LC–MS/MS法在检测基因毒性杂质方面的应用

郭晓娜　王军玲
石药集团中奇制药技术（石家庄）有限公司　河北　石家庄　050035

摘　要：基因毒性杂质因潜在致癌风险，ICH-M7指南要求控制在ppb级水平，对分析方法的灵敏度与选择性提出严苛要求，而液质联用技术凭借其高灵敏度、高选择性和广泛的适用性，已成为该类杂质检测的核心手段。本文从基本原理、关键技术要点、应用举例三个维度，梳理了近年代表性研究。在原理层面，LC-MS/MS通过多反应监测模式实现痕量定量的机制;在技术要点层面,围绕样品前处理、色谱质谱条件优化方法学验证构建了完整的实验体系;在应用举例中，梳理了亚硝胺类、磺酸酯类基因毒性杂质的代表检测方法及其方法参数。目前液质联用法已成为基因毒性杂质检测的核心技术，未来将向靶向筛查与绿色分析方向发展。

关键词：液相色谱-串联质谱；基因毒性杂质；多反应监测；痕量定量分析

引言：基因毒性杂质因具有潜在DNA反应活性，在药品中的允许暴露量极低，对其精准测定构成分析化学领域的持续挑战。常规检测手段难以兼顾高灵敏度与复杂基质下的选择性要求。液相色谱-串联质谱法将优异的物理分离能力与基于母离子-子离子特征跃迁的质谱监测技术相结合，为痕量水平杂质的定性与定量提供了可行路径。当前，围绕不同类型原料药中该类杂质的检测方法开发虽已有诸多报道，但针对通用性实验参数体系构建及系统化操作规范方面的整合论述仍相对有限。

1 检测方法原理

1.1 液相色谱分离原理

液相色谱分离，说到底是靠固定相和流动相对各组分作用力的差异来实现分离。样品溶液进样后，高压输液泵推着流动相，把各组分带进色谱柱。柱子里填充的固定相颗粒表面带有特定的化学键合相，不同杂质分子因极性、疏水性或离子交换能力不一样，在固定相和流动相两相间的分配系数自然有差别。正因为分配行为各有不同，各组分随流动相向前跑的速度也有快有慢，不同杂质就按时间顺序依次被洗出来。基因毒性杂质通常偏中等极性或弱极性，只要挑对反相柱、调好流动相比例，就能把目标杂质和主成分以及其他干扰物有效分开。

1.2 串联质谱定性定量原理

经液相色谱分离后的目标组分顺序进入质谱检测器。离子源将电喷雾或大气压化学电离技术作用于目标分子，使其获得质子或失去质子而形成带电离子。这些气化离子在质量分析器内受电磁场作用按照质荷比值进行分离。串联质谱采用两级质量分析模式，第一级质量分析器筛选出目标母离子，母离子在碰撞室内与惰性气体分子发生碰撞诱导解离反应，碎裂产生特征性子离子。第二级质量分析器对子离子进行选择性监测。这种多反应监测模式能够有效排除复杂基质中的化学噪声干扰，使方法获得较高的检测灵敏度与选择性。通过记录母离子到子离子的特征跃迁通道信号强度，完成对目标杂质的定性确认与定量测定。

1.3 基因毒性杂质LC-MS/MS检测适配原理

基因毒性杂质通常含有亲电反应性官能团结构，这类物质在体内可能攻击DNA碱基形成加合物。由于该类杂质在药品基质中的允许暴露限度极低，常规检测手段难以满足灵敏度要求。液相色谱与串联质谱联用技术将色谱的高分离能力和质谱的高鉴别能力相结合，能够针对特定基因毒性杂质的分子离子跃迁通道进行选择性监测。基于该类杂质分子结构中含有易于质子化或去质子化的官能团，电喷雾离子源可提供稳定且高效的离子化效率[1]。通过优化碰撞能量参数，母离子能够碎裂生成高强度特征子离子，确保在极低浓度水平下仍可获得可辨识的质谱响应信号。

