

基因毒性杂质的控制策略及其在HPLC-MS中的应用

胡克荣^{1*}, 陈瑞², 班玉娟², 黄静^{1#}

¹贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳

²贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年6月10日; 录用日期: 2022年6月25日; 发布日期: 2022年8月12日

摘要

在药品研发中, 基因毒性杂质的评估一直是药品质量评价的重点内容, 关系到药品上市的安全性。基因毒性杂质危险系数高, 对人体的危害性大, 选用高灵敏度、专属性良好的分析仪器并结合TTC概念选择合适的分析方法是目前控制药物中基因毒性杂质含量的核心内容。其是药物开发的重要组成部分, 贯穿于整个研发过程。高效液相色谱-质谱联用技术作为药物基因毒性杂质研究的有力分析工具之一, 已广泛应用于多种基因毒性杂质的分析与鉴定。本文将从基因毒性杂质的概念、国内外的法规要求、以及HPLC-MS在基因毒性杂质中的应用进行概述, 以为基因毒性杂质的有效控制提供参考依据, 保证患者用药安全。

关键词

基因毒性杂质, HPLC-MS, 警示结构, 限度控制

Control Strategies for Genotoxic Impurities and Their Application in HPLC-MS

Kerong Hu^{1*}, Rui Chen², Yujuan Ban², Jing Huang^{1#}

¹School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

²Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang Guizhou

Received: Jun. 10th, 2022; accepted: Jun. 25th, 2022; published: Aug. 12th, 2022

Abstract

In drug research and development, the evaluation of genotoxic impurities has always been the fo-

*第一作者。

#通讯作者。

cus of drug quality evaluation, which is related to the safety of drug marketing. Genotoxic impurities have a high risk factor and are harmful to the human body. The selection of analytical instruments with high sensitivity and good specificity and the selection of appropriate analytical methods combined with the concept of TTC are the core content of controlling the content of genotoxic impurities in drugs. It is an important part of drug development and runs through the entire R&D process. High performance liquid chromatography-mass spectrometry, as one of the powerful analytical tools for the study of drug genotoxic impurities, has been widely used in the analysis and identification of various genotoxic impurities. This article will summarize the concept of genotoxic impurities, domestic and foreign regulatory requirements, and the application of HPLC-MS in genotoxic impurities, in order to provide a reference for the effective control of genotoxic impurities and ensure drug safety for patients.

Keywords

Genotoxic Impurities, HPLC-MS, Alert Structure, Limit Control

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

药品是指为预防、治疗、诊断人体疾病，有目的地调节人体生理功能，规定适应症或者功能适应症、用法用量的一类特殊物质。在原料药的生产 and 储存过程中，影响药品纯度的物质称为杂质[1]，药品中的杂质会影响药物的稳定性及疗效，甚至导致不良反应事件的发生[2]。在杂质研究领域，基因毒性杂质备受关注。Ashby [3]等首次提出了基因毒性的概念，并将基因毒性杂质(genotoxic impurity, GTI)定义为“经过适当遗传毒性实验模型，如细菌基因突变(Ames)实验，证实具有遗传毒性的杂质”。其可能导致 DNA 损伤或突变，从而直接影响 DNA 的功能或改变其遗传特性，引起致癌、致突变、致畸变等遗传毒性[4]。

基因毒性杂质的来源贯穿于药品的整个生产和流通。药物中基因毒性杂质的来源包括原料药合成的起始物料、反应中间体、催化剂和试剂等。同时，如果在药物的制剂、储存或运输过程中处理不当[5]，也会产生相应的基因毒性杂质。基因毒性杂质与普通的杂质前期发展相似，在 20 世纪 80 年代末~90 年代初开始被系统地研究。由于药物分析行业的不断发展，灵敏度更高的仪器(如 HPLC-MS、GC-MS)等大规模应用于药物分析和检测，基因毒性杂质逐渐被检出[6]。

近年来，关于药物中基因毒性杂质超标导致药品召回的不良事件均有报道。2020 年 9 月，美国 FDA 数据库显示，超过 1400 个产品批次已从市场召回，原因是致癌性的基因毒性杂质 N-亚硝胺含量超过了可接受的摄入量 26.5 ng/天，召回药物包括缬沙坦、厄贝沙坦、二甲双胍、雷尼替丁等[7]。同时，因为痕量基因毒性杂质的残留而引发的医疗事故也频繁发生，如备受关注的甲磺酸奈非那韦事件以及近两年出现的 N-亚硝基二甲胺事件。这引起各国药品监督管理部门的高度重视，针对此类事件，对基因毒性杂质的控制出台了一系列的指导性文件。目的是为了严控控制基因毒性杂质在药物中的限度，保证患者用药安全。

