

REFERENCES

- [1] ZHOU L M, ZENG S H, CHEN Y. Discussion on determination of anisidine value in fat emulsion injection [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(2): 185-188.
- [2] LI L B, WANG H Y, MA L, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on lysophosphatidylcholine-induced ventricular arrhythmias in rats [J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2011, 31(4): 578-581.
- [3] SONG D J, PAN J Q, LI P X, et al. Research progress of lysophosphatidylcholines for liver diseases [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2014, 30(12): 1646-1650.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Publicity of National Standard about Fat Emulsion Injection(C 14~24) [EB/OL] [2015-7-8]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080814e238d59014e6b3611c9206f?a=BZHXY>.
- [5] CHEN Y F, LU M, ZHANG B. Stability of etomidate fat emulsion injection [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2005, 36(5): 275-276.

收稿日期: 2016-01-30

LC-MS/MS 测定草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的含量

梁键谋¹, 傅聪², 陈悦¹ (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.宁波医药高等专科学校, 宁波 317503)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 测定草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的含量。方法 采用 Zorbax Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 采用 Ultimate 3000 HPLC-AB Science 4000 QTrap 三重四极杆串联离子阱液质联用仪和多反应离子监测模式二级质谱 MS/MS(ESI 源)检测, 正离子模式采集数据。结果 基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯均在 5~100 ng 内与峰面积呈良好的线性关系, 线性方程分别为 $y=1.19\times10^4x-140$ ($r=0.999\ 5$) 和 $y=1.27\times10^3x-156$ ($r=0.999\ 4$), 检测限分别为 1 ng 和 2 ng, 定量限分别为 2 ng 和 4 ng, 平均回收率分别为 99.0%和 101.0%; RSD 分别为 3.5%和 4.7%($n=9$)。结论 方法简便准确, 可用于草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的检测。

关键词: 草酸右旋西酞普兰; 对甲苯磺酸乙酯; 对甲苯磺酸异丙酯; 基因毒性; 液质联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1436-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.019

Determination of Genotoxic Impurities in Escitalopram Oxalate by LC-MS/MS

LIANG Jianmou¹, FU Cong², CHEN Yue¹ (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 317503, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS analytical method for the determination of genotoxic impurities in escitalopram oxalate. **METHODS** The method was achieved on a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) utilizing a mobile phase of 20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate(A)-acetonitrile(B) with gradient elution at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The temperature of column was set at 35 °C. The Ultimate 3000 HPLC-AB Science 4000 QTrap Tripling Four bar LC-MS was used to detect ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate(ESI source, in Multiple Reaction Monitoring positive mode). **RESULTS** Standard curve was linear in the range of 5–100 ng($r=0.999\ 9$). The limit of quantification of ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate were separately 1 ng and 2 ng. The limit of detection were 2 ng and 4 ng, respectively. The average recovery of ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate were 99.0% and 101.0%, RSD were 3.5% and 4.7%($n=9$). **CONCLUSION** The method is convenient and sensitive for the determination of genotoxic impurities in escitalopram oxalate.

KEY WORDS: escitalopram oxalate; ethyl p-toluenesulfonate; isopropyl p-toluenesulfonate; genotoxic impurities; LC-MS

作者简介: 梁键谋, 男, 硕士, 主管药师

Tel: (0571)87180340

E-mail: dashi1982530@163.com

基因毒性杂质(或遗传毒性杂质, genotoxic impurity, GTI)是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA, 产生基因突变或体内诱变, 具有致癌可能或者倾向^[1]。

基因毒性物质的特点是在很低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤, 进而导致基因突变并可能促使肿瘤的发生。因其毒性较强, 对用药的安全性产生了极大的威胁, 2005 年发生了甲磺酸萘非维拉事件, 为防范此类事件再度发生, 随后欧盟药监局(EMA)对磺酸酯类物质的限度进行了严格的控制。且近年来各国的法规机构如人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)、FDA、EMA 等均对基因毒性杂质有了更明确的要求, 越来越多的药企在新药研发过程中就着重关注基因毒性杂质的控制和检测。

