LC-MS 法测定托格列净中的 4- 二甲氨基吡啶及其氮氧化物

张晓雯[1,2]，蒋港龙[1]，孟冬朔[1,2]，周爱南[3]，刘　育[1]*

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，科技成果转化中心，上海 201203；2. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，化学制药新技术中心，上海 201203；3. 中国科学院上海药物研究所，上海 201203）

摘要：建立了 LC-MS 法测定托格列净（**1**）中的 4- 二甲氨基吡啶（**2**）和 4- 二甲氨基吡啶氮氧化物（**3**）。采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）和电喷雾离子源，多反应监测模式，以甲醇为流动相 A，0.1%甲酸水溶液为流动相 B，梯度洗脱。结果表明，**2** 和 **3** 分别在 15.40 ～ 616.00 ng/mL 和 15.58 ～ 623.20 ng/mL 内线性关系良好，检测限分别为 3.08、3.12 ng/mL，**2** 和 **3** 的平均回收率（*n*=9）分别为 104.33%和 101.54%，RSD 分别为 3.32%和 3.10%。建立的方法灵敏度好、选择性强、准确度高，可用于 **1** 中的 **2** 和 **3** 的测定。

关键词：托格列净；4- 二甲氨基吡啶；4- 二甲氨基吡啶氮氧化物；LC-MS；杂质

中图分类号：R917；R977.1^{+}5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)09-1250-05

引用：张晓雯 , 蒋港龙 , 孟冬朔 , 等．LC-MS 法测定托格列净中的 4- 二甲氨基吡啶及其氮氧化物 [J]．中国医药工业杂志 , 2024, 55(9): 1250-1254．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.09.012

Determination of 4-Dimethylaminopyridine and Its *N*-Oxide in Tofogliflozin by LC-MS

ZHANG Xiaowen[1,2], JIANG Ganglong[1], MENG Dongshuo[1,2], ZHOU Ainan[3], LIU Yu[1]*

(*1. Incubation Center for S&T Achievements, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: A LC-MS method was established to determine the 4-dimethylaminopyridine (**2**) and 4-dimethylaminopyridine *N*-oxide (**3**) in tofogliflozin (**1**). The ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used, with the electrospray ionization and multiple response monitoring mode. The analysis was carried out in the gradient elution mode with methanol as mobile phase A, and 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase B. The results showed that it was linear for **2** and **3** in the ranges of 15.40 – 616.00 ng/mL and 15.58 – 623.20 ng/mL, respectively. The limits of detection for **2** and **3** were 3.08 and 3.12 ng/mL, respectively. The average recoveries were 104.33% and 101.54%, with RSDs of 3.32% and 3.10%, respectively. The established method is sensitive, selective and accurate, which can be used for the determination of **2** and **3** in **1**.

Key Words: tofogliflozin; 4-dimethylaminopyridine; 4-dimethylaminopyridine *N*-oxide; LC-MS; impurity

托格列净（tofogliflozin，**1**）是由日本中外制药（Chugai）公司研发的一种钠 - 葡萄糖耦联转运体 2（sodium-glucose linked transporter，SGLT-2）抑制剂类药物，用于治疗 2 型糖尿病[1]。4- 二甲氨基吡啶（4-dimethylaminopyridine，DMAP，**2**）是一种高效酰化反应催化剂，被广泛用于各类药物的合成反应中，但对人体的皮肤、眼、呼吸系统和神经系统均具有刺激性和高毒性[2—3]。**1** 的合成反应（图 1A）中使用了 **2** 为催化剂[1]，而后处理过程为强碱环境，

收稿日期：2024-01-11

作者简介：张晓雯（1997—），女，硕士研究生，专业方向：药物合成及药物分析。

通信作者：刘　育（1981—），男，研究员，博士生导师，从事创新药物及药物合成工艺的研究。

E-mail：liuyu_tianjin@126.com

使用水且与空气接触；此条件下，**2** 易氧化生成 4-二甲氨基吡啶氮氧化物（4-dimethylaminopyridine *N*-oxide，**3**）（图 1B）。

