UPLC-MS/MS 法测定瑞戈非尼中的 2 种基因毒性杂质

齐明燕[1,2]，周　盼[1,2]，孙春艳[1*]，王如伟[2*]
（1. 扬子江药业集团有限公司，江苏泰州 225300；2. 克服递药屏障高端制剂全国重点实验室，江苏泰州 225300）

摘要：建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定瑞戈非尼（**1**）原料药中的 2 种基因毒性杂质 4-（4- 氨基 -3- 氟苯氧基）吡啶 -2- 甲酸（**2**）和 4-（4- 氨基 -3- 氟苯氧基）-*N*-（2- 氟 -4- 羟基苯基）吡啶 -2- 甲酰胺（**3**）。采用 Poroshell 120 EC-C_{18} 柱（3.0 mm×100 mm，1.9 μm），用 0.5%甲酸溶液和乙腈进行梯度洗脱，流速 0.60 mL/min，柱温 30 ℃。采用质谱检测器，在电喷雾离子源、正离子模式下扫描，多反应监测模式下检测。结果表明，**2**、**3** 的质量浓度分别在 0.92 ～ 110.70 和 0.93 ～ 112.19 ng/mL 内与峰面积线性关系良好；LOD 分别为 0.18 和 0.19 ng/mL，且 10%、50%、100%、200%水平样品的加样回收率均在要求范围内。该方法简便、快速、准确，可用于 **1** 原料药中基因毒性杂质的质量控制。

关键词：瑞戈非尼；抗肿瘤药；基因毒性杂质；UPLC-MS/MS；质量控制
中图分类号：R917；R979.1+9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2026)07-0830-04
引用：齐明燕, 周盼, 孙春艳, 等. UPLC-MS/MS法测定瑞戈非尼中的2种基因毒性杂质[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(7): 830-833. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.07.012

Determination of Two Genotoxic Impurities in Regorafenib by UPLC-MS/MS

QI Mingyan[1,2], ZHOU Pan[1,2], SUN Chunyan[1*], WANG Ruwei[2*]
(*1. Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou 225300; 2. National Key Lab. of Advanced Drug Formulations for Overcoming Delivery Barriers, Taizhou 225300*)

ABSTRACT: A UPLC-MS/MS method was established for the simultaneous determination of two genotoxic impurities, 4-(4-amino-3-fluorophenoxy)pyridine-2-carboxylil acid(**2**) and 4-(4-amino-3-fluorophenoxy)-*N*-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)picolinamide(**3**), in regorafenib(**1**) bulk drug. The analysis was performed on a Poroshell 120 EC-C_{18} column(3.0 mm×100 mm, 1.9 μm) with gradient elution using 0.5% formic acid aqueous solution and acetonitrile at a flow rate of 0.60 mL/min, a column temperature of 30 ℃. A mass spectrometric detector equipped with an electrospray ionization source operating in positive ion mode was adopted, and the analytes **2** and **3** were quantified using multiple reaction monitoring. The results showed that impurities **2** and **3** exhibited good linearity over the mass concentration ranges of 0.92 − 110.70 and 0.93 − 112.19 ng/mL, respectively. The LODs were 0.18 and 0.19 ng/mL for **2** and **3**, and the average spiked recoveries at levels of 10%, 50%, 100% and 200% were all within acceptable ranges. This method was simple, rapid and accurate, and could be applied to the quality control of genotoxic impurities in regorafenib(**1**) bulk drug.

Key Words: regorafenib; antineoplastics; genotoxic impurity; UPLC-MS/MS; quality control

瑞戈非尼［regorafenib，4-［4-［［［4- 氯 -3-（三氟甲基）苯基］氨基甲酰］氨基］-3- 氟苯氧基］-*N*- 甲基吡啶 -2- 甲酰胺，**1**，图 1］是德国拜耳公司研发的一种新型口服多靶点激酶抑制剂[1-2]。**1** 为索拉非尼的氟化衍生物[3-4]，能抑制肿瘤细胞增殖相关的关键激酶，阻滞肿瘤微环境中的血管形成，促进肿瘤细胞凋亡，延缓耐药性产生[5-6]。**1** 于 2012 年 9 月获 FDA 批准上市，2017 年 3 月在中国上市[7]，用于晚期结直肠癌、肝细胞癌及胃肠道间质瘤的治疗[8]。2018 年，该药被纳入我国医保乙类目录，显著提高

收稿日期：2025-11-28
作者简介：齐明燕，工程师，从事药物分析工作。
通信作者：孙春艳，副主任药师，从事药物质量研究工作。
王如伟，高级工程师，从事中药、化药的新药开发工作。

