

# 顶空-气相色谱-质谱法同时测定 7 种 甲磺酸酯类杂质

王少敏<sup>1,2</sup>, 牛颖<sup>1</sup>, 代敏<sup>1</sup>, 魏一<sup>1</sup>, 刘宏民<sup>2</sup>

(1. 郑州大学 化学与分子工程学院 河南 郑州 450001; 2. 新药创制与药物安全性  
评价河南省协同创新中心 河南 郑州 450001)

**摘要:**建立了一种同时测定药物中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯、甲磺酸正丙酯、甲磺酸仲丁酯、甲磺酸异丁酯、甲磺酸正丁酯等 7 种甲磺酸酯类基因毒性物质的原位衍生-顶空-气相色谱-质谱法,改变衍生反应溶剂和用量,优化了反应时间、温度等反应条件以及孵化温度、平衡时间等顶空萃取条件.经方法学验证,7 种甲磺酸酯类化合物在各自的线性范围内线性关系良好( $R^2 > 0.999 0$ ),方法检出限( $S/N=3$ )为 0.21~2.64  $\mu\text{g/L}$ ,定量限( $S/N=10$ )为 0.70~8.81  $\mu\text{g/L}$ ,日内、日间  $RSD$  分别小于 10.3% 和 5.07%,加标回收率为 88.2%~115.1%.对替比培南酯中间体中甲磺酸酯类杂质进行测定,均检出甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸正丙酯残留.该方法可用于活性物质中甲磺酸酯类杂质的同时测定.

**关键词:** 烷基甲磺酸酯; 衍生; 顶空-气相色谱-质谱; 检测

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1671-6841(2019)03-0104-05

DOI: 10.13705/j.issn.1671-6841.2018240

## 0 引言

基因毒性物质是一类能对 DNA 结构造成破坏而产生致癌性的物质,因此对药物中此类物质的检测引起人们广泛关注<sup>[1-3]</sup>.在制药过程中,烷基磺酸常用作原料药的成盐试剂来提高药物的稳定性和溶解性,磺酸酯的前体物质(如磺酰氯)也常用作反应试剂或催化剂,这些应用都可能生成磺酸酯类基因毒性物质<sup>[4]</sup>.替比培南酯是第 1 个可口服的碳青霉烯类抗生素,对大多数临床分离的菌株均具有比青霉素及头孢类抗生素更强的抗菌性,但由于在其侧链的生产中使用了甲磺酰氯<sup>[5]</sup>,会与残留的溶剂醇生成甲磺酸酯,因此需要对替比培南酯侧链中的甲磺酸酯类杂质进行检测.

目前检测甲磺酸酯的方法主要有 GC-MS 法<sup>[6-10]</sup>、LC-MS 法<sup>[11-13]</sup>和气相色谱-微池电子捕获法<sup>[14]</sup>.微池电子捕获检测器灵敏度高,但线性范围窄;质谱(MS)检测器因具有选择性强、灵敏度高、线性范围宽等优势而成为重要的检测手段<sup>[15]</sup>.由于直接进样测定难以避免原料药本身对仪器的污染及离子化效率低等问题,在 GC-MS 方法中,使用低挥发性的衍生试剂,通过顶空萃取挥发性衍生产物可有效降低基质干扰.目前采用较多的方法是以乙腈/水(体积比 80:20)混合溶剂为衍生基质的碘化钠衍生方法<sup>[9-10]</sup>,本文改进了碘化钠衍生方法,将甲磺酸酯与碘化钠在 2-己酮/水(体积比 3:97)溶剂中反应得到相应的碘代烷烃产物,在优化样品的顶空萃取条件和色谱条件的基础上,实现了同时对 7 种甲磺酸酯类杂质的定性、定量检测,可用于活性物质中甲磺酸酯类杂质的检测.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Trace ISQ<sup>TM</sup> 气质联用仪,配套有 Triplus 顶空自动进样器、顶空进样瓶(20 mL)和 Xcalibur 数据处理系统

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(21772180).

作者简介: 王少敏(1973—),女,河南新乡人,教授,主要从事药物分析研究, E-mail: wshaomin@zzu.edu.cn.

(EI 离子源,美国 Thermo Scientific 公司);FiveEasy Plus<sup>TM</sup> pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);Milli-Q Reference 超纯水系统(美国 Millipore 公司).

