



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112763590 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(21) 申请号 202011466669.1

(22) 申请日 2020.12.14

(71) 申请人 上海明捷医药科技有限公司

地址 201210 上海市浦东新区张江路1238  
弄恒越国际大厦1号11层

(72) 发明人 朱子丰 顾凯 许华锋

(74) 专利代理机构 南京常青藤知识产权代理有限公司 32286

代理人 毛洪梅

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

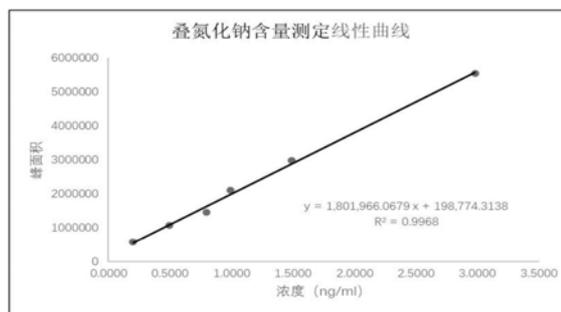
权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠

(57) 摘要

本发明提供一种LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠,具体涉及药检测技术领域,配制pH5.0磷酸盐缓冲溶液;配制10mg/ml丹磺酰氯溶液为衍生剂;精密量取水1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入pH5.0的0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液;配制对照品溶液;精密称取奥美沙坦酯供试品约13.3mg,置50ml量瓶中,用乙腈适量超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液。精密量取供试品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入水1.0ml,0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈2.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。本发明可显著提高肉眼观察和检测的灵敏度,特异性较高,抗干扰能力强,且检测效率,节省了人力成本。



1. LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠,其特征在于,具体如下:

S1、配制pH5.0磷酸盐缓冲溶液;

S2、配制10mg/ml丹磺酰氯溶液为衍生剂;S3、精密量取水1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入pH5.0的0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液;

S4、称取叠氮化钠1.0g,置10ml量瓶中,用水溶解并定容,摇匀,作为10%叠氮化钠溶液;

精密量取10%叠氮化钠溶液1.0ml,置100ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为1级对照品储备液;精密量取1级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为2级对照品储备液;精密量取2级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为3级对照品储备液;精密量取3级对照品储备液5.0ml,置50ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为4级对照品储备液;

精密量取4级对照品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液;

S5、精密称取奥美沙坦酯供试品约13.3mg,置50ml量瓶中,用乙腈适量超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液。

精密量取供试品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入水1.0ml,0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈2.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

S5、根据谱图,确认LC-MS参数

离子模式	离子对	DP	CE
ESI+ 离子源	185/277	42	15

不同超声时间对照品峰面积结果如下

超声时间	对照品峰面积
5min	2125167
10min	2121965
30min	2131146

2. 根据权利要求1所述的LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠,其特征在于:色谱参数如下:

色谱柱	Waters BEH C <sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7μm) 或等效			
流动相 A	0.1%甲酸溶液			
流动相 B	乙腈			
流速	0.3 ml/ml			
进样量	10 μl			
进样盘温度	不控制			
柱温	40 °C			
洗脱程序	时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	
	0.01	30	70	
	1	30	70	
	2	5	95	
	3	5	95	
	3.1	30	70	
	5	30	70	
LC-MS 参数	离子模式	离子对	DP	CE
	ESI+ 离子源	185/277	42	15
供试品浓度	26.7μg/ml			
叠氮化钠的限度	37.5ppm			
定量方式	外标法			

3. 根据权利要求2所述的LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠,其特征在于:S1步骤中,称取无水磷酸氢二钠7.1g,用水稀释至1000ml溶解,用磷酸调节pH值至5.0,混匀,即得。

4. 根据权利要求3所述的LC-MS衍生化法测定抗生素中的叠氮化钠,其特征在于:S2步骤中,称取丹磺酰氯约1g,置100ml量瓶中,用水适量超声溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

## LC-MS衍生生化法测定抗生素中的叠氮化钠

### 技术领域

[0001] 本发明属于药检测技术领域,具体涉及一种LC-MS衍生生化法测定抗生素中的叠氮化钠。

### 背景技术

[0002] 叠氮化钠是六方晶体或白色结晶,溶于水和液氨,微溶于乙醇,不溶于乙醚,可由氨基钠与一氧化二氮作用制得。它是医药行业中常用的化工原料,主要包括四唑类例和三唑类化合物的合成,而四唑类化合物,是进一步合成抗生素头孢菌素药物的原料,在其他药物合成中也是关键物料,如在抗癌药卡莫氟的制备中需要以叠氮化钠和庚酰氯合成中间体异氰酸乙酯。

