

超高效液相色谱-串联质谱法测定厄贝沙坦和氯沙坦钾原料药中 3 种叠氮类基因毒性杂质

黄海伟,袁松,张龙浩,何兰,张庆生

(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] **目的:**建立厄贝沙坦原料药和氯沙坦钾原料药中 5-[4'-(叠氮甲基)-[1,1'-联苯]-2-基]-1*H*-四氮唑(MB-X),4'-叠氮甲基-[1,1'-联苯]-2-氰基(AZBC)和 5-[4'-((5-(叠氮甲基)-2-丁基-4-氯-1*H*-咪唑-1-基)甲基)-[1,1'-联苯]-2-基)-1*H*-四唑(LADX)这 3 种叠氮类基因毒性杂质的超高效液相色谱-串联(UPLC-MS/MS)三重四级杆质谱的检测方法。**方法:**ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱;0.1%甲酸水溶液为流动相 A,0.1%甲酸的甲醇溶液为流动相 B,梯度洗脱;流速为 0.35 mL·min⁻¹,柱温为 50℃;采用大气压化学离子源(APCI)正/负离子扫描,多反应监测(MRM)模式对 3 种基因毒性杂质同时进行定量检测。**结果:**3 种杂质在 0.5~100 ng·mL⁻¹范围内具有良好的线性关系;检测限分别为 0.05,0.03,0.02 ng·mL⁻¹,定量限分别为 0.15,0.11,0.08 ng·mL⁻¹;3 种杂质在厄贝沙坦原料药中,低、中、高 3 个浓度的加样回收率(*n*=3)范围为 94.5%~103.5%,相对标准偏差(RSD)<3.88%;在氯沙坦钾原料药中,低、中、高 3 个浓度的加样回收率(*n*=3)范围为 93.8%~100.9%,RSD<4.25%。**结论:**该方法灵敏度高、专属性强,可用于测定厄贝沙坦原料药和氯沙坦钾原料药中 3 种叠氮类基因毒性杂质,为厄贝沙坦和氯沙坦钾的质量控制提供技术支持。

[关键词] 厄贝沙坦;氯沙坦钾;叠氮类基因毒性杂质;含量测定;超高效液相色谱-串联质谱

[中图分类号] R927.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)07-0742-05

Determination of three azides genotoxic impurities in irbesartan and losartan potassium active pharmaceutical ingredients by UPLC-MS/MS

HUANG Hai-wei, YUAN Song, ZHANG Long-hao, HE Lan, ZHANG Qing-sheng

(Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs of NMPA, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC-MS/MS method for determination of three azide-type genotoxics, 5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1*H*-tetrazole (MB-X), 4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile (AZBC), and 5-(4'-((5-azido-2-butyl-4-chloro-1*H*-imidazol-1-yl) methyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1*H*-tetrazole (LADX), in active pharmaceutical ingredients (API) of irbesartan and losartan potassium. **Methods:** The separation was performed on a ACQUITY UPLC HSS T3 column(100 mm×2.1 mm,1.8 μm) with the mobile phases consisting of 0.1% formic acid aqueous solution(mobile phase A) and 0.1% formic acid methanol solution(mobile phase B) using a gradient elution at a flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 50℃. Multiplereaction monitoring (MRM) was performed on a triple quadrupole mass spectrometer equipped with a APCI source in positive/negative mode. **Results:** the calibration curve was linear for three compounds in the range of 0.5~100 ng·mL⁻¹. The recoveries (*n*=3) in irbesartan of low, middle, high concentration-spiked samples are 94.5%~103.5% with

[作者简介] 黄海伟,男,副研究员,主要从事药品质量控制研究。E-mail:huanghw@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 张庆生,男,主任药师,主要从事药品质量安全研究。E-mail:zqs@nifdc.org.cn。

RSD < 3.88%. The recoveries ($n = 3$) in losartan potassium of low, middle, high concentration-spiked samples are 93.8% ~ 100.9% with RSD < 4.25%. The limits of detection are 0.05, 0.03, 0.02 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the limits of quantification are 0.15, 0.11, 0.08 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The method is sensitive and accurate, which is applicable for quantification of three azide-type genotoxic impurities in irbesartan API and losartan potassium API. The method can provide reference for quality control of irbesartan and losartan potassium.

