·实验研究·

LC-MS 法测定塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质

冯　蕊[1,2],陈冠军[2,3],刘　莉[2,3],汪　生[2,3]

(安徽医科大学 1 药学院,2 重大自身免疫性疾病安徽省重点实验室,3 科研实验中心,合肥 230032)

[摘要] **目的**:建立液相色谱-质谱(LC-MS)法测定塞来昔布中对肼基苯磺酰胺(SHH)和对甲苯腙基苯磺酰胺(MAP)2 个苯肼类基因毒性杂质。**方法**:采用 Thermo BDS Hypersil C_{18}(100 mm×4.6 mm,2.4 μm)色谱柱,以 0.1% 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液∶甲醇(90∶10)溶液为流动相 A,以甲醇为流动相 B 进行线性梯度洗脱。样品中加入 5% 二巯基苏糖醇的醋酸铵缓冲液作为稳定剂,在质谱电喷雾正离子化多反应监测模式下,以内标法进行定量测定。**结果**:SHH 和 MAP 在 20 ~ 200 ng·mL^{-1}浓度范围内线性关系良好;平均回收率分别为 99.7%(RSD = 6.0%,n = 9)和 97.6%(RSD = 5.1%,n = 9)。检测限为 10 ng·mL^{-1},定量限为 20 ng·mL^{-1},对照溶液和供试品溶液于 4 ℃进样盘放置 4 h 内稳定。**结论**:本实验建立的 LC-MS 测定法适用于塞来昔布中 SHH 和 MAP 2 个苯肼类基因毒性杂质的检测。

[关键词] 塞来昔布;对肼基苯磺酰胺;对甲苯腙基苯磺酰胺;基因毒性杂质;液质联用;限度检查

[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)02 - 0182 - 05

Determination of two phenylhydrazine-like genotoxic impurities in celecoxib by LC-MS

FENG Rui[1,2], CHEN Guan-jun[2,3], LIU Li[2,3], WANG Sheng[2,3]

(*Anhui Medical University* 1 *School of Pharmacy*, 2 *Anhui Province Key Laboratory of Major Autoimmune Diseases*, 3 *the Center for Scientific Research of Anhui Medical University*, *Hefei* 230032, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish an LC-MS method for the determination of two phenylhydrazine-like genotoxic impurities [(4-sulfamoylphenyl) hydrazine, SHH; (4-methyl-acetophenone) para-sulfonamide phenylhydrazine, MAP] in celecoxib. **Methods**: The separation was established on Thermo BDS Hypersil C_{18} (100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm) column by liner gradient elution using (0.1% ammonium formate-0.1% formic acid buffer solution)-methanol 90∶10 as mobile phase A and methanol as mobile phase B. 5 mmol·L^{-1} dithiothreitol buffer solution was used as the antioxidant, the determination was carried out by multiple reactions monitoring mode with positive electrospray ionization, meanwhile, the analytes were quantitatively determined by internal reference method. **Results**: The established LC-MS method displayed satisfactory linearity over the concentration range of 20 ~ 200 ng·mL^{-1}. The average recovery was 99.7% (RSD = 6.0%) for SHH and 97.6% (RSD = 5.1%) for MAP. The limit of detection and limit of quantification were 10 ng·mL^{-1} and 20 ng·mL^{-1}, respectively. The reference and test solutions were stable at 4 ℃ for 4 h. **Conclusion**: The established LC-MS method is suitable for simultaneous determination of SHH and MAP genotoxic impurities in celecoxib.

[**Key words**] celecoxib; (4-sulfamoylphenyl) hydrazine; (4-methyl-acetophenone) para-sulfonamide phenylhydrazine; genotoxic impurity; LC-MS; quantification

塞来昔布(celecoxib)化学名为 4-[5-(4-甲苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺,特异性抑制环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2,COX-2),阻止炎性前列腺素类物质产生[1],临床用于治疗风湿性关

