

色谱-质谱联用技术用于遗传毒性杂质检测的研究进展

彭诗雁¹, 陈 华^{2*}, 尹 婕²

1. 中国药科大学 药学院, 江苏 南京 211198

2. 中国食品药品检定研究院 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629

摘要: 遗传毒性杂质种类繁多且通常痕量存在于药物中, 而色谱-质谱联用技术具有相对更高的灵敏度和选择性, 极适用于分析药物中的遗传毒性杂质。主要介绍了如何根据遗传毒性杂质的极性、挥发性、热不稳定性等理化性质建立合适的色谱-质谱联用技术, 并综述了气相色谱、液相色谱、超高液相色谱、亲水性相互作用色谱、超临界流体色谱、毛细管电泳色谱6种色谱技术与质谱联用在遗传毒性杂质(如亚硝胺类、磺胺酯类、卤代烷烃类等)检测中的研究进展, 从而为建立科学合理的遗传毒性杂质检测方法提供参考。

关键词: 遗传毒性杂质; 色谱-质谱联用技术; 气相色谱; 液相色谱; 超高液相色谱; 亲水性相互作用色谱; 超临界流体色谱; 毛细管电泳色谱

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2583-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.025

Research progress of chromatography-mass spectrometry in detection of genotoxic impurities

PENG Shiyan¹, CHEN Hua², YIN Jie²

1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Abstract: The genotoxic impurities are various and usually trace in drugs, while the chromatographic-mass spectrometry technique has relatively high sensitivity and selectivity, which is extremely suitable for the analysis of genotoxic impurities in drugs. This article mainly introduces how to establish a suitable chromatographic-mass spectrometry technique according to the physicochemical properties of genotoxic impurities such as polarity, volatility and thermal instability, as well as the research progress of gas chromatography, high performance liquid chromatography, ultra performance liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, capillary electrophoresis chromatography combined with mass spectrometry in the detection of genotoxic impurities such as nitrosamines, sulfonates, halogenated alkanes, etc., so as to provide a reference for the establishment of scientific and reasonable detection methods of genotoxic impurities.

Key words: genotoxic impurities; chromatography-mass spectrometry; gas chromatography; liquid chromatography; application; ultra performance liquid chromatography; hydrophilic interaction liquid chromatography; supercritical fluid chromatography; capillary electrophoresis

遗传毒性杂质(GTIs)在极微量条件下即可诱发基因突变和(或)染色体损伤^[1]。而潜在遗传毒性杂质(PGIs)通常含有与致突变或致癌特性相关的化学结构,即警示结构(SAs),一般情况下也作为GTIs进行研究。自2007年起,已在维拉塞特、缬沙坦原料(API)和氯沙坦钾片等药物中陆续检测到GTIs,一系列GTIs事件使得国内外药品监管机构均

加强了对药物中GTIs的研究和监管,并相继发布了GTIs的相关草案和指南^[2]。其中,《中国药典》2020年版新增了《遗传毒性杂质控制指导原则》,采用5分类系统对GTIs进行分类并以阶段化毒理学关注阈值(TTC)控制未经研究、但可能具致癌或其他毒性作用的化合物^[3]。由于GTIs种类繁多且一般痕量存在于药物中,而相对于传统分析方法,色谱技

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室学科建设资助项目(1030050090124)

第一作者: 彭诗雁(1998—),女,硕士研究生,研究方向为药物质量与过程控制。E-mail: pengsy810@163.com

*通信作者: 陈 华,主任药师,研究方向为药物分析。E-mail: chenhu@nifdc.org.cn

术与质谱检测器(MSD)联用具有可提供化合物结构信息、分析速度快及灵敏度更高等优点^[4],可为分析药物中GTIs提供更多的可能,故本文主要介绍了如何根据GTIs的理化性质建立合适的色谱-质谱(MS)联用技术以及气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、超高压液相色谱(UPLC)等6种色谱技术与MS联用在亚硝胺类、磺酸酯类、卤代烷烃类等GTIs检测中的研究,为建立合理的GTIs检测方法提供参考。

1 色谱-MS联用技术的建立

一般可根据样品是否具有挥发性来建立合适的检测方法。目前,研究人员通常采用GC与MS联用检测挥发性GTIs,而HPLC与MS联用常用于检测不易挥发及热不稳定性的GTIs。如在美国食品药品监督管理局(FDA)发布的用于检测药物中亚硝胺类杂质的参考方法中体现了2种方法建立的思路。1种是采用GC-MS/MS法进行检测,其可根据样品的溶解性选择直接进样或顶空进样^[5-9]。但由于*N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸(NMBA)为酸类物质,需经衍生化处理后方可采用GC进行色谱分离,故而FDA提供了可用于同时检测NMBA及血管紧张素II受体阻滞剂中可能存在其他5种亚硝胺杂质的HPLC与高分辨MS联用的检测方法^[10]。同时,FDA发现加热样品会使雷尼替丁降解,产生*N*-亚硝基二甲胺(NDMA),故而FDA发布了2种HPLC-MS/MS法检测雷尼替丁中的亚硝胺类杂质,以排除检测结果的假阳性^[11-12]。

