·实验研究·

LC-MS/MS 法测定盐酸法舒地尔中 2 种基因毒性杂质的含量

石小娜[1,2],张志英[3],王立爽[1],赵龙山[1]
(1 沈阳药科大学药学院,沈阳 110016;2 瀚盟测试科技有限公司,天津 300457;
3 山西诺成制药有限公司,朔州 038300)

[摘要] **目的**:建立液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)测定盐酸法舒地尔中 2 种基因毒性杂质 5-异喹啉磺酸甲酯(杂质 A)和 5-异喹啉磺酸乙酯(杂质 C)的含量测定方法,并进行方法学验证。**方法**:采用 LC-MS/MS 方法,使用 Waters Sunfire C_{18}(100 mm×3 mm,3.5 μm)色谱柱,以 0.1% 甲酸水-乙腈溶液为流动相,梯度洗脱,流速 0.5 mL·min^{-1},柱温 30 ℃,进样量 10 μL。采用电子喷雾源 ESI,正离子模式采集分析。**结果**:杂质 A 和杂质 C 在线性范围内线性关系良好。杂质 A 和杂志 C 的检测限分别为 0.2 和 0.02 ng·mL^{-1},平均回收率均在 93.0% ~98.0% 之间,RSD <4.67%(n =9)。准确度、稳定性和耐用性的 RSD 均 <10.0%。3 批盐酸法舒地尔中均未检测到杂质 A 和杂质 C。**结论**:所建立的方法快捷、准确且重复性好,可用于盐酸法舒地尔中杂质 A 和杂质 C 基因毒性杂质的控制。

[关键词] 盐酸法舒地尔;基因毒性杂质;液相色谱-质谱联用方法
[中图分类号] R932 [文献标志码] A [文章编号] 1003 -3734(2021)13 -1236 -06

Simultaneous determination of the contents of two genotoxic impurities in fashudil hydrochloride by LC-MS/MS

SHI Xiao-na[1,2], ZHANG Zhi-ying[3], WANG Li-shuang[1], ZHAO Long-shan[1]
(1 *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016, *China*; 2 *Hanmeng Test Technology Co., Ltd., Tianjin* 300457, *China*; 3 *Shanxi Nuocheng Pharmaceutical Co., Ltd., Shuozhou* 038300, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS method) for determination the contents of 5-methyl isoquinoline sulfonic acid (impurity A) and 5-ethyl isoquinoline sulfonic acid (impurity C) which are genotoxic impurities in fashudil hydrochloride. **Methods**: The LC-MS/MS method was achieved by a Waters Symmetry C_{18} (100 mm × 3 mm, 3.5 μm) column utilizing a mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile with gradient elution at a flow rate of 0.5 mL·min^{-1}. The column temperature was set at 30 ℃, the injection volume was 10 μL. The electrospray was operated with the source ESI under positive ionization scanning mode, and data were collected and analyzed. **Results**: Standard curves of impurity A and impurity C have a good linear relationship in the linear range. The limits of detection were 0.2 and 0.02 ng·mL^{-1}, respectively, and the average recovery range was 93.0% ~98.0%, RSD <4.67% (n =9). The RSDs of precision, accuracy, stability and durability tests were all less than 10.0%. Impurities A and C in the 3 batches of fashudil hydrochloride were not detected. **Conclusion**: The established method was fast, accurate and reproducible, which could be used for the control of genotoxic impurities A and C in fashudil hydrochloride.

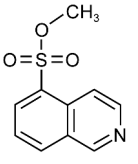
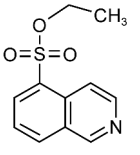
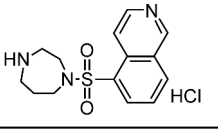
[**Key words**] fashudil hydrochloride; genotoxic impurity; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

[作者简介] 石小娜,女,助理研究员,主要从事药物分析研究。E-mail:15002293774@163.com。
[通讯作者] 赵龙山,男,副教授,主要从事纳米材料的合成及其在痕量残留药物富集中应用的研究。E-mail:longshanzhao@163.com。

