

## 药物杂质分析综合应用文集



# 前言

药物杂质一直是药品研发生产中风险控制的重要内容。国家药品监督管理局（NMPA）在《化学药物杂质研究的技术指导原则》中定义任何影响药物纯度的物质统称为杂质。化药杂质的研究对象与药物生产过程中相关的物质来源有重要关系：如生产过程中工艺杂质（如合成中未完全反应的底物、合成过程中的中间体、副产物、催化剂等）、降解产物、从反应物或试剂中引入杂质等。人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）按照杂质理化性质将其分为三大类：有机杂质、无机杂质及残留溶剂。

目前，各国药典，例如美国药典（USP）、日本药典（JP）、和欧洲药典（EP）及中国药典（ChP）等对原料药和药品制剂中杂质限量水平的规定和要求越来越严格。关于杂质的鉴别、定量、定性和控制已成为药物开发过程和申报的关键组成部分。杂质检测的分析方法选择涉及到杂质测定结果的专属性和准确性。对于有机杂质含量检测常涉及到色谱法（LC、GC）、光谱法、对于痕量的基因毒性杂质会使用到三重四极杆串级质谱仪器（LCMSMS 和 GCMSMS）、未知杂质的定性会涉及到高分辨质谱仪等的使用；无机杂质常会直接影响到药品的稳定性，ICP 及 ICP-MS 等仪器在重金属杂质分析方面具有广泛的使用；残留溶剂杂质常使用气相色谱法（GC）、或者气质（GCMS、GCMSMS）法进行有机溶剂的含量检测。合适分析方法和分析仪器的选择对杂质分析检测带来事半功倍的效果。

岛津是一家成立于 1875 年的全球著名仪器分析厂商，一直秉承“以科学技术向社会做贡献”的宗旨，特别是在药物杂质分析方面仪器和方法技术不断创新，拥有药物杂质分析丰富的产品线：液相色谱仪、液相色谱质谱联用仪、高分辨质谱仪、气相色谱仪、气相色谱质谱联用仪、电感耦合等离子体发射光谱仪、电感耦合等离子体质谱仪等。岛津公司同时一直关注药物杂质分析领域的国内外法规的更新、热点事件的应对、及时提供全面有效的解决方案。

本册应用文集收录了近年来岛津在药品杂质分析方面的应用工作：包括有机杂质、无机杂质和溶剂残留检测三部分，共 28 篇文章，涉及杂质鉴定系统、色谱质谱联用系统、ICP-MS 等特色技术，希望能对药品中杂质检测工作有所帮助。

岛津企业管理（中国）有限公司

分析中心

# 目 录

<b>第一章 药物杂质分析及相关法规 .....</b>	<b>5</b>
<b>第二章 药物中杂质分析技术 .....</b>	<b>9</b>
<b>第三章 药物杂质分析综合应用文集 .....</b>	<b>13</b>
<b>第一节 有机杂质分析 .....</b>	<b>14</b>
1.1 工艺及降解杂质 .....	15
高效液相色谱法分析盐酸多西环素中的有关物质 .....	15
高效液相色谱法结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质 .....	20
采用加校正因子主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质 .....	28
二维液相色谱法用于碘帕醇对映异构体杂质的定量分析 .....	34
液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用分析头孢替唑钠及其杂质 .....	40
在线体积排阻反相液相色谱-飞行时间质谱鉴定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中聚合物杂质 .....	50
在线二维液相色谱-四极杆飞行时间质谱法鉴定盐酸氟西汀的杂质 .....	60
超临界流体色谱系统在原料药杂质分析中的应用 .....	70
1.2 遗传毒性杂质分析 .....	74
三重四极杆气质联用法同时测定药品中八种磺酸酯类基因毒性杂质 .....	74
三重四极杆气质联用法测定沙坦类药物中六种 N-亚硝胺含量 .....	79
高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测 .....	83
三重四极杆液质联用法检测缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质 .....	87
厄贝沙坦原料中叠氮类遗传毒性杂质 AZBC 的分析 .....	92
厄贝沙坦原料中叠氮基遗传毒性杂质 MB-X 的分析 .....	97
三重四极杆气质联用法测定丁酸氯维地平中基因毒性杂质丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛含量 .....	101
三重四极杆液质联用系统测定甲磺酸伊马替尼中芳香胺类遗传毒性杂质含量 .....	105
三重四极杆液质联用法检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4-氯苯胺 .....	110
三重四极杆液质联用法测定磷酸肌酸钠中肌酸磷酰二甲酯、肌酸酐磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酐磷酰二乙酯含量 .....	115
<b>第二节 药品中无机（元素）杂质分析 .....</b>	<b>122</b>
ICH Q3D X-射线荧光光谱法分析原料药的元素杂质 .....	123
电感耦合等离子体光谱法测定原料药样品中的元素杂质含量 .....	129
利用电感耦合等离子体质谱测定药物中间体中 Pd 催化剂残留量 .....	134
电感耦合等离子体质谱法测定喷雾剂中的元素杂质含量 .....	136

利用电感耦合等离子体质谱测定葡萄糖注射液中重金属元素含量 .....	141
<b>第三节 残留溶剂检测 .....</b>	<b>144</b>
气相色谱结合顶空进样器测定药品中微量环氧氯丙烷残留 .....	145
顶空-气相色谱法测定化学药品中三种溶剂残留 .....	148
气相色谱法测定药用辅料聚山梨酯 80 中六种杂质含量 .....	152
气质联用仪结合顶空进样器测定药品中溶剂残留 .....	156
顶空-气质联用法测定药物中水合肼含量 .....	160
<b>附录：分析方案及对应分析仪器索引 .....</b>	<b>164</b>



# 第一章 药物杂质分析及相关法规

药物研发和生产过程中，药物杂质的控制是影响药品质量研究的关键环节。药物杂质因其关系到药品质量、安全性、有效性，目前已成为药物研发机构和药品监管机构重点关注内容。随着医药产业的蓬勃发展，国际化合作不断深入，各国也相继推出对应的政策法规来规范和保障医药产品的安全性。目前各国药典及相关药品研究监管机构都对药物杂质研究制定相关法规如：人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）、中国药典（ChP）、美国药典（USP）、欧洲药典（EP）等。人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）按照杂质理化性质将其分为三大类：有机杂质、无机杂质及残留溶剂。

## 有机杂质

有机杂质可在药品的生产或贮存中引入，也可由药物与辅料或包装结构的相互作用产生，这些杂质可能是已鉴定或者未鉴定的、挥发性的或非挥发性的，包括起始物、副产物、中间体、降解产物、试剂、配位体和催化剂；其中化学结构与活性成分类似或具渊源关系的有机杂质，通常称为有关物质。药物中有机杂质的控制目前各国法规都有明确杂质限度指南，如根据每日最大摄入量，计算相应杂质的相关报告限度，对于表观含量在鉴定阈值及以上的单个杂质和在鉴定阈值以下但具强烈生物作用的单个杂质或毒性杂质，予以定性或确证其结构。下表为相关法规在有机杂质项下的相关内容及规定。

表 1 有机杂质相关法规

法规	项目	内容
ICH	ICH Q3A (R2) 新原料药中杂质 ICH Q3B (R2) 新药制剂中杂质	1) Q3A 规定了新原料药中杂质分类，有机杂质报告和控制的合理性及杂质报告限度、鉴定限度和界定限度说明。 2) Q3B 介绍新药制剂中降解产物报告和控制的合理性，降解产物检查项目和降解产物的报告、鉴定和界定限度说明。
USP 2022	USP<466>一般杂质 (ordinary Impurities) USP<1086>原料药和药物制剂中杂质	1) 466 该规定用于评估普通杂质。规定报告限度、方法学、测试溶剂、标准溶液等内容。 2) 1086 为原料药和制剂中杂质提供术语解读，包括原料药杂质分类，制剂中降解产物的限度制定参照 ICH 和 FDA 相关指导原则。
Chp 2020	2020 版药典四部《9102 药品杂质分析指导原则》	原料药和制剂质量标准中杂质检查项目的确定主要参照 ICH Q3A 和 Q3B 指导原则进行研究，并给予药品杂质报告、鉴定和确证限度的说明
EP 10 <sup>th</sup>	5.10 药用物质中杂质控制 通则 2034 “药用物质”	5.10 说明各论杂质详细说明基础，杂质来源，各论中有关物质解读，决策树等内容 通则 2034（药用物质）中给出活性物质中出现的有机杂质的界定、鉴别和报告阈值

2017年，中国正式加入人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)，真正开始融入国际药品监管体系，并参与国际化药品注册监管国际规则制定。ICH起草的Q系列指导原则，被多国药典及药品生产企业所参考和接受，具有广泛适用性。下表2为ICH Q3A中关于新原料药中杂质限度说明，表3为ICH Q3B新药制剂中降解产物的限度。

表2 新原料药杂质限度

每日最大剂量	报告限度	鉴定限度	界定限度
≤2 克/天	0.05%	0.10%或每天摄入 1.0mg(取限度低者)	0.15%或每天摄入 1.0mg(取限度低者)
>2 克/天	0.03%	0.05%	0.05%

表3 新药制剂中降解产物的限度

项目	每日最大剂量	限度值
报告限度	≤1 克/天	0.1%
	>1 克/天	0.05%
鉴定限度	<1mg	1.0%或 5μg TDI, (取限度低者)
	1mg-10mg	0.5%或 20μg TDI, (取限度低者)
	>10mg-2g	0.2%或 2mg TDI, (取限度低者)
	>2g	0.10%
界定限度	<10mg	1.0%或 50μg TDI (取限度低者)
	10mg-100mg	0.5%或 200μg TDI (取限度低者)
	>100mg-2g	0.2%或 3mg TDI (取限度低者)
	>2g	0.15%

## 溶剂杂质

药物中的残留溶剂在此定义为在原料药或辅料的生产中以及制剂制备过程中使用或产生的有机挥发性化合物。这些溶剂在现有生产技术条件下不能完全除去。由于残留溶剂并不能助益治疗，故应尽可能除去所有残留溶剂，以符合制剂质量标准、生产质量管理规范(GMP)或其他质量要求。制剂的残留溶剂量不应高于安全性数据可支持的水平。

ICH Q3C关于残留溶剂指导原则于1997年获得通过，其后成为各国药监部门和药典参考适用的指导原则。ICH Q3C(R8)中将药品生产及纯化中常用的73种有机溶剂按照，按风险评估将溶剂杂质分为四类，分别未应避免溶剂(1类溶剂5种)、应限制溶剂(2类溶剂31种)、低潜在毒性溶剂(3类溶剂27种)、尚无足够毒理学依据(4类10种)。除第4类外，其他三类均给出详细的限定值。Chp 2020版参考ICH Q3C列出的1、2、3类残留溶剂，各残留溶剂的量和可接受限度均与ICH指导原则中相同，但2类溶剂中缺少环戊基甲基醚和叔丁醇的限度值，且2-甲基四氢呋喃未列入3类溶剂。EP完全采纳了ICH关于残留溶

剂的指导原则，溶剂残留的可接受限度均与 ICH 指导原则相同。USP 更加侧重于对第 1 和第 2 类溶剂的分析。下表 4 为不同法规对应残留溶剂杂质的说明。

表 4 残留溶剂相关法规

法规	项目	内容
ICH	ICH Q3C (R8) 杂质：残留溶剂的指导原则 (2021 年)	规定基于风险评估的残留溶剂 4 类分类方法；建立残留溶剂的“每日允许暴露量” (PDE) 的方法；残留溶剂的限度及报告水平。
USP 2022	USP<467>有机挥发性杂质-残留溶剂限制	根据残留溶剂危害程度进行分类，提出“允许的日接触量”PDE，残留溶剂报告水平及残留溶剂限度。分类及限度同 ICH Q3C 类似，
Chp 2020	2020 版药典四部《0861 残留溶剂测定法》	主要规定残留溶剂三种气相色谱测定方法，及三类溶剂的限度值，参考 ICH Q3C，
EP 10 <sup>th</sup>	5.4 残留溶剂	规定残留溶剂的分类，PDE 值建立，分析方法，以及残留溶剂的限度值。

## 无机杂质

药品中的元素杂质有多种来源：它们可能是在合成中有意添加的催化剂的残留，也可能是生产设备或包装系统相互作用等产生的杂质或药品各个组分中存在的杂质。因为元素杂质不能为患者提供任何治疗作用，所以它们在药品中的含量需要被控制在可接受的限度范围内。金属元素杂质随着药品生产过程中催化剂和试剂的应用日益广泛，近年来，元素污染的风险因素发生了巨大变化，ICH 在 2013 年批准制定了 Q3D 金属杂质指导原则，旨在为药品中的金属杂质定性和定量控制提供全球性政策法规，并于 2014 发布了 Q3D 第四阶段的正式文件。随后 USP 和 EP 等欧美药典陆续出台一系列指导原则对元素杂质进行控制，并经多次修订完善，目前，元素杂质的种类和限度基本上和 ICH 保持一致。中国药典 ChP 2020 《9102 药品杂质分析指导原则》中对于元素种类及限度控制方法遵循 ICH Q3D，如下表 5 所示。

表 5 无机杂质相关法规

法规	项目	内容
ICH	ICH Q3D (R1) 元素杂质指导原则 (2019 年制定)	潜在元素杂质的安全性评估；元素分类，确定每一种有毒元素的每日允许暴露量 (PDE)；元素杂质的风险评估和控制
USP 2022	USP<232>限度规定 USP<233>方法规定	USP<232>根据元素的毒理学数据，规定了药品和原料药、辅料中需要检测的 15 种元素及其限量。并基于不同给药途径分类给出限值；USP<233>对元素杂质的检测方法以及样品前处理方法做了规定

Chp 2020	2020 版药典四部《9102 药品杂质分析指导原则》	无机杂质参照 ICH 元素杂质指导原则 (Q3D)进行研究, 并确定检查项目。
EP 10 <sup>th</sup>	5.20 元素杂质 2.4.20 元素杂质测定	各元素杂质的种类和限度要求均遵循了 ICH Q3D

## 遗传毒性杂质

遗传毒性杂质属于一类痕量情况下即可与DNA 反应的物质, 这些物质在较低水平时也可能直接引起DNA 损伤, 导致 DNA 诱变, 从而引发癌症。最早2006年, EMA即发布《遗传毒性杂质限度指南》, 提出遗传毒性杂质限量TTC为1.5μg/人/天, 为制定药物中遗传毒性杂质含量提供依据。2008年FDA随后制定《原料药和成品药中遗传毒性和致癌性杂质: 推荐方法》, 提供基因毒性杂质的分析方法、处理方法和减少方法, 上市申请和临床研究申请的可接受限度作了详细阐述和说明。2013年ICH出台ICH M7指南《评估和控制药物中的DNA反应性(致突变性)杂质以限制潜在的致癌风险》, 该指导原则对ICH Q3A和Q3B做了一定补充。对遗传毒性杂质的鉴定、分类、限定、控制提供了标准的方案, 其内容与 EMEA、FDA 草案基本一致, 并且比两者覆盖范围更广, 更详尽, 该指导原则针对TTC值阐述如何设定质量标准等问题。中国药典2020版中新增《9306 遗传毒性杂质控制指导原则》, 该指导原则规定了药物遗传毒性杂质的危害评估、分类和限值制定, 以控制药物中遗传毒性杂质潜在的致癌风险。为国内药物遗传毒性杂质研究提供参考和依据, 下表6为相关遗传毒性杂质的相关法规及介绍。

表 6 遗传毒性杂质相关法规

法规	项目	内容
EMA	《遗传毒性杂质限度指南》2006 年	定义遗传物质限量 TTC 为 1.5μg/人/天, 计算药品中允许基因毒性杂质含量。
FDA	《原料药和成品药中遗传毒性和致癌性杂质: 推荐方法》2008 年	原料药和制剂中的基因毒 性杂质生成的预防办法, 基因毒性杂质的分析方法、处理方法和减少方法
ICH	ICH M7 《评估和控制药物中的 DNA 反应性(致突变性)杂质以限制潜在的致癌风险》2013 年	规定危害性评估要素, 风险特征、摄入量制定(TTC 法、结构-活性(QSAR) 分析法、LTL 法等); 杂质控制等内容
Chp2020	2020 版药典四部药典四部《9306 遗传毒性杂质控制指导原则》	1) 杂质评估方法: (Q)SAR 危害评估 2) 可摄入量计算: TD50 线性外推法, PDE 每日允许暴露量, TTC 毒理学关注阈值

从以上各国药物杂质法规修订内容来看, 杂质控制的种类越来越多, 分析方法朝着高灵敏度方向发展, 同时关于不同类型杂质的控制限度逐渐趋于统一, 趋向于 ICH 的要求。这对于推动形成完整, 统一的行业发展标准具有重大的意义。

## 第二章 药物中杂质分析技术

药品在临床使用中产生的不良反应除了与药品本身的药理活性有关外，药品中存在的杂质也会产生很大影响，所以规范性对药品进行杂质研究，并将其控制在合理可控的范围内，关系到药品临床的安全性和有效性。人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）按照杂质理化性质将其分为三大类：有机杂质、无机杂质及残留溶剂。因为不同杂质的理化性质不同，在药物杂质过程中，选择合适的杂质分析技术，可极大缩短药物杂质研究时间，推进药物研究进展。

### 1 常见杂质分析技术

#### 1.1 有机杂质

有机杂质通常包括工艺中引入的杂质和降解产物，可能为已知的，或者未知的。由于这类杂质的化学结构一般与活性成分类似或具有渊源关系，故通常又称之为有关物质。其中有部分有机杂质在痕量的状况下对机体有致突变致癌风险，这类特殊杂质物质称为遗传毒性杂质，需要根据摄入量进行限度的单独制定，不可按照常规药物一般杂质水平来控制。下文阐述相关有机杂质的分析检测方法。

##### ◆ 高效液相色谱技术

高效液相色谱技术（HPLC）属于常见主流的杂质分析技术，通过合适色谱柱选择、流动相优化、洗脱梯度调整，适用于大多数杂质化合物的分离和检测。2020版《中国药典》四部通用技术要求《0512 高效液相色谱法》中对于液相色谱法的色谱条件和仪器要求做了详细的描述，同时对于品种色谱参数允许调整范围进行了规定。HPLC法因其分析效率高、稳定性好、适用范围广、灵敏度高、样品量少等优势，广泛适用于大多数化合物的分离检测。近年来为了应对快速分离的色谱要求，超高效液相色谱技术（UHPLC）应运而生，适用于小粒径色谱柱，超快速的分析要求，极大提高了分析效率，同时也节约流动相的使用。

##### ◆ 多维液相色谱技术

多维色谱又称为色谱/色谱联用技术，通过阀的使用，将一维中未完全分离或者需要进一步分离的组分，切入第二维色谱进行进一步分离洗脱，如需进一步分离可切入第三维液相。实际上优选两合适的色谱柱即可满足绝大多数难分离化合物的分离检测，一般多维液相常指二维液相。

##### ◆ 超临界流体色谱技术

超临界流体色谱（SFC）以超临界流体作为流动相的新型色谱技术，超临界流体的性质介于气体和液体之间，使超临界流体色谱具有气相色谱和液相色谱的优点：其扩散系数和粘度接近气体，具有低传质阻力，柱压低，分离效率高优点，同时超临界流体密度接近于液体，具有较高的溶解性，对于低温下难挥发，热不稳定化合物具有较好的分离和保护作用。在超临界流体色谱中，因CO<sub>2</sub>流体具有易于达到的超临界温度和压力条件，目前使用最为广泛。在药物杂质分析中，SFC常用于异构体和手性化合物的拆分，易氧化不稳定化合物的分离检测。

##### ◆ 高分辨液质联用技术

高分辨质谱技术对于未知杂质的鉴定发挥越来越重要的作用。根据ICH Q3A要求，当原料药最大日剂量大于2g/天，杂质的鉴定阈值为0.05%；当原料药最大日剂量小于等于2g/天，则该杂质的鉴定阈值为

0.1%。药物的质量研究过程中，对于未知杂质定性分析时，常用的鉴定方法为高分辨质谱一级和二级信息，结合相关分子式预测软件和碎片归属软件进行结构解析。高分辨质谱技术因其特有的高特异性、高灵敏度、前处理简单、分析速度快等优点，已成为药物中微量杂质分析的首选。

#### ◆ 三重四极杆质谱技术

三重四极杆质谱技术是一种利用串联四极杆进行质量扫描和离子筛选的质谱检测设备，具有专属性强、基质干扰小、灵敏度高、定量方便等特点，适合痕量物质的定量分析检测，如遗传毒性杂质的检测。遗传毒性杂质又称基因毒性杂质，是指在痕量情况下，即可直接或者间接损伤机体的 DNA，导致致癌、致突变的物质。美国国立卫生研究院给出了 1547 潜在基因毒性杂质结构，包括常见的甲磺酸酯类、N-亚硝胺类等高基因毒性的物质。目前世界各国的法规机构都对遗传毒性杂质做了明确的规定和要求。我国 2020 版《中国药典》四部通用技术要求中《9306 遗传毒性杂质控制指导原则》中规定遗传毒性杂质的危害评估、分类和限值制定。由于基因毒性杂质一般痕量情况下，即有遗传物质损伤风险，故对仪器检测灵敏度要求很高，如 ICHM7 的要求，缬沙坦中 NDMA 杂质的可接受限度指标为 0.3 ppm。目前痕量基因毒性杂质常用的仪器包括三重四极杆液质联用仪和三重四极杆气质联用仪。

### 1.2 无机杂质

无机杂质常指在原料药或者制剂生产或传递过程中产生的杂质，这些杂质来源通常为：催化剂、重金属、配位体、无机盐、残留金属。由于无机杂质直接影响药品的稳定性，并可反映生产工艺本身的情况，了解药品中无机杂质分析方法对评价质量的安全性有很大帮助。无机杂质参照 ICH 元素杂质指导原则 (Q3D) 进行研究，包括潜在元素杂质的毒性评估，毒性元素允许日暴露量 (PDE) 建立，以及控制药品中元素杂质水平手段的发展，并确定检查项目。目前对于药品和原料药、辅料中需要检测的 4 种高毒元素 As、Hg、Cd 和 Pb，以及多种选测元素如 Cr、Mo、Ni、V、Pd、Pt 等。美国药典 USP<233> 推荐使用 ICP-MS 或 ICP-OES 测定药品及成分中元素杂质的含量。当然如果其他的测试方法通过验证并且满足可接受标准也能使用，如 EDX 通过含量验证后，也可以应用于药品中原原料药的检测。ICP-MS 电感耦合等离子体质谱，作为重要的元素分析手段，具有多元素同时检测和定量的能力，且灵敏度高、线性范围宽、分析速度快，目前越来越多的应用于药物等基质中的元素分析。

### 1.3 溶剂残留

残留溶剂通常指药品生产过程中，在工艺中使用或者添加的未完全去除的有机溶剂。溶剂残留来源于原料药、辅料或制剂生产中使用的有机溶剂，特别是原料药合成过程中有机溶剂的使用。当药品中溶剂残留含量的水平是否超过安全摄入水平时，需进行检测和监控，可参考 ICH Q3C 残留溶剂指导原则进行检测。

根据其毒性限度，将残留溶剂分为 4 类：1 类溶剂为 5 种避免使用溶剂，如苯、四氯化碳、1, 2-二氯乙烷、1,1-二氯乙烯、1,1,1-三氯乙烷；2 类溶剂由于其固有剧毒性，应限制使用，如乙腈、氯苯、三氯甲烷等；3 类溶剂为低潜在毒性溶剂，应受 GMP 或其他质量要求限度使用，如乙酸、丙酮、乙醇等；4 类溶剂为无毒理学数据的溶剂，无 PDE 值，生产商需论证溶剂残留量的合理性。具体使用溶剂根据类别进行对应的检测监控。残留溶剂由于均为挥发或者半挥发溶剂，常使用顶空+气相色谱或者气质联用的方法进行检测。

气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术结合了气相色谱高效与质谱结构鉴定的优势，适用于定性、定量分析

热稳定、易挥发的多组分混合物中有机挥发性杂质，对于复杂样品，通过质谱技术可降低噪音的干扰，避免假阳性的发生，同时灵敏度对于常规气相色谱有数量级别的提升，目前在溶剂残留等领域使用越来越广泛。

## 2 岛津药物杂质分析方案

岛津在杂质分析的有机杂质、无机杂质、溶剂残留方面具有相关的仪器产品，可应对常规物质分析、未知杂质定性分析、手性化合物拆分、基因毒性杂质的痕量检测、元素杂质的定性定量分析、残留溶剂的痕量检测。下面介绍岛津在杂质分析方面特色的仪器分析系统，为相关从业人员提供参考。

未知杂质的鉴定，一直是有机杂质分析控制中的关键步骤，未知杂质的分析常会用到高分辨质谱技术。常规液相用的缓冲盐流动相没法直接进入质谱，需要进行脱盐或者更换挥发性缓冲盐体系，进质谱进行检测，但这种方式导致杂质的保留和定位同常规方法不一致。基于中心切割的机理，岛津开发出 2DLC/MS 杂质鉴定系统。该系统解决了常规含缓冲盐的色谱方法在液质联用时没法直接使用的问题，同时该系统配多个样品环，一次进样可完成多个杂质的分析检测。使用该系统可以将使用非挥发性缓冲盐甚至是离子对试剂的 LC 分析方法直接移植使用，即保证了目标杂质的定位，提高了杂质定性的准确性，同时节省了方法开发人员的时间。同时结合岛津新推出的四极杆-飞行时间质谱仪 LCMS-9030，提高杂质鉴定的效率。LCMS-9030 该系统传承了岛津串联四极杆质谱 LCMS-8060 的离子源和离子传输系统，得益于高效率的离子产生、传输和聚焦能力，具有优异的灵敏度，同时 TOF 部分运用了多项最新专利技术，保证了在分辨率和质量准确度。结合便捷的数据处理和数据库搜库比对软件，是有关物质检查和结构鉴定的有力工具。

手性或者异构体杂质的拆分也是杂质分析的难点，超临界流体色谱是手性和异构体化合物拆分的有利武器。Nexera UC 是岛津超临界流体色谱系统，可针对在线超临界流体萃取、超临界流体色谱质谱分析、手性化合物分析、超临界流体制备 Nexera UC prep 等开发各种不同应用体系，特别是 SFC 手性化合物拆分系统，可通过改性剂自动混合功能，对多达 12 根色谱柱进行切换筛选，以实现对手性化合物的分析方法优化，提高分析的效率。

基因毒性杂质由于其痕量情况下即有致癌致突变的影响。2007 年欧洲药品管理局 EMA 在《基因毒性杂质限度指南》中正式引入毒理学关注阈值 (TTC) 并设定限度值为 1.5  $\mu\text{g}/\text{day}$ ，即每日摄入量 1.5  $\mu\text{g}$  的基因毒性杂质，对于大多数药品来说是可以接受的风险。加上检测中溶液的溶解稀释，通常对仪器的检测灵敏度要求很高，目前对于非挥发性基因毒性杂质常用三重四极杆液质联用仪来检测，对于一些易挥发性的痕量遗传毒性杂质，适用三重四极杆气质联用仪进行分析。岛津三重四极类液质产品经历了多代产品的研究与发展，岛津串级质谱系列产品在医药、DMPK 等领域已经取得了业界的广泛认可，其独有的 UF-Switching 技术实现正负离子 5 msec 的超高速切换、UF-Scanning 技术实现 30000 u/sec 超快扫描速度、以及碰撞室 UF-sweeper 超快速技术，保障在灵敏度和稳定性方面优异的表现。

无机杂质分析检测，各国药典都有收录记载相关简单、方便等行之有效的检测方法。对于成熟生产工艺的仿制，可根据实际情况，采用药典收载的方法进行质量考察及控制。但对于采用新生产工艺生产的新药，建议使用电感耦合等离子发射光谱 (ICPE) 或电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 等分析技术，对产品中可能存在的各类无机杂质进行定性、定量分析，以便对其生产工艺进行合理评价，并为制定合理的质量标准提供依据。岛津 ICPMS-2030 LF 采用独特的双模电子倍增管检测器，具有最宽的动态线性范围，运行成本最

低，新开发的碰撞池大大降低了基体干扰，提高了传输效率，是一款集众多优点于一身的高性能痕量金属元素分析利器，可以大大提高分析速度和工作效率。

溶剂残留大多具有挥发性，常使用气相色谱和气相色谱质谱联用进行检测。岛津 GCMS-QP2020 NX 继承抗污染型高灵敏度气质 GCMS-QP2020 卓越硬件性能，软件智能化最高的超快速质谱产品。搭载全新大容量超高效真空系统，集成专利高辉度离子源和屏蔽板（Shield）技术，使其超强抗污染性能和超高灵敏度脱颖而出，成为复杂样品痕量物质分析的有力利器。



### 第三章 药物杂质分析综合应用文集

药物杂质研究是药物研发和生产过程中重要的内容，关系到药品的质量和临床疗效。药物杂质的研究离不开相关的应用分析仪器使用。我们紧跟相关法规发布如《中国药典》、密切关注热点事件如沙坦类药物亚硝胺基因毒性杂质事件，针对药物杂质不同杂质理化性质，开发契合标准和法规的药物杂质分析应用报告，让用户及时掌握最新的分析技术。通过整理近年来在药物杂质分析方面的特色应用报告，形成一份包含多种类型杂质分析的应用文集，为相关用户提供参考。

本文集收录了岛津在医药杂质分析领域相关的多篇具有代表性的应用报告，其中有机杂质分析 17 篇，包括液相色谱法进行常规药物中有关物质的检测；二维液相对异构体杂质分析、高分辨质谱法对药物定性分析；二维液相+高分辨质谱法对非挥发缓冲盐体系中杂质定性分析检测；超临界流体色谱 SFC 药物合成中的手性化合物进行拆分；基因毒性杂质的检测；无机元素杂质分析 5 篇，涉及 ICP-OES、EDX、ICPMS 等机种在原料药、喷雾剂、注射液、合成中间体催化剂等方面的应用；残留溶剂 5 篇，包含使用顶空+气相色谱法和顶空+气质联用法对药品中常见的溶剂杂质如环氧乙烷等进行检测的案例。



LC-40



LCMS-9030



LCMS-8060 NX



GC-2030



GCMS-TQ8050NX



ICPMS 2030

## 第一节 有机杂质分析

有机杂质是一大类由工艺引入和降解生成的杂质物质，该类物质化学结构种类繁多，分析方法也是多样化。按照有无基因毒性，分为基因毒性杂质和一般工艺降解杂质。对于一般工艺降解杂质根据是否需要鉴定分为已知杂质和未知杂质，其中未知杂质基于 ICH Q3A 其含量决定是否需要鉴定，其他已知工艺降解杂质参照常规的限量要求进行控制即可。本节按照常规工艺杂质和基因毒性杂质两大类进行分别收集阐述。

常规已知工艺降解杂质的检测常需用到液相色谱进行分析，本节优选了 2 篇关于有关物质的液相色谱法的定量分析应用报告；对于未知杂质鉴定，本节选了 3 篇，一篇关于常规高分辨质谱进行杂质鉴定分析流程报告和 2 篇关于常规液相使用了非挥发缓冲盐，如何通过二维液相进行除盐和分离鉴定的基于二维液相的高分辨质谱杂质鉴定应用分析；有些异构体和手性化合物杂质的分析，可参考二维液相色谱法和 SFC 手性化合物拆分法。对于基因毒性杂质，由于其含量较低，需要的检测仪器灵敏度较高，对挥发性基因毒性杂质常采用气质质方法，高沸点，热不稳定化合物采用液质质方法。本节筛选收录了常见的磷酸酯类、亚硝酸类、叠氮类、芳香胺类的基因毒性杂质的分析应用报告，为相关从业人员提供参考。

## 1.1 工艺及降解杂质

### 高效液相色谱法分析盐酸多西环素中的有关物质

**摘要：**本文参考美国药典（USP），采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素中有关物质分析的超高效液相色谱测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120（2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 μm），以甲醇-水（含磷酸二氢钾、EDTA·Na<sub>2</sub>、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5）为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件设置系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均>1.5，满足测定需求。

**关键词：**Nexera LC-40 高效液相色谱仪 盐酸多西环素 有关物质

多西环素（Doxycycline）又名强力霉素或脱氧土霉素，是一种半合成的抗生素，临床上作为广谱抑菌剂，高浓度时具有杀菌功能。该药品以发酵产生的土霉素为原料，经氯代、脱水、催化氢化、转化和成盐等单元反应制备而成。药典将从起始原料带入、生产过程氢化反应不完全、反应副产物等杂质，如：杂质A-6-表多西环素（6-epidoxycycline）、杂质B-甲烯土霉素（metacycline）、杂质C-4-表-多西环素（4-epidoxycycline）、杂质D-4、6-表多西环素（4、6-epidoxycycline）、杂质E-土霉素（oxytetracycline）、杂质F-2-acetyl-2-Decarbamoyld-oxycycline等有关物质。因其疗效低、毒性大，各国药典对有关物质的含量进行了限定。《中国药典》2015版规定，杂质A和B面积不得大于对照溶液主峰面积（2.0%），其他单个杂质峰面积不得大于主峰的0.5倍（1.0%），各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的2倍（4.0%）。美国药典（USP）采用主成分自身对照法，限定杂质C的限量<0.5%，未知杂质之和<0.5%，总杂质<2.0%。文献报道，四环素类抗生素会发生光降解，在高温、强酸、强碱、氧化条件下稳定性差。USP采用了超高效液相色谱法，分析时间更短，样品稳定性更好，流动相消耗更少。

本实验参考USP药典，使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪，以亚2 μm填料色谱柱进行分离，建立了盐酸多西环素中有关物质的分析方法。Nexera LC-40高效液相色谱仪是岛津公司2019年推出的液相新产品，该产品秉承了岛津一直以来的设计理念，同时还引入了智能分析(AI)、智能物联(IoT)等尖端技术。Nexera LC-40系统耐压70 Mpa，可满足大部分超高效液相分析需求。自动进样器SIL-40CXR采用空气循环式控温，更均匀，有效避免样品降解，配置的二极管阵列检测器SPD-M40具有极高的灵敏度和卓越的线性范围（2.5 AU），三重控温技术能有效降低基线噪音并提供稳定的基线，因此，即使在高浓度的样品中，也能准确定量检测痕量的杂质组分，可为有关物质分析提供参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B

XR 输送泵, SIL-40CXR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40A 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm i.d.×50 mm L., 1.9 μm)

流动相: A, 水 (每升含 3.1 g 磷酸二氢钾、0.5 g EDTA·Na<sub>2</sub>、0.5 mL 三乙胺, 氢氧化钠调节 pH=8.5); B, 甲醇

流速: 0.6 mL/min

柱温: 60°C

检测波长: 350 nm

进样体积: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Pumps	Pump B Conc.	10
9.00	Controller	Stop	

## 2. 样品前处理

样品: 盐酸多西环素片 (市售, 规格: 0.1 g, 批号: 20190204, 有效期至2022.01)

稀释剂: 0.01 M 盐酸

系统适应性储备溶液1: 1 mg/mL β-多西环素和盐酸甲烯土霉素, 溶剂为0.01 M 盐酸。

系统适应性储备溶液2: 1.2 mg/mL 盐酸多西环素, 溶剂为0.01 M 盐酸

系统适应性溶液: 取5 mL 系统适应性储备溶液2至25 mL 容量瓶, 加热60 min, 加热至干燥, 小心不要烧焦, 将残留物溶解在稀释剂中, 加入0.5 mL 系统适应性储备溶液1, 以稀释剂定容。过滤。这份溶液包括4-epi多西环素、多西环素有关物质A、甲烯土霉素以及多西环素, 可以保存14 d。

样品溶液: 0.25 mg/mL 多西环素, 稀释剂溶解。操作流程, 取不少于20片剂研钵磨粉, 取一部分至容量瓶, 加50%稀释剂, 超声5 min, 振摇15 min, 定容。过0.22 μm 滤膜。

标准溶液: 1.5 μg/mL, 取适量多西环素标准品, 超声溶解, 稀释剂定容。

分离度: >1.5, 4-epi多西环素和甲烯土霉素; >1.5, 4-epi多西环素、多西环素有关物质A; >1.5, 多西环素有关物质A和多西环素。

相对标准偏差: <5.0%多西环素峰, 标准溶液。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 系统适应性考察

岛津LabSolutions软件拥有丰富智能的批处理功能, 可以实现系统适应性的自动判别, 省去了繁琐的人工核验。在方法中设置系统适应性参数, 并在批处理中选择相应的判定条件, 系统适应性通

过则继续样品分析，否则暂停分析。批处理运行后，自动输出一份系统适应性考察结果的HTML文件，如图1所示。由图1所知，标准溶液连续分析6次，多西环素峰面积相对标准偏差（RSD）=2.05%，满足USP药典关于多西环素峰面积重复性的要求。

<标准>					
ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	面积	-	-	5.000

<面积>	
评价	Pass

数据号	PDA-1
1	44408
2	45564
3	46383
4	45815
5	44518
6	44061
平均值	45125
%RSD	2.047

图 1. 多西环素系统适应性检查结果

<样品信息>			
数据路径	D:\ZX\DOX		
数据号	样品名	样品ID	分析日期和时间
1	系统适应性		2019/9/4 11:44:46 (+0800)
	D:\ZX\DOX\0904_系统适应性_00		System Administrator
	4.lcd		

<标准>					
ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	分离度	1.500	100.000	-
PDA-2	多西环素有关A	分离度	1.500	100.000	-
PDA-3	4epi多西环素	分离度	1.500	100.000	-

<分离度>			
评价	Pass		

数据号	PDA-1	PDA-2	PDA-3
1	2.819	1.709	4.829

图 2. 有关物质系统适应性检查结果

USP药典要求，多西环素、多西环素有关物质A、4-epi多西环素、甲烯土霉素等相邻峰之间分离度大于1.5。在采集方法中设置分离度参数，批处理分析后，即自动出具分离度的系统适应性结果，如图2所示，多西环素与多西环素有关物质A分离度为2.8，多西环素有关物质A与4-epi多西环素之间的分离度为1.7，4-epi多西环素与甲烯土霉素分离度为4.8，分离度均大于1.5，满足要求。

### 3.2 色谱图

稀释剂、系统适应性溶液和标准溶液色谱图如下所示。稀释剂色谱图无干扰峰，系统适应性溶液色谱图中多西环素和杂质分离良好。

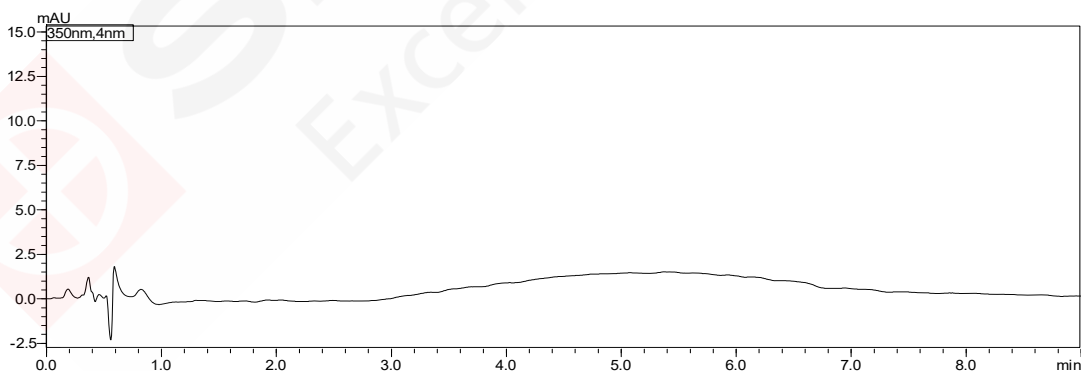


图 3. 空白溶剂色谱图

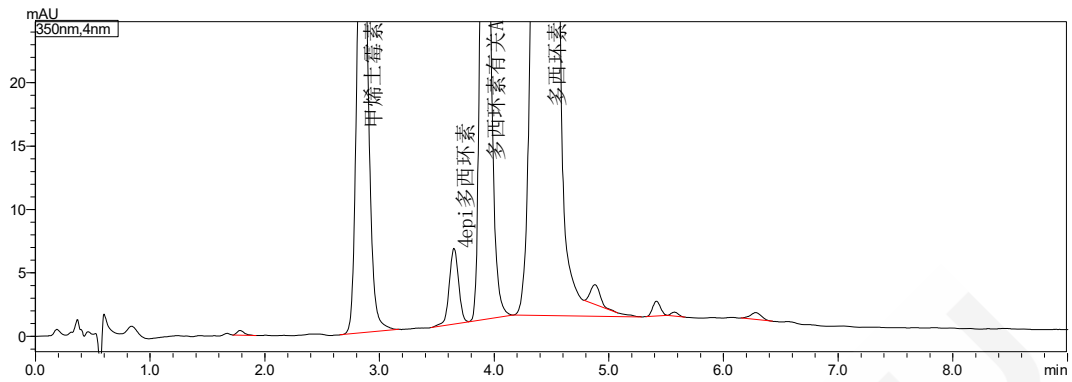


图 4. 系统适应性色谱图

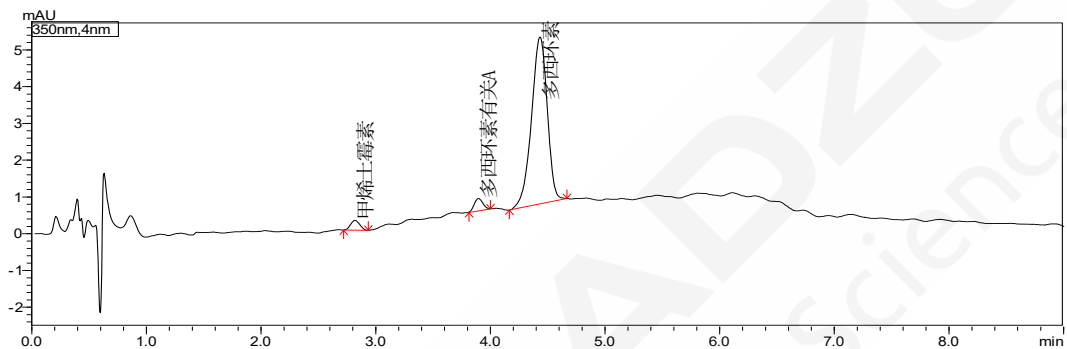


图 5. 标准溶液色谱图 (1.5 µg/mL)

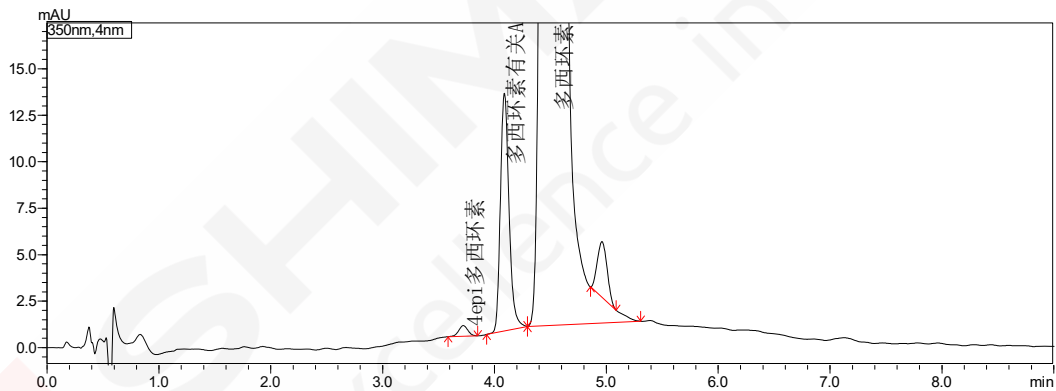


图 6. 样品溶液色谱图 (0.25 mg/mL)

### 3.3 样品测定

按前述条件，制备样品溶液，并分析。结果如图 6 所示，多西环素、有关物质 A、4-epi 多西环素邻近峰之间实现了基线分离。

#### 4. 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素片中有关物质测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 μm)，以甲醇-水（含磷酸二氢钾、EDTA·Na<sub>2</sub>、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5）为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件进行系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均>1.5，满足测定需求。



# 高效液相色谱法结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质

**摘要:** 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质测定方法。对于未知杂质, 用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中采用了自动进样器 Co-injection 功能, 相较传统的直接进样 (标准模式) 可以获得更高的柱效及分离度; 系统适用性试验, 空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定干扰情况及分离度溶液测试结果均满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0  $\mu\text{g/mL}$  线性范围内线性良好, 相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015  $\mu\text{g/mL}$  和 0.051  $\mu\text{g/mL}$ 。精密度实验中, 双氯芬酸钠的保留时间相对标准偏差为 0.040~0.071%; 峰面积的相对标准偏差为 0.191~1.621%。供试品中单个杂质均小于 0.5%, 并且总杂质小于 1.0%, 结果符合药典要求。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

**关键词:** Nexera LC-40 高效液相色谱仪 双氯芬酸钠肠溶片 有关物质

双氯芬酸钠肠溶片为解热镇痛及非甾体抗炎镇痛药, 用于缓解各种关节炎的关节肿痛症状, 治疗非关节性的各种软组织风湿性疼痛, 急性的轻、中度疼痛, 对成人和儿童的发热有解热作用。其主要靠抑制环氧合酶减少前列腺素的合成, 以及一定程度上抑制脂氧酶而减少白三烯、缓激肽等产物的生成而发挥解热镇痛及抗炎作用。

国内外对双氯芬酸钠制剂的HPLC方法报道较多, 但较少有使用UHPLC法对其有关物质进行检测的研究。和HPLC法相比, UHPLC法能有效节省分析时间和有机溶剂的消耗。

参照《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下方法, 本研究采用岛津新款液相色谱仪LC-40, 建立UHPLC法测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质, 该方法准确、快速、灵敏度高, 可用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 NexeraLC-40 液相色谱仪, 包括 CBM-40A Lite 系统控制器, DGU-405 脱气机, LC-40B XR 输送泵, SIL-40CXR 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SPD-M40A 检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D.×100 mm L, 2.2  $\mu\text{m}$ )

流动相: A 相-4%冰醋酸溶液; B 相-甲醇

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

检测波长：254 nm

进样体积：4  $\mu\text{L}$

洗脱方式：等度洗脱，A/B = 35/65 (v/v)

## 2. 样品前处理

供试品溶液制备：参照《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，取本品细粉适量（约相当于双氯芬酸钠 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使双氯芬酸钠溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，离心，取上清液作为供试品溶液。

对照溶液制备：参照中国药典《双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，另取邻苯二甲酸二乙酯 5 mg，置 200 mL 量瓶中，精密加供试品溶液 1 mL，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

分离度溶液制备：参照《中国药典》双氯芬酸钠有关物质项下，取双氯芬酸钠对照品适量，用水制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液，取该溶液暴露于紫外光灯（254 nm）下照射 15 分钟，取 4  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪，记录色谱图，在与主峰相对保留时间约 0.8 处出现一杂质峰，两者的分离度应大于 6.0。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 进样模式考察

岛津Nexera LC-40系统自动进样器SIL-40CXR具备多种预处理程序，可实现在线稀释样品溶液、在线柱前衍生、Co-injection、重叠进样等多项功能。Co-injection模式相较传统直接进样（标准模式）可以去除溶剂效应，改善峰型，提高定量灵敏度。尤其当样品溶液含高比例有机溶剂时，可以直接进样分析而无需担心溶剂效应。本实验选择以水作为同时注入试剂，Co-injection模式程序设定如图1所示。将100%甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式与Co-injection模式的谱图对比，如图2所示；对照溶液分别在两种模式下连续进样测定6次重复性色谱图如图3及图4所示，对比结果见表1。



图 1. 自动进样器 SIL-40CXR 同时注入功能 (Co-injection) 程序设定

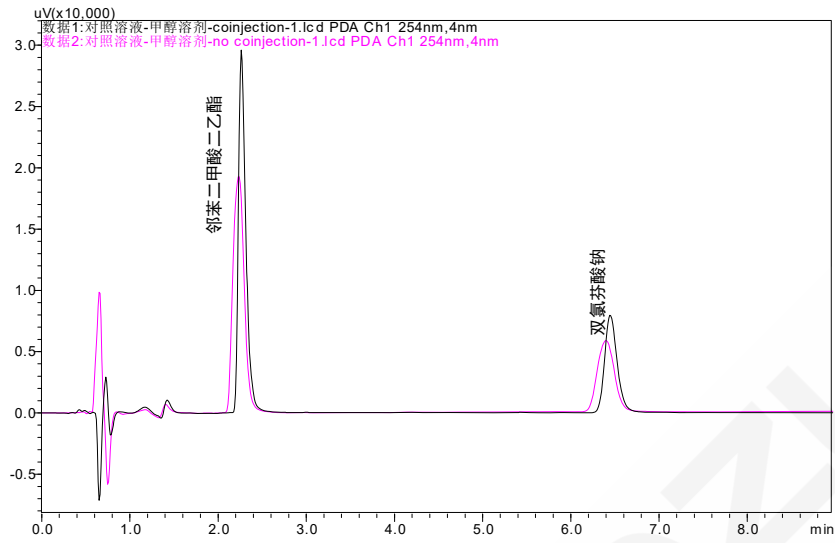


图 2. 对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: Co-injection 模式; 数据 2: 标准模式)

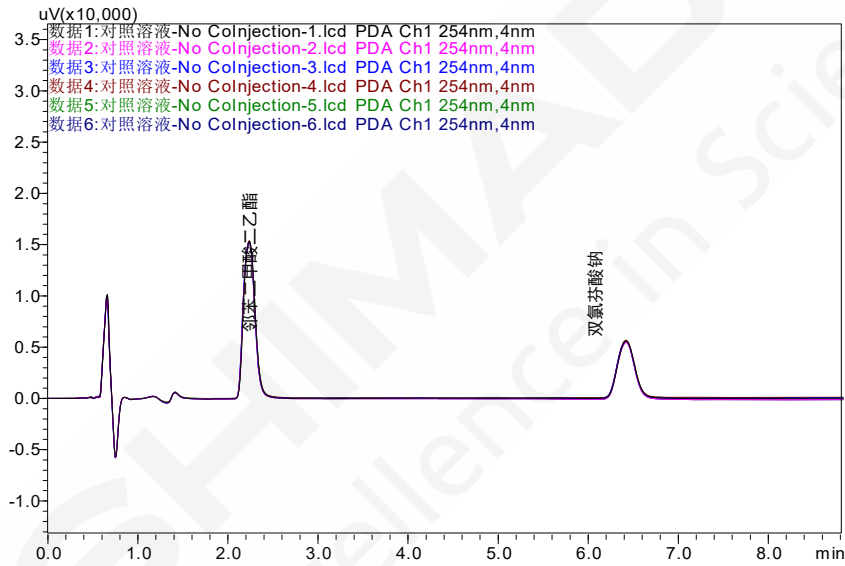


图 3. 对照溶液标准模式下重复性色谱图

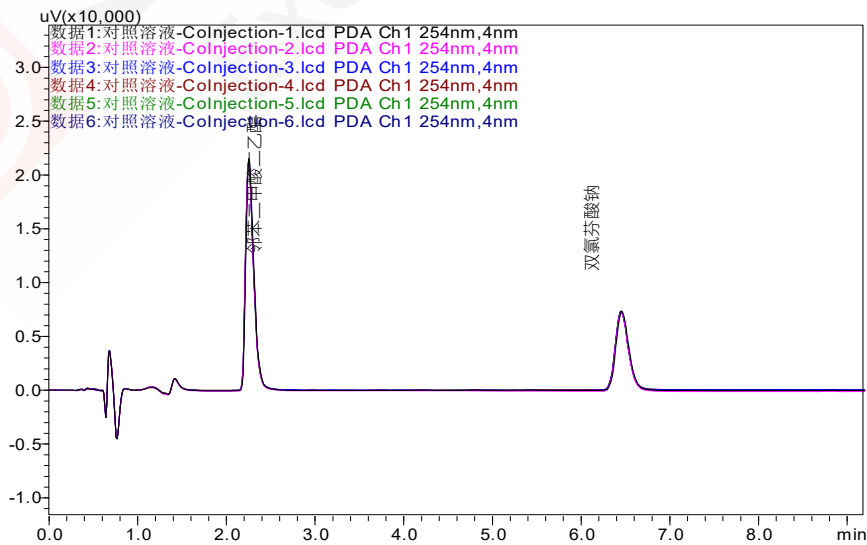


图 4. 对照溶液 Co-injection 模式下重复性色谱图

表 1. 标准模式和 Co-injection 模式下双氯芬酸钠色谱参数比对结果

No.	Co-injection 模式				标准模式			
	保留时间	峰面积	分离度*	理论塔板数	保留时间	峰面积	分离度*	理论塔板数
1	6.447	75,543	18.014	8,380	6.422	74,922	14.041	5,164
2	6.452	75,386	17.963	8,368	6.422	74,536	14.023	5,133
3	6.451	75,484	17.932	8,328	6.418	74,320	13.997	5,120
4	6.450	75,251	17.983	8,351	6.419	74,479	14.047	5,171
5	6.452	75,378	18.029	8,396	6.421	74,706	14.045	5,177
6	6.451	75,420	17.947	8,352	6.422	74,737	14.018	5,128
平均值	6.450	75,410	17.978	8,363	6.421	74,617	14.028	5,149
RSD(%)	0.027	0.133	0.212	0.287	0.028	0.287	0.137	0.481

\*: 双氯芬酸钠色谱峰与邻苯二甲酸二乙酯色谱峰的分离度

通过上述图表, 可见当样品溶液含高比例有机溶剂时, 采用 Co-injection 模式的色谱峰型明显优于标准模式下的色谱峰型; 对比可知, 仪器精密度考察结果表明峰面积及保留时间 RSD 与标准模式基本一致, 但是由于色谱峰型较标准模式得到改善, 进而提高了分离度及理论塔板数。

为了进一步说明 Co-injection 功能对峰型改善的能力, 将以水和 65% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式的谱图与以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式的谱图对比, 如图 5 所示。以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式所得色谱图, 其色谱峰型与以水或 65% 甲醇为稀释溶剂时在标准模式下的色谱峰型基本一致。结果表明, 当样品溶液含高比例有机溶剂时, 可以采用 Co-injection 模式分析而无需担心溶剂效应。

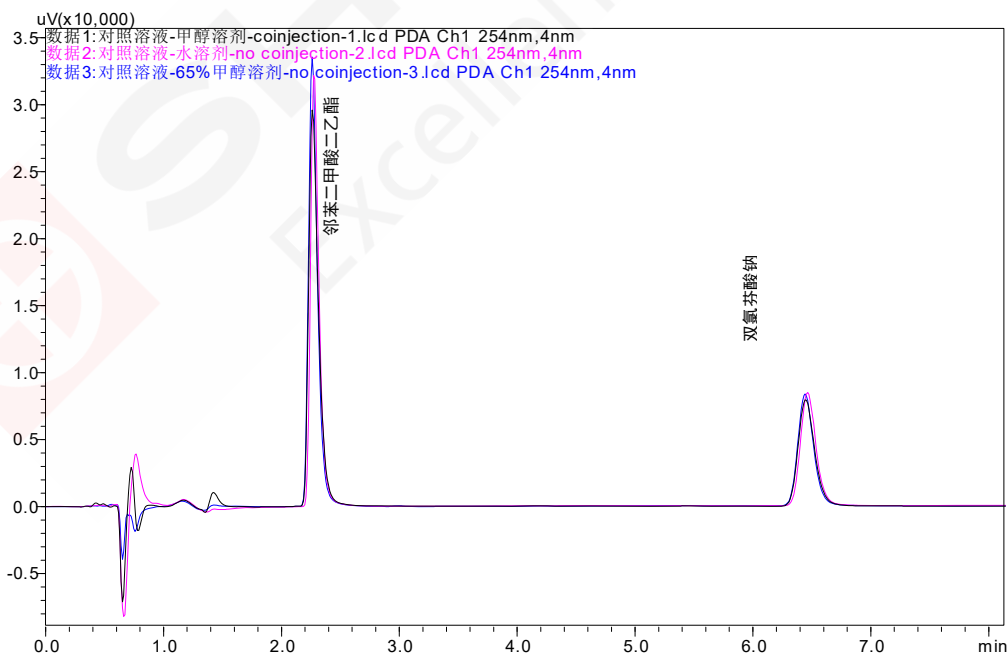


图 5. 不同稀释溶剂的对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: 甲醇, Co-injection 模式; 数据 2: 水, 标准模式; 数据 3: 65% 甲醇, 标准模式)

### 3.2 系统适用性试验

按照1.2中分析条件对空白溶剂、对照溶液、分离度溶液进行测定，色谱图如下所示。结果显示空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰；经光照破坏的分离度溶液中主峰与各杂质峰均能有效分离，分离度均大于1.5；在与主峰相对保留时间约0.8处出现一杂质峰，两者的分离度为6.45，满足药典要求。

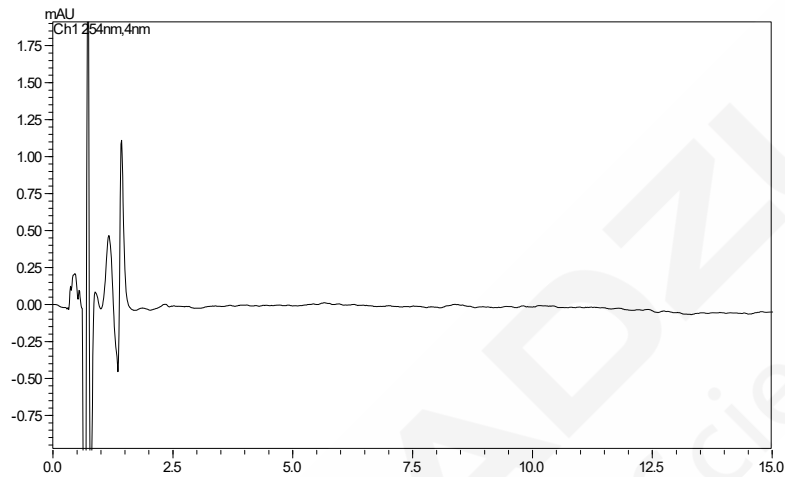


图6. 空白溶剂（甲醇）色谱图

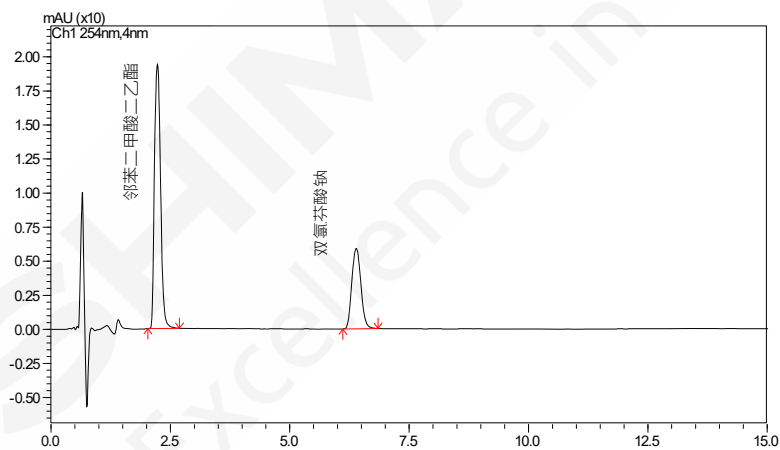


图7. 对照溶液色谱图

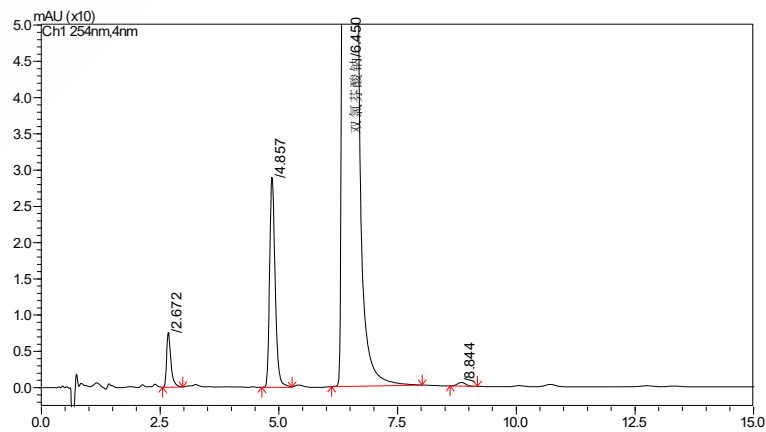


图8. 分离度溶液色谱图

### 3.3 标准曲线

对于未知杂质,用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的线性及范围。按 1.2 中的分析条件进行测定,以浓度为横坐标,峰面积比为纵坐标,采用外标法建立标准曲线,结果如图 9 所示,双氯芬酸钠在 0.1-10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性浓度范围内,线性相关性良好,相关系数为 0.9996,具体结果见表 2。