2 和 **3** 均具有基因毒性杂质警示结构[4]，在较低浓度条件下也会对人体造成巨大的伤害，影响药物质量。根据 ICH 的有关规定[5]，在药物生产过程中需要对 **1** 中的杂质 **2** 和 **3** 进行严格监控。目前，**2** 的检测方法主要有容量滴定法和 HPLC 法[6—8]，但上述方法均无法满足原料药中基因毒性杂质检测的灵敏度要求。并且，关于 **1** 中杂质 **2** 和 **3** 的质量研究目前尚未见文献报道。

本研究采用高效液相色谱 - 质谱（LC-MS）法测定 **1** 中的基因毒性杂质 **2** 和 **3**，并对该方法进行系统的方法学验证，以期建立一种灵敏度好、选择性强、准确度高的检测方法，同时为烷基取代的芳香胺类基因毒性杂质测定提供参考。

1 仪器与试药

ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；6420 Triple Quad 型三重四极杆质谱仪（美国 Agilent 公司）；XS205 型十万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 对照品（含量 99.80%，批号 RS190520-1）由本科研团队合成；**1** 原料药（山东盛华新材料科技股份有限公司，批号 SH181001-1、SH181005-1、SH181012-1、SH190301-1-4、SH190801-1-4、SH190802-1-4，前 3 批为粗品，后 3 批为精制品）；**2** 对照品（上海萨恩化学技术有限公司，含量 98%，批号 G1220236）；**3** 对照品（上海梯希爱化成工业发展有限公司，含量 98%，批号 MDICJ）；甲醇为色谱纯，甲酸为质谱纯，水为超纯水。

