GC-MS 法测定磷酸西格列汀中磷酸三甲酯的含量

徐 盼[1]，董淑波[2]，杨汉跃[2]，李善金[1]，程青芳[1]*

（1. 江苏海洋大学药学院，江苏连云港 222005；2. 江苏德源药业股份有限公司，江苏连云港 222047）

摘要：建立了气相色谱 - 质谱（GC-MS）法测定磷酸西格列汀（**1**）中的基因毒性杂质磷酸三甲酯（**3**）。色谱柱选用 DB-624（0.25 mm×30 m×1.4 μm）毛细管柱，采用选择离子监测（SIM）模式。结果显示，**3** 在 40.93 ～ 233.90 ng/ml 内线性关系良好，定量限为 40.9 ng/ml，检测限为 12.3 ng/ml，平均加样回收率（n=12）为 97.0%，RSD 为 5.2%，且稳定性良好。样品检测结果显示 3 批 **1** 中均未检出 **3**，建立的分析方法重复性好、专属性强、灵敏度高，适用于 **1** 中基因毒性杂质 **3** 的检测。

关键词：GC-MS；磷酸西格列汀；基因毒性杂质；磷酸三甲酯

中图分类号：O657.63；R927.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）04-0559-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.019

Determination of Trimethyl Phosphate in Sitagliptin Phosphate by GC-MS

XU Pan[1], DONG Shubo[2], YANG Hanyue[2], LI Shanjin[1], CHENG Qingfang[1]*

(*1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Jiangsu Deyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047*)

ABSTRACT: A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was established for the determination of the genotoxic impurity trimethyl phosphate (**3**) in sitagliptin phosphate (**1**). The DB-624 (0.25 mm×30 m×1.4 μm) capillary column was used, and the selected ion monitoring (SIM) mode was adopted. The results showed that it was linear for **3** in the range of 40.93 – 233.90 ng/ml, the limit of quantification was 40.9 ng/ml, and the limit of detection was 12.3 ng/ml. The average sample recovery (n=12) was 97.0%, with the RSD of 5.2%, and the stability was good. The sample test results showed that **3** was not detected in three batches of **1**. The established method has good repeatability, strong specificity and high sensitivity, which is suitable for the detection of genotoxic impurity **3** in **1**.

Key Words: GC-MS; sitagliptin phosphate; genotoxic impurity; trimethyl phosphate

磷酸西格列汀（sitagliptin phosphate，**1**）是全球首个用于治疗 2 型糖尿病的二肽基肽酶 -4（DDP-4）抑制剂[1—2]，其通过抑制 DPP-4 水解肠促胰岛素，进而提高血浆中胰高血糖素样肽 -1（GLP-1）和葡萄糖依赖性促胰岛素分泌多肽的活性，以葡萄糖依赖性方式促进胰岛素分泌，并降低胰高血糖素水平。**1** 具有耐受性好和安全性高等优点，无论单独使用还是与二甲双胍、阿卡波糖和吡格列酮等降糖药物联用都能有效发挥降血糖作用[3]，并且患者不会出现低血糖、体质量增加等不良反应，市场应用前景良好。

三氟甲基 -5,6,7,8- 四氢 -1,2,4- 三唑并［4,3-α］- 吡嗪盐酸盐（**2**）是合成 **1** 的重要中间体[4]，其合成路线较多[5—6]，代表性合成路线是以水合肼、三氟乙酸乙酯和氯乙酰氯为起始原料，经肼解后，在三氯氧磷作用下关环，再发生亲核取代反应，最后在甲醇盐酸溶液中关环制得。在 **2** 的制备过程中，三氯氧磷可能会与溶剂甲醇发生酯化反应，生成杂质磷酸三甲酯（**3**），**1**、**2**、**3** 的化学结构式见图 1。

