LC-MS 法测定磷酸特地唑胺中的潜在基因毒性杂质

孟冬朔[1,2,3]，陈　月[2,3]，王维维[1,2,3]，葛　鼎[4]，刘　育[1,2,3]*

（1. 中国医药工业研究总院有限公司，化学制药新技术中心，上海 201203；2. 中国医药工业研究总院有限公司，上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203；3. 上海制药工艺工程研究中心，上海 201203；4. 国药集团国瑞药业有限公司，药物工程研究中心，安徽淮南 232001）

摘要：建立 LC-MS 法测定磷酸特地唑胺中的 5 种潜在基因毒性杂质。采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）和电喷雾离子源，在多反应监测模式下，以 0.1％甲酸水溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱。其中 3 种潜在基因毒性杂质和 2 种亚硝胺杂质分别在 3.0 ～ 155.6 和 14.4 ～ 742.5 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.990，所有杂质的平均回收率为 87.9％～ 104.1％。该方法简便、准确，可用于磷酸特地唑胺中潜在基因毒性杂质的检测。

关键词：磷酸特地唑胺；抗菌药；LC-MS；潜在基因毒性杂质；亚硝胺杂质

中图分类号：R917；R978.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2026)03-0343-05

引用：孟冬朔, 陈　月, 王维维, 等. LC-MS法测定磷酸特地唑胺中的潜在基因毒性杂质[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(3): 343-347. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.03.012

Determination of Potential Genotoxic Impurities in Tedizolid Phosphate by LC-MS

MENG Dongshuo[1,2,3], CHEN Yue[2,3], WANG Weiwei[1,2,3], GE Ding[4], LIU Yu[1,2,3]*

(*1. Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 2. National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. Shanghai Engineering Research Center of Pharmaceutical Process, Shanghai 201203; 4. China National Medicines Guorui Pharmaceutical Co., Ltd., Huainan 232001*)

ABSTRACT: An LC-MS method for the determination of five potential genotoxic impurities in tedizolid phosphate was established. The ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used with electrospray ionization and multiple reaction monitoring mode. The analysis was performed using gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. Three potential genotoxic impurities and two nitrosamines showed good linearity (r>0.990) in the ranges of 3.0 – 155.6 and 14.4 – 742.5 ng/mL, respectively. The average recoveries of all impurities were 87.9 % – 104.1 % . The established method is simple and accurate, which can be used for the determination of potential genotoxic impurities in tedizolid phosphate.

Key Words: tedizolid phosphate; antibacterial drug; LC-MS; potential genotoxic impurity; nitrosamine

急性细菌性皮肤及皮肤组织感染是一种高发病率、病情复杂的感染性疾病，主要由链球菌、葡萄球菌等革兰阳性菌引起，包括蜂窝织炎、淋巴管炎、软组织坏死和严重伤口感染等。并且，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌等耐药菌种不断演变，使现有抗菌药物持续面临选择压力与用药挑战[1]。

磷酸特地唑胺（tedizolid phosphate，**1**）是由美国 Cubist 制药公司研发的第二代新型噁唑烷酮类抗菌药，在临床上表现出比第一代药物利奈唑胺更好的抗菌活性、更长的半衰期和更低的耐药性。**1** 片

收稿日期：2025-07-01

作者简介：孟冬朔，博士研究生，专业方向：药物化学及药物质量控制。

通信作者：刘　育，研究员，从事创新药物及药物合成工艺研究。

于 2014 年首次由美国 FDA 批准上市。作为国内的热点仿制药，对 **1** 进行药学研究具有重要社会经济价值。

1 有多条合成路线[2]。本课题组曾结合优化的工艺路线和强制降解试验结果分析了 **1** 原料药的杂质谱，并建立了 HPLC-UV 法测定 **1** 的有关物质[3]。

