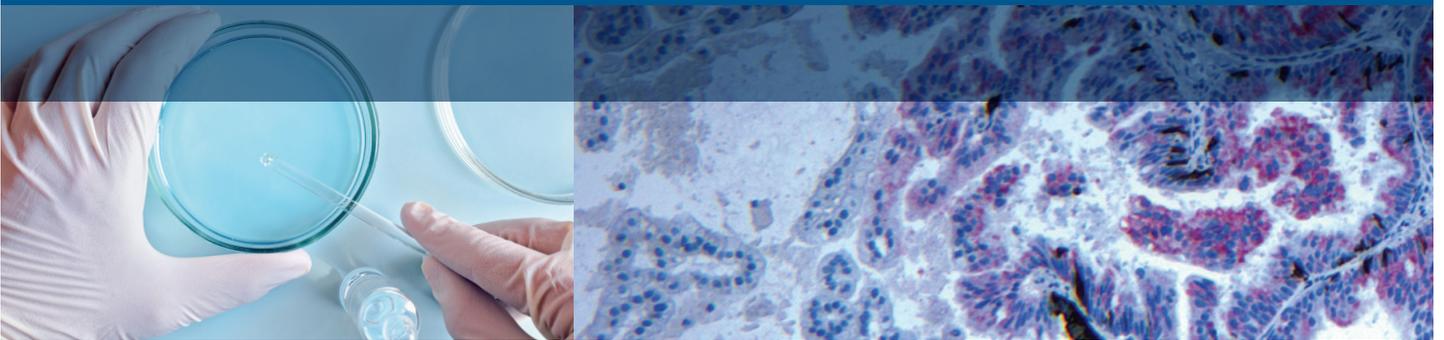


# 基因毒性杂质检测 — 安捷伦完整解决方案

灵敏 可靠 高效



# 目录

基因毒性杂质分析背景与概况 .....	03
- 基因毒性杂质概述 .....	03
- 基因毒性杂质法规发展历程 .....	04
- 典型基因毒性杂质类别及主要分析技术 .....	05
- 基因毒性杂质检测的难点 .....	07
- 基因毒性杂质限度控制和检测 .....	08
典型基因毒性杂质检测实例分享 .....	09
- 磺酸酯类基因毒性杂质分析 .....	09
- 芳香胺类基因毒性杂质分析 .....	15
- 氨基甲酸酯类基因毒性杂质分析 .....	16
- 氮亚硝胺类基因毒性杂质分析 .....	18
- 相关元素杂质分析 .....	19
安捷伦基因毒性杂质检测全面解决方案平台 .....	21
- 基因毒性杂质分析解决方案 .....	21

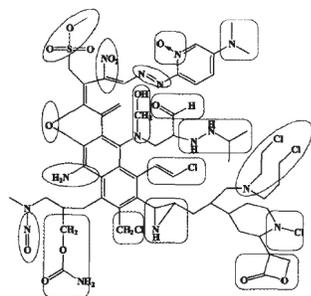
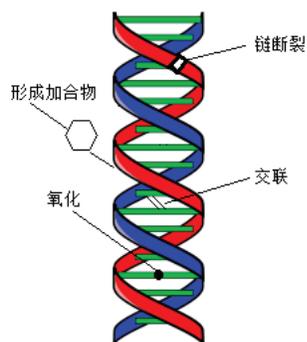
# 基因毒性杂质分析背景与概况



## 基因毒性杂质概述

### 甲磺酸奈非那非（维拉赛特锭）事件回顾

奈非那韦（甲磺酸盐）是一种用于 HIV 治疗的抗病毒药物，分别于 1997 年和 1998 年由美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品局 (EMA) 批准后上市。2007 年 6 月，罗氏制药接到 6 名患者投诉 DNA 序列异常后，立即召回产品，欧洲药品局 (EMA) 暂停其上市销售。在后期内部调查时发现原料药存储罐中有残留的乙醇未清除干净，与甲基磺酸反应形成甲磺酸乙酯。之后罗氏对存储罐工艺进行修正并在生产过程中增加对甲磺酸乙酯的控制，要求低于 0.5 μg/mL。欧洲药品局 (EMA) 重新评估检查后，2007 年 10 月恢复其上市销售。在该事件后，各国的法规机构（如美国食品药品监督管理局 (FDA)、欧洲药品局 (EMA) 及人用药物注册技术要求国际协调会议指南 (ICH) 等）都对基因毒性杂质有了更明确的要求，越来越多的药企在研发过程中重点关注基因毒性杂质的控制和检测。



### 基因毒性杂质定义

基因毒性杂质是指能直接或间接损伤细胞 DNA，产生致突变和致癌作用的物质。基因毒性杂质主要来源于原料药合成过程中的起始物料、中间体、试剂和反应副产物。此外，药物在合成、储存或者制剂过程中也可能降解产生基因毒性杂质。除此之外，有些药物通过激活正常细胞而产生基因毒性物质导致突变，如化疗药物顺铂等。

表 1. 根据诱变性和致癌性及其控制措施对杂质分类

分类	定义	拟定控制措施（详见第 7 和 8 部分）
1	已知诱变致癌性	控制不高于化合物可接受限度
2	已知具有诱变性，致癌效应未知（细菌诱变呈阳性*，无啮齿动物致癌数据）	控制不高于可接受限度（适当的 TTC）
3	警示结构，与原料药结构无关，无诱变性数据	控制不高于可接受限度（适当的 TTC）或检测细菌诱变含量： 如果非诱变性 = 第 5 类 如果具有诱变性 = 第 2 类
4	警示结构，与原料药或有关物质有相同警示（例如，工艺中间体），经测试为无诱变性	与非诱变性杂质同等对待
5	无警示结构，或警示结果具有充分的数据证明其不具备诱变性和致癌性	与非诱变性杂质同等对待

\* 或其它相关阳性诱变数据，说明与诱导基因变性的 DNA 反应活性（例如，体内基因诱变研究显示阳性）

## 基因毒性杂质法规发展历程

2006 年欧洲药品局 (EMA) 首先颁布了《遗传性杂质限度指导原则》和《CHMP 遗传毒性杂质限度指导原则问答》。该指南为新药研究中的基因毒性杂质研究提供了解决问题的框架和具体做法, 弥补了 ICH Q3 不足。引入毒理学关注阈值 (TTC) 的概念及其取值, 以及遗传毒性杂质可接受性评估的决策树。同时指出, 致癌性明确的杂质需进行特殊的风险评价, TTC 法并不适用。但在短期暴露、治疗病危预期仅存活 5 年且没有更安全的治疗选择时, TTC 的 1.5  $\mu\text{g}/\text{d}$  这个限度可以适当放宽。

2008 年美国食品药品监督管理局 (FDA) 正式签发《行业指南: 原料药及制剂中的遗传毒性及致癌性杂质研究方法推荐》, 内容和欧洲药品局 (EMA) 指南基本一致。

2013 年人用药物注册技术要求国际协调会议指南 (ICH) 在欧洲药品局 (EMA)、美国食品药品监督管理局 (FDA) 等关于基因毒性杂质控制指导原则的基础上, 发布了《M7 基因毒性杂质指南》等技术指导文件, 提供了遗传毒性杂质鉴别、分类、定量分析和控制的基本思路和策略。

表 2. 药物临床研究阶段美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品局 (EMA) 规定的基因毒性杂质可接受的限度

基因毒性杂质 每日允许最大摄入量 ( $\mu\text{g}/\text{d}$ )	对应给药时间	
	美国食品药品监督管理局 (FDA)	欧洲药品局 (EMA)
120	< 14 天	1 天
60	14 天 - 1 个月	< 1 个月
20	1 - 3 个月	< 3 个月
10	3 - 6 个月	< 6 个月
5	6 - 12 个月	< 12 个月
1.5	> 12 个月	> 12 个月

# 基因毒性杂质分析背景与概况

表 3.

指南类别	指南名称
遗传毒性杂质控制指南	PhRMA 意见书：测定、检验和控制药物中特定潜在遗传毒性杂质的基本原理 (2006)。
	欧洲药品局 (EMA)：遗传毒性杂质限度指南。
	欧洲药品局 (EMA) 安全工作组 (SWP)：关于遗传毒性杂质限量指南的问答
	美国食品药品监督管理局 (FDA) 行业指南 (草案)：原料药和成品药中遗传毒性和致癌性杂质：推荐方法 (2008)。
	ICH M7：诱变性杂质评估和控制
遗传毒性试验指南	ICH S2：人用药物的遗传毒性试验和数据解释。
	欧洲药品局 (EMA)：草药物质/制剂遗传毒性评估指南 (2008)。
遗传毒性和致癌性物质的风险评估	欧盟委员会健康与消费者保护局：遗传毒性和致癌性物质一般风险评估的方法学和途径 (2009)。

