



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111707747 A

(43)申请公布日 2020.09.25

(21)申请号 202010568861.5

G01N 30/86(2006.01)

(22)申请日 2020.06.19

(71)申请人 江西省药品检验检测研究院

地址 330000 江西省南昌市北京东路1566号

(72)发明人 钟振华 夏红英 程奇珍 易路遥

刘绪平 潘蕾 余师师 熊欣

王鹏 陈珍珍 王烜 陈雨萍

(74)专利代理机构 南昌金轩知识产权代理有限公司 36129

代理人 牛永山

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

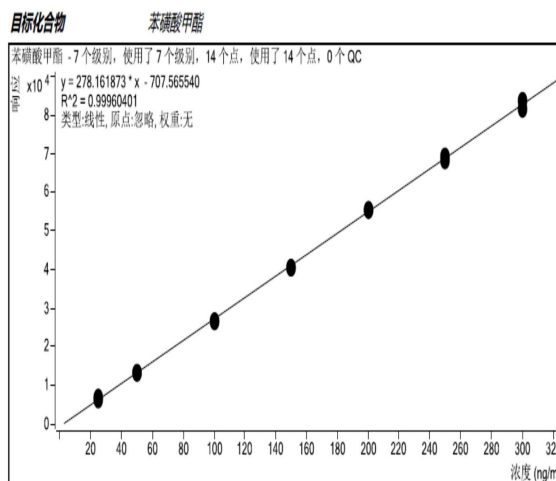
权利要求书2页 说明书12页 附图7页

(54)发明名称

一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法

(57)摘要

本发明涉及药物分析技术领域,具体涉及一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,包括以下步骤:1)在盐酸吉西他滨中加入1,2-二氯乙烷,进行超声后,加入1,2-二氯乙烷定容得提取液,提取液过滤,得到供试品溶液;2)采用GC-MS/MS法测定步骤1)中的供试品溶液,采用外标法计算盐酸吉西他滨中各甲磺酸酯类基因毒性杂质的含量;所用气相色谱柱为VF-624ms色谱柱;所述甲磺酸酯类基因毒性杂质包括甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯。本发明提供的测定方法具有抗杂质干扰能力强,噪音低,专属性强和灵敏度高的特点。



1. 一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 在盐酸吉西他滨中加入1,2-二氯乙烷,进行超声后,加入1,2-二氯乙烷定容得提取液,提取液过滤,取续滤液,得供试品溶液;

2) 采用GC-MS/MS法测定步骤1)中的供试品溶液,采用外标法计算盐酸吉西他滨中各甲磺酸酯类基因毒性杂质的含量;

所用气相色谱柱为VF-624ms色谱柱;

所述甲磺酸酯类基因毒性杂质包括甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯。

2. 根据权利要求1所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,步骤1)所述提取液中盐酸吉西他滨与1,2-二氯乙烷的质量体积比为0.022-0.026g/ml,优选地,步骤1)所述提取液中盐酸吉西他滨与1,2-二氯乙烷的质量体积比为0.024g/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,所述盐酸吉西他滨为盐酸吉西他滨原料药或者注射用盐酸吉西他滨。

4. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,步骤1)所述超声的频率为40000Hz。

5. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,所述超声的时间为25-35min。

6. 根据权利要求5所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,所述超声的时间为30min。

7. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,

当盐酸吉西他滨为原料药时,步骤1)采用的具体步骤为:

取盐酸吉西他滨约1.2g,精密称定,置于50ml容量瓶中,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30min,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,得到供试品溶液;

当盐酸吉西他滨为注射用盐酸吉西他滨时,步骤1)采用的具体步骤为:

取注射用盐酸吉西他滨6瓶,相当于盐酸吉西他滨1.2g,用1,2-二氯乙烷25ml将内容物转移至50ml量瓶中,加1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,得注射用盐酸吉西他滨供试品溶液。

8. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,在步骤2)中,采用的气相色谱测定条件为:

柱长为60m,直径为0.25mm,膜厚为1.4 μ m;

柱温:采用程序升温,起始温度120 $^{\circ}$ C,以10 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ 升温至250 $^{\circ}$ C保持5min;

进样口温度:250 $^{\circ}$ C;

恒流流速:1.0ml/min;

分流进样,分流比:10:1;

进样量:1 μ L。

9. 根据权利要求1或2所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,在步骤2)中,采用的质谱条件为:

EI源温度:230℃;

电子能量:70eV;

溶剂延迟时间:6.5min。

10. 根据权利要求9所述的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,其特征在于,在进行质谱操作时,所采用的定性定量的离子对和碰撞能如下:

待测化合物	离子对性质	离子对	碰撞能 (mv)
甲磺酸甲酯	定量	110→79	10
	定性	80→65	5
		80→48	40
甲磺酸乙酯、甲磺酸丙酯及甲磺酸丁酯	定量	123→79	5
	定性	109→79	5
		109→45.1	2
甲磺酸异丙酯	定量	123→79	5
	定性	123→59.1	2
		123→45.1	5

一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物分析技术领域,具体涉及一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法。

背景技术

[0002] 遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurities, GTIs) 是指能引起遗传毒性的杂质,在药物活性成分合成中,基因毒性杂质 (又成遗传毒性杂质) 可能由起始原料、中间产物、反应副产物、降解产物、试剂、溶剂和催化剂引入。与药品中其他杂质相比,基因毒性杂质会造成人体DNA结构发生功能性改变,从而导致人类遗传突变、染色体断裂,染色体重排和致癌。因此,近年来,各国监管机构特别关注基因毒性杂质,如欧洲药物委员会,美国食品药品监督管理局。2013年11月,ICH发布了评估和控制药物中的DNA活性 (致突变) 杂质以限制潜在的致癌风险M7 (R1),在缺乏支持基因毒性阈值存在的有力证据下,提出采用“毒理学关注阈值” (threshold of toxicological concern, TTC) 作为基因毒性杂质的可接受限度。其含义为在人的一生 (70岁) 中,每天摄入1.5 μ g的基因毒性杂质,其致癌的风险是可接受的 (<1/10万)。TTC概念用于界定所有未经研究,但具有致癌风险或其他毒性效果的化学品的可接受摄入量。

[0003] 药物中基因毒性杂质的残留问题,已成为制药行业所面临的重大挑战,自2008年罗氏生产的抗艾滋病药物甲磺酸奈非那韦因被检测出甲磺酸乙酯严重超标而从市场召回,2018年6月华海药业缙沙坦中N-亚硝基二甲胺基因毒性杂质超标,导致相关制剂也从欧洲、美国和中国市场上被召回,2018年9月Torrent制药公司三批次缙沙坦药品中查出基因毒性杂质超标而从市场被召回。这三起事件给国内各大药品生产企业敲响警钟,随着中国正式加入ICH,国内药物研发相关法规政策也逐渐向ICH靠拢。近期国家药典委员会官网发布了“关于《中国药典》2020年版四部通则增修订内容 (第四批) 的公示”,其中就包括了“遗传毒性杂质控制指导原则审核稿”。综上所述,基因毒性杂质的研究变得尤其重要。

[0004] 甲磺酸酯类物质目前已被确认为基因毒性杂质,1999年,甲磺酸甲酯被世界卫生组织国际癌症研究机构列入二类致癌物清单中,属2A类致癌物 (对人很可能致癌,此类致癌物对人致癌性证据有限,对实验动物致癌性证据充分),甲磺酸乙酯于1987年列为2B类致癌物 (对人可能致癌,此类致癌物对人致癌性证据有限,对实验动物致癌性证据并不充分;或对人类致癌性证据不足,对实验动物致癌性证据充分)。有研究表明,甲磺酸酯类物质可作用于DNA分子的嘌呤基团,生成烷基化嘌呤,破坏DNA双链的空间构象和稳定,诱发机体基因突变和癌症。根据欧洲药物委员会发行的关于GTI控制的指导原则,以及ICH发行的关于基因杂质 (ICH M7) 的指导原则的相关要求,甲磺酸酯类以药物每日最大摄入量 (MDD) 为基础,毒理性方面的阈值为1.5 μ g/day。

