

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)24-0086-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.020



# 柠檬酸三甲酯碱降解途径及其杂质结构初步解析\*

耿 燕<sup>1</sup>, 李香荷<sup>1</sup>, 王月英<sup>1</sup>, 王永欣<sup>2</sup>, 张 冬<sup>1△</sup>

(1. 河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050200; 2. 河北省军区石家庄第三离休干部休养所, 河北 石家庄 050000)  
**摘要:**目的 分析柠檬酸三甲酯及其碱降解产物的降解途径,并初步对其主要杂质进行结构解析。方法 采用液相色谱-离子阱-飞行时间质谱联用(LC-IT-TOF/MS)法,色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD Dim 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(10:90, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 214 nm,柱温为 35℃,进样量为 20 μL。电喷雾离子源(ESI);接口电压 4.5 kV;扫描范围,一级质谱  $m/z$  10~1 500;自动多级  $m/z$  50~1 000;雾化气为氮气,流速为 1.5 L/min;漂移管温度为 200℃;干燥气为氮气,流速为 10 L/min;加热模块温度为 200℃;碰撞气为氩气;检测器电压为 1.52 kV。结果 初步确认杂质 a、b 的结构分别与柠檬酸单甲酯及柠檬酸二甲酯一致,并提出柠檬酸三甲酯碱破坏降解途径。结论 所建立的方法可用于柠檬酸三甲酯碱降解产物及降解途径研究,进而可为改进柠檬酸三甲酯合成工艺及提高产品质量提供参考。

**关键词:**柠檬酸三甲酯;液相色谱-离子阱-飞行时间质谱联用法;碱降解;杂质;结构解析

## Alkaline Degradation Pathway of Trimethyl Citrate and Preliminary Analysis of Its Impurity Structure

GENG Yan<sup>1</sup>, LI Xianghe<sup>1</sup>, WANG Yueying<sup>1</sup>, WANG Yongxin<sup>2</sup>, ZHANG Dong<sup>1</sup>

(1. Hebei Institute of Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050200; 2. Shijiazhuang No. 3 Retired Cadre Rest Center of Hebei Military Region, Shijiazhuang, Hebei, China 050000)

**Abstract: Objective** To analyze the degradation pathway of trimethyl citrate and its alkaline degradation products, and to preliminarily analyze the structure of its main impurities. **Methods** Liquid-chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry (LC-IT-TOF/MS) method was adopted. The chromatographic column was Thermo Hypersil GOLD Dim column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (10:90, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 20 μL. Electro-spray ionization (ESI) was adopted, the interface voltage was 4.5 kV, the scanning range of primary mass spectrometry was  $m/z$  at 10 to 1 500, the automatic grading range was  $m/z$  at 50 to 1 000, the atomized gas was nitrogen with a flow rate of 1.5 L/min, the drift tube temperature was 200℃, the dry gas was nitrogen with a flow rate of 10 L/min, the temperature of the heating module was 200℃, the collision gas was argon, and the detector voltage was 1.52 kV. **Results** It was preliminarily confirmed that the structures of impurities a and b were consistent with those of monomethyl citrate and dimethyl citrate, respectively, and a alkali degradation pathway of trimethyl citrate was proposed. **Conclusion** The established method can be used to study the alkali degradation products and degradation pathways of trimethyl citrate, which can provide a reference for improving the synthesis process and product quality of trimethyl citrate.

