

Detection of methylphenyl-like genotoxic impurities in antibiotics

Qiannan Song Yanling Wang Xiaoxue Cheng Lihui Yang Yurun Zhao*

Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei, 050000, China

Abstract

Methylphenyl genotoxic impurities have attracted much attention in antibiotic drugs due to their potential genotoxic risks. It may cause gene mutation or cancer through direct interaction with DNA. In order to guarantee the quality and safety of drugs, it is very important to study their chemical characteristics and genotoxicity mechanism and develop efficient and sensitive detection methods. In this paper, the chemical properties of methyl phenyl impurities, the mechanism of genotoxicity generation, and the detection methods of chromatographic analysis, mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry were reviewed, in order to provide reference for the detection and control of genotoxic impurities in antibiotics.

Keywords

antibiotics; methyl phenyl groups; genotoxic impurities; chromatographic analysis; mass spectrometry detection

抗生素中甲基苯基类基因毒性杂质的检测

宋倩男 王艳玲 程晓雪 杨立会 赵雨润*

中奇制药技术(石家庄)有限公司, 中国·河北 石家庄 050000

摘要

甲基苯基类基因毒性杂质因其潜在的基因毒性风险在抗生素药物中引起了广泛关注。其可能通过与DNA的直接作用导致基因突变或致癌。为保障药品的质量和安全性,研究其化学特性及基因毒性机制,并开发高效灵敏的检测方法至关重要。论文综述了甲基苯基类杂质的化学特性、基因毒性生成机制,以及色谱分析、质谱技术和液相色谱-质谱联用技术等检测方法,旨在为抗生素药物中基因毒性杂质的检测和控制提供参考。

关键词

抗生素; 甲基苯基类; 基因毒性杂质; 色谱分析; 质谱检测

1 引言

甲基苯基类基因毒性杂质是药品生产和储存过程中常见的杂质之一,具有潜在的DNA损伤风险,可能导致基因突变和致癌性。这类杂质的来源包括生产过程中未反应的中间体、副产物以及储存和降解过程中产生的其他杂质。当前,国际药品管理机构(如ICH)对基因毒性杂质的含量提出了严格限制,这对检测技术的灵敏度、专属性和可靠性提出了更高要求。

【作者简介】宋倩男(1985-),女,中国河北石家庄人,硕士,副高级工程师,从事药物分析研究。

【通讯作者】赵雨润(1977-),女,中国河北保定人,硕士,工程师,从事药物分析研究。

2 甲基苯基类基因毒性杂质的化学特性

2.1 化学反应活性与代谢行为

甲基苯基类基因毒性杂质因其化学结构中含有高度活性的甲基和苯基基团,表现出独特的化学反应性和代谢行为。这些化学特性使其在药物合成、储存及代谢过程中具有生成和转化为毒性产物的潜力。在药物合成阶段,甲基苯基类化合物由于甲基基团的电子给性作用,容易发生氧化反应,生成醛类或羧酸类物质,而苯基的共轭 π 电子体系则使其具有较高的化学稳定性,但在特定条件下也可能通过电离或自由基反应形成活性更高的带电分子或自由基。特别是在氧化条件下,活性氧分子或过氧化物可以引发进一步反应,使其生成具有毒性的中间体或产物,如环氧化物或芳香族自由基。

代谢过程中,这类杂质在体内可能受到代谢酶系统的作用,形成代谢产物。研究表明,细胞色素P450等氧化酶能够将这些化合物氧化为反应性更强的代谢物。这些代谢物往往具有更高的生物活性,能够通过共价结合或自由基反应

与细胞内关键的生物大分子发生相互作用，导致潜在的基因毒性效应。在储存和运输过程中，甲基苯基类杂质可能受环境因素（如光照、热或湿度）的影响，发生降解反应，生成新的次生代谢产物。特别是紫外线的作用可能引发杂质的光化学反应，导致芳香环结构的断裂或生成多种含氧基团的氧化物，进一步加剧其毒性风险^[1]。这些复杂的化学反应和代谢行为使得甲基苯基类杂质的生成路径变得难以预测，因此，系统研究其化学反应特性和代谢行为对于药物质量控制具有重要意义。

