

离子色谱法测定氟达拉滨中三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质

李丹^{1,3}, 王淑君^{1*}, 姚慧敏², 姜玮伦², 于海伟³, 徐莹³(1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.通化师范学院制药与食品科学学院, 吉林 通化 134002; 3.沈阳鑫泰格尔医药科技开发有限公司, 沈阳 110016)

摘要: 目的 采用离子色谱法对氟达拉滨中的三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质进行测定。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 洗脱液: [0.15 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵-0.090 mmol·L⁻¹ 苹果酸(pH 6.5)]-乙腈(70:30), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 检测方式为直接电导检测。结果 有效测定了氟达拉滨中的三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质, 检测限为 2.5 µg·mL⁻¹, 定量限为 7.4 µg·mL⁻¹, 线性范围为 1.917~22.344 mg·L⁻¹, $r=0.997\ 4$, 方法耐用性好。结论 本法可有效检测氟达拉滨中的三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质, 方法灵敏度高, 准确度高, 耐用性好。

关键词: 离子色谱法; 三氟甲磺酸酯类; 遗传毒性杂质; 氟达拉滨

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)20-2557-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.014

引用本文: 李丹, 王淑君, 姚慧敏, 等. 离子色谱法测定氟达拉滨中三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2557-2560.

Determination of Genetic Toxic Impurities of Trifluoromethanesulfonate in Fludarabine by Ion Chromatography

LI Dan^{1,3}, WANG Shujun^{1*}, YAO Huimin², JIANG Weilun², YU Haiwei³, XU Ying³(1.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2.School of Pharmaceutical and Food Sciences, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China; 3.Shenyang Xintaige Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the genotoxic impurities of trifluoromethanesulfonate fludarabine by ion chromatography. **METHODS** The method was achieved on a C₁₈ column utilizing an eluent of [0.15 mmol·L⁻¹ tetrabutylammonium hydroxide-0.090 mmol·L⁻¹ malic acid (pH 6.5)]-acetonitrile (70:30) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 35 °C, the detection method was direct conductivity detection. **RESULTS** This method could effectively determine the trifluoromethanesulfonate genotoxic impurities in fludarabine. The detection limit was 2.5 µg·mL⁻¹ and the limit of quantification was 7.4 µg·mL⁻¹, the linear range was 1.917~22.344 mg·L⁻¹, $r=0.997\ 4$. The method had good durability. **CONCLUSION** This method can effectively detect the genotoxic impurities of mesylate analogues. The method has high sensitivity, high accuracy and good durability.

KEYWORDS: ion chromatography; trifluoromethanesulfonate; genotoxic impurities; fludarabine

遗传毒性杂质(也称“致突变杂质”)极微量即能诱导基因突变, 控制其含量对药品的安全至关重要。欧盟、美国药品监管机构相继发布了遗传毒性和致癌性杂质的指导原则^[1], ICH 也针对遗传毒性杂质制定 M7 指导原则^[2]。对于遗传毒性杂质的检测在药品研究中的重要性日益显著。

烷基或苯基磺酸酯是遗传毒性警示杂质的一类, 大部分烷基或苯基磺酸酯类(例如, 对甲苯磺酸甲酯^[3]、对甲苯磺酸乙酯^[4-5]等)有紫外吸收官能团, 可以通过 HPLC-紫外检测器直接测定; 少数不含紫外吸收的化合物, 可以采用柱前衍生^[6-9],

与碘离子通过亲核取代反应衍生成碘代烷, 气相色谱法测定。气相色谱法检测采用的检测器通常为电子捕获检测器(electron capture detector, ECD)或者质谱检测器(mass spectrometer, MS), 通常的氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)检测的灵敏度低^[10], 仅适用于分析溶解性好或是甲磺酸酯限度含量较高的原料药(active pharmaceutical ingredients, APIs), 对于大部分 APIs 不适用; ECD 或 MS 的灵敏度高, 低浓度的供试品溶液即可满足测定要求, 因此适用范围更广, 缺点是 ECD 或者 MS 的普及率不高。此外, APIs