此外,超临界流体色谱(SFC)作为以超临界流体为流动相的色谱分析方法,其亦可用于分析遇水不稳定、热不稳定及高分子量化合物,故SFC-MS可作为GC-MS和HPLC-MS的补充检测手段^[13]。与此同时,由于UPLC、亲水性相互作用色谱(HILIC)及毛细管电泳(CE)等分离技术各具特色,亦常与MS联用于检测药物中的GTIs。其中,由于相对

于正相HPLC所采用的非极性流动相,HILIC中的水-有机流动相更有利于溶解极性和亲水性化合物,故HILIC-MS极适用于亲水性GTIs的分析,笔者总结了部分色谱-MS联用技术的检测特点,见表1。

而针对基质复杂、高活性及稳定性较差的GTIs,亦可采用合适的样品前处理技术以提高分析方法的选择性、分离效果和灵敏度。如由于采用反相HPLC-MS/MS分析尿液中的可替宁和致癌物质4-(甲基亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-1-丁醇(NNAL)时难以消除基质效应,故Luo等^[14]采用PRiME HLB固相萃取-HILIC-MS/MS法来检测尿液中的可替宁和NNAL。结果表明,此法可有效去除基质影响,NNAL和可替宁在 $5.00\sim 3.00\times 10^3\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.200\sim 400.000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好,且NNAL的检出限(LOD)优于其他文献报道的方法。Zhao等^[15]自制了共价有机纳米球(CONs)作为固相微萃取的纤维涂层,采用1-碘辛烷、1-氯苯、1-溴代癸烷、1,2-二氯苯、1-溴辛烷、1-氯己烷和1,8-二溴辛烷、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯此9种GTIs评价该涂层性能,结果表明CONs可用于预浓缩药物中的GTIs,且CONs提高了纤维的富集性能。之后采用该固相微萃取涂层,以GC-MS/MS法检测卡培他滨和甲磺酸伊马替尼样品中GTIs。结果表明,与先前研究报道相比,此法提取时间短、有机溶剂用量低,具有较好的LOD、线性和回收率。3-氯羰基-1-甲磺酰-2-咪唑啉酮(CMI)是用于合成美洛西林原料的关键中间体,其含有酰氯遗传毒性警示结构。但酰氯具有高反应活性,故Chen等^[16]将CMI酯化为3-(甲酰基)-2-氧代咪唑啉-1-羧酸甲酯,采用UPLC-MS/MS对其进行痕量检测。

总之,已有多种色谱-MS联用技术运用到各领域的相关研究中,而GTIs具有种类繁多、活性高的特点,故应根据待测GTIs的理化性质选择合适的样品制备方法、色谱分离方法等,以建立满足相应分

表1 部分色谱-MS联用技术的检测特点

Table 1 Detection characteristics of some chromatographic-mass spectrometry techniques

色谱-MS联用技术	检测特点
GC-MS	适用于检测具有挥发性、热稳定的样品,可根据样品溶解度选择直接进样或顶空进样
HPLC-MS	适用于检测热不稳定、挥发性较差的样品
UPLC-MS	样品检测适用范围类似于HPLC-MS,但其具有更高的分析效率和灵敏度
HILIC-MS	流动相富含极性有机溶剂,该技术极适用于亲水性化合物的分析
SFC-MS	SFC兼顾GC和LC的特点,该技术既可用于分析遇水不稳定的化合物,亦可用于分析热不稳定性化合物
CE-MS	CE具有多种分离模式,适用于检测离子型和中性化合物

析要求的色谱-MS联用技术。

2 色谱-MS联用技术在GTIs检测的应用

基于色谱-MS联用技术的诸多优点,目前国外药典现行版所收载品种已有采用该技术来检测药物中的GTIs,如欧洲药典(EP)中采用GC-MS/MS分析原料中的磺酸(甲、乙、异丙)酯类,美国药典(USP)和EP均采用LC-MS/MS、GC-MS/MS对亚硝胺类杂质进行分析。同时,亦已有较多研究报道采用GC-MS、HPLC-MS、UPLC-MS、HILIC-MS等技术检测药物中的GTIs或PGIs,故下文对相关联用技术在GTIs/PGIs检测中的应用进行介绍。

2.1 GC-MS

GC是以气体为流动相,根据混合化合物沸点及理化性质不同而对其进行分离的色谱法,可分为一维气相色谱(1DGC)和多维气相色谱(MDGC),而二维气相色谱(2DGC)是MDGC最为常见的。