[Key words] irbesartan; losartan potassium; azides genotoxic impurity; assay; UPLC-MS/MS

沙坦类药物是一种选择性、非竞争性血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂,用于治疗高血压病^[1],其特点为作用机制新颖、疗效确切且不良反应少,是治疗高血压的一线药物^[2-3]。2021年6月英国药品和保健品产品监管署(UK Medicines and Healthcare Products Agency)就其正在调查的沙坦类药物发出召回通报^[4],Bristol Laboratories Limited公司宣布召回10批次厄贝沙坦片和厄贝沙坦原料药,Brown and Bulk UK Limited公司召回18批次厄贝沙坦片和3批次厄贝沙坦氢氯噻嗪片,Teva UK Limited公司召回2批次氯沙坦钾片。此次召回是因为在这些制剂中检测出含5-[4'-(叠氮甲基)-[1,1'-联苯]-2-基]-1*H*-四氮唑(MB-X,结构见图1A),沙坦类化合物某些生产路线中需用到叠氮化钠以生成四氮唑结构^[5-8],叠氮化钠可能与工艺中间体反应生成潜在的致突变化合物;厄贝沙坦的工艺中间体4'-溴甲基-2-氰基联苯可与叠氮化钠反应生成4'-叠氮甲基-[1,1'-联苯]-2-氰基(AZBC,结构见图1B),进而生成5-[4'-(叠氮甲基)-[1,1'-联苯]-2-基]-1*H*-四氮唑;氯沙坦钾的生产工艺中采用叠氮化生成终产品的同时,还有可能继续反应生成5-[4'-[(5-(叠氮甲基)-2-丁基-4-氯-1*H*-咪唑-1-基)甲基)-[1,1'-联苯]-2-基]-1*H*-四氮唑(LADX,结构见图1C),这些杂质为国际人用药品注册技术协调会(ICH)M7中规定的2类杂质,即潜在的致突变化合物^[9],目前已有监管机构发布针对MB-X和AZBC这2种潜在遗传毒性杂质进行控制的方法^[10-11],尚未见沙坦类药物中同时检测这3种杂质的报道。

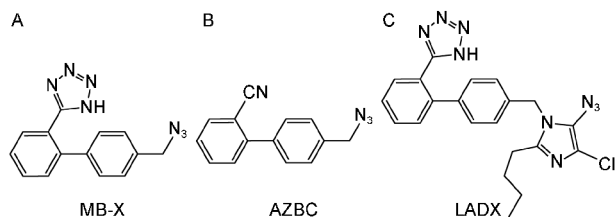


图1 3种基因毒性杂质化学结构

根据 ICH M7 指导原则,分类为 2 类杂质的毒理学关注阈值(TTC)为 1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。在厄贝沙坦每日最大给药剂量为 300 mg 的情况下,MB-X, AZBC 和 LADX 的残留限度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,在氯沙坦钾每日最大给药剂量 100 mg 的情况下,MB-X, AZBC 和 LADX 的残留限度为 15 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。基因毒性杂质的检测需要很高的灵敏度和专属性,液相色谱-质谱联用技术已成为基因毒性杂质检查的常用手段^[12-13]。本研究首次建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定 MB-X, AZBC 和 LADX,并应用于厄贝沙坦原料药和氯沙坦钾原料药的监测和控制,确保药品的质量安全。该方法简单、快速,为厄贝沙坦原料药和氯沙坦钾原料药中叠氮类基因毒性杂质的检查提供技术支持。

材 料

1 试药与试剂

MB-X 对照品(批号:IRS200801,纯度:100%)、AZBC 对照品(批号:2020-5365,纯度:97.4%)、LADX 对照品(批号:IRS210701,纯度:100%)均由浙江天宇药业股份有限公司提供;厄贝沙坦原料药(厂家1,批号:1018-1807003V;厂家2,批号:0101020180303;厂家3,批号:80318100502);氯沙坦钾原料药(厂家4,批号:C5398-18-027,C5398-18-028,C5398-18-029,C5398-18-030;厂家5,批号:10100-181003,10100-181014,10100-190302,10100-181021,10100-190303,10100-190304);甲醇(Merck KgaA公司,LC-MS级);水(Fisher Chemical公司,LC-MS级);甲酸(SIGMA-ALDRICH公司,LC-MS级)。

