

GC-MS/MS 联合分析保护剂测定头孢西丁钠中基因毒性杂质 氨基磺酸甲酯

李发田 史文凤 方提 马宁宁*

斯坦德检测集团股份有限公司 青岛 266000

摘要: 目的: 建立一种测定头孢西丁钠中基因毒性杂质氨基磺酸甲酯的方法。方法: 采用气相色谱-三重四极杆串联质谱(GC-MS/MS)技术、联合分析保护剂掩蔽活性位点。选择L-古洛糖酸- γ -内酯作为分析保护剂, 封闭活性较大的氨基磺酸甲酯在进样口、衬管、色谱柱头等活性位点的吸附, 使氨基磺酸甲酯在GC-MS/MS上响应保持稳定; 采用DB-624色谱柱, 程序升温; 进样口温度280℃; 载气为高纯氮, 流速1.0ml/min; EI源; 离子源温度300℃; 多反应监测(MRM)模式。结果: 氨基磺酸甲酯检测限为1.5ng/ml, 定量限为4.5ng/ml, 在4.5~30ng/ml范围内峰面积与浓度呈良好线性关系, 相关系数r为0.9994; 在7.5、15和30ng/ml加标水平下, 回收率在84.8%~102.1%, 相对标准偏差(RSD, n=6)为6.2%。结论: 该方法操作简便、准确度高、稳定性好、灵敏度高, L-古洛糖酸- γ -内酯对氨基磺酸甲酯保护作用显著, 可用于头孢西丁钠中基因毒性杂质氨基磺酸甲酯测定。

关键词: 气相色谱-三重四极杆串联质谱; 头孢西丁钠; 氨基磺酸甲酯; 基因毒性杂质; 分析保护剂

头孢西丁钠(Cefoxitin Sodium), 是一种头孢菌素类抗生素^[1], 对革兰阳性、阴性需氧及厌氧致病菌高度敏感^[2], 主要用于治疗敏感菌导致的呼吸道、尿路、骨关节、皮肤和软组织以及腹内感染等^[3], 应用前景良好。

头孢西丁钠原料药在合成过程(见图1)^[4]中用到的氯磺酰异氰酸酯极易水解生成氨基磺酸, 可能会和第二步工艺中残留的甲醇反应生成氨基磺酸甲酯(A)。

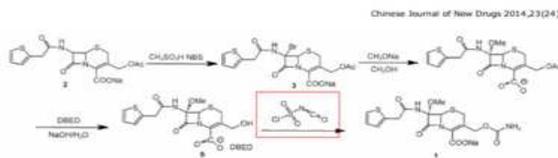


图1 头孢西丁钠的合成路线

A具有磺酸酯类警示结构, 为潜在基因毒性杂质, 且WHO国际癌症研究机构致癌物质清单将结构类似的磺酸甲酯列为2A类致癌物。采用FDA推荐的Case Ultro软件评估, 结果显阳性。A作为潜在基因毒性杂质, 需严格控制。

关于A测试方法较少有国内外文献报道, 近期公开了两篇测定A的中国专利, 其中专利CN116297937A^[5]采用衍生法处理样品, 用气相色谱-ECD检测器检测, 专利

CN117169395A^[6]采用液质检测, 两者均较为复杂, 方法稳定性差。本文采用GC-MS/MS法, 使用L-古洛糖酸- γ -内酯(B)作为分析保护剂, 建立一种操作简便、专属性强、准确度高、稳定性好、灵敏度高的方法, 用于检测头孢西丁钠中基因毒性杂质A含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Trace1300气相色谱-TSQ9000三重四级杆质谱联用仪(Thermo Fisher)。

1.2 试剂

对照品A(重庆药物制剂工程技术研究中心, 纯度78.6%), 乙腈(CNW, HPLC级别)、B(麦克林, 纯度97%)