作者简介: 李丹, 女, 硕士生, 工程师 Tel: 13897947133
博导 Tel: (024)43520518 E-mail: xiaohu6408_cn@sina.com

E-mail: zzythab001@163.com

*通信作者: 王淑君, 女, 博士, 教授,

活泼性高的物质,更容易与碘离子发生反应,或者酸性极强的磺酸酯类(例如,三氟甲磺酸酯类)则不适合这种方法检测。

对于无法通过气相色谱法检测的磺酸酯类,可以通过甲磺酸酯在碱性条件下水解,生成甲磺酸钠,采用离子色谱法进行检测^[11],但相关报道较少,阴离子交换色谱柱的价格昂贵,采用常规的 C₁₈ 色谱柱实现三氟甲磺酸酯类的检测通用性强,适合多数 APIs,且适合可能含有多种构型的磺酸酯类,易于实现,操作性强。本实验以三氟甲磺酸酯类为例,选择氟达拉滨为模型药物对三氟甲磺酸酯类进行研究,以离子形态的三氟甲磺酸根为检测对象,控制药品中三氟甲磺酸酯类遗传毒性杂质的含量。

1 仪器与试剂

ICS-600 型离子色谱仪(美国 Thermo Scientific),色谱柱为 C₁₈ 键合硅胶柱;KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);EX1250ZH 电子天平(分度值 0.000 01 g,奥豪斯仪器)。

三氟甲磺酸钠对照品(北京百灵威科技有限公司,批号:LN90P75;纯度:98.0%);氟达拉滨(新乡市天丰精细化工有限公司,批号:20161102,20180502);乙腈为色谱纯,苹果酸和 10%的四丁基氢氧化铵为分析纯;水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,洗脱液:[0.15 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵-0.090 mmol·L⁻¹ 苹果酸 (pH6.5)]-乙腈 (70 : 30),流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 35 °C,检测方式为直接电导检测,进样量 20 μL。

2.2 对照品储备液的配制

精密称取三氟甲磺酸钠适量,用水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含三氟甲磺酸钠 150 μg 的溶液,作为对照品储备液。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取三氟甲磺酸钠适量,用水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含三氟甲磺酸钠 15 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

精密称取氟达拉滨约 0.5 g 于 10 mL 具塞试管中,加入 1.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL,室温放置 0.5 h,加入 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL,中和后

转移至 10 mL 量瓶中,加水稀释并定容,作为供试品溶液。

2.5 空白溶液的配制

以水为空白溶剂。

2.6 碱空白溶液的配制

取 1 mL 1.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液,室温破坏 0.5 h 后,加 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸 1 mL 中和剩余碱,加水稀释并定容至刻度,作为碱空白溶液。

3 结果

3.1 专属性

分别按“2.3”“2.4”“2.5”“2.6”项下方法配制各溶液,精密量取各溶液 20 μL,分别注入离子色谱仪,按“2.1”项下方法检测,记录色谱图,结果见图 1。空白溶剂、碱空白和氟达拉滨供试品均不干扰三氟甲磺酸钠的测定。

