2025 年 11 月 色 谱 Vol.43 No.11
November 2025 Chinese Journal of Chromatography 1262~1267

技术与应用 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.04017

高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱法测定克唑替尼原料药中的基因毒性杂质

占小兵[1,2]，秦 怡[1]，颜 滢[1]，周 婕[1]，赵龙山[1*]

（1. 沈阳药科大学，辽宁 沈阳 110016；2. 江苏万邦生化医药集团有限责任公司，江苏 徐州 221000）

摘要：建立了一种高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱（HPLC-ESI-MS/MS）方法，用于测定克唑替尼原料药中潜在基因毒性杂质（WHT1408-Q2H）的含量。实验中利用 Agilent Eclipse XDB C8 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3.5 μm），以 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈为流动相，流速为 0.4 mL/min，梯度洗脱，柱温为 40 ℃，进样量 5 μL；质谱部分采用电喷雾正离子（ESI^+）多反应监测（MRM）扫描模式，杂质 WHT1408-Q2H 的$[M+H]^+$母离子为 *m/z* 205.3，碎片离子为 *m/z* 121.0。结果显示，所建立的方法专属性良好，WHT1408-Q2H 在 2~40 ng/mL 范围内呈现出良好的线性关系，相关系数（*r*）为 0.999 9；检出限为 0.396 9 ng/mL，定量限为 1.984 6 ng/mL；在低、中、高 3 个水平下的回收率为 95.6%~102.7%，RSD 为 0.4%~0.7%。应用该方法对 3 批克唑替尼原料药样品中的 WHT1408-Q2H 进行测定，3 批样品中均未检出 WHT1408-Q2H，表明当前生产工艺可有效控制该基因毒性杂质的含量。该方法专属性强，灵敏度高，操作简单，适用于克唑替尼原料药中基因毒性杂质 WHT1408-Q2H 的严格质量控制。依据 M7 基因毒性杂质指导原则，该方法能够准确定量测定痕量的遗传毒性杂质，将进一步确保药物符合监管要求并保障药物安全。未来该分析方法将扩展到其他治疗药物中类似的遗传毒性杂质评估，从而推进药物杂质分析和控制。

关键词：非小细胞肺癌；克唑替尼原料药；基因毒性杂质；高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Determination of genotoxic impurity in the bulk drug of crizotinib by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

ZHAN Xiaobing[1,2], QIN Yi[1], YAN Ying[1], ZHOU Jie[1], ZHAO Longshan[1*]

(*1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Jiangsu Wanbang Biopharmaceuticals, Xuzhou 221000, China*)

Abstract: A method based on high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) was developed for the determination of the potential genotoxic impurity (WHT1408-Q2H) in the bulk drug of crizotinib. An Agilent Eclipse XDB C8 chromatographic column (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) was used for chromatographic separation. The mobile phases were 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution at a flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was maintained at 40 ℃ and the sample size was 5 μL. In the mass spectrometry section, the electrospray positive ion (ESI^+) mode with multiple reaction monitoring (MRM) scanning was adopted. The accurate mass of the $[M+H]^+$ parent ion of WHT1408-Q2H was *m/z* 205.3, and the accurate mass of the extracted fragment ion was *m/z* 121.0. The results of methodological validation demonstrated that the established method exhibited excellent specificity. The peak area and mass concentration of WHT1408-Q2H exhibited a good linear relationship within the range of 2–40 ng/mL, with a correlation coefficient (*r*) of 0.999 9. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for WHT1408-Q2H were 0.396 9 ng/mL and 1.984

收稿日期：2025-04-13

* **通讯联系人**. Tel：(024)43520571，E-mail：longshanzhao@163.com.

6 ng/mL, respectively. The recoveries of WHT1408-Q2H at low, medium, and high levels were in the range of 95.6%-102.7%, while the relative standard deviations (RSDs) were between 0.4% and 0.7%. Finally, the proposed method was successfully applied to analyze three independent batches of the bulk drug of crizotinib. The results revealed that WHT1408-Q2H was not detected in all samples, indicating that the current production process can effectively control the content of this genotoxic impurity. In conclusion, the developed HPLC-ESI-MS/MS method is highly specific, sensitive, and simple, making it suitable for the stringent quality control of WHT1408-Q2H in the bulk drug of crizotinib. According to the M7 guideline on genotoxic impurities, this method is capable of accurately quantifying trace amounts of genotoxic impurities and will further ensure compliance with regulatory requirements and safeguard drug safety. Future applications may extend this analytical framework to similar genotoxic impurities assessment in other therapeutic compounds, thereby advancing the field of pharmaceutical impurity profiling and control.