[0005] 在药物生产过程中,醇类物质如甲醇、乙醇和异丙醇常用作药物结晶或提纯的溶剂参与药物合成,甲磺酸常作为反离子试剂与药物活性成分形成稳定的共轭盐类物质,以

改善其溶解性、吸收性等理化特性。在药物合成过程中,甲磺酸或甲磺酰氯会与醇类物质发生副反应,生成具有基因毒性的甲磺酸酯类物质,此类物质一般难以完全从合成体系中除去。盐酸吉西他滨为人工合成的新型二氟核苷类抗代谢抗肿瘤药,根据企业提供的合成路线及文献报道,盐酸吉西他滨的合成过程中使用了甲磺酰氯、甲醇、乙醇、异丙醇等溶剂,存在生成甲磺酸酯类基因毒性杂质的可能;如甲磺酸盐类药物,也是因为在药物合成过程中使用甲磺酸及各种常见的醇类物质,存在生成甲磺酸酯类基因毒性杂质的可能。因此,在原料药的研发过程、日常检验以及对在流通环节药品的检测中,能够在微量水平上定性定量检测出药物(特别是甲磺酸盐药物)中的甲磺酸酯类基因毒性杂质是至关重要的。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足之处,本发明的目的在于提供一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,能够针对盐酸吉西他滨原料药或者盐酸吉西他滨注射剂中的甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯这些基因毒性杂质在微量水平上进行定量检测。

[0007] 为了实现本发明的上述目的,采用以下技术方案:

[0008] 一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 在盐酸吉西他滨中加入1,2-二氯乙烷,进行超声后,加入1,2-二氯乙烷定容得到提取液,提取液过滤,取续滤液,得供试品溶液;

[0010] 2) 采用GC-MS/MS法测定步骤1)中的供试品溶液,采用外标法计算盐酸吉西他滨中各甲磺酸酯类基因毒性杂质的含量;

[0011] 所用气相色谱柱为VF-624ms色谱柱;

[0012] 所述甲磺酸酯类基因毒性杂质包括甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯。

[0013] 进一步地,步骤1)所述提取液中盐酸吉西他滨与1,2-二氯乙烷的质量体积比为0.022-0.026g/ml;优选地,步骤1)所述提取液中盐酸吉西他滨与1,2-二氯乙烷的质量体积比为0.024g/ml。

[0014] 对上述方法中的质量体积比的含义进行举例说明如下:

[0015] 例如,当配制供试品溶液时,称取的盐酸吉西他滨的质量为1.2g,容量瓶为50ml,其质量体积比的计算方法为:1.2g/50ml=0.024g/ml。

[0016] 此处描述的1.2g是对小数点后第二位四舍五入之后获得的数值。

[0017] 本发明提供的另外一些具体实施方式中,称取的盐酸吉西他滨的质量还可以是1.1g或1.3g,当容量瓶为50ml时,其获得的提取液中盐酸吉西他滨相应的质量体积比分别是0.022g/ml和0.026g/ml。

[0018] 其中的盐酸吉西他滨的质量是指盐酸吉西他滨原料药样品质量,当盐酸吉西他滨为注射用盐酸吉西他滨时,其中的盐酸吉西他滨的质量按照注射用盐酸吉西他滨中所添加的盐酸吉西他滨原料药计。

[0019] 进一步地,步骤1)所述超声的频率为40000Hz。

[0020] 进一步地,所述超声的时间为25-35min,优选地,所述超声的时间为30min。

[0021] 进一步地,

[0022] 当盐酸吉西他滨为原料药时,步骤1)采用的具体步骤为:

[0023] 取盐酸吉西他滨约1.2g,精密称定,置于50ml容量瓶中,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30min,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,得到供试品溶液;

[0024] 当盐酸吉西他滨为注射用盐酸吉西他滨时,步骤1)采用的具体步骤为:

[0025] 取注射用盐酸吉西他滨6瓶(相当于盐酸吉西他滨1.2g),用1,2-二氯乙烷25ml将内容物转移至50ml量瓶中,加1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得注射用盐酸吉西他滨供试品溶液。

[0026] 本发明提供的上述供试品溶液的配制方法,选用直接提取法,可有效地将盐酸吉西他滨中五种甲磺酸酯类基因毒性杂质提取出来,其提取的操作步骤少,提取方法方便快捷,样品无需经过多次萃取操作,所提取样品无需干燥除水可直接作为供试品进样检测。经方法学验证,本发明方法对盐酸吉西他滨原料药中5种甲磺酸酯类基因毒性物质检测,其平均回收率为99%-104%。

[0027] 进一步地,在步骤2)中,采用的气相色谱测定条件为:

[0028] 柱长为60m,直径为0.25mm,膜厚为1.4 μ m;

[0029] 柱温:采用程序升温,起始温度120 $^{\circ}$ C,以10 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ 升温至250 $^{\circ}$ C保持5min;

[0030] 进样口温度:250 $^{\circ}$ C;

[0031] 恒流流速:1.0ml/min;

[0032] 分流进样,分流比:10:1;

[0033] 进样量:1 μ L。

[0034] 进一步地,在步骤2)中,采用的质谱测定条件为:

[0035] EI源温度:230 $^{\circ}$ C;

[0036] 电子能量:70eV;

[0037] 溶剂延迟时间:6.5min。

[0038] 进一步地,在进行质谱操作时,所采用的定性定量的离子对和碰撞能如下:

	待测化合物	离子对性质	离子对	碰撞能 (mv)
[0039]	甲磺酸甲酯	定量	110 \rightarrow 79	10
		定性	80 \rightarrow 65	5
			80 \rightarrow 48	40
	甲磺酸乙酯、 甲磺酸丙酯及甲 磺酸丁酯	定量	123 \rightarrow 79	5
		定性	109 \rightarrow 79	5
			109 \rightarrow 45.1	2
	甲磺酸异丙	定量	123 \rightarrow 79	5
[0040]	酯	定性	123 \rightarrow 59.1	2
			123 \rightarrow 45.1	5

[0041] 本发明的技术方案具有以下优点：本发明提供的一种GC-MS/MS法检测盐酸吉西他滨中甲磺酸酯类基因毒性杂质的方法，经方法学验证，本方法线性范围宽，线性相关性好；回收试验结果显示平均回收率为93%~104% (原n=9)，RSD (%) < 3.0，表明该方法准确度较高，能够很好实现甲磺酸酯类基因毒性杂质残留量的准确测定；重复性及精密度试验表现良好。5种甲磺酸酯类待测成分定量限均为10ng/ml；检出限为5ng/ml，说明该方法灵敏度较高。本发明检测方法采用的MRM模式 (multiple reaction monitoring, 质谱多反应监测)，选择各待测成分特异性较高的离子对进行监测分析，与GC-MS方法比较，专属性更好，抗干扰能力更强。

[0042] 综上所述，本方法具有抗干扰能力强，噪音低，专属性强，灵敏度高的特点，可以很好的应用于生产企业盐酸吉西他滨原料药和注射用盐酸吉西他滨中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯等甲磺酸酯类基因毒性杂质的日常检测。对该药品生产、日常监督检验具有重要意义，同时有助于提升该药品的质量，进一步降低临床用药风险，保证患者用药安全。

附图说明

- [0043] 图1甲磺酸甲酯线性关系试验结果；
- [0044] 图2甲磺酸乙酯线性关系试验结果；
- [0045] 图3甲磺酸异丙酯线性关系试验结果；
- [0046] 图4甲磺酸丙酯线性关系试验结果；
- [0047] 图5甲磺酸丁酯线性关系试验结果；
- [0048] 图6空白溶剂 (1,2-二氯乙烷) 色谱图；
- [0049] 图7对照品溶液的色谱图；
- [0050] 图8定量限色谱图；
- [0051] 图9检出限色谱图；
- [0052] 图10对比例2中乙酸乙酯作为溶剂的色谱图。