草酸右旋西酞普兰为目前世界一线抗抑郁药物, 广泛应用于临床, 但其工艺中使用了对甲苯磺酰氯及小分子醇类溶剂, 如工艺中未能除尽, 则这些潜在的遗传毒性杂质可能会对人体健康造成不可估量的损害, 故应对右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类杂质进行残留量测定, 并制订合适的限度。本研究建立了草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸乙酯及对甲苯磺酸异丙酯的残留量测定方法, 并进行了相应方法学研究, 认为可作为本品中对甲苯磺酸酯类潜在基因毒性杂质的定量检测方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000-4000 QTrap 液相色谱-三重四极杆线性离子阱质谱联用仪, 由 Ultimate 3000 高效液相色谱系统(美国戴安公司)、4000QTrap 质谱仪(美国 AB 公司)及其工作站组成。液相部分包括真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器和变色龙色谱工作站; 质谱部分为三重四极杆线性离子阱质谱仪, 带 APCI-ESI 源。质谱工作站版本为 Analyst 1.5.1。BP211D 电子天平(德国 Sartorius)。

1.2 试剂

草酸右旋西酞普兰(批号: 141001, 140901 和 141002, 规格: 每袋 10 g, 浙江奥托康制药集团股份有限公司); 对甲苯磺酸乙酯对照品(批号: ATYDH-SR, 含量: 98.0%)和对甲苯磺酸异丙酯

对照品(批号: LB90085, 含量: 90.0%)均由浙江奥托康制药集团股份有限公司提供。

对照品储备溶液: 分别精密称取对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯对照品 20.41, 22.23 mg, 置 200 mL 量瓶中, 加 80%甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀作为对照品储备溶液。

2 方法与结果

2.1 液相色谱、质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测波长为 254 nm; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 进样体积为 20 μL; 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液-乙腈(A : B), 梯度洗脱程序如下: 0 min(90 : 10)→2 min(50 : 50)→4 min(40 : 60)→7 min(10 : 90)→12 min(10 : 90)→15 min(90 : 10)→20 min(90 : 10)。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式采集; 多反应离子监测模式(MRM)^[2-3], 定量离子对 201.0/173.1(对甲苯磺酸乙酯), 232.0/173.1(对甲苯磺酸异丙酯); 干燥气温度为 450 °C; 干燥气流速为 14.00 psi; 雾化电压为 5 500 V; 传输电压为 85 V; 碎裂电压为 15 V; 扫描范围为 *m/z* 100~500。

2.2 定性研究和定量离子对的确定

取“1.2”项下对照品储备溶液 10 mL, 加入样品(批号: 141001)约 2 mg, 振摇使溶解, 摇匀, 制成系统适用性试验溶液, 依法测定, 结果显示草酸右旋西酞普兰与对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯分离度良好。结果见图 1。

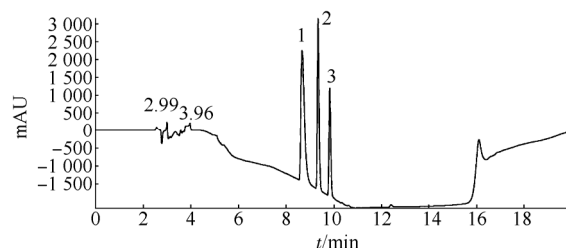


图 1 系统适用性试验图谱

1-草酸右旋西酞普兰; 2-对甲苯磺酸乙酯; 3-对甲苯磺酸异丙酯。

Fig. 1 Chromatogram of system suitability solution

1-escitalopram oxalate; 2-ethyl *p*-toluenesulfonate; 3-isopropyl *p*-toluenesulfonate.

取草酸右旋西酞普兰样品(批号: 141001)约 20 mg, 精密称定, 加 80%甲醇制成浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 的溶液, 并取“1.2”项下对照品储备溶液, 分别进质谱仪测定。图谱见图 2~3, 定性表见表 1。

