

甲磺酸伊马替尼中致突变杂质研究

张兰平 姚彤 刘梦婷

连云港杰瑞药业有限公司 江苏 连云港 222000

【摘要】参照 ICHM7 (R1) 制定了甲磺酸伊马替尼中致突变杂质甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS) 和甲磺酸异丙酯 (IMS) 的控制策略, 研究确定采用 GC-MS 方法对其进行检测, 采用 6% 氰丙基苯基和 94% 二甲基聚硅氧烷为固定相的毛细管柱, 进样口温度为 240℃; 流速为每分钟 1.5mL; 进样量为 1 μL; 分流比为 20:1; 载气为氮气; 检测器为质谱, 离子源为 EI, MMS 选择离子为 79/80/95, EMS 和 IMS 选择离子为 79/97/109/123, 线性关系、准确度等指标良好, 符合 ICHQ2 (R1) 要求。

【关键词】致突变性杂质; 甲磺酸甲酯 (MMS); 甲磺酸乙酯 (EMS); 甲磺酸异丙酯 (IMS); GC-MS

甲磺酸伊马替尼 (Imatinib Mesylate), 由瑞士诺华公司制造, 商品名为格列卫 (Gleevec), 是慢性骨髓性白血病一线用药, 还可以治疗胃肠道间质肿瘤。2003 年 4 月首次被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准, 2005 年 1 月获中国食品药品监督管理局批准上市, 2011 年美国 FDA 和欧盟药品监督管理局 EMA 批准用于治疗急性淋巴细胞白血病儿科患者。

甲磺酸伊马替尼结构中含有甲磺酸基团, 容易与反应溶剂甲醇、乙醇、异丙醇等发生反应, 生成含警示结构的甲磺酸酯类: 甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸异丙酯 (IMS) 等致突变杂质, 根据 ICHM7 (R1) [1] 指导原则要求, 根据甲磺酸伊马替尼每日最大给药剂量为 800mg/天, 结合毒理学数据, 最终确定按照毒理学关注阈值 (TTC) 1.5 μg/天, 计算允许限度为 1.6ppm, 采用 GC-MS 方法, 按照 ICHQ2(R1) 技术要求 [2], 对方法的系统适用性、专属性、检测限与定量限度、线性、准确度、精密度等进行了全面分析方法验证, 方法稳定、可控, 可有效检测甲磺酸伊马替尼中甲磺酸酯类致突变杂质含量。

1 仪器与试剂

检验用仪器和试剂等基本信息如下表 1:

表 1 检验用试剂基本信息

Tab. 1 Basic information of the reagents and test samples

| 名称 | 批号 | 纯度 | 来源 |
|--------|----------|-------|-------------------|
| 甲磺酸甲酯 | L07ZB | 99.9% | 梯希爱 (上海) 化成工业有限公司 |
| 甲磺酸甲酯 | 7C22B | 99.9% | |
| 甲磺酸异丙酯 | A0319477 | 99.6% | ACROS ORGANICS |

| 名称 | 批号 | 纯度 | 来源 |
|---------|---------------|-------|-----------------|
| 乙酸乙酯 | 170057 | 99.9% | Fisher chemical |
| | YM-101-180301 | 99.9% | |
| 甲磺酸伊马替尼 | YM-101-180302 | 99.9% | 连云港杰瑞药业有限公司 |
| | YM-101-180303 | 99.9% | |

