

UPLC-MS/MS 法测定阿加曲班中 4 个基因毒性杂质*

勾新磊¹, 赵铁禅², 赵婷¹, 张梅¹, 刘伟丽¹, 高峡¹, 赵新颖¹, 胡光辉^{1**}, 张秀亭^{2**}

(1. 北京市理化分析测试中心, 有机材料检测技术与质量评价北京市重点实验室 北京 100089;

2. 北京悦康科创医药科技股份有限公司, 北京 100076)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定阿加曲班中4个基因毒性杂质: 3-甲基-8-喹啉磺酸、3-甲基-8-喹啉磺酸甲酯、3-甲基-8-喹啉磺酸乙酯、3-甲基-8-喹啉磺酰氯。**方法:** 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行线性梯度洗脱; 流速 0.2 mL·min⁻¹; 采用 ESI 离子源正离子模式, 多反应监测模式下, 以外标法对 4 个基因毒性杂质同时进行定量测定。**结果:** 除 3-甲基-8-喹啉磺酰氯外, 其他 3 个基因毒性杂质质量浓度在 0.125~500 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好; 低、中、高 3 个浓度的加样回收率(n=3) 范围为 91.5%~104.2%, RSD 范围为 0.15%~4.6%; 检测下限范围为 0.042~1.667 ng·mL⁻¹, 定量下限范围为 0.125~5.000 ng·mL⁻¹。样品中均未检出杂质。**结论:** 本方法操作简便, 结果可靠, 经方法学验证, 可用于阿加曲班中 4 个基因毒性杂质的同时检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 阿加曲班; 基因毒性杂质; 3-甲基-8-喹啉磺酰氯; 3-甲基-8-喹啉磺酸甲酯; 3-甲基-8-喹啉磺酸乙酯; 3-甲基-8-喹啉磺酸

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)11-2059-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.19

Determination of four genotoxic impurities in argatroban by UPLC-MS/MS*

GOU Xin-lei¹, ZHAO Tie-chan², ZHAO Ting¹, ZHANG Mei¹, LIU Wei-li¹,
GAO Xia¹, ZHAO Xin-ying¹, HU Guang-hui^{1**}, ZHANG Xiu-ting^{2**}

(1. Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing Technology & Quality Evaluation, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China; 2. Beijing Youcare Kechuang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 10076, China)

Abstract Objective: To establish a UPLC-MS/MS analytical method for the determination of genotoxic impurities (3-methyl-8-quinoline sulfonic acid, 3-methyl-8-methyl quinolinesulfonate, 3-methyl-8-ethyl

* 北京市自然科学基金-北京市科学技术研究院联合资助项目(L160005);北京市科学技术研究院高水平创新团队计划(HIT201902);北京市科学技术研究院北科萌芽计划(BGS201904)

** 通信作者 胡光辉 Tel:(010)58717279; E-mail: guanghui_9@163.com
张秀亭 Tel:(010)67856288; E-mail: zhangxiuting1991@163.com

第一作者 Tel:(010)58717279; E-mail: 817411@163.com

quinolinesulfonate, and 3-methyl-8-quinolinesulphonyl chloride) in argatroban. **Methods:** The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B) by gradient elution at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. Multiple reaction monitoring (MRM) was performed on a triple quadrupole mass spectrometer equipped with a ESI source in the positive mode. **Results:** Except for 3-methyl-8-quinolinesulphonyl chloride, the calibration curve was linear for other compounds in the range of 0.125–500 ng · mL⁻¹. The recoveries (*n*=3) of low, middle and high adding concentrations were 91.5%–104.2%, RSD were 0.15%–4.6%. The limit of detection was 0.042–1.667 ng · mL⁻¹, and the limit of quantification was 0.125–5.000 ng · mL⁻¹. No impurities were detected in the samples. **Conclusion:** This established method is simple, rapid and reliable, which is applicable for quantifications of four genotoxic impurities in argatroban.

