

## 药物中胍类基因毒性杂质分析研究进展

刘爱赞, 袁永兵, 靳文仙, 张 博, 郑永刚, 吴 赞\*

天津药物研究院有限公司, 天津 300193

**摘要:** 基因毒性杂质具有在极低暴露水平下即能导致严重毒性的特点, 对用药的安全性造成严重的威胁。作为一类重要的基因毒性杂质, 胍是一种常见的中间体, 而且是常见药物的降解产物。对基因毒性杂质进行了概述, 并较为详尽地介绍了胍类基因毒性杂质的分析方法, 为需要测定此类基因毒性杂质的分析人员提供参考。

**关键词:** 基因毒性杂质; 胍; 分析方法; 衍生化

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 02-0356-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.033

## Advances on analysis of genotoxic impurities of hydrazines in pharmaceuticals

LIU Aiyun, YUAN Yongbing, JIN Wenxian, ZHANG Bo, ZHENG Yonggang, WU Yun

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300193, China

**Abstract:** Genotoxic impurities can cause serious toxicity at very low exposure levels, which pose a serious threat to the medication safety. As an important genotoxic impurity, hydrazine is a common intermediate and a degradation product of common drugs. This article reviews the hydrazine genotoxic impurities and its analysis methods in detail, which intended to provide guidance for analyst needing to determine such genotoxic impurities.

**Key word:** genotoxic impurities; hydrazines; analysis methods; derivatization

基因毒性杂质 (genotoxic impurity, GTI) 是指能直接或间接损害细胞DNA, 引起DNA突变、染色体断裂、DNA重组及DNA复制过程中共价键结合或者插入, 导致基因突变或者癌症的药物相关物质。警示结构是指杂质中特殊基团, 可能与遗传物质发生化学反应, 诱导基因突变或者染色体断裂, 具有潜在的致癌危险<sup>[1]</sup>, 一些常见的可能带有基因毒性警示结构的官能团见图1<sup>[2]</sup>。

2006年, 美国药物研究和制造商协会根据风险级别将GTI分为5级<sup>[3]</sup>: 一是已知具有基因毒性 (致突变性) 和致癌性的杂质; 二是已知具有基因毒性 (致突变性), 但潜在致癌性未知的杂质; 三是具有警示结构, 但其与原料药结构无关, 同时与未知基因毒性 (致突变性) 潜在结构无关的杂质; 四是具有与原料药相关警示结构的杂质; 五是无警示结构, 或没有足够证据证明其没有基因毒性的杂质。

Szekely等<sup>[4]</sup>对GTI进行化学分类: 一是来源于

反应物的杂质, 如卤代烷、二羟基硫酸盐、环氧化物、胍、四甲基哌啶氧化物、芳香胺、硼酸; 二是来源于副反应的杂质, 如磺酸酯、卤代烷、乙酰胺。

GTI的来源复杂<sup>[5]</sup>, 药物生产过程中的起始原料、试剂、反应物、催化剂、溶剂、中间体、副产物均可能由于被污染、降解或原辅料相互反应引起GTI的产生。在药物上市后由于存放运输不当也会引起水解、氧化、分解、异构化、聚合、潮解、发霉而产生GTI。

2007年, 罗氏制药生产的奈非那韦甲磺酸盐由于有甲磺酸乙酯这种GTI, 造成6名患者DNA序列异常<sup>[6]</sup>。该事件之后, 各国的法规机构都对GTI有了更加明确的要求<sup>[7]</sup>。欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 于2006年颁布了《GTI限度指南》, 首次提出了毒理学关注阈值 (threshold of toxicological concern, TTC) 的概念, 并通过计算将TTC设定为1.5 μg/d。但是对于短期暴露的患者来

收稿日期: 2019-05-16

第一作者: 刘爱赞 (1990—), 女, 硕士, 新药、仿制药研发。E-mail: liuay@tjipr.com

\*通信作者: 吴 赞 (1979—), 女, 副研究员, 硕士, 新药、仿制药研发。Tel: (022) 23006883 E-mail: wuy@tjipr.com