人用药品技术要求国际协调理事会(The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)、欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)及美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)都陆续提出了基因毒性杂质研究策略和限度要

求[8][9][10],我国国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)也于2020年5月8日发布了《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》[11],查阅各类法规可知,目前普遍采用“警示结构”的方法,将可能引起基因毒性的结构列入关注队列,含有这些基团的杂质通常被认为具有潜在基因毒性。

高效液相色谱-质谱联用技术(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS),即 HPLC-MS 联用技术。具有高选择性以及高灵敏度,在药物分析的鉴别、定量中可以显著提高方法的灵敏度,能最大限度减少干扰,满足基因毒性杂质痕量分析的要求,是近年基因毒性杂质检测常用的技术。它既可以有效整合多样化的结构信息,又能高效分离出待测物,特别适用其分离和结构识别。在当前的医学领域中, HPLC-MS 联用技术之已成为研究杂质最有力的分析工具之一。

本文将从基因毒性杂质的分类、限度要求、各类基因毒性杂质在 HPLC-MS 中的应用及目前研究所面临的问题 4 个方面进行阐述,为基因毒性杂质的进一步研究提供参考。

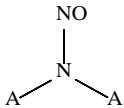
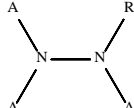
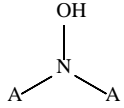

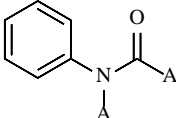
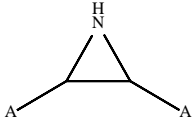
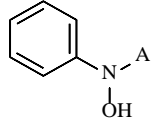
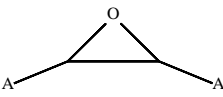
2. 基因毒性杂质的分类

目前主要通过毒理学评估手段(体外 Ames 实验为主)辅以体内实验评估化合物是否具有基因毒性。经过化学结构研究及毒理学评价,发现某些官能团或亚结构单元,能与生物体内的一些功能性的大分子发生作用,从而引起基因突变。由于其对生物活性具有一定的警示作用,又称警示结构[12]。利用警示结构判断化合物是否具有基因毒性,使对基因毒性杂质的判断更加迅速,开展研究也更具针对性。Ashby 等[13]假设了一个超级化合物,将很多警示结构包含在其中(图 1)。结合文献及相关研究,将其中较为普遍的警示结构解析出来。见表 1。

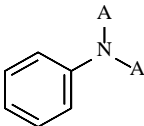
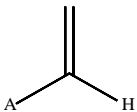
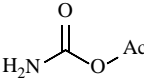
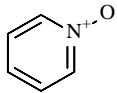
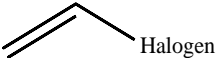
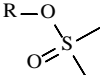
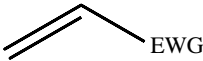
EMA 和 FDA 指南都认为利用警示结构去研究基因毒性杂质是有效方法之一。但需注意的是,具有警示结构的化合物不一定具有基因毒性,只是其含基因毒性的可能性比较高,需对其做进一步的毒理学评估。例如,吡啶类的氮氧化合物,近期有研究表明其引起基因毒性的可能性很小[14],但由于其被列入警示结构,申报人在提交新药申请时,涉及到此类化合物都被要求评估其产生基因毒性的风险,大大增加了不必要的研究成本。

Table 1. Common warning functional groups

表 1. 常见的警示性官能团

序号	官能团类别	警示基团	序号	官能团类别	警示基团
1	N-亚硝基胺		9	胍类化合物	
2	N-亚甲基醇		10	偶氮类化合物	
3	N-酰化氨基苯		11	氮丙啶类	
4	N-羟基苯胺类		12	环氧丙烷	

Continued

5	芳香胺和烷基取代的芳香胺		13	醛	
6	氨基甲酸酯		14	过氧化物	$R-O-OH$
7	氮杂芳基 N-氧化物		15	卤代烯烃	
8	磺酸盐的烷基酯		16	迈克尔反应加成受体	

