

## 利用Xevo™ TQ Absolute串联四极杆质谱仪和ACQUITY™ Premier系统对具有潜在致突变作用的硼酸进行高灵敏度分析

---

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

---

### 摘要

硼酸及其酯类是合成有机化合物的常用试剂。研究发现几种硼酸为潜在诱变剂，应使用灵敏的方法将其控制在较低水平。本研究使用超高效液相色谱法(UPLC)和串联四极杆质谱仪对七种具有潜在致突变作用的硼酸进行了高灵敏度定量分析。采用ACQUITY Premier BEH™ C<sub>18</sub>色谱柱进行色谱分离。使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪与ACQUITY Premier联用系统进行定量分析。在负离子电喷雾电离(ESI)和多重反应监测(MRM)模式下，硼酸的定量限可达到0.005~0.05 ng/mL。

### 优势

- 使用具有高选择性和高灵敏度的UPLC方法，在MRM模式下运行Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪，对具有潜在致突变作用的硼酸进行准确鉴定和定量
  - 使用ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱对硼酸进行稳定分离
  - Xevo TQ Absolute质谱仪可使具有潜在致突变作用的硼酸实现低水平的定量限(LOQ)，范围为0.005~0.05 ng/mL
-

---

## 简介

硼酸及其酯类是合成药物的重要组成部分和关键中间体<sup>1</sup>中描述的稀释方案制备样品。一项已发表的研究报告指出，一些硼酸在微生物试验中表现出致突变活性<sup>1</sup>中描述的稀释方案制备样品。致突变化合物（通常称为基因毒性物质）是一种可能损害DNA的DNA活性物质，可能导致引发癌症的恶性突变<sup>2,3</sup>。因此，根据致突变杂质的可接受安全性水平，需要高灵敏度的方法来准确鉴定和定量<sup>3</sup>。硼酸在合成过程中常被用作中间体，并且可能作为杂质存在于原料药中。

紫外(UV)分析方法通常用于非挥发性化合物的药物分析，气相色谱(GC)和火焰离子化检测(FID)用于分析挥发性化合物。但这些方法并不能提供控制原料药中低水平致突变化合物所需的检测能力。在这种情况下，需要使用质谱检测器才能达到所需的灵敏度。串联四极杆质谱是一种具有高灵敏度和高选择性的技术，常用于药物化合物的低水平定量<sup>4</sup>。

本研究开发出一种高灵敏度、高选择性的UPLC-MS/MS方法，用于分析具有潜在致突变作用的硼酸（表1）。该方法使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪与ACQUITY Premier联用系统进行分析。

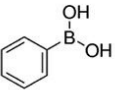
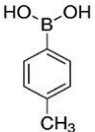
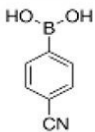
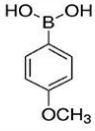
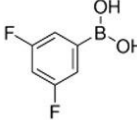
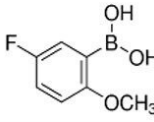
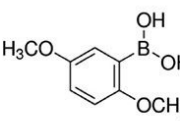
| 化合物           | 单同位素质量数 (Da) | 分子式                                                          | 结构                                                                                    |
|---------------|--------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 苯基硼酸          | 122.05       | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> BO <sub>2</sub>                |    |
| 4-甲基苯基硼酸      | 136.07       | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> BO <sub>2</sub>                |    |
| 4-氰基苯基硼酸      | 147.05       | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> BNO <sub>2</sub>               |    |
| 4-甲氧基苯基硼酸     | 152.06       | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> BO <sub>3</sub>                |    |
| 3,5-二氟苯基硼酸    | 158.03       | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> BF <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |   |
| 5-氟-2-甲氧基苯基硼酸 | 170.06       | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> BFO <sub>3</sub>               |  |
| 2,5-二甲氧基苯基硼酸  | 182.08       | C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> BO <sub>4</sub>               |  |

表1. 硼酸及化学信息列表

## 实验

硼酸购自Fisher Scientific，质谱级溶剂购自Sigma。

## 样品描述

利用Xevo™ TQ Absolute串联四极杆质谱仪和ACQUITY™ Premier系统对具有潜在致突变作用的硼酸进行高灵敏度分  
析

用甲醇制备浓度为5.0 mg/mL的硼酸单标储备液。将等体积的各种储备液转移到同一个样品瓶中，用甲醇稀释，制得每种分析物浓度均为10 µg/mL的混标。然后用水连续稀释混标溶液，制备LOD、LOQ和线性标准品溶液。