具体实施方式

[0053] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限制本发明的范围。下述实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或者制造商建议的条件进行。所用试剂或者仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0054] 实施例1

[0055] 1仪器和试剂

[0056] Agilent 7890B-7000C气相色谱-串联质谱仪

[0057] 二氯乙烷来源：梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；批号：P1529190；

[0058] 乙酸乙酯来源：LiChrosolv；批号：10942649812；纯度：质谱级

[0059] 无水硫酸钠：西陇科学股份有限公司；批号：1801051；含量≥99.0%；纯度：分析纯

[0060] 对照品来源

[0061] 甲磺酸甲酯来源：SIGMA-ALDRICH；批号：MKCG1346；含量：>99%

[0062] 甲磺酸乙酯来源:SIGMA-ALORICH;批号:BCBW8635;

[0063] 甲磺酸异丙酯来源:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;批号:A031422;含量:>98.0%

[0064] 甲磺酸丙酯来源:梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;批号:G6G6L-OM;含量:>99%

[0065] 甲磺酸丁酯来源:北京百灵威科技有限公司;批号:LS20S35;含量:>98.5%。

[0066] 供试品溶液配制方法:取盐酸吉西他滨原料药约1.2g,精密称定,置50ml量瓶中,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得原料药供试品溶液。

[0067] 取注射用盐酸吉西他滨6瓶(约相当于盐酸吉西他滨1.2g),用1,2-二氯乙烷25ml将内容物转移至50ml量瓶中,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得注射用盐酸吉西他滨试验供试品溶液。

[0068] 2方法学

[0069] 2.1.1色谱与质谱条件

[0070] 色谱柱:VF-624MS (60m×0.25mm×1.4μm) 石英毛细管柱;

[0071] 测定条件:

[0072] 载气:氦气,纯度≥99.999%,流速:1.0mL/min;碰撞气:氮气,纯度≥99.999%。

[0073] 柱温:采用程序升温,起始温度120℃,以10℃·min⁻¹升温至250℃保持5min;

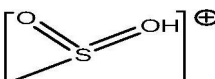
[0074] 进样口温度:250℃;恒流流速:1.0ml/min;分流进样,分流比:10:1

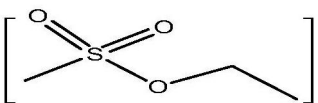
[0075] 进样量:1μL

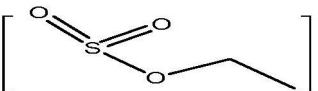
[0076] 电离方式:EI离子源,源温度:230℃,电子能量:70eV;溶剂延迟时间:6.5min。

[0077] 各甲磺酯类待测物对照品经离子源电离并通过GC-MS/MS的扫描(SCAN)模式测试,

甲磺酸甲酯选择分子离子( 分子量110) 以及其去甲氧基碎片离子(

 分子量80) 作为定性定量母离子;甲磺酸乙酯、甲磺酸丙酯、甲磺酸丁酯选

择碎片离子(分子离子)( 分子量123) 及其碎片离子(

 分子量109) 作为定性定量母离子;甲磺酸异丙酯选择碎片离子

(分子离子)( 分子量123) 作为定性定量母离子。

[0078] 离子对及碰撞能优化:采用上述各待测物母离子通过子离子扫描模式测试优化出各自特异性较强、丰度较大的离子对。通过碰撞能优化,最终选定了各待测物最终的定性定量离子对及其相应的碰撞能,详见表1。

[0079] 表1离子对选择及碰撞能信息

[0080]	待测化合物	离子对性质	离子对	碰撞能 (mv)
	甲磺酸甲酯	定量	110→79	10
		定性	80→65	5
			80→48	40
	甲磺酸乙酯、甲磺酸丙酯及甲磺酸丁酯	定量	123→79	5
		定性	109→79	5
			109→45.1	2
	甲磺酸异丙酯	定量	123→79	5
		定性	123→59.1	2
			123→45.1	5

[0081] 2.1.2测定法

[0082] 精密量取系列混合对照溶液各1μL,分别注入气相色谱仪,以测量值为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。精密量取供试品溶液1μL,分别注入气相色谱仪中测定,从标准曲线上计算得相应的浓度。

[0083] 2.1.3线性关系

[0084] 精密称取甲磺酸甲酯10.25mg,甲磺酸乙酯10.10mg,甲磺酸异丙酯10.15mg,甲磺酸丙酯10.33mg,甲磺酸丁酯10.26mg,置同一10ml量瓶中,加1,2-二氯乙烷溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置200ml量瓶中,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,作为对照品混合贮备液(约5μg/ml);

[0085] 精密量取对照品混合贮备液0.5、1、2、3、4、5、6ml,分别置100ml量瓶中,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液①、②、③、④、⑤、⑥、⑦;即得各待测物浓度约为25、50、100、150、200、250、300ng/ml系列对照品溶液。对照溶液线性关系试验结果详见表2及图1-5,空白溶液及对照品溶液色谱图见图6-7。

[0086] 根据欧洲药物委员会发行了关于GTI控制的指导原则,以及ICH发行的关于基因杂质(ICH M7)的指导原则的相关要求,甲磺酸酯类以药物每日最大摄入量(MDD)为基础,毒理性方面的阈值为1.5μg/day。注射用盐酸吉西他滨说明书中的用法用量显示,注射用盐酸吉西他滨周最大注射用量为1000mg/m²,按成年人平均人体表皮面积1.6m²计,按1.5μg/d基因毒性杂质限度计算,甲磺酸酯类应不得过6.6ppm。本试验盐酸吉西他滨供试品浓度为0.024g/ml,因此各甲磺酸酯类在供试品溶液中的浓度应不得过158ng/ml,本试验线性关系试验中对照品溶液浓度在25~300ng/ml,其150ng/ml浓度点作为中间点浓度,最低浓度点25ng/ml为各待测物仪器定量限浓度,远低于150ng/ml,因此线性关系试验各对照品溶液浓度设置较为合理。

[0087] 表2对照溶液线性关系试验结果

	元素	线性方程	R^2
[0088]	甲磺酸甲酯	$y = 278.162x - 707.566$	0.9996
	甲磺酸乙酯	$y = 293.728x - 226.937$	0.9999
	甲磺酸异丙酯	$y = 137.235x + 392.856$	0.9997
[0089]	甲磺酸丙酯	$y = 309.459x + 181.463$	0.9997
	甲磺酸丁酯	$y = 146.073x + 299.163$	0.9996

[0090] 由图1-7以及上表2的结果可知：本方法线性范围宽，线性相关性好。

[0091] 2.1.4回收率试验

[0092] 精密量取对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 10ml, 置100ml量瓶中, 用1,2-二氯乙烷稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率试验混合对照品溶液;

[0093] 取盐酸吉西他滨原料药约1.2g, 精密称定9份, 分别置50ml量瓶中, 分别精密对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1、1、1、1.5、1.5、1.5、2、2、2ml, 加1,2-二氯乙烷至约40ml, 超声30分钟, 放冷, 用1,2-二氯乙烷稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得回收率试验供试品溶液, 按“2.1.2测定法”项下方法测定, 用“2.1.3线性关系”项下标准曲线计算各待测物的回收结果, 详见表3。

[0094] 表3待测物在原料药中回收试验结果

[0095]

待测物 名称	回收率（%）									平均回 收率 （%）	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
甲磺酸 甲酯	99.86	100.12	104.61	104.51	104.14	105.56	104.20	104.44	104.12	103.51	1.97
甲磺酸 乙酯	98.99	96.00	101.67	102.85	101.92	103.70	103.61	102.89	102.74	101.60	2.49
甲磺酸 异丙酯	97.37	94.15	100.04	100.15	100.06	100.62	101.06	100.78	100.44	99.41	2.26
甲磺酸 丙酯	99.34	99.20	103.59	104.42	102.62	103.69	103.00	102.46	103.13	102.38	1.82
甲磺酸 丁酯	102.29	100.61	107.51	105.18	104.72	103.71	103.61	103.15	103.94	103.86	1.85

