

HPLC-MS/MS 法分析吉非替尼中痕量基因毒性杂质

王珊珊, 宁凡盛, 王晓利, 陈跃, 赵金, 苑金鹏, 赵汝松, 陈相峰

(山东省分析测试中心, 济南 250014)

摘要 目的: 建立液相色谱-串联质谱法测定吉非替尼中基因毒性杂质的含量。方法: 采用 Accucore C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液 (70:30) 为流动相, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C; 采用 ESI 离子源正离子模式, 多反应离子监测 (MRM) 模式下选择离子对 m/z 130.1 → 83.1 (3,4-二氟苯胺) 和 m/z 146.0 → 111.0 (4-氯-3-氟苯胺) 进行测定。结果: 基因毒性杂质 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺的线性浓度范围为 1~24 ng · mL⁻¹, 且线性关系良好 ($r=0.9994$, $r=0.9992$); 检测限为 0.2 mg · kg⁻¹, 定量限为 0.5 mg · kg⁻¹; 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺的精密度试验的 RSD ($n=6$) 分别为 2.3% 和 2.0%; 杂质 3,4-二氟苯胺低、中、高浓度的加标回收率 ($n=3$) 分别为 99.4%、97.0%、105.5%, RSD=8.2%、5.1%、1.7%; 杂质 4-氯-3-氟苯胺低、中、高浓度的加标回收率 ($n=3$) 分别为 102.0%、98.6%、106.0%, RSD 分别为 3.9%、7.9%、2.4%。经检测, 3 批吉非替尼供试品中 3,4-二氟苯胺均未检出, 批号 2 吉非替尼样品中 4-氯-3-氟苯胺有少量检出, 但低于样品的定量限 (<0.5 mg · kg⁻¹)。结论: 本方法操作简便, 结果可靠, 经方法学验证, 可用于吉非替尼药物中基因毒性杂质 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺含量的同时测定。

关键词: 吉非替尼; 基因毒性杂质; 3,4-二氟苯胺; 4-氯-3-氟苯胺; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 07-1309-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.23

Trace determination of genotoxic impurity in gefitinib by HPLC-MS/MS

WANG Shan-shan, NING Fan-sheng, WANG Xiao-li, CHEN Yue, ZHAO Jin, YUAN Jin-peng, ZHAO Ru-song, CHEN Xiang-feng

(Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-MS/MS analytical method for the determination of genotoxic impurity in Gefitinib. **Methods:** The analytical column was ThermoAccucore C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution-0.1% formic acid acetonitrile (70:30), and the flow rate was 0.3 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 30 °C. The detection was achieved in ESI positive ion mode with m/z 130.1 → 83.1 for the determination of 3,4-difluoroaniline and m/z 146.0 → 111.0 for 4-chloro-3-fluoroaniline. **Results:** The calibration curve of 3,4-difluoroaniline and 4-chloro-3-fluoroaniline were in a good linearity over

第一作者 Tel: (0531) 82605340; E-mail: cs_wss@163.com

the range of 1–24 ng · mL⁻¹ ($r=0.999\ 4$ and $0.999\ 2$, respectively). The limit of detection was 0.2 mg · kg⁻¹, and the limit of quantification was 0.5 mg · kg⁻¹. Repetition of genotoxic impurity was fine, with RSD ($n=6$) of 2.3% and 2.0%, respectively. The recoveries ($n=3$) of low, middle and high adding concentrations of 3, 4–difluoroaniline were 99.4%, 97.0%, 105.5%, respectively, and inter-day RSD were 8.2%, 5.1%, 1.7%, respectively. The recoveries ($n=3$) of low, middle and high adding concentrations of 4–chloro–3–fluoroaniline were 102.0%, 98.6%, 106.0%, respectively, and inter-day RSD were 3.9%, 7.9%, 2.4%, respectively. 3, 4–Difluoroaniline was not detected in 3 batches of samples and 4–chloro–3–fluoroaniline in batch number 2 was detected in trace amount, lower than the limit of quantification (<0.5 mg · kg⁻¹). **Conclusion:** The established method is simple, rapid and reliable, which is applicable for both quantification of 3, 4–difluoroaniline and 4–chloro–3–fluoroaniline in Gefitinib.

