

## 基因毒性杂质分析方法和前处理技术的研究进展

谢含仪, 林云良, 张瑞凌, 王珊珊, 陈相峰\*

(山东省分析测试中心 齐鲁工业大学(山东省科学院), 济南 250014)

**摘要:** 基因毒性杂质对人们的用药安全造成了严重威胁。由于性质活泼、稳定性差, 基因毒性杂质的痕量分析极具挑战性。本文系统地介绍 9 种基因毒性杂质(烷基卤化物、双烷基硫酸酯、环氧化合物、胍类化合物、四甲基哌啶氧化物、芳香胺、硼酸、磺酸酯和乙酰胺)的分析方法(包括 GC、LC、GC-MS 和 LC-MS 法等)及其前处理技术(包括顶空分析法、固相萃取法和衍生化法等), 为更好地选择和建立基因毒性杂质的检测方法提供重要参考。

**关键词:** 基因毒性杂质; 分析方法; 前处理; 顶空; 衍生化; 固相萃取; 固相微萃取

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)10-1668-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.02

## Advances in analytical methods and pre-treatment techniques for genotoxic impurities

XIE Han-yi, LIN Yun-liang, ZHANG Rui-ling,  
WANG Shan-shan, CHEN Xiang-feng\*

(Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology

(Shandong Academy of Science), Jinan 250014, China)

**Abstract:** Genotoxic impurities pose a serious threat to people's safety of medication. Trace-level analysis of genotoxic impurities is challenging due to the active property and poor stability. This article systematically introduces the analytical methods including GC, LC, GC-MS and LC-MS, and the pre-treatment techniques containing headspace, solid-phase extraction and derivatization for the nine kinds of genotoxic impurities: alkyl halides, dialkyl sulfates, epoxides, hydrazines, TEMPO, aromatic amines, boronic acids, sulfonate esters and acetamide. It will be beneficial for the better selection and establishment of analysis methods for genotoxic impurities.

**Keywords:** genotoxic impurity; analytical method; pre-treatment; headspace; derivatization; solid-phase extraction; solid-phase microextraction

\* 通信作者 Tel:(0635)82605340; E-mail: xiangchensdas@163.com

第一作者 Tel:(0635)82605342; E-mail: xiehanyisdu@163.com

基因毒性杂质 (genotoxic impurity, GTI) 是指能直接或间接损害 DNA, 导致基因突变或具有致癌倾向的物质<sup>[1-2]</sup>。潜在遗传毒性杂质 (potential genotoxic impurity, PGI) 被定义为从结构上看类似基因毒性杂质, 有警示性, 但未经实验证明的化合物。基因毒性杂质特点是在浓度很低时即可造成人体遗传物质的损伤, 具有致突变性和致癌性, 在用药过程中严重威胁到人类的健康。

基因毒性杂质的结构多种多样, 对于绝大多数的杂质而言, 往往没有充分的毒性或致癌研究数据。近年来 EMEA、FDA、ICH 等相继发布了针对基因毒性杂质的指导原则<sup>[3-5]</sup>。在缺乏杂质安全性数据支持的情况下, 这些原则均将警示结构作为区分普通杂质和潜在遗传毒性杂质的主要标志。警示结构是指杂质结构中的某些特殊基团或亚单元, 具有与遗传物质发生化学反应的能力, 可能会诱导基因突变, 具有潜在的致癌风险<sup>[6]</sup>。在欧盟发布的警示结构数据库中记录了 1 547 种警示结构的结构式、CAS 号、作用部位等信息<sup>[7]</sup>。另一方面, 由于缺乏支持基因毒性阈值存在的有力证据, 这些原则均提出采用“毒理学关注阈值” (threshold of toxicological concern, TTC) 作为基因毒性杂质的可接受限度。其含义为在人的一生 (70 岁) 中, 每天摄入 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质, 其致癌的风险是可接受的 (<1/10 万)<sup>[8]</sup>。TTC 概念用于界定所有未经研究, 但具有致癌风险或其他毒性效果的化学品的可接受摄入量。值得注意的是, TTC 是一个风险管理工具, 它采用的是概率的方法, 不能被理解为绝对无风险的保障。在特定的条件下, 一些基因毒性杂质存在较高的阈值。而有些结构基团, 如黄曲霉素类、N-亚硝基物类、偶氮苯类等具有较高的致癌风险, 对这些种类的物质需要进行特殊的风险评价<sup>[9]</sup>。

近年来, 在已上市药品中发现痕量的基因毒性杂质残留引发了重大的医疗事故, 给患者和药企带来难以挽回的损失<sup>[10]</sup>。越来越多的药企在研发新药的过程中, 开始高度重视基因毒性杂质的控制和检测。基因毒性杂质的含量很低 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  或  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 对其进行分析检测不仅要求较高的灵敏度, 还要求较好的特异性, 因此根据不同基因毒性杂质的特点, 开发能够灵敏检测各种杂质的分析技术和研究方法是十分必要的。本文根据基因毒性杂质的不同来源结构, 对几种常见的基因毒性杂质的检测方法和前处理技术