A: 烷基、芳香基或氢原子; Halogen: F, Cl, Br, I; EWG: 吸电子基团, 如氰基和羰基等。

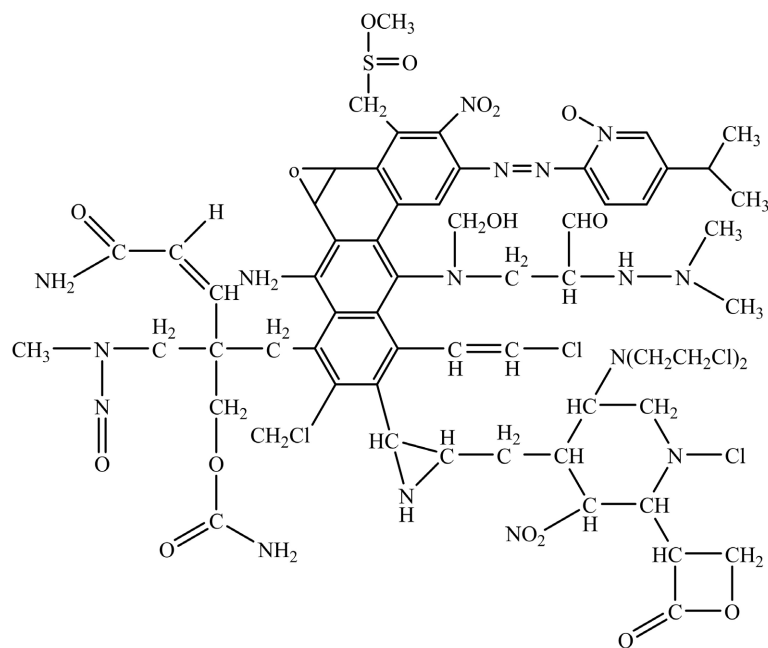


Figure 1. Structure of super compounds

图 1. 超级化合物的结构

3. 基因毒性杂质的限度要求

限度要求

针对基因毒性杂质的限度, 2006 年欧洲 EMA 和 2008 年美国 FDA 在指南中都提出用“毒理学关注阈值”(Threshold of toxicological concern, TTC)作为基因毒性杂质的可接受限度[15]。TTC 具体含义为在人的的一生(70 岁)中, 每天摄入 1.5 μg 基因毒性杂质, 其致癌的风险是可接受的($<1/100000$)。故在实际检测中, 基因毒性杂质常常采用限度检查的方法。阶段性基因毒性杂质的限制摄入量见表 2。

但需注意的是, TTC 不能被认为是绝对安全的保障, 在药物上市过程中, 还是需要更加具体的毒性

数据以及更灵敏的检测技术来确定基因毒性杂质的允许摄入量。2019年1月23日,国家药典委员会根据我国国情发布了《关于<中国药典>2020年版四部通则增修订内容的公示》,新增了内容“遗传毒性杂质控制指导原则审核稿”,其对药物基因毒性杂质的分类和控制做了进一步的指导[16],本指导原则包括了危害评估方法、可接受摄入量计算方法和限值制定方法。表明我国在原料药以及药物制剂中基因毒性杂质的限度控制上应该更加严格规范。

Table 2. Acceptable limits for genotoxic impurities specified by EMA and FDA in stages

表 2. 阶段性 EMA 和 FDA 规定的基因毒性杂质可接受的限度

给药时间		基因毒性杂质每日允许最大摄入量/ μg
EMA	FDA	
>12 个月	>12 个月	1.5
<12 个月	>6~12 个月	5
<6 个月	>3~6 个月	10
<3 个月	>1~3 个月	20
<1 个月	14 d~1 个月	60
1d	<14 d	120

4. 不同类型的基因毒性杂质的研究

药物中的基因毒性杂质必须控制在低于 0.01%~0.03% 的限度内[17] [18]。这就需要使用高灵敏度的分析仪器,同时还要求检测方法具有更高的选择性。HPLC-MS 作为杂质分析最有力的工具之一,近年来已广泛应用于基因毒性杂质的检测。下面是常见的一些基因毒性杂质的检测实例:

4.1. 亚硝胺类化合物

亚硝胺类基因毒性杂质是公认的强致癌物之一,应保持较高的警惕性和敏感性。常见的亚硝胺类结构如图 2。

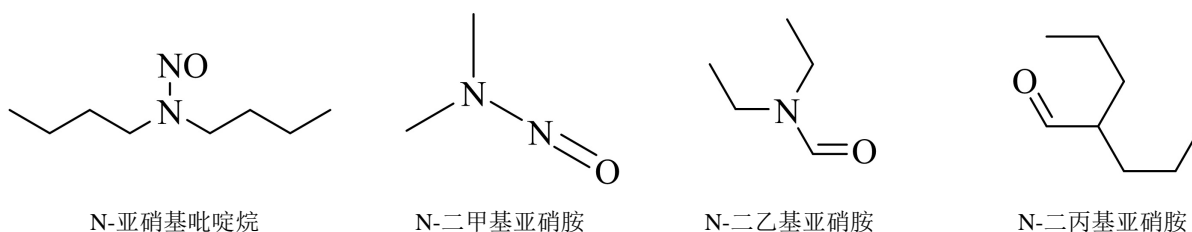


Figure 2. Structures of GTIs in nitroamine

图 2. 常见亚硝胺类基因毒性杂质结构

Khorolskiy M 等[19]建立了一种 HPLC-MS/MS 方法能同时测定缬沙坦、氯沙坦和厄贝沙坦中亚硝胺类的基因毒性杂质,并优化了质谱条件使其摆脱基质效应成为可能,袁松等[20]运用 HPLC-MS/MS 测定了奥美沙坦酯中 7 种类型的基因毒性杂质。在工艺合成路线中,如同时使用胺类化合物与亚硝酸盐,也应研究可能产生的相关亚硝胺类杂质。例如,在替格瑞洛工艺合成路线[21] (图 3)的步骤 2 中,重氮化环化反应在亚硝酸钠/乙酸条件下进行,理论上可能与中间体 M1 中含有的仲胺等第二类胺类化合物发生反应,或者是与胺类试剂如三乙醇胺(TEA)、三乙胺等引入的第二类试剂的结构发生相互作用,可能存在产生亚硝胺类杂质的风险。应注意防范。