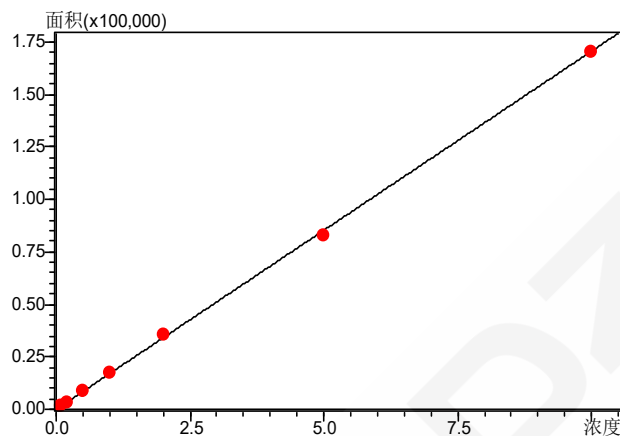


图 9. 双氯芬酸钠标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	线性方程	相关系数 r	准确度%
双氯芬酸钠	0.1-10.0	$Y = (17064.5)X + (-13.8032)$	0.9996	96.9-103.5

### 3.4 检测限和定量限

对于未知杂质,用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的检测限及定量限。根据 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  双氯芬酸钠标准溶液数据,计算检出限 ( $S/N=3$ , LOD 表示)、定量限 ( $S/N=10$ , LOQ 表示),色谱图如图 10 所示,结果如表 3 所示。

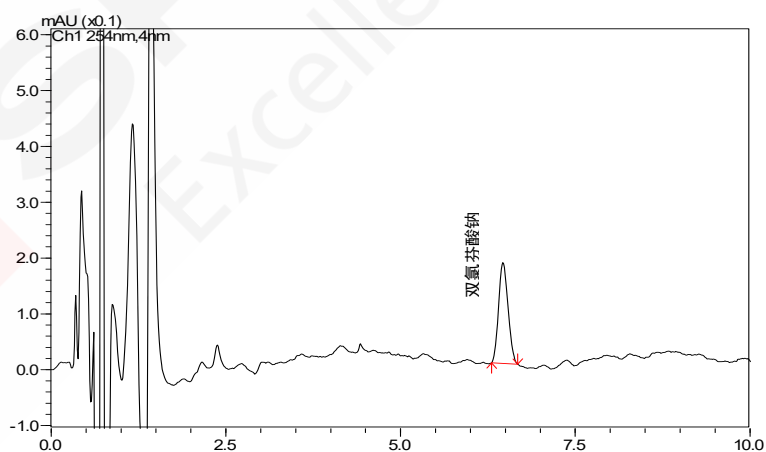


图 10. 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液色谱图

表 3. 检测限和定量限测定结果

化合物	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	信噪比	LOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
双氯芬酸钠	0.103	20.16	0.015	0.051

### 3.5 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.1、0.5 和 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的双氯芬酸钠对照品溶液分别连续进样测定 6 次，结果见表 4。双氯芬酸钠的保留时间 RSD 为 0.040~0.071%；峰面积 RSD 为 0.191~1.621%。结果表明 Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的稳定性。

表 4. 双氯芬酸钠对照品溶液精密度的结果 (n=6)

NO.	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	6.466	1,829	6.476	8,102	6.48	82,799
2	6.465	1,749	6.481	8,110	6.476	82,492
3	6.467	1,759	6.484	8,272	6.473	82,580
4	6.471	1,775	6.482	8,244	6.472	82,435
5	6.475	1,799	6.481	8,115	6.474	82,517
6	6.476	1,772	6.483	8,388	6.474	82,335
平均值	6.47	1,781	6.481	8,205	6.475	82,526
RSD(%)	0.071	1.621	0.040	1.413	0.044	0.191

### 3.6 样品测定

按照 1.2 分析条件测定，精密量取供试品溶液与对照溶液分别注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰，除邻苯二甲酸二乙酯峰和其之前的色谱峰外，在相对保留时间 1.2~1.3 处的杂质峰（杂质 III），其峰面积乘以 0.5 后不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积 (0.5%)，其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积 (0.5%)，各杂质峰面积的和（杂质 III 按校正后的峰面积计）不得大于对照溶液双氯芬酸峰面积的 2 倍 (1.0%)。

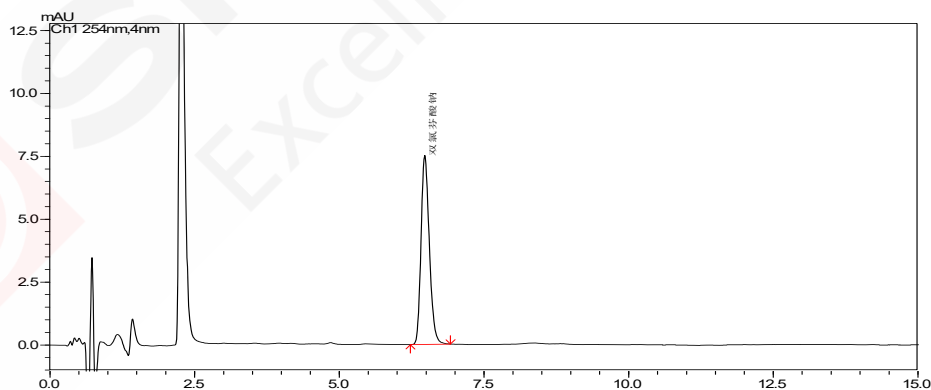


图 11. 对照溶液色谱图

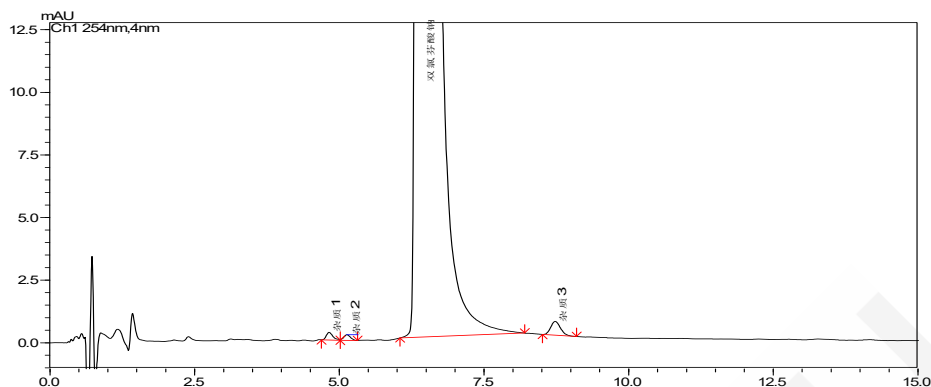


图 12. 供试品溶液色谱图

表 5. 样品杂质测定结果

	保留时间	峰面积	杂质含量 (%)
对照溶液主峰	6.473	75260	-
杂质 1	4.824	2497	0.017
杂质 2	5.131	1694	0.011
杂质 3	8.732	6455	0.021
总杂质	-	-	0.049

#### 4. 结论

本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，参照《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项，建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质的测定方法。对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中，采用 Co-injection 功能，相较标准进样模式可以获得更高的柱效及分离度；系统适用性试验，空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰，分离度溶液测试结果满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性范围内线性良好，相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.051  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密度实验中，双氯芬酸钠的保留时间 RSD% 为 0.040~0.071%；峰面积 RSD% 为 0.191~1.621%，仪器精密度良好。采用主成分自身对照法对杂质进行定量，供试品中单个杂质均小于 0.5%，并且总杂质小于 1.0%，结果符合药典要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

# 采用加校正因子主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质

**摘要：**本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了加校正因子的主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质的方法。该方法中，依那普利及其有关物质在 0.1-50.0 mg/L 线性范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999；依那普利及其有关物质保留时间 RSD%为 0.06~0.24%，峰面积 RSD%为 0.03~1.28%，稳定性良好；依那普利拉（杂质 I）、依那普利双酮（杂质 II）校正因子分别为 0.85 和 0.94，加校正因子的主成分自身对照法和不加校正因子的主成分自身对照法测得结果无显著性差异。实验结果表明，该方法能快速准确地测定马来酸依那普利片的有关物质。

**关键词：**Nexera LC-40 校正因子 主成分自身对照法 有关物质

马来酸依那普利片是临床上常用于抗高血压的血管紧张素酶抑制剂，其主要降解产物为依那普利拉和依那普利双酮。按照2020年版《中国药典》（第二部）马来酸依那普利片检查项下限度要求，使用岛津Nexera LC-40高效液相色谱仪对马来酸依那普利片有关物质进行测定。

随着对杂质研究的逐渐深入，研究人员越来越倾向于对已知杂质采用外标法或加校正因子的主成分自身对照法定量。本实验使用了加校正因子主成分自身对照法计算依那普利拉（杂质I）和依那普利双酮（杂质II）的量，以提高定量结果的准确性。

本实验使用 Nexera LC-40 高效液相色谱仪建立了加校正因子的主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质的方法，该系统具有稳定性良好、结果准确度高的特点，适用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器	: SCL-40	自动进样器	: SIL-40C XR
柱温箱	: CTO-40C	输液泵	: LC-40B XR
脱气机	: DGU-405	二极管阵列检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.99		

### 1.2 分析条件

色 谱 柱	: Shim-pack GIST C8 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2 μm; 岛津 (上海) 实验器材有限公司; P/N: 227-30160-04)
流 动 相 A	: 磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 用磷酸调 pH 值为 2.2)
流 动 相 B	: 乙腈
流 速	: 0.4 mL/min
柱 温	: 50°C

检测波长：215 nm  
进样体积：20  $\mu$ L  
洗脱方式：等度洗脱，B相浓度为 25%

## 2. 样品前处理

参照 2020 年版《中国药典》（第二部）马来酸依那普利检查项下有关物质溶液制备方法配制。

系统适用性溶液：取马来酸依那普利及依那普利拉（杂质 I）、依那普利双酮（杂质 II）对照品各 10 mg，精密称定，分别置 100 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀作为对照品储备液。精密量取上述三种对照品储备液各 2 mL，置同一 10 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性试验溶液。

对照品溶液：精密量取马来酸依那普利及依那普利拉（杂质 I）、依那普利双酮（杂质 II）对照品储备液各 2 mL，置同一 100 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度。

供试品溶液：精密称取本品细粉适量（相当于马来酸依那普利 10 mg），置 5 mL 量瓶中，加流动相超声溶解并稀释至刻度。

对照溶液：精密量取供试品溶液 3 mL 置 100 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 色谱图

取 2 中的系统适用性溶液及对照品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，色谱图如图 1~2 所示。系统适用性结果见表 1。结果表明，所有化合物系统适用性试验结果符合 2020 年版《中国药典》（第四部）通则 0512 高效液相色谱法规定。

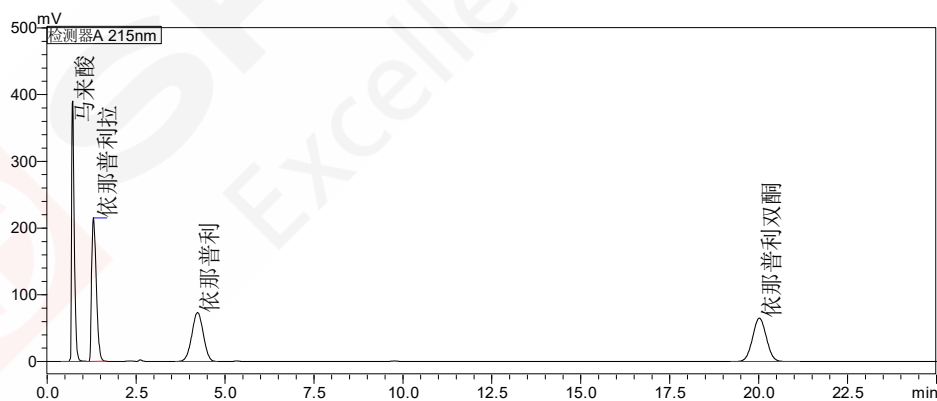


图 1. 系统适用性溶液色谱图 (20.0 mg/L)

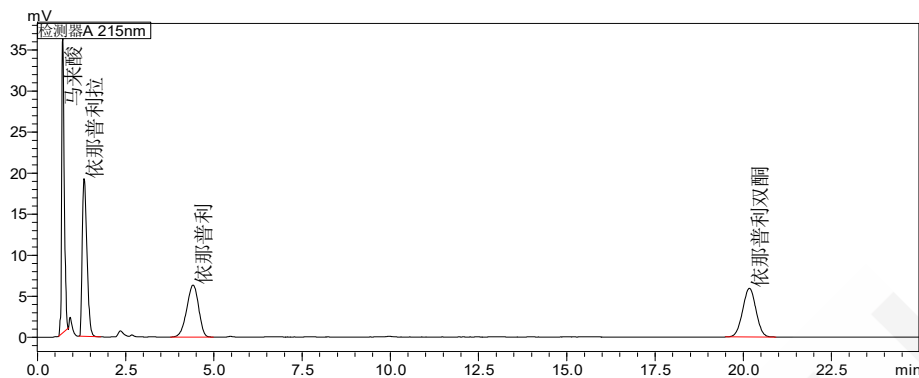


图 2. 对照品溶液色谱图 (2.0 mg/L)

表 1. 依那普利及其有关物质灵敏度结果

化合物名称	分离度	拖尾因子
依那普利拉 (杂质 I)	2.945	1.085
依那普利	6.878	0.994
依那普利双酮 (杂质 II)	23.930	1.029

### 3.2 线性范围

配制依那普利及其有关物质系列浓度混合工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 3 所示，依那普利及其有关物质在 0.1-50.0 mg/L 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999，具体结果见表 2。

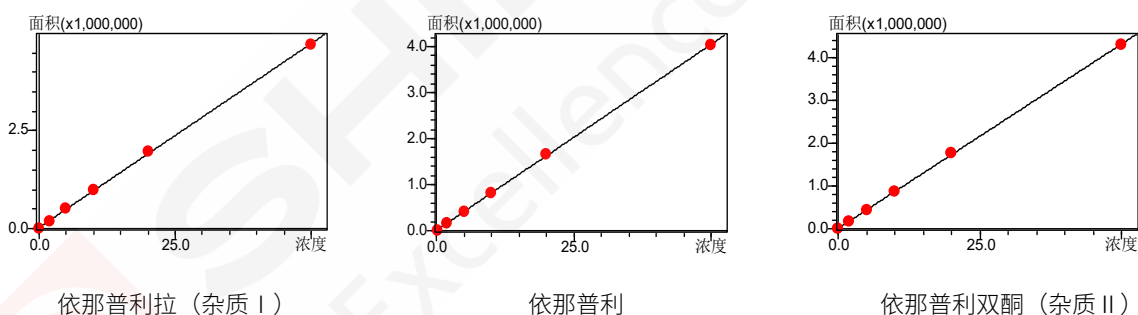


图 3. 依那普利及其有关物质标准曲线图

表 2. 标准曲线参数

化合物名称	线性方程	线性范围 (mg/L)	相关系数 r	准确度 (%)
依那普利拉 (杂质 I)	$Y = 96194.9X + (-250.220)$		0.9997	93.5-104.8
依那普利	$Y = 81667.0X + (-916.219)$	0.1-50.0	0.9999	97.0-102.9
依那普利双酮 (杂质 II)	$Y = 86680.7X + (-1717.01)$		0.9999	96.5-102.4

### 3.3 精密度

取混合工作标准溶液 (0.1 mg/L、5.0mg/L、20.0 mg/L) 连续进样 6 次，考察仪器精密度，结果如表 3，依那普利及其有关物质保留时间 RSD%为 0.06~0.24%，峰面积 RSD%为 0.03~1.28%，仪器精密度良好。

表 3. 精密度结果 (n=6)

化合物名称	0.1 mg/L		5.0 mg/L		20.0 mg/L	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
	RSD(%)	RSD(%)	RSD(%)	RSD(%)	RSD(%)	RSD(%)
依那普利拉 (杂质 I)	0.06	0.41	0.05	0.04	0.14	0.04
依那普利	0.11	0.81	0.10	0.05	0.24	0.04
依那普利双酮 (杂质 II)	0.13	1.28	0.12	0.05	0.15	0.03

### 3.4 灵敏度

按照 1.2 分析条件测定, 混合标准工作溶液中最低点 0.1 mg/L 计算仪器灵敏度, 通过 LabSolutions 软件计算仪器检测限及定量限, 结果见表 4。

表 4. 依那普利及其有关物质灵敏度结果

化合物名称	检测限 LOD( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 LOQ( $\mu\text{g/L}$ )
依那普利拉 (杂质 I)	1.15	3.82
依那普利	3.71	12.36
依那普利双酮 (杂质 II)	4.27	14.24

### 3.5 方法回收率

取已知两种杂质含量的供试品, 分别精密加入相当于两种杂质含量的 80%、100%与 120% 的杂质对照品, 按 2 中供试品溶液的制备进行样品前处理, 制备低、中、高 3 种浓度的溶液, 进样测定, 回收率测定结果见表 5。依那普利拉 (杂质 I) 的平均回收率为 97.7%, 依那普利双酮 (杂质 II) 的平均回收率为 95.4%。

表 5. 回收率结果考察 (n=4)

化合物名称	低浓度 (80%)	中浓度 (100%)	高浓度 (120%)
依那普利拉 (杂质 I)	93.1%	92.0%	108.0%
依那普利双酮 (杂质 II)	92.4%	95.6%	98.3%

### 3.6 校正因子的计算

以 3.2 中标准曲线所得的依那普利和依那普利拉 (杂质 I)、依那普利双酮 (杂质 II) 的线性方程斜率计算依那普利的两种杂质相对于依那普利的校正因子 (f),  $f = k_{\text{依那普利}} / k_{\text{杂质}}$ , 结果见表 6。杂质 I 与杂质 II 的相对校正因子分别为 0.85 和 0.94。根据杂质研究相关技术指导原则<sup>[4]</sup>, 为确保杂质测定结果的准确可靠, 一般情况下, 校正因子在 0.9~1.1 时可不予校正, 直接采用不加校正因子的自身对照法定量; 超出该范围, 须用加校正因子的主成分自身对照法, 以保证杂质定量的准确性。

表 6. 马来酸依那普利片有关物质的校正因子

化合物名称	校正因子
依那普利拉 (杂质 I)	0.85
依那普利双酮 (杂质 II)	0.94

### 3.7 有关物质测定结果

按 1.2 中的分析条件进行测定，供试品溶液色谱图如图 4 所示，对照溶液色谱图如图 5 所示，有关物质测定结果见表 7。结果表明，两种杂质测定结果符合 2020 年版《中国药典》（第二部）马来酸依那普利片检查项下有关物质规定。

2020 年版《中国药典》（第二部）马来酸依那普利片检查项下有关物质规定：供试品溶液色谱图中如有杂质峰，依那普利（杂质 I）峰面积不得大于对照溶液中依那普利峰面积的 1.5 倍（1.5%），依那普利双酮（杂质 II）峰面积不得大于对照溶液中依那普利峰面积（1.0%），其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液中依那普利峰面积的 0.5 倍（0.5%），各杂质峰面积的和不得大于对照溶液中依那普利峰面积的 3 倍（3.0%）。

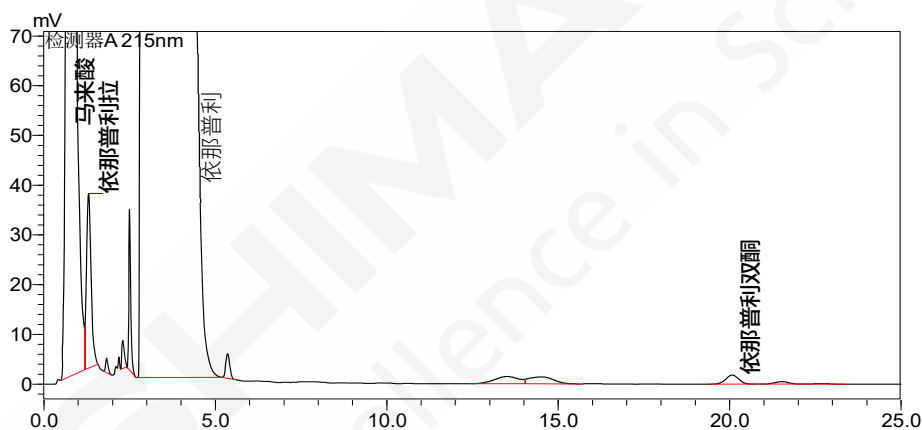


图 4. 供试品溶液色谱图

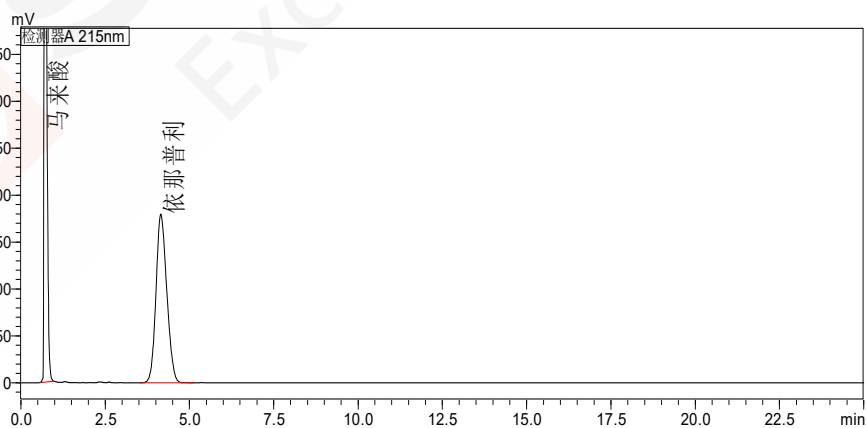


图 5. 对照溶液色谱图

表 7. 马来酸依那普利片有关物质测定结果

化合物名称	杂质峰面积与对照品溶液中依那普利峰面积的倍数 (加校正因子主成分自身对照法)	杂质峰面积与对照品溶液中依那普利峰面积的倍数 (不加校正因子主成分自身对照法)	标准要求 (不得大于对照溶液中依那普利峰面积的倍数)
依那普利拉 (杂质 I)	0.07	0.08	≤1.5
依那普利双酮 (杂质 II)	0.01	0.01	≤1.0
其他单个杂质峰	/	0.004	≤0.5
	/	0.007	
	/	0.03	
	/	0.01	
	/	0.02	
	/	0.02	
	/	0.003	
各杂质峰之和	/	0.18	≤3.0

#### 4. 结论

本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 参照 2020 年版《中国药典》(第二部) 马来酸依那普利片检查项下有关物质测定, 建立了加校正因子的主成分自身对照法测定马来酸依那普利片有关物质的方法。结果表明, 依那普利的有关物质依那普利拉(杂质 I) 和依那普利双酮(杂质 II) 使用了加校正因子主成分自身对照法进行测定, 提高了定量结果的准确性。本实验使用了岛津 Nexera LC-40 超高效液相色谱仪, 其稳定性良好、结果准确度高; 各峰分离度、重复性良好, 与药典方法相比节省了一半以上的流动相用量。该方法为现行检测方法的完善提供了数据支持, 并为制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作提供了参考。

## 二维液相色谱法用于碘帕醇对映异构体杂质的定量分析

**摘要：**本实验以岛津 Prominence HPLC 为基础构建二维液相色谱系统，用于建立碘帕醇对映异构体杂质的定量分析方法。该系统使用手性色谱柱为一维分离手段，实现碘帕醇对映异构体的初步分离，后经目标峰捕集再对 R-碘帕醇进行反相 C18 色谱分析，可显著改善由于手性拆分分离导致的色谱峰展宽问题，从而提高检测灵敏度，实现微量异构体杂质的定量分析。本实验在 20 分钟内完成碘帕醇的二维色谱的分离，分析结果显示，R-碘帕醇在 1~125 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  在 0.999 以上，准确度在 96~105% 之间。

**关键词：** Prominence HPLC 二维液相 碘帕醇 定量分析

碘帕醇是一种医用造影剂，广泛用于神经、血管、关节等组织及器官的影像学辅助检查，其化学名为(S)-N, N'-双[2-羟基-1-(羟甲基)乙基]-5-[(2-羟基-1-氧化丙基)氨基]-2, 4, 6-三碘-1, 3-苯二甲酰胺。碘帕醇含有一对手性异构体，R-构型碘帕醇由于会导致注射液黏度增大而引发不良反应，因此控制 R-碘帕醇的含量是碘帕醇注射液质量控制的关键步骤。

目前单独使用手性色谱法拆分碘帕醇的异构体时存在由于柱效不高导致的检测灵敏度差等问题，碘帕醇的分子结构提示其可在反相色谱上有良好保留，因此考虑构建手性色谱体系和反相色谱体系的二维液相色谱系统，对已获分离的异构体杂质再次进行反相色谱分离以提高检测的灵敏度。

### 1. 实验条件

#### 1.1 仪器

Prominence HPLC 二维液相色谱系统，具体配置为：LC-20AD×3（输液泵），DGU-20A5（在线脱气机），SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱，含 FCV-36AH 流路切换阀），SPD-20A（紫外检测器），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver5.86（色谱工作站）。

#### 1.2 样品信息

称取一定量碘帕醇样品及 R-碘帕醇样品，加纯水溶解并稀释至 250 mg/L。R-碘帕醇样品溶液用纯水稀释成 125.0、50.0、25.0、10.0、2.5.0、2.0 和 1.0 mg/L 系列工作液，进样 2  $\mu$ L 进行二维液相色谱分析。

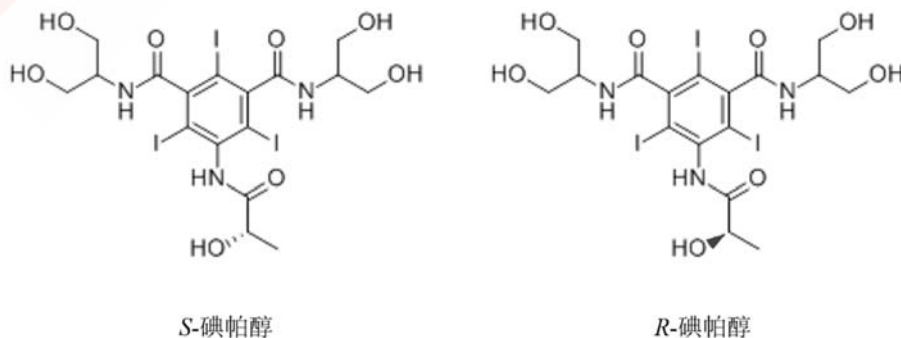


表 1 化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	S-碘帕醇	S-lopamidol	62883-00-5	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
2	R-碘帕醇	R-lopamidol	-	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>

### 1.3 分析条件:

色 谱 柱 1 : Daicel CHIRALPAK MA (+) 4.6 mm ID.×50 mm L., 3 μm

捕 集 柱 : 反相 C18 4.6 mm ID.×30 mm L., 5 μm

色 谱 柱 2 : 反相 C18 4.6 mm ID.×150 mm L., 5 μm

流 动 相 1 : 1 mM CuSO<sub>4</sub>水溶液 流 速: 0.5 mL/min

流 动 相 2 : A-水; B-MeOH 流 速: 0.8 mL/min

柱 温 : 30°C 检 测 波 长: 240 nm

进 样 量 : 2 μL

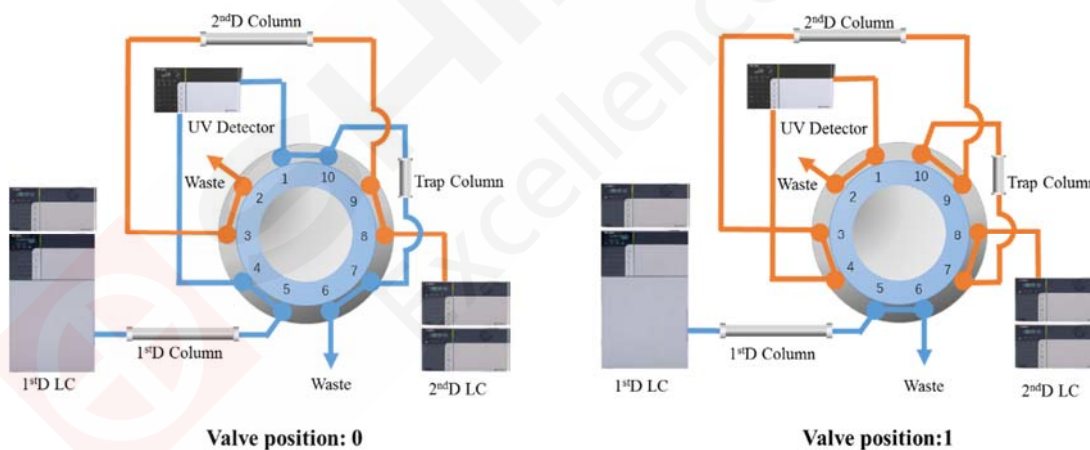
洗 脱 方 式 : 1<sup>st</sup>D LC 等度洗脱;

2<sup>nd</sup>D LC 梯度洗脱:

1%B(0-12.5 min)-80%B(16.5-17.5 min)-1%B(18.5-21.5 min)

## 2. 结果与讨论

### 2.1 二维液相系统流路图



该系统中使用 FCV-36AH 二位十通阀以两个流路、三个色谱柱之间的切换和协同作用来实现目标物质 R-碘帕醇的手性分离—捕集—反相分离的过程。FCV-36AH 耐压高达 100 MPa, 内部体积仅有 0.3 μL, 适用于包括 UHPLC 在内的液相色谱系统, 安装于 CTO-20A\20AC 或 CTO-30A 柱温箱内, 通过 LabSolutions 工作站软件进行控制, 便捷可靠。

### 2.2 1<sup>st</sup>D LC分离

1<sup>st</sup>D LC 是以 Chiralpak MA (+) 色谱柱和硫酸铜溶液为流动相的手性分离体系, 该系统建议的硫酸铜溶液浓度在 0.1~2 mM 之间, 离子浓度增大会缩短 R/S-碘帕醇的保留时间并降低分离度, 因

此从高效和实用考虑,使用硫酸铜溶液浓度为 1 mM。在该条件下, R/S-碘帕醇分离结果如下所示。

通过分离结果可以看到,该手性分离体系能在 20 min 内实现碘帕醇两种构型的手性分离,但和多数液相手性分离的色谱行为相似,存在柱效较低的缺点,因此在定量分析中对于含量较低的待测物的检出存在不足。

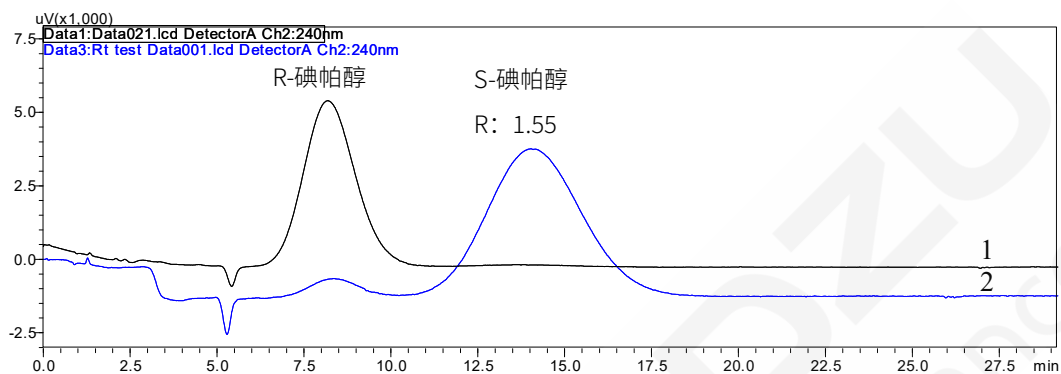


图 1 250 mg/L 浓度的 R-碘帕醇样品溶液 (1)和 S-碘帕醇样品溶液(2) 的 1<sup>st</sup>D LC 色谱图

### 2.3 捕集能力的考察

经过 1<sup>st</sup>D LC 分离的 R-碘帕醇在后续会导入 2<sup>nd</sup>D LC 进行反相色谱分离以提高响应灵敏度,待测物从 1<sup>st</sup>D LC 到 2<sup>nd</sup>D LC 的切换间使用反相填料的色谱柱进行捕集。考察了规格为 2.1 mmID.×10 mmL和 4.6 mmID.×30 mmL的两款反相色谱柱捕集效果。实验结果表明,4.6 mmID.×30 mmL的反相色谱柱可以实现化合物大于 1 min 的保留,即能使目标化合物的合理捕集,又不对后续 2<sup>nd</sup>D LC 的分离产生影响。在切阀时间的考察上,分别测试了运行时间为 9.0、9.5、10.0、11.0 min 时进行阀切换后目标物 R-碘帕醇峰面积的变化,结果表明 10.0 min 时切阀可以保证目标峰响应最好并能使得总分析时间最短,同时亦表明所选 4.6 mmID.×30 mmL的反相色谱柱可以用于该样品的捕集。

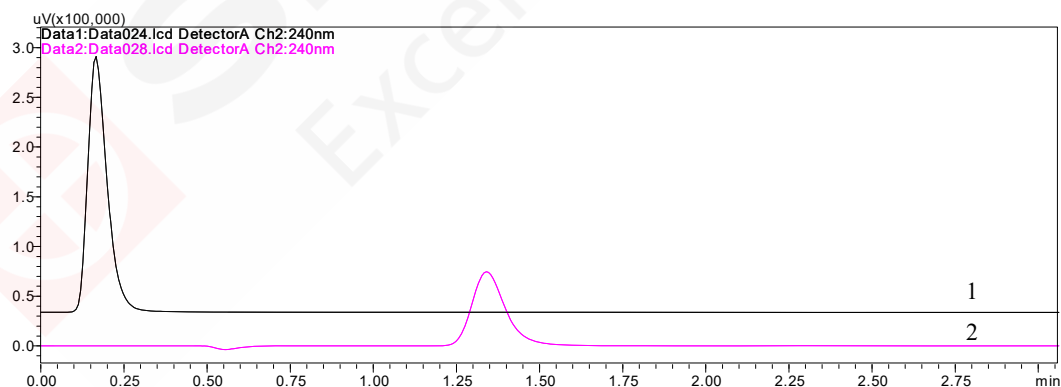


图 2 R-碘帕醇样品在 1<sup>st</sup>D LC 流动相条件下在两种捕集柱上的保留效果  
(1- 2.1 mmID.×10 mmL.捕集柱; 2- 4.6 mmID.×30 mmL 捕集柱)

### 2.4 2<sup>nd</sup>D LC 分离

经过捕集的 R-碘帕醇导入 2<sup>nd</sup>D LC 后经过反相色谱分离,无保留的硫酸铜在高比例水相中快速流出色谱柱,待硫酸铜流出后 R-碘帕醇在梯度条件下于 16.3 min 左右洗脱。

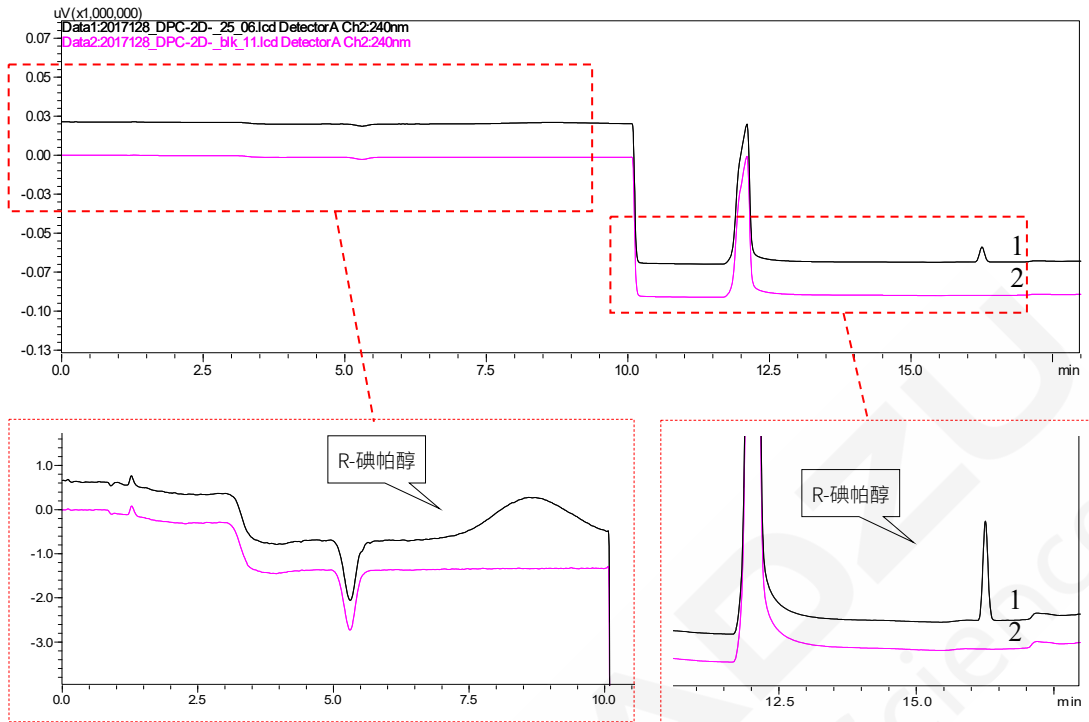


图3 浓度为 25 mg/L 的 R-碘帕醇样品溶液(1)和溶剂空白溶液(2)的 2D LC 分析色谱图

## 2.5 灵敏度

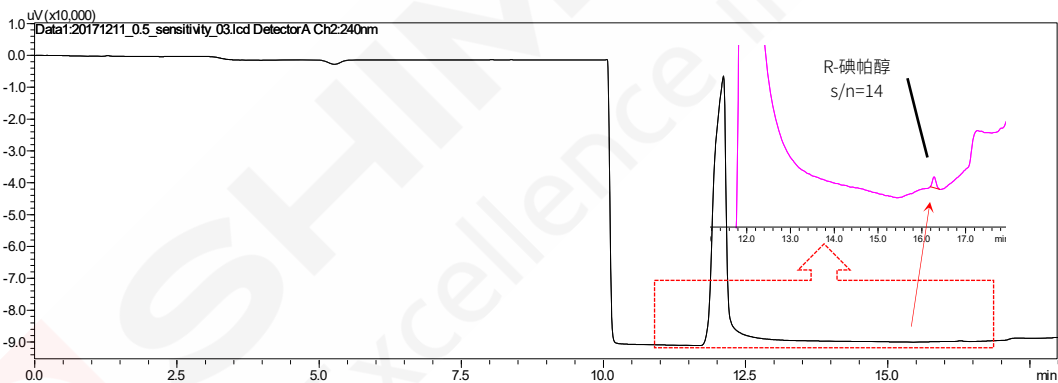


图4 浓度为 0.5 mg/L 的 R-碘帕醇溶液 2D LC 分析色谱图

浓度为 0.5 mg/L 的 R-碘帕醇溶液在二维液相色谱上的分离效果如上图所示，7.5-10 min 为 1<sup>st</sup>D LC 的色谱行为，该处无明显色谱峰；16.7 min 处为经过捕集后的 R-碘帕醇在 2<sup>nd</sup>D LC 上的分离结果，S/N 为 14，满足定量分析对定量下限的一般要求。同手性分离的 1<sup>st</sup>D LC 结果相比（图 6），经过二维液相色谱分离的 R-碘帕醇灵敏度较之有 10 倍的提升。

## 2.6 线性

取 R-碘帕醇适量，以纯水溶解并逐级稀释使成为浓度分别为 125、50、25、10、2.5、2、1 mg/L 的系列标准溶液进样分析，标准曲线及相关信息表明在 1~125 mg/L 浓度范围内，R-碘帕醇经二维液相色谱分析线性良好，回归系数为 0.9997，各校准点准确度在 97.8~102.3%之间。

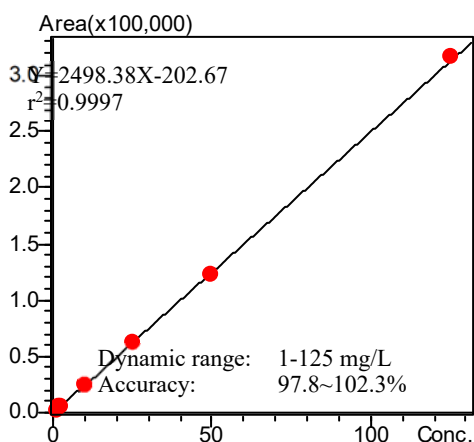


图 5 R-碘帕醇样品溶液 2D LC 分析标准曲线

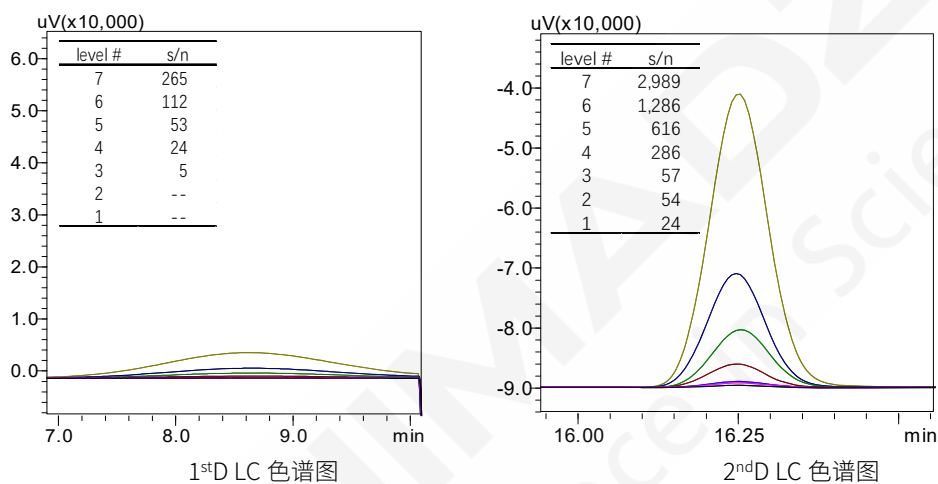


图 6 各校准点色谱图及信噪比

## 2.7 重复性和准确度

以浓度分别为 2.0 和 50.0 mg/L 的 R-碘帕醇溶液测试系统和分析方法的稳定性，通过保留时间和峰面积的重复性及测试样品的回收率来表征，结果表明该系统及方法重复性和准确度良好。

表 2 R-碘帕醇样品溶液 2D LC 分析重复性结果

#	浓度 (mg/L)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	回收率 (X%±SD)
1	2.0	0.03	0.79	104.6±0.4
2	50.0	0.04	0.40	102.5±0.4

## 2.8 样品分析及加标回收率

称取一定量碘帕醇样品以纯水溶解并稀释使浓度为 0.25 g/L，进样 2 μL 测定样品中 R-碘帕醇浓度如表 3 所示。另取相同浓度碘帕醇样品 6 份，分两组并分别加入一定量 R-碘帕醇后计算加标回收率，结果如表 3 所示。

表 3 样品测定结果和加标回收率测定结果

#	加标量	测得浓度	加标回收率	RSD (n=3)
样品	-	19.4 mg/L	-	0.9%
加标样品 1	13.68 mg/L	33.5 mg/L	103%	0.3%
加标样品 2	17.10 mg/L	37.6 mg/L	105%	0.8%

### 3. 结论

本文研究了使用 Prominence HPLC 构建二维液相色谱系统用于造影剂碘帕醇及其手性杂质的分离及定量分析方法的建立。二维液相色谱的使用弥补手性色谱柱效不足的缺点，既获得两种异构体的有效分离，又在经过反相色谱分离中获得良好响应。以此建立的二维液相分析方法可在 20 min 内完成 R/S-碘帕醇的分离和分析，异构体杂质 R-碘帕醇的定量下限为 0.5 mg/L，其在 1-125 mg/L 浓度范围内线性良好，重复性和回收率满足一般定量分析的需要，可以作为碘帕醇检测中异构体杂质质量控制的方法予以参考。



# 液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用分析头孢替唑钠及其杂质

**摘要:** 本文利用岛津液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF) 对抗生素药物头孢替唑钠杂质进行定性分析。通过一级高分辨质谱信息获得准确分子量并用 Insight Explore 预测分子式, 结合紫外吸收光谱图推测化合物大致发色基团和可能的不饱和度, 将该信息用于分子式的进一步筛选。结合头孢替唑钠[M+H]<sup>+</sup>峰与杂质[M+H]<sup>+</sup>峰的差异, 以及二级碎片信息, 推测可能的杂质结构。将该结构导入 ACD/Labs 软件, 所得碎片与二级质谱匹配, 最终筛选得到可能的杂质结构。

**关键词:** 液相色谱-四极杆飞行时间质谱 Q-TOF 头孢替唑钠 Ceftezole Sodium

药物的质量研究过程中, 常常需要对未知杂质进行定性分析, 常用的鉴定方法为高分辨质谱一级和二级信息。根据ICHQ3A要求, 当原料药最大日剂量大于2 g/天, 杂质的鉴定阈值为0.05%; 当原料药最大日剂量小于等于2 g/天, 则该杂质的鉴定阈值为0.1%。头孢替唑钠 (Ceftezole Sodium), 化学名为6R(反式)-8-氧代-7-[(1H-1-四氮唑基乙酰基)氨基]-3-[[2-(1,3,4-噻二唑基)硫]甲基]-5-硫杂-1-氮杂二环[4,2,0]辛-2-烯-2-羧酸钠盐, 化学式C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>4</sub>S<sub>3</sub>, MW 462.4528, 是由日本藤泽药品公司合成和开发的半合成头孢菌素抗生素, 于1978年4月以Ceolslin的商品名上市销售。由于该药物上市较晚、研究较少, 但由于其显著的临床作用, 生产厂家逐年增加。本文以头孢替唑钠为样品, 介绍岛津Q-TOF LCMS-9030在药物杂质鉴定中应用及相关流程。

## 1. 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

试剂: MS 级乙腈、甲酸, 水为超纯水机制备所得。

样品: 注射用头孢替唑钠

仪器: 快速液相色谱仪 Nexera 系统、四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030。Nexera 系统包括 LC-30AD×2 (输液泵), DGU-20A<sub>5</sub> (在线脱气机), SIL-20ACXR (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SPD-M20A (二极管阵列检测器), CBM-20A (系统控制器)。数据采集和分析由 LabSolutions Ver5.95 (工作站) 完成。质谱碎片结构分析由 ACD/Labs Ver2012 完成。

### 1.2 样品信息

称取 1 mg 样品, 用 1 mL 超纯水溶解, 振摇, 得到浓度为 1 mg/mL 样品溶液, 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤后进样分析。

### 1.3 分析条件

液相条件:

色 谱 柱	: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. ×150 mm L., 2.2 μm
流 动 相	: A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-0.1%甲酸乙腈
流 速	: 0.3 mL/min

柱 温 : 45°C  
检测波长 : 254 nm  
进样体积 : 2 μL  
洗脱方式 : 等度洗脱, A/B=85/15(V/V)

质谱条件 :

离子源: ESI(+)	接口电压: 4.5 kV
雾化气: 3.0 L/min	加热气流量: 10.0 L/min
干燥气流量: 10.0 L/min	接口温度: 300°C
DL 管温度: 250°C	加热块温度: 400°C
校准方法: 外标法校准质量数	一级质谱质量范围: m/z 250-500
二级质谱质量范围: m/z 100-500	CE: 35±17 V

## 2. 结果与讨论

头孢替唑的 LC-UV 图中 (图 1), 峰面积在 0.05%-0.6% 的杂质共 5 个 (杂质 1-5), 这 5 个化合物中, 杂质 1,3,4 和 5 具有较好的 ESI<sup>+</sup>响应, 可获得一级和二级质谱图。杂质 2 在 ESI<sup>+</sup>和 ESI<sup>-</sup>响应均较弱, 需要其他手段鉴定。杂质 6 含量较低, 可通过增加进样量, 并选择仅杂质 6 进入质谱的方式获得完整的一级和二级质谱信息。从[M+H]<sup>+</sup>峰数值和 Insight Explore 推测得分子式可以看到, 杂质 1 和 6, 杂质 3 和 4 为两对同分异构体。杂质 1-6 一级质谱信息如表 1 所示 (杂质 2 未鉴定)。主成分头孢替唑紫外吸收光谱图和裂解规律如图 2 所示。

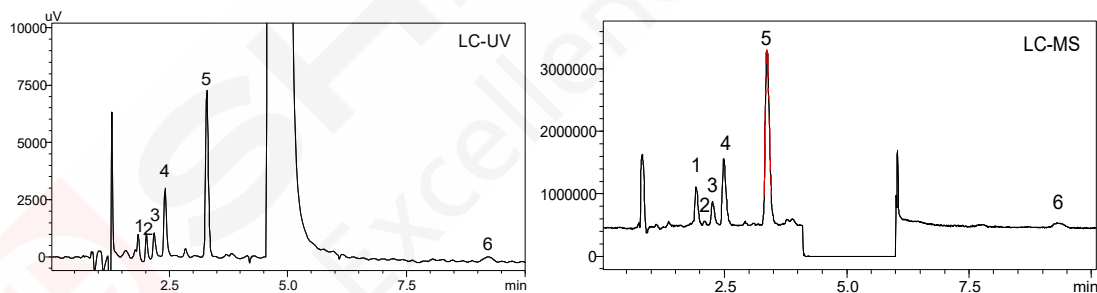


图 1 头孢替唑钠 LC-UV 图 (左) 和 LC-MS 图 (右)

### 2.1 主成分结构信息

根据头孢替唑的一级质谱图获得[M+H]<sup>+</sup>峰信息为 441.02099, Insight Explore 预测得到分子式 C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub>。根据头孢替唑的二级质谱碎片信息, 结合 ACD/Labs 软件, 推得其质谱裂解规律如图 2 所示。

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	99.20	440.014363	441.021640	441.020987	-0.653	C13 H12 N8 O4 S3	[M+H] <sup>+</sup>	-1.4795	99.93
2	99.11	440.013678	441.020954	441.020987	0.033	C20 H12 N2 O6 S2	[M+H] <sup>+</sup>	0.0747	99.02
3	99.07	440.013026	441.020302	441.020987	0.685	C12 H16 N4 O8 S3	[M+H] <sup>+</sup>	1.5528	99.83

## 2.2 杂质1和6的结构鉴定

杂质 1 和杂质 6 的[M+H]<sup>+</sup>峰均为 323.055，Insight Explore 预测得到相同分子式 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sub>0</sub>。杂质 1 和杂质 6 分子离子峰与头孢替唑[M+H]<sup>+</sup>峰分别相差 117.9656 和 117.9654，用 Insight Explore 推测得到相差结构的分子式为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>，推测为头孢替唑丢失含硫氮杂环和 H<sub>2</sub> 所得。杂环丢失并增加双键或形成环的结构有 8 种，如图 3 所示。β-内酰胺环的张力较大，含这种结构的化合物稳定性较差，故排除结构 3-1，3-5 和 3-6。

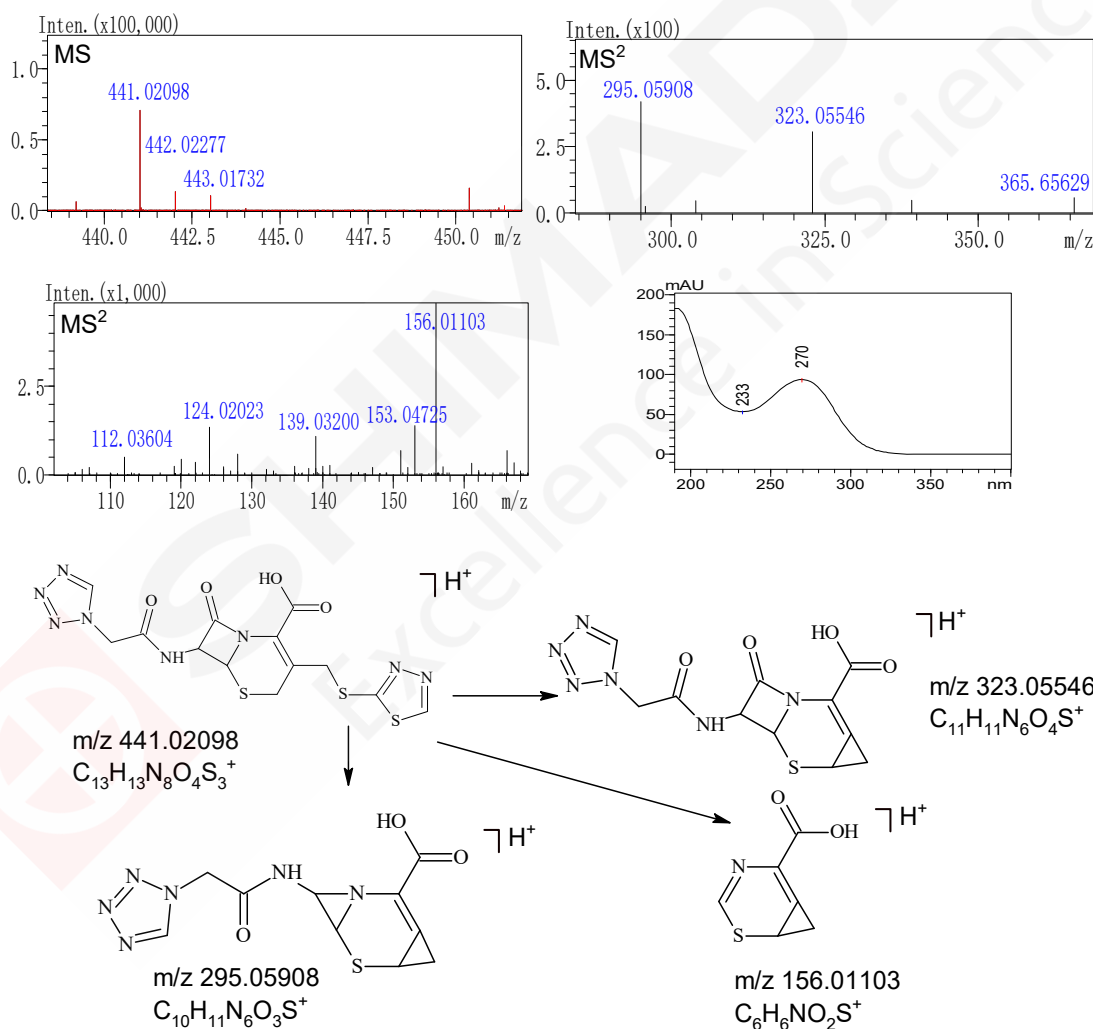


图 2 头孢替唑谱图信息（上）和可能的裂解规律（下）

表 1 样品中杂质的分子式预测结果

名称	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Diff (ppm)	Iso Score
杂质 1	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	M <sup>+</sup>	323.05539	323.05570	-0.9721	94.57
杂质 3	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	457.01650	457.01654	-0.1207	99.16
杂质 4	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	457.01654	457.01654	0.2185	97.74
杂质 5	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	395.01616	395.01599	-0.3827	98.48
杂质 6	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	323.05557	323.05570	-0.4180	83.95

将剩余 5 种结构中分为酰胺化合物和季铵两种类型。杂质 1 紫外吸收光谱图中有一个吸收峰与主成分类似 (255 nm)，而杂质 6 紫外吸收光谱图相对主成分存在明显的红移现象，说明杂质 6 可能有新的共轭体系生成。由于杂质 1 与头孢替唑最大吸收波长相似 (255 nm)，排除有新共轭体系生成的结构 3-8。综合以上信息，杂质 1 可能的结构为 3-2, 3-3, 3-4 和 3-7。杂质 1 的保留明显弱于杂质 6。季铵盐与 C18 残留硅羟基的离子交换作用会增强其在 C18 上离子交换保留，同时季铵基团的形成会增大化合物本身的极性，减少其在 C18 上的疏水保留。两种作用力综合结果通常为季铵盐保留弱于叔胺盐，如小檗碱和二氢小檗碱在 C18 上的保留，作为季铵盐的小檗碱保留弱于作为叔胺盐的二氢小檗碱 (Data was not shown)。因此，结构 1 可能的结构为 3-2 到 3-4。将 3-2 到 3-4 结构导入 ACD/Labs，所得 MS 碎片符合程度最高的为结构 3-3。杂质 1 质谱信息和结构推导如图 4 所示。由于杂质 1 为季铵类化合物，其 M<sup>+</sup>峰与分子量相同，因此杂质 1 分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S。

排除季铵盐，杂质 6 可能的结构为 3-7 和 3-8，根据吸收波长紫移红移规则，结构 3-8 所形成的共轭体系紫外吸收波长最长 (酸、酰胺 β 位共轭+5 nm，延长一个双键共轭+30 nm)，可实现 299 nm 处出现最大吸收。将结构 3-8 导入 ACD/Labs，所得 MS 碎片符合实际测得信息。杂质 6 质谱信息和结构推导如图 5 所示。

Figure 4: Screenshot of ACD/Labs Formula Predictor showing search results for mass 323.055386 (Scan#: 1158). The top result is C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S with a score of 94.67 and a difference of -0.314 mDa.

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	94.67	322.048424	323.055700	323.055386	-0.314	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	-0.9721	94.57
2	76.01	322.047738	323.055015	323.055386	0.371	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.1497	73.94
3	71.07	322.047955	323.055231	323.055386	0.155	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	0.4795	68.07
4	56.77	322.048607	323.055883	323.055386	-0.497	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-1.5384	52.83
5	47.86	322.047772	323.055048	323.055386	0.338	C <sub>3</sub> H <sub>14</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.0458	42.61
6	46.30	322.048241	323.055517	323.055386	-0.131	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-0.4058	40.51
7	42.28	322.048640	323.055917	323.055386	-0.531	C <sub>4</sub> H <sub>18</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	-1.6422	36.79

Figure 5: Screenshot of ACD/Labs Formula Predictor showing search results for mass 323.055565 (Scan#: 5604). The top result is C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S with a score of 85.39 and a difference of -0.135 mDa.