因 **1** 具有含氮芳环，会氧化产生带有芳基氮氧化物警示结构的杂质 A 和杂质 B，化学名分别为 (*R*)-5-[2- 氟 -4-(5- 羟甲基 -2- 噁唑烷 -3- 基)- 苯基]-2-(2- 甲基 -2*H*- 四唑 -5- 基) 吡啶 -1- 氧化物和 (*R*)-5-[2- 氟 -4-[2- 氧代 -5-[(膦酰氧基) 甲基] 噁唑烷 -3- 基] 苯基]-2-(2- 甲基 -2*H*- 四唑 -5- 基) 吡啶 -1- 氧化物 (图 1)。此外，在 **1** 合成工艺中可能存在带有烷烃单卤代物警示结构的杂质 C，化学名为 (*R*)-5-(氯甲基)-3-[3- 氟 -4-[6-(2- 甲基 -2*H*- 四唑 -5- 基) 吡啶 -3- 基] 苯基] 噁唑烷 -2- 酮 (图 1)。上述 3 个杂质均具有潜在基因毒性；其中，杂质 C 与文献[4] 中的 TDZA-010 和文献[5] 中的杂质 Ⅰ 为同一物质，而杂质 A 和杂质 B 尚未见相关分析研究。同时，**1** 的四唑环构建中可能使用叠氮化钠和 DMF，产生 *N*- 亚硝基二甲胺 (*N*-nitrosodimethylamine，NDMA，图 1) 和 *N*- 亚硝基二乙胺 (*N*-nitrosodiethylamine，NDEA，图 1) 等，此二者也是需要严格控制的亚硝胺杂质[6]。为保证药品的安全性，本文建立了同时测定 **1** 中上述 5 种基因毒性杂质的检测方法，并完成方法学验证，为 **1** 的基因毒性杂质检测提供技术支持。

1　仪器与试药

ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)；6420 型三重四极杆质谱仪 (美国 Agilent 公司)；XS205 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)；SB-800D 型超声仪 (宁波新芝生物科技有限公司)。

1 原料药 (国药集团国瑞药业有限公司，含量 99.3%、99.6%、99.6%，批号 2108001、2108002、2108003)；杂质 A (含量 99.77%，批号 20190611)、杂质 B(含量 98.40%，批号 20190905) 的对照品均购于深圳卓越生物医药科技有限公司；杂质 C 对照品 (按文献[7] 自制，含量 97.93%)；NDMA(含量 99%，批号 P3295787)、NDEA(含量 98%，批号 P1856752) 的对照品均购于上海泰坦科技股份有限公司；甲酸为质谱纯，乙腈为色谱纯，氨水为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱 (2.1 mm×100 mm，1.8 μm)；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为乙腈，按表 1 所示程序进行梯度洗脱；柱温 30 ℃；流速 0.4 mL/min；检测波长 254 nm；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源，正离子模式，多反应监测 (multiple reaction monitoring，MRM) 模式；干燥气 氮气；干燥气温度 350 ℃；干燥气流速 11 L/min；雾化器压力 103.42 kPa；毛细管电压

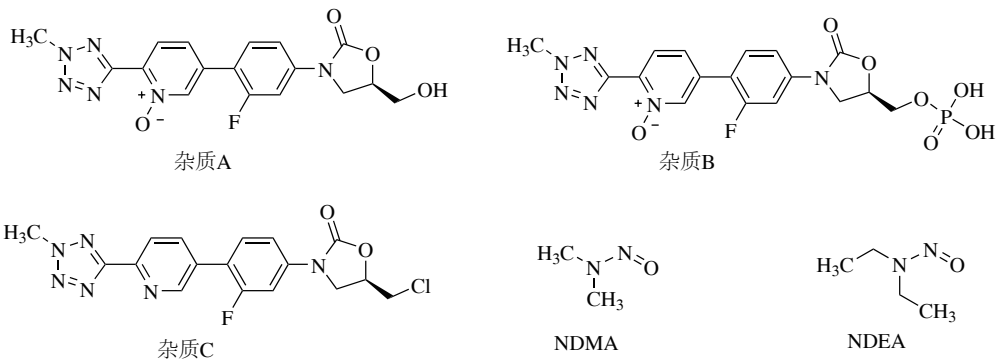


图 1　1 的 5 种基因毒性杂质的化学结构

Fig.1　Chemical Structures of 5 Genotoxic Impurities in **1**

3 500 V；MRM 模式参数如表 2 所示。

2.2 溶液配制

空白溶剂：乙腈、水和氨水（体积比 50 ∶ 50 ∶ 0.1）。

杂质 A ～ C 为固体杂质，与 2 种亚硝胺杂质在状态、挥发性、稳定性上差异较大，混合配制会影响定量分析的准确性，因此分开制备。

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient Elution Program

t/min	A/%	B/%
0	90	10
17	30	70
20	30	70
21	90	10
25	90	10

表 2 MRM 模式参数

Tab.2 MRM Mode Parameters

杂质名称	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
杂质 A	387.1	387.1	135	5
杂质 B	467.1	467.1	135	5
杂质 C	389.1	389.1	135	5
NDMA	75.1	43.1	110	10
NDEA	103.1	75.2	70	10