进行了总结。

## 1 来源于反应物的基因毒性杂质的检测方法

来源于反应物的基因毒性杂质按结构分为烷基卤化物、双烷基硫酸酯、环氧化合物、胍类化合物、四甲基哌啶氧化物、芳香胺、硼酸等<sup>[11]</sup>。

### 1.1 烷基卤化物

烷基卤化物一般来源于残留试剂或在盐酸醇等溶剂中产生。它能够直接与 DNA 等生物大分子发生烷基化反应, 是基因毒性杂质中最常见的一类。在检测这类杂质时, 首先要确定其是否具有挥发性, 然后根据杂质分子的结构特点 (是否具有紫外吸收基团等), 选择最佳的分析方法进行样品供试溶液的制备与检测。

#### 1.1.1 分析方法和难点

对于具有挥发性的烷基卤化物, 如卤代甲烷、卤代乙烷和卤代丙烷等, 气相色谱法是首选的检测方法; 对于非挥发性的烷基卤化物, 最常用的检测方法是液相色谱法。为了实现对分析物的快速分离, 提高检测的灵敏度和特异性, 往往需要选择合适的检测器及前处理方法, 并结合多种分析技术 (如 GC-MS、LC-MS 联用等) 对样品进行分析和检测。

#### 1.1.2 前处理方法

烷基卤化物的前处理方法有顶空分析法、固相微萃取法及衍生化法。

**1.1.2.1 顶空分析法** Ellison 等<sup>[12]</sup> 报告了利用顶空-气相色谱法 (HS-GC 法) 分析 23 种烷基或者芳基卤化物, 指出 HS-GC 对检测挥发性化合物具有很好的适用性, 其中碘化物的响应性最好, 而溴化物的响应性最差, 23 种分析物的检测下限为 2.5~290  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Ho 等<sup>[13]</sup> 将离子液体引入到 HS-GC 方法中, 测定了 8 种高沸点的烷基卤化物, 扩大了 HS-GC 方法的适用范围, 并且大大提高了灵敏度 (10~1 000 倍) 和检测下限 (5~500  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 提供了一个比复杂的联用分析手段经济可行的替换方案。

**1.1.2.2 固相微萃取法** 固相微萃取法 (SPME) 是基于萃取涂层与样品之间的吸附、溶解、解吸平衡而建立起来的集进样、萃取、浓缩功能于一体的技术。Frost 等<sup>[14]</sup> 利用 SPME 结合 HS-GC 方法分析了氯化苄和氯乙基甲基醚, 灵敏度分别为 0.3 和 4.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Ho 等<sup>[15]</sup> 利用聚合离子液体作为 SPME 的吸附剂涂层, 分析了几种烷基卤化物, 发现其对

含有长烃链的烷基卤化物具有很好的选择性和灵敏度。

**1.1.2.3 衍生化法** 衍生化法是指通过化学反应,将一些极性化合物(例如含NH、OH、SH基团的化合物)的活性氢原子进行取代,以改善样品的挥发性、极性 or 热稳定性,从而提高样品的分离检测效果。根据所用的试剂和发生的反应,衍生化方法可分为5类,即酰化、烷基化、硅烷化、缩合和酯化。衍生化法在仪器分析的制样、分离和提取等环节中广泛应用。对于非挥发的烷基卤化物,可通过化学衍生化法改善其挥发性或者电离效率,进而采用GC或MS法进行测定。Bai等<sup>[16]</sup>以二甲胺溶液为衍生化试剂,结合电喷雾电离的LC-MS法分析了原料药中的3种烷基氯化物,灵敏度为1~5 ng·mL<sup>-1</sup>。Wijk等<sup>[17]</sup>对衍生化试剂4-二甲基氨基吡啶进行改性,使用1-(4吡啶基)哌啶-4-羧酸丁酯作为新型衍生化试剂,开发了一种LC-MS/MS方法来筛选原料药中的烷基卤化物,灵敏度达到1 mg·kg<sup>-1</sup>。

## 1.2 双烷基硫酸酯

在制药行业中最常用的双烷基硫酸酯是硫酸二甲酯(DMS)。DMS作为一种有效的甲基化试剂,在烷基化反应中与烷基卤化物相比有着更高的反应速率和更低的副产物产出。DMS属于高毒类有机溶剂,对局部黏膜有强烈的刺激和腐蚀作用。急性DMS中毒后可引起染色体畸变,产生致畸致癌作用,是潜在的基因毒性杂质。

### 1.2.1 分析方法和难点

现有报道的硫酸二甲酯的检测方法有LC法、LC-MS法和GC-MS法等<sup>[18-20]</sup>。由于DMS稳定性较差,遇热易分解,在碱水中迅速水解成硫酸和甲醇,因此在分析过程中既要保证DMS的稳定性,同时还要提高检测手段的灵敏度,如采用GC法测定DMS时,由于气化温度较高,很可能导致DMS部分分解出甲醇,因此要严格控制气化室温度和柱温,否则微小的温度波动也会影响检测的准确度。

### 1.2.2 前处理方法

为了保证分析物的稳定性,在检测DMS时常用的前处理方法包括衍生化法和顶空分析法。

**1.2.2.1 衍生化法** DMS作为一种常见的甲基化试剂,经过衍生化处理后可以提高稳定性,便于进行准确的分析和检测。Hoogerheide等<sup>[18]</sup>用2-巯基吡啶作为衍生化试剂,采用LC-荧光检测法测定DMS,灵