## 方法条件

|         |                                                                       |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|
| 液相色谱系统： | ACQUITY Premier二元系统                                                   |
| 样品瓶：    | LCMS最大回收样品瓶，容积2 mL，部件号：600000670CV                                    |
| 色谱柱：    | ACQUITY Premier BEH C <sub>18</sub> (2.1 × 100, 1.7 µm)，部件号：186009453 |
| 柱温：     | 40 °C                                                                 |
| 样品温度：   | 15 °C                                                                 |
| 进样体积：   | 7.0 µL                                                                |
| 流速：     | 0.3 mL/min                                                            |
| 流动相A：   | 0.05%氢氧化铵水溶液                                                          |
| 流动相B：   | 乙腈                                                                    |
| 梯度：     | 见梯度表                                                                  |

## 梯度表

| 时间<br>(min) | 流速<br>(mL/min) | %A   | %B   | 曲线 |
|-------------|----------------|------|------|----|
| 初始          | 0.300          | 98.0 | 2.0  | 初始 |
| 1.0         | 0.300          | 98.0 | 2.0  | 6  |
| 5.0         | 0.300          | 5.0  | 95.0 | 6  |
| 5.6         | 0.300          | 5.0  | 95.0 | 6  |
| 5.7         | 0.300          | 98.0 | 2.0  | 6  |
| 8.0         | 0.300          | 98.0 | 2.0  | 6  |

## 质谱条件

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| 质谱系统：   | Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪 |
| 电离模式：   | ESI-                     |
| 采集：     | MRM模式，如表2所述              |
| 毛细管电压：  | 1.0 V                    |
| 脱溶剂气温度： | 550 °C                   |
| 脱溶剂气流速： | 950 L/h                  |
| 锥孔气流速：  | 150 L/h                  |

喷雾器压力：7.0 bar

离子源温度：150 °C

| 硼酸          | MRM通道<br>( <i>m/z</i> ) | 锥孔电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(eV) | 软电离 |
|-------------|-------------------------|-------------|--------------|-----|
| 苯基          | 121.03>42.89            | 10          | 8            | 是   |
| 4-甲基苯基      | 135.07>42.89            | 10          | 8            | 是   |
| 4-氰基苯基      | 146.04>42.87            | 10          | 8            | 是   |
| 4-甲氧基苯基     | 151.03>42.89            | 10          | 10           | 否   |
| 3,5-二氟苯基    | 157.07>42.87            | 5           | 9            | 否   |
| 5-氟-2-甲氧基苯基 | 169.05>42.88            | 10          | 8            | 是   |
| 2,5-二甲氧基苯基  | 181.08>42.89            | 10          | 8            | 是   |

表2. 硼酸的MRM通道

## 数据管理

仪器控制：MassLynx™ v4.2

数据处理：TargetLynx™

## 结果与讨论

ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱成功分离了硼酸（图1）。使用Xevo TQ Absolute串联四极杆质谱仪，在负离子模式下使用电喷雾电离(ESI)进行检测和定量。多重反应监测(MRM)实验的运行方式是指定目标化合物的母离子及碎片离子质量数，然后监测一个子离子。使用MassLynx软件中的IntelliStart™确定硼酸的MRM通道和电离参数，并通过手动注射进行确认。

