

药物中痕量磺酸酯类物质的检测技术研究进展

张园园¹, 李银峰², 王杰晶³, 李佩¹, 靳朝东^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

3. 河南大学, 河南 开封 475001

摘要: 烷基磺酸酯和芳基磺酸酯类化合物作为潜在性基因毒性杂质, 严重威胁人类健康, 因此需要控制食品及药品中磺酸酯的限度。主要介绍了磺酸酯类物质的痕量分析检测技术手段, 如 GC-MS、HPLC-MS、NMR 等, 同时阐述了各种检测技术的优缺点。另外, 还论述了这些杂质产生的条件, 从而提出了避免生成该类杂质的具体措施。因此, 主要从避免杂质的产生和痕量检测两方面进行了综述, 讨论了有效控制药品中基因毒杂质限度的方法, 以保证用药安全。

关键词: 基因毒性杂质; 磺酸酯; 痕量分析; GC-MS; HPLC-MS; 限度

中图分类号: R991 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)04-0304-04

Advances in studies on analytical techniques for trace amount of sulfonate esters in pharmaceuticals

ZHANG Yuan-yuan¹, LI Yin-feng², WANG Jie-jing³, LI Pei¹, JIN Chao-dong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center of Forecasting and Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Alkyl sulfonate esters and aryl sulfonate esters as potential genotoxic impurities badly threatened people's health. Therefore, it was necessary to control the limit of sulfonate esters in foods and pharmaceuticals. Now the analytical techniques for trace amount of sulfonate esters, for instance, GC-MS, HPLC-MS, and NMR etc, were introduced, and their characteristics were discussed in this paper. It also demonstrated the generation of impurities under various situations and the detailed measures to avoid their formations. In a word, the study mainly summarized the obviation of impurities and determination of them by trace analysis, aiming at discussing the methods used for controlling the limit of those sulfonate esters effectively, and then ensuring the safety of medication.

Key words: genotoxic impurities; sulfonate esters; trace analysis; GC-MS; HPLC-MS; limit

近几年基因毒性杂质成为人们关注的焦点^[1], 甲磺酸、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酯如甲磺酸甲酯(MMS)、甲磺酸乙酯(EMS)、异丙基甲磺酸酯(IMS)、正丁基甲磺酸酯(NBMS)^[2], 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^[3-4], 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^[5-6], 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 μg/d。这些潜在基因毒性的存在引起管理机构的高度重视^[7-8], 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。

1 分析检测技术手段

1.1 样品前处理技术

当样品的溶解性、稳定性较好, 响应较强时, 可以直接进样, 然后采用气相色谱法(GC)、液相色谱法(LC)及其联用技术进行分析。

收稿日期: 2012-05-16

作者简介: 张园园(1986—), 女, 回族, 天津中医药大学药物分析学研究生。E-mail: yuanyuan860920@163.com

*通讯作者 靳朝东 Tel: (022)23006877 E-mail: jincd@tjpr.com

当样品不能满足直接进样分析的条件时,需要对样品进行必要的前处理,通常的样品前处理方法主要有各种萃取技术^[9]、衍生化方法^[10]等,对样品进行分离、纯化、富集和浓缩,以达到分

析方法的要求,见表1。样品经前处理后得到的产物可以通过GC-MS或HPLC-MS联用技术进行分析,有利于提高检测灵敏度,获得更好的测定结果。

表1 样品处理方法

Table 1 Sample processing methods

制备方法	具体分类	溶剂	优缺点
萃取技术	固相萃取、固相微萃取;	丙酮、甲醇、乙腈、THF、二氯乙	可靠,应用范围广泛;操作复杂、耗时,容易受有机溶剂及浓缩过程的干扰
	液液萃取、液相微萃取	烷、甲苯等	
衍生化法	烷基化衍生化、酰基化衍	五氟硫酚、硫氰酸盐、2-巯基吡啶、	检测灵敏度高、选择性强、耐受性好,基质干扰较小,增加样品稳定性
	生化、硅烷化衍生化	三烷基胺、正丁基乙酸酯等	

1.2 气相色谱(GC)法

GC法主要用于测定挥发性的成分^[11],该法灵敏度高,专属性强。如甲磺酸酯类化合物的微量检测可采用GC法及其联用技术。GC法按进样方式的不同可分为直接进样GC法和顶空进样GC法,检测器类型包括FID、ECD、NPD、MS等。

