枸橼酸西地那非中硫酸酯类基因毒性杂质的测定

李翠芬[1,2]，钱日彬[1,2]，李健华[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，广东广州 510515；2. 广东省化学药原料与制剂关键技术研究重点实验室，广东广州 510515）

摘要：建立了枸橼酸西地那非（**1**）中硫酸酯类基因毒性杂质硫酸二乙酯（**2**）、硫酸单乙酯（**3**）的检测方法。其中，**2** 采用 GC-MS 法测定，色谱柱为 TG-5SILMS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），载气为氦气，以选择离子监测（SIM）模式进行测定；**3** 采用 LC-M/SMS 法测定，色谱柱为 Agilent Zorbax C_{18}-AQ Plus 柱（4.6 mm×100 mm，3.5 μm），流动相 A 为含 50 mmol/L 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液，B 为甲醇，梯度洗脱。采用电喷雾电离（ESI）源，多反应监测（MRM）模式。结果显示，**2** 和 **3** 分别在 21.1 ～ 422.6、4.06 ～ 81.2 ng/mL 内线性关系良好，平均回收率（n=9）分别为 104.6%、104.8%，检测限分别为 7.04、2.03 ng/mL，定量限分别为 21.1、4.06 ng/mL。建立的方法准确、灵敏、方便，可用于 **1** 中 **2** 和 **3** 的测定。

关键词：枸橼酸西地那非；基因毒性杂质；硫酸二乙酯；硫酸单乙酯

中图分类号：R917；R972^{+}.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)04-0531-05

引用：李翠芬，钱日彬，李健华，等. 枸橼酸西地那非中硫酸酯类基因毒性杂质的测定[J]. 中国医药工业杂志，2025, 56(4): 531-535. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.014

Determination of Sulfates as Genotoxic Impurities in Sildenafil Citrate

LI Cuifen[1,2], QIAN Ribin[1,2], LI Jianhua[1,2], QIN Fei[1,2]*

(*1. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Guangzhou 510515; 2. Key Lab. of Key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations of Guangdong Province, Guangzhou 510515*)

ABSTRACT: The detection methods were established for diethyl sulfate(**2**) and ethyl hydrogen sulphate(**3**) as the genotoxic impurities in sildenafil citrate(**1**). Compound **2** was determined by GC-MS method with TG-5SILMS capillary column(30 m×0.25 mm×0.25 μm) as the chromatographic column, helium as the carrier gas, and selected ion monitoring(SIM) mode for determination. Compound **3** was determined by LC-MS/MS method with an Agilent Zorbax C_{18}-AQ Plus column (4.6 mm×100 mm, 3.5 μm). And the analysis was carried out in the gradient elution mode with 0.1% formic acid solution containing 50 mmol/L ammonium formate as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. The electrospray ionization(ESI) source and multi reaction monitoring(MRM) mode were adopted. The results showed that it was linear for **2** and **3** in the ranges of 21.1 − 422.6 and 4.06 − 81.2 ng/mL, respectively. The average recovery rates(n=9) of **2** and **3** were 104.6% and 104.8% , respectively, with detection limits of 7.04 and 2.03 ng/mL, and quantification limits of 21.1 and 4.06 ng/mL, respectively. The established method is accurate, sensitive, and convenient, which can be used for the determination of **2** and **3** in **1**.

Key Words: sildenafil citrate; genotoxic impurity; diethyl sulfate; ethyl hydrogen sulphate

枸橼酸西地那非（sildenafil citrate，**1**，图 1）是首个上市的 5 型磷酸二酯酶抑制剂（phosphodiesterase type 5 inhibitor，PDE5I）[1]，原研公司为美国辉瑞公司，临床上主要用于治疗男性勃起功能障碍（erectile dysfunction，ED）[2]。2005 年被美国 FDA 批准用于

收稿日期：2024-05-21

基金项目：广东省科技计划项目（项目编号 2019A101002014）

作者简介：李翠芬（1987—），女，硕士，工程师，从事药品质量研究。

通信作者：秦 飞（1988—），男，博士，高级工程师，从事药物研究与开发。

E-mail：102536@byszc.com

肺动脉高压新适应症的治疗[3]。

1 的合成方法报道较多，方法大同小异，必需原料与反应路径相同[4]。本品合成路线以 2- 乙氧基苯甲醛和 4- 氨基 -1- 甲基 -3- 正丙基 -1*H*- 吡唑 -5- 甲酰胺（氨基物）为起始原料，经缩合、磺酰化、缩合、闭环等反应得到西地那非，最后精制成盐获得成品。合成工艺路线中用到了氯磺酸，且后续用到溶剂乙醇，可能发生连续酯化反应而产生硫酸单乙酯（ethyl hydrogen sulphate，**3**）、硫酸二乙酯（diethyl sulfate，**2**）。硫酸酯类化合物中的硫酸酯基团为警示结构（图 1），应按照基因毒性杂质进行研究与控制[5]。张霁等[6]在药物研发中基因杂质的控制策略中提到了辉瑞公司通过改进西地那非的合成工艺，使反应路线中的潜在基因毒性杂质 **2**、**3** 得到了有效控制。

