

使用 Agilent 7697A 顶空进样器和 5977 GC/MSD 准确、高灵敏地分析药品中甲磺酸烷基酯类基因毒性杂质

应用简报

制药行业

作者

吴嘉嘉

安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文将 Agilent 7697A 顶空进样器与 Agilent 7890B 气相色谱/5977 系列单四极杆气质联用系统 (GC/MSD) 进行联用，参考欧洲药典建立了药品中四种甲磺酸烷基酯的分析方法。目标物在顶空进样器中经衍生化生成相应的烷基碘化物，之后使用 GC/MSD 进行分析。通过分析不同浓度的实际样品证明该方法准确可靠，具有优异的灵敏度和重现性，完全满足欧洲药典要求。

前言

近几年，甲磺酸倍他司汀 (betahistine mesilate) 药物中的甲磺酸酯类基因毒性杂质日益成为人们关注的焦点。在此类药物的生产工艺中，其使用的甲醇、丙醇、异丙醇等低级醇溶剂有可能与甲磺酸在合成反应中生成具有基因毒性的甲磺酸烷基酯类物质，如甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸丙酯 (PMS)、甲磺酸异丙酯 (IMS) 等，这些物质被认为具有潜在的致癌性，已成为多国药物管理机构的重点管控目标。

本文参考欧洲药典^[1] (European Pharmacopoeia 8.0) 使用衍生化法采用 Agilent 7697A 顶空进样器与 Agilent 7890B 气相色谱/5977 系列单四极杆气质联用系统，建立了准确、可靠、高灵敏的甲磺酸烷基酯类基因毒性杂质分析方法。



Agilent Technologies

实验部分

试剂和样品

实验用色谱纯乙腈购自 Merck，色谱纯甲苯购自 J.T. Baker，超纯水为 Milli-Q 系统制备，碘化钠购自 J&K，无水硫代硫酸钠购自 Alfa Aesar。标准品购自 Dikma。

仪器和设备

实验采用配置了 Agilent 7697A 顶空进样器（配 111 位样品盘）的 7890B 气相色谱/5977 系列单四极杆气质联用系统对药品中甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸丙酯 (PMS)、甲磺酸异丙酯 (IMS) 这四种甲磺酸烷基酯进行分析，通过衍生将待测的目标物转化为相应的烷基碘化物，以碘正丁烷为内标进行定量。使用 0.53 mm 内径去活石英管线（部件号：160-2535-5）将 7697A 顶空进样器与气相进样口连接，进样口使用 1 mm 内径去活直式衬管（部件号：5190-4047）。

按照欧洲药典推荐，使用 Agilent VF-WAXms 色谱柱（30 m × 0.25 mm，1 μm，部件号：CP9206）对目标物进行分离。

溶液配制

依据欧洲药典方法配置了以下溶液待用。

溶剂 M：将适量的水和乙腈按 20:80（体积比）配制成混合溶剂。

衍生溶液 A：称取 30.0 mg 无水硫代硫酸钠和 60.0 g 碘化钠，用水溶解后并用水定容至 50.0 mL。

内标溶液 B：量取 10 μL 甲磺酸正丁酯 (BMS)，用溶剂 M 稀释并定容至 10.0 mL，配成溶液 B1；随后量取 20 μL 溶液 B1，用溶剂 M 稀释并定容至 10.0 mL，配成溶液 B2；最后量取 10.0 mL 溶液 B2，用溶剂 M 稀释并定容至 100.0 mL，配成最终的内标溶液 B。

参照标样 a：分别称取甲磺酸甲酯 (MMS)、甲磺酸乙酯 (EMS)、甲磺酸丙酯 (PMS) 和甲磺酸异丙酯 (IMS) 纯品各 25.0 mg，用甲苯溶解并用甲苯定容至 5.0 mL；随后量取 50 μL 该溶液用内标溶液 B 定容至 25.0 mL，配成参照标样 a。

样品前处理过程

本实验中甲磺酸烷基酯的衍生化过程由 7697A 顶空自动进样器完成，待测的实际样品、空白样品和标准曲线系列样品将按下述过程配制于 20 mL 顶空瓶（部件号：5182-0837）中，随后立即用带有 PTFE/硅橡胶隔垫的铝制瓶盖（部件号：5183-4477）密封。

