·实验研究·

qHNMR 法测定 5 种苯磺酸酯类化合物的含量

陈忠兰,杨会英,张雅军*,吴先富*
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要] **目的**:建立 qHNMR 法测定苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸异丙酯等 5 种苯磺酸酯类化合物含量的方法。**方法**:采用 Bruker ANANCE NEO 600 型核磁共振波谱仪采集一维核磁氢谱,30°脉冲,弛豫延迟时间(D1)10 s,扫描次数(NS)16 次,测定温度 25 ℃,分别以对苯二甲酸二甲酯为内标物,采用氘代氯仿($CDCl_3$-*d*)为溶剂,对苯磺酸酯类化合物进行定量研究。**结果**:采用对苯二甲酸二甲酯为内标物,通过 qHNMR 法测定 5 种苯磺酸酯类化合物的含量与质量平衡法所得结果基本一致。**结论**:本研究建立的 qHNMR 法操作简单、快速、准确,可用于苯磺酸酯类化合物的含量测定,为此类标准物质准确赋值提供有力的佐证数据。

[关键词] qHNMR 法;苯磺酸酯类化合物;基因毒性;对苯二甲酸二甲酯
[中图分类号] R917 [文献标志码] A [文章编号] 1003 - 3734(2026)10 - 1057 - 06

Quantitative analysis of five benzenesulfonate ester compounds by qHNMR

CHEN Zhong-lan, YANG Hui-ying, ZHANG Ya-jun*, WU Xian-fu*
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish quantitative proton nuclear magnetic resonance (qHNMR) method to determine the contents of methyl benzenesulfonate, propyl benzenesulfonate, isopropyl benzenesulfonate, methyl p-toluenesulfonate, and isopropyl p-toluenesulfonate. **Methods**: Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (qHNMR) spectra were collected by BRUKEANANCE NEO 600 MHz NMR spectrometer. The parameters were set up as follows: 30° pulse sequences, the relaxation delay time was 10 s, the number for scanning was 16, and the experiment temperature was controlled at 25 ℃, dimethyl terephthalate were used as internal standard, respectively. The quantitative study of benzenesulfonate ester compounds was carried out in $CDCl_3$-*d* as solvents. **Results**: Using dimethyl terephthalate as internal standard, the contents of five benzenesulfonate ester compounds determined by qHNMR method were basically consistent with the results obtained by mass balance method. **Conclusion**: The qHNMR method established in this study is simple, rapid, and accurate, and can be used for the determination of benzenesulfonate ester compounds, providing strong evidence data for the accurate assignment of the reference material.

[**Key words**] qHNMR; benzenesulfonate ester compounds; genotoxicity; dimethyl terephthalate

[作者简介] 陈忠兰,女,助理研究员,研究方向:药品标准物质研究。E-mail: 550736995@qq.com。
[通讯作者] *吴先富,男,研究员,研究方向:药品质量控制及药品标准物质研究。E-mail: wuxf99@163.com。*张雅军,女,副主任药师,研究方向:药品标准物质研究。E-mail: zyj95860@126.com。
[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.10.007

苯磺酸酯类化合物在药物合成中常作为中间体或杂质出现。鉴于这类化合物为潜在的基因毒性杂质,能够与 DNA 发生反应,诱导 DNA 损伤,导致基因突变,可能引发癌症风险[1-2],甚至在以低级醇为溶剂时,与磺酸类化合物发生化学反应生成磺酸酯类杂质[3],为了保障人们的用药安全和人民的身体健康,在药品质量检测过程中,对这些基因毒性杂质的控制至关重要。《中华人民共和国药典》2020 年版和 ICH M7 指导原则要求,需对潜在遗传毒性杂质进行风险评估,控制限通常低于 1.5 μg·d^{-1}[4-5]。《欧洲药典》(EP)和《美国药典》(USP)对特定药物(如奥美沙坦酯)中的苯磺酸酯化合物设定了明确限度[6-7],作为限制药物研发和生产过程中引入基因毒性杂质的标准。因此,苯磺酸酯类化合物标准物质的研制为药品检测和质量控制提供了物质保障。

