

LC-MS/MS 测定酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质

戴寿沣¹, 陈爽², 张舒²(1.浙江工业大学, 杭州 310000; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 方法测定酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质(6-氨基喹喔啉、4-硝基邻苯二胺、6-氨基-5-溴喹喔啉)的含量。方法 采用色谱柱 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1%乙酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 流速 0.35 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃; 采用 Shimadzu LC30 UPLC-AB Science 4000+三重四极杆液质联用仪和多反应离子监测模式二级质谱 MS/MS(ESI)源检测, 正离子模式采集数据。结果 6-氨基喹喔啉、4-硝基邻苯二胺、6-氨基-5-溴喹喔啉分别在 9.98~199.50, 9.94~198.74, 10.03~200.55 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好; 低、中、高浓度(50, 100, 150 ng·mL⁻¹)回收率为 94.8%~110.8%, RSD 均<4.2%; 溶液在 12 h 内稳定性良好。结论 本方法操作简便, 结果可靠, 可以用于酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质(6-氨基喹喔啉、4-硝基邻苯二胺、6-氨基-5-溴喹喔啉)的控制。

关键词: 酒石酸溴莫尼定; 苯胺类基因毒性杂质; 液相色谱-质谱联用; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)12-1479-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.012

引用本文: 戴寿沣, 陈爽, 张舒, 等. LC-MS/MS 测定酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1479-1483.

Determination of Anilines Genotoxic Impurity in Brimonidine Tartrate by LC-MS/MS

DAI Shoufeng¹, CHEN Shuang², ZHANG Shu²(1.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310000, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish LC-MS/MS method for the determination of anilines genotoxic impurities (6-aminoquinoxaline, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, and 6-amino-5-bromoquinoxaline) in brimonidine tartrate. **METHODS** The method was achieved on a ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) utilizing a mobile phase of 0.1% acetic acid(A)-acetonitrile(B) with gradient elution at the flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. The temperature of column was set at 35 °C. The Shimadzu LC30 UPLC-AB Science 4000+ LC-MS was used to detect(ESI source) in multiple reaction monitoring positive mode. **RESULTS** The calibration curves of 6-aminoquinoxaline, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, 6-amino-5-bromoquinoxaline were linear in 9.98–199.50, 9.94–198.74, 10.03–200.55 ng·mL⁻¹. The average recoveries of the control samples at low, middle and high concentrations(50, 100, 150 ng·mL⁻¹) were 94.8%–110.8%, all RSDs were <4.2%, solution stability was good within 12 h. **CONCLUSION** The method is convenient to operate and has reliable results for the determination of anilines genotoxic impurities of 6-aminoquinoxaline, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, 6-amino-5-bromoquinoxaline in bromnidine tartrate.

KEYWORDS: brimonidine tartrate; anilines genotoxic impurity; LC-MS/MS; quality control

基因毒性杂质(或称遗传毒性杂质)化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA, 产生基因突变或体内诱变, 具有致癌可能或者倾向。欧洲药品管理局、美国食品药品监督管理局及人用药品注册技术要求国际协调会先后颁布了基因毒性杂质控制的指导文件^[1-2], 推荐以毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC, 1.5 μg·d⁻¹)来控制用药风险^[3], 并发布基因毒性警示结构基团。

酒石酸溴莫尼定是一种新型高度选择性 α₂-肾上腺素能受体激动剂, 本品用以治疗开角型青光眼、高眼压症以及防治眼前节激光手术后的眼压升高。酒石酸溴莫尼定的合成路线见图 1, 其中

起始物料及多步中间体结构中均含有苯胺类基因毒性警示结构基团, 具有潜在基因毒性, 见图 2。

酒石酸溴莫尼定已收载于中国药典 2015 年版^[4]和欧洲药典^[5], 其中欧洲药典要求关注上述苯胺类基因毒性杂质的控制, 但未提供具体的检测方法, 目前也未见相关文献报道本品中苯胺类基因毒性杂质的测定方法^[6-10], 因此本研究对酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质的含量进行控制, 采用 LC-MS/MS 定量测定酒石酸溴莫尼定中的 4-硝基邻苯二胺、6-氨基喹喔啉和 6-氨基-5-溴喹喔啉, 限度为 100 μg·g⁻¹, 并进行了相应的方法学研究, 为酒石酸溴莫尼定工艺过程控制和质量

