

LC-MS/MS测定枸橼酸西地那非中磺酸酯类基因毒性杂质



李翠芬^{1,2}, 李健华^{1,2}, 陈新国³, 阮鹏伍^{1,2}, 秦飞^{1,2}

1. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂 (广州 510515)
2. 广东省化学药原料与制剂关键技术研究重点实验室 (广州 510515)
3. 广州国标检验检测有限公司 (广州 510535)

【摘要】目的 建立液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法测定枸橼酸西地那非中磺酸酯类基因杂质 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯。**方法** 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), 柱温为 25 °C, 流动相为 0.1% 甲酸溶液-甲醇, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 5 μL。采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正离子扫描, 定量离子对为 m/z 259.3 → 203.1, 定性离子对为 m/z 259.3 → 187.1。**结果** 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯在 4.92~196.99 ng/mL 浓度范围内线性关系良好 ($r=0.9995$), 平均回收率为 96.5%, RSD 为 4.2% ($n=9$), 检测限为 0.098 ng/mL, 定量限为 0.246 ng/mL。**结论** 本方法操作简便、灵敏度高、结果可靠, 可用于枸橼酸西地那非中 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的检测。

【关键词】 枸橼酸西地那非; 基因毒性杂质; 磺酸酯; 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯; 高效液相色谱-串联质谱法

【中图分类号】 R927.2 **【文献标识码】** A

Determination of genotoxic impurity of sulfonate ester in sildenafil citrate by LC-MS/MS

LI Cuifen^{1,2}, LI Jianhua^{1,2}, CHEN Xinguo³, RUAN Pengwu^{1,2}, QIN Fei^{1,2}

1. Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou 510515, China
 2. Key Laboratory of key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations of Guangdong Province, Guangzhou 510515, China
 3. Guangzhou Guobiao Inspection and Testing Co., Ltd, Guangzhou 510535, China
- Corresponding author: QIN Fei, Email: 102536@byszc.com

【Abstract】Objective To establish an liquid chromatography mass spectromete (LC-MS/MS) method for the determination of genotoxic impurity ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate in sildenafil citrate. **Methods** The separation was carried out on Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm) at the column temperature of 25 °C. The mobile phase was 0.1% formic acid solution-methanol with gradient elution, the flow

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202405143

基金项目: 广州市科技计划项目 (201906010026)

通信作者: 秦飞, 博士, 高级工程师, Email: 102536@byszc.com

rate was 0.3 mL/min and the injection volume was 5 μ L. The mass spectrometry was operated in electrospray ionization with multiplereactions monitoring mode. The quantitative ion pairs were m/z 259.3 \rightarrow 203.1 and m/z 259.3 \rightarrow 187.1. **Results** Ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate had a good linear relationship within the concentration range of 4.92-196.99 ng/mL ($r=0.999$ 5). Its average recovery rate was 96.5%, and the *RSD* was 4.2% ($n=9$). The detection limit was 0.098 ng/mL and the quantification limit was 0.246 ng/mL. **Conclusion** The method is simple, sensitive and reliable, which can be applied to determine genotoxic impurity ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate in sildenafil citrate.

【Keywords】 Sildenafil citrate; Genotoxic impurity; Suifonate ester; Ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate; High performance liquid chromatography mass spectromete

枸橼酸西地那非是一种环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 特异的 5 型磷酸二酯酶 (type 5 phosphodiesterase, PDE5) 选择性抑制剂, 通过抑制血管平滑肌上的 PDE5, 提高局部 cGMP 水平, 松弛、扩张血管平滑肌, 广泛用于勃起功能障碍和肺动脉高压的治疗^[1-2]。

基因毒性杂质是指痕量即能造成细胞 DNA 损伤、染色体断裂或重排、引起基因突变的杂质^[3]。近年来国内药品注册审评中日益重视潜在基因毒性杂质的评估^[4-5]。枸橼酸西地那非国家药品标准 (WS1-XG-014-2021) 规定: 应对枸橼酸西地那非生产工艺进行评估, 分析其产生磺酸酯遗传毒性杂质的可能性。必要时, 采用合适的分析方法对产品进行检测, 确保产品中

磺酸酯含量符合人用药品技术要求国际协调理事会 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) M7 或我国药品监管部门相关指导原则的限度要求^[6]。本品以 2-乙氧基苯甲醛和 4-氨基-1-甲基-3-正丙基-1H-吡唑-5-甲酰胺 (氨基物) 为起始原料, 经磺酰胺化、缩合、环合、成盐等制备得到枸橼酸西地那非 (工艺路线见图 1)。合成反应过程中用到了乙醇, 在磺酰胺化过程中可能产生副产物 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯 (图 2)。磺酸酯类杂质在体内代谢后易产生较强的毒性, 对人体有较大的危害, 在药物研发及生产过程中应严格控制^[7]。