敏度为10 ng·mL<sup>-1</sup>。An等<sup>[21]</sup>用三甲胺作为衍生化试剂,将双烷基硫酸酯转化成稳定较好的季铵离子进行检测。采用亲水作用色谱柱(HILIC柱)清洗去除API中的干扰物质以保证硫酸二甲酯、硫酸二乙酯及硫酸二丙酯等分析物检测的灵敏度,同时最大限度地减少污染。Grinberg等<sup>[19]</sup>利用苯并二氮杂革和吡啶为衍生化试剂,使用离子液体为溶剂,采用LC-MS法测定了原料药中DMS的含量,灵敏度为0.05 μg·mL<sup>-1</sup>。

**1.2.2.2 顶空分析-衍生化法** DMS经衍生化处理后,改善了其在高温环境中的不稳定性,因此更适用于利用HS-GC进行分析。Lee等<sup>[20]</sup>用硫代硫酸钠作为衍生化试剂,采用HS-GC-MS法分析了药物基质中的DMS,检测灵敏度为0.02 μg·mL<sup>-1</sup>。Alzaga等<sup>[22]</sup>利用五氟苯硫酚对药物基质中的DMS进行原位衍生化处理后,进行HS-GC-MS分析,此方法显著缩短了分析时间,提高了检测的选择性和样品的稳定性,适用于针对不同的药物基质的高通量的样品分析。

## 1.3 环氧化合物

环氧化合物具有较大的环张力和很高的反应活性,易与水、醇、胺、卤代化合物、芳香化合物等多种试剂发生反应而开环,是药物合成的重要中间体。环氧化合物可以与DNA发生亲核反应,从而导致DNA发生突变,是潜在基因毒性杂质。

### 1.3.1 分析方法和难点

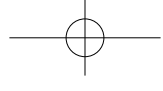
环氧化合物的检测方法有LC法和LC-MS法等<sup>[23-26]</sup>。环氧化合物的不稳定性不仅表现在其较高的反应活性,而且在高温下易分解,这均给准确分析环氧化合物带来了难度。

### 1.3.2 前处理方法

环氧化合物的前处理方法有固相萃取法和衍生化法。

**1.3.2.1 固相萃取法** Brinker等<sup>[23]</sup>使用SPE和HPLC-UV技术评估了来自雷公藤的根提取物中环氧化物二萜的残留水平,检测灵敏度为0.028 ng·mL<sup>-1</sup>。Kursinszki等<sup>[24]</sup>利用SPE和HPLC技术测定了环氧生物碱东莨菪碱的含量,检测灵敏度为0.8 ng·mL<sup>-1</sup>。Tappin等<sup>[25]</sup>利用SPE技术结合反相液相色谱对3种环氧化合物建立了分析方法,并使用统计学方法对该法进行了优化。

**1.3.2.2 衍生化法** 环氧化合物经过衍生化前处理后



不仅能够提高稳定性,还能改善质子化能力,从而提高质谱检测的灵敏度。Wu 等<sup>[26]</sup>以乙基氮杂炔正离子( $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{N}^+\text{H}\leftrightarrow\text{CH}_3-\text{C}^+=\text{NH}$ )为衍生化试剂,进行麦尔外因反应,利用 HPLC-MS 法测定原料药中的 2 种环氧化合物,检测下限为  $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Bruzzoniti 等<sup>[27]</sup>以亚硫酸钠为衍生化试剂,利用离子色谱-质谱法测定了水中的环氧氯丙烷,检测下限为  $100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

#### 1.4 胍类化合物

胍类化合物作为具有较强亲核力的还原剂,已被用作几种不同类型的药物生产中的合成试剂<sup>[28-30]</sup>。胍类化合物还是绿色还原剂,反应生成的副产物只有氮气和氨气。胍类及其衍生物可以形成碳正离子、碳中心自由基和氧中心自由基等高活性的中间体,导致 DNA 发生烷基化或者其他损伤<sup>[31]</sup>,是已知的基因毒性杂质。

##### 1.4.1 分析方法和难点

胍类化合物的分析方法有 LC 法、LC-MS 法及 GC-MS 法<sup>[32-34]</sup>。胍类化合物的反应活性较强,易发生副反应而造成假阳性的结果。另一方面,胍类化合物的碱性较强,容易与色谱柱上的硅氧基发生相互作用,从而造成峰形拖尾,因此对于色谱柱的选择有着较高的要求。

##### 1.4.2 前处理方法

对于胍类化合物,一般采用衍生化法作为前处理手段,如衍生化法及顶空分析-原位衍生化法 2 种方法。

**1.4.2.1 衍生化法** 在药物环境中分析胍的含量容易受到药物基质和其他相关物质的干扰,衍生化处理成为分析原料药中胍的主要手段。Fortin 等<sup>[32]</sup>以丙酮作为药物的溶解剂,同时作为衍生化试剂,分析了药物基质中的甲基胍的含量,通过 GC-MS 检测的灵敏度为  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Wang 等<sup>[33]</sup>利用 2-羟基-1-萘甲醛为衍生化试剂,通过衍生化反应将发色团连接到药物中的胍上,提高了 HPLC-UV 检测的灵敏度,同时减少原料药基质的影响,检测分辨率达到  $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  API。Cui 等<sup>[34]</sup>利用苯甲醛作为衍生化试剂,同时分析了药物基质中的胍和乙酰胍,在衍生化反应中加入苯甲酸来调节酸度,以保证回收率,通过 LC-MS 方法分析胍和乙酰胍的检测下限分别为  $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**1.4.2.2 顶空分析-原位衍生化法** Sun 等<sup>[35]</sup>开发