实际样品的制备：称取 25.0 mg（以有效成分计）样品于顶空瓶中，随后加入 0.50 mL 衍生溶液 A 和 0.50 mL 内标溶液 B，立即加盖密封待测。

空白样品的制备：量取 0.50 mL 衍生溶液 A 和 0.50 mL 内标溶液 B 于顶空瓶中，随后立即加盖密封待测。

标准曲线系列样品的制备：将参照标样 a 用内标溶液 B 分别稀释成浓度为 5、10、25、50、100 和 250 ng/mL 的标准曲线系列溶液；每个浓度各取 0.50 mL 分别置于顶空瓶中，分别加入 0.50 mL 衍生溶液 A，立即加盖密封待测（现用现配）。如表 1 所示为 6 个标准曲线系列样品浓度与实际样品中甲磺酸烷基酯含量的换算关系。

表 1. 标准曲线系列样品浓度与实际样品中甲磺酸烷基酯含量的换算关系

标准曲线系列样品浓度 (ng/mL, ppb)	顶空瓶中目标物质量 (以量取 0.50 mL 标样溶液计, ng)	实际样品中甲磺酸烷基酯含量 (以称取 25.0 mg 计, ng/mg, ppm)
5	2.5	0.1
10	5	0.2
25	12.5	0.5
50	25	1
100	50	2
250	125	5

顶空进样器条件

样品瓶加压气体:	氦气
定量环体积:	1.0 mL
加热炉温度:	60 °C
加热平衡时间:	30 min
定量环温度:	80 °C
传输管线温度:	120 °C
顶空瓶振摇水平:	2
顶空瓶填充模式:	加压
顶空瓶填充压力:	15 psi
定量环填充模式:	自定义
定量环加压速度:	20 psi/min
定量环最终压力:	10 psi
定量环平衡时间:	0.05 min
进样时间:	0.3 min
载气控制模式:	GC 载气控制
提取后放空:	开启
进样后放空:	100 mL/min, 持续 3 min
顶空瓶待机流量:	20 mL/min

气相色谱条件

进样口:	分流/不分流进样口
衬管:	1 mm 内径直通型超惰衬管
进样口温度:	220 °C
进样口模式:	分流, 分流比 20:1
色谱柱:	VF-WAXms, 30 m × 0.25 mm × 1.0 μm
色谱柱压力模式:	恒流, 流速 0.8 mL/min
柱温箱升温程序:	40 °C 保持 1 min 后, 以 10 °C/min 升温至 130 °C
后运行:	230 °C 保持 8 min, 柱流速 2 mL/min

质谱条件

传输管线温度:	220 °C
离子源:	EI 源, 250 °C
四极杆温度:	150 °C
调谐模式:	etune
溶剂延迟:	0 min
增益因子:	5.0
质谱工作模式:	选择离子监测 (SIM), 离子信息见表 2

表 2. 质谱 SIM 监测离子信息

待测目标物	衍生后实测化合物*	RT/min	定量离子	定性离子
甲磺酸甲酯 (MMS)	碘甲烷 (MeI)	3.843	142	127
甲磺酸乙酯 (EMS)	碘乙烷 (EtI)	4.798	156	127
甲磺酸异丙酯 (IMS)	碘异丙烷 (iPrI)	5.190	170	127
甲磺酸丙酯 (PMS)	碘丙烷 (PrI)	6.249	170	127
内标-甲磺酸正丁酯 (BMS)	内标-碘正丁烷 (BuI)	7.786	184	127

* 待测的甲磺酸烷基酯经衍生后将转化为相应的烷基碘化物

结果与讨论

分离效果

采用文中所述方法对含 25 ng 目标物的标准曲线溶液（以顶空瓶中目标物质量计）进行分析，所得总离子流图和所有目标物、内标物的提取离子图如图 1 所示。从图中结果可以看出碘乙烷 (Etl) 和碘异丙烷 (iPrI) 实现了良好分离，完全满足欧洲药典中对两者分离度 > 1.5 的要求。