1.2.1 直接进样GC法 直接进样方法操作简单,应用广泛。Seymour等^[12]采用直接进样GC-FID法测定疏水性活性药物成分中DMS(二甲基甲磺酸酯),李卫勇等^[13]使用DB-WAX石英毛细管柱(30 m×0.53 mm, 1 μm),以乙腈-水(80:20)为溶剂,测定药物中的痕量MMS、EMS、IPMS,检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} ,该法可靠,灵敏度较高;但是一般来说直接进样GC-MS法比GC-FID法灵敏度更高,专属性更强。Raman等^[14]使用DB-624石英毛细管柱(60 m×0.32 mm, 1.8 μm),以甲醇-水(1:3)作为溶剂,采用直接进样GC-MS-SIM法验证了泮托拉唑钠中残留的DMS,LOD和LOQ分别为 1×10^{-6} 和 3×10^{-6} ;Sarat等^[15]采用该法测定药物中残留的MMS、EMS,同时用DB-1毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),以正己烷作为溶剂,运用该法验证了伊马替尼甲磺酸酯中的MMS和EMS,证实了伊马替尼中不存在这些酯类杂质^[16];另外,GC-MS-SIM法首次用于研究埃索美拉唑镁中樟脑磺酸甲酯及乙酯^[17],拓宽了磺酸酯类杂质的研究范围,该法使用DB-5毛细管柱(30 m×0.32 mm, 1.0 μm),以二甲基乙烯脲作为溶剂,LOD和LOQ分别为 3×10^{-6} 和 1×10^{-5} ;使用上述方法和DB-5毛细管柱,以乙腈-水-氨水(90:9:1)作为溶剂时,测定多沙唑啉甲磺酸酯中MMS、EMS、IPMS、NBMS^[2],其LOD和LOQ为 2×10^{-6} 和 6×10^{-6} 。综上可知,毛细管柱种类及溶剂的选择影响药物中磺酸酯类杂质的检测水平;同时,

仪器对磺酸酯类杂质的检出影响也很大,直接进样GC/FID方法不稳定,容易引进污染物,从而出现鬼峰,干扰测定;相比而言,GC-MS联用技术应用较为普遍,可以很好的应用于磺酸酯类杂质的检测;磺酸酯类物质的研究范围日益扩大等,这些对该领域的研究技术革新具有推动作用。

1.2.2 顶空进样GC法 直接进样方法应用广泛,但是也有自身的局限性,直接进样容易引入不挥发性杂质,出现“鬼峰”,造成污染,导致重现性差,影响测定结果^[18]。顶空进样方法可以避免上述缺点,常应用于GC/MS联用技术中,可以获得良好的精密度,并且该法耐受性更强,在现今的分析技术中应用较为广泛。

1.2.3 萃取技术和衍生化法与GC-MS联用 为提高检测灵敏度,可以对样品进行适当处理,如液液萃取法、固相微萃取法和衍生化方法等,然后采用GC-MS进行分析。液液萃取法GC-MS可以克服基质干扰,提高检测灵敏度,但是操作繁琐,容易受萃取溶剂干扰;SPME-GC-MS测定药物活性成分中MMS、EMS、MBS、EBS、Mp-TS、Ep-TS^[9],该法选择性强,应用范围广泛。

衍生化GC-MS法可以提高分析效率,Alzaga等^[10]用五氟硫酚作为衍生化试剂,采用顶空GC-MS法测定活性药物成分中残留烷基化试剂(AAs),随后Andrew等^[19]利用相同方法监测乙醇与甲磺酸形成甲磺酸乙酯的过程,确定二者反应的条件,从而控制条件,避免杂质甲磺酸酯的形成。

1.3 液相色谱(LC)法

LC法与GC法相比,前者可以分析不挥发性成分,而且载样量也较大,方法简单、可行。LC法具体分类见表2。

1.3.1 高效液相色谱(HPLC)法 很多文献报道使用HPLC法测定磺酸酯类杂质时,HPLC-UV法

表2 液相色谱法分类
Table 2 Classifications of LC

液相方法	检测器类型	具体应用
HPLC 法	UV、ELSD、RID、FLD ^[8] 、CAD、CLND ^[11] 、MS	HPLC、HPLC/MS、衍生化 HPLC/MS ^[24] 、萃取技术与 HPLC/MS 联用等等
离子对色谱法	ECD	IPC-ECD

是比较常用的检测方法^[4,20],如 RP-HPLC 法测定苯磺酸氨氯地平中 MBS、EBS、IPBS、NBBS^[20], 该法使用 Inertsil ODS 3V 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1%三乙胺 (H₃PO₄ 调 pH 3.0) -乙腈, 其分离度和峰形较好, 但是检测限较低, 而且当被测物浓度较低时, 可能不能检测到紫外吸收, 从而影响测定; HPLC-ELSD/RID/FLD (荧光检测器)^[8]/CAD (电喷雾检测器)/CLND (氮化学发光检测器)^[11]法可以满足不同物质的检测要求, 用于无紫外吸收、有荧光吸收或含氮化合物的分析等, 检测灵敏度比 HPLC-UV 法高。