了一种适用于检测不同药物基质中胍的方法。该方法使用丙酮或丙酮- $d_6$  作为衍生化试剂,将胍转化为具有挥发性的丙酮吡嗪或丙酮吡嗪- $d_{12}$ ,然后通过顶空 GC-MS 方法进行检测,灵敏度达到  $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

#### 1.5 四甲基哌啶氧化物

2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧自由基(TEMPO)是可以稳定存在的 N-氧自由基,可以经过单电子氧化过程转化为氮羰基阳离子,常用作自由基俘获剂、自由基反应抑制剂和阻聚剂,在化学和生物化学相关行业中广泛使用。TEMPO 目前没有明确的致突变性的证据,是潜在的基因毒性杂质<sup>[36]</sup>。

##### 1.5.1 分析方法和难点

TEMPO 在溶液中及电喷雾离子化过程中容易发生歧化反应,生成还原态和氧化态的形式,给单组分子的测定带来了不准确性,对测量过程中的供试品溶液制备和测试方法的选择提出了较高要求。

##### 1.5.2 前处理方法

目前针对原料药中 TEMPO 的检测分析工作十分有限。Strohmeier 等<sup>[37]</sup>利用 HS-GC-MS 方法检测了丙型肝炎病毒聚合酶抑制剂非利布韦中 TEMPO 的含量,灵敏度为  $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Pennington 等<sup>[38]</sup>利用坏血酸钠作为还原剂,将 TEMPO 转化为还原态形式进行 LC-MS 分析,此分析方法的灵敏度为  $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

#### 1.6 芳香胺

芳香胺类化合物是医药行业中常用的化工原料,其分子结构中芳香烃的苯环与胺基的氮原子相连接,分子比较活跃,经代谢活化生成稳定的氮正离子( $\text{ArN}^+\text{H}$ )。此离子能与 DNA 结合<sup>[39]</sup>,具有致癌性和致突变性,因此具有更易形成氮正离子结构的芳香胺的毒性更强。

##### 1.6.1 分析方法和难点

芳香胺的检测方法较多,目前较多采用 GC 法、HPLC 法、GC-MS 法和 LC-MS 法<sup>[40-43]</sup>。根据芳香胺的极性和弱碱性的差异,在利用 GC 法进行检查时,可以使用不同的检测器以增加对特定胺的选择性,包括氮磷检测器、火焰光度检测器和电子捕获检测器等。

##### 1.6.2 前处理方法

为了提高芳香胺的检测灵敏度,在测试前一般需进行样品预处理以分离富集痕量的芳香胺。常用的预处理方法包括 SPE、SPME 和衍生化法等。

**1.6.2.1 SPE 法** SPE 不仅能对芳香胺进行浓缩,还

能消除基质残留对质谱离子化的不利影响。Aznar 等<sup>[40]</sup>使用阳离子交换柱的 SPE 技术,随后通过 UPLC 与 MS 检测分析了 22 种芳香胺的含量,提供了一个高灵敏度和准确度的芳香胺的定量方法。Jurado-Sanchez 等<sup>[41]</sup>基于芳香胺与其他胺(脂肪类和杂环类)  $pK_a$  值的不同,研究开发了针对特定胺的 SPE 的吸附材料,通过 GC 与电子轰击电离质谱分析了苯胺、氯苯胺、*N*-亚硝胺和脂族胺的含量。

**1.6.2.2 SPME 法** SPME 法作为无溶剂的萃取技术,与 SPE 技术相比更加简单快速。Huang 等<sup>[42]</sup>根据相似相溶原理,以聚苯胺作为 SPME 的吸附涂层,结合 HS-GC-FID 技术检测了 6 种芳族胺,灵敏度为  $0.019\sim 1.06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Liu 等<sup>[43]</sup>将氧化的多壁碳纳米管作为吸附涂层,使用管内 SPME 结合 HPLC 开发了一种用于测定苯胺化合物的自动化方法。该方法对 4-硝基苯胺、2-硝基苯胺和 2-氯苯胺、2,4-二氯苯胺的检测有着很好的灵敏度,检测下限为  $0.04\sim 0.13 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**1.6.2.3 衍生化法** 芳香胺经过衍生化处理后可以改善与色谱柱相互作用而导致的峰形拖尾。Brede 等<sup>[44]</sup>引入了三氟乙酸酐作为固定相进行衍生化固相分析,利用 GC 与 MS 对 8 种芳香胺进行测试,灵敏度为  $0.1\sim 0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Zhao 等<sup>[45]</sup>开发了 2 种易于合成、性质稳定的荧光衍生化试剂用于 6 种芳香胺的衍生化检测,经衍生化的芳族胺采用 HPLC 分析,显示出良好的基线分辨率和峰形,检测下限为  $0.12\sim 0.21 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 1.7 硼酸