[0096] 由表3可知：本方法对盐酸吉西他滨原料药的回收率为99%~104%，RSD (%) < 3.0, 表明该方法用于盐酸吉西他滨原料药中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯的检测准确度较高。

[0097] 取注射用盐酸吉西他滨6瓶(约相当于盐酸吉西他滨1.2g), 用1,2-二氯乙烷25ml将内容物转移置50ml量瓶中, 同法制备9份, 分别精密加入对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1、1、1、1.5、1.5、1.5、2、2、2ml, 加1,2-二氯乙烷至约40ml, 超声30分钟, 放冷, 用1,2-二氯乙烷稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得回收率试验供试品溶液, 以2.2.2测定法测定, 用2.2.3线性关系计算各待测物的回收结果。回收试验结果详见表4。

[0098] 表4待测物在注射用吉西他滨中回收试验结果

待测物名称	回收率 (%)									平均回收率 (%)	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
[0099] 甲磺酸甲酯	102.64	100.65	100.88	100.22	100.74	99.26	100.74	99.87	98.66	100.41	1.12
甲磺酸乙酯	99.73	100.30	98.84	97.32	98.76	97.67	98.76	98.16	97.17	98.52	1.07
甲磺酸异丙酯	96.08	95.78	95.35	92.77	92.14	91.02	92.14	91.28	90.77	93.04	2.28
甲磺酸丙酯	98.95	97.87	97.54	95.03	95.74	94.58	95.74	94.05	95.10	96.07	1.74
甲磺酸丁酯	97.76	97.69	95.54	91.96	93.08	93.01	93.08	93.06	92.97	94.24	2.33

[0100] 由表4可知:本方法对注射用盐酸吉西他滨中基因毒性物质的测定,平均回收率为93%-101%,RSD(%)<3.0,表明该方法用于注射用吉西他滨中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯和甲磺酸丁酯的检测准确度较高。

[0101] 2.1.5精密度试验

[0102] 取“2.2.3”项混合对照品溶液④,按“2.2.1”项下试验条件重复进样测定6次,记录测定结果。结果详见表5,表明仪器精密度良好。

[0103] 表5精密度试验结果

	精密度试验测定结果 (ng/ml)						平均结果 (ng/ml)	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
[0104] 甲磺酸甲酯	150.67	151.04	151.45	151.70	151.93	151.32	151.35	0.30
甲磺酸乙酯	152.16	151.17	149.94	149.59	152.31	152.45	151.27	0.83
甲磺酸异丙酯	151.61	151.28	151.70	149.87	148.98	148.89	150.39	0.87
[0105] 甲磺酸丙酯	156.35	153.63	151.67	153.28	155.11	154.23	154.04	1.04
甲磺酸丁酯	156.88	150.40	152.18	150.40	150.41	148.86	151.52	1.87

[0106] 2.1.6重复性试验

[0107] 取盐酸吉西他滨原料药约1.2g,精密称定6份,分别置50ml量瓶中,各份样品中分别精密加入对照品混合贮备液(约5μg/ml) 1.5ml,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得盐酸吉西他滨原料药重复性试验溶液。结果表明样品测定重复性良好,详见表6。

[0108] 表6待测物在盐酸吉西他滨原料药中重复性试验结果

	精密度试验测定结果 (ng/ml)						平均结果 (ng/ml)	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
[0109] 甲磺酸甲酯	149.08	149.43	148.97	149.22	149.82	150.23	149.46	0.32
甲磺酸乙酯	149.08	149.43	148.97	149.22	149.82	150.23	149.46	0.32
甲磺酸异丙酯	143.98	143.64	143.22	142.23	143.56	143.63	143.38	0.43
甲磺酸丙酯	144.96	144.31	145.12	144.19	144.50	144.40	144.58	0.26
甲磺酸丁酯	144.91	144.37	145.31	142.69	143.41	144.35	144.18	0.67

[0110] 取注射用盐酸吉西他滨6瓶(约相当于盐酸吉西他滨1.2g),用1,2-二氯乙烷25ml

将内容物转移置50ml量瓶中,同法制备6份,分别精密加入对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1.5ml,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得注射用盐酸吉西他滨重复性试验溶液,以2.2.2测定法测定,用2.2.3线性关系计算各待测物含量。结果详见表7,表明样品测定重复性良好。

[0111] 表7待测物在注射用盐酸吉西他滨中重复性试验结果

	精密度试验测定结果 (ng/ml)						平均结果 (ng/ml)	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
[0112] 甲磺酸甲酯	151.83	151.50	155.11	152.77	152.32	151.80	152.55	0.87
甲磺酸乙酯	150.29	148.81	151.14	147.61	147.28	150.11	149.21	1.04
甲磺酸异丙酯	141.59	142.52	142.64	138.12	138.71	137.01	140.10	1.75
甲磺酸丙酯	149.97	148.02	150.08	146.46	145.10	145.48	147.52	1.48

[0113] 甲磺酸丁酯	147.15	142.32	145.90	140.27	138.52	141.54	142.62	2.32
--------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	------

[0114] 2.1.7稳定性试验

[0115] 取盐酸吉西他滨原料药约1.2g,精密称定,分别置50ml量瓶中,样品中精密加入对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1.5ml,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,经0、2、4、6、8、10、12、24小时按“2.1.1”项下试验条件,“2.1.2”项下测定法测定,考察样品溶液的稳定性。结果表明样品溶液在24小时内各待测物稳定,详见表8。

[0116] 表8稳定性试验结果

待测物 进样时间	甲磺酸甲酯 (ng/ml)	甲磺酸乙酯 (ng/ml)	甲磺酸异丙酯 (ng/ml)	甲磺酸丙酯 (ng/ml)	甲磺酸丁酯 (ng/ml)
[0117] 0 小时	145.10	140.11	142.80	142.31	141.15
2 小时	148.21	143.16	144.15	144.38	143.06
4 小时	149.57	144.76	144.38	146.59	145.85
6 小时	147.52	144.20	143.60	144.62	143.16
8 小时	149.62	143.49	143.90	144.59	143.10
10 小时	150.63	144.20	143.53	145.32	144.40
12 小时	152.63	146.89	143.84	146.27	146.40
24 小时	154.43	146.99	141.92	145.42	143.41
平均值	149.71	144.22	143.51	144.94	143.82
RSD(%)	1.95	1.52	0.56	0.91	1.17

[0118] 取注射用盐酸吉西他滨6瓶(约相当于盐酸吉西他滨1.2g),用1,2-二氯乙烷25ml将内容物转移置50ml量瓶中,精密加入对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1.5ml,加1,2-二氯乙烷至约40ml,超声30分钟,放冷,用1,2-二氯乙烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,经0、2、4、6、8、10、12、24小时按“2.2.1”项下试验条件,“2.2.2”项下测定法测定,考察样品溶液的稳定性。结果详见表9,表明样品溶液在24小时内各待测物稳定。

[0119] 表9稳定性试验结果

待测物 进样时间	甲磺酸甲酯 (ng/ml)	甲磺酸乙酯 (ng/ml)	甲磺酸异丙酯 (ng/ml)	甲磺酸丙酯 (ng/ml)	甲磺酸丁酯 (ng/ml)
0 小时	152.51	150.89	140.97	150.23	146.68
2 小时	151.63	148.37	140.95	150.17	147.52
4 小时	153.70	149.31	140.75	148.34	144.88
6 小时	153.08	147.97	139.30	147.36	142.06
8 小时	153.47	150.74	138.76	145.82	142.78
10 小时	152.97	148.39	137.50	147.45	141.22
12 小时	150.96	145.76	136.02	143.47	140.72
24 小时	150.65	146.85	137.99	144.66	142.33
平均值	152.37	148.53	139.03	147.19	143.52
RSD(%)	0.76	1.19	1.30	1.66	1.77