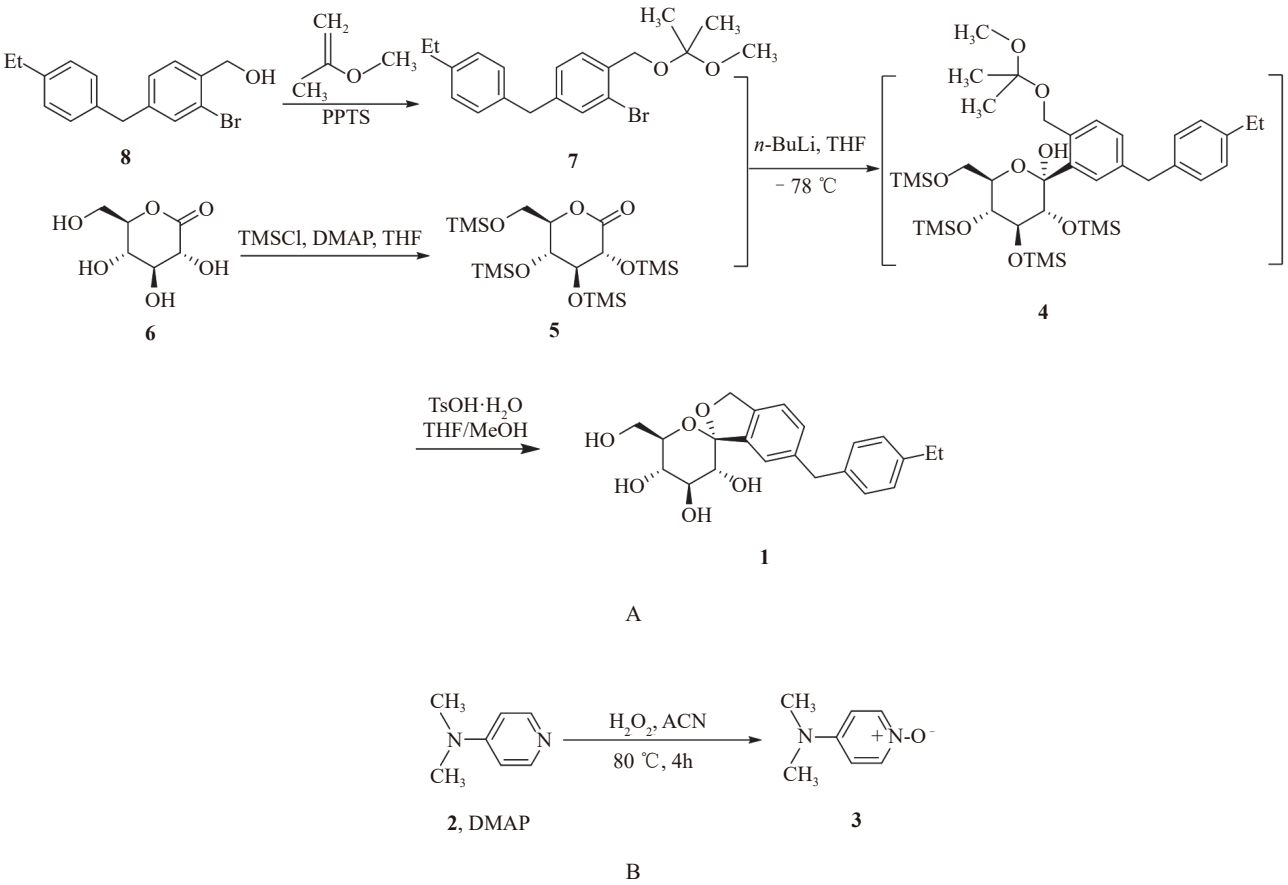


图 1 1 的合成路线（A）和 2 的氧化反应（B）

Fig.1 Synthesis Route of **1**（A）and Oxidation Reaction of **2**（B）

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；流动相 A 为甲醇，B 为 0.1％甲酸水溶液，梯度洗脱（0—2 min，A 5％；2—2.5 min，A 5％—90％；2.5—3.9 min，A 90％；3.9—4 min，A 90％—5％；4—6 min，A 5％）；柱温 30 ℃；流速 0.4 mL/min；检测波长 220 nm；进样量 1 μL。

质谱条件：电喷雾离子源（ESI），正离子模式，多反应监测（MRM）；离子喷雾电压 4 000 V；碎裂电压 120 V；碰撞能量 20 eV；毛细管温度 350 ℃；雾化器压力 241 kPa；雾化气流 12 L/min；监测离子对 *m*/*z* 122.8→ *m*/*z* 106.8（**2**）；*m*/*z* 138.8→ *m*/*z* 120.8（**3**）。

2.2 溶液配制

空白溶液：甲醇和 0.1％甲酸水溶液（体积比 5 ∶ 95）。

2 对照品贮备液：精密称取 **2** 对照品适量，用空白溶液溶解并制成质量浓度为 15 μg/mL 的 **2** 对照品贮备液。

3 对照品贮备液：精密称取 **3** 对照品适量，用空白溶液溶解并制成质量浓度为 15 μg/mL 的 **3** 对照品贮备液。

混合对照品贮备液：精密量取 **2** 对照品贮备液和 **3** 对照品贮备液各 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用空白溶液定容，制成质量浓度为 1.5 μg/mL 的混合对照品贮备液。

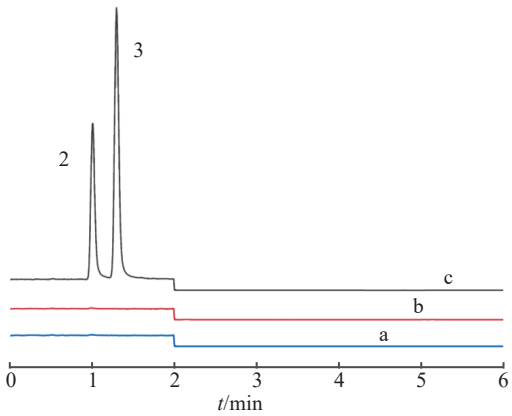
混合对照品溶液：精密量取混合对照品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用空白溶液定容，制成质量浓度为 150 ng/mL 的混合对照品溶液。

系列对照品溶液：分别取混合对照品贮备液 0.1、0.4、0.6、0.8、1、2、4 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用空白溶液定容，制成质量浓度为 15、60、90、120、150、300、600 ng/mL 的系列对照品溶液。

供试品溶液：取 **1** 原料药约 10 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用空白溶液溶解并定容，制成质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.3 专属性试验

精密量取“**2.2**”项下的空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液（**1** 批号 SH190802-1-4），按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图，结果如图 2 所示。**2** 的保留时间为 1.06 min，**3** 的保留时间为 1.36 min，空白溶液不干扰杂质的测定，专属性良好。



a—空白溶液；b—供试品溶液；c—混合对照品溶液。2—**2**；3—**3**。

图 2 专属性试验色谱图

Fig.2 Chromatograms of the Specific Test

2.4 精密度试验和稳定性试验

精密量取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，连续进样 6 针，记录谱图。结果显示，**2** 和 **3** 的峰面积 RSD（*n*=6）分别为 1.41％和 1.76％，表明系统的进样精密度良好。