2 方法与结果

2.1 仪器条件

2.1.1 色谱条件

采用DB-624(30m×0.25mm, 1.4 μ m)色谱柱; 起始温度50℃, 保持3分钟, 以20℃/min升至250℃, 保持1分钟; 载气为高纯氮; 进样口温度280℃; 不分流模式; 柱流量1.0ml/

min; 进样体积 1 μ l。

2.1.2 质谱条件

EI 源, 电离能量 70eV, 传输线温度 250 $^{\circ}$ C, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, MRM 模式, 定性离子 m/z 为 81 \rightarrow 65、64 \rightarrow 48, 定量离子 m/z 为 80 \rightarrow 64。

2.2 溶液制备

(1) 分析保护剂 取 B 适量, 精密称定, 加水适量使溶解, 用乙腈稀释制成每 1ml 中约含 20mg 的溶液。(2) 对照品贮备液 取 A 20mg, 精密称定, 置 100ml 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1ml, 置 20ml 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀。(3) 对照品溶液 精密量取对照品贮备液 1ml, 置 100ml 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀;

精密量取 1ml, 置 20ml 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀; 再精密量取 1ml, 置进样小瓶中, 加 40 μ l 分析保护剂, 混匀。(4) 供试品溶液 取本品约 0.5g, 精密称定, 置 20ml 顶空瓶中, 精密加入 5ml 乙腈, 密封, 涡旋 10 分钟, 静置, 取上清液, 滤过; 精密移取 1ml 续滤液, 置进样小瓶中, 加 40 μ l 分析保护剂, 混匀。(5) 线性贮备液 精密量取对照品贮备液适量, 用乙腈稀释制成每 1ml 中约含 A 150ng 的溶液。(6) 线性上机溶液 精密量取线性贮备液 0.9、1、2、3 和 4ml, 分别置不同 20ml 量瓶中, 用乙腈稀释制成每 1ml 中约含 A 4.5、7.5、15、22.5、30ng/ml 的溶液, 作为线性系列标准溶液。分别精密移取上述溶液 1ml, 置不同进样小瓶中, 分别加 40 μ l 分析保护剂, 摇匀。(7) 回收率溶液 取本品约 0.5g, 精密称定, 置 20ml 顶空瓶中, 精密加入 5ml 浓度分别为 7.5、15、22.5ng/ml 的线性系列标准溶液, 封盖, 自“涡旋……”起, 按“2.2.4”项下方法处理, 即得 50%、100% 和 150% 加标供试品溶液。

2.3 专属性

取供试品溶液、对照品溶液、空白溶剂(乙腈), 按“2.1”项下条件检测。结果显示, 在该条件下, 乙腈对 A 检测无干扰, 供试品中其他峰不影响 A 测定, 专属性良好。见图 2。

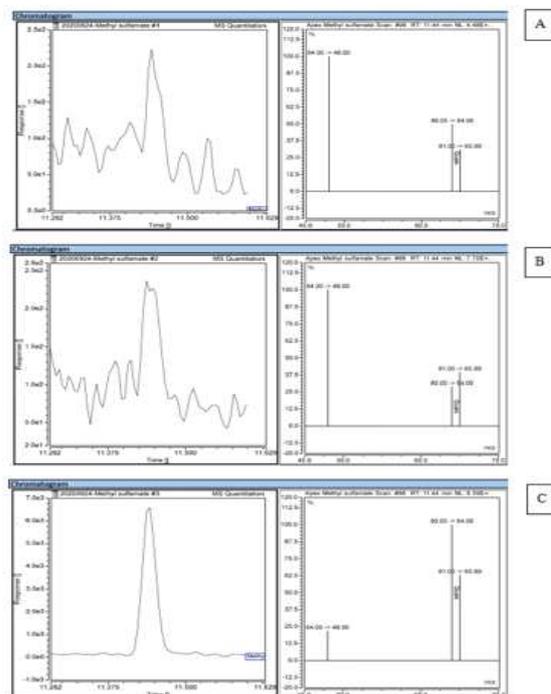


图 2 专属性色谱图

A. 空白溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液

2.4 线性与范围

取“2.2.6”项下溶液, 按“2.1”项下条件检测。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标计算线性回归方程为 $y = 12298.7101x - 16.4195$ $r=0.9994$, 说明 A 在 4.5 ~ 30ng/ml 浓度范围内线性关系良好。