ICH《M7（R2）：评估和控制药物中 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在致癌风险》[7] 附录中列出了部分化合物的适宜摄入量（adequate intake，AI）或每日允许接触量（permitted daily exposure，PDE），其中包含硫酸二甲酯的致癌数据。但 **2**、**3** 的致癌数据未知，因此按照终身可接受摄入量限定在 1.5 μg/d 的毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC），作为 **2**、**3** 的 AI 参考值[7]。**1** 最大日剂量为 100 mg（以西地那非计），基于此计算得出 **2**、**3** 的限度为 1×10^{-5}。

目前关于 **1** 中基因杂质的相关报道较少，检测方法亦未见报道。本研究建立了 GC-MS 法及 LC-MS/MS 法测定 **1** 中的 **2**、**3** 的含量，并进行了系统的方法学验证，对多批次原料样品进行了测定，以建立科学、合理的控制策略，为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

6890N 型气相色谱仪和 5975 型质谱仪（美国 Agilent 公司）；TRIPLE QUAD 4500 型高效液相质联用色谱仪（美国 AB Sciex 公司）；MS204TS/02 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 样品（广州白云山医药集团股份有限公司白云山化学制药厂，含量均大于 99.0 %，批号 JFB1611001、JFB1611002、JFB1611003、JFB1707007、JFB1707008、JFB1707009、JFB1806005、JFB1806006、JFB1806007、JFB1901004、JFB1901005、JFB1901006，）；**2** 对照品（东京化成工业株式会社，含量 98.0 %，批号 AA8YJQH）；**3** 对照品（美国 Sigma-Aldrich 公司，含量 98.9 %，批号 MKCG0312）；甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　溶液配制

2.1.1　**2** 测定相关溶液的配制

空白溶剂①：无水乙醇。

2 对照品贮备液：精密称取 **2** 对照品 10.78 mg，置 50 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并定容，摇匀。精密量取该溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用无水乙醇定容，摇匀，即得。

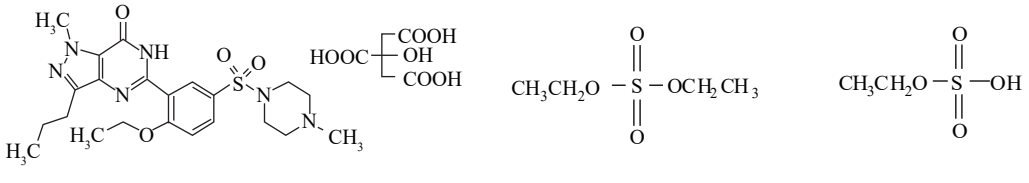
2 对照品溶液：精密量取 **2** 对照品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用无水乙醇定容，摇匀，即得。

供试品溶液①：精密称取 **1** 样品 100 mg，置 5 mL 量瓶中，加无水乙醇适量，旋涡振荡 10 min，加无水乙醇定容，摇匀，过滤，取续滤液即得。

2.1.2　**3** 测定相关溶液的配制

空白溶剂②：取 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，置 5 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，过滤；取续滤液 200 μL，加水 800 μL，混匀，即得。

3 对照品贮备液：精密称取 **3** 对照品 10.26 mg，置 100 mL 量瓶中，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容，摇匀。精密量取该溶液 1.0 mL，置 250 mL



1　　**2**　　**3**

图 1　1 ～ 3 的化学结构

Fig.1　Chemical Structures of **1** – **3**

量瓶中，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液定容，摇匀，即得。

3 对照品溶液：精密量取 **3** 对照品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液定容，摇匀，即得。

供试品溶液②：精密称取 **1** 样品 100 mg，置 5 mL 量瓶中，加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，溶解，再加水定容，摇匀，过滤，取续滤液 200 μL，加水 800 μL，混匀，即得。