心脑血管病占全球十大死亡原因之首。在我国，估算每年新发脑卒中患者约 200 万人，约 150 万人死于心脑血管病，其中缺血性脑血管病约占 80%，脑血管病约占 20%[1-3]。Rho 激酶（Rho-assoicated kinases，ROCK）作为 Rho 蛋白下游作用底物，参与脑血管痉挛、缺血性脑损害等病理生理过程。盐酸法舒地尔是目前唯一用于临床的 Rho 激酶抑制剂，目前已被应用于临床治疗急性缺血性脑卒中[4-7]。随着我国人口老龄化程度不断严重，老年人比例逐渐增长，脑血管病发病率处于不断上升趋势，患病率由 1993 年的 4.2% 上升至 2008 年的 9.8%，并且还呈现出高死亡率、高残废率及高复发率等特点。与此相应，我国脑血管病化学药的市场规模快速增长，因此盐酸法舒地尔注射液的销量近年亦快速上升。

盐酸法舒地尔（fasudil hydroxyl）的化学名称为 6（*H*）-1-（5-磺酰基异喹啉）-1（*H*）-1，4-二氮杂䓬盐酸盐，分子式为 $C_{14}H_{17}N_3O_2S\cdot HC$[8-9]。其原料药以 5-异喹啉磺酸为合成的起始原料，在合成过程中其中间体 5-磺酰氯异喹啉会与提取盐酸法舒地尔粗品的醇类溶剂反应生成 5-异喹啉磺酸甲酯（杂质 A）和 5-异喹啉磺酸乙酯（杂质 C），生产过程中可能会传递到成品中[10-11]。杂质 A、杂质 C 和盐酸法舒地尔的结构式见表 1。

表 1 杂质 A 和杂质 C 结构

名称	结构
杂质 A	
杂质 C	
盐酸法舒地尔	

原料药及杂质合成路线见图 1。

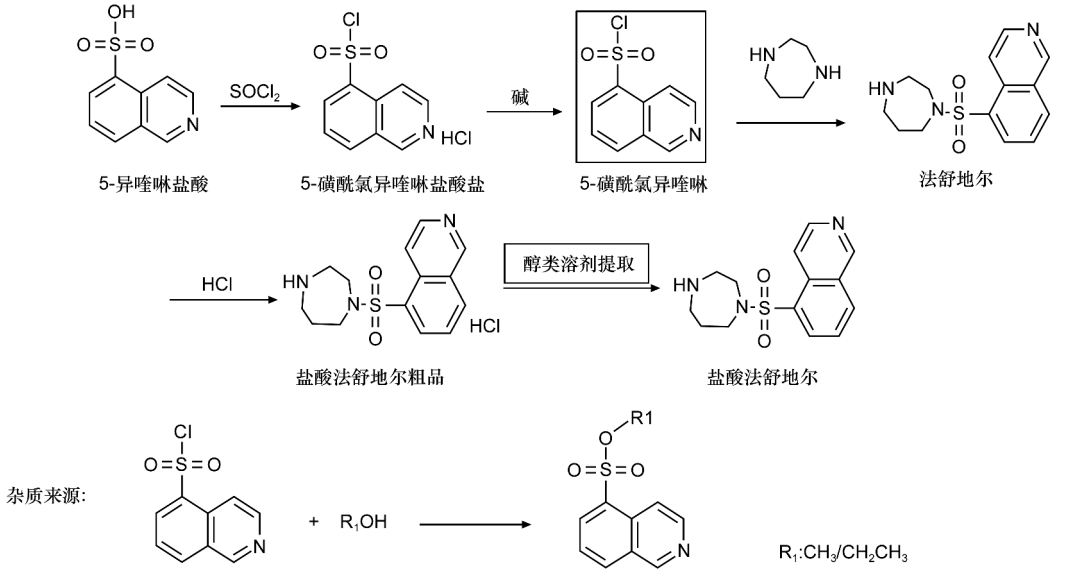


图 1 盐酸法舒地尔和杂质合成路线

基因毒性杂质主要是指在以 DNA 反应物质为主要研究对象的体内或体外实验中，对 DNA 具有直接或者间接的破坏性，而具有致癌可能或者倾向的杂质[12]。基因杂质的毒性很强，常常在很低的含量或浓度水平下，即可对人体造成遗传毒性的损伤[13]。ICH 颁布了相关的基因毒性杂质指导文件，推荐以毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）来控制用药风险。其中 TTC 的含义为在人的一生（70 岁）中，每天可摄入 1.5 μg 基因毒性杂质，相当于增加十万分之一的患癌风险，相对于药物带来的益处，其致癌的风险是可接受的[14-15]。磺酸酯类是一种较为常见的基因毒性杂质，临床研究发现甲