3 为有机磷酸酯类化合物，具有致癌性警示结构[7]，有损伤中枢神经和生殖细胞的风险，已被收录于 1 574 种致癌物质数据库（The Carcinogenic

收稿日期：2021-09-24

作者简介：徐 盼（1997—），女，硕士研究生，专业方向：药物合成及分析。

通信作者：程青芳（1969—），女，教授，从事药物化学研究。

E-mail：spring817191@sina.com

Potency Database，CPDB）[8—9]。使用 **2** 为原料合成 **1** 时，**3** 可能会被带入 **1** 中，因此，需要对 **1** 中 **3** 的含量进行严格控制。根据《中华人民共和国药典》2020 年版四部 9306 遗传毒性杂质控制指导原则和人用药品技术要求国际协调理事会（The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use，ICH）M7 指南中限值的制定方法，**1** 的相对分子质量为 523.33，西格列汀的相对分子质量为 407.32，则 **1** 的每日最大剂量按西格列汀 100 mg/d 计约为 128 mg，以毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）1.5 μg/d 计算 **3** 的可接受摄入量，得 **3** 的限度为 0.001 2%[10]。

目前，有机磷酸酯类化合物的检测方法主要有 GC 法、GC-MS 法和 LC-MS/MS 法等[11—13]。其中 GC 法较为常用，但该法灵敏度较低，无法对痕量组分进行准确定量；**3** 为易挥发的极性小分子化合物，LC-MS/MS 法对其保留较弱，易受基质干扰。因此，本研究采用精密度高、灵敏度好且适用于极性易挥发痕量组分分析的 GC-MS 法测定 **1** 中 **3** 的含量，并进行全面的方法学验证，以期为 **1** 的质量控制及安全性评估提供参考。

1　仪器与试药

GCMS-QP2020 NX 型气相色谱 - 质谱联用仪（日本 Shimadzu 公司）；SECURA225D-1CN 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

1（江苏德源药业股份有限公司，按无水物计含量分别为 100.1%、100.1%和 99.5%，批号分别为 011220062801、011220041001 和 011220032601）；**3** 对照品（上海麦克林生化科技有限公司，含量 99.34%，批号 C10726837）；*N*- 甲基吡咯烷酮、乙腈、甲醇、乙醇均为色谱纯；0.22 μm 有机滤膜（上海兴亚净化材料厂）。

2　方法与结果

2.1　色谱与质谱条件

色谱条件：色谱柱 DB-624 柱（0.25 mm×30 m×1.4 μm）；进样口温度 230 ℃；进样方式 直接进样；分流比 10 ∶ 1；进样量 1 μl；载气 氦气（纯度 99.999%）；隔垫吹扫流速 3 ml/min；柱流速 1.5 ml/min；柱温 初始温度 60 ℃，维持 1 min，以 8 ℃ /min 升温至 190 ℃，保持 1 min，再以 25 ℃ /min 升温至 220 ℃，保持 5 min。

质谱条件：离子源 电子轰击离子源（EI）；离子源温度 230 ℃；接口温度 250 ℃；溶剂延迟时间 5 min；采集模式 选择离子监测模式（SIM）；定量离子 *m*/*z* 110；定性离子 *m*/*z* 79、*m*/*z* 140。

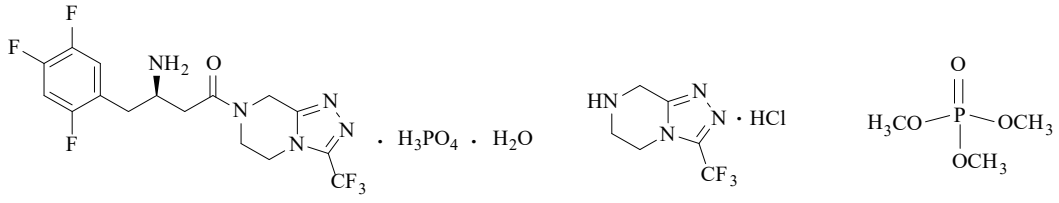
2.2　溶液配制

空白溶剂：*N*- 甲基吡咯烷酮∶乙腈 =10 ∶ 90（*v* ∶ *v*）。

3 对照品贮备液：精密称取 **3** 对照品适量，用空白溶剂配制成质量浓度为 1.2 μg/ml 的 **3** 对照品贮备液。

3 对照品溶液：精密量取 **3** 对照品贮备液 1 ml，置 10 ml 量瓶中，用空白溶剂定容，即得 **3** 对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1**（批号 011220062801）100 mg，置 10 ml 量瓶中，加入 *N*- 甲基吡咯烷酮 1 ml 超声使其溶解，用乙腈定容，摇匀。放入冰箱（4 ℃）1 h 后取出，放至室温，用 0.22 μm 有机滤膜