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目(2018C37054)

作者简介: 戴寿沣, 男, 硕士, 主管药师

Tel: 13575746825

E-mail: 153483764@qq.com

保障提供参考依据。

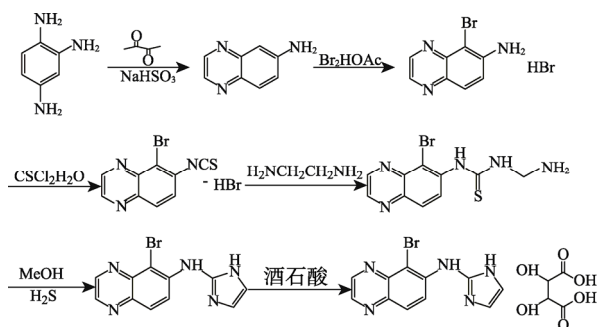


图1 酒石酸溴莫尼定合成路线图

Fig. 1 Synthetic route of brimonidine tartrate

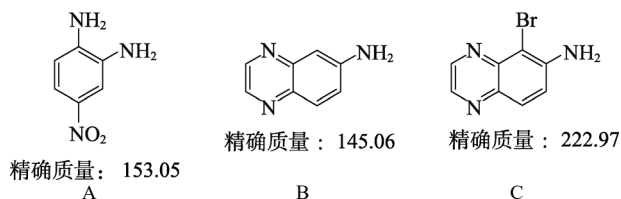


图2 酒石酸溴莫尼定中苯胺类基因毒性杂质

A-4-硝基邻苯二胺; B-6-氨基喹啉; C-6-氨基-5-溴喹啉。

Fig. 2 Anilines genotoxic impurity in brimonidine tartrate
A-4-nitro-o-phenylenediamine; B-6-aminoquinoline; C-6-amino-5-bromoquinoline.

1 仪器与试剂

Shimadzu LC30 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); AB SCIEX API4000+超高效液相色谱仪、SCIEX API4000+三重四极杆质谱仪均购自美国AB公司, 配备 ESI 离子源, 质谱软件为 Analyst 1.6.3 采集工作站; XS3DU 百万分之一电子天平(瑞士梅特勒托利多公司)。

6-氨基喹啉对照品(批号: APX674; 纯度: 95%)、4-硝基邻苯二胺对照品(批号: AT2704; 纯度: 98%)、6-氨基-5-溴喹啉对照品(批号: ANP714; 纯度: 99.52%)均购自上海毕得医药科技有限公司; 酒石酸溴莫尼定(常州亚邦制药有限公司, 批号分别为 M170901, M190601, M190701); 乙腈、乙酸均为色谱级(默克试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

液相色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 流速 0.35 mL·min⁻¹; 0.1% 乙酸水为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱(0~0.5 min, 5% B; 0.5~3.5 min, 5%→80% B; 3.5~4.7 min, 80% B; 4.7~4.8 min, 80%→5% B; 4.8~6.0 min, 5% B); 柱温 35 °C; 进样体积 2 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 正离子检测模式

MRM 采集, 参数见表 1。喷雾电压为 5.5 kV, 离子源温度为 500 °C, 气帘气为 25 psi, 雾化气为 50 psi, 辅助气为 55 psi, 以多反应监测扫描模式, 质谱采集时间为 0.2~6.0 min。

2.2.1 母离子 取 100 ng·mL⁻¹ 混标对照品溶液, 在 SCAN 模式下进样, 进行一级 MS 分析, 各杂质的一级质谱图见图 3, 其中 6-氨基喹啉的母离子为 *m/z* 146.0, 4-硝基邻苯二胺母离子为 *m/z* 154.0, 6-氨基-5-溴喹啉母离子为 *m/z* 223.9。