2.1.1 1DGC-MS 1DGC通常仅采用1根色谱柱进行化合物分析,目前大多数气相色谱仪为一维色谱分析仪。基于MS的高灵敏度和选择性,GC常与MS联用于检测沸点较低、热稳定性较好和遇水不稳定的GTIs,目前已有许多关于GC-MS用于GTIs检测的报道。Uppala等^[17]建立了高灵敏度、高选择性的GCHS-MS方法定量分析青霉素中的PGIs羟胺。此法选用DB-624(30 m×0.32 mm, 1.8 μm)色谱柱,进样口温度为250 °C,分流比5:1,以氦气为载气进行程序升温,体积流量2 mL·min⁻¹。顶空条件为:100 °C平衡10 min,定量环和输送线温度分别为150 °C和170 °C,进样时间0.1 min。通过加入吡啶、丙酮对羟胺进行衍生化处理后,MS采用单离子检测扫描(SIM)模式,选用荷质比(*m/z*)73进行化合物检测。结果表明,此方法测得的衍生化产物丙酮肟的LOD和定量限(LOQ)分别为2、5 ng·mL⁻¹,说明此法具有良好的灵敏性,且经验证,其准确度、精密度、线性等均符合规定。Liu等^[18]建立了GC-MS/MS用于定量分析原料中9种痕量常见烷基磺酸酯类GTIs的方法,并成功应用于卡培他滨和甲磺酸伊马替尼中此9种GTIs的测定。选用HP-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)色谱柱,将进样口温度设为200 °C,分流比20:1,以氦气为载气进行程序升温,体积流量1.2 mL·min⁻¹,进样量1 μL。采用多反应监测(MRM)模式对9种GTIs进行定量,以避免每个分析物的噪声重叠,从而提高检测方法的灵敏度和选择性。结果表明,9种GTIs的LOQ在0.10~1.05 ng·mL⁻¹,远低于先前已报道的其他方法的定量

限。Jadhav等^[19]建立了GC-MS/MS法测定盐酸文拉法辛中6种PGIs: 甲烷磺酸甲酯、甲烷磺酸乙酯、甲烷磺酸异丙酯、邻苯甲醚、间茴香酰氟化物和对茴香酰氟化物。此法选用DB-624(30 m×0.25 mm, 1.4 μm)色谱柱,进样口温度为180 °C,采用不分流进样模式,以氦气为载气进行程序升温。MS选择基于时间相关性反应监测(*t*-SRM)模式,此模式可通过降低二级四极杆分析仪的噪声和1次对单个跃迁的保留依赖扫描来提高检测方法的灵敏度和选择性,显示了相对于传统SIM模式的优越性。同时,结果表明该法能够在4.5~24.1 ng·g⁻¹内定量分析烷基磺酸盐和茴香氟化物。Zhong等^[20]开发了GC-MS/MS法用于测定醋酸阿比特龙中5种PGIs,即氯甲烷、2-氯丙烷、2-溴丙烷、4-氯-1-丁醇和硫酸二乙酯。选用DB-1701(60 m×0.32 mm, 1 μm)色谱柱,进样口温度220 °C,设置分流比20:1,以氦气为载气进行程序升温。MS则在电喷雾电离正离子(ESI⁺)模式下,选用MRM模式对5种PGIs进行定量分析。经验证,此法可用于定量检测原料和制剂中的5种痕量PGIs。

2.1.2 2DGC-MS 与1DGC相比,MDGC具有更高的分辨率、分析容量和灵敏度,可降低基质效应,简化复杂样品的处理过程,以避免样品损失等优点^[21]。与1DGC不同,2DGC主要通过将机制不同且相互独立的2根色谱柱串联以进行化合物分析。

2DGC与MS联用会进一步提高检测方法灵敏度,极适用于分析微量物质,为药物中GTIs检测提供了新的思路。对2-溴乙醇、2-碘乙醇、4-氯-1-丁醇、2-(2-氯乙氧基)乙醇和11-溴-十一醇进行衍生化处理后,David等^[22]采用中心切割二维GC与MS联用检测卡马西平中的卤醇衍生物和PGIs迈克尔反应受体(肉桂腈和3-乙氧基-2-环己酮)。首先使用非极性柱HP-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)进行一维分离,进样口温度设为250 °C,采用不分流进样模式,以氦气为载气进行程序升温,体积流量1 mL·min⁻¹,进样量为1 μL。后将含有目标分析物的流经中心切割转移至第2根极性毛细管柱DB-17MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)上,这使得API、溶剂和衍生化剂不被引入到第2根柱或MS探测器中,避免了污染、柱降解问题。其中,第2根毛细管柱被安装在低热质量烘箱(LTM)中,可独立设定升温程序,更有利于优化目标分析物峰的分离、检测条件。实验结果表明,经中心切割及优化第2根毛细管柱温控条件后,所有目标分析物峰均可有效分离且可