[0121] 2.1.8检出限与定量限

[0122] 取对照品溶液,逐步稀释后进样测试,以信噪比约为10:1时相应质量浓度为定量限浓度,以信噪比约为3:1时相应质量浓度为检测限浓度,根据进样量计算检测限和定量限。结果详见表10,定量限及检出限色谱图见图8-9。

[0123] 表10检出限与定量限结果

待测物名称	定量限浓度 (ng/ml)	检出限浓度 (ng/ml)
甲磺酸甲酯	10.15	5.07
甲磺酸乙酯	10.10	5.05
甲磺酸异丙酯	9.95	4.97
甲磺酸丙酯	10.23	5.11
甲磺酸丁酯	10.11	5.05

[0125] 由图8-9以及表10可以看出,本发明提供的方法灵敏度高。

[0126] 实施例2

[0127] 按照实施例1提供的供试品溶液的配制方法,将盐酸吉西他滨原料药的质量换成1.1g,其余不变,其方法学数据能够达到实施例1的效果。

[0128] 实施例3

[0129] 按照实施例1提供的供试品溶液的配制方法,将盐酸吉西他滨原料药的质量换成1.3g,其余不变,其方法学数据能够达到实施例1的效果。

[0130] 实施例4

[0131] 按照实施例1提供的供试品溶液的配制方法,将超声提取的时间替换成25min,其余不变,其方法学数据能够达到实施例1的效果。

[0132] 实施例5

[0133] 按照实施例1提供的供试品溶液的配制方法,将超声提取的时间替换成35min,其余不变,其方法学数据能够达到实施例1的效果。

[0134] 对比例1

[0135] 采取1,2-二氯乙烷用萃取法萃取盐酸吉西他滨原料药中基因毒性物质,并检测回收率,萃取方法和检测结果如下:

[0136] 萃取法回收溶液的制备:取盐酸吉西他滨原料药约1.2g 9份,分别精密对照品混合贮备液(约5 μ g/ml) 1、1、1、1.5、1.5、1.5、2、2、2ml,精密加入去离子水50ml,超声(40000Hz) 10分钟,放冷,转移至分液漏斗中,分别精密加入1,2-二氯乙烷15、15、20ml,分次振摇萃取,收集3次萃取后的1,2-二氯乙烷层置100ml离心管中,加无水硫酸钠10g去除水分,滤过,取续滤液即得萃取法回收溶液。按照按“实施例1中2.1.2测定法”项下方法测定,用“2.1.3线性关系”项下标准曲线计算各待测物的回收结果,结果显示萃取法回收率较低,其中,甲磺酸甲酯平均回收率为78.95%;甲磺酸乙酯平均回收率为84.36%;甲磺酸异丙酯平均回收率为88.71%;甲磺酸丙酯平均回收率为87.65%;甲磺酸丁酯平均回收率为89.27%。

[0137] 对比例2

[0138] 选用N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯进行溶剂试验:

[0139] N,N-二甲基甲酰胺制混合对照品溶液的制备:精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯、甲磺酸丁酯各10mg,置同一10ml量瓶中,加N,N-二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置200ml量瓶中,用N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置100ml量瓶中,用N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,即得N,N-二甲基甲酰胺制混合对照品溶液(40ng/ml)。

[0140] N,N-二甲基乙酰胺制混合对照品溶液的制备:精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯、甲磺酸丁酯各10mg,置同一10ml量瓶中,加N,N-二甲基乙酰胺溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置200ml量瓶中,用N,N-二甲基乙酰胺稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置100ml量瓶中,用N,N-二甲基乙酰胺稀释至刻度,摇匀,即得N,N-二甲基乙酰胺制混合对照品溶液(40ng/ml)。

[0141] 乙酸乙酯制混合对照品溶液的制备:精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸丙酯、甲磺酸丁酯各10mg,置同一10ml量瓶中,加乙酸乙酯溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置200ml量瓶中,用乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml,置100ml量瓶中,用乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,即得乙酸乙酯制混合对照品溶液(40ng/ml)。

[0142] 结果显示:盐酸吉西他滨及其甲磺酸酯类基因毒性杂质均在N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺中溶解性较好,但对照品溶液色谱图中甲磺酸甲酯峰无法与溶剂峰分离,导致无法准确测定甲磺酸甲酯;盐酸吉西他滨在乙酸乙酯、1,2-二氯乙烷两种溶剂中较难溶解,但甲磺酸酯类基因毒性杂质溶解性均较好,检测中发现:乙酸乙酯基线噪音较大,导致甲磺酸甲酯灵敏度较低,见图10。而1,2-二氯乙烷中,无溶剂影响,基线噪音较低,各待测物灵敏度较高。

[0143] 对比例3

[0144] 本发明对DB-5ms (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)、VF-624ms (60m \times 0.25mm \times 1.40 μ m)、VF-WAXms (60m \times 0.25mm \times 0.25 μ m) 进行色谱柱优化;

[0145] 结果显示:DB-5ms (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m) 的缺陷是:第一个待测成分峰(甲磺酸甲酯) 易受到溶剂的影响,导致其灵敏度较低。

[0146] VF-WAXms (60m \times 0.25mm \times 1.40 μ m) 的缺陷是:采用VF-WAXms (60m \times 0.25mm \times 1.40 μ m) 毛细管色谱柱及VF-624ms (60m \times 0.25mm \times 1.40 μ m) 毛细管色谱柱均能较好的分离5个待测成分,且各待测成分均不会受溶剂的影响。从各待测成分峰的分度评价,采用VF-624ms