表 2 检验用仪器基本信息

Tab. 2 Basic information of analytical instruments

| 名称 | 规格 | 厂家 | 编号 |
|---------|------------|---------|-----------|
| 气相质谱联用仪 | 7890B5977B | 安捷伦 | GC-MS-002 |
| 电子分析天平 | ME55/02 | 梅特勒-托利多 | BAL-005 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 6% 氰丙基苯基和 94% 二甲基聚硅氧烷为固定相的毛细管柱 (Agilent DB-624UI, 30m × 0.32mm × 1.8 μm), 进样口温度为 240℃; 升温程序: 100℃保持 3 分钟, 以每分钟 20℃速率升温至 160℃, 保持 3 分钟, 以 30℃速率升温至 220℃保持 1 分钟, 250℃下后运行 2 分钟; 流速为每分钟 1.5mL; 进样量为 1 μL; 分流比为 20:1; 载气为氮气; 检测器为质谱, 离子源为 EI, 甲磺酸甲酯选择离子为 79/80/95, 甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯选择离子为 79/97/109/123。

2.2 系统适用性试验

精密量取系统适用性溶液 1 μL, 注入气相质谱联用色谱仪, 记录色谱图, 进样 6 针, 考察溶液峰面积 RSD (≤ 15%), 试验典型图谱如下:

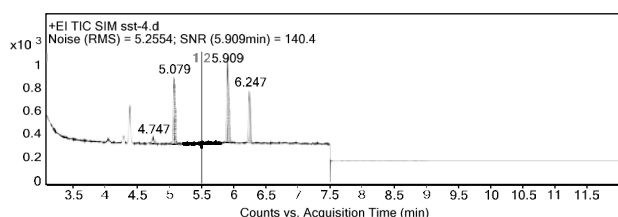


图 1 甲磺酸伊马替尼中 MMS、EMS、IMS 系统适用性试验典型图谱
Fig.1 Typical system suitability chromatogram of MMS,EMS,IMS in Imatinib Mesylate

2.3 专属性试验

取空白溶剂、供试品溶液、储备溶液 1 和样品加标溶液，分别进样，采集色谱图，典型图谱如下：

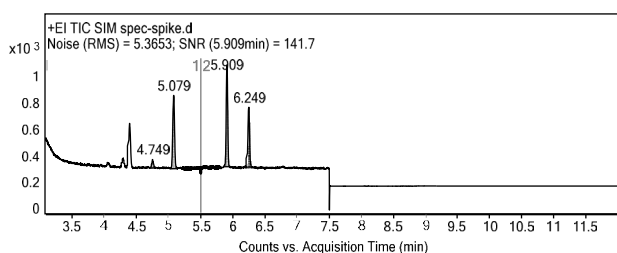


图 2 专属性试验典型图谱
Fig.2 Specificity test typical chromatogram

2.4 检测限与定量限

量取检测限溶液 1 μ L，注入气相色谱联用色谱仪，记录色谱图，重复测定定量限浓度溶液 6 次，分别精密量取 1 μ L，注入气相色谱联用色谱仪，考察定量限浓度下 MMS、EMS、IMS 的精密度，均符合要求，试验结果如下：

表 3 甲磺酸伊马替尼中 MMS、EMS 和 IMS 检测限和定量限结果

| Tab.3 LOD and LOQ of MMS,EMS,IMS in Imatinib Mesylate | | | | | |
|---|-----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| 名称 | 限度浓度 (μ g/mL) | 检测限 S/N \geq 3 | 检测限 (μ g/ mL) | 定量限 (μ g/mL) | 定量限 S/N \geq 10 |
| MMS | 0.09027 | 7.2 | 0.006018 | 0.01805 | 21 |
| EMS | 0.09798 | 7.2 | 0.006532 | 0.01960 | 27 |
| IMS | 0.09617 | 5 | 0.006412 | 0.01923 | 17 |

2.5 线性

取线性溶液 L-LOQ、L-50%、L-100%、L-120%、L-150%、L-200%，注入气相色谱联用色谱仪，记录色谱图，线性范围良好，结果如下：

表 4 MMS、EMS、IMS 线性范围

| Tab.4 Results of Linearity Test of MMS、EMS、IMS | | |
|--|------------------|------------------------|
| 测试物 | 线性范围 μ g/mL | 回归方程 |
| MMS | 0.01805 ~ 0.1805 | $y=11942.2109x+9.0671$ |
| EMS | 0.01951 ~ 0.1951 | $y=13115.3563x-9.7245$ |
| IMS | 0.01923 ~ 0.1923 | $y=8456.5362x+6.7459$ |