排除易共洗脱杂质的影响。经过验证,此法具有较高的灵敏度和重复性。

2.2 HPLC-MS

HPLC是高效、操作自动化、选择性好的现代分析技术,虽然紫外检测器、二极管阵列检测器、蒸发光散射检测器等常用检测器目前已广泛应用于药物分析领域,但难以满足研究人员对定量分析痕量GTIs的需求,故常选择将HPLC与灵敏度更高的MS检测器联用以检测GTIs。Mullangi等^[23]建立了有效的HPLC-MS/MS方法定量分析伊布鲁替尼药物中的PGI——4-苯氧苯基硼酸。此法选用Atlantis T3(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm)为色谱柱,以10 mmol·L⁻¹甲酸铵缓冲液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱,柱温40 °C,进样量20 μL,体积流量1 mL·min⁻¹(待分析物进入MSD前,体积流量降低至0.5 mL·min⁻¹)。MS采用ESI负离子模式,选用 m/z 231.02在SIM模式下对目标PGI进行检测。结果表明,该杂质的LOD和LOQ分别为0.134、0.45 μg·mL⁻¹,且该方法的精密度、准确度、线性、耐用性等均符合规定。由于在合成艾氟康唑过程中会产生2种PGIs:2-[(1R)-1-[2R]-2-(2,4-二氟苯基)-2-环氧乙烷基]乙氧基]四氢-2H-吡喃(IMPA)和(2R,3R)-3-2,4-二氟苯基)-3-羟基-4-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丁烷-2-基甲磺酸酯(IMPB),故Uppala等^[24]建立了一种HPLC-MS/MS方法来检测IMPA和IMPB,选用Agilent Zorbax SB C₁₈(100 mm×4.6 mm, 3.5 μm)为色谱柱,流动相为10 mmol·L⁻¹醋酸铵缓冲液-乙腈(40:60),体积流量为0.6 mL·min⁻¹,并将进样量设为10 μL。同时,作者使用三重四极杆MS仪分别采用大气压化学电离源(APCI)和ESI 2种离子源对2种PGIs进行分析,发现与APCI相比,IMPA和IMPB在ESI⁺模式下可显示出良好的电离效果,故最终在ESI⁺模式下,分别选用离子对 m/z 285.2/85.1、348.1/252.1对IMPA和IMPB进行MRM模式监测分析。结果表明,IMPA的LOD和LOQ分别为20、60 ng·mL⁻¹,IMPB的LOD和LOQ分别为12、20 ng·mL⁻¹,表明此方法具有较高的灵敏度。Wang等^[25]建立了HPLC-MS/MS方法来检测甲磺酸伊马替尼原料、片剂和胶囊中的2种GTIs:*N*-(5-氨基-2-甲苯基)-4-(3-吡啶基)-2-氨基嘧啶(IMA)和*N*-(2-甲基-5-硝基苯基)-4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-胺(IMN)。此法建立过程中最大的难点在于灵敏度的提高,通过筛选色谱柱、流动相种类和pH等条件,最终选择Waters Acquity UPLC HSS T3

C₁₈(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱,以0.02 mol·L⁻¹甲酸铵缓冲液(甲酸调节pH至3.4)和0.05%甲酸乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,柱温40 °C,体积流量0.4 mL·min⁻¹,将进样量设为5 μL。该法MS采用ESI⁺模式及MRM监测模式,并选择IMA母离子为 m/z 278,子离子为 m/z 106、262,IMN母离子为 m/z 308,子离子为 m/z 262、247进行检测。结果表明,IMA在甲磺酸伊马替尼原料、片剂和胶囊中的LOD分别为0.003 9、0.004 3、0.004 4 ng·mL⁻¹,IMN在甲磺酸伊马替尼原料、片剂和胶囊中的LOD分别为0.003 4、0.003 5、0.003 6 ng·mL⁻¹,此法具有较好的灵敏度。泮托拉唑钠起始原料5-二氟甲氧基-2-巯基-1H-苯并咪唑(DMBZ)的合成过程中会产生6种PGIs,故Chen等^[26]开发了HPLC-ESI-MS法来测定DMBZ中的PGIs。作者选用Columbia Alltima C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为0.005 mol·L⁻¹醋酸铵水溶液(含0.1%甲酸)-甲醇(60:40),并将柱温设为40 °C,体积流量设为0.5 mL·min⁻¹,进样量设为10 μL,MS则采用ESI⁺模式及MRM监测模式对6种PGIs进行检测。结果表明,此法可在10 ng·mL⁻¹水平上对上述6种PGIs进行检测。

2.3 UPLC-MS

多数液相色谱柱填充颗粒粒径通常为2.5~5 μm,而UPLC一般使用填充颗粒粒径小于2 μm的固定相,故相对于传统的HPLC,UPLC峰容量是传统的2倍以上,灵敏度提高了3~5倍,可以在4.14×10⁷~10.34×10⁷ Pa的压力范围内工作,分析速度提高了近10倍^[27]。同时,UPLC另1个显著优点是:通过保持相同的液相条件(如温度和洗脱液)HPLC可转换为UPLC使用,从而提高分离效能、增加分析通量、减少分析时间等,且UPLC的溶剂用量可显著减少80%^[28]。