了患者的用药可及性。**1** 市场前景广阔，但其长期的用药安全仍需进一步监测评估。

基因毒性杂质可通过亲核取代反应与 DNA 碱基（如鸟嘌呤 N^7 位点）共价结合，形成 DNA 加合物，进而诱发碱基错配、链间交联或单 / 双链断裂[9]。在 **1** 的合成路线中，易产生多种工艺杂质，其中杂质 4-(4- 氨基 -3- 氟苯氧基）吡啶 -2- 甲酸（**2**）及 4-(4- 氨基 -3- 氟苯氧基）-*N*-(2- 氟 -4- 羟基苯基）-吡啶 -2- 甲酰胺（**3**）均含苯胺类警示结构。根据 ICH M7(R2) 指导原则《评估和控制药物中 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在致癌风险》中的技术要求，须对工艺中存在警示结构的潜在 DNA 反应性杂质开展遗传毒性风险评估研究，并结合风险评估结果及毒理学数据制定相应的杂质控制限度，实现药物致癌风险的可控管理[10-12]。**1** 原研厂家发布的药品说明书中提到，**1** 的最大日服剂量为 160 mg；考虑到本品为抗肿瘤药，用药周期一般不超过 10 年，再根据 ICH M7 指导原则《基因毒性杂质》及 ChP 2025 年版四部通则 9306《遗传毒性杂质控制指导原则》的要求，确定单个杂质的日摄入量为 10 μg，计算得基因毒性杂质限度为 62.5×10^{-6}。

目前尚未见文献报道 **1** 中 **2**、**3** 的含量检测方法。本文建立了 UPLC-MS/MS 法同时检测 **1** 中痕量的 **2**、**3**，并进行完整的方法学验证。所构建的分析方法可用于该产品的质量放行检测，为保障检测结果精准、可靠提供技术支撑。

1 仪器与试药

Xevo TQ-S micro 型液相色谱质谱联用仪（美国 Waters 公司）；XPE205DR 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 原料药（扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司，含量 99.2%、99.5%、98.9%、99.4%、99.4%、99.8%，批号分别为 1911401、19051401、19110701、RGA2012001、RGA2012002、RGA2012003）；**2** 对照品（含量 95.35%，批号 RGFN-2201）和 **3** 对照品（含量 99.25%，批号 RGFN-220407）均购自山东博洛德生物科技有限公司；甲酸、乙腈、DMSO 均为色谱纯；试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

空白溶液：将 DMSO 950 mL 与水 50 mL 混合，加入甲酸 5 mL，摇匀，即得。

对照品贮备液：精密称取 **2** 和 **3** 的对照品各 12.5 mg，置同一 100 mL 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀；精密量取上述溶液 1.5 mL，置 100 mL 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，即得。

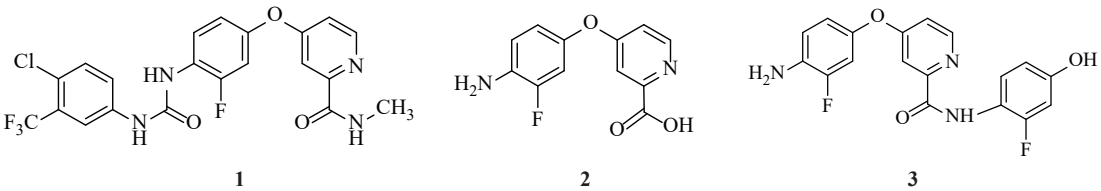
对照品溶液：精密量取对照品贮备液 1 mL，置 50 mL 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，制成质量浓度为 37.5 ng/mL 的对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药 30 mg，置 50 mL 量瓶中，加适量空白溶液超声溶解，放冷后用空白溶液定容，摇匀，制成质量浓度为 0.6 mg/mL 的供试品溶液。

100%水平加标供试品溶液：称取 **1** 原料药 30 mg，置 50 mL 量瓶中，加入对照品贮备液 1 mL，加空白溶液超声溶解并定容至刻度，摇匀，即得。

2.2 UPLC-MS/MS 条件

色谱条件：色谱柱 Poroshell 120 EC-C_{18} 柱（3.0 mm×100 mm，1.9 μm）；流动相 A 为 0.5%甲酸溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—8.0 min，B 5%—70%；8.0—8.5 min，B 70%—90%；8.5—10.5 min，



1 **2** **3**

图 1 1、2 及 3 的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of **1**, **2** and **3**