2.5 定量限与检测限

取“2.2.3”项下对照品溶液适量, 用乙腈逐级稀释。分别精密移取稀释后溶液 1ml, 置不同进样小瓶中, 分别加入 40 μ l 分析保护剂, 摇匀, 作为定量限溶液和检测限溶液。按“2.1”项下条件检测。以信噪比 $S/N \geq 10$ 作为定量限 (LOQ), 信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限 (LOD)。结果所得检测限浓度为 1.5ng/ml, 定量限浓度为 4.5ng/ml。

2.6 回收率

按“2.2.7”项下方法制备加标供试品溶液, 每个浓度平行制备 3 份。按“2.1”项下条件检测, 结果见表 1。供试品本底中均未检出 A, 加标回收率在 84.8% ~ 102.1%, 平均回收率 93%, RSD 为 6.2%, 该方法具有较好的准确度。

表 1 回收率试验结果

加标供试品溶液	测得量 (ng)	本底量 (ng)	加入量 (ng)	回收率 %	平均值 %	RSD%
50%	38.38	0	37.59	102.1	93	6.2
	37.14			98.8		
	33.01			87.8		
100%	67.26	0	74.98	89.7	93	6.2
	63.55			84.8		
	71.81			95.8		
	98.21			87.3		
150%	104.83	0	112.55	93.1	93	6.2
	105.24			93.5		

2.7 重复性

按“2.2.7”项下方法平行制备 6 份 100% 加标供试品溶液, 按“2.1”项下条件检测, 以外标法峰面积计算得 A 平均含量为 0.1519 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 5.0%, 该方法重复性良好。

2.8 溶液稳定性

按“2.2.3”项下方法制备对照品溶液, 于 0、3.5、7.5、15、25.5h 检测, 以峰面积计算 A 的 RSD 为 8.4%, 该方法制备的对照品溶液 25.5h 内稳定。

按“2.2.7”项下方法制备 100% 加标供试品溶液, 于 0、4、11.5、17、27h 检测, 以峰面积计算 A 的 RSD 为 3.3%, 该方法制备的 100% 加标供试品溶液 27h 内稳定。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

A 在 DB-5MS 和 DB-17MS 低极性色谱柱上峰形差, 拖尾严重, 峰响应随进样次数增多逐渐下降; 在 DB-wax 和 DB-FFAP 强极性色谱柱上不出峰; 在 DB-624 中等极性色谱柱上, 虽响应仍逐渐降低, 但峰形好。因此选 DB-624 色谱柱进一步研究。

3.2 前处理方法优化

在此前研究中, A 响应随进样次数增多逐渐降低, 直至再无响应, 无论更换何种色谱柱和溶剂, 仍未改善。推测因 A 在进样过程中被吸附所致。这就不得不引入农药中常用到的基质效应概念。Erney 等^[7]在农药检测研究时提出基质效应, 指出极性农药可能在活性位点被吸附。活性位点可能来自玻璃衬管表面硅醇基或金属离子, 或前一次进样残留在进样口和色谱柱中难挥发物或基质组分的热分解。基质效应敏感的典型农药大多具有极性和(或)能形成强氢键作用的酸性和(或)碱性化合物, 一般带有磷酸基、羟基、氨基、咪唑基、苯并咪唑基、氨基甲酸酯基和脲基官能团^[8]。从结构特征看, A 也极具活性, 因此可能在活性位点被吸附。但以