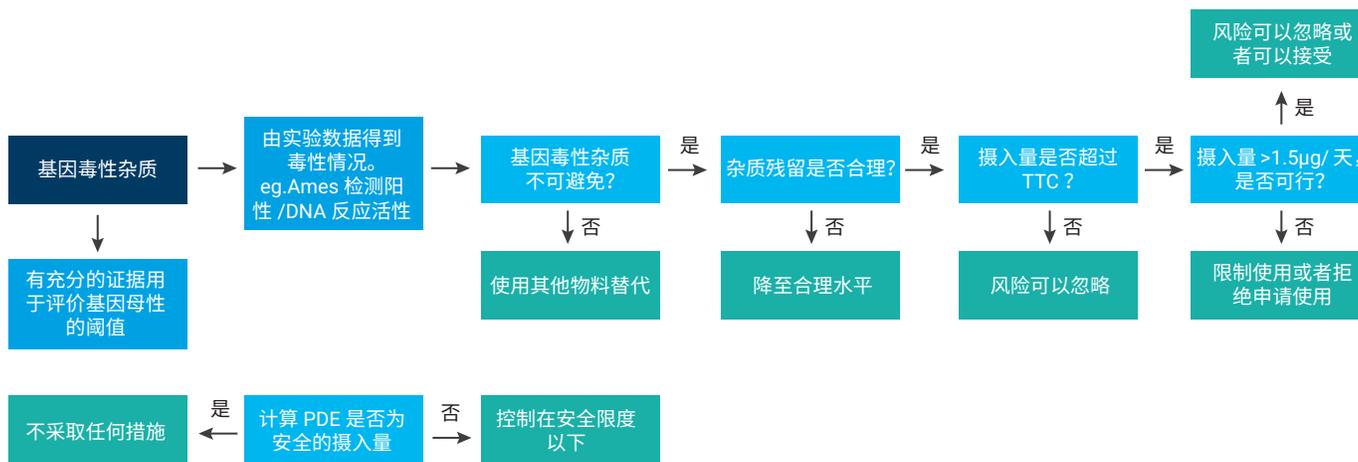


图 1. 基因毒性杂质检测决策树

## 基因毒性杂质分析背景与概况

表 4. 典型基因毒性杂质类别及主要分析技术

基因毒性杂质类别		分析平台	方案特点
卤代烷烃	挥发性卤代烷烃 (已知具有诱癌数据)	HS-GC-ECD	常规方法
		HS-GC-MS	灵敏度高
	非挥发性卤代烃	衍生化法 +GC	常规检测手段, 样品处理复杂
		HPLC-UV	常规方法
		LC-MS; LC-MS/MS ; LC-ICP-MS	高灵敏度, 高专属性
磷酸酯 / 烷基磷酸酯 / 芳基磷酸酯		GC, 有时需衍生化	常规方法, 灵敏度难以达到痕量检测要求; 样品进样口高温分解问题及磷酸与醇类溶剂反应等问题
		GC-MS	样品处理简单方便, 分析速度快
		GC/MS/MS	MRM 模式使方法灵敏度高, 选择性好, 背景干扰小
		HS-GC/GC/MS	虽需要简单衍生化, 但样品背景干扰小, 污染程度低, 残留小
		HPLC-UV	常规方法测定芳香磷酸酯
		LC-MS; LC-MS/MS	高灵敏度, 高专属性
胍类		衍生化法 +HS-GC-MS	衍生化操作复杂耗时, 但 GC-MS 方法灵敏度较高
		衍生化法 +LC	衍生化操作复杂耗时
		LC-MS/MS	高灵敏度, 较好解决胍类化合物强保留性的分析难点
环氧化物	挥发性环氧化物	GC 柱上进样技术	避免待测物进样口分解问题, 常规方法
		HPLC-UV	常规方法
	非挥发性环氧化物	LC-MS ; LC-MS/MS ; 有时配合衍生化法	高灵敏度, 高专属性; 部分环氧化物不易电离, 衍生化有助于提高灵敏度
酰卤类		衍生化法 +GC-MS	高反应活性分子如酰氯, 通常需要衍生化
		衍生化法 +LC-MS	
氮亚硝胺类 (NDMA 及同系物)		HS-GC/MS	样品背景干净, 对系统污染程度低, 持续分析可靠性好
		GC/MS	ng/mL 级检出, 分析速度快
		GC/MS/MS	亚 ng/mL 级检出, 分析灵敏度高, 背景干扰小, 同时可覆盖的同系物 (带有警示基团) 种类全
具有警示基团的未知杂质的甄别		GC-QTOF	对非目标杂质是否带有警示基团进行甄别, 发现潜在风险, 给出更全面的报告
元素杂质类		ICP-OES	基体耐受强, 分析速度快
		ICP-MS	高灵敏度, 适合所有元素的测定

# 基因毒性杂质检测的难点

基因毒性杂质分析是一项非常有挑战性的任务。药物中基因毒性杂质检测在灵敏度、选择性、待测物稳定性、基质复杂性等方面具有特殊性，因此在分析方法开发和选择上具有与常规药物杂质检测不同的特点。在方法开发过程中遇到的常见问题有：

### 灵敏度与选择性要求高

常规的液相和气相方法有时达不到痕量基因毒性杂质的检测要求，此时液质联用与气质联用技术成为优先选择。

### 特殊性

由于某些 PGIs 没有特征官能团，采用常规检测器 (UV/DAD/FID 等) 分析效果不佳。

### 本底干扰

PGI 限度要求非常低，高浓度的 API 有可能对低浓度的 PGI 产生干扰。药品中其他有机杂质非常容易对 PGI 检测造成干扰。基质效应容易影响测定结果的准确性，一般通过各种萃取技术及适当的前处理方法对样品进行分离、纯化和富集，如 LLE、SPE、LSPE 和 SPME 等，处理后不仅能够提高检测灵敏度，同时可以有效减少基质效应并获得更好的分析结果。

### 结构多样化

PGI 的官能团多样化，涉及多种结构类型且产生来源不同，很难找到一个通用的分析方法进行同时测定。

### 反应性

某些 PGI (如酰卤) 具有很高的反应活性，在样品提取、前处理及分析过程中极易发生转化造成灵敏度差或回收率低，或者检测结果不准确。一般通过衍生化法将其转化为稳定化合物，然后进行测定，同时也能够达到提高检测灵敏度的目的。

### 样品溶解度

溶解度是基因毒性杂质分析中非常重要的影响因素，由于 PGI 限度较低，通常需要较高的供试品浓度才能满足检测限要求。为避免降解或其他转化的反应溶液通常需要冷藏，高浓度溶液在冷藏过程中往往容易产生沉淀现象也可能导致检测不准确。



# 典型基因毒性杂质检测实例分享



## 案例分析 – 磺酸酯类基因毒性杂质分析

LCMSMS 同时分析 16 种磺酸酯类基因毒性杂质，无需衍生化，同时分析，快速高效。

### 概述

磺酸或磺酰卤类试剂常用作烷基化试剂和催化剂，还应用于药物化学合成的纯化或成盐步骤。临床研究发现磺酸酯能够直接与生物大分子（DNA、RNA 及蛋白质）发生烷基化反应，可能会导致 DNA 的突变。甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯及甲磺酸异丙酯已证明具有基因毒性，而其他具有磺酸基的物质可能存在潜在基因毒性，对人类健康造成威胁。

### 前处理多以衍生化为主

磺酸或磺酰卤类试剂常用作烷基化试剂和催化剂，还应用于药物化学合成的纯化或成盐步骤。临床研究发现磺酸酯能够直接与生物大分子（DNA、RNA 及蛋白质）发生烷基化反应，可能会导致 DNA 的突变。甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯及甲磺酸异丙酯已证明具有基因毒性，而其他具有磺酸基的物质可能存在潜在基因毒性，对人类健康造成威胁。

### 多种杂质并存

部分药品中通常会同时含有多种磺酸酯类基因毒性杂质。氨氯地平在合成过程中使用溶剂正丙醇或异丙醇，而在与苯磺酸成盐时，以甲醇为反应溶剂，乙醇作为最终重结晶溶剂。因此在整个合成过程中就有可能形成具有潜在基因毒性的苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯、苯磺酸丙酯或苯磺酸异丙酯。

表 5.

药物名称	潜在磺酸酯类基因毒性杂质
苯磺酸氨氯地平	苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯
依普罗沙坦甲磺酸盐	甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯
阿瑞匹坦	对甲苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯
S- 西酞普兰	甲磺酸乙酯
氯沙坦钾	对甲苯磺酸异丙酯

# 典型基因毒性杂质检测实例分享

## 直接分析

LC-MS/MS 同时分析 16 种磺酸酯类基因毒性杂质。

- 采用 APCI (-) MRM 模式，16 种磺酸酯类化合物均有良好的质谱响应，

- 采用 C<sub>18</sub> 色谱柱，各化合物峰形良好，可以分别定量。

- 空白溶剂无残留

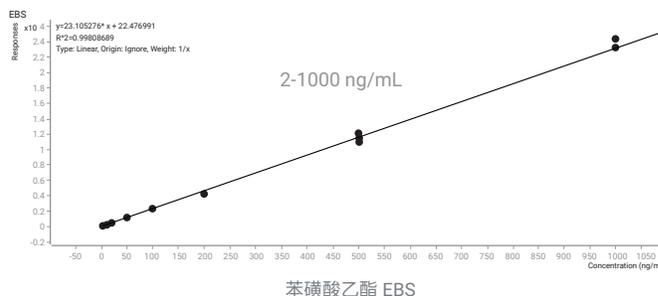
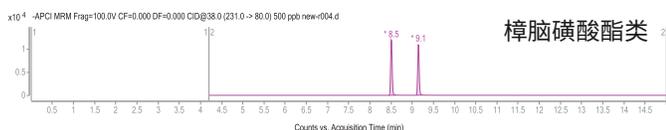
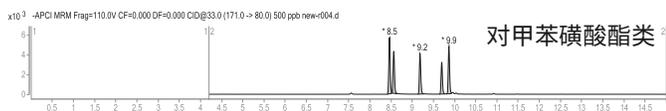
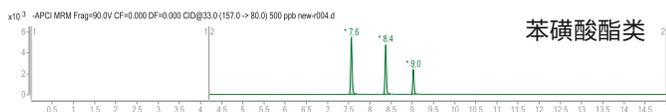
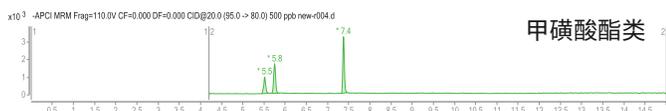
- 前处理简单，无需衍生化

- 苯磺酸酯类、对甲苯磺酸酯类、樟脑磺酸酯类

LLOQ 2ng/mL, 2~1000ng/mL 线性关系良好 ( $r^2>0.99$ )

- 甲磺酸酯类、乙磺酸酯类

LLOQ 10ng/mL, 10~1000ng/mL 线性关系良好 ( $r^2>0.99$ )



