

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.014

长春西汀注射液中2种磺酸酯类基因毒性杂质的测定*

焦洁, 妙苗, 王涛, 蔡虎[△]

(陕西省食品药品监督检验研究院·国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065)
摘要:目的 建立测定长春西汀注射液中 对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters ODS2 C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (39:61, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 226 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。结果 对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸乙酯质量浓度分别在 0.149 9~0.599 8 μg/mL 和 0.113 6~0.454 2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r=0.999\ 9, 0.999\ 8$), 平均回收率分别为 98.78% ($RSD=2.02\%$, $n=6$) 和 99.33% ($RSD=1.27\%$, $n=6$)。结论 该方法简便、准确, 可用于长春西汀注射液中 对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的定性和定量分析。

关键词: 高效液相色谱法; 长春西汀注射液; 对甲苯磺酸甲酯; 对甲苯磺酸乙酯; 磺酸酯类; 基因毒性杂质

中图分类号: R927.2; R972

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)10-0054-03

Content Determination of Two Genotoxic Impurities of Sulfonate Esters in Vinpocetine Injection

JIAO Jie, MIAO Miao, WANG Tao, CAI Hu

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory of Drug Microbiological Detection Technology, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To establish an high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of the methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate in Vinpocetine Injection. **Methods** The chromatographic column was C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (39:61, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 226 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate were 0.149 9~0.599 8 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.113 6~0.454 2 μg/mL ($r=0.999\ 8$), respectively. The average recoveries of methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate were 98.78% ($RSD=2.02\%$, $n=6$) and 99.33% ($RSD=1.27\%$, $n=6$), respectively. **Conclusion** This method is simple and accurate, which can be used for the qualitative and quantitative analysis of methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate in Vinpocetine Injection.

Key words: HPLC; Vinpocetine Injection; methyl *p*-toluene sulfonate; ethyl *p*-toluene sulfonate; sulfonate esters; genotoxic impurity

长春西汀注射液是由主药长春西汀和辅料山梨醇、苯甲醇等经现代工艺精制而成的无菌注射液, 临床主要用于改善脑梗死后遗症、脑出血后遗症、脑动脉硬化症等诱发的各种症状^[1]。其主药以长春胺为起始原料, 经脱水消除、水解和酯化制得。在长春西汀中间体制备过程中使用了对甲苯磺酸作催化剂, 后续处理过程中虽进行了充分洗涤, 但仍可能存在对甲苯磺酸残留, 在后续的酯化反应中会继续反应, 生成基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯, 故需在成品的质量控制中严格控制两者含量。目前, 对甲苯磺酸酯类的检测方法主要有高效液相色谱 (HPLC) 法^[2-8]、液质联用法^[9-12]、气质联用法^[13-15]等。HPLC 法具有成本低、分离快、灵敏度高、适用于热不稳定化合物等优点。本研究中建立了测定长春西汀注射液中 对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸乙酯含量的 HPLC 法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪, 含 2998 二极管阵列检

测器 (美国 Waters 公司); XPE-105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ2200E 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司)。

1.2 试剂

对甲苯磺酸甲酯对照品 (批号为 F1012054, 含量为 98.0%), 对甲苯磺酸乙酯对照品 (批号为 E1012037, 含量为 98.0%), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 长春西汀注射液 (7 个厂家, 共 79 批, 包括 2 mL: 10 mg, 5 mL: 30 mg, 2 mL: 20 mg 3 种规格); 磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ODS2 C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (39:61, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 226 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取对甲苯磺酸甲酯对照品和对甲苯磺酸乙酯对照品各适量, 精密称定, 用流动相溶解, 并制成

*基金项目: 陕西省重点研发计划项目 [2019SF-075]; 陕西省创新能力支撑计划项目 [2020PT-041]。

第一作者: 焦洁, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品、药包材、医疗器械、化妆品等的安全性评价, (电子信箱) 674272301@qq.com。

[△]通信作者: 蔡虎, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品、药包材、医疗器械、化妆品等的安全性评价, (电话) 029-62288418。