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	85.39	322.048424	323.055700	323.055565	-0.135	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	-0.4180	83.95
2	71.15	322.047738	323.055015	323.055565	0.550	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.7038	68.92
3	63.96	322.047955	323.055231	323.055565	0.334	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.0336	60.48
4	62.91	322.048607	323.055883	323.055565	-0.318	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-0.9843	59.29

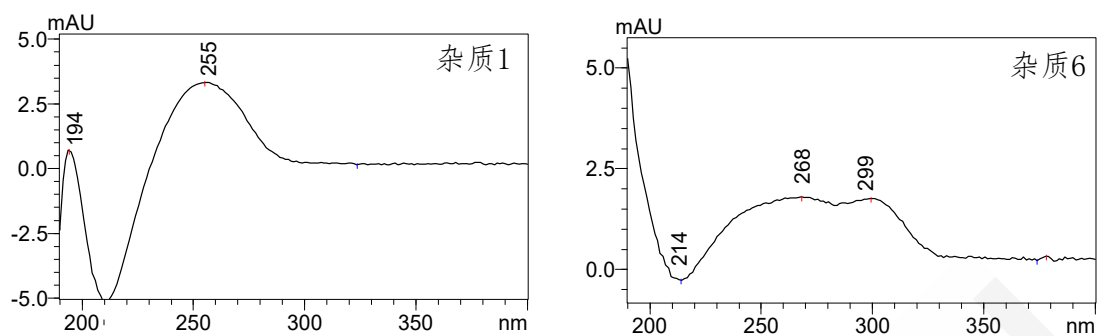


图2 杂质1和杂质6分子式预测(上)紫外吸收光谱图(下)

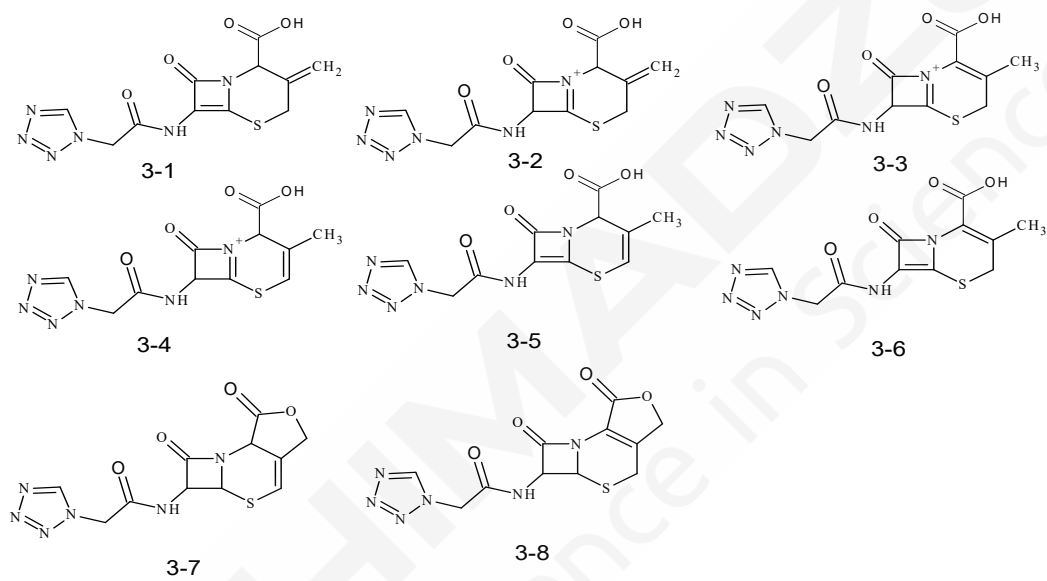


图3 杂质1和6可能的结构

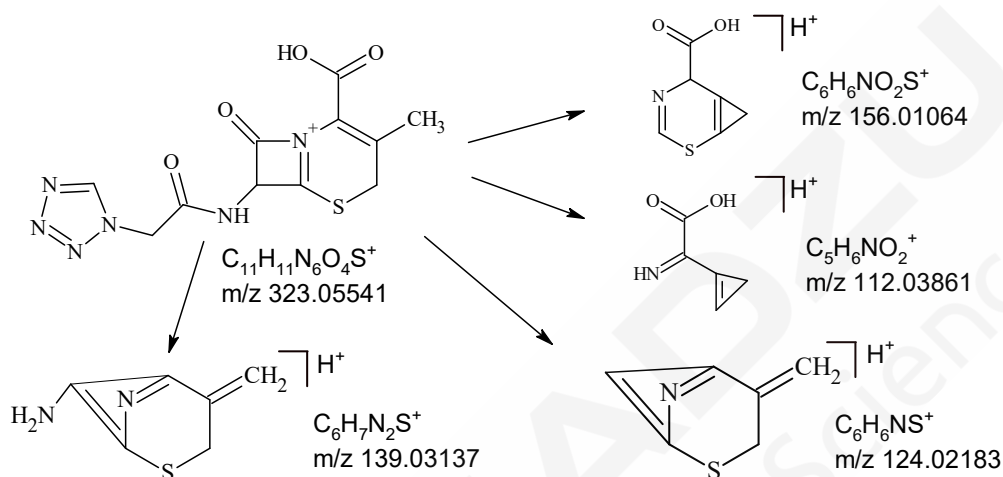
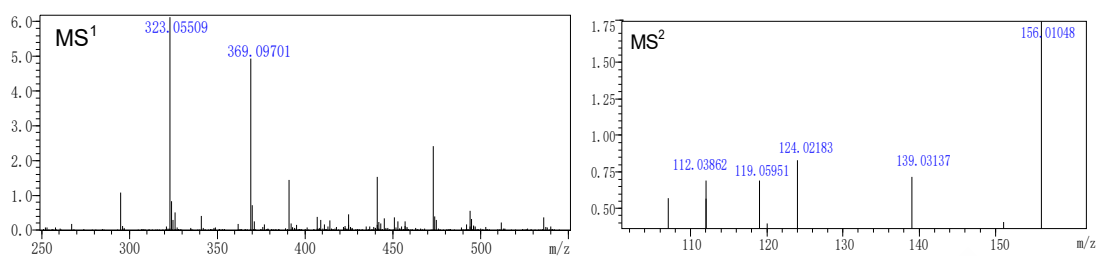


图 4 杂质 1 质谱图 (上) 和可能的裂解规律 (下)

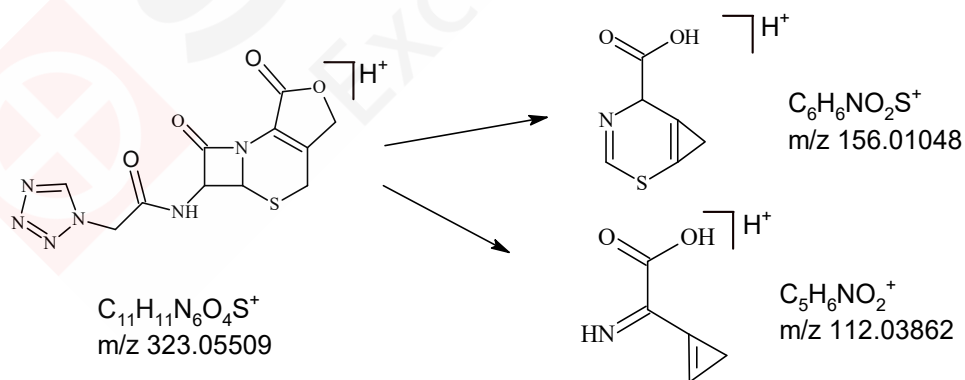
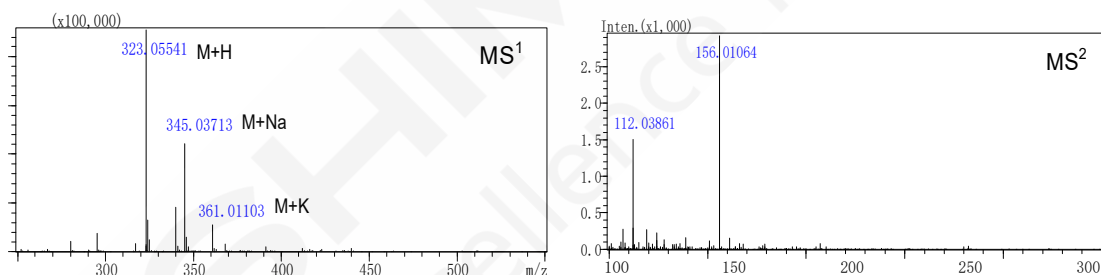


图 5 杂质 6 质谱图 (上) 和可能的裂解规律 (下)

### 2.3 杂质3和杂质4的鉴定

杂质 3 和杂质 4 的  $[M+H]^+$  峰均为 457.0161, Insight Explore 预测得到相同分子式  $C_{13}H_{12}N_8O_5S_3$ 。杂质 3 和杂质 4 的  $[M+H]^+$  峰与头孢替唑  $[M+H]^+$  峰分别相差 15.9955 和 15.9956, 即与头孢替唑相差

一个氧原子，推测为头孢替唑某氢原子被羟基取代所得。

Formula Predictor - 457.016499 - MS(ESI+) Scan#: 1363									
457.016499		Charge: 1							
#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	99.21	456.009278	457.016554	457.016499	-0.055	C13 H12 N8 O5 S3	[M+H] <sup>+</sup>	-0.1207	99.16
2	78.12	456.009061	457.016338	457.016499	0.161	C20 H4 N6 O8	[M+H] <sup>+</sup>	0.3531	75.84
3	72.12	456.008809	457.016085	457.016499	0.414	C13 H20 N4 O4 S5	[M+H] <sup>+</sup>	0.9055	69.47
4	66.95	456.008592	457.015869	457.016499	0.630	C20 H12 N2 O7 S2	[M+H] <sup>+</sup>	1.3792	64.02
5	65.06	456.009461	457.016737	457.016499	-0.238	C21 H16 N2 O2 S4	[M+H] <sup>+</sup>	-0.5209	61.41
6	64.43	456.008490	457.015684	457.016499	0.813	C13 H8 N8 O10 S	[M+H] <sup>+</sup>	1.7705	45.05

Formula Predictor - 457.016654 - MS(ESI+) Scan#: 1500									
457.016654		Charge: 1							
#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	97.89	456.009278	457.016554	457.016654	0.100	C13 H12 N8 O5 S3	[M+H] <sup>+</sup>	0.2185	97.74
2	96.85	456.009061	457.016338	457.016654	0.316	C20 H4 N6 O8	[M+H] <sup>+</sup>	0.6922	96.84
3	73.79	456.008809	457.016085	457.016654	0.569	C13 H20 N4 O4 S5	[M+H] <sup>+</sup>	1.2446	71.54
4	71.63	456.010146	457.017423	457.016654	-0.769	C14 H16 N8 S5	[M+H] <sup>+</sup>	-1.6816	69.43
5	69.14	456.008592	457.015869	457.016654	0.785	C20 H12 N2 O7 S2	[M+H] <sup>+</sup>	1.7183	66.70

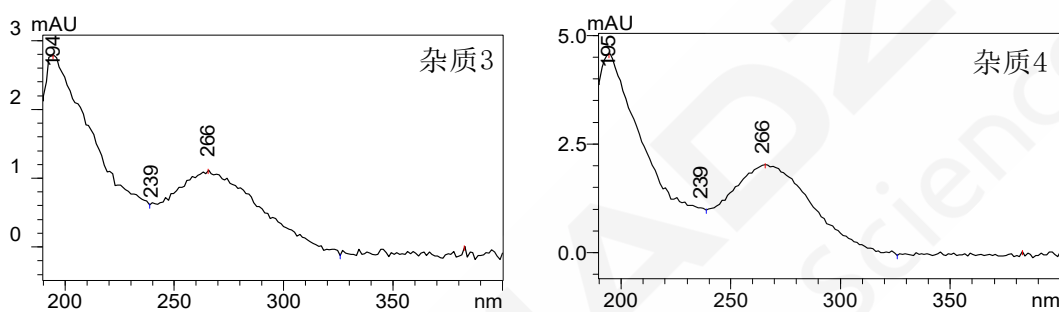


图 6 杂质 3 和杂质 4 质谱图 (上) 和紫外吸收光谱图 (下)

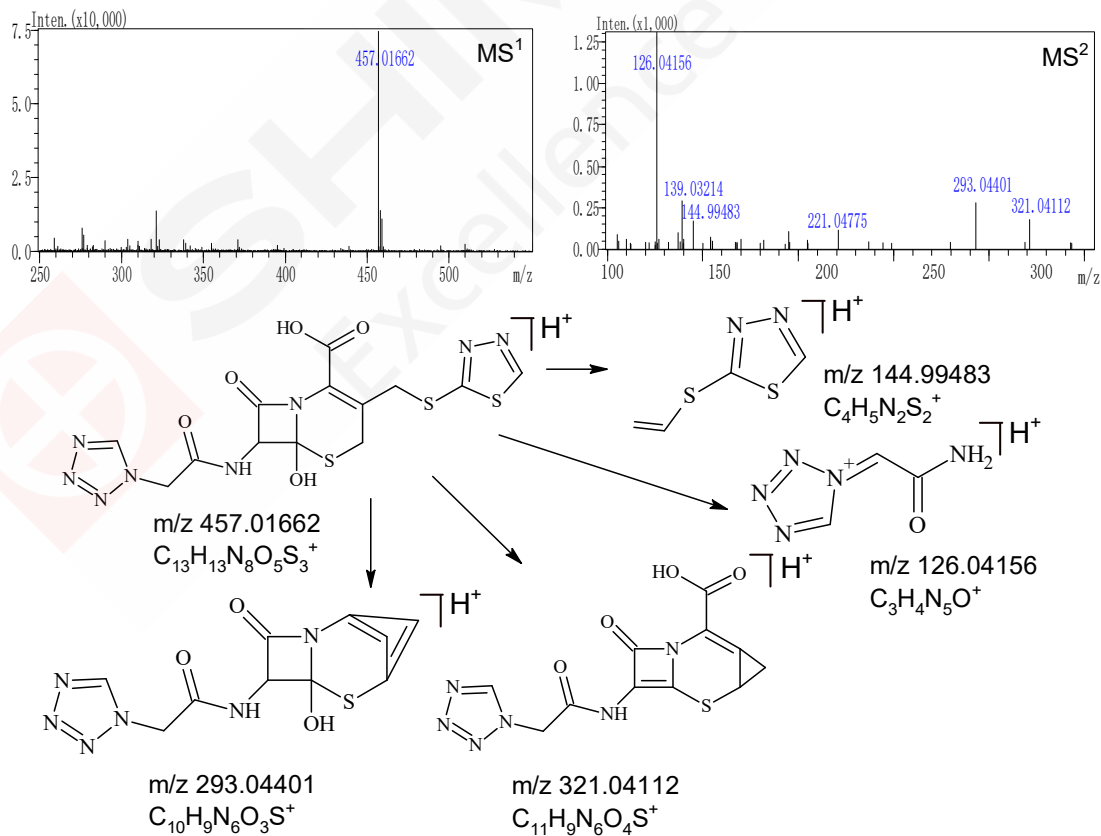


图 7 杂质 3 质谱图 (上) 和可能的裂解规律 (下)

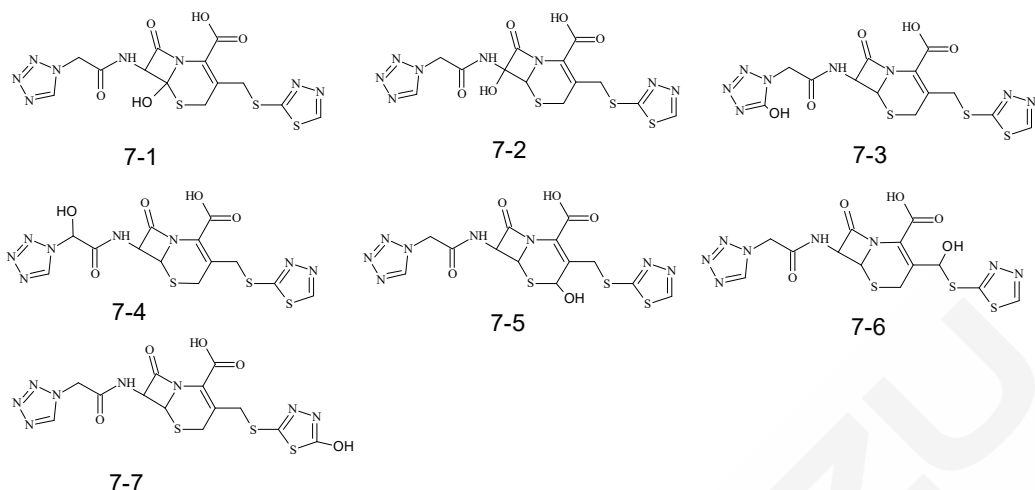


图 8 杂质 3 和 4 可能的结构

头孢替唑某氢原子被羟基取代的结构有 7 种，如图 8 所示。这 7 种结构中分为双键或酰胺键  $\alpha$  位取代（结构 3-7）和非  $\alpha$  位取代（1-2）。双键或酰胺键  $\alpha$  位羟基取代会使得最大吸收波长红移约 15 nm。杂质 3 和 4 与头孢替唑相比紫移 4 nm，推测杂质 3 和 4 可能的结构为图 7 中结构 7-1 和 7-2。将结构 7-1 和 7-2 导入 ACD/Labs，所得 MS 碎片相同且与杂质 3 和 4 所得二级质谱信息吻合。ACD/Lab 预测化合物 logP 值，结构 7-1 和 7-2 的 logP 分别为  $-0.19 \pm 0.86$  和  $0.07 \pm 0.86$ ，根据 C18 疏水保留规律，杂质 3 可能为结构 7-1（图 7），杂质 4 可能为结构 7-2（图 9）。

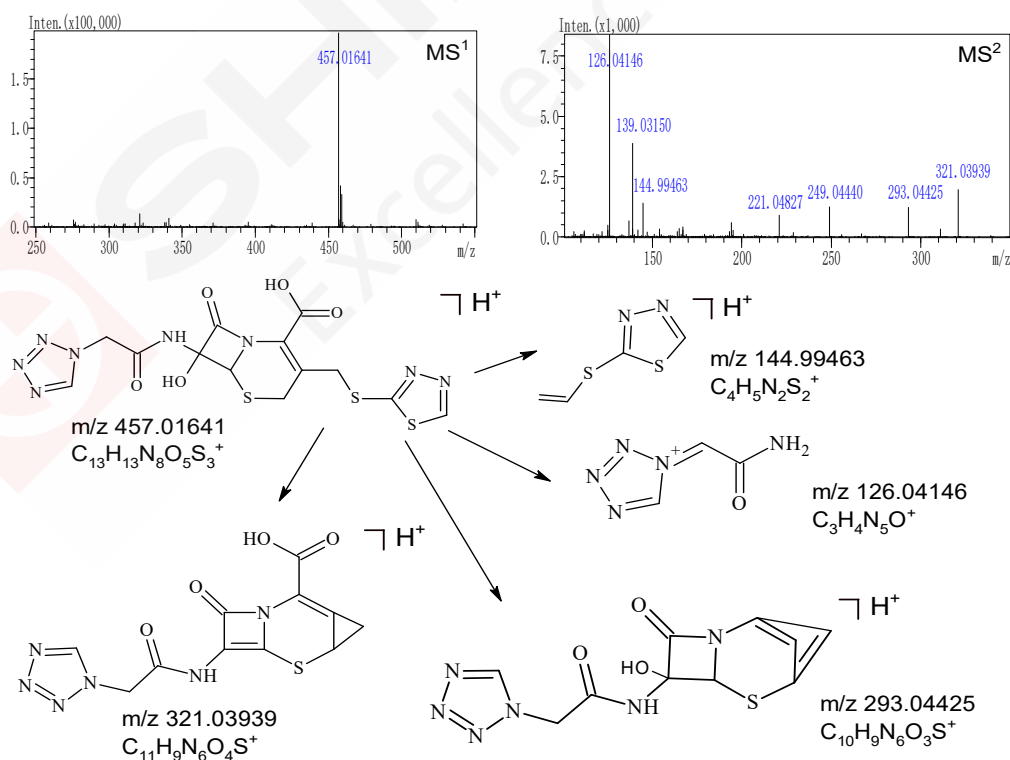


图 9 杂质 4 质谱图（上）和可能的裂解规律（下）

## 2.4 杂质5的鉴定

杂质 5 的[M+H]<sup>+</sup>峰为 395.0160, Insight Explore 预测得到分子式 C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub>。杂质 5 的[M+H]<sup>+</sup>峰与头孢替唑的[M+H]<sup>+</sup>峰相差 46.0050, 即与头孢替唑相差 CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 推测为头孢替唑羧基被 H 取代同时丢失 H<sub>2</sub>。杂质 5 与头孢替唑紫外吸收光谱图相比, 最大吸收紫移 4 nm, 因此新生成的双键与原有双键并非共轭结构, 可能结构如图 10 所示。将图 10 结构导入 ACD/Labs, 所得 MS 碎片与杂质 5 所得二级质谱信息吻合。

Formula Predictor - 395.016009 - MS(ESI+) Scan#: 2063

Charge: 1

#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score
1	98.48	394.008884	395.016160	395.016009	-0.151	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-0.3827	98.48
2	88.24	394.008667	395.015944	395.016009	0.065	C <sub>19</sub> H <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	0.1653	86.99
3	77.30	394.008415	395.015691	395.016009	0.318	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	0.8045	75.17
4	54.47	394.008198	395.015475	395.016009	0.534	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.3525	50.14
5	49.16	394.008232	395.015508	395.016009	0.501	C <sub>4</sub> H <sub>14</sub> N <sub>10</sub> O <sub>4</sub> S <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.2676	44.18
6	47.82	394.008015	395.015292	395.016009	0.717	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	1.8156	43.08
7	45.18	394.009353	395.016629	395.016009	-0.620	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> N <sub>12</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	-1.5699	39.97
8	23.40	394.008850	395.016127	395.016009	-0.118	C <sub>27</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	-0.2978	15.01

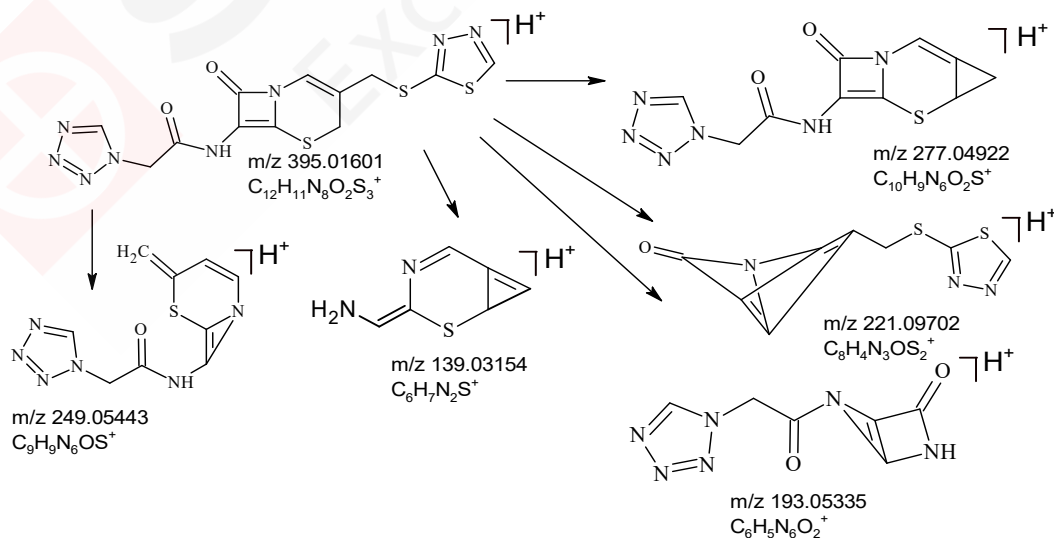
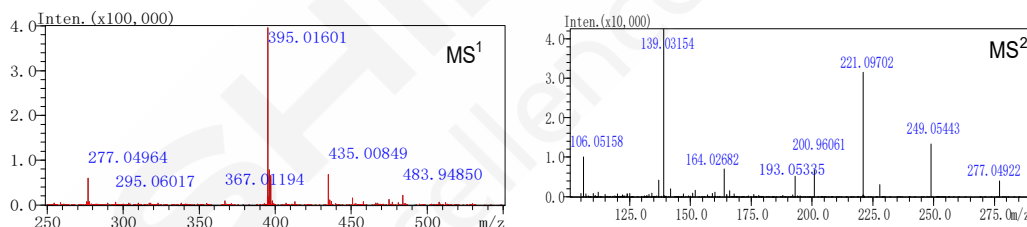
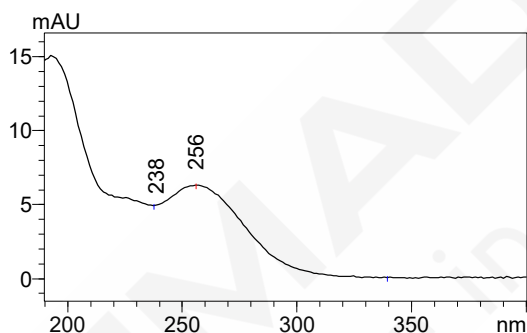


图 10 杂质 5 质谱图 (左上)、光谱图 (右上) 和可能的裂解规律 (下)

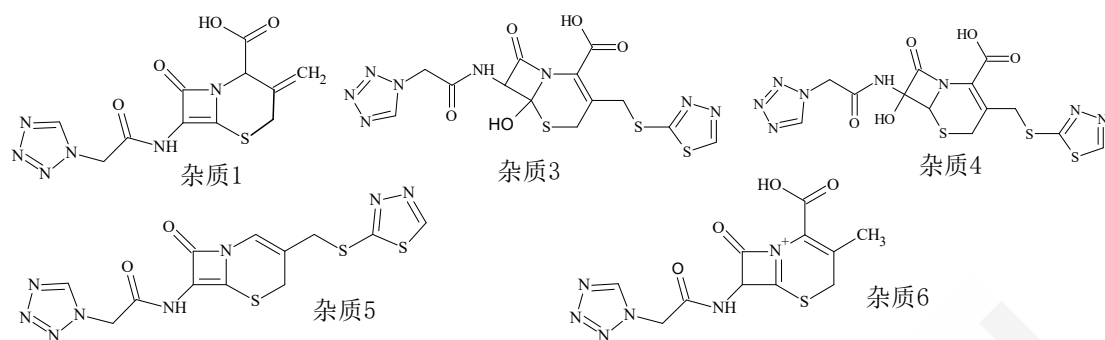


图11 6种杂质可能结构式

### 3. 结论

3.1 经过Q-TOF分析，对头孢替唑钠进行一级质谱信息和二级质谱采集，并结合紫外吸收光谱图、Insight Explore软件推测杂质分子式和结构信息，所得结构与ACD/Labs软件预测相互验证，共鉴定出6种杂质，可能的机构式如图11所示。

3.2 对低浓度杂质，如杂质 6，可采用增加进样量并用 Q-TOF 自带的废液阀选择性切入目标杂质的方法实现鉴定。由于 Q-TOF LCMS-9030 的高灵敏度，本应用实现了峰面积百分含量从 0.05%到 0.6% 杂质的结构鉴定。

# 在线体积排阻反相液相色谱-飞行时间质谱鉴定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中聚合物杂质

**摘要:** 本文建立在线体积排阻-反相液相色谱-飞行时间质谱法(SEC-RPLC-QTOFMS)用于注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的聚合物杂质的鉴定。一维采用 Shimpack Diol-150 (7.9 mm I. D. × 250 mm L, 5 μm)色谱柱; 进样量为 20 μL 并以 254 nm 为检测波长, 建立了头孢哌酮和聚合物杂质的 SEC 分离条件; 并将 SEC 分离所得聚合物杂质通过中心切割技术收集到二维 RPLC 中脱盐和进一步分离, 采用 Q-TOF 为检测器, 采集分离所得杂质一级和二级质谱信息后对其进行结构鉴定。在一维条件下头孢哌酮与聚合物峰分离良好; 通过二维 RPLC-QTOFMS 推测出 9 个杂质的结构, 其中有 4 个为闭环二聚物。在线 SEC-RPLC-QTOFMS 技术可以将聚合物指针性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来, 为表征聚合物杂质的研究开拓了新的思路。

**关键词:** 头孢哌酮 聚合物杂质 在线体积排阻-反相液相色谱-飞行时间质谱

β-内酰胺类抗生素包括了头孢菌素、青霉素和碳青霉烯类, 是临床最常用的注射剂型抗生素。注射用头孢哌酮钠 (Cefoperazone Sodium) 舒巴坦钠 (Sulbactam Sodium) 是一种复合制剂, 是由第三代头孢菌素类抗生素头孢哌酮和由辉瑞公司研制开发的首个β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦钠组合而成。β-内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应与药物中存在的高分子聚合物杂质有关。其中内源性聚合物是β-内酰胺类抗生素杂质控制的重点。

聚合物杂质检测的难点是: 含量低、类型多、且结构不稳定无商用对照品色谱不易定位。《中国药典》2015年版采用Sephadex G10葡聚糖凝胶柱对β-内酰胺类抗生素中高分子聚合物进行测定, 该色谱柱柱效低, 聚合物杂质分离效率低, 辅料干扰严重, 除分子排阻作用外, 还会产生吸附、疏水等作用。

本文首次使用Shimpack Diol-150色谱柱建立了注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的高分子聚合物的尺寸排阻色谱法, 使用二维液相阀切技术并辅之与质谱联用, 对头孢哌酮及高分子杂质分别进行了一级、二级质谱解析。对谱图进行分析归纳, 推测出注射液头孢哌酮钠舒巴坦钠中9个未知杂质, 其中4个为闭环聚合物杂质。该法进样量小, 分离效能高, 分析时间短, 专属性强, 灵敏度高, 为注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的质量控制提供了重要的依据。

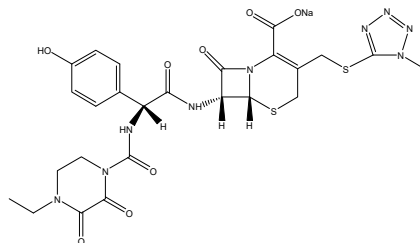


图1. 头孢哌酮钠结构式

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

岛津二维SEC-RPLC-QTOFMS系统,如图2所示。具体配置为LC-20AD×4(输液泵),SIL-20AC(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),CBM-20A(系统控制器),DGU-20A<sub>5</sub>(在线脱气机),SPD-20A(紫外检测器,一维检测器),SPD-M30A(二极管阵列检测器,二维检测器),FCV-32AH×2(流路选择阀),定量环体积500 μL。LCMS 9030(LCMS-QTOF,四极杆-飞行时间质谱仪)和LabSolution Ver.5.96(色谱工作站)。

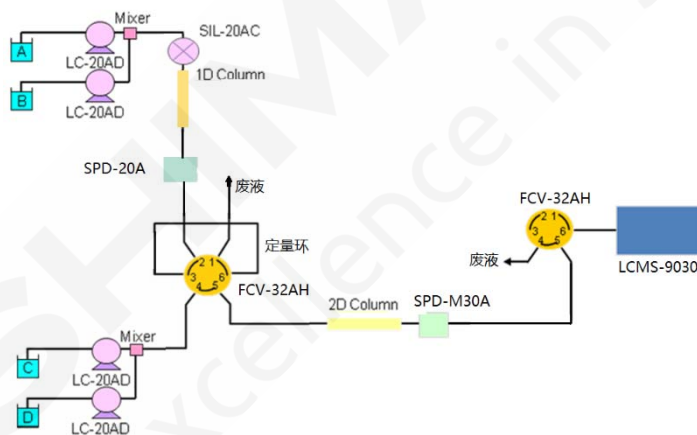


图2. 二维SEC-RPLC-QTOFMS杂质鉴定系统流程图

### 1.2 分析条件

1<sup>st</sup>D 液相色谱条件: Shimpack Diol-150 (7.9 mm I.D.×250 L. mm, 5 μm); 流动相: 磷酸缓冲溶液[5 mmol/L 磷酸氢二钠-5 mmol/L 磷酸二氢钠-61:39 (体积比)]-乙腈(95:5)。等度洗脱, 0.8 mL/min。采集时间: 60 min。检测波长: 254 nm; 柱温: 30°C; 进样量: 20 μL。

2<sup>nd</sup>D 液相色谱条件: Shimpack VP ODS 色谱柱 (4.6 mm I.D.×250 L. mm, 5 μm), 检测波长: 254 nm, 柱温: 30°C, 流速: 1.0 mL/min, 定量环体积: 500 μL, 流动相 A: 0.1%甲酸水; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈。梯度洗脱: 0-10 min (5% B)→10-20 min (5%-20% B)→20-30 min(20%-50% B)→40-50 min(100% B)→51-60 min(5% B)。柱后分流比, 废液端: 质谱端=8:2。进质谱流速约为 0.2 mL/min。右阀切入质谱端时间为 12 min。

质谱条件：离子源：ESI (+)，接口电压：4.5 kV，扫描范围：一级质谱： m/z 100 ~3000；自动二级：m/z 100 ~3000；雾化气：氮气 3.0 L/min，干燥气：氮气 10 L/min，加热气：空气 10 L/min，碰撞气：氩气，脱溶剂管温度：100°C，加热模块温度：100°C，接口温度：100°C，检测器电压：2.5 KV，校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。检测器工作时间 12-50 min。

### 1.3 溶液的配制

精密称取注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠原料药样品 0.2 g 置 5 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品溶液(临用新制)。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 一维色谱图

按照 1.3 制备供试品溶液，按“1.2”项下的<LC 1<sup>st</sup>D>色谱条件进行分析，<LC 1<sup>st</sup>D>色谱图如图 3 所示，峰 1 (R.T.=8.66 min) 为高分子聚合物杂质；峰 2 (R.T.=10.60 min) 为头孢哌酮主峰。本实验研究对象为聚合物杂质，在 SEC 色谱柱上，其出峰时间在主峰之前。在峰 1 前有一小峰，经鉴定不是目标物，本文不做讨论。

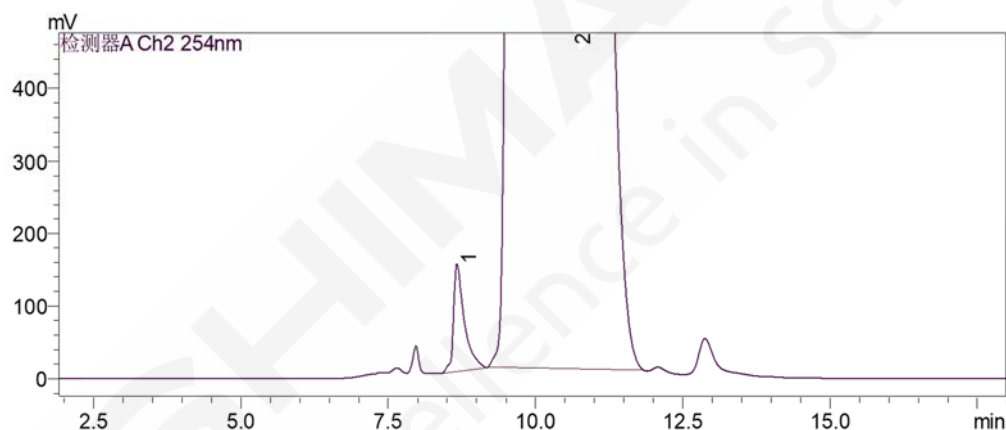


图 3. 头孢哌酮<LC 1<sup>st</sup>D>色谱图 (1: 聚合物 (polymer); 2: 头孢哌酮 (Cefoperazone))

## 2.2 头孢哌酮主峰结构鉴定

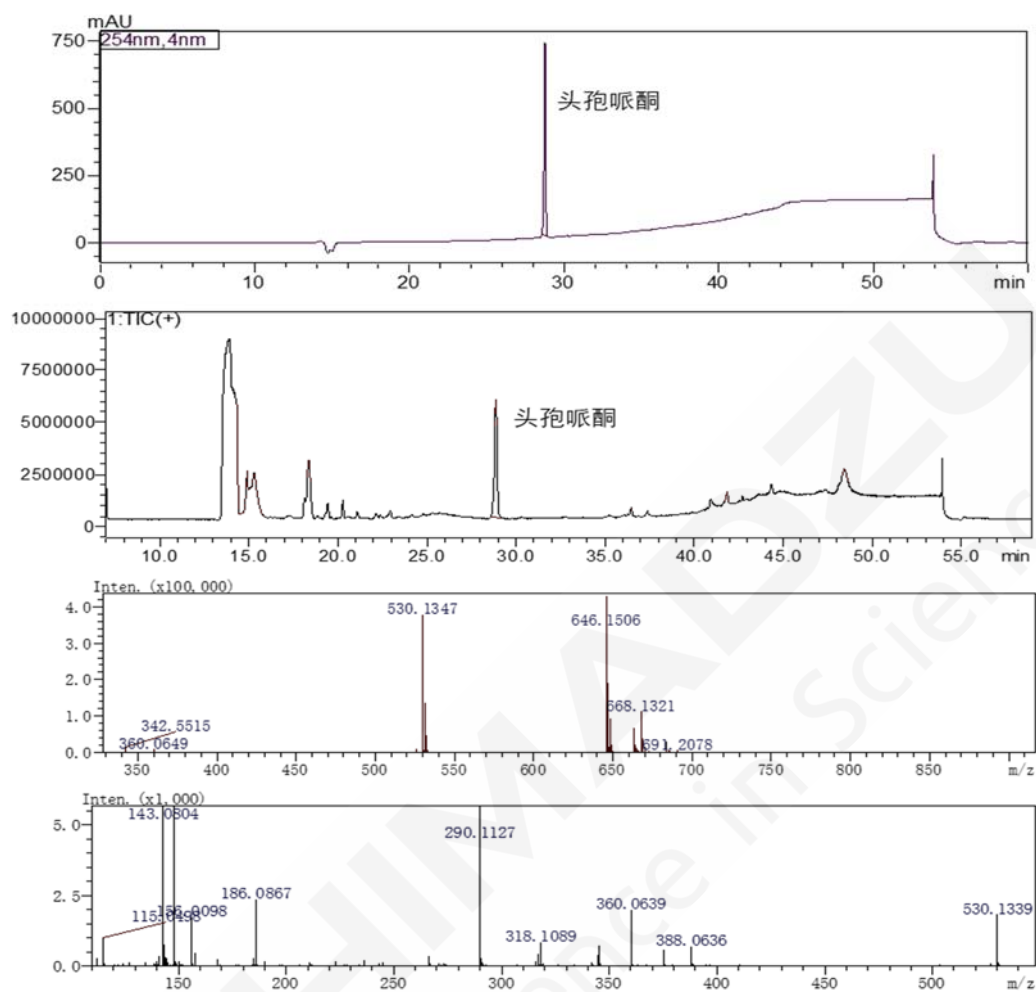


图 4. 头孢哌酮主峰<LC 2<sup>nd</sup>D>液相色谱图、TIC 图及 MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 质谱图

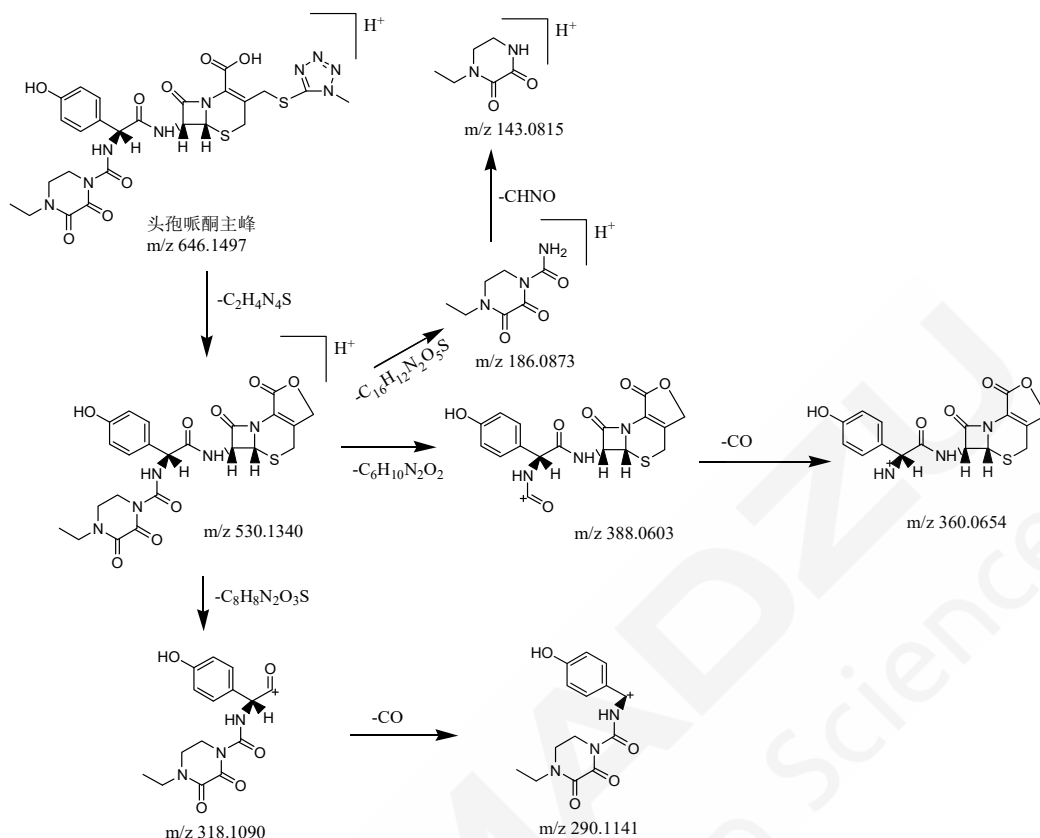


图 5. 头孢哌酮主峰可能的裂解规律

使用 SEC-RPLC-QTOFMS 系统鉴定主峰的原因是为了得到主峰在二维柱上的出峰时间，便于结合二维保留时间鉴定聚合物杂质。在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中，将头孢哌酮主峰切换到定量环转至二维脱盐分析，左阀切阀时间为 10.5-11.1 min。馏分经过  $<2^{nd}D LC>$  分析，得到头孢哌酮主峰的二维液相色谱图，TIC 总离子流色谱图和多级质谱图如图 4 所示。头孢哌酮主峰在二维的出峰时间为 28.76 min，TIC 图上亦可见明显响应。对头孢哌酮主峰进行二级质谱分析结果如下：头孢哌酮分子式  $C_{25}H_{26}N_9NaO_8S_2$ ，精确质量数为 645.1424，一级质谱图中  $m/z$  646.1506 为  $[M+H]^+$ ， $m/z$  668.1321 为  $[M+Na]^+$ ， $m/z$  530.1347 为头孢哌酮在离子源分解产生的碎片，以上离子与软件计算理论质核比误差均在 2 ppm 内。头孢哌酮二级质谱碎片主要有  $m/z$  530.1339、388.0636、360.0639、318.1089、290.1127、186.0867 和 143.0804。推测其可能的裂解规律见图 5。

### 2.3 聚合物杂质结构鉴定

在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中，将头孢哌酮聚合物峰切换到定量环转至二维脱盐分析，左阀切阀时间为 8.5-9.1 min。馏分经过  $<2^{nd}D LC>$  分析，得到聚合物峰的二维液相色谱图如图 6 所示。与空白溶剂相比，聚合物峰在二维紫外色谱图中分离出多种组分，说明聚合物峰是混合物。质谱检测器上有 9 个物质峰检出。前 4 个杂质二维出峰时间在主峰之前，后 5 个杂质的二维出峰时间在主峰之后。

聚合物峰-1 的  $MS^1$  为  $m/z$  234.0434， $MS^2$  主要碎片为  $m/z$  217.1043、146.0537、124.0744 等，经鉴定其为原料药中的舒巴坦。聚合物峰-2 的  $MS^1$  为  $m/z$  377.1457， $MS^2$  主要碎片为  $m/z$  164.0705、143.0805、115.0486 等，推测其结构可能是头孢哌酮  $\beta$ -内酰胺键断裂生成的副产物。聚合物峰-3 的

MS<sup>1</sup>为m/z 548.1453, MS<sup>2</sup>主要碎片为m/z 406.0703、319.0749、143.0802等。其结构可能是头孢哌酮内酯的水解产物。聚合物峰-4物质的MS<sup>1</sup>为m/z 761.2280, MS<sup>2</sup>主要碎片为m/z 575.1555、532.1819、390.1110、186.0867和143.0802等。m/z 186.0867和143.0802二氮六元杂环的特征碎片, m/z 532.1819和390.1110为头孢哌酮内酯及特征碎片的加氢还原峰。推断聚合物峰-4为头孢哌酮的有关物质, 碎片信息有限未推导出其可能的结构。聚合物峰-5的MS<sup>1</sup>为m/z 664.1614, MS<sup>2</sup>主要碎片为m/z 548.1452、406.0703、143.0804等, 其结构可能是头孢哌酮β-内酰胺键水解产物。以上五个杂质均非聚合物杂质。

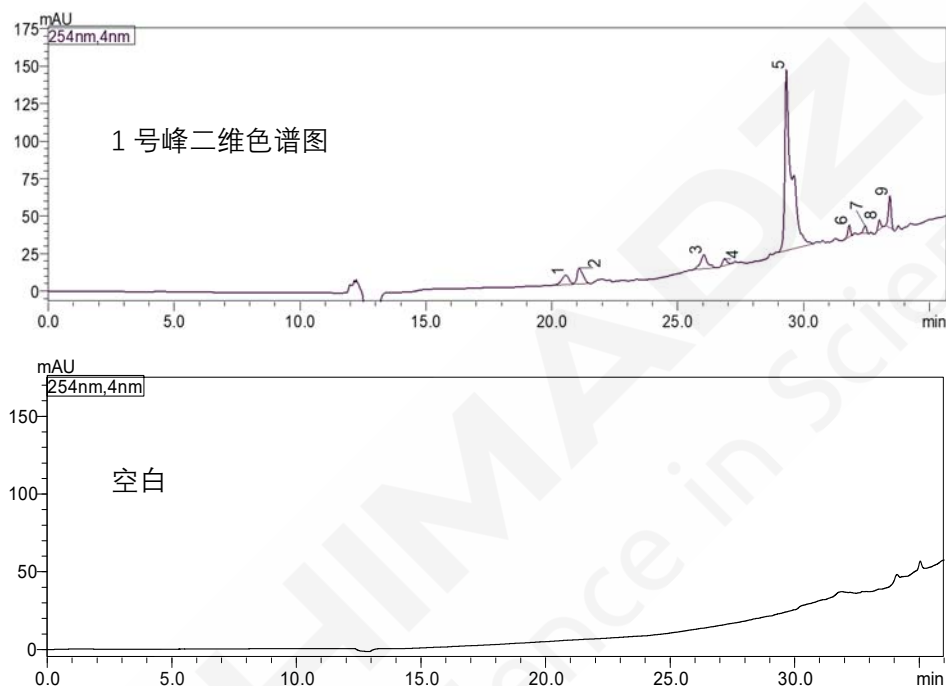


图6. 头孢哌酮聚合物峰<LC 2<sup>nd</sup>D>液相色谱图及空白溶剂二维色谱图

聚合物峰-6与聚合物峰-7的质谱图见图7。两者的MS<sup>1</sup>均为m/z 1175.2797, MS<sup>2</sup>主要碎片为m/z 1059.2567、345.0546、530.1317等。

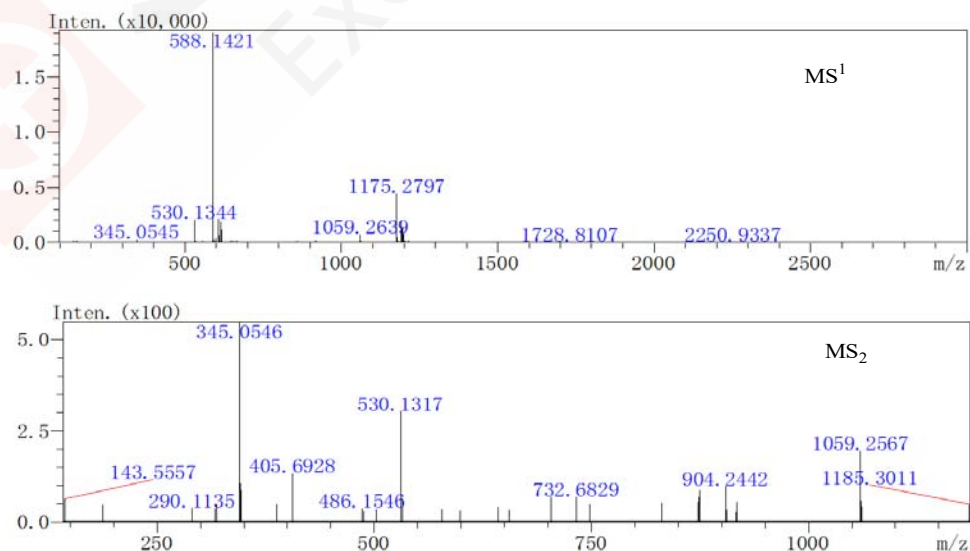


图7. 聚合物峰-6、7 MS<sup>1</sup>和MS<sup>2</sup>质谱图(母离子m/z 1175.2797)

推测其结构是头孢哌酮和头孢哌酮内酯闭环二聚而成，分子式为 $C_{48}H_{50}N_{14}O_{16}S_3$ ，与理论质核比相对误差为1.02 ppm。闭环二聚的反应过程，可能是头孢哌酮7位侧链活性氨基进攻内酯的 $\beta$ -内酰胺键（8a），也可能是内酯的7位侧链活性氨基进攻头孢哌酮的 $\beta$ -内酰胺键（8b），对应的结构式见图8。8a与8b的二级碎片完全一致，由于没有对照品，不能进一步鉴定。以8a为例推导其可能的裂解规律见图9。聚合峰-6与聚合物峰-7二维出峰时间在主峰之后，满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

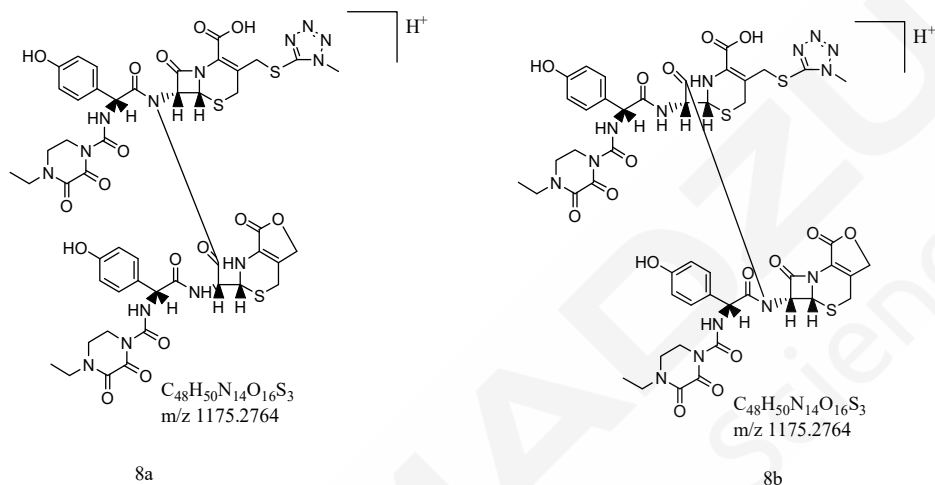


图 8. 聚合物峰-6、7 可能的结构式

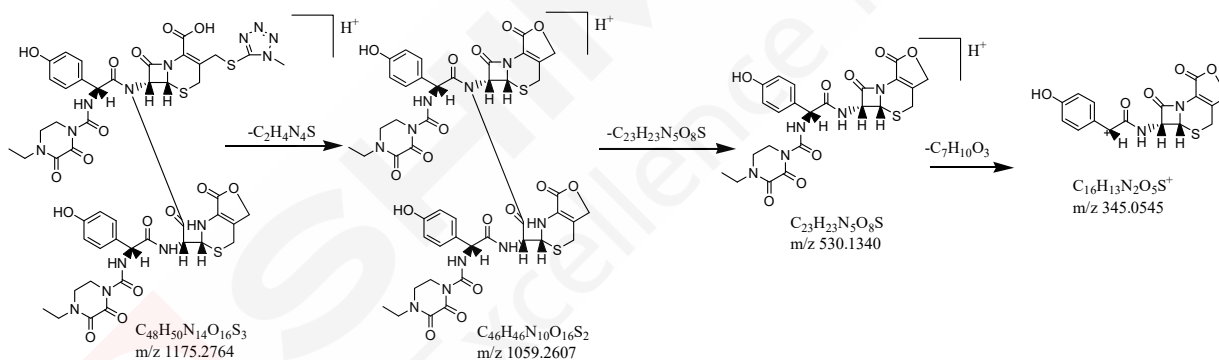


图 9. 聚合物峰-6、7 可能的裂解规律

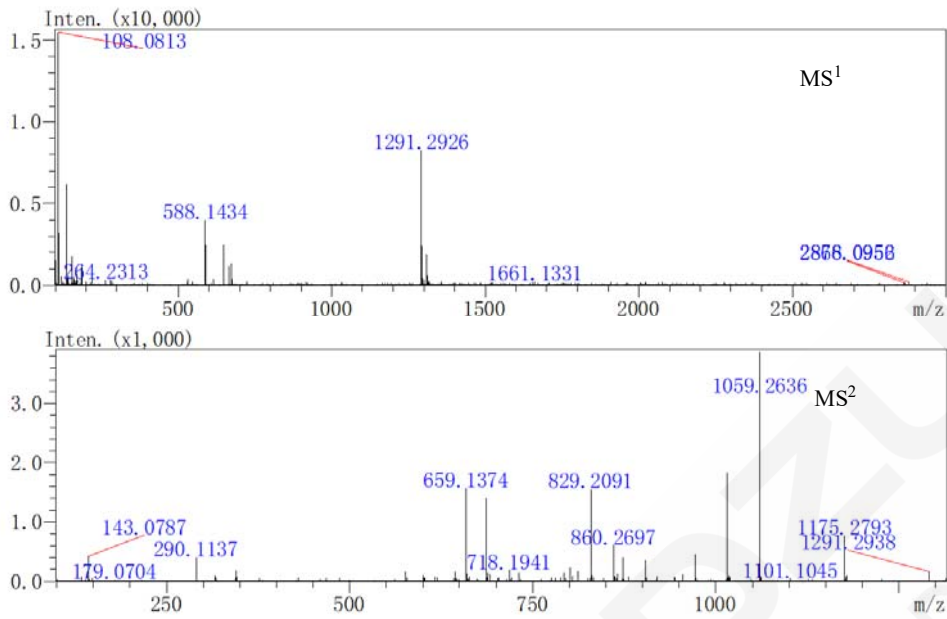


图10. 聚合物峰-8、9 MS1和MS2质谱图(母离子m/z 1291.2961)

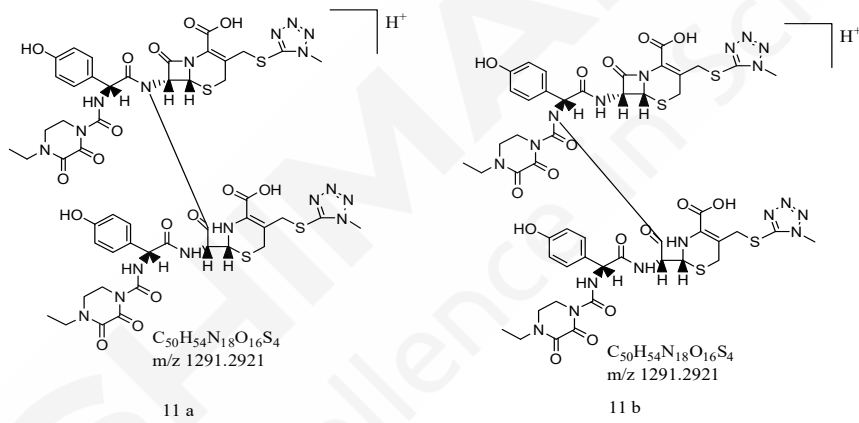


图11. 聚合物峰-8、9可能的结构式

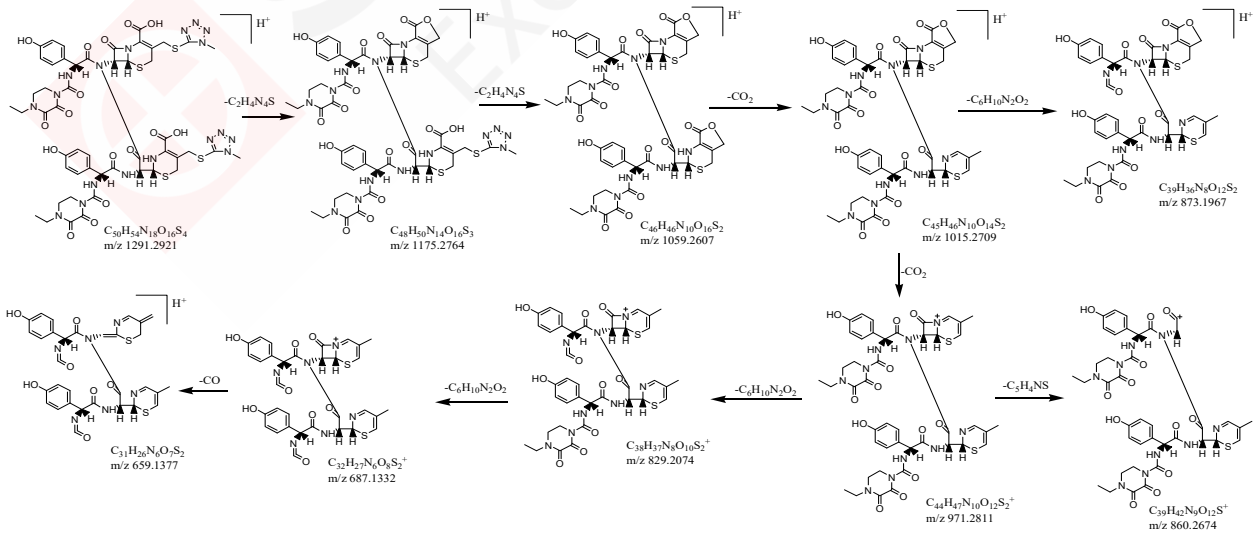


图12. 聚合物峰-8、9可能的裂解规律

聚合物峰-8与聚合物峰-9的质谱图见图10，两者的MS<sup>1</sup>均为m/z 1291.2926。推测其结构是头孢哌酮闭环二聚产物，分子式为C<sub>50</sub>H<sub>54</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>S<sub>4</sub>，[M+H]<sup>+</sup>与理论质核比误差为0.38 ppm。聚合物峰-8强度弱无二级碎片，聚合物峰-9的二级主要碎片为m/z 1175.2793、1059.2636、1015.2711、829.2091等，上述二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在，为推测聚合物杂质的结构和聚合方式提供了依据。由于头孢哌酮7位侧链有两个活性氨基位点，发生L型聚合反应有两种产物，可能的结构式见图11。由于没有对照品，不能进一步鉴定。结合聚合物峰-9的二级碎片，以11a为例推导其可能的裂解规律见图12。聚合物峰-8与聚合物峰-9的二维出峰时间在主峰之后，满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

### 3 讨论

#### 3.1 在线脱盐液质联用技术

本实验采用二维SEC-RPLC-QTOFMS法对注射用头孢哌酮聚合物进行鉴定，该方法基于馏分收集环(Fraction loop)将目标馏分从一维转移至二维液相质谱联用系统，对目标峰指针性的快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程，即在不改变原流动相条件的基础上，实现了液质联用鉴定目标聚合物杂质。鉴定出4种聚合物，并对其结构及裂解规律进行推测。二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在，并非范德华力结合的二聚体。4种聚合物杂质二维出峰时间均在主峰二维的出峰时间之后，符合聚合物杂质保留更强的特性。

#### 3.2 色谱柱的选择

现行标准采用的葡聚糖G10的色谱柱，色谱条件下由于高分子助悬剂的影响，聚合物峰检出数量少，聚合物峰型差，无法与主峰完全分离。本文选择的Shimpack Diol-150色谱柱(岛津公司)采用二醇基键合的多孔高纯硅胶，独有的化学修饰技术确保分离度的同时峰型更加尖锐。实验结果表明聚合物峰与主峰之间分离度有了很大改善。尽管供试品采用过量进样，一维色谱图中主峰为平头峰，聚合物峰切至二维经高分辨质谱确证聚合物峰中未检测到头孢哌酮主峰。表明本法一维聚合物峰与主峰分离度良好。

#### 3.3 与《中国药典》方法对比

本法结合QTOFMS对头孢哌酮聚合物杂质进行精准检测，克服了药典方法定性能力不足的技术缺陷。按《中国药典》2015版收载的注射用头孢哌酮聚合物检查方法进行对比实验，本法的进样量更少，选择性更高，灵敏度更高，分离度更好。聚合物峰在二维为混合物，经高分辨质谱确证其紫外谱图中响应最大的峰是头孢哌酮水解产物，并非聚合物杂质。聚合物杂质在样品中的含量微乎其微，本法采用500 μL定量环将一维中聚合峰全切入二维才得以检测。同时由于一维流动相中无有机相，并未引起二维溶剂效应。全切的另一个优点是：如有需要，二维可以对聚合物杂质进行定量检测。

#### 3.4 方法的优化

β-内酰胺类抗生素的聚合物结构不稳定易水解，需临用新配。质谱检测时需将离子源温度设置为较低值，避免聚合物在离子源上分解。β-内酰胺类抗生素的闭环二聚体的响应为[2M+H]<sup>+</sup>。当样品