2.6 准确度

分别加入低、中、高浓度共 9 份样品，注入气相色谱联用色谱仪，记录色谱图，按照外标法计算得 MMS、EMS 和 IMS 的平均回收率分别为 100%、105% 和 104%，RSD 分别为 3%、3% 和 2%，准确度符合规定。

2.7 精密度和重复性试验

取准确度项下 100% 回收率溶液 6 份，作为中间精密度和重复性溶液，精密移取各 1 μ L，注入气相色谱联用色谱仪，记录色谱图，以回收率计算中间精密度和重复性。

中间精密度结果为：MMS、EMS 和 IMS 的平均回收率分别 93%、99%、100%，RSD 分别为 1%、2%、1%，符合要求（回收率：80% ~ 120%，RSD \leq 15%）。

重复性结果为：MMS、EMS 和 IMS 的平均回收率分别 99%、104%、106%，RSD 分别为 2%、2%、3%，符合要求（回收率：80% ~ 120%，RSD \leq 15%）。

2.8 样品检测

取 3 批甲磺酸伊马替尼原料药，分别注入气相色谱联用色谱仪，记录色谱图，对除溶剂峰以外的色谱峰进行积分，按外标法计算 MMS、EMS、IMS 的含量，结果均未检出。

2.9 MMS、EMS、IMS 控制策略

根据 ICHM7 (R1)，首选按照每个物质的毒性数据，推算允许残留，若无毒性数据参考，则可参照毒理学关注阈值 (TTC) 1.5 μ g/天的策略计算允许限度。MMS、EMS 均为致突变杂质，在毒性数据库^[3]中可检索到 MMS 毒性数据 TD50 为 31.8mg/kg/天，按照终生服用甲磺酸伊马替尼，计算每日可允许摄入量 (AI) 为：

$$AI=TD50 \times 50kg/50000=0.0318mg/天 =31.8 \mu g/天,$$

远大于 TTC1.5 μ g/天。

A.Segal 等^[4]报道了 EMS 和 IMS 具有致突变毒性，但未披露确切毒性数据，为了严控 MMS、EMS 和 IMS 在甲磺酸伊马替尼中残留限度，统一按照按 TTC1.5 μ g/天的策略，以甲磺酸伊马替尼每日最大给药剂量为 800mg/天（以伊马替尼计），计算允许限度为：

$$MMS、EMS、IMS 限度 =1.5 \mu g/day \div (800 mg/day \times 589.71 \div 493.60)=1.6ppm。$$

进一步收严，按照控制三者之和 1.5ppm，进行研究和控制。

3 结论

本文按照 ICHM7(R1) 研究制定了甲磺酸伊马替尼中 MMS、EMS、IMS 的控制策略，制定了限度，并研究确定采用 GC-MS 进行方法验证，线性、专属性、检测限、定量限、准确度等指标均符合 ICHQ2(R1) 要求，方法稳

定可控,可有效检测甲磺酸伊马替尼中致突变杂质甲磺酸酯类含量。

【参考文献】

- [1]The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH).Assessment and control of DNA reactive(Mutagenic) in Pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.[EB/OL].[2020-05-15].https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.
- [2]The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH).Validation of Analytical Procedures:Text and methodology[EB/OL].[2020-05-15].<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- [3]CarcinogenicPotency Database[EB/OL].[2020-05-15].<https://files.toxplanet.com/cpdb/chempages/METHYL%20METHANESULFONATE.html>.
- [4]A.Segal,A.Sellakumar;Inducibility of thymic lymphomas in female hsd:(icr)br mice following subcutaneous injection of ethyl-and isopropyl methanesulfonate[J]Cancer Lett.1989, 44(3):199-204.