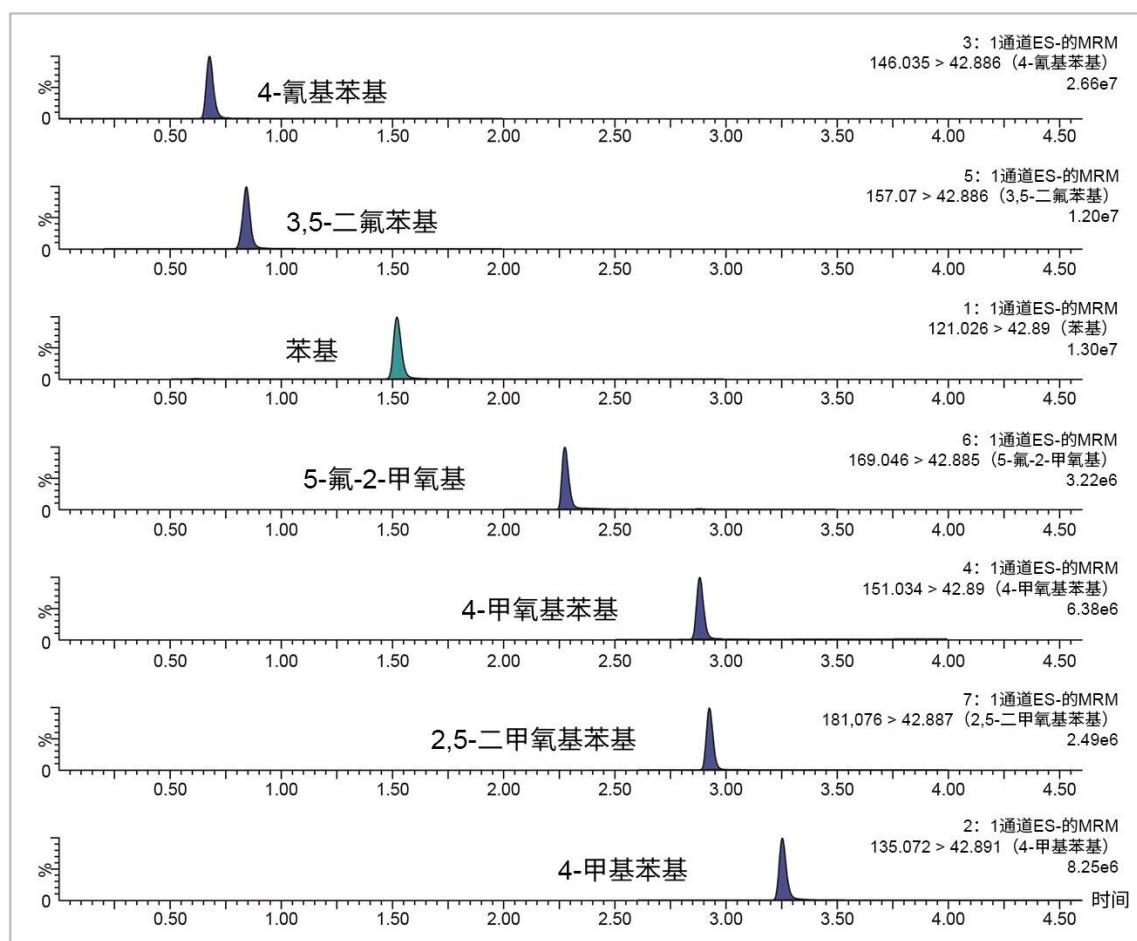


图1.在MRM采集模式下使用Xevo TQ Absolute对硼酸进行的色谱分离。样品为10 ng/mL的标准品溶液。

硼酸的检测限和定量限（LOD和LOQ）分别是按照3:1和10:1的信噪比(S/N)标准确定的。代表硼酸LOD和LOQ浓度水平的色谱图如图2所示。根据S/N标准，LOD和LOQ的范围分别为0.0025~0.025 ng/mL和0.005~0.05 ng/mL。此外，该方法还显示出硼酸的MS响应值和浓度之间的线性关系，相关系数为 $\geq 0.996$ （图3）。