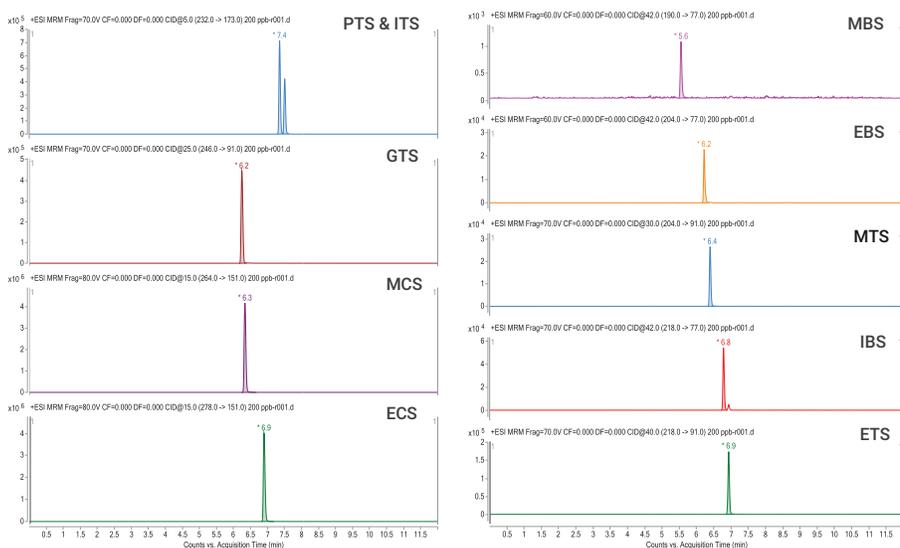
以氨氯地平为例，按照 TTC 最大日摄入量 1.5ug/day、氨氯地平日最大剂量 10mg 计算，该方法安全满足对限度测定的要求。

# 案例分析 – 磺酸酯类基因毒性杂质分析

## LCMS 法分析磺酸酯类基因毒性杂质

### 芳香族磺酸酯非衍生化分析方法

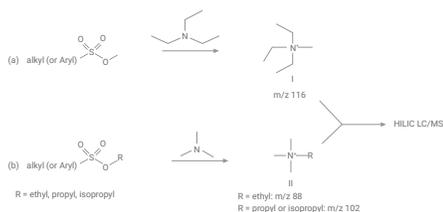
ESI 电离模式下，苯磺酸酯类化合物无需衍生化，ECS、MCS、EBS、ITS、GTS、PTS 最低定量限可达 0.1ng/mL。



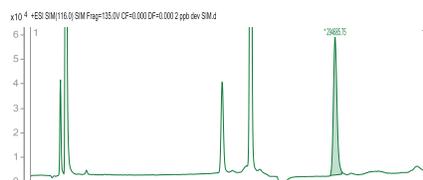
### 磺酸酯类衍生化 LC/MS 分析方法评估

– 甲磺酸酯可采用三乙胺为衍生化试剂，衍生化后样品经 ESI 电离后生成  $m/z$  116，可做为定量分析离子，磺酸甲酯、磺酸乙酯和磺酸异丙酯可采用三甲胺为衍生化试剂，衍生化后样品经 ESI 电离后分别生成  $m/z$  130、144、158，可作为定量分析离子。

– 经衍生化后最低定量限可达 2ng/mL。



衍生化反应原理示意图



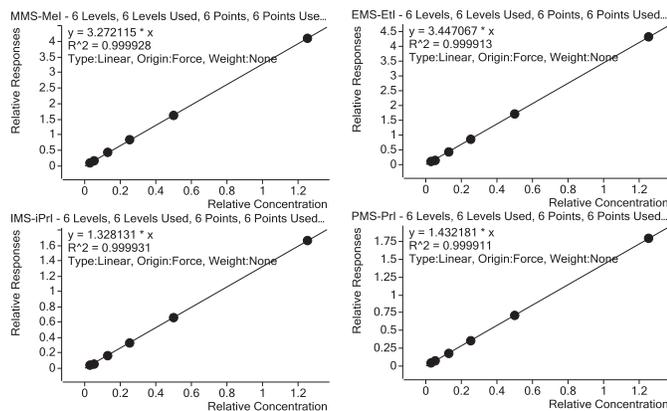
2 ng/mL标准品典型色谱图

## 案例分析 – 磺酸酯类基因毒性杂质分析

HS-GC/MS 分析甲磺酸烷基酯类基因毒性杂质零残留、高灵敏、高准确度

甲磺酸是一种常用的医药原料，反应后的残留量与合成工艺和片剂生产中用到的甲醇、异丙醇和乙醇等低级醇反应，产生具有基因毒性的甲磺酸烷基酯类：甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸异丙酯 (IMS) 等，这些物质被认为具有潜在的致癌性，已成为多国药物管理机构的重点管控目标。

目前中国药典没有对此类残留规定限量，但欧洲药监局 (EMA)、美国食品药品监督管理局 (FDA) 及人用药物注册技术要求国际协调会议指南 (ICH) 已先后对此类基因毒性杂质做出限度规定。参照欧洲药典，使用 Agilent 7697A 顶空进样器与 Agilent 7890B 气相色谱 /5977 系列单四极杆气质联用系统，可准确、可靠、高灵敏地对甲磺酸烷基酯类基因毒性杂质进行分析。

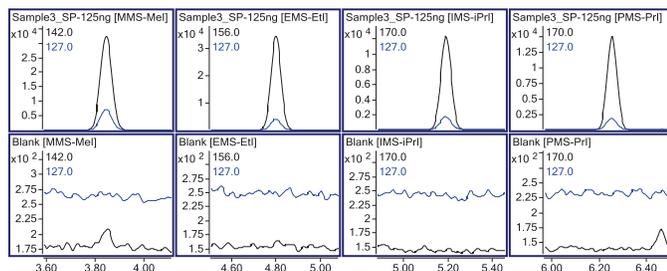


线性: 2.5~125ng,  $R^2 > 0.999$

表 6.

回收率 / %			
化合物	加标量 -5 ng	加标量 -12.5 ng	加标量 -125 ng
MMS-MeI	105.3	108.3	107.4
EMS-EtI	103.3	103.6	102.7
IMS-iPrI	92.1	98.8	99.8
PMS-PrI	91.9	98.9	100.3

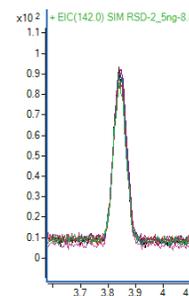
准确度: 回收率 91.9~108.3%



高惰性流路，无任何残留 (上图为125ng的高浓度样品，下图为其后的空白样品)

表 7.

	RSD%	IDL/ng
MMS-MeI	4.8%	0.36
EMS-EtI	1.9%	0.14
IMS-iPrI	2.6%	0.19
PMS-PrI	2.8%	0.21



标准曲线最低点2.5 ng连续进样8次的RSD，在置信度99%下计算仪器的检出限 (IDL)

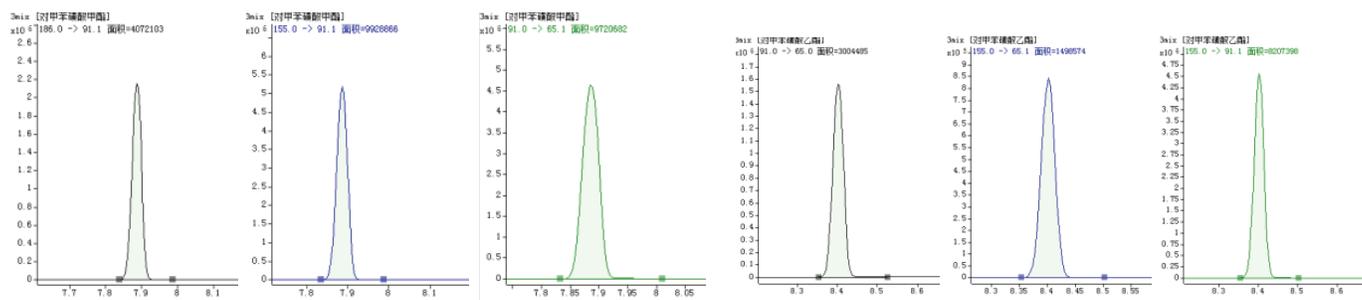
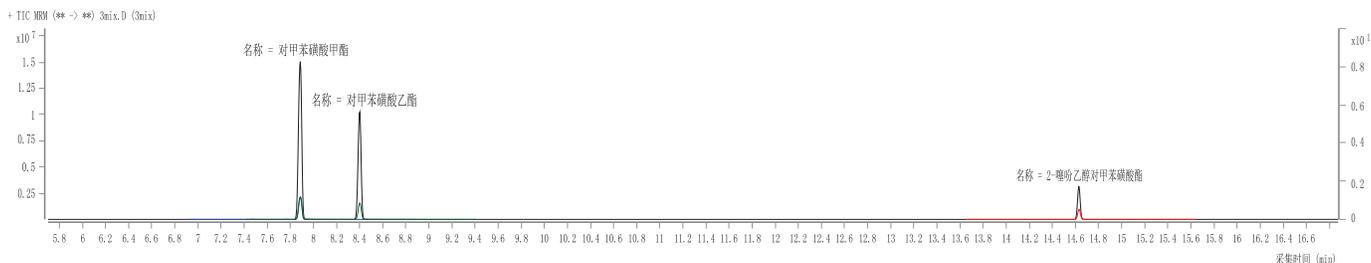
# 案例分析 – 磺酸酯类基因毒性杂质分析

## GC-MS/MS 分析甲苯磺酸酯、樟脑磺酸酯类基因毒性杂质

### GC-MS/MS 同时分析磺酸酯类基因毒性杂质

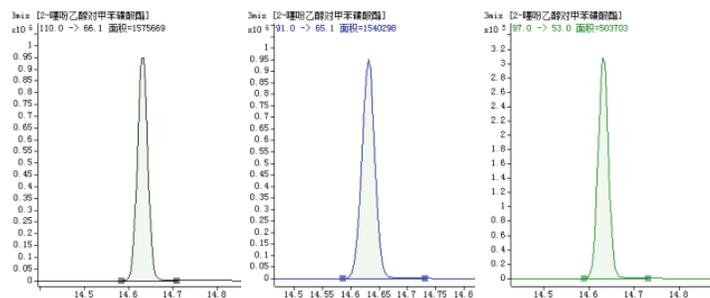
对甲苯磺酸是制药工业中常用的一种化学合成试剂。但任何残留的醇（如甲醇和乙醇）都会与对甲苯磺酸反应生成相应的烷基甲苯磺酸酯，这属于已知的潜在遗传毒性杂质 (PGI)。这些 PGI 的烷基与 DNA 发生烷基化作用，可诱发突变、致癌和致畸等等。