2.2 检测条件

2.2.1 GC-MS 条件

色谱条件：色谱柱 TG-5SILMS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；柱温 初始柱温 50 ℃，保持 3 min，以 15 ℃/min 升温至 125 ℃，保持 5 min；进样口温度 200 ℃；载气 氦气；流速 1.0 mL/min；分流比 5∶1；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 电子轰击（electron impact，EI）离子源，选择离子监测（selected ion monitoring，SIM）模式；离子源温度 230 ℃；溶剂延迟时间 6 min；传输接口温度 280 ℃；**2** 碎片离子 *m*/*z* 99、111、125、127、139；定量时采用 SIM 方式，**2** 提取离子 *m*/*z* 139。

2.2.2 LC-MS/MS 条件

色谱条件：色谱柱 Agilent Zorbax C_{18}-AQ Plus 柱（4.6 mm×100 mm，3.5 μm）；流动相 A 为含 50 mmol/L 甲酸铵的 0.1％甲酸溶液，B 为甲醇，梯度洗脱（0—2 min，A 97 %；2—3 min，A 97 %—10 %；3—5 min，A 10 %；5—5.1 min，A 10 %—97%；5.1—10 min，A 97%）；流速 0.3 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子（electrospray ionization，ESI）源，负离子模式检测，多反应离子监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式；喷雾电压 4 500 V；干燥气温度 450 ℃；雾化气压力（GS1）310 kPa，干燥气压力（GS2）310 kPa，气帘气压力 276 kPa，碰撞气压力 55 kPa；扫描时间 200 ms；**3** 的监测离子对 *m*/*z* 125.0、80.0；去簇电压 40 V；碰撞能量 35 V。

2.3 专属性试验

2.3.1 GC-MS 法的专属性考察

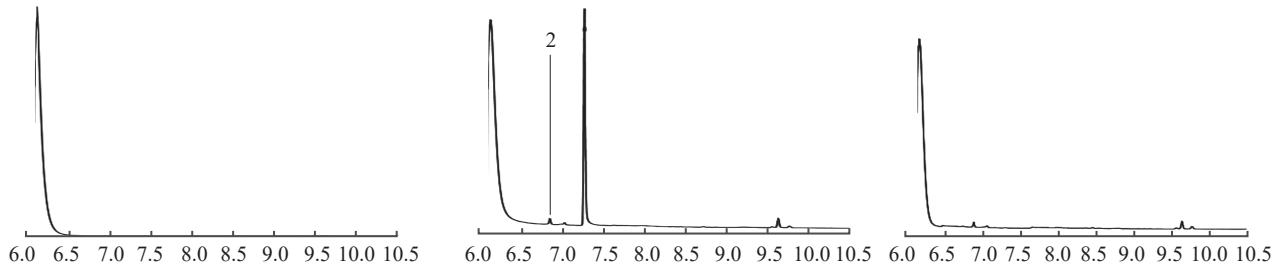
取“**2.1.1**”项下对照品溶液、供试品溶液①和空白溶剂①，按“**2.2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果（图 2）显示，**2** 的保留时间为 7.3 min，在该保留时间处空白溶剂未出峰，对 **2** 检测无干扰。

2.3.2 LC-MS/MS 法的专属性考察

取“**2.1.2**”项下对照品溶液、供试品溶液②和空白溶剂②，按“**2.2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。结果（图 3）显示，**3** 的保留时间为 1.8 min，在该保留时间处空白溶剂未检出相应色谱峰，对 **3** 检测无干扰。

2.4 线性试验

分别精密量取“**2.1.1**”项下 **2** 对照品贮备液 0.1、

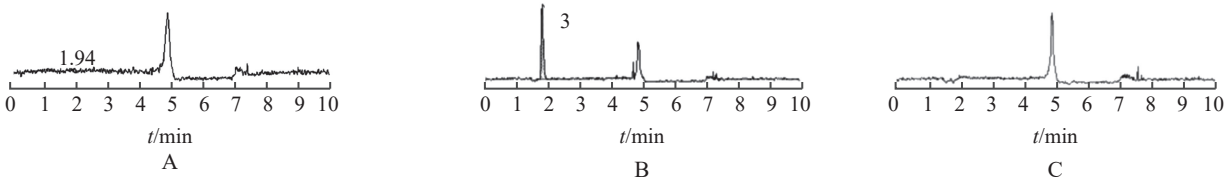


A—空白溶剂①；B—对照品溶液；C—供试品溶液①。

2—**2**。

图 2 GC-MS 专属性典型色图谱

Fig.2 GC-MS Typical Chromatograms of Specificity Test



A—空白溶剂②；B—对照品溶液；C—供试品溶液②。

3—**3**。

图 3　LC-MS/MS 专属性试验典型色图谱

Fig.3　LC-MS/MS Typical Chromatograms of Specificity Test

0.25、0.5、1、1.5、2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用乙醇定容，摇匀，得 **2** 线性系列溶液。分别精密量取“**2.1.2**”项下 **3** 对照品贮备液 0.1、0.25、0.5、1、1.5、2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液定容，摇匀，得 **3** 线性系列溶液。