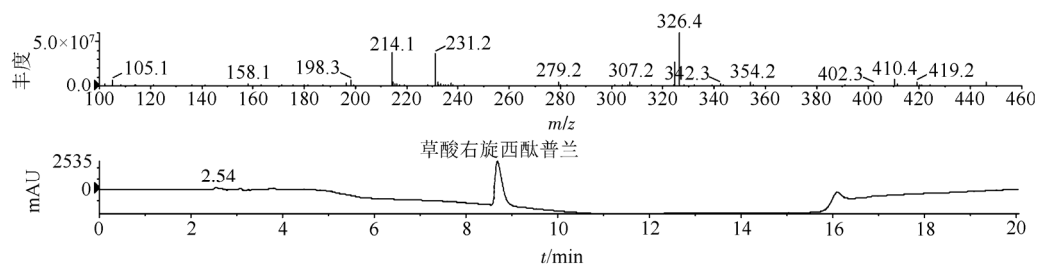


图2 草酸右旋西酞普兰定性质谱图和色谱图

Fig. 2 The MS chromatogram and UV chromatogram of escitalopram oxalate

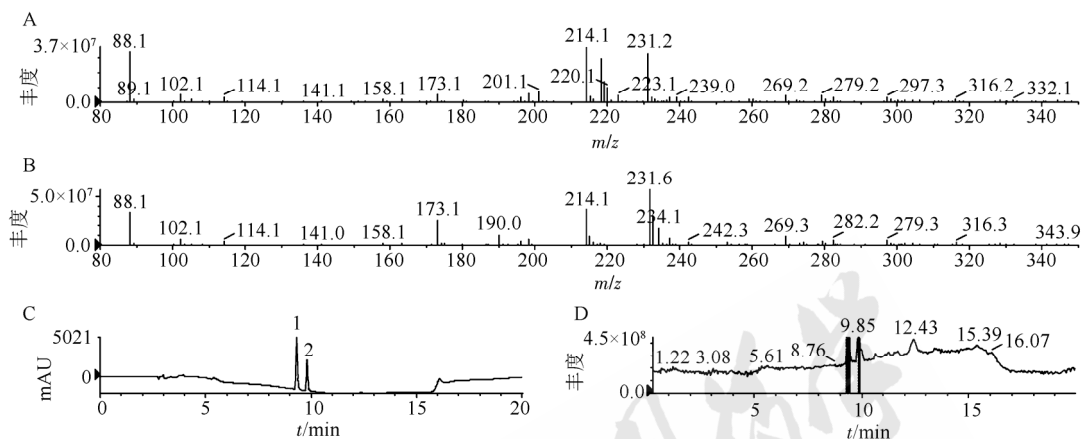


图3 对照品储备溶液定性质谱图和色谱图

A-对甲苯磺酸乙酯质谱图；B-对甲苯磺酸异丙酯质谱图；C-对照品储备溶液色谱图；D-对照品储备溶液质谱图；1-对甲苯磺酸乙酯；2-对甲苯磺酸异丙酯。

Fig. 3 The MS chromatogram and UV chromatogram of reference solution

A-MS chromatogram of ethyl *p*-toluenesulfonate; B-MS chromatogram of isopropyl *p*-toluenesulfonate; C-UV chromatogram of reference solution; D-MS chromatogram of reference solution; 1-ethyl *p*-toluenesulfonate; 2-isopropyl *p*-toluenesulfonate.

表1 草酸右旋西酞普兰样品及对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸异丙酯定性表

Tab. 1 The Qualitative form of escitalopram oxalate, ethyl *p*-toluenesulfonate and isopropyl *p*-toluenesulfonate

名称	结构式	分子量	保留时间/min	MS 碎片峰
草酸右旋西酞普兰		414.43	8.67	326.4[M-C ₂ O ₄ H ₂ +H] ⁺
对甲苯磺酸乙酯		200.25	9.34	201.1[M+H] ⁺ , 173.1[M-C ₂ H ₅ +H] ⁺
对甲苯磺酸异丙酯		214.28	9.83	214.1(分子离子), 231.6[M+H ₂ O] ⁺ , 173.1[M-C ₃ H ₇ +H] ⁺

根据一级质谱的结果和软件的 TUNE 模式下优化, 分别选定离子对 201.0/173.1 和 232.0/173.1

作为对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯的定量离子对。图谱见图 4。

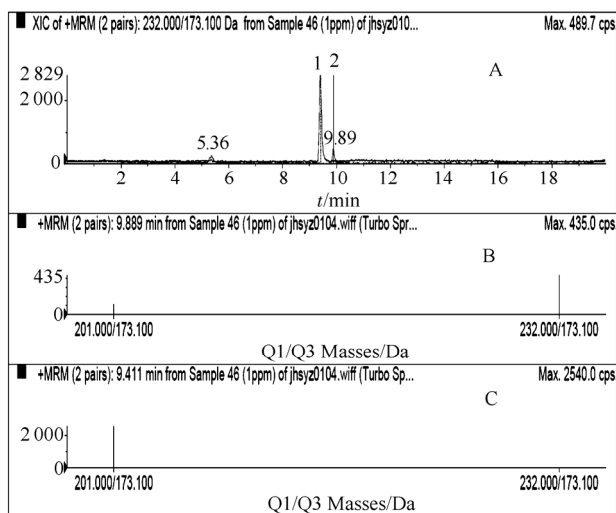


图4 对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯的质谱和色谱图 A-色谱图; B-对甲苯磺酸异丙酯(232.0/173.1); C-对甲苯磺酸乙酯(201.0/173.1); 1-对甲苯磺酸乙酯; 2-对甲苯磺酸异丙酯; 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 4 The MS chromatogram and UV chromatogram of ethyl *p*-toluenesulfonate and isopropyl *p*-toluenesulfonate reference solution