目前,已将UPLC-MS联用技术逐渐应用于痕量GTIs的检测。如欧洲药品监督管理局(EDQM)发布了UPLC-APCI-MS/MS法检测雷尼替丁及其薄膜衣片中的NDMA^[29]。此法选用色谱柱HSS T3 C₁₈(100 mm×3 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相选用0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B)进行梯度洗脱,柱温30 °C,体积流量0.5 mL·min⁻¹,进样量20 μL。MS则采用APCI离子源,在MRM模式下选用离子对 m/z 75/43、81/46分别定量分析NDMA及其内标物。结果表明该法LOD为0.5 ng·mL⁻¹,LOQ为1.2 ng·mL⁻¹,具有较好的灵敏度。Jireš等^[30]采用UPLC-MS/MS

同时检测洛沙坦、坎地沙坦、厄贝沙坦、缬沙坦和奥美沙坦5种含四氮唑沙坦类药物中的2种PGIs: 4'-(叠氮甲基)-[1,1'-联苯]-2-腈(GTI-azide-1)和5-(4'-(叠氮甲基)-[1,1'-联苯]-2-基)-1*H*-四唑(GTI-azide-2)。选用Waters Acquity UPLC BEH Shield RP₁₈ 1.7 μm 色谱柱,以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱,柱温为30℃,体积流量及进样量分别为0.4 mL·min⁻¹、5 μL。此法MS采用加热电喷雾电离(HESI)正离子模式对GTI-azide-1和GTI-azide-2进行MRM模式扫描。结果,在短时间内(11 min)即可完成对2种杂质的检测,且可在低于标准限度的1/10的水平上对2种GTIs进行准确定量,具有高度灵敏性。Wolff等^[31]建立了UPLC-MS/MS分析方法用于检测甲磺酸伊马替尼片中的2种GTIs:*N*-(2-甲基-5-氨基苯基)-4-(3-吡啶基)-2-嘧啶胺(Imp1)和*N*-[4-甲基-3-(4-甲基-3-基-2-吡啶-2-氨基)-苯基]-4-氯甲基苯甲酰胺(Imp2)。作者选用Waters Acquity BEH C₁₈(150 mm×2.1 mm,1.7 μm)色谱柱,以0.063%甲酸铵水溶液(A)-0.05%甲酸乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,柱温40℃,体积流量0.2 mL·min⁻¹。同时,MS在ESI⁺模式下,分别以离子对*m/z* 278/262和*m/z* 430/153对Imp和Imp进行定量分析。结果表明,此法运行时间仅需10 min,大大提高了GTIs检测效率,且相对于此前所报道的反相HPLC法,此法Imp1和Imp2的LOD分别为0.20、0.13 ng·mL⁻¹,具有更高的灵敏度。Fu等^[32]建立了反相UPLC结合高分辨率MS的分析方法用于检测MLN9708中的GTI:2,5-二氯苯甲酰氯(DCBC)。由于在目标检测水平下,DCBC可与环境中的微量水迅速反应,得到与DCBC具有相同萃取离子色谱信号的水解产物2,5-二氯苯甲酸(DCBA),且MLN9708原料本身含有微量水分,故采用替代策略,将DCBC水解为DCBA,提供稳定可靠的检测靶点,检测信号为DCBC和DCBA之和。该法选用Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(100 mm×4.6 mm,2.7 μm)色谱柱,流动相选用10 mmol·L⁻¹醋酸铵水溶液(pH 6.5)(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱,体积流量0.7 mL·min⁻¹,MS在ESI负离子模式下,以*m/z* 188.9515对目标化合物进行分析。经验证,此法LOD、LOQ、重复性、线性、准确度等均符合规定。

