UPLC-MS/MS法测定非奈利酮原料药中遗传毒性杂质硫酸二甲酯和硫酸二乙酯

刘健[1]，马珊萍[2*]，谢志霞[2]，陈小露[3]，张辉[3]（1.江西心诚药业有限公司，江西 宜春 336000；2.江西省抚州市东乡区人民医院，江西 抚州 331800；3.台州科技职业学院，浙江 台州 318020）

摘要：目的 建立超高效液相色谱-三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）法测定非奈利酮原料药中遗传毒性杂质硫酸二甲酯和硫酸二乙酯。**方法** 采用Agilent Poroshell 120 HILIC-Z（100 mm×2.1 mm，2.7 μm）色谱柱，流动相为甲酸-水-乙腈（0.5∶300∶700，*v/v/v*），流速0.3 mL·min^{-1}，柱温30 ℃；质谱检测器，电喷雾离子源负离子模式检测，多反应监测模式。**结果** 硫酸二甲酯和硫酸二乙酯在0.75～15.00 ng·mL^{-1}范围内线性关系良好，相关系数（*r*）均为0.999 9，方法的检出限为0.23 μg·g^{-1}，定量限为0.75 μg·g^{-1}，加标回收率均为107.53%～109.79%。**结论** 该方法可以快速、简便、灵敏、准确地同时测定非奈利酮原料药中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的含量，为非奈利酮原料药的质量控制提供技术支撑。

关键词：超高效液相色谱-三重四极杆质谱；遗传毒性杂质；硫酸二甲酯；硫酸二乙酯；非奈利酮

中图分类号：R917　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-229X（2026）03-0175-04

Doi：10.12048/j.issn.1674-229X.2026.03.003

The Determination of Genotoxic Impurities Dimethyl Sulfate and Diethyl Sulfate in Finerenone by UPLC-MS/MS

LIU Jian[1], MA Shanping[2*], XIE Zhixia[2], CHEN Xiaolu[3], ZHANG Hui[3] (1. *Jiangxi Xincheng Pharmaceutical Co., Ltd., Yichun, Jiangxi* 336000, *China*; 2. *The People's Hospital of Dongxiang, Fuzhou, Jiangxi* 331800, *China*; 3. *Taizhou Vocational College of Science and Technology, Taizhou, Zhejiang* 318020, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UPLC-MS/MS method for the determination of genotoxic impurities dimethyl sulfate (DMS) and diethyl sulfate (DES) in Finerenone bulk drug. **METHODS** The analytes were separated on an Agilent Poroshell 120 HILIC-Z (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) column. The mobile phase consisted of a formic acid, water, and acetonitrile solution in a volume ratio of 0.5∶300∶700 (*v/v/v*). The flow was set at 0.3 mL·min^{-1}, with a column temperature of 30 ℃. The target compounds were analyzed in the negative ion MRM mode. **RESULTS** DMS and DES showed good linear relationships within the ranges of 0.75–15.00 ng·mL^{-1}, with correlation coefficients (*r*) being 0.999 9. The detection limits of the method were 0.23 μg·g^{-1} and the quantification limits were 0.75 μg·g^{-1}. The recoveries were both 107.53%–109.79%. No DMS and DES were detected in 3 batches of Finerenone. **CONCLUSION** This method is accurate, specific, and sensitive. It could be used for the simultaneous determination of DMS and DES in Finerenone bulk drug, thereby providing technical support for the quality control of Finerenone.

KEYWORDS: UPLC-MS/MS; genotoxic impurities; dimethyl sulfate; diethyl sulfate; finerenone

非奈利酮（Finerenone）是由拜耳公司开发的一种新型口服非甾体选择性盐皮质激素受体拮抗剂，其选择性拮抗盐皮质激素受体，抑制醛固酮和皮质醇介导的炎症与纤维化反应，保护肾脏、心脏及血管组织，从而延缓肾功能恶化并降低终末期肾病风险。2021年7月，非奈利酮获美国FDA批准上市（商品名Kerendia），并于2022年6月在中国获批（商品名可申达）用于治疗与II型糖尿病相关的成人慢性肾病。2025年1月，拜耳已向中国国家药监局药品审评中心提交其用于心力衰竭的新适应证申请，进一步拓展心肾共病治疗领域[1]。

非奈利酮原料药合成工艺中用到了甲醇、乙醇和浓硫酸[2,3]，因此，生产过程中易产生硫酸二甲酯（Dimethyl sulfate，DMS）和硫酸二乙酯（Diethyl sulfate，

基金项目：浙江省基础公益研究计划（LGN22B020002）；台州市科技计划项目（24nyb10）

作者简介：刘健，工程师，研究方向：药品生产技术工作　　*通信作者：马珊萍，主管药师，研究方向：药品质量与安全，E-mail：ma_shanping@163.com

