

岛津 Nexera LC-40 分析盐酸普拉格雷中的基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯

LC-177

摘要： 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸普拉格雷中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的测定方法。方法采用 Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm×100 mm, 1.9 μm)，以乙腈 - 水为流动相，0.5 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 225 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，0.05 μg/mL 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液 S/N 大于 50。对甲苯磺酸乙酯在 0.01~10 μg/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数达 0.9999 以上，精确度在 95.8%~103.5% 之间。0.05 μg/mL 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液连续进样 6 针，保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.29% 和 1.77%，仪器精密度良好。对照品溶液室温 10℃放置 8 h，溶液稳定性良好。待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量 7 ppm，低于毒理学关注阈值。低中高不同浓度加标回收率范围在 94.96% ~ 101.19% 之间，RSD 范围为 0.31% ~ 2.32%，准确度良好，该方法能够有效地检测盐酸普拉格雷中的对甲苯磺酸乙酯。

关键词： Nexera LC-40 高效液相色谱仪 对甲苯磺酸乙酯 盐酸普拉格雷

近年来，基因毒性杂质因存在重大的安全隐患，而受到了广泛关注。欧洲药物管理局 (EMA)、美国食品药品监督管理局 (FDA) 及人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 等机构陆续发布了针对基因毒性杂质的指南，对该类杂质的控制与评估提出要求。2006 年，EMA 首先颁布了《基因毒性杂质限度指南》，提出有必要采用“可接受风险水平”的概念，以毒理学关注阈值 (threshold of toxicological concern, TTC) 控制基因毒性杂质，TTC 为 1.5 μg/day (终身癌症风险小于百万分之一)。根据患者每天预计的服用剂量，便可计算出原料药中所允许的基因毒性杂质的含量。

盐酸普拉格雷是日本第一三共制药和美国礼来公司共同开发的新一代口服抗血栓药物，于 2009 年 2 月获欧盟批准上市。盐酸普拉格雷合成方法较多，部分合成工艺中使用对甲苯磺酸进行脱保护，中间体经过对接和乙酰化后得到目标产物，产物选择以乙醇为精制溶剂时则会产生基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯。口

服盐酸普拉格雷的推荐日负荷剂量为 60 mg，由此计算出原料中允许的对甲苯磺酸乙酯含量为 25 ppm。目前对甲苯磺酸乙酯残留量的检测多采用 GC-MS，LC-MS 和 HPLC-UV 法。常规 HPLC 法往往需要较长的分析时长来满足基因毒性杂质与待测原料及其其它杂质之间的分离度。本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，以亚 2 μm 填料色谱柱进行分离，建立了盐酸普拉格雷中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的分析方法。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。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，也能定量检测痕量的杂质组分，可为基因毒性杂质检测提供参考检测方法。

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



图 1 岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪

1.2 分析条件

色谱柱: Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm i.d. × 100 mm L, 1.9 μm)

流动相: A, 水; B, 乙腈

流速: 0.5 mL/min

柱温: 45°C

检测波长: 225 nm

进样体积: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相起始浓度为 40%, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	45
7.10	Pumps	Pump B Conc.	95
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.01	Pumps	Pump B Conc.	40
12.00	Controller	Stop	

■ 样品前处理

标准曲线溶液配制: 取对甲苯磺酸乙酯对照品适量, 精密称定, 加乙腈溶解并稀释制成 100 μg/mL 的溶液, 作为贮备液。分别精密量取贮备液适量, 用 5 mM 甲酸铵水: 乙腈 (3:2) 逐级稀释制成 0.01、0.02、0.05、0.2、1、2、5、10 μg/mL 的溶液即得。

供试品溶液配制: 取盐酸普拉格雷原料约 20 mg 置 10 mL 容量瓶中, 精密称定, 分别加入 1 mL 乙腈和 5 mM 甲酸铵水: 乙腈 (3:2) 溶解并定容至刻度, 制得约 2 mg/mL 的样品溶液, 经滤膜过滤后, 取续滤液即得。

■ 结果与讨论

3.1 检测波长选择

取 2 $\mu\text{g/mL}$ 的对甲苯磺酸乙酯对照品溶液，于 190 nm ~ 400 nm 波长范围内进行紫外吸收波长扫描。结果显示：对甲苯磺酸乙酯在 225 nm 波长处有最大吸收，故本实验选择 225 nm 为检测波长。