[0003] 但叠氮化钠是一种剧毒品,其毒性和氰化物相似,对细胞色素氧化酶和其他酶有抑制作用,并能使体内氧合血红蛋白形成受阻,有显著的降压作用。在较低浓度水平时也可能直接引起DNA损伤,导致DNA的诱变,从而引发癌症,叠氮化物应根据人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)-M7指导原则作为致遗传突变杂质进行控制,因此在药物生产过程中,必须严格控制药物和医药中间体中叠氮化物的含量。

[0004] 目前叠氮类化合物的检测方法较多,文献报道的叠氮化物分析方法有容量分析法、紫外分光光谱分析法、GC法、GC-MS法和HPLC法等。其中容量分析法和分光光谱分析法在测定低浓度叠氮化物时不够准确,很少用到。GC法和HPLC法灵敏度低、选择性差,所以想开发一种灵敏度高,选择性好的原料药中叠氮化物的检测方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种LC-MS衍生生化法测定抗生素中的叠氮化钠,选择性更好,而且整个方法能控制在10min内完成,灵敏度更高,能大幅提高检测效率。

[0006] 本发明提供了如下的技术方案:

[0007] LC-MS衍生生化法测定抗生素中的叠氮化钠具体如下:

[0008] S1、配制pH5.0磷酸盐缓冲溶液;

[0009] S2、配制10mg/ml丹磺酰氯溶液为衍生剂;S3、精密量取水1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入pH5.0的0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液;

[0010] S4、称取叠氮化钠1.0g,置10ml量瓶中,用水溶解并定容,摇匀,作为10%叠氮化钠溶液;

[0011] 精密量取10%叠氮化钠溶液1.0ml,置100ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为1级对照品储备液;精密量取1级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为2级对照品储备液;精密量取2级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为3级对照品储备液;精密量取3级对照品储备液5.0ml,置50ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为4级对照品储备液;

[0012] 精密量取4级对照品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液;

[0013] S5、精密称取奥美沙坦酯供试品约13.3mg,置50ml量瓶中,用乙腈适量超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液。

[0014] 精密量取供试品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入水1.0ml,0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈2.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;

[0015] S5、根据谱图,确认LC-MS参数

	离子模式	离子对	DP	CE
[0016]	ESI+ 离子源	185/277	42	15

[0017] 不同超声时间对照品峰面积结果如下

[0018]	超声时间	对照品峰面积
	5min	2125167
	10min	2121965
	30min	2131146

[0019] 优选的,色谱参数如下:

	色谱柱	Waters BEH C <sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7μm) 或等效
	流动相 A	0.1%甲酸溶液
	流动相 B	乙腈
[0020]	流速	0.3 ml/ml
	进样量	10 μl
	进样盘温度	不控制
	柱温	40 °C

洗脱程序	时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	
	0.01	30	70	
	1	30	70	
	2	5	95	
	3	5	95	
	3.1	30	70	
	5	30	70	
[0021] LC-MS 参数	离子模式	离子对	DP	CE
	ESI+ 离子源	185/277	42	15
供试品浓度	26.7 $\mu$ g/ml			
叠氮化钠的限度	37.5ppm			
定量方式	外标法			

[0022] 优选的, S1步骤中, 称取无水磷酸氢二钠7.1g, 用水稀释至1000ml溶解, 用磷酸调节pH值至5.0, 混匀, 即得。

[0023] 优选的, S2步骤中, 称取丹磺酰氯约1g, 置100ml量瓶中, 用水适量超声溶解并稀释至刻度, 混匀, 即得。

[0024] 本发明的有益效果:

[0025] 本发明使用丹磺酰氯衍生化试剂对叠氮化钠衍生化; 在显著改善叠氮化钠在反向液相色谱中保留行为的同时, 也极大提高了叠氮化钠在质谱中检测灵敏度。该方法灵敏度高, 选择性好, 操作简便, 且无需进行繁琐的样品前处理就可疑定量检测抗生素中的叠氮化钠含量。

#### 附图说明

[0026] 附图用来提供对本发明的进一步理解, 并且构成说明书的一部分, 与本发明的实施例一起用于解释本发明, 并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0027] 图1为离子对确认图;

[0028] 图2为CE值确认图;

[0029] 图3为DP值确认值;