B 90%；10.5—11.0 min，B 90%—5%；11.0—14.0 min，B 5%）；柱温 30 ℃；流速 0.6 mL/min；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源，正离子模式；毛细管电压 3 kV；脱溶剂气温度 600 ℃；脱溶剂气流速 1 000 L/h；锥孔气流速 50 L/h；离子源温度 150 ℃。采用多反应监测模式，具体参数如表 1 所示。

表 1　多反应监测模式的参数设置

Tab.1　Parameter Settings for Multiple Reaction Monitoring

监测化合物	母离子 (*m*/*z*)	子离子 (*m*/*z*)	采样锥电压 /V	碰撞能 /eV
2	249	203	35	17
3	358	340	35	18

2.3　专属性试验

取“**2.1**”项下空白溶液、对照品溶液、供试品溶液各 5 μL，按“**2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果（图 2）表明，该方法专属性良好，空白溶液在待测组分出峰处无干扰。

2.4　LOD 和 LOQ

取“**2.1**”项下对照品溶液，用空白溶液逐步稀释，按“**2.2**”项下条件进样测定，以信噪比 *S*/*N* 为 3 和 10 时的质量浓度为 LOD 和 LOQ。结果表明，**2**、**3** 的 LOD 分别为 0.18、0.19 ng/mL；LOQ 分别为 0.92、0.93 ng/mL。取 LOQ 溶液连续测定 6 次，计算得 **2**、**3** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 4.4%、2.9%，RSD ≤ 10.0%，表明该法灵敏度良好。

2.5　线性试验

分别精密量取“**2.1**”项下对照品贮备液适量，用空白溶剂稀释成系列线性溶液，分别精密量取 5 μL，按“**2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。以各组分的质量浓度（*c*）为横坐标，峰面积（*A*）为纵坐标进行线性回归。结果表明，**2**、**3** 的质量浓度在对照品溶液质量浓度的 2.5%～300.0%水平与峰面积线性关系良好。

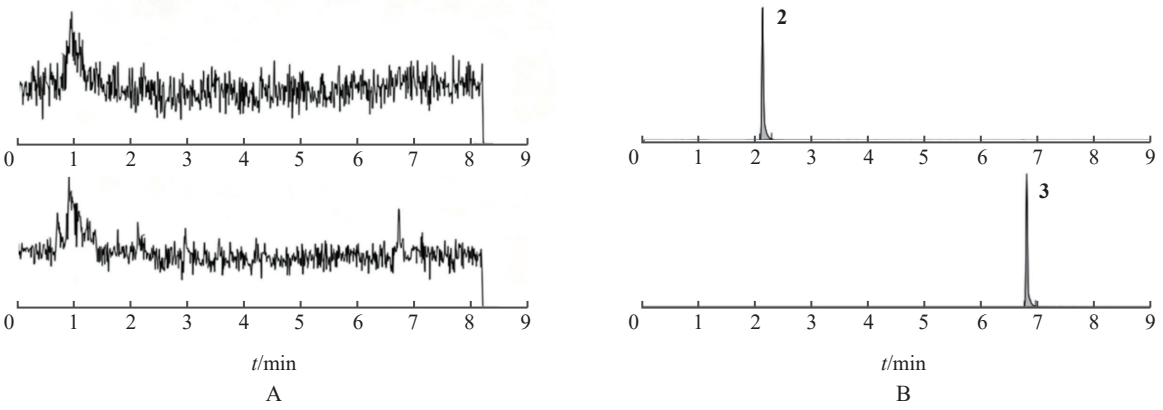
表 2　线性试验结果

Tab.2　Linearity Test Results

杂质名称	线性范围 /(ng·mL^{-1})	线性方程	*r*
2	0.92 ～ 110.70	*A*=3 386.999*c*–154.631 0	0.999 7
3	0.93 ～ 112.19	*A*=2 157.013*c*+471.946 9	0.999 6

2.6　准确度试验

精密称取 **1** 原料药 30 mg 于 50 mL 量瓶中，共 12 份，分别加入“**2.1**”项下对照品贮备液 0.1、0.5、1.0 和 2.0 mL（每个水平平行配制 3 份），加入适量空白溶液超声溶解，放冷后定容，即得各杂质 10%、50%、100%、200%水平的准确度溶液，按“**2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果表明，**2**、**3** 在 10%水平的平均回收率分别为 105.8%、108.5%；**2** 在 50%、100%、200%浓度水平的平均回收率分别为 105.9%、102.7%、105.8%，RSD（*n*=3）为 2.2%；**3** 在 50%、100%、200%浓度水平的平均回收率分



A—空白溶液；B—对照品溶液。

图 2　2、3 的典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms of **2** and **3**

