

GC-MS法测定甲磺酸萘莫司他原料药中的遗传毒性杂质

毛颐晴^{1*}, 李 伟², 朱丽君²(1.南京市食品药品监督管理局, 南京 210038; 2.南京长澳医药科技有限公司, 南京 210038)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2555-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.36

摘要 目的:建立同时测定甲磺酸萘莫司他原料药中遗传毒性杂质甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯的方法。方法:采用气相色谱-质谱联用法,使用二氯甲烷进行提取。色谱柱为DB-5毛细管柱,柱温采用程序升温,进样口温度为240℃,柱流量为3.0 ml/min,吹扫流量为6.0 ml/min,进样方式为不分流进样,载气为高纯氦气,检测器为质谱检测器,离子源温度为230℃,接口温度为230℃,溶剂延迟时间为2.5 min,离子化模式为电子轰击离子化模式,检测器电压为相对于调谐结果,扫描(检测)方式为选择性离子检测,电子能量为70 eV,进样量为1.0 μl。结果:3种杂质成分之间的分离度均>2.0;3种杂质成分检测质量浓度线性范围均为0.10~20 μg/ml($r \geq 0.999 5$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为97.7%~104.8%、102.5%~110.7%、103.0%~107.6%,RSD分别为2.8%、2.6%、1.6%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、灵敏、迅速,可用于甲磺酸萘莫司他原料药中3种遗传毒性杂质的测定。

关键词 甲磺酸萘莫司他原料药;遗传毒性杂质;甲磺酸甲酯;甲磺酸乙酯;甲磺酸异丙酯;气相色谱-质谱联用法

Determination of the Genotoxicity Impurity in Mesylate Nafamostat Raw Materia by GC-MS

MAO Yiqing¹, LI wei², ZHU Lijun²(1.Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210038, China; 2. Nanjing Changao Pharmaceutical Science and Techology Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determination the genotoxicity impurities (methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate and isopropyl methanesulfonate) in mesylate nafamostat raw materia. METHODS: GC-MS was conducted, and the genotoxicity impurities were extracted by dichloromethane. The column was DB-5 capillary column by programmed temperature, the inlet temperature was 240 °C, column flow was 3.0 ml/min, purge flow was 6.0 ml/min, sample mode splitless injection, carrier gas was high purity helium, detector is a mass spectrometer detector, ion source temperature was 230 °C, the interface temperature was 230 °C, the delay time of solvent was 2.5 min, ionization mode was electron impact, detector voltage was respect to the tuning results, scanning (detection) method was selective ion monitoring, electron energy was 70 eV, and the injection volume was 1.0 μl. RESULTS: The separation degree of 3 impurities were greater than 2.0; the linear range of 3 impurities were 0.10-20 μg/ml ($r \geq 0.999 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 97.7%-104.8% (RSD=2.8%, $n=9$), 102.5%-110.7% (RSD=2.6%, $n=9$) and 103.0%-107.6% (RSD=1.6%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive and rapid, and can be used for the genotoxicity impurities in mesylate nafamostat raw materia.

KEYWORDS Mesylate nafamostat raw materia; Genotoxicity impurity; Methyl methanesulfonate; Ethyl methanesulfonate; Isopropyl methanesulfonate; GC-MS

甲磺酸萘莫司他(Nafamostat mesilate),化学名为6-脞基-2-萘基-4-胍基苯甲酸酯二甲磺酸盐,是一种合成的非肽类蛋白酶抑制剂,由日本鸟居药品株式会社研发上市,临床用于治疗急性胰腺炎等疾病^[1-2]。该药尚未在我国上市,正在按照三类新药要求进行临床前研究。

甲磺酸萘莫司他原料药在合成工艺中使用了原料甲磺酸、溶剂乙醇,因此在甲磺酸萘莫司他原料药中有可能存在甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯3种杂质^[3]。甲磺酸酯类物质作为一种潜在性遗传毒性杂质,严重威胁患者的健康,故需要对其含量进行控制^[3]。根据欧洲药物管理局(EMA)发布的《遗传毒性杂质限度指导原则》相关规定,按照毒理学担忧阈值(TTC)作为评价大部分遗传毒性杂质的阈值,则遗传毒性杂质摄入量最大限值为1.5 μg/d^[4-5]。甲磺酸萘莫司他作为抗凝药物使用时,每日最大使用量约600 mg,按此计算,含甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯不得过2.5 μg/g。