2.2 基因毒性杂质的生成路径分析

甲基苯基类基因毒性杂质在药物生产、加工和储存的不同环节中可能通过多种路径生成，表现出复杂的生成机制。

在药物合成过程中，杂质的来源可能是未完全反应的原料、中间体或副产物。带有苯基结构的化合物在特定催化剂的作用下，可能发生副反应，生成包括羟基苯基、甲氧基苯基等在内的多种取代产物，这些副产物通常具有较高的基因毒性潜力^[2]。例如，在氧化条件下，苯基结构可能经历羟基化反应，生成活性更强的羟基化合物，或在脱氢反应中形成具有强氧化性的环状化合物。

在储存过程中，药物分子的降解和结构修饰是甲基苯基类杂质生成的重要途径之一。抗生素等复杂药物分子在长期储存中，可能因暴露于光线、高温或湿度条件下而发生分解反应，生成含有甲基苯基结构的降解产物。这些降解产物通常具有高反应性，可能进一步与环境中的氧气或水分子发生化学反应，生成更复杂的杂质组合。例如，在潮湿环境中，氧气可能参与芳香环的氧化反应，导致醌类化合物或其他氧化产物的生成。药物生产中使用的溶剂可能与药物分子或其中间体发生化学相互作用。例如，极性溶剂可能与甲基苯基基团发生亲核反应，生成取代结构复杂的杂质，这些杂质在特定条件下可能表现出基因毒性。

2.3 与 DNA 作用机制的理论研究

甲基苯基类基因毒性杂质的基因毒性效应通常通过其与 DNA 分子直接或间接作用来实现。这些作用机制主要涉及电离反应、自由基反应以及与 DNA 碱基的共价结合。研究表明，这类杂质通过自由基诱导或电子转移机制生成高活性的中间体，如环氧化物或自由基，这些活性中间体容易与 DNA 分子发生相互作用，尤其是与核苷酸碱基之间的亲核中心形成共价加合物^[3]。共价加合物的形成可能导致 DNA 链的结构不稳定性，引发双链断裂或碱基的缺失，从而对基因组完整性造成威胁。

自由基反应是甲基苯基类杂质的重要毒性途径之一。在体内代谢过程中，代谢酶催化可能生成具有强氧化性的代谢产物，这些产物能够与 DNA 中的关键结构（如鸟嘌呤）发生反应。例如，自由基氧化可能导致 DNA 碱基被修饰为 8-羟基脱氧鸟苷，这种修饰不仅会影响碱基对的正常配对，

还可能干扰 DNA 的复制和转录，进一步诱导基因突变。实验研究发现，这种损伤通常具有累积效应，随着杂质浓度的增加或暴露时间的延长，DNA 损伤的程度可能呈指数增长。这些杂质还可能通过干扰 DNA 的修复机制来增强其毒性效应。

3 抗生素中甲基苯基类基因毒性杂质的检测

3.1 色谱分析法

色谱分析法是检测甲基苯基类基因毒性杂质的传统而重要的方法之一，其依赖样品中不同成分在固定相和流动相之间的分配差异实现分离和分析。在药物质量控制中，气相色谱和液相色谱是最常用的两种色谱技术。气相色谱适用于挥发性和热稳定性较高的甲基苯基类杂质，通过高效分离柱和精确的温度控制，可以有效地实现复杂样品中不同组分的分离和定量。但由于甲基苯基类杂质中有些化合物的挥发性较低或对热较敏感，气相色谱的适用性受到一定限制^[4]。相比之下，液相色谱能够更广泛地适用于极性较强、挥发性较低的杂质分析，特别是在反相色谱模式下，可以利用各组分极性的差异将目标杂质从复杂基质中分离出来。