别为 107.0%、102.0%、108.3%，RSD（n=3）为 2.9%，表明该方法准确度良好。

2.7 精密度试验

取“**2.1**”项下对照品溶液，按“**2.2**”项下条件连续测定 6 次，记录色谱图，计算峰面积及保留时间的 RSD。结果表明，**2**、**3** 保留时间的 RSD（n=6）均为 0，峰面积的 RSD（n=6）分别为 3.3%和 3.4%，均不大于 10.0%，表明该法仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

按“**2.1**”项下方法配制供试品溶液和 100%水平加标供试品溶液各 6 份，按“**2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果表明，6 份供试品溶液中 **2**、**3** 均未检出，6 份 100%水平加标供试品溶液中 **2**、**3** 含量的 RSD（n=6）为 2.6%和 1.6%，均不大于 10.0%，表明该法重复性良好。

2.9 溶液稳定性试验

因供试品溶液均未检出 **2**、**3**，故考察 100%水平加标供试品溶液及对照品溶液的稳定性。取“**2.1**”项下 100%水平加标供试品溶液和对照品溶液，室温放置，按“**2.2**”项下条件分别于 0、3.5、8.0、11.5、14.0、19.5、22.0、24.5、26.0 h 时取样检测，记录色谱图。结果表明，对照品溶液在室温放置 26 h，各时间点 **2**、**3** 的峰面积与 0 h 比较，比值均在 80.0%～120.0%，表明对照品溶液基本稳定；100%水平加标供试品溶液在室温放置 24.5 h，各时间点 **2**、**3** 的含量与 0 h 比较，变化绝对值均不大于 12.5×10^{-6}，表明 100%水平加标供试品溶液室温下 24.5 h 内基本稳定。

2.10 耐用性试验

以单因素试验考察不同流速（0.55、0.65 mL/min）、不同柱温（28、32 ℃）对系统适用性及杂质检出的影响。取“**2.1**”项下对照品溶液及 100%水平加标供试品溶液，其他条件按“**2.2**”项下进样测定，记录色谱图。结果表明，各变动条件下，对照品溶液系统适用性均满足要求；在不同流速条件下，100%水平加标供试品溶液中的 **2**、**3** 与正常条件（流速 0.60 mL/min）相比，含量的 RSD（n=3）分别为 2.3%、1.7%；在不同柱温条件下，100%水平加标供试品溶液中的 **2**、**3** 与正常条件（柱温 30 ℃）相比，含量的 RSD（n=3）分别为 1.9%、3.8%。上述结果表明在流速及柱温发生微小改变的情况下，本法耐用性良好。

2.11 样品检测

选取 6 个不同批次的 **1** 原料药样品，按“**2.1**”项下方法配制供试品溶液，每批样品平行 2 份，按“**2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果表明，6 批样品均未检出目标杂质。

3 讨论

3.1 试验方法的选择

待检杂质 **2**、**3** 具有沸点高、官能团结构相似的特点，较难采用 GC 法检测。方法开发初期，优先考察了 HPLC-UV 检测法，但灵敏度较低，实际应用时需提高供试品浓度或增大进样量，可能会导致系统干扰增大、残留风险升高及基线不稳定等问题，显著增加分析难度。因此，本研究选用灵敏度高、选择性强的质谱检测器，结合待测杂质结构中均含有易质子化氨基的特征，采用电喷雾离子源正离子模式，获得了更佳的质谱响应，满足痕量杂质检测的需求。

3.2 色谱质谱条件的优化

1 属于 BCS Ⅱ类药物，溶解性低，渗透性高，其疏水性结构（含多个芳香环和三氟甲基）使其在常规极性溶剂（如水、甲醇、乙腈）中均难以溶解。针对 **1** 在液相常规体系中溶解性差的问题，本研究使用高比例的非质子溶剂 DMSO 助溶，使 **1** 溶解。考虑到 **2**、**3** 有碱性基团（吡啶氮、氨基），因此使用适合分离中等极性化合物的 Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱，其固定相中键合的带正电官能团可通过静电作用中和硅羟基的负电荷，从而减少碱性化合物与固定相的非特异性吸附，有效改善峰拖尾的情况。

经验证，所建立的方法专属性强、准确度高、精密度及耐用性好，能准确测定原料药中目标杂质的含量，确保质量控制数据的可靠性。该方法不仅适用于 **1** 的质量监测，也为其他含有相似结构杂质的药物分析提供了参考。