两者质量浓度均约为 0.25 μg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取 2 mL:20 mg 规格样品 3 支,混匀,精密量取 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释并定容,摇匀,即得;其余规格样品,直接取样品溶液进样。

阴性对照品溶液:根据各厂家提供的长春西汀注射液处方,取山梨醇、苯甲醇、维生素 C、焦亚硫酸钠、酒石酸等辅料适量,用流动相溶解并滤过,取滤液,即得。

空白溶液:取流动相,作为空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下除供试品溶液外的 3 种溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,理论板数以对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯峰计分别为 13 359 和 13 880,分离度为 9.2,空白溶液和阴性对照品溶液对测定无干扰。详见图 1。

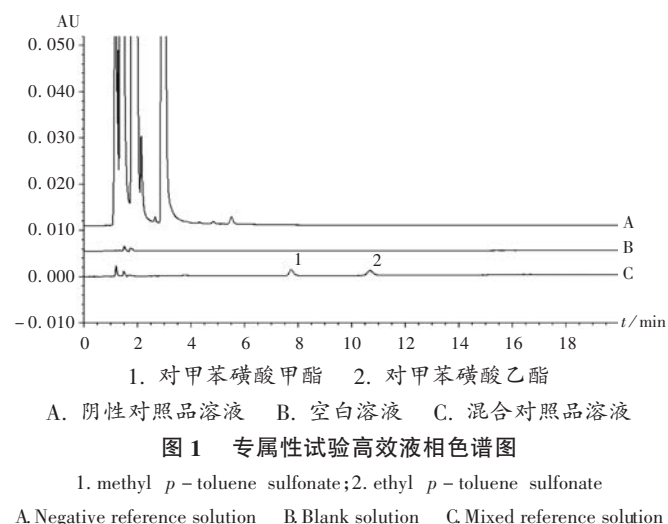


Fig. 1 HPLC chromatograms of the specific test

线性关系考察:取对甲苯磺酸甲酯 12.24 mg 和对甲苯磺酸乙酯 9.27 mg,精密称定,置同一 100 mL 容量瓶中,用流动相溶解,并定容,摇匀。精密量取 2.5 mL,置 100 mL 容量瓶中,用流动相溶解并定容,摇匀,作为线性试验混合对照品贮备液。精密量取 1,1.5,2,3,4 mL,分别置 20 mL 容量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得线性混合对照品溶液。精密量取 20 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,得回归方程,对甲苯磺酸甲酯为 $Y_1 = 63\,593.589\,2X_1 - 309.226\,0$ ($r_1 = 0.999\,9$, $n = 5$),对甲苯磺酸乙酯为 $Y_2 = 61\,195.719\,7X_2 - 317.174\,5$ ($r_2 = 0.999\,8$, $n = 5$)。结果表明,对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯质量浓度分别在 0.149 9~0.599 8 μg/mL 和 0.113 6~0.454 2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

回收率试验和加标重复性试验:考虑到各厂家间工艺、处方的差异,取长春西汀注射液使用辅料最多的 G 公司生产批号为 1901261 的样品 10 支(规格为 2 mL:20 mg,均未检出对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯),混匀,精密量取 2 mL,共 6 份,分别精密加入一定量的

对照品溶液 2 mL,摇匀。精密量取 20 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,按外标法计算回收率。结果见表 1。根据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0901 分析方法验证指导原则中回收率相关要求,待测成分含量在 0.1% 时,回收率限度为 90%~108%。本方法试验中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的回收率分别为 98.78% 和 99.33%,表明准确度符合要求。6 份加标样品中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯含量的 RSD 均小于 3.0%,表明方法的重复性符合要求。

表 1 回收率试验结果($n = 6$)

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

加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.199 5	0.908 5	1.213 5	0.918 1	101.17	101.06				
1.199 5	0.908 5	1.210 8	0.905 7	100.94	99.69				
1.199 5	0.908 5	1.191 1	0.891 4	99.30	98.12	98.78	99.33	2.02	1.27
1.199 5	0.908 5	1.161 5	0.910 6	96.83	100.23				
1.199 5	0.908 5	1.172 8	0.900 9	97.77	99.16				
1.199 5	0.908 5	1.159 8	0.887 8	96.69	97.72				

注:A 为对甲苯磺酸甲酯,B 为对甲苯磺酸乙酯。

Note: A is methyl *p*-toluene sulfonate, B is ethyl *p*-toluene sulfonate.