**Key words:** trimethyl citrate; liquid-chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry; alkaline degradation; impurity; structural analysis

柠檬酸三甲酯具有生物降解性好、无毒、挥发性小及抗细菌等优点<sup>[1]</sup>,为环境友好型医药中间体,广泛应用于医药、食品、化工等各领域。工业生产上通常以柠檬酸经酸催化进行酯化反应制得<sup>[2-4]</sup>,由于反应中需产生 3 个酯键,收率较低(多在 74%~78% 之间)。黄飞等<sup>[5]</sup>通过改良催化合成条件,收率最高可达 89.6%。且其在碱破坏条件下最不稳定,所产生的杂质质量最高<sup>[6]</sup>。常采用气相色谱(GC)法或气相色谱质谱联用(GC-MS)法进行检测<sup>[7-10]</sup>。目前产品中的杂质控制已成为影响质量及优化生产工艺的重要环节,样品纯度也成

为产品质量的重要指标之一。为此,本研究中采用液相色谱-离子阱-飞行时间质谱联用(LC-IT-TOF/MS)法,直接分析碱破坏样品中的降解产物,确立降解途径,从而优化合成工艺防止降解反应发生,继而提高产品质量。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪、UV-2450 型紫外-可见分光光度计,离子阱飞行时间质谱液质联用仪(日本 Shimadzu 公司)。

\*基金项目:河北省重点研发计划项目[21372002D]。

第一作者:耿燕,女,大学本科,高级工程师,研究方向为有源医疗器械检测,(电子信箱)1519753672@qq.com。

△通信作者:张冬,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)kafeipian@sina.com。

## 1.2 试药

柠檬酸三甲酯对照品(批号ZY160517,含量98%,上海谱振生物科技有限公司/上海科拉曼试剂有限公司);柠檬酸三甲酯样品(自制,批号为D0414);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Thermo Hypersil GOLD Dim柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(10:90, V/V);流速为1.0 mL/min;检测波长为214 nm;柱温为35℃;进样量为20 μL。

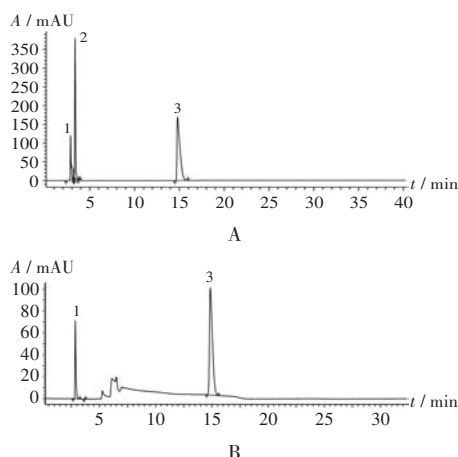
质谱条件:电喷雾离子源(ESI);接口电压为4.5 kV;扫描范围,一级质谱 $m/z$  10~1 500,自动多级 $m/z$  50~1 000;雾化气为氮气,流速为1.5 L/min,漂移管温度200℃;干燥气为氮气,流速为10 L/min;加热模块温度为200℃;碰撞气为氩气;检测器电压为1.52 kV;校准方法,自动调谐优化电压,外标法校准质量数。

### 2.2 供试品溶液制备

取样品2份,各约50 mg,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,均加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL溶解,分别放置8, 10 min,均加入0.1 mol/L盐酸溶液中和,用流动相定容,摇匀,滤过,取续滤液,分别作为供试品溶液I和II。

### 2.3 分析方法选择

取2.2项下2种供试品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果显示,供试品溶液I中杂质a的检出量较小,检出的杂质主要为杂质b,供试品溶液II中杂质a显著增加,杂质b降解(见图1)。鉴于此,



1. 杂质a 2. 杂质b 3. 柠檬酸三甲酯  
A. 供试品溶液 I B. 供试品溶液 II

图1 高效液相色谱图

1. Impurity a 2. Impurity b 3. Trimethyl citrate  
A. Test solution I B. Test solution II

Fig. 1 HPLC chromatograms

本研究中采用2种降解模式富集杂质、采集数据,采用LC-IT-TOF/MS技术对2种杂质进行初步结构解析。

### 2.4 质谱解析

#### 2.4.1 柠檬酸三甲酯

柠檬酸三甲酯的相对分子质量为234,其正离子模式一级质谱图见图2。其中未直接显示分子离子峰,但在 $m/z$  235, 252, 257处显示 $M^+ + 1$ 峰、 $M^+ + H_2O$ 峰及 $M^+ + Na$ 峰。且由于柠檬酸三甲酯呈蜡状,分子较黏稠,因此在 $m/z$  491处出现较大量的 $2M^+ + Na$ 峰,表明所测分子结构与柠檬酸三甲酯一致。