磺酸酯的烷基化作用会导致 DNA 突变,其中甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯已有这方面报道[16-17]。本文采用 LC-MS/MS 技术,同时测定盐酸法舒地尔中的 2 种基因毒性杂质,该方法具有灵敏度高、分析速度快、结果准确可靠等优点,并且能够满足痕量基因毒性杂质的检测要求。

材　　料

1　药品与试剂

盐酸法舒地尔和各杂质均由山西诺成制药有限公司提供,杂质 A 和杂质 C 纯度分别为 95.4% 和 97.6%;甲醇、乙腈、DMSO 均为色谱纯,购自美国 Fishe Chemical 公司;甲酸为色谱纯,购自德国 CNW 公司;Milli-Q 纯水仪自制超纯水。

2　仪器

API-4000 QTrap LC-MS/MS 液相色谱质谱联用仪、液相色谱系统(泵:LC－20AD,岛津公司);Waters Sunfire C_{18}(100 mm × 3 mm,3.5 μm)色谱柱;SIL－20AC 自动进样器;CTO－20A 柱温箱;Analyst 1.5.2 工作站;百万分之一天平、十万分之一天平(梅特勒公司);Proline Plus 20 ~ 200 μL 和 100 ~ 1 000 μL 移液枪(Biohit 公司)。

方法与结果

1　色谱条件与质谱条件

采用 Waters Sunfire C_{18}(100 mm × 3 mm,3.5 μm)色谱柱,流动相:0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序(0.01 ~ 0.05 min,80% A;3 ~ 4.2 min,10% A;4.21 ~ 6 min,81% A),流速:0.5 mL·min^{-1},柱温:30 ℃,进样量:10 μL,运行时间:6 min。

采用电喷雾离子源 ESI,正离子模式,气帘气体压力:20 psi。采集时间:2.5 ~ 4.0 min。杂质 A 的母离子和子离子质核比分别是 224.1 和 128.9,去簇电压:99 V,碰撞能:44 V;杂质 C 的母离子和子离子质核比分别是 238.2 和 210.1,去簇电压:80 V,碰撞能:23 V;盐酸法舒地尔的母离子和子离子质核比分别是 292.2 和 99.2,去簇电压:104 V,碰撞能:40 V。

2　溶液的制备

2.1　对照品溶液的制备　精密称定杂质 A 和杂质 C 各 2 mg,分别置于 20 mL 量瓶,用稀释液(50% 乙腈-水溶液)溶解并稀释至刻度,得到浓度为 0.1 mg·mL^{-1}的各杂质对照品溶液储备液Ⅰ。精密量取此储备液Ⅰ 200 μL,置于 20 mL 量瓶,用稀释液溶解并稀释至刻度,得到浓度为 1 μg·mL^{-1}的各杂质对照品溶液储备液Ⅱ。精密量取储备液Ⅱ 200 μL,置于 20 mL 量瓶,用稀释液溶解并稀释至刻度,得到每 1 mL 含各杂质 10 ng 的混标溶液,作为对照品溶液。

2.2　供试品溶液的制备　取盐酸法舒地尔约12.2 mg,精密称定,置于 20 mL 量瓶,用稀释液溶解并稀释至刻度,得到浓度为 0.61 mg·mL^{-1}的供试品溶液。