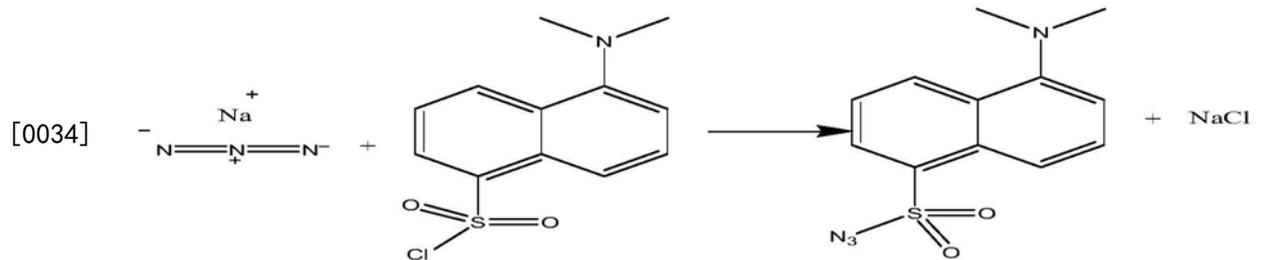
[0030] 图4空白溶液图;

[0031] 图5对照品溶液图;

[0032] 图6叠氮化钠线性图。

### 具体实施方式

[0033] 衍生化法原理：



[0035] 本发明公开了一种衍生化LC-MS法测定抗生素中的叠氮化钠的方法,该方法使用丹磺酰氯衍生化试剂对叠氮化钠衍生化;在显著改善叠氮化钠在反向液相色谱中保留行为的同时,也极大提高了叠氮化钠在质谱中检测灵敏度。该方法灵敏度高,选择性好,操作简便,且无需进行繁琐的样品前处理就可疑定量检测抗生素中的叠氮化钠含量。

[0036] 色谱参数

色谱柱	Waters BEH C <sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7μm) 或等效			
流动相 A	0.1%甲酸溶液			
流动相 B	乙腈			
流速	0.3 ml/ml			
进样量	10 μl			
进样盘温度	不控制			
柱温	40 °C			
[0037] 洗脱程序	时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	
	0.01	30	70	
	1	30	70	
	2	5	95	
	3	5	95	
	3.1	30	70	
	5	30	70	
LC-MS 参数	离子模式	离子对	DP	CE
	ESI+ 离子源	185/277	42	15
供试品浓度	26.7μg/ml			
叠氮化钠的限度	37.5ppm			
定量方式	外标法			

[0038] 溶液配制

[0039] 磷酸盐缓冲溶液 (pH5.0)

[0040] 称取无水磷酸氢二钠7.1g,用水稀释至1000ml溶解,用磷酸调节pH值至5.0,混匀,即得。

[0041] 衍生剂:丹磺酰氯溶液 (10mg/ml) :

[0042] 称取丹磺酰氯约1g,置100ml量瓶中,用水适量超声溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

[0043] 空白溶液

[0044] 精密量取水1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液 (pH5.0) 3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液。

[0045] 对照品溶液

[0046] 称取叠氮化钠1.0g,置10ml量瓶中,用水溶解并定容,摇匀,作为10%叠氮化钠溶液。

[0047] 精密量取10%叠氮化钠溶液1.0ml,置100ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为1级对照品储备液;精密量取1级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为2级对照品储备液;精密量取2级对照品储备液1.0ml,置100ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为3级对照品储备液;精密量取3级对照品储备液5.0ml,置50ml量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,作为4级对照品储备液。

[0048] 精密量取4级对照品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈3.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

[0049] 供试品溶液

[0050] 精密称取奥美沙坦酯供试品约13.3mg,置50ml量瓶中,用乙腈适量超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液。

[0051] 精密量取供试品储备液1.0ml,置10ml量瓶中,依次加入水1.0ml,0.05mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)3.0ml,乙腈2.0ml与衍生剂1.0ml,室温超声反应10min后,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

[0052] 方法确认

[0053] 质谱条件的确认,根据图1至图3,确认以下LC-MS参数

[0054]	离子模式	离子对	DP	CE
	ESI+离子源	185/277	42	15

[0055] 衍生条件的确认

[0056] 不同超声时间对照品峰面积结果

[0057]	超声时间	对照品峰面积
	5min	2125167
	10min	2121965
	30min	2131146

[0058] 不同超声时间,对照品峰面积均无差异,说明5分钟内衍生反应已完成。

[0059] 方法验证

[0060] 专属性

[0061] 参见图4至5,空白溶液在目标峰处有微弱响应,但小于<LOD,对于目标峰的定量检测无干扰

[0062] 对照品溶液STD1连续进样6针,目标峰峰面积RSD=0.55%,保留时间RSD=0.28%;符合要求。结果详见下表。

[0063] 进样精密度结果

序号	峰面积	保留时间 (min)
1	2150283	2.276
2	2140562	2.288
3	2124777	2.287
4	2142860	2.276
5	2153518	2.291
6	2127342	2.283
AVE	2139890	2.2835
RSD (%)	0.55%	0.28%