2.2.2 子离子 取 100 ng·mL⁻¹ 混合对照品溶液, 在 Product Ion 模式下进样, 进行 MS/MS 分析, 二级质谱图见图 3, 试验中对二级质谱碰撞能量进行了优化, 各基因毒性杂质的 MRM 参数见表 1, 定量离子及定性离子的选择见表 1。

表 1 MRM 采集参数设置

Tab. 1 MRM sampling parameter

对照品	定量/定性	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能 量/eV	去簇电 压/V	扫描时 间/ms
6-氨基喹啉	定量离子	146.0	119.0	29	71	75
	定性离子	146.0	65.1	47		
4-硝基邻苯二胺	定量离子	154.0	137.1	19	61	75
	定性离子	154.0	107.2	29		
6-氨基-5-溴喹啉	定量离子	223.9	145.1	35	91	
	定性离子	223.9	118.0	45		

2.3 混合对照品溶液的配制

精密称取 6-氨基喹啉对照品、4-硝基邻苯二胺对照品、6-氨基-5-溴喹啉对照品各适量, 加稀释剂[水-乙腈(50:50)]溶解并稀释成 1.0 μg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液。精密量取适量, 稀释 10 倍, 作为 100 ng·mL⁻¹ 混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

取本品约 20 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶, 用稀释剂溶解并稀释到刻度, 摇匀, 作为供试品溶液(1 mg·mL⁻¹)。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 取稀释剂按“2.1”项下色谱条件进行试验, 记录色谱图, 见图 4, 结果显示稀释剂不干扰测定, 表明该方法专属性良好。

2.5.2 线性关系、检测限和定量限 精密量取混合对照品储备液适量, 加稀释剂稀释得到浓度分别为 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ng·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 进样分析, 绘制标准曲线, 得线性方程。逐步稀释, 考察定量限及检测限, 结果见表 2。

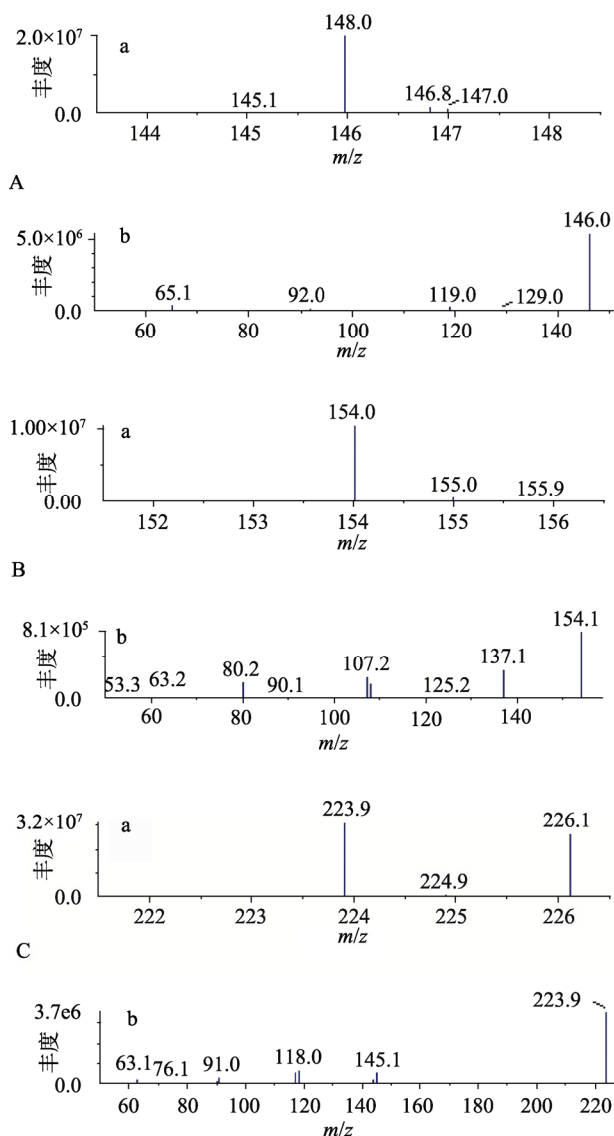


图3 各基因毒性杂质的一级、二级质谱图
A-6-氨基喹啉；B-4-硝基邻苯二胺；C-6-氨基-5-溴喹啉；a—一级质谱图；b—二级质谱图。

Fig. 3 MS and MS² spectrum of genotoxic impurities
A-6-aminoquinoline; B-4-nitro-*o*-phenylenediamine; C-6-amino-5-bromoquinoline; a-MS spectrum; b-MS² spectrum.