3　方法学考察

3.1　专属性实验　取空白溶剂、各杂质单标溶液(10 ng·mL^{-1}),依次进样分析,结果显示空白溶剂对各杂质均无干扰,见图 2 ~ 4。

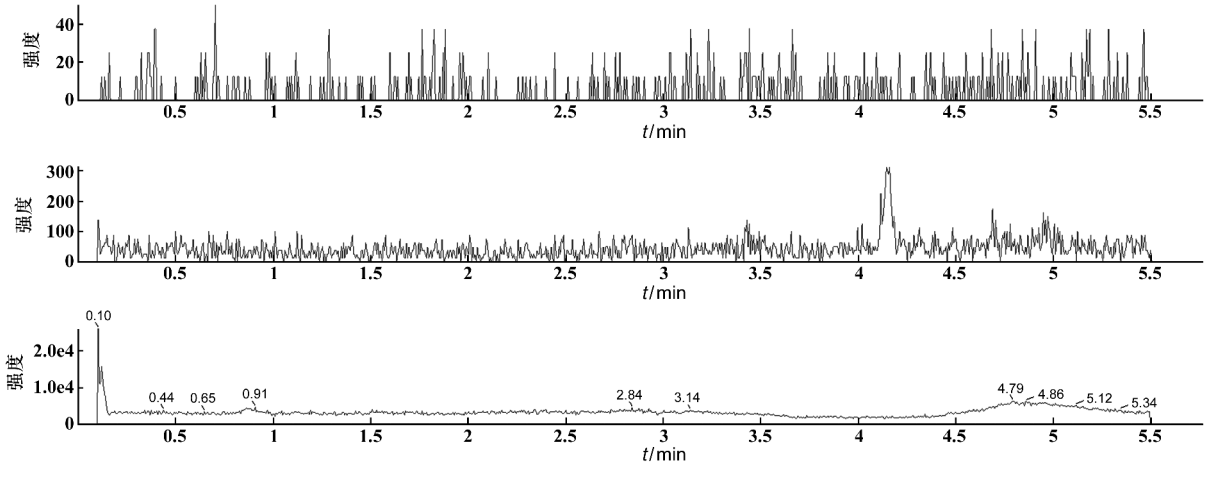


图 2　空白溶剂色谱图

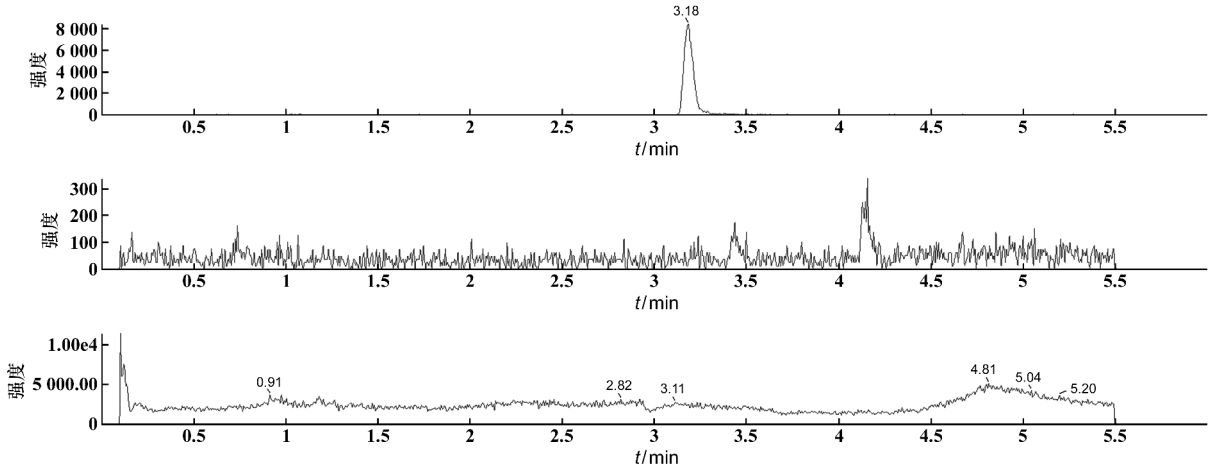


图 3 杂质 A 色谱图

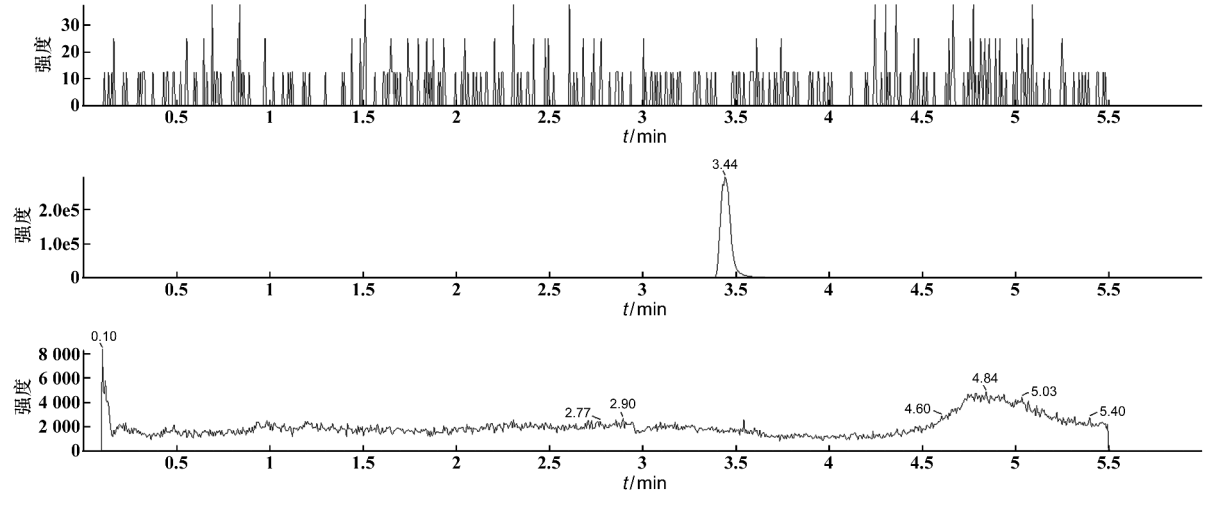


图 4 杂质 C 色谱图

3.2 定量限与检测限实验 杂质 A 的定量限溶液浓度为 0.5 ng·mL^{-1},杂质 C 的定量限溶液浓度为 0.05 ng·mL^{-1}。取杂质 A 和杂质 C 的定量限溶液各 2 mL,分别置于 5 mL 的容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,作为检测限考察溶液。取 10 μL 溶液进样,记录色谱图。结果显示杂质 A 的检测限为 0.2 ng·mL^{-1},杂质 C 的检测限为 0.02 ng·mL^{-1}。杂质 A 和杂质 C 保留时间 RSD 的最大值为 0.38%(<2.0%),峰面积 RSD 的最大值为 8.16%(<20.0%),结果符合方法学要求。