定量限和检测限确定:取线性混合对照品溶液,逐级稀释,按 2.1 项下色谱条件进样分析,得对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的定量限(信噪比 > 10 时)分别为 0.037 μg/mL 和 0.045 μg/mL,检测限(信噪比 > 3 时)分别为 0.015 μg/mL 和 0.023 μg/mL。

精密密度试验:精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 20 μL,连续进样测定 6 次。结果对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 0.92% 和 1.96% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液,于室温放置 0,1,2,3,4,5,6,7,8 h 时分别按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯峰面积有变小的趋势,RSD 分别为 4.00% 和 4.20% ($n = 9$),建议供试品溶液在配制后 6 h 内测定(此时的 RSD 均小于 2.0%)。

2.4 样品测定

分别取 7 个厂家各 1 批样品(A 公司,批号为 191108;B 公司,批号为 P1/20190901;C 公司,批号为 A92055A;D 公司,批号为 11904042;E 公司,批号为 1902211;F 公司,批号为 1906181;G 公司,批号为 1901241),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,色谱图见图 2。按外标法计算,结果均未检出对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯。

3 讨论

3.1 流动相优化

预试验中先后考察了 3 种流动相:①乙腈-0.1%

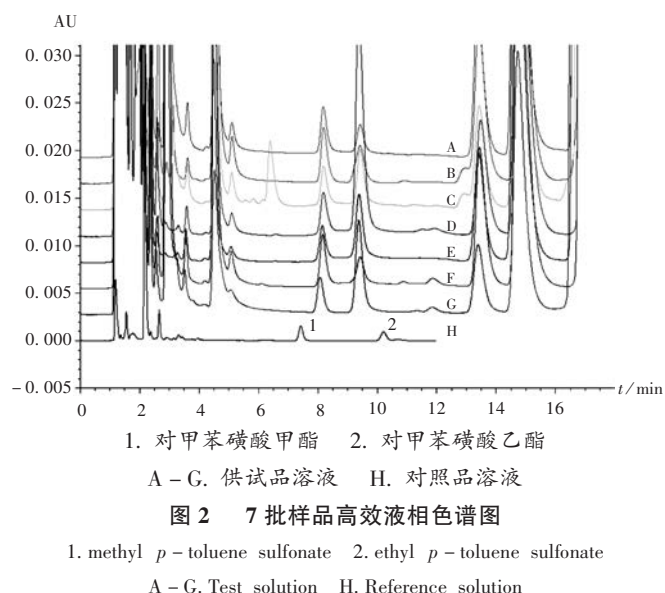


Fig. 2 HPLC chromatograms of seven batches of samples

磷酸溶液(39:61, V/V), 检测波长为 226 nm; ②乙腈-水(40:60, V/V), 检测波长为 220 nm; ③乙腈-0.2 mol/L 醋酸铵溶液(50:50, V/V), 检测波长为 260 nm。结果发现, 3 种流动相均可满足系统适用性试验要求, 但流动相③的检测限比流动相①和流动相②约高 10 倍, 流动相②的系统耐用性较差, 故选择流动相①。

3.2 色谱柱选择

预试验中先后考察了 3 种色谱柱: ① Waters ODS2 C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); ② Agilent TC-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); ③ ACE Excel C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。结果发现, 采用乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相时, 3 种色谱柱均可满足系统适用性试验要求, 但选择色谱柱②和色谱柱③时, 2 种待测物出峰时间均晚于长春西汀主成分, 由于供试品溶液浓度较大, 有拖尾现象, 导致 2 种待测组分的灵敏度低, 达不到限度要求。选择色谱柱①时, 2 个待测组分在长春西汀主峰前流出, 可杜绝高浓度样品对待测组分的干扰, 降低基线噪音, 提高检测的灵敏度。故选择色谱柱①。