1　　**2**　　**3**

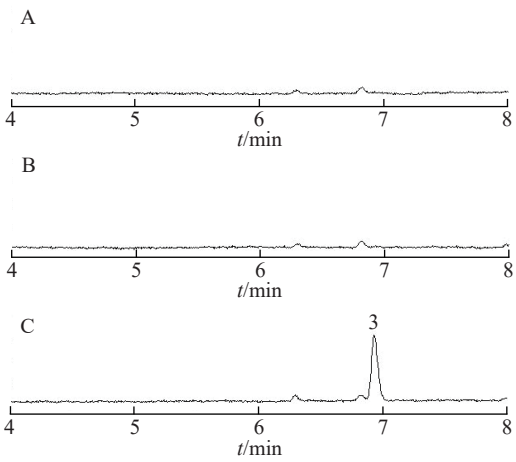
图 1　1、2、3 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1**, **2**, and **3**

过滤，取滤液即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

精密量取“**2.2**”项下空白溶剂、**3** 对照品溶液和供试品溶液各 1 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录提取离子流图。结果见图 2，空白溶液和供试品溶液均未出峰，不干扰 **3** 的检测，说明本方法专属性良好。



A：空白溶液，B：供试品溶液，C：**3** 对照品溶液

3－**3**

图 2 专属性试验色谱图

Fig.2 Chromatograms of Specificity Test

2.4 定量限与检测限

取“**2.2**”项下 **3** 对照品溶液，逐级稀释，分别以待测物信噪比（*S*/*N*）为 10 和 3 的质量浓度作为定量限和检测限，按“**2.1**”项下色谱与质谱条件进行测定。结果显示，**3** 的定量限为 40.9 ng/ml，检测限为 12.3 ng/ml。取定量限溶液，按“**2.1**”项下色谱与质谱条件重复进样 6 次，结果显示峰面积 RSD（*n*=6）为 1.8%，表明本方法灵敏度较高。

2.5 线性试验

取“**2.2**”项下 **3** 对照品贮备液 0.35、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0 ml，各置 10 ml 量瓶中，加入空白溶剂定容，摇匀，作为系列线性对照品溶液。按“**2.1**”项下色谱与质谱条件进行测定，记录提取离子流图，以峰面积（*A*）为纵坐标，质量浓度（*c*）为横坐标建立线性回归方程。结果显示，线性回归方程为 *A*=12.110 3*c*－57.942 8，*r*=0.999 7，表明 **3** 在 40.93 ～ 233.90 ng/ml 内线性关系良好。

2.6 回收率试验

精密称取 **1**（批号 011220062801）100 mg，置 10 ml 量瓶中，加入 *N*- 甲基吡咯烷酮 1 ml 超声使其溶解，分别加入“**2.2**”项下 **3** 对照品贮备液 0.35、0.5、1.0、1.5 ml 制成定量限（LOQ）、50%、100% 及 150% 加样回收率试验溶液，每个浓度平行配制 3 份，分别加入乙腈定容，摇匀，放入冰箱 1 h 后取出，放至室温，用 0.22 μm 有机滤膜过滤，取过滤液。按“**2.1**”项下色谱质谱条件进行测定，记录提取离子流图，按外标法以峰面积计算各个浓度 **3** 的回收率，结果显示，4 份不同浓度的加样回收率试验溶液的回收率均在 88.0% ～ 104.2%，平均回收率（*n*=12）为 97.0%，RSD 为 5.2%，准确度较高，能够满足检测要求。

2.7 重复性试验

精密称取 **1**（批号 011220062801）100 mg，置 10 ml 量瓶中，加入 *N*- 甲基吡咯烷酮 1 ml 超声使其溶解，再精密加入 **3** 对照品贮备液 1 ml，用乙腈定容，摇匀。放入冰箱 1 h 后取出，放至室温，用 0.22 μm 有机滤膜过滤，取滤液，得重复性试验溶液。取上述重复性试验溶液 6 份，按“**2.1**”项下色谱与质谱条件进样测定，记录提取离子流图，按外标法以峰面积计算 **3** 的含量。结果显示，6 次测定结果的 RSD（*n*=6）为 3.1%，说明方法重复性良好。