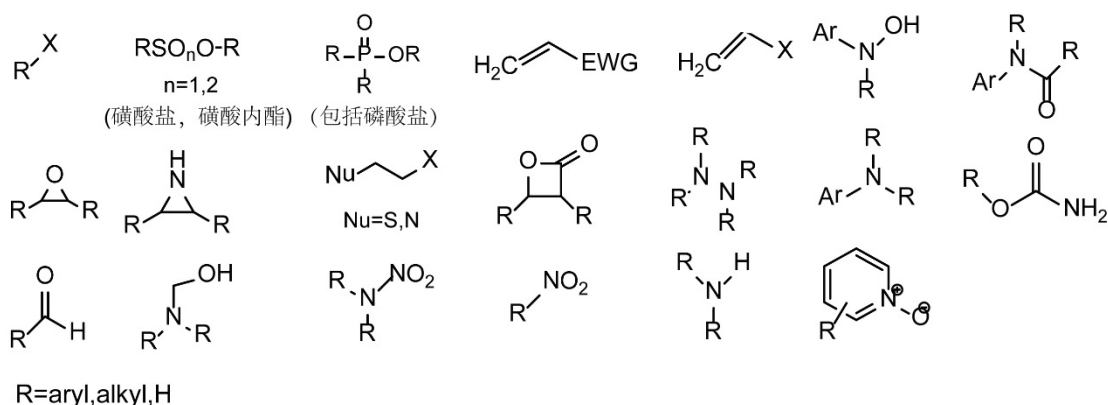


图1 一些常见的可能带有基因毒性警示结构的官能团

Fig. 1 Some common functional groups that may have genotoxicity warning structure

说, 1.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  作为 GTI 的控制限度过于保守。为此, EMA 和美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 均提出了阶段化 TTC 来确立临床研发中不同用药周期的药中 GTI 的可接受摄入量, 见表 1。

表1 EMA、FDA对GTI的控制限度  
Table 1 Control limit of EMEA and FDA to GTI

控制限度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1})$	EMA 指标	FDA 指标
120	单剂量	< 14 d
60	$\leq 1$ 个月	14 d ~ 1 个月
20	$\leq 3$ 个月	1 个月 ~ 3 个月
10	$\leq 6$ 个月	3 个月 ~ 6 个月
5	$\leq 12$ 个月	6 个月 ~ 12 个月
1.5	\	> 12 个月

### 1 肼类GTI的特性

肼、酰肼和腙 (结构见图2) 具有基因毒性警示结构, 是一种已知的 GTI, 具有潜在的致癌性<sup>[1]</sup>。研究表明, 肼类化合物是烷基化试剂, 其在体内代谢活化形成碳正离子、碳中心自由基和氧中心自由基等高活性的甲基中间体, 体内产生的甲基与 DNA 碱基发生烷基化反应, 生成加合物, 引起 DNA 损伤和基因突变<sup>[8]</sup>。

肼类 GTI 虽然具有致癌性, 但是由于其具有较强的亲核性, 是一种高活性的还原性碱, 其在药理学中广泛作为合成某些药物的起始化合物。例如, 邻氟苯甲醛、邻甲基肼可以用肼缩合制备吡达唑<sup>[9]</sup>; 以  $\alpha, \beta$ -不饱和酮和肼衍生物为起始原料合成氢化吡啶衍生物<sup>[10]</sup>; 抗肿瘤药物舒尼替尼、抗精神病药物齐拉西酮也使用肼作为还原剂<sup>[11]</sup>; 肼作为中间体通过酰肼的形成生产抗糖尿病药物西格列汀、抗结核药异烟肼, 通过肼解作用生产抗艾滋药物沙奎那韦、

莫非吉兰, 通过亲电加成作用生产舒立托唑, 通过杂环化生产西地那非<sup>[12]</sup>。值得注意的是, 肼还是绿色还原剂, 反应生成的副产物只有氮气和水的。另外, 肼是抗高血压药物肼嗪、抗结核药物异烟肼、苯并肼和异碳氧肼的主要水解降解产物<sup>[13]</sup>。此外, 肼本身作为硫酸盐, 还可以作为药物治疗肺结核、镰状细胞贫血症和各种慢性疾病<sup>[14]</sup>。