（下转第 846 页）

中的应用[J]. 中国药事, 2022, **36**(12): 1424-1429.
[7] 郑小玲, 王征南, 王知坚, 等. 药品微生物检测实验室环境菌库的建立[J]. 中国现代应用药学, 2015, **32**(7): 847-850.
[8] 宋明辉, 李琼琼, 秦峰, 等. 无菌药品生产企业过程污染微生物菌株库的建立及数据分析[J]. 药物分析杂志, 2019, **39**(11): 1954-1960.
[9] 王淑娟, 朱冉, 蒋波, 等. 分子生物学技术在药品微生物鉴定溯源中的应用[J]. 中国药品标准, 2023, **24**(6): 579-584.
[10] 闫雯倩, 陈企发, 夏炎. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在微生物鉴定中的应用[J]. 化学教育(中英文), 2022, **43**(10): 7-14.
[11] 尹盼盼, 白雯静, 李海燕, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在微生物鉴定中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, **50**(10): 4655-4666.
[12] GB/T 16294—2010 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法[S].
[13] 杨玲玲, 李小燕, 朱毅忠. 微生物洁净室环境菌库建立方法探讨[J]. 中国药业, 2021, **35**(7): 763-767.
[14] 黄结, 李雪玲, 朱斌, 等. 药品微生物限度检查真菌污染鉴定溯源[J]. 中国药业, 2023, **32**(20): 91-94.
[15] 白雯静, 王艳炜, 周斌, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)在微生物方面的应用进展[J]. 甘肃科技, 2019, **35**(19): 74-77.
[16] 张浩然, 孙冰清, 徐汀, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术在病原微生物鉴定中的应用[J]. 中国兽医杂志, 2022, **58**(1): 106-109.
[17] 张秋艳, 唐静, 祝素珍, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析技术在微生物鉴定与分型中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, **12**(19): 7549-7555.
[18] 张国林, 苏远科, 沈海英, 等. 16S rRNA/ITS基因序列分析与微生物分类鉴定及其在药品微生物质量控制中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2017, **34**(10): 1489-1495.
[19] 姚瑛, 宣泽, 王霞, 等. 基于16S rRNA测序的制药生产环境微生物菌种分布特征研究[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(8): 1077-1085.
[20] 黄启红, 熊娟, 蔡大川, 等. 微生物洁净室管理与检测质量控制规程的探讨[J]. 食品工程, 2018(2): 5-8.
[21] 卞真红, 姚鲲. 多种消毒剂杀菌效果评价[J]. 广东化工, 2022, **49**(21): 103-105.

(上接第 833 页)

参考文献：

[1] 李宏名, 张娇. 瑞戈非尼结晶工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2025, **42**(5): 754-759.
[2] 金莎莎, 杨庆, 方铂钰, 等. 伊马替尼、瑞戈非尼与华法林的体内药动学相互作用[J]. 中国临床药学杂志, 2025, **34**(7): 481-487.
[3] 洪望龙, 郑淼淼, 马国强, 等. 瑞戈非尼治疗经索拉非尼治疗失败后的肝细胞癌的经济性[J]. 中国药房, 2023, **34**(8): 968-973.
[4] 杨艳丽. 瑞戈非尼定性定量方法的建立及其电氟化合成研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2023: 4.
[5] 郭莉君, 董梅, 王嘉林, 等. LC-ESI-MSMS表征瑞戈非尼的强制降解产物[J]. 中国药师, 2018, **21**(9): 1594-1610.
[6] 汪蓓蕾, 王倩, 杨德志. 瑞戈非尼合成研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(6): 604-608.
[7] 龙霞, 干小红, 曾晓欢. 瑞戈非尼的安全警戒信号检测与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2019, **39**(15): 1573-1577.
[8] 李晓鹏, 钟文辉, 孙元培, 等. 瑞戈非尼有关物质的合成[J]. 化学试剂, 2019, **41**(8): 860-863.
[9] 陈爽, 刘柱, 石云峰, 等. UHPLC-MS/MS法测定瑞戈非尼中两种痕量基因毒性杂质[J]. 药学研究, 2023, **42**(7): 485-488.
[10] 范茜芙, 李杨杰. 苯胺类基因毒性杂质的毒性与检测方法研究进展[J]. 质量安全与检验检测, 2026, **36**(1): 96-100.
[11] 高理想, 林学怡, 庞丽, 等. 亚硝胺类基因毒性杂质的监管策略研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2026, **43**(3): 292-298.
[12] 王秀珍, 张治云, 杨海霞, 等. LC-MS/MS法测定瑞戈非尼中4-(4-氨基-3-氟苯氧基)-*N*-甲基吡啶-2-甲酰胺[J]. 中国药师, 2017, **20**(2): 348-350.