(60m×0.25mm×1.40μm)毛细管色谱柱,各待测成分峰分离度更好。

[0147] 最后应当说明的是,以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

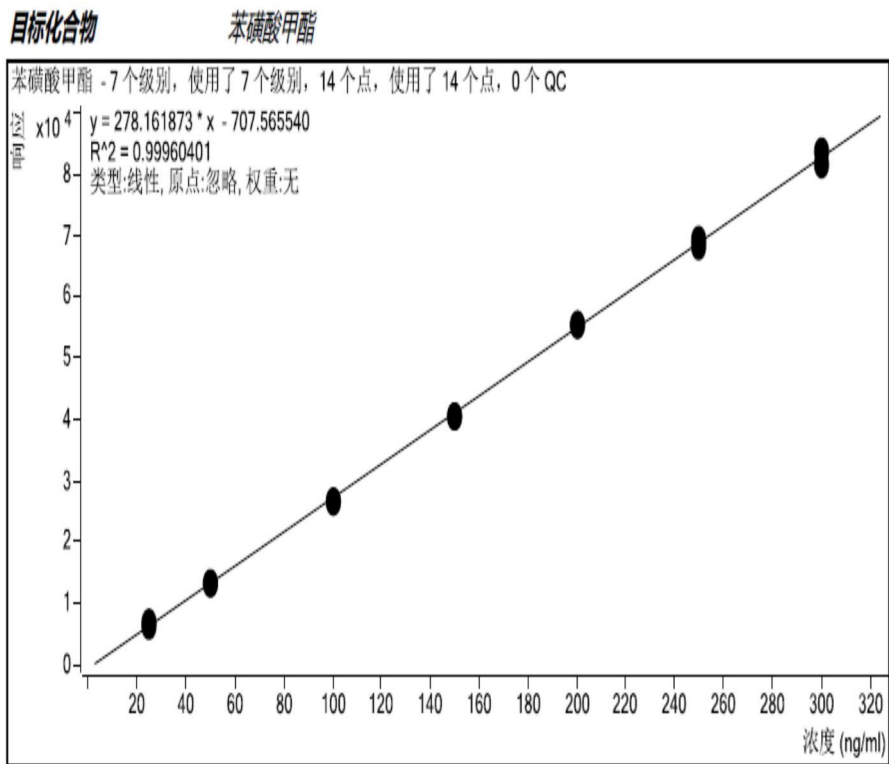


图1

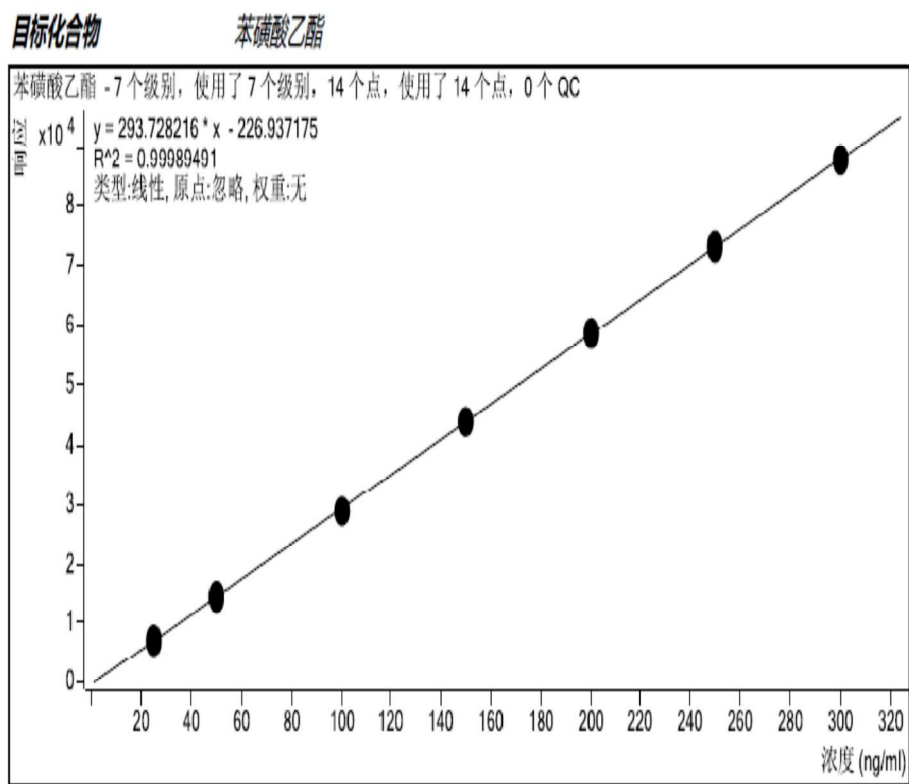