2 仪器

ACQUITY CLASS PLUS 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、Xevo TQ-XS 三重四级杆质谱检测器(美国 Waters 公司);XP205DR 0.01 mg 电子天平(美国 METTLER TOLEDO 公司);XPE26 0.001 mg 电子天平(美国 METTLER TOLEDO 公司)。

方法与结果

1 色谱及质谱条件

1.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 以 0.1% 甲酸的水溶液作为流动相 A, 以 0.1% 甲酸的甲醇溶液作为流动相 B, 梯度洗脱 (0.0 ~ 9.0 min, B 50% ~ 90%; 9.0 ~ 12.0 min, B 90%; 12.0 ~ 12.1 min, B 90% ~ 50%);

12.1 ~ 16.0 min, B 50%); 流速为 0.35 mL·min⁻¹, 柱温为 50 °C, 进样盘温度为 20 °C, 进样量为 10 μL。

1.2 质谱条件 采用大气压化学离子源 (APCI), 正/负离子检测模式, 锥孔气体积流量为 150 L·h⁻¹, 脱溶剂气体积流量为 1 000 L·h⁻¹, 离子源温度为 150 °C, 脱溶剂气温度为 400 °C, 毛细管电压为 3.5 kV (APCI+) 和 3.0 kV (APCI-), 采集方式为多反应监测 (MRM) 模式, MRM 参数见表 1。

表 1 UPLC-MS/MS 的 MRM 参数

化合物	扫描模式	采集时间/min	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
MB-X	APCI-	2.20 ~ 4.00	276.0	192.1 ^a	25	10
				165.1		15
AZBC	APCI+	4.00 ~ 5.20	207.1	151.1 ^a	20	30
				179.1		15
LADX	APCI+	4.80 ~ 6.00	448.10	207.10 ^a	40	20
				405.10		10

a: 定量离子

2 溶液配制

2.1 对照品溶液制备 取 MB-X 对照品、AZBC 对照品、LADX 对照品各约 2 mg, 精密称定, 分别置于 20 mL 量瓶中, 加水-甲醇 (1:1) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为各杂质对照品储备液。

2.2 供试品溶液制备 取厄贝沙坦原料药约 20 mg, 精密称定, 置于 20 mL 量瓶中, 加甲醇约 10 mL, 略超声使其溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为厄贝沙坦供试品溶液。取氯沙坦钾原料药约 20 mg, 精密称定, 置于 20 mL 量瓶中, 加水-甲醇 (1:1) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 用水-甲醇 (1:1) 稀释至刻度, 摇匀, 作为氯沙坦钾供试品溶液。

3 线性范围实验

精密量取各杂质的对照品储备液 100 μL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 用水-甲醇 (1:1) 溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液, 精密量取适量, 用水-甲醇 (1:1) 溶液定量稀释制成浓度均约为 0.25,

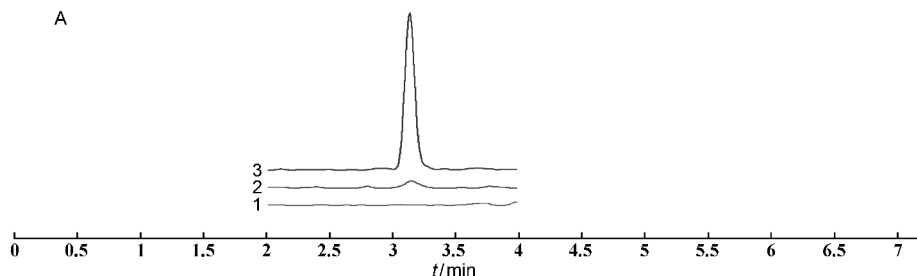
0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng·mL⁻¹ 的系列线性溶液。分别取 10 μL 进样检测, 记录色谱图, 以各杂质对照品浓度 (X , ng·mL⁻¹) 为横坐标, 以各杂质对照品的峰面积 (Y) 进行线性回归, 所得线性方程见表 2, 各杂质在其测定范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