取上述 **2**、**3** 线性系列溶液，分别按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图。以各组分的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标进行线性回归。结果显示，**2** 的回归方程为 *A*=15.429*c*－140.05（*R*=0.999 6）、**3** 的回归方程为 *A*=0.988 6*c*+1.756 1（*R*=0.999 7），说明 **2** 和 **3** 分别在 21.1 ～ 422.6、4.06 ～ 81.2 ng/mL 内线性关系良好。

2.5　检测限和定量限

取“**2.1**”项下 **2**、**3** 对照品溶液逐级稀释，分别按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）3 ∶ 1 时的浓度为检测限，以 *S*/*N* 为 10 ∶ 1 时的浓度为定量限。测得 **2** 的定量限浓度为 21.1 ng/mL（相当于供试品浓度的 1.05×10^{-6}），检测限浓度为 7.04 ng/mL（相当于供试品浓度的 3.52×10^{-7}）；**3** 的定量限浓度为 4.06 ng/mL（相当于供试品浓度的 1.01×10^{-6}），检测限浓度为 2.03 μg/mL（相当于供试品浓度的 5.1×10^{-7}）。将定量限溶液连续进样 6 次，**2** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 4.3％，**3** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 5.2％。结果表明，建立的方法灵敏度高。

2.6　回收率试验

精密称取 **1**（批号 JFB1901004）100 mg，共 9 份，分别置 5 mL 量瓶中，加入 **2** 对照品贮备液 0.25、0.5、0.75 mL，加适量乙醇，旋涡振荡 10 min，加入无水乙醇定容，摇匀，每个浓度平行 3 份，分别作为低、中、高浓度（50％、100％、150％限度浓度）的 **2** 回收率试验溶液。

精密称取 **1**（批号 JFB1901004）100 mg，共 9 份，分别置 5 mL 量瓶中，加入 **3** 对照品贮备液 1.25、2.5、3.75 mL，加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，溶解，再加水定容，摇匀，过滤，取续滤液 200 μL，加水 800 μL，混匀。每个浓度平行 3 份，分别作为低、中、高浓度（50％、100％、150％限度浓度）的 **3** 回收率试验溶液。

分别取“**2.1.1**”项下 **2** 对照品溶液、供试品溶液①，以及“**2.1.2**”项下 **3** 对照品溶液、供试品溶液②，和上述 **2**、**3** 回收率试验溶液，分别按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定，记录色谱图峰面积，分别计算 **2**、**3** 的回收率。结果显示，**2** 和 **3** 的平均回收率（*n*=9）为 104.6％和 104.8％，RSD 为 5.2％和 5.8％，表明建立的方法准确度高。

2.7　重复性试验

按“**2.6**”项下 100％限度浓度的回收率试验溶液的配制方法，分别配制含 **2**、**3** 的加标样品溶液，各平行配制 6 份。分别按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定，计算含量及 RSD。结果显示，6 份加标样品溶液中测得 **2** 和 **3** 含量的 RSD（*n*=6）为 4.1％和 3.7％，说明方法重复性符合要求。

2.8　稳定性试验

取“**2.1.1**”项下 **2** 对照品溶液、供试品溶液①，以及“**2.1.2**”项下 **3** 对照品溶液与供试品溶液②，于室温条件下放置 2、4、6、8、10、12 h 时取样，分别按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定。结果显示，**2** 对照品溶液和供试品溶液①室温下放置 12 h，主峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 2.1％、2.4％；**3** 对照品溶液和供试品溶液②室温下放置 12 h，主峰面积的

RSD（n=6）分别为 2.8%、3.7%。该结果表明各对照品溶液与供试品溶液在 12 h 内相对稳定。

2.9 样品测定

取 12 批 **1** 样品，分别按“**2.1.1**”“**2.1.2**”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液，并按“**2.2.1**”“**2.2.2**”项下条件进样测定。结果显示，12 批样品中均未检出 **2**、**3**，说明现有生产工艺对 **2**、**3** 的清除能力和控制情况较好。