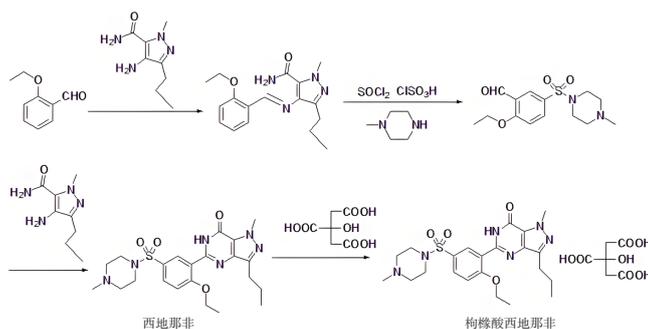


图1 枸橼酸西地那非的合成工艺路线

Figure 1. Synthetic route of sildenafil citrate

目前关于枸橼酸西地那非中磺酸酯类基因杂质研究和检测方法未见报道。本研究建立了液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography mass spectromete, LC-MSMS) 法, 通过多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描方式, 检测枸橼酸西地那非原料中的 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯, 该方法操作简单、灵敏度高, 可为枸橼酸西地那非及其制剂的质量控制提供依据, 也可为其他药物中

磺酸酯类杂质的痕量分析提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo UltiMate 3000-AB Sciex 4000 Q TRAP 液质联用色谱仪, 包括 Analyst 工作站 (美国 Thermo 公司); CPA225D 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

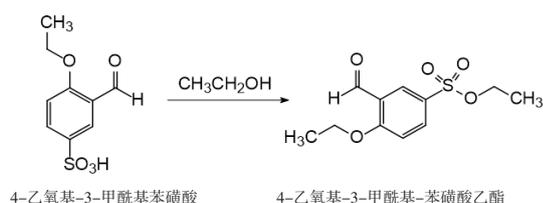


图2 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯产生途径
Figure 2. Generation pathway of ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate

1.2 主要药品与试剂

4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯对照品（广州市朗启医药科技有限责任公司，批号：192-1-1903，纯度 98.99%）；枸橼酸西地那非原料（广州白云山医药集团股份有限公司白云山化学制药厂，批号：JFB1611001、JFB1611002、JFB1611003、JFB1707007、JFB1707008、JFB1707009、JFB1806005、JFB1806006、JFB1806007、JFB1901004、JFB1901005、JFB1901006，含量均大于 99.0%）；甲酸及甲醇为色谱纯，其余试剂为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱（150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm）；柱温：25 °C；流动相：0.1% 甲酸溶液（A）- 甲醇（B），按表 1 进行梯度洗脱；流速：0.3 mL/min；进样量：5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Table 1. Gradient elution procedure

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~3	90	10
3~15	90~5	10~95
15~18	5	95
18~18.2	5~90	95~10
18.2~25	90	10

2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源，以多反应监测模式进行正离子扫描；喷雾电压：5 500 V；干燥气温度：500 °C；雾化气压力：50 psi；干燥气压力：50 psi；气帘气压力：40 psi；扫描时间：80 ms。4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的定量离子对为 m/z 259.3 → 203.1；去簇电压：82.0 V；碰撞能量：23.0 V；碰撞室出口电压：

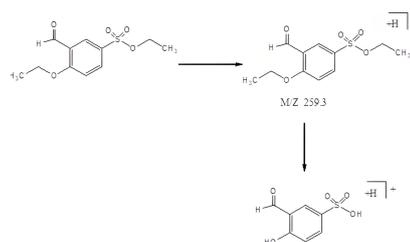


图3 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的裂解途径
Figure 3. Fragmentation paths of ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate

Figure 3. Fragmentation paths of ethyl 4-ethoxy-3-formylbenzenesulfonate

10.0 V；入口电压：10.0 V。定性离子对为 m/z 259.3 → 187.1；去簇电压：82.0 V；碰撞能量：25.0 V；碰撞室出口电压：10.0 V；入口电压：10.0 V。4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的裂解途径见图 3。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液

精密称 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯对照品 9.95 mg，置 100 mL 量瓶中，用稀释剂溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取该溶液 1.0 mL，置 200 mL 量瓶中，用稀释剂定容至刻度，摇匀，即得。

2.2.2 对照品溶液

精密量取对照品贮备液 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，用稀释剂定容至刻度，摇匀，即得。

2.2.3 供试品溶液

取枸橼酸西地那非原料约 50 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加 N,N-二甲基乙酰胺 1.0 mL 使溶解，再用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.4 供试品加标溶液

取枸橼酸西地那非原料约 50 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加 N,N-二甲基乙酰胺 1.0 mL 使溶解，再加入 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯线性贮备液 1.0 mL，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.5 稀释剂（空白溶剂）