欧洲药品局 (EMA)、美国食品药品监督管理局 (FDA) 及人用药物注册技术要求国际协调会议指南 (ICH) 都对原料药和制剂中的这类潜在基因毒性杂质（包括对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯）规定了限值（欧洲药品局 (EMA) 发布的最大摄入量是 1.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ）



对甲苯磺酸甲酯

对甲苯磺酸乙酯



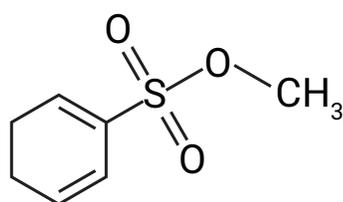
2-噁吩乙醇对甲苯磺酸酯

# 案例分析 – 磺酸酯类基因毒性杂质分析

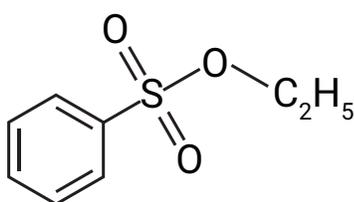
高分辨 GC/Q-TOF 表征苯磺酸氨氯地平中的磺酸酯类基因毒性杂质

高分辨 GC/Q-TOF 以其高分辨率和高选择性, 可对目标化合物苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯进行高灵敏度的定量分析。

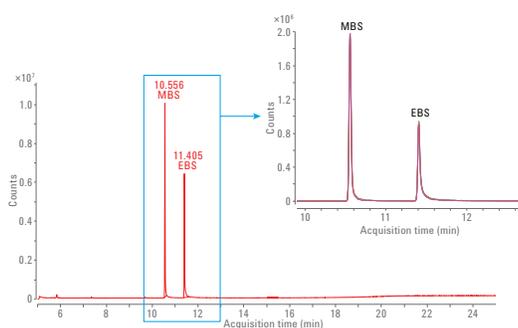
在基因毒性杂质的分析中, 未知杂质需确定其结构, 依据其是否含有警示结构以判断该杂质是否具有基因毒性, GC/Q-TOF 的 MS/MS 功能可对未知杂质进行结构推测和确证。



**MBS**  
Molecular Formula  $C_7H_8O_3S$   
Mono isotopic Mass 172.0194 Da



**EBS**  
Molecular Formula  $C_8H_{10}O_3S$   
Mono isotopic Mass 186.0351 Da



化合物结构及标准品谱图

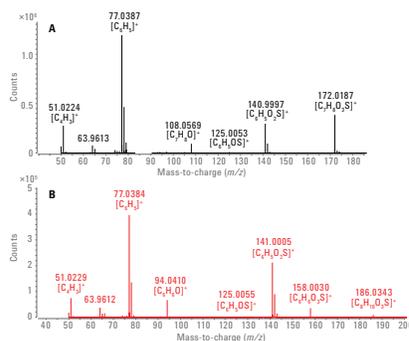
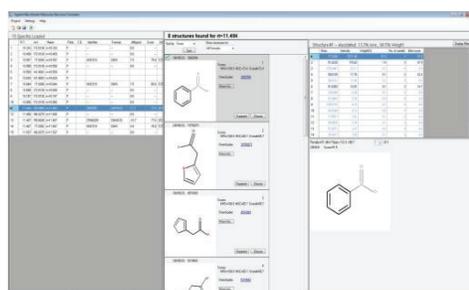
**A** Best ▾ ID Source ▾ Formula ▾ Species ▾ m/z ▾ Score ▾ Diff (ppm) ▾ Score (MFG) ▾ Mass (MFG) ▾ DBE ▾

Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height	Ion Formula
M+	172.0187	96.66	99.68	98.82	98.82	99.7		245858.8	C7H8O3S
Height (Calc)	Height Sum % (Calc)	Height % (Calc)	m/z (Calc)	Diff (mDa)	Height	Height %	Height Sum %	m/z	Diff (ppm)
240587.5	87.7	100	172.0189	0.2	245858.8	100	89.7	172.0187	1.11
20610.8	7.5	8.6	173.0219	0	17697.7	7.2	6.5	173.0219	-0.26
13024.3	4.7	5.4	174.0162	0	10666	4.3	3.9	174.0162	-0.04

**B** Best ▾ ID Source ▾ Formula ▾ Species ▾ m/z ▾ Score ▾ Diff (ppm) ▾ Score (MFG) ▾ Mass (MFG) ▾ DBE ▾

Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height	Ion Formula
M+	186.0341	97.32	97.89	97.89	97.89	98.59		9970.8	C8H10O3S
Height (Calc)	Height Sum % (Calc)	Height % (Calc)	m/z (Calc)	Diff (mDa)	Height	Height %	Height Sum %	m/z	Diff (ppm)
9934.3	86.8	100	186.0345	0.4	9970.8	100	87.1	186.0341	2.18
960.8	8.4	9.7	187.0376	0.8	1035.1	10.4	9	187.0368	4.32
547.2	4.8	5.5	188.032	0.5	436.4	4.4	3.8	188.0316	2.44

质量准确度



MSC和分子式计算工具对分子结构进行预测

# 案例分析 – 芳香胺类基因毒性杂质分析

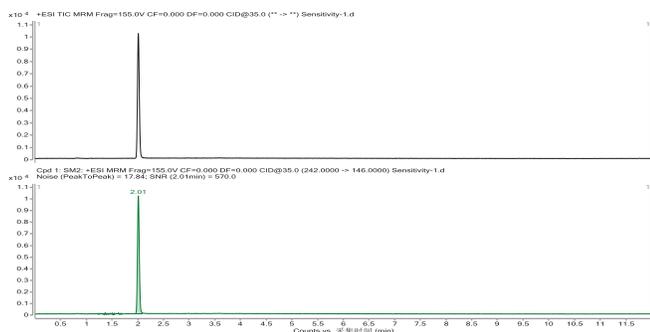
LC-MS/MS 法分析单取代或多取代芳香胺类

## 取代芳香胺类基因毒性杂质分析

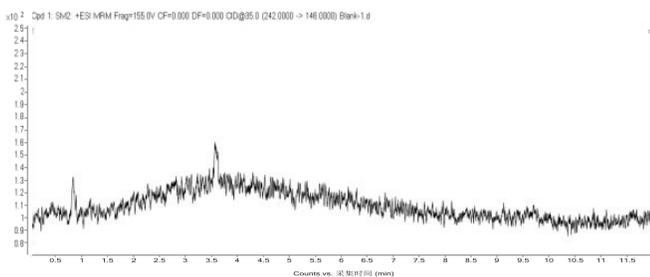
### 直接分析

举例说明,某药品中含有芳香胺取代杂质,化合物分子量 241,因芳香胺类化合物具有潜在的基因毒性,需对其进行限度控制。该化合物在甲醇中溶解度良好,可尝试不经衍生化采用 ESI 电离源进行直接分析。

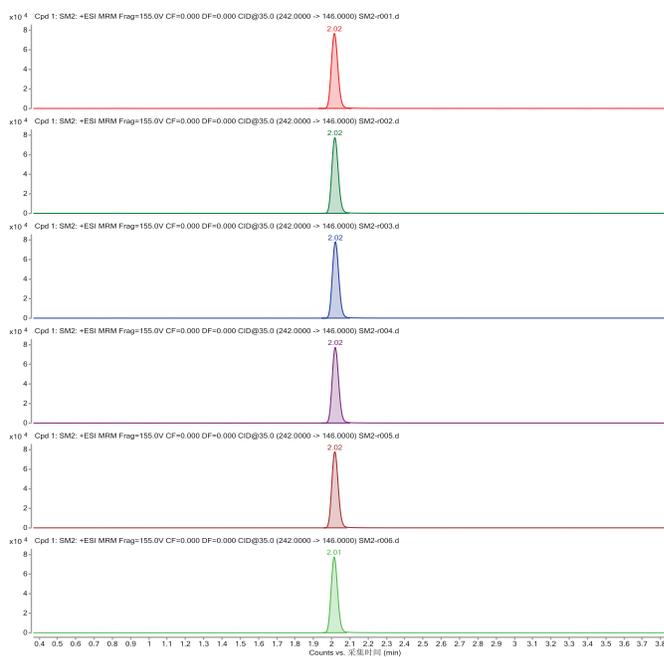
- 1ng/ml 标准品进样分析,信噪比 S/N=570.0,质谱响应良好,可采用 LC-ESI-MS/MS 直接分析。
- 交叉污染测试分析方法下样品无交叉污染,空白样品无响应。
- 重现性连续 6 针进样,峰面积 RSD 0.23%,方法具有优异的重现性。



ESI 电离源下灵敏度测试谱图



空白样品交叉污染测试谱图



样品连续6针进样谱图

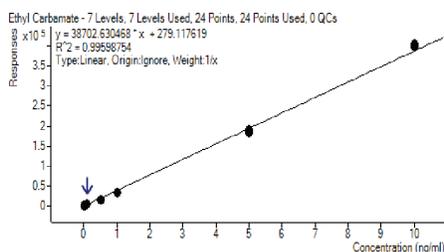
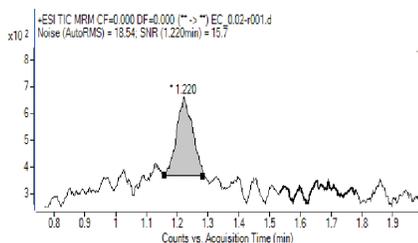
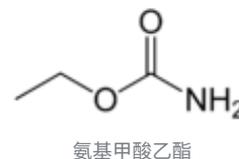
### 衍生化分析