甲磺酸甲酯(MMS, 98.0%, 吴睿化学有限公司);甲磺酸正丙酯(*n*-PMS)和甲磺酸异丁酯(*i*-BMS)(>98.0%, 梯希爱化成工业发展有限公司);甲磺酸仲丁酯(*s*-BMS)和甲磺酸正丁酯(*n*-BMS)(>98.0%, 苏州麦凯生物医药科技有限公司);甲磺酸乙酯(EMS, 98.5%)、甲磺酸异丙酯(*i*-PMS, 97.0%)、碘化钠(99.0%)、2-己酮(99.0%)(百灵威科技有限公司);内标 CHCl<sub>3</sub>(99.8%, J. T. Baker 公司);硫代硫酸钠(99.0%, Sigma Aldrich 公司);其他试剂均为色谱纯或分析纯.

## 1.2 溶液的配制

衍生试剂:称取 60 g 碘化钠和 30 mg 硫代硫酸钠,加水溶解并稀释至 50 mL,摇匀备用.

内标溶液:量取 CHCl<sub>3</sub> 适量,用 2-己酮溶解并稀释,配制质量浓度为 14.84 g/L 的内标储备液,再用超纯水稀释至质量浓度为 7.42 mg/L 的内标溶液,摇匀备用.

甲磺酸酯类混合标准溶液:精密量取 MMS、EMS、*i*-PMS、*n*-PMS、*s*-BMS、*i*-BMS、*n*-BMS 标准品适量,用 2-己酮溶解并稀释,配制质量浓度约为 5 g/L 的储备液,摇匀,于 4 °C 冷藏备用.精密量取标准品储备液适量,用超纯水分别稀释至质量浓度约为 1、1、3、2、2、2 mg/L 的混合标准溶液,现制现用.

## 1.3 衍生反应

混合标准溶液的衍生:精密量取混合标准溶液 200 μL 置于 20 mL 顶空瓶中,加入超纯水 320 μL、2-己酮 30 μL、内标溶液 50 μL 和衍生试剂 400 μL,立即加盖密封,涡旋混匀,于 60 °C 下反应 20 min.

样品溶液的衍生:精密称取原料药 25 mg 置于 20 mL 顶空瓶中,加入超纯水 520 μL 和 2-己酮 30 μL,涡旋使其溶解,再加入内标溶液 50 μL 和衍生试剂 400 μL,立即加盖密封,涡旋混匀,于 60 °C 下反应 20 min.

## 1.4 色谱-质谱条件

色谱柱为 TR-wax MS 柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);程序升温:40 °C 保持 6 min,然后以 20 °C/min 升至 240 °C,保持 5 min;载气为高纯氦气;流速为 0.8 mL/min,恒流模式;进样口温度 200 °C;进样量 100 μL;进样方式为分流进样,分流比 50:1;孵化室温度 80 °C,平衡时间为 30 min.质谱条件:离子源温度 250 °C;传输线温度 250 °C;EI 离子源能量 70 eV;检测模式为选择离子扫描(SIM).定量监测离子:*m/z* 142(碘甲烷),*m/z* 156(碘乙烷),*m/z* 170(碘代正丙/异丙烷),*m/z* 184(碘代正丁/异丁/仲丁烷);*m/z* 83(CHCl<sub>3</sub>).定性监测离子:*m/z* 127(碘代烷烃),*m/z* 118(CHCl<sub>3</sub>).

# 2 结果分析与讨论

## 2.1 衍生反应条件

**2.1.1 反应溶剂和用量** 目前的碘化钠衍生方法均是以乙腈/水(体积比 80:20)混合溶剂为衍生基质,衍生结束后经顶空萃取,大量的强极性乙腈进入仪器中会产生很强的溶剂峰,不仅降低离子源灯丝的寿命,还容易引起色谱柱的填料流失.因此,对一些出峰位置不干扰检测物目标组分的有机相进行了考察.按 1.3 所述过程操作,其他条件不变,分别加入 30 μL 的有机相苯甲醚、氯苯、正己烷、甲基叔丁基醚、乙酸正丁酯、2-庚酮、正丁醇、2-己酮,与未加入有机相的各组分对比分析,发现 2-己酮效果最好.同时对 2-己酮的用量也进行了优化,确定 2-己酮/水(体积比 3:97)的最佳用量为 30 μL.

**2.1.2 衍生试剂用量** 分别加入 0.2、0.3、0.4、0.5 mL 衍生试剂,按 1.3 所述过程操作,通过调整超纯水用量使顶空瓶内的液体总量保持在 1 mL.结果表明,当衍生试剂加入 0.4 mL 时可达最佳衍生效果,略低于文献[9-10]中 0.5 mL 的用量.