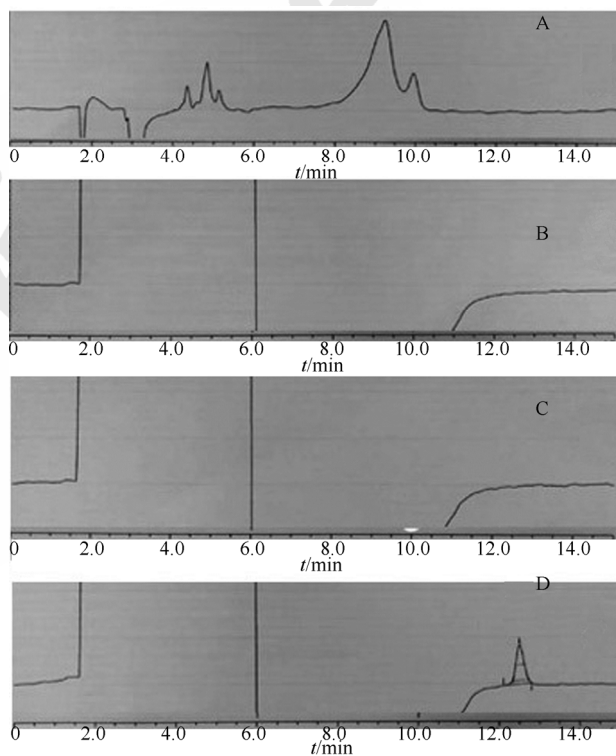


图 1 离子色谱图

A-空白溶剂; B-碱空白溶液; C-供试品溶液; D-对照品溶液。

Fig. 1 Ion chromatograms

A-blank solvent; B-alkali blank solution; C-sample solution; D-standard solution.

3.2 仪器精密度

精密量取对照品溶液 20 μL,连续进样 6 针,考察主峰的保留时间、峰面积、理论板数。结果保留时间 RSD 为 0.26%,峰面积 RSD 为 0.52%,平均理论板数为 19 042,表明该色谱系统适用于本品中三氟甲磺酸钠的测定,仪器精密度良好。

3.3 定量限与检测限

采用逐步稀释法测定定量限($S/N=10$)和检测限($S/N=3$), 结果表明三氟甲磺酸钠的定量限为 $7.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相当于被测药物的 0.015%, 检测限为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相当于被测药物的 0.005%。

3.4 线性范围

精密量取对照品储备液 0.8, 0.9, 1.0, 1.2 和 1.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。取上述溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样分析, 以峰面积(A)为纵坐标, 以质量浓度(C , $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标作线性回归。结果三氟甲磺酸钠在 $1.917\sim 22.344 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好, 线性方程为 $A=0.0019C-0.0003$, 相关系数 $r=0.9974$ 。

3.5 加样回收率

精密称取氟达拉滨约 0.5 g, 共 7 份, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 加入 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 0.5 h, 加入 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL, 中和后转移至 10 mL 量瓶中, 取 6 份分别加入三氟甲磺酸钠对照品储备液 1.0 mL, 另一份不加三氟甲磺酸钠对照品, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。取上述溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样分析, 取“2.3”项下对照品溶液同法测定, 用外标法计算三氟甲磺酸钠的含量, 扣除本底含量后计算回收率, 结果见表 1。由表 1 可知, 三氟甲磺酸钠平均回收率为 92.0%, RSD 为 2.5%, 平均回收率为 90%~108%, $\text{RSD}\leq 10\%$, 表明方法回收率良好。

表 1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test($n=6$)

加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
14.896 0	13.296 1	89.26	92.0	2.5
14.896 0	13.958 1	93.70		
14.896 0	14.068 4	94.44		
14.896 0	13.461 6	90.37		
14.896 0	13.461 6	90.37		
14.896 0	14.013 3	94.07		

3.6 耐用性

分别在(柱温 ± 5) $^{\circ}\text{C}$, (流速 ± 0.2) $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\text{pH}\pm 0.2$, 有机相比比例 $\pm 5\%$ 范围内考察微小色谱系统参数变化对于各物质分离的影响。结果表明,

在柱温 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.8\sim 1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pH 值 $6.3\sim 6.7$, 有机相比比例 $25\%\sim 35\%$ 内时, 各物质的分离度满足要求, 方法耐用性良好。

3.7 样品三氟甲磺酸酯类含量检测

取氟达拉滨(批号: 20161102, 20180502), 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进样分析, 按外标法计算三氟甲磺酸酯类的含量。结果 2 批氟达拉滨中均未检测出三氟甲磺酸钠, 表明氟达拉滨样品中不含有三氟甲磺酸酯类似物。

