

药品中基因毒性物质—三种甲基磺酸酯的分析

刘茜 余翀天

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

pharmacopeia, HS-GCMS, methyl sulfonate

目标

通过衍生化法完成对甲基磺酸酯的衍生，采用顶空法分析衍生产物，完成对药品中甲基磺酸酯的分析方法开发。

引言

近年来基因毒性杂质成为人们关注的焦点，甲磺酸酯、苯甲磺酸等磺酸类物质与微量的低级醇在合成反应中生成烷基磺酸如甲磺酸甲酯（MMS）、甲磺酸乙酯（EMS）、异丙基甲磺酸酯（IMS）、正丁基甲磺酸酯（NBMS），以及芳基磺酸酯如苯磺酸甲酯（MBS）、苯磺酸乙酯（EBS）、对甲苯磺酸酯（MP-TS），这些物质可与 DNA 发生烷基化反应，从而可能成为引发癌症的诱因，因此控制药物中该类杂质的毒理学关注阈值（TTC）水平非常重要，欧洲医药评价署（EMA）发布了关于基因毒性杂质的最大摄取量为 1.5 $\mu\text{g}/\text{d}$ 。这些潜在基因毒性的存在引起管理机构的高度重视，为防止奈非那韦事件的发生，EMA 首先实施详细指南控制杂质限度，美国食品和药物管理局（FDA）随后颁布指南草案，国际药品注册协调会议（ICH）也对基因毒性杂质做出限度规定，《欧洲药典》增补版 7.3 明确指出采用衍生化法检测药物中 MMS、EMS、IMS（2.5.38）。本文简要介绍了近年来磺酸酯类杂质检测方法的研究进展，探讨了不同检测方法的特点及不足；同时说明了杂质产生条件和避免该类杂质产生的具体措施，从而有效地控制杂质限度。



仪器

仪器条件见表 1。

表 1. 仪器参数设置

| | |
|-------------------------------|---|
| 仪器型号及配置 | Trace 1310-ISQ SSL 进样口 Triplus-300 顶空自动进样器 |
| 色谱柱类型尺寸、S/N 号及柱温 | TG-Wax MS, 30 m, 0.25 mm, 0.5 μm 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 200 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) P/N: 26088-2230; S/N: 1106835 |
| 检测器类型、工作参数 | ISQ: 离子源: 温度 300 $^{\circ}\text{C}$, Transfer line: 250 $^{\circ}\text{C}$ 扫描方式: SIM |
| 载气类型及流速 | 氦气, 恒流模式, 流速: 1.0 mL/min |
| 进样方式及进样体积 (如使用顶空、吹扫捕集需增加具体参数) | 顶空 炉温: 80 $^{\circ}\text{C}$, manifold: 90 $^{\circ}\text{C}$, 传输线: 110 $^{\circ}\text{C}$ 平衡时间: 20 min 压力模式: 标准 压力: 100 kpa, 进样模式: split, 分流比: 20: 1, 进样口温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 1 mL |

表 2. 分析物保留时间及定性定量离子

| 编号 | 化合物 | 衍生产物 | 保留时间 | 定量离子 | 定性离子 |
|----|---------|------|------|------|------|
| 1 | 甲基磺酸甲酯 | 碘甲烷 | 3.08 | 142 | 127 |
| 2 | 甲基磺酸乙酯 | 碘乙烷 | 4.28 | 156 | 127 |
| 3 | 甲基磺酸异丙酯 | 碘异丙烷 | 4.90 | 170 | 127 |