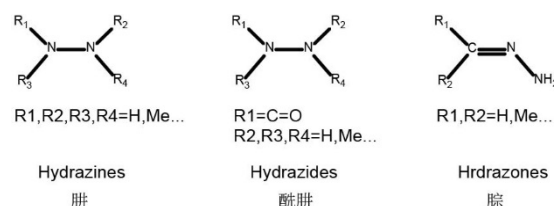


图2 肼、酰肼、腙的结构

Fig. 2 Structure of hydrazine, hydrazide and hydrazone

### 2 肼类GTI的分析难点

肼类化合物作为 GTI, 不仅是一种较为常见的中间体, 而且是一种常见药物的降解产物, 因此研究者们尝试了多种分析方法来分析肼类 GTI。但是, 肼类 GTI 的分析具有挑战性。第一, 肼极性大, 相对分子质量低, 无发色团, 没有碳原子<sup>[15]</sup>; 第二, 肼类 GTI 的反应活性较强, 易发生副反应而造成假阳性的结果; 第三, 肼类 GTI 的碱性较强, 容易与色谱柱上的硅氧基发生相互作用, 造成峰形拖尾, 因此对于色谱柱的选择有着较高的要求; 第四, 药物中 GTI 的允许含量在低  $1 \times 10^{-6}$  区域<sup>[16]</sup>。因此在原料药或药物制剂赋形剂的存在下, 开发和验证在  $1 \times 10^{-6}$  水平下准确测定肼类 GTI 的方法可能具有挑战性。

### 3 肼类GTI的分析方法

#### 3.1 直接法

肼是一种弱碱, pKa 在 6~8, 在酸性溶液中会电离。当使用酸性洗脱剂提供肼的质子化作用时, 肼

可以通过离子色谱法在保留因子高于反相高效液相色谱(RP-HPLC)和良好选择性的阳离子交换剂上直接分离。Lakshmi等<sup>[17]</sup>采用离子交换色谱法-电导检测器测定西那普利中残留胍,定量限4.63 μg/mL。Kean等<sup>[18]</sup>以卡比多巴分析为例,将其与采用HPLC和薄层色谱法进行药物分析的官方方法进行比较,3种方法的测定结果相似,但离子色谱法可以直接测定,操作简单。然而,常规的离子色谱法直接测定药物中的胍类GTI存在检测灵敏度不高的问题,因此需要采取其他方法进行测定。

### 3.2 衍生化法

衍生化法是测定胍类GTI的主要方法。胍类GTI反应性较高,又由于原料药(API)本身和其中的杂质导致样品的基质复杂<sup>[19]</sup>,有时直接定量较为困难。因此,基于化学衍生的方法更适合于胍类GTI的量化。苯甲醛具有高的反应性,可以与活性较低的胍类GTI发生衍生化反应,是常用的衍生化试剂。Cui等<sup>[20]</sup>选苯甲醛为衍生化试剂,将胍和乙酰胍转化为1,2-二苄基亚苯基胍和亚苄基乙酰胍,同时分析药物基质中的胍和乙酰胍,但样品在衍生化制备时,基质效应大,衍生化试剂会与样品中的其他物种发生反应,导致假阳性反应,或者衍生化反应可能无法继续完成,导致假阴性反应<sup>[21]</sup>,因此需要采取相应的方式来控制。由于样品基质中存在API的反离子,加入苯甲酸酸化衍生化反应介质,在原料药盐存在和不存在的条件下,化学衍生化反应速率相似,回收率数据更为准确。最终,使用LC-SIMS在痕量水平测定胍和乙酰胍的含量,胍和乙酰胍的检测下限分别为0.1、1 μg/mL。

紫外检测器在实验室中更为普遍,因此开发HPLC-UV的方法很有必要。但胍没有发色团,因此,选择适当的衍生化试剂非常重要。衍生产物必须具有较强的紫外吸收,以满足高灵敏度需求。此外,衍生产物的最大吸收波长必须远离药物及其相关基质的吸收区域,以达到分离的要求。Wang等<sup>[22]</sup>选用2-羟基-1-萘甲醛为衍生化试剂,将发色团连接到胍上,所得的氢化产物在可见光范围内波长406/424 nm处具有最大的紫外吸收。由于大多数药物和杂质的紫外吸收率在190~380 nm,因此基质的干扰最小,得到了合适的选择性。检测限为0.25 μg/g API。