取代芳香胺类化合物数量众多,化学性质差异较大。苯胺及部分简单取代芳香胺类化合物分子量较小,因保留行为或质谱响应较差等原因需经衍生化后再进行分析。

## 案例分析 – 氨基甲酸酯类基因毒性杂质分析

### LCMS 法分析氨基甲酸乙酯

- 灵敏度测试 0.02ng/mL 氨基甲酸乙酯, 信噪比 (S/N)>10
- 线性范围测试 0.02–10 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 R<sup>2</sup>=0.9958 (权重 = 1/x)
- 重复性测试 0.02 ng/mL 连续进样 6 针, 峰面积 RSD 1.84, 准确度均符合方法学验证要求
- 回收率测试实际样品加标回收率均值 >90%, 符合方法学验证要求



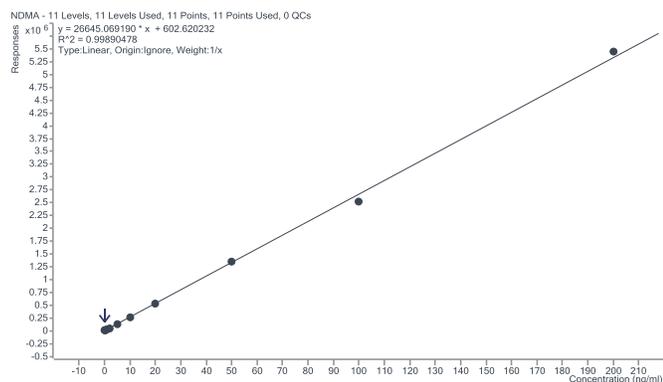
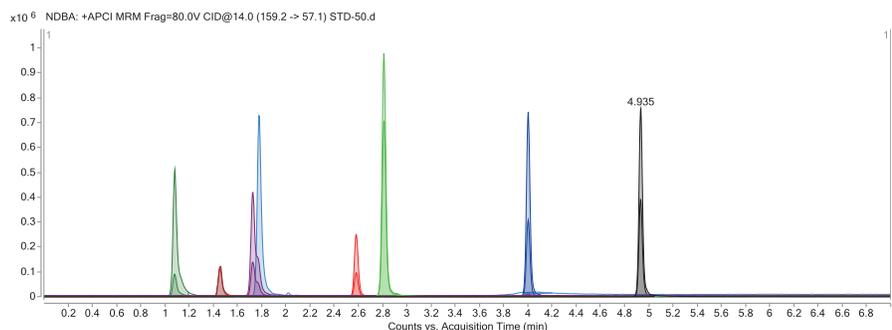
Sample			Ethyl Carbamate Results			
Data File	Type	Level	RT	Final Conc.	Accuracy	Area
EC_0.02-r001.d	Cal	1	1.22	0.0223	111.5	1142
EC_0.02-r002.d	Cal	1	1.24	0.0216	108.1	1116
EC_0.02-r003.d	Cal	1	1.24	0.0219	109.5	1127
EC_0.02-r004.d	Cal	1	1.25	0.0224	112.2	1147
EC_0.02-r005.d	Cal	1	1.24	0.0212	106.0	1100
EC_0.02-r006.d	Cal	1	1.25	0.0212	105.8	1098

# 案例分析 – 亚硝胺类基因毒性杂质分析

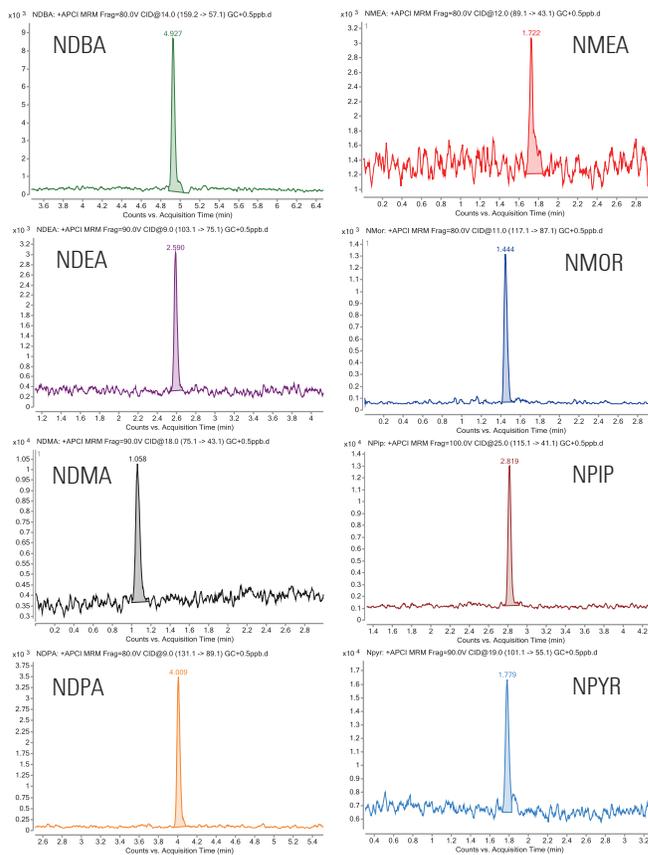
LC-MS/MS 同时分析 8 种常见亚硝胺类基因毒性杂质，采用大气压化学电离源，快速高效

APCI 电离模式下，对 8 种常见亚硝胺类基因毒性杂质 (NDMA、NMOR、NMEA、NPNR、NDEA、NPIP、NDPA、NDBA) 进行同时检测。

最低定量限可达 0.1ng/mL。



在 0.1~200  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内，各化合物具有良好的线性关系。NDMA 的线性回归系数 ( $R^2$ ) 大于 0.998。

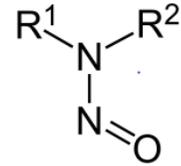


空白药物添加 8 种亚硝胺的 MRM 色谱图，添加浓度以 API 计为 0.5  $\mu\text{g/g}$ 。

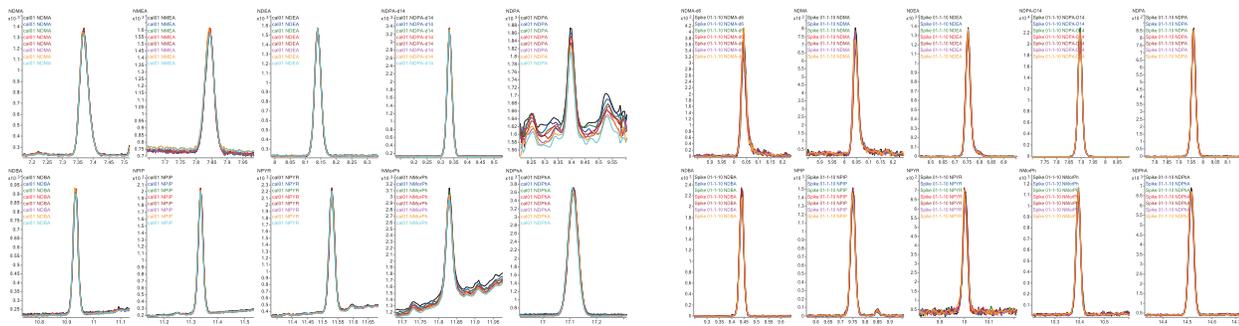
# 案例分析 - 氮亚硝胺类基因毒性杂质分析

## GC/MS 与 GC-MS/MS 分析氮亚硝胺类

N-亚硝胺是一类具有 R<sup>1</sup>-N(R<sup>2</sup>)-N=O 结构的胺化合物，其大部分化合物都属于强致癌物，具有肝毒性和致癌性。在已检测的 300 种亚硝胺类化合物中，已证实有 90% 至少可诱导一种动物致癌，其中乙基亚硝胺、二乙基亚硝胺和二甲基亚硝胺至少对 20 种动物具有致癌活性。

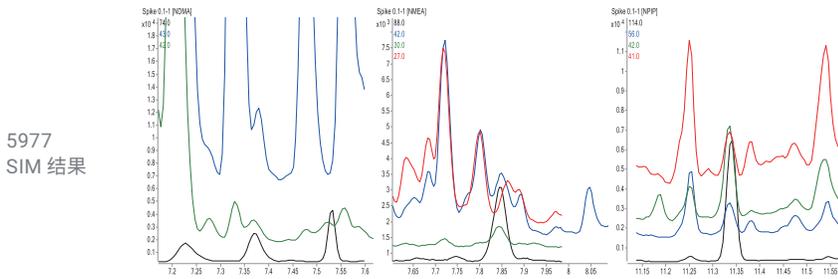


GC/MS 与 GC-MS/MS 均可用于 N-亚硝胺的检测。GC-MS/MS 的 MRM 采集模式较 GC/MS 的 SIM 模式抗干扰能力更强，检测灵敏度更高。

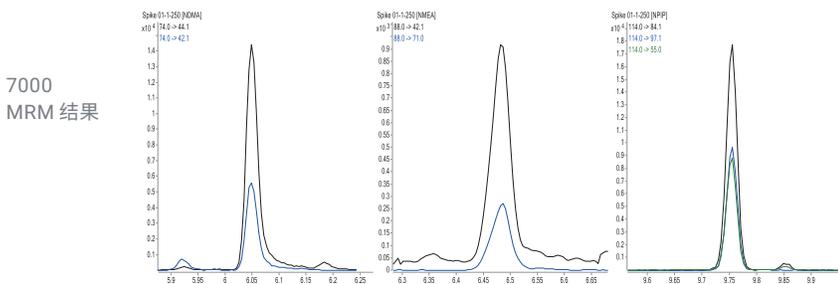


10 µg/L 亚硝胺化合物叠加色谱图 (SIM n=7)

0.1 µg/L 亚硝胺化合物叠加色谱图 (MRM n=7)