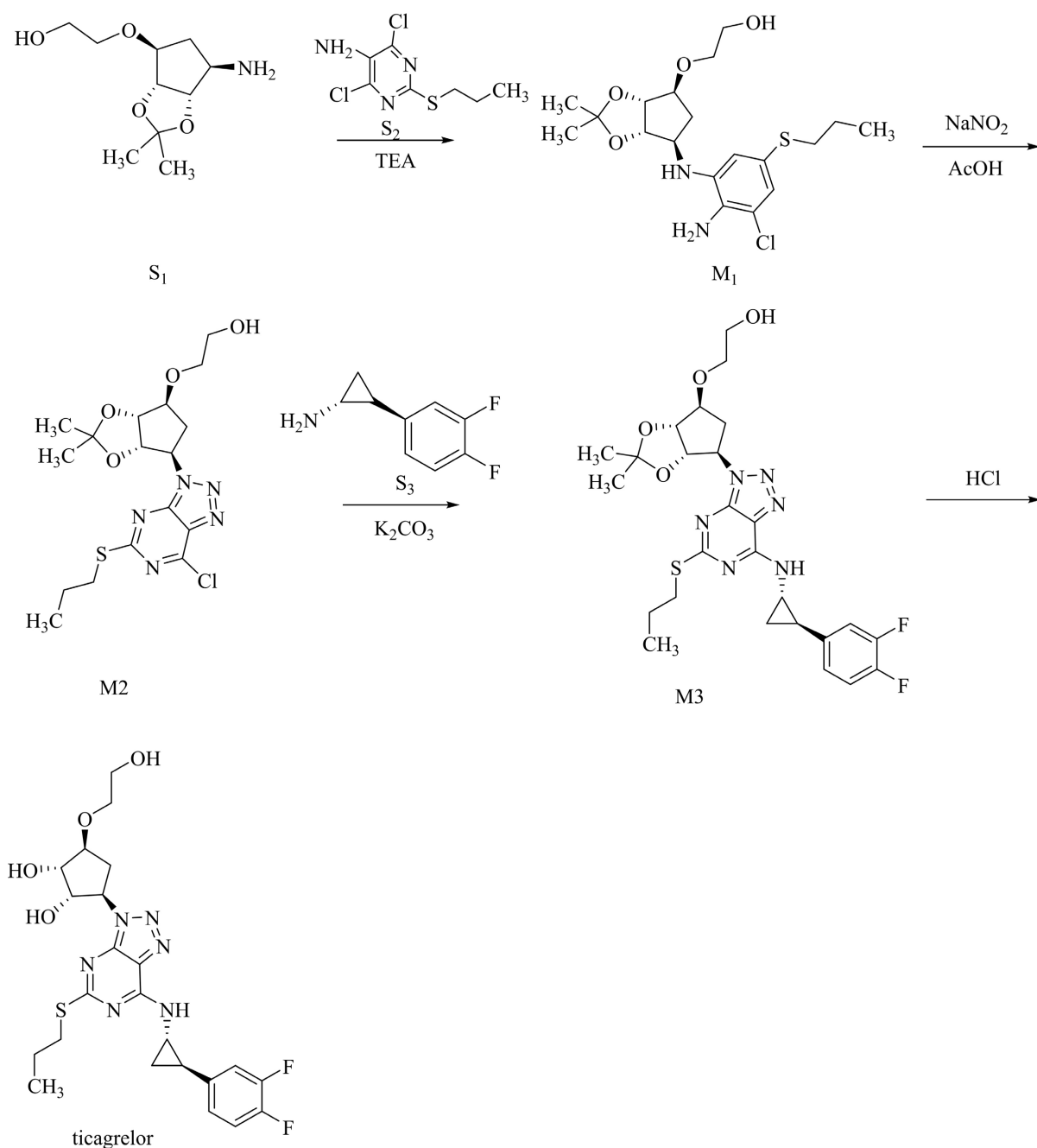


Figure 3. Synthetic route of ticagrelor

图 3. 替格瑞洛的合成路线

4.2. 磺酸酯类化合物

骆美玉等[22]建立了不需要前处理的 HPLC-MS/MS 方法对盐酸吉西他滨中甲磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)、甲磺酸甲酯(ethyl methanesulfonate, EMS)进行了测定。其灵敏度高, 重现性好。曹琳等[23]采用 LC-QQQ-MS/MS 分析苯磺酸氨氯地平中痕量苯磺酸酯类基因毒性杂质, 其建立的方法准确度良好, 使用于芳香基磺酸酯类基因毒性杂质的测定。为了优化分析结果、避免衍生化过程中醇类和卤代烃的引入造成假阳性, 易大为等[24]采用乙腈-水为专有溶剂, 建立衍生化气相色谱-质谱联用(GC-MS)

技术分别对甲磺酸培氟沙星中的 MMS、EMS、甲磺酸异丙酯(isopropyl methanesulfonate, IMS)和甲磺酸萘莫司他原料药中的 MMS、EMS 进行了检测。常见的甲磺酸类基因毒性杂质见图 4。

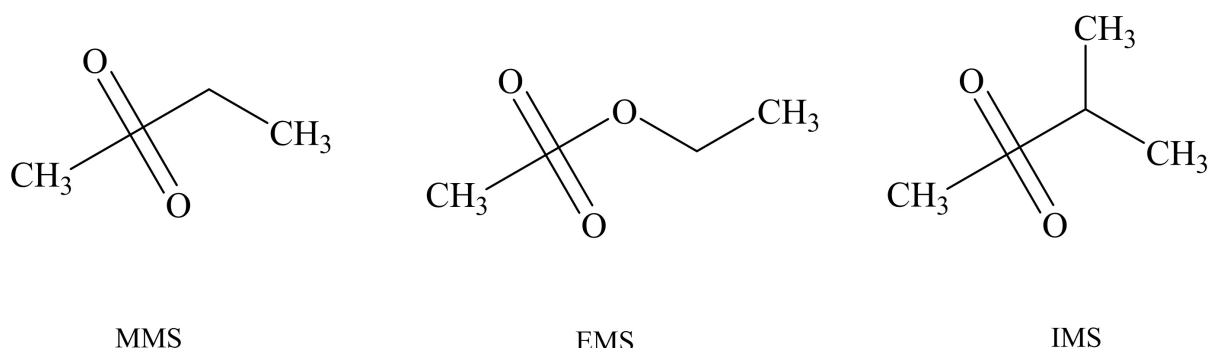


Figure 4. Structure of common methanesulfonic acid genotoxic impurities

图 4. 常见甲磺酸类基因毒性杂质结构

4.3. 胍类化合物

胍类化合物是目前已知具有较强的亲核性和潜在致癌性的基因毒性杂质(见图 5)。其性质活泼,很容易和色谱柱上的硅氧基发生反应,导致峰形拖尾。建立一种简便,快捷,灵敏度高的分析方法对胍类基因毒性杂质进行测定是必不可少的。冯蕊等[25]建立 LC-MS 法去测定塞来昔布中对胍基苯磺酰胺 [(4-sulfamoylphenyl) hydrazine, SHH]和对甲苯胺基苯磺酰胺[(4-methyl-acetophenone) para-sulfonamide phenylhydrazine, MAP]2 个苯胍类基因毒性杂质。胍类化合物极性较大,需要衍生化前处理增加挥发性和稳定性, Lakshmp KJ 等[26]建立了离子交换色谱法 - 电导检测器对西拉普利中残留的胍类物质进行了测定。该方法样品前处理简单、高效且具有很高的灵敏度。胍类化合物作为潜在的基因毒性杂质,大多是从起始物料或者中间体中直接带入或者从合成副反应中引入,因此在生产过程中要对其进行相应的控制,建立合适的质量标准 and 已验证的分析方法对其进行痕量残留检测。