2.8 精密度试验

取“**2.6**”项下 100% 加样回收率试验溶液，按“**2.1**”项下色谱与质谱条件重复测定 6 次，记录提取离子流图，按外标法以峰面积计算 **3** 的含量。结果显示，6 次测定结果的 RSD（*n*=6）为 1.9%，说明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

取“**2.2**”项下供试品溶液、**3** 对照品溶液和“**2.7**”项下重复性试验溶液，分别于室温下放置 0、2、4、6、11、16、22、28、38、48 h 后取样测定，记录提取离子流图。结果显示，**3** 对照品溶液和重复性试验溶液中 **3** 峰面积的 RSD（*n*=10）分别为 3.2%、3.8%，

供试品溶液中未检出，说明供试品溶液、对照品溶液和重复性试验溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.10 耐用性考察

按“**2.7**”项下重复性试验溶液的配制方法配制 2 份测定溶液，在“**2.1**”项下色谱与质谱条件的基础上，分别改变柱流速（±0.1 ml/min）、离子源温度（±5 ℃）以及进样口温度（±5 ℃），其他色谱条件不变，进行测定。结果显示，改变柱流速（1.4、1.5、1.6 ml/min）、离子源温度（225、230、235 ℃）、进样口温度（225、230、235 ℃）后，2 份测定溶液中 **3** 的峰面积基本一致，RSD（n=6）分别为 3.5%、3.4% 和 3.0%，表明该分析方法的耐用性良好。

2.11 样品检测

取 3 批 **1**，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，并取“**2.2**”项下 **3** 对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱及质谱条件分别进样测定，记录提取离子流图，按外标法以峰面积计算 **3** 的含量，结果表明，3 批 **1** 中均未检测出 **3**。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

3 的极性和挥发性较大，按分离组分极性或官能团与固定液相似的原则[14]，试验选择固定液为聚乙二醇的毛细管柱 VF-WAX ms 柱（0.25 mm×30 m×0.25 μm）和固定液为 6% 氰丙基苯基 -94% 甲基聚硅氧烷的毛细管柱 DB-624 柱（0.25 mm×30 m×1.4 μm）作为分析柱，比较 **3** 在 2 种色谱柱上的保留情况。结果显示，**3** 在 VF-WAX ms 毛细管柱条件下色谱峰峰形较差，拖尾严重，而在 DB-624 毛细管柱条件下峰形尖锐、灵敏度较高，因此选用 DB-624 毛细管柱开展后续研究。

此外，因供试品溶液、回收率试验溶液和重复性试验溶液的制备中均加入了较高浓度的 **1**，为防止 **1** 浓度过高堵塞色谱柱，所以在进样前将供试品溶液、回收率试验溶液和重复性试验溶液均放入冰箱 1 h，使部分 **1** 析出后再进样，方法学考察中的回收率试验已证明 **1** 析出对 **3** 的检测结果无影响，又因前期工作已确定 **3** 对照品溶液是否冷藏 1 h 对其出峰结果无影响，因此为节约时间与成本，**3** 对照品溶液无需处理，可直接进样测定。

3.2 溶剂的选择

根据 **3** 的限度（0.001 2%）及 **1** 和 **3** 的理化性质，分别考察二甲基亚砜、*N*- 甲基吡咯烷酮、乙腈、甲醇，以及不同体积比的 *N*- 甲基吡咯烷酮和乙腈作为溶剂时，**1** 和 **3** 的溶解度及出峰情况。研究发现二甲基亚砜、*N*- 甲基吡咯烷酮及甲醇均对 **1** 或 **3** 的出峰存在不同程度的干扰，而 **1** 在乙腈中溶解度较差，均不选用。当使用混合溶剂 *N*- 甲基吡咯烷酮：乙腈 =10 ： 90（v ： v）为空白溶剂时，**1** 和 **3** 的溶解度较好，且对 **1** 和 **3** 出峰无干扰，灵敏度较高，故选择混合溶剂 *N*- 甲基吡咯烷酮：乙腈 =10 ： 90（v ： v）为空白溶剂。