3.3 线性关系实验 精密移取“**2.1**”中各杂质对照品溶液储备液Ⅱ 1 mL 于 20 mL 容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 50 ng·mL^{-1}的各杂质混标溶液,用该溶液配制浓度水平为 2,5,8,10,15 和 20 ng·mL^{-1}的线性工作溶液。以各杂质的浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),进行线性回归分析。实验结果表明,杂质 A 在 1.94 ~ 19.4 ng·mL^{-1}的浓度范围内线性方程为 $y = 3\,510.5x + 646.51$($r = 0.998$);杂质 C 在 1.99 ~ 19.9 ng·mL^{-1}的浓度范围内线性方程为 $y = 116\,823x + 101\,226$($r = 0.999$),线性关系均良好。

3.4 精密度实验 取“**3.3**”项下配制的 10 ng·mL^{-1}浓度水平的杂质 A 和杂质 C 的线性工作溶液,重复进样 6 次。结果表示,杂质 A 和杂质 C 峰面积的 RSD 分别为 4.74% 和 4.46%(<15%),保留时间的 RSD 为 0.17% 和 0.12%(<2.0%),符合方法学验证要求。

3.5 稳定性实验 分别取“**2.1**”项下配制的杂质 A 和杂质 C 的对照品溶液,于室温和 4 ℃放置 0,2,4,6 和 8 h 进样,结果见表 2。结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