[作者简介] 冯蕊,女,助理实验师,主要从事药学相关研究工作。联系电话:(0551)65161217,E-mail:fengruicpu@126.com。

[通讯作者] 汪生,男,助理实验师,主要从事质谱相关研究工作。联系电话:(0551)65160310,E-mail:wangsheng_cpu@163.com。

节炎和骨关节炎等疾病[2]。

基因毒性杂质(genotoxic impurity)是指可能具有遗传毒性的一类物质[3]。在研究药物中基因毒性杂质时,应全面考虑药物的合成工艺和纯化流程等,充分考虑可能引入的基因毒性杂质。塞来昔布的合成工艺中,对肼基苯磺酰胺[(4-sulfamoylphenyl) hydrazine, SHH]是药物合成的中间体;4,4,4-三氟-1-(4-甲苯基)-1,3-丁二酮与 SHH 反应生成塞来昔布,SHH 还可能与反应中间体对甲基苯乙酮反应,生成对甲苯腙基苯磺酰胺[(4-methyl-acetophenone) para-sulfonamide phenylhydrazine, MAP]。因此,在塞来昔布合成工艺中,可能涉及 SHH 和 MAP 2 个苯肼类杂质。肼是已知的基因毒性杂质,具有潜在致癌性[4],SHH 和 MAP 属于苯肼类基因毒性杂质,需对塞来昔布原料药中这 2 个杂质进行限度检查。

欧洲 EMEA 和美国 FDA 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[3]。2010 年 EMEA 在基因毒性杂质限度计算方面指出,TTC 值 1.5 μg·d^{-1}是应用在不同结构杂质的限度[5]。结构相同或相似的基因毒性杂质,它们可能具有相同的作用模式或靶点,故该类杂质总量应不超过 1.5 μg·d^{-1}。SHH 和 MAP 化学结构式如图 1 所示,均为肼类基因毒性杂质,所以各杂质的限度均设置为 0.75 μg·d^{-1}。

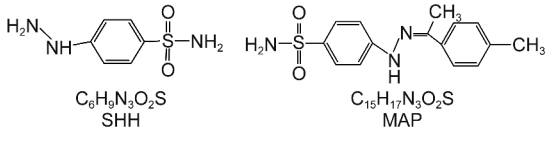


图 1 塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质的化学结构

关于肼类杂质的测定方法:徐秀兰[6]采用 HPLC 法测定塞来昔布中的 SHH,限度为 500 ng·mL^{-1},灵敏度达不到本研究的要求;Vijaya 等[7]采用 LC-MS 法测定肼类杂质,条件探索时发现 2 个苯肼杂质在水溶液中极不稳定;Raman 等[8]采用苯甲醛衍生化,LC-MS 法测定肼类杂质;Oh 等[9]采用苯二甲醛衍生化及 GC-MS 法测定肼类杂质。衍生化结合 LC-MS 或 GC-MS 法的灵敏度均较高,但是操作繁琐、涉及的试剂毒性较大。采用处理方法简单、高灵敏高专属的 LC-MS 法测定肼类杂质的报道较少。本研究建立塞来昔布中 SHH 和 MAP 2 个肼类杂质快速、便捷、高灵敏度的测定法,为肼类基因毒性杂质测定提供新的思路和方法,报道如下。

材　料

1　仪器

Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪(配有在线真空脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱和 Chromeleon 工作站,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TSQ Quantum Ultra(EMR)三重四极杆质谱仪(配有 LC-quan 2.9QF1 定量处理软件,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BDS Hypersil C_{18} 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.4 μm,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BS 21S 分析天平(德国 Satrious 公司);5424R 台式高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司);Milli-Q Integral 5 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2　试药和试剂

塞来昔布原料药(南京亿华药业有限公司,批号:120701,120702,120703,纯度:>99.0%);SHH 和 MAP 标准品(南京亿华药业有限公司,纯度均为 99.0%);乙腈、甲醇(美国 TEDIA 公司,色谱纯);醋酸铵、甲酸、氨水(南京化学试剂有限公司,分析纯);二巯基苏糖醇(上海麦克林生化科技有限公司,纯度为 99%);卡马西平对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100142-201004,纯度为 99.5%);自制去离子水。

方法与结果

1　液相色谱-质谱条件

1.1　液相色谱条件　采用 Thermo BDS Hypersil C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.4 μm)色谱柱;以 0.1% 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液:甲醇(90∶10)为流动相 A,甲醇为流动相 B;线性梯度洗脱(A∶B):0 min (60∶40) → 1.5 min (60∶40) →2.0 min(15∶85) →5.5 min (15∶85) →5.6 min(60∶40) →7 min(60∶40)。柱温为 45 ℃,进样量为 10 μL,流速为 0.65 mL·min^{-1},柱后分流(6∶4)进行 LC-MS/MS 测定。