Keyword: gefitinib; genotoxic impurity; 3, 4–difluoroaniline; 4–chloro–3–fluoroaniline; HPLC–MS/MS

吉非替尼是一种选择性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,作为铂剂化疗(一线化疗)和多烯紫杉醇化疗(二线化疗)都失败的局部晚期或转移性非小细胞(型)肺癌的治疗药物,成为第一种应用于肺癌的靶向药物^[1–6]。合成吉非替尼的主要化学原料为 3–氯–4–氟苯胺,而 3, 4–二氟苯胺和 4–氯–3–氟苯胺是合成 3–氯–4–氟苯胺过程中的附属产物,因其具有基因毒性,应在吉非替尼的生产过程中作为基因毒性杂质控制其含量。目前鲜有文献报道吉非替尼中杂质的测定方法,仅有的几篇报道也都仅限于杂质的液相色谱定量检测^[7–11]。针对痕量基因毒性杂质的质谱定量测定方法还未见报道^[12–15]。本文建立了一种吉非替尼中 2 种基因毒性杂质的质谱定量测定方法,操作简单,灵敏度高,可实现吉非替尼药物中 2 种痕量基因毒性杂质的质量控制。

1 仪器与试剂

U3000 液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司), 5500 型四极杆串联线性离子阱质谱仪(美国应用生物系统公司), XS205 型电子天平(瑞士梅特勒–托利多国际有限公司), Thermo Accucore C18 色谱柱(填料为十八烷基键合硅胶,内径 2.1 mm,长度 100 mm,粒径 2.6 μm;美国赛默飞世尔科技公司)。

吉非替尼样品(未上市,由齐鲁制药有限公司提供), 3, 4–二氟苯胺和 4–氯–3–氟苯胺对照品均由齐鲁制药有限公司提供,乙腈(色谱纯,购自瑞典欧普森公司),甲酸(色谱纯,购自美国如意公司),水(纯净水,购自杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 色谱条件与质谱条件

2.1 色谱条件 采用色谱柱 Accucore C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶),以

0.1% 甲酸水溶液–0.1% 甲酸乙腈溶液(70:30)为流动相,流速 0.3 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样体积 2 μL。

2.2 质谱条件 采用 ESI 离子源正离子模式,多反应离子监测(MRM)模式下选择离子对 m/z 130.1 → 83.1(3, 4–二氟苯胺)和 m/z 146.0 → 111.0(4–氯–3–氟苯胺);解簇电压 90 V(3, 4–二氟苯胺)、76 V(4–氯–3–氟苯胺);解离能量 32 V(3, 4–二氟苯胺)、26 V(4–氯–3–氟苯胺);入口电压 10 V;出口电压 12 V;碰撞气压力 Medium;气帘气压力 1.03 MPa;雾化压力 0.38 MPa;辅助加热气压力 0.38 MPa;离子喷雾电压 5.5 kV;离子源温度 500 °C。

3 溶液的配制

3.1 对照品溶液 精密称取 3, 4–二氟苯胺、4–氯–3–氟苯胺对照品各约 10.01 mg,置 100 mL 量瓶中,加稀释剂乙腈–水(50:50)溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用稀释剂乙腈–水(50:50)稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为 1 μg · mL⁻¹ 对照品储备液;精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用稀释剂乙腈–水(50:50)稀释至刻度,摇匀;精密量取 12 mL,置 100 mL 量瓶中,用稀释剂乙腈–水(50:50)稀释至刻度,摇匀,配成浓度为 12 ng · mL⁻¹ 的对照品溶液。