A-UV chromatogram; B-isopropyl *p*-toluenesulfonate(232.0/173.1); C-ethyl *p*-toluenesulfonate(201.0/173.1); 1-ethyl *p*-toluenesulfonate; 2-isopropyl *p*-toluenesulfonate; concentration: $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 线性关系

精密量取“1.2”项下对照品储备溶液适量,加 80%甲醇稀释制成浓度分别为 5, 2, 1, 0.5, $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,进样测试,得线性方程 $y = 1.19 \times 10^4 x - 140 (r = 0.9995)$ (对甲苯磺酸乙酯); $y = 1.27 \times 10^3 x - 156 (r = 0.9994)$ (对甲苯磺酸异丙酯)。对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯在 5~100 ng 内线性关系良好。

2.4 回收率试验

分别取草酸右旋西酞普兰(批号: 141001),精密称定 2.0 g,置 100 mL 量瓶中,依次加入“1.2”项下对照品贮备溶液 0.025, 0.05, 0.1 mL 各 3 份,用 80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成低、中、高浓度的溶液^[4-5]。依法测定,计算平均回收率,对甲苯磺酸乙酯的平均回收率为 99.0%, RSD 为 3.5%($n=9$);对甲苯磺酸异丙酯的平均回收率为 101.0%, RSD 为 4.7%($n=9$)。

2.5 检测限和定量限

从“1.2”项下对照品储备溶液中分别精密量取适量,加 80%甲醇溶液稀释制成浓度分别为 0.2, 0.1, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,进样测试,得对甲苯磺酸乙酯的 LOD 为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 即 $1.0 \text{ ng} (S/N=9.4)$, LOQ 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 即 $2.0 \text{ ng} (S/N=14.4)$ 。对甲苯

磺酸异丙酯的 LOD 为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 即 $2.0 \text{ ng} (S/N=4.1)$, LOQ 为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 即 $4.0 \text{ ng} (S/N=12.1)$ 。

2.6 样品测定

分别取草酸右旋西酞普兰 3 批(批号: 141001、140901、141002)样品各约 200 mg,加 80%甲醇溶液制成每 1 mL 约含 20 mg 的溶液,依法测定,以外标法计算,结果 3 批草酸右旋西酞普兰中均未检出对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯。并对空白溶剂进行了测定,结果空白溶剂无干扰。

3 讨论

本实验对草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯的残留量进行了测定,结果 3 批草酸右旋西酞普兰中均未检出,说明企业的工艺良好,起始物料反应完全,可排除潜在基因毒性物质的危害。

最初 ICH 推出的原料药杂质研究指导原则 Q3A(R2)和制剂杂质研究指导原则 Q3B(R2)中提及“对于能够产生强的药理活性或毒性的潜在杂质,使其含量低于 0.1%”。而在 EMA 推出的《遗传毒性杂质限度指导原则》中引入了可接受风险的摄入量,即毒性物质限量,或称毒理学关注门槛(threshold of toxicological concern, TTC)。设置了限度值 $\text{TTC}(1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1})$,即相当于每天摄入 $1.5 \mu\text{g}$ 的基因毒性杂质,被认为对于大多数药品来说是可以接受的风险^[6-9](一生中致癌的风险小于十万分之一)。

因此虽然在 3 批次样品中均未检出,但是为了良好的工艺控制,在建立的检测方法基础上,结合 EMA 的《遗传毒性杂质限度指导原则》,制定了本实验中草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类杂质的限度,即 $0.15 \mu\text{g} \cdot (300 \text{ mg})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (300 mg 为该药品单日最大口服剂量)。这个限度值仅为官方指导原则限度的十分之一,故可良好的控制药品的工艺并排除潜在基因毒性物质的危害。

REFERENCES

- [1] WANG P, XU C H, CHEN Y Q. Development of genotoxic impurities control in active pharmaceutical ingredient [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 119-125.
- [2] SONG D M, XU Q Y, DUAN G L. HPLC-QTOF MS determination of ethyl *p*-toluenesulfonate in enalapril maleate and its intermediate [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(5): 834-837.
- [3] SUN P. Determination of ethyl *p*-toluenesulfonate in Citalopram Hydrobromide by HPLC [J]. J Pharm Res(药学研究), 2015, (34)11: 637-639.