苯磺酸酯类化合物的含量测定方法主要有 HPLC、GC-MS 和 LC-MS 法等[8-13]。HPLC 法测定含量时需要提供对照品,通常采用外标法计算,而 GC-MS 和 LC-MS 法多用于样品测定的痕量分析中,GC-MS 测定时还需进行衍生化处理。本实验采用 qHNMR 法对苯磺酸酯类化合物进行含量测定,比传统的定量方法更具优势,无需待测物对应的标准物质就可测定其含量,具有操作简单、快速、准确等特点,现多国药典已收载了 qNMR 法[14-16]。目前,NMR 技术在标准物质定值和药品质量控制等领域的应用也日益广泛[17-20]。本研究采用 qHNMR 法测定 5 种苯磺酸酯类化合物(结构见图 1)的含量,其测定结果与质量平衡法测定结果基本一致,为苯磺酸酯类化合物的含量测定提供了一种简便快捷、准确可靠的分析方法。

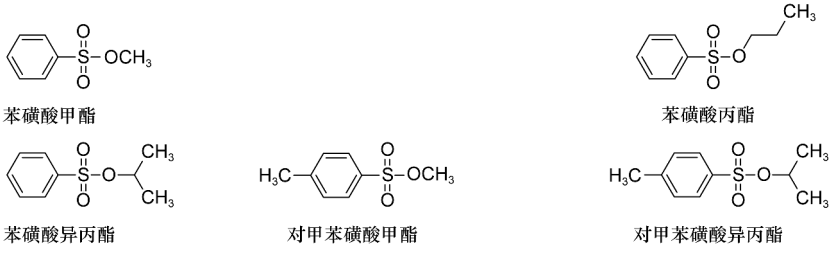


图 1 5 种苯磺酸酯类化合物结构

材料与方法

1 仪器与试剂

Bruker ANANCE NEO 600 型核磁共振谱仪(Bruker 公司);Waters 超高效液相色谱仪(Waters 公司);MX5 型百万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);851 型水分测定仪(Metrohm 公司);Thermo concept KL09/12 型马弗炉(Thermo 公司);对苯二甲酸二甲酯(中国食品药品检定研究院,批号:510137-201601,含量 99.3%);氘代氯仿($CDCl_3$-*d*,Cambridge Isotope Laboratories,Inc.,批号:PR-33450/03212CL1);苯磺酸甲酯(中国食品药品检定研究院,批号:510193-202001)、苯磺酸丙酯(中国食品药品检定研究院,批号:510195-202001)、苯磺酸异丙酯(中国食品药品检定研究院,批号:510178-202502)、对甲苯磺酸甲酯(中国食品药品检定研究院,批号:510175-202402)、对甲苯磺酸异丙酯(中国食品药品检定研究院,批号:510177-202001)。

2 qHNMR 法

2.1 供试品溶液的制备 分别取苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯各约 20 mg 和内标物对苯二甲酸二甲酯约 10 mg,精密称定,用 0.6 mL 的 $CDCl_3$-*d* 溶解,混匀,作为供试品溶液。

2.2 测试条件及数据处理 采用 30° 脉冲,温度 25 ℃,采集时间(AQ)2.75 s,弛豫延迟时间(D1)10 s,扫描次数(NS)16 次,谱宽(SWH)为 11 904.76 Hz,采集 5 种苯磺酸酯类化合物及内标物^{1}H-NMR 谱(见图 2)。在上述实验条件下,调整仪器参数、调谐、锁场、匀场、采样,得到^{1}H-NMR 谱,然后对谱图进行相位校正和基线调整。分别选取氢谱图中待测物苯磺酸甲酯 δ7.92、苯磺酸丙酯 δ7.92、苯磺酸异丙酯 δ7.92、对甲苯磺酸甲酯 δ7.79、对甲苯磺酸异丙酯 δ7.79 和内标物 δ8.10 为定量峰进行测定。