**2.1.3 衍生温度和时间** 按 1.3 所述过程操作,分别在 40、50、60、70 °C 下衍生反应 20 min 后进样测定,发现 60 °C 下衍生效果最佳.在此基础上,考察了反应时间 10、20、30、40 min 对衍生反应的影响,确定最佳反应时间为 20 min.

## 2.2 顶空萃取条件

将衍生后的样品分别在 50、60、70、80 °C 下平衡 30 min 后顶空进样分析.结果发现,随着温度的升高,所检测到的组分含量逐渐增大,其中相对分子质量高的化合物受温度的影响程度较大,考虑到顶空瓶内压力和

气密性等问题,选择在 80 °C 下平衡.在此基础上,考察了在 80 °C 下平衡时间对分析结果的影响,结果表明,平衡 30 min 时萃取效果最好,因此将顶空萃取条件设为 80 °C 下平衡 30 min.

### 2.3 混合标准溶液和衍生物的稳定性

将新制的甲磺酸酯类混合标准溶液于室温下放置,依次取放置 0、20、40、60、80 min 的样品进行分析,发现在 20 min 内各个组分可保持稳定,超出 20 min 后,*s*-BMS 最容易分解,其次是 *i*-PMS 和 *i*-BMS.对衍生物的稳定性进行考察,4 个由混合标准溶液配制的样品衍生后于室温下放置,每隔 24 h 检测 1 个样品,发现碘代烷烃产物在 3 d 内都能保持稳定.

### 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性范围、精密度和回收率** 将甲磺酸酯类混合标准溶液稀释至 7 个质量浓度,以目标物和内标的峰面积比对比样品质量浓度进行线性回归,得到线性回归方程及相关系数.通过混合标准溶液逐级稀释,由信号响应信噪比( $S/N$ )来确定检出限( $S/N=3$ )和定量限( $S/N=10$ ),结果如表 1 所示.分析物标准曲线的线性相关系数均大于 0.999 0,检出限为 0.21~2.64  $\mu\text{g/L}$ ,定量限为 0.70~8.81  $\mu\text{g/L}$ ,对应的实际样品的检出限为 8.4~106 ng/g,定量限为 28~352 ng/g.取混合标准溶液(MMS、EMS、*i*-PMS、*n*-PMS、*s*-BMS、*i*-BMS、*n*-BMS 的质量浓度分别为 10、9、27、18、22、22、18  $\mu\text{g/L}$ )进行日内、日间平行分析,经过精密度计算,相对标准偏差( $RSD, n=3$ )为 0.95%~10.3%,满足方法学的要求.称取替比培南酯中间体样品 25 mg(含微量 MMS、EMS 和 *n*-PMS 杂质),分别加入混合标准溶液(MMS、EMS、*i*-PMS、*n*-PMS、*s*-BMS、*i*-BMS、*n*-BMS 的质量浓度分别为 10、9、27、18、22、22、18  $\mu\text{g/L}$ )进行回收率试验,各目标物的加标回收率为 88.2%~115.1%( $n=3$ ),满足方法学的要求.

表 1 甲磺酸酯类化合物的线性范围、回归方程、相关系数、精密度和回收率

Tab.1 The linear range, regression equation, correlation coefficient, precision and recovery of methanesulfonate compounds

化合物	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	线性回归方程	相关系数	检出限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	定量限/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	日内 $RSD/\%$	日间 $RSD/\%$	平均 回收率/ $\%$
MMS	2.50~400	$Y=0.6102 * X-1.3120$	0.9996	0.53	1.78	10.3	5.07	101.6
EMS	2.25~360	$Y=1.1878 * X-2.2285$	0.9996	0.21	0.70	2.90	4.13	112.3
<i>i</i> -PMS	6.75~1080	$Y=2.1168 * X-5.9091$	0.9998	1.32	4.39	0.95	1.64	115.1
<i>n</i> -PMS	4.50~720	$Y=4.5657 * X-3.4643$	0.9999	0.65	2.15	1.45	2.85	88.2
<i>s</i> -BMS	11.0~880	$Y=2.2816 * X+8.3712$	0.9991	2.64	8.81	1.43	3.18	96.4
<i>i</i> -BMS	5.50~880	$Y=0.3489 * X+1.2050$	0.9990	1.15	3.84	1.25	2.54	99.5
<i>n</i> -BMS	4.50~720	$Y=0.3250 * X+1.4631$	0.9994	0.85	2.85	2.56	4.45	108.2