N,N-二甲基乙酰胺：甲醇为 1：9。

2.3 专属性试验

按“2.1”项下方法，精密量取对照品溶液、供试品溶液、供试品加标溶液和空白溶剂，分别进样测定，记录色谱图（图 4）。结果显示：4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯保留时间为 13.81 min，空白溶剂不干扰待测组分测定，供试品溶液中无其他物质干扰。

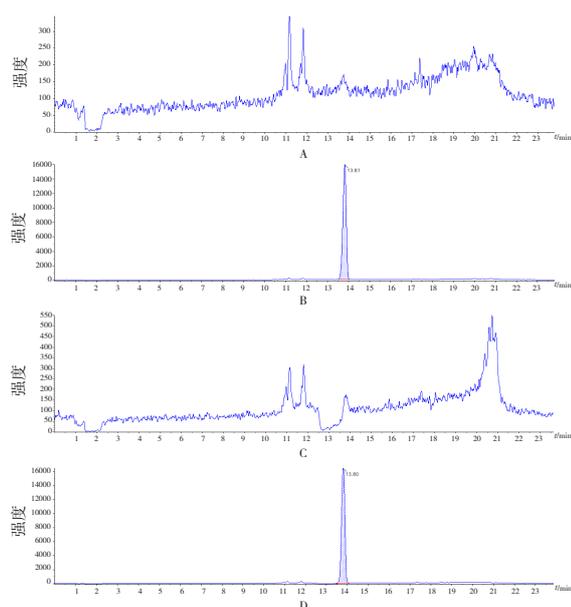


图4 专属性试验典型图谱

Figure 4. Typical chromatograms of specificity test

注: A. 空白溶剂; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; D. 100%加标样品。

2.4 线性考察

精密量取杂质对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用稀释剂定容至刻度, 摇匀, 得到浓度分别为 4.92、9.85、24.62、49.25、98.50、196.99 ng/mL 的线性系列标准溶液。按“2.1”项下分析条件进样测定, 记录色谱图, 以浓度 (X , ng/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 计算得 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的回归方程为 $Y=7\ 842.806X+7\ 906.696$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明, 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯在 4.92~196.99 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.5 检测限和定量限

取 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯对照品溶液逐级稀释, 按“2.1”项下分析条件进样测定, 以信噪比约为 3:1 时的浓度作为检测限, 以信噪比为 10:1 时浓度作为定量限, 计算得 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的定量限为 0.246 ng/mL (相当于供试品溶液浓度的 0.000 005%), 检测限为 0.098 ng/mL (相当于供试品溶液浓度的 0.000 002%)

2.6 精密度试验

取定量限溶液按“2.1”项下分析条件连续进样 6 次, 计算得 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯峰面积的 RSD 为 2.3% ($n=6$), 结果表明该仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品加标溶液, 室温条件下放置, 分别于 2、4、6、8、10、12 h 取样, 并按“2.1”项下条件进样测定, 计算得两种溶液中 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 2.9% 和 3.2% ($n=6$), 结果表明两种溶液在室温条件下 12 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取枸橼酸西地那非原料 (批号: JFB1901004) 50 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 N,N -二甲基乙酰胺 1.0 mL 使溶解, 再加入 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯对照品贮备液 1.0 mL, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为 100% 限度浓度的加标供试品溶液, 平行配制 6 份, 按“2.1”项下分析条件进样测定, 计算得 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的平均含量为 9.8 mg/L, RSD 为 1.6% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验

精密称取枸橼酸西地那非原料 (批号: JFB1901004) 50 mg, 共 9 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 N,N -二甲基乙酰胺 1.0 mL 使溶解, 再分别加入 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯对照品贮备液 0.5、1.0、1.5 mL, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 每个浓度平行 3 份, 分别作为低、中、高浓度 (50%、100%、150%) 的回收率试验溶液。分别取对照品溶液、供试品溶液及各浓度下回收率试验溶液, 按“2.1”项下分析条件进样测定。结果显示 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的回收率在 93.7%~99.3% 范围内, 平均回收率为 96.5%, RSD 为 4.2% ($n=9$), 结果表明该方法准确度良好。

2.10 样品测定

取 2016—2019 年期间每年 3 批共 12 批枸橼酸西地那非原料 (批号: JFB1611001、JFB1611002、JFB1611003、JFB1707007、JFB1707008、JFB1707009、JFB1806005、JFB1806006、JFB1806007、JFB1901004、JFB1901005、JFB1901006), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液, 并按“2.1”项下分析条件进样测定。结果显示, 12 批样品中均未检出 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯, 结果表明现有生产工艺对 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯的清除能力和控制情况较好。