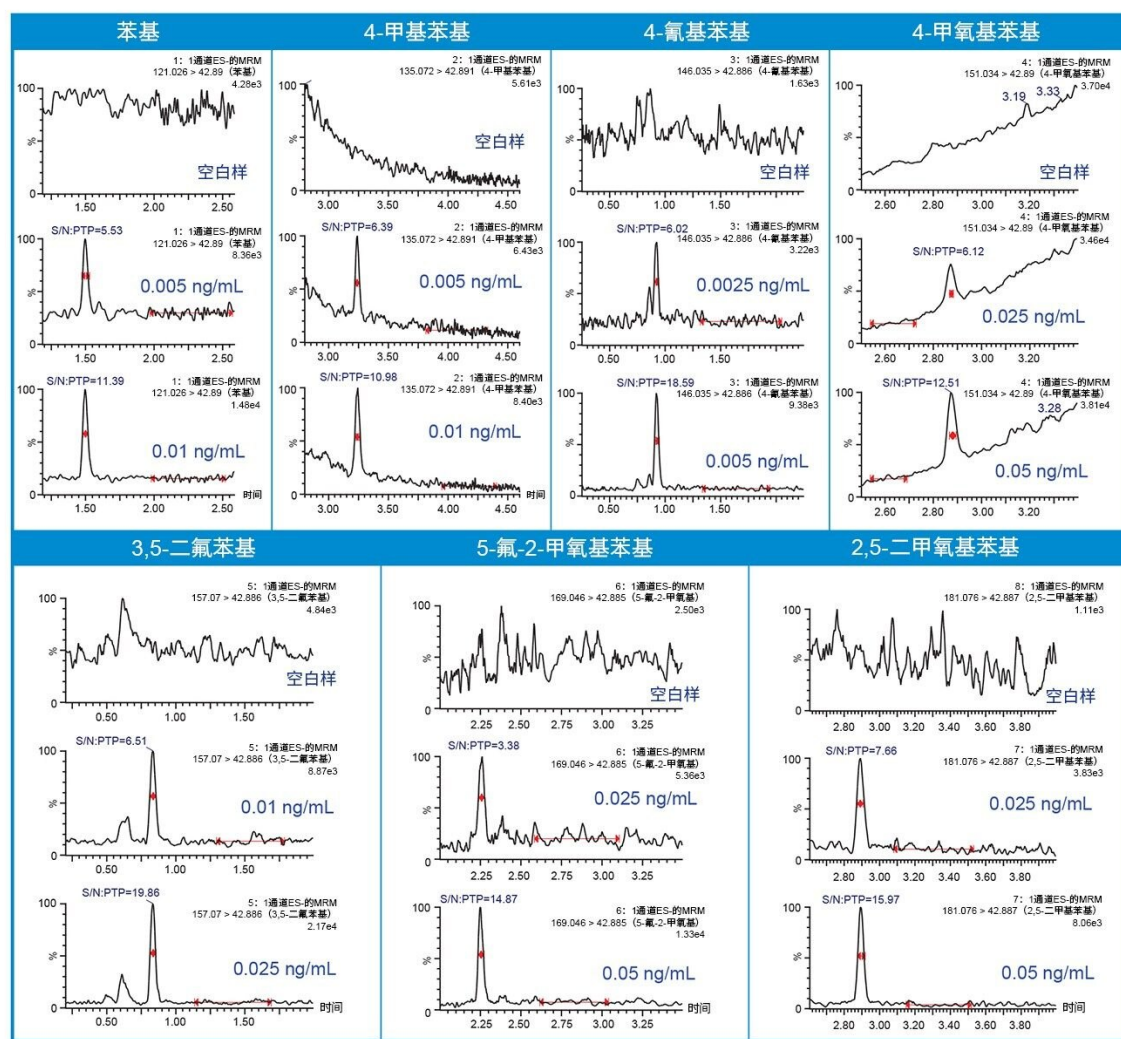


图2.使用Xevo TQ Absolute质谱仪测定硼酸LOD ( $S/N \geq 3$ )和LOQ ( $S/N \geq 10$ )浓度的代表性色谱图



| 硼酸          | MRM通道        | 线性范围<br>(ng/mL) | 线性拟合<br>$R^2$ |
|-------------|--------------|-----------------|---------------|
| 苯基          | 121.03>42.89 | 0.01-50         | 0.9972        |
| 4-甲基苯基      | 135.07>42.89 | 0.01-50         | 0.9982        |
| 4-氰基苯基      | 146.04>42.87 | 0.01-100        | 0.9974        |
| 4-甲氧基苯基     | 151.03>42.89 | 0.005-50        | 0.9976        |
| 3,5-二氟苯基    | 157.07>42.87 | 0.05-100        | 0.9956        |
| 5-氟-2-甲氧基苯基 | 169.05>42.88 | 0.05-50         | 0.9973        |
| 2,5-二甲氧基苯基  | 181.08>42.89 | 0.05-50         | 0.9971        |