3.3 目标离子的选择

采用全扫描模式（m/z 36→500）对空白溶剂和对照品溶液进行测定，考察 **3** 的质谱参数。结果显示，空白溶剂对 **3** 的测定无干扰，碎片离子 m/z 110、m/z 79 和 m/z 140 丰度较高且分离度良好（如图 3 所示），因此选取 m/z 110 作为定量离子，m/z 79 和 m/z 140 作为定性离子。

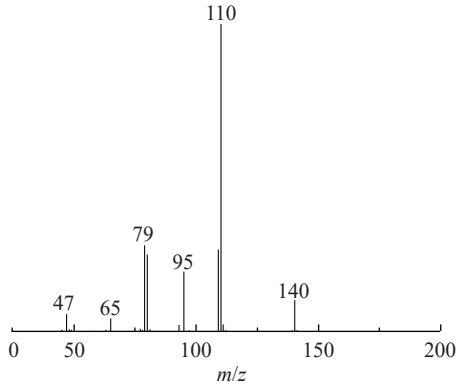


图 3　3 的 MS 图

Fig.3　The Mass Spectrum of **3**

参考文献：

[1] 蔡　倩, 刘　蕾. 新型降糖药物二肽基肽酶-4抑制剂的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(3): 302-307.

[2] SCOOT L J. Sitagliptin: a review in type 2 diabetes [J]. *Drugs*, 2017, **77**(2): 209-224.

[3] 柳　越, 柏　松. 阿卡波糖联合磷酸西格列汀对2型糖尿病

的治疗作用研究[J]. 中国实用医药, 2019, **14**(4): 116-118.

[4] PAN X H, LI X J, LIU Q L, *et al*. Efficient synthesis of sitagliptin phosphate, a novel DPP-IV inhibitor, via a chiral aziridine intermediate [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, **54**(50): 6807-6809.

[5] 李佳明. 3-三氟甲基-5,6,7,8-四氢-[1,2,4]三唑-[4,3- α]并吡嗪盐酸盐合成工艺研究[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2010.

[6] 田志高, 刘安昌, 张 良, 等. 3-三氟甲基-5,6,7,8-四氢-1,2,4-三唑[4,3- α]吡嗪盐酸盐的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2010, **41**(11): 805-806.

[7] 马 磊, 马玉楠, 陈 震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(18): 2106-2111.

[8] 顾 杰, 顾爱华, 石利利, 等. 有机磷酸酯环境分布及神经毒性研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2018, **35**(3): 227-281.

[9] YUAN S W, ZHU K R, MA M, *et al*. *In vitro* oxidative stress, mitochondrial impairment and G1 phase cell cycle arrest induced by alkyl-phosphorus-containing flame retardants [J]. *Chemosphere*, 2020, **248**: 1-11.

[10] 张 霁, 张英俊, 聂 飚. 药物研发中基因毒性杂质的控制策略与方法探索进展[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(9): 1203-1220.

[11] BRUNENGRABER D Z, MCCABE B J, KATANIK J, *et al*. Gas chromatography-mass spectrometry assay of the (18)o enrichment of water as trimethyl phosphate [J]. *Anal Biochem*, 2002, **306**(2): 278-282.

[12] 潘 萌, 宋淑玲, 王 媛, 等. 气相色谱火焰光度法测定水体中9种有机磷酸酯阻燃剂[J]. 分析测试学报, 2015, **34**(12): 1377-1381.

[13] 刘 星, 万正瑞, 杜 伟, 等. 液相色谱-串联四极杆质谱法测定海水和海底泥中的有机磷酸酯类阻燃剂[J]. 环境化学, 2020, **39**(10): 2947-2951.

[14] 徐小民. 串联毛细管气相色谱柱分离原理及应用[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2012.

(上接第521页)

[12] KONSTANTINOS NK, ANDREANA NA, IOANNIS T, *et al*. Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications [J]. *Int J Pharm*, 2011, **409**(1/2): 216-228.

[13] 李京晗, 潘 昊, 陈建亭, 等. 静电纺丝技术在药物递送系统中的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, **36**(1): 85-90.

[14] ZAMANI M, PRABHAKARAN M P, RAMAKRISHNA S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, **8**: 2997-3017.

[15] 崔 静, 邱玉宇, 卢杭诣, 等. 共混与同轴静电纺载药纳米纤维的制备、表征及比较[J]. 功能材料, 2016, **47**(4): 4055-4059.