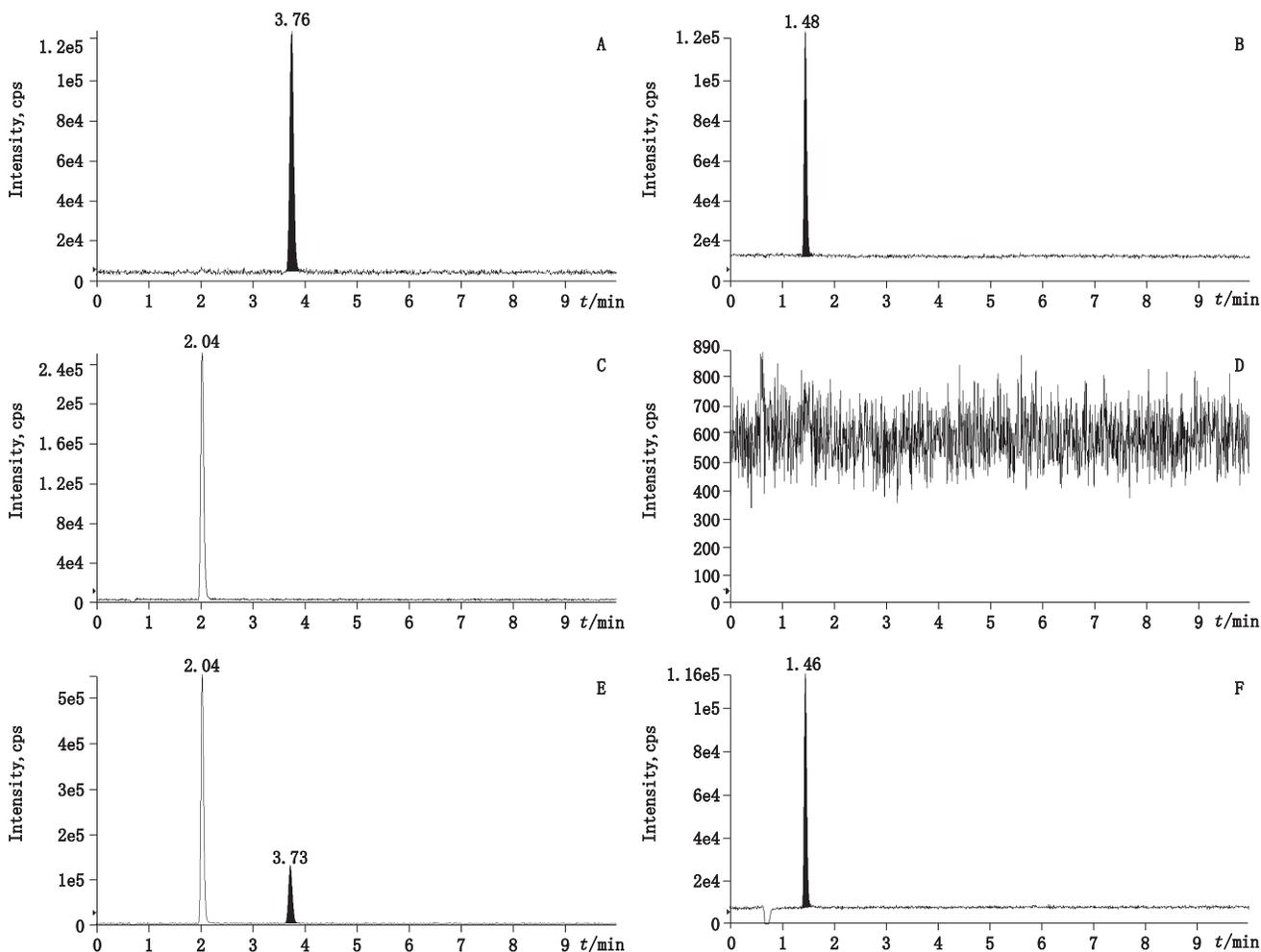
3.2 供试品溶液 精密称取吉非替尼供试品约 20.03 mg,置 10 mL 量瓶中,用稀释剂乙腈–水(50:50)振摇使溶解并稀释至刻度,取 1 mL 置 2 mL 离心管中,12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液,配制成浓度为 2 mg · mL⁻¹ 的吉非替尼供试品溶液。

4 方法学确证

4.1 专属性试验 分别取 12 ng · mL⁻¹ 的 3, 4–二氟苯胺和 4–氯–3–氟苯胺对照品溶液、2 mg · mL⁻¹ 的

吉非替尼供试品溶液、稀释剂乙腈-水(50:50),按上述条件进样分析,记录峰面积,图1的结果显示,本方法3,4-二氟苯胺液质检测的保留时间为1.47 min左右,