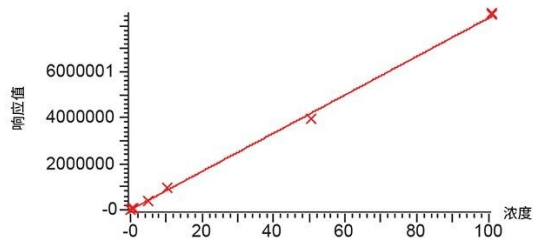
化合物名称: 4-氰基苯基

相关系数:  $r = 0.998728$ ,  $r^2 = 0.997457$

校准曲线:  $83193.6 * x + -218.426$

响应类型: 外标法, 按峰面积计算

曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重:  $1/x$ , 轴转: 无



化合物名称: 4-甲氧基苯基

相关系数:  $r = 0.998796$ ,  $r^2 = 0.997594$

校准曲线:  $17731.2 * x + -367.68$

响应类型: 外标法, 按峰面积计算

曲线类型: 线性, 原点: 排除, 权重:  $1/x$ , 轴转: 无

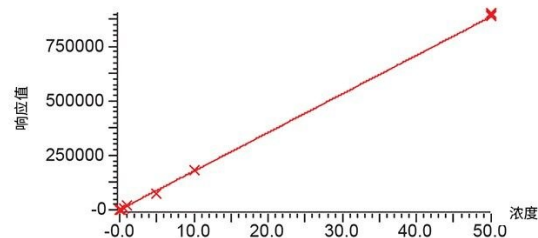


图3.使用Xevo TQ Absolute质谱仪获得的方法线性, 权重为 $1/x$

证明方法在同一分析中的日间性能可确保产生一致的结果, 这对于药品的质量控制和安全性至关重要。在几天内进样LOD和LOQ标准品溶液, 研究硼酸分析方法的日间性能。通过计算硼酸的S/N和峰面积%RSD来评估每天的性。结果汇总于表3中。在研究期间, 所有硼酸在LOQ浓度下都表现出稳定的信号, S/N比远高于10:1。此外, LOQ水平下的重复性也非常好, 峰面积%RSD  $\leq 6.86\%$ 。本研究没有使用内标来校正数据差异性。

| 硼酸          | LOQ<br>(ng/mL) | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 6 天 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 6 天 |
|-------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 苯基          | 0.01           | 11.4  | 10.0  | 13.90 | 2.87  | 1.88  | 8.33  |
| 4-甲基苯基      | 0.01           | 11.0  | 11.9  | 15.86 | 6.86  | 4.94  | 3.10  |
| 4-氟基苯基      | 0.005          | 18.6  | 16.5  | 12.45 | 5.10  | 5.26  | 5.64  |
| 4-甲氧基苯基     | 0.05           | 12.5  | 10.42 | 13.65 | 6.34  | 4.98  | 6.31  |
| 3,5-二氟苯基    | 0.025          | 19.9  | 13.83 | 22.08 | 3.04  | 4.74  | 3.35  |
| 5-氟-2-甲氧基苯基 | 0.05           | 14.9  | 13.59 | 12.28 | 3.34  | 5.26  | 3.23  |
| 2,5-二甲氧基苯基  | 0.05           | 16.0  | 18.84 | 20.42 | 4.84  | 6.69  | 3.70  |

表3.LOQ水平的日间方法性能

## 结论

本研究利用ACQUITY Premier I-Class与Xevo TQ Absolute质谱仪联用系统成功开发出一种高灵敏度的UPLC-MS/MS方法，可检测极低浓度的潜在致突变硼酸，LOQ低至0.005~0.05 ng/mL。该方法在LOQ水平上具有良好的日间性能。高灵敏度方法对于准确鉴定和控制致突变化合物的残留水平至关重要，有助于确保产品的质量和安全性。

## 参考资料

1. O’ Donovan MR, Mee CD, Fenner S, Teasdale A, Phillips DH.Boronic acids-A Novel Class of Bacterial Mutagen.*Mutation Research*.2011, 724: 1–6.
2. Liu DQ, Sun M, Kord AS.Recent Advances in Trance Analysis of Pharmaceutical Genotoxic Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, 999–1014.
3. ICH M7(R1), Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, International Conference on Harmonization, March 2018.

4. Loos G, Van Schepdael A, Cabooter D. Quantitative Mass Spectrometry Methods for Pharmaceutical Analysis. *Philosophical Transactions*, 2016, 374:20150366.

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ Absolute <</nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007562ZH, 2022年3月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#)   [隐私](#)   [商标](#)   [网站地图](#)   [招聘](#)   [Cookie](#)   [Cookie](#)   [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号