalcone with anti-ulcer activity[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2004, 21(5): 375-376.
- [7] XIE H Y, LIN Y L, ZHANG R L, et al. Advances in analytical methods and pre-treatment techniques for genotoxic impurities[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(10): 1668-1676.
- [8] LI Y, MA M X, CENG S, et al. Simultaneous determination of sulfonate esters of genotoxic impurities in safinamide by HS-GC-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(19): 2431-2435.
- [9] LIANG J M, FU C, CHEN Y. Determination of genotoxic impurities in escitalopram oxalate by LC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 36(11): 1436-1440.

收稿日期: 2020-06-03

(本文责编: 沈倩)