**2.4.2 低级醇的干扰性实验** 文献[9-10]中提出,空气中的甲醇会与碘化钠衍生试剂发生亲核取代反应,生成碘甲烷,进而对检测准确性造成一定的影响.而在本方法中,未见空白样品中有甲醇带来的干扰.作为补充,按照混合标准溶液的配制方法配制了甲醇和乙醇的混合溶液,于顶空瓶中的质量浓度均为 127  $\mu\text{g/L}$ ,按同样的方法进行衍生分析,也未观察到碘甲烷或碘乙烷谱峰的出现,表明空气或样品中残留的甲醇或乙醇对该方法的检测结果没有影响.文献[9-10]中的干扰可能是由于使用了大量有机相溶剂乙腈,促进了干扰产物的生成.

**2.4.3 样品分析** 按上述方法对某药企生产的 5 批替比培南酯中间体进行分析,其 SIM 色谱图如图 1 所示.由图 1(a)可见,7 min 内所有目标化合物均已出峰,内标  $\text{CHCl}_3$ (IS)的保留时间为 5.47 min,对应 MMS、EMS、*i*-PMS、*n*-PMS、*s*-BMS、*i*-BMS、*n*-BMS 的衍生物的保留时间分别为 2.25、2.77、3.06、4.05、4.91、5.17、6.43 min.图 1(b)中保留时间为 3.68、3.80 min 的峰来源于溶剂本底.图 1(c)为实际样品的 SIM 色谱图(图 1(c)中的小图分别为实际样品中  $m/z$  142、 $m/z$  156 和  $m/z$  170 的萃取离子流图),均检出 MMS、EMS 和 *n*-PMS,来源于生产中甲醇、乙醇、丙醇等溶剂与甲磺酰氯的副反应,而生产中未用到的异丙醇和正、异、叔丁醇没有检测到,5 批样品(S1~S5)的测定结果见表 2.

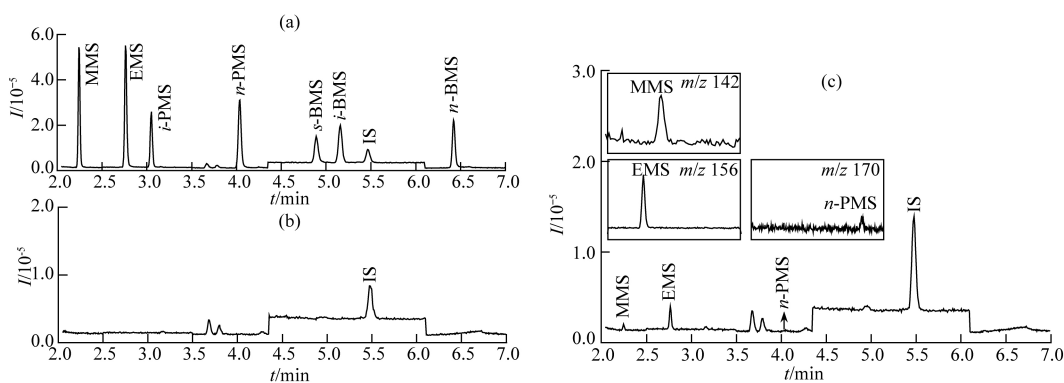


图1 混合标准品溶液(a)、空白溶液(b)和实际样品(c)的SIM色谱图

Fig.1 Selected-ion monitoring chromatograms of mixed standard solution (a), blank solution (b) and the sample (c)

表2 5批样品的测定结果

Tab.2 Determination results of five batches of samples

样品	S1	S2	S3	S4	S5	ng/g
MMS	0.181	0.199	0.176	0.213	0.188	
EMS	0.278	0.438	0.411	0.374	0.414	
n-PMS	0.086	0.143	0.087	0.140	0.153	

### 3 结论

文献[8,12]中报道的色谱-质谱法对药物中甲磺酸酯类杂质同时检测的数量最多有4种,本文方法可以同时检测7种甲磺酸酯类杂质进行定性、定量分析,具有更广泛的适用性.与基于碘化钠衍生的GC-MS法相比,该方法避免了有机相乙腈的大量使用,仅使用少量2-己酮就可达到分析要求.由于衍生反应溶剂中有机相用量少,避免了空气或样品中残留的甲醇或乙醇对检测结果的影响.该方法具有适用范围广、灵敏度高、基质干扰小等特点,可用于药物中间体、原料药及成品药中甲磺酸酯类杂质的检测.