1.3.2 HPLC-MS 法 HPLC-MS 联用技术具有很高的检测效率, 在药物分析中得到广泛应用, Taylor 等^[21]使用 HPLC-MS 法检测药物中低水平的对甲苯磺酸酯和苯磺酸酯, 采用梯度方法, 色谱柱为 Zobax RX C₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 与质谱仪联用, 检测灵敏度显著提高。Chandrashekar 等^[22]采用 LC-MS-MS 法测定洛匹那韦和茚地那韦, 线性良好, 回收率高, 适用于这些杂质的痕量检测; 该技术也用于测定人体血浆和乳液中的 EMS^[23]。

1.3.3 萃取技术和衍生化法与 HPLC-MS 联用 萃取技术和衍生化法处理样品后, 可以使样品稳定, 不发生降解, 便于检测。Alireza 等^[24]采用三甲胺和三乙胺作为衍生化试剂, 然后进行 HPLC-MS 法测定药物中的烷基磺酸酯和二烷基磺酸酯等, 该法最大优点是增加了样品的稳定性, 避免样品在分析过程中降解。

1.3.4 离子对色谱 (IPC) 法 IPC 法依据离子交换机制, 测定药物中的磺酸酯。采用离子对色谱法-电导检测器 (IPC-ECD) 法^[25]快速检测药物中三氟甲磺酸酯和 MP-TS, 该法运用反相硅胶整体柱和直接电导检测技术, 成功检测离子液中三氟甲磺酸酯和 MP-TS。显然, 对于磺酸酯类化合物的研究技术方法不断得到创新, 分析技术手段越来越高。

1.4 其他

其他方法有制备液相与 NMR 联用技术^[26]。制

备液相可以用于分析、纯化杂质, 然后用 NMR 技术进行分析, 确定杂质的准确结构, 用以研究磺酸酯类杂质的结构与诱变性和癌变性的关系^[27], 为磺酸酯类物质的研究提供新方法。

2 避免磺酸酯类物质生成的措施

磺酸酯类化合物作为潜在基因毒性杂质, 应该尽量避免生成^[28]。Andrew 等^[29]研究了磺酸酯的形成及影响其降解的各种因素, 包括温度、醇类、水分、酸、碱、盐等, 结果表明, 在中性或微量碱过量 (如 2, 6-二甲基吡啶)、无水、低浓度醇、弱于甲磺酸的酸类物质 (如磷酸)、盐 (如高氯酸钠) 的条件下可避免这些杂质生成。目前没有报道说明磺酸酯类化合物在其他药物中降解产生。

3 结语

由于磺酸酯类物质具有基因毒性, 可以尽量控制条件或是改变工艺路径来避免这些杂质的生成, 这对研究工艺提出更高的要求, 同时可以扩宽研究思路, 对新药的研发具有推动作用; 磺酸类物质除经常研究的甲磺酸酯、苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯以外, 其他具有磺酸基的物质是否会威胁人类健康, 有待于进一步研究; 各种分析技术手段用于研究检测磺酸酯类物质的限度, 如 GC-MS、HPLC-MS、NMR 和手性色谱法等, 以及各种新型检测器类型如 MS、CAD、ELSD 得到应用, 提高了检测效率和灵敏度^[30]。总的来说, 目前对磺酸酯类杂质的分析检测研究仍然以 GC-MS 和 HPLC-MS 为主。

参考文献

- [1] Elder D P, Teasdale A, Lipczynski A M. Control and analysis of alkyl and aryl sulfonic acids in novel active pharmaceutical ingredients (APIs) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(1): 1-8.
- [2] Sitaram C, Rupakula R B. Determination of alkyl methanesulfonates in doxazosin mesylate by gas chromatography-mass spectrometer [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73(1): 107-110.
- [3] Stopper H, Lutz W K. Induction of micronuclei in human cell lines and primary cells by combination treatment with ³²P-radiation and ethyl methanesulfonate [J]. *Mutagenesis*, 2002, 17: 177-181.
- [4] García A, Rupérez F J, Ceppa F, et al. Development of chromatographic methods for the determination of genotoxic impurities in cloperastine fendizoate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 61: 230-236.
- [5] European Medicines Agency. Evaluation of medicines for human use, guideline on the limits of genotoxic impurities [S]. CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006(2007).
- [6] The European Agency for the evaluation of medicinal