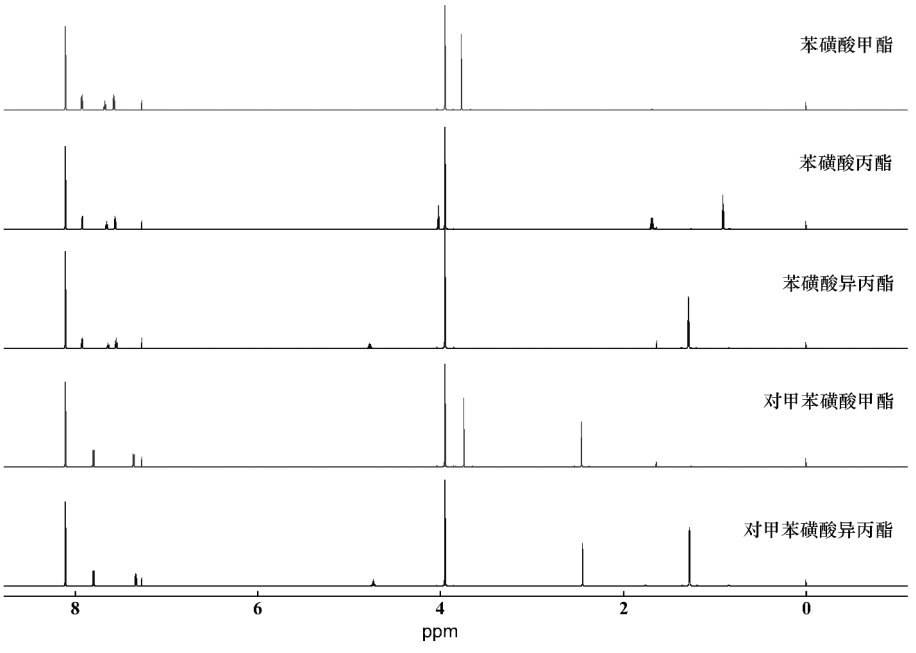


图 2 5 种苯磺酸酯类化合物加入内标物后的^{1}H-NMR 谱图

对选定的内标定量峰信号和样品定量峰信号进行积分，所有谱图采用相同积分区间，待测物的含量计算公式为：

$$P_s = \frac{M_s \times A_s \times N_r \times m_r}{M_r \times A_r \times m_s \times N_s} \times P_r \times 100\%$$

其中 P_s、P_r 分别为样品与内标物的质量百分含量；M_s、M_r 分别为样品与内标物的相对分子质量；A_s、A_r 分别为样品与内标物的定量峰积分面积；N_s、N_r 分别为样品与内标物的定量峰包含的质子数；m_s、m_r 分别为样品与内标物的称样量。

3 HPLC 法[21]

3.1 供试品溶液制备 分别取苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸异丙酯各约 10 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液；再分别精密吸取上述各溶液适量，用乙腈稀释成 0.1% 的溶液，作为自身对照溶液。

3.2 色谱条件 采用 CAPCELL PAK C_{18}柱(250 mm ×4.6 mm，5 μm)为色谱柱，以 0.1% 磷酸水溶液和乙腈(50∶50)为流动相；流速为 1.0 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 225 nm；进样体积为 10 μL。

结 果

1 线性关系考察

分别精密称取 5 种苯磺酸酯类化合物适量，用 $CDCl_3$-*d* 溶解，制成苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯浓度分别约为 5、10、15、40 和 50 mg·mL^{-1}，对苯二甲酸二甲酯浓度约为 16 mg·mL^{-1}，作为线性关系溶液。按上述“**2.2**”项下实验条件测定 NMR 图，记录定量峰峰面积，分别以样品与内标物的质量比为横坐标，样品定量峰与内标物定量峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线，得到回归方程，见表 1。