取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，于室温下放置，分别在 0、0.5、1、2、4、8 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图。结果表明，混合对照品溶液中 **2** 和 **3** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 4.48％和 4.94％，表明混合对照品溶液在 8 h 内稳定性良好，可满足样品的测定要求。

2.5 线性试验和灵敏度试验

根据 ChP 2020 年版四部通则 9306《遗传毒性杂质控制指导原则》的规定，杂质 **2** 和 **3** 可接受的摄入量为 1.5 μg/d。采用毒理学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）方法 [8] 计算，杂质 **2** 和

3 的限度应不得超过 150 μg/g。

精密量取“**2.2**”项下的系列对照品溶液各 1 μL，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图。以峰面积 *A* 为纵坐标、溶液中 **2** 或 **3** 的质量浓度 *c* 为横坐标，线性回归。以标准曲线的最低质量浓度为定量限。精密量取“**2.2**”项下质量浓度为 15 ng/mL 的系列对照品溶液 2 mL，置 10 mL 量瓶中，用空白溶液定容，得到质量浓度为 3 ng/mL 的检测限溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图。

结果显示，**2** 和 **3** 分别在 15.40 ～ 616.00 ng/mL 和 15.58 ～ 623.20 ng/mL 内线性关系良好，标准曲线方程分别为 A=17.904c - 32.718（r=0.999 5）、A=34.17c - 3.942（r=0.999 8）；检测限分别为 3.08 和 3.12 ng/mL（信噪比 >3），定量限分别为 15.40 和 15.58 ng/mL（信噪比 >10），可以满足检测 **1** 中杂质 **2** 和 **3** 的要求。

2.6 准确度试验和重复性试验

取 **1**（批号 SH190802-1-4）约 10 mg，共 9 份，精密称定，各置 10 mL 量瓶中，分别加入“**2.2**”项下混合对照品贮备液 0.5、1、1.5 mL，用空白溶液定容，作为低（50％）、中（100％）、高（150％）3 个浓度组，每组平行配制 3 份，作为加样回收率溶液。取上述溶液，按“**2.1**”项下的色谱质谱条件进样测定，记录谱图，以外标法计算 **2** 和 **3** 的回收率。结果显示，**2** 和 **3** 的平均回收率（n=9）分别为 104.33％和 101.54％，RSD 分别为 3.32％和 3.10％。

取 **1**（批号 SH190802-1-4）约 10 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加入“**2.2**”项下混合对照品贮备液 1 mL，用空白溶液定容。平行配制 6 份。取上述溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图，以外标法计算 **2** 和 **3** 的回收率。结果显示，**2** 和 **3** 的平均回收率（n=6）分别为 106.09％和 104.28％，RSD 分别为 1.68％和 1.73％，表明方法的重复性良好。

2.7 中间精密度试验

由不同分析人员，在不同时间进行“**2.6**”项下重复性试验操作。综合 2 次试验的结果，**2** 和 **3** 的平均回收率（n=12）分别为 99.98％和 99.31％，RSD 分别为 7.02％和 5.89％。

2.8 耐用性试验

取“**2.2**”项下的空白溶液、混合对照溶液、供试品（**1** 批号 SH190802-1-4）溶液和“**2.6**”项下的中浓度加样回收率溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录谱图。改变流动相流速（±0.02 mL/min）、色谱柱柱温（±2 ℃）、有机相初始比例（±1％甲醇）、色谱柱品牌和批次等，以外标法计算 **2** 和 **3** 的含量，再计算准确度。结果显示，空白溶液不干扰待测物的测定，各样品中 **2** 和 **3** 的回收率均在 90％～ 110％，RSD（n=9）均小于 5％，说明本法耐用性良好。

2.9 样品测定

取“**2.2**”项下的供试品溶液（**1** 批号 SH181001-1、SH181005-1、SH181012-1、SH190301-1-4、SH190801-1-4、SH190802-1-4），按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样，测定 6 批样品中 **2** 和 **3** 的含量，结果如表 1 所示。