浓度高时由于范德华力聚合在离子源上也能出现 $[2M+H]^+$ 的响应，需要结合保留时间和二级质谱图进行区分。

#### 4 结论

本文建立了在线SEC-RPLC-QTOFMS系统，将聚合物指针性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来。经高分辨质谱LCMS-9030鉴定二维色谱图中强度最高峰并非聚合物杂质，高分辨质谱的使用克服了药典方法定性不足的问题。LCMS-9030灵敏度高，适用于低含量杂质的结构鉴定，为 $\beta$ -内酰胺类抗生素中聚合物的分离、分析及产品质量提高提供了依据。



# 在线二维液相色谱-四极杆飞行时间质谱法鉴定盐酸氟西汀的杂质

**摘要:** 本文建立二维液相色谱 (RP1-WAX-RP2) -飞行时间质谱法, 在线去除流动相中的有机缓冲盐和离子对试剂, 并成功用于盐酸氟西汀杂质的鉴定。一维采用 C8 色谱柱, 流动相使用含有辛烷磺酸钠和乙酸钠的缓冲液, 建立了氟西汀主峰和杂质的分离条件; 将目标杂质通过中心切割转移到捕集柱上进行阴离子交换, 去除馏分中的辛烷磺酸根离子和乙酸根离子; 目标杂质进而转移到二维 C18 柱上分离。采用 Q-TOF 为检测器, 采集各杂质一级和二级质谱信息后, 结合主峰裂解规律对杂质进行结构鉴定。经鉴定三个杂质中两个为已知杂质, 一个为未知杂质。

**关键词:** 盐酸氟西汀; 二维液相; RP1-WAX- RP2

近几十年来, 抑郁症在全球范围呈现高发趋势。盐酸氟西汀 (fluoxetine) 是1987年美国礼来公司上市的一种选择性5-羟色胺再摄取抑制剂, 达到抗抑郁、改善情绪的效应。目前氟西汀在我国有广泛的临床使用, 其不良反应也日渐显现, 这与药品中存在的杂质密切相关。

2015版《中国药典》采用三乙胺缓冲液-甲醇-四氢呋喃测定四种盐酸氟西汀的有关物质测定。盐酸氟西汀为碱性化合物, 本文比较了药典流动相和辛烷磺酸钠流动相的分离效果, 流动相中添加辛烷磺酸钠可分出更多的杂质。

辛烷磺酸钠和乙酸钠为非挥发缓冲盐, 无法兼容质谱检测器。本文通过在线二维液相联用技术, 有效去除一维馏分中的离子对和缓冲盐。实现了目标杂质的高分辨质谱定性。

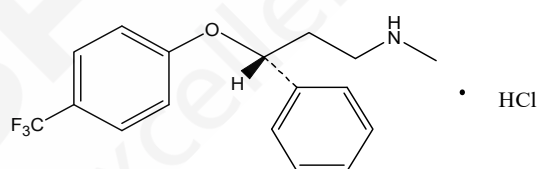


图1. 盐酸氟西汀结构式

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

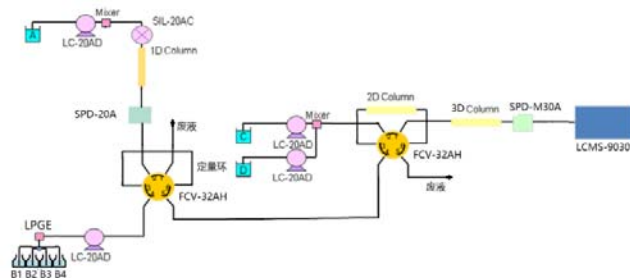


图2. 在线二维RP1-WAX-RP2-QTOFMS杂质鉴定系统流程图 (初始状态L1R1)

岛津二维RP1-WAX-RP2液相色谱系统，如图2所示。具体配置为LC-20AD×4（输液泵）其中一台配LPGE流路选择阀，SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），DGU-20A<sub>5</sub>（在线脱气机），SPD-20A（紫外检测器，一维检测器），SPD-M30A（二极管阵列检测器，二维检测器），FCV-32AH×2（流路选择阀），定量环体积20 μL。LCMS 9030（LCMS-QTOF，四极杆-飞行时间质谱仪）和LabSolution Ver.5.97（色谱工作站）。

## 1.2 分析条件

1<sup>st</sup>D 液相色谱条件：C8 (4.6 mm I. D. × 150 mm L., 2.7 μm)；流动相 A：辛烷磺酸钠缓冲液（30 mM 辛烷磺酸钠，35 mM 乙酸钠水溶液，用冰醋酸调 pH 至 5.0）-甲醇-四氢呋喃（418：512：70）。等度洗脱，0.8 mL/min。采集时间：30 min。检测波长：215 nm；柱温：40°C；进样量：30 μL。

捕集柱液相色谱条件：NH2P-50 4B (4.6 mm I. D. × 50 mm L., 5 μm)，柱温：40°C，流速：0.2 mL/min，定量环体积：20 μL，流动相 B1：1%甲酸水溶液；流动相 B2：0.35%氨水乙腈溶液；流动相 B3：乙腈。

2<sup>nd</sup>D 液相色谱条件：C18 (2.0 mm I. D. × 50 mm L., 5 μm)，检测波长：215 nm，柱温：40°C，流速：0.2 mL/min，流动相 C：1%甲酸水溶液；流动相 D：1%甲酸乙腈。梯度洗脱。

质谱条件：离子源：ESI (+)，接口电压：4.5 kV，扫描范围：一级质谱：m/z 100~800；自动二级：m/z 30~400；雾化气：氮气 3.0 L/min，干燥气：氮气 10 L/min，加热气：空气 10 L/min，碰撞气：氩气，脱溶剂管温度：250°C，加热模块温度：400°C，接口温度：300°C，检测器电压：2.1 kV，校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

## 1.3 溶液的配制

氟西汀片剂去包衣，碾碎，精密称取样品 10.0 mg 置 5 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品溶液。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 一维色谱图

按照 1.3 制备供试品溶液，按“1.2”项下的<LC 1<sup>st</sup>D>色谱条件进行分析，<LC 1<sup>st</sup>D>色谱图如图 3 所示，1、2、3 号峰为杂质，对应的保留时间分别为 10.28、14.02、14.41 min。4 号峰为氟西汀主峰，保留时间为 14.68 min。与药典流动相（图 4）相比，本实验流动相可分离出更多杂质。按照 ICH 指导原则，杂质含量在 0.1%以上需给出鉴定结果。本次实验研究杂质含量极低，3 个杂质峰的面积归一化结果为：0.029%、0.032%和 0.023%，均在 ICH 要求的限度之下。各杂质在 215 nm 下的紫外响应仅 5 mV，大大增加了本次鉴定的难度。

杂质 2 和 3 与主峰出峰时间很接近，如果将流动相中辛烷磺酸钠和乙酸钠更换为近似 pH 值的质谱兼容流动相，将导致峰位变化，无法识别目标杂质。因此必须使用含盐流动相。然而辛烷磺酸钠和乙酸钠不挥发，且有较强的质谱响应（图 5）。如将一维流动相直接进质谱，杂质无响应且污染质谱仪。这是本次鉴定的第二个技术难点。

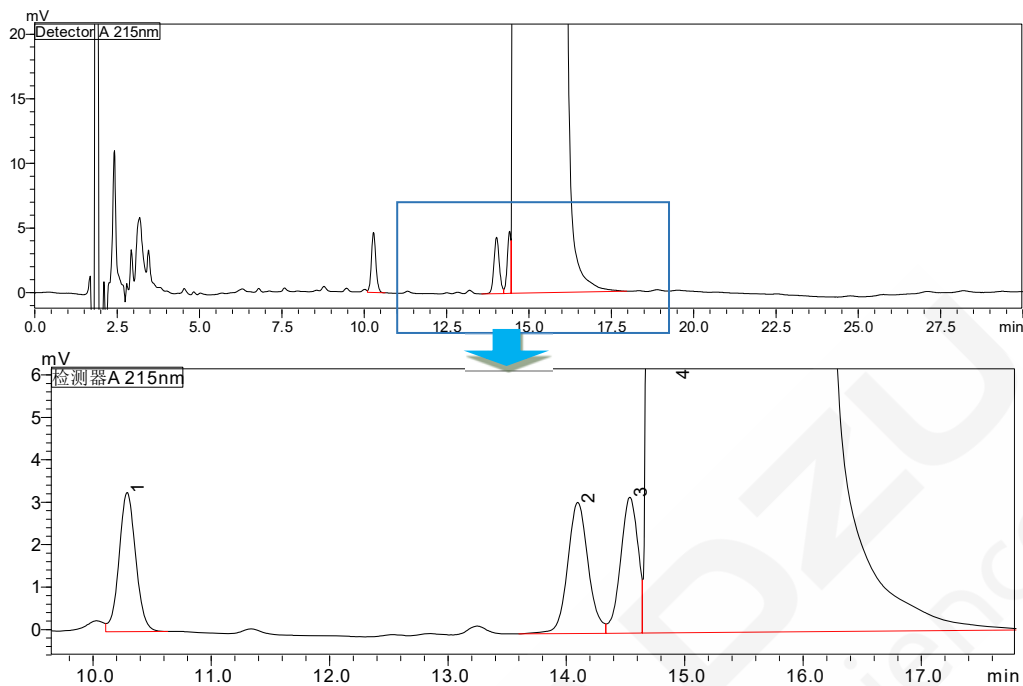


图 3. 盐酸氟西汀<LC 1<sup>st</sup>D>色谱图及放大图 (1、2、3号峰为杂质, 4号峰为主峰)

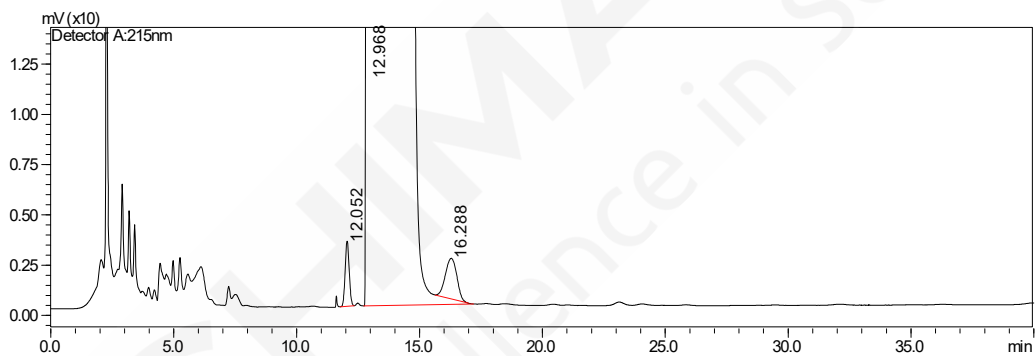


图 4. 盐酸氟西汀药典流动相紫外色谱图

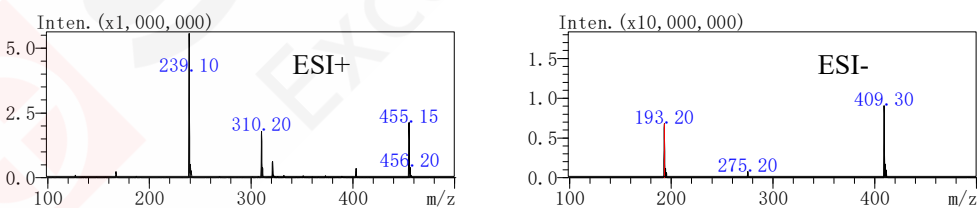


图 5. 辛烷磺酸钠质谱响应

## 2.2 氟西汀主峰结构鉴定

氟西汀采用流动注射模式进样分析, 其一级和二级质谱图如图 6。氟西汀分子式  $C_{17}H_{18}F_3NO$ , 精确质量数为 309.1340, 一级质谱图中  $m/z$  310.1410 为  $[M+H]^+$ , 与软件计算理论质核比误差为 0.97 ppm。

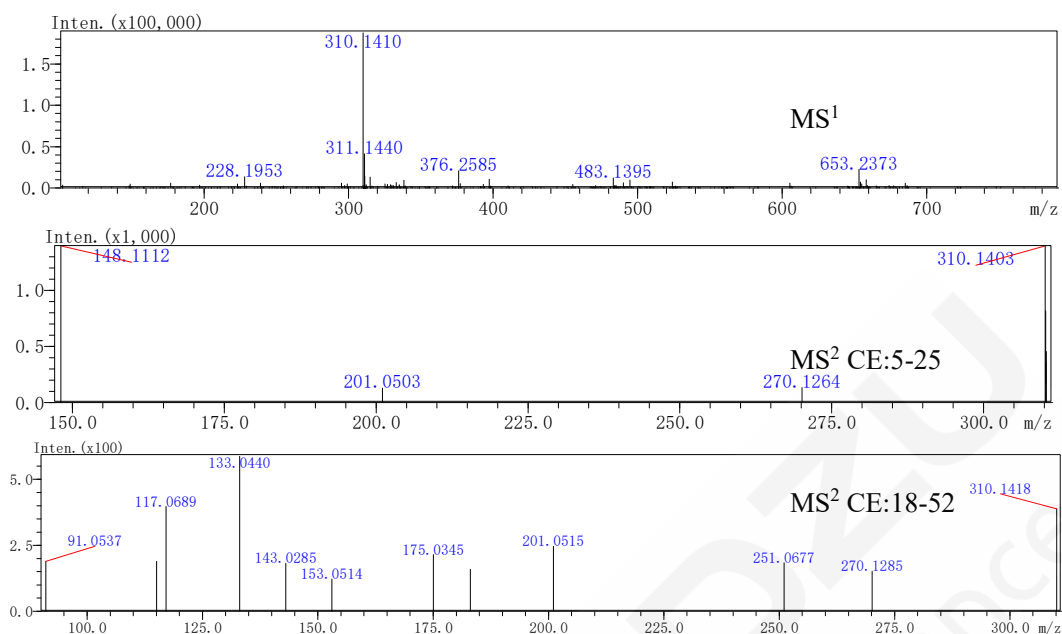


图 6. 氟西汀主峰 MS<sup>1</sup>和 MS<sup>2</sup>质谱图

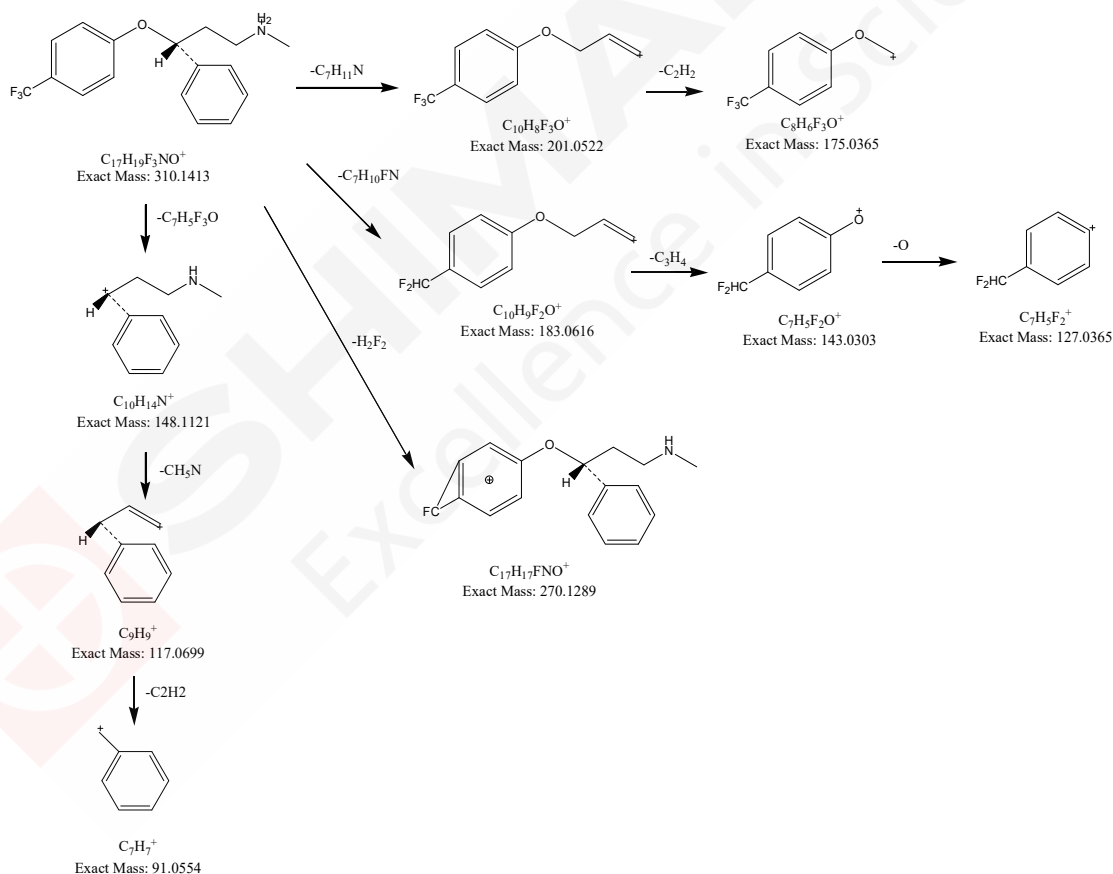


图 7. 氟西汀主峰可能的裂解规律

氟西汀中不同结构部分断裂所需能量不同,因此本实验给出了高、低两个碰撞能下的 MS<sup>2</sup> 谱图。氟西汀二级裂解规律总结如下:若质子加在氧上,醚键断裂可生成 148,然后依次生成 117 和 91。若质子加在氮上,可生成 201、175、183、143、127 等碎片,若质子加在氟上,可生成 270 的碎片。推测其可能的裂解规律见图 7。

### 2.3 杂质1结构鉴定

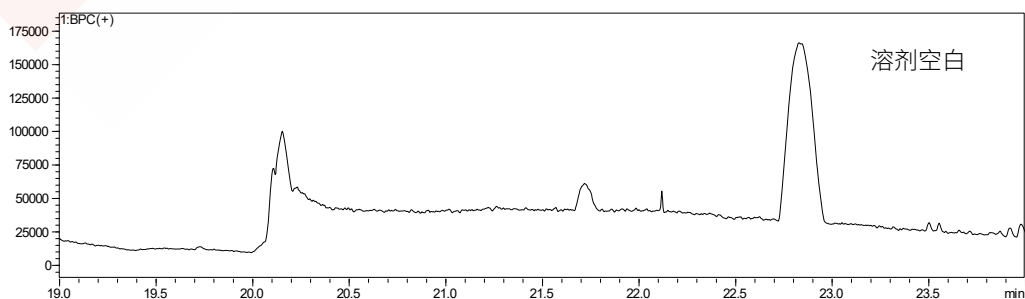
在RP1-WAX-RP2-QTOFMS系统中，杂质1的一维保留时间为10.28 min。将杂质1切换到定量环转至捕集柱脱盐分析，左阀切阀时间为10.10-10.29 min，选择此切阀时间的目的是将目标杂质储存在定量环的中心。定量环选择20  $\mu$ L的原因是尽可能减少一维馏分的体积，延长氨基柱的使用时间。一维馏分在B1的输送下经过氨基柱，优化后的上样时间为2.5 min。B1为1%甲酸水溶液，在此流动相下，氨基柱表面的氨基基团带正电荷，具有阴离子交换能力。在此过程中乙酸根和辛烷磺酸根离子被吸附在氨基柱上，钠离子经由废液排出，目标杂质虽然是阳离子但是由于疏水作用可在氨基柱上保留。在线除盐过程结束后，右阀切换，捕集柱与二维柱串联，二维输液泵启动梯度洗脱程序，经4分钟时间有机相比例从5%提升到95%，杂质从柱上洗脱进高分辨质谱鉴定。以鉴定杂质1为例，RP1-WAX-RP2系统的时间切换程序见表1。

表1. 杂质1鉴定的RP1-WAX-RP2系统的时间切换程序

Time(min)	Module	Command	Value	描述
0.01	Column Oven	CTO.RVL	1	1 2 通
0.01	Column Oven	CTO.RVR	1	1 2 通
10.10	Column Oven	CTO.RVL	0	1 6 通
10.29	Column Oven	CTO.RVL	1	1 2 通
12.80	Column Oven	CTO.RVR	0	1 6 通
12.80	Pumps	B Conc.	5	二维启动
16.80	Pumps	B Conc.	95	梯度洗脱
16.80	Column Oven	CTO.RVR	1	1 2 通
25.00	Pumps	B Conc.	95	
25.10	Pumps	B Conc.	5	
30.00	Controller	Stop		

通常杂质鉴定需要对比空白和杂质的紫外色谱图，找出杂质出峰时间对应的质谱图进行鉴定。盐酸氟西汀及其有关物质为碱性化合物，经实验条件摸索流动相中必须加入甲酸才能洗脱。但是甲酸在215 nm有吸收，杂质本身含量极低 (<0.032%) 在二维紫外色谱图上无响应，这是本实验的三个难点。

本实验通过对比空白和杂质1的质谱BPC图，从而找到杂质在质谱中的出峰时间。如图8所示，杂质1的质谱出峰时间为21.23 min。



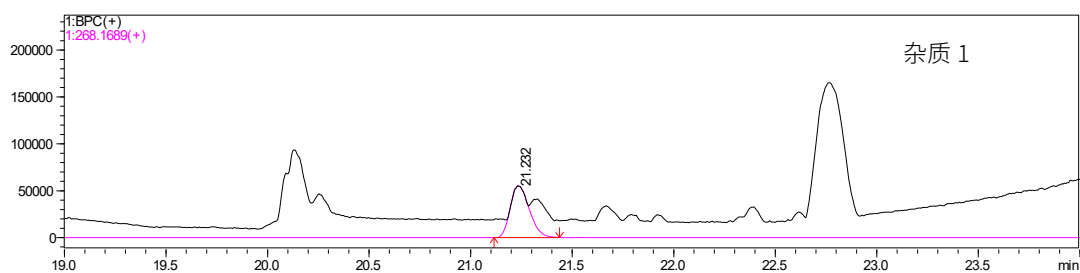


图 8. <LC 2<sup>nd</sup>D>空白溶剂及杂质 1 的 BPC 质谱图

杂质1的一级和二级质谱图如图9所示。杂质1的MS<sup>1</sup>质谱图中m/z 268.1689，经Insight Explore精确分子式预测软件推测其分子式为C<sub>18</sub>N<sub>21</sub>NO。MS<sup>1</sup>质谱图中未见到辛烷磺酸钠的电离响应，表明本系统可有效在线去除辛烷磺酸钠。MS<sup>2</sup>质谱图中可见91和117两个与主峰共有的特征碎片，推测其结构中含有有机苯胺取代基。146的碎片推断比主峰多一个不饱和度。结合主峰的裂解规律，推测杂质1可能的结构和裂解规律见图10。查阅文献，此结构未见报道，为新发现杂质。

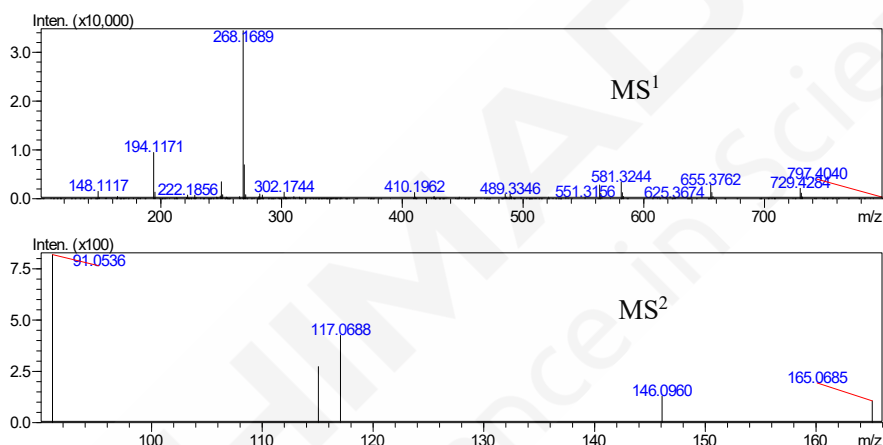


图 9. 杂质 1 的 MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 质谱图

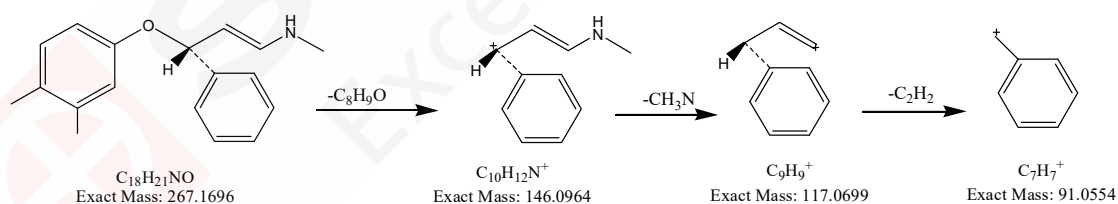


图 10. 杂质 1 可能的结构及其裂解规律

## 2.4 杂质2结构鉴定

与杂质1的鉴定过程类似，杂质2切换到定量环转至捕集柱脱盐分析，左阀切阀时间为13.08-14.03 min。在线脱盐后二维启动梯度洗脱程序。对比溶剂空白和杂质2的质谱BPC图（图11），确认杂质2在质谱中出峰时间为25.04 min。杂质2的一级和二级质谱图如图12所示。杂质2的MS<sup>1</sup>质谱图中m/z 310.1407，经Insight Explore精确分子式预测软件推测其分子式为C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NOF<sub>3</sub>，与主峰分子式一致。MS<sup>2</sup>质谱图中可见148、201、270等与主峰共有的特征碎片，推断其结构为主峰异构体，可能为《中国药典》杂质C。其可能的裂解规律见图13。

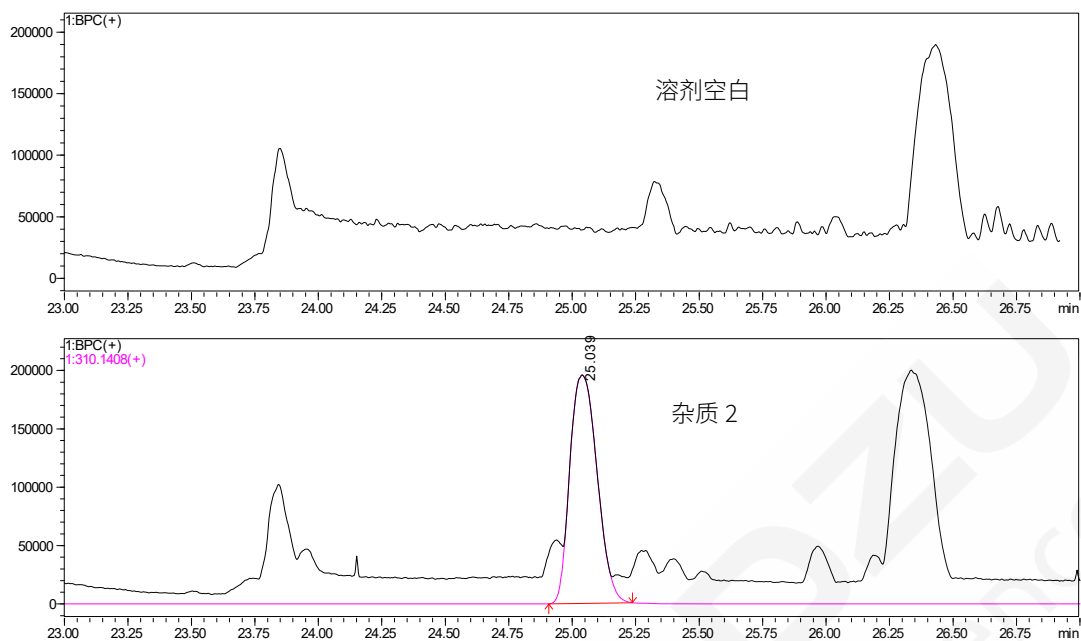


图11. <LC 2<sup>nd</sup>D>空白溶剂及杂质2的BPC质谱图

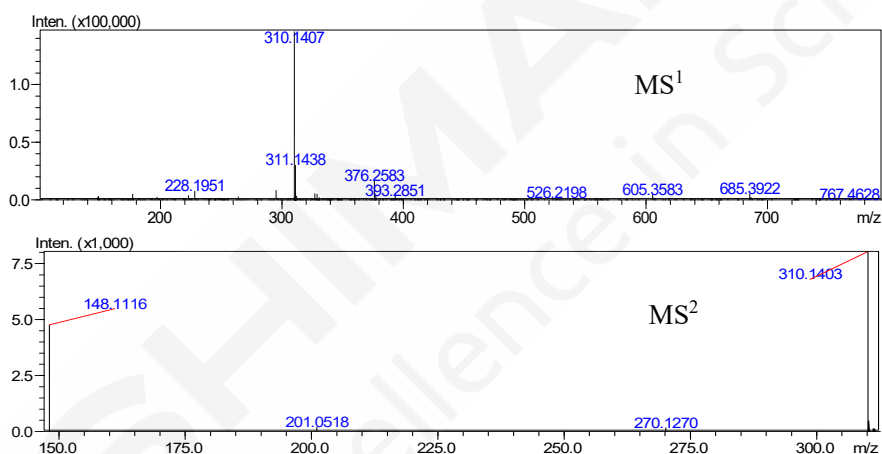


图 12. 杂质 2 的 MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 质谱图

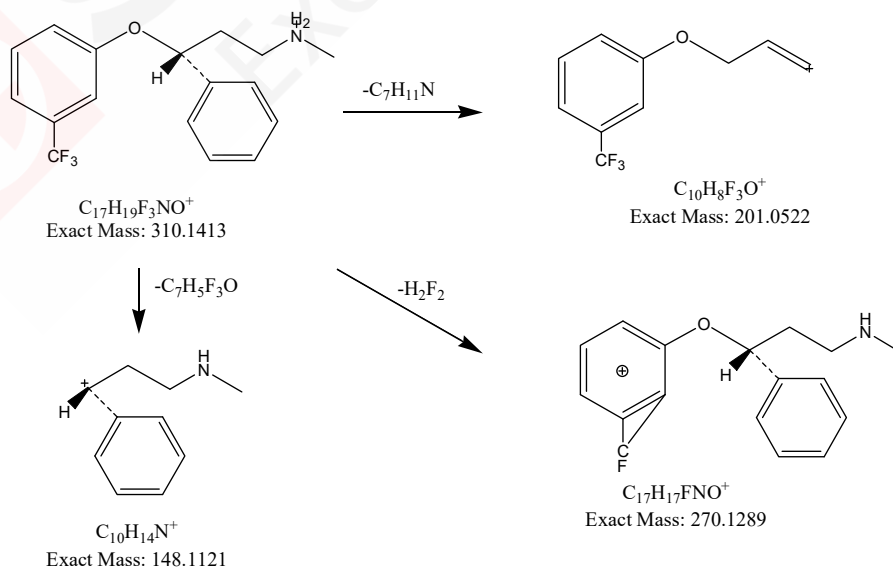


图 13. 杂质 2 可能的结构及其裂解规律

## 2.5 杂质3结构鉴定

与杂质1的鉴定过程类似,杂质3切换到定量环转至捕集柱脱盐分析,左阀切阀时间为14.20-14.42 min。在线脱盐后二维启动梯度洗脱程序。对比溶剂空白和杂质3的质谱BPC图(图14),确认杂质3在质谱中出峰时间为25.26 min。杂质3的一级和二级质谱图如图15所示。杂质3的MS<sup>1</sup>质谱图中m/z 324.1566,经Insight Explore精确分子式预测软件推测其分子式为C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NOF<sub>3</sub>,比主峰多一个亚甲基。MS<sup>2</sup>质谱图中可见91、117等与主峰共有的特征碎片,低碰撞能下基峰为162与主峰中对应的基峰148相比多了14。查阅文献,杂质3可能是二甲胺结构,为已报道杂质。其可能的裂解规律见图16。

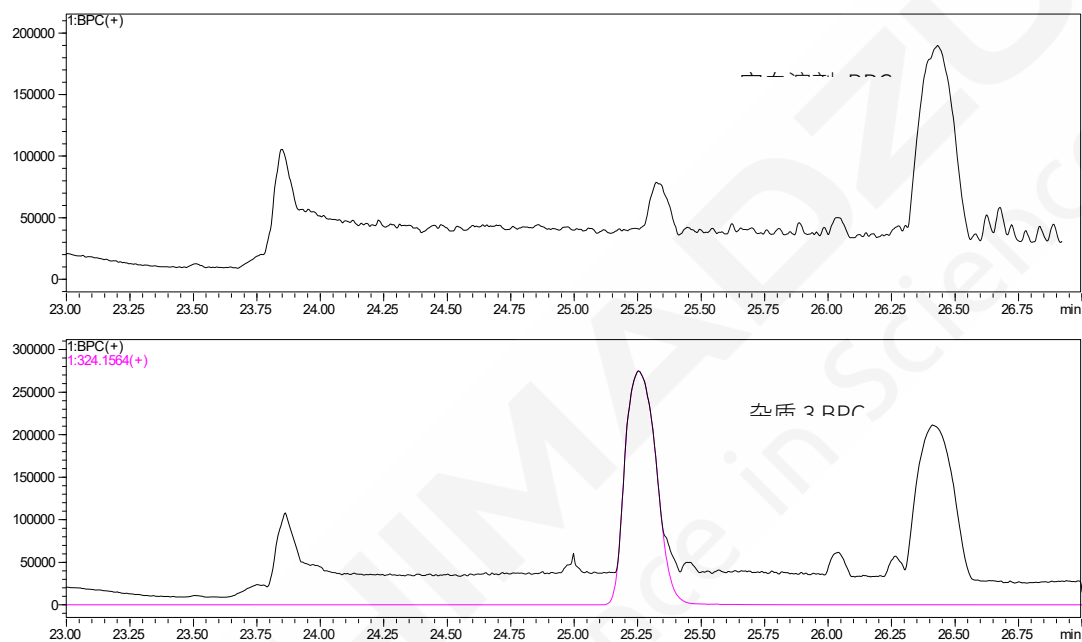


图14. <LC 2<sup>nd</sup>D>空白溶剂及杂质3的BPC质谱图

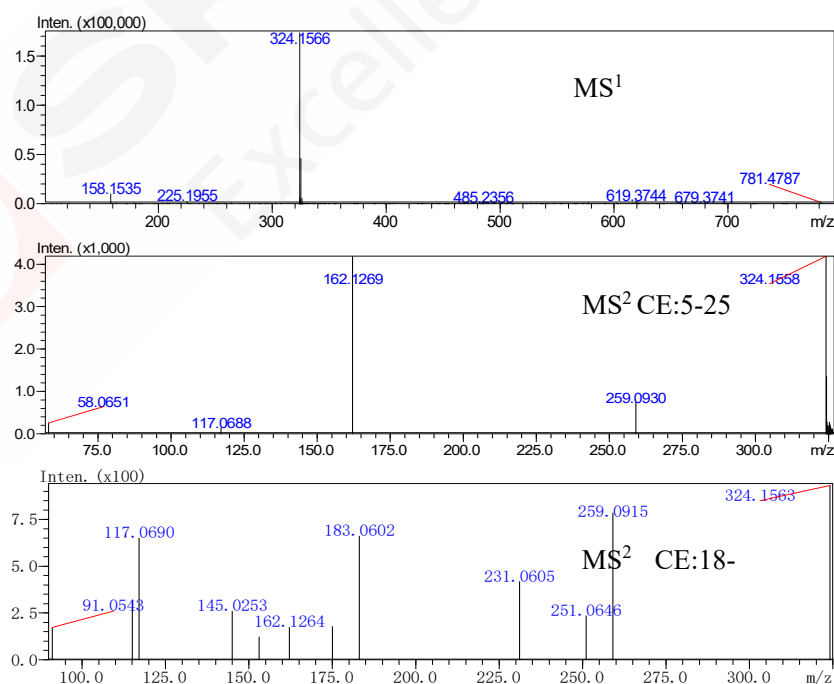


图 15. 杂质 3 的 MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 质谱图



脱并切入废液。实现了目标峰指针性的快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程，即在不改变原流动相条件的基础上，实现了液质联用鉴定目标杂质。

但是对于辛烷磺酸钠、乙酸钠等有机非挥发离子，这些物质在ODS柱上保留强呈拖尾峰，在离子源上生成簇离子，质谱信号强且持久，使用传统在线脱盐技术无法有效去除，离子对的存在将抑制目标物的电离，且污染仪器。本文使用聚合物氨基柱，通过阴离子交换可有效在线去除无机和有机阴离子。流动相空白的高分辨质谱图中未见辛烷磺酸钠的响应，表明本法切实可行。聚合物氨基柱容量高，每天仅需清洗活化一下，因此本系统可连续进样和自动清洗活化。

### 3.3 RP1-WAX-RP2系统的优点

本文设计的RP1-WAX-RP2系统，与已报道的二维流路相比，优点如下：1) 待机及清洗时三只色谱柱在各自的流动相下平衡，各流动相持续送液不中断。2) 使用B2清洗活化氨基柱时，B2只能定向导入到氨基柱，从设计上杜绝了B2进二维柱的可能性，防止二维柱损坏。3) 二维泵采用二元高压模式，比四元低压模式的延迟体积小，可快速洗脱杂质。同时采用梯度洗脱的方法可有效分离杂质和流动相干扰离子。4) 目标物从氨基柱导入二维柱后，可将氨基柱切出二维系统，进一步降低梯度延迟体积。同时由于聚合物氨基柱耐压仅5 MPa,将氨基柱切出后，即可提高二维柱的流速或使用工作压力稍高的色谱柱。

### 3.4 RP1-WAX-RP2系统的局限性

本系统仅适用于阳离子目标杂质的鉴定，如未知杂质是阴离子将无法鉴定。

## 4 结论

本文建立了在线二维液相RP1-WAX-RP2-QTOFMS系统，在不改变一维流动相的前提下，对杂质峰进行切割导入氨基柱。利用阴离子交换原理，在线去除离子对试剂和缓冲盐，进而导入二维进行高分辨质谱鉴定。本系统成功用于盐酸氟西汀中的三个杂质结构鉴定，发现一个新杂质和两个已知杂质。本法有望在抗生素及化药杂质鉴定领域推广。

# 超临界流体色谱系统在原料药杂质分析中的应用

**摘要：**本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离，通过考察多种色谱柱和流动相组合，DAICEL DCpak SFC-A 和乙醇为流动相时可获得主药和杂质的最佳分离效果。在此基础上建立杂质 SFC 分析方法，结果显示杂质在 50~500 mg/L 线性良好，保留时间和峰面积重复性 RSD 在 0.2%和 1.5%以内。

**关键词：**Nexera UC SFC 药物杂质

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是以超临界流体为主要流动相，添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界 CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) 以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFC 常用的主要流动相。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

本实验使用的岛津 Nexera UC SFC-UV 系统属于岛津最新的超临界流体色谱仪系列产品，具有系统耐压高、背压阀 (BPR) 内部体积小、灵敏度高、操作界面通用性好等特点。本实验对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离，通过考察多种色谱柱和流动相组合获得最优分析条件，并建立杂质 SFC 分析方法，结果显示线性和重复性等表现良好，可为进一步开展该类药物定性定量研究提供分离方法的参考。《中国药典 (2015 版)》首次收载超临界流体色谱法 (四部 0531 法) 作为药物分析的可选方法，岛津 Nexera UC 系统可为相关药物的 SFC 分析方法建立提供帮助。

## 1. 实验条件

### 1.1 仪器

Nexera UC SFC-UV 系统，具体配置为：LC-30ADSF (CO<sub>2</sub> 输液泵)，LC-20ADXR (输液泵，含 LPGU 低压梯度比例阀)，DGU-20A<sub>5</sub> (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，SFC-30A (背压调节单元)，SPD-20A (紫外检测器)，CBM-20A (系统控制器)，LabSolutions Ver5.8 (色谱工作站)。

### 1.2 样品信息

二乙酰鸟嘌呤是重要的医药中间体，杂质检测是其质量控制的关键。该化合物在常用溶剂中溶解性差，并且遇水分解，使得常规的 RP-HPLC 分析不能实现。本实验中以少量 DMSO 溶解该样品后再以 DMSO-ACN (1:1, v/v) 稀释，经过滤后进样分析。

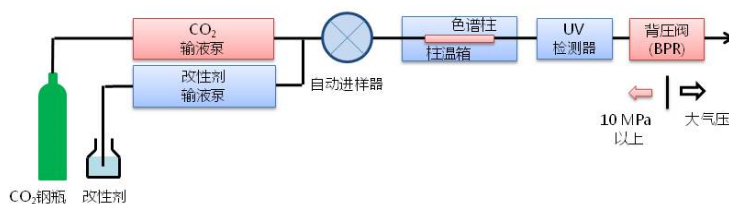


图 1 Nexera UC SFC-UV 系统

表 1 化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	乙酰基鸟嘌呤	N2-Acetylguanine	19962-37-9	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
2	二乙酰鸟嘌呤	N(2),9-Diacetylguanine	3056-33-5	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>

## 2. 结果与讨论

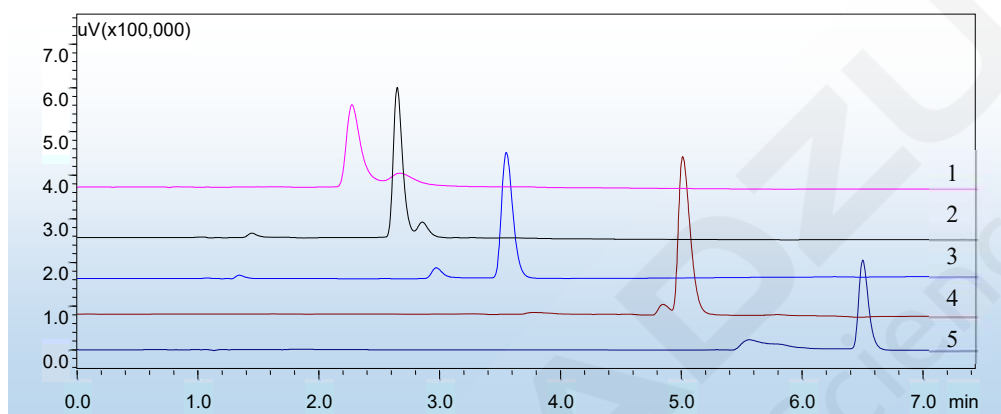


图 2 甲醇为改性剂时不同色谱柱分离效果对比 (检测波长: 264 nm)

1.ODS-P, 2.ODS-4, 3.OD-H, 4.SIL, 5.SFC-A

### 2.1 色谱柱填料对分离的影响

实验考察了 GL science ODS-P、ODS-4、SIL 及 Daisel 的 OD-H 和 SFC-A 五款色谱柱, 所用规格均为 4.6 mm I.D. × 250 mm L, 5 μm。在 scCO<sub>2</sub>-MeOH 体系中对样品进行分析, 结果显示 ODS-P、ODS-4 和 SIL 对样品中主成分和杂质分离度不佳, OD-H, SFC-A 对该样品中两种成分的分离效果较前三款色谱柱好, 如图 2 所示。对比 OD-H, SFC-A 发现, SFC-A 虽然对主成分前的杂质峰形表现较差, 但对该杂质的响应优于其在 OD-H 色谱柱上的表现。

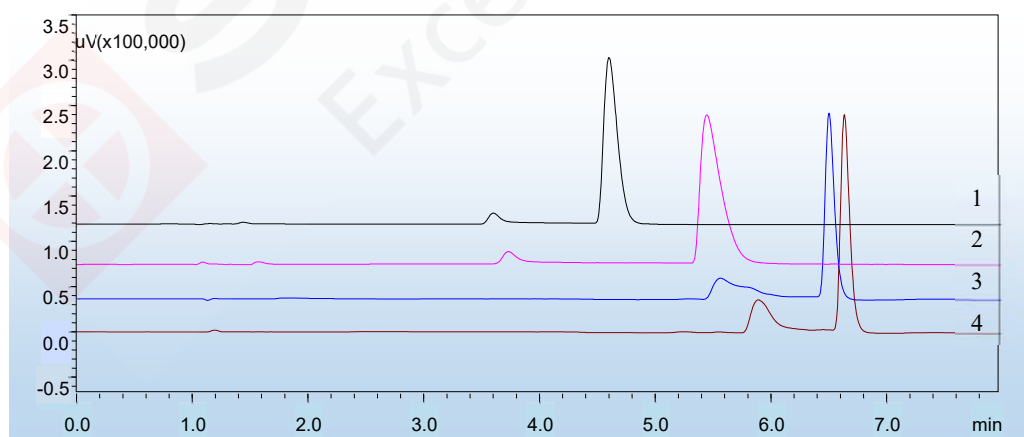


图 3 甲醇和乙醇作为改性剂时分离效果对比 (检测波长: 264 nm)

1.OD-H-甲醇, 2.OD-H-乙醇, 3.SFC-A-甲醇, 4.SFC-A-乙醇

### 2.2 流动相对分离的影响

SFC 分析中, scCO<sub>2</sub> 和少量改性剂构成的混合流体对化合物的色谱保留行为具有显著影响, 因此

在色谱柱筛选的基础上对流动相进行优化，分别选择 scCO<sub>2</sub>-MeOH 和 scCO<sub>2</sub>-EtOH 在 OD-H 和 SFC-A 色谱柱上进行分析。结果显示在 SFC-A 色谱柱上以 scCO<sub>2</sub>-EtOH 进行分离时，无论是分离度还是杂质响应均为最佳，因此选择该条件为二乙酰鸟嘌呤样品的分析条件。

超临界流体色谱中，分离系统背压和柱温通常也是考察的关键。增高背压和提高温度可以改变超临界体的密度和粘度，进而改变洗脱能力和洗脱效果。本实验中，背压和柱温对实验结果影响并不显著，故在此未列出。

### 2.3 SFC色谱条件

色 谱 柱 : DAICEL DCpak SFC-A 4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm  
 流 动 相 : A-scCO<sub>2</sub>; B-乙醇 流 速 : 3 mL/min  
 柱 温 : 40°C 检 测 波 长 : 264 nm  
 背 压 : 10 MPa 进 样 量 : 1 μL  
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 起始比例5%B, 时间程序见表2所示

表2 梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
3	Pump	Pump B Con.	12
6	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	5
10	Controller	Stop	

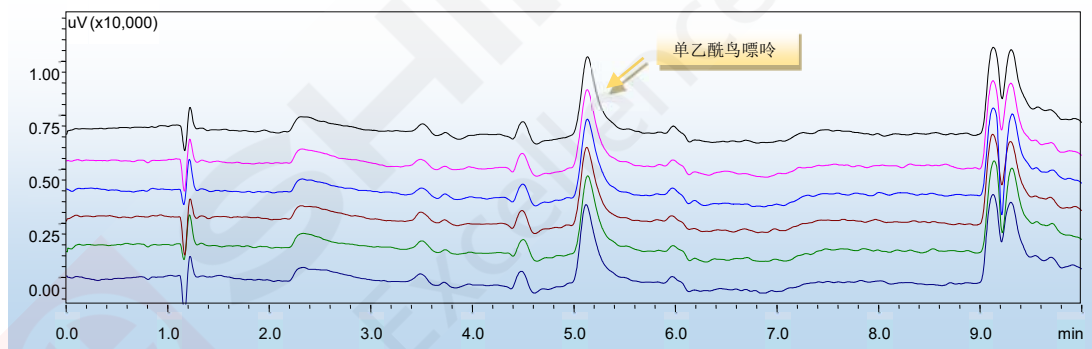


图4 杂质单乙酰鸟嘌呤 (50 mg/L) 重复性分析色谱图 (n=6)

表3 单乙酰鸟嘌呤 (50 mg/L) 重复性分析结果 (n=6)

	保留时间 (min)	峰面积
1	5.135	34,567
2	5.132	33,970
3	5.134	34,476
4	5.128	34,480
5	5.137	33,973
6	5.121	35,047
平均值	5.131	34,419
RSD%	0.11	1.18

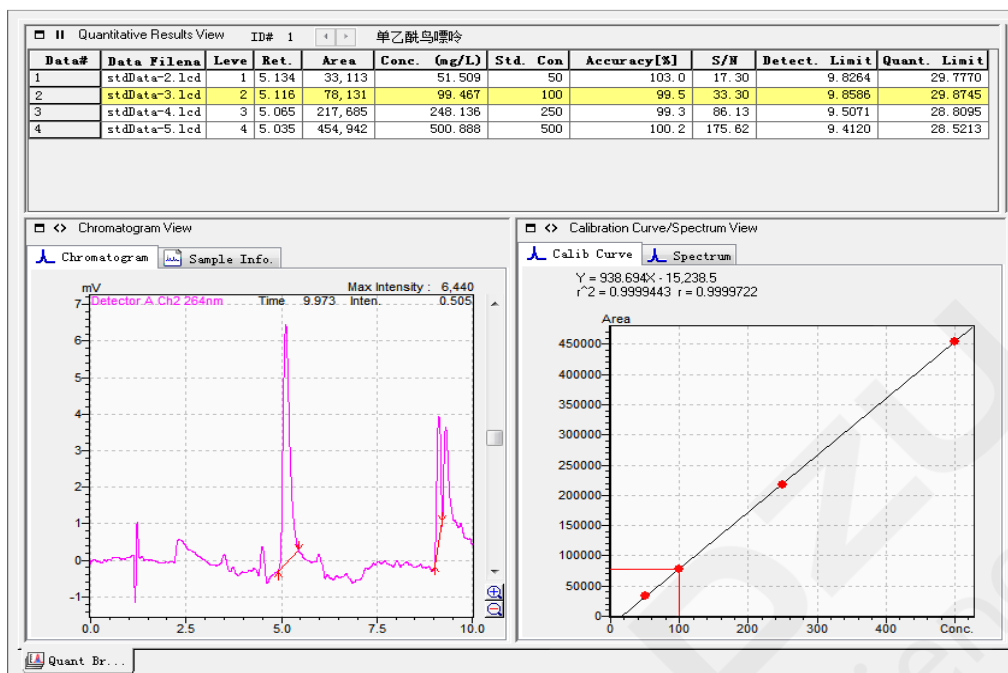


图5 单乙酰鸟嘌呤标准曲线及参数

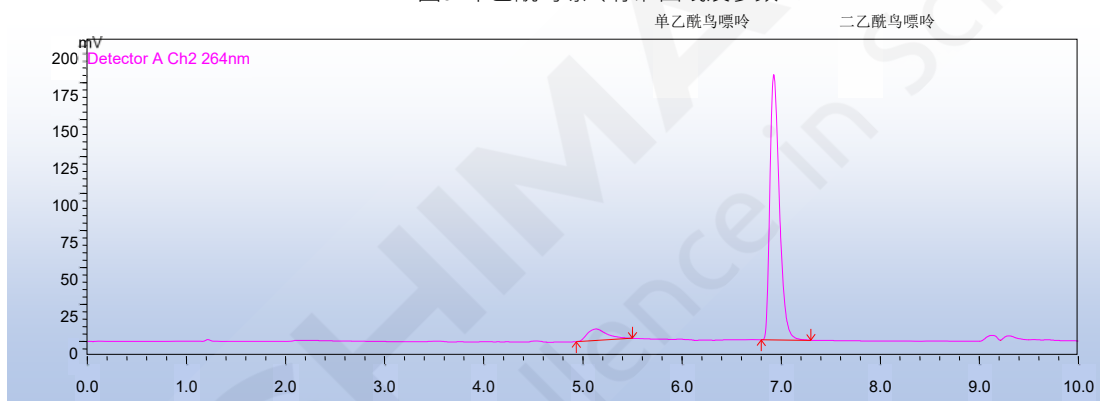


图6 二乙酰鸟嘌呤样品分析结果

### 3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对药物中间体二乙酰鸟嘌呤中的杂质进行分析，有效避免使用反相色谱分析中该药物不稳定遇水分解的可能，并且 SFC 系统分析速度快、重现性好、灵敏度高、溶剂消耗少并且安全环保，另外使用  $scCO_2$ 、甲醇、乙醇、乙腈等做流动相时和质谱联用也不存在任何障碍，方便 SFC 方法直接移植成为 SFC-MS 方法，可进一步提升检测灵敏度和扩展应用领域。

## 1.2 遗传毒性杂质分析

# 三重四极杆气质联用法同时测定药品中八种磺酸酯类基因毒性杂质

**摘要:**建立了气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)同时测定药品中八种磺酸酯类基因毒性物质的分析方法。结果表明:在1~200 μg/L的范围内,各组分线性相关系数r均在0.9993以上。对10 μg/L的磺酸酯类标准溶液进行重复性实验,各组分峰面积的相对标准偏差(RSD%)均在5%在以下,在1.0和10.0 μg/g的加标水平下,各组分的加标回收率分别在74.21%~81.72%和88.33%~101.60%之间。此方法可为药品中磺酸酯类物质检测提供参考。

**关键词:** GC-MS/MS 磺酸酯 基因毒性杂质

近几年,基因毒性杂质成为人们关注的焦点,甲磺酸、苯甲磺酸等磺酸类物质与微量的低级醇在合成反应中生成烷基磺酸酯如甲磺酸甲酯(MMS)、甲磺酸乙酯(EMS)、以及一些芳基磺酸酯。这些物质可与DNA发生烷基化反应,从而可能成为引发癌症的诱因,因此控制药物中该类杂质的含量显得尤为重要

传统的检测方法有顶空衍生法和直接进样法。顶空衍生法操作简单,可以较好的排除复杂基质的干扰,但是顶空衍生的过程中也可能有假阳性的衍生物产生,对测定造成干扰;传统的直接进样(GC-FID)方法不稳定,容易引进污染物,重现性较差,干扰测定。相比而言,GCMS联用技术应用较为普遍,可以较好地应用于磺酸酯类杂质的检测,但有些药品往往基质较为复杂,对样品的测定也会有较大的干扰,本文采用岛津GCMS-TQ8040三重四级杆气质联用仪,建立了一种同时测定药品中八种磺酸酯类方法,该方法处理简单,化学干扰小,灵敏度高。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

三重四极杆气质联用仪: GCMS-TQ8040

### 1.2 分析条件

色谱柱: Intercap 35, (30m×0.25 mm×0.25μm)	进样口温度: 260°C
柱温程序: 50°C(1min)_15°C/min_260°C(1min)	进样方式: 不分流进样 (1min)
载气控制方式: 恒线速度 (47.2 cm/sec)	离子源温度: 230°C
接口温度: 280°C	检测器电压: 调谐电压+0.4kV
采集方式: MRM (采集参数见表1)	

表 1 八种磺酸酯类化合物的 MRM 参数

No	中文名称	CAS 号	定量 离子对	CE	定性 离子对 1	CE	定性 离子对 2	CE
1	甲磺酸甲酯	66-27-3	80.00>65.00	9	109.00>79.00	6	80.00>63.00	21
2	甲磺酸乙酯	62-50-0	109.00>79.00	6	109.00>79.00	3	97.00>79.000	12
3	甲磺酸异丙酯	926-06-7	123.00>79.00	9	123.00>59.00	3	97.00>79.00	9
4	苯磺酸甲酯	80-18-2	77.00>51.00	15	141.00>77.00	9	172.00>77.00	27
5	苯磺酸乙酯	515-46-8	141.00>77.00	9	77.00>51.00	15	141.00>95.00	6
6	对甲苯磺酸甲酯	80-48-8	91.00>65.00	12	155.00>91.00	15	186.00>91.00	18
7	对甲苯磺酸乙酯	80-40-0	155.00>91.00	15	91.00>65.00	12	200.00>91.00	27
8	对甲苯磺酸异丙酯	2307-69-9	91.00>65.00	15	155.00>91.00	155	172.00>107.00	15

### 1.3 样品前处理

可溶于有机溶液药品：称取药品粉末0.05 g于试管中，准确加入2 mL乙酸乙酯，充分振荡，超声提取20min。水溶性药品：称取药品粉末0.05 g于试管中，准确加入2 mL甲醇：水（体积比为5:1）充分振荡，超声提取10min，再以2 mL乙酸乙酯充分超声提取，过无水硫酸钠，将以上处理液，过滤膜，上机分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准样品的MRM图谱

混标溶液（100 μg/L）MRM图谱见图1，MRM质量色谱图如图2所示。

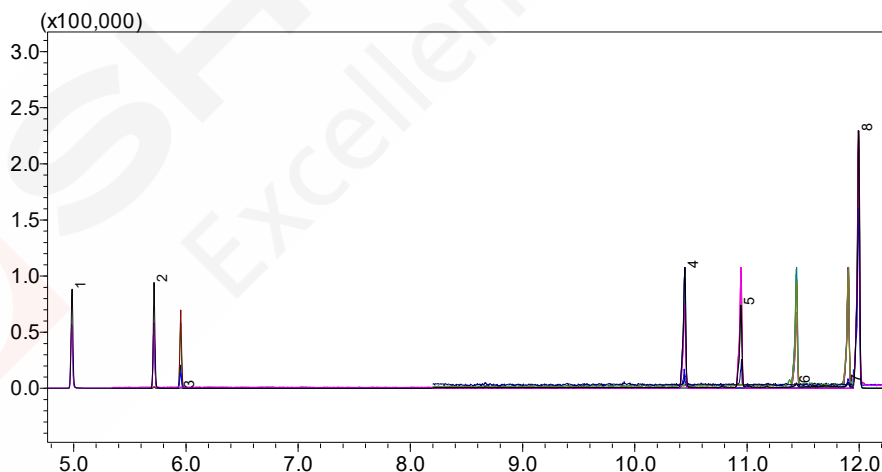


图1 混合标准溶液MRM图（100 μg/L）

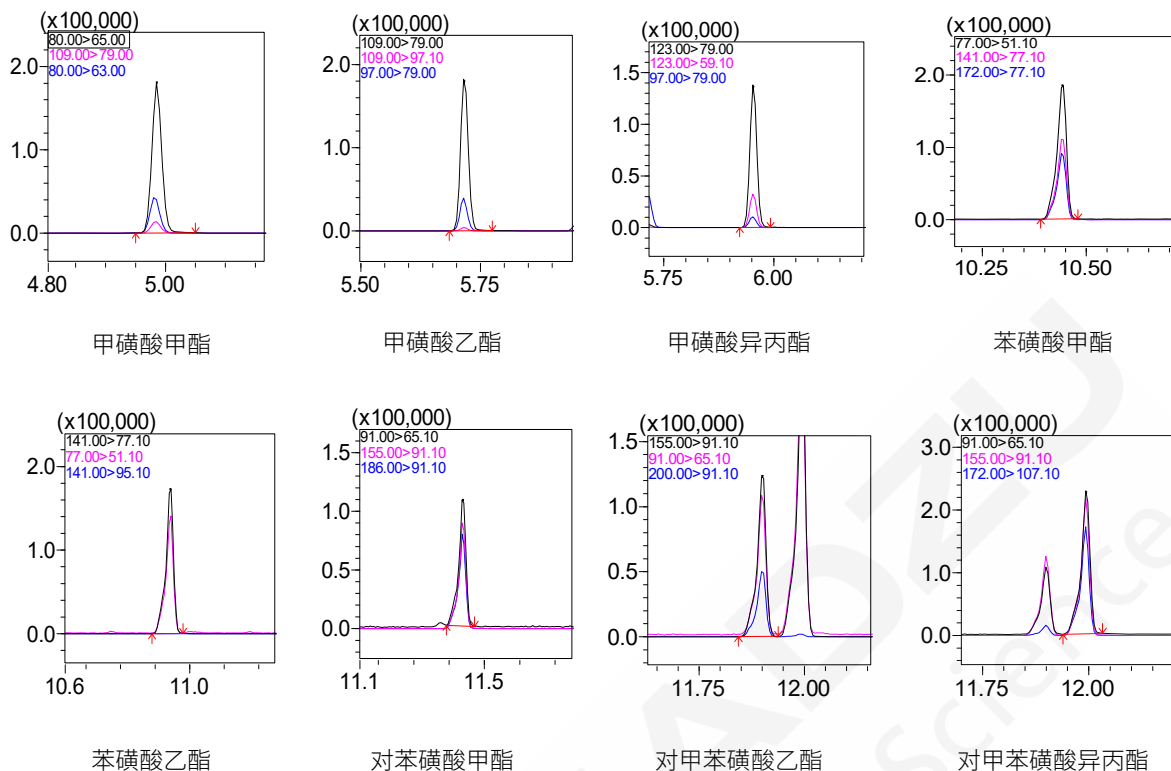


图2 混合标液MRM质量色谱图

## 2.2 标准曲线与检出限

配制八种磺酸酯类标准溶液混合标液，八种化合物目标组分浓度为1、10、20、50、100、200  $\mu\text{g/L}$ ，以目标组分浓度为横坐标，目标组分峰面积纵坐标，绘制标准曲线，线性相关系数和检出限见表2，由于篇幅有限，仅列出部分化合物标准曲线。