2 液质联用技术检测基因毒杂质的技术要点

2.1 样品前处理

样品前处理是液质联用检测基因毒杂质的第一道关口，处理效果直接决定后续分析的灵敏度和准确度。基因毒杂质在药物中的允许限度通常很低，样品基质又复杂，前处理不到位就会出现回收率偏低、基质效应严重或色谱峰形异常。首先要根据杂质的理化性质选择合适的溶解溶剂，一般优先选用与流动相组成接近的体系，减少进样后溶剂效应。其次，提取方式需要结合基质类型确定，原料药相对简单，制剂则要考虑辅料干扰，超声提取配合离心和过滤是比较常用的组合。对于基质干扰较大的样品，固相萃取和液液萃取仍是有效手段。样

品溶液配好后应关注稳定性，必要时进行低温避光保存并在规定时间内完成进样，避免杂质降解或二次吸附导致数据失真。

2.2 色谱条件优化

色谱条件优化的目标是在较短时间内实现基因毒杂质与主成分及相邻杂质的有效分离，同时保证目标物有足够的响应值。固定相的选择是首要环节，C18柱是常规起点，但对于极性较大或保留较弱的杂质，C8柱或具有极性嵌入基团的色谱柱往往效果更好。流动相的优化同样关键，水相中加入甲酸或乙酸铵有助于改善离子化效率，有机相则需根据分离需要选择甲醇或乙腈，两者混合使用有时能兼顾洗脱能力和峰形。梯度洗脱程序的设计要考虑杂质与主成分的保留差异，在保证分离度的前提下尽量缩短运行时间。柱温、流速和进样量也需要同步优化，柱温升高有助于降低柱压和改善峰形，但过高可能影响某些不稳定杂质的响应。质谱端的参数应与色谱条件匹配，多反应监测模式下的母离子和碎片离子选择要结合杂质结构确定，确保目标物在复杂基质中仍能获得稳定且灵敏的检测信号。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性检测操作

系统适用性试验可在每批样品测定之前执行。连续进样标准溶液5次或6次，记录各目标杂质峰面积。计算其相对标准偏差，该值应不大于2%。系统适用性测试通过后方可开展后续标准曲线和样品测定工作。近年来发布的LC-MS/MS测定化药原料中基因毒性杂质的分析方法对此环节亦有严格要求，例如苏爽等建立的磷酸特地唑胺中2种基因毒性杂质测定方法中，采用WatersBEHC18色谱柱，以0.1%甲酸水和0.1%甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱，在系统适用性试验中2种杂质在0.375~30μg/L范围内线性关系良好[2]；占小兵等建立的克唑替尼原料药中潜在基因毒性杂质WHT1408-Q2H的HPLC-ESI-MS/MS测定方法中，使用AgilentEclipseXDBC8色谱柱，同样采用0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈流动相体系，梯度洗脱条件下目标杂质在2~40ng/mL范围内线性相关系数达0.9999[3]。

2.3.2 线性检测操作

标准工作溶液按浓度由低到高依次进样，每个浓度点重复进样两次，记录目标杂质峰面积。以溶液浓度为横坐标、峰面积为纵坐标。方法学验证已有文献支持：李筱玲等采用UPLC-MS/MS测定盐酸决奈达隆中三种遗传毒性杂质，线性范围(ng/mL)分别为20.13~805.1、62.15~776.9和5.081~813.0，相关系数r均不低于0.999；齐明燕等测定瑞戈非尼中两种杂质，相应线性范围各为0.92~110.70和0.93~112.19，结果同样良好[4]。

2.3.3 待测样品检测操作

前处理后的供试品溶液放入自动进样器样品盘，按设定序列依次进样。每份供试液进样两次，记录目标杂质峰面积，取平均后代入当日拟合的标准曲线回归方程，即可算出供试品中的目标杂质浓度。测出来的响应值必须落在标准曲线的线性动态范围内；要是高了或低了，就得把供试液适当稀释再重新进样，直到响应值回到线性区间为止。占小兵等用HPLC-ESI-MS/MS法测了三批克唑替尼原料药中的WHT1408-Q2H，结果三批都没检出该杂质，表明当前工艺对该基因毒性杂质控制得不错[3]。苏爽等检测磷酸特地唑胺片及原料药中的杂质时发现，杂质主要源自原料药，且两种杂质总量均低于规定限值。以上实例说明，LC-MS/MS法完全能胜任化药原料中痕量基因毒性杂质的定量检测需求。