Key words: non-small cell lung cancer; the bulk drug of crizotinib; genotoxic impurity; high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)

肺癌是世界范围内最常见的癌症之一，根据癌细胞的形态及外观大小可分为非小细胞癌，小细胞癌和混合小细胞癌。其中非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的形式，占所有肺癌的 85%[1,2]。研究表明，治疗 NSCLC 的靶点有表皮因子生长受体(EFGR)、间质表皮转化因子(MET)、渐变性淋巴瘤激酶(ALK)等[3-5]。克唑替尼是第一代被研究的 ALK 和 MET 抑制剂，对于既往接受过治疗的 ALK 重排晚期非小细胞肺癌患者，克唑替尼优于标准化疗，能够延长患者无进展生存期，改善生活质量[6,7]。

基因毒性杂质(genotoxic impurity, GTI)是一类能够直接或间接损伤 DNA、诱发基因突变或染色体畸变的化合物，即使在痕量水平也可能对患者构成潜在的致癌风险[8]。因此，各国药品监管机构(如人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)、美国食品药物管理局(FDA)、欧洲药品管理局(EMA))对药物中 GTI 的控制提出了严格要求[9]，其中 ICH M7 指导原则明确了此类杂质的鉴定、评估和限量标准，通常要求其含量控制在毒理学关注阈值(TTC)以下。WHT1408-Q2H 是由偶氮二羧酸二异丙酯通过光延反应过程生成的，是克唑替尼原料药合成工艺的一个副反应产物。这个杂质具有肼的警示结构(见图 1)，在体内可能主要通过代谢活化生成碳正离子和碳氧中心自由基等活性较强的中间体，再与 DNA 碱基发生烷基化反应，是一种潜在的 GTI[10]。然而，目前尚未有针对 WHT1408-Q2H 杂质检测的方法，因此，开发一种快速、简便的方法对其进行高效检测至关重要。

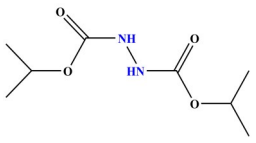


图 1　基因毒性杂质 WHT1408-Q2H 的警示结构

Fig. 1　Warning structure of genotoxic impurity WHT1408-Q2H

本文建立了一种高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)方法，用于检测克唑替尼原料药中潜在的 WHT1408-Q2H，并进行了系统的方法学验证。由于缺乏相关安全性研究数据，因此根据 ICH M7 以及《中国药典》2020 年版四部通则 9306 遗传毒性杂质控制指导原则[11]，采用 TTC 可接受摄入值计算限度：本品最大日剂量为 0.5 g，其治疗期为 1~10 年，则该杂质允许最大日摄入量 10 μg/d，其限度为 20 ng/mg。

引用本文：占小兵，秦怡，颜滢，周婕，赵龙山. 高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱法测定克唑替尼原料药中的基因毒性杂质. 色谱，2025，43(11)：1262-1267.

ZHAN Xiaobing, QIN Yi, YAN Ying, ZHOU Jie, ZHAO Longshan. Determination of genotoxic impurity in the bulk drug of crizotinib by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(11): 1262-1267.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 6470 高效液相色谱-三重四极杆质谱联用系统(Agilent 公司,美国);XS205 十万分之一天平(Mettler Toledo 公司,瑞士)。甲酸、乙腈(HPLC 级,上海麦克林生化科技股份有限公司);克唑替尼原料药(批号:WHT1408-Y-190804、WHT1408-Y-221019、WHT1408-Y-221022、WHT1408-Y-221028,江苏万邦生化医药集团有限责任公司);WHT1408-Q2H(批号:H1821918,含量:97%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 实验条件

1.2.1 对照品溶液的制备

精密称取 WHT1408-Q2H 对照品 20.00 mg,以水-乙腈(30∶70,v/v)为稀释剂,制成质量浓度为 1 μg/mL 的对照品储备液。精密量取 1 mL 对照品储备液置于量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度为 20 ng/mL 的对照品溶液。