1.2　质谱条件　电喷雾正离子化(ESI^+)测定 2 个苯肼基因毒性杂质,质谱参数如下:喷雾电压为 4.5 kV,雾化温度为 200 ℃,毛细管温度为 350 ℃,辅助气压力为 276 kPa,鞘气压力为 70 kPa。三重四极杆质谱 MRM 模式检测,SHH:m/z 170.9→m/z 90.1,碰撞能量为 17 eV;MAP:m/z 304.1→m/z 209.1,碰撞能

量为 20 eV;内标:*m/z* 237.11→*m/z* 194.10,碰撞能量为 25 eV。

2 溶液制备

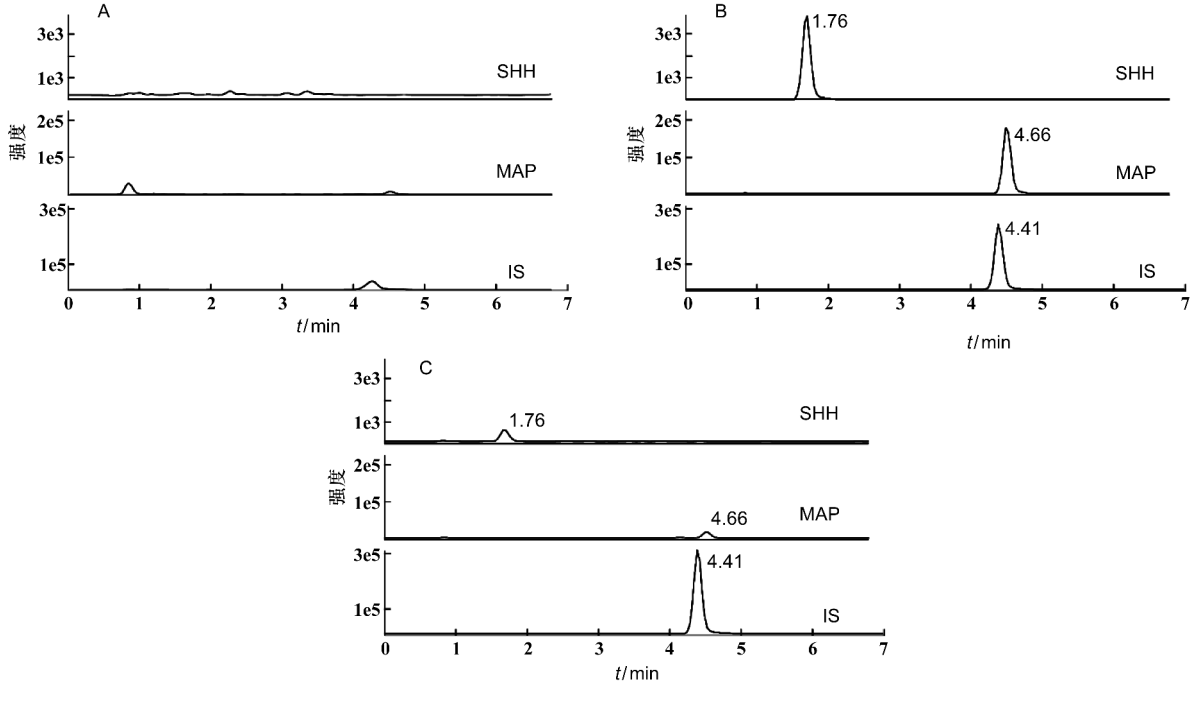
2.1 二巯基苏糖醇醋酸铵缓冲液 5 mmoL·L^{-1}二巯基苏糖醇的 1% 醋酸铵缓冲液,氨水调节 pH 至 8~9。