表 1 样品测定结果

Tab.1 Determination Results of the Samples

1 批号	**2**/×10^{-6}	**3**/×10^{-6}
SH181001-1[1)]	88	92
SH181005-1[1)]	179	124
SH181012-1[1)]	56	71
SH190301-1-4	未检出	未检出
SH190801-1-4	未检出	未检出
SH190802-1-4	未检出	未检出

注：[1)]SH181001-1、SH181005-1、SH181012-1 批样品为 **1** 粗品。

3 讨论

3.1 质谱离子源和离子化方式的选择

通过研究 **2** 和 **3** 的化合物结构，选择 ESI 离子源正离子模式扫描，得到 **2** 和 **3** 的母离子分别为 122.8 和 138.8；再进行碎片离子扫描得到 **2** 和 **3** 的子离子分别为 106.8 和 120.8。碎片裂解途径如图 3 所示。

3.2 质谱参数和色谱条件的优化

由于 **2** 和 **3** 均为碱性物质，首先采用弱碱性的 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 - 甲醇作为流动相，进行分析方法开发，以增强二者的保留。该流动相体系的 pH 值为 **2** 的 pK_a 值 ±2，导致其分子态与离子态共存，因此 **2** 的色谱峰峰形拖尾严重；用

氨水调节乙酸铵水溶液至 pH 7.65，同时调整流动相的比例，**2** 的峰形拖尾情况无明显改善（图 4A）。考虑到色谱柱对碱性流动相的耐受性较差，尝试采用酸性流动相进行分离。结果显示，以 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇为流动相体系时，**2** 和 **3** 的峰形较好，可完全分离（图 4B）。与此同时，酸性流动相体系可以提高正离子模式下的杂质离子化效率，提高检测灵敏度。

在筛选色谱分离条件的同时，也需要进行质谱参数的优化，如调整质谱的离子喷雾电压、碎裂电压、碰撞能量和雾化器压力。当离子喷雾电压为 4 000 V，碎裂电压为 120 V，碰撞能量为 20 eV，雾化器压力为 241 kPa 时，既能使 **2** 和 **3** 完全分离，也能满足检测灵敏度的需求。

3.3　样品的精制

1 的精制方法为：将 **1** 粗品在石油醚（60～90 ℃）和二氯甲烷的混合溶剂中搅拌回流，过滤，所得滤饼干燥后加入乙腈和水进行重结晶，得 **1** 精制品。根据样品测定结果（表 1）可知，3 批 **1** 粗品中均含有杂质 **2** 和杂质 **3**，精制可将杂质 **2**、**3** 除去，所得终产品中均未检出杂质 **2** 和 **3**。

（下转第 1281 页）

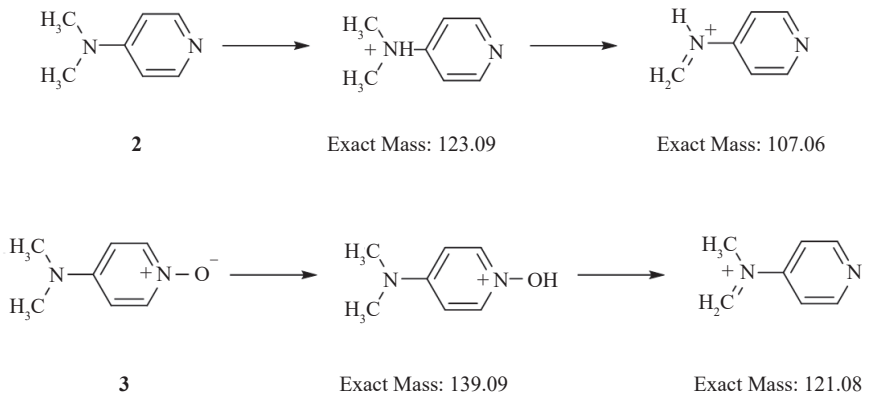
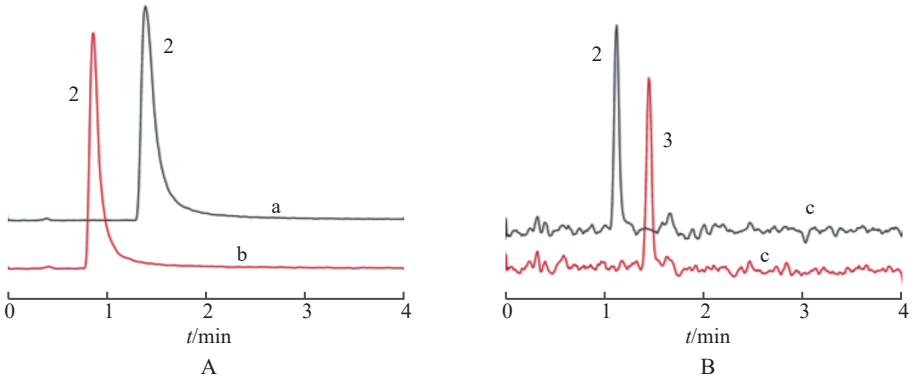