溶液配制

标准溶液：取本品 30 mg 溶于 10mL 甲苯溶液中，取 50 μ L 置于容量瓶中采用 80% 乙腈水溶液稀释至 25mL，做为标准储备液 A。

准确称取 60g NaI+30 mg 硫代硫酸钠溶于 50mL 水中，做为衍生化试剂 B

将 A 稀释至不同浓度的甲基磺酸酯 1mL 待用。

取以上 0.5 mL 甲基磺酸酯待用液 +0.5mL 衍生化试剂 B 于 20mL 顶空瓶中，待分析。

样品的前处理

称取某样品 50 mg，溶于 0.5 mL 80% 乙腈水溶液，加入 0.5mL NaI 溶液于顶空瓶中，待上机分析。

结果与讨论

1. 顶空条件的选择

本实验选取 80% 乙腈水溶液做溶剂，可将待分析药品完全溶解，溶剂中含大量有机溶剂因此顶空温度不易过高，同时随着样品平衡温度的升高，进入气相的有机物的量增加，从而可以提高分析的灵敏度，但当孵化温度过高时，对分析目标物碘代烷的灵敏度有影响，从而降低气相中目标化合物的相对浓度，本实验中主要考察了 40 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C 的平衡温度对灵敏度的影响，试验结果表明选择平衡温度 80 $^{\circ}$ C 时目标化合物的灵敏度最大，更适宜分析。实验中传输线温度选择 110 $^{\circ}$ C 以保证没有水气带入色谱柱，影响分析效果。

当孵化时间增长分析物在水相和气相两相中的分配系数越小，当孵化时间达到一定时间分析物在两相间达到最大的分配，此时为最佳的分析时间，本实验中考察了 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 对孵化效率的影响，实验最终结果表明，当孵化时间为 20 min 时效率最高。如下图所示为不同孵化时间下孵化效率的比较图。

2. 色谱柱的选择

参考欧洲药典 8.0 中对药品中甲基磺酸酯的分析测定方法，符合药品中基因毒性物质限量要求。本方法采用 NaI 衍生法将甲基磺酸酯衍生为碘甲烷、碘乙烷、碘异丙烷，通过顶空法进行分析测定。分析的目标化合物碘甲烷、碘乙烷、碘异丙烷为极性低沸点化合物，因此采用极性色谱柱，本方法中考察了 Tg-Wax 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm 和 Tg-Wax 30 m \times 0.5 μ m \times 0.25 mm 两种不同膜后色谱柱，实验结果发现，当选择膜厚为 0.25 μ m 的色谱柱时，由于衍生产物沸点低，在色谱柱上保留能力较小，需将初始温度降到 30 $^{\circ}$ C 低温，此时色谱峰形较差，有托尾现象。当选择 0.5 μ m 色谱柱时，色谱峰拖尾得到改善，同时出峰时间推后，可将初始温度升至 35 $^{\circ}$ C。如下图所示为两种色谱柱下分析物的色谱图。

3. 标准品色谱图及样品加标色谱

甲基磺酸酯为药物生产中的副产物，本方法选择某样品测定，发现其中含有甲基甲磺酸酯、甲基异丙基磺酸酯，某药品中无其它物质对所分析物质干扰，如图 2 为某样品及其加标色谱图。其中下图为样品加标色谱图。

4. 线性、检出限及 RSD

配制浓度分别为：1.0、5.0、15.0、75.0、150 μ g/L 的校准溶液，采用上述方法分别进样分析，考察各组分在 1.0-150 μ g/L 浓度范围内的线性。实验结果表明 3 种组分在 1.0-150 μ g/L 线性关系良好，线性相关系数均大于 0.999（见表 3）。

对某样品添加混合标准溶液（加标浓度为 0.02 μ g/g、1.5 μ g/g），考察三种甲基磺酸酯的加标回收情况。实验结果表明各组分的加标回收率均在 85.0-103% 之间，符合日常分析检测的要求。对 0.02、1.5 μ g/g 加标水平平行测定 6 次，平均 RSD 值在 5.2-7.3%，符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算各组分检出限，各组分仪器检出限在 0.2-1.0 μ g/L（见表 3）。