3 讨论

3.1 杂质限度及方法选择

参考欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA)、ICH 中毒理学关注阈值 (1.5 $\mu\text{g}/\text{d}$) 作为基因毒性杂质的可接受限度^[8-9], 按枸橼酸西地那非最大服用剂量 (以西地那非计) 100 mg 计算, 限度为 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。目前文献报道的磺酸酯类的测定方法主要有 HPLC 法、GC 法、液相色谱-质谱联用 (LC-MS、LC-MS/MS) 法和气相色谱-质谱联用 (GC-MS、GC-MS/MS) 法^[7]。结合药物以及目标杂质的理化性质, 本研究采用 HPLC-MS/MS 法测定枸橼酸西地那非中磺酸酯类基因杂质 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯, 与 HPLC 法 (检出限约 20 ng/mL) 相比, 灵敏度更高, 高达 0.1 ng/mL , 适用于痕量水平的基因毒性杂质检测; GC、GC-MS 广泛应用于易分离气体和易挥发的成分, 如烷基磺酸酯类, 本研究的待测物质为芳基磺酸酯, 为难挥发性杂质, 更适用于 LC-MS 或 LC-MS/MS。此外, GC-MS、GC-MS/MS 法需高温, 对于不耐热的物质分析结果可能有影响。

3.2 色谱条件优化

对于流动相选择方面, 由于磺酸酯采用正离子模式检测, 通常流动相选择含甲酸铵、乙酸铵、甲酸或乙酸等, 初步选择 0.01 mol/L 甲酸铵 +0.1% 甲酸水溶液和甲醇, 梯度洗脱, 发现回收率较低, 初步判断为杂质出峰时间处有其他组分一同出峰, 影响了质谱电离效果, 故需将杂质出峰时间与其他组分出峰时间分开; 通过更换流动相组成为 0.1% 甲酸水溶液和甲醇, 梯度洗脱, 以及更换长度为 150 mm 的 C_{18} 色谱柱进行测试, 回收率满足要求。

3.3 杂质控制策略

由于 12 批枸橼酸西地那非原料样品中均未检出杂质 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯, 说明原料现有生产工艺能够使 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯得到有效的控制, 因此 4-乙氧基-3-甲酰基-苯磺酸乙酯不作为原料标准中日常检测项目, 但鉴于基因杂质的危害性较大, 按照 ICH M7^[8] 中方法 1 定期确认性检测的控制方式, 在生产工艺路线发生了调整变更时, 重新进行评估及检测。

参考文献

1 Kouvelas D, Goulas A, Papazisis G, et al. PDE5inhibitors:

in vitro and *in vivo* pharmacological profile[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(30): 3464-3475. DOI: 10.2174/138161209789206971.

- 刘冬, 韩鸿璨, 王骏. 枸橼酸西地那非片生物等效性试验研究现状及其审评要求 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 677-681. [Liu D, Han HC, Wang J. Progress and review requirement for sildenafil citrate tablet bioequivalence test[J]. *Drug Evaluation Research*, 2023, 46(3): 677-681.] DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.029.
- 杨竹, 杭太俊, 郭晓迪, 等. N-亚硝胺类基因毒性杂质的研究进展 [J]. *药学与临床研究*, 2020, 28(4): 270-274. [Yang Z, Hang TJ, Guo XD, et al. A review of research progress on n-nitrosamine genotoxic impurities[J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2020, 28(4): 270-274.] DOI: 10.13664/j.cnki.pcr.2020.04.008.
- 吴兆伟, 杜凯, 王琳, 等. GC-MS 法测定缬沙坦中的 N-亚硝基二甲胺 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(20): 2478-2481. [Wu ZW, Du K, Wang L, et al. Determination of the contents of N-nitrosodimethylamine in valsartan by GC-MS [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, 28(20): 2478-2481.] DOI: 10.2174/138161209789206971.
- 孙朗, 石明睿, 熊志立. LC-MS/MS 法测定苯磺酸氨氯地平胶囊中两种潜在基因毒性杂质的含量 [J]. *医药导报*, 2022, 41(12): 1846-1849. [Sun L, Shi MR, Xiong ZL. Content determination of two potential genotoxic impurities in amlodipine besylate capsule by LC-MS/MS[J]. *Herald of Medicine*, 2022, 41(12): 1846-1849.] DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2022.12.021.
- 国家药品监督管理局. 国家药品标准. WS1-XG-014-2021[S]. 2021.
- 韩佳芮, 徐艳梅, 郝丽娟, 等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质测定方法研究进展 [J]. *化学分析计量*, 2023, 32(6): 104-108. [Han JR, Xu YM, Hao LJ, et al. Research progress in the determination of genotoxic impurities of sulfonates[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2023, 32(6): 104-108.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-6145.2023.06.021.
- ICH Harmonised guideline. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7 (R2)[S]. 2023.
- EMA. Guideline on the limits of genotoxic impurities[S]. 2006: 2.

收稿日期: 2024 年 05 月 24 日 修回日期: 2024 年 07 月 18 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