1.2.2 样品前处理

取克唑替尼原料药(批号:WHT1408-Y-190804)约 50 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加入水-乙腈(30∶70,v/v)溶解并稀释至刻度,摇匀即得,作为供试品溶液。

1.2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C8 色谱柱(150 mm×4.6 mm,3.5 μm),柱温为 40 ℃,流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱程序如下:0~10.0 min,10%B~95%B;10.0~10.1 min,95%B ~ 10%B;10.1~15.0 min,10%B。流速为 0.4 mL/min,进样量为 5 μL。

六通阀切换设置:时间为 5.0~8.0 min 时,流动相进入废液,其余时间流动相进入质谱检测。

1.2.4 质谱条件

电喷雾正离子化(ESI^+),多反应检测(MRM)模式,鞘气温度为 250 ℃,鞘气流速为 11 L/min,喷嘴电压为 500 V,雾化器压力为 241 325 Pa,毛细管电压为 4 000 V,干燥气流速为 5 L/min,干燥气温度为 300 ℃;WHT1408-Q2H 的检测离子对为 m/z 205.3(母离子)、m/z 121.0(子离子),裂解电压为 65 V,碰撞能量为 5 eV。

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 色谱条件的优化

流速的考察:本研究对流动相流速进行了考察,分别评估了 0.8 mL/min 与 0.4 mL/min 两种流速条件下 WHT1408-Q2H 的色谱响应特性。结果显示,流速为 0.8 mL/min 时,没有出现目标物峰(图 2a);当流速调整为 0.4 mL/min 时,目标杂质的色谱响应强度明显增强(图 2b),且呈现多峰状态。基于此优化结果,为确保分析方法具有最佳的检测灵敏度,最终确定采用 0.4 mL/min 作为方法开发的优选流速条件。

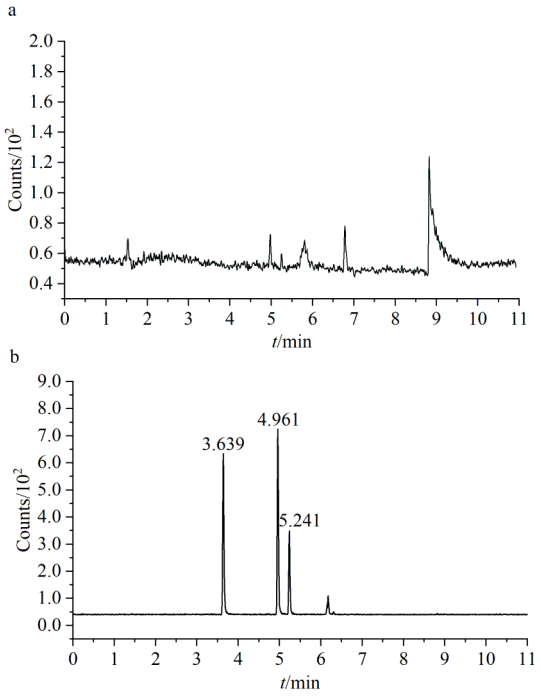


图 2 以(a)0.8 mL/min 与(b)0.4 mL/min 作为流速时对照品溶液的 TIC 色谱图

Fig. 2 TIC chromatograms of a control solution at flow rates of (a) 0.8 mL/min and (b) 0.4 mL/min

Column: Agilent Eclipse XDB C8 column (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); mobile phase: 0.1% formic acid aqueous solution (A) -0.1% formic acid acetonitrile solution (B). Gradient elution: 0–5.0 min, 30%B–95%B; 5–7 min, 95%B; 7–7.01 min, 95%B–30%B; 7.01–11.0 min, 30%B. The column temperature was set at 40 ℃, and the injection volume was 5 μL.