表 1 回归方程

编号	成分	回归方程	R^2	线性范围/mg·mL^{-1}
1	苯磺酸甲酯	y = 0.558 1x + 0.016 3	0.999 8	5.30 ~ 52.93
2	苯磺酸丙酯	y = 0.465 3x + 0.007 8	1.000 0	5.08 ~ 50.78
3	苯磺酸异丙酯	y = 0.425 3x + 0.031 1	0.999 1	5.12 ~ 51.10
4	对甲苯磺酸甲酯	y = 0.489 2x + 0.027 9	0.999 6	6.40 ~ 51.18
5	对甲苯磺酸异丙酯	y = 0.439 1x + 0.015 8	0.999 5	5.12 ~ 51.23

2 精密度实验

取供试品溶液，按“**2.2**”项下的测定条件连续测定 5 次，计算样品定量峰面积与内标物定量峰面积比值的 RSD，苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯分别为 0.28%、0.02%、0.16%、0.09% 和 0.08%，表明仪器精密度良好。

3 重复性实验

按“**2.1**”项下的方法平行制备供试品溶液 6 份，按“**2.2**”项下实验条件进行测定，实验结果表明重复性良好，结果见表 2。

表 2 重复性结果

编号	含量/%				
	苯磺酸甲酯	苯磺酸丙酯	苯磺酸异丙酯	对甲苯磺酸甲酯	对甲苯磺酸异丙酯
1	99.50	99.32	99.56	99.84	99.38
2	100.02	99.31	98.93	99.69	99.55
3	99.50	99.33	98.95	99.41	99.43
4	99.49	99.17	99.30	99.43	99.49
5	99.41	99.52	99.11	99.60	99.31
6	99.58	99.55	99.17	99.66	99.41
平均值	99.6	99.4	99.2	99.6	99.4
RSD	0.25	0.14	0.24	0.16	0.08

4 稳定性实验

按“**2.1**”项下方法制备供试品溶液，按“**2.2**”项下实验条件在 0、2、4、8、12 h 进行测定，计算样品苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯定量峰与内标峰内标物峰面积的比值，其 RSD 分别为 0.49%、0.48%、0.15%、0.40% 和 0.14%，这表明供试品溶液在 24 h 内测定稳定性良好。

5 检测限和定量限

取线性关系项下的供试品溶液约 5 $mg\cdot mL^{-1}$，以定量峰的信噪比（S/N）= 3 计，苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯检测限分别为 14.8、13.6、14.8、3.3 和 6.1 $\mu g\cdot mL^{-1}$；以定量峰的 S/N = 250[22] 计，苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸异丙酯定量限分别为 1 237.5、1 137.5、1 240.0、275.0 和 307.5 $\mu g\cdot mL^{-1}$。

6 qHNMR 法与质量平衡法结果比较

取按“**3.1**”项下配制的 5 种苯磺酸酯类化合物的供试品溶液，按照“**3.2**”项下方法测定，分别测得苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸异丙酯供试品溶液的纯度（见图 3）；按照《中华人民共和国药典》2020 年版第四部 0841 通则项下炽灼残渣检查法，分别测定炽灼残渣量；按照《中华人民共和国药典》2020 年版第四部 0832 通则项下“第一法 费休氏法”进行水分测定，分别测得水分含量。根据质量平衡法含量计算公式，含量（%）=（100% − 水分% − 炽灼残渣%）× HPLC 纯度，结果表明质量平衡法与 qHNMR 法测定结果基本一致，见表 3。