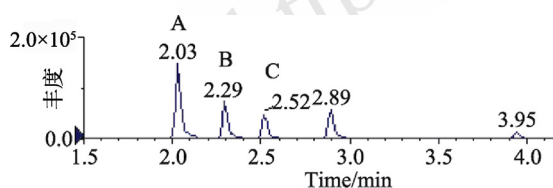


图4 混合对照品溶液总离子流图
A-6-氨基喹啉；B-4-硝基邻苯二胺；C-6-氨基-5-溴喹啉。

Fig. 4 Total ion current of mix reference substances solution
A-6-aminoquinoline; B-4-nitro-*o*-phenylenediamine; C-6-amino-5-bromoquinoline.

2.5.3 稳定性试验 取“2.3”项下 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液，连续进样 12 h 进行分析，各峰面积的 RSD 均 $<2.1\%$ ，表明对照品溶液在 12 h 内稳定性良好。

表2 酒石酸溴莫尼定中各基因毒性杂质的线性范围及定量限、检测限

Tab. 2 Linearity range, limit of quantitation and limit of detection of genotoxic impurities in brimonidine tartrate

基因毒性杂质	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	定量限/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	检测限/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
6-氨基喹啉	$y=2\,292.2x+18\,675.8$	0.996 1	9.98~199.50	0.2	0.05
4-硝基邻苯二胺	$y=1\,164.5x-2\,935.1$	0.999 4	9.94~198.74	0.2	0.1
6-氨基-5-溴喹啉	$y=683.6x+2\,478.1$	0.998 8	10.03~200.55	0.2	0.1

2.5.4 加样回收率和仪器精密度试验 精密称取酒石酸溴莫尼定(批号: M170901)约 20 mg，一式 9 份，分别置 20 mL 量瓶中，精密加入“2.5.2”项下浓度为 50, 100, 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液，分别溶解并稀释至刻度，摇匀，即得低(50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 份)、中(100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 份)、高(150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 份)3 个浓度的供试品加样溶液，取混合对照品溶液和各供试品加样溶液分别进样分析，外标法计算回收率结果见表 3，各基因毒性杂质回收率均在 94.8%~110.8%之间，RSD 均 $<4.2\%$ ，表明各基因毒性杂质回收率和仪器精密度良好。

表3 酒石酸溴莫尼定中各基因毒性杂质的加样回收率

Tab. 3 Recoveries of genotoxic impurities in brimonidine tartrate

基因毒性杂质	加入量/ng	测得量/ng	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
6-氨基喹啉	970.3	959.1	98.8	98.6	3.0
		1 011.6	104.3		
		987.9	101.8		
	1 940.7	1 907.5	98.3		
		1 932.5	99.6		
		1 854.6	95.6		
	2 911.0	2 832.4	97.3		
		2 759.6	94.8		
		2 828.0	97.2		
4-硝基邻苯二胺	995.7	989.8	99.4	107.3	4.2
		1 083.8	108.9		
		993.8	99.8		
	1 991.4	2 205.0	110.7		
		2 205.6	110.8		
		2 141.9	107.6		
	2 987.0	3 274.5	109.6		
		3 310.7	110.8		
		3 228.7	108.1		
6-氨基-5-溴喹啉	1 006.74	1 090.6	108.3	103.5	3.6
		1 097.4	109.0		
		1 020.6	101.4		
	2 013.49	2 053.2	102.0		
		2 136.2	106.1		
		2 063.5	102.5		
	3 020.23	3 033.2	100.4		
		3 137.4	103.9		
		2 953.5	97.8		