Keywords: UPLC-MS/MS; argatroban; genotoxic impurity; 3-methyl-8-quinolinesulphonyl chloride; 3-methyl-8-methyl quinolinesulfonate; 3-methyl-8-ethyl quinolinesulfonate; 3-methyl-8-quinoline sulfonic acid

阿加曲班是1种新型凝血酶抑制剂,可逆地与凝血酶活性位点结合,可用于缺血性脑梗死急性期病人的抗凝治疗,用于肝素诱发的血小板减少和血栓综合症,比肝素有更好的抗凝和抗血栓作用^[1-5]。阿加曲班的合成中会使用到3-甲基-8-喹啉磺酰氯(杂质D),若未在工艺中完全除去,易

与后续合成反应中使用的有机溶剂如甲醇、乙醇反应,生成3-甲基-8-喹啉磺酸甲酯(杂质B)、3-甲基-8-喹啉磺酸乙酯(杂质C),杂质D在工艺中遇水也会水解成3-甲基-8-喹啉磺酸(杂质A)^[6-7](图1)。杂质A、B、C和D均具有潜在的基因毒性。

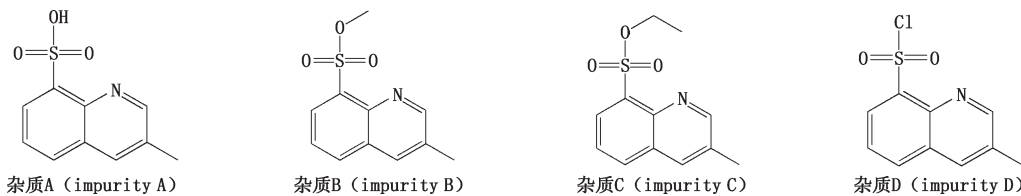


图1 杂质的结构式

Fig. 1 Structural formulas of genotoxic impurities

根据欧洲药事管理局和美国食品药品监督管理局的法规要求^[8-9],基因毒性杂质的毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)限度为1.5 μg · d⁻¹,阿加曲班每日最高服用剂量为60 mg,因此,阿加曲班中杂质A、B、C和D的限度均为25 μg · g⁻¹,总限度值也是25 μg · g⁻¹。现有文献尚未见阿加曲班基因毒性杂质测定的报道,因此,有必要建立阿加曲班中杂质的检测方法。

目前,喹啉磺酸类杂质主要的检测方法是液相色谱法(LC)^[10-11]。LC法灵敏度较低,多组分分析有时无法有效分离;液相色谱-质谱联用技术具有灵敏度高、分析速度快、结果准确可靠的特点,可以满足痕量毒性杂质检测的要求^[12-16]。本文建立了超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS)测定

阿加曲班中4种基因毒性杂质,并进行了相应的方法学验证,为阿加曲班的工艺和质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Acquity 超高效液相色谱仪(Waters公司),XEVO TQ 串联质谱仪(Waters公司),质谱软件为Masslynx 4.1工作站;XPE105电子天平(0.01 mg,梅特勒托利多公司);Milli-Q超纯水器(Millipore公司);ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm;填料:十八烷基硅烷键合硅胶;Waters公司)。

阿加曲班原料药、杂质A~D的对照品(含量100%)均由北京悦康科创医药科技股份有限公司提供;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱级(默克公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

2.1.1 色谱条件 液相色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈溶液为流动相 B; 梯度洗脱 (0~6 min, 10%B → 90%B; 6~8 min, 90%B; 8~8.5 min, 90%B → 10%B; 8.5~10 min, 10%B); 流速 0.2 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样体积 5 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾正离子化 (ESI⁺) 测定 3 个基因毒性杂质, 优化后的参数如下: 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 150 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流速 650 L · h⁻¹, 锥孔气流速 20 L · h⁻¹, 萃取电压 5.0 V。多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法定量。共分 2 段进行监测: 0~3.5 min 多反应监测杂质 A (*m/z* 223.8 → *m/z* 142.0), 0~10 min 多反应监测杂质 B (*m/z* 237.9 → *m/z* 142)、杂质 C (*m/z* 251.9 → *m/z* 224.0)、杂质 D (*m/z* 241.8 → *m/z* 115.0), 其他实验参数见表 1。