表 2 对照品溶液室温放置的稳定性试验结果

放置时间	保留时间/min				峰面积			
	杂质 A		杂质 C		杂质 A		杂质 C	
	室温	4 ℃	室温	4 ℃	室温	4 ℃	室温	4 ℃
0 h	3.12	3.12	3.41	3.41	33 000	33 000	1 190 000	1 190 000
2 h	3.12	3.13	3.42	3.42	32 500	32 700	1 250 000	1 230 000
4 h	3.12	3.12	3.41	3.41	32 300	34 100	1 240 000	1 240 000
6 h	3.12	3.12	3.41	3.41	32 100	32 300	1 200 000	1 240 000
8 h	3.11	3.11	3.41	3.41	31 200	32 200	1 230 000	1 240 000
平均值	3.12	3.12	3.41	3.41	32 220	32 860	1 222 000	1 228 000
RSD/%	0.143	0.227	0.131	0.131	2.05	2.32	2.12	1.77

由于供试品溶液在杂质 A 和杂质 C 的含量均低于定量限以下,不能客观地反映本方法的重复性。因此配制 6 个 100% 加标样品溶液来考察重复性。杂质 A 和杂质 C 的 RSD 分别为 2.13% 和 1.59%,结果表明实验的重复性良好,符合方法学要求。

3.7 耐用性实验 改变柱温(30 ± 2) ℃、流速(0.5 ± 0.05) mL·min^{-1}和色谱柱[改用 Waters SunFire C_{18} (100 mm × 3.0 mm, 3.5 μm)],考察方法的耐用性。结果显示,当色谱条件中流速、柱温和色谱柱发生轻微变化时,各杂质回收率的 RSD 均 < 10%,说明该方法耐用性良好。

3.8 加标回收率实验 精密移取“**2.1**”项下 1 μg·mL^{-1}的各杂质对照品溶液储备液Ⅱ 2 mL 于 20 mL 容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,得到各杂质浓度约为 100 ng·mL^{-1}的工作溶液。精密量取“**2.2**”项下 0.61 mg·mL^{-1}的盐酸法舒地尔储备溶液和 100 ng·mL^{-1}的杂质 A 和杂质 C 的混标溶液加入容量瓶中,用稀释液稀释至刻度。得到加标 100% 的回收率样品溶液,平行制备 3 份。同法制备加标 80% 和 120% 的回收率样品溶液,分别进样 10 μL。结果表明,杂质 A 和杂质 C 在 80%,100% 和 120% 3 个浓度水平的回收率均在 93.0% ~ 98.0%,9 份样品结果 RSD 的最大值为 4.67%(< 10.0%),表明该方法准确度良好,实验结果见表 3 和表 4。

表 3 杂质 A 加标回收率结果

对照储备液取样量	0.8 mL			1 mL			1.2 mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
加入量/ng·mL^{-1}	—	7.77	—	—	9.71	—	—	11.65	—
测得量/ng·mL^{-1}	7.31	7.48	7.51	9.05	8.91	9.14	11.1	10.9	10.7
回收率/%	94.1	96.3	96.7	93.2	91.8	94.1	95.6	93.4	92.2
平均回收率/%		95.7			93.0			93.7	
RSD/%		1.45			1.28			1.86	

表 4 杂质 C 加标回收率结果

对照储备液取样量	0.8 mL			1 mL			1.2 mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
加入量/ng·mL^{-1}	—	7.96	—	—	9.95	—	—	11.93	—
测得量/ng·mL^{-1}	7.63	7.87	7.79	9.74	9.43	9.35	12.3	11.5	11.3
回收率/%	95.9	98.9	97.9	97.9	94.8	94.0	103.2	96.0	94.7
平均回收率/%		97.6			95.6			98.0	
RSD/%		1.59			2.17			4.67	

4 样品测定

实际样品选自山西诺成制药有限公司,取 3 批样品,批号分别为 20170501,20170502 和 20170503。按照“**2.2**”项下进行供试品溶液制备,平行进样 2