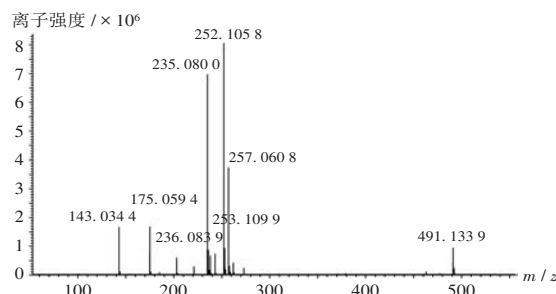


图2 柠檬酸三甲酯正离子模式一级质谱

Fig. 2 Primary mass spectrometry of trimethyl citrate in positive ion mode

#### 2.4.2 杂质b

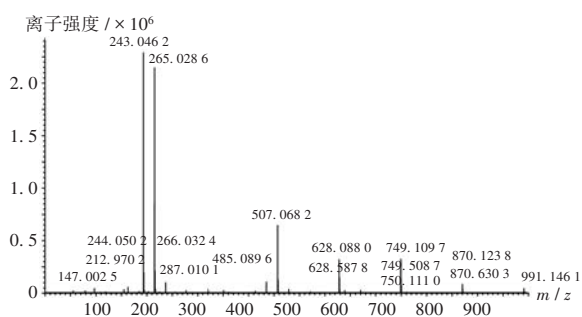
正离子模式:一级质谱图见图3 A,其中未显示分子离子峰,在约 $m/z$  243, 265, 507处分别显示 $M^+ + Na$ 峰、 $M^+ + CO_2$ 峰,以及二者结合后失去 $H^+$ 的结合峰,且由于分子的黏稠特性,在 $m/z$  991, 870, 749, 628处分别出现了双分子甚至四分子的结合峰,与其蜡状性质相一致。该 $M^+ + CO_2$ 峰的二级质谱图见图3 B。其中清楚显示出其失去甲基( $M^+ - 15$ )在 $m/z$  205处的离子峰及其进一步失去 $CO_2Me$ 后在 $m/z$  147处的离子峰。

负离子模式:一级质谱图见图4 A,在 $m/z$  219处清晰显示了柠檬酸二甲酯的 $M^- - 1$ 峰,与其含有羧基酸易失去质子形成负离子的结构一致。该峰的二级质谱图见图4 B。推测其最高峰( $m/z$  143)为分子离子峰失去 $CO_2Me$ 和水后的负离子峰。以上谱图所示结构与柠檬酸二甲酯一致。

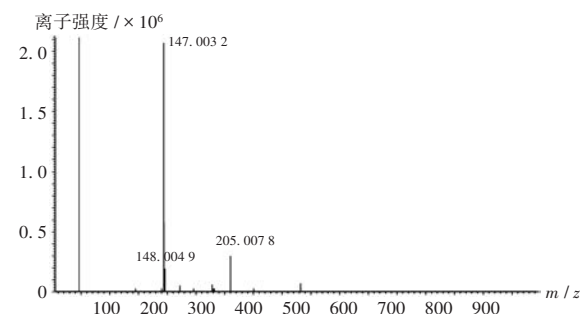
#### 2.4.3 杂质a

正离子模式:一级质谱图见图5 A。其中未直接显示分子离子峰,但在 $m/z$  251和273处分别显示 $M^+ + CO_2 + 1$ 峰和 $M^+ + CO_2 + Na$ 峰,这与柠檬酸单甲酯易失去 $CO_2$ 的性质一致。 $M^+ + CO_2 + Na$ 峰的二级质谱图见图5 B。在 $m/z$  187处显示分子离子失去水再失去1个质子的离子峰,在 $m/z$  147处则显示失去 $CO_2Me$ 后的离子峰。