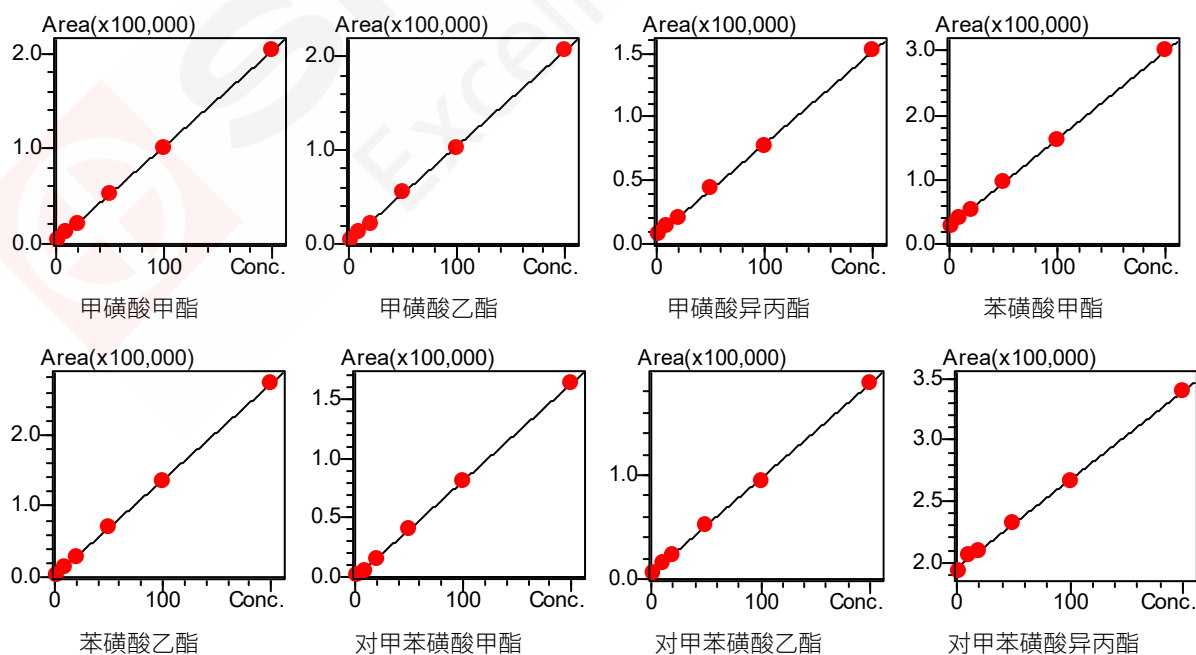


图2 八种磺酸酯化合物标准曲线

表2 八种磺酸酯化合物线性相关系数和检出限

No.	化合物名称	相关系数 R	检出限 (µg/L)
1	甲磺酸甲酯	0.9999	0.02
2	甲磺酸乙酯	0.9999	0.02
3	甲磺酸异丙酯	0.9998	0.04
4	苯磺酸甲酯	0.9998	0.51
5	苯磺酸乙酯	0.9999	0.05
6	对甲苯磺酸甲酯	0.9999	4.58
7	对甲苯磺酸乙酯	0.9998	0.05
8	对甲苯磺酸异丙酯	0.9993	0.13

### 2.3 重复性结果

对10 µg/L的标准样品, 重复进样6次, 各组分峰面积及RSD%见表3。

表3 重复性实验结果 (n=6)

No.	化合物	峰面积						RSD%
		1	2	3	4	5	6	
1	甲磺酸甲酯	10311	10905	10554	10739	10998	11149	2.85
2	甲磺酸乙酯	11051	11558	11443	11702	11887	11921	2.79
3	甲磺酸异丙酯	11648	11598	11141	11060	11661	12106	4.57
4	苯磺酸甲酯	32364	34419	31846	33204	32478	32706	2.72
5	苯磺酸乙酯	10475	10685	10996	10811	11308	11490	3.50
6	对甲苯磺酸甲酯	4768	4841	4967	4873	4644	4565	3.13
7	对甲苯磺酸乙酯	9903	10238	10972	10492	10879	10341	3.84
8	对甲苯磺酸异丙酯	101566	108335	102831	104506	108168	109131	2.35

### 2.4 样品测试结果及回收率

选取市售某品牌药品, 按 1.3 处理方法进行样品前处理和上机测定, 并在样品空白中添加混标, 加标浓度为 1.0 µg/g 和 10.0 µg/g, 各自平行处理 3 份, 样品测定结果以及加标回收率结果见表 4。

表4 样品测试结果及加标回收率

No.	化合物名称	样品浓度 (µg/g)	加标浓度 1.0 µg/g		加标浓度 10.0 µg/g	
			平均回收率 (%)	RSD%	平均回收率 (%)	RSD%
1	甲磺酸甲酯	N.D	81.72	3.16	99.14	1.81
2	甲磺酸乙酯	N.D	80.05	3.02	101.60	1.63
3	甲磺酸异丙酯	N.D	74.21	1.47	99.25	1.32
4	苯磺酸甲酯	N.D	74.99	3.65	88.33	0.33
5	苯磺酸乙酯	N.D	74.78	3.53	93.58	1.73
6	对甲苯磺酸甲酯	N.D	78.93	3.30	93.00	2.39
7	对甲苯磺酸乙酯	N.D	74.09	1.64	96.24	0.90
8	对甲苯磺酸异丙酯	N.D	79.72	1.16	88.97	1.81

注: N.D 为未检出

### 3 结论

采用岛津公司三重四极杆气相色谱质谱联用仪 (GCMS-TQ8040) 分析药品中的磺酸酯类基因毒性杂质, 在 1~200  $\mu\text{g/L}$  标准曲线范围内, 相关系数 R 均在 0.999 以上, 连续进样 6 次各组分峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 均在 5% 在以下, 在 1.0  $\mu\text{g/g}$  和 10.0  $\mu\text{g/g}$  的加标水平下, 各组分的加标回收率分别在 74.21%~81.72% 和 88.33%~101.60% 之间, 此方法操作简单, 灵敏度高, 可为药品中磺酸酯类物质检测提供参考。



# 三重四极杆气质联用法测定沙坦类药物中六种 N-亚硝胺含量

**摘要：**本文建立了三重四极杆气质联用仪测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质含量的方法。结果表明：在 1~50 ng/mL 的浓度范围内，6 种 N-亚硝胺的线性相关系数  $r$  为 0.999 以上，线性关系良好。将对照品溶液重复进样 6 次，峰面积 RSD% 小于 10%，定量离子信噪比大于 30，定性离子信噪比 10，满足欧洲药典质量控制要求。实际样品在 30 ng/g 的加标水平下，加标回收率为 90%~105%。本方法参考欧洲药典 GC-MS/MS 法检测沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺相关标准，可为沙坦类药物中 N-亚硝胺类基因毒性杂质的测定提供参考。

**关键词：**三重四极杆气质联用仪，N-亚硝胺，沙坦类药物，基因毒性杂质

N-亚硝胺，是遗传毒性杂质的一种，属于 2A 类致癌物。N-亚硝胺是一种常见的污染物，在水和食品中，包括熏肉和烤肉、奶制品中均有发现。最早在药品中被发现是 2018 年 7 月，EMA 发布公告称其在抗压药缬沙坦中检出 NDMA，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。FDA、中国药典接连发布了相关检测标准，从最早采用顶空+GCMS 法检测 2 种 N-亚硝胺，之后使用 GC-MS/MS 法检测 5 种亚硝胺，岛津公司均及时发布了相应解决方案。

2020 年 4 月欧洲药典发布了三种不同仪器检测沙坦类药物中 N-亚硝胺的征求意见稿。本文参考该征求意见稿，开发了 GC-MS/MS 法测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺检测方法，使用本征求意见稿方法，前处理净化效果好，可检测的 N-亚硝胺种类更多。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

三重四极杆气相色谱-质谱联用仪：GCMS-TQ 8050 NX

### 1.2 分析条件

色谱柱：Rtx 624Sil MS, (60 m×0.32 mm×1.8 μm)	进样方式：不分流进样
柱温程序：40°C(1 min)_40°C/min_180°C_20°C/min_300°C(2 min)	离子源温度: 230°C
进样量：2 μL	接口温度: 300°C
载气控制方式：恒线速度 (36.1 cm/sec)	检测器电压：调谐电压+0.6kV
	采集方式：MRM (采集参数见表1)

### 1.3 样品前处理

准确称取 250 mg 沙坦类药物至 50 mL 离心管中，加入 10 mL 氢氧化钠溶液（称取 4 g NaOH，超纯水溶解，加入 5 mL 乙腈，并用超纯水定容至 100 mL），振摇 5 min，准确加入含内标 NEMA 的二氯甲烷溶液（内标含量为 10 ng/mL）2 mL，振摇 5 min 后，4000 r/min 离心 5 min，取下层有机层用 GC-MS/MS 分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 对照品溶液MRM图谱

准确称取样品 250 mg，添加混标，加标浓度为 30 ng/g(欧洲药典定量限)，按照 1.3 的方法进行样品前处理，得到的溶液作为对照品溶液 (Reference Solution)，上机浓度为 3.75 ng/mL，其 MRM 图见图 1，MRM 采集参数见表 1。

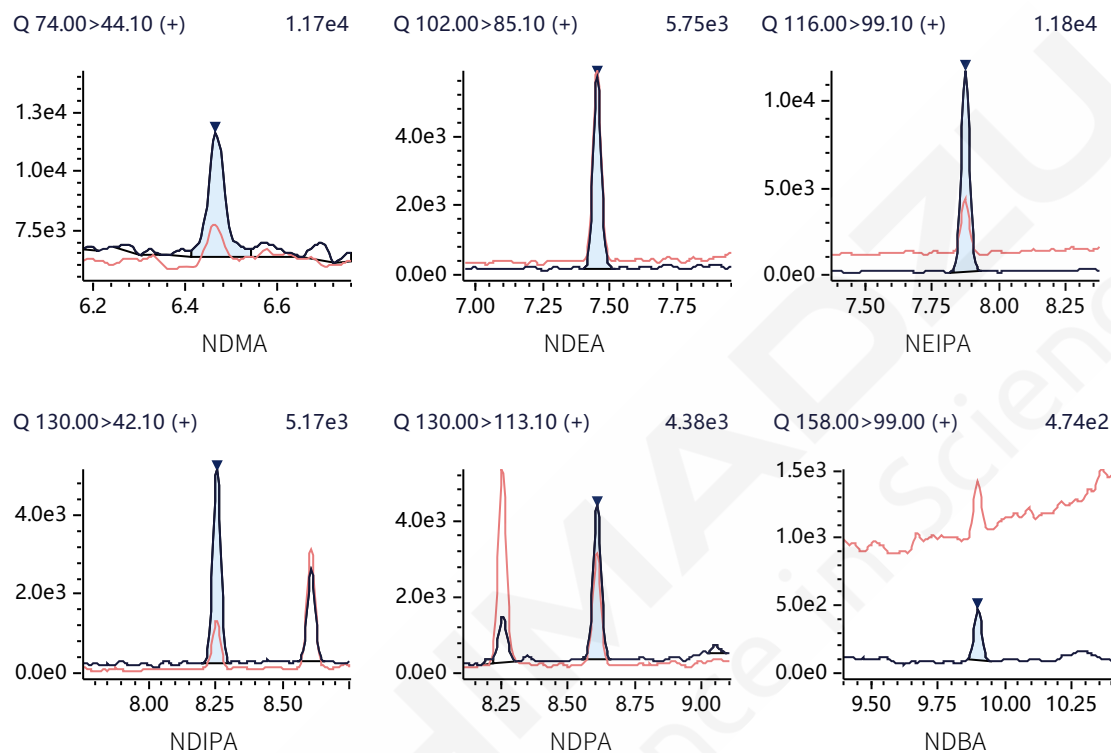


图 1 6 种 N-亚硝胺 MRM 图 (浓度为 3.75 ng/mL)

表 1 6 种 N-亚硝胺及内标 MRM 参数信息

No.	组分名称	保留时间 (min)	定量离子对(m/z)	碰撞电压 CE	定性离子对(m/z)	碰撞电压 CE
1	NDMA	6.455	74.00>44.10	6	74.00>42.10	24
2	NEMA (内标)	7.000	88.00>71.10	6	88.00>43.10	9
3	NDEA	7.460	102.00>85.10	10	102.00>56.10	18
4	NEIPA	7.885	116.00>99.10	6	116.00>44.00	15
5	NDIPA	8.270	130.00>42.10	9	130.00>113.00	3
6	NDPA	8.610	130.00>113.10	6	130.00>43.10	15
7	NDBA	9.905	158.00>99.00	9	158.00>141.20	6

### 2.2 标准曲线与检出限

按照对照品配制方法配制标准溶液，浓度分别为1、2.5、5、10、20、50 ng/mL，内标浓度为10 ng/mL。以目标组分与内标浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线，见图2。线性相关系数见表2，以1 ng/mL浓度标准溶液的3倍信噪比计算检出限，见表2。

### 2.3 欧洲药典质量控制要求

按照药典要求，将对照品溶液重复测试 6 次，要求定量离子峰面积 RSD%<20%，定量离子 S/N>10，

定性离子 S/N>3。对浓度为 3.75 ng/mL 的对照品溶液进行测试，结果为定量离子峰面积 RSD<7%，定量离子 S/N>30，定性离子 S/N>10，满足药典要求，具体结果见表 3。

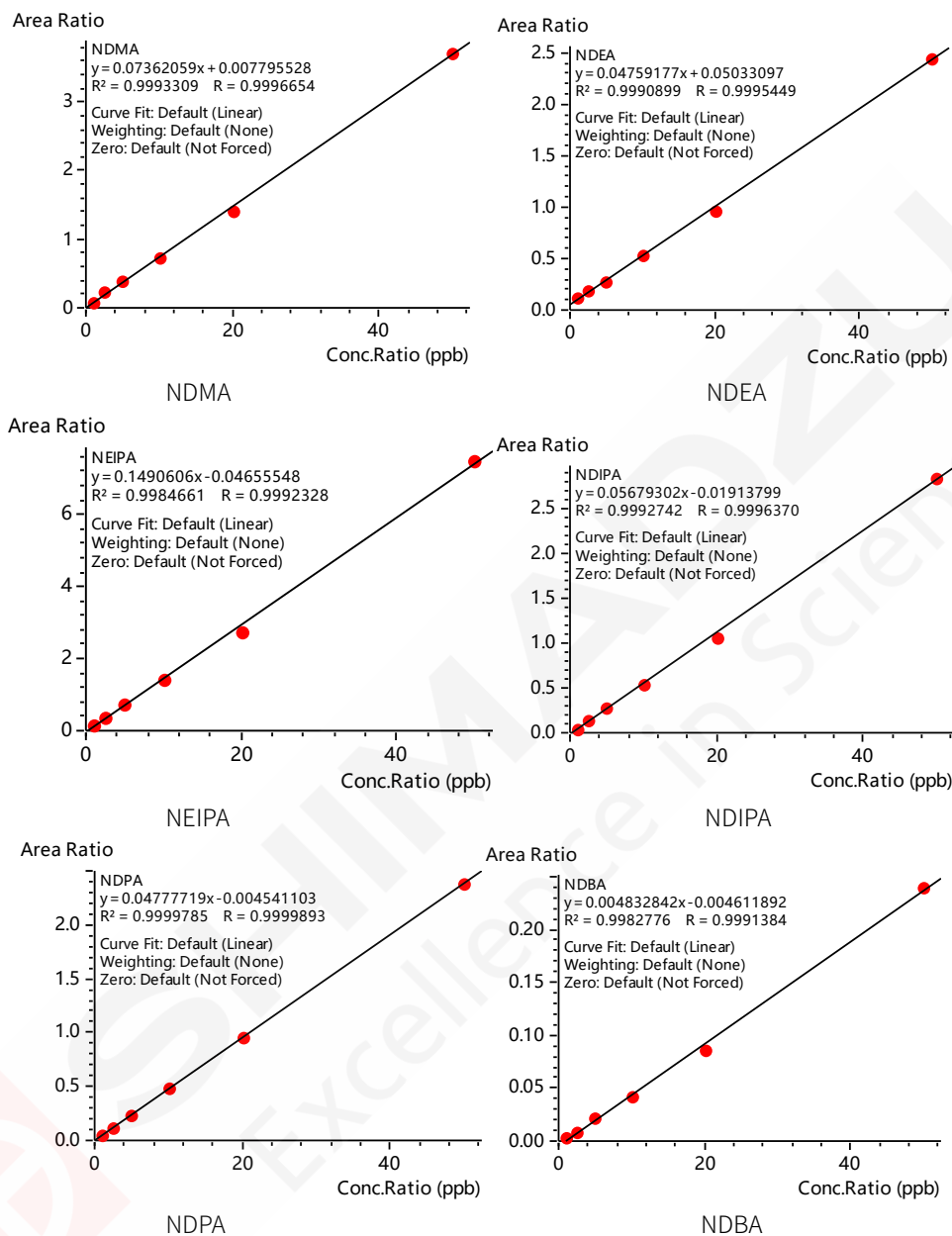


图2 6种N-亚硝胺校准曲线

表2 6种N-亚硝胺线性相关系数和检出限

No.	化合物名称	相关系数 r	S/N (1 ng/mL)	检出限 (ng/g)
1	NDMA	0.9996	12.06	0.249
2	NDEA	0.9995	129.94	0.023
3	NEIPA	0.9992	196.43	0.015
4	NDIPA	0.9996	80.51	0.037
5	NDPA	0.9999	33.28	0.090
6	NDBA	0.9991	16.81	0.178

表 3 峰面积相对标准偏差(n=6)及信噪比

No.	化合物	定量离子峰面积						RSD%	定量离子 S/N	定性离子 S/N
		1	2	3	4	5	6			
1	NDMA	14,662	12,462	13,774	12,794	14,027	14,076	5.61	38.6	14.04
2	NDEA	11,593	12,187	11,557	13,528	12,449	11,705	5.70	424.6	184.1
3	NEIPA	26,193	26,530	26,695	27,714	26,188	25,196	2.96	920.7	65.2
4	NDIPA	9,804	9,676	9,772	11,085	10,714	10,541	5.28	264.4	139.8
5	NDPA	8,503	9,207	8,930	9,282	8,868	8,728	3.09	171.9	132.1
6	NDBA	772	743	741	808	787	686	6.22	115.4	28.3

## 2.4 实际样品检测及加标回收

准确称取缬沙坦原料药样品 250 mg, 按照 1.3 的方法进行样品前处理, 得到实际样品上机溶液。准确称取样品 250 mg, 添加混合标准溶液, 加标浓度为 30 ng/g, 此浓度为欧洲药典定量限, 上机浓度为分别 3.75 ng/mL, 重复实验两次, 定量结果及回收率见表 4。

表 4 实际样品测试结果及加标回收率

No.	化合物	样品中浓度 (ng/g)	加标后浓度		平均回收率 (%)
			1	2	
1	NDMA	N.D	28.7	28.1	94.7
2	NDEA	N.D	32.1	28.8	101.5
3	NEIPA	N.D	29.7	28.1	96.4
4	NDIPA	N.D	31.9	30.8	104.6
5	NDPA	N.D	29.5	28.4	96.6
6	NDBA	N.D	32.9	29.1	103.4

## 3. 结论

本文建立了三重四极杆气质联用仪测定沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺类基因毒性杂质含量的方法。结果表明: 在 1~50 ng/mL 的浓度范围内, 6 种 N-亚硝胺的线性相关系数  $r$  为 0.999 以上, 线性关系良好。将对照品溶液 (3.75 ng/mL) 重复进样 6 次, 峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 小于 10%, 精密度良好, 满足欧洲药典质量控制要求。实际样品在 30 ng/g 的加标水平下, 加标回收率为 90%~105%。本方法参考欧洲药典 GC-MS/MS 法检测沙坦类药物中 6 种 N-亚硝胺相关标准, 可为沙坦类药物中 N-亚硝胺类基因毒性杂质的测定提供参考。

# 高效液相色谱应用于沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测

**摘要:** 本文以 Nexera LC-40 超高效液相色谱建立了厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法, 该方法定量限为 0.08 ppm, 重复性结果显示, NDMA 和 NDEA 保留时间和峰面积%RSD 均在 5.0% 以内, 重复性良好, 满足 ANSM French OMSL 法规的要求, 可以作为分析厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的选择。

**关键词:** LC-40 遗传毒性杂质 NDMA NDEA

遗传毒性杂质是一类能够直接或间接损害 DNA, 导致基因突变或产生癌症的物质, 包括磺酸酯、N-亚硝胺类等, 自从沙坦类原料药中报道检测出 N-亚硝基二甲胺 (NDMA) 和 N-亚硝基二乙胺 (NDEA), 社会广泛关注。各国监管机构 (FDA、EMA) 发布了关于 N-亚硝胺类遗传毒性杂质的液质和气质的相关检测方法。最新, ANSM French OMSL 发布了用液相色谱和紫外检测器进行 NDMA 和 NDEA 的检测方法, 该方法要求 5 ng/mL 标准品溶液 S/N 大于 10, 回收率为 90.0%-110.0%。

本文根据 ANSM 法规要求, 建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱进行沙坦类原料药中 NDMA 和 NDEA 的检测方法。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 X3 系统。具体配置为: LC-40B<sub>X3</sub> 输液泵, SIL-40C<sub>X3</sub> 自动进样器, CTO-40S 柱温箱, SCL-40 系统控制器, SPD-M40 光电二极管阵列检测器, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18-120, 250 mmL × 4.6 mm I.D., 5 μm  
(P/N:227-31020-06, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流 动 相 : A 相-甲醇/水(35/65, v/v); B 相-甲醇/水(25/75, v/v)

流 速 : 1.0 mL/min 波 长 : 228 nm

柱 温 : 30°C 洗 脱 程 序 : 梯度洗脱

进 样 量 : 50 μL

表 1. 梯度程序

Time (min)	Module	Command	Value
5	Pumps	Pump B Conc.	0
10	Pumps	Pump B Conc.	100
25	Pumps	Pump B Conc.	100
27	Pumps	Pump B Conc.	0
35	Controller	Stop	

## 2. 结果与讨论

### 2.1 专属性

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 进行对照品和样品溶液的制备。图 2 表明空白溶液在 NDMA 和 NDEA 出峰处无干扰，专属性良好。

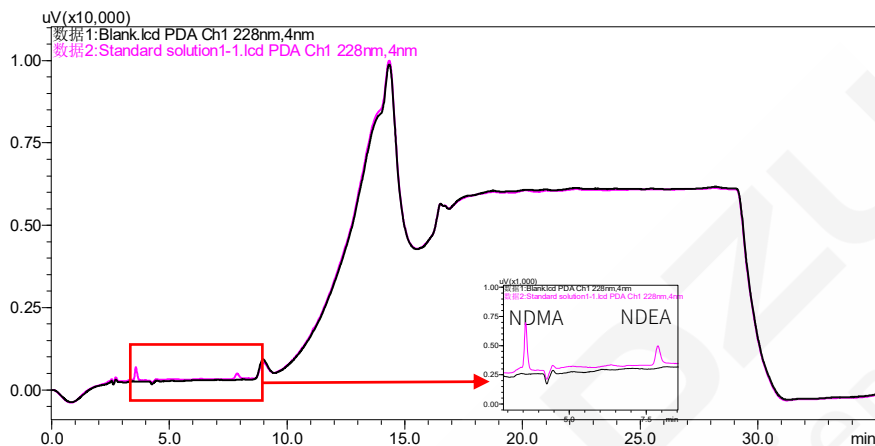


图 2. 专属性色谱图 (10 ng/mL 对照品溶液)

### 2.2 灵敏度

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 取浓度为 5 ng/mL 标准品溶液按照上述方法进样分析考察灵敏度，结果显示，NDMA 和 NDEA 的 S/N 分别为 29.8 和 15.6，均大于 10，满足法规要求。

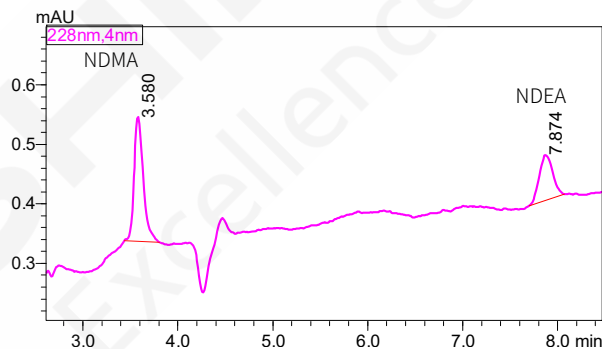


图 3. 灵敏度色谱图

### 2.3 重复性

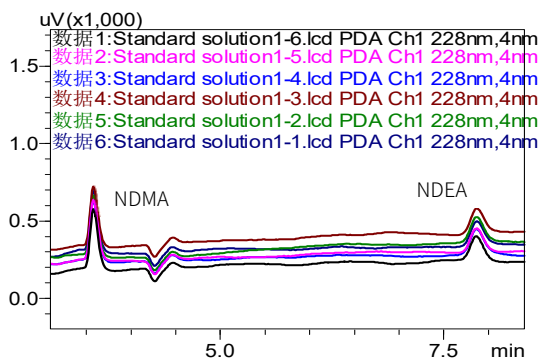


图 4. 10 ng/mL 对照品溶液进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

以浓度为 10 ng/mL 对照品溶液进行方法重复性考察，测定 6 次，结果如下。从图 4 中可以看出，NDMA 和 NDEA 连续进样 6 针，保留时间%RSD 分别为 0.01%和 0.04%，峰面积%RSD 分别为 0.85%和 3.7%，均在可接受范围内，重复性良好。

表 2. 重复性结果

	NDMA		NDEA	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	3.578	2449	7.873	1563
Injection-2	3.578	2413	7.872	1669
Injection-3	3.579	2419	7.869	1609
Injection-4	3.579	2449	7.868	1699
Injection-5	3.579	2450	7.864	1548
Injection-6	3.579	2468	7.869	1585
Average	3.579	2441	7.869	1612
RSD%	0.01	0.85	0.04	3.70

## 2.4 加标回收率

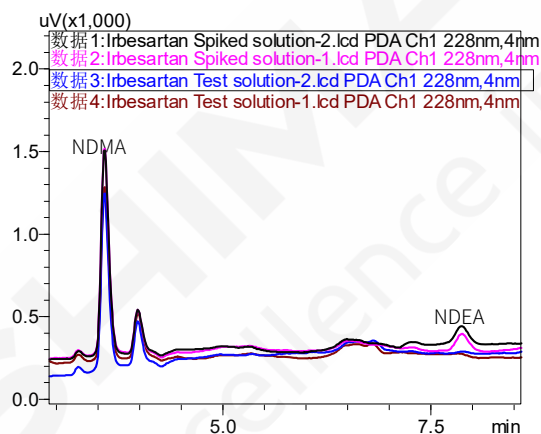


图 5. 样品加标溶液色谱图

根据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01，准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中，加入 1 mL 浓度为 25 ng/mL 对照品溶液，并加入 4 mL 稀释液（甲醇：水=35:65，v/v），震荡 5 min，超声 5 min，然后 4000 rpm 离心 5 min，取上清液作为样品加标溶液进样分析，进行加标回收率计算。NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2%和 107.8%，在 90.0-110.0%范围内，满足法规要求。

表 3. 样品加标回收率(n=2)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mL)	5.0 ng/mL	
		回收率%	RSD%
NDMA	28.4	103.2	1.9
NDEA	ND	107.8	1.2

## 2.5 实际样品分析

依据 ANSM French OMCL Method: 19A0416-01 要求, 采用液相色谱法进行分析。准确称取 300 mg 厄贝沙坦原料药样品至 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 稀释液 (甲醇: 水=35:65, v/v), 震荡 5 min, 超声 5 min, 然后 4000 rpm 离心 5 min, 取上清液作为样品溶液进样分析, 结果显示, 厄贝沙坦原料药样品 NDMA 浓度为 0.47 ppm, NDEA 为未检出。

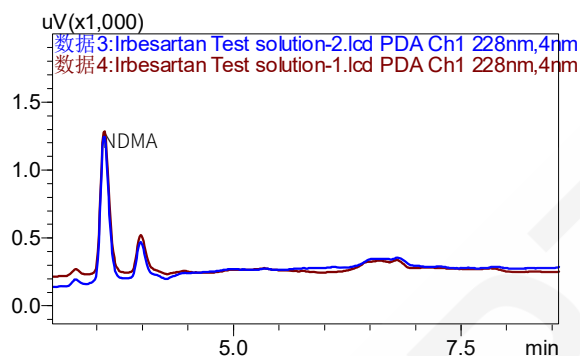


图 6. 样品溶液色谱图

表 4. 样品计算结果

#	称样量(mg)	NDMA			NDEA		
		峰面积	浓度(ng/mL)	含量(ppm)	峰面积	浓度(ng/mL)	含量(ppm)
对照品	/	2441	10	/	1612	10	/
样品 1	300.10	6,953	28.5	0.47	/	/	ND
样品 2	300.06	6,919	28.3	0.47	/	/	ND

## 3. 结论

根据 ANSM French OMSL Method 19A0416-01 建立了采用 Nexera LC-40 超高效液相色谱仪进行厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA 的分析方法。实验结果显示该方法专属无干扰、灵敏度为 0.08 ppm, 重复性结果显示 NDMA 和 NDEA 的保留时间%RSD 分别为 0.01%和 0.04%, 峰面积%RSD 分别为 0.85%和 3.7%, 重复性良好, NDMA 和 NDEA 加标回收率分别为 103.2%和 107.8%。Nexera LC-40 超高效液相色谱的低噪音、高灵敏度和高稳定可靠等特点可轻松应对 HPLC 方法检测厄贝沙坦原料药中 NDMA 和 NDEA。

# 三重四极杆液质联用法检测缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质

**摘要：** 本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA 和 NDBA 同时分析的方法。该方法采用外标法定量，六种亚硝胺类杂质线性相关系数均在 0.998 以上；六种亚硝胺类化合物定量限（LOQ）在 0.001~0.01 ppm 之间；3 ng/mL 标准溶液连续进样 8 次，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~0.27%和 1.28~4.61%之间；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 95.1~108.7%之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40%之间，方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

**关键词：** LCMS-8050三重四极杆液质联用系统 缬沙坦 亚硝胺类化合物

遗传毒性杂质（Genotoxic Impurities, GTI）又称基因毒性杂质，是指化合物本身直接或间接损伤细胞DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能，亚硝胺类化合物NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA及NDBA是常见的遗传毒性杂质。

缬沙坦是一款血管紧张素II受体拮抗剂抗高血压类药物，主要用于治疗高血压症、充血性心力衰竭、后心肌梗塞的药物。2018年以来，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝胺类化合物，引起社会的广泛关注，并给相关企业造成巨大损失。沙坦类药物作为高血压用药，具有服药时间长的特点，因此其中可能含有的亚硝胺类遗传毒性杂质将产生致癌风险，故需要进行严格的检测和管控。

目前FDA已公布沙坦类药物中亚硝胺类杂质的LC-HRMS和LC-MS/MS分析方法及相关的限度要求。本文采用岛津三重四极杆液质联用仪LCMS-8050，建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA和NDBA的分析方法，供相关检测人员参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵， DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，FCV-20AH 流路切换阀，CBM-20A 系统控制器，SPD-20A 紫外检测器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：ACE-C18-AR (4.6 mm I.D. × 150 mm L, 3 μm)

流动相：A 相-0.1%甲酸水； B 相-0.1%甲酸甲醇

流速：0.8 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	泵	B.Conc	30
8.50	泵	B.Conc	70
13.00	泵	B.Conc	75
13.10	控制器	Event	1*
14.00	泵	B.Conc	98
16.00	泵	B.Conc	98
16.10	泵	B.Conc	30
18.50	控制器	Event	0*
20.00	控制器	Stop	

注：\* “0” 表示流路切换至质谱，“1” 表示流路切换至废液；

LCMS-8050 质谱条件：

离子源	: APCI (+)	接口电压	: 4.0 kV
雾化气流速	: 3 L/min	加热模块温度	: 200°C
D L 温度	: 180°C	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
接口温度	: 300°C	干燥气流速	: 5.0 L/min
MRM 参数	: 见表 2		

表 2. MRM 参数

No.	名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	NDMA	62-75-9	75.10	43.15*	-14	-14	-17
				58.15	-14	-16	-24
2	NMBA	61445-55-4	147.10	117.15*	-11	-12	-20
				44.05	-11	-14	-19
3	NDEA	55-18-5	103.10	75.10*	-20	-15	-27
				47.20	-20	-19	-19
4	NEIPA	16339-04-1	117.10	75.10*	-14	-13	-16
				47.00	-14	-18	-21
5	NDIPA	601-77-4	131.00	89.10*	-10	-12	-10
				47.00	-10	-15	-19
6	NDBA	924-16-3	159.30	57.15*	-12	-15	-24
				103.00	-12	-14	-11

注：\*表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制

取六种亚硝胺类化合物混合标准贮备液 (50 mg/L)，用甲醇做溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、50 ng/mL 的标准系列工作溶液，待上机分析。

## 1.4 样品前处理方法

准确称取缬沙坦原料药400 mg至15 mL的离心管中，先加2 mL甲醇超声涡旋至原料药完全溶解，再加甲醇定容至4 mL，经0.22 μm滤膜过滤，取滤液上机分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准品MRM色谱图与缬沙坦UV图

为避免高浓度的缬沙坦原料药进入仪器，污染质谱，实验中六种亚硝酸胺杂质全部出峰后将液相流路切入废液。由于不同色谱系统的延迟体积的差异，六种亚硝酸胺杂质和缬沙坦的保留时间会发生变化，建议配置紫外检测器进行色谱图的监控。

按照 1.3 配制 10 ng/mL 的混合标准溶液上机分析，所得色谱图如图 1 上图所示，缬沙坦原料药按照 1.4 处理上机分析，通过紫外检测器（检测波长 254nm）监测缬沙坦色谱图如图 1 下图所示，从图中可以看出六种亚硝酸胺杂质与缬沙坦间分离度良好，NDBA 出峰后 13.1 min 开始切入废液，为避免切阀造成下一针进样的基线波动，18.5 min 将流路切入质谱。

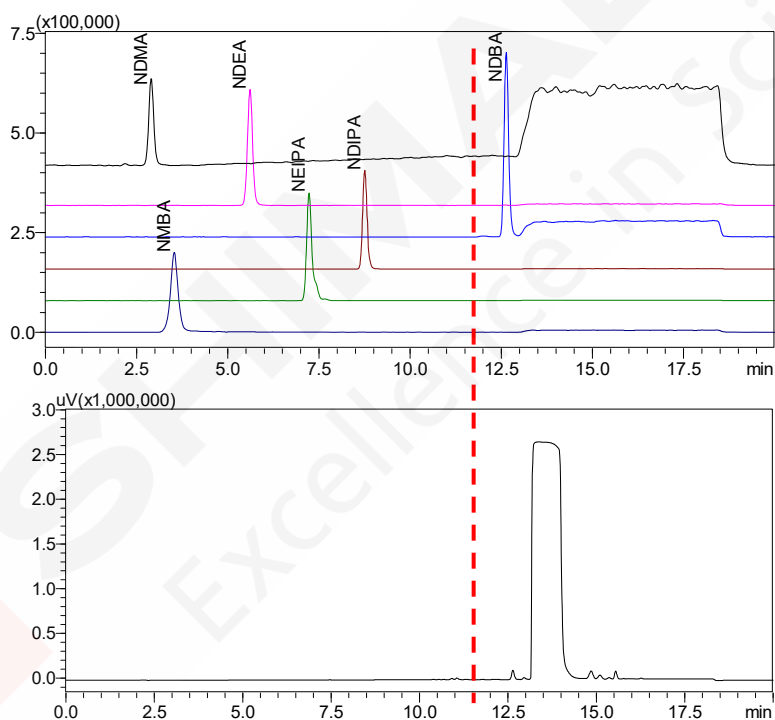


图 1. 标准品 (10 ng/mL) MRM 色谱图 (上) 与缬沙坦原料药 UV 图 (下)

### 2.2 线性范围

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液，以各目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数均大于 0.998，准确度在 90.6%-104.8% 之间。曲线结果如下图 2 所示。

### 2.3 灵敏度实验

配制一定浓度的标准溶液进行灵敏度测试，使用 USP 法计算 S/N，各化合物 LOQ (S/N=10) 在 0.1~1 ng/mL (0.001~0.01 ppm) 之间，具体色谱图如图 3 所示

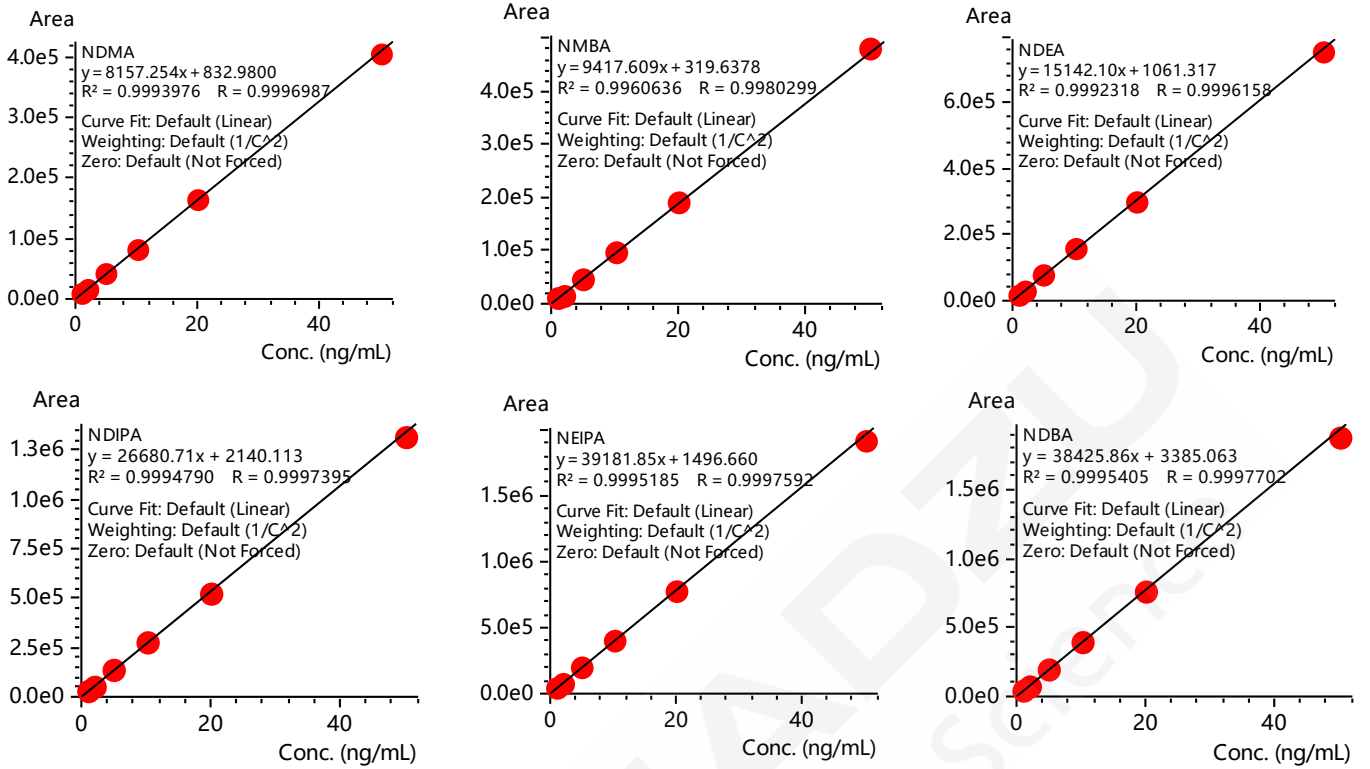


图 2. 亚硝胺类化合物标准曲线

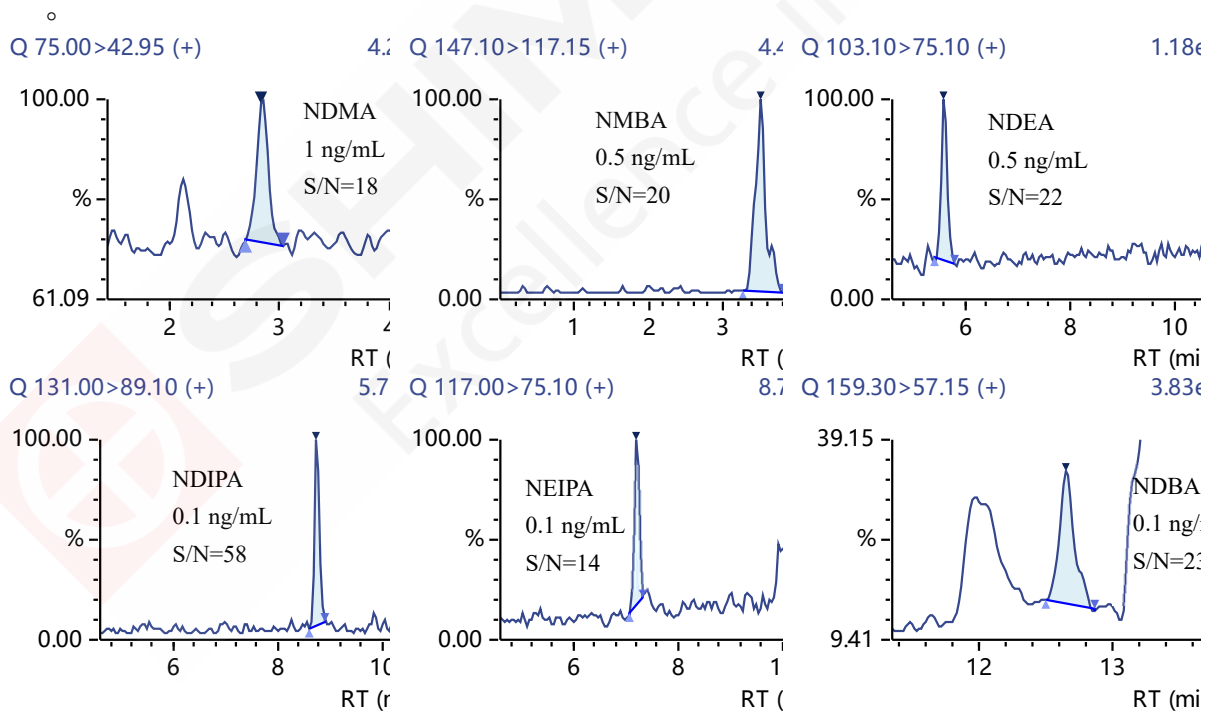


图 3. 六种亚硝胺类杂质的色谱图 (0.1~1 ng/mL)

## 2.4 重复性考察

3 ng/mL 的标准溶液，连续进样 8 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 3 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别在 0.02~0.27%和 1.28~4.61%之间，仪器精密度良好。

表 3. 重复性测试 (n=8)

NO.	化合物名称	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	NDMA	0.04	2.88
2	NMBA	0.27	4.61
3	NDEA	0.04	2.03
4	NEIPA	0.02	1.76
5	NDIPA	0.02	1.39
6	NDBA	0.02	1.28

## 2.5 加标回收实验

缬沙坦原料药样品中添加三个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，结果如表 4 所示，缬沙坦原料药中未检测出六种亚硝胺类化合物，三个不同浓度加标回收率在 95.1~108.7% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40% 之间，方法准确可靠。

表 4. 加标回收实验结果 (n=3)

NO.	化合物	2 ng/mL (0.02 ppm)		5 ng/mL (0.05 ppm)		10 ng/mL (0.1 ppm)	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
1	NDMA	106.0	2.08	99.8	3.96	100.5	1.68
2	NMBA	107.0	3.68	96.6	7.40	100.4	4.20
3	NDEA	108.7	2.00	98.1	2.47	97.2	0.81
4	NEIPA	101.5	1.56	95.1	2.54	95.2	4.04
5	NDIPA	106.0	2.30	98.4	2.77	95.8	1.70
6	NDBA	106.9	2.07	98.4	5.22	96.6	4.52

## 3. 结论

本实验建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定缬沙坦原料药中 NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA 和 NDBA 六种亚硝胺类化合物的方法，用外标法定量，定量限在 0.1~1 ng/mL (0.001~0.01 ppm) 之间，3 ng/mL 标准溶液重复进样 8 针，其保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.02~0.27% 和 1.28~4.61% 之间；缬沙坦原料药三个不同浓度样品加标回收率在 95.1~108.7% 之间，平行处理三次的相对标准偏差在 0.81~7.40% 之间。该方法适用于缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质的测试，供相关人员参考。

# 厄贝沙坦原料中叠氮类遗传毒性杂质 AZBC 的分析

**摘要:** 本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪测定厄贝沙坦原料中叠氮类遗传毒性杂质 AZBC 的方法。AZBC 在 0.25 ng/mL~25 ng/mL 浓度范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数  $r$  在 0.999 以上; 对照品连续进样 6 次, 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.04%和 2.36%; 低、中、高不同浓度的加标回收率在 95.97%~100.55%之间。该方法专属性强、灵敏度高, 稳定性好, 结果准确, 可用于厄贝沙坦原料中 AZBC 的检测。

**关键词:** 三重四极杆质谱 厄贝沙坦 遗传毒性杂质 叠氮基 AZBC

厄贝沙坦是一种血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB), 主要用于治疗成人原发性高血压, 属于一线降压药, 临床应用广泛。

2018 年以来, 缬沙坦、厄贝沙坦等沙坦类药物由于可能存在的氮亚硝胺类遗传毒性杂质, 如 NDMA、NDEA 等被多次召回。近期, 韩国生物医药评论 Korea Biomedical Review 发布消息, 赛诺菲-安万特韩国公司表示, 由于其他国家提出的杂质问题, 该公司将召回三种含有厄贝沙坦的高血压治疗药物。此次召回涉及的杂质是叠氮杂质。

2021 年 4 月 29 日, EDQM 宣布叠氮杂质是一种新的致突变物质, 即遗传毒性杂质。叠氮化合物是医药行业中常见的化工原料, 通常作为起始物料、反应试剂或中间体存在于药物合成过程中, 如在厄贝沙坦的合成中, 通常需要使用三丁基叠氮化锡或叠氮化钠以形成药物结构中的四唑环。遗传毒性杂质叠氮化合物需依据 ICH M7 开展研究, 并确保叠氮杂质水平低于毒理学关注阈值 (TTC) 的控制限度, 确保药品质量安全。本文采用岛津 LCMS-8050 建立了厄贝沙坦原料中叠氮杂质 4'-叠氮甲基[1,1-联苯]-2-氰基 (AZBC) 的方法, 该方法灵敏、准确, 供相关研究人员参考。

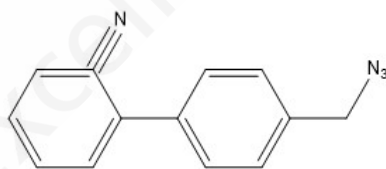


图 1. AZBC 杂质的结构式

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器:	CBM-20A	自动进样器:	SIL-20AC XR
输液泵:	LC-20ADXR x2	质谱仪:	LCMS-8050
柱温箱:	CTO-20AC	色谱工作站:	LabSolutions Ver. 5.99
在线脱气机:	DGU-20A <sub>5R</sub>		

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：ACE Excel 3 C18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm)

流动相：A相-0.01mol/L 乙酸铵水溶液-乙腈 (90: 10) ， B相-乙腈

流 速：0.5 mL/min

柱 温：40°C

进样体积：10 μL

自动进样器温度：10°C

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 20%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.00	Oven	CTO RVR	1
11.00	Pumps	Pump B Conc.	90
11.01	Pumps	Pump B Conc.	20
13.00	Oven	CTO RVR	0
16.00	Controller	Stop	

注：“0”表示流路切换至废液；“1”表示流路切换至质谱

质谱条件

离子源：	APCI，正离子模式	DL 管温度：	200°C
离子源接口电压：	4.5 KV	加热模块温度：	250°C
雾化气：	氮气 2.0 L/min	接口温度：	450°C
干燥气：	氮气 9.0 L/min	扫描模式：	多反应监测(MRM)
碰撞气：	氩气 (230kPa)	MRM 参数：	见表 2

表 2. MRM 参数

化合物名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE(V)	Q3 Pre
4'-(叠氮甲基)[1,1-联苯]-	133690-91-2	207.10	180.10*	-10	-21	-20
2-氰基 (AZBC)			77.10	-15	-35	-15

\*表示定量离子

### 1.3 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制：取 AZBC 对照品适量，精密称定，加 80%乙腈溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 AZBC 约为 0.25、0.75、1.25、2.5、5.0、12.5、25 ng 的溶液。

供试品溶液：取厄贝沙坦原料约 25 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 80%乙腈适量，超声溶解并加 80%乙腈稀释至刻度，摇匀。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 厄贝沙坦UV图及AZBC对照品溶液谱图

为避免厄贝沙坦污染离子源的风险，实验中建议配制紫外检测器进行色谱图的监控。根据色谱图中厄贝沙坦与 AZBC 保留时间的差异，将供试品中高浓度的厄贝沙坦切入废液。本实验中，厄贝

沙坦与 AZBC 保留时间分别为 5.850 min 和 9.242 min，二者之间的分离度良好。

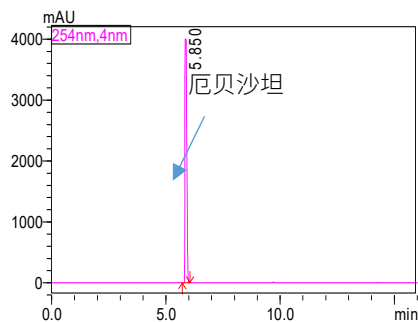


图 2. 厄贝沙坦原料 UV 色谱图

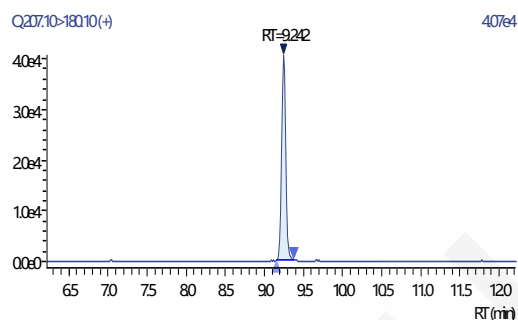


图 3. 2.5 ng/mL AZBC 标准品溶液质量色谱图

### 3.2 线性关系

将上述 AZBC 系列标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程为  $Y = (47795.95)X + (1131.704)$ ，相关系数  $R = 0.9995$ ，准确度在 95.5~102.9% 之间。

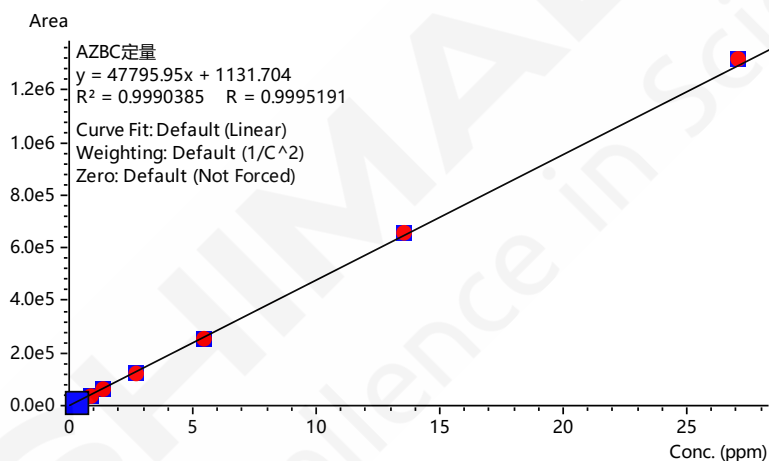


图 4. AZBC 校准曲线

### 3.3 精密度

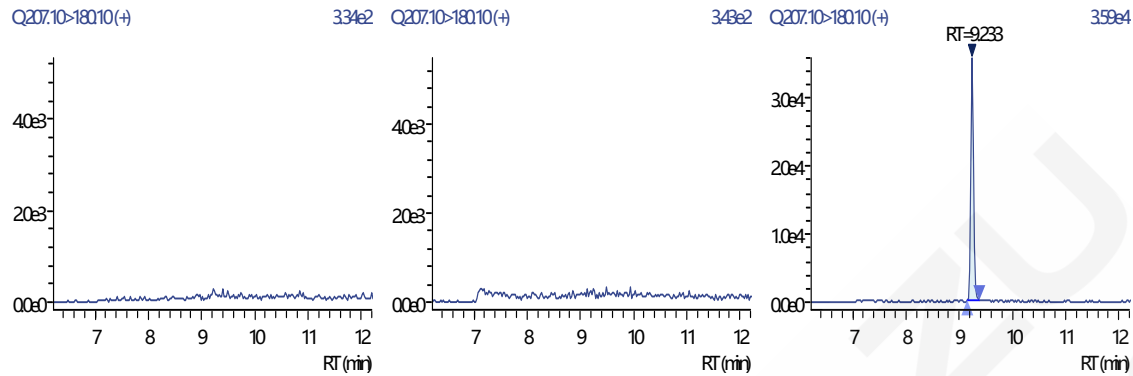
对 2.70 ng/mL 的对照品溶液连续测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示：AZBC 色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04% 和 2.36%，仪器精密度良好。

表 3. AZBC 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

序号	保留时间	峰面积
1	9.242	148003
2	9.241	144769
3	9.246	150574
4	9.235	144549
5	9.238	153048
6	9.240	151126
RSD(%)	0.04	2.36

### 3.4 专属性

图 5-7 分别为空白溶液、供试品及供试品加标溶液的 MRM 色谱图，可见空白无干扰。供试品中 AZBC 未检出。



根据检出限  $MDL=3 S/N$ ，定量限  $LOQ=10 S/N$  计算检出限和定量限，分别为 0.02 和 0.06 ng/mL。

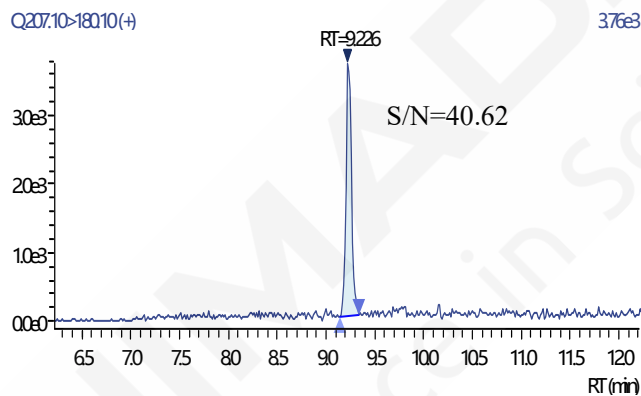


图 8. 0.25 ng/mL MRM 色谱图

### 3.5 回收率

取厄贝沙坦样品 9 份按照 2 步骤进行前处理，分别加入低、中、高三种不同浓度的 AZBC 标准溶液，按照 1.2 中的分析条件测定加标回收率，每种浓度平行测定 3 次。AZBC 的回收率在 95.97%~100.55%之间，具体结果见表 4。

表 4. AZBC 回收率测试结果(n=9)

加标浓度 (ng/mL)	序号	回收率 (%)	RSD(%)
1.25	1	95.97	2.33
	2	98.14	
	3	100.55	
2.5	1	99.18	1.14
	2	97.10	
	3	97.42	
3.75	1	99.58	1.81
	2	96.99	
	3	100.44	

## 4 结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 测定厄贝沙坦原料中叠氮基遗传毒性杂质 AZBC 的方法。AZBC 在 0.25 ng/mL~25 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，且专属性、精密度及不同浓度的加标回收率实验结果良好。该方法专属性强、灵敏度高、稳定性好结果准确，可用于厄贝沙坦原料中的 AZBC 检测。



# 厄贝沙坦原料中叠氮基遗传毒性杂质 MB-X 的分析

**摘要:** 本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪测定厄贝沙坦原料中叠氮基遗传毒性杂质 MB-X 的方法。MB-X 在 1 ng/mL~75 ng/mL 浓度范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数  $r$  在 0.999 以上; 对照品连续进样 6 次, 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.14%和 1.78%; 低、中、高不同浓度的加标回收率在 103.53%~111.82%之间。该方法专属性强、灵敏度高、稳定性好、结果准确, 可用于厄贝沙坦原料中的 MB-X 检测。

**关键词:** 三重四极杆质谱 厄贝沙坦 遗传毒性杂质 叠氮基 MB-X

厄贝沙坦是一种血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB), 主要用于治疗成人原发性高血压, 属于一线降压药, 临床应用广泛。

2021 年 6 月, 加拿大卫生局发布消息, 加拿大一家制药公司因测试发现叠氮杂质超出可接受的限度而召回了 12 批厄贝沙坦药物。除此之外, 8 月份韩国和英国也发布公告撤下或召回含有厄贝沙坦的药物制剂, 如厄贝沙坦片 (Aprovel)、厄贝沙坦氢氯噻嗪片 (CoAprovel) 等。

2021 年 4 月 29 日, EDQM 宣布叠氮杂质是一种新的致突变物质, 即遗传毒性杂质。叠氮化合物是医药行业中常见的化工原料, 通常作为起始物料、反应试剂或中间体存在于药物合成过程中, 如在厄贝沙坦的合成中, 通常需要使用三丁基叠氮化锡或叠氮化钠以形成药物结构中的四唑环。遗传毒性杂质叠氮化合物需依据 ICH M7 开展研究, 并确保叠氮杂质水平低于毒理学关注阈值 (TTC) 的控制限度, 确保药品质量安全。本文采用岛津 LCMS-8050 建立了厄贝沙坦原料中叠氮杂质 5-[4'-(叠氮甲基)[1,1-联苯]-2-基]-2H-四氮唑 (MB-X) 的方法, 该方法灵敏、准确, 供相关研究人员参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera-XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器:	CBM-20A	自动进样器:	SIL-20AC XR
输液泵:	LC-20ADXR x2	质谱仪:	LCMS-8050
柱温箱:	CTO-20AC	色谱工作站:	LabSolutions Ver. 5.99
在线脱气机:	DGU-20A <sub>SR</sub>		

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: 五氟苯基色谱柱 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.7  $\mu$ m 或其他性能相当的色谱柱)

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液, B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 20°C

进样体积：3  $\mu$ L

自动进样器温度：20°C

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 40%，时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
4.00	Oven	CTO RVR	1
5.50	Pumps	Pump B Conc.	40
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Oven	CTO RVR	0
11.00	Pumps	Pump B Conc.	95
11.01	Pumps	Pump B Conc.	40
15.00	Controller	Stop	

注：“0”表示流路切换至废液；“1”表示流路切换至质谱

质谱条件

离子源：	ESI，负离子模式	接口温度：	450°C
离子源接口电压：	-3.0 KV	扫描模式：	多反应监测(MRM)
雾化气：	氮气 3.0 L/min	加热气：	空气 15.0 L/min
干燥气：	氮气 5.0 L/min	DL 管温度：	150°C
碰撞气：	氩气	加热模块温度：	450°C
MRM 参数：	见表 2		