Figure 5. The structure of common hydrazine compounds genotoxic impurities

图 5. 常见胍类化合物基因毒性杂质结构

4.4. 其他类型的基因毒性杂质

Iliou K 等[27]提出了一种 LC-MS/MS 方法用于定量测定雷贝拉唑中两种潜在的基因毒性杂质,通过优化流动相中缓冲盐的 pH 值和浓度,并按照 ICH 指南进行方法学验证其建立的方法专属性良好,灵敏度高。Al-Sabti B 等[28]利用 HPLC-MS 测定维格列汀中吡啶、4-二甲氨基吡啶的含量,吡啶类化合物是用于维格列汀药物中的活性碱,其含有亲电官能团,被认为是潜在的基因毒性杂质。李锐等[29]建立了高效液相色谱 - 四极杆/线性离子阱质谱法(HPLC-QTRAP-MS/MS)同时测定艾司奥美拉唑钠中氮氧化物(GTIE)和氮氧磺酰物

(GTII) 2种潜在基因毒性杂质。艾司奥美拉唑钠是一种质子泵抑制剂, 应用于胃食管返流病、消化性溃疡等酸相关性疾病的治疗。在其合成过程中用到了过氧化物体系, 在氧化反应时可能生成副产物奥美拉唑氮氧化物(OmeprazoleN-oxide, GTIE)及奥美拉唑氮氧磺酰物(OmeprazolesulfonylateN-oxide, GTII), 属于潜在的基因毒性杂质, 需在制剂生产中加以控制。常见的氮杂芳基 N-氧化物基因毒性杂质见图 6。

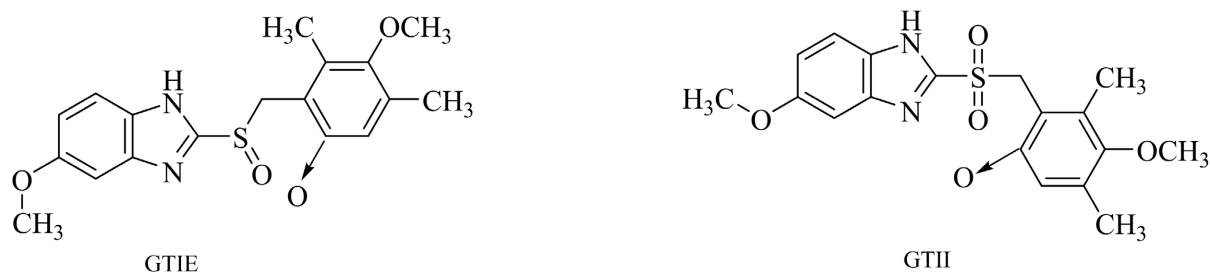


Figure 6. Structure of common azaaryl N-oxide genotoxic impurities
图 6. 常见氮杂芳基 N-氧化物基因毒性杂质结构

5. 目前基因毒性杂质研究所面临的问题

5.1. 基因毒性杂质的限度低

基因毒性杂质检测时, 由于其限度较低, 要达到所需要的检测限, 就必须配制高浓度的供试品溶液。然而, 高浓度的供试品溶液可能会面临堵塞色谱柱、污染离子源、以及基质效应等问题, 检测难度大大增加[30]。同时其检测一般使用气质联用或者液质联用技术, 对于药企来说, 检测成本增加。在实际操作时, 上述问题可通过改变溶剂的组分使供试品溶液成分析出, 将高浓度的基质除去, 以降低基质干扰。

5.2. 基因毒性杂质的种类繁多且理化性质差异较大

一个药物中可能含有多种类型的基因毒性杂质, 在进行测定时, 可能就需要建立多种检测方法对其分别进行测定, 将得到的检测结果进行对比, 相互补充, 才能满足其检测要求。

5.3. 基因毒性杂质的稳定性较差

由于基因毒性杂质大多数具有活泼的官能团, 自身容易发生氧化、水解或还原反应, 或者与其他物质发生反应, 故在测定时需进行衍生化或加入稳定剂[31]。

5.4. 基因毒性杂质的溶解性

为了确保检测结果的可靠性, 一般要求选择合适的溶剂体系, 既要使潜在的基因毒性杂质完全溶解, 同时也要保证所选择的溶剂对待测物质无干扰。

5.5. 杂质评估不充分

药企对药物合成路线中的基因毒性杂质的来源评估不充分忽略了在原始物料、反应中间体以及制剂的贮存和运输等因素会产生潜在的基因毒性杂质。

5.6. 计算机理论预测比较单一化

对于未经检测的降解杂质产物不应仅根据计算机或理论预测进行研究, 而应重点研究通过强制性降解试验、加速或长期稳定性研究观察到的降解途径和主要降解产物[32]; 目前关于如何识别、预测和处理