* 副主任药师。研究方向:药物质量分析。E-mail:myq_2006@126.com

近年来,对甲磺酸酯类杂质检测方法研究较多,常用的有气相色谱(GC)法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法、液相色谱-质谱联用(LC-MS)法等^[6-12]。本试验中,笔者参考《欧洲药典》(EP)8.0版中关于甲磺酸盐中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯的测定方法^[13],采用GC-MS法,并以二氯甲烷提取样品,对甲磺酸萘莫司他原料药中上述3种遗传毒性杂质进行了测定。

1 材料

1.1 仪器

GC-MS2010Plus 色谱仪(日本岛津公司);XS205型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

甲磺酸萘莫司他原料药(南京长澳制药有限公司,批号:141001、141002、141003);甲磺酸甲酯对照品(百灵威化学技术有限公司,批号:LASOM69,纯度>99%);甲磺酸乙酯对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:C1329031,纯度>99%);甲磺酸异丙酯对照品(上海阿达玛斯试剂有限公

司,批号:P1077113,纯度>98%);二氯甲烷为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 GC-MS条件

色谱柱:DB-5毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.5 μm);柱温:采用程序升温,起始柱温55℃,保持1 min,再以10℃/min上升到115℃,维持2 min;进样口温度:240℃;柱流量:3.0 ml/min;吹扫流量:6.0 ml/min;进样方式:不分流进样;载气:高纯氮气;检测器:MS检测器;离子源温度:230℃;接口温度:230℃;溶剂延迟时间:2.5 min;离子化模式:电子轰击离子化模式(DI);检测器电压:相对于调谐结果;进样量:1.0 μl;扫描(检测)方式:选择性离子检测(SIM);电子能量:70 eV。各待测成分扫描模式见表1。

表1 各待测成分扫描模式

Tab 1 Scanning mode of ingredient to be tested

待测成分	m/z	采集方式	开始时间,min	结束时间,min
甲磺酸甲酯	80	SIM	3.0	4.0
甲磺酸乙酯	79	SIM	4.0	4.8
甲磺酸异丙酯	123	SIM	4.8	6.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶液 取二氯甲烷作为空白溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品1.0 g,精密称定,加5 ml 60℃的水溶解后,加5 ml二氯甲烷提取,分离,取下层有机相滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯对照品各适量,加二氯甲烷溶解稀释制成每1 ml中各约含2 mg的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液1.0 ml,置于100 ml量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,摇匀,再精密量取125 μl,置于10 ml量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.4 定位溶液 精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯对照品各适量,分别加二氯甲烷溶解稀释制成每1 ml中约含2.5 μg的3种定位溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下空白溶液、混合对照品溶液、供试品溶液和3种定位溶液各1.0 μl,注入GC-MS仪,记录质谱,按照表1模式扫描,详见图1。由图1可见,甲磺酸甲酯保留时间为3.341 min,甲磺酸乙酯保留时间为4.329 min,甲磺酸异丙酯保留时间为4.827 min;各组分之间及与其他杂质分离完全,分离度均>2.0。

2.4 检测限与定量限考察

取“2.2.4”项下3种定位溶液适量,分别用二氯甲烷逐级稀释后,按“2.1”项下GC-MS条件进样,测定各杂质的检测限(信噪比为3:1)和定量限(信噪比为10:1)。结果,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯的检测限分别为0.002、0.001、0.002 μg/ml,定量限分别为0.006、0.004、0.006 μg/ml。

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.3”项下混合对照品贮备液0.025、0.05、0.1 ml,分别置于10 ml量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,摇匀,制得3种成分质量浓度分别均约为5、10、20 μg/ml的溶液,作为线性工作溶液(5)~(7);精密量取线性工作溶液(7)0.05、0.1、0.5、1.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,摇匀,制得3种成分质量浓度分别均约为0.1、0.2、1、2 μg/ml的溶液,作为线性工作溶液(1)~(4)。取上述线性工作溶液(1)~