2.4 HILIC-MS

HILIC是采用极性固定相和富含极性有机溶剂的流动相分析待测化合物的方法^[33]。由于HILIC

流动相具有有机氢特征,使其极适合与MSD耦合,特别是ESI-MS,富有机流动相可通过协助喷雾形成和提高电离效率以提高MS检测灵敏度^[34]。

基于HILIC优点,已有报道采用HILIC与MS联用进行痕量GTIs检测。Mullangi等^[35]建立了HILIC-MS/MS法用于检测阿立哌唑(APZ)原料中的PGIs 2,3-二氯苯胺(PGI-1)、双(2-氯乙基)胺(PGI-2)和2-氯乙胺(PGI-3)。选用ACE HILIC-N(HILN-5-1046U,100 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相A为乙腈:甲酸铵缓冲液(pH 6)(95:5),流动相B为乙腈:甲酸铵缓冲液(pH 6)(50:50),柱温为35℃,采用梯度洗脱,体积流量及进样量分别为0.8 mL·min⁻¹和10 μL。MS采用ESI⁺模式,并分别以离子对*m/z* 163.1/90.1、143.1/107.1、80.5/45.1对PGI-1、PGI-2和PGI-3进行MRM监测分析。结果表明,PGI-1、PGI-2、PGI-3在16~200 ng·mL⁻¹范围内具有良好的线性关系,此法具有较好的专属性、灵敏性、准确性和精密度,可用于定量分析APZ原料及制剂中的痕量PGIs。由于二甲双胍(MET)中的二甲胺(DMA)易氧化,产生不对称的二甲胍,二甲胍与空气或其他氧化剂接触后进一步氧化生成*N*-亚硝基二甲胺,故Douša等^[36]建立了HILIC-MS/MS法检测MET中的DMA。选用Cortecs HILIC(150 mm×3 mm,2.7 μm)为色谱柱,流动相为10 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液(甲酸调节至pH至4.8)-乙腈(25:7),体积流量0.8 mL·min⁻¹,柱温45℃,进样量10 μL,并在SIM模式下选用*m/z* 46对目标杂质进行检测。此法样品前处理简单,样品制备及分析10份样品溶液(包括测量校准曲线)仅需120 min,且分析运行时间只需5 min,可大大提高样品检测效率。故而,此法可用于替代EP中所载的MET中DMA检测方法。

2.5 SFC-MS

SFC是自20世纪80年代以来得以迅速发展的一种以超临界流体为流动相的色谱分析方法,具有高分离效率、低有机溶剂消耗和分析时间较短等优点。

目前已有少数关于采用SFC-MS检测GTIs的文献报道,如Schmidtsdorff等^[37]经过条件筛选优化,最终选用Waters HSS C₁₈ SB(100 mm×3.0 mm,1.8 μm)为色谱柱,以CO₂(A)-0.1%三氟乙酸甲醇溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,柱温为55℃,体积流量为1.2 mL·min⁻¹,进样量为1 μL。MS采用ESI⁺模式,并选用选择反应监测扫描模式(SRM)检测沙坦类药物中10种亚硝胺类GTIs。结果表明,该方法

的灵敏度与FDA和欧洲药品管理局(EMA)发布的检测方法相似,但大大提高了分析速度且能够在同一时间单次运行分析API相关杂质。

2.6 CE-MS

CE是一种在高电场电压的作用下,在毛细管柱内产生电渗透流(EOF),通过待测化合物间电泳迁移率和分配差异而达到分离目的的分析方法。CE的主要优点是所需样品量少、分离性能高、溶剂消耗低、易于操作且分析速度快^[38-39]。CE-MS常用离子源主要有ESI、基质辅助激光解吸电离(MALDI)和电感耦合等离子体(ICP)。ESI是MS与CE在线耦合最常用的方法,ICP常用于分析含有金属纳米颗粒的复杂基质样品,MALDI主要用于离线的CE-MS联用^[40]。

CE-MS联用技术常用于代谢组学、蛋白质组学、食品等领域的分析,但在痕量GTIs分析方面的应用较少,如Van Wijk等^[41]以4-二甲氨基吡啶(DMAP)或1-(4-吡啶基)哌啶-4-甲酸正丁酯(BPPC)为衍生化试剂,采用CE-MS检测4种卤代烷烃GTIs。其中,CE采用毛细管区带电泳(CZE)模式,以含有20%乙腈的100 mmol·L⁻¹ TRIS水溶液(磷酸调节pH至2.5)为背景电解质(BGE),使用长度为20 cm、内径为50 μm的毛细管(CE-UV有效检测长度为92 cm,CE-UV-MS有效检测长度为20 cm)进行检测,进样前在10 mbar条件下,注入乙腈-水-BGE(50:40:10)溶液50 s。样品在10 kV下,电动进样150 s,进样压力和时间分别为5 000 Pa、50 s,分离电压为30 kV,柱温为30 °C。MS采用ESI⁺模式,以甲醇-水-甲酸(50:50:0.2)为鞘液,并在先前报道的基础上将去溶剂温度和雾化器压力分别调整为300 °C、3.45×10⁵ Pa进行样品检测。经验证,样品衍生化和预富集化处理提高了此检测方法的灵敏度、选择性和分离效率,相对于先前报道的LC-MS方法,此法显示了较为突出的优越性。

3 结语

随着对药物中GTIs监管要求的不断提高,色谱-MS联用技术已成为痕量GTIs检测必不可少的手段之一。GC-MS通常用于检测具有挥发性、热稳定的GTIs,而热不稳定、挥发性较差的GTIs则可选择性地采用HPLC-MS、UPLC-MS、HILIC-MS、SFC-MS和CE-MS进行检测。其中,UPLC-MS相对于HPLC-MS具有更高的检测效率和灵敏度。但UPLC-MS的主要缺点在于与传统的LC相比,其背