图 3　2 和 3 在 ESI 正离子模式下的碎片裂解途径

Fig.3　Fragmentation Pathways of **2** and **3** in Positive Ion Mode of ESI Source



A—5 mmol/L 乙酸铵水溶液 - 甲醇流动相体系（a—乙酸铵水溶液的 pH 值未调节；b—乙酸铵水溶液的 pH 值用氨水调至 pH 7.65）；B—0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇流动相体系。

2—**2**；3—**3**。

图 4　采用不同流动相体系时 2 和 3 的谱图

Fig.4　Chromatograms of **2** and **3** in Different Mobile Phase Systems

29-32.

[6] 王荪璇, 靳 权, 刘雪峰. 激光散射法测定醋酸地塞米松原料药粒度的方法学研究 [J]. 海峡药学, 2022, **34**(7): 51-54.

[7] 刘亚方, 张治云, 郭新艳, 等. 激光散射测定甲苯磺酸拉帕替尼粒度方法的建立和验证 [J]. 食品与药品, 2023, **25**(2): 119-122.

[8] 秦士慧, 冯 中, 张贵民. 帕博昔布原料药粒径的激光散射法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(8): 1203-1207.

[9] 李 昊, 赵 煊, 汤 宇, 等. 激光散射法测定双氢青蒿素原料药的粒度 [J]. 中国药物评价, 2023, **40**(2): 142-146.

[10] 孙 超, 康 帅, 吴 谧, 等. 激光散射法测定非达霉素粒度的方法开发与验证 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, **48**(10): 1162-1167.

[11] 耿志鹏, 姜鹰雁, 李永东, 等. 缬沙坦原料药粒度的激光散射法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(5): 716-719.

[12] 夏 颖, 严 菲, 邵方娴, 等. 聚苯乙烯磺酸钙散粒度测定方法研究 [J]. 中国药业, 2022, 31(10): 79-81.

[13] 郑敏侠, 辛 芳, 刘晓峰. Mastersizer 2000 型激光粒度仪技术参数对粒度分布的影响 [J]. 中国粉体技术, 2013, (1): 76-80.

[14] 耿淑华, 丁伟中, 郭曙强. 激光粒度分析中颗粒折射率的确定方法 [J]. 上海金属, 2014, **36**(2): 1-4.

（上接第 1254 页）

参考文献：

[1] 村形政利, 池田拓真, 川濑朗, 等. 螺酮缩醇衍生物的制备方法：中国, 102656177A [P]. 2012-09-05.

[2] U. S. Department of Commerce, National technical information service [EB/OL]. [2023-01-07]. https://www.ntis.gov/.

[3] SCHAFER E W, BOWLES W A. Acute oral toxicity and repellency of 933 chemicals to house and deer mice [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1985, **14**: 111-129.

[4] BENIGNI R, BOSSA C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology [J]. *Muta Res*, 2008, **659**(3): 248-261.

[5] ICH. M7(R1), Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2023-01-07]. https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines.

[6] 柴将红, 林琪珊, 洪淑华, 等. 容量滴定法测定 4- 二甲氨基吡啶含量 [J]. 当代化工研究, 2022, (15): 44-46.

[7] 范小振, 张小杰, 徐宝军. 高效液相色谱法测定烯草酮合成废液中 4- 二甲氨基吡啶含量 [J]. 化学研究与应用, 2015, **27**(2): 237-240.

[8] SZÉKELY G, HENRIQUES B, GIL M, *et al*. Design of experiments as a tool for LC-MS/MS method development for the trace analysis of the potentially genotoxic 4-dimethylaminopyridine impurity in glucocorticoids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, **70**: 251-258.