负离子模式:一级质谱图见图6 A,在 $m/z$  205处清晰显示了 $M^- - 1$ 的离子峰,与柠檬酸单甲酯含羧基团易失去质子形成负离子的性质一致。该峰二级质谱



A



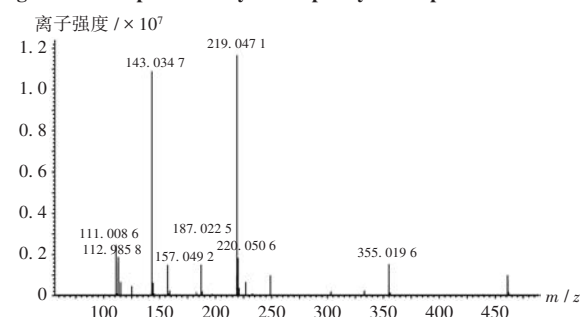
B

A. 一级质谱 B.  $M^+ + CO_2$ 峰二级质谱

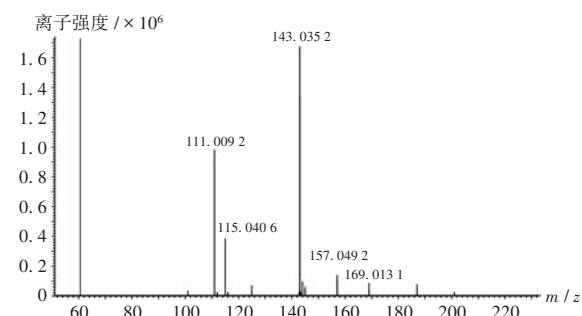
图3 杂质b正离子模式质谱

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum of  $M^+ + CO_2$  peak

Fig. 3 Mass spectrometry of impurity b in positive ion mode



A



B

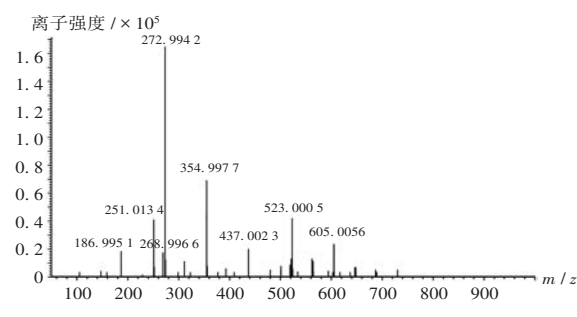
A. 一级质谱 B.  $M^- - 1$ 峰二级质谱

图4 杂质b负离子模式质谱

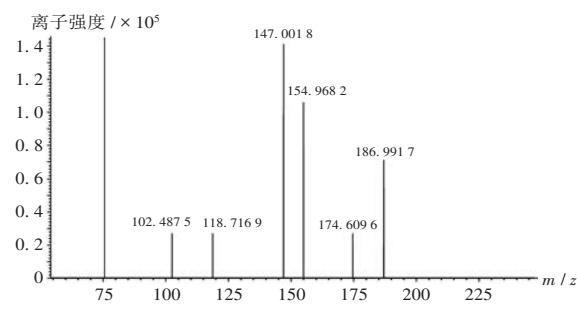
A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum of  $M^- - 1$  peak

Fig. 4 Mass spectrometry of impurity b in negative ion mode

图见图6 B,在 $m/z$  173处显示其失去1个分子甲醇后的离子峰,在 $m/z$  155处则给出其进一步失水的离子峰。以上谱图所示结构与柠檬酸单甲酯一致。