- products, ICH topic S1B, note for guidance on carcinogenicity: Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals [S]. CPMP/ICH/299/95, 1998.
- [7] Giordani A, Kobel W, Gally H U. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(1-2): 1-15.
- [8] Raman N V V S S, Prasad A V S S, Reddy K R. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substance: A pharmaceutical industry perspective [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(4): 662-667.
- [9] Colon I, Richoll S M. Determination of methyl and ethyl esters of methanesulfonic, benzenesulfonic and p-toluenesulfonic acids in active pharmaceutical ingredients by solid-phase microextraction (SPME) coupled to GC/SIM-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3-4): 477-485.
- [10] Alzaga R, Ryan R W, Taylor-Worth K, et al. A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization headspace gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(3): 472-479.
- [11] Liu D Q, Sun M, Kord A S. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 999-1014.
- [12] Seymour M. Determination of residual dimethyl sulfate in a lipophilic bulk by wide-bore capillary gas chromatography [J]. *J Chromatographia*, 1989, 463: 216-221.
- [13] Li W. Trace analysis of residual methyl methanesulfonate, ethyl methane sulfonate and isopropyl methanesulfonate in pharmaceuticals by capillary gas chromatography with flame ionization detection [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1046(1-2): 297-301.
- [14] Raman N V V S S, Reddy K R, Prasad A V S S, et al. Validated chromatographic methods for the determination of process related toxic impurities in pantoprazole sodium [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(5-6): 481-484.
- [15] Sarat M, Ramakrishna M, Suresh Y, et al. Low-level determination of residual methyl methane sulfonate and ethyl methane sulfonate in pharmaceutical by gas chromatography with mass spectrometry [J]. *E-J Chem*, 2010, 7(2): 629-635.
- [16] Ramakrishna K, Raman N V V S S, Rao K M V N, et al. Development and validation of GC-MS method for the determination of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in imatinib mesylate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(4): 780-783.
- [17] Raman N V V S S, Reddy K R, Prasad A V S S, et al. Development and validation of GC-MS method for the determination of methyl and ethyl camphorsulfonates in esomeprazole magnesium [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(7-8): 675-678.
- [18] Zheng J, Pritts W A, Zhang S H, et al. Determination of low ppm levels of dimethyl sulfate in an aqueous soluble API intermediate using liquid-liquid extraction and GC-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5): 1054-1059.
- [19] Jacq K, Delaney E, Teasdale A. Development and validation of an automated static headspace gas chromatography-mass spectrometry (SHS-GC-MS) method for monitoring the formation of ethyl methane sulfonate from ethanol and methane sulfonic acid [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(5): 1339-1344.
- [20] Raman, N V V S S, Reddy K R, Prasad A V S S, et al. Development and validation of RP-HPLC method for the determination of genotoxic alkyl benzenesulfonates in amlodipine besylate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(7): 227-230.
- [21] Taylor G E, Gosling M, Pearce A. Low level determination of p-toluenesulfonate and benzenesulfonate esters in drug substance by high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1119(1-2): 231-237.
- [22] Kakadiya P R, Reddy B P, Singh V, et al. Low level determinations of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate impurities in Lopinavir and Ritonavir active pharmaceutical ingredients by LC/MS/MS using electrospray ionization [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(2): 379-384.
- [23] Montesano M A, Whitehead J R D, Jayatilaka N K, et al. Measurement of ethyl methanesulfonate in human plasma and breast milk samples using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(2): 260-264.
- [24] An V, Sun M, Bai L, et al. A practical derivatization LC/MS approach for determination of trace level alkyl sulfonates and dialkyl sulfates genotoxic impurities in drug substances [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 1006-1010.
- [25] Li S W, Yu H, Ma Y J. Rapid Determination of trifluoromethanesulfonate and p-toluenesulfonate by ion-pair chromatography using a reversed-phase silica-based monolithic column: Application to the analysis of ionic liquids [J]. *Chromatographia*, 2011, 74: 759-765.
- [26] Zhou L, Mao B, Reamer R, et al. Impurity profile tracking for active pharmaceutical ingredients: Case reports [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 421-429.
- [27] Tuttolomondo M E, Navarro A, Pena T. Conformational and vibrational analysis of methyl methanesulfonate, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$ [J]. *Phys Chem A*, 2009, 113: 8401-8408.
- [28] Argentine M D, Owens P K, Olsen B A. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances [J]. *Adv Drug De Rev*, 2007, 59(1): 12-28.
- [29] Teasdale A, Delaney E, Eyley S C, et al. A detailed study of sulfonate ester formation and solvolysis reaction rates and application toward establishing sulfonate ester control in pharmaceutical manufacturing processes [J]. *Org Process Res Dev*, 2010, 14(4): 999-1007.
- [30] 苏倩, 雷勇胜, 刘小琳, 等. 药物中杂质对照品的标定项目与纯度测定方法研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(2): 150-154.