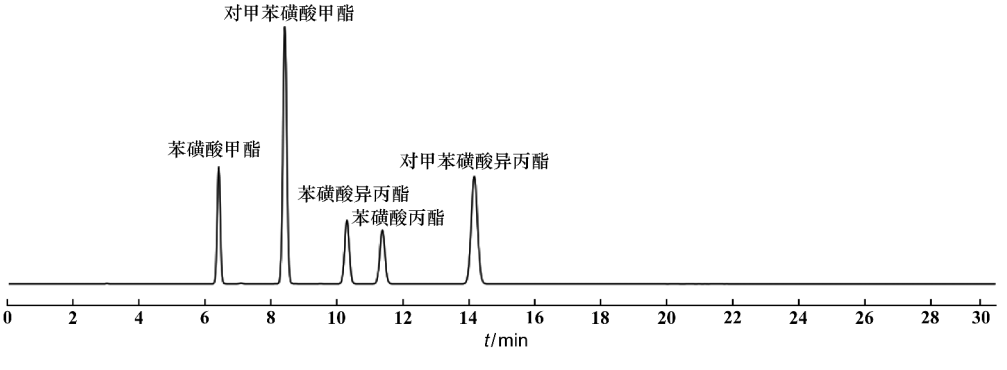


图 3 5 种苯磺酸酯类化合物 HPLC 图谱出峰顺序

表 3 qHNMR 法与质量平衡法结果

成分	含量/%	
	qHNMR 法	质量平衡法
苯磺酸甲酯	99.6	99.9
苯磺酸丙酯	99.4	99.4
苯磺酸异丙酯	99.2	99.4
对甲苯磺酸甲酯	99.6	99.5
对甲苯磺酸异丙酯	99.4	99.3

讨　论

1　内标物及其溶剂的选择

内标物的选择不应与待测物或溶剂发生反应，在^{1}H-NMR 谱图中具有简单峰，且与待测物信号无重叠，其定量峰应与待测物的定量峰互不干扰[23]。遵循这一原则本研究选用对苯二甲酸二甲酯为内标物。溶剂的选择优先考虑其对待测样品和内标物的溶解性，同时保证溶剂峰在^{1}H-NMR 谱中不会与待测物及内标物的定量峰产生重叠[24-25]。本实验选用 $CDCl_3$-*d* 作为溶剂，因其对供试品及所选内标物对苯二甲酸二甲酯均具有良好的溶解性，并在测定的^{1}H-NMR 谱图中，溶剂峰均未与样品定量峰及内标物定量峰发生干扰。

2　弛豫时间(T1)的设置

在定量实验研究中，核磁共振信号积分值受到 D1 的显著影响，为确保实验数据的准确性，通常设定 D1 值不低于 5 倍的定量峰中所涉及最长纵向 T1 的峰值[26]。本实验通过测定待测物和内标物在不同溶剂中的 T1 值，测得苯磺酸甲酯、苯磺酸丙酯、苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸异丙酯的 T1 值均为 0.6 s，内标物对苯二甲酸二甲酯的 T1 值为 0.7 s，为保证采样过程中质子能够充分弛豫，D1 设置为 10 s。

3　质量平衡法与 qHNMR 法测定结果分析

质量平衡法受多种因素的影响，尤其在采用色谱法进行纯度测定时，受各杂质分离度、不同成分响应值等因素影响，可能导致检测结果的误差，从而对质量平衡法所得结果的准确性造成干扰；而 qNMR 法仅与待测物质中的氢质子数量有关，且无需待测物对应的标准物质，不受残留溶剂、水分和无机离子等因素干扰。对于标准物质的赋值，除采用通用的质量平衡法定值外，还需要其他方法予以验证，本实验采用 qNMR 法测定含量，作为质量平衡法的佐证数据，以确保标准物质赋值的准确性。

4　结论

本研究建立了 qHNMR 法测定 5 种苯磺酸酯类化合物含量的方法，并对该方法的线性、精密度、重复性和溶液稳定性等进行了考察，结果均显示良好。研究表明，采用对苯二甲酸二甲酯内标物测定 5 种苯磺酸酯类化合物的含量与质量平衡法赋值结果基本一致。综合分析，本研究建立的 qHNMR 法具有准确度高、操作简便、快捷等优点，为苯磺酸酯类化合物的含量测定提供了新的测定方法。

[参 考 文 献]

[1] 鲁晶晶，冯芳. 磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 广州化工，2019，47(9)：20-22.

[2] 刘雪薇，厉程，韩海云，等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 色谱，2018，36(10)：952-961.