硼酸和硼酸酯由于其温和的路易斯酸性及良好的稳定性,被广泛应用于制药工业中。虽然目前没有直接证据表明硼酸能够与 DNA 发生反应,但是 O'Donovan 等<sup>[46]</sup>在 13 种硼酸和硼酸酯衍生物中检测到 12 种物质具有致突变性。随着制药行业对硼酸及衍生物潜在遗传毒性的认识的提高,数家制药公司检测了 17 种硼酸衍生物,发现其中 14 种物质具有致突变性<sup>[47]</sup>。硼酸衍生结构的致突变阳性率(82.4%)超过了烷基化试剂(57.7%)和芳香胺(37.0%)<sup>[48]</sup>,硼酸作为警示结构的潜在基因毒性值得深入探索。

### 1.7.1 分析方法和难点

硼酸衍生物的检测方法有电感耦合等离子质谱法(ICP-MS)<sup>[49]</sup>及结合火焰离子化检测器的气相色谱法(GC-FID)等。

但是 GC-FID 对硼酸的检测限较低,难以实现痕量检测的要求。由于易水解,挥发性差,硼酸酯的定量分析非常具有挑战性。比如利用 GC 分析硼酸酯时,载气中痕量的水分就有可能导致硼酸酯,特别是无环硼酸酯的水解<sup>[50]</sup>。因此,要在检测过程中严格保证无水环境,采用合适的分析手段来提高检测的灵敏度。

**1.7.1.1 非水毛细管电泳** 非水毛细管电泳(NACE)使用非水溶剂作为电泳介质,扩展了毛细管电泳技术分析对象的范围。利用 NACE 技术分析硼酸酯类物质能够有效避免其水解。此外,NACE 的分离效率高,分析时间短,且非水溶剂可降低待测物与管壁的作用,降低峰宽并改善拖尾,同时可显著提高待测物的回收率,降低用管壁面积较大的毛细管进行分析时被分析物的损失<sup>[51]</sup>,因此在药物分析中的应用越来越广泛。Forst 等<sup>[52]</sup>利用 NACE 技术建立了硼酸酯定量分析的方法学,并且对 10 组硼酸及硼酸酯进行了测试,发现其中的 8 组具有较好的灵敏度和尖峰回收率。

**1.7.1.2 ICP-MS** ICP-MS 是一种以等离子体为离子源的质谱型元素分析方法。该方法将电感耦合等离子体的高温电离特性与质谱仪灵敏快速扫描的优点相结合,操作简便,对微量元素硼进行分析时具有高度敏感性和特异性,为准确测量硼酸及硼酸酯提供了可能性。Patel 等<sup>[49]</sup>利用 ICP-MS 法测定了药物基质中硼元素的含量,检测灵敏度为  $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,为药物中微量无机物质的分析提供了一个重要方法。

## 2 来源于副反应的基因毒性杂质的检测方法

来源于副反应的基因毒性杂质有磺酸酯、乙酰胺及烷基卤化物<sup>[11]</sup>。由于烷基卤化物的分析方法已在“1.1”项中介绍,接下来将主要介绍磺酸酯和乙酰胺的分析方法。

### 2.1 磺酸酯

磺酸酯来源于药物合成中甲磺酸、苯甲磺酸等磺酸类物质与微量的低级醇发生的副反应,包括烷基磺酸酯如甲磺酸甲酯(MMS)、甲磺酸乙酯(EMS)等以及芳基磺酸酯如苯磺酸甲酯(MBS)等。2007 年在对抗 HIV 药物 Viracept 的检测中发现,由于原料中的甲磺酸与残留的乙醇发生反应,甲磺酸乙酯水平超标,导致该产品退出欧洲市场<sup>[10]</sup>。磺酸酯类的基因毒性杂质引起了制药行业的广泛关注,磺酸

酯能够与 DNA 发生烷基化反应,是潜在的基因毒性杂质。

### 2.1.1 分析方法和难点

磺酸酯的检测方法有 HPLC 法及 GC-MS 法等。磺酸酯的反应活性较高,在利用 GC 检测时要注意控制进样口温度,防止磺酸酯发生水解;另一方面,药剂中残留的磺酸易与测试中常用到的醇类溶剂发生反应,造成假阳性的结果。

### 2.1.2 前处理方法

为了减少原料药基质对磺酸酯测试的影响,提高磺酸酯检测的灵敏度,检测中常用的前处理方法包括各种富集手段,如液液萃取法(LLE)和 SPE,以及衍生生化法。

**2.1.2.1 LLE 法** LLE 常用于样品中被测物质与基质的分离,在 2 种不相溶的液体中,根据其组分在溶剂中的不同溶解度而达到被测物质纯化和消除干扰物质的目的。Wollein 等<sup>[53]</sup>开发了一种同时测定药品中甲磺酸甲酯(MMS)、甲磺酸乙酯(EMS)、甲磺酸异丙酯(IMS)、苯磺酸甲酯(MBS)和苯磺酸乙酯(EBS)的方法,通过对药品进行 LLE 萃取并结合 GC-MS 进行分析,此方法对目标烷基酯和芳基酯均有很好的灵敏度( $0.003\sim 0.005\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。欧洲药典<sup>[54]</sup>发布的通则中,对于甲磺酸中 3 种磺酸酯 MMS、EMS 和 IMS 的分析,采用的同样是 LLE 结合 HS-GC-MS 的方法。