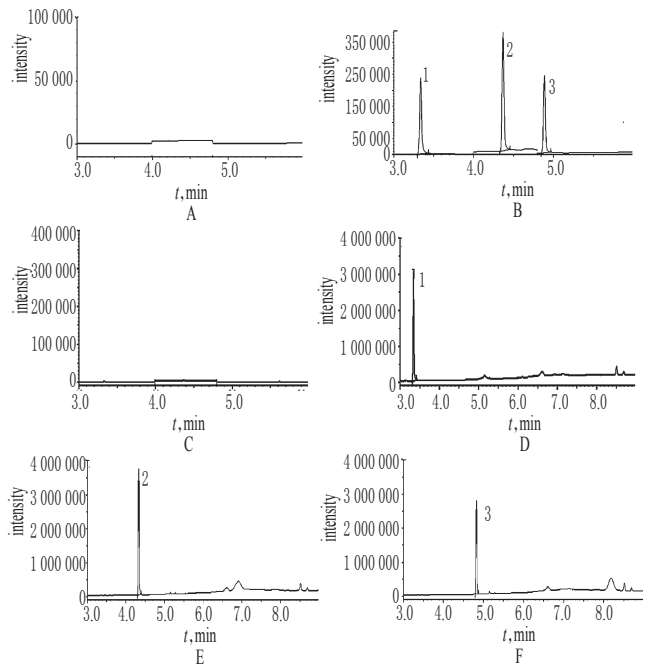


图1 气相色谱-质谱图

A.空白溶液;B.混合对照品溶液;C.供试品溶液;D.甲磺酸甲酯定位溶液;E.甲磺酸乙酯定位溶液;F.甲磺酸异丙酯定位溶液;1.甲磺酸甲酯;2.甲磺酸乙酯;3.甲磺酸异丙酯

Fig 1 GC-MS spectrogram

A.blank solution; B. mixed reference substance solution; C. test sample solution; D. targeting solution of methyl methanesulfonate; E. targeting solution of ethyl methanesulfonate; F. targeting solution of isopropyl methanesulfonate; 1.methyl methanesulfonate; 2.ethyl methanesulfonate; 3.isopropyl methanesulfonate

(7),按“2.1”项下GC-MS条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得甲磺酸甲酯的回归方程为 $y=179\ 547x-19\ 911$ ($r=0.999\ 6$),甲磺酸乙酯的回归方程为 $y=281\ 919x-30\ 234$ ($r=0.999\ 6$),甲磺酸异丙酯的回归方程为 $y=196\ 574x-22\ 377$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯检测质量浓度线性范围均为0.10~20 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.5”项下线性工作溶液(4)1.0 μl,按“2.1”项下GC-MS条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯峰面积的RSD分别为1.3%、1.3%、1.2%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.5”项下线性工作溶液(4)和“2.2.2”项下供试品溶液(批号:141001)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、14、16 h时各精密量取1.0 μl,按“2.1”项下GC-MS条件进样测定,记录峰面积。结果,线性工作溶液(4)中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯峰面积的RSD分别为1.2%、1.5%、0.9%($n=9$);供试品溶液中均未检出上述3种成分,表明上述溶液在室温放置16 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

考虑到样品中均未检出上述3种成分,将3种成分对照品按限量加入到样品中作为供试品来进行重复性试验,以供试品中各成分的加样回收率为考察指标。精密量取“2.2.3”项下混合对照品贮备液适量,加水稀释制成3种成分质量浓度均

为0.5 μg/ml的溶液。取样品(批号:141001)1.0 g,共6份,精密称定,分别置于60 ml分液漏斗中,精密加入上述经稀释后的混合对照品贮备液5.0 ml使溶解,加5 ml二氯甲烷萃取,取下层有机相滤过,取续滤液,作为加样后的供试品溶液,按“2.1”项下GC-MS条件进样测定并计算加样回收率。结果,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯加样回收率的RSD分别为1.5%、1.7%、1.5%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取“2.2.3”项下混合对照品贮备液适量,加水稀释制成3种成分质量浓度均约为2 μg/ml的溶液,备用。取样品(批号:141001)1.0 g,共9份,精密称定,分别置于60 ml分液漏斗中,精密量取上述经稀释后的混合对照品贮备液4.0、5.0、6.0 ml,各3份,分别加入分液漏斗中,使样品溶解,加5 ml二氯甲烷萃取,取下层有机相滤过,取续滤液,作为供试品溶液,按“2.1”项下GC-MS条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 2 Result of recovery test(n=9)

待测成分	样品含量, %	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
甲磺酸甲酯	0	8.18	8.57	104.8	100.9	2.8
	0	8.18	8.43	103.1		
	0	8.18	8.05	98.4		
	0	10.22	9.98	97.7		
	0	10.22	10.47	102.4		
	0	10.22	10.02	98.0		
	0	12.26	12.64	103.1		
	0	12.26	11.98	97.7		
	0	12.26	12.57	102.5		
甲磺酸乙酯	0	8.31	8.70	104.7	105.7	2.6
	0	8.31	8.61	103.6		
	0	8.31	8.88	106.9		
	0	10.39	10.65	102.5		
	0	10.39	10.79	103.9		
	0	10.39	10.92	105.1		
	0	12.47	13.81	110.7		
	0	12.47	13.54	108.6		
	0	12.47	13.15	105.5		
甲磺酸异丙酯	0	8.43	8.95	106.2	105.0	1.6
	0	8.43	9.07	107.6		
	0	8.43	8.68	103.0		
	0	10.54	10.87	103.1		
	0	10.54	11.15	105.8		
	0	10.54	11.02	104.6		
	0	12.65	13.45	106.3		
	0	12.65	13.27	104.9		
	0	12.65	13.09	103.5		