次。结果表明 3 批盐酸法舒地尔样品中杂质 A 和杂质 C 均未检出。

讨　论

本研究建立了 LC-MS/MS 同时检测盐酸法舒地尔中 2 种基因毒性杂质——杂质 A 和杂质 C 的方法，优化了质谱与色谱方法。

由于药物中基因毒性杂质含量甚微，故提高进样浓度是最直接有效提高微量基因毒性杂质检测能力的办法，实验过程发现盐酸法舒地尔在甲醇、乙腈-水溶液中均易溶，故考察了各杂质在甲醇、50% 甲醇-水、50% 乙腈-水溶液体系下的加标回收率，结果显示杂质 A 和杂质 C 在甲醇、50% 甲醇-水溶液体系下杂质 A 回收率偏低，在 20% ~30% 左右甲醇-水溶液体系下杂质 C 回收率良好；在 50% 乙腈-水溶液体系下，杂质 A 和杂质 C 的回收率均良好。故选用 50% 的乙腈-水溶液作为稀释液。

实验结果表明该方法的专属性强、稳定性可靠，并且检测限、定量限和耐用性均符合方法学验证要求。该方法能够快速准确、简单高效地同时检测出盐酸法舒地尔中的 5-异喹啉磺酸甲酯和 5-异喹啉磺酸乙酯 2 种基因毒性杂质。

[参 考 文 献]

[1] 王班，关天嘉，尤莉莉，等. 我国缺血性脑卒中残疾情况及其影响因素分析[J]. 中国全科医学，2016，19(2)：216 - 219.

[2] 郭大华，郭奕辉. 盐酸法舒地尔联合尼莫地平治疗脑动脉瘤性脑血管痉挛的疗效分析[J]. 中国实用医药，2020，15(14)：114 - 116.

[3] 温少红，吴迪，刘向荣，等. 缺血性脑血管病后小胶质细胞极化的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志，2017，14(3)：159 - 163.

[4] 夏海丹·艾买尔，李曙，陈炎，等. 盐酸法舒地尔治疗不稳定型心绞痛的疗效的系统评价[J]. 武汉大学学报(医学版)，2019，40(4)：661 - 668.

[5] 程晟，余俊先，卫红涛，等. 盐酸法舒地尔注射液临床应用合理性与安全性评价[J]. 中国药师，2019，22(8)：1474 - 1476.

[6] 余旭. 盐酸法舒地尔治疗急性脑梗死临床观察[J]. 中国实用神经疾病杂志，2019，22(4)：380 - 385.

[7] 刘丰进，孙斌，邱建清. 盐酸法舒地尔应用于急性脑梗死的临床效果[J]. 中外医学研究，2020，18(2)：6 - 8.

[8] 莫肇. 盐酸法舒地尔联合氯吡格雷治疗急性脑梗死的临床效果[J]. 中国当代医药，2019，26(15)：136 - 138.

[9] 陈慧君，安秋花，张春煜. Rho 激酶抑制剂治疗急性心肌梗死血清炎症因子的临床疗效分析[J]. 中国实用医药，2017，12(9)：22 - 24.

[10] 王智军，赵立伟，李晨光，等. 5-异喹啉磺酸酯的合成及降解研究[J]. 山东化工，2019，48(16)：27 - 28.

[11] 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 - 48.

[12] 于瑞董，俞海荣，杨杰，等. 药物中基因毒性杂质磺酸酯类分析方法的研究近况[J]. 海峡药学，2019，31(8)：122 - 125.

[13] 汪生，杭太俊. 药物中基因毒性杂质检测策略的研究[J]. 中国新药杂志，2019，28(23)：2840 - 2846.

[14] 刘爱赟，袁永兵，靳文仙，等. 药物中肼类基因毒性杂质分析研究进展[J]. 药物评价研究，2020，43(2)：356 - 360.

[15] 孙春艳，纪颖鹤，秦昆明，等. 液相色谱-串联质谱法测定吉非替尼中 4 种基因毒性杂质[J]. 色谱，2019，37(12)：1297 - 1304.

[16] 鲁晶晶，冯芳. 磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 广州化工，2019，47(9)：20 - 22.

[17] 刘雪薇，厉程，韩海云，等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 色谱，2018，36(10)：952 - 961.

编辑：刘卓越/接受日期：2020 - 11 - 22