液相色谱法的优势还体现在灵活性方面。通过选择适当的固定相（如 C18 柱）和优化流动相的成分比例，可以实现对多种不同极性杂质的高效分离。梯度洗脱技术进一步提升了分离能力，特别是在复杂混合物样品中，可以更好地解决色谱峰重叠的问题，提高分离效率和灵敏度^[5]。配合紫外检测器或荧光检测器，液相色谱法能够对甲基苯基类杂质实现快速的定性和定量分析。但传统色谱检测方法在面对痕量杂质或复杂基质干扰时，其灵敏度和专属性可能受到限制。因此，在色谱技术的基础上，近年来进一步开发了基于超高效液相色谱（UHPLC）的方法，其在分离效率、分析速度和灵敏度方面均优于传统液相色谱，为甲基苯基类杂质的高效检测提供了更强有力的工具^[6]。

3.2 质谱检测技术

质谱检测技术因其高度灵敏和分辨率高的特点，被广泛应用于甲基苯基类基因毒性杂质的检测。质谱通过对样品分子进行离子化并根据其质荷比对其进行分离和分析，能够精确测定杂质的分子量和分子结构特征，是一种高效的定性和定量工具^[7]。对于甲基苯基类杂质，通过电喷雾离子化（ESI）或化学电离（CI）等技术，可以实现对复杂基质样品中非挥发性和极性杂质的有效分析。多级质谱（MS/MS）技术进一步增强了质谱在杂质检测中的应用价值，通过对初级离子的碎片离子进行深入分析，可以揭示杂质的结构特征和反应机理。

质谱检测通常与样品的前处理技术相结合，以提高目标杂质的富集效率并减少基质效应干扰。常用的样品前处理方法包括固相萃取（SPE）、液液萃取（LLE）和超临界流体萃取等，这些方法能够高效地从复杂样品中分离和浓缩目

标杂质。结合高分辨质谱(如轨道阱质谱和飞行时间质谱),可以显著提高检测的质量精度,甚至在复杂药物基质中实现痕量杂质的定性和定量分析。质谱技术的另一个优势在于其数据处理能力,通过数据库搜索和自动化谱图解析,可以快速识别未知杂质成分,特别是在药物研发和质量控制中,能够满足国际药品监管机构对基因毒性杂质检测的严格要求^[8]。质谱技术常由于仪器价格昂贵、操作复杂等因素使其使用受限,同时在背景噪声较强的复杂基质中可能存在一定程度的假阳性或假阴性问题。

3.3 高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)

高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)是目前分析甲基苯基类基因毒性杂质的最先进和最有效的技术之一。该技术将液相色谱的高效分离能力与质谱的高灵敏度和高分辨率相结合,能够在复杂药物基质中对目标杂质进行快速而准确的检测。液相色谱部分通过选择性固定相(如C18反相柱)和优化流动相组成,能够对目标杂质进行精确分离,同时去除基质干扰^[9]。分离后的目标化合物直接进入质谱部分,通过离子化和质荷比分析实现定性和定量检测。

LC-MS技术的最大优势在于其对痕量杂质的高灵敏度和高特异性,特别是在多反应监测(MRM)模式下,可以针对特定的目标杂质设定检测条件,从而大幅度降低基质干扰并提高检测效率。LC-MS广泛用于抗生素药物中的基因毒性杂质检测,特别是针对苯基结构复杂、极性较强的杂质,通过优化液相分离条件和质谱参数,可以实现杂质的准确识别和定量分析。近年来,超高效液相色谱-质谱联用技术(UHPLC-MS)进一步提升了分离效率和检测灵敏度,为药物研发和质量控制提供了更加先进的技术支持。在实际检测过程中,LC-MS技术的应用还应注意仪器的维护和方法开发的复杂性,特别是针对极其复杂的样品基质,需要反复优化分析条件以确保结果的可靠性。为了进一步提高分析速度和降低检测成本,近年来还发展了基于高通量自动化的LC-MS方法,这为批量样品的快速检测提供了可能。