5977  
SIM 结果



7000  
MRM 结果

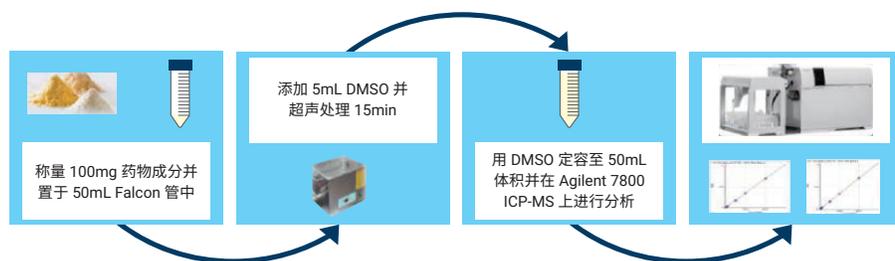
GCMS 与 GCMSMS 对比, 0.1ug/L

## 案例分析 – 相关元素杂质分析

使用 USP<233>/ICH Q3D 方法 7800 ICP-MS 测定药物成分中的元素杂质

USP 233 推荐的四种前处理方法均有各自的应用范围和处理量，但是由于操作简单、样品成分需求更少和高通量，与密闭容器微波酸解相比，使用有机溶剂（如二甲亚砜 (DMSO)）的方法要更为普遍。

配合 7800 ICP-MS 强大的有机溶剂耐受性能及配套开发的方法进行分析，在灵敏度、稳定性、可靠性、回收率和检测限方面均得到良好的结果。同时，本方法的主要优势在于无需使用耗时的酸消解方法，从而实现更高样品通量并提高分析效率。



样品前处理和分析流程图

表 8. 7800 ICP-MS 仪器参数

参数	设置
等离子体模式	通用
RF 功率 (W)	1550
载气流速 (L/min)	0.99
采样深度 (mm)	8.0
S/C 温度 (°C)	17
反应池气体流速 (ml/min)	4
动能歧视电压 (V)	3
可选气体 (%)	10

表 9. 每种目标元素在 100% J 下加标回收率的准确性结果

元素	J 值 (µg/L)	API-1 回收率 (n=6)	RSD %	API-2 回收率 (n=6)	RSD %	API-3 回收率 (n=6)	RSD %
Li	110	107.1	3.0	102.4	3.2	103.0	1.5
V	20	101.7	2.7	97.5	1.1	98.7	1.2
Cr	2200	106.1	2.7	102.2	0.9	103.0	1.1
Co	10	104.4	2.7	100.4	1.3	101.0	1.0
Ni	40	104.4	2.8	100.4	1.4	101.1	1.0
Cu	600	109.8	2.8	105.5	1.9	106.4	1.0
As	3	90.9	3.1	90.6	4.9	96.6	2.0
Se	1	95	7.1	86.5	4.6	92.9	1.4
Mo	600	105.2	2.8	101.4	1.2	102.0	0.7
Ru	20	101.8	2.6	97.9	1.4	98.2	0.5
Rh	20	102.1	2.5	98.2	1.3	98.6	0.4
Pd	20	104.1	2.2	100.0	1.2	100.5	0.6
Ag	30	91.3	2.0	97.8	2.9	94.6	2.2
Cd	1	103.2	2.6	98.7	2.1	100.0	1.5
Sn	1200	106.9	2.2	102.5	1.3	102.8	0.6
Sb	240	110.5	2.3	107.2	1.7	108.0	0.6
Ba	280	93.7	2.1	90.5	1.0	91.3	0.5
Os	20	91.8	2.9	87.4	0.6	88.1	0.4
Ir	20	103.5	2.4	98.4	0.9	99.0	0.4
Pt	20	106.7	2.3	101.4	1.0	102.2	0.2
Au	20	98.6	2.7	95.6	3.0	94.1	2.8
Hg	6	108.2	3.4	102.3	0.9	103.2	0.6
Tl	1.6	102.9	2.7	97.6	0.3	98.8	0.7
Pb	1	101.7	3.1	96.6	0.4	97.1	0.5

## 案例分析 – 相关元素杂质分析

使用 USP<233>/ICH Q3D 方法 5110 ICP-OES 测定阿司匹林中的元素杂质

- 准确称取 1.0 g 左右阿司匹林样品加入 5 mL HNO<sub>3</sub> 和 1 mL HCl 中对样品进行微波消解后，用超纯水稀释至 50 mL 待测。
- 使用市售 Agilent ICH Q3D/USP <233> 元素杂质试剂盒中的多元素标样，配制含 0.5 J、1.0 J 和 1.5 J 各目标分析物的校准标样。该试剂盒包含五种有证标准物质 (CRM)。
- 使用“定量流程”对方法进行了验证：包括准确度、精密度（重复性、耐用性）和特异性。
- Agilent 5110 同步垂直双向观测 (SVDV) ICP-OES 是测量散装原料（填充剂、粘合剂及其他赋形剂）中元素杂质的理想之选，并可用于口服制剂成品。



表 10. 加标浓度为 1.0 J 的样品与 1.0 J 标样的检测能力测试结果对比

元素与波长 (nm)	1.0 J 标样 (ng/mL) (n=3)	1.0 J 加标样品 (ng/mL) (n=3)	差异 (%)	阿司匹林的 0.8J 值 (μg/mL) (n=3)	合格 / 不合格
Ag 328.068	666.67	625	6.20%	504	合格
As 193.696	100	96	1.40%	74	合格
Au 242.794	666.67	642	3.80%	515	合格
Ba 455.403	933.33	8892	4.90%	7117	合格
Cd 214.439	33.33	32	0.30%	26	合格
Co 238.892	333.33	319	4.00%	257	合格
Cr 205.560	73333.33	70162	4.30%	57642	合格
Cu 327.395	20000	18714	6.40%	14888	合格
Hg 184.887	200	183	7.80%	142	合格
Ir 212.681	666.67	624	6.20#	502	合格
Li 670.783	3666.67	3638	0.80%	2867	合格
Mo 202.032	20000	18570	7.10%	14811	合格

元素与波长 (nm)	1.0 J 标样 (ng/mL) (n=3)	1.0 J 加标样品 (ng/mL) (n=3)	差异 (%)	阿司匹林的 0.8J 值 (μg/mL) (n=3)	合格 / 不合格
Ni 231.604	1333.33	1271	5.00%	1026	合格
Os 225.585	666.67	651	2.90%	501	合格
Pb 220.353	33.33	34	4.20%	26	合格
Pd 340.458	666.67	617	7.30%	489	合格
Pt 214.424	666.67	643	3.00%	512	合格
Rh 343.488	666.67	631	5.40%	498	合格
Ru 245.657	1000	944	5.40%	757	合格
Sb 217.582	8000	7512	6.10%	6039	合格
Se 196.026	1000	984	1.20%	802	合格
Sn 189.925	40000	38473	3.80%	31036	合格
Tl 190.794	53.33	45	14.10%	36	合格
V 292.401	666.67	613	8.10%	485	合格

# 安捷伦基因毒性杂质检测全面解决方案平台



## 基因毒性杂质分析解决方案

Infinity II 系列液相色谱，快速高效，自由随心

### 概述

Agilent Infinity II 系列液相色谱提供了极为全面的分离解决方案，全面满足任何使用目的及分离方法的需求，在保证稳定性、兼容性的基础上，极大扩展了仪器的使用范围，为基因毒性杂质分离方法的研究及检验检测应用提供全面的技术方案。



**完美的方法兼容性及无缝方法转移：**Infinity II 系列液相色谱可以完美兼容任何现有的 HPLC 条件，确保仪器更新换代前后的结果一致性，通过安捷伦的智能系统模拟技术 (ISET)，还以模拟任何其他仪器系统 (不限品牌型号) 的特征梯度行为，从而彻底消除分析方法在不同实验室间转移过程中由于仪器系统差异带来的巨大风险。

**灵活的硬件搭配及投资保护：**Infinity II 系列液相色谱可以针对不同的方法及应用目的提供灵活的模块化选择，所有的模块均可进行灵活的混搭和组合，便于在不同的分离 / 检测机理间进行灵活的切换；基于安捷伦投资价值保护理念，所有模块均可以在不同系列仪器间混搭，以应对基因毒性杂质检测要求变化带来的仪器升级要求。