图2

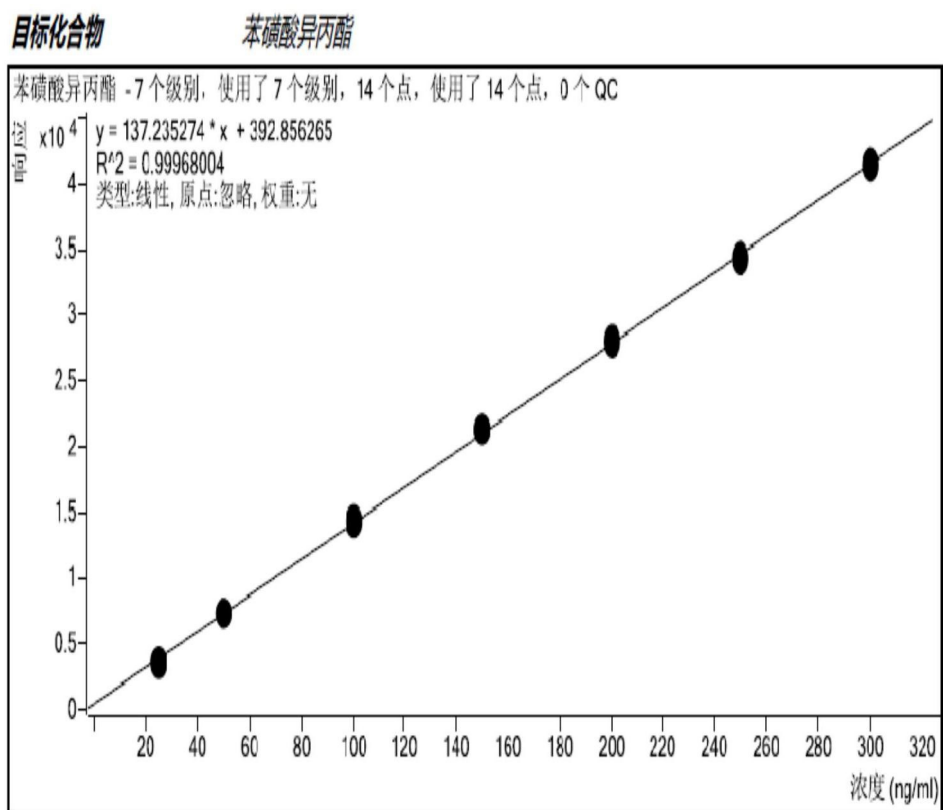


图3

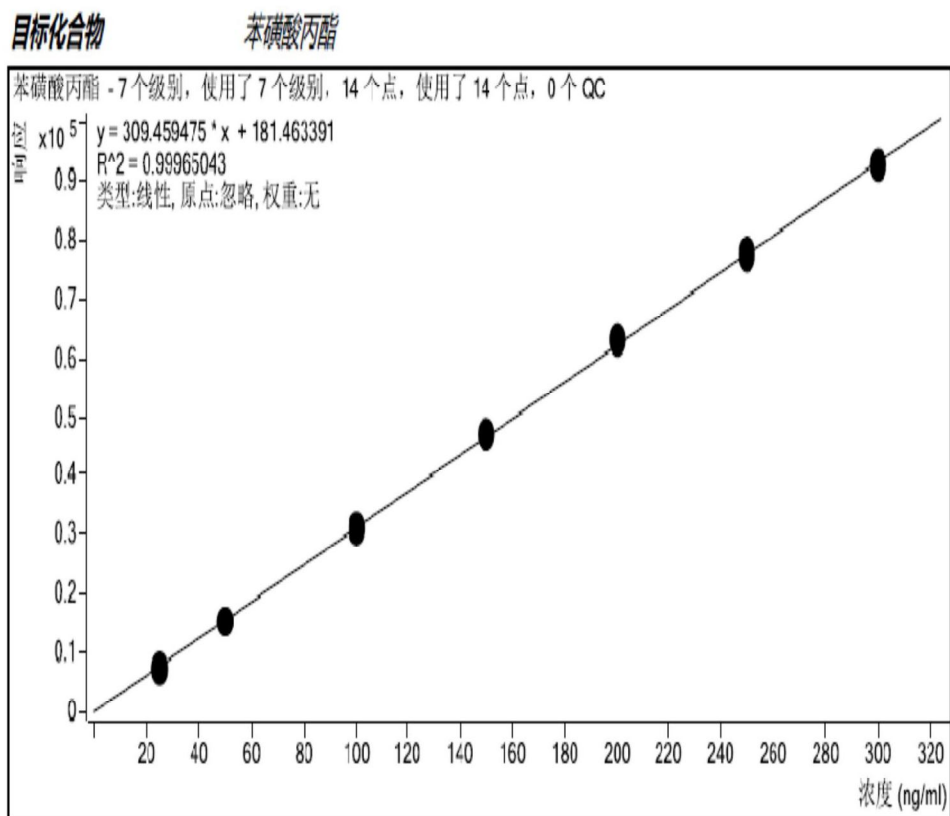


图4

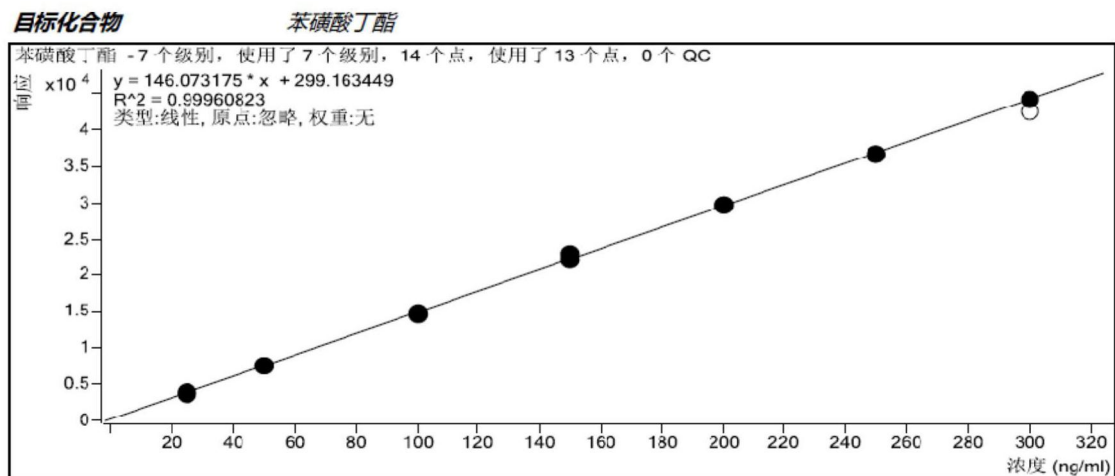


图5

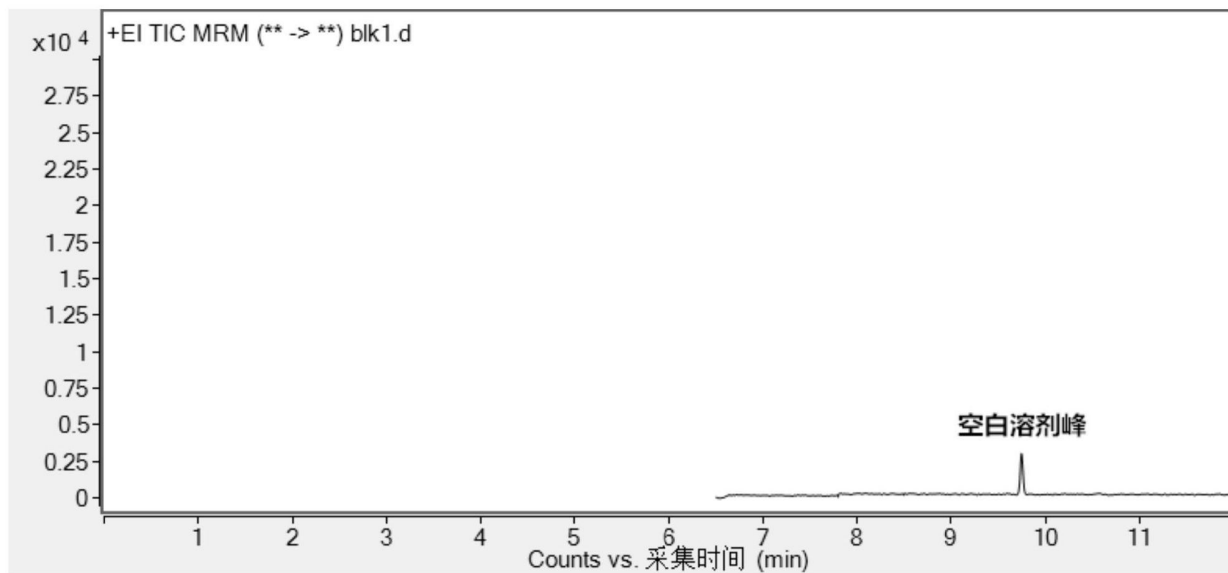