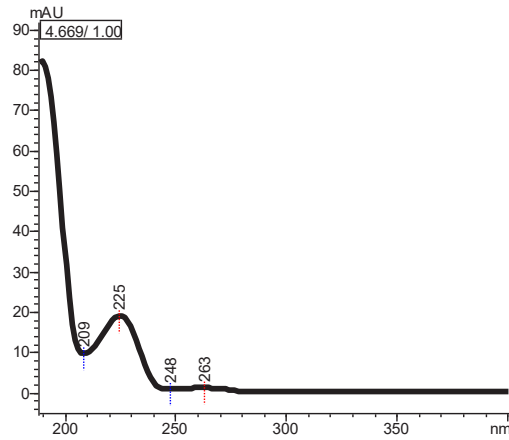


图 2 紫外吸收波长扫描谱图

3.2 标准溶液液相色谱图

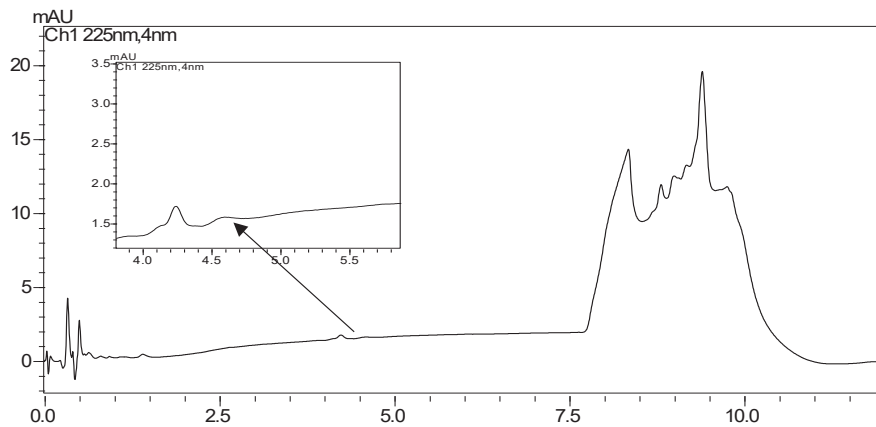


图 3 空白溶剂色谱图

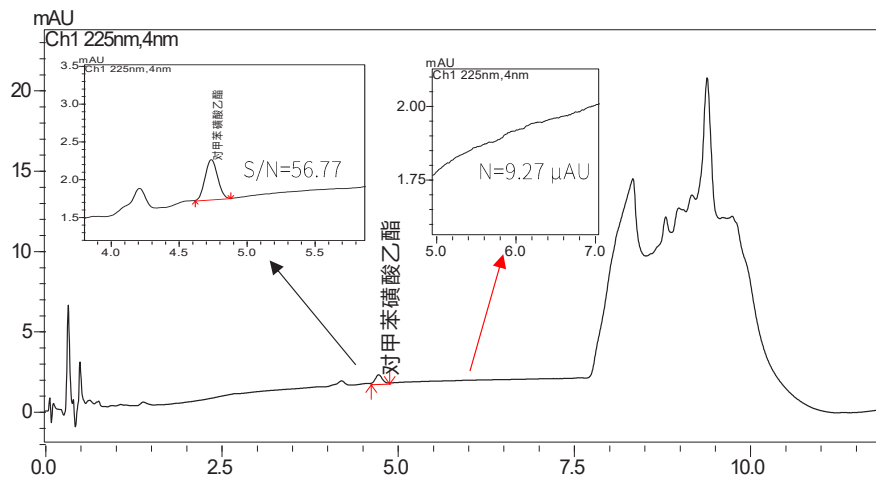


图 4 标准溶液色谱图 (0.05 $\mu\text{g/mL}$)