微量分析中的基质效应增大,导致灵敏度降低,回收率下降,分析物不稳定。因此,在分析胍类GTI时,要注意样品的制备,选择合适的色谱柱使

API和杂质分开,并获得较短的分析时间。Reddy等<sup>[23]</sup>采用LC-SRM-MS/MS法同时测定了塞来昔布原料药中4-氨基磺酰基苯胍盐酸盐(SHH)和4-(4-甲基苯乙酮)磺胺基苯胍盐酸盐(MAP)这两种胍类GTI。塞来昔布和杂质在甲醇中均具有良好的溶解性,作者使用甲醇作为稀释剂;选用C<sub>18</sub>柱,并在流动相中加适量乙酸铵来掩蔽固定相表面的硅醇基的活性,两种胍类GTI与API分离,响应和峰型均良好。结果显示,0.06×10<sup>-6</sup>~7.5×10<sup>-6</sup>线性关系良好,检出限和定量限分别为0.02×10<sup>-6</sup>和0.06×10<sup>-6</sup>,在0.06×10<sup>-6</sup>~3.0×10<sup>-6</sup>的浓度范围,回收率达到95.0%至104.0%。该方法特异性、线性、准确性、精密性和耐用性良好。并将所建立的方法应用于塞来昔布3个制剂批次中SHH和MAP-PGI的测定。

由于GTI要限制在1×10<sup>-6</sup>水平,其所需浓度与原料药的量相差5~6个数量级。为了在1×10<sup>-6</sup>水平测定杂质,需要大量样品,但是大量的原料药会使色谱系统超载,分析效率降低。因此,在样品制备过程中,原料药的用量需要减少,而待测GTI的用量应保持不变。Tamas等<sup>[24]</sup>选用苯甲醛将杂质衍生化为强紫外吸收的苯甲醛嗪,采用液相色谱法测定别嘌醇中的胍。采用C<sub>18</sub>固相萃取制备样品,由于别嘌醇比苯甲醛嗪的极性大,因此很容易从固相萃取中洗脱出来,从而去除大量的别嘌醇。检测限低于1×10<sup>-7</sup>。这种方法适用于其他比苯甲醛嗪更具极性、在水溶液中高浓度可溶的原料药。

对于不含碳的胍类GTI,极性大,需要经过衍生化增加挥发性降低沸点来满足气相色谱(GC)法的分析要求。有文献采用苯甲醛作为衍生化试剂,用GC法测定胍嗪和异烟胍中的胍。但是研究员们常用丙酮或丙酮-d<sub>6</sub>作为衍生化试剂<sup>[25]</sup>。这是因为胍、甲基胍是很强的还原剂,与丙酮以SN<sub>2</sub>亲核取代反应进行,反应迅速。有文献表明,胍和丙酮在水溶剂中的定量反应在2 min内完成<sup>[26]</sup>。所得的衍生产物丙酮嗪、丙酮甲酰胍稳定且具有挥发性,适合于GC分析。此外,在分析药物中的GTI时,基质非常复杂,因此,研究员们常选用顶空气相色谱(HS-GC)来分析。HS-GC只取气相部分进行分析,大大减少了样品基质对分析的干扰,采用气体进样,分析速度快,灵敏度高,还可以防止非挥发性样品基质进入气相色谱系统,减小样品基质对仪器的污染<sup>[27]</sup>。

## 4 结语

GTI来源广泛,关于GTI的事件不时出现,严重



威胁着人们的用药安全。药物监管部门与药物研发机构高度重视GTI的控制。作为一类重要的GTI,肼是一种常见的中间体,而且是常见药物的降解产物。肼的极性大,分子量低,无发色团,性质活泼,碱性较强,实现高灵敏度的痕量分析肼类基因毒性极具挑战。本文重点介绍了肼类GTI的分析难点以及分析方法,为肼类GTI检测的方法建立提供了重要参考。