图6

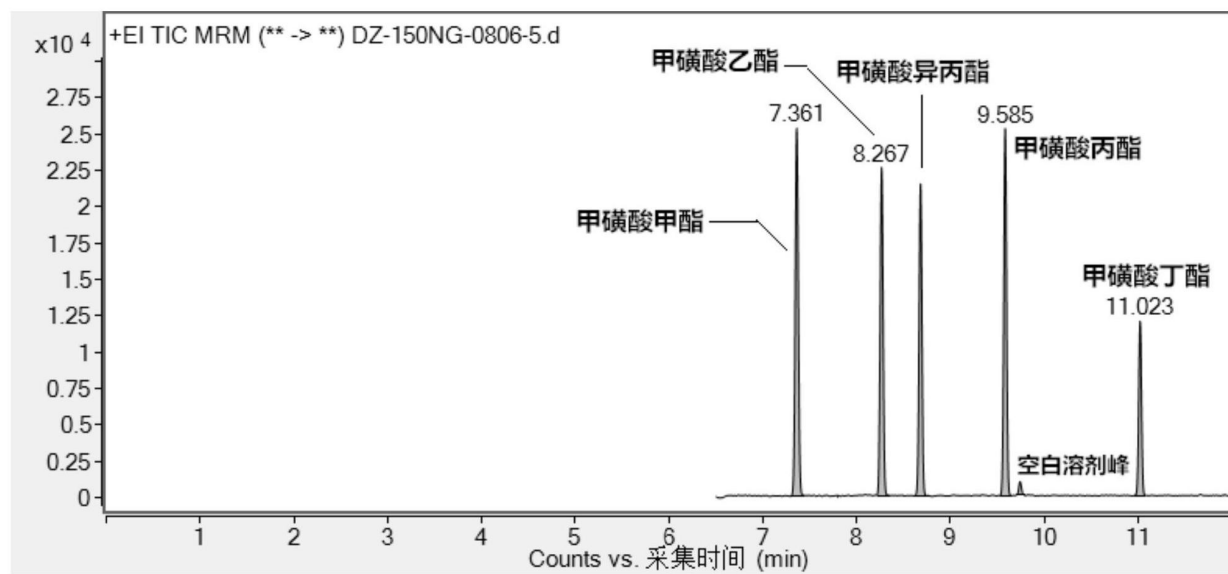


图7

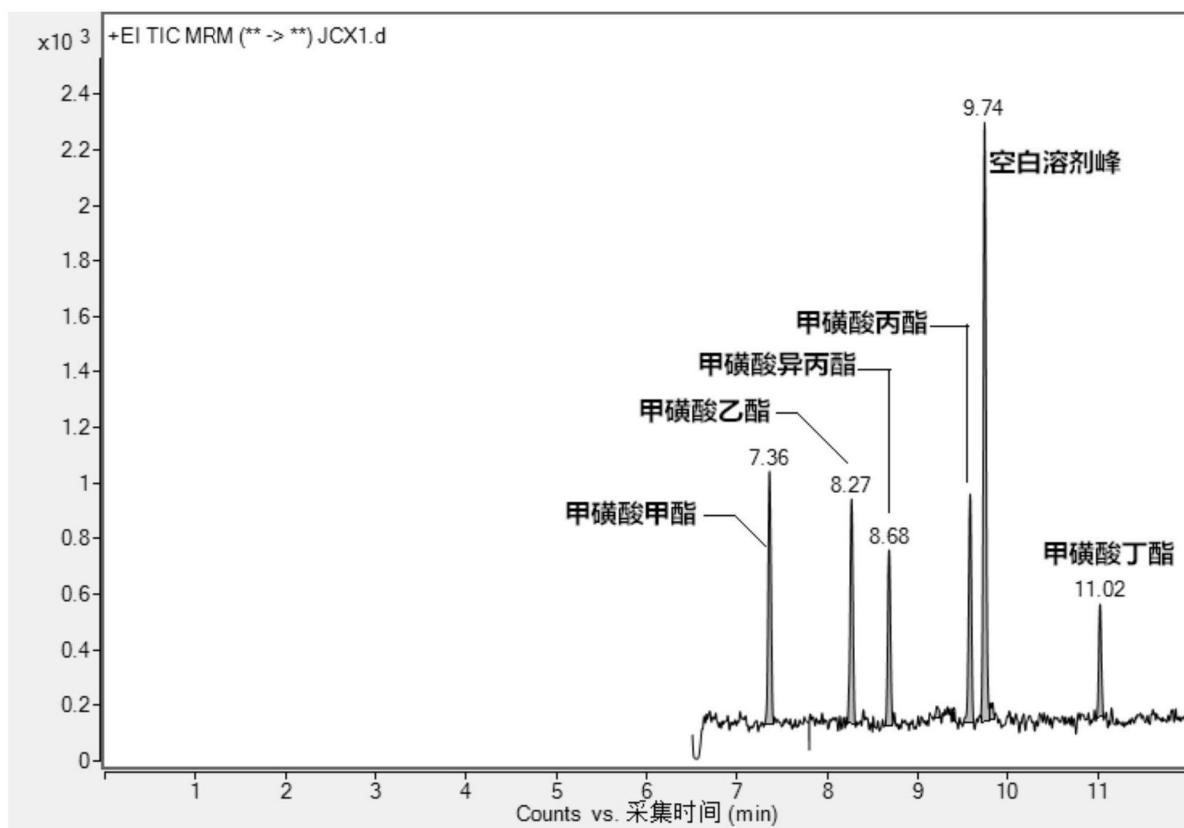


图8

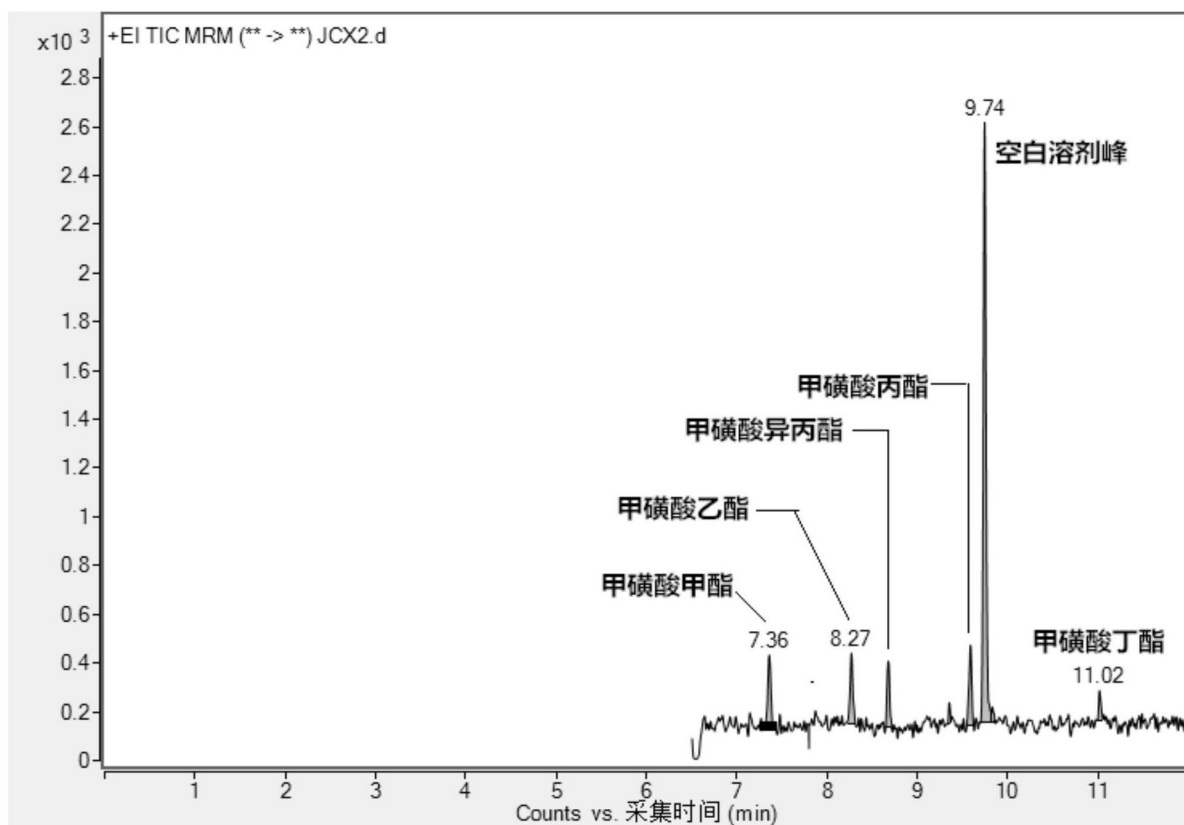


图9

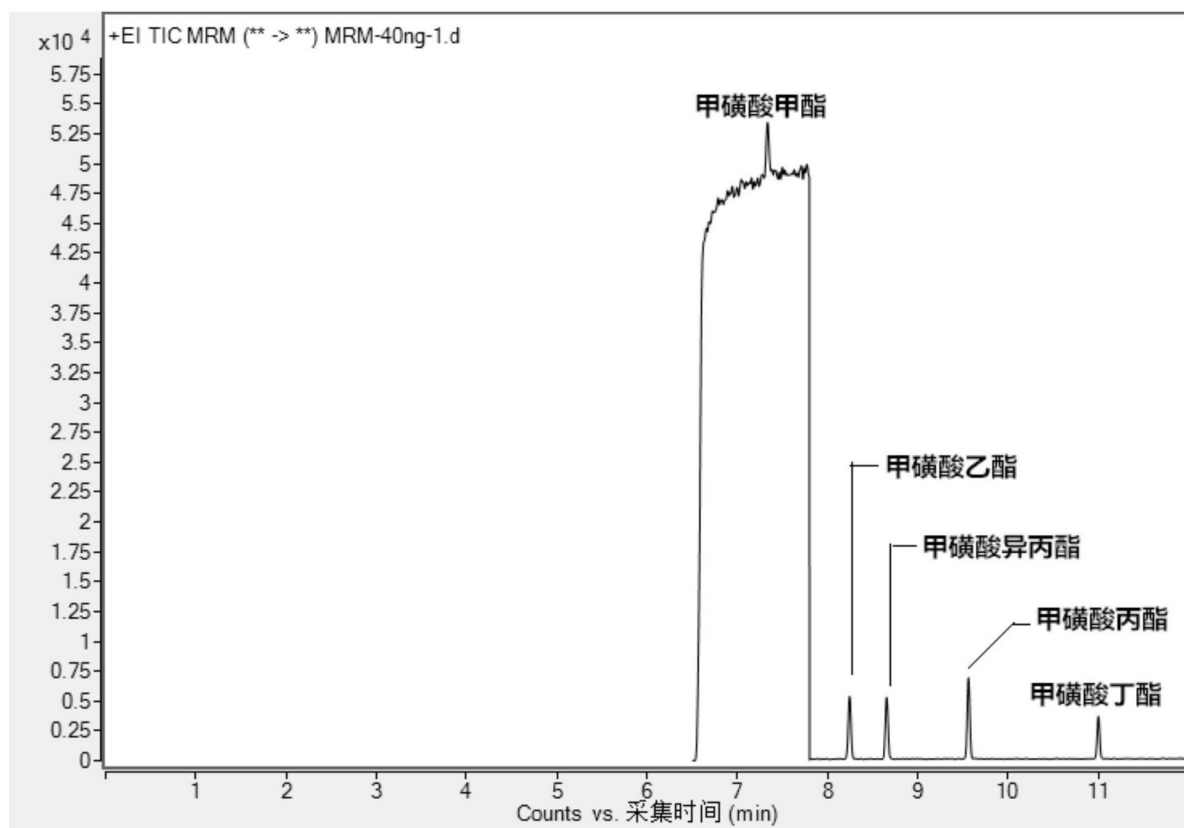


图10