2.6 样品测定

取酒石酸溴莫尼定供试品 3 批(批号: M170901, M190601, M190701), 每批精密称取 2 份约 20 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 进样分析, 结果 3 批次酒石酸溴莫尼定中 6-氨基喹啉、4-硝基邻苯二胺、6-氨基-5-溴喹啉和 5-溴-6-异硫氰酸喹啉均未检出, 6-氨基-5-溴喹啉有检出, 检出量均低于定量限, 见表 4 和图 5。

表 4 酒石酸溴莫尼定中基因毒性杂质检测结果

Tab. 4 Result of residue determination about genotoxic impurity in brimonidine tartrate %

批号	6-氨基喹啉	4-硝基邻苯二胺	6-氨基-5-溴喹啉
M170901	0.000 0	0.000 0	0.002 7
M190601	0.000 0	0.000 0	0.002 0
M190701	0.000 0	0.000 0	0.002 5

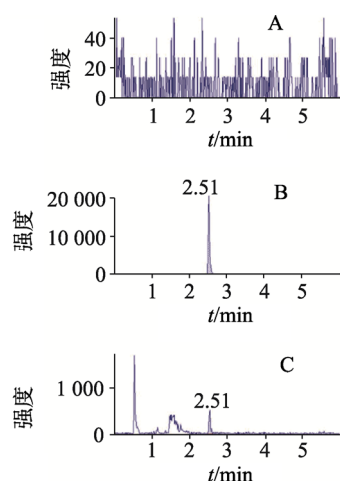


图 5 6-氨基-5-溴喹啉检测的 MRM 图谱

A-空白溶液; B-6-氨基-5-溴喹啉对照品溶液; C-样品(批号: M170901)。

Fig. 5 MRM chromatograms of 6-amino-5-bromoquinoline

A-blank solvent; B-6-amino-5-bromoquinoline reference substance; C-sample(batch No: M170901)

3 讨论

3.1 酒石酸溴莫尼定的合成工艺

以 4-硝基邻苯二胺为原料, 在亚硫酸氢钠存在下与乙二醛水溶液反应得到 6-氨基喹啉, 溴化得到 6-氨基-5-溴喹啉, 经异硫氰化生成 5-溴-6-异硫氰酸喹啉, 再经胺乙基化、环合最后成盐, 见图 1。合成路线中涉及多个起始物料及中间体带有基因警示结构, 因此, 必须对酒石酸溴莫尼定合成路线中引入的带有基因警示结构的潜在基因毒性杂质进行控制。

3.2 色谱条件的优化

色谱条件优化试验中, 探索了甲醇和乙腈 2 种有机相, 水相中添加不同比率的酸(0.1%甲酸水、0.05%甲酸水和 0.1%乙酸水)对分离度和灵敏度的影响。结果显示, 采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱, 当流动相 0.1%乙酸水溶液-乙腈梯度洗脱时, 4-硝基邻苯二胺、6-氨基喹啉、6-氨基-5-溴喹啉响应较好, 且 3 个化合物分离度良好, 故流动相中选择 0.1%乙酸水。本试验考察了流速 0.2~0.4 mL·min⁻¹ 内对苯胺类物质响应和峰形的影响, 发现流速为 0.35 mL·min⁻¹ 时, 4-硝基邻苯二胺、6-氨基喹啉、6-氨基-5-溴喹啉离子化效率最高, 出峰时间合适, 且峰形较好。

3.3 质谱解析

6-氨基喹啉的质谱图中 m/z 146.0 为 $[M+H]^+$ 离子, 主要的碎片离子有 m/z 119.1 和 m/z 65.1, 其中 m/z 119.1 和 m/z 65.1 均为 6-氨基喹啉开环产物, 均反映了 6-氨基喹啉的结构特征, 质谱裂解方式见图 6。试验中对二级质谱碰撞能量进行了优化, 6-氨基喹啉中 2 个离子对 m/z 146.0→119.1 和 m/z 146.0→65.1 的 MRM 参数见表 1, 其中, 离子对 m/z 146.0→119.1 的信噪比离子对 m/z 146.0→65.1 更高, 因此选择 m/z 146.0→119.1 作为定量离子对, m/z 146.0→65.1 作为定性离子对。4-硝基邻苯二胺、6-氨基-5-溴喹啉的质谱裂解方式见图 7~8, 定量离子及定性离子选择见表 1。