压更高,不利于维护色谱柱的使用寿命且小于2 μm的颗粒不可再生^[42]。而HILIC-MS流动相富含极性有机溶剂,故该技术极适用于亲水性GTIs的分析,且其流动相与MSD更为兼容,可进一步提高MS灵敏度。同时,SFC一方面可兼顾GC和LC的特点,另一方面SFC相对于LC具有更高的检测效率,故SFC-MS可作为GC-MS和LC-MS的补充检测手段且检测效率相对更高^[43]。而CE-MS操作简便且可通过电动进样和堆积进样等方式对样品进行预浓缩,有助于进一步实现样品的痕量分析。

目前GC-MS和HPLC-MS此2种色谱-MS技术最常被用于检测亚硝胺类、磷酸酯类、卤代烷烃类等GTIs,而UPLC-MS、HILIC-MS、SFC-MS和CE-MS此4种技术亦各具有其独特的优点。然而目前此几种技术仪器的使用普及性相对较低,导致其在检测GTIs方面的报道相对较少。但随着更多新药的不断涌现和对已上市药品安全监管力度的不断加强,更加深入研究更多类型的色谱-MS联用技术在检测痕量GTIs方面的应用是非常必要的。此外,由于GTIs一般活性较高、稳定性较差,在提取、制备或者分析过程中易发生反应或挥发,而导致检测准确度差,故仍需进一步深入研究不同类型的GTIs合适的柱前处理方法,以满足GTIs检测专属性和灵敏度的需求。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Giordani A, Kobel W, Gally H U. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(1/2): 1-15.
- [2] 文海若, 闫明, 王亚楠, 等. 药物杂质遗传毒性评价策略与监管研究 [J]. *中国药事*, 2020, 34(2): 131-140.
Wen H R, Yan M, Wang Y N, et al. Strategy and regulatory research for genotoxicity evaluation of impurities [J]. *Chin Pharm Aff*, 2020, 34(2): 131-140.
- [3] 中华人民共和国药典 [S]. 四部. 2020: 527-530.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020: 527-530.
- [4] 马聪玉, 生宁, 李元元, 等. 中药成分质谱分析新技术和新策略进展 [J]. *质谱学报*, 2021, 42(5): 709-717.
Ma C Y, Sheng N, Li Y Y, et al. Advances in mass spectrometric-based technologies and strategies for the analysis of traditional chinese medicine [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2021, 42(5): 709-717.
- [5] US Food and Drug Administration. Combined Direct Injection *N*-nitrosodime thylamine (NDMA) and *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS

- [EB/OL]. (2018-12-11) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/117807/download>.
- [6] US Food and Drug Administration. Combined Direct Injection *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), *N*-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), and *N*-Nitrosodibutylamine (NDBA) Impurity Assay by GC-MS/MS [EB/OL]. (2019-04-19) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/123409/download>.
- [7] US Food and Drug Administration. Combined Headspace *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and *N*-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS [EB/OL]. (2019-04-19) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/124025/download>.
- [8] US Food and Drug Administration. Combined *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS-Headspace [EB/OL]. (2019-01-28) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/117843/download>.
- [9] US Food and Drug Administration. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products [EB/OL]. (2019-01-25) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/115965/download>.
- [10] US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of Six Nitrosamine Impurities in ARB Drugs [EB/OL]. (2019-05-21) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/125478/download>.
- [11] US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product [EB/OL]. (2019-09-13) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/130801/download>.
- [12] US Food and Drug Administration. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Solid Dosage Drug Product [EB/OL]. (2019-10-17) [2022-04-27]. <https://www.fda.gov/media/131868/download>.
- [13] Toribio L, Bernal J, Martín M T, et al. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry: A valuable tool in food analysis [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2021, 143: 116350.
- [14] Luo X Y, Wang W J, Zhao X, et al. A new method for the simultaneous determination of urinary NNAL and cotinine concentrations using HILIC-MS/MS coupled with PRiME HLB SPE [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2021, 465: 116579. doi:10.1016/j.ijms.2021.116579.
- [15] Zhao Y F, Li J K, Xie H Y, et al. Covalent organic nanospheres as a fiber coating for solid-phase microextraction of genotoxic impurities followed by analysis using GC-MS [J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12(4): 583-589.
- [16] Chen Y Q, Huang L Z, Yuan X, et al. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for ultra-trace level determination of acyl chloride potential genotoxic impurity in mezlocillin [J]. *J Chromatogr Sci*, 2021, doi: 10.1093/chromsci/bmab119.
- [17] Uppala R, Arthanareeswari M. Determination of hydroxylamine genotoxic impurity by derivatization in penicillamine drug substance by GCHS-MS [J]. *Mater Today: Proc*, 2021, 34(4): 506-509.
- [18] Liu Z, Fan H J, Zhou Y H, et al. Development and validation of a sensitive method for alkyl sulfonate genotoxic impurities determination in drug substances using gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 168: 23-29.
- [19] Jadhav R, Sonawane R, Wadghule B, et al. Time dependent selected reaction monitoring based enhanced sensitivity approach for the determination of alkyl sulfonates and anisyl cyanides in venlafaxine hydrochloride by gas chromatography with mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Open*, 2021, doi:10.1016/j.jcoa.2021.100003.
- [20] Zhong Z H, Chen Y P, Xia H Y, et al. Development and validation of a sensitive GC-MS/MS method for the determination of five potential genotoxic impurities in abiraterone acetate [J]. *J Chromatogr Sci*, 2022, 60(2): 105-110.
- [21] Kulsing C, Nolvachai Y, Marriott P J. Concepts, selectivity options and experimental design approaches in multidimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020, 130: 115995.
- [22] David F, Jacq K, Sandra P, et al. Analysis of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals by two-dimensional gas chromatography with Deans switching and independent column temperature control using a low-thermal-mass oven module [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(3): 1291-1300.
- [23] Mullangi S, Ravindhranath K, Panchakarla R K. LC-MS/MS method for the quantification of potential genotoxic impurity 4-phenoxyphenyl-boronic acid in ibrutinib [J]. *J Iran Chem Soc*, 2021, 18(6): 1381-1389.
- [24] Uppala R, Maruthapillai A. Quantification of potential genotoxic impurity IMP-A and IMP-B in efinaconazole drug material by LC-MS/MS [J]. *Mater Today: Proc*, 2021, 40: S198-S205.
- [25] Wang D, Luo L J, Peng Y, et al. Detection of two genotoxic impurities in drug substance and preparation of