2.2 杂质对照溶液 精密称定 SHH,MAP 和内标卡马西平各约 10 mg,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中各约含 0.1 mg 的杂质对照品储备液。精密移取 SHH 和 MAP 对照品储备液各约 500 μL、内标储备液约 50 μL,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中含 SHH 和 MAP 均约为 5 μg、内标为 500 ng 的混合工作溶液(现配现用)。取甲醇 500 μL 置于 2 mL 离心管中,加入二巯基苏糖醇的醋酸铵缓冲液约 20 μL,精密移取杂质混合溶液 20 μL 于离心管中,摇匀,再精密加入纯净水 500 μL,即得每 1 mL 中含 SHH 和 MAP 均约为 100 ng,内标为 10 ng 的溶液,作为杂质对照溶液。

2.3 供试品溶液 精密称定塞来昔布原料药约 80 mg,置于 2 mL 离心管中,加入甲醇(氨水碱化)500 μL,振摇使溶解,加入二巯基苏糖醇的醋酸铵缓冲液约 20 μL,摇匀;精密加入内标工作溶液(500 ng·mL^{-1})20 μL,摇匀,再加入纯净水约 500 μL,振摇,析出塞来昔布。15 800 r·min^{-1}低温(4 ℃)离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤,作为供试品溶液。

3 专属性试验

在所建立的测定条件下,SHH 和 MAP 2 个杂质的保留时间分别为 1.76 和 4.66 min,2 个待测物完全分离,峰形良好,LC-MS 色谱图见图 2。可见空白溶剂和供试品溶液对测定无干扰。



A:空白溶剂;B:杂质对照溶液;C:供试品溶液

图 2 塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质 LC-MS 检查专属性试验图

4 标准曲线

精密量取"**2.2**"项下各杂质储备液适量,制成内标均为 10 ng·mL^{-1}、SHH 和 MAP 的质量浓度均分别约为 20,30,50,100,150 和 200 ng·mL^{-1}(各相当于限度浓度的 20%,30%,50%,100%,150% 和 200%)的系列浓度梯度的溶液,按照"**1**"项下条件分别进行测定,记录色谱图。以待测物峰面积(A_x)和内标峰面积(A_i)比值 $R(A_x/A_i)$ 对浓度(C)进行线性回归。SHH 和 MAP 浓度在 20~200 ng·mL^{-1}的范围内,峰面积比值和进样浓度呈现良好的线性关系,线性回归方程分别为 $R = 0.000\ 122\ 3C - 0.001\ 020$($r = 0.996\ 4$)和 $R = 0.005\ 607C - 0.012\ 34$

(r = 0.999 8)。

5 检测限和定量限

根据《中华人民共和国药典》2015 年版通则 9101[10] 中“响应值标准偏差和标准曲线斜率法”计算,2 个杂质的检测限约为 10 ng·mL^{-1},定量限约为 20 ng·mL^{-1}。按照“**2.2**”项下方法,配制定量下限测试溶液 6 份,分别进样分析,测定结果带入标准曲线回算。SHH 和 MAP 定量下限的测定浓度与理论浓度的偏差 <20%,测定浓度的 RSD(n = 6)分别为 13.4% 和 1.7%,符合测定的灵敏度和精密度要求。

6 加样回收率试验

按照“**2.2**”项下配制 2 个待测物低、中、高浓度(2.5,5.0,7.5 μg·mL^{-1})和内标(500 ng·mL^{-1})的混合工作液,作为加样回收率试验工作液。取已测定 SHH 和 MAP 基因毒性杂质(含量均未检出)的塞来昔布供试品约 80 mg,精密称定,置于 2 mL 离心管中,精密加入甲醇 500 μL,振摇使完全溶解,加入“**2.1**”项下二巯基苏糖醇的醋酸铵缓冲液约 20 μL,摇匀;精密加入 SHH 和 MAP 的加样回收率试验工作液 20 μL,摇匀,再加入纯净水约 500 μL,制得低(50%)、中(100%)、高(150%)浓度的加样回收率试验溶液,每个浓度样品平行制备 3 份;按照“**2.2**”和“**2.3**”项下方法制备供试品溶液和杂质对照溶液。按照“**1**”项下方法分别进样测定,记录色谱图。按照内标法以峰面积比计算 SHH 和 MAP 的测得质量浓度,并分别计算 SHH 和 MAP 的回收率,结果见表 1。SHH 与 MAP 的平均回收率分别为 99.7%(RSD = 6.0%,n = 9)和 97.6%(RSD = 5.1%,n = 9),表明本法准确度良好。