**2.1.2.2 SPE 法和 SPME 法** 相较于 LLE 法使用大量有机试剂和操作烦琐的缺点,SPE 法和 SPME 法是效率更高,对环境更加友好的前处理手段。Colon 等<sup>[55]</sup>利用 SPME 结合 GC-MS 建立了一种分析磺酸酯的通用方法,并测试了原料药中限度为  $50\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的几种磺酸酯。同时,还与液相微萃取(LPME)和 SPE 2 种前处理方法进行比较,发现 SPME 方法通过优化 pH 可以显著降低药物基质的干扰,实现较好的重现性。Garcia 等<sup>[56]</sup>利用 SPE 法结合 HPLC-DAD 分析了氯哌斯汀芬地柞酸盐药物中对甲苯磺酸甲酯(MPTS)和对甲苯磺-2-氯乙酯(CEPTS)的含量,灵敏度分别达到 11.2 和  $2.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.1.2.3 衍生生化法** 欧洲药典<sup>[57]</sup>发布的通则中,对甲磺酸倍他司汀药物中的 MMS、EMS 和 IMS 的分析,采用的是以碘化钠为衍生生化试剂并结合 HS-GC-MS 的方法。Zhou 等<sup>[58]</sup>以 *N,N*-二乙基二硫代氨基甲酸酯(DDTC)为衍生生化试剂,开发了一种简单的

HPLC-UV 分析方法,分析甲磺酸中的 MMS 和 EMS,并与欧洲药典中的 LLE 结合 GC-MS 分析方法进行对比,发现 GC-MS 的测定结果大都低于新开发的 HPLC-UV 法,为甲磺酸中的杂质检测提供了一种新方法。

## 2.2 乙酰胺

乙酰胺是一种已知的致癌物质,其主要产生于药物合成中常用的 2-溴乙酰胺、*N*-溴乙酰胺或三氟乙酰胺的降解,以及乙腈在高温酸性或碱性的水解。虽然乙酰胺不具有基因毒性,但在一些研究中也将其归类于潜在的基因毒性杂质<sup>[59]</sup>。

### 2.2.1 分析方法和难点

乙酰胺的相对分子质量较低,极性大,不易在 LC 仪常用的非极性反相色谱柱中保留。另外,乙酰胺在水溶液中加热时易发生水解,生成醋酸铵,这些均为乙酰胺的定量分析造成了困难。

### 2.2.2 前处理方法

目前已经报道的分析乙酰胺的方法十分有限。Elias 等<sup>[60]</sup>通过热浓缩的前处理方法,利用 HPLC 测试了水中的乙酰胺,灵敏度达到  $7.7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Cho 等<sup>[61]</sup>以占吨氢醇为衍生生化试剂,同时通过 LLE 并结合 GC-MS 法测定了水中乙酰胺的含量,灵敏度为  $0.03\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 3 结语

实现高灵敏度的基因毒性杂质的痕量分析极具挑战,而针对不同基因毒性杂质的独特性质(如挥发性、稳定性等),需要采用有效的前处理技术,选择合适的分析仪器,开发高选择性的检测方法。本文依据基因毒性杂质的不同来源,介绍了 9 种基因毒性杂质——烷基卤化物、双烷基硫酸酯、环氧化合物、胍类化合物、四甲基哌啶氧化物、芳香胺、硼酸、磺酸酯和乙酰胺的分析方法和难点,并着重介绍了不同基因毒性杂质的前处理技术,为基因毒性杂质检测的方法建立提供了重要参考。

## 参考文献

- [1] REDDY AVB, 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
- [2] LIU DQ, SUN MJ, KORD AS. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities [J]. *J Pharm Biomed*, 2010, 51(5): 999