表 2. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
5-[4' -(叠氮甲基)[1,1-联苯]-2-基]-2H-四氮唑 (MB-X)		192.20*	-15	12	-15
	275.90	248.30	-15	11	-15
		165.40	-15	16	-15

\*表示定量离子

## 2. 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制：取 MB-X 对照品适量，精密称定，加 80%乙腈溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 MB-X 为 1、3、7.5、15、30、45、75 ng 的溶液。

供试品溶液：取厄贝沙坦原料约 60 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加 80%乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 厄贝沙坦UV图及MB-X对照品溶液谱图

为避免厄贝沙坦污染离子源的风险，实验中建议配制紫外检测器进行色谱图的监控。根据色谱图中厄贝沙坦与 MB-X 保留时间的差异，将供试品中高浓度的厄贝沙坦切入废液。本实验中，厄贝沙坦与 MB-X 保留时间分别为 1.818 min 和 5.942 min，二者之间的分离度良好。

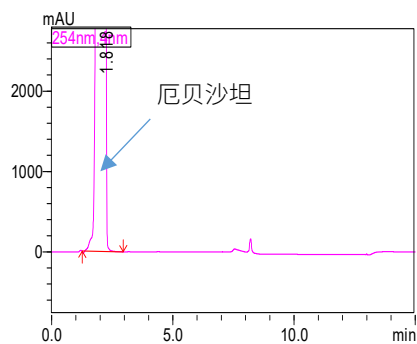


图 1. 厄贝沙坦原料 UV 色谱图

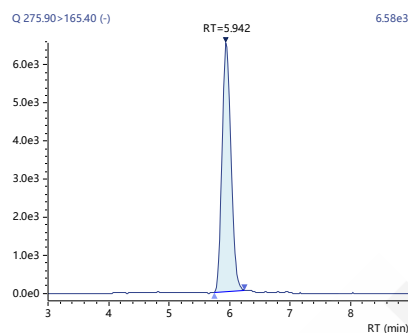


图 2. 15 ng/mL MB-X 标准品溶液质量色谱图

### 3.2 线性关系

将上述 MB-X 系列标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程为  $Y = (4642.994)X + (-485.3603)$ ，相关系数  $R = 0.9996$ ，准确度在 98.2~102.2%之间。

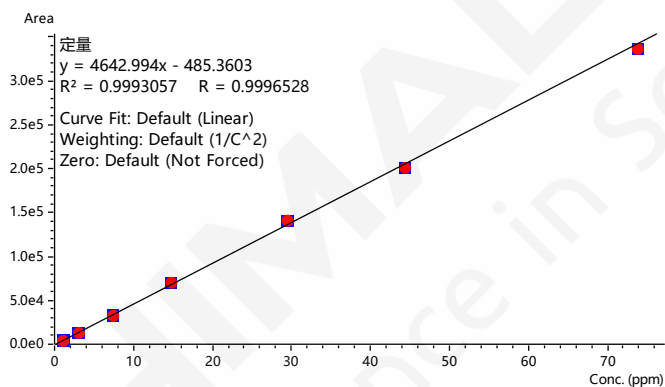


图 3. MB-X 校准曲线

### 3.3 精密度

对 15 ng/mL 的对照品溶液连续测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示：MB-X 色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14%和 1.78%，仪器精密度良好。

表 3. AZBC 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

序号	保留时间	峰面积
1	5.927	66195
2	5.928	64858
3	5.934	68095
4	5.925	67536
5	5.945	66672
6	5.942	67651
RSD(%)	0.14	1.78

### 3.4 专属性

图 4-6 分别为空白溶液、供试品及供试品加标溶液的 MRM 色谱图，可见空白无干扰。供试品中 MB-X 的含量为 1.75 ppm，按厄贝沙坦最大日剂量 300 mg 计算，该产品中 MB-X 的含量小于 TTC。

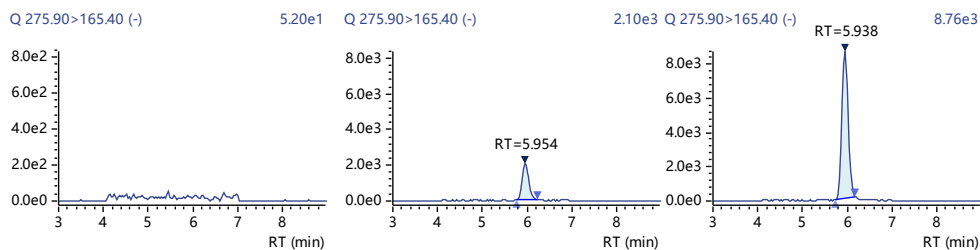


图 4. 空白 MRM 色谱图

图 5. 供试品 MRM 色谱图

图 6. 供试品加标 MRM 色谱图

### 3.5 灵敏度

根据检出限 MDL=3 S/N, 定量限 LOQ=10 S/N 计算检出限和定量限, 分别为 0.19 和 0.64 ng/mL。

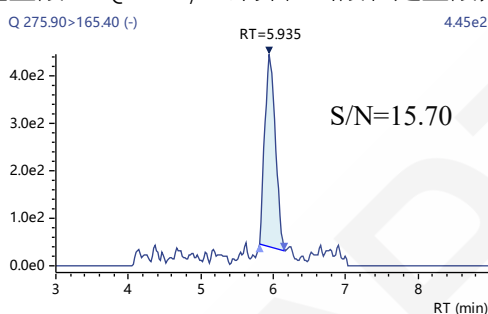


图 7. 1 ng/mL MRM 色谱图

### 3.6 回收率

取厄贝沙坦样品 9 份, 按照 2 步骤进行前处理, 分别加入低、中、高三种不同浓度的 MB-X 标准溶液, 按照 1.2 中的分析条件测定加标回收率, 每种浓度平行测定 3 次。MB-X 的回收率在 103.53%~111.82%之间, 具体结果见表 4。

表 4. MB-X 回收率测试结果(n=9)

加标浓度 (ng/mL)	序号	回收率 (%)	RSD(%)
15	1	108.18	1.85
	2	108.46	
	3	111.82	
30	1	103.67	1.36
	2	104.36	
	3	106.41	
45	1	105.34	0.89
	2	104.06	
	3	103.53	

## 4 结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 测定厄贝沙坦原料中叠氮基遗传毒性杂质 MB-X 的方法。MB-X 在 1 ng/mL~75 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 且专属性、精密度及不同浓度的加标回收率实验结果良好。该方法专属性强、灵敏度高、稳定性好结果准确, 可用于厄贝沙坦原料中的 MB-X 检测。

# 三重四极杆气质联用法测定丁酸氯维地平中基因毒性杂质丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛含量

**摘要:** 本文建立了三重四极杆气相色谱质谱联用仪 (GCMS-TQ8050 NX) 测定丁酸氯维地平中两种基因毒性杂质丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛含量的方法。结果表明: 丁酸氯甲酯标液浓度在 2~200  $\mu\text{g/L}$ , 2,3-二氯苯甲醛标液浓度在 1~100  $\mu\text{g/L}$  范围内, 两目标组分校准曲线线性相关系数  $r$  均在 0.9999 以上。对浓度 2  $\mu\text{g/L}$  丁酸氯甲酯和 1  $\mu\text{g/L}$  2,3-二氯苯甲醛标准溶液进行重复性实验, 两组分峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别为 2.28%和 3.13%( $n=6$ ), 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛最低检出限 (LOD) 为 0.022  $\mu\text{g/L}$  和 0.067  $\mu\text{g/L}$ , 在对应的加标浓度下 (丁酸氯甲酯: 10  $\mu\text{g/g}$ , 2,3-二氯苯甲醛: 5  $\mu\text{g/g}$ ), 两组分的回收率为 117.4%和 81.5%。本文可为丁酸氯维地平中丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛的准确测定提供一种参考。

**关键词:** GC-MS/MS 基因毒性杂质 丁酸氯甲酯 2,3-二氯苯甲醛

丁酸氯维地平(Clevudipine butyrate, CLE), 是一种新型的静脉注射用抗高血压药物, 于 2008 年作为处方药首次在美国上市。丁酸氯维地平是一种超短效二氢吡啶类钙离子通道拮抗剂, 可选择性抑制动脉血管平滑肌细胞外的钙离子内流, 其起效迅速, 剂量响应呈线性, 半衰期短, 作用结束也迅速, 因此可以通过对剂量的精细调节起到降压效果, 有助于医生在临床使用中根据患者的具体血压监测值采取个体化用药。与硝酸甘油、硝普钠相比, 丁酸氯维地平维持血压更为有效且更加安全。

目前, 在合成丁酸氯维地平原料药的过程中, 会使用到中间体 2,3-二氯苯甲醛以及丁酸氯甲酯, 并在药物合成后对药物进行精制, 得到高纯度的丁酸氯维地平。在此过程中, 需要对基因毒性杂质 2,3-二氯苯甲醛和丁酸氯甲酯进行监控, 获得满足质量要求的原料药。

本文基于岛津公司三重四极杆气相色谱质谱联用仪 GCMS-TQ8050 NX, 建立了测定丁酸氯维地平中基因毒性杂质丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛方法。此方法灵敏度高, 结果准确, 可为丁酸氯维地平中丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛准确定量提供参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

GCMS-TQ8050 NX 三重四极杆气质联用仪

### 1.2 分析条件

色谱柱:

SH-Rxi-5Sil MS, 30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu\text{m}$

柱温程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ (1min)\_10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \_150 $^{\circ}\text{C}$ \_30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \_300 $^{\circ}\text{C}$ (5min)

柱流量: 1.2 mL/min

溶剂切割时间: 2.5min

检测器电压：调谐电压+0.5 KV

离子源温度：230°C

接口温度：280°C

采集方式：MRM，见表 1

### 1.3 样品前处理

准确称取 0.1 g 精制的丁酸氯维地平样品于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 乙酸乙酯,旋涡震荡直至溶解完全后,在 3000 r/min 的转速下离心 5min,取上清液 1 mL 至 1.5 mL 的样品瓶中,待分析。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 丁酸氯甲酯和2,3-二氯苯甲醛标准溶液谱图

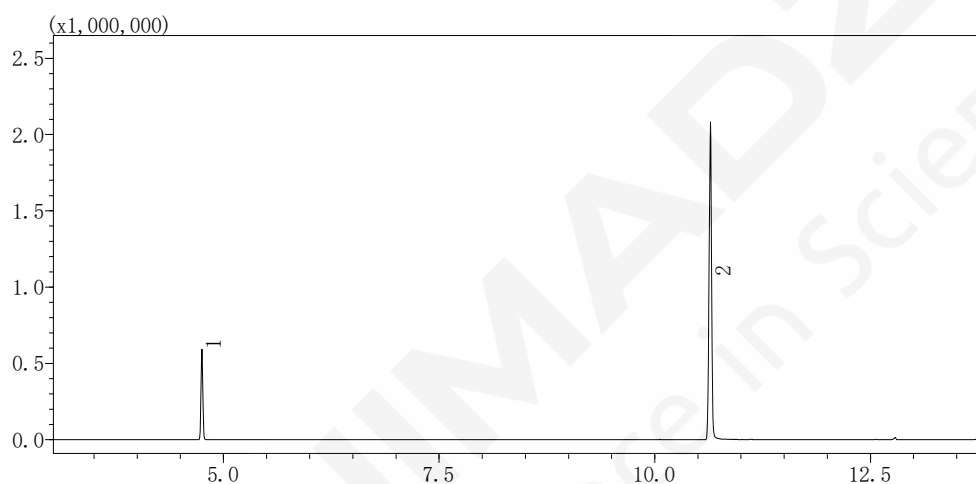


图 1. 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛 TIC 图 (丁酸氯甲酯: 500  $\mu\text{g/L}$ ; 2,3-二氯苯甲醛: 250  $\mu\text{g/L}$ )

表 1. 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛保留时间及 MRM 参数

ID	化合物名称	CAS 号	保留时间	定量离子对	CE	定性离子对	CE
1	丁酸氯甲酯	33657-49-7	4.740	108.00>72.00	4	108.00>60.00	20
2	2,3-二氯苯甲醛	6334-18-5	10.630	173.00>145.00	14	173.00>109.00	24

### 3.2 标准曲线和检出限

用乙酸乙酯配置丁酸氯甲酯和2,3-二氯苯甲醛混合标准溶液(丁酸氯甲酯浓度为2、10、40、100、200  $\mu\text{g/L}$ , 2,3-二氯苯甲醛浓度为1、5、20、50、100  $\mu\text{g/L}$ ),取1  $\mu\text{L}$ 混合标准溶液进样,以目标组分的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,丁酸氯甲酯和2,3-二氯苯甲醛标准曲线及质量色谱图如图2和图3所示;标准曲线方程、线性相关系数、检出限见表2。

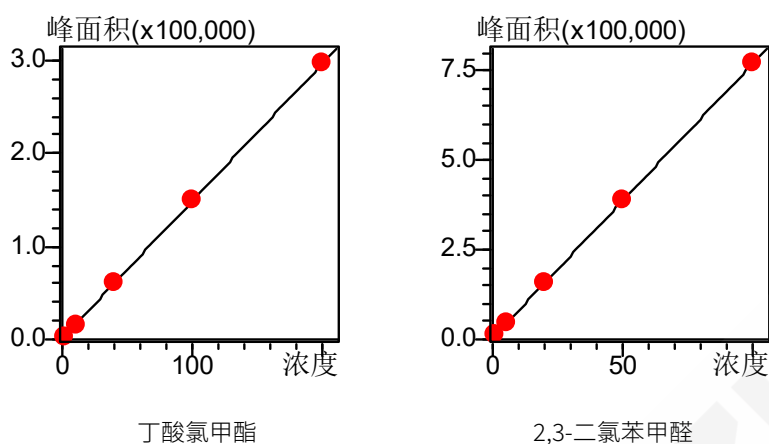


图 2. 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛标准曲线图

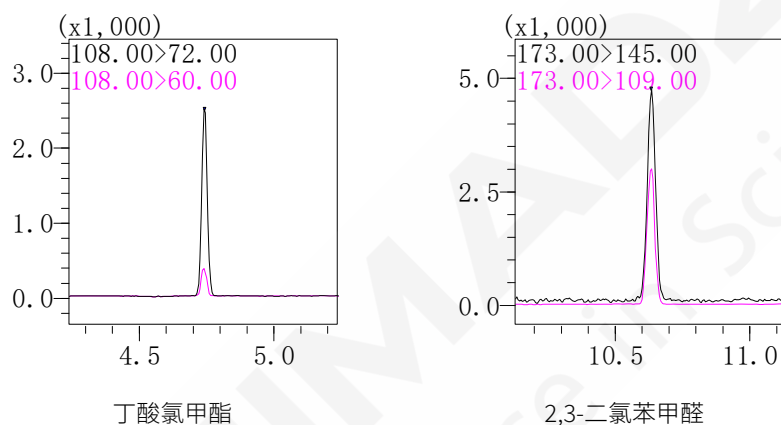


图 3. 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛质量色谱图 (丁酸氯甲酯: 2 μg/L; 2,3-二氯苯甲醛: 1 μg/L)

表 2. 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛标准曲线方程、线性相关系数、检出限及重复性

ID	组分名称	标准曲线方程	相关系数 (R)	检出限 (μg/L)	峰面积 RSD% (n=6)
1	丁酸氯甲酯	$Y=1477.113X+1473.526$	0.9999	0.022	2.28
2	2,3-二氯苯甲醛	$Y=7654.62X+4619.979$	0.9999	0.067	3.13

### 3.3 重复性实验

取丁酸氯甲酯浓度为2 μg/L, 2,3-二氯苯甲醛浓度为1 μg/L的混合标液连续进样6针, 计算组分峰面积的RSD%, 考察重复性, 测定结果见表2中峰面积RSD%。

### 3.4 加标回收率

在待测样品中添加丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛标准混合溶液, 添加水平为丁酸氯甲酯为 10 μg/g 和 2,3-二氯苯甲醛 5 μg/g, 加标样品平行处理 3 份, 样品的加标回收率结果见 3。

表 3. 各组分添加回收率结果

ID	化合物名称	加标浓度 (μg/g)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	丁酸氯甲酯	10	117.4	1.41
2	2,3-二氯苯甲醛	5	81.5	2.98

### 3.5 样品分析结果

取精制的丁酸氯维地平待测样品 0.1 g, 按 1.2 样品前处理流程处进行样品前处理, GCMS-TQ8050 NX 测定, 样品定量结果如图 4 和表 4 所示。

表 4. 精制丁酸氯维地平样品定量结果

ID	化合物名称	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )
1	丁酸氯甲酯	20.54
2	2,3-二氯苯甲醛	5.05

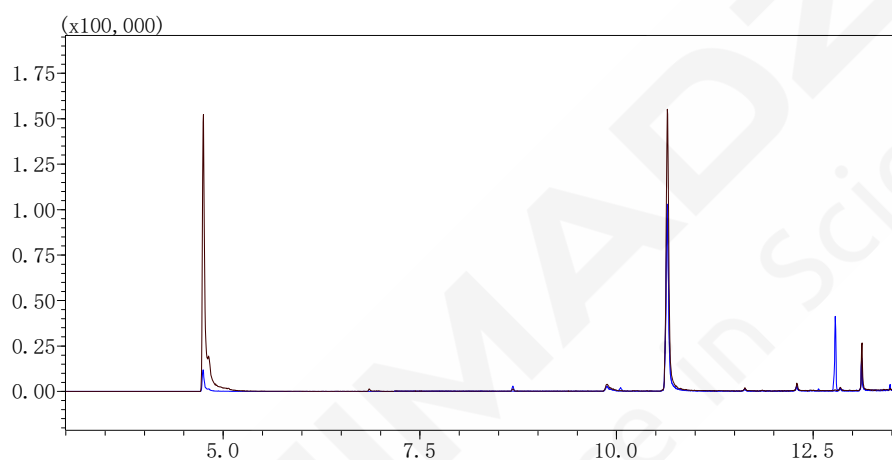


图 4. 精制丁酸氯维地平样品 MRM 图

### 4. 结论

采用岛津公司三重四极杆气相色谱质谱联用仪(GCMS-TQ8050 NX)对丁酸氯维地平中两种基因毒性杂质丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛进行测定。两目标物的标准曲线线性相关系数均大于 0.9999, 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛的检测限分别为  $0.022 \mu\text{g/L}$  和  $0.067 \mu\text{g/L}$ , 丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛的加标浓度为  $10 \mu\text{g/g}$  和  $5 \mu\text{g/g}$  的条件下, 两组分加标回收率为 117.4%和 81.5%。实验结果表明: 此方法定量准确、灵敏度高, 可为丁酸氯维地平中丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛的准确测定提供一种参考。

# 三重四极杆液质联用系统测定甲磺酸伊马替尼中芳香胺类遗传毒性杂质含量

**摘要:** 本文建立了岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8060 测定甲磺酸伊马替尼中潜在芳香胺类遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺含量的方法。2-甲基-5-硝基苯胺在 5~60 ng/mL 范围内线性良好, 校准曲线线性相关系数  $r$  值在 0.999 以上, 且精密密度实验结果良好, 低中高浓度加标回收率在 94.1%~95.7%。该方法简单、快速、且灵敏度和准确度高, 实用性强, 可用于甲磺酸伊马替尼中 2-甲基-5-硝基苯胺遗传毒性杂质的检测。

**关键词:** 三重四极杆质谱 甲磺酸伊马替尼 遗传毒性杂质

甲磺酸伊马替尼是瑞士诺华制药公司研发的 Bcr-Ab1 酪氨酸激酶受体抑制剂, 属苯胺喹唑啉类化合物, 商品名为格列卫。该药物通过抑制酪氨酸激酶来有效治疗胃肠基质肿瘤和慢性骨髓性白血病, 是世界上第一个分子靶向治疗药物。

遗传毒性杂质(Genotoxic Impurities, GTIs)是指能引起遗传毒性的杂质, 包括致突变性杂质和其它类型的无致突变性杂质, 其主要来源于原料药的生产过程, 如起始原料、反应物、催化剂、中间体、副产物、降解产物等。欧洲药品管理局(EMA), 人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)和美国食品药品监督管理局(FDA)都出台了相应的遗传毒性杂质的指导原则要求。近期, 中国国家药典委员会发布了关于《中国药典》2020 年版四部通则增修订内容的公示, 其中包括了“遗传毒性杂质控制指导原则审核稿”, 遗传毒性杂质的研究变得越来越重要。

本文使用岛津 LCMS-8060 三重四极杆液质联用系统, 建立了测定甲磺酸伊马替尼中潜在芳香胺类遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺含量的方法。此方法灵敏度高, 检测时间短, 结果准确, 可供甲磺酸伊马替尼质量控制参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, 二极管阵列检测器(PDA), CBM-20A 系统控制器, 流路切换阀 FCV-20AH<sub>2</sub>, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (2.1×100 mm L., 2 μm)

流动相: A 相-0.1%甲酸水; B 相-0.1%甲酸甲醇

等度洗脱: A/B = 45/55 (v/v)

流速: 0.30 mL/min

进样体积: 10 μL

## 质谱条件

离子源:	ESI, 正离子模式	离子源接口电压:	4.0 KV
雾化气:	氮气 3.0 L/min	干燥气:	氮气 10 L/min
加热气:	空气 10 L/min	碰撞气:	氩气
脱溶剂管温度:	250°C	加热模块温度:	450°C
接口温度:	350°C	扫描模式:	多反应监测(MRM)
驻留时间:	80 ms	MRM 参数:	见表 1

表 1. MRM 参数

化合物名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
2-甲基-5-硝基苯胺	99-55-8	153.0>107.1*	-30	-20	-10
		153.0>89.1	-30	-33	-16
甲磺酸伊马替尼	220127-57-1	494.0>394.1*	-12	-28	-28
		494.0>217.1	-12	-25	-14

注: \*表示定量离子对

## 1.3 样品前处理

对照品溶液: 取 2-甲基-5-硝基苯胺对照品适量, 精密称定, 加入 30%甲醇水溶液(v/v)溶解并稀释成 5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL 不同浓度的对照品溶液。

供试品溶液: 取甲磺酸伊马替尼供试品大约 500 mg, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 30%甲醇水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 分析流路优化

遗传毒性杂质在主药中含量很低, 为了确保遗传毒性杂质具有足够的响应, 不宜对主药稀释太多。为避免一次进样中大量的主药对 LC-MS/MS 系统造成污染, 可在分析过程中使用流路切换阀 FCV-20AH<sub>2</sub>, 设置 MS 时间程序切除主药, 只需将待测杂质引入质谱进行分析。同时, 实现系统自动化分析, 确保数据可靠, 重复性好。本实验中, LC 系统配置 PDA 检测器, 可根据主药的出峰位置 (见图 1) 确定切阀时间。使用 FCV-20AH<sub>2</sub> 在 3.2 min 后将 LC 洗脱组分切入质谱, 进行 LC-MS/MS 分析。

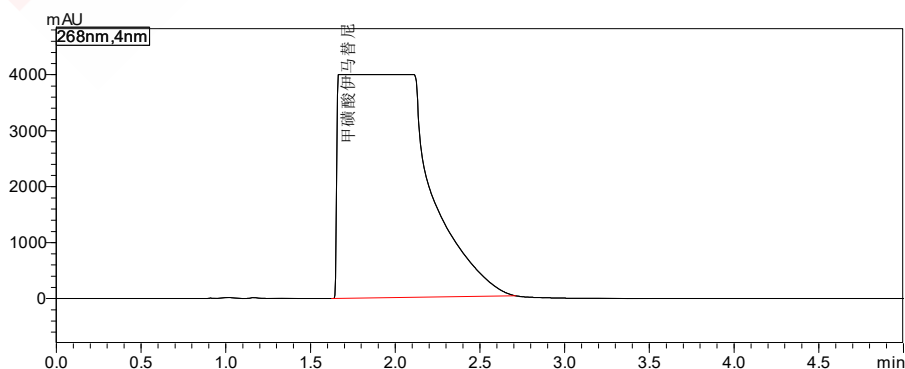


图 1. 甲磺酸伊马替尼样品 HPLC 色谱图(268nm)

## 2.2 方法专属性实验

在 1.2 分析条件下，对空白溶剂（30%甲醇水溶液）和 2-甲基-5-硝基苯胺对照品溶液(30 ng/mL)进行检测，考察方法的专属性，色谱图见图 2 和图 3。结果表明，在上述分析条件下，空白溶液不干扰 2-甲基-5-硝基苯胺杂质的检测，专属性良好。

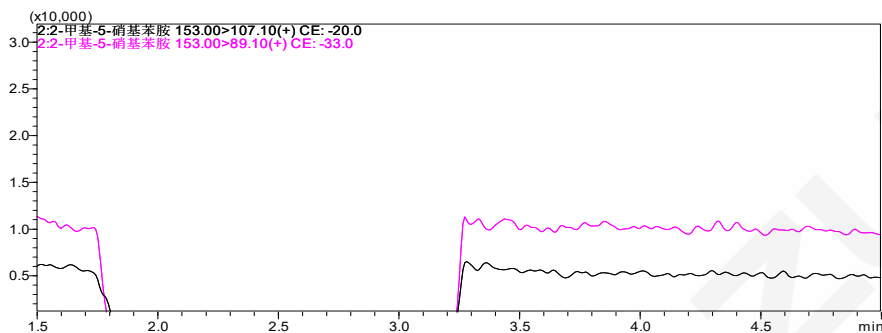


图 2. 空白溶剂 MRM 色谱图

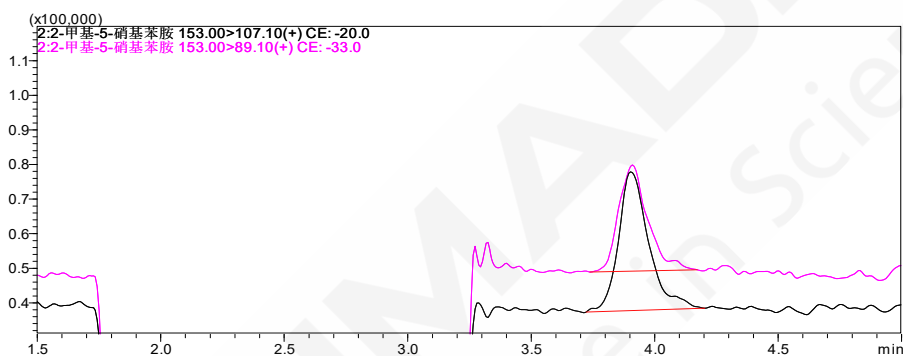


图 3. 遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺的 MRM 图谱

## 2.3 标准曲线和检出限

将不同浓度 2-甲基-5-硝基苯胺的对照品溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 4 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 2。

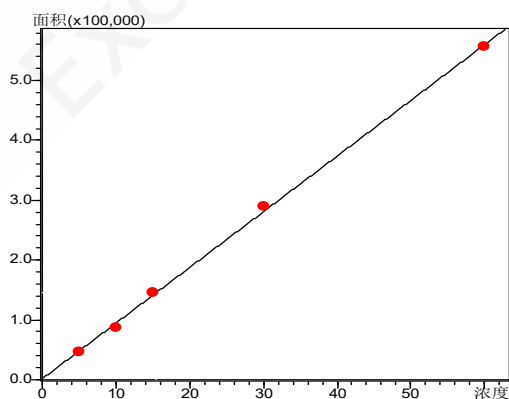


图 4. 2-甲基-5-硝基苯胺的标准曲线

表 2. 标准曲线与检出限信息

化合物	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度	定量限 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)
2-甲基-5-硝基 苯胺	$Y = (9307.32)X + (1616.36)$	0.9995	5~60	91.7-103.1%	5	1.6

## 2.4 精密度实验

精密量取浓度为 15 ng/mL 的 2-甲基-5-硝基苯胺对照品溶液 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录色谱图和峰面积, 见图 5。2-甲基-5-硝基苯胺保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.13%和 2.85%。结果表明, 本品连续进样精密度良好。

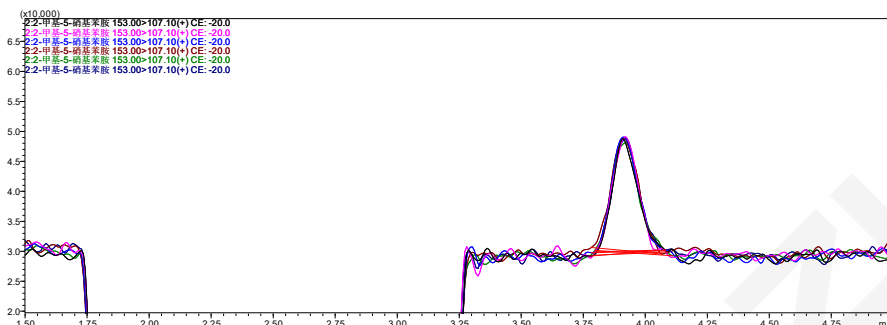


图 5. 对照品连续 6 次进样图谱

## 2.5 回收率实验

取甲磺酸伊马替尼供试品, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 30%甲醇水溶液溶解, 并加入适量 2-甲基-5-硝基苯胺对照品, 配制成低中高三个不同浓度水平的加标样品。将加标样品上机分析, 计算回收率结果如表 3。

表 3. 加标回收率结果 (n=3)

No.	加标浓度 ( $\mu$ g/g)	回收率(%)
1	0.3	95.7
2	0.6	94.1
3	0.9	95.5

## 2.6 实际样品分析结果

按照上述试验条件, 对甲磺酸伊马替尼供试品中遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺进行检测 (见图 6), 计算供试品中 2-甲基-5-硝基苯胺的含量为 0.15  $\mu$ g/g。根据《中国药典》2020 年版四部通则增修订内容关于遗传毒性杂质控制的指导原则和甲磺酸伊马替尼成人最高日服用量 800 mg 计算, 杂质 2-甲基-5-硝基苯胺含量不应超出 1.875  $\mu$ g/g 的限量。

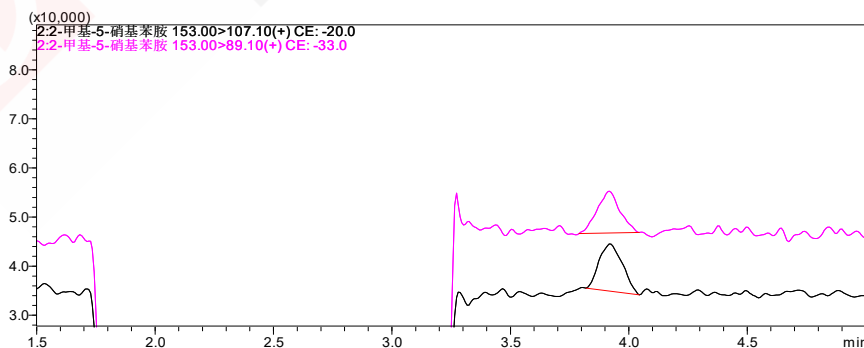


图 6. 甲磺酸伊马替尼供试品中 2-甲基-5-硝基苯胺分析图谱

### 3. 结论

采用 LC-MS/MS 法测定药物中的遗传毒性杂质具有选择性好，灵敏度高的优点，目前正越来越多的应用于新药研发中遗传毒性杂质的检测。本文使用岛津 LCMS-8060 三重四极杆液相色谱质谱联用系统建立了甲磺酸伊马替尼中潜在遗传毒性杂质 2-甲基-5-硝基苯胺的测定方法。2-甲基-5-硝基苯胺在 5~60 ng/mL 范围内线性良好，校准曲线线性相关系数  $r$  在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法简单、快速、且灵敏度和准确度高，可为相关药品的检测工作提供快速准确的支持，进一步为药品安全提供技术保障。



# 三重四极杆液质联用法检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4-氯苯胺

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4-氯苯胺含量的方法。样品以 50% 甲醇水溶液溶解定容，滤过后上机分析。采用外标法定量，在 0.1~100 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.9999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.02~0.08% 和 1.50~2.22% 之间。该方法灵敏可靠，4-氯苯胺定量限为 0.1 ppm，远低于浓度限度值 17 ppm；三个浓度样品加标回收率在 97.8~98.3% 之间，每个浓度平行处理三次，测试结果的 RSD 在 0.83~3.22% 之间；残留实验结果为阴性，可为扑热息痛中遗传毒性杂质 4-氯苯胺含量测定提供参考。

**关键词:** 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 4-氯苯胺 扑热息痛 遗传毒性杂质

遗传毒性杂质 (Genotoxic Impurity, GTI) 是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能。其在极低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤，导致基因突变并促使肿瘤发生。因其毒性很强，对药物的安全性造成巨大威胁。

扑热息痛又名对乙酰氨基酚，具有解热镇痛作用，是感冒药中的主要成分。2020 年 7 月初，荷兰媒体报道，在一家制药公司生产的扑热息痛中检测到 4-氯苯胺。4-氯苯胺是苯胺类遗传毒性杂质，作为药物合成的起始物料和中间体而被广泛应用，但因为 4-氯苯胺对细胞存在潜在毒性，因此需要控制其在药物中的含量。

目前尚无质量标准收录 4-氯苯胺遗传毒性杂质含量测定方法。本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪定量检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4-氯苯胺的分析方法，供相关检测人员参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A <sub>5</sub>
输液泵	: LC-30AD×2	自动进样器	: SIL-30AC
柱温箱	: CTO-20AC	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.99		

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱	: Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm; P/N: 227-32001-03; 岛津 (上海) 实验器材有限公司		
流动相	: A-0.1% 乙酸水溶液; B-0.1% 乙酸甲醇溶液		
洗针模式	: 进样前后洗针, External only (进样针外壁清洗), Rinse Port		
流速	: 0.4 mL/min	柱温	: 40°C



测，故主药及辅料与待测杂质的分离度至关重要。本文对流动相组成和梯度时间程序进行了优化，优选的乙酸流动相体系以及缓和梯度时间程序，实现了主药等与待测杂质的良好分离。本方法中通过设置阀切换程序将 3.75 min 以后洗脱液切入质谱进行分析，其余时间切入废液。扑热息痛样品 PDA 色谱图和 4-氯苯胺 MRM 谱图见图 1。

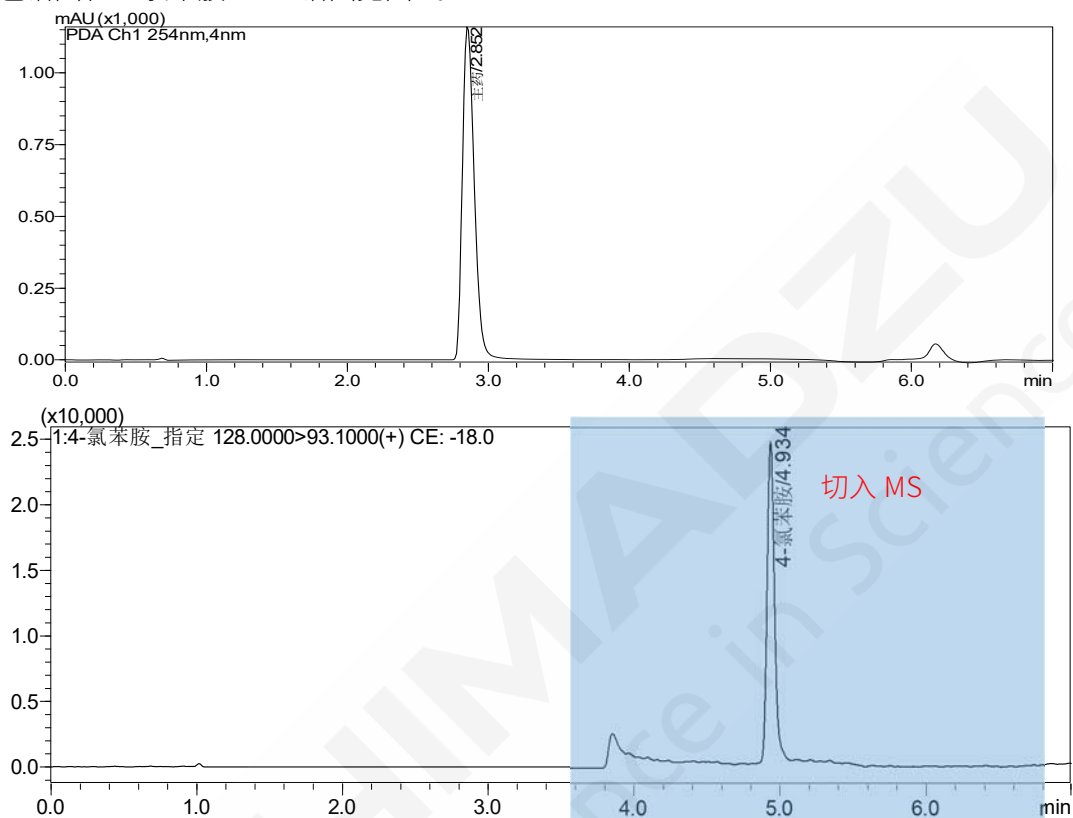


图 1.扑热息痛片样品 PDA 色谱图（上，API 浓度 1 mg/mL）  
和 4-氯苯胺 MRM 谱图（下，4-氯苯胺浓度 1 ng/mL）

## 2.2 专属性

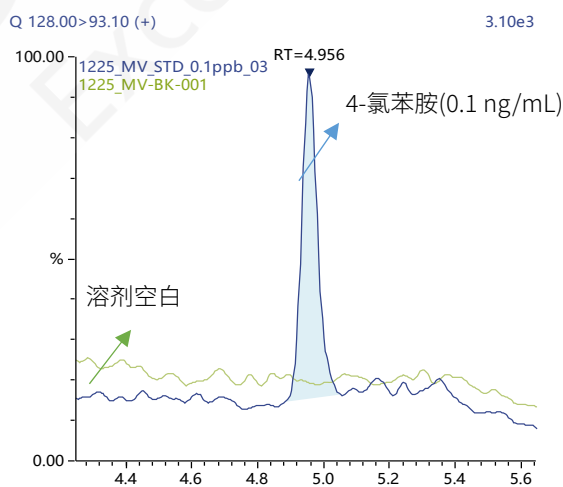


图 2. 4-氯苯胺标准溶液（0.1 ng/mL）和溶剂空白 MRM 重叠色谱图

溶剂空白样品与 4-氯苯胺标准溶液（0.1 ng/mL）MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处，未见明显干扰，方法专属性好。

## 2.3 线性关系

按照1.3配制十个不同浓度的标准系列溶液，按照1.2中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制标准曲线。4-氯苯胺标准曲线见图3，线性方程、相关系数和定量限见表3。

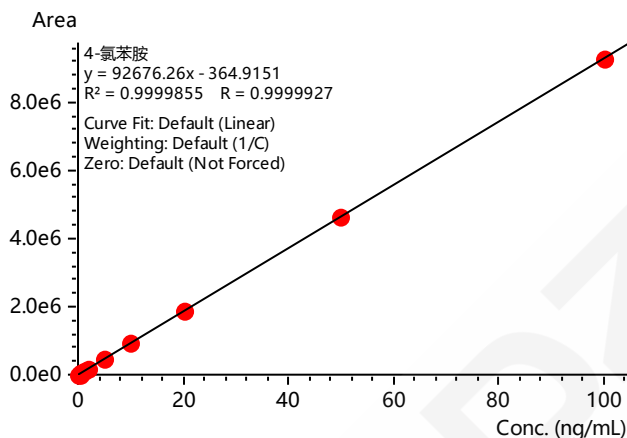


图3. 4-氯苯胺标准曲线

表 3. 线性关系、检出限和定量限（权重：1/C）

名称	定量方法	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r	定量限 (ng/mg)	定量限 S/N
4-氯苯胺	外标法	$Y=92676.26X - 364.9151$	0.1~100	95.0~102.4	0.9999	0.1	20.2

## 2.4 精密度实验

对三个浓度的标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.02~0.08%和 1.50~2.22%之间，仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
4-氯苯胺	0.07	2.22	0.08	1.50	0.02	1.77

## 2.5 加标回收实验

在扑热息痛片样品中添加三个不同浓度的标准溶液，每个浓度的加标样品平行处理三份，加标回收结果见表 5。所测扑热息痛片样品中未检测出 4-氯苯胺杂质。三个不同浓度加标回收率在 97.8~98.3% 之间，测试结果的 RSD 在 0.83~3.22% 之间。

表 5. 样品加标回收率(n=3)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mg)	0.5 ng/mg		5 ng/mg		50 ng/mg	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
4-氯苯胺	未检出	98.1	3.22	97.8	0.83	98.3	1.35

## 2.6 残留实验

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后，进样分析溶剂空白，分析结果与定量下限 (0.1 ng/mL) 比对，残留考察结果表明，4-氯苯胺检测通道中无干扰。

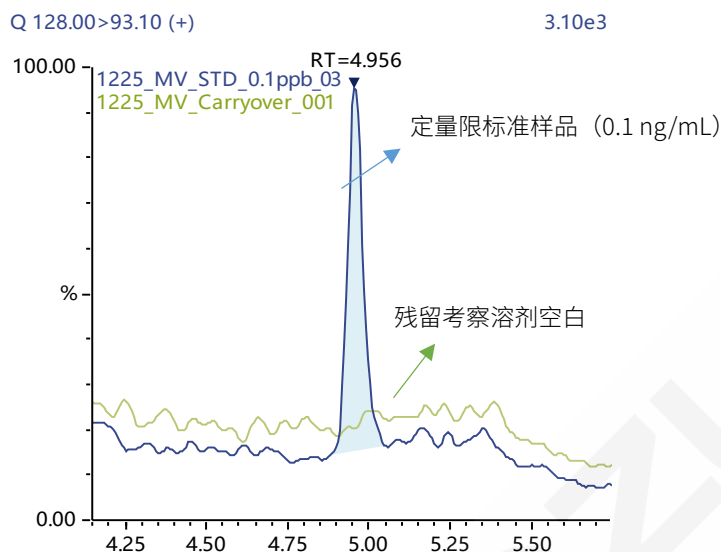


图 4. 残留考察溶剂空白样品色谱图

### 3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用定量测定扑热息痛片中 4-氯苯胺遗传毒性杂质的新方法。ICH M7 指南（评估和控制药品中 DNA 反应性/诱变性杂质以限制潜在致癌风险）附录所规定的 4-氯苯胺可接受摄入量（API）为 34  $\mu\text{g}/\text{day}$ ，通常成人服用扑热息痛的最大日摄入量为 2 g，故 4-氯苯胺浓度限度为 17 ppm。本方法 4-氯苯胺定量限为 0.1 ppm，远低于浓度限度值。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单，可实现扑热息痛中痕量遗传毒性杂质 4-氯苯胺的高灵敏度、快速检测。

## 三重四极杆液质联用法测定磷酸肌酸钠中肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯含量

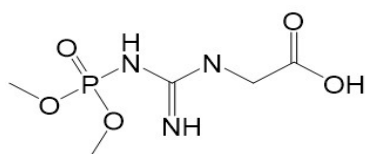
**摘要：**本文建立了三重四极杆液相色谱质谱联用仪（LCMS-8050）测定磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯以及肌酸酞磷酰二乙酯的方法。结果表明：肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯标液浓度在 0.2~40 ng/mL 范围内线性良好，肌酸酞磷酰二乙酯标液浓度在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好；校准曲线线性相关系数  $r$  均在 0.999 以上。取校准曲线最低浓度点的四种杂质标准溶液进行重复性实验，各组分计算浓度的相对标准偏差（RSD%）分别在 2.25%~9.27% ( $n=6$ )，最低检出限（LOD）分别为肌酸磷酰二甲酯 0.027 ng/mg、肌酸酞磷酰二甲酯 0.039 ng/mg、肌酸磷酰二乙酯 0.097 ng/mg、肌酸酞磷酰二乙酯 0.033 ng/mg。在对应的加标量下（肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯：2 ng/mg），各组分的回收率为 89.3%~107.5%。本文可为磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯的准确测定提供一种参考。

**关键词：**LC-MS/MS 肌酸磷酰二甲酯 肌酸酞磷酰二甲酯 肌酸磷酰二乙酯 肌酸酞磷酰二乙酯

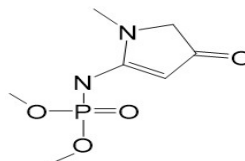
药物生产过程中残留或引入的具有人体 DNA 结构直接或间接损伤，进而产生基因突变或体内诱变而具有致癌可能或者倾向的物质称为基因毒性杂质（Genotoxic Impurity, GTI）。因此近年来各国的法规机构如 ICH、FDA、EMA 等都对基因毒性杂质控制建立明确的要求，越来越多的药企在新药开发过程中就着手重点关注基因毒性杂质的检测及控制。

磷酸肌酸是人体内自有的活性物质，专为 ATP 补充能量。而 ATP 是细胞代谢过程中最主要的能量源，在肌肉收缩代谢（如平滑肌、横纹肌）中充当重要的供能物质。磷酸肌酸钠(Phosphocreatine disodium)是其药用形式，在心脏手术全程中，可作为减少缺血性心肌损害、室性心律失常以及改善心衰的重要辅助药物。广泛应用于心肌梗塞溶栓疗法和经皮冠状动脉腔内成形术(冠脉内支架)及冠脉搭桥等治疗方案中。在合成磷酸肌酸钠原料药的过程中，会产生肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯四种具基因毒性警示结构（下图结构式中红色标注部分）的杂质；因此，在此过程中，需要对四种杂质进行定量监控，从而获得符合质量要求的原料药。

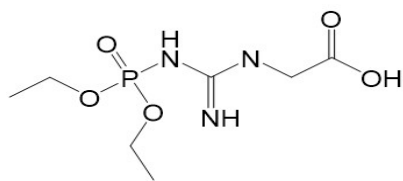
本文基于岛津公司三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8050，建立了定量测定磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯的方法。此方法灵敏度高，结果准确，可为磷酸肌酸钠质量控制提供参考。



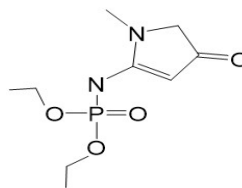
肌酸磷酰二甲酯结构式



肌酸酞磷酰二甲酯结构式



肌酸磷酸二乙酯结构式



肌酸酐磷酸二乙酯结构式

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A、三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱: InertSustainBio C18, 2.1×100 mm, 1.9 μm

流动相: A 相-0.05% TFA 水; B 相-甲醇

流 速: 0.35 mL/min, B 相初始比例为 5 %

表 1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.60	Pumps	Pump B Conc.	5
1.10	Column Oven	CTO.RVR	1
5.00	Column Oven	CTO.RVR	0
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
8.50	Pumps	Pump B Conc.	95
8.51	Pumps	Pump B Conc.	5
10.00	Controller	Stop	

\* CTO.RVR 为色谱柱后流路切换阀指令, Value 值为“0”时流路与废液管相连, Value 值为“1”时流路与质谱相连。

#### 质谱条件

离子化模式	: ESI(+)	雾化气流量	: 3.0 L/min
接口电压	: 4.5 kV	加热气流量	: 10.0 L/min
接口温度	: 300°C	DL 温度	: 250°C
加热块温度	: 400°C	干燥气流量	: 10.0 L/min
MRM 参数	: 见表 2	驻留时间	: 10 ms

表 2. MRM 参数

K	化合物名称	CAS 号	监测离子对	Q1 pre (V)	CE (V)	Q3 Pre (V)
1	磷酸肌酸钠 Creatine phosphate disodium	71519-72-7	256.25>256.25* 212.25>212.25	-10.0	-1.0	-10.0
2	肌酸磷酰二甲酯 Creatine dimethyl phosphate	--	240.05>109.00* 240.05>152.00	-12.0	-31.0	-21.0
3	肌酸酞磷酰二甲酯 Creatinine dimethyl phosphate	--	222.00>151.00* 222.00>109.00	-11.0	-17.0	-15.0
4	肌酸磷酰二乙酯 Creatine diethyl phosphate	--	268.05>124.00* 268.05>122.80	-10.0	-29.0	-23.0
5	肌酸酞磷酰二乙酯 Creatinine diethyl phosphate	--	250.05>114.05* 250.05>222.05	-12.0	-21.0	-21.0

注：带 “\*” 表示定量离子对。

### 1.3 样品前处理

精密称定磷酸肌酸钠对照样品于离心管中，加入 50% 甲醇-水溶液，旋涡震荡直至溶解完全后，在 13000 r/min 的转速下离心 5min，取上清液至 1.5 mL 的样品瓶中，以 2  $\mu$ L 进样分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 结果视图

磷酸肌酸钠、四种杂质标准溶液 MRM 色谱图（如图 1~2 所示）；

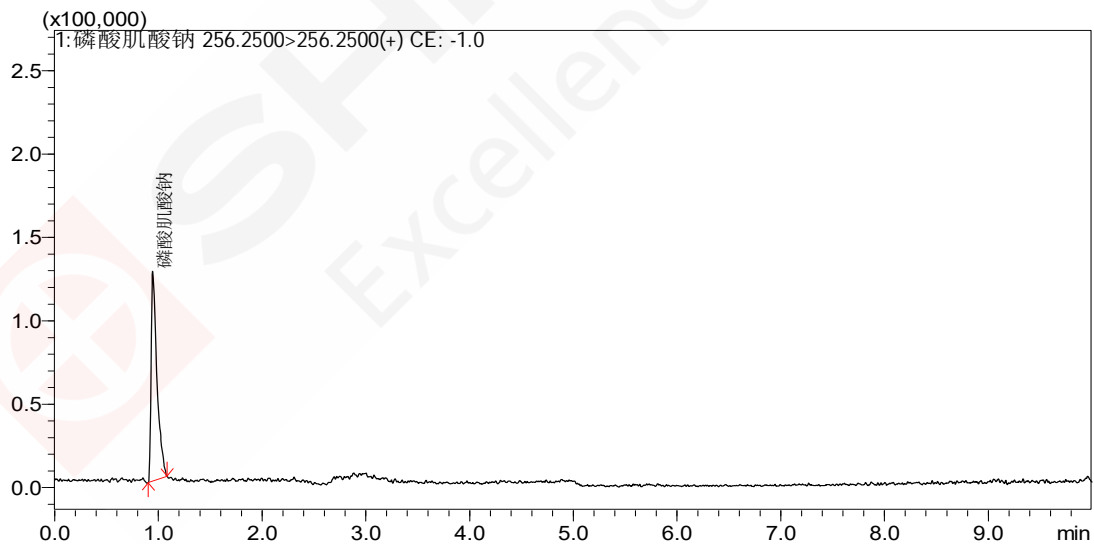


图 1. 磷酸肌酸钠标准溶液 MRM 图 (200 ng/mL)

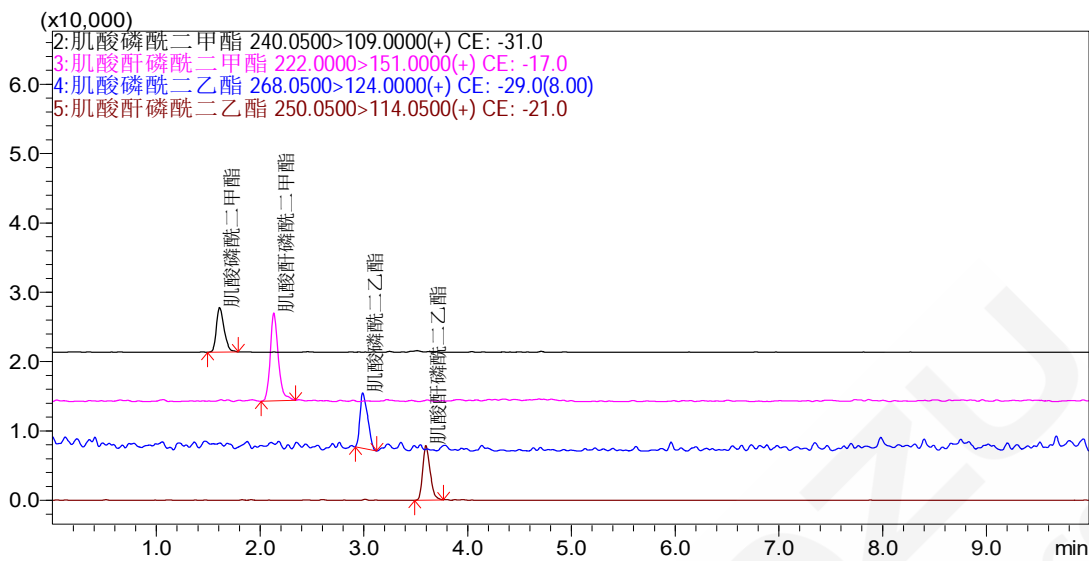


图 2.四种杂质标准溶液 MRM 图 (STD 1)

## 2.2 标准曲线和检出限

用50%甲醇-水溶液配制四种杂质混合标准溶液（肌酸磷酸二甲酯、肌酸酐磷酸二甲酯、肌酸酐磷酸二乙酯浓度为0.2、0.5、1、2、4、10、20、40 ng/mL，肌酸磷酸二乙酯浓度为0.5、1、2、4、10、20、40、100 ng/mL），取2  $\mu$ L混合标准溶液进样，以目标组分的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线及MRM色谱图如图3~10所示；标准曲线方程、线性相关系数、检出限、定量限及重复性见表3。

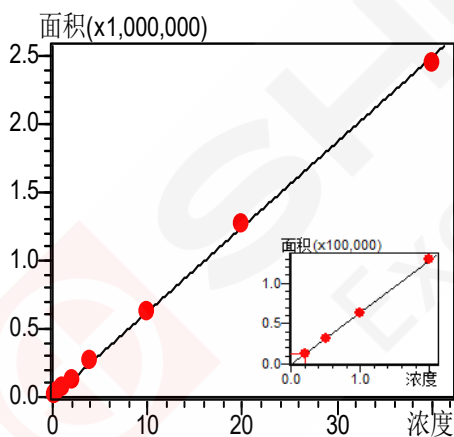


图 3. 肌酸磷酸二甲酯标准曲线图

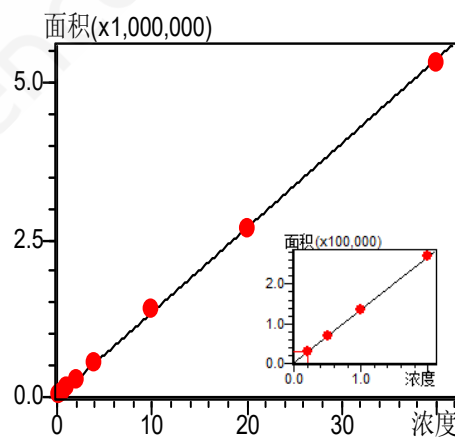


图 4. 肌酸酐磷酸二甲酯标准曲线图

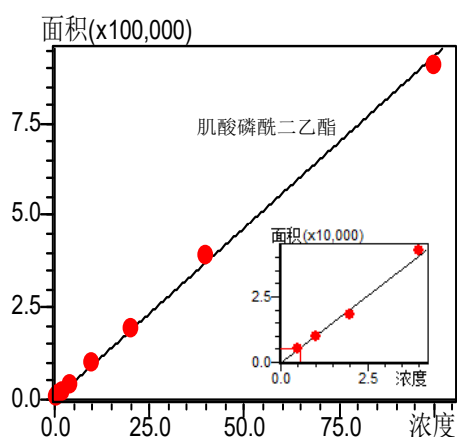


图 5. 肌酸磷酸二乙酯标准曲线图

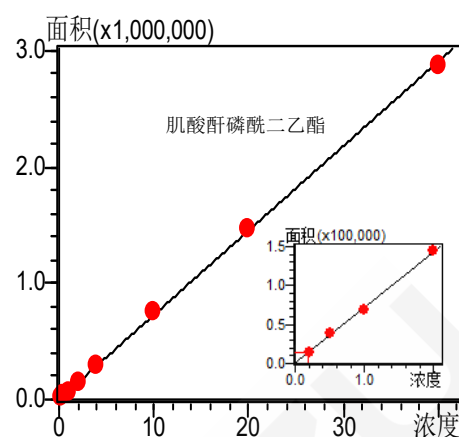


图 6. 肌酸酞磷酸二乙酯标准曲线图

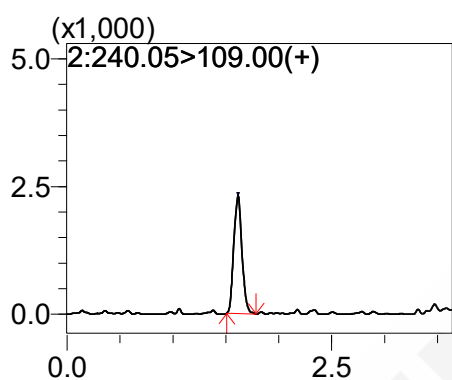


图 7. 肌酸磷酸二甲酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

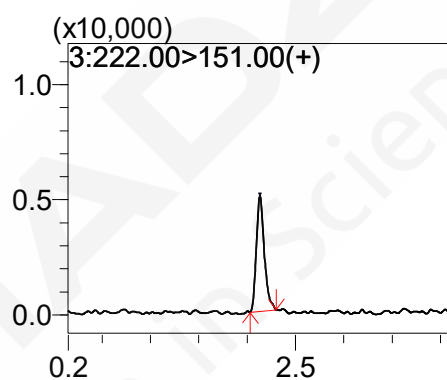


图 8. 肌酸酞磷酸二甲酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

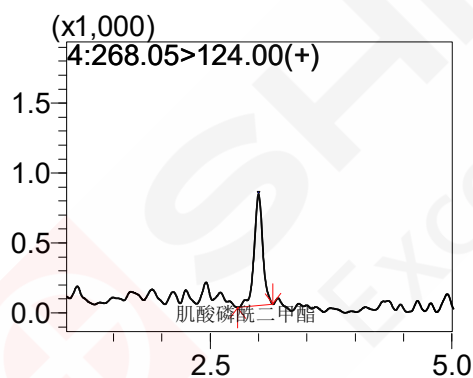


图 9. 肌酸磷酸二乙酯 MRM 色谱图 (0.5ng/mL)

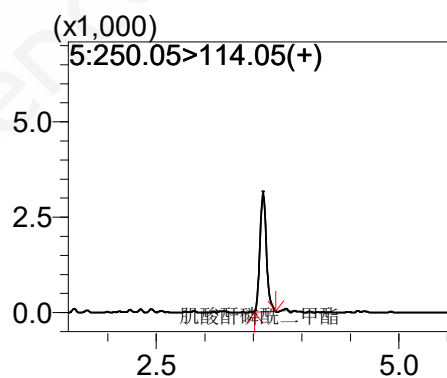


图 10. 肌酸酞磷酸二乙酯 MRM 色谱图 (0.2 ng/mL)

表 3.标准曲线方程、线性相关系数及重复性

ID	组分名称	标准曲线方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (R)	重复性 RSD% (LLOQ 浓 度,n=6)	准确度%
1	肌酸磷酸二甲酯	$Y=60816.5X+1320.52$	0.2~40	0.9998	5.05	92.3~105.0
2	肌酸酞磷酸二甲酯	$Y=7654.62X+4619.979$	0.2~40	0.9999	2.25	87.4~106.2
3	肌酸磷酸二乙酯	$Y=1862.23X+1058.92$	0.5~100	0.9992	9.27	91.4~111.6
4	肌酸酞磷酸二乙酯	$Y=14535.9X+1743.92$	0.2~40	0.9998	7.17	90.1~107.3

## 2.3 重复性实验

取肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二乙酯浓度为0.2 ng/mL，肌酸磷酸二乙酯浓度为0.5 ng/mL的混合标液连续进样6针，考察重复性，结果见表3中各组分定量限样品（LLOQ）回算浓度值RSD%。

## 2.4 加标回收率

在待测样品中添加四种杂质，加标样品平行处理 3 份；在对应的加标量下（肌酸磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二甲酯、肌酸酞磷酸二乙酯、肌酸磷酸二乙酯：2 ng/mg），各组分的加标回收率结果见图4。

表 4.各组分添加回收率结果

ID	化合物名称	加标后理论浓度 (ng/mg)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	肌酸磷酸二甲酯	2	107.5	3.61
2	肌酸酞磷酸二甲酯	2	93.2	2.98
3	肌酸酞磷酸二乙酯	2	89.3	8.52
4	肌酸磷酸二乙酯	2	105.1	6.37