杂质 A ～ C 贮备液：精密称取杂质 A ～ C 的对照品适量，用空白溶剂溶解，经连续梯度稀释，制得杂质 A、B、C 终质量浓度均为 150 ng/mL 的贮备液。

亚硝胺类杂质贮备液：在预先加入少量空白溶剂的量瓶中精密加入 NDMA 和 NDEA 对照品各适量，制得终质量浓度均为 750 ng/mL 的贮备液。

混合对照品溶液：取杂质 A ～ C 贮备液 1 mL，转移至 10 mL 量瓶中，用空白溶剂定容，制得各杂质质量浓度为 15 ng/mL 的混合对照品溶液①。同法配制亚硝胺类杂质质量浓度均为 75 ng/mL 的混合对照品溶液②。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药适量，用空白溶剂溶解并稀释，分别制成质量浓度为 2 和 50 mg/mL 的供试品溶液。

2.3 专属性试验

照“**2.1**”项下条件检测“**2.2**”项下的空白溶剂、2 种混合对照品溶液、供试品溶液，进行专属性考察。结果（图 1）显示，空白溶剂图谱中没有干扰峰，NDMA、NDEA、杂质 B、杂质 A、杂质 C 依次在 0.9、2.9、3.3、4.6、10.2 min 时出峰，保留时间差异显著、

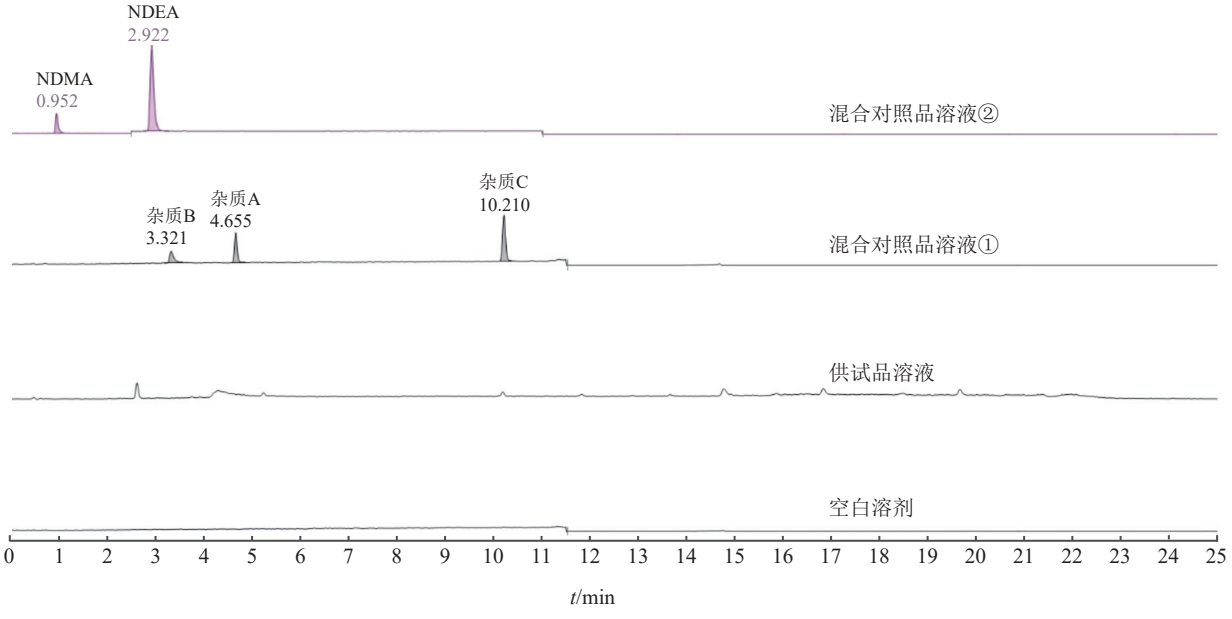


图 2 专属性试验色谱图

Fig.2 Chromatogram of Specificity Test

分离度高，提示本方法专属性良好。

2.4 线性试验和灵敏度试验

采用梯度稀释法在对照品质量浓度20%～1 000%范围内进行线性考察，以各待测杂质的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。结果如表3所示，各组分在相应范围内均线性关系良好，相关系数 *r*>0.990。同时取2种贮备液进行逐级稀释，以信噪比大于10和3时的溶液质量浓度作为LOQ和LOD。结果如表3所示。