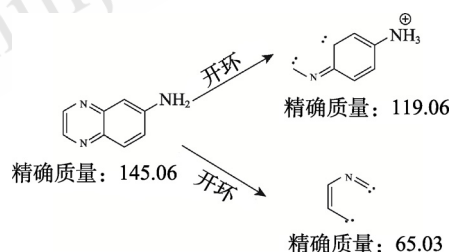


图 6 6-氨基喹啉的质谱裂解途径

Fig. 6 MS fragmentation pathway of 6-aminoquinoline

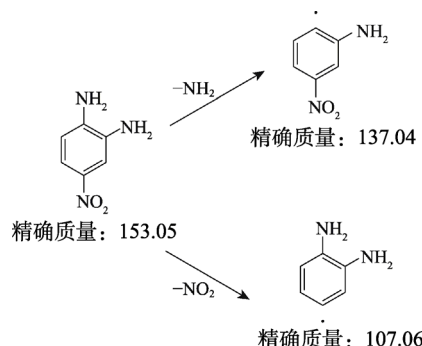


图 7 4-硝基邻苯二胺的质谱裂解途径

Fig. 7 MS fragmentation pathway of 4-nitro-o-phenylenediamine

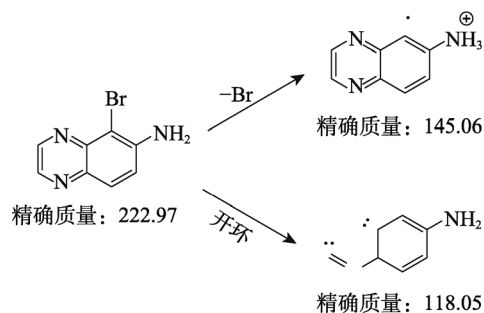


图8 6-氨基-5-溴喹喔啉的质谱裂解途径

Fig. 8 MS fragmentation pathway of 6-amino-5-bromo-quinoxaline

本研究建立了超高效液相色谱-质谱联用法测定酒石酸溴莫尼定中的3种苯胺类基因毒性杂质(6-氨基喹喔啉, 4-硝基邻苯二胺, 6-氨基-5-溴喹喔啉), 并进行了方法学验证, 可以有效控制酒石酸溴莫尼定的潜在苯胺类基因毒性杂质。该方法专属性强, 灵敏度高, 满足基因毒性杂质测定要求, 可以作为酒石酸溴莫尼定原料药中苯胺类基因毒性杂质的质控方法。

REFERENCES

- [1] European Medicines Agency(EMA). Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities(欧洲药品管理局关于基因毒性杂质限度指导原则)[EB/OL]. [2015-03-02]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf.
- [2] European Medicines Agency(EMA). Questions and Answers on the Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [EB/OL]. (2010-09-23) [2015-03-02]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002907.pdf.
- [3] RAMAN NVVSS, PRASAD AVSS, REDDY K R. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: a pharmaceutical industry perspectives[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(4): 662.
- [4] 中国药典[S]. 2015 年版第一增补本: 1426.
- [5] EP 9.0[S]. 2017: 1864-1865.
- [6] 黄翠云, 陈静. HPLC-MS/MS 测定酒石酸溴莫尼定滴眼液的含量[J]. 海峡药学, 2020, 32(2): 52-54.
- [7] CAO L, LUO S Q, ZHANG Y, et al. Determination of trace genotoxic impurities of benzenesulfonate esters in amlodipine besilate by LC-QQQ-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(11): 1296-1300.
- [8] LU F, XING S S, WANG Y. Determination of methyl p-toluenesulfonate and ethyl p-toluenesulfonate in me acetate by LC-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 657-659.
- [9] OH D J, CHEN J L, VAJARANANT T S, et al. Brimonidine tartrate for the treatment of Glaucoma[J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(1): 115-122.
- [10] JIANG S, CHAPPA A K, PROKSCH J W. A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for the quantitation of brimonidine in ocular fluids and tissues[J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(3): 107-114.

收稿日期: 2020-06-05
(本文责编: 曹粤锋)