洗脱程序的考察:在流速为 0.4 mL/min 条件下,杂质 WHT1408-Q2H 呈现多响应质谱峰,经结构解析确认系其烯醇-酮式互变异构现象所致[12]。在 WHT1408-Q2H 结构中,由于羰基的作用,α-H 变得非常活泼,呈现出酸性特性,因此会以烯醇式和

酮式之间的平衡状态存在,并不断发生互变。相较于酮式,烯醇式的最大吸收波长向长波长方向移动,同时吸光度也有所增加。在极性方面,酮式状态缺乏亲水基团,极性非常小;而烯醇式状态引入了羟基,极性显著增大。因此在定量分析中,烯醇式极性增加,在反相色谱上的保留能力较弱,导致出峰时间较早。同时,其光谱图和响应值也可能与酮式有所不同。因此,可通过改变流动相中有机相的比例改变流动相极性、pH 值来规避这种互变异构现象[13]。根据文献报道,降低初始有机相比例(即增大极性)可促进酮式构型稳定化。经实验验证,发现降低初始有机相比例后,杂质 WHT1408-Q2H 只有一个峰,保留时间为 7.0 min,但此条件下供试品的主要物质的保留时间为 5.5 min,且在 6.3 min 时完全出峰,与杂质 WHT1408-Q2H 分离效果差。

因此,为实现供试品与杂质峰的有效分离,本研究对梯度洗脱程序进行了进一步的系统性优化。通过调节有机相比例,最终确定的洗脱条件如 1.2.3 节所示。优化后的对照品溶液色谱图如图 3 所示,WHT1408-Q2H 的保留时间为 9.1 min。优化后的供试品溶液色谱图如图 4 所示,保留时间为 6.5 min,在约 7.2 min 完全出峰,说明 WHT1408-Q2H 与供试品分离度改善。

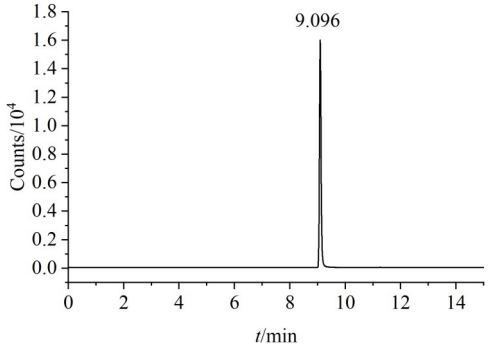


图 3　优化条件下 WHT1408-Q2H 对照品溶液的 TIC 色谱图

Fig. 3　TIC chromatogram of WHT1408-Q2H control solution under optimized conditions

Gradient elution: 0–10.0 min, 10%B–95%B; 10.0–10.1 min, 95%B–10%B; 10.1–15.0 min, 10%B. Other conditions are the same as in Fig. 2.

样品盘温度的考察:样品盘控温过程中可能产生冷凝水,若冷凝水积聚未能及时排出,仪器检测系统会触发报错机制导致分析序列中断,从而增加实验异常风险。为此,本研究对样品在室温条件下

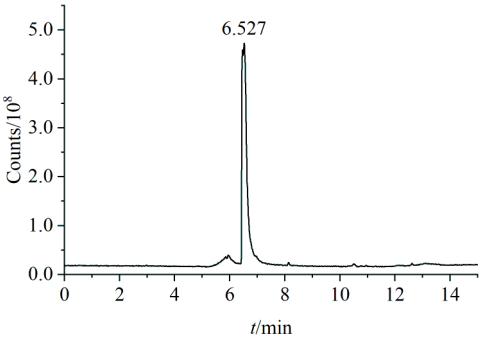


图 4　优化条件下供试品溶液的 TIC 色谱图

Fig. 4　TIC chromatogram of test solution under optimized conditions

The chromatogram conditions are the same as in Fig. 3.

的稳定性(分别放置 0、2、4、7、9 h)进行了系统考察。结果表明,对照品及供试品溶液的色谱峰面积均未呈现显著性变化(对照品峰面积的 RSD 为 9.7%,供试品溶液的 RSD 为 7.0%,均<10%),证明杂质 WHT1408-Q2H 对照品溶液与供试品溶液在室温条件下具有良好的化学稳定性。基于此实验结果,建议取消样品盘控温设置,且该操作不会对分析结果的准确性产生显著影响

2.1.2　质谱条件的优化

采用电喷雾电离源(ESI),分别在正、负离子模式下对目标化合物 WHT1408-Q2H(相对分子质量 204.23)进行母离子扫描。该化合物在正离子模式下易形成 *m/z* 205.3 的准分子离子峰[M+H]⁺,故选择正离子模式进行后续质谱参数优化。

首先在选择离子监测(SIM)模式下对裂解电压进行系统优化。随后采用 MRM 模式,通过梯度测试(50~90 V,步长 5 V)考察裂解电压对离子传输效率的影响。基于信号响应强度,最终确定 65 V 为最优裂解电压。