DES)。DMS和DES具有遗传毒性和致癌性,在动物体内组织中可缓慢水解生成甲醇或乙醇和硫酸,具有强烈的腐蚀性[4]。根据FDA发布的《原料药及制剂中基因毒性杂质控制指南》和ICH发布的《基因毒性杂质研究指南》,非奈利酮原料药中DMS和DES的含量均不得超过75 ppm[5,6]。药物中残留的DMS和DES过量时会对人体产生巨大的危害,因此非常有必要控制非奈利酮原料药中DMS和DES的残留量。由于有其他遗传性杂质共存,本研究从严控制DMS和DES的限度均为7.5 μg·g^{-1}。

目前,同时检测DMS和DES的方法时有报道,汪鑫等[7]使用气相色谱法(GC)测定羟苯磺酸钙中DMS和DES;徐嘉等[8]利用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)测定化妆品中DMS和DES;李军等[9]使用GC-MS测定固体废物中的DMS和DES;郭志强等[10]使用衍生化结合高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)法测定硝酸硫康唑中DMS和DES。但是,DMS和DES遇碱易分解;遇水会水解,在冷水中水解缓慢,随温度上升水解加快,在50 ℃时易水解为硫酸和甲醇[11]。因此,GC和GC-MS进样过程中DMS和DES易在高温衬管中降解,检出值偏低;另外,通过衍生化一方面虽然可以解决DMS和DES的稳定性问题,还可以提高检测灵敏度与特异性,但也存在前处理操作复杂、单针运行时间长、运行成本高等问题。因此,目前文献报道的DMS和DES检测方法存在灵敏度低、前处理复杂、结果不准确和运行效率低,不适合大批量药品放行检测等问题。

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)近几年在痕量杂质检测领域应用广泛,尤其是在药物中遗传毒性杂质检测方向更为突出。另外,非奈利酮原料药中DMS和DES的检测方法未见报道。为此,本文建立了一种UPLC-MS/MS法测定非奈利酮中DMS和DES含量方法,并完成了方法学验证。

1 仪器与试剂

Milli-Q Advantage A10超纯水仪(德国Merck公司);Agilent Poroshell 120 HILIC-Z色谱柱(美国Agilent公司);Waters ACQUITY I UPLC Class-TQ-S micro超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(美国Waters公司)。DMS和DES购于百灵威,纯度均大于99%;非奈利酮原料药3批为实验室自制;色谱纯乙腈和质谱纯甲酸(均购自德国Merck公司)。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 稀释剂 稀释剂为甲酸-水-乙腈(0.5∶300∶700,*v/v/v*)。

2.1.2 供试品溶液 取非奈利酮原料药样品25 mg于25 mL容量瓶中,用稀释剂溶解并稀释至刻度,混匀,制得浓度为1 mg·mL^{-1}的非奈利酮溶液。

2.1.3 对照品储备液 取DMS、DES对照品适量,用稀释剂溶解并稀释成DMS和DES浓度均为250 μg·mL^{-1}的溶液。

2.1.4 线性储备液 移取“2.1.3”项下对照品储备液1.5 mL于100 mL容量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,混匀,DMS和DES浓度均为3.75 μg·mL^{-1};移取上述溶液1.0 mL于100 mL容量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,混匀,DMS和DES浓度均为37.5 ng·mL^{-1}。

2.1.5 系统适用性溶液 移取“2.1.4”项线性储备液5.0 mL于25 mL容量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,混匀,DMS和DES浓度均为7.5 ng·mL^{-1}。

2.1.6 线性溶液 精密吸取“2.1.4”项下线性储备液0.5、2.0、5.0、8.0、10.0 mL,分别置于25 mL容量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,定容后浓度梯度为0.75、3.00、7.50、12.00、15.00 ng·mL^{-1}。

2.1.7 定量限溶液 以线性溶液的最低浓度(0.75 ng·mL^{-1})作为定量限溶液。

2.1.8 检测限溶液 移取“2.1.7”项下定量限溶液3.0 mL于10 mL容量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,混匀得0.23 ng·mL^{-1}溶液。

2.2 色谱质谱条件

2.2.1 色谱条件 采用Agilent Poroshell 120 HILIC-Z(100 mm×2.1 mm,2.7 μm)色谱柱分析,流动相:甲酸-水-乙腈(0.5∶300∶700,*v/v/v*),流速为0.3 mL·min^{-1},柱温为30 ℃,样品盘温度为8 ℃,进样体积为3.0 μL。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI源),负离子模式检测;脱溶剂气流速1 000 L·Hr^{-1};脱溶剂气温度500 ℃;锥孔电压30 V;毛细管电压0.5 kV;扫描模式为多反应监测(Multiple reaction monitorning,MRM),质谱采集时间为2.00~4.00 min。目标化合物定量离子对*m/z*:110.90-79.90(DMS)与124.90-96.90(DES)。质谱参数见表1。