4-氯-3-氟苯胺的保留时间为3.75 min左右,空白样品中虽然在2.0 min左右有个杂质峰出现,但对目标物3,4-二氟苯胺和4-氯-3-氟苯胺的检测无干扰。



A. 4-氯-3-氟苯胺对照品(4-chloro-3-fluoroaniline) B. 3,4-二氟苯胺对照品(3,4-difluoroaniline) C. 空白吉非替尼样品中4-氯-3-氟苯胺(4-chloro-3-fluoroaniline in blank Gefitinib sample) D. 空白吉非替尼样品中3,4-二氟苯胺(3,4-difluoroaniline in blank Gefitinib sample) E. 加标样品中4-氯-3-氟苯胺(blank Gefitinib sample spiked with 4-chloro-3-fluoroaniline) F. 加标样品中3,4-二氟苯胺(blank Gefitinib sample spiked with 3,4-difluoroaniline)

图1 专属性试验结果

Fig.1 Results of specificity tests

4.2 线性试验 取 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品储备液,逐级稀释成浓度为24、18、12、9、6、1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,按上述条件进样分析,记录峰面积,以3,4-二氟苯胺的峰面积对浓度进行线性回归,线性方程为:

$$Y = 2.801 \times 10^5 X + 4.517 \times 10^3 \quad r = 0.9994$$

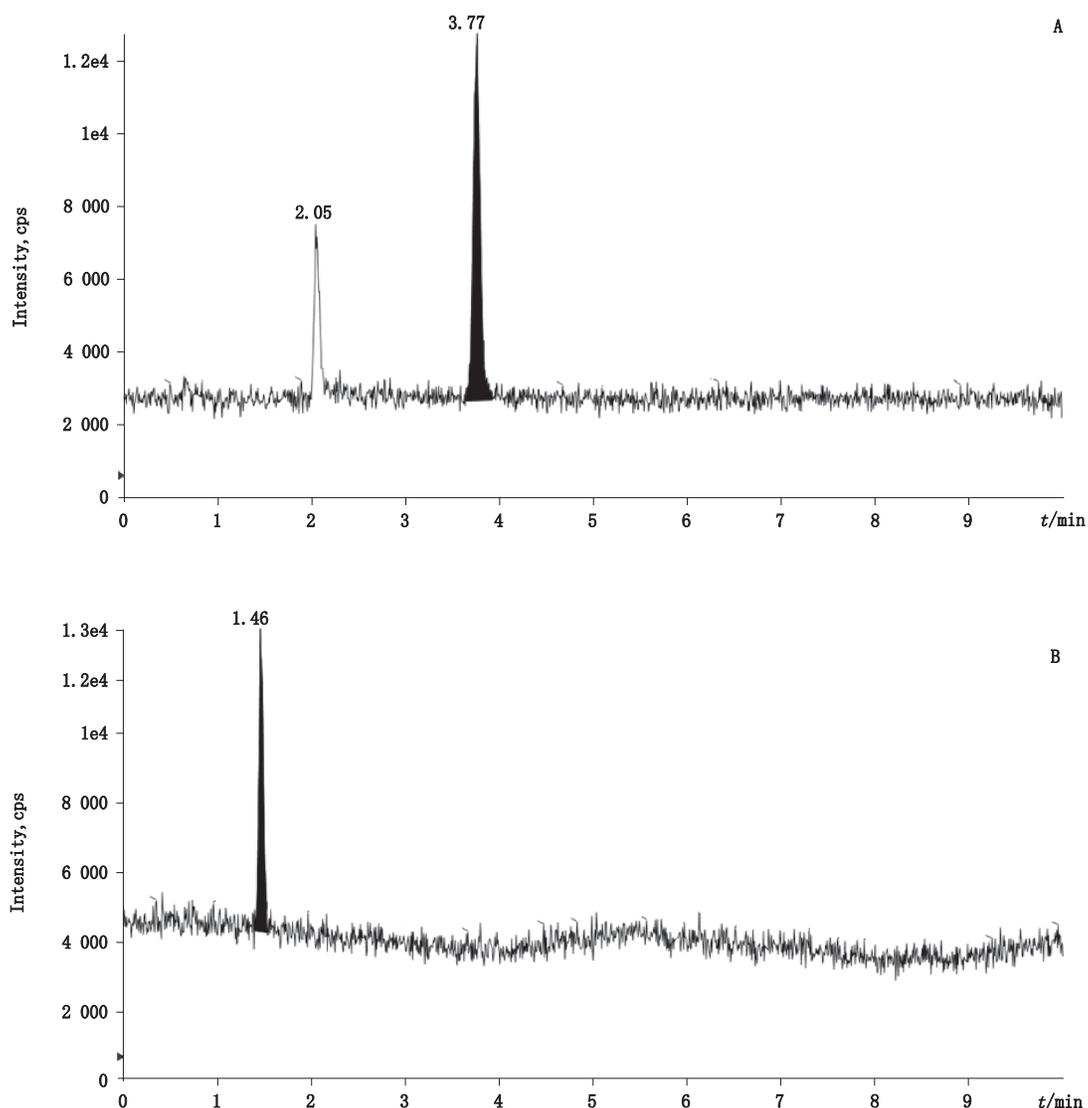
以4-氯-3-氟苯胺的峰面积对浓度进行线性回归,线性方程为:

$$Y = 5.063 \times 10^4 X + 9.593 \times 10^5 \quad r = 0.9992$$

结果表明,3,4-二氟苯胺和4-氯-3-氟苯胺在浓

度 $1 \sim 24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好。

4.3 检测限和定量限 取3,4-二氟苯胺和4-氯-3-氟苯胺对照品储备液逐级稀释,按上述条件进样分析,在满足检测要求的情况下,最终确定 $0.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为方法的检测限浓度, $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为方法的定量限浓度,样品添加 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 定量限浓度对照品溶液的质谱检测结果如图2所示。分别对3,4-二氟苯胺和4-氯-3-氟苯胺定量限浓度的检测稳定性进行考察,计算RSD分别为2.2%和1.7% ($n=6$)。



A. 空白吉非替尼样品中加入 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-氯-3-氟苯胺对照品 (spiked Gefitinib sample with $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-chloro-3-fluoroaniline) B. 空白吉非替尼样品中加入 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3,4-二氟苯胺对照品 (spiked Gefitinib sample with $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3,4-difluoroaniline)

图2 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品添加到样品中的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of spiked sample with $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ control

4.4 精密度试验 取 $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺对照品溶液 $2 \mu\text{L}$ 进样分析, 连续进样 6 针, 记录峰面积, 计算 RSD 分别为 2.3% 和 2.0%。

4.5 回收率试验 精密称定空白吉非替尼供试品约 20 mg 共 9 份, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 1 mL $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺的混标溶液 (低浓度)、 $120 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混标溶液 (中浓度) 和 $180 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混标溶液 (高浓度), 加入稀释剂定容至刻度, 不同浓度同法各配制 3 份。按上述条件进样分析, 结果经计算 3,4-二氟苯胺的低、中、高

3 种浓度的平均回收率 ($n=3$) 分别为 99.4%、97.0%、105.5%, RSD ($n=3$) 分别为 8.2%、5.1%、1.7%。4-氯-3-氟苯胺的低、中、高三种浓度的平均回收率 ($n=3$) 分别为 102.0%、98.6%、105.7%, RSD ($n=3$) 分别为 3.9%、7.9%、2.4%。

4.6 样品检测 按“3.2”项下操作配制 3 批 (批号 1、批号 2、批号 3) 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的吉非替尼供试品溶液各 3 份, 按上述条件进样分析, 结果显示, 3 批吉非替尼供试品中 3,4-二氟苯胺均未检出, 批号 2 吉非替尼样品中 4-氯-3-氟苯胺有少量检出, 但低于样品的定量限 ($<0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

5 结论

本方法经方法学试验验证,能够对吉非替尼中的痕量基因杂质 3,4-二氟苯胺和 4-氯-3-氟苯胺进行准确测定,方法专属强,灵敏度高,满足杂质定量检测的要求,可作为吉非替尼基因毒性杂质的质量控制方法。