本实验中样品溶液浓度为 2 mg/mL, 根据盐酸普拉格雷原料中允许的对甲苯磺酸乙酯含量限度 (25 ppm), 计算出对甲苯磺酸乙酯的限度浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图所示, 该浓度下目标化合物的 S/N 达到 56.7, 让定量结果的检测更加准确可靠。本实验使用新 Nexera 系列 SPD-M40 二极管阵列检测器, 通过光学系统的改良, 不仅扩大了线性范围 (在一定条件下达到 2.5 AU), 还具备了卓越的噪音抑制能力, 指定条件下噪音低于 4.5×10^{-6} AU 性能。同时, 流通池、分光器和光源室的三重控温技术, 提高了检测器的稳定性。

3.3 标准曲线

取 0.01、0.02、0.05、0.2、1、2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对甲苯磺酸乙酯对照品溶液各 10 μL 进样, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标做标准曲线, 标准曲线及线性信息如图 5 和表 2 所示。

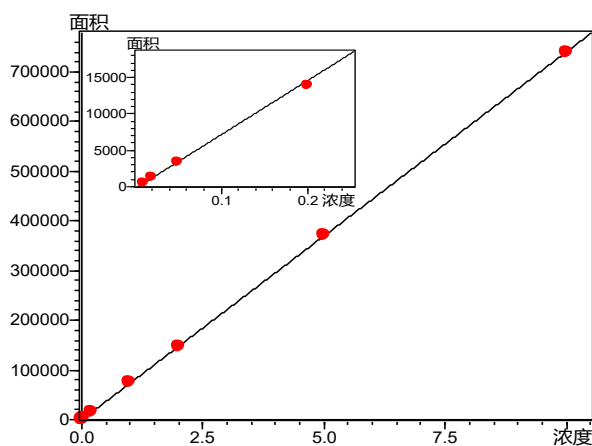


图 5 对甲苯磺酸乙酯标准曲线

表 2 对甲苯磺酸乙酯线性信息

组分名称	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数 (R)	精确度 (%)
对甲苯磺酸乙酯	0.01 ~ 10	$Y=74041.5X-263.090$	0.99998	95.8 ~ 103.5

3.4 精密度实验

取 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 限度浓度的对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 考察仪器精密度, 测定结果见表 3。结果显示: 连续测定 6 次, 对甲苯磺酸乙酯保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.29% 和 1.77%, 仪器精密度良好。

表 3 重复性结果

ID	保留时间	峰面积
1	4.695	3264
2	4.690	3231
3	4.702	3210
4	4.724	3197
5	4.688	3268
6	4.690	3113
RSD (%)	0.29	1.77

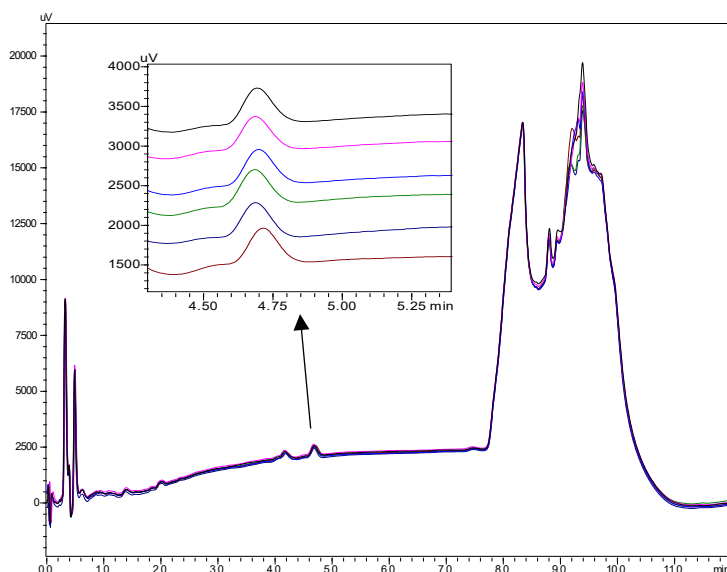


图 6 重复性色谱图

3.5 溶液稳定性

取 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液，室温 10°C 放置，分别于 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 取样进行分析，对照品溶液稳定性结果如表 4。结果显示：室温 10°C 放置 8 h，对甲苯磺酸乙酯峰面积无明显变化，峰面积 RSD 为 1.68%，对照品溶液稳定性良好。

表 4 对照品溶液稳定性结果

序号	取样时间 (h)	峰面积	RSD(%)
1	0	3264	1.68
2	1	3113	
3	2	3210	
4	4	3196	
5	6	3236	
6	8	3162	