合成过程中形成的基因毒性杂质的文献报道较多,如替尼类药物的N-氧化物、硝基苯催化氧化还原反应及副反应的控制、过渡金属杂质的处理等,但目前还没有统一的策略和方法,已经成为制约国内基因毒性杂质研究的瓶颈。

6. 结语

充分的杂质研究是制定科学合理的质量标准的基础,也是药品安全、有效、质量可控的重要保证。加强药品研发和质量控制,特别是对药品中所含基因毒性杂质的有效控制,将其限度控制在一个可接受的范围内,保证药品质量,减少不良反应的发生。是当前的首要任务。

HPLC-MS 联合技术具有分离效率高、速度快、灵敏度高、选择性好等优点。它不仅具有色谱的优点,而且可以给出丰富的结构信息,提高其定性能力,可以寻找和鉴定药物中基因毒性杂质的最佳条件,是目前有效控制药物质量的最重要的分析工具之一。同时,在药物定性鉴定、体内代谢物研究、中药复杂成分分析等领域发挥着重要作用。随着色谱及其联用技术的不断进步,各种技术相互配合和补充,将成为未来药物杂质研究的主流。

随着科技的发展,对致癌、致突变等遗传毒性杂质的研究越来越深入,也将会出现新的遗传毒性杂质结构,现有遗传毒性杂质的控制限度和控制方法也会随之做出相应的调整。因此,应关注基因毒性杂质在药品整个生产周期的研究进展,与时俱进地开展研究,制定合理的控制策略。

参考文献

- [1] Kątny, M. and Frankowski, M. (2017) Impurities in Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **47**, 187-193. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1242401>
- [2] Gillette, M., Taylor, A., Butulija, D., Kadiyala, H. and Jneid, H. (2020) Reflections of the Angiotensin Receptor Blocker Recall by the FDA and Repercussions on Healthcare. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, **34**, 579-584. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-06976-0>
- [3] Ashby, T.W. (1991) Definitive Relationships among Chemical Structure, Carcinogenicity and Mutagenicity for 301 Chemicals Tested by the U.S. NTP. *Mutation Research*, **257**, 229-306. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(91\)90003-e](https://doi.org/10.1016/0165-1110(91)90003-e)
- [4] Charoo, N.A., Ali, A.A., Buha, S.K. and Rahman, Z. (2019) Lesson Learnt from Recall of Valsartan and Other Angiotensin II Receptor Blocker Drugs Containing NDMA and NDEA Impurities. *AAPS PharmSciTech*, **20**, Article No. 166. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1376-1>
- [5] Reddy, A.V., Jaafar, J., Umar, K., Majid, Z.A., Aris, A.B., Talib, J., et al. (2015) Identification, Control Strategies, and Analytical Approaches for the Determination of Potential Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals: A Comprehensive Review. *Journal of Separation Science*, **38**, 764-779. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401143>
- [6] 王先龙. HPLC-MS 联用技术在药物杂质分析中的应用[J]. 化工设计通讯, 2021, 47(7): 197-198.
- [7] Bharate, S.S. (2021) Critical Analysis of Drug Product Recalls due to Nitrosamine Impurities. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 2923-2936. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02120>
- [8] International Conference on Harmonization (ICH) (2017) M7(R1). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk.
- [9] European Medicines Agency (2019) EMA Temporary Interim Limits for NMBA, DIPNA and EIPNA Impurities in Sartan Blood Pressure Medicines, EMA/351053/2019.
- [10] U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1995) Food Additives: Threshold of Regulation for Substances Used in food-Contact Articles (Final Rule). *Federal Register*, **60**, 36582-36596.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行) [S]. 北京: 国家药品监督管理局, 2020.
- [12] 文海若, 闫明, 王亚楠, 王翀, 耿兴超, 朱炯, 等. 药物杂质遗传毒性评价策略与监管研究[J]. 中国药事, 2020, 34(2): 131-140.
- [13] Ashby, J. and Tennant, R.W. (1988) Chemical Structure, *Salmonella mutagenicity* and Exten of Carcinogenicity as Indicators of Genotoxic Carcinogenesis among 222 Chemicals Tested in Rodents by the US NCI/NTP. *Mutation Research*, **204**, 17-115. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(88\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(88)90114-0)