参考文献

- [1] SHEPHERD FA, DANCEY J, RAMLAU R, *et al.* Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10): 2095
- [2] 徐建康,车大庆,赵宗敏,等.吉非替尼的合成工艺研究[J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(4): 362
XU JK, CHE DQ, ZHAO ZM, *et al.* Study on synthesis process of gefitinib[J]. *West China J Pharm Sci*, 2012, 27(4): 362
- [3] 徐娟芳,孔雅俊,刘燕,等.抗癌药吉非替尼合成新工艺[J]. *西南科技大学学报*, 2016, 31(3): 25
XU JF, KONG YJ, LIU Y, *et al.* A new synthetic process of Gefitinib—an Anticancer Drug[J]. *J Southwest Univ Sci Technol*, 2016, 31(3): 25
- [4] 陈昊.抗肿瘤药物吉非替尼专利技术分析[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(12): 1326
CHEN H. Analysis of the patent technology for the anti-tumor drug gefitinib[J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 24(12): 1326
- [5] 戴青,马荔.吉非替尼治疗非小细胞肺癌的临床研究进展[J]. *海峡药学*, 2014, 26(11): 6
DAI Q, MA L. Progress in clinical studies of the gefitinib used in the treatment of non-small-cell lung cancer(NSCLC)[J]. *Strait Pharm J*, 2014, 26(11): 6
- [6] 徐风华,郭荣荣,孙华燕.吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2009, 9(2): 218
XUE FH, GUO RR, SUN HY. Systemic evaluation of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. *Chin J Evid-based Med*, 2009, 9(2): 218
- [7] 齐敬敬,孙春艳,褚岩凤,等.HPLC法测定吉非替尼原料药有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(4): 704
QI JJ, SUN CY, CHU YF, *et al.* Determination of related substances of gefitinib raw material by HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(4): 704
- [8] 吴学昊,罗安,叶连宝,等.反相液相色谱法同时测定原料药中吉非替尼及其有关物质的含量[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(1): 35
WU XH, LUO A, YE LB, *et al.* Simultaneous determination of gefitinib and its related substances in raw material drugs by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. *J Instr Anal*, 2016, 35(1): 35
- [9] 梁晓东,马小涛,和龙,等.HPLC法测定吉非替尼原料药的含量和有关物质[J]. *中国药房*, 2015, 26(15): 2138
LIANG XD, MA XT, HE L, *et al.* Determination of the content of gefitinib active pharmaceutical ingredients and related substances by HPLC[J]. *Chin Pharm*, 2015, 26(15): 2138
- [10] 叶连宝,杨杰波,吴杰,等.HPLC测定吉非替尼中的有关物质[J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(5): 526
YE LB, YANG JB, WU J, *et al.* Determination of the related substances in Gefitinib by HPLC[J]. *West China J Pharm Sci*, 2016, 31(5): 526
- [11] 孙春艳,齐敬敬,石莹. HILIC-HPLC法测定吉非替尼原料药的酸降解杂质 X 的含量[J]. *中南药学*, 2017, 15(2): 217
SUN CY, QI JJ, SHI Y. Determination of impurity X in gefitinib raw materials by HPLC with HILIC column[J]. *Central South Pharm*, 2017, 15(2): 217
- [12] 周浩,孟繁华,孙磊,等.LC-MS/MS法定量检测恩格列净原料药中杂质的含量[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(4): 753
ZHOU H, MENG FH, SUN L, *et al.* Related substances in empagliflozin determined by LC-MS/MS[J]. *J Int Pharm Res*, 2016, 43(4): 753
- [13] 董晓燕,陶玮彦,刘孟,等.基于 LC-MS/MS 法的盐酸胍屈嗪片有关物质研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 155
DONG XY, TAO WY, LIU M, *et al.* Study on the related substances in hydralazinehydrochloride tablets by LC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 155
- [14] 张云峰,钱建钦,王建.HPLC-MS/MS法分析氟胞嘧啶中痕量基因毒性杂质 N,N-二甲苯胺[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(2): 265
ZHANG YF, QIAN JQ, WANG J. Determination of trace level of genotoxic impurity N,N-dimethylaniline in flucytosine by HPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(2): 265
- [15] 阮晓玲,郑项元,徐洁,等.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*, 2016, 47(3): 267
RUAN XL, ZHENG XY, XU J, *et al.* Advances in analytical techniques for the determination of genotoxic impurities in pharmaceuticals[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(3): 267

(本文于 2016 年 7 月 20 日收到)