## 2.5 样品分析结果

取磷酸肌酸钠样品适量，按 1.2 项下样品前处理流程方法配制成样品浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  溶液，LCMS-8050 测定其中四种杂质，样品定量结果如图 11 和表 5 所示。

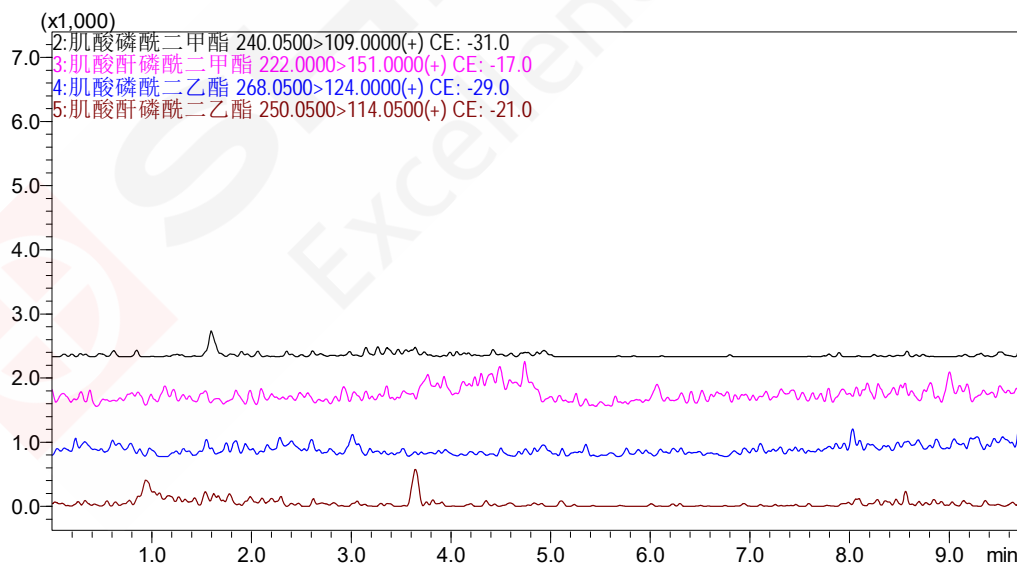


图 11.磷酸肌酸钠样品 MRM 图

表 5. 磷酸肌酸钠样品定量结果

ID	化合物名称	含量 (ng/mg)	检出限 (ng/mg)	定量限 (ng/mg)
1	肌酸磷酰二甲酯	ND	0.027	0.085
2	肌酸酞磷酰二甲酯	ND	0.039	0.131
3	肌酸磷酰二乙酯	ND	0.097	0.290
4	肌酸酞磷酰二乙酯	ND	0.033	0.123

\* ND 代表未检出，四种杂质含量要求限度低于 12 ppm。

### 3. 结论

采用岛津公司三重四极杆液相色谱质谱联用仪(LCMS-8050)对磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯以及肌酸酞磷酰二乙酯进行测定；结果表明：肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二乙酯标液浓度在 0.2~40 ng/mL 范围内线性良好，肌酸磷酰二乙酯标液浓度在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好；校准曲线线性相关系数  $r$  均在 0.999 以上。取校准曲线最低浓度点的四种杂质标准溶液进行重复性实验，各组分计算浓度的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 2.25%~9.27% ( $n=6$ )，最低检出限 (LOD) 分别为肌酸磷酰二甲酯 0.027 ng/mg、肌酸酞磷酰二甲酯 0.039 ng/mg、肌酸磷酰二乙酯 0.097 ng/mg、肌酸酞磷酰二乙酯 0.033 ng/mg。在对应的加标量下 (肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯：2 ng/mg)，各组分的回收率为 89.3%~107.5%。本文可为磷酸肌酸钠中四种具基因毒性警示结构的杂质肌酸磷酰二甲酯、肌酸酞磷酰二甲酯、肌酸磷酰二乙酯、肌酸酞磷酰二乙酯的准确测定提供一种参考。

## 第二节 药品中无机（元素）杂质分析

药品中无机元素杂质的分析也是其质量控制中非常重要的一部分。根据药物途径，ICH和USP对于口服、注射和吸入给药的元素杂质给与了每日允许暴露限（PDE）。对元素杂质进行了分类，分为1类（Cd、Pb、As和 Hg），2A类（Co、V、Ni），2B类（Tl、Au、Pd、Ir、Os、Rh、Ru、Se、Ag、Pt），3类（Li、Sb、Ba、Mo、Cu、Sn、Cr）。元素杂质的潜在毒性根据给药途径的差异而有所不同。在产品风险评估中，必须根据最终药品的预期给药途径考虑元素杂质。还必须考虑元素天然存在（如矿物类原料的相关元素）或有意/无意添加（如作为化学反应的催化剂，或通过工艺设备的污染）的可能性。在所有药品的风险评估中，必须考虑毒性最高且普遍存在的 1 类元素（Cd、Pb、As和 Hg）。仅在药物通过注射或吸入给药时，才可能需要考虑 3 类杂质等其他元素。

美国药典（USP）宣布全新的USP通则章节USP<232>（元素杂质-限值）和<233>（元素杂质-流程）将于2018年1月1日实施。通则<232>和<233>基于给药途径规定了关注元素的列表及其允许的日接触（PDE）限值。此次标准更新使USP在关注元素杂质列表和PDE方面与人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）Q3D文件相匹配。

USP<233>推荐使用ICP-MS或ICP-OES测定药品及成分中元素杂质的含量。当然如果其他的测试方法通过验证并且满足可接受标准也能使用，如EDX通过含量验证后，也可以应用于药品中原料药的检测。

ICP-MS作为重要的元素分析手段，除了具有分析速度快、线性范围宽、灵敏度高优点外，还有两个潜在的优点：一是绝对定量能力，一是多组分同时分析能力是当前体内元素强有力的分析手段，简便的技术使其应用越来越广泛。随着ICP-MS仪器的逐渐普及和研究工作的不断深入，ICP-MS灵敏度高、分析速度快、方法可靠，易与其他技术联用，这些都符合了医药检测的发展需要。本章节收集了EDX、ICP、ICP-MS在药物元素杂质含量检测中的案例。

# ICH Q3D X-射线荧光光谱法分析原料药的元素杂质

制剂产品的元素杂质协调指南 (ICH Q3D)(1) 要求对 24 种关注毒性的元素的残留量进行控制。对于新制剂产品,这一要求自 2016 年 6 月起在美国和欧盟启用,在日本则从 2017 年 4 月起启用。对于现有药品,美国自 2018 年 1 月开始适用,欧盟则从 2017 年 12 月起开始适用。尽管该指南推荐的元素杂质分析方法为电感耦合等离子原子发射光谱法 (ICP-AES)(2) 和电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS), 但若有适宜的备选方法时也允许使用。因此,参考美国药典 USP<735>(3),对 X-射线荧光光谱法作为上述方法的替代方案的适合性进行了验证。所用的仪器为一台 EDX-7000 及其选配的“药物杂质分析方法包”。使用两种粉末形式的原料药作为试验材料,以标准样品水溶液用校准曲线法进行了定量分析。结果证明可以使用 EDX 法对制剂产品中的元素杂质进行分析控制。

## 1 元素

“药物杂质分析方法包”能分析 ICH Q3D 中规定的以下 12 种元素。这些元素是控制元素杂质中的重要部分。

1 类: As, Cd, Hg, Pb

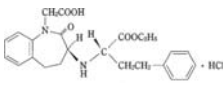
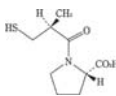
2A 类: V, Co, Ni

2B 类: Ru, Rh, Pd, Ir, Pt

## 2 评估样品

使用以下两种类型的原料药粉末作为评估样品。表 1 显示了某种制剂产品的详情和制剂产品的日用量 (1) 盐酸贝那普利; (2) 卡托普利

表 1 评估样品和结构式

名称	盐酸贝那普利	卡托普利
组成式	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> · HCl	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S
原子量	460.95	217.29
结构式		
制剂产品的日用量	10 mg/天	150 mg/天

## 3 对照值的概念

### (1) 最大允许量的设定

ICH Q3D 规定了每种元素的允许日暴露量 (PDE)。因此,当评估制剂产品或其组成成分中的元素杂质时,必须将 PDE 值转换为浓度。ICH Q3D 中有换算方法选项 1、2a、2b 和 3。在本评估中,制剂产品的日用量为 300mg,高于表 1 中的规定值,以验证较低的浓度范围。使用口服制剂

值作为 PDE 值，使用方法选项 2b 来换算 PDE 值。

## (2) 加标浓度的设定值

因为 ICH Q3D 规定将 PDE 值的 30% 作为控制阈值，故将 (1) 中最大允许浓度的 30% 设定为对照值。按照 USP <735> 将加标浓度设定为对照值的 1/2。表 2 显示的是 PDE 值、最大允许浓度和加标浓度之间的关系。

表 2 PDE 值和加标浓度

	PDE 值 (A)	最大允许浓度 (B)=(A)/0.3	加标浓度 (B)x0.3/2
元素 / 单位	µg/day	µg/g	µg/g
Pb, Cd	5	16.7	2.5
As	15	50	7.5
Hg	30	100	15
Co	50	167	25
V, Ir, Pt, Ru, Rh, Pd	100	333	50
Ni	200	667	100

## 4 标准样品

用以下两种混标溶液中的每一种制备五个标点。表 3 和表 4 所示为它们的浓度。混标溶液 (SPEX 生产) XSTC-2046, USP-TXM4。

表 3 采用 XSTC-2046 配制的标准样品浓度 [µg/mL]

	空白样品	STD1	STD2	STD3	STD4
稀释比	超纯水	10	5	2	1
Pb, Cd	0	0.5	1	2.5	5
As	0	1.5	3	7.5	15
Hg	0	3	6	15	30
Co	0	5	10	25	50
V	0	10	20	50	100
Ni	0	20	40	100	200

表 4 采用 USP-TXM4 配制的标准样品浓度 [µg/g]

	空白样品	STD1	STD2	STD3	STD4
稀释比	超纯水	10	5	2	1
Ir, Pt, Ru, Rh, Pd	0	10	20	50	100

## 5 样品预处理

### (1) 加标样品的制备

将原子吸收标准溶液或含有高 As 的纤维素粉末以加标浓度添加到评估样品中，混匀，即制得加标样品。

### (2) 样品设置

如图 1 所示，将样品盛入衬有聚丙烯膜的样品容器中，然后进行测定。

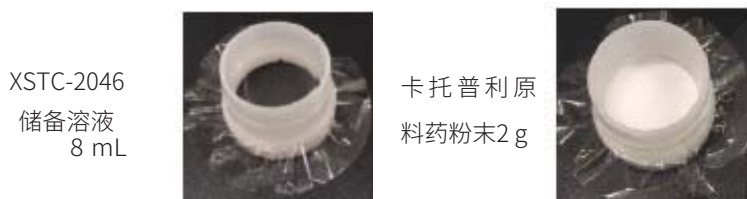


图 1 测量样品

## 6 验证结果

进行 USP<735> 准确度、精密度、特异性、定量限、线性度和稳健性等项目的验证。表 5 显示了“USP<735> 验证程序”的概述，以及本实验的验证结果；表 6 至表 10 和图 2 显示了各个项目的结果。

表 5 USP <735> 验证和验证结果综述

项目	方法	验收标准	结果	判定
准确度	<ul style="list-style-type: none"><li>校准曲线法定量分析</li><li>加标和回收实验</li></ul>	回收率 70.0 - 150.0%	回收率 92 - 108%	通过
精密度	<ul style="list-style-type: none"><li>加标样品：3</li><li>3个样品的 3 次平行测定</li><li>共9次定量分析的相对标准偏差 (RSD)</li></ul>	RSD≤20.0%	RSD≤5.8%	通过
特异性	<ul style="list-style-type: none"><li>可清楚地分离和辨识元素定量光谱与基质的谱图。</li></ul>	满足准确度条件	<ul style="list-style-type: none"><li>从基质组分分离定量光谱。</li><li>准确度令人满意。</li></ul>	通过
定量限	<ul style="list-style-type: none"><li>未平加行标测样定品的重6 复次性定量分析</li><li>10 倍标准偏差的估算值</li></ul>	满足不超过对照值的 50% 和准确度和精密度条件。	<ul style="list-style-type: none"><li>估算值 &lt;对照值的50% (=加标浓度)</li><li>准确度和精密度令人满意。</li></ul>	通过
线性度	<ul style="list-style-type: none"><li>标准样品：5</li><li>最小二乘法回归线。</li></ul>	NLT0.99	相关系数 R > 0.9941	通过
稳健性	<ul style="list-style-type: none"><li>应使用样品量作为实验参数。</li><li>使用2.0 g 作为标准值，并变更为 1.0 g、0.5 g 和 0.3 g。</li></ul>	实验参数改变后定量值的变化率应在±20.0%以内	定量值的变化率： -12.0 - +8.3%	通过

表 6 准确度

		[g/g]											
类别		1 类				2A 类			2B 类				
元素		As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd
加标浓度		7.5	15	2.5	2.5	50	25	100	50	50	50	50	50
盐酸贝那普利	加标样品	7.2	14.9	2.5	2.6	50.8	25.5	104.2	51.0	49.6	53.0	51.6	50.9
	未加标样品	<0.5	<0.3	<0.6	<1.2	<2.9	<1.4	<0.7	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	回收率[%]	96	99	102	104	102	102	104	102	99	106	103	102
卡托普利	加标样品	7.2	13.8	2.7	2.5	46.2	23.0	94.5	47.9	45.9	52.6	52.4	51.2
	未加标样品	<0.5	<0.4	<0.7	<1.2	<3.4	<1.7	<0.8	<0.6	<0.6	<0.4	<0.4	<0.7
	回收率 [%]	96	92	108	100	93	92	95	96	92	105	105	102

表 7 精密度

		%											
元素		As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd
盐酸贝那普利	RSD	0.5	0.4	4.8	5.8	0.7	0.5	0.3	0.4	0.7	0.8	0.7	0.8
卡托普利	RSD	2.3	0.8	4.6	5.5	2.7	1.8	1.1	1.4	0.5	0.6	0.9	0.5

表 8 定量限的估算值

		[g/g]											
元素		As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd
盐酸贝那普利		0.2	0.4	0.6	1.4	4.3	1.0	0.9	0.5	0.1	0.3	0.6	0.7
卡托普利		0.1	0.4	1.0	1.3	4.1	3.3	0.9	0.5	0.4	0.6	0.2	0.5

表 9 线性度

		[μg/g]											
元素		As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd
相关系数		0.9998	0.9999	0.9975	0.9941	0.9999	0.9999	0.9999	0.9997	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999

表 10 稳定性

		[μg/g]											
元素		As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd
翻印自表 6	2.0 g (标准品)	7.2	14.9	2.5	2.6	50.8	25.5	104.2	51.0	49.6	53.0	51.6	50.9
盐酸贝那普利	1.0 g	7.1	15.1	2.4	2.3	51.1	25.7	103.7	51.9	49.8	55.1	53.2	51.3
	0.5 g	6.7	14.9	2.4	2.4	53.2	26.3	104.4	51.7	49.9	53.9	49.3	50.6
	0.3 g	6.6	14.6	2.2	2.4	53.0	26.1	102.1	52.0	49.4	52.2	49.9	50.7
	变化率 [%]	1.0 g	-1.4	+1.3	-4.0	-11.5	+0.6	+0.8	-0.5	+1.8	+0.4	+4.0	+3.1
	0.5 g	-6.9	0.0	-4.0	-7.7	+4.7	+3.1	+0.2	+1.4	+0.6	+1.7	-4.5	-0.6
	0.3 g	+8.3	-2.0	-12.0	-7.7	+4.3	+2.4	-2.0	+2.0	-0.4	-1.5	-3.3	-0.4
翻印自表 6	2.0g (标准品)	7.2	13.8	2.7	2.5	46.2	23.0	94.5	47.9	45.9	52.6	52.4	51.2
卡托普利	1.0 g	7.1	13.8	2.6	2.6	45.9	23.1	93.8	48.0	46.0	54.1	53.3	51.1
	0.5 g	7.3	13.6	2.4	2.4	48.0	23.8	96.3	49.2	46.9	54.7	50.6	51.4
	0.3 g	7.0	13.6	2.4	2.6	47.6	23.7	95.9	47.3	46.5	50.6	49.3	49.8

	1.0 g	-1.4	0.0	-3.7	+4.0	-0.6	+0.4	-0.7	+0.2	+0.2	+2.9	+1.7	-0.2
变化率 [%]	0.5 g	+1.4	-1.4	-11.1	-4.0	+3.9	+3.5	+1.9	+2.7	+2.2	+4.0	-3.4	+0.4
	0.3 g	-2.8	-1.4	-11.1	+4.0	+3.0	+3.0	+1.5	-1.3	+1.3	-3.8	-5.9	-2.7

## 7. 加标样品和浓度的适宜性

为验证加标样品及其浓度的适宜性，用 ICPMS-2030 对未加标样品和加标样品进行了分析。用微波消解仪消解部分样品（粉末），并溶解成溶液。对于 1 类和 2A 类样品，从固体样品稀释 5,000 倍制得测量溶液，对于 2B 类样品，稀释 25,000 倍制得测量溶液。

表 11 显示了 ICP-MS 分析结果。因为两种原料药加标样品测量结果均接近加标浓度，故认为评估样品的加标和均质化是恰当的。此外，未加标样品测定结果的适宜性也合格。

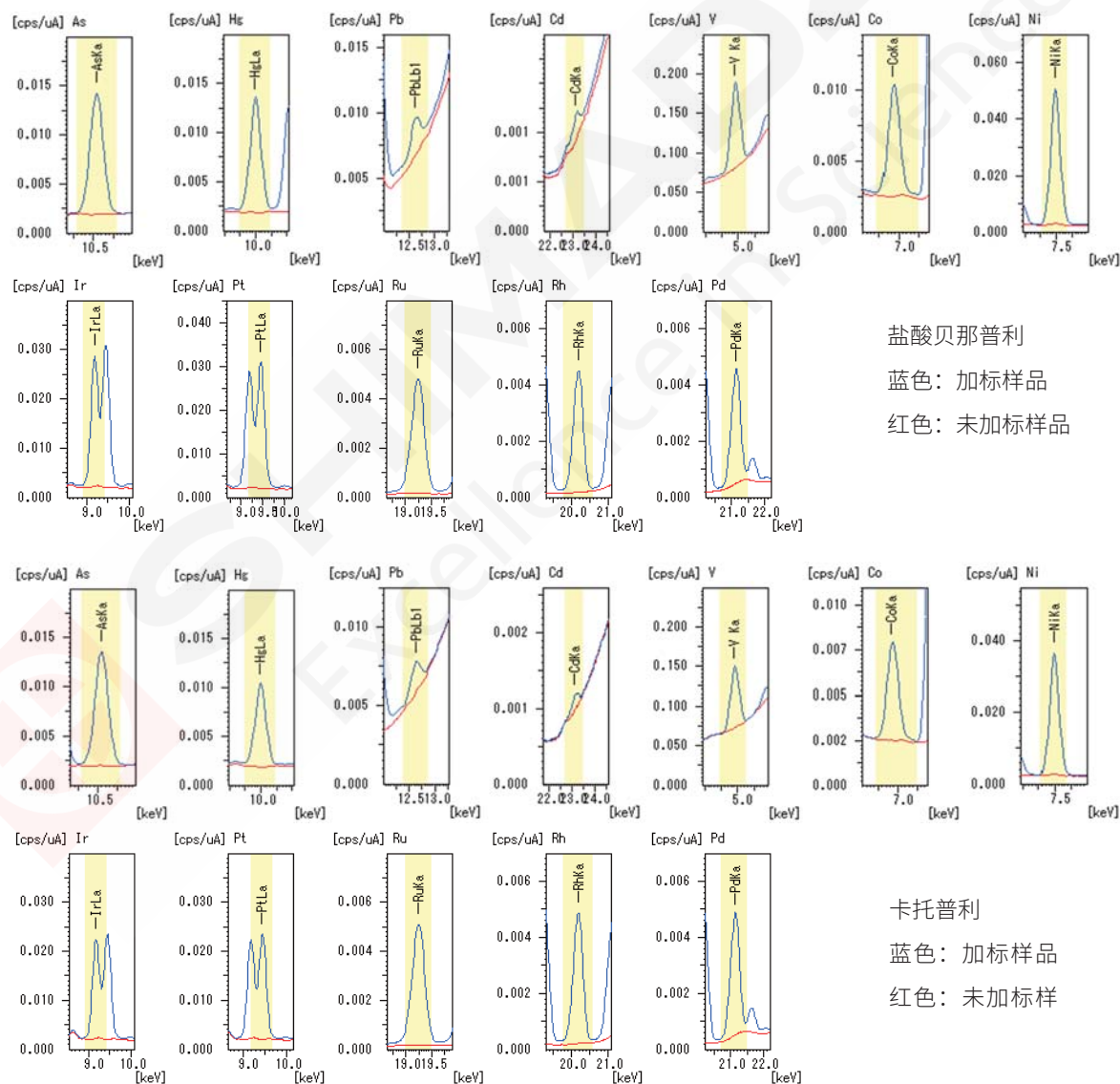


表 11 ICPMS-2030 分析结果 (n=2 时的平均值)

[g/g]

类别 元素	1 类				2A 类			2B 类					
	As	Hg	Pb	Cd	V	Co	Ni	Ir	Pt	Ru	Rh	Pd	
盐酸贝那普利	加标浓度	7.5	15	2.5	2.5	50	25	100	50	50	50	50	50
	加标样品	7.1	14.9	2.58	2.42	48.6	24.1	99.0	52.1	49.9	50.0	50.3	49.5
	未加标样品	<0.2	<0.1	0.03	<0.02	<0.7	<0.02	0.3	<0.05	<0.2	<0.05	<0.07	<0.1
卡托普利	加标样品	7.3	15.0	2.62	2.43	50.5	24.8	99.8	51.8	49.5	49.4	50.7	50.1
	未加标样品	<0.2	<0.1	0.03	<0.02	<0.7	<0.02	<0.2	<0.05	<0.2	<0.05	<0.07	<0.1

<: 表明该值低于原料药 (未加标) 粉末的换算检测下限 (10 $\sigma$ )。低于换算检测下限 (10 $\sigma$ ): 测量溶液中的检测下限 (10 $\sigma$ ) $\times$  稀释率 (1 类、2A 类: 5,000 $\times$ ; 2B 类: 25,000 $\times$ )

## 8.结论:

本实验证明了 EDX 法作为“ICH Q3D 原料药样品的元素杂质分析”中规定的 ICP-AES/ICP-MS 的一种替代方案的有效性。即使是对于含硫量高达约 15% 的卡托普利, 验证和核实结果也是令人满意的。本方法包使用标准品水溶液样品制作校准曲线, 其有效性也得到了证实。根据这些结果, 认为可以采用本方法来控制各种原料药和制剂产品的质量。

由于在一些情况下, EDX 法分析的浓度限值满足日用量为 1 g 的制剂产品量级, 因此认为, 针对原料药种类和摄入量选择性地配合使用 EDX 法操作对于提高效率和降低成本是有用的。

表 12 EDX 测定条件  
(药物杂质分析方法包)

仪器	: EDX-7000
元素	: As, Hg, Pb, Cd, V, Co, Ni, Ir, Pt, Ru, Rh, Pd
分析组	: 定量
检测器	: SDD
X 射线管	: Rh 靶材
射线管电压	: 50 kV
射准线直管仪电流	: 自动 [ $\mu$ A]
准直仪	: 10 [mm $\phi$ ]
初级滤光片	: #1 (Cd, Ru, Rh, Pd), #2 (V) #4 (As, Hg, Pb, Co, Ni, Ir, Pt)
大气	: 空气
积分时间	: 1800[s] $\times$ 3(#1, #2, #4)
死时间	: 最大 30[%]

### < 参考文献 >

- (1) ICH 协调指南, 元素杂质指南 Q3D (R1) (最终版于 2019 年 3 月 22 日获采纳)
- (2) USP <233> 元素杂质 - 程序
- (3) USP <735> X- 射线荧光光谱法 (2015 年 5 月)

# 电感耦合等离子体光谱法测定原料药样品中的元素杂质含量

**摘要:** 本文参考美国药典USP<232>对原辅料药品中元素杂质的限量要求及USP<233>对元素杂质的测定方法,采用有机溶剂二甲基亚砷(DMSO)直接溶解原料药样品,利用全谱型电感耦合等离子体光谱(ICP-AES)测定了原料药中的重金属元素和其它杂质元素的含量。实验结果表明:各元素的相关系数  $r > 0.9996$ ,加标回收率在93.8%~106%之间,RSD小于6%。该方法前处理操作简单,无需酸消解,可快速测定原料药中元素杂质。

**关键词:** ICP-AES 原料药 DMSO USP<232> USP<233>

原料药,指用于生产各类制剂的原料药物,是制剂中的有效成份,由化学合成、植物提取或者生物技术所制备的各种用来作为药用的粉末、结晶、浸膏等,但病人无法直接服用的物质。美国药典(简称USP)是美国政府对药品质量标准和检定方法作出的技术规定,也是药品生产、使用、管理、检验的法律依据。2010年1月,USP在欧洲药典(EP)的建议下,用USP<232>和USP<233>这两个通则代替原来的USP<231>通则,以使将来标准更容易协调。其中USP<232>规定了药品(含原料药)中14种金属元素的限量值,USP<233>推荐了试剂溶解、微波消解等样品前处理方法,并用ICP-AES或者ICP-MS测定的方法规程。

本文参考USP<232>的限量要求和USP<233>方法规程,采用有机溶剂(DMSO)溶解原料药,使用内标法,利用岛津公司全谱直读型ICPE-9000发射光谱仪的纵向观测模式高观测位置测定了原料药中重金属含量及其它元素含量。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 ICPE-9000 全谱发射光谱仪。

### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿均为玻璃材料,用硝酸溶液(1+1)浸泡24小时后,用去离子水冲洗,干燥备用;实验所用有机溶剂DMSO为优级纯试剂,实验用水为超纯去离子水。

### 1.3 样品的前处理

准确称取0.5 g(精确至0.1 mg)原料药样品于25 mL容量瓶中,加入适量有机溶剂DMSO,超声1 min,待样品完全溶解后,加入0.5 mL 50 mg/L的内标Y,用DMSO定容至25 mL。同法制备样品空白溶液和样品加标溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器参数

仪器工作条件见表1。

表 1 仪器工作条件

观测方向	雾化器类型	矩管类型	雾化室	等离子气 (L/min)	辅助气 (L/min)	载气 (L/min)	高频频率 (MHz)	高频功率 (kW)
纵向	同心	标准	旋流	16	1.4	0.9	27.12	1.3

## 2.2 标准曲线

根据药品剂型和每日最大剂量 ( $\leq 10$  g/day) 定义目标元素限值“J”值为分析杂质元素的可接受浓度, 即样品经前处理后待测元素在溶液中的最大限值。USP<233>规定了标准曲线系列为两个基体匹配的标准溶液和一个基体匹配的空白溶液, 每个元素标准溶液高浓度为目标限值的2倍(即2J), 低浓度为目标限值的0.5倍(即0.5J) 待测元素的目标限值(J)。

利用DMSO制空白溶液、0.5 J和2 J浓度的各个元素混合标准溶液, 各元素的限量值及标准溶液浓度见表2。

表 2 各元素的限量值及标准溶液浓度

元素	元素限值	元素限值J	标准曲线系列 (mg/L)		
	( $\mu\text{g/g}$ )	(mg/L)	0	0.5 J	0.5 J
镉	2.5	0.05	0	0.025	0.1
钷	10	0.2	0	0.1	0.4
铈	10	0.2	0	0.1	0.4
钡	10	0.2	0	0.1	0.4
钺	10	0.2	0	0.1	0.4
铈	10	0.2	0	0.1	0.4
钷	10	0.2	0	0.1	0.4
钼	10	0.2	0	0.1	0.4
镍	50	1	0	0.5	2
钒	10	0.2	0	0.1	0.4
铜	100	2	0	1	4

## 2.3 部分元素标准曲线如下:

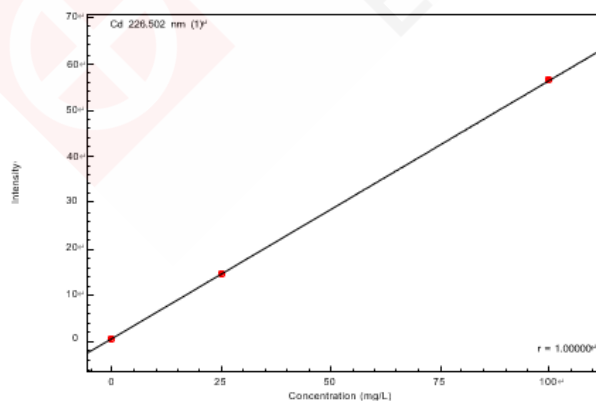


图1 Cd 元素的标准曲线

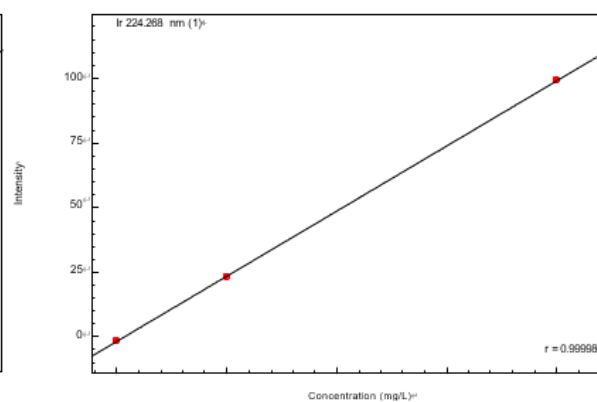


图2 Ir 元素的标准曲线

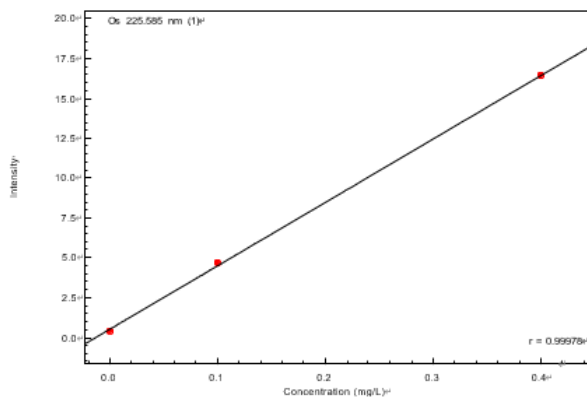


图3 Os 元素的标准曲线

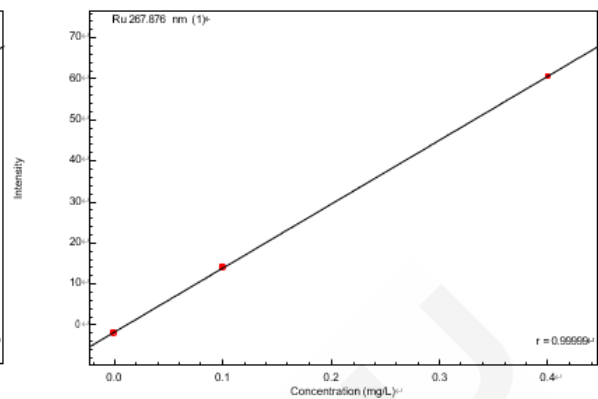


图4 Ru 元素的标准曲线

## 2.4 部分元素谱线轮廓图

Cd 226.502 Best

条件1

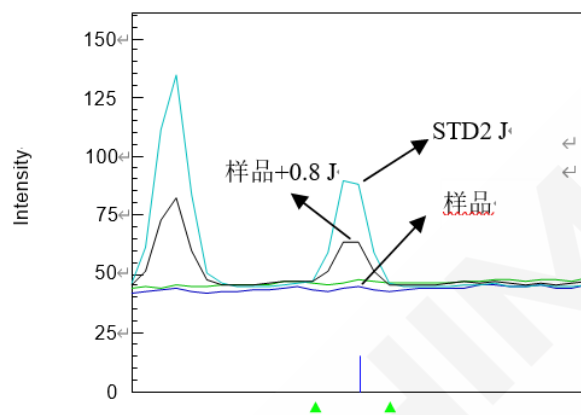


图 5 Cd 元素的谱线轮廓图

Ir 224.268 Best

条件1

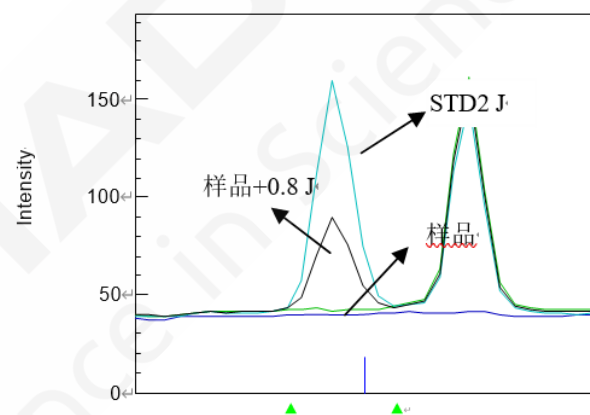


图 6 Ir 元素的谱线轮廓图

Pd 340.458 Best

条件1

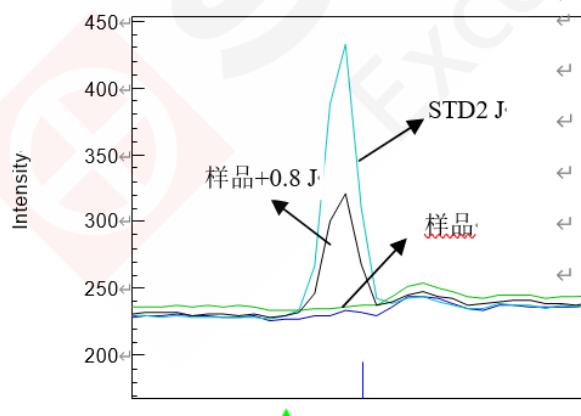


图 7 Pd 元素的谱线轮廓图

V 292.402 Best

条件1

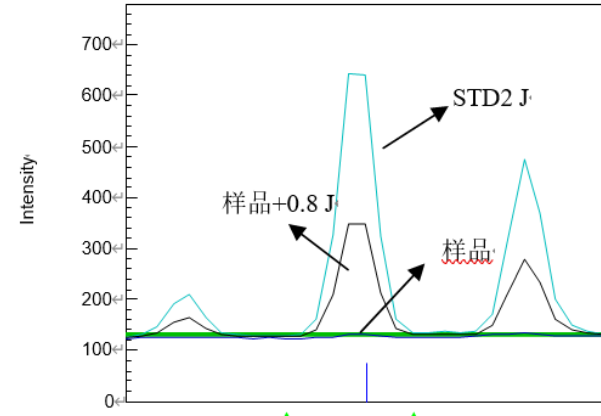


图 8 V 元素的谱线轮廓图

## 2.5 方法检出限、样品分析结果及加标回收率

按照实验方法，对空白溶液重复测定10次，取3倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得各元素在溶液中的检出限；根据样品稀释倍数，求得该方法的检出限；

测定样品中的无机杂质元素含量，每个样品重复测定3次；根据USP<233>的指导原则，向样品

中加入0.8 J限量的标准溶液，求出加标回收率，以考察方法的准确性。

结果显示，岛津 ICPE-9000 原子发射光谱仪测定注射剂中的元素杂质含量，各元素的方法检出限低于原料药含量限值，可以满足美国药典 USP<232>对原料药的杂质元素的限量要求。0.8 倍的限量值的加标回收率在 93.8~106%之间，满足 USP<233>对样品加标回收率需要70%~150% 的要求。

表 2 样品分析结果、方法检出限及加标回收率

元素	分析波长 (nm)	分析结果 (µg/L)	0.8 J 的加标回收率 (%)	RSD(n=3) (%)	方法检出限 (µg/g)	原料药元素 限值 (µg/g)
镉	226.502	ND	93.8	1.08	0.06	2.5
铈	224.268	ND	101	0.86	0.12	10
铈	225.585	ND	106	4.35	1.4	10
铂	203.646	ND	93.8	4.74	1.3	10
钡	340.458	ND	103	0.73	0.15	10
铯	339.682	ND	98.8	4.45	0.69	10
钕	267.876	0.045	98.1	0.88	0.20	10
钼	202.030	ND	102	0.56	0.19	10
镍	221.647	ND	97.3	0.53	0.33	50
钒	292.402	ND	100	0.89	0.04	10
铜	224.700	ND	96.3	0.49	0.16	100

N.D: 未检出。

## 2.6 方法精密度实验

为了验证本方法的重复性，取6份同样的样品，分别向样品中加入各元素的1倍限量值（即1 J），求出6份样品加标回收率的RSD值，确定方法的精密度，其结果见表3。

表 3 样品加标回收率和精密度

元 素	1#样品 (%Rec)	2#样品 (%Rec)	3#样品 (%Rec)	4#样品 (%Rec)	5#样品 (%Rec)	6#样品 (%Rec)	RSD (%)
镉	101	100	99.6	99	100	98.6	0.84
铈	105	102	93.0	105	104	107	1.59
铈	103	98.5	106	101	93.5	96	4.46
铂	92.5	103	92.5	103	92.5	92.5	5.86
钡	106	107	108	108	108	108	0.76
铯	104	104	110	110	104	104	3.1
钕	101	102	103	102	103	102	0.58
钼	1075	109	109	109	107	109	3.4
镍	101	101	96.9	105	101	106	1.1

钒	105	106	106	106	106	106	0.55
铜	102	102	102	101	102	101	0.37

结果表明，6份样品一倍限量值加标回收率的相对标准偏差小于6%，即该方法的精密度(%RSD)值完全符合USP<233>规定的标准，即每种目标元素的RSD值小于20%。

### 3 结论

利用有机溶剂(DMSO)直接稀释原料药样品，采用岛津公司电感耦合等离子体发射光谱ICPE-90004测定原料药中元素杂质的含量，元素线性关系及重复性良好，定量准确：线性相关系数在0.9996~1.0000，0.8倍的加标回收率在93.8%~106%之间，6次1倍加标回收率的RSD小于6%。该方法前处理操作简单、快速，可以满足美国药典对原料药中元素杂质限量值的测定要求。

# 利用电感耦合等离子体质谱测定药物中间体中 Pd 催化剂残留量

**摘要:** 使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICPMS-2030 LF) 对药物中间体中 Pd 催化剂残留量进行了测试。该方法操作简单, 精密度高, 测试准确, 灵敏度高, 适合于各种药物中间体及产品的钯催化剂残留量测定。该方法检出限为 0.0015 mg/kg, 连续 6 次测定 RSD 为 2.7%, 加标回收率为 98.5%。

**关键词:** ICPMS-2030 LF 药物中间体 钯催化剂

催化剂是一种改变反应速率但不改变反应总标准吉布斯自由能的物质。这种作用称为催化作用, 涉及催化剂的反应称为催化反应。含钯类催化剂在石油化工等行业的催化加氢、催化氧化等反应过程中有着极为广泛的应用。在多种原料药中间体的合成过程中, 钯 (Pd) 催化剂均起到非常重要的促进作用。

作为风险控制日益严格的原料药对金属元素的残留量有着严格的限制, ICH Q3D中对钯的日允许暴露量要求最严格的是吸入剂, 为1  $\mu\text{g}/\text{天}$ 。为控制原料药Pd催化剂的残留, 对于最终产物不是由钯催化生成的反应, 需要在催化反应结束后对药物中间体进行Pd催化剂残留量的测试。Pd催化剂残留量在允许的范围内是中间体能够用于下一步反应的前提, 因此需要快速、准确判定中间体中钯的含量。

本文使用岛津 ICPMS-2030 LF电感耦合等离子体质谱仪测定了药物中间体中Pd催化剂残留量, 提供了准确测定药物中间体Pd催化剂残留量的方法。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 LF 电感耦合等离子体质谱仪。

### 1.2 仪器参数

ICP-MS仪器分析条件见错误!未找到引用源。。

表 1. ICP-MS 分析条件

参数	参数设定	参数	参数设定
高频功率	1.20 KW	等离子体气流速	9.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

### 1.3 样品前处理

称取约0.1 g样品置于微波消解内罐中, 加8 mL  $\text{HNO}_3$ 后微波消解, 冷却至室温后转移至 100 mL容量瓶, 纯水定容至刻度线, 摇匀待测, 同法制备样品空白溶液及加标样品溶液。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

配制介质为8% (V/V) HNO<sub>3</sub> 的Pd系列标准溶液于50 mL容量瓶中，配制溶液浓度分别为0、10、20、30、40、50 μg/L。以50 μg/L 的In元素作为内标溶液，在线加入内标。

### 2.2 元素标准曲线

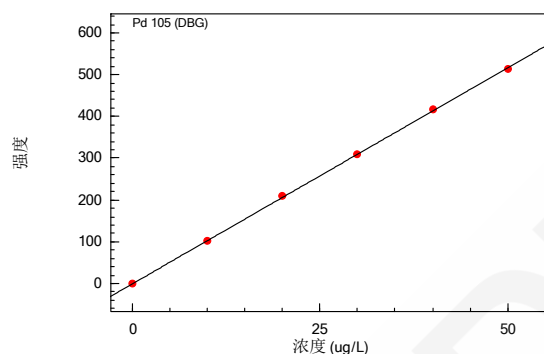


图1 校准曲线图,  $r=0.99994$

按照10倍空白强度标准偏差计算得到仪器定量限为0.0015 μg/L, 方法定量限为0.0015 mg/kg, 完全可以满足测试需求。

### 2.3 样品测定结果及加标回收率

上机测定样品含量，并进行加标回收试验，结果见表2。

表2. 样品测定结果及加标回收率

元素	质量数	内标	测定结果 (μg/L)	RSD (n=3,%)	样品含量 (mg/kg)	加标浓度 (μg/L)	加标后测定结果 (μg/L)	加标回收率 (%)
Pd	105	<sup>115</sup> In	25.6	1.1	25.3	20.0	45.3	98.5

### 2.4 精密度考察

连续6次测定样品中钯的含量后计算测定结果的RSD (%)，结果见表3。

表3. 连续6次测定结果

测定次数	测定结果(μg/L)
1	25.6
2	25.2
3	25.5
4	25.2
5	23.7
6	25.1
RSD(%)	2.7

## 3. 结论

本文采用微波消解法处理药物中间体，使用岛津ICPMS-2030 LF电感耦合等离子体质谱仪测定了药物中间体中Pd催化剂的残留量。该方法稳定好，样品连续六次测定的RSD为2.7%，检出限低，方法定量限为0.0015 mg/kg，准确性好，加标回收率为98.5%。

# 电感耦合等离子体质谱法测定喷雾剂中的元素杂质含量

**摘要:** 本文参考美国药典USP<232>对元素杂质的限量要求及USP<233>对元素杂质的测定方法,利用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定了吸附给药样品中的重金属元素和其它元素杂质的含量。实验结果表明:各元素的相关系数  $r > 0.9992$ ,加标回收率在93.0%~103%之间,满足USP<233>对样品加标回收率需要70%~150%的要求,6份样品一倍限量值加标回收率的相对标准偏差小于7%,方法的精密度(%RSD)值完全符合USP<233>规定每种目标元素的RSD值小于20%的要求,该方法操作简便、快速,样品前处理简单,可以满足美国药典对口服药中杂质元素限量值的测定要求。

**关键词:** USP<232> USP<233> 吸入给药 ICP-MS

美国药典(简称USP)是美国政府对药品质量标准和检定方法作出的技术规定,也是药品生产、使用、管理、检验的法律依据。2010年1月,USP在欧洲药典(EP)的建议下,用USP<232>和USP<233>这两个通则代替原来的USP<231>通则,以使将来标准更容易协调。USP<232>(该标准于2015年12月1日起正式执行)规定了药品中元素杂质的限量值。USP<233>规定了不同的样品处理方法,供不同样品使用,并用ICP-AES或者ICP-MS测定的方法规程。

本文参考USP<232>的限量要求和USP<233>方法规程,采用直接稀释法处理喷雾剂样品,使用岛津ICPMS-2030测定了吸入给药喷雾剂中重金属含量及其它元素含量。该方法操作简单,定量准确,可以满足美国药典对药品中杂质元素限量值的测定要求。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

岛津ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质,使用硝酸溶液(1+1)浸泡24小时后,用去离子水冲洗,干燥备用;实验所用HNO<sub>3</sub>为优级纯试剂,实验用水为超纯去离子水。

### 1.3 样品的采集和样品前处理

称取0.5g(精确至0.0001g)试样于100 mL PET中,在天平上用2% HNO<sub>3</sub>定至50.0 g,摇匀,待测。同法制备样品空白溶液和样品加标溶液。

### 1.4 仪器参数

等离子体参数:

高频功率: 1.2 KW

矩管类型: Mini

采样深度: 5.0 mm

载气流速: 0.7 L/min

雾室温度: 5 °C

碰撞气种类: He

辅助气流速: 1.1 L/min

雾化室: 旋流

等离子体气流速: 8.0 L/min

雾化器类型: 同心

高频频率: 27.12 MHz碰撞池参数:

池电压: -21 V

碰撞气流速：6.0 mL/min

能量过滤器电压：7.0 V

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

根据药品剂型和每日最大剂量 ( $\leq 10$  g/day) 定义目标元素限值“J”值为分析杂质元素的可接受浓度, 即样品经前处理后待测元素在溶液中的最大限值。USP<233>规定了标准曲线系列为两个基体匹配的标准溶液和一个基体匹配的空白溶液, 每个元素标准溶液高浓度为目标限值的2倍 (即2 J), 低浓度为目标限值的0.5倍 (即0.5 J), 待测元素的目标限值 (J)。

利用2%的硝酸溶液配制空白溶液、0.5 J和2 J浓度的各个元素混合标准溶液, 各元素的限量值及标准溶液浓度见表1。内标元素In、Bi、Ge、Sc浓度均为200  $\mu\text{g/L}$ , 采用内标组件在线添加。

表 1 元素限值及标准曲线溶液浓度系列

元素	质量数 (amu)	吸入给药 PDE ( $\mu\text{g/day}$ )	元素限值 ( $\mu\text{g/g}$ )	元素限值 J ( $\mu\text{g/L}$ )	标准曲线系列 ( $\mu\text{g/L}$ )		
					0	0.5 J	2J
镉	111	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铅	208	5	0.5	5	0	2.5	10
砷	75	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
汞	202	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铊	193	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铍	189	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
钡	105	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铂	195	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铷	103	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
钇	101	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
铬	52	25	2.5	25		12.5	50
铝	95	10	1	10	0	5	20
镍	60	1.5	0.15	1.5	0	0.75	3
钒	51	30	3	30	0	15	60
铜	63	100	10	100	0	50	200

备注: 1. PDE为每日允许暴露剂量 ( $\mu\text{g/day}$ );

2. 根据10 g/day的剂量及稀释100倍计算得到元素限值 (J)

3. 以上元素测定为氦气碰撞模式

### 2.2 部分元素标准曲线如下:

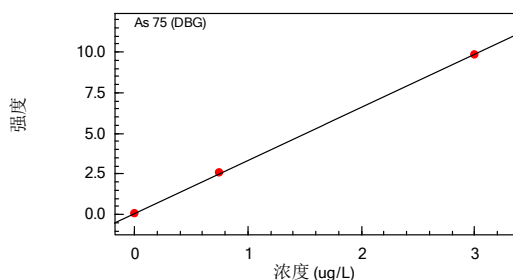


图 1 As 元素的标准曲线  $r=0.99996$

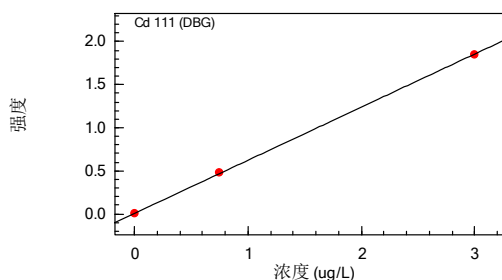


图 2 Cd 元素的标准曲线  $r=0.99990$

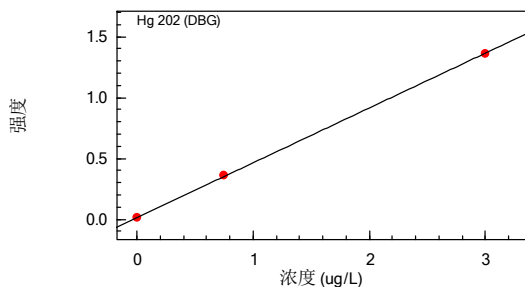


图 3 Hg 元素的标准曲线  $r=0.99994$

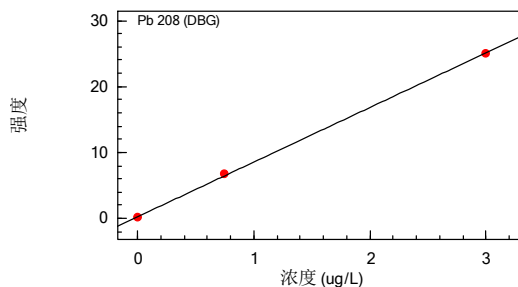


图 4 Pb 元素的标准曲线  $r=0.99976$

### 2.3 部分元素质量轮廓图

质谱分析存在着同量异位素干扰、多原子离子干扰、难熔氧化物干扰、双电荷离子干扰和基体干扰等多种类型的干扰因素。ICPMS-2030的八极杆碰撞池通过引入氦气碰撞,可以有效地消除干扰。当分析结果异常,需要经验去识别甄选时,岛津LabSolutions ICPMS软件具有独特的“诊断助手”功能,可根据各元素的质量灵敏度、等效背景浓度、干扰情况等因素综合判断,对结果做出“Best”,“Good”和“NG”的判断,并给出相应的诊断依据,可大大提高分析效率并保证分析结果的准确性。

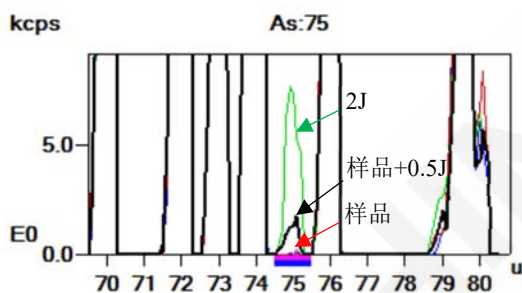


图 5 Mo 元素质量轮廓图

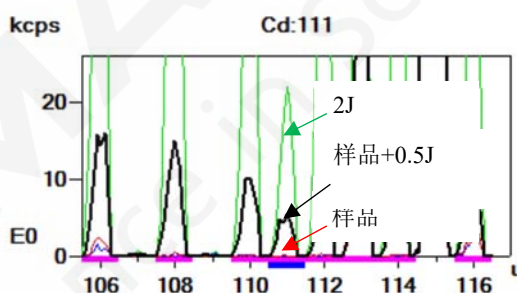


图 6 Cd 元素质量轮廓图

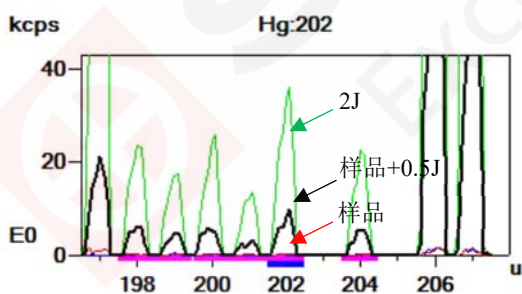


图 7 汞元素质量轮廓图

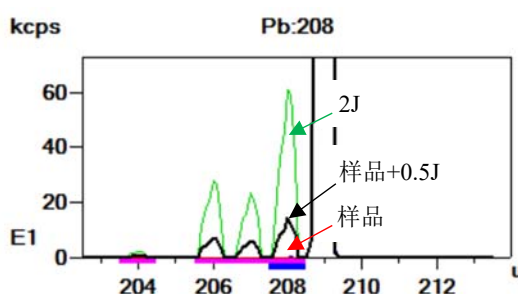


图 8 铅元素质量轮廓图

### 2.4 样品分析及加标回收率

按照实验方法,对空白溶液重复测定10次,取3倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得各元素在溶液中的检出限;根据样品稀释倍数(100倍),求得该方法的检出限;

测定样品中的杂质元素含量,每个样品重复测定3次;

根据USP<233>的指导原则,向样品中加入0.5J限量的标准溶液,求出加标回收率,以考察方法的准确性。

表 2 样品分析及加标回收率

元素	内标	分析结果 ( $\mu\text{g/L}$ )	0.5 J 加标 测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(n=3) (%)	0.5 J 的加标 回收率 (%)	方法检出限 ( $\mu\text{g/kg}$ )
镉	$^{115}\text{In}$	ND	0.72	1.16	96	0.2
铅	$^{209}\text{Bi}$	ND	0.76	0.96	101	0.2
砷	$^{72}\text{Ge}$	ND	0.76	2.27	101	1.5
汞	$^{209}\text{Bi}$	ND	0.76	0.70	101	3
铊	$^{209}\text{Bi}$	ND	0.75	1.75	100	0.1
铊	$^{209}\text{Bi}$	ND	0.73	0.54	97	1
钪	$^{115}\text{In}$	ND	0.70	2.39	93	0.5
钪	$^{209}\text{Bi}$	ND	0.76	1.82	101	0.1
铊	$^{115}\text{In}$	ND	0.72	1.65	96	0.1
钪	$^{115}\text{In}$	ND	0.72	0.91	96	0.2
铊	$^{45}\text{Sc}$	ND	12.4	2.33	99	13
铊	$^{115}\text{In}$	ND	5.02	3.44	100	0.3
铊	$^{45}\text{Sc}$	ND	0.77	3.35	103	1
钪	$^{45}\text{Sc}$	ND	0.76	1.49	101	0.1
铜	$^{72}\text{Ge}$	ND	50.9	0.80	102	25

备注：N.D 未检出；

结果显示，岛津 ICPMS-2030 质谱仪测定喷雾剂中的元素杂质含量，各元素的方法检出限远低于喷雾剂含量限值，可以满足美国药典 USP<232>对喷雾剂的元素杂质的限量要求。

0.5 倍的限量值的加标回收率在 93~103% 之间，满足 USP<233>对样品加标回收率需要 70%~150% 的要求。

## 2.5 方法精密度实验

为了验证本方法的重复性，取 6 份同样的样品，分别向样品中加入各元素的 1 倍限量值（即 1 J），求出 6 份样品加标测定结果的 RSD 值，确定方法的精密度，其结果见表 3。

表 3 样品加标样测定结果和精密度

元素	加标样 (1J) 测定结果 ( $\mu\text{g/L}$ )						RSD (%)
	1#样品	2#样品	3#样品	4#样品	5#样品	6#样品	
镉	1.51	1.44	1.44	1.47	1.43	1.43	2.2
铅	1.55	1.51	1.29	1.52	1.49	1.50	6.3
砷	1.52	1.47	1.46	1.48	1.46	1.44	1.8
汞	1.56	1.51	1.29	1.52	1.48	1.48	6.4
铊	1.55	1.49	1.28	1.48	1.46	1.46	6.3
铊	1.54	1.49	1.29	1.51	1.47	1.49	6.1
钪	1.45	1.38	1.36	1.37	1.34	1.35	2.9
钪	1.51	1.43	1.22	1.44	1.39	1.39	7.0

铯	1.46	1.40	1.39	1.41	1.38	1.38	2.1
钇	1.50	1.42	1.41	1.44	1.39	1.40	2.8
铬	25	24.7	24.6	24.8	24.2	24.4	1.2
钼	10.1	9.71	9.72	9.83	9.56	9.60	2.0
镍	1.50	1.47	1.46	1.47	1.44	1.56	2.8
钒	1.52	1.49	1.49	1.51	1.47	1.47	1.4
铜	102	99.6	98.9	101	99.1	99.1	1.3

结果表明，6 份样品一倍限量值加标样测定结果的相对标准偏差小于 7%，即该方法的精密度 (%RSD) 值完全符合 USP<233>规定的标准，即每种目标元素的 RSD 值小于 20%。

### 3. 结论

采用岛津公司电感耦合等离子体质谱仪ICPMS-2030测定吸入给药中各限量元素的含量，元素线性关系及重复性良好，定量准确，各元素的相关系数  $r > 0.9992$ ，加标回收率在93.0%~103%之间，6份样品一倍限量值加标回收率的相对标准偏差小于7%，各指标均符合USP<233>规定的标准。该方法操作简便、快速，样品前处理简单，可以满足美国药典对吸入给药中杂质元素限量值的测定要求。

# 利用电感耦合等离子体质谱测定葡萄糖注射液中重金属元素含量

**摘要:** 本文使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 直接对 5%葡萄糖注射液中重金属元素含量进行了测试。该方法操作简单, 分析速度快, 灵敏度高, 可以对多元素含量进行同时测定。各元素不同浓度加标回收率在 87~110%之间, 满足 70~150%的回收率要求, 各元素连续 6 次 0.5 倍限值浓度加标样品测定结果 RSD 小于 3%。

**关键词:** ICPMS-2030LF 葡萄糖注射液 重金属

葡萄糖注射液是临床上运用非常广泛的药物, 葡萄糖作为营养物质常被用于补充高热、昏迷或者是衰弱不能进食的患者所需要的热量和体液, 同时葡萄糖也可以作为溶媒, 可以促进其它药物的溶解和吸收。因其使用广泛且单日使用剂量大, ICH (人用药品技术要求国际协调理事会) 在元素杂质限度方面规定其按照日给药体积 2 L 进行限度考察, 并将注射剂需要进行风险评估的元素分为 1 类、2A 类及部分 3 类。鉴于日摄入量, 葡萄糖注射液中的杂质含量限度极大降低, 对测定仪器的灵敏度都有较高要求。

本文使用岛津 ICPMS-2030 LF 电感耦合等离子体质谱仪直接测定了葡萄糖注射液中重金属元素的含量, 验证了岛津 ICP-MS 产品在葡萄糖注射液中重金属元素测定中的适用性。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 LF 电感耦合等离子体质谱仪。

### 1.2 仪器参数

ICP-MS 仪器分析条件见 [错误!未找到引用源。](#)

表 2. ICP-MS 分析条件

参数	参数设定	参数	参数设定
高频功率	1.20 KW	等离子体气流速	9.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.60 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

配制 100 倍限值浓度 (限值浓度用 J 表示) 的混合标液, 使用优级纯葡萄糖配制 5% 葡萄糖溶液作为稀释剂, 稀释 100J 的混合标液一定倍数得到所需标准溶液, 标准溶液浓度如表 3 所示。内标元素  $^9\text{Be}$ 、 $^{45}\text{Sc}$ 、 $^{72}\text{Ge}$ 、 $^{115}\text{In}$ 、 $^{209}\text{Bi}$  浓度为 100  $\mu\text{g/L}$ , 采用内标组件在线添加, 蠕动泵转速为 5 转/分钟, 内

标组件中的内标软管用样品软管替代。

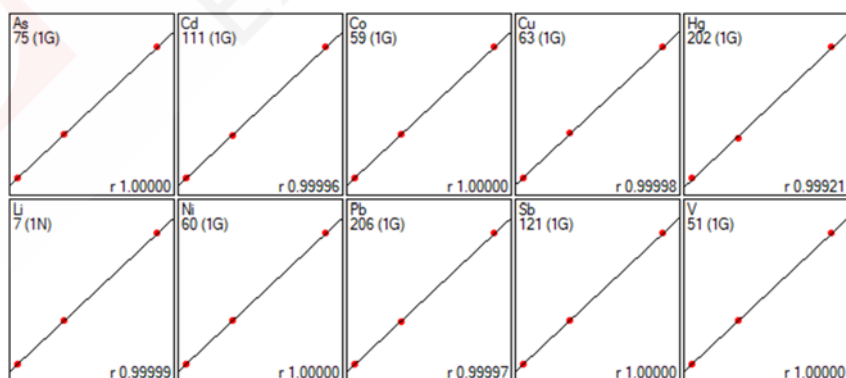
表2. 元素限度信息

元素	分类	日允许暴露量 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	样品中元素杂质允许浓度 J ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )
Cd	1	2	1
Pb	1	5	2.5
As	1	15	7.5
Hg	1	3	1.5
Co	2A	5	2.5
V	2A	10	5
Ni	2A	20	10
Li	3	250	125
Sb	3	90	45
Cu	3	300	150