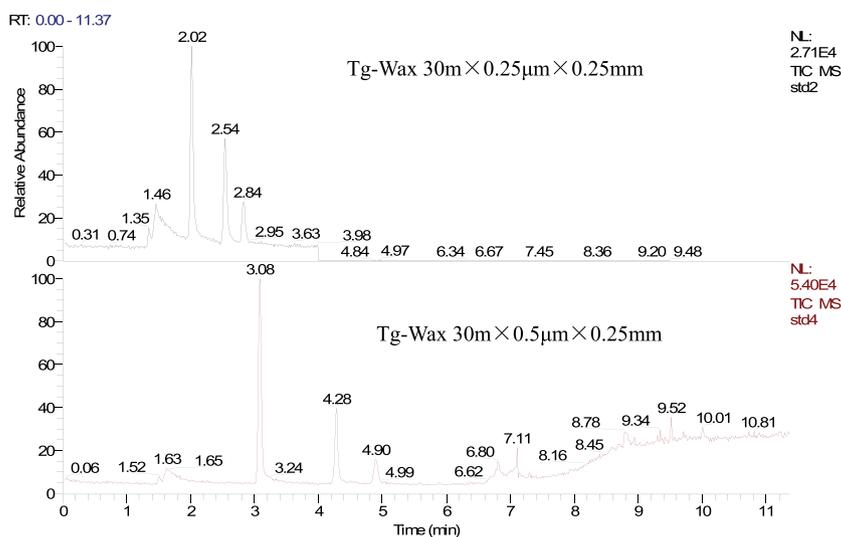


图 1. 15 µg/L 甲基磺酸酯衍生后在不同膜厚 Wax 色谱柱上的分离情况

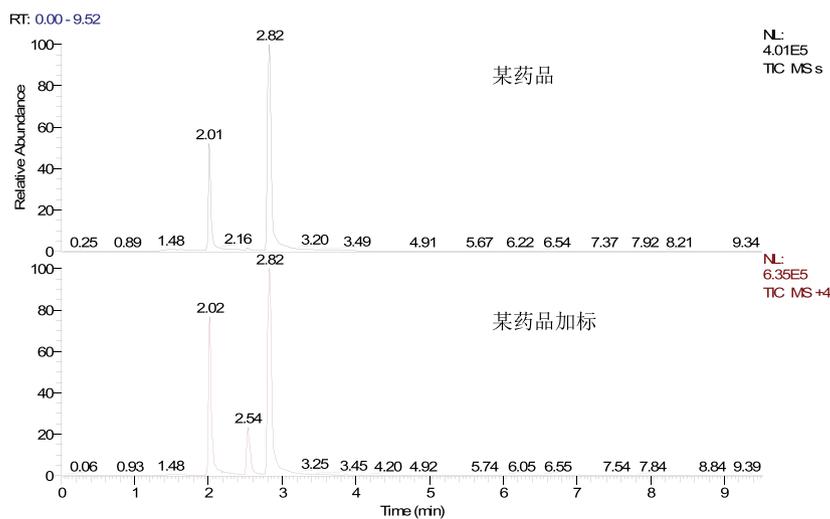


图 2. 图为加标 1.5 µg/g 浓度样品加标、样品色谱图，其中 2.01 为甲基磺酸甲酯，2.54 为甲基磺酸乙酯，2.82 为甲基磺酸异丙酯

表 3. 线性、检出限及 RSD 数据 (n=3)

| 化合物 | 线性方程 | R ² / %0.02 | 加标 (µg/g) 回收率 / % | | 仪器检出限 / µg/L | 方法检出限 / µg/kg | RSD / % |
|---------|------------------------|---------------------------|-------------------|------|-----------------|------------------|------------|
| | | | 0.02 | 1.5 | | | |
| 甲基磺酸甲酯 | Y=-498.061+12708.8 × X | 1.0000 | 90.5 | 89.4 | 0.2 | 4.0 | 6.5 |
| 甲基磺酸乙酯 | Y=-17393.3+11006 × X | 0.9999 | 92.5 | 103 | 0.5 | 10.0 | 5.2 |
| 甲基磺酸异丙酯 | Y=-9775.06+4757.16 × X | 0.9999 | 85.0 | 93.0 | 1.0 | 5.0 | 7.3 |

总结

本实验采用赛默飞世尔科技 Triplus 300 顶空自动进样器结合 1300GC 配 ISQ 质谱检测器分析药品中的 3 种基因毒性物质——甲基磺酸酯，样品通过衍生法采用顶空进样方式，方法准确，灵敏度高，满足检测要求。

参考文献

- [1] 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 药物评价研究, 2012,35 (4): 304-208.
- [2] Graham E.Taylor, Mark Gosling, Andrea Pearce Low level determination of p-toluensulfonate and benzenesulfonate esters in drug substance by high performance liquid chromatography/mass spectrometry. 2006, (1119):231-237
- [3] Roberto Alzaga , Robert W. Ryanb. A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace-gas chromatography-mass spectrometry . 2007, (45):472-479
- [4] European Pharmacopoeia 8.0.2.5.38, MMS,EMS and IMS in active substances

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
S C I E N T I F I C