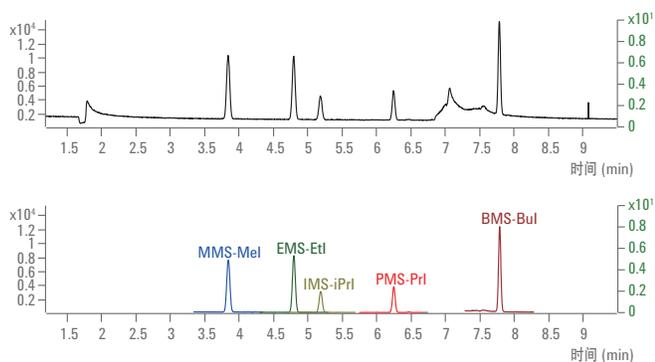


图 1. 含 25 ng 目标物的标准曲线溶液（以顶空瓶中目标物质量计）的谱图结果：上方为总离子流图，下方为四种目标物和内标物的提取离子图

对标准曲线最低点——含 2.5 ng 目标物的标准曲线溶液（以顶空瓶中目标物质量计）进行分析，所得四种目标物的提取离子图如图 2 所示。从图中结果可以看出，在此低浓度水平下所有目标物均仍有优异的峰形和响应结果，远优于欧洲药典的灵敏度要求。

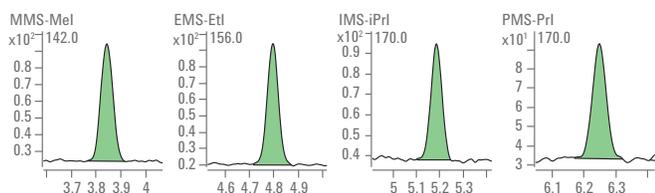


图 2. 含 2.5 ng 目标物的标准曲线溶液（以顶空瓶中目标物质量计）中目标物提取离子图

检出限、线性和精密度

根据欧洲药典要求，以碘正丁烷 (Bul) 为内标，建立了 2.5 - 125.5 ng（以顶空瓶中目标物质量计）范围的标准曲线。如图 3 所示，在此线性范围内所有目标物均具有十分优异的线性结果 ($R^2 > 0.999$)。

含 2.5 ng 目标物的标准曲线溶液（以顶空瓶中目标物质量计）连续进样 8 次进行平行实验。所得结果如表 3 所示，四种目标物的 RSD 均小于等于 4.8%，重复性较好。并据此在置信度 99% 下计算仪器的检出限 (IDL)，实验结果显示所有目标物的 IDL 均小于 0.4 ng（以顶空瓶中目标物质量计），说明仪器不仅具有优异的灵敏度，且在极低浓度水平下依然具有良好的稳定性。

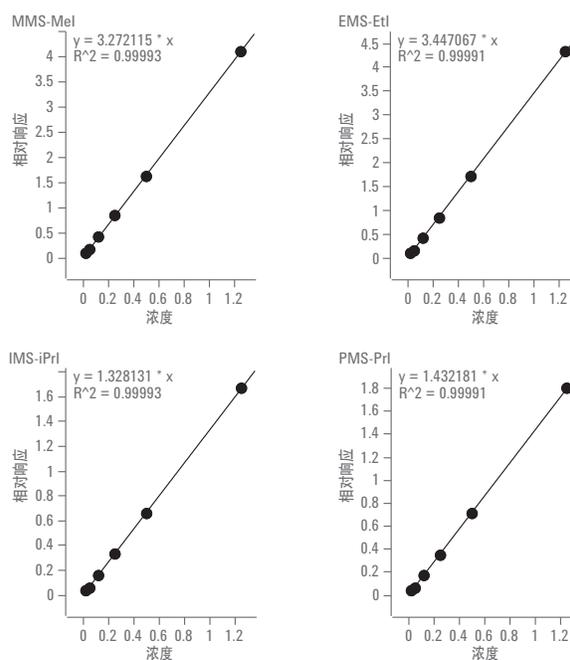


图 3. 四种目标物的标准曲线

表 3. 四种目标物的精密度和检出限结果 (n = 8)

化合物	RSD%	IDL/ng
MMS-Mel	4.8%	0.36
EMS-Etl	1.9%	0.14
IMS-iPrI	2.6%	0.19
PMS-PrI	2.8%	0.21