- [4] 孟涛, 唐奎山, 周秀峰. 齐多夫定中对甲苯磺酸甲酯检测方法的研究[J]. 辽宁医药, 2007, 22(2): 24-25.
- [5] LIU J H, ZHONG Y N, HE G T. LC-MS determination of genotoxic impurities in imatinib mesylate [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(7): 1168-1170.
- [6] ICH. Guideline: Impurities in New Drug Substances Q3 A (R2) [EB/OL]. (2006-10-25).
- [7] ICH. Guideline: Impurities in New Drug Products Q3B (R2) [EB/OL]. (2006-10-25).
- [8] CHMP. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [EB/OL]. (2006-06-28).
- [9] CDER. Guidance for Industry Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches [EB/OL]. (2008-10).

收稿日期: 2016-02-22

原子荧光法测定苄达赖氨酸滴眼剂中抑菌剂硫柳汞的含量

陈超, 程磊, 洪利娅, 俞辉* (浙江省食品药品检验研究院, 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 杭州 310051)

摘要: 目的 建立苄达赖氨酸滴眼剂中抑菌剂硫柳汞的原子荧光光谱含量测定方法。方法 采用微波消解系统消解样品后, 用双道原子荧光光谱仪测定苄达赖氨酸滴眼剂中硫柳汞的含量。结果 3家企业样品的平均含量分别为 0.001%, 0.030%和 0.001%, 方法检出限为 $0.0134\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性范围为 $0.4\sim 2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性回归方程相关系数为 0.999 3, 平均回收率为 99.2%。结论 采用本法测定滴眼剂中硫柳汞的含量灵敏准确, 专属性强, 干扰少, 对于控制滴眼剂中硫柳汞含量有实际意义。

关键词: 原子荧光分光光谱法; 苄达赖氨酸滴眼剂; 抑菌剂; 硫柳汞

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1440-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.020

Determination of the Content of the Merthiolate in the Bendazac Lysine Eye Drops by Atomic Fluorescence Spectrometry

CHEN Chao, CHENG Lei, HONG Liya, YU Hui* (Zhejiang Insititute for Food and Drug Control, Key laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Provincial 2014E10006, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an atomic fluorescence spectrometry method for the determination of the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops. **METHODS** Determination of the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops by dual channel atomic fluorescence spectrometry after digestion of samples with microwave digestion system. **RESULTS** The average content of the sample of 3 enterprises was 0.001%, 0.030%, and 0.001%, respectively, the detection limit was $0.0134\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the linear range was $0.4\sim 2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the correlation coefficient was 0.999 3, and the average recovery was 99.2%. **CONCLUSION** Using this method to determine the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops is sensitive and accurate, with strong specificity and little interference. It is of practical significance for the control of the content of merthiolate in the eye drops.

KEY WORDS: atomic fluorescence spectrometry; bendazac lysine eye drops; bacteriostatic agent; merthiolate

硫柳汞是一种广泛应用于眼科制剂和生物疫苗的有机汞类抑菌剂^[1], 硫柳汞又名乙基汞硫代水杨酸钠, 代谢或降解产物为乙基汞和硫代水杨酸盐。硫柳汞对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有很强的抑菌能力, 为广谱抑菌剂。其作用机制为汞离子与菌体中酶蛋白的-SH(巯基)结合而使酶失去活性, 但对细菌抗原和血清蛋白没有^[2]。但硫柳

汞可引起明显的点状角膜上皮损伤、可使隐形眼镜变色。有机汞类抑菌剂存在一定的眼表毒性, 是引起角膜毒性的一个重要原因^[3-4], 并且在体内具有蓄积性。在筛选抑菌剂用量时应尽量采用抑菌剂的最低有效浓度, 保证药品在使用过程及有效期内符合卫生学要求, 同时最大限度地降低抑菌剂对眼睛的刺激和损害。至今美国药典、欧洲

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 陈超, 男, 高级工程师 Tel: (0571)86456586 E-mail: chenchao@zjyj.org.cn

*通信作者: 俞辉, 男, 硕士, 主任药师 Tel:

(0571)87180328 E-mail: ybc@zjyj.org.cn