A



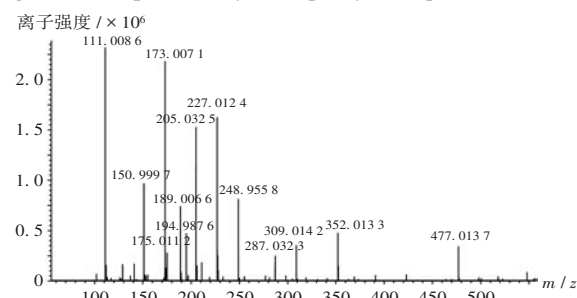
B

A. 一级质谱 B.  $M^+ + CO_2 + Na$ 峰二级质谱

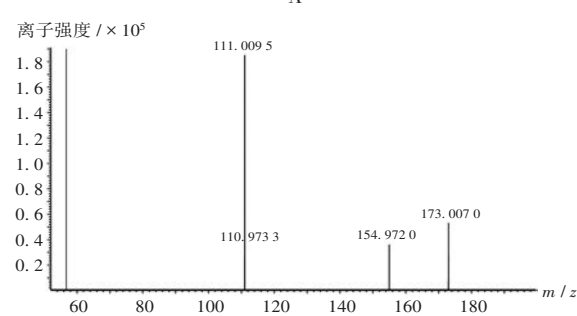
图5 杂质a正离子模式质谱

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum of  $M^+ + CO_2 + Na$  peak

Fig. 5 Mass spectrometry of impurity a in positive ion mode



A



B

A. 一级质谱 B.  $M^- - 1$ 峰二级质谱

图6 杂质a负离子模式质谱

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum of  $M^- - 1$  peak

Fig. 6 Mass spectrometry of impurity a in negative ion mode

## 2.5 降解途径

根据以上质谱解析结果,初步分析得柠檬酸三甲酯碱降解途径及降解产物,详见图7。

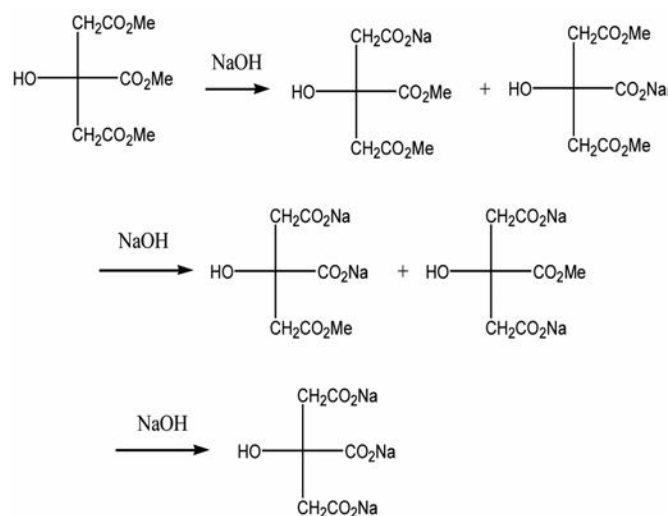


图7 柠檬酸三甲酯碱降解途径

Fig. 7 Alkaline degradation pathway of trimethyl citrate

### 3 讨论

#### 3.1 供试品溶液选择

本研究中所用样品以新合成路线研制,故通过解析主成分的质谱以验证分子结构。柠檬酸三甲酯为合成产品,杂质含量很少,无法达到质谱检测所要求的检出量,故在碱性条件下将酯水解成羧酸钠盐,结果碱降解8,10 min时主要杂质分别为柠檬酸二甲酯的同分异构体及柠檬酸单甲酯的同分异构体,继而可通过有针对性地富集杂质样本,分阶段对样品进行分析,以获得高质量质谱图,降低谱图分析难度。

#### 3.2 仪器与流动相选择

仪器中一旦存在不挥发盐,便无法得到好的离子流,无论使用ESI还是大气压化学电离(APCI)均不能挥发,很可能堵住离子源后方的加热毛细管,影响其他样品分析。选择液质联用仪,因其接口可避免不挥发的缓冲盐进入。仪器色谱条件中,常用的流动相为甲醇、乙腈、水及其不同比例的混合物,以及一些易挥发盐的缓冲液<sup>[11]</sup>。鉴于供试品溶液的紫外检测波长为214 nm,故流动相选用乙腈-水系统,响应值更高。