表 1 塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质含量测定加样回收率试验测定结果

SHH					MAP				
试剂本底浓度/ng·mL^{-1}	加入浓度/ng·mL^{-1}	测得浓度/ng·mL^{-1}	回收率/%	平均值(RSD/%)	试剂本底浓度/ng·mL^{-1}	加入浓度/ng·mL^{-1}	测得浓度/ng·mL^{-1}	回收率/%	平均值(RSD/%)
0	50.25	47.39	94.3	99.7(6.0)	0	50.00	48.65	92.3	97.6(5.1)
		53.83	107.1				49.83	94.7	
		45.11	89.8				46.35	87.7	
	100.5	104.0	103.5			100.0	102.5	100.0	
		106.9	106.4				103.5	101.0	
		99.40	98.9				101.5	99.0	
	150.8	148.7	98.6			150.0	157.5	103.3	
		154.2	102.3				152.5	100.0	
		145.0	96.2				153.2	100.5	

7 精密度试验

取“**2.2**”项下限度浓度杂质对照溶液,连续进样 6 次,计算 2 个杂质峰面积和内标峰面积比值的 RSD(n = 6)分别为 2.8% 和 1.7%,表明仪器进样精密度良好。

8 重复性试验

按照“**6**”项下方法制备“中浓度”的加样供试液 6 份,按照“**1**”项下方法分别测定,2 个杂质峰面积和内标峰面积比值的 RSD(n = 6)分别为 4.5% 和 2.0%,方法符合测定的精密度要求。

9 稳定性试验

9.1 进样盘(4 ℃)稳定性 按照“**6**”项下方法制备低、高浓度的加样供试液和不加样的低、高浓度的对照溶液。分别在 0 和 4 h,按照“**1**”项下方法分别进样测定,记录色谱图。计算 2 个杂质峰面积同内标峰面积比值的 RSD(n = 6),4 组 RSD 均 <10%,表明该处理条件下的 4h 内稳定性良好,可满足分析批测样要求。

9.2 杂质对照品储备液(−20 ℃)稳定性 取“**2**”项下的方法将新鲜配制的各杂质对照品储备液及 −20 ℃冰箱储存 9 d 的各杂质对照品储备液适量,分别制成 SHH 和 MAP 为 100 ng·mL^{-1},内标为 10 ng·mL^{-1}的混合对照溶液各 3 份,按照“**1**”项下方法分别进样测定,记录色谱图。各对照品峰面积和称样量重量比值的 RSD(n = 6)均 <10%,表明杂质储备液在 −20 ℃条件下存放 9 d 稳定性良好。

10 样品测定

按照“**2**”项下方法分别配制杂质对照溶液和供试品溶液,按照“**1**”项下的条件分别测定,记录色谱图。按内标法以峰面积的比值计算供试品中 SHH

和 MAP 的含量,结果如图 2-C 所示。3 批待测样本中 SHH 和 MAP 基因毒性杂质均未检出。

讨　论

在色谱柱选择时,分别考察了 Thermo BDS Hypersil C_{18}(100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm)、Insertsil ODS-SP(250 mm × 4.6 mm,5 μm)、Phenomenex CuroSil-PFP(250 mm × 4.6 mm,5 μm)和 Waters Symmetry C_{18}(150 mm × 3.9 mm,5 μm)色谱柱。2 个待测物在 BDS Hypersil C_{18}色谱柱上均有较佳的峰型,且各峰分离度良好。在流动相选择时,分别考察甲醇、乙腈和甲醇-乙腈 3 种体系的流动相,流动相为乙腈时,各检测通道无干扰;流动相为甲醇时,检测通道有较小干扰,但待测物的响应较乙腈体系中增加约 10 倍。最终选用甲醇为流动相的体系,以满足样品分析的灵敏度要求;同时在流动相中添加一定量的甲酸,可增加待测物的质谱响应,加入适量乙酸铵能够有效改善待测物的色谱峰型。