3.4 其他检测手段与其应用

除了色谱和质谱技术之外,其他检测手段也在甲基苯基类基因毒性杂质的分析中逐渐展现出应用潜力。核磁共振(NMR)技术作为一种无损分析方法,通过对杂质分子中的原子核磁共振信号进行解析,能够提供其结构信息和化学环境。这种方法特别适用于复杂分子结构的分析和未知杂质的结构鉴定,尽管其灵敏度较低,但在需要结构信息的研究中具有不可替代的作用^[10]。光谱技术如紫外-可见光谱(UV-Vis)和红外光谱(IR)也被广泛用于杂质的快速筛选和初步定性分析,尤其是在筛查潜在的基因毒性杂质时,这些技术因其操作简单和成本低廉而备受青睐。

基于纳米技术的传感器检测方法近年来得到了快速发

展。例如,功能化纳米材料制备的电化学传感器能够通过高效富集目标杂质,实现对甲基苯基类杂质的高灵敏度检测。生物传感技术如酶联免疫吸附检测(ELISA)和分子印迹技术也在杂质分析中展现出一定的应用前景,这些方法通过与特定杂质的特异性结合,可以实现快速、定量的高通量分析。

4 结语

甲基苯基类基因毒性杂质的存在对抗生素的质量与安全性构成潜在威胁,其检测与控制是药物研发与生产中不可忽视的环节。通过对其化学特性、生成机制及与DNA的作用机制的深入研究,可为其来源追踪及毒性评估提供理论支持。检测技术的快速发展,特别是液相色谱-质谱联用技术,为该类杂质的精确分析提供了有力手段。未来,应进一步优化现有检测技术,开发更加高效、环保的分析方法,同时完善相关法规,为药品安全性和有效性提供坚实保障。

参考文献

- [1] 龚飞虎,吴云登,赵赛.黄嘌呤氧化酶抑制剂非布司他杂质2-(2-羟基-5-甲酰基苯基)-4-甲基噻唑-5-甲酸乙酯的合成及晶体结构表征[J].化学世界,2023,64(6):459-463.
- [2] 黄颂,张玉莲,姚静怡,等.基于细菌群体感应的抗生素联合毒性评估[J].中国科学:技术科学,2024,54(10):1949-1965.
- [3] K R A, V E C, S A P, et al. 3-(2-Methylphenyl)-2-selenoxo-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one and Its Complex with Cd(II): Synthesis and Molecular and Crystal Structures[J]. Russian Journal of Coordination Chemistry, 2023, 49 (12): 841-855.
- [4] Chanysheva R A, Dibaeva T S, Zorin V V. BIOCATALYTIC REDUCTION OF 1-(4-METHYLPHENYL)ETHANONE[J]. ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ. СЕРИЯ ХИМИЯ И ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ, 2023, 67(1):104-109.
- [5] Xulan W, Guoyong L, Jianghai Y, et al. The crystal structure of 5'-(furan-2-yl)-3'-((4-methylphenyl)sulfonamido)-3',4',5',6'-tetrahydro-[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-carboxylic acid, C30H27NO5S[J]. Zeitschrift für Kristallographie-New Crystal Structures, 2023, 239(1): 93-95.
- [6] 朱玉蓉,吴向荣,刘洪,等.反应性甲基苯基树脂储存稳定性的研究[J].有机硅材料,2023,37(6):8-13.
- [7] 黄财顺,陆璐璐,冯启宏,等.抗生素类药物中基因毒性杂质检测分析进展[J].淮海医药,2023,41(4):438-441.
- [8] 洗芷然,孙春萌,骆雪芳,等.盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究[J].中国药科大学学报,2020,51(4):466-471.
- [9] 任业明,刘宜辉,邓玉晓,等.丁酸氯维地平4种杂质的合成[J].食品与药品,2020,22(4):276-279.
- [10] 马平平,周君安,孙琳.LC-MS/MS测定沙卡布曲缬沙坦钠中的基因毒性杂质[J].山东化工,2019,48(22):88-89+94.