**灵活的自动化方案：**安捷伦独有的基于阀的多种扩展方案，如杂质在线富集脱盐质谱鉴定系统、全二维液相色谱、多中心切割二维液相色谱、自动方法开发系统等，可以全面提升基因毒性杂质研究方法的使用效率、分离度、灵敏度及质谱检测兼容性。

**超低残留技术：**Infinity II 系列多功能自动进样器的多重清洗功能可以全方位清洗进样器流路的内外表面及针座，从而将交叉污染降至 9 µg/mL 以下，为超高灵敏度的杂质质谱研究提供强大的保证，确保方法和数据结果稳定可靠。

**更全面的分离手段：**Infinity II 系列还提供了超临界流体色谱、毛细管电泳等多种分离手段选择，对于杂质的分离方法研究提供了更多可能。



## 基因毒性杂质分析解决方案

6400 系列，优异灵敏度和稳定性，信心之选

### 优异的灵敏度

采用更加客观和准确的仪器检测限 (IDL) 方式表征灵敏度。Ultivo 和 6400 系列都具有 fg 级 IDL 性能，是基因毒性杂质分析灵敏度要求的保证。



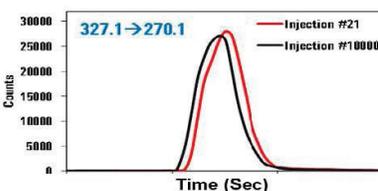
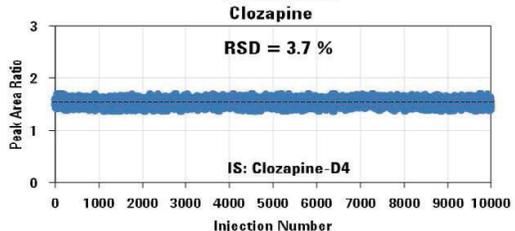
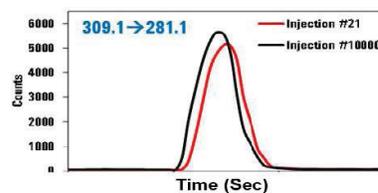
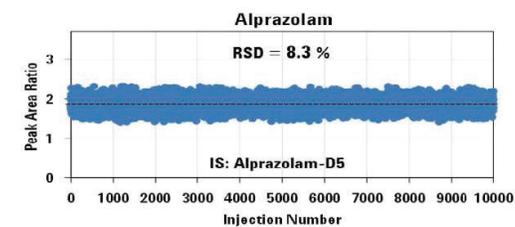
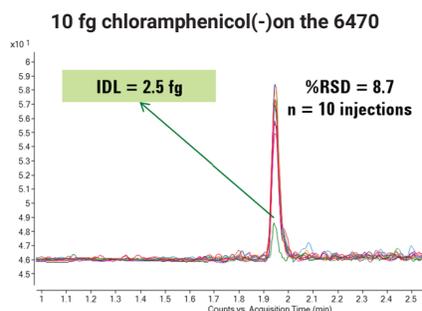
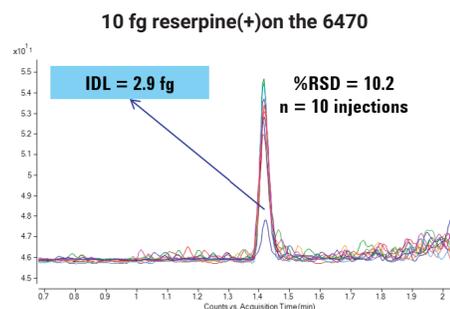
### 超长运行时间的稳定性

无论 Ultivo 还是 6400 系列三重四极杆质谱仪都具有可靠的连续运行稳定性，是实验室长期运行的数据可靠性保障。



### 全自动方法开发

Agilent MassHunter Optimizer 质谱参数优化软件支持自动进样器程序化优化方式，极大程度上简化了操作人员进行质谱参数优化的流程。



## 基因毒性杂质分析解决方案

Poroshell 120 助您建立耐用快速的方法

### HPLC 压力下获得 UHPLC 性能

Poroshell 120 2.7  $\mu\text{m}$  能够在 HPLC 的压力下获得亚 2  $\mu\text{m}$  全多孔颗粒色谱柱 90% 以上的柱效。这使您能够最大限度提高 HPLC 系统的分离性能和分析通量。

### 快速方法开发

多达 18 种化学键合相最大程度提高选择性, 为您的样品寻找最佳的分离条件。

### 出色的峰形

高纯度硅胶和高级键合相可减少色谱峰拖尾, 使您获得更快速、更准确的结果。

### 长色谱柱寿命

高稳定性 Poroshell 填料和化学键合相在所需的压力下十分稳定。UHPLC 保护柱还可以进一步延长分析柱的寿命。

### 优异的批间重现性

专利的一步合成表面多孔层技术工艺极大程度地减少了批次之间和色谱柱之间的细微差异。



表 11. 常用消耗品列表

描述	货号	作用
A-Line 螺口棕色样品瓶, 带书写标签	5190-9590	样品瓶的惰性性能可以减少分析物的峰差异性, 可以确保您对分析结果信心十足
A-Line 螺口透明样品瓶, 带书写标签	5190-9589	
分流放空外部捕集阱, 带三个吸附柱	RDT-1020	防止样品组分进入实验室环境

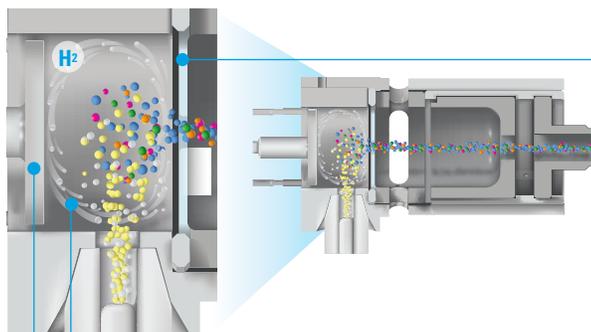
## 基因毒性杂质分析解决方案

### 7890B/Intuvo 9000-5977B 单四极杆 GC/MS

安捷伦长期以来始终坚持为客户提供最可靠的单四极杆 GC/MS 系统, Agilent 5977B GC/MSD 系统是这一传承的最新成果:

- 通过集成安捷伦最新的 HES 高效离子源, 我们得以将 GC/MS 的技术前沿再次向前推进。HES 高效离子源可使由离子源体产生并传输至四极杆分析器的离子数量大大增加, 灵敏度提升 10 倍, 仪器检测限 (IDL) 低至 1.5 fg。
- 模块化的 Intuvo GC, 节省实验室空间, 操作更加简便, 250°C /min 的快速升温能力可节省方法时间。
- 自动化自清洁离子源, Agilent JetClean 智氢洁离子源能够保持安捷伦单四极杆或三重四极杆气质联用系统不产生基质沉积, 避免这些沉积随时间逐步积聚和降低仪器性能。Agilent JetClean 技术通过严格控制的氢气流显著减少或免除清洁离子源的需要, 提高效率并降低每次分析的成本。

#### 利用 Agilent JetClean 智氢洁离子源减少或避免手动清洁离子源的不便



推斥极

#### 利用严格控制的氢气

严格控制的氢气流可确保离子源保持洁净而不受污染, 并提供一致的结果。这一灵活的过程支持两种运行模式, 适用于不同的分析。

#### 提取透镜

自动启动清洁循环, 可除去透镜中最顽固的沉积物以保持高灵敏度。



之前



之后

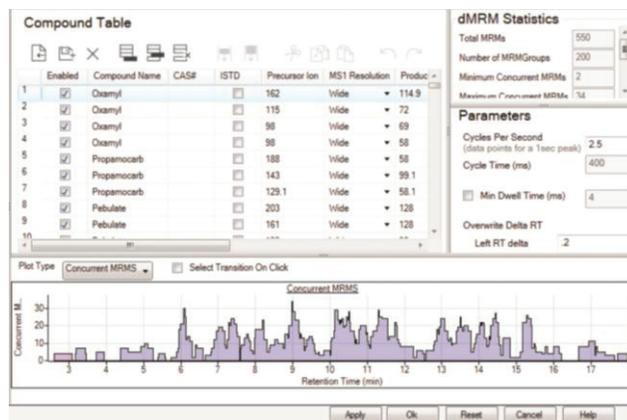
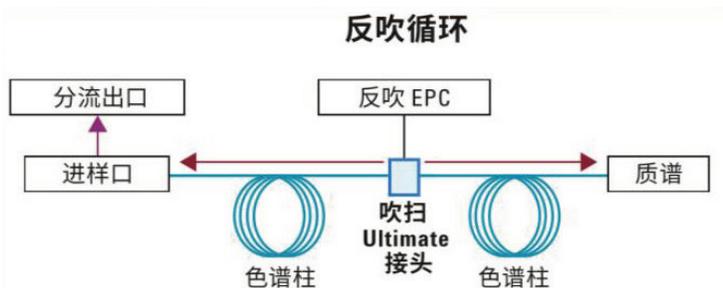
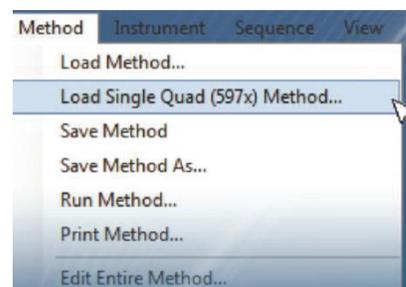


## 基因毒性杂质分析解决方案

### 7000D&7010B 三重四极杆气质联用仪

串联质谱是靶向定量分析公认的最佳手段。现在您可将实验室效率和生产力提升至更高水平，并能以更低的使用维护成本获得更可靠的实验结果：

- 选择您所需要的 MS/MS 灵敏度水平。为获得最佳性能，安捷伦在 7010B 中配备了高效离子源 (HES)，能够测量低至 0.5 fg 以下的八氟萘 (OFN)。或者，也可在更常规的分析中选择 OFN 灵敏度为 4.0 fg 以下的 7000D。
- 具备单四极杆 GC/MS 的所有能力。通过在三重四极杆系统上直接加载并执行单四极杆方法，运行 SIM 和扫描采集程序。无需运行方法转换程序或进行手动调整。只需加载单四极杆方法并启动分析即可。
- 利用全球顶尖的气相色谱仪开展 GC/MS 分析除进样口的多样化选择全惰性流路、反吹功能以外，该系统的自动化保留时间锁定 (RTL) 功能能够让您最有效地利用动态 MRM。利用集成软件工具简化整个测量工作流程 — 从仪器设置到数据分析与报告生成。

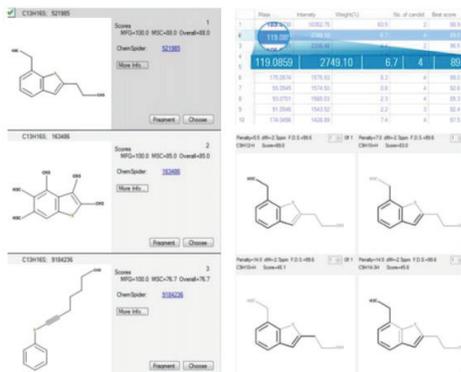
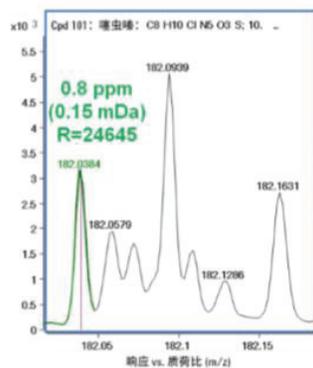
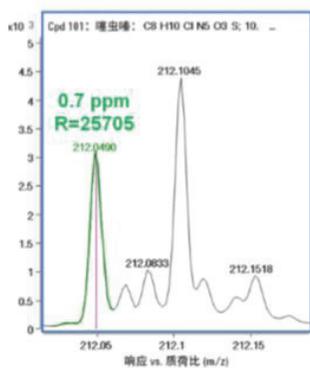
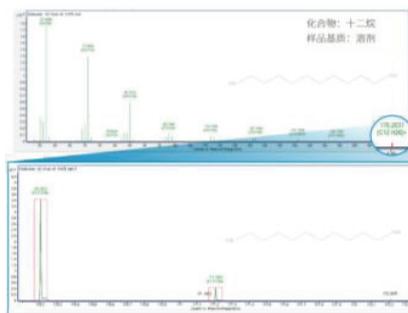
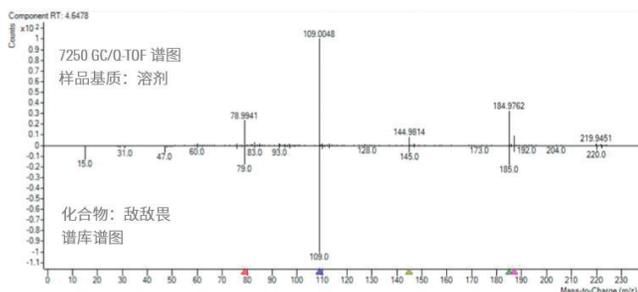