按照“**6**”项下条件,制备塞来昔布添加限度浓度对照溶液(未加稳定剂),SHH 在连续 6 次进样分析中,峰面积的 RSD(n = 6)超过 50%。参考文献显示苯肼类物质多数使用衍生化方法测定[11-12],原因可能是苯肼类化合物在溶液中极易氧化降解,溶样液(50% 甲醇)测得其表观 pH 显酸性,苯肼类杂质在酸性条件下更易发生氧化反应。选择抗氧化剂可以有效增加该类化合物的稳定性,二巯基苏糖醇是一类常用的抗氧化剂,当 pH 在 8 ~ 10 之间时能发挥较好的抗氧化作用[13]。最终优化的条件为:溶解样品的甲醇先用氨水碱化 pH 至 8 ~ 9,各样品在处理时加入适量 5 mmoL·L^{-1}二巯基苏糖醇溶液(1% 醋酸铵缓冲液),保持溶液在碱性环境,使二巯基苏糖醇发挥最大的抗氧化作用。经测试加入抗氧化剂二巯基苏糖醇和调节溶样液 pH 后,苯肼杂质的溶液在 4 h 内稳定,满足分析批样品测定的要求。

塞来昔布易溶于甲醇和乙腈,在甲醇中溶解度约为 180 mg,水中几乎不溶。限度浓度供试品溶液中塞来昔布的浓度为 80 mg·mL^{-1},80 mg 塞来昔布可完全溶解于 1 mL 甲醇中,但是在甲醇和水的混合体系中不能完全溶解。在测定供试品中基因毒性杂质时,首先应选择适宜的溶剂完全溶解供试品,使得潜在的基因毒性杂质完全释放、溶解,保证测定结果准确、可靠;同时考虑溶样液和流动相匹配的原则、高浓度的供试品会污染离子源或引起基质效应、液相分离时高浓度基质易使色谱柱过载或析出等因素。综合以上考虑,在供试品完全溶解的前提下,结合基质钝化法[11]等方法,除去供试液中大部分的塞来昔布。

综上所述,本研究采用 LC-MS 法测定塞来昔布中 SHH 和 MAP 2 个苯肼类基因毒性杂质,方法灵敏度高、专属性好。采用特定的溶样方式,去除高浓度塞来昔布样品干扰;二巯基苏糖醇的应用解决了肼类杂质水溶液不稳定的问题。该方法样品前处理简单方便,已成功应用于塞来昔布中 2 个苯肼类基因毒性杂质的分析检测,为其质量控制提供保障,同时也为药物中微量肼类杂质的检测提供了新的方法。

[参 考 文 献]

[1] DAVIES NM, MCLACHLAN AJ, DAY RO, *et al*. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38(3): 225 - 242.

[2] DEMBO G, PARK SB, KHARASCH ED. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans[J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(2): 409 - 415.

[3] ICH M7(R1) Current Step 2 version, Addendum to ICH M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk[S]. 2015.

[4] BHAVANI KG, KRISHNA KBM, SRINIVASU N, *et al*. Determination of genotoxic impurity in atazanavir sulphate drug substance by LC-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 132: 156 - 158.

[5] EMA·CHMP·SWP·431994·2007 Rev.3. Questions and answers on the ‘Guideline on the limits of genotoxic impurities’[S]. 2010.

[6] 徐秀兰. HPLC 法测定塞来昔布中对磺酰胺基苯肼盐酸盐的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(2): 360 - 362.

[7] VIJAYA BRA, VENUGOPAL N, MADHAVI G. A selective and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of twopotential genotoxic impurities in celecoxib[J]. *J Anal Sci Technol*, 2014, 5(1): 18.

[8] RAMAN NV, PRASAD AV, REDDY KR. Sensitive derivatization methods for the determination of genotoxic impurities in drug substances using hyphenated techniques[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 276 - 281.

[9] OH JA, SHIN HS. Simple and sensitive determination of hydrazine in drinking water by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with naphthalene-2, 3-dialdehyde[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1395: 73 - 78.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社, 2015:861.

[11] 汪生, 杭太俊. 药物中基因毒性杂质检测策略的研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(23): 2840 - 2846.

[12] 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 - 274.

[13] 宋凡, 宋晓妮, 王磊, 等. 酒石酸伐尼克兰中 6 个类苯胺基因毒性杂质的 LC-MS 法测定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 130 - 134.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 05 - 31