#### 3.3 质量分析器选择

液相色谱/质谱常用的质量分析器包括四极杆分析器、飞行时间分析器和离子阱飞行器。其中四极杆质谱仪是最常见的质谱仪器,定量能力突出,但无串极功能,定性能力不足;飞行时间质谱仪质量范围宽,扫描速度快,但同样无串极功能,限制了进一步的定性能力;离子阱质谱仪结构小巧,质量轻,灵敏度高,具有多级质谱功能,但定量能力不足,无法做母离子扫描和中性丢失,在筛选特征结构分子的时候能力不足。离子阱-飞行时间质谱仪实现了离子阱质谱和飞行时间质谱的优势

互补,既可用于制作多级质谱,又能达到高质量精度,具有高分辨率、高灵敏度的特点,提高了定性和定量能力。故本研究中选择离子阱-飞行时间质谱。

#### 3.4 方法评价

联用分析技术是分析化学发展的重要发展方向之一。液质联用技术结合了色谱、质谱的优点,近年来在生物医学、药学、环境检测、毒物分析等领域发挥了巨大作用<sup>[12-14]</sup>。本研究中所建立的LC-IT-TOF法可用于柠檬酸三甲酯碱降解产物及降解途径研究,进而可为改进柠檬酸三甲酯合成工艺及提高产品质量提供参考。

#### 参考文献

- [1] 李静,蒋剑春,徐俊明. 柠檬酸酯合成用催化剂研究进展[J]. 生物质化学工程,2009,43(1):52-56.
- [2] 田红丽,刘荣杰,朱璠珊. 柠檬酸三甲酯合成工艺研究[J]. 山东化工,2017,46(21):1-4.
- [3] 黄丽,李春莲,胡庆国. 固体酸催化合成柠檬酸三甲酯[J]. 辽宁化工,2012,41(3):232-233.
- [4] 谢国豪,胡昕,罗荣. 固体酸催化合成柠檬酸三甲酯[J]. 上饶师范学院学报,2011,12(6):47-50.
- [5] 黄飞,胡雪倩,芦黎黎,等. 柠檬酸三甲酯催化合成条件的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2019,35(2):64-67.
- [6] 张冬,王强,毕华,等. 高效液相色谱法测定柠檬酸三甲酯含量及有关物质[J]. 中国药业,2022,31(17):73-76.
- [7] 刘诚,彭小雪,赖璟琦,等. 1,2-二氯乙烷接触者尿液中生物指标监测的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(2):269-270.
- [8] FRYŠ O, CESLA P, BAJEROVÁ P, et al. Optimization of focused ultrasonic extraction of propellant components determined by gas chromatography / mass spectrometry [J]. Talanta,2012,99:316-322.
- [9] 徐秀娟,屈展,何保江,等. 不同品种葡萄干中有机酸的成分分析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(4):107-113.
- [10] 林海,李变,容穗华,等. 青梅的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):110-112.
- [11] 段雯利,王新科. 高效液相色谱法在药品检验中的应用效果观察及有效性分析[J]. 中国医药工业杂志,2021,52(10):1408.
- [12] 邹平,张迎阳,邹林玲. 牡丹籽壳中黄酮类化合物提取及组分分析[J]. 食品与机械,2023,39(4):44-50.
- [13] 邱萍英,卢浩扬,倪晓佳,等. 用LC-MS/MS法同时测定人血清文拉法辛、O-去甲基文拉法辛和N-去甲基文拉法辛的浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(7):1028-1032.
- [14] 苏腾伟,盛天露,易永,等. 初步探究液相色谱-串联质谱法测定稻田土壤及水中环啉酮的残留量[J]. 当代化工研究,2023(4):64-66.

(收稿日期:2023-03-02;修回日期:2023-06-21)