4 讨论

氟达拉滨的合成工艺路线中使用三氟甲磺酸酐, 得到三氟甲磺酸酯类似物中间体。根据 ICH M7 “遗传毒性杂质”的指导原则, 磺酸酯为遗传毒性的警示结构, 属于潜在的遗传毒性物质, 因此对三氟甲磺酸酯类杂质的检测方法的开发尤为重要。

本研究中检测对象为离子形态的三氟甲磺酸根, 因在原料药可能存在的三氟甲磺酸酯的形式多, 不易确定对照品, 三氟甲磺酸酯易被碱解为三氟甲磺酸钠, 故以三氟甲磺酸钠为对照品可以用于三氟甲磺酸酯的定量检测。

本研究三氟甲磺酸酯类物质的限度的制定, 是基于 ICH M7 中推荐的毒理学关注阈值(threshold toxicology concern, TTC)计算的。基于 TTC 原理, 日摄入量与治疗时段有关, 磷酸氟达拉滨的治疗时段属于 >1 月~12 月, 日摄入量限量为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$, 根据磷酸氟达拉滨的用法用量及规格可知, 本品规格为 10 mg, 最大日剂量约为 70 mg, 即每日最大用量为 7 片(根据磷酸氟达拉滨片福达华的说明书, 推荐剂量为每日口服, 磷酸氟达拉滨 $40 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 体表面积, 而身高 165 cm, 体质量 55 kg 的成人的体表面积为 1.576 m^2 , 计算出限度为 0.03%。

三氟甲磺酸钠没有紫外吸收, 采用离子对试剂四丁基氢氧化铵, 电导检测器可以有效的检出三氟甲磺酸钠, 进而测定三氟甲磺酸酯类似物, 采用 C_{18} 色谱柱较采用阴离子交换柱-电导检测器的方便、廉价, 易于操作。

REFERENCES

- [1] WANG R R. Introduction to regulations for genotoxic impurities in API registration [J]. Shanghai Med Pharm J(上海

- 医药), 2016, 37(15): 63-67.
- [2] ZHANG H M, LIN J Q, FENG K B, et al. Evaluation and control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(9): 1160-1166.
- [3] ZHANG W, CHEN Y H, ZHENG F. Determination of methyl p-toluenesulfonate and ethyl p-toluenesulfonate in vinpocetine by LC-MS/MS [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46(12): 1334-1336.
- [4] 宋冬梅, 徐倩昱, 任美婷, 等. HPLC-QTOF MS 法测定马来酸依那普利及中间体中的对甲苯磺酸乙酯[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 834-837.
- [5] 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.
- [6] LIU L Y, ZHANG Q R, SUN L F, et al. Simultaneous determination of three kinds of methanesulfonates in dronedarone hydrochloride by GC-MS [J]. China Pharm(中国药师), 2014, 17(8): 1274-1276.
- [7] JI Z Z, YE X J. Determination of residual solvents in esomeprazole magnesium by headspace gas chromatography [J]. Pharm Today(今日药理学), 2017, 27(7): 466-468, 474.
- [8] 杨荣, 于润芳, 王志凤. 气相色谱法测定甲磺酸达比加群酯中的甲磺酸乙酯[J]. 继续医学教育, 2014, 28(9): 42-44.
- [9] WANG L F, GUO W M, YANG H Y, et al. Simultaneous determination of the contents of three methanesulfonates in SIPI5357 mesylate by GC-MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2014, 23(11): 1326-1329.
- [10] ZHANG M M, YAO X H, JIANG Y S, et al. Comparison on different detectors for the determination of ethyl and isopropyl methanesulfonate in dabigatran etexilate mesylate by headspace gas chromatography [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46(10): 1108-1112.
- [11] LIU Y Z, YU H, ZHANG R Q. Determination of ionic liquid anions of trifluoroacetate, thiocyanate, tetrafluoroborate and trifluoromethanesulfonate by ion-pair chromatography with direct conductivity detection [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2012, 30(4): 384-390.

收稿日期: 2018-10-29

(本文责编: 曹粤锋)