[0065] 线性和定量限参见图6,目标峰在在0.1987~2.9801ng/ml浓度范围内,线性关系良好,线性方程为 $y=1,801,966.0679x+198,774.3138$  (y为峰面积,x为目标物浓度),相关系数r为0.9984

[0066] 线性结果

线性溶液	浓度 (ng/ml)	峰面积
L20%	0.1987	579817
L50%	0.4967	1069679
L80%	0.7947	1462883
L100%	0.9934	2101995
L150%	1.4901	2976331

L300%	2.9801	5532117
-------	--------	---------

[0069] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

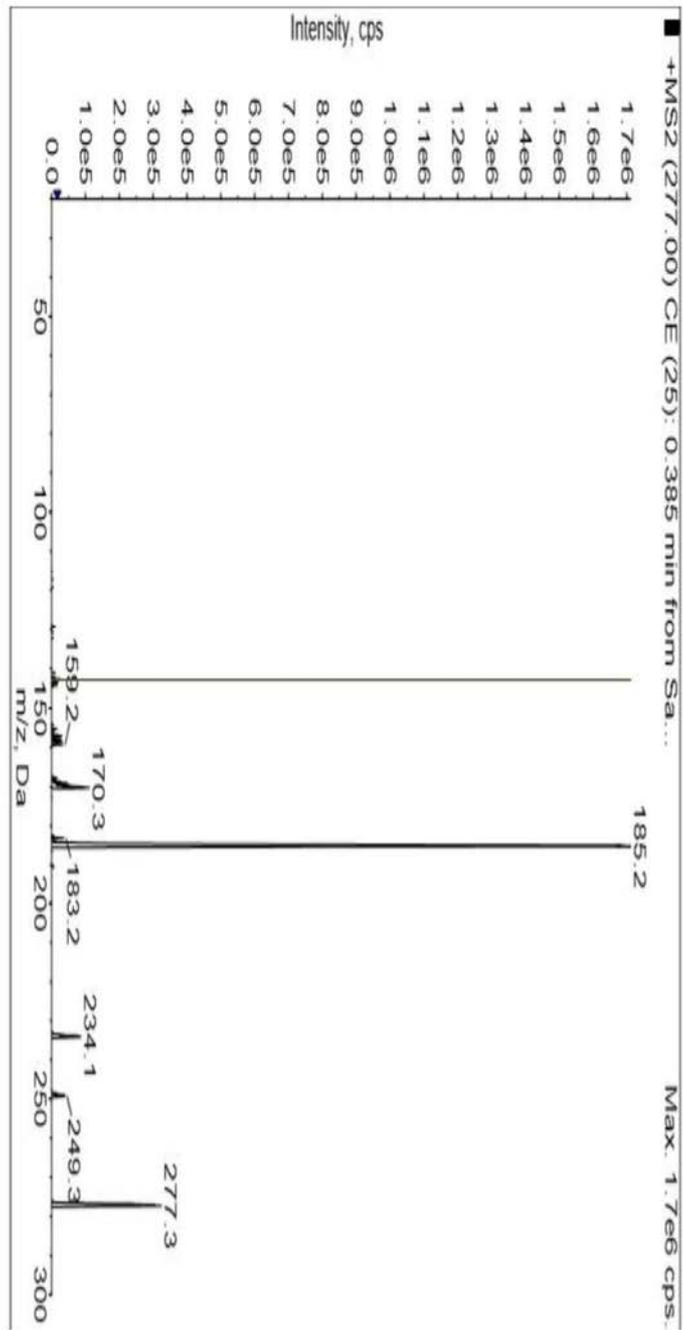


图1

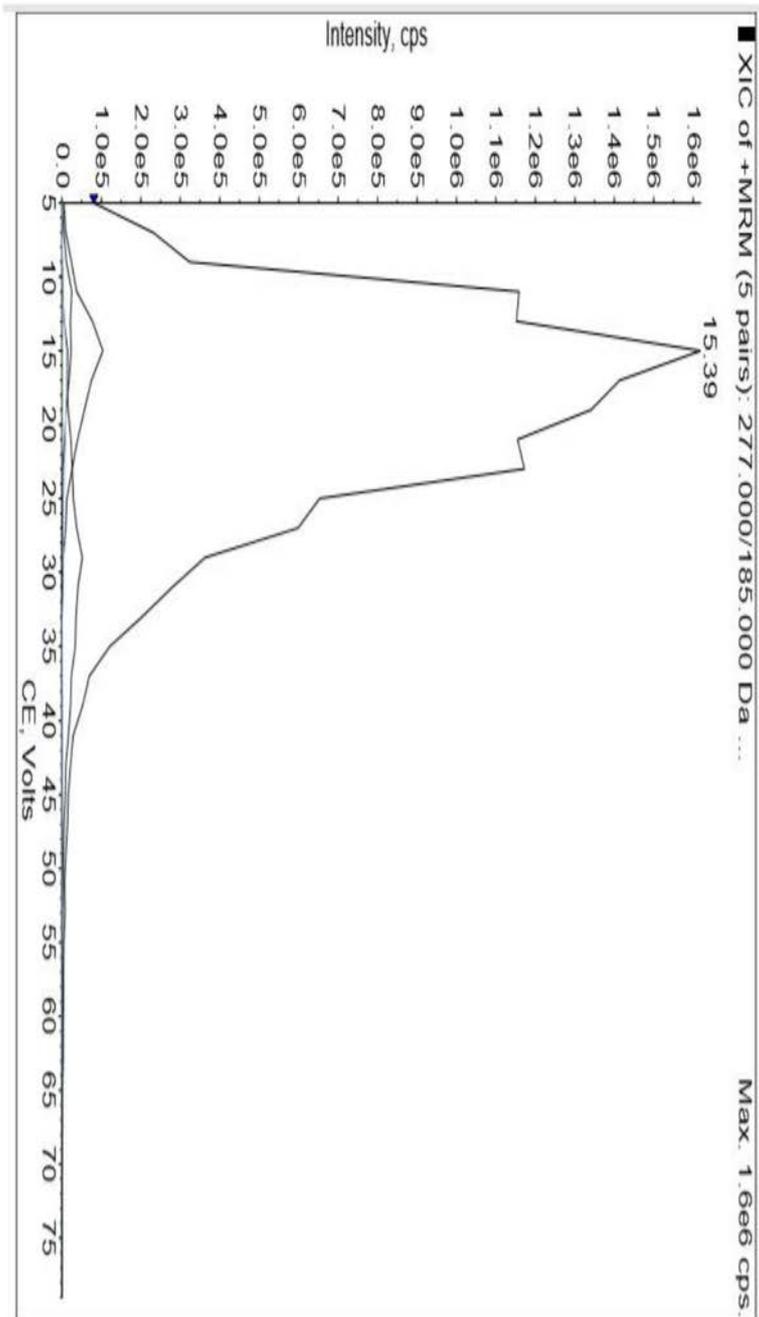


图2

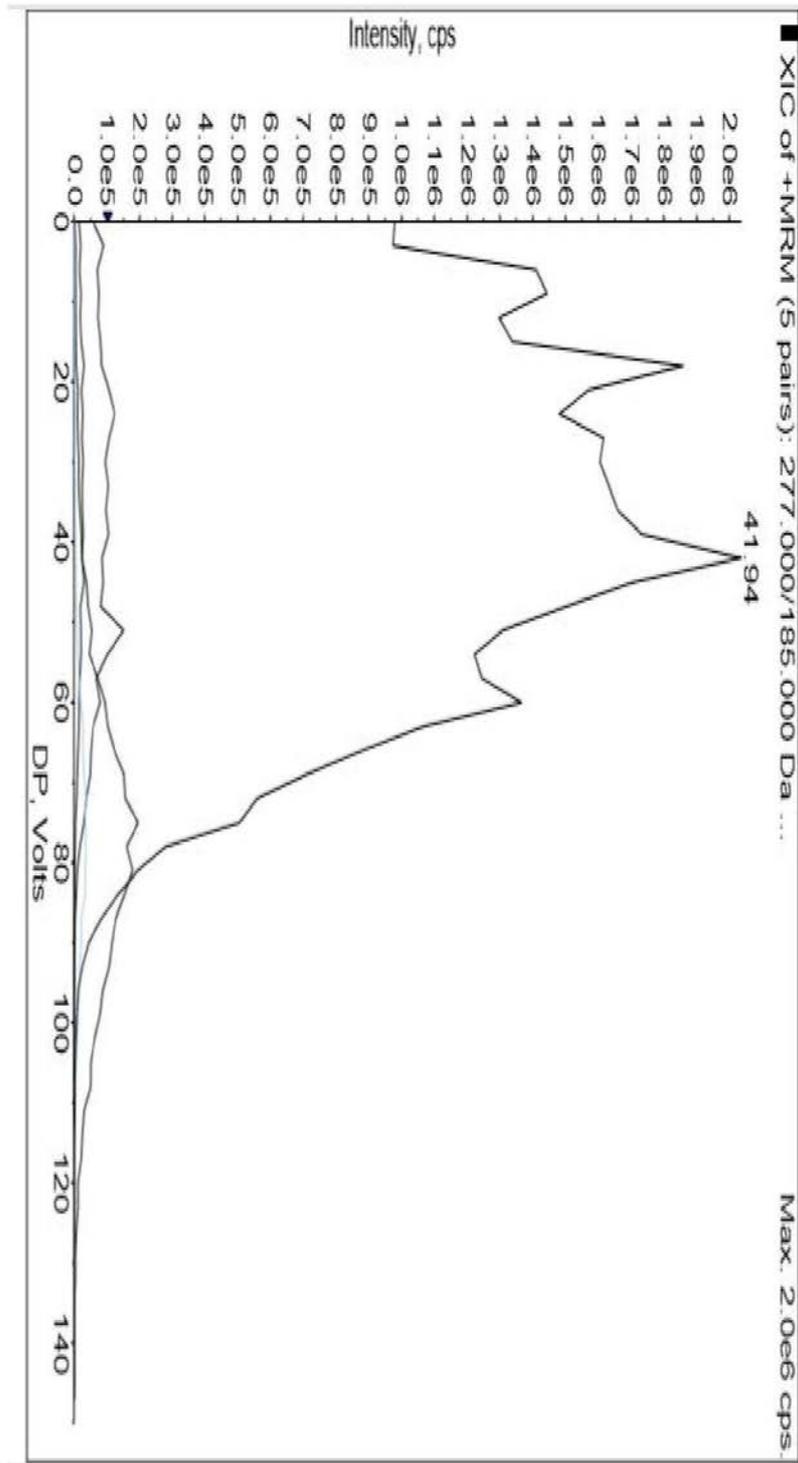


图3