准确度 — 加标回收率测试

选取一个不含待测目标物的实际样品为空白基质，加入适量的标准样品将其配制成 5 ng、12.5 ng 和 125 ng（以顶空瓶中目标物质量计）三个不同添加水平的基质加标样品，之后按照上述实验过程进行测试分析。表 5 为上述基质加标样品的回收率结果，所有目标物在低、中、高添加水平的回收率均为 90% – 110%。图 4 为添加水平 5 ng 的加标样品中四种目标物的提取离子图。从上述结果可以看出本方法对不同含量的实际样品进行分析均有优异的准确度和灵敏度，在分析低含量实际样品时目标物依然有良好的峰形和响应。

表 4. 实际空白样品在不同添加水平下的加标回收率结果

化合物	回收率/%		
	加标量-5 ng	加标量-12.5 ng	加标量-125 ng
MMS-Mel	105.3	108.3	107.4
EMS-Etl	103.3	103.6	102.7
IMS-iPrI	92.1	98.8	99.8
PMS-PrI	91.9	98.9	100.3

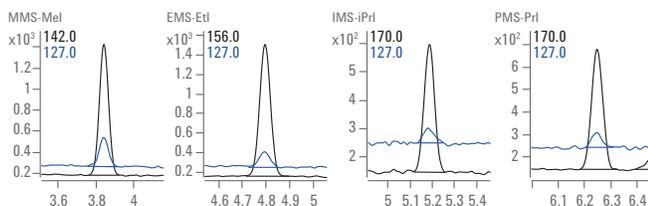


图 4. 添加水平 5 ng 的加标样品中四种目标物的提取离子图

交叉污染测试

Agilent 7697A 顶空在每次进样完成后均会自动对仪器流路进行吹扫清洗以避免样品间的交叉污染。在上述高浓度 125 ng 加标量的样品进样完成后，随即分析一个空白样品。如图 5 所示为这两个样品中目标物的提取离子图对比，其中第一行为 125 ng 加标样品结果，第二行为空白样品结果。从图中结果对比可以看出，分析高浓度样品并不会对仪器分析性能造成影响。

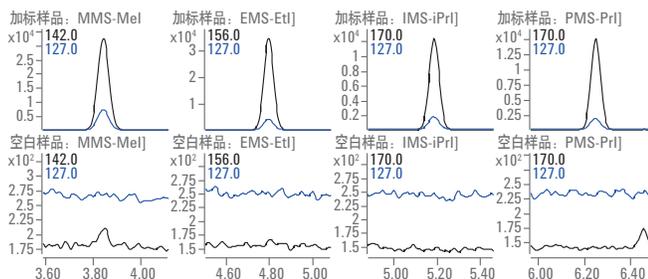


图 5. 添加水平 125ng 加标样品（第一行、上方四幅谱图）和空白样品（第二行、下方四幅谱图）的目标物提取离子图

实际样品测试

选取市售甲磺酸法舒地尔药物（一号样品）、甲磺酸酚妥拉明药物（二号样品）、甲磺酸左氧氟沙星（三号样品）各 1 种，分别按照上述实际样品的制备过程和仪器方法参数进行处理和分析，每个样品称样量为 25.0 mg（以药品包装标称的有效成分计）。图 6 为其中三号样品的谱图结果，其中虚线指示的是目标物在标样中的保留时间位置。经测试，四种甲磺酸烷基酯在三个样品中均未检出。

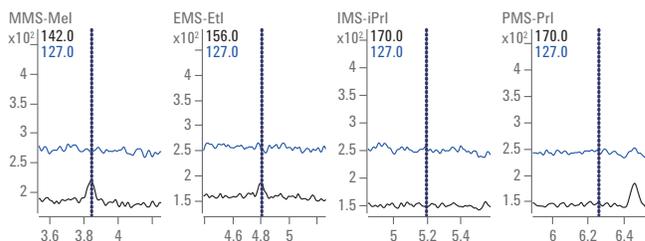


图 6. 三号样品中四个目标物的提取离子图

结论

Agilent 7697A 顶空进样器 - 7890B 气相色谱/5977 系列单四极杆气质联用系统具有优异的仪器分析性能，本研究使用该系统开发了针对药物中甲磺酸烷基酯类基因毒性物质的分析方法。该方法完全满足欧洲药典的要求，具有优异的定量准确性、灵敏度和稳定性。

参考文献

- [1] European Pharmacopoeia 8.0, 2.5.38 Methyl, Ethyl and Isopropyl Methanesulfonate in Active Substances

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2016
2016年06月01日, 中国印刷
5991-6989HCN



Agilent Technologies