表 3. 标准溶液浓度及分析质量数

元素	质量数 (amu)	内标	标准曲线浓度( $\mu\text{g}/\text{L}$ )		
			STD1	STD2	STD3
Cd	111	$^{115}\text{In}$	0.00	0.50	1.50
Pb	208	$^{209}\text{Bi}$	0.00	1.25	3.75
As	75	$^{45}\text{Sc}$	0.00	3.75	11.25
Hg	202	$^{209}\text{Bi}$	0.00	0.75	2.25
Co	59	$^{72}\text{Ge}$	0.00	1.25	3.75
V	51	$^{45}\text{Sc}$	0.00	2.50	7.50
Ni	58	$^{45}\text{Sc}$	0.00	5.00	15.00
Li	7	$^9\text{Be}$	0.00	62.5	187.5
Sb	121	$^{115}\text{In}$	0.00	22.50	67.5
Cu	63	$^{72}\text{Ge}$	0.00	75.0	225.0

## 2.2 元素标准曲线



## 2.3 样品测定结果及加标回收率

按照实验方法，对空白溶液重复测定 11 次，取 3 倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得各元素在溶液中的检出限。使用 ICPMS-2030 LF 直接测定了 5%葡萄糖注射液中重金属元素含量，并进行 0.5 J、1 J 浓度的加标回收试验，结果见表 4。

表 4. 样品测定结果及各浓度加标回收率

元素	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	测定结果 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标回收率 (%)	
			0.5J	1J
Cd	0.01	N.D.	104	98
Pb	0.06	0.17	110	102
As	0.16	0.32	103	102
Hg	0.03	0.13	87	99
Co	0.02	N.D.	104	97
V	0.02	N.D.	99	98
Ni	0.17	0.71	96	98
Li*	0.02	0.51	100	100
Sb	0.02	0.57	100	99
Cu	0.18	5.33	98	98

注：1、N.D.表示未检出；2、\*表示采用非碰撞模式测定。

## 2.4 精密度考察

配制 6 份 0.5 倍各元素限值浓度的加标样品，连续测定后计算测定结果的 RSD (%)，结果见表 5。

表 5. 各元素测定结果精密度 (n=6)

元素	测定结果精密度
	RSD (%)
Cd	2.5
Pb	2.2
As	1.4
Hg	2.5
Co	2.8
V	1.1
Ni	1.4
Li	0.8
Sb	0.9
Cu	0.8

## 3. 结论

本文使用岛津 ICPMS-2030 LF 电感耦合等离子体质谱仪直接测定了 5%葡萄糖注射液中重金属元素的含量，验证了岛津 ICP-MS 产品在葡萄糖注射液中重金属元素测定中的适用性。各元素不同浓度加标回收率在 87~110%之间，满足 70~150%的回收率要求，各元素连续 6 次 0.5 倍限值浓度加标样品测定结果 RSD 小于 3%，该方法操作简便、分析速度快，灵敏度高，适用于葡萄糖注射液等样品中重金属元素含量的测试。

### 第三节 残留溶剂检测

药品中溶剂残留是指在原料药、辅料及制剂生产中使用的，但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。在原料药合成工艺中，有机溶剂必不可少，选择适当的溶剂可以提高产量或决定药物的性质，如晶型、纯度、溶解度等。但当药品中溶剂残留水平高于安全值时，就会对人体产生危害。因此溶剂残留的监测对药品质量控制具有重要意义。

《中国药典》2020 版四部，根据通则 0861 残留溶剂测定法，将药品中常见的残留溶剂分为三类，第一类溶剂应该避免使用，共 5 种（包括苯、四氯化碳、1,1-二氯乙烷、1,2-二氯乙烯、1,1,1-三氯乙烷），其中 1,1,1-三氯乙烷限度为 0.15%，其余 4 种限度为 0.0002~0.0008%，第二类溶剂应该限制使用，相对于 2015 版《中国药典》的 27 种中新加入了异丙基苯和甲基异丁酮、共 29 种（如甲醇、吡啶、甲苯、N,N-二甲基甲酰胺和乙腈），限度为 0.005%~0.388%。第三类溶剂（如醋酸、丙酮、异丙醇、丁醇、乙醇和乙酸乙酯）为药品 GMP 或其他质量要求限制使用。其中第一类和第二类对人体的危害性最大。

一些常见的挥发性有机溶剂杂质的 ICH 限量值

挥发性有机杂质	限量 (ppm)	PDE (mg/天)
乙腈	410	4.1
氯仿	60	0.6
1,4-二氧六环	380	3.8
二氯甲烷	600	6.0
吡啶	200	2.0
1,1,2-三氯乙烷	80	0.8

根据药典方法，岛津气相色谱解决方案可以实现快速、高灵敏度的残留溶剂分析。本章收录了气相色谱技术在药物中常见溶剂残留分析相关的应用。

# 气相色谱结合顶空进样器测定药品中微量环氧氯丙烷残留

**摘要:** 本文利用岛津公司 GC-2010 Plus 气相色谱仪结合 HS-20 Trap 型顶空自动进样器的捕集进样模式,建立了药品中微量环氧氯丙烷残留的测定方法。在标准曲线浓度范围内组分线性关系良好,相关系数  $r$  为 0.9999;峰面积重复性良好,RSD 为 1.30%。该方法可用于药品中环氧氯丙烷残留的快速定性定量测定。

**关键词:** 顶空自动进样器 气相色谱仪 药品 环氧氯丙烷

环氧氯丙烷 (ECH) 别名表氯醇,是一种易挥发的无色油状液体,有类似氯仿气味,主要用于生产环氧树脂等精细化工产品,也可用于药物合成中间溶剂、纸张湿强剂、电镀光亮剂等。其摄取、吸入及皮肤吸收均有毒,且刺激性强烈,动物实验证明有潜在致癌作用。

目前,对药品中溶剂残留的控制已受到越来越多的重视。根据某药业有限公司内部指标,其用顶空法的限量值为  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2010版药典中提供的药品中溶剂残留的检测方法为顶空进样和溶液直接进样。本文建立了一种利用捕集顶空进样模式测定药品中微量溶剂残留含量的方法。岛津公司新推出的 HS-20 Trap 型顶空进样器具有两种不同的进样模式,即静态顶空模式 (Loop mode) 和捕集顶空模式 (Trap mode)。捕集顶空模式是利用电子制冷的捕集阱,将经平衡后顶空瓶上部全部挥发性组分进行多次富集浓缩,然后捕集阱快速升温后实现瞬间进样,从而得到比静态顶空模式更高的灵敏度,实现更低含量组分测定。本方法操作简单,灵敏度更高,适合于药品中极微量溶剂残留的检测。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

HS-20 Trap 顶空自动进样器 (岛津公司)

GC-2010 Plus 气相色谱仪

### 1.2 分析条件

HS-20 条件 (Loop 模式):

顶空瓶平衡温度:  $105^{\circ}\text{C}$

定量环温度:  $115^{\circ}\text{C}$ , 传输线温度:  $120^{\circ}\text{C}$

平衡时间: 30min, 进样时间: 1min

色谱条件:

色谱柱: Rtx-624,

$60\text{m}\times 0.32\text{mm}\times 1.8\mu\text{m}$

柱温程序:  $40^{\circ}\text{C}(10\text{min})_{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}_{200^{\circ}\text{C}}$   
(2min)

载气控制方式: 恒线速度 ( $35.0\text{ cm}/\text{sec}$ )

进样方式: 分流进样, 分流比 5:1

FID 温度:  $250^{\circ}\text{C}$

HS-20 条件 (Trap 模式):

顶空瓶平衡温度:  $105^{\circ}\text{C}$

定量环温度:  $115^{\circ}\text{C}$ , 传输线温度:  $120^{\circ}\text{C}$

平衡时间: 30min, 进样时间: 1min

Trap 次数: 2 次

色谱条件:

色谱柱: Rtx-624,

$60\text{m}\times 0.32\text{mm}\times 1.8\mu\text{m}$

柱温程序:  $40^{\circ}\text{C}(10\text{min})_{10^{\circ}\text{C}/\text{min}}_{200^{\circ}\text{C}}$   
(10min)

载气控制方式：恒线速度（35.0 cm/sec） FID 温度：250°C

进样方式：分流进样，分流比 10:1

### 1.3 样品前处理

精密称取 0.2 g 药品样品，加入 5 mL DMSO 后密封，待测。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准谱图

环氧氯丙烷标准谱图（Loop mode）如图 1 所示。

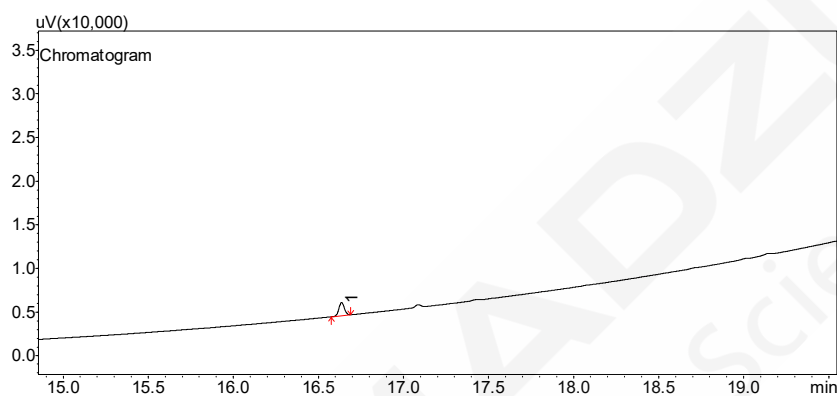


图 1. 环氧氯丙烷标准溶液色谱图（0.2 µg/mL）

表 1. 环氧氯丙烷组分保留时间

No.	保留时间	化合物	英文名称	CAS#	峰面积
1	16.636	环氧氯丙烷	ECH	106-89-8	3385

环氧氯丙烷标准谱图（Trap mode）如图 2 所示。

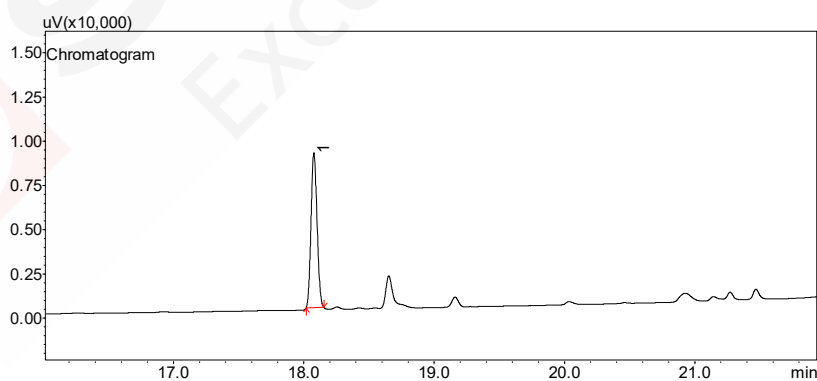


图 2. 环氧氯丙烷标准溶液色谱图（0.2 µg/mL）

表 2. 环氧氯丙烷组分保留时间

No.	保留时间	化合物	英文名称	CAS#	峰面积
1	18.077	环氧氯丙烷	ECH	106-89-8	28163

## 2.2 标准曲线 (Trap mode)

使用 DMSO 配制环氧氯丙烷标准系列，浓度分别为 0.2、1.0、2.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线，如下图 3 所示。

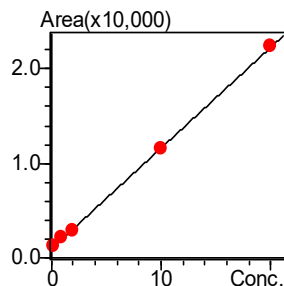


图 3. 标准曲线

表 3. 组分相关系数及检出限

No.	名称	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	环氧氯丙烷	0.9999	0.097

## 2.3 重复性测试 (Trap mode)

0.2  $\mu\text{g}/\text{L}$  环氧氯丙烷标准溶液连续进样 5 针，计算峰面积 RSD% 以考察仪器重复性，结果如表 4 所示。

表 4. 各组分检出限及面积重复性 (n=5)

No.	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	RSD%
1	28163	28082	27580	28127	28612	1.30

## 2.4 样品测试结果

将环氧氯丙烷标准溶液添加到药品样品中，按照样品前处理方法制备，样品中加标浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。样品加标回收率结果见表 5。

表 5. 样品测试结果及加标回收率

No.	化合物名称	药品		
		检测结果 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	回收率%	RSD% (n=3)
1	环氧氯丙烷	1.3	99.57	1.87

## 3 结论

采用岛津公司气相色谱仪 (GC-2010 Plus) 结合 HS-20 Trap 顶空进样器分析药品中微量环氧氯丙烷，比较顶空进样器的两种进样模式下的灵敏度，采用捕集模式 (Trap mode) 进样具有比静态顶空模式 (Loop mode) 更高的灵敏度。方法操作简单，在 0.2~20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准曲线范围内线性良好，样品加标回收率为 99.57%。本方法可以用于药品中微量环氧氯丙烷的定性定量检测。

# 顶空-气相色谱法测定化学药品中三种溶剂残留

**摘要:** 本文利用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪结合 HS-10 顶空自动进样器, 建立了化学药品中叔丁醇、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲醚 3 种溶剂残留的检测方法。采用外标法定量, 在 0.1~10  $\mu\text{g}$  浓度范围内线性关系良好, 3 种物质的相关系数  $R^2$  大于 0.9999。以 3 倍信噪比计算, 3 种化合物的检出限分别在 0.027~0.048  $\mu\text{g}$  之间。平行检测七份 0.2  $\mu\text{g}$  标液, 峰面积 RSD% 在 2.73~3.34% 之间。该方法简单方便, 对仪器污染小, 可以很好的满足化学药品中这 3 种溶剂残留的检测。

**关键词:** 气相色谱仪 顶空进样 化学药品 溶剂残留

药品中的残留溶剂系指在原料药或辅料的生产中, 以及在制剂制备过程中使用的, 但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。药品中溶剂残留的分析是药品质量控制中重要的环节。

2020年4月29日国家药品监督管理局药品审评中心 (CDE) 在官网上发布了“关于公开征求ICH《Q3C (R8): 杂质: 残留溶剂的指导原则》指导原则草案意见的通知”。ICH Q3C指导原则新增了3种溶剂: 2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚和叔丁醇, 这意味着相关制药企业溶剂残留的检测项目可能需要增加这几种化合物。

按照最新版的《中国药典》药品的溶剂残留检测可采用顶空进样和溶液直接进样。顶空进样对仪器的污染小, 前处理简单, 常常成为药品溶剂残留检测的首选。本文利用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪结合 HS-10 顶空自动进样器, 建立了药品中 2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚和叔丁醇 3 种溶剂残留的检测方法。该方法前处理简单, 对仪器污染小, 可以很好的满足化学药品中这 3 种溶剂残留的检测。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

气相色谱仪: Nexis GC-2030

HS-10 顶空自动进样器

### 1.2 试剂

2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚和叔丁醇 3 种溶剂标准物质, 购自上海安谱实验科技股份有限公司; 氯化钠 (分析纯, 北京化学试剂厂)

### 1.3 分析条件

顶空条件:

平衡温度: 80°C

平衡时间: 30 min

样品流路温度: 100°C

进样时间: 1 min

传输线温度: 120°C

加压压力: 100 kPa

GC 条件:

色谱柱: Rtx-624, 30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  1.8  $\mu\text{m}$  进样口温度: 250°C

载气控制方式: 恒线速度, 35.0 cm/sec\_20°C 进样方式: 分流  
/min\_ 220°C (5 min)

柱温程序: 40°C (2 min) \_5°C/min\_ 90°C 分流比: 10:1

载气: 氮气

FID 检测器温度: 250°C

## 1.4 样品前处理

准确称取 0.2 g 药品置于 20 mL 顶空瓶中, 加入 0.4 g 氯化钠, 再加入 2 mL 去离子水, 振摇使之溶解, 待测。

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准溶液色谱图

3种溶剂残留的色谱图见图1, 相关化合物信息见表1。

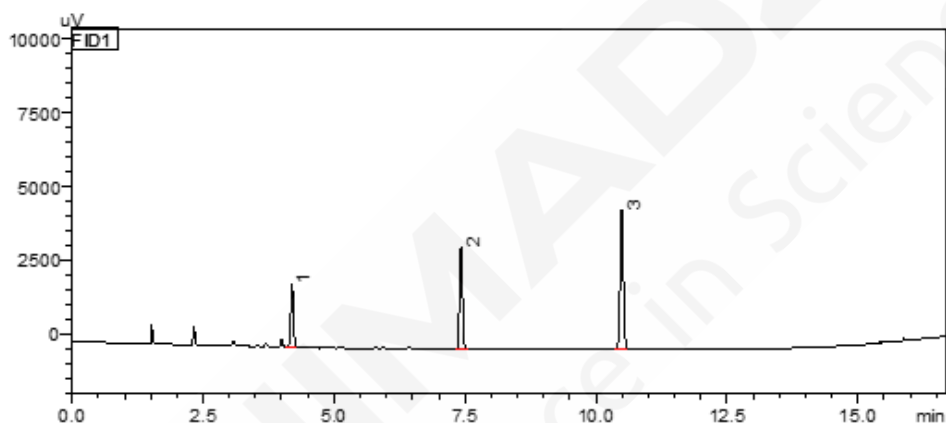


图 1. 3种溶剂残留的色谱图 (1.0 μg)

表 1. 3种溶剂残留的化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	叔丁醇	tert-butanol	75-65-0	4.199
2	2-甲基四氢呋喃	2-methyltetrahydrofuran	96-47-9	7.423
3	环戊基甲基醚	cyclopentyl methyl ether	5614-37-9	10.487

### 2.2 标准曲线

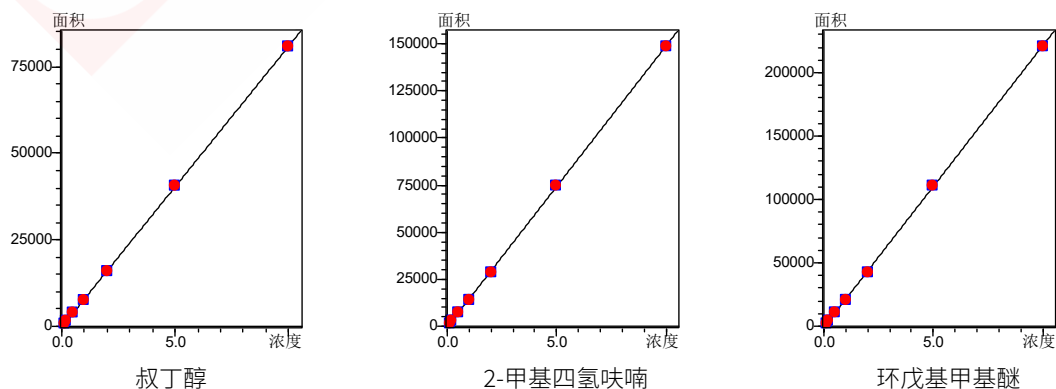


图2. 3种溶剂残留标准曲线 (0.1~10 μg)

使用去离子水配制溶剂残留混合标准系列，从10 µg/mL溶液中分别吸取0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 mL，用纯水定容到2 mL，转移到20 mL顶空瓶中，加入0.4 g氯化钠，得到浓度分别为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 µg的混标系列溶液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，标准曲线如图2所示。根据0.1 µg标液数据，以3倍信噪比（ASTM）计算检出限，各物质线性相关系数如表2所示。

表 2.3 种溶剂残留线性相关系数及检出限

No.	组分名称	相关系数 (R <sup>2</sup> )	检出限 (µg)
1	叔丁醇	0.9999	0.048
2	2-甲基四氢呋喃	0.9999	0.031
4	环戊基甲基醚	0.9999	0.027

### 2.3 重复性实验

平行配制七份0.2 µg标液，依次检测，考察仪器的重复性，测定结果见表3。

表3. 3种溶剂残留重复性结果

	叔丁醇	2-甲基四氢呋喃	环戊基甲基醚
峰面积 1	1529	2719	3820
峰面积 2	1495	2627	3697
峰面积 3	1481	2768	3875
峰面积 4	1577	2650	3680
峰面积 5	1555	2774	3802
峰面积 6	1460	2551	3521
峰面积 7	1509	2707	3855
RSD%	2.73	2.99	3.34

### 2.4 实际样品测试及加标回收率

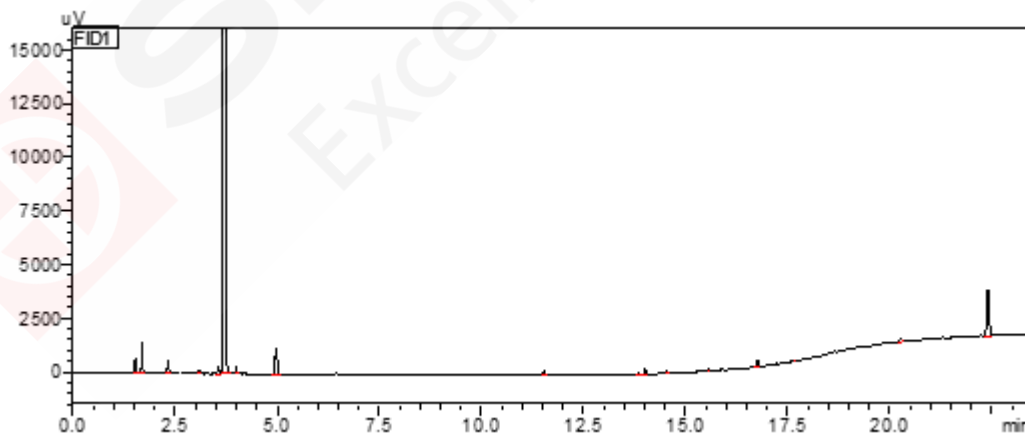


图 3. 实际样品谱图

检测甲磺酸倍他司汀原料药，样品谱图如图3所示，3种溶剂残留均未检出。平行精密称取0.2 g该原料药三份，分别加入10 µg/mL标液0.02 mL（即加标0.2 µg），再加入0.4 g氯化钠，定容至2 mL，转移至20 mL顶空瓶，密封，检测。添加回收率结果如表4所示。

表 4.3 种溶剂残留回收率结果 (0.2  $\mu\text{g}$  添加量)

	叔丁醇	2-甲基四氢呋喃	环戊基甲基醚
本底值 ( $\mu\text{g}$ )	N.D	N.D	N.D
加标检测值 1 ( $\mu\text{g}$ )	0.192	0.186	0.176
加标检测值 2 ( $\mu\text{g}$ )	0.195	0.189	0.177
加标检测值 3 ( $\mu\text{g}$ )	0.198	0.185	0.177
平均值 ( $\mu\text{g}$ )	0.195	0.186	0.177
RSD (%)	1.50	1.18	0.59
平均回收率 (%)	97.4	93.2	88.4

### 3. 结论

本文利用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪结合 HS-10 顶空自动进样器，建立了化学药品中叔丁醇、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚 3 种溶剂残留的检测方法。采用外标法定量，在 0.1~10  $\mu\text{g}$  浓度范围内线性关系良好，3 种物质的相关系数  $R^2$  大于 0.9999。以 3 倍信噪比计算，3 种化合物的检出限分别在 0.027~0.048  $\mu\text{g}$  之间。平行检测七份 0.2  $\mu\text{g}$  标液，峰面积 RSD%2.73~3.34%之间。以甲磺酸倍他司汀原料药为检测样品并进行加标实验，样品中 3 种物质均未检出，0.2  $\mu\text{g}$  加标平均回收率在 88.4%~97.4%之间。该方法简单方便，对仪器污染小，可以很好的满足化学药品中这 3 种溶剂残留的检测。

# 气相色谱法测定药用辅料聚山梨酯 80 中六种杂质含量

**摘要:** 本文利用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪,建立了药用辅料聚山梨酯 80 中环氧乙烷、二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇 6 种杂质的测定方法。在 5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999。5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标液连续进样 6 针,峰面积比 RSD%均小于 3%。加标回收率在 88.1~110.8%之间。该方法准确、可靠,可以应用于药用辅料聚山梨酯 80 中环氧乙烷、二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇的检测。

**关键词:** 气相色谱 药用辅料 聚山梨酯80 杂质

聚山梨酯80是中药注射剂中常用的增溶辅料,目前用于药品生产中的聚山梨酯80品种繁多、质量良莠不齐,缺乏完善的质量标准对其进行监管。因此,有必要重视对辅料聚山梨酯80的质量评价,从而进一步从源头上确保药品的安全性和有效性。

环氧乙烷是聚山梨酯80生产中所使用的原料,可在产品中存在残留;在合成过程中环氧乙烷还可产生二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇及三甘醇等副产物,该类物质均会对人体产生一定的毒性。因此通过建立气相色谱法对这六种杂质同时进行测定。

本文使用岛津Nexis GC-2030建立了聚山梨酯80中环氧乙烷、二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇的检测方法。该方法具有良好的线性、重复性和回收率,适用于药用辅料聚山梨酯80中这六种杂质残留量的测定。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

Nexis GC-2030 气相色谱仪

### 1.2 分析条件

色谱柱:SH-Stabilwax (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ )

柱温程序: 35 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)\_30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \_125 $^{\circ}\text{C}$ \_10 $^{\circ}\text{C}$  /min\_160 $^{\circ}\text{C}$ \_50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \_240 $^{\circ}\text{C}$ (20 min) 线速度: 40.8 mL/min

进样口温度: 230 $^{\circ}\text{C}$

进样方式: 分流进样

流速控制方式: 恒线速度方式

分流比: 10:1  
FID 温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

## 2. 样品前处理

准确称量聚山梨酯80样品4 g,加入甲醇溶解定容,制成每1mL含40 mg聚山梨酯80的溶液,取此溶液1 mL至进样小瓶待测。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 乙二醇、二甘醇、三甘醇混合标准溶液谱图

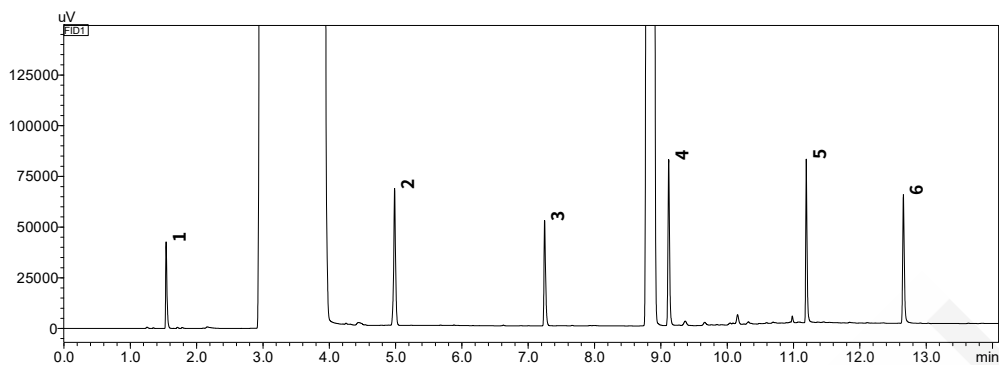


图 1. 聚山梨酯 80 中 6 种杂质色谱图 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

表 1. 化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间(min)
1	环氧乙烷	Ethylene oxide	75-21-8	1.540
2	二氧六环	1,4-Dioxane	123-91-1	4.986
3	氯乙醇	2-Chloroethanol	107-07-3	7.247
4	乙二醇	Ethylene glycol	107-21-1	9.119
5	二甘醇	Diethylene glycol	111-46-6	11.193
6	三甘醇	Triethylen glycol	112-27-6	12.656

### 3.2 标准曲线和检出限

以甲醇为溶剂配制浓度为5、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液序列, 对各浓度对照品溶液进行检测, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 标准曲线如图2所示, 以3倍信噪比计算3种化合物检出限, 各化合物检出限以及线性相关系数如表2所示。

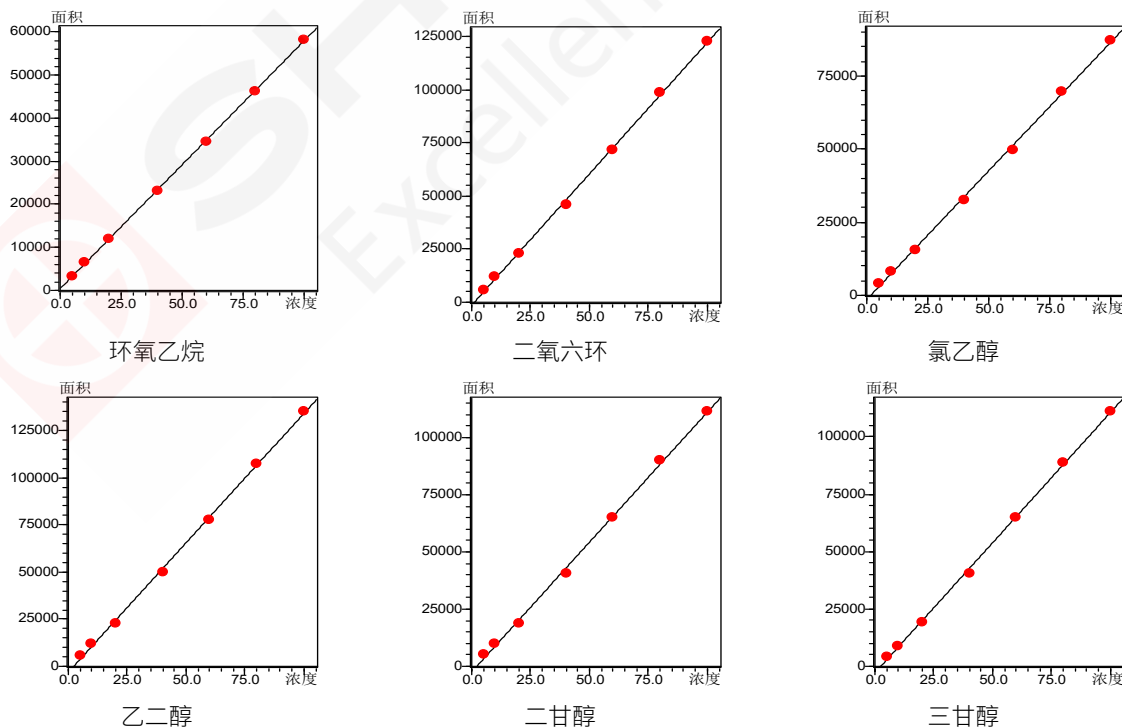


图 2. 6 种化合物标准曲线

表 2. 各组分相关系数及检出限

No.	组分名称	相关系数 (R)	检出限 (μg/mL)
1	环氧乙烷	0.9999	0.55
2	二氧六环	0.9996	0.42
3	氯乙醇	0.9994	0.48
4	乙二醇	0.9995	0.40
5	二甘醇	0.9992	0.39
6	三甘醇	0.9995	0.50

### 3.3 重复性实验

取5 μg/mL标准品溶液，连续进样6次，考察仪器的重复性，测定结果见表3。

表 3. 3种化合物重复性结果

No.	化合物名	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	峰面积 6	RSD%
1	环氧乙烷	3220	3115	3220	3185	3186	3114	1.52
2	二氧六环	5850	5823	6059	6053	5865	5689	2.43
3	氯乙醇	3971	4001	4067	4036	4028	3940	1.15
4	乙二醇	5694	5724	5690	5701	5719	5807	0.76
5	二甘醇	4965	4912	4882	4830	4858	4957	1.10
6	三甘醇	4394	4329	4283	4323	4334	4411	1.10

### 3.4 加标回收率

样品测试色谱图如图3所示，4种化合物有检出。将此样品进行加标实验，加标浓度为250 μg/g，回收率结果如表5所示。

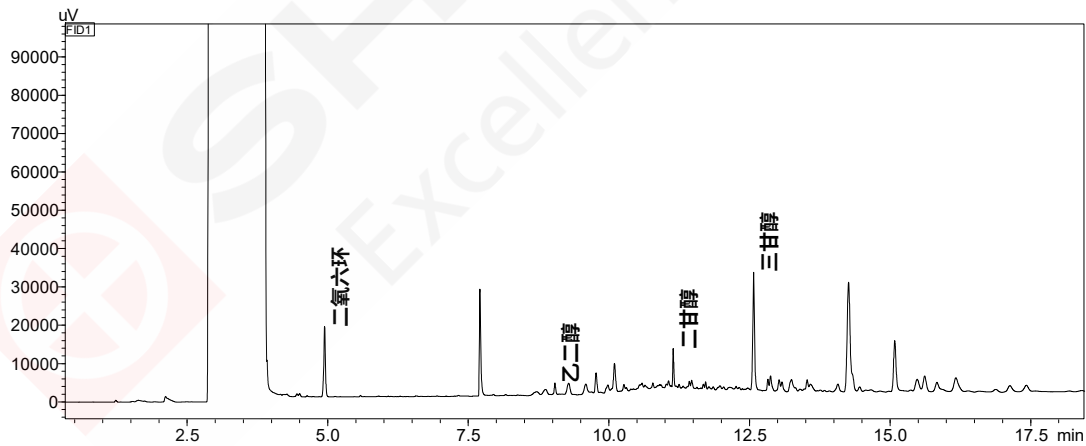


图3. 样品测试谱图

表 4 样品加标实验结果 ( $\mu\text{g/g}$ )

No.	名称	样品测试结果	加标测试结果			平均回收率 (%)
			1	2	3	
1	环氧乙烷	0.00	292.35	291.75	246.60	110.8
2	二氧六环	771.98	1022.68	1014.20	1020.38	98.8
3	氯乙醇	0.00	275.43	272.50	264.45	108.3
4	乙二醇	155.10	385.28	394.58	402.88	95.7
5	二甘醇	341.78	555.55	557.40	584.25	89.6
6	三甘醇	1537.2	1766.5	1750.0	1756.4	88.2

#### 4. 结论

本文利用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪，建立了药用辅料聚山梨酯 80 中环氧乙烷、二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇的测定方法。方法显示在 5~100  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内线性关系良好，相关系数 R 均大于 0.999。5  $\mu\text{g/mL}$  标液连续进样 6 针，峰面积比 RSD% 均小于 3%。250  $\mu\text{g/g}$  浓度加标回收率在 88.2~110.8 % 之间。方法具有良好的线性、重复性和回收率，适用于药用辅料聚山梨酯 80 中 6 种杂质的检测。

# 气质联用仪结合顶空进样器测定药品中溶剂残留

**摘要:** 本文利用岛津公司顶空自动进样器HS-20, 结合GCMS-QP2010 Ultra气质联用仪, 建立了药品中19种溶剂残留测定方法。在标准曲线浓度范围内各组分线性关系良好, 相关系数 $r$ 大于0.997; 峰面积重现性良好, RSD小于8.32%。该方法可用于药品中溶剂残留的快速定性定量测定。

**关键词:** 顶空自动进样器 气相色谱质谱联用仪 药品 第一类溶剂残留 第二类溶剂残留

药品中溶剂残留是指在原料药或者辅料的生产中, 以及在制剂制备过程中使用或者生产的, 但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。

目前, 对溶剂残留的控制已越受到人们的关注。根据2010版国家药典, 药品中常见的残留溶剂分为三类, 第一类为应该避免使用的溶剂, 共5种, 除1,1,1-三氯乙烷限定值为0.15%, 其余4种限定值为2~8 $\mu\text{g/g}$ , 第二类为应该限制使用的溶剂, 共27种, 其限定值为50 $\mu\text{g/g}$  ~0.388%。第三类为药品GMP或其他质量要求限制使用的溶剂。其中第一类和第二类对人体的危害性最大。因此为了保障药物的用药安全, 控制产品质量, 需要进行有机溶剂残留量的检测和控制。

2010版中国药典中提供的测定方法为顶空进样和溶液直接进样。本文建立了一种顶空进样测定药品中溶剂残留含量的应用方法, 该方法操作简单, 灵敏度高, 检出限低, 且适用性强。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

HS-20 顶空自动进样器 (岛津公司)

GCMS-QP2010 Ultra 气相色谱-质谱联用仪

### 1.2 分析条件

HS-20条件:	进样方式: 分流, 分流比: 10:1
顶空瓶平衡温度: 80°C	载气: 氦气
定量环温度: 110°C, 传输线温度: 120°C	载气控制方式: 恒线速度, 35.0 cm/sec
平衡时间: 30min, 进样时间: 1min	接口温度: 230°C
GCMS条件:	离子源温度: 200°C
色谱柱: Rtx-624, 60m $\times$ 0.32mm $\times$ 1.8 $\mu\text{m}$	离子化方式: EI
柱温程序: 40°C (6min) _5°C/min_	采集方式: SCAN
200°C (2min)	质量数范围: 29~300

### 1.3 样品前处理

精密称取 1g 左右样品, 用 10mL 水充分溶解, 加入 1g 氯化钠后密封, 待测。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准谱图

19 种溶剂残留混标总离子流图如图 1 所示。

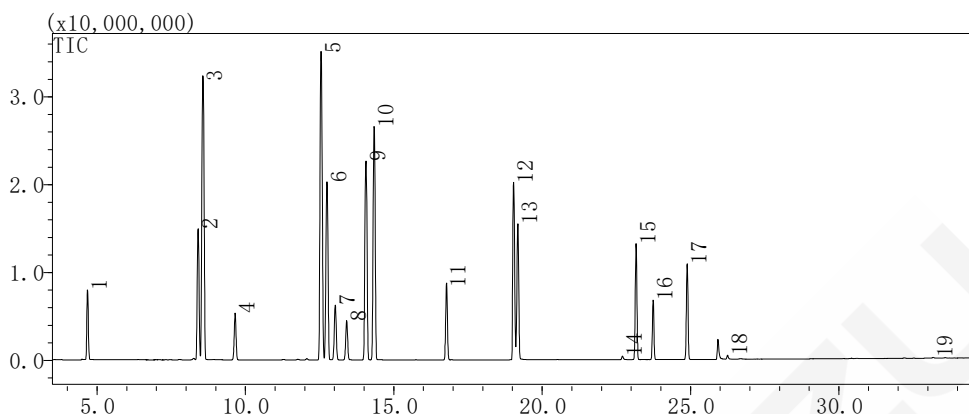


图 1.溶剂混标总离子流图

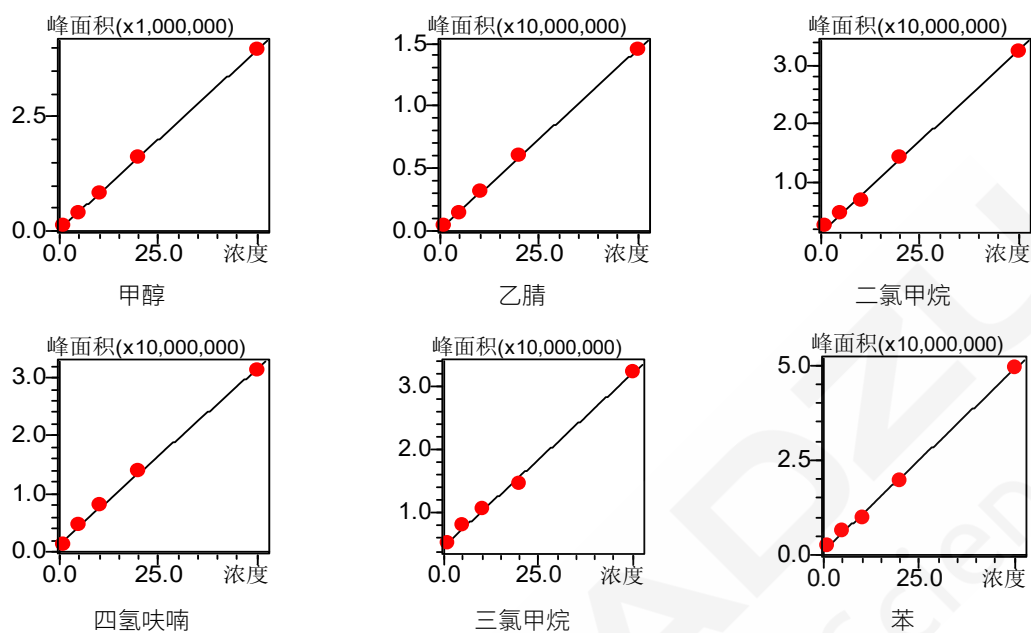
表 1.组分保留时间、中英文名称和 CAS 号

No.	保留时间 (min)	化合物名称	英文名称	CAS 号
1	4.675	甲醇	Metaanol	67-56-1
2	8.405	乙腈	Acetonitrile	75-05-8
3	8.560	二氯甲烷	Dichloromethane	75-09-2
4	9.655	正己烷	Hexane	110-54-3
5	12.545	四氢呋喃	Tetrahydrofuran	109-99-9
6	12.745	三氯甲烷	Chloroform	67-66-3
7	13.025	环己烷	Cyclohexane	110-82-7
8	13.410	四氯化碳	Tetrachloromethane	56-23-5
9	14.060	苯	Benzene	71-43-2
10	14.340	1,2-二氯乙烷	1,2-Dichloroethane	107-06-2
11	16.770	二氧六环	1,4-Dioxane	123-91-1
12	19.040	吡啶	Pyridine	110-86-1
13	19.180	甲苯	Toluene	108-88-3
14	22.710	N,N-二甲基甲酰胺	N,N-	68-12-2
15	23.165	氯苯	Chlorobenzene	108-90-7
16	23.740	对二甲苯	p-Xylene	106-42-3
17	24.890	间二甲苯	o-Xylene	108-38-3
18	26.255	N,N-二甲基乙酰胺	N,N-	127-19-5
19	33.175	N-甲基吡咯烷酮	N-Methylpyrrolidone	872-50-4

## 2.2 标准曲线

使用纯水配制溶剂残留混合标准系列，从 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液中分别吸取 0.1、0.5、1、2 和 5 mL，用纯水定容到 10 mL，转移到 20 mL 顶空瓶中，加入 1 g 氯化钠，得到浓度分别为 0.1、0.5、1.0、

2.0、5.0  $\mu\text{g}$  的混标系列溶液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作标准曲线。因篇幅所限，部分溶剂组分标准曲线如下所示，各组分标准曲线相关系数如表 2 所示。



### 2.3 检出限及重现性

根据 0.1  $\mu\text{g}$  标准溶液数据，计算方法检出限（3 倍噪声计算）。各组分检出限见表 2，且面积重现性良好。

表 2. 各组分检出限及面积重现性 (n=5)

No.	化合物	相关系数	检出限 (ng/g)	%RSD	No.	化合物	相关系数	检出限 (ng/g)	%RSD
1	甲醇	0.9999	0.7	3.4	11	二氧六环	0.9999	1.0	4.39
2	乙腈	0.9998	0.4	4.65	12	吡啶	0.9993	0.6	7.31
3	二氯甲烷	0.9994	0.2	4.13	13	甲苯	0.9968	0.2	5.55
4	正己烷	0.9973	0.5	8.00	14	N,N-二甲基甲酰胺	0.9982	3.0	3.60
5	四氢呋喃	0.9986	0.6	4.20	15	氯苯	0.9976	0.3	7.11
6	三氯甲烷	0.9985	0.3	4.55	16	对二甲苯	0.9975	0.7	8.32
7	环己烷	0.9992	0.5	1.03	17	间二甲苯	0.9970	0.3	7.52
8	四氯化碳	0.9996	1.0	5.42	18	N,N-二甲基乙酰胺	0.9982	3.0	1.51
9	苯	0.9994	0.3	4.52	19	N-甲基吡咯烷酮	0.9999	5.0	1.78
10	1,2-二氯乙烷	0.9997	0.5	3.60					

## 2.4 回收率

将溶剂残留混标溶液分别添加到三个样品中(市售小儿氨酚烷胺颗粒,感冒灵颗粒,急支糖浆),按照样品前处理方法制备,样品中加标浓度分别为 0.5  $\mu\text{g}$ 。回收率结果见表 3。

表 3. 样品测试结果及加标回收率

No.	化合物名称	小儿氨酚烷胺颗粒		感冒灵颗粒		急支糖浆	
		检测结果 ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率%	检测结果 ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率%	检测结果 ( $\mu\text{g/g}$ )	回收率%
1	甲醇	N.D	93.76	N.D	95.08	N.D	99.89
2	乙腈	N.D	81.88	N.D	89.32	N.D	77.36
3	二氯甲烷	N.D	93.70	N.D	86.49	N.D	87.81
4	正己烷	N.D	92.90	N.D	83.76	N.D	82.46
5	四氢呋喃	N.D	96.40	N.D	92.46	N.D	99.94
6	三氯甲烷	N.D	95.79	N.D	87.03	N.D	85.14
7	环己烷	N.D	90.27	N.D	98.73	N.D	87.70
8	四氯化碳	N.D	83.17	N.D	91.31	N.D	91.51
9	苯	N.D	83.15	N.D	87.62	N.D	81.29
10	1,2-二氯乙烷	N.D	89.02	N.D	87.39	N.D	85.67
11	二氧六环	N.D	68.36	N.D	94.23	N.D	87.35
12	吡啶	2.19	92.51	N.D	104.97	N.D	83.65
13	甲苯	N.D	93.15	N.D	87.24	N.D	84.07
14	N,N-二甲基甲酰胺	N.D	97.75	N.D	92.73	N.D	91.14
15	氯苯	N.D	100.97	N.D	86.03	N.D	85.34
16	对二甲苯	N.D	89.96	N.D	86.82	N.D	88.88
17	间二甲苯	N.D	86.88	N.D	85.96	N.D	84.11
18	N,N-二甲基乙酰胺	N.D	85.16	N.D	82.49	N.D	88.58
19	N-甲基吡咯烷酮	N.D	87.89	N.D	73.04	N.D	81.88

## 3. 结论

采用岛津公司 HS-20 结合气相色谱质谱联用仪 (GCMS-QP2010 Ultra) 分析药品中的溶剂残留,方法操作简单,在 0.1~5  $\mu\text{g}$  标准曲线范围内线性良好,样品加标回收率为 75~102%。本方法可以用于药品中的溶剂残留定性定量检测。

# 顶空-气质联用法测定药物中水合肼含量

**摘要:** 本文采用岛津的 HS-20 顶空自动进样器与 GCMS-QP2020 气质联用仪, 建立了药物中水合肼的分析方法。在 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9991。0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液连续测定 5 次, 峰面积 RSD 为 1.97%。样品高低浓度加标回收率为 78.2%~118.3%, 能满足日常检测的要求。

**关键词:** GCMS 顶空水合肼

肼是一种无色发烟的、具有腐蚀性和强还原性的液体化合物。一般用作制药原料, 如合成氨基脲、异烟肼、呋喃西林、百生肼等。肼的水合物称为水合肼( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 是塑料、橡胶发泡剂的原料, 是异烟肼等药物的原料。肼在药物中一般以水合肼形式存在。

肼极毒。对眼睛有刺激作用, 能引起延迟性发炎, 对皮肤和粘膜也有强烈的腐蚀作用。欧洲药典和美国药典中列出了部分以肼作为原料的药物中肼的允许限值, 肼的允许限值从 1 ppm 到 1000 ppm, 对检测方法的灵敏度要求有一定差异。在药物溶剂残留检测研究中, 建立一种快速、简便、高灵敏的检测方法来监测药物生产过程中肼的残留量显得愈加紧迫。

目前对水合肼的分析方法有高效液相色谱法、流动注射化学发光分析法、荧光法等。气相色谱对水合肼分析一般采用直接和衍生法。本文用乙酸丙酮作为萃取剂和衍生化试剂, 利用岛津 HS-20 顶空进样器与 GCMS-QP2020 气质联用仪, 采用超声萃取的方法, 对药物中残留的水合肼进行了分析, 在萃取的同时完成了衍生, 灵敏度高, 选择性好, 样品前处理简单。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

HS-20顶空自动进样器

岛津GCMS-QP2020气质联用仪

### 1.2 分析条件

HS-20条件:	柱温程序: 40°C(5 min)_15°C/min_220°C
顶空瓶平衡温度: 80°C	(1 min)
平衡时间: 15 min	载气线速度: 36.1 cm/sec
进样时间: 0.5 min	进样方式: 分流, 分流比: 10:1
进样量: 1.0 mL	离子源温度: 230°C
GCMS条件:	色谱质谱接口温度: 250°C
色谱柱: SH-Rtx-wax (30 m×0.25mm×0.25 $\mu\text{m}$ )	采集模式: SIM 模式, 选择离子: 56、97、112。

### 1.3 样品前处理

样品磨细, 准确称取 0.01 g 样品于 20 mL 顶空瓶中, 加入 100  $\mu\text{L}$  乙酸丙酮 (V: V=1: 10), 静

置，待样品充分溶解，再加入 4.90 mL 饱和氯化钠水溶液，超声 15 min。样品冷却后加入 25  $\mu$ L 50%NaOH 水溶液，混匀，顶空进样，经 GCMS 分析。

## 2 结果讨论

### 2.1 标准色谱图

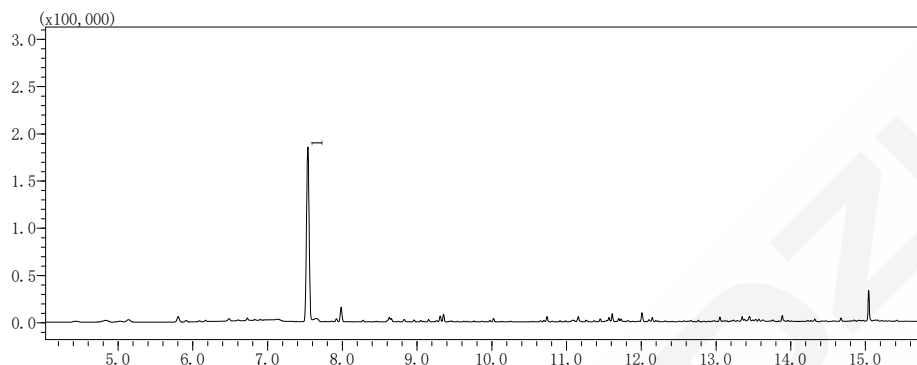


图 1 标准溶液色谱图 (0.04  $\mu$ g/mL)

表 1.水合肼保留时间及选择离子

No.	中文名称	保留时间(min)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)
1	水合肼	7.540	112	56、97

### 2.2 标准曲线

使用 (V: V/1: 10) 乙酸丙酮配制 10.0  $\mu$ g/mL 水合肼标准使用液，超声 15 min。分别取适量超声后的 10.0  $\mu$ g/mL 水合肼标准使用液，采用饱和氯化钠溶液定容至 5.0 mL，配制成浓度为 0.01、0.02、0.04、0.1 和 0.2  $\mu$ g/mL 标准溶液系列，加入 25  $\mu$ L50%NaOH 水溶液，加盖密封，混匀，顶空进样，经 GCMS 分析。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线如图 2 所示。以 0.01  $\mu$ g/mL 标准溶液数据，按照 3 倍的信噪比计算方法的检出限，检出限和标准曲线相关系数如表 2 所示。

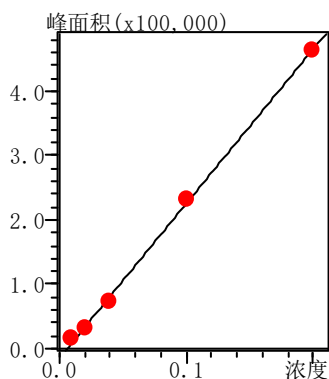


图 2 水合肼标准曲线

表 2 水合肼标准曲线相关系数及检出限

No.	化合物名称	相关系数	检出限( $\mu\text{g/g}$ )
1	水合肼	0.9991	0.2

### 2.3 重复性结果

浓度为  $0.02 \mu\text{g/mL}$  的标准溶液连续进样 5 次, 考察仪器重复性, 峰面积及 RSD % 见表 3。

表 3. 峰面积重复性结果(n=5)

No.	化合物名称	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	峰面积 4	峰面积 5	RSD(%)
1	水合肼	30616	29822	30070	29126	29366	1.97

### 2.4 样品测试及回收率

按照 1.3 步骤进行样品处理, 顶空进样, 经 GCMS 分析 1 个脂溶性药品和 1 个水溶性药品。样品谱图见图 3、图 4, 测定结果见表 4、表 5。

在脂溶性药品和水溶性药品中分别添加标准溶液进行回收率测试, 添加浓度分别为  $5 \mu\text{g/g}$  和  $50 \mu\text{g/g}$ , 按照 1.3 步骤进行前处理, 每个添加浓度平行测试 3 次, 回收率见表 4、表 5。

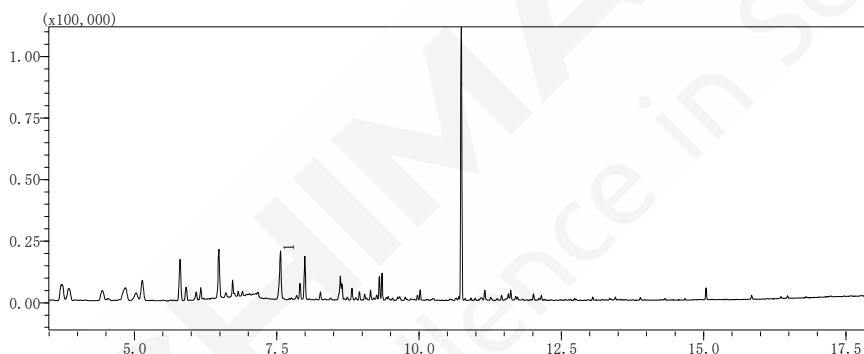


图 3 脂溶性药品色谱图

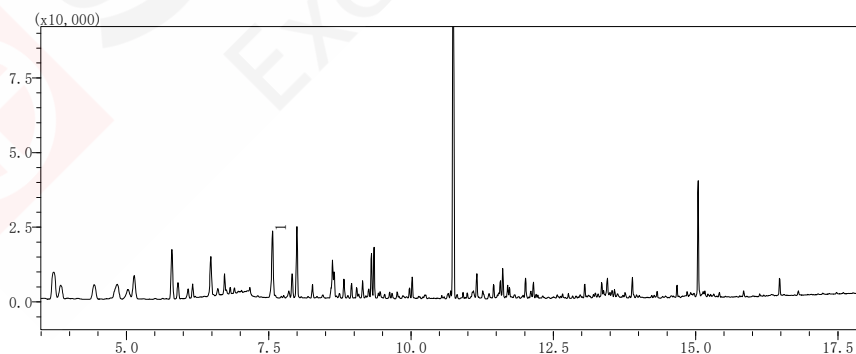


图 4 水溶性药品色谱图

表 4 脂溶性样品测定结果及回收率

化合物	检测结果	加标浓度 5.0 $\mu\text{g/g}$				加标浓度 50 $\mu\text{g/g}$			
	( $\mu\text{g/g}$ )	回收率 1	回收率 2	回收率 3	RSD% (n=3)	回收率 1	回收率 2	回收率 3	RSD% (n=3)
水合肼	3.22	79.6	78.2	87.4	6.07	96.6	99.3	99.6	1.68

表 5 水溶性样品测定结果及回收率

化合物	检测结果	加标浓度 5.0 $\mu\text{g/g}$				加标浓度 50 $\mu\text{g/g}$			
	( $\mu\text{g/g}$ )	回收率 1	回收率 2	回收率 3	RSD% (n=3)	回收率 1	回收率 2	回收率 3	RSD% (n=3)
水合肼	3.15	88.6	90.1	88	1.22	117.6	118.3	117.8	0.29

### 3 结论

本文利用岛津的 HS-20 顶空自动进样器与 GCMS-QP2020 气质联用仪对药品中水合肼进行分析。在 0.01~0.2  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内标准曲线线性良好，方法检出限为 0.2  $\mu\text{g/g}$  (3 倍信噪比计算)，回收率为 78.2~118.3%。方法适用于药物中水合肼含量的测定。

## 附录：典型分析方案及对应分析仪器索引

序号	分析类型	待测物	目标物	分析仪器	页码
1	定量分析	盐酸多西环素	有关物质	LC-40	<a href="#">15</a>
2	定量分析	双氯芬酸钠	有关物质	LC-40	<a href="#">20</a>
3	定量分析	马来酸依那普利	有关物质	LC-40	<a href="#">28</a>
4	定量分析	碘帕醇	对映异构体杂质	二维液相色谱	<a href="#">34</a>
5	定性分析	头孢替唑钠	杂质	LCMS-9030	<a href="#">40</a>
6	定性分析	头孢哌酮钠舒巴坦钠	聚合物杂质	2DLC-LCMS-9030	<a href="#">50</a>
7	定性分析	盐酸氟西汀	杂质	2DLC-LCMS-9030	<a href="#">60</a>
8	定量分析	二乙酰乌嘌呤	杂质	SFC-UV	<a href="#">70</a>
9	定量分析	药物	八种磺酸酯类	GCMS-TQ8040	<a href="#">74</a>
10	定量分析	沙坦类药物	6种N-亚硝胺	GCMS-TQ 8050 NX	<a href="#">79</a>
11	定量分析	沙坦类原料药	NDMA 和 NDEA	LC-40	<a href="#">83</a>
12	定量分析	缬沙坦原料药	6种N-亚硝胺	LCMS-8050	<a href="#">87</a>
13	定量分析	厄贝沙坦原料	叠氮杂质 AZBC	LCMS-8050	<a href="#">92</a>
14	定量分析	厄贝沙坦原料	叠氮杂质 MB-X	LCMS-8050	<a href="#">97</a>
15	定量分析	丁酸氯维地平	丁酸氯甲酯和 2,3-二氯苯甲醛	GCMS-TQ8050 NX	<a href="#">101</a>
16	定量分析	甲磺酸伊马替尼	芳香胺类遗传毒 性杂质	LCMS-8060	<a href="#">105</a>
17	定量分析	扑热息痛	4-氯苯胺	LCMS-8050	<a href="#">110</a>
18	定量分析	磷酸肌酸钠	肌酸磷酸二甲 酯、肌酸酐磷酸 二甲酯、肌酸磷 酰二乙酯、肌酸 酐磷酸二乙酯	LCMS-8050	<a href="#">115</a>
19	定量分析	盐酸贝那普利、卡托 普利	12种元素杂质	ICPMS-2030、EDX- 7000	<a href="#">123</a>

20	定量分析	原料药	11 种元素杂质	ICPE-9000	<a href="#">129</a>
21	定量分析	药物中间体	Pd	ICPMS-2030 LF	<a href="#">134</a>
22	定量分析	喷雾剂	15 种元素杂质	ICPMS-2030	<a href="#">136</a>
23	定量分析	注射剂	10 种元素杂质	ICPMS-2030LF	<a href="#">141</a>
24	定量分析	化药	环氧氯丙烷	HS20+GC-2010 Plus	<a href="#">145</a>
25	定量分析	甲磺酸倍他司汀	叔丁醇、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲醚	HS10+Nexis GC-2030	<a href="#">148</a>
26	定量分析	药用辅料聚山梨酯 80	环氧乙烷、二氧六环、氯乙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇 6 种杂质	Nexis GC-2030	<a href="#">152</a>
27	定量分析	化药	19 种溶剂残留	HS20+GCMS-QP2010 Ultra	<a href="#">156</a>
28	定量分析	化药	水合肼	HS20+GCMS-QP2020	<a href="#">160</a>



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司/岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层  
邮政编码: 100020  
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

### 沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层  
邮政编码: 110016  
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

### 西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501  
邮政编码: 710065  
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座  
邮政编码: 830002  
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

### 郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
邮政编码: 450007  
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋  
邮政编码: 200233  
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

### 成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼  
B座12层  
邮政编码: 610063  
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

### 南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座  
邮政编码: 210005  
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座  
邮政编码: 400010  
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

### 武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室  
邮政编码: 430060  
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

### 广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦  
邮政编码: 510656  
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

### 昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室  
邮政编码: 650021  
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C  
邮政编码: 518040  
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

### 长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室  
邮政编码: 410005

### 香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室  
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,  
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG  
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439  
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知