- imatinib mesylate by LC-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2020, 83(7): 821-828.
- [26] Chen Y Y, Wu S, Yang Q Y. Development and validation of LC-MS/MS for analyzing potential genotoxic impurities in pantoprazole starting materials [J]. *J Anal Methods Chem*, 2020, doi:10.1155/2020/6597363.
- [27] Zhao Y Y, Wu S P, Liu S, et al. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomics applications [J]. *Chem-biol Interact*, 2014, 220: 181-192.
- [28] Ramachandra B. Development of impurity profiling methods using modern analytical techniques [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2017, 47(1): 24-36.
- [29] European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Test method for the determination of NDMA by LC-MS/MS in Ranitidine Drug Substance and Film Coated Tablets [EB/OL]. (2019-10-23)[2022-04-27]. <https://www.edqm.eu/documents/52006/71923/Ad-hoc-projects-OMCL-Network-cvua-ranitidine.pdf/e198028d-734c-0b92-10e9-083ee1094d8a?t=1628667918241>.
- [30] Jireš J, Gibala P, Kalásek S, et al. The determination of two analogues of 4-(azidomethyl)-1,1'-biphenyl as potential genotoxic impurities in the active pharmaceutical ingredient of several sartans containing a tetrazole group [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 205: 114300.
- [31] Wolff F C, Dillenburger T L, Venzon Antunes M, et al. Characterization of imatinib mesylate formulations distributed in South American Countries: Determination of genotoxic impurities by UHPLC-MS/MS and dissolution profile [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(7): e4222.
- [32] Fu M K, Lu Q, Hewitt E, et al. Ultra high performance liquid chromatography coupled with high resolution quantitation mass spectrometry method development and validation for determining genotoxic 2,5-dichlorobenzoyl chloride in MLN9708 drug substance [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 233-239.
- [33] Jandera P, Hájek T. A new definition of the stationary phase volume in mixed-mode chromatographic columns in hydrophilic liquid chromatography [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4819.
- [34] Taraji M, Haddad P R, Amos R I J, et al. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1000: 20-40.
- [35] Mullangi S, Ravindhranath K, Panchakarla R K. An efficient HILIC-MS/MS method for the trace level determination of three potential genotoxic impurities in aripiprazole active drug substance [J]. *J Anal Sci Technol*, 2021, 12(1): 21.
- [36] Douša M, Jireš J. HILIC-MS determination of dimethylamine in the active pharmaceutical ingredients and in the dosage forms of metformin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 191: 113573.
- [37] Schmidtsdorff S, Schmidt A H. Simultaneous detection of nitrosamines and other sartan-related impurities in active pharmaceutical ingredients by supercritical fluid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 151-160.
- [38] Ramos-Payán M, Ocaña-Gonzalez J A, Fernández-Torres R M, et al. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(1): 111-125.
- [39] Abdul Keyon A S, Miskam M, Ishak N S, et al. Capillary electrophoresis for the analysis of antidepressant drugs: A review [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(4): 906-924.
- [40] Týčová A, Ledvina V, Klepárník K. Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications [J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(1): 115-134.
- [41] Van Wijk A M, Niederländer H A, Van Ogten M D, et al. Sensitive CE-MS analysis of potentially genotoxic alkylation compounds using derivatization and electrokinetic injection [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 874: 75-83.
- [42] Nahar L, Onder A, Sarker S D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010—2019) [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(4): 413-457.
- [43] Chollet C, Boutet-Mercey S, Laboureur L, et al. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry for lipidomics [J]. *J Mass Spectrom*, 2019, 54(10): 791-801.

[责任编辑 李红珠]