- [14] Amberg, A., Anger, L.T., Bercu, J., Bower, D., Cross, K.P., Custer, L., *et al.* (2019) Extending (Q)SARs to Incorporate Proprietary Knowledge for Regulatory Purposes: Is Aromatic N-Oxide a Structural Alert for Predicting DNA-Reactive Mutagenicity. *Mutagenesis*, **34**, 67-82. <https://doi.org/10.1093/mutage/gey020>
- [15] Mahony, C., Bowtell, P., Huber, M., Kosemund, K., Pfuhrer, S., Zhu, T., *et al.* (2020) Threshold of Toxicological Concern (TTC) for Botanicals - Concentration Data Analysis of Potentially Genotoxic Constituents to Substantiate and Extend the TTC Approach to Botanicals. *Food and Chemical Toxicology*, **138**, Article ID: 111182. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111182>
- [16] Chinese Pharmacopoeia Commission (2019) Methods for the Detection of Sulfonate Alkyl Ester Impurities in Sulfonate Drugs (Draft).
- [17] International Conference on Harmonization (ICH) (2006) Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances.
- [18] International Conference on Harmonization (ICH) (2006) Q3B(R2): Impurities in New Products.
- [19] Khorolskiy, M., Ramenskaya, G., Vlasov, A., Perederyaev, O. and Maslennikova, N. (2021) Development and Validation of four Nitrosamine Impurities Determination Method in Medicines of Valsartan, Losartan, and Irbesartan with HPLC-MS/MS (APCI). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **20**, 541-552.
- [20] 袁松, 冯玉飞, 于颖洁, 黄海伟, 丁建. UPLC-MS/MS 法测定奥美沙坦酯中 7 个亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 药物评价研究 2021, 44(2): 356-361.
- [21] 孙兰天, 王业明, 闫红. 替格瑞洛的合成工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(4): 445-449.
- [22] 骆美玉, 隗海龙. LC-MS/MS 法测定盐酸吉西他滨中磺酸酯类基因毒杂质[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2018, 34(3): 285-287.
- [23] 曹琳, 罗淑青, 章燕, 陈军, 孙春业, 赖丛芳, 钱江. LC-QQQ-MS/MS 分析苯磺酸氨氯地平中痕量苯磺酸酯类基因毒性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(11): 1296-1300.
- [24] 易大为, 邹宇, 赵晓东, 张亚杰. GC-MS 法测定甲磺酸培氟沙星中甲磺酸酯杂质的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(6): 521-525.
- [25] Lakshmp, K.J., Devi, P.R. and Mukkanti, K. (2010) Quantitative Determination of Residual Hydrazine Content in Cilazapril Byion Chromato-Graph. *Oriental Journal of Chemistry*, **26**, 1001-1006.
- [26] 冯蕊, 陈冠军, 汪生. LC-MS 法测定塞来昔布中 2 个苯胍类基因毒性杂质[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(2): 182-186.
- [27] Iliou, K., Malenović, A., Loukas, Y.L. and Dotsikas, Y. (2018) Analysis of Potential Genotoxic Impurities in Rabeprazole Active Pharmaceutical Ingredient via Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Following Quality-by-Design Principles for Method Development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **149**, 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.037>
- [28] Al-Sabti, B. and Harbali, J. (2021) Development and Validation of an Analytical Method for Quantitative Determination of Three Potentially Genotoxic Impurities in Vildagliptin Drug Material Using HPLC-MS. *Journal of Separation Science*, **44**, 2587-2595. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100136>
- [29] 李锐, 徐金梅, 孙卫东, 邬向东. 高效液相色谱-四极杆/线性离子阱质谱法同时测定艾司奥美拉唑钠中 2 种潜在基因毒性杂质残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(4): 449-454.
- [30] Al Saeedy, M., Al-Adhrai, A., Öncü-Kaya, E.M. and Şener, E. (2022) An Overview of Advances in the Chromatography of Drugs Impurity Profiling. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **18**, 1-17.
- [31] 谢含仪, 林云良, 张瑞凌, 王珊珊, 陈相峰. 基因毒性杂质分析方法和前处理技术的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1668-1676.
- [32] Udutha, S., Shankar, G., Borkar, R.M., Kumar, K., Srinivasulu, G., Guntuku, L., *et al.* (2018) Identification and Characterization of Stress Degradation Products of Sumatriptan Succinate by Using LC/Q-TOF-ESI-MS/MS and NMR: Toxicity Evaluation of Degradation Products. *Journal of Mass Spectrometry*, **53**, 963-975. <https://doi.org/10.1002/jms.4266>