[3] 韩佳芮，徐艳梅，郝丽娟，等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质测定方法研究进展[J]. 化学分析计量，2023，32(6)：104-108.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京：中国医药科技出版社，2020：537-540.

[5] Industry G F. M7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk[EB/OL]. (2014-06-23)[2025-12-10]. https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/4/0.

[6] European Medicines Agency. Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities[EB/OL]. (2010-09-23)[2025-12-10]. https://www.ema.europa.eu/en/homepage.

[7] Guidance for industry genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: Recommended Approaches[EB/OL]. (2017-04-09)[2025-12-10]. https://max.book118.com/html/2017/0407/99220567.shtm.

[8] 栾保磊，徐新军，梁桂挺，等. HPLC-MS 测定奥美沙坦酯中有关基因毒性杂质[J]. 中国药科大学学报，2019，50(3)：325-329.

[9] 李明显，郑枫，丁黎. HPLC-UV 法测定卡培他滨中的对甲苯磺酸酯[J]. 广州化工，2019，47(10)：92-94.

[10] 赵江，张倬熙. HPLC 法测定缬沙坦氨氯地平片中苯磺酸甲酯杂质的验证方法[J]. 昆明冶金高等专科学校学报，2024，40(6)：34-39.

[11] 舒诗会，姚君亮，尹大全. LC-MS/MS 法检测拉科酰胺原料中的对甲苯磺酸甲酯[J]. 上海医药，2019，40(15)：116-119.

[12] 郭佳音. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定苯磺酸酯类基因毒性杂质[J]. 广东化工，2020，47(7)：199-207.

[13] 董海峰，汤桦，杨俊免，等. 气相色谱-质谱法检测药物中 3 种苯磺酸酯类基因毒性杂质[J]. 分析仪器，2021，28(3)：28-32.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京：中国医药科技出版社，2020：53-55.

[15] U.S. Pharmacopeial Convention. USP-NF: The United States Pharmacopeia and The National Formulary[S]. 44th ed. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2022.

[16] European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European Pharmacopoeia[S]. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

[17] 刘慢，赵阗，刘会利，等. 定量核磁共振氢谱法测定枸橼酸托法替布片的有效含量[J]. 分析测试学报，2023，42(3)：363-367.

[18] 陈忠兰，靳龙龙，徐翊雯，等. 核磁共振波谱法对维莫非尼的定性和定量分析[J]. 中国新药杂志，2023，32(7)：747－751.
[19] 丽妍，杨帆，孙萌，等. 安格洛苷C对照品的定值研究[J]. 北京中医药大学学报，2023，46(2)：273－280.
[20] 田冶，崇小萌，刘颖，等. 盐酸伊达比星标准物质的研制[J]. 中国新药杂志，2022，31(17)：1747－1751.
[21] 舒理建，楼赛丽，吴晨皓，等. 苯磺贝他斯汀片中基因毒性杂质苯磺酸乙酯与苯磺酸异丙酯的含量测定[J]. 质量与检测，2020，2(5)：19－20.
[22] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*，2010，57(2)：229－240.
[23] RUNDLÖF T，MATHIASSON M，BEKIROGLU S，*et al*. Survey and qualification of internal standards for quantification by 1H NMR spectroscopy[J]. *J Pharm Biomed Anal*，2010，52(5)：645－651.
[24] 冯玉飞，马玲云，关皓月，等. 定量核磁共振法测定帕瑞昔布钠的质量分数[J]. 中国新药杂志，2024，33(12)：1277－1280.
[25] 张雅军，陈忠兰，徐翊雯，等. 定量核磁共振氢谱法测定5种*N*-亚硝胺类化合物的含量[J]. 中国新药杂志，2022，31(13)：1326－1330.
[26] 师小春，冯玉飞，陈忠兰，等. 6种核磁共振法含量测定用标准物质纵向弛豫时间影响因素分析[J]. 药物分析杂志，2020，40(11)：1928－1934.

编辑：刘卓越/接受日期：2025－07－30