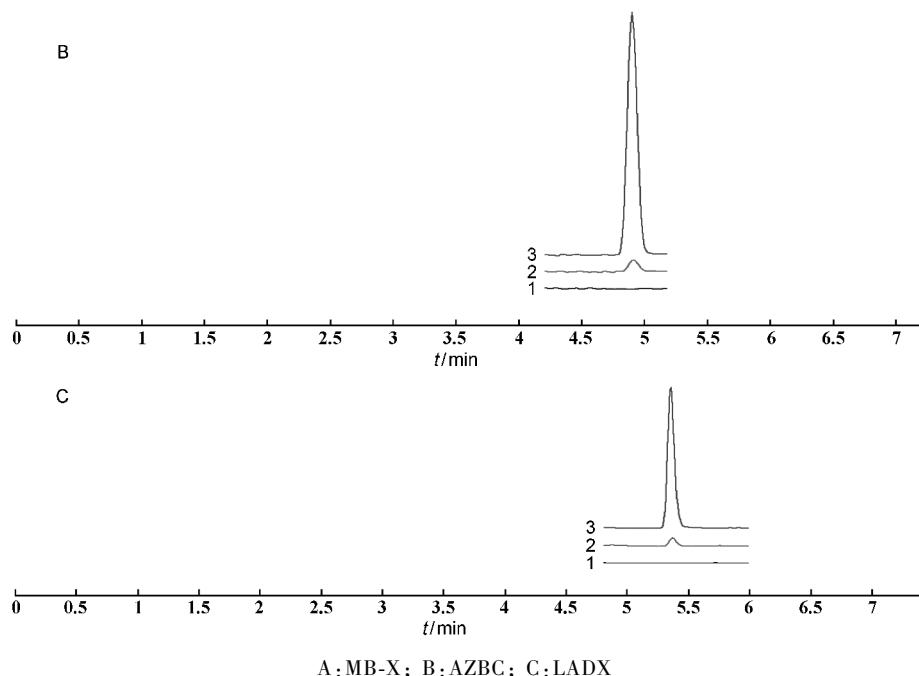
表 2 各杂质线性范围试验结果

化合物	线性范围/ng·mL ⁻¹	线性方程	相关系数(r)
MB-X	0.28 ~ 110.20	$Y = 34.02X - 7.24$	0.997 7
AZBC	0.28 ~ 112.98	$Y = 1\ 712X + 132.1$	0.999 9
LADX	0.29 ~ 116.00	$Y = 98.07X + 14.34$	0.999 4

4 专属性实验

取水-甲醇 (1:1) 溶液, “3”项下 5 ng·mL⁻¹ 线性溶液分别进样检测, 记录 5 ng·mL⁻¹ 的线性溶液的提取离子流色谱图, 见图 2, MB-X, AZBC, LADX 的保留时间分别为 3.10, 4.85, 5.30 min, 3 个杂质峰之间完全分离, 峰形良好, 空白溶剂对各杂质的检测无影响。





A; MB-X; B; AZBC; C; LADX

图2 空白溶液(1)、灵敏度溶液(2)和对照品溶液(3, 5 ng·mL⁻¹)提取离子流色谱图

5 检测限与定量限

精密量取“3”项下 0.5 ng·mL⁻¹ 的线性溶液,以水-甲醇(1:1)逐步稀释,分别在信噪比(S/N)为 3:1, 10:1 时作为检测限和定量限。测得 MB-X, AZBC 和 LADX 的检测限分别为 0.05, 0.03 和 0.02 ng·mL⁻¹, 定量限分别为 0.15, 0.11 和 0.08 ng·mL⁻¹。