表 1 基因毒性杂质的质谱条件

Tab. 1 MS/MS acquisition parameters for genotoxic impurities

杂质 (impurity)	母离子 (parent ion) <i>m/z</i>	子离子 (product ion) <i>m/z</i>	锥孔电压 (cone voltage) /V	碰撞能量 (collision energy) /V
A	223.8	142.0*/206.0	28	28/20
B	237.9	142.0*/206.0	24	28/20
C	251.9	224.0*/206.0	16	25/18
D	241.8	115.0*/142.0	20	40/25

注 (note): 表中加 * 代表定量离子 (The * in the table 1 represent quantitative ion)

2.2 溶液配制

2.2.1 稀释剂 水与乙腈等比例 (50 : 50) 混合。

2.2.2 杂质对照溶液 由于杂质 D 在含水相体系中水解成杂质 A, 因此本实验杂质 D 的含量由杂质 A 代替, 杂质 D 的方法学数值不再关注, 如样品中检测到杂质 D, 则说明其含量超过限度值。取杂质 A~C 各约 10 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 杂质 A 加水溶解, 杂质 B 和杂质 C 用乙腈溶解, 均稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 中各约含 1.0 mg 的杂质对照品储备液。精密移取各杂质对照品储备液 0.1 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 40 °C 放置 8 h, 制成每 1 mL 中含各杂质均约为 10 μg 的杂质混合溶液。精密移取杂质混合溶液 0.25 mL,

于 10 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 中含杂质 A~C 均约 250 ng 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液 取阿加曲班原料药约 100 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂约 10 mL 溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 中含阿加曲班约为 100 mg 的溶液, 将该溶液于 40 °C 放置 8 h, 即得。

2.3 专属性试验

在所建立的色谱和质谱条件下, 杂质 A~C 的保留时间分别为 1.32、3.85、4.31 min, 3 个基因毒性杂质完全分离, 峰形良好。空白稀释剂、供试品溶液和杂质对照溶液中各杂质的检查无干扰 (图 2)。

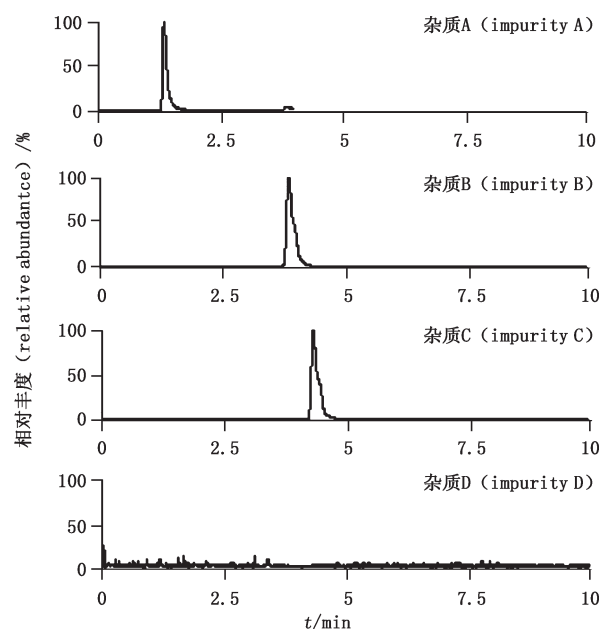


图 2 杂质对照品溶液总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of genotoxic impurities reference substance solution

2.4 检测下限和定量下限

取杂质 A~C 对照品储备液, 逐级稀释, 直至各杂质峰高约为基线噪音的 10 倍, 测得杂质 A、B、C 的定量下限分别为 5.0、0.125、0.25 ng · mL⁻¹; 连续进样 6 次, 杂质 A、B、C 峰面积的 RSD 分别为 2.6%、2.4% 和 1.9%, 表明定量下限具有良好的精密度。