2.5 重复性试验

对“**2.2**”项下2种混合对照品溶液，分别进行系统精密度考察，各连续进样6次，测得5个杂质的峰面积RSD（*n*=6）均小于5.0%，保留时间RSD（*n*=6）均小于0.5%，表明进样精密度良好。

精密称取**1**原料药2 mg置离心管中，精密加入“**2.2**”项下混合对照品溶液① 1 mL，超声溶解，混匀；另取**1**原料药50 mg置离心管中，加入混合对照品溶液② 1 mL，超声溶解，混匀。各平行配制6份加标回收溶液，使用针式滤器过滤后进样分析。结果显示，杂质A、杂质B、杂质C、NDMA、NDEA的平均加标回收率分别为100.7%、87.9%、103.1%、98.5%、101.5%，RSD分别为5.9%、4.1%、6.8%、1.8%、0.6%，可见各杂质加标回收率的RSD（*n*=6）均不超过7.0%，证实方法重复性符合要求。

2.6 回收率试验

按“**2.5**”项下方法配制加标回收溶液。精密称取**1**原料药2 mg置离心管中，分别精密加入“**2.4**”项下混合对照品溶液①质量浓度50%、100%、150%（即7.5、15、22.5 ng/mL）的溶液各1 mL；另精密称取**1**原料药50 mg置离心管中，分别精密加入“**2.4**”项下混合对照品溶液②质量浓度50%、100%、150%（即37.5、75、112.5 ng/mL）的溶液各1 mL。各溶液分别超声溶解并混匀，使用针式滤器过滤后进样分析，制成低、中、高质量浓度的加样回收率溶液，各平行配制3份，分别进样分析。经计算，杂质A、杂质B、杂质C、NDMA、NDEA的平均回收率（*n*=9）分别为94.4%、88.7%、101.1%、99.6%、104.1%，RSD分别为4.3%、7.2%、5.8%、3.7%、3.6%，各杂质回收率的RSD（*n*=9）均不超过8.0%，表明方法准确度良好。

2.7 样品测定

按“**2.2**”项下方法分别配制供试品溶液，检测3批**1**原料药中的5种基因毒性杂质，每批样品重复3次。结果显示，各批原料药中均未检出目标杂质，表明现行工艺对相关潜在基因毒性杂质的清除效率较高。

3 讨论

3.1 限度的确定

参照ICH M7《评估和控制药物中DNA反应性（致突变）杂质以限制潜在的致癌风险》的相关要求，采用致突变杂质的毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）1.5 μg/d计算上述杂质的限度标准。**1**的每日最大使用剂量（maximum permissible daily dose，MPD）不超过200 mg，那么其中的基因毒性杂质应不超过7.5×10^{-6}。此外，可根据基因毒性杂质的半数中毒剂量（median intoxic dose，TD_{50}）值确定部分致癌杂质的限度[8]。通过查询致癌潜因数据库（Carcinogenic Potency Database，CPDB）和PubChem数据库，结合NDMA和NDEA在大鼠体内的急性毒性试验结果（LD_{50}值分别为58和280 mg/kg），成人体质量按50 kg计，通过下式可计算出各杂质的无可见影响水平（no observed

表3 线性试验、LOD和LOQ结果

Tab.3 Results of Linearity Test, LOD and LOQ

杂质名称	线性方程	*r*	线性范围/(ng·mL^{-1})	LOD/(ng·mL^{-1})	LOQ/(ng·mL^{-1})
杂质A	*A*=388.72*c*－1108.1	0.999	3.1～155.6	1.6	3.1
杂质B	*A*=252.94*c*－514.9	0.999	3.0～151.1	1.5	3.0
杂质C	*A*=708.19*c*－1011.9	0.999	3.0～149.7	1.5	3.0
NDMA	*A*=9.61*c*－3.9	0.997	14.7～742.5	7.2	14.3
NDEA	*A*=61.90*c*+433.3	0.997	14.4～736.1	1.9	3.8