在产物离子扫描模式下,对特征碎片离子进行筛选及碰撞能量(CE)优化。选择 *m/z* 205.3/121.0 作为定量离子对,通过对比不同碰撞能量(3、5、7、10 eV)下的离子丰度,确定 5 eV 为最佳碰撞能量。最佳质谱条件如 1.2.4 节所示,WHT1408-Q2H 杂质的二级质谱图如图 5 所示。

2.2　方法学验证

2.2.1　专属性

精密进样空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液各 5 μL。通过对照品溶液确证杂质 WHT1408-Q2H 的保留时间为 9.151 min。空白溶剂及供试品溶液色谱图中,目标杂质峰保留时间处未见显著干

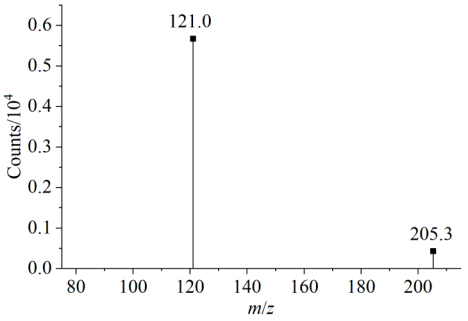


图 5 WHT1408-Q2H 的二级质谱图
Fig. 5 MS^2 spectrum of WHT1408-Q2H

扰峰(*S/N*<3),表明该方法对目标杂质具有良好的分析专属性,符合方法学验证要求[10]。相关色谱图见图 6。

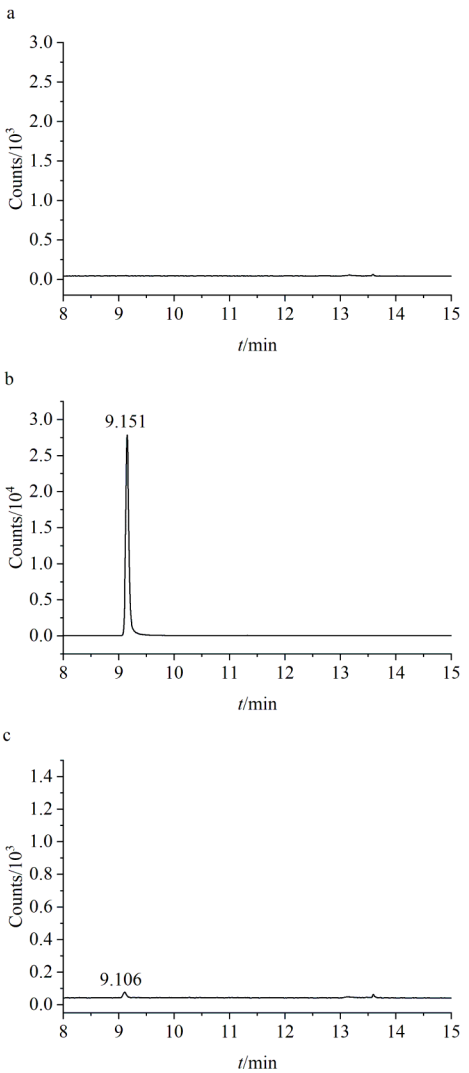


图 6 (a)空白溶剂、(b)对照品溶液和(c)供试品溶液的 TIC 图
Fig. 6 TIC chromatograms of (a) a blank solvent, (b) control solution and (c) test solution
Conditions are the same as in Fig. 3.

2.2.2 线性关系

精密量取 WHT1408-Q2H 对照品储备液适量,稀释成 2、6、10、20、30、40 ng/mL 系列标准溶液,进样分析。以峰面积为 y,质量浓度(ng/mL)为 x,不加权重拟合线性校正曲线,建立线性回归方程:y=6.320×10^3x−4.572×10^3, r=0.999 9。结果表明 WHT1408-Q2H 的峰面积与其质量浓度在 2~40 ng/mL 范围内呈现良好的线性关系。

2.2.3 检出限和定量限

精密量取 1.2.1 节的对照品储备溶液,用稀释剂逐级稀释,按照 *S/N*≥3 和≥10 分别计算检出限和定量限。结果表明,杂质 WHT1408-Q2H 的检出限为 0.396 9 ng/mL(即 0.396 9 ng/mg),相当于限度浓度[10](20 ng/mg)的 2%;定量限为 1.984 6 ng/mL(即 1.984 6 ng/mg),相当于限度浓度的 10%。6 次定量限平行试验中,峰面积的 RSD(n=6)为 0.73%,不大于 15%,重复性良好,且 *S/N* 均大于 10,说明本方法的最低检测能力满足使用要求。