6 精密度实验

取“3”项下 1 ng·mL⁻¹ 的线性溶液,进样检测,连续进样 6 次,计算得杂质 MB-X, AZBC 和 LADX 峰面积的 RSD 分别为 4.11%, 2.62% 和 4.18%, 均不超过 5.0%, 说明仪器精密度良好。

7 回收率实验

7.1 厄贝沙坦原料药回收率实验 精密量取各杂质对照品储备液 100 μL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2, 10, 10 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别作为浓度约为 2, 10, 20 ng·mL⁻¹ 的回收储备液。取厄贝沙坦原料药(批号: 1018-1807003V, MB-X 含量为 1.1 μg·g⁻¹, AZBC 和 LADX 均未检出)

约 20 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 分别精密加入以上储备液 10 mL, 超声溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 每个浓度的样品平行制备 3 份, 分别进样检测, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算各杂质的实测浓度, 并分别计算回收率, 结果见表 2。

7.2 氯沙坦钾原料药回收率实验 精密量取各杂质对照品储备液 1 mL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加水-甲醇(1:1)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1, 10, 20 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用水-甲醇(1:1)稀释至刻度, 摇匀, 分别作为浓度约为 10, 100, 200 ng·mL⁻¹ 的回收储备液。取氯沙坦及原料药(批号: 10100-181021, LADX 含量为 772.4 μg·g⁻¹, MB-X 和 AZBC 未检出) 约 20 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 分别用以上储备液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 用水-甲醇(1:1)稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 每个浓度的样品平行制备 3 份, 分别进样检测, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算各杂质的实测浓度, 并分别计算回收率, 结果见表 3。

表3 3种杂质加样回收率

%, $\bar{x} \pm s, n = 3$

化合物	厄贝沙坦原料药			氯沙坦钾原料药		
	1 ng·mL ⁻¹	10 ng·mL ⁻¹	20 ng·mL ⁻¹	1 ng·mL ⁻¹	10 ng·mL ⁻¹	20 ng·mL ⁻¹
MB-X	98.6 ± 2.77	94.5 ± 1.59	103.8 ± 3.17	93.8 ± 3.04	96.1 ± 4.25	98.7 ± 3.95
AZBC	100.1 ± 2.20	98.4 ± 2.08	96.4 ± 1.55	97.3 ± 2.23	100.9 ± 2.08	94.7 ± 2.63
LADX	103.1 ± 3.88	97.5 ± 3.69	103.5 ± 2.11	94.8 ± 2.09	97.6 ± 3.59	94.5 ± 3.57

8 样品测定

取厄贝沙坦原料药约 20 mg,精密称定,置于 20 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL,略超声溶解后用水稀释至刻度,摇匀,作为厄贝沙坦原料药的供试品溶液;取氯沙坦钾原料药约 20 mg,置于 20 mL 量瓶中,加水-甲醇(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置于 50 mL 量瓶中,用水-甲醇(1:1)稀释至刻度,摇匀,作为氯沙坦钾原料药供试品溶液。每批平行制备 2 份供试品溶液。按照“1”项下色谱条件进样检测,按标准曲线法以峰面积计算供试品溶液中 MB-X, AZBC 和 LADX 的含量。对 5 个厂家 13 批厄贝沙坦和氯沙坦钾原料进行检测,结果 2 批次厄贝沙坦原料药中检测出 MB-X,其中 1 批次超出了 $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的限度;所有批次氯沙坦钾原料药中均检测出 LADX,且 LADX 含量大大超出了 $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的限度。

讨 论

在选择离子源时,分别对 3 个待测杂质在电喷雾离子源(ESI)和 APCI 源的响应分别做了考察,MB-X 和 LADX 在 ESI 源上优化后均具有较强响应,比较了不同溶剂对响应的影响,以乙腈作为溶剂时响应明显得到增强,但 AZBC 在 ESI 源上基本无响应;AZBC 在 APCI 源上响应较强,MB-X 和 AZBC 在 APCI 源响应低于 ESI,通过优化调整后,以 APCI 作为离子源,3 个杂质的检测限均能满足检测的要求,综合考虑,采用 APCI 源进行进一步优化实验。根据 3 个待测物的特性,以 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)进行分离优化,MB-X 极性较大,最快出峰,AZBC 与 LADX 极性相对接近,梯度较为平缓时,两峰分离较差甚至完全重合,为此加大梯度,使两峰可分离完全,LADX 出峰后,切入废液,以防止主成分对仪器的污染。