3.3 待测物确认

试验过程中发现, 供试品溶液色谱图中, 在待测物保留时间附近还有其他色谱峰, 为排除因保留时间漂移引起的漏检, 对上述样品均进行加标回收验证, 试验结果表明, 该色谱峰不是待测物, 应为长春西汀原料引入的其他杂质。

3.4 限度确定

根据人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)的规定, 基因毒性杂质的最大摄取量为 1.5 μg/d^[16-17], 长春西汀每天最大用量为 30 mg, 按此计算, 确定对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的限度不得超过 0.005%。

3.5 方法评价

本研究中建立的 HPLC 法可快速、准确地对注射用长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯进行定性及定量分析, 避免使用液质仪、气质仪等贵重和普及度较低的仪器, 降低了检验成本, 提高了方法的可行性, 可为该药中潜在的有害杂质的检测提供参考。

参考文献

- [1] 劳荣巨, 李伟恩, 林炯垣. 基于循证药学医嘱点评对长春西汀注射液合理应用的影响[J]. 中国药业, 2020, 29(7): 141-144.
- [2] 王荪璇, 刘雪峰, 王嫦鹤, 等. 电感耦合等离子体-质谱法测定长春西汀等 5 种原料药中催化剂钨残留[J]. 中国药业, 2020, 29(1): 44-46.
- [3] 陈雪江, 郭丽蓉, 沈红娅, 等. 长春西汀注射液中的基因毒性杂质研究与含量测定[J]. 中国药物经济学, 2018, 13(5): 42-44.
- [4] 朱小华, 吕列超, 赵金亮, 等. HPLC 法测定原料药 AL58805 中基因毒杂质[J]. 化工时刊, 2020, 34(2): 17-20.
- [5] 李明显, 郑枫, 丁黎. HPLC-UV 法测定卡培他滨中的对甲苯磺酸酯[J]. 广州化工, 2019, 47(10): 92-94.
- [6] 谢卫峰, 高玉珍. HPLC 法检测托吡司特中的基因毒性杂质对甲苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸仲丁酯、对甲苯磺酸乙酯[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1788-1793.
- [7] 江凡, 张炎, 林晓燕, 等. 高效液相色谱法测定布林佐胺中对甲苯磺酸异丙酯[J]. 医药导报, 2018, 37(7): 882-885.
- [8] 樊高娜, 郑枫, 孙宏张. 高效液相色谱法测定缬沙坦中两种基因毒性杂质[J]. 海峡药学, 2020, 32(4): 75-77.
- [9] 张薇, 陈夷花, 郑枫. 长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的 LC-MS/MS 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(12): 1334-1336.
- [10] 梁键谋, 傅聪, 陈悦. 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[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(11): 1436-1440.
- [11] 舒诗会, 姚君亮, 尹大全. LC-MS/MS 法检测拉科酰胺原料中的对甲苯磺酸甲酯[J]. 上海医药, 2019, 40(15): 116-119.
- [12] 芦飞, 邢珊珊, 王咏. LC-MS 测定醋酸甲羟孕酮中对甲苯磺酸甲酯及对甲苯磺酸乙酯的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 657-659.
- [13] 侯金凤, 李珉, 齐麟, 等. 气相色谱质谱联用法用于甲磺酸左氧氟沙星片中甲磺酸乙酯的含量测定[J]. 中国医药导报, 2018, 15(3): 126-129.
- [14] 包小红, 苟琰, 耿昭, 等. GC-MS/MS 法分析泊沙康唑中四种基因毒性杂质[J]. 中国药师, 2020, 23(2): 269-272.
- [15] 牛慧敏, 李运莉, 王辰, 等. 苯磺酸氯氟地平原料中基因毒性杂质苯磺酸甲酯与苯磺酸乙酯的含量测定[J]. 抗感染药学, 2019, 16(7): 1110-1114.
- [16] 刘雪薇, 厉程, 韩海云, 等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 色谱, 2018, 36(10): 952-961.
- [17] 于瑞董, 俞海荣, 杨杰, 等. 药物中基因毒性杂质磺酸酯类分析方法的研究近况[J]. 海峡药学, 2019, 31(8): 122-125.

(收稿日期: 2020-10-07; 修回日期: 2021-02-04)