2.10 样品中遗传毒性杂质测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下GC-MS条件进样测定并计算含量。结果,3批样品中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯均未检出。

3 讨论

甲磺酸酯类物质具有明确的潜在遗传毒性,因此EMEA和美国食品与药品管理局(FDA)均要求严格控制其含量。一般的高效液相色谱(HPLC)法、GC-氢火焰离子化检测(FID)法均难以满足甲磺酸酯类物质测定的灵敏度需要,而常采用的GC-衍生化法,因为牵涉到衍生化反应,操作比较复杂,也不易

采用。采用GC-MS法,则能够满足测定所需的灵敏度、精密度、准确度,可以用于其质量控制。

本试验采用液-液萃取方法进行样品中的甲磺酸酯类物质的提取。因甲磺酸酯类物质可在水中溶解,采用水将样品溶解后,再使用二氯甲烷将样品中可能存在的甲磺酸酯类物质提取出来。通过加样回收率试验说明本方法科学、准确度高。同时,采用该提取方法能够减少直接进样时高浓度的非挥发性主成分进入色谱系统后对测定的干扰,并能减少对色谱柱的污染,保证能连续分析样品。

为了保证本方法的可靠性,在方法学验证时,笔者分别考察了进样口温度变化±5℃、离子源温度变化±5℃、接口温度变化±5℃、起始柱温变化±5℃、柱流量变化±20%时,对测定结果的影响。结果,测定结果均一致,说明本方法具有较好的耐用性,易于实现。

综上所述,本方法简便、准确、灵敏、迅速,可用于甲磺酸萘莫司他原料药中3种遗传毒性杂质的测定。

参考文献

- [1] 李博,步芬,徐光富,甲磺酸萘莫司他中有机溶剂残留的测定[J].中国医药科学,2011,1(23):41.
- [2] 陈宝泉,赵煜松,欧阳杰,等.甲磺酸萘莫司他的合成[J].中国医药工业杂志,2007,38(8):545.
- [3] 张园园,李银峰,王杰晶,等.药物中痕量磺酸酯类物质的检测技术研究进展[J].药物评价研究,2012,35(4):304.
- [4] European Medicines Agency. *Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities*[S].2006.
- [5] 史继峰.EMA《遗传毒性杂质限度指导原则》介绍[EB/OL].(2007-08-20)[2013-08-01].http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=2054.
- [6] 范达,涂家生.顶空气相色谱法测定注射用甲磺酸吉米沙星中基因毒性杂质[J].药学进展,2014(3):220.
- [7] 连小刚,李孝壁,程红艳.衍生气相色谱法测定甲磺酸伊马替尼中甲磺酸烷基酯类[J].中国医药科学,2013,3(17):128.
- [8] 张萌萌,潘红娟,陈佳,等.盐酸达泊西汀中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯及甲磺酸异丙酯的顶空毛细管GC-ECD法测定[J].中国医药工业杂志,2015,46(1):55.
- [9] 丁逸梅,吴娟,陆春晓,等.盐酸决奈达隆中甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯的GC-MS法测定[J].中国药师,2014,17(8):1274.
- [10] 刘立云,张倩如,孙连福,等.GC-MS法同时测定盐酸决奈达隆中的3种甲磺酸酯[J].中国医药工业杂志,2014,45(11):1069.
- [11] 王莉芳,郭文敏,杨汉煜,等.GC-MS法同时测定SIPI 5357甲磺酸盐中3种甲磺酸酯[J].中国新药杂志,2014,23(11):1326.
- [12] 冯慧敏,杭太俊,高新桃,等.LC-MS法同时检测甲磺酸伊马替尼中3个磺酸酯基因毒杂质[J].药物分析杂志,2014,34(12):2202.
- [13] European Medicines Agency. *European Pharmacopoeia* 8.0[S]. 2012:170-171.

(收稿日期:2015-07-17 修回日期:2016-05-10)

(编辑:周 箐)