2.3.4 空白与对照品检测操作

为了监测系统残留和试剂污染，设置了空白溶液，前处理同供试品溶液；另外还配制对照品，即空白基质里加已知量的目标杂质。进样时，把空白、对照品和供试品交叉着放在同一批序列里。从回收率看，磷酸特地唑胺法中四个加标水平（25%、50%、100%、150%）的回收率在96.9%~129.6%之间，RSD小于5%；克唑替尼法低中高三水平回收率95.6%~102.7%，RSD为0.4%~0.7%；瑞戈非尼法在10%、50%、100%、200%水平也全在可接受范围；盐酸决奈达隆法中杂质Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的平均回收率分别是93.0%~99.4%、83.5%~91.7%和82.0%~92.9%[5]。

3 应用举例

3.1 亚硝胺类杂质的LC-MS/MS检测应用

亚硝胺类杂质因致癌性强且限度极低，是LC-MS/MS法应用最集中的领域。2022年有研究建立了替米沙坦原料中16种N-亚硝胺类基因毒性杂质的UPLC-MS/MS检测方法，采用Biphenyl色谱柱，以0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸的甲醇溶液梯度洗脱，APCI离子源正离子扫描，多反应监测模式定量。16种杂质在1至20纳克每毫升范围内线性良好，加样回收率为90.1%至109.1%，检测限为0.03至0.26纳克每毫升，定量限为0.13至0.84纳克每毫升[6]。这些方法普遍采用APCI源，因为亚硝胺类杂质极性较弱，APCI比ESI响应更稳定，动态多反应监测模式可有效降低基质干扰。

3.2 磺酸酯类杂质的LC-MS/MS检测应用

磺酸酯类杂质分为烷基磺酸酯和芳基磺酸酯两类。2022年有研究建立了UPLC-MS/MS法测定盐酸法舒地尔中2种烷基磺酸酯类基因毒杂质，采用BEH C18色谱柱，以

0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸甲醇溶液等度洗脱，正离子电喷雾多反应监测模式测定。方法检出限分别为0.51和0.48纳克每毫升，定量限分别为2.05和1.90纳克每毫升[7]。2024年有研究建立了UPLC-MS/MS法测定苯磺酸氯吡格雷中5种苯磺酸酯类遗传毒性杂质，对硝基苯磺酰氯和对硝基苯磺酸的检出限和定量限分别为0.045纳克每毫升和0.150纳克每毫升，对硝基苯磺酸甲酯、乙酯和异丙酯的检出限和定量限分别为0.113纳克每毫升和0.375纳克每毫升[8]。这些方法表明LC-MS/MS对烷基磺酸酯和芳基磺酸酯均有良好的灵敏度和准确度，色谱柱多选用C18或氟苯基柱，流动相以甲酸水和甲醇或乙腈体系为主。

结束语

LC-MS/MS将液相色谱的高分离能力与串联质谱的多反应监测模式结合，为基因毒性杂质的痕量检测提供了可靠手段。前处理净化、色谱条件优化和方法学验证共同决定方法的灵敏度、选择性与准确性。针对亚硝胺和磺酸酯类杂质，合理选择离子源、色谱柱和流动相，可降低基质干扰并满足低限度定量要求。后续应完善样品处理与检测条件，强化过程质量控制，提升复杂基质中痕量杂质的检测能力，为药品质量评价提供稳定支撑。

参考文献

[1]刘蝶,彭霄逍,方静美,等.基于GC-MS/MS和LC-MS/MS检测原料药中的14种磺酸酯类基因毒性杂质[J].药学学报,2024,59(2):424-431.

[2]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

[3]占小兵,秦怡,颜滢,等.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[J].色谱,2025,43(11):1262-1267.

[4]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.中国医药工业杂志.2026,57(7):830.

[5]李彬,李丽婉.气相色谱法测定非布司他原料药中的基因毒性杂质盐酸羟胺[J].天津药学,2024,36(2):18-21.

[6]袁松,黄海伟,于颖洁,等.UPLC-MS/MS法测定替米沙坦中16种N-亚硝胺类基因毒性杂质[J].中国新药杂志,2022,31(5):477-482.

[7]冷佳蔚,石峰,杭宝建,等.超高效液相色谱-三重四极杆质谱测定盐酸法舒地尔中2种烷基磺酸酯类基因毒杂质[J].食品与药品,2022,24(6):503-506.

[8]乔敏莎,郑秋莹,兰为环,等.UPLC-MS/MS法测定苯磺酸氯吡格雷中5种遗传毒性杂质[J].化工与医药工程,2024,45(1):39-45.