取上述定量下限用溶液, 用稀释剂稀释后进样测定, 直至各杂质峰高约为基线噪音的 3 倍, 测得杂质 A、B、C 的检测下限分别为 1.667、0.042、0.083 ng · mL⁻¹。

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下杂质混合溶液适量, 用稀释剂定量稀释成各杂质的质量浓度均分别约为 25、50、250 和 500 ng · mL⁻¹ (各相当于限度浓度的 10%、20%、

100% 和 200%) 的系列溶液, 与定量下限溶液一起, 照“2.1”项下条件分别进样测定, 记录色谱图。以质量浓度 ($X, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 主峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归。杂质 A、B、C 线性回归方程分别为:

$$Y=456.6X+887.59 \quad r=0.9984$$

$$Y=7807X+85.52 \quad r=0.9998$$

$$Y=4527X+182.69 \quad r=0.9997$$

结果表明, 各杂质在其线性范围内与其峰响应值呈良好线性关系。

2.6 进样精密度和重复性试验

取“2.2.2”项下杂质对照溶液, 连续进样 6 次, 计算得杂质 A、B、C 峰面积的 RSD 分别为 2.1%、1.5% 和 2.0%, 表明进样精密度良好。

取阿加曲班原料药样品适量, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 均未检出杂质; 精密移取杂质混合溶液 0.25 mL, 置 10 mL 量瓶中, 按“2.2.3”项下方法, 配制含杂质 A、B 和 C 质量浓度均约为 $250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液 6 份, 进样测定, 计算得杂质 A、B 和 C 峰面积平均值分别为 113 740、1 902 150、1 188 134, RSD 分别为 2.4%、1.3%、0.84%, 表明方法重复性良好。

2.7 溶液稳定性试验

取“2.2.2”项下杂质对照溶液, 室温放置 24 h, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 结果杂质 A、B、C 峰面积的 RSD 分别为 2.6%、2.2%、3.0%, 表明 24 h 内杂质 A、B、C 在溶剂中的稳定性良好。

2.8 回收率试验

精密取阿加曲班原料药样品各 9 份, 每份约 100 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 精密加入“2.2.2”项下杂质混合溶液 0.20、0.25、0.30 mL, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得低 ($200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高 ($300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的供试溶液各 3 份, 进样分析, 根据“2.5”项下线性方程计算, 杂质 A 低、中、高浓度下的平均回收率 ($n=3$) 分别为 91.5%、93.8%、94.9%, RSD 分别为 2.1%、4.6%、3.1%; 杂质 B 低、中、高浓度下的平均回收率分别为 93.9%、94.6%、93.3%, RSD 分别为 0.74%、0.15%、0.22%; 杂质 C 低、中、高浓度下的平均回收率分别为 101.5%、104.2%、103.2%, RSD 分别为 0.41%、0.95%、0.54%, 方法回收率良好。

2.9 样品检测

取 3 批阿加曲班原料药样品, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液; 按“2.2.2”项下方法制备杂

质对照溶液; 精密量取供试品溶液与杂质对照溶液各 $5 \mu\text{L}$, 分别注入超高效液相色谱质谱仪, 按外标法以峰面积计算阿加曲班中杂质 A、B、C 和 D 的含量。结果显示, 3 批样品中均未检出杂质 A、B、C 和 D。

3 讨论

3.1 水解时间和水解温度的优化

本实验研究了杂质 D 生成杂质 A 的水解时间和水解温度。直接配制 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 D 的溶液, 在室温和 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下分别放置 0、2、4、6、8、10 h, 然后取出配制成杂质 D 的杂质对照溶液, 分别进样, 观察杂质 A 与杂质 D 的峰面积变化情况。结果表明 (图 3、4): 0 h 时, 杂质 D 即可水解生成杂质 A; 随着时间延长, 杂质 D 的峰面积逐渐变小; 8 h 时, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 下杂质 D 已全部水解为杂质 A; 而直到第 10 h, 室温条件下还有杂质 D 尚未完全水解。因此, 本实验选择在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 8 h。