3.6 样品测定

取 2 mg/mL 的样品溶液 10 μL 进样，样品溶液色谱图如图 7，将测定结果带入 3.3 项下标准曲线，测得样品中对甲苯磺酸乙酯的浓度是 0.014 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量为 7 ppm，低于毒理学关注阈值。

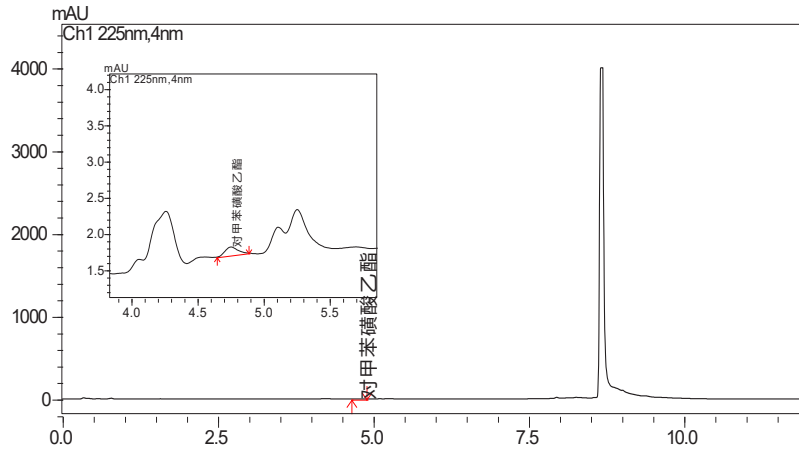


图 7 样品溶液色谱图 (2 mg/mL)

3.7 加标回收率

取盐酸普拉格雷原料适量，分别加入对甲苯磺酸乙酯对照品 0.2 μg 、0.5 μg 和 2.5 μg ，按照上述前处理方法处理后，分别制得对甲苯磺酸乙酯加入水平为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (限度浓度的 40%)、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (限度浓度) 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5 倍限度浓度) 的 2 mg/mL 样品溶液各 3 份，考察加标回收率。具体结果如下：低中高 3 种水平的加标回收率在 94.96% ~ 101.19% 之间，RSD 为 0.31% ~ 2.32%，该方法准确度良好。

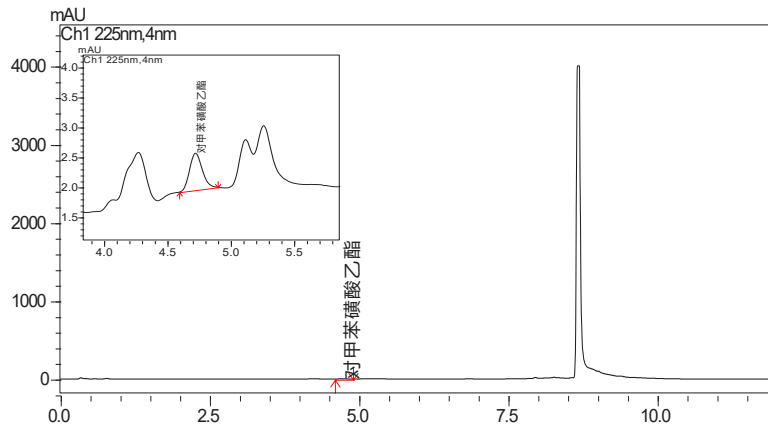


图 8 样品加标色谱图 (加标水平 0.5 μg)

表 5 加标回收率结果

序号	样品中杂质含量 (μg)	加标水平 (μg)	加标后杂质测定 含量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
1	0.137		0.350	103.86		
2	0.139	0.2	0.340	100.29	101.19	2.32
3	0.142		0.340	99.42		
4	0.139		0.610	95.46		
5	0.148	0.5	0.620	95.68	97.13	1.44
6	0.143		0.630	97.98		
7	0.133		2.480	94.19		
8	0.137	2.5	2.480	94.05	94.96	0.31
9	0.138		2.470	93.63		

结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸普拉格雷中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的测定方法。方法采用 Shim-Pack GIST-HP C18-AQ (2.0 mm \times 100 mm, 1.9 μm