3 结果与分析

3.1 专属性考察

分别精密吸取空白溶剂(稀释剂)、供试品溶液

表1　硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的多反应监测参数

化合物	保留时间/min	离子对(*m/z*)
硫酸二甲酯	3.13	110.90~79.90
		110.90~95.90
硫酸二乙酯	2.73	124.90~96.90
		124.90~79.90

及对照品溶液(DMS与DES)进样检测。结果显示，空白溶剂和供试品溶液对DMS和DES无干扰，杂质与样品分离度好，专属性良好(见图1)。

3.2　线性关系考察

取“2.1.6”项下线性溶液进样，分别以DMS和DES质量浓度为横坐标，对应的平均峰面积为纵坐

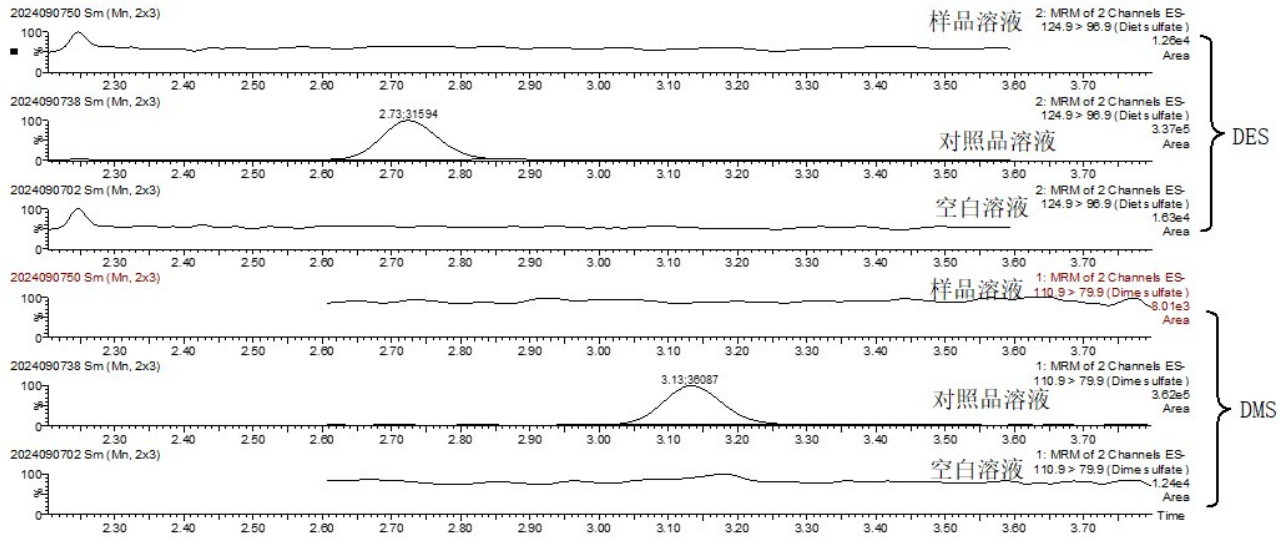


图1　各样品溶液定量离子色谱图

标，绘制线性回归曲线。结果表明DMS和DES在0.75~15.00 ng·mL^{-1}范围内线性关系良好，相关系数均为0.999 9(表2)。

表2　硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的回归方程、相关系数、线性范围

化合物	回归方程	*r*	线性范围/ng·mL^{-1}
硫酸二甲酯	y=4 633.0036x+219.024 3	0.999 9	0.75~15.00
硫酸二乙酯	y=4 222.587 2x−363.277 6	0.999 9	0.75~15.00

3.3　定量限与检测限

取“2.1.7”项下定量限溶液及“2.1.8”项下检测限进样，以信噪比*S/N*≥10计，DMS和DES的定量限为0.75 μg·g^{-1}。以信噪比*S/N*≥3计，DMS和DES的检测限为0.23 μg·g^{-1}。检出限和定量限均满足要求。

3.4　准确度与精密度

采用加标回收法对非奈利酮原料药的分析方法进行验证。在准确度考察中，设置低、中、高3个浓度水平的加标溶液(见表3)，每个浓度水平进行3次平行测定；精密度验证则采用6份中等浓度加标溶液进行重复性实验。实验数据显示，DMS和DES的回收率均为107.53%~109.79%，标准偏差均小于5.0%(见表3~4)。该结果表明本方法具有较好的回收率和重现性。

表3　非奈利酮原料药中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯检测准确度(n=3)

化合物	添加量/ng·mL^{-1}	平均回收率/%	相对标准偏差/%
硫酸二甲酯	0.75	109.49	4.14
	7.50	108.62	0.44
	11.99	107.53	2.00
硫酸二乙酯	0.75	108.64	4.95
	7.50	109.79	1.33
	11.99	107.83	1.53