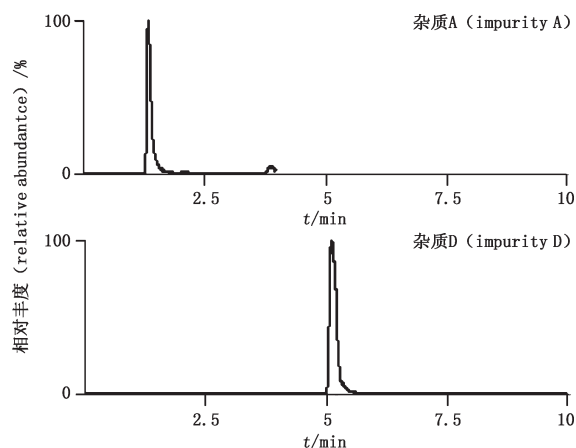
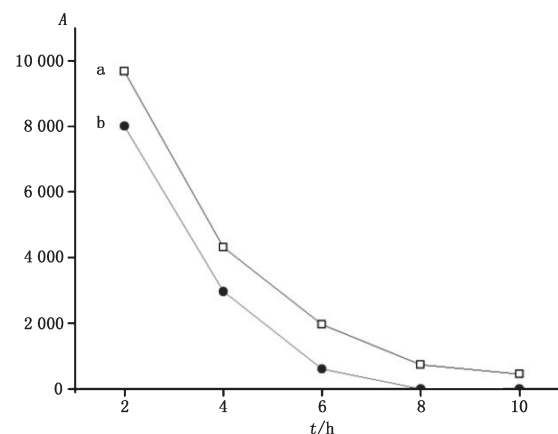


图 3 0 h 基因毒性杂质 A 和 D 总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of genotoxic impurity A and D at 0 h



a. 室温 (room temperature) b. $40 \text{ }^\circ\text{C}$

图 4 不同温度下杂质 D 峰面积随时间变化图

Fig. 4 Variation of genotoxic impurity D peak area with time at different temperatures

3.2 质谱条件的优化

分别取杂质 A、B、C 和 D 的对照品,按“2.2.2”项下方法配制质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单标标准溶液,采用蠕动泵方式将其单独注入质谱的离子源中,在正离子(ESI^+)、负离子(ESI^-)模式下进行全扫描,选择合适的准分子离子峰和电离方式。结果表明,在 ESI^+ 模式下,4 个杂质均可获得较高丰度的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 准分子离子峰。对离子源温度、去溶剂气温度及流量、锥孔气流量进行优化,使待测物质的离子化效率达到最佳。

3.3 色谱条件的优化

考察了乙腈-水、甲醇-0.1% (*v/v*) 甲酸水溶液、乙腈-0.1% (*v/v*) 甲酸水溶液作为流动相体系对目标化合物分离效果的影响。结果显示,以乙腈为有机相时,各待测物响应强度稳定,且色谱峰形较好;以甲醇为有机相时,杂质 A 响应值明显降低;在流动相中加入甲酸,提高了目标化合物的离子化效率,获得了更高的灵敏度。故实验选择乙腈-0.1% (*v/v*) 甲酸水溶液体系作为流动相。

3.4 结论

经方法学试验验证,本方法能够对阿加曲班中的 4 个痕量基因杂质进行准确测定,方法专属性强,灵敏度高,能满足杂质定量检测的要求,可作为阿加曲班基因毒性杂质的质量控制方法。