2.2.4 精密度

取 WHT1408-Q2H 对照品溶液,连续进样 6 次,WHT1408-Q2H 峰面积的 RSD(n=6)为 0.49%,表明本方法的仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性

取对照品溶液于进样瓶中,按照实验条件分别放置 0、2、5、8、11、14、16、19 h 后进样测定。结果显示 WHT1408-Q2H 峰面积的 RSD(n=8)为 1.0%,说明该条件下 WHT1408-Q2H 在 19 h 内稳定性良好。

2.2.6 回收率

取克唑替尼原料药约 50 mg,精密称取 9 份(低、中、高水平各 3 份),分别精密加入对照品储备液各 0.5、1、1.5 mL,用稀释剂溶解并稀释至刻度,得到加标回收试验用供试品溶液,分别进样分析。结果如表 1 显示,克唑替尼原料药的加标回收率为 95.6%~102.7%, RSD (n=3) 为 0.4%~0.7%, 不大于 15%,符合药典规定,说明本方法的准确度良好。

表 1 克唑替尼中杂质 WHT1408-Q2H 的加标回收率(n=3)
Table 1 Spiked recoveries of the impurity WHT1408-Q2H in crizotinib (n=3)

Added/(ng/mL)	Recovery/%	RSD/%
9.9231	95.6	0.7
19.8462	100.2	0.4
29.7693	102.7	0.4

2.2.7　实际样品检测

取 3 批克唑替尼原料药(批号:WHT1408-Y-221019、WHT1408-Y-221022、WHT1408-Y-221028),按 1.2.2 节方法制备供试品溶液,按已验证的方法进样测定。以外标法计算 WHT1408-Q2H 的含量,3 批克唑替尼原料药样品中均未检出杂质 WHT1408-Q2H,表明克唑替尼原料药生产企业在生产工艺中对基因毒性杂质控制良好。

3　结论

本文建立了 HPLC-ESI-MS/MS 测定克唑替尼原料药中基因毒性杂质 WHT1408-Q2H 的方法,该方法展现出高灵敏度、准确度以及良好的重现性,符合 ICH M7 指导原则的要求。此外,该方法的建立不仅为克唑替尼中基因毒性杂质的检测提供了有力的工具,也为其他药物中类似杂质的检测提供了参考和借鉴。随着药物分析技术的不断发展,该方法有望在未来得到更广泛的应用和推广,为药物质量控制和安全性评价提供更有力的支持。

参考文献:

[1] Wang S J, Liu G W, Yu L S, et al. Transl Lung Cancer R, 2024, 13(11): 3175
[2] Huang X F, Chen Q, Ren Y X, et al. BMJ Open, 2024, 14(11): e090728
[3] Nicolas Z, Cheuk H L, William N W, et al. J ImmunoTher Cancer, 2024, 12(10): e009677
[4] Nadia G, Jamie F, Katrina H, et al. The Adv Med Oncol, 2024, 42(16): 8052
[5] Li S, Zhu S, Wei H, et al. Biomed Pharmacother, 2022, 156: 113959
[6] Shaw A T, Kim D W, Nakagawa K, et al. New Engl J Med, 2013, 368(25): 2385
[7] Kang L, Wang Y, Fang Q, et al. World Clinical Drug, 2024, 45(10): 1091
康乐, 王彦, 方琦, 等. 世界临床药物, 2024, 45(10): 1091
[8] Birla D, Khandale N, Ravindra B M, et al. Microchem J, 2024, 202: 110828
[9] Anita R P, Milind J U, Krishna R G. Asian J Pharm Clin Res, 2020, 13(6): 10
[10] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part Ⅳ. Beijing: China Medical Science Press, 2020
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 版, 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020
[11] Benigni R, Bossa C. Chem Rev, 2011, 111(4): 2507
[12] Kawano S, Inohana Y, Hashi Y, et al. Chinese Chem Lett, 2013, 24(8): 685
[13] Fei W Q. Guide of China Medicine, 2008, 6(14): 35
费文庆. 中国医药指南, 2008, 6(14): 35