表4　非奈利酮原料药中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯检测精密度(n=6)

化合物	添加量/ng·mL^{-1}	平均回收率/%	相对标准偏差/%
硫酸二甲酯	7.50	109.03	1.29
硫酸二乙酯	7.50	109.32	1.53

3.5　稳定性

分别精密吸取“3.6”项下非奈利酮样品溶液、“2.1.5”项下系统适用性溶液作为对照品溶液稳定性溶液、“3.4”项下精密度溶液，于0、4、8、12 h进样测定并记录色谱图，以DMS与DES峰面积为指标，考察溶液的稳定性。结果对照品溶液稳定性中DMS与DES峰面积与系统适用性溶液峰面积的

*RSD*均小于5.0%；样品溶液中DMS与DES峰面积均小于检测限溶液峰面积；加标样品溶液中DMS与DES回收率107.53%~109.49%，表明供试品溶液在12 h内的稳定性良好。

3.6 样品检测

应用本研究所建立的分析方法，对3批独立生产的非奈利酮原料药样品进行定量分析。检测数据显示，目标杂质DMS和DES在所有批次中检测结果均低于方法检测限（检测限和定量限见“3.3”项）。

4 讨论和结论

4.1 质谱条件的选择

DMS和DES遇水极易水解，DMS水解失去甲基，产生带电荷的负离子*m/z*为110.9，二级碎片离子*m/z*为79.9和95.9；DES水解失去乙基，产生带电荷的负离子*m/z* 124.9，二级碎片离子*m/z*为79.9和96.9。

4.2 色谱条件的选择

DMS和DES结构极为相似，而且在普通反相色谱柱中均不易保留。本研究选择亲水相互作用液相色谱柱（Agilent Poroshell 120 HILIC-Z），该色谱柱能与带电化合物相互作用，增加带电化合物在色谱柱上的保留能力，有效解决了传统反相色谱对非极性化合物DMS/DES保留不足的难题，同时对DMS、DES和非奈利酮实现了基线分离。

综上，本文建立了一种UPLC-MS/MS法直接同时测定非奈利酮中遗传毒性杂质DMS和DES的分析方法，完成了方法学验证，并用于实际样品的测定。本方法样品前处理简单、无基质干扰，专属性强、灵敏度高、准确度好，检测效率高，适合于大批量样品放行检测，有助于非奈利酮原料药生产企业的产品质量控制，同时也为该药品的监管提供技术支撑。

参考文献

[1] 丁雪婷. 非奈利酮（Finerenone，Kerendia）[J]. 中国药物化学杂志，2022，32(5)：418.

[2] Bakris G L，Agarwal R，Anker S D，*et al*. Effect of finerenone on chronic kidney disease outcomes in type 2 diabetes[J].N Engl J Med，2020，383(23)：2219-2229.

[3] Method for the preparation of (4S)-4-(4-cyano-2-methoxyphenyl)-5-ethoxy-2，8-dimethyl-1，4-dihydro-1，6-naphthy ridine-3-carbox-amide and the purication thereof for use as an active pharmaceutical ingredient. WO，2017032673[P]. 2017-03-02.

[4] 陈丽华，徐晓春，涂红雨，等. 基于气相色谱-质谱法测定染整助剂中的硫酸二甲酯[J]. 染整技术，2016，38(2)：50-53.

[5] International council for harmonization (ICH). ICH harmonised guideline，assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential crcinogenic risk M7 (R1)[EB/OL].[2025-02-29].https://database.ich.Org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.

[6] U. S.Department of Health and Human Services，Food and Drug Administration (FDA)，Center for Drug Evaluation and Research. Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products：Recommended approaches[EB/OL].[2025-02-29]. http://www. fda. gov/Drugs/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidances/ucm528107.html.

[7] 汪鑫，章华. 气相色谱-火焰光度法检测羟苯磺酸钙中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的残留量[J]. 中国药业，2022，31(17)：65-67.

[8] 徐嘉，王学连，杨晓燕，等. 气相色谱质谱联用仪测定化妆品中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯[J]. 当代化工，2018，47(6)：1317-1320.

[9] 李军，何国忠，王克华，等. 气相色谱-质谱法测定固体废物中的硫酸二甲酯、硫酸二乙酯及稳定性研究[J]. 广州化工，2025，53(2)：87-90.

[10] 郭志强，李铁军，孙迎基，等. 衍生化结合LC-MS法测定硝酸硫康唑中2种基因毒性杂质[J]. 化学工业与工程，2025，42(1)：106-112.

[11] 匡兴亚，贾晓东. 职业中毒检验与临床应用[M]. 上海：同济大学出版社，2018：164-168.

（收稿日期：2025-09-09；在线出版日期：2026-01-30）