effect level，NOEL）、每日允许暴露量（permitted daily exposure，PDE）和杂质限度（即 PDE 与 MPD 之比）。

$$NOEL=\frac{LD_{50}}{2\,000}$$

$$PDE=\frac{NOEL\times 50\ kg}{F_1\times F_2\times F_3\times F_4\times F_5}$$

式中：F_1=5，F_2=10，F_3= 10，F_4=10，F_5=1。

经计算，NDMA 和 NDEA 的限度分别为 1.5×10^{-6} 和 7.0×10^{-6}，均低于基于 TTC 计算所得的 7.5×10^{-6}。本着从严控制的原则，上述 2 个亚硝胺杂质的限度确定为 1.5×10^{-6}，而杂质 A、B、C 的限度则确定为 7.5×10^{-6}。

3.2 质谱离子源和离子化方式的选择

常见的亚硝胺杂质检测方法有 GC-MS 法[9]和 LC-MS 法[10]，本研究采用 LC-MS 法。检测 NDMA 和 NDEA 时，结合文献[11]中的参数和实际质谱扫描结果，确定其离子参数。

对于另外 3 种杂质，采用正离子模式进行一级质谱扫描，根据扫描结果确定母离子，再用 product ion 模式确定子离子。与文献[5]报道不同，杂质 C 在二级质谱扫描中并没有发生裂解，子离子仍保持母离子的质荷比，杂质 A 和杂质 B 也出现相同情况。受仪器干燥器流速、雾化器温度、毛细管电压等参数的影响，能量过高会造成杂质结构过度裂解，而选用表 2 所示 MRM 参数，对相关杂质的响应值没有影响，仪器灵敏度仍然良好。

同时，因为部分供试品溶液的质量浓度较高，在 11 min 时设置了切阀程序，这可使 5 种潜在基因杂质全部进入质谱仪中进行检测，又保证主成分 **1** 被切入废液，不污染质谱。

参考文献：

[1] 范星岳, 侯雅琴, 贾 旭. 替加环素治疗颅内多重耐药革兰氏阴性杆菌感染研究进展[J]. 世界临床药物, 2025, **46**(2): 196-202.

[2] 王家会, 赵传猛, 张福利, 等. 泰地唑利磷酸酯合成路线图解[J]中国医药工业杂志, 2015, **46**(3): 316-318.

[3] 孟冬朔, 张晓雯, 张子学, 等. HPLC-UV法测定磷酸特地唑胺原料药中的有关物质[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(11): 1556-1564.

[4] 黎龙香, 郑康乐, 王学明. HPLC-MS/MS法测定磷酸特地唑胺中基因毒性杂质含量[J]. 浙江化工, 2024, **55**(3): 48-54.

[5] 苏 爽, 杨继伟, 徐 巧, 等. LC-MS/MS法测定磷酸特地唑胺中2种基因毒性杂质[J]. 中国抗生素杂志, 2025, **50**(1): 65-69.

[6] HAO G, HU R, WANG X, *et al*. *N*-Nitrosodimethylamine formation in metformin hydrochloride sustained-release tablets: effects of metformin and hypromellose used in drug product formulation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, **222**: 115066.

[7] LE CORRE SS, BERCHEL M, COUTHON-GOURVÈS H, *et al*. Atherton-Todd reaction: mechanism, scope and applications [J] *Beilstein J Org Chem*, 2014, **10**: 1166-1196.

[8] 石富江, 王全军. 基因毒性杂质的毒理学评估策略[J]. 中国新药杂志, 2021, **30**(3): 232-235.

[9] 文松松, 牛 冲, 刘 琦, 等. 气相色谱-质谱联用法测定盐酸二甲双胍及制剂中的痕量*N*-亚硝基二甲胺[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(2): 244-249.

[10] 李钰鑫, 扈 麟, 李晓燕, 等. HPLC-MS/MS法测定西咪替丁片中11种*N*-亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 广东化工, 2024, **51**(17): 152-154.

[11] 张一平, 鲍梦娟, 贾永娟, 等. LC-MS/MS法测定盐酸二甲双胍缓释片中*N*-亚硝基二甲胺及其产生原因初探[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(11): 1504-1509.