为减小溶剂效应,采用流动相的初始比例水-甲醇(1:1)作为溶剂,氯沙坦钾在甲醇和水中易溶,但厄贝沙坦在甲醇中微溶,在水中不溶,以水-甲醇(1:1)作为溶剂,厄贝沙坦无法完全溶解,为此采用先用甲醇溶解,再用等体积水稀释的方法制备厄贝沙坦原料药的供试品溶液,但以此方法制备的供试品溶液在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下放置 1 h 后,有明显的絮状沉淀析出,对供试品溶液放置温度考察发现,于

$20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 h,尚无沉淀析出,因此建议应临用新制,或将进样盘温度控制在不低于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

综上所述,本研究建立了用于厄贝沙坦原料药和氯沙坦钾原料药中 3 种叠氮类基因毒性杂质测定的 UPLC-MS/MS 法,完成了相关的方法学验证。建立的方法灵敏度高、专属性好、操作简便,为厄贝沙坦和氯沙坦钾中基因毒性杂质的检查提供技术支持,为药品的质量控制提供了保障。

[参 考 文 献]

- [1] CODY RJ. The clinical potential of renin inhibitors and angiotensin antagonists[J]. *Drugs*, 1994, 47(4): 586-598.
- [2] SMITH DHG. Treatment of hypertension with an angiotensin II-receptor antagonist compared with an angiotensin-converting enzyme inhibitor: a review of clinical studies of telmisartan and enalapril[J]. *Clin Ther*, 2002, 24(10): 1484-1501.
- [3] 蔡思宇, 张雪华, 胡晓晟, 等. 厄贝沙坦治疗轻、中度高血压病[J]. *中国新药与临床杂志*, 2002, 21(5): 277-280.
- [4] MHRA. Class 2 Medicines Recall: Bristol Laboratories Limited, Brown & Burk UK Ltd, Teva UK Ltd, Irbesartan-containing and Losartan-containing products, EL (21) A/14[EB/OL]. (2021-07-17) [2022-02-18]. https://assets.publishing.service.gov.uk/media/60ca70e2e90e07438f7af73b/EL__21_A_14_FINAL.pdf.
- [5] 岑均达, 马霞. 厄贝沙坦的合成[J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(3): 239-240.
- [6] 杨会来, 毛杰, 孙学喜. 一种厄贝沙坦的合成方法:CN105001209A[P]. 2015-10-28.
- [7] CARINI DJ, DUNCIA JJV, WONG PC. Angiotensin II receptor blocking imidazoles: US5354867[P]. 1994-10-11.
- [8] SEDELMEIER G. Process for the preparation of tetrazole derivatives from organo boron and organo aluminium azides: US8569528[P]. 2013-10-29.
- [9] 国家药品监督管理局. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. (2017-10-30) [2022-02-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/mtbd/20171030163101383.html>.
- [10] Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). AZBT impurity in Valsartan, Irbesartan, Losartan, Candesartan[EB/OL]. (2021-06-11) [2022-02-18]. <https://www.edqm.eu/sites/default/files/general-methodparameters-azbt-lcms.pdf>.
- [11] Swissmedic OMCL. Genotoxic substances in sartans[EB/OL]. (2021-06-24) [2022-02-18]. https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL_Network/31-pv-185-genotoxic-substances-sartans.pdf.
- [12] 葛雨琦, 叶晓霞, 乐健, 等. 厄贝沙坦剂中 N-亚硝胺类基因毒性杂质的 GC-MS/MS 测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(6): 759-764.
- [13] 钱建钦, 陈悦. 正负离子切换超高效液相色谱-质谱联用法同时测定达比加群酯中间体中的 2 个毒性杂质[J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(11): 930-934.
- [14] 冯蕊, 陈冠军, 刘莉, 等. LC-MS 法测定塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(2): 182-186.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-03-21