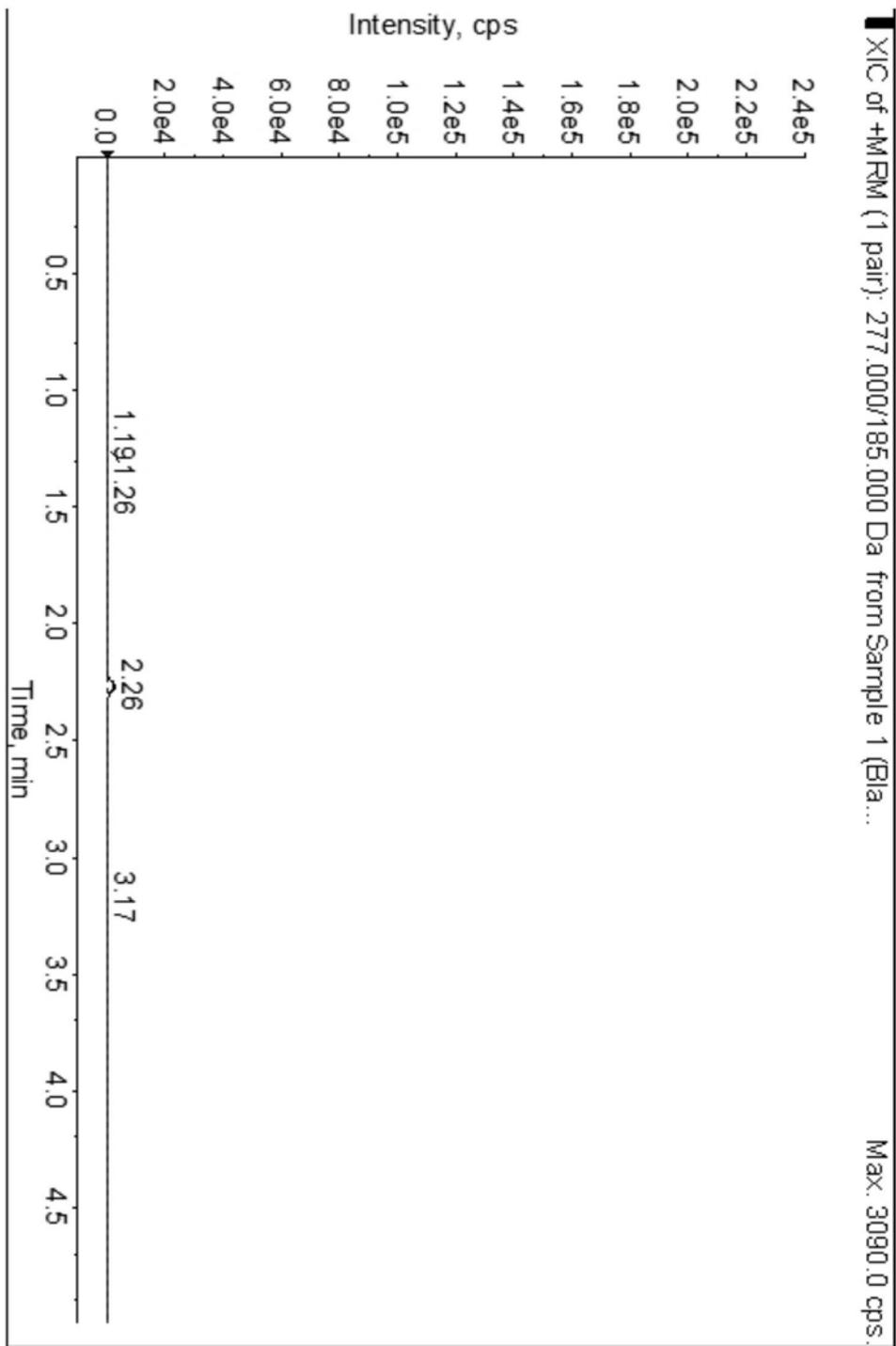


图4

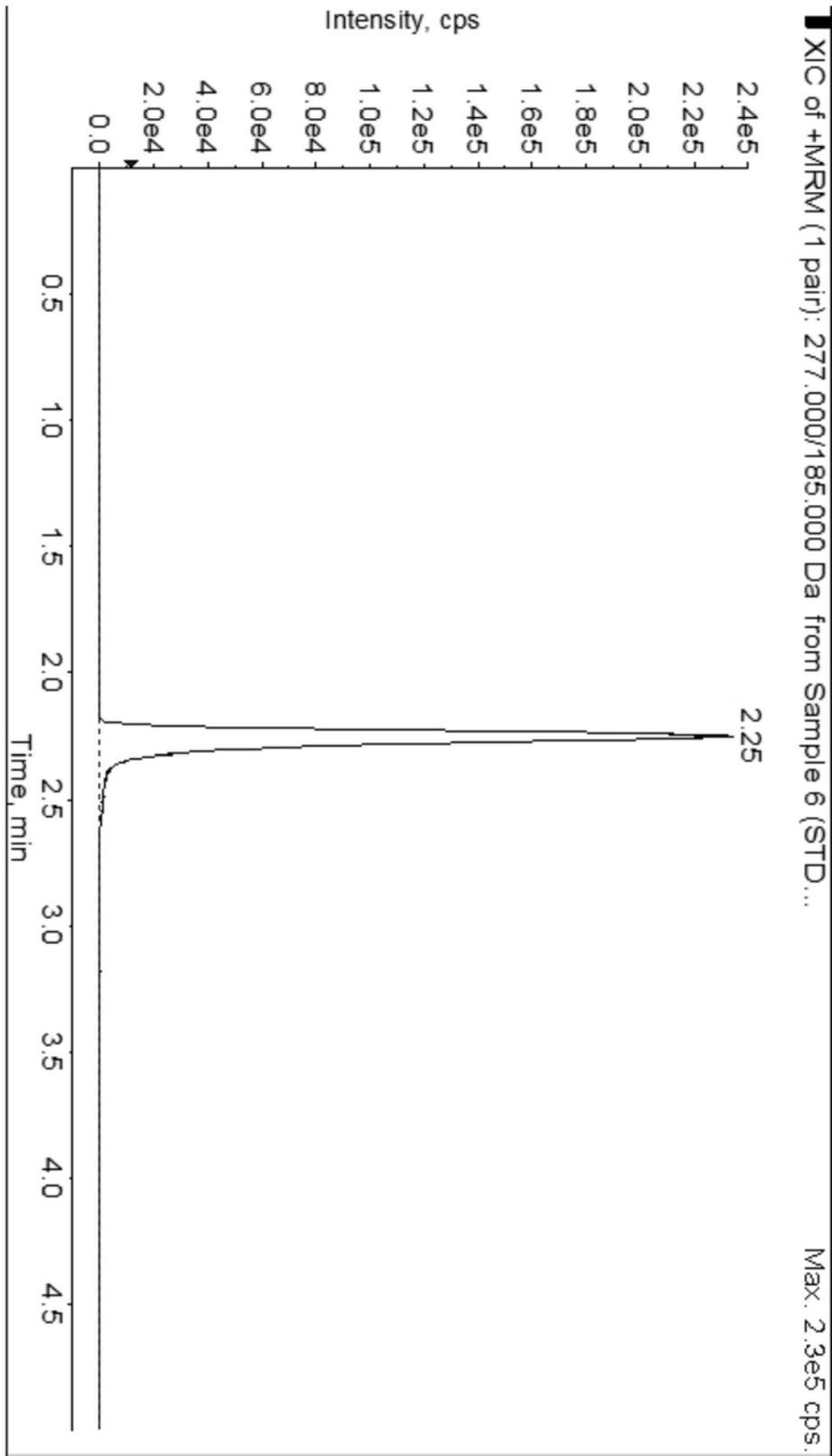


图5

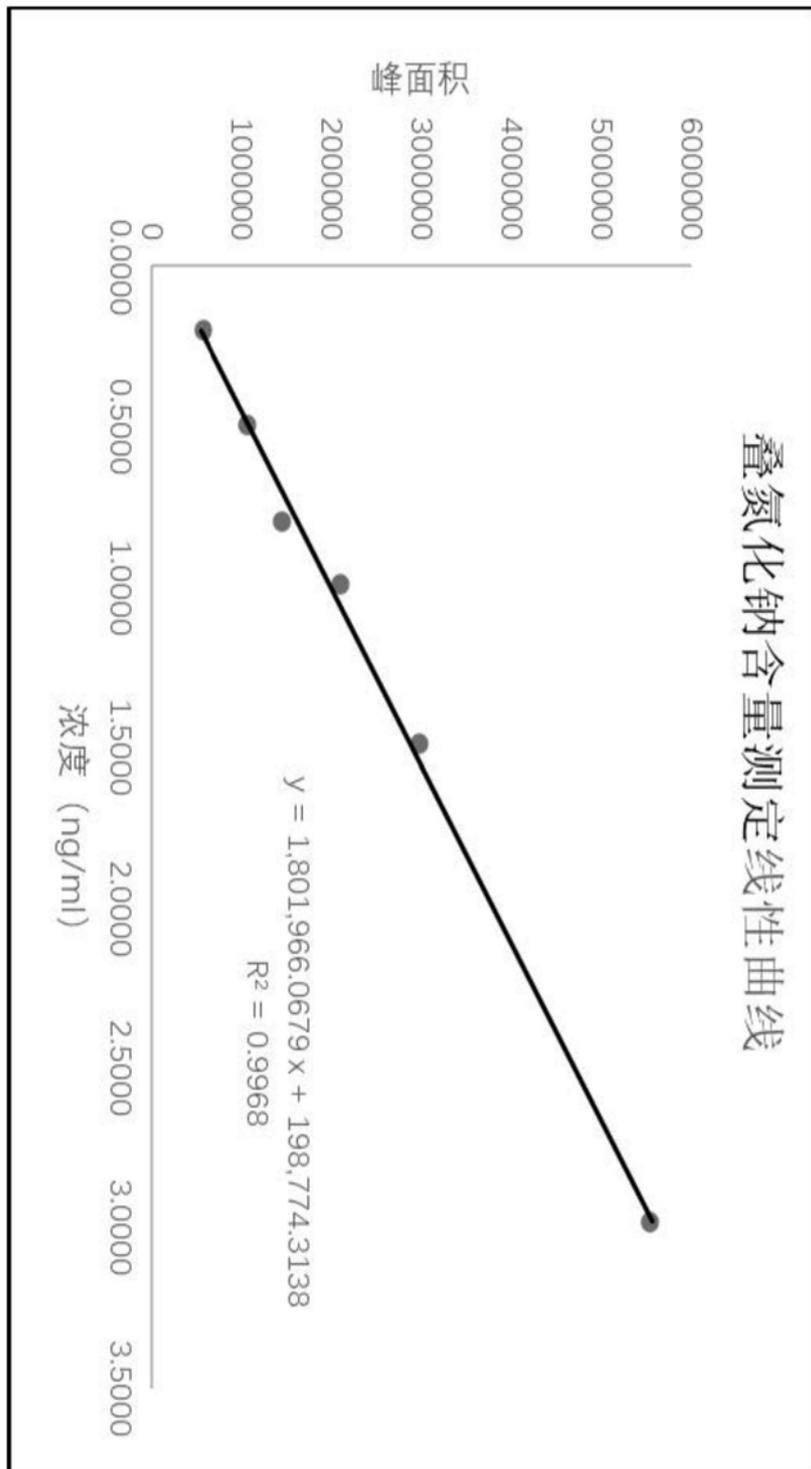


图6