- [ 3 ] ICH M7 ( R1 ). Assessment and Control of DNA Reactive ( Mutagenic ) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [ EB/OL ]. [ 2017-11-11 ]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7\\_R1\\_Addendum/Step\\_4\\_2017\\_0331.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_R1_Addendum/Step_4_2017_0331.pdf)
- [ 4 ] FDA Guidance for Industry Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. [ EB/OL ]. [ 2017-11-11 ]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm074925.pdf>
- [ 5 ] EMEA. Guideline on the Limit of Genotoxic Impurities [ EB/OL ]. [ 2017-11-11 ]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002903.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf)
- [ 6 ] BENIGNI R, BOSSA C. Structural alerts of mutagens and carcinogens [ J ]. *Curr Comput Aid Drug*, 2006, 2 ( 2 ): 169
- [ 7 ] Development of Structure Alerts for the *In Vivo* Micronucleus Assay in Rodents [ DB/OL ]. [ 2017-11-11 ]. [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive\\_toxicology/doc/EUR\\_23844\\_EN.pdf](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/doc/EUR_23844_EN.pdf)
- [ 8 ] DOBO KL, GREENE N, CYR MO, *et al.* The application of structure-based assessment to support safety and chemistry diligence to manage genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients during drug development [ J ]. *Regul Toxicol Pharm*, 2006, 44 ( 3 ): 282
- [ 9 ] MCGOVERN T, JACOBSON-KRAM D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products [ J ]. *Trend Anal Chem*, 2006, 25 ( 8 ): 790
- [ 10 ] EMEA. European Medicines Agency announces recall of Viracept [ EB/OL ]. [ 2017-11-11 ]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2009/11/WC500014207.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500014207.pdf)
- [ 11 ] SZEKELY G, DE SOUSA MCA, GIL M, *et al.* Genotoxic impurities in pharmaceutical manufacturing: sources, regulations, and mitigation [ J ]. *Chem Rev*, 2015, 115 ( 16 ): 8182
- [ 12 ] ELDER DP, LIPCZYNSKI AM, TEASDALE A. Control and analysis of alkyl and benzyl halides and other related reactive organohalides as potential genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients ( APIs ) [ J ]. *J Pharm Biomed*, 2008, 48 ( 3 ): 497
- [ 13 ] 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
- [ 14 ] FROST RP, HUSSAIN MS, RAGHANI AR. Determination of pharmaceutical process impurities by solid phase microextraction gas chromatography [ J ]. *J Sep Sci*, 2003, 26 ( 12-13 ): 1097
- [ 15 ] HO TD, JOSHI MD, SILVER MA, *et al.* Selective extraction of genotoxic impurities and structurally alerting compounds using polymeric ionic liquid sorbent coatings in solid-phase microextraction: alkyl halides and aromatics [ J ]. *J Chromatogr A*, 2012, 1240: 29
- [ 16 ] BAI L, SUN M, AN J, *et al.* Enhancing the detection sensitivity of trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities by chemical derivatization and coordination ion spray-mass spectrometry [ J ]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217 ( 3 ): 302
- [ 17 ] van WIJK AM, NIEDERLANDER HAG, SIEBUM AHG, *et al.* A new derivatization reagent for LC-MS/MS screening of potential genotoxic alkylation compounds [ J ]. *J Pharm Biomed*, 2013, 74: 133
- [ 18 ] HOOGERHEIDE JG, SCOTT RA. Use of 2-mercaptopyridine for the determination of alkylating agents in complex matrices: application to dimethyl sulfate [ J ]. *Talanta*, 2005, 65 ( 2 ): 453
- [ 19 ] GRINBERG N, ALBU F, FANDRICK K, *et al.* Assay at low ppm level of dimethyl sulfate in starting materials for API synthesis using derivatization in ionic liquid media and LC-MS [ J ]. *J Pharm Biomed*, 2013, 75: 1
- [ 20 ] LEE CR, GUIVARCH F, VAN DAU CN, *et al.* Determination of polar alkylating agents as thiocyanate/isothiocyanate derivatives by reaction headspace gas chromatography [ J ]. *Analyst*, 2003, 128 ( 7 ): 857
- [ 21 ] AN JG, SUN MJ, 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*, 2008, 48 ( 3 ): 1006
- [ 22 ] ALZAGA R, RYAN RW, TAYLOR-WORTH K, *et al.* A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace-gas chromatography-mass spectrometry [ J ]. *J Pharm Biomed*, 2007, 45 ( 3 ): 472
- [ 23 ] BRINKER AM, RASKIN I. Determination of triptolide in root extracts of *Tripterygium wilfordii* by solid-phase extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatography [ J ]. *J Chromatogr A*, 2005, 1070 ( 1-2 ): 65
- [ 24 ] KURSINSZKI L, HANK H, LASZLO I, *et al.* Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 beta-hydroxyhyoscyamine and apoatropine in solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography [ J ]. *J Chromatogr A*, 2005, 1091 ( 1-2 ): 32
- [ 25 ] TAPPIN MRR, NAKAMURA MJ, SIANI AC, *et al.* Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design [ J ]. *J Pharm Biomed*, 2008, 48 ( 4 ): 1090
- [ 26 ] WU L, LIU DQ, VOGT FG, *et al.* Gas-phase derivatization via the Meerwein reaction for selective and sensitive LC-MS analysis of epoxides in active pharmaceutical ingredients [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56 ( 5 ): 1106
- [ 27 ] BRUZZONITI MC, ANDRENESEK S, NOVIC M, *et al.* Determination of epichlorohydrin by sulfite derivatization and ion chromatography: characterization of the sulfite derivatives by ion chromatography-mass spectrometry [ J ]. *J Chromatogr A*, 2004, 1034 ( 1-2 ): 243