# 基因毒性杂质分析解决方案

## 7250 GC/Q-TOF 四极杆 - 飞行时间高分辨质谱仪

Agilent 7250 GC/Q-TOF 是应对 GC/MS 鉴定、定量和探索挑战的首选仪器。可靠全面地对分析样品进行定性定量,在得出结论实现突破和兑现承诺时,提供最高可信度。安捷伦凭借其 7250 GC/Q-TOF 和完善的 MassHunter 软件,能够在整个 GC/MS 工作流程中提供信心:

- **谱库级高质量谱图** — 无失真的谱图保真度提供了结合市售谱库的可靠化合物鉴定
- **同位素保真性** — 可靠的同位素丰度分布有助于在分子式鉴定中获得更高的确定性
- **高分辨和质量准确度** — 为检测结果提供最高的可信度
- **谱图内动态范围广** — 可靠检测痕量分析物,即使存在大量共洗脱也可实现
- **结构解析** — MS/MS 测量的高分辨率、精确质量离子谱图 可提供结构信息,并进一步提高了选择性,消除了基质干扰



## 基因毒性杂质分析解决方案

5110 ICP-OES 电感耦合等离子体发射光谱仪

7800 ICP-MS 电感耦合等离子体质谱仪

### 选择 ICP-OES 还是 ICP-MS ?

- ICP-OES 和 ICP-MS 之间的关键性能区别体现在：检出限，稀释倍数，耐受总溶解固体的能力，形态分析。
- ICP-OES 适合分析散装原料（如填料、黏合剂）等成分，且适用于 PDE 限值较高的口服药物。
- ICP-MS 的高灵活性和低至 pg/mL 级的检测限适合所有剂型（包括注射和吸入给药的药物）中所有元素（包括并不局限于受监管的元素）的准确分析。

### 硬件

#### 5110 ICP-OES, 史上最快的 ICP-OES, 同步双向观测, 最大程度缩短您的等待时间!

- 垂直矩管设计 — 轻松应对各类复杂基体或挥发性有机溶剂
- 智能光谱组合技术 (DSC) — 一次测量完成水平和垂直信号的同步采集读取
- 节能环保功能 — 高效低成本运行, 即开即用, 节省电力、气体消耗

#### 7800 ICP-MS, 助您快速提高分析效率, 提升您的期望值!

- 高性能氦气碰撞模式 — 有效去除干扰, 确保数据准确性
- 耐高基体进样技术 HMI — 基质耐受能力强, 减少样品前处理并使信号抑制最小化
- 离轴检测器 — 动态范围可达 10 个数量级, 一次运行可同时分析常量和痕量元素

### 软件

- 为 USP/ICH 方法定制的软件, 包括仪器条件和方法参数: 涵盖 PDE、日剂量、J 值计算等内容。
- 内置模板, 用于系统适用性测试报告。

### 经认证的可追溯标准溶液, 确保数据质量

- 安捷伦的 ICH/USP 有证标准物质 (CRM) 是元素预混物, 浓度为相对于 ICH/USP 方法中规定的口服 PDE 限值的某个浓度 (适用于其他给药途径 PDE 的 CRM 正在开发中)。CRM 可溯源到 NIST, 为安捷伦 ICP-MS 和 ICP-OES 生成的定量结果提供了较高可信度。用户无需利用单一元素标准品自行配制标样。

### 商品化的解决方案

- 7800 ICP-MS 配套商品化 ICH Q3D 和 USP <232>/<233> 元素杂质分析的解决方案, 包括详细的标准操作规程 (SOP)、前处理开发、完整工作流程建立 // 数据完整性讨论 / 安捷伦工程师上门培训等。



选择预设方法

应用方法	通用方法	摘要
EPA6020	EPA6020 应用方法	
饮用水 (He 模式)	低基体样品应用方法 (例如: 饮用水)	
食品/临床	食品/临床应用方法	
USP<232>	药物元素杂质分析应用方法 (使用 USP <232>)	
中国药典	药物元素杂质分析应用方法 (使用中国药典)	

适用样品类型:  
简单水溶液基体和酸消解样品 (固体溶解量低于 0.4%)

注释:  
调谐: 常规碰撞池模式: 常规药物分析需要使用 He 模式和用户访问控制可选软件。

## 基因毒性杂质分析解决方案

### 完全符合法规要求的软件体系

根据美国食品药品监督管理局（FDA）21 CFR Part 11 及 CFDA 2015 第 54 号公告 GMP 附录 < 计算机化系统 > 等法规内容，对数据可靠性提出要求。法规基于计算机化系统控制利用全新的自动化技术，Agilent ECM 科学数据管理系统完全符合法规要求。对于安捷伦三重四极杆液质联用仪所产生数据的法规符合性也通过 ECM 实现，包括：

- 设置用户权限，限制对系统的访问以及阻止未经授权的访问来为数据提供物理保护。
- 保护原始数据和元数据并防止有人未经授权即对它们进行修改，此外，还链接原始数据和结果以便随时（例如，在审计情形下）重新生成原始结果，并记录每个新结果副本。
- 通过审计追踪和版本控制，记录系统状态、仪器状态、人员状态信息，针对方法和批数据记录更详细的日志。记录谁对结果执行了何种操作以及何时执行，并跟踪向原始数据中添加重新分析新版本的用户。

数据安全性



数据完整性



审计可追溯性



## 基因毒性杂质分析解决方案

### 计算机化系统验证 CSV

#### 法规要求

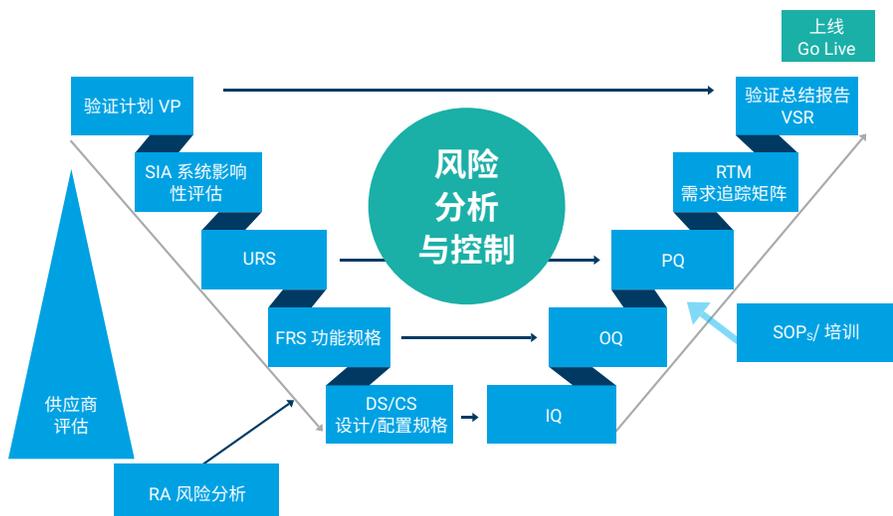
- 在基因毒性杂质检测分析中，势必会使用到一些重要的计算机化系统，如 CDS (Agilent OpenLab CDS2.X/Masshunter/ChemStation) /SDMS (Agilent ECM)/ GC-MS/LC-MS 等，那么根据美国食品药品监督管理局 (FDA) 21 CFR Part 11 及 CFDA 2015 第 54 号公告 GMP 附录 < 计算机化系统 > 等法规内容，这些生成、处理、记录保存数据的计算机化系统合规性及其验证，就成为确保基因毒性杂质检测数据准确性、可靠性的重要因素。

#### 用户所面临的挑战

- 计算机化系统验证 CSV，需要验证人员具有 GMP 知识和经验，了解实验流程，且兼具 IT 方面知识和技能。这对于大多数分析实验室而言，是十分挑战的。

#### 安捷伦 CSV 解决方案

- 安捷伦公司积极响应制药行业客户需求，参考 ISPE GAMP5 基于风险的 V 模型验证策略，开发出安捷伦 CSV 验证咨询服务，内容涵盖：验证计划 (VP)、系统影响性评估 (SIA)、用户需求说明 (URS)、功能需求说明 (FRS)、详细风险评估 (RA)、配置规范 (CS)、安装确认 (IQ)、运行确认 (OQ)、性能确认 (PQ)、需求追踪矩阵 RTM、验证总结报告 VSR。



## 参考文献

1. 药品中的遗传毒性杂质 — 法规与分析。安捷伦出版号 5991-187CHCN。
2. Ruan XL. et al. Advances in analytical techniques for the determinations of genotoxic impurities in pharmaceuticals [J]. Journal of China Pharmaceutical University 2016, 47(3):267-274
3. Ambavaram V. B. et al. Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: A comprehensive review J. Sep. Sci. 2015, 00, 1–16

了解更多：

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

在线商城：

[www.agilent.com/store](http://www.agilent.com/store)

安捷伦客户服务中心：

800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)



扫描二维码  
关注安捷伦视界

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2018  
2018 年 9 月, 中国出版  
5994-0229ZHCN