3 讨论

3.1 方法的选择

2、**3** 的限度均为 1×10^{-5}，普通的 HPLC 法（紫外检测器）无法满足杂质检测的灵敏度要求，因此选用灵敏度高的 GC-MS 以及 LC-MS/MS 法进行测定。由于 **2** 沸点为 208 ℃，满足气相色谱 - 质谱的气化要求，故本研究采用 GC-MS 法测定 **2**，同时也考察了 DMSO、DMF、50%乙醇、无水乙醇等溶剂，其中 DMSO、DMF 的干扰较大，50%乙醇作溶剂时峰宽较宽且回收率低，而无水采用乙醇作溶剂时峰形较好。由于 **3** 在衬管的高温状态下易分解，故不适合采用 GC-MS 法测定，所以采用了 LC-MS/MS 法进行检测，由于 **3** 在碱溶液中易溶解，故选择氢氧化钠溶液作为溶剂。

3.2 关于测定过程中 **2**、**3** 可能发生水解或转化的探讨

2、**3** 为酯类化合物，在一定条件下会发生水解。酯基水解反应的条件通常包括适当的酸性或碱性含水条件、温度和反应时间。**2** 的测定采用 GC-MS 法，测定过程中使用的溶剂为无水乙醇，对其水解有一定阻碍。前期研究中对溶剂的筛选结果也表明，当使用含水乙醇（50%乙醇）作溶剂时，测得 **2** 的回收率低（约 30%），而采用无水乙醇作溶剂时，**2** 的回收率符合要求（104.6%）。而 **3** 的测定采用了 LC-MS/MS 法，柱温为 25 ℃，此条件下 **3** 的水解极为缓慢。针对测定过程中 **3** 是否会水解为硫酸和乙醇，以及测定过程中样品可能存在的 **2** 是否会水解转化为 **3** 的问题，分别进行了样品加标（加入已知量的 **3**）后测定 **3** 回收率以及样品加标（加入已知量的 **2** 和 **3**）后测定 **3** 回收率的试验。结果显示，样品加标（加入 **3**）后测得 **3** 的回收率在 97.2%～112.8%，样品加标（加入 **2** 和 **3**）后测得 **3** 的回收率在 95.8%～104.1%，回收率均符合要求。上述结构说明在样品测定过程中，**3** 和 **2** 的水解极微，对样品中 **3** 测定准确度的影响可忽略。

3.3 杂质控制策略

2、**3** 均为合成路线中可能产生的副产物。本品合成路线中的多个步骤用到乙醇，由于 **3** 在乙醇重结晶过程中易进一步转化为 **2**，而 **2** 为油状液体，不溶于水，易溶于乙醇，在后续乙醇重结晶过程中，可溶于乙醇中而被去除，因此推测 **2**、**3** 的残留的风险较低。采用高灵敏度的 GC-MS、LC-M/SMS 检测方法对 12 批原料药进行检测，均未检出杂质 **2** 或 **3**，证明了现有合成路线能够使 **1** 中杂质 **2**、**3** 得到有效控制。按照 ICH《M7（R2）：评估和控制药物中 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在致癌风险》[7] 中的控制要求，杂质 **2** 或 **3** 无需订入原料药的质量标准，仅在生产工艺路线发生变更时，需重新进行评估及检测。

参考文献：

[1] 杨小刚，武志强，田华山，等．不同剂量、频次枸橼酸西地那非治疗勃起功能障碍患者的疗效观察［J］．现代泌尿外科杂志，2023, **28**(7)：608-612.

[2] CARTOR A J, BALLARD S A, NAYLOR A M．Effect of the selective phosphordiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectilefunction in the anesthetized dog［J］．*J Urol*, 1998, **160**(1)：242-246.

[3] 李文娟．枸橼酸西地那非片的质量研究［D］．广州：华南理工大学硕士学位论文，2022.

[4] 李淑恒，宋煜伟，申鹏翠，等．枸橼酸西地那非原料药新的未知杂质的发现与合成［J］．山东化工，2019, **48**(8)：54-57.

[5] 朱长友，罗　文．GC-MS 法测定塞来昔布中硫酸酯类基因毒性杂质［J］．海峡药学，2022, **34**(10)：26-30.

[6] 张　霁，张英俊，聂　飚．药物研发中基因毒性杂质的控制策略与方法探索进展［J］．中国医药工业杂志，2018, **49**(9)：1203-1220.

[7] ICH．Harmonised guideline: assessment and control of DNA reactive（mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7（R2）［EB/OL］．［2024-02-01］．https://baijiahao．baidu．com/s?id=1793848430440911349&wfr=spider&for=pc.