#### 参考文献

- [1] Channon R B, Newland J C, Bristow A W T, et al. Selective detection of hydrazine in the presence of excess electrochemically active pharmaceutical ingredients using boron doped diamond metal nanoparticle functionalised electrodes [J]. *Electroanalysis*, 2013, 25 (12): 2613-2619.
- [2] Snodin D J. Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification [J]. *Org Process Res Dev*, 2010, 14(4): 960-976.
- [3] 阮晓玲. 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展 [J]. *中国药科大学学报(中文版)*, 2016, 47(3): 267-274.
- [4] Szekely G, Amores de Sousa M C, Gil M, et al. Genotoxic impurities in pharmaceutical manufacturing: source, regulation, and mitigation [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(16): 8182-8229.
- [5] Bhavani K G, Krishna K B M, Srinivasu N, et al. Determination of Genotoxic impurity in Atazanavir sulphate drug substance by LC-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 132: 156-158.
- [6] Thayer A M. Genotoxic impurities: Faced with new guidelines that many find constraining, pharmaceutical manufacturers are seeking ways to avoid or reduce harmful contaminants in drugs [J]. *Chem Eng News*, 2010, 88 (39): 16-26.
- [7] 胡向青, 郝福, 李志刚, 等. 药物中杂质及有害物质控制限度的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(9): 953-964.
- [8] Reddy A V B, Jaafar J, Umar K, et al. Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: A comprehensive review [J]. *J Sep Sci.*, 2015, 38(5): 764-779.
- [9] Lukin K, Hsu M C, Fernando D, et al. New practical synthesis of indazoles via condensation of *o*-fluorobenzaldehydes and their *o*-methyloximes with hydrazine [J]. *J Org Chem*, 2006, 71(21): 8166-8172.
- [10] Nakhai A, Bergman J. Synthesis of hydrogenated indazole derivatives starting with alpha,beta-unsaturated ketones and hydrazine derivatives [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(11): 2298-2306.
- [11] 张 霁, 张英俊, 聂 颺. 药物研发中GTI的控制策略与方法探索进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2018, 49(9): 1203-1220.
- [12] Elder D P, Snodin D, Teasdale A. Control and analysis of hydrazine, hydrazides and hydrazones - Genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs) and drug products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54 (5): 900-910.
- [13] Khan M, Kumar S, Jayasree K, et al. Simultaneous Trace Level Determination of Potentially Genotoxic Hydrazine, Methylhydrazine and Alkylamines in Pharmaceutical Substances by CE Using Indirect Photometric Detection [J]. *Chromatographia*, 2013, 76(13-14): 801-809.
- [14] Von Burg R, Stout T. Hydrazine [J]. *J Appl Toxicol*, 1991, 11: 447-450.
- [15] Channon R B, Joseph M B, Bitziou E, et al. Electrochemical Flow Injection Analysis of Hydrazine in an Excess of an Active Pharmaceutical Ingredient: Achieving Pharmaceutical Detection Limits Electrochemically [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(19): 10064-10071.
- [16] Kean T, Miller J H, Skellern G G, et al. Hydrazine in pharmaceutical substances [J]. *Pharmeur Sci Notes*, 2006, 2: 23-33.
- [17] Lakshmi K J, Devi P R, Mukkanti K. Quantitative determination of residual hydrazine content in cilazapril by ion chromatography [J]. *Orient J Chem*, 2010, 26( 3): 1001-1006.
- [18] Kean T, Miller J H, Skellern G G, et al. Acceptance criteria for levels of hydrazine in substances for pharmaceutical use and analytical methods for its determination [J]. *Pharm Sci Notes*, 2006, 2: 23-33.
- [19] Sun M, Bai L, Liu D Q. A generic approach for the determination of trace hydrazine in drug substances using in situ derivatization-headspace GC-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2): 529-533.
- [20] Cui L, Jiang K N, Liu D Q, et al. Simultaneous quantitation of trace level hydrazine and acetohydrazide in pharmaceuticals by benzaldehyde derivatization with sample 'matrix matching' followed by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1462: 73-79.
- [21] An J G, Sun M J, Bai L, et al. A practical derivatization LC/MS approach for determination of trace level alkyl sulfonates and dialkyl sulfates genotoxic impurities in drug substances [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 1006-1010.

- [22] Wang J, Yang S, Zhang K. A simple and sensitive method to analyze genotoxic impurity hydrazine in pharmaceutical materials [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 126: 141-147.
- [23] Reddy V B, Venugopal N, Madhavi G. A selective and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of two potential genotoxic impurities in celecoxib [J]. *J Anal Sci Technol*, 2014, 5: 1-8.
- [24] Tamas K, Wachter-Kiss E, Kormany R. Hydrazine determination in allopurinol using derivatization and SPE for sample preparation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 152: 25-30.
- [25] Kumar A, Zhang K, Wigman L. Analytical Technologies for genotoxic impurities in pharmaceutical compounds [J]. *LCGcC North Am*, 2015, 33(5): 344-359.
- [26] Selim S, Warner C R. Residue determination of hydrazine in water by derivatization and gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1978, 166(2): 507-511.
- [27] Ho TD, Yehl PM, Chetwyn NP, et al. Determination of trace level genotoxic impurities in small molecule drug substances using conventional headspace gas chromatography with contemporary ionic liquid diluents and electron capture detection [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1361: 217-228.