参考文献

- [1] VINODH G, VENKATESAN CS, JAYA SA, *et al.* Novel degradation products of argatroban: Isolation, synthesis and extensive characterization using NMR and LC-PDA-MS/Q-TOF [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(2): 86
- [2] LIONEL P, ANME CS, ELENA F, *et al.* Determination of inhibitory potency of argatroban toward thrombin by electrophoretically mediated microanalysis [J]. *Talanta*, 2013, 116: 719
- [3] PHILIPPE HS, MAHER K, MELISANDE B, *et al.* Photodegradation of aqueous argatroban investigated by LC/MS: photoproducts, transformation processes and potential implications [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 223
- [4] NORIAKI T, KENICHI T, MICHIO M, *et al.* Management of intra-aortic balloon counterpulsation by argatroban anticoagulation in a patient with a history of heparin-induced thrombocytopenia [J]. *J Cardiol Cases*, 2012, 6(5): 154
- [5] FAREED J, JESKE W. Small molecule direct antithrombins: argatroban [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2004, 17(1): 127
- [6] 谢智乾,王哲烽,时惠麟. 阿加曲班-水合物合成路线图解 [J]. *中国医药工业杂志*, 2011, 42(11): 868
XIE ZQ, WANG ZF, SHI HL. Graphical synthetic routes of argatroban monohydrate [J]. *Chin J Pharm*, 2011, 42(11): 868
- [7] 刘克全,康彦龙,李菁,等. 阿加曲班的合成 [J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46(11): 1161
LIU KL, KANG YL, LI J, *et al.* Synthesis of argatroban [J]. *Chin J Pharm*, 2015, 46(11): 1161
- [8] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guidelines on the limits of genotoxic impurities [EB/OL]. [2016-12-05]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf
- [9] US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry. Genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches [EB/OL]. [2016-12-05]. <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/FDA-2008-D-0629-gdl.pdf>
- [10] 李开凤,普俊学,高宏涛. HPLC 法测定盐酸法舒地尔中基因毒性杂质 [J]. *海峡药学*, 2018, 30(2): 45
LI KF, PU JX, GAO HT. Determination of genotoxic impurity in fasudil hydrochloride by HPLC [J]. *Strait Pharm J*, 2018, 30(2): 45
- [11] 樊春艳,谢学渊,任婷麟,等. HPLC 法测定盐酸法舒地尔有关物质的应用价值 [J]. *西部医学*, 2014, 26(7): 930
FAN CY, XIE XY, REN TL, *et al.* Application value of determination of fasudil hydrochloride related substances by HPLC [J]. *Med J West China*, 2014, 26(7): 930
- [12] 王珊珊,宁凡盛,王晓利,等. HPLC-MS/MS 法分析吉非替尼中痕量基因毒性杂质 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(7): 1309
WANG SS, NING FS, WANG XL, *et al.* Trace determination of genotoxic impurity in gefitinib by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(7): 1309
- [13] 宋凡,宋晓妮,王磊,等. 酒石酸伐尼克兰中 6 个类苯胺基因毒性杂质的 LC-MS 法测定 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(1): 130
SONG F, SONG XN, WANG L, *et al.* Determination of six aniline-like genotoxic impurities in varenicline tartrate by LC-MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(1): 130
- [14] 钱建钦,张云峰,王建,等. UHPLC-MS 法测定 2 种硫酸氢氯吡格雷晶型中的基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(11): 1994
QIAN JQ, ZHANG YF, WANG J, *et al.* Determination of genotoxic impurity methyl p-toluenesulfonate in two kinds of crystal forms of clopidogrel hydrogen sulfate [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(11): 1994
- [15] 陈菁菁,杨小玲,李琴. UPLC-QTOF/MS 法分析盐酸奈必洛尔中痕量遗传毒性杂质 A 和 B [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(11): 2035
CHEN JJ, YANG XL, LI Q. Trace determination of genotoxic impurities A and B in nebivolol hydrochloride by UPLC-QTOF/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(11): 2035
- [16] 周长朋,王东武,张曼玉,等. 高效液相色谱-四极杆/线性离子阱质谱仪测定盐酸决奈达隆中两种基因毒性杂质的痕量残留 [J]. *分析测试学报*, 2016, 35(9): 1111
ZHOU CP, WANG DW, ZHANG MY, *et al.* Determination of two genotoxic impurities residues in dronedarone hydrochloride by HPLC-QTRAP-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(9): 1111

(本文于 2019 年 1 月 11 日收到)