### 参考文献:

- NIKOLOVA T, MARINI F, KAINA B. Genotoxicity testing: comparison of the  $\gamma$ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays[J]. Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis, 2017, 822: 10-18.
- 钱建钦, 张云峰, 王建, 等. UHPLC-MS法测定2种硫酸氢氯吡格雷晶型中的基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(11): 1994-1999.
- CAO X F, MITTELSTAEDT R A, PEARCE M G, et al. Quantitative dose-response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt-delta transgenic mice[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 2014, 55(5): 385-399.
- SZEKELY G, AMORES S M C, GIL M, et al. Genotoxic impurities in pharmaceutical manufacturing: sources, regulations, and mitigation[J]. Chemical reviews, 2015, 115(16): 8182-8229.
- 翟雪, 隋强, 时惠麟. 替比培南酯合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(6): 503-506.
- ZHANG C Z, HUANG L, WU Z G, et al. Determination of sulfonate ester genotoxic impurities in imatinib mesylate by gas chromatography with mass spectrometry[J]. Journal of separation science, 2016, 39(18): 3558-3563.
- 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]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007, 45(3): 472-479.
- SITARAM C, RUPAKULA R B, REDDY B N, et al. Determination of alkyl methanesulfonates in doxazosin mesylate by gas chromatography-mass spectrometer[J]. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2011, 73(1): 107-110.
- 张萌萌, 姚晓华, 蒋元森, 等. 不同检测器-顶空气相色谱法测定甲磺酸达比加群酯中的甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(10): 1108-1112.
- 易大为, 邹宇, 赵晓东, 等. GC-MS法测定甲磺酸培氟沙星中甲磺酸酯类杂质的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(6):

521-525.

- [11] 冯慧敏,杭太俊,高新桃,等.LC-MS 法同时检测甲磺酸伊马替尼中 3 个磺酸酯基因毒杂质[J].药物分析杂志,2014,34(12):2202-2206.
- [12] GUO T,SHI Y Y,ZHENG L, et al.Rapid and simultaneous determination of sulfonate ester genotoxic impurities in drug substance by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: comparison of different ionization modes[J].Journal of chromatography A,2014,1355:73-79.
- [13] ZHOU J,XU J,ZHENG X Y, et al.Determination of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in methanesulfonic acid by derivatization followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J].Journal of separation science,2017,40(17):3414-3421.
- [14] 范达,涂家生.顶空气相色谱法测定注射用甲磺酸吉米沙星中基因毒性杂质[J].药学进展,2014,38(3):220-223.
- [15] 陈俊苗,朱登勇,王少敏,等.HPLC-MSMS 法快速鉴定 Z/E 马来酸桂哌奇特异构体[J].郑州大学学报(理学版),2012,44(3):94-96.

## Simultaneous Determination of Seven Methanesulfonate Impurities by Headspace-GC-MS

WANG Shaomin<sup>1,2</sup>, NIU Ying<sup>1</sup>, DAI Min<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>1</sup>, LIU Hongmin<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. School of Collaborative Innovation Center of New Drug Research and Safety Evaluation of Henan Province, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** A procedure for the simultaneous determination of seven methanesulfonate genotoxic impurities, such as MMS, EMS, *i*-PMS, *n*-PMS, *s*-BMS, *i*-BMS, *n*-BMS, employed in drug synthesis was developed and validated by derivatization-headspace-GC-MS. The effects of type and amount of organic phase, reaction temperature and time related to the derivatization were studied and the optimum conditions were determined. The conditions including heating temperature and equilibration time to the headspace method were discussed and optimized, too. The methodological validation showed the good linearity for all the analytes with the correlation coefficients greater than 0.999 0, the detection limits ( $S/N=3$ ) varying from 0.21 to 2.64  $\mu\text{g/L}$ , and the limits of quantitation ( $S/N=10$ ) from 0.70 to 8.81  $\mu\text{g/L}$ . The standard deviations of intra-day and inter-day were less than 10.3% and 5.07% respectively, and the recoveries of standard addition ranged from 88.2% to 115.1%. The method was successfully used to test tepipenem intermediates and it was found that all the samples tested contained MMS, EMS and *n*-PMS. The method was suitable for the simultaneous analysis of the methanesulfonate impurities in active substances.

**Key words:** alkyl methanesulfonate; derivatization; headspace-GC-MS; determination

(责任编辑:孔 薇)