- [28] SETOH M, ISHII N, KONO M, *et al.* Discovery of the first potent and orally available agonist of the orphan G-protein-coupled receptor 52 [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(12): 5226
- [29] LUKIN K, HSU MC, 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
- [30] NAKHAI A, BERGMAN J. Synthesis of hydrogenated indazole derivatives starting with alpha, beta-unsaturated ketones and hydrazine derivatives [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(11): 2298
- [31] KOVACIC P, JACINTHO JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer [J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(7): 773
- [32] FORTIN DT, CHEN R. Developing a trace level GC-MS method for detecting methylhydrazine in an experimental drug substance [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(4): 299
- [33] WANG J, YANG S, ZHANG K. A simple and sensitive method to analyze genotoxic impurity hydrazine in pharmaceutical materials [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, 126: 141
- [34] CUI L, JIANG KN, LIU DQ, *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
- [35] SUN MJ, BAI L, LIU DQ. A generic approach for the determination of trace hydrazine in drug substances using in situ derivatization-headspace GC-MS [J]. *J Pharm Biomed*, 2009, 49(2): 529
- [36] DAMIANI E, GRECI L, HRELIA P. Cyto- and genotoxic effects of novel aromatic nitroxide radicals *in vitro* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(3): 330
- [37] STROHMEYER HE, SLUGGETT GW. Determination and control of TEMPO, a potentially genotoxic free radical reagent used in the synthesis of filibuvir [J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 62: 216
- [38] PENNINGTON J, COHEN RD, TIAN Y, *et al.* Development of an LC-MS method for ultra trace-level determination of 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), a potential genotoxic impurity within active pharmaceutical ingredients [J]. *J Pharm Biomed*, 2015, 114: 488
- [39] SNODIN DJ. Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification [J]. *Org Process Res Dev*, 2010, 14(4): 960
- [40] AZNAR M, CANELLAS E, NERIN C. Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(27): 5176
- [41] JURADO-SANCHEZ B, BALLESTEROS E, GALLEGO M. Comparison of several solid-phase extraction sorbents for continuous determination of amines in water by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 79(3): 613
- [42] HUANG MJ, TAI C, ZHOU QF, *et al.* Preparation of polyaniline coating on a stainless-steel wire using electroplating and its application to the determination of six aromatic amines using headspace solid-phase microextraction [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1048(2): 257
- [43] LIU XY, JIA YS, ZHANG HX, *et al.* Highly sensitive analysis of substituted aniline compounds in water samples by using oxidized multiwalled carbon nanotubes as an in-tube solid-phase microextraction medium [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1212(1-2): 10
- [44] BREDE C, SKJEVRAK I, HERIKSTAD H. Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 983(1-2): 35
- [45] ZHAO X, SUO Y. Analysis of primary aromatic amines using precolumn derivatization by HPLC fluorescence detection and online MS identification [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(4): 646
- [46] O'DONOVAN MR, MEE CD, FENNER S, *et al.* Boronic acids—A novel class of bacterial mutagen [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2011, 724(1-2): 1
- [47] GALLOWAY SM, REDDY MV, MCGETTIGAN K, *et al.* Potentially mutagenic impurities: analysis of structural classes and carcinogenic potencies of chemical intermediates in pharmaceutical syntheses supports alternative methods to the default TTC for calculating safe levels of impurities [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2013, 66(3): 326
- [48] HANSEN MM, JOLLY RA, LINDER RJ. Boronic acids and derivatives—probing the structure-activity relationships for mutagenicity [J]. *Org Process Res Dev*, 2015, 19(11): 1507
- [49] PATEL I, VENKATRAMANI CJ, STUMPF A, *et al.* Trace analysis of potentially mutagenic boronic acids and esters in drug substance by ICP-MS [J]. *Org Process Res Dev*, 2017, 21(2): 182
- [50] HAKEN JK, ABRAHAM F. Gas-chromatography of homologous esters XXXIV. Alkyl borate and boronate esters [J]. *J Chromatogr*, 1991, 550(1-2): 155
- [51] NAYLOR S, BENSON LM, TOMLINSON AJ. Application of capillary electrophoresis and related techniques to drug metabolism studies [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 735(1-2): 415
- [52] FORST MB, WARNER AM. Development and validation of non-aqueous capillary electrophoresis methods to analyze boronic esters and acids [J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 64-65: 49
- [53] WOLLEIN U, SCHRAMEK N. Simultaneous determination of alkyl mesitates and alkyl besitates in finished drug products by direct injection GC/MS [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(1-2): 201
- [54] European Directorate for Quality and Medicines & Health Care (EDQM). Methyl, ethyl and isopropyl methanesulfonate in methanesulfonic acid [EB/OL]. [2017-11-11]. [https://www.edqm.eu/sites/default/files/publication\\_calendar\\_for\\_the\\_9th\\_edition\\_pheur.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/publication_calendar_for_the_9th_edition_pheur.pdf)
- [55] COLON I, RICHOLL SM. Determination of methyl and ethyl esters



- of methanesulfonic, benzenesulfonic and p-toluenesulfonic acids in active pharmaceutical ingredients by solid-phase microextraction (SPME) coupled to GC/SIM-MS [J]. *J Pharm Biomed*, 2005, 39 (3-4): 477
- [56] GARCIA A, RUPEREZ FJ, CEPPA F, *et al.* Development of chromatographic methods for the determination of genotoxic impurities in cloperastine fendizoate [J]. *J Pharm Biomed*, 2012, 61: 230
- [57] European Directorate for Quality and Medicines & Health Care (EDQM). Methyl, ethyl and isopropyl methanesulfonate in active substances [EB/OL]. [2017-11-11]. [https://www.edqm.eu/sites/default/files/publication\\_calendar\\_for\\_the\\_9th\\_edition\\_pheur.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/publication_calendar_for_the_9th_edition_pheur.pdf)
- [58] ZHOU J, XU J, ZHENG XY, *et al.* Determination of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in methanesulfonic acid by derivatization followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40 (17): 3414
- [59] SCHULE A, ATES C, PALACIO M, *et al.* Monitoring and control of genotoxic impurity acetamide in the synthesis of zaurategrast sulfate [J]. *Org Process Res Dev*, 2010, 14(4): 1008
- [60] ELIAS G, MATTSON ED, LITTLE JE. An HPLC method for the quantification of butyramide and acetamide at ppb levels in hydrogeothermal waters [J]. *Anal Methods-UK*, 2012, 4(2): 530
- [61] CHO YH, SHIN HS. Determination of trace levels of acetamide, propanamide, and butyramide in surface and drinking water using gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidrol [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 787: 111
- (本文于2017年12月1日收到)

### 《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。