上基质效应, 是样品基质通过衬管和色谱柱时, 遮蔽了活性位点, 减少了对目标物的吸附, 产生基质诱导增强效应^[9]。而在本实验中, 头孢西丁钠样品基质加标和对照品在进样过程中, 响应均逐渐降低, 说明头孢西丁钠样品基质对 A 无基质诱导增强效应, 两者响应逐渐降低均可能由于活性位点对 A 的吸附, 因此需对样品和对照品同法处理, 以遮蔽进样体系中活性位点, 达到对样品和对照品中 A 的保护。

目前, 分析保护剂已成为消除基质效应热点之一^[10]。在活性位点上, 分析保护剂和农药竞争吸附, 减少了由于吸附和降解导致的热不稳定农药的损失, 增强纯溶剂中农药响应, 实现与基质中相同的响应水平^[11]。常用分析保护剂中, 山梨糖醇可用于低挥发性农药, B 可用于半挥发性农药, 3-乙氧基-1,2-丙二醇可用于挥发性农药^[12]。

借鉴以上分析保护剂概念, 评估本实验所需分析保护剂种类。A 沸点 200℃左右, 属于半挥发性物质, 因此使用 B 最佳。重新调整供试品溶液和对照品制备方式, 在进样前溶液中加入 B (2.2.1) 溶液, 成功解决用 GC-MS/MS 法测定头孢西丁钠中 A 时响应逐渐降低问题, 使 A 被准确测定。

结论: 本研究建立 GC-MS/MS 法测定头孢西丁钠中基因毒性杂质 A, 通过使用分析保护剂 B, 遮蔽进样系统中活性位点, 避免 A 被活性位点吸附, 保证 A 在 GC-MS/MS 上响应稳定性。方法验证结果表明, 该方法操作简便、专属性强、准确度高、耐受性好、灵敏度高, B 对 A 保护作用显著, 可用于头孢西丁钠中基因毒性杂质 A 测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典二部 (2020 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:304
- [2] Calderon Montano J M, Burgos M E, Perez G C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. [J]. Mini reviews in medicinal chemistry, 2011, 11(4):298
- [3] Lau W Y, Fan S T, Chu K W, et al. Cefoxitin versus gentamicin and metronidazole in prevention of postappendectomy sepsis: A randomized, prospective trial [J]. Antimicrob Chemother, 1986, 18(5):613
- [4] 尹伟成, 彭东明, 周汨等. 头孢西丁钠的合成工艺改进 [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(24):2930
- [5] 胡德行, 李琪灵, 全文瑞等. 浙江国邦药业有限公司. CN116297937A [P]. 2023

[6] 李蕊, 董坤, 刘姣等. 山东鲁抗医药股份有限公司. CN117169395A[P].2023

[7] ERNEY D R, GILLESPIE A M, GILVYDIS D M, et al. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot oncolumn injection and flame photometric detection[J]. Journal of Chromatography, 1993, 638(1):57

[8] 贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 气相色谱分析农药残留的基质效应及其解决方法 [J]. 色谱, 2008, 26(1):98

[9] 焦斌, 徐军, 贾爽爽, 等. 气相色谱串联质谱法检测乙氧氟草醚、啶草酮和乙螨在 4 种香辛料中的残留 [J]. 农药学报, 2019, 21(1):97

[10] 罗茜, 郭洪梅, 蔡函青, 等. 分析保护剂补偿基质

效应 GC-MS/MS 测定果蔬中 24 种有机磷农药残留 [J]. 中国测试, 2023, 49(7):69

[11] Kirchner M, Hůšková R, Matisová E, et al. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1186(1-2):271

[12] Anastassiades M, Mastovská K, Lehota S J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1015(1-2):163

作者简介:

李发田 (1991—), 男, 汉族, 山东省日照市人, 硕士研究生, 斯坦德检测集团股份有限公司, 中级工程师, 药物分析

通讯作者: 马宁宁, 1991.03.29, 女, 汉族, 硕士研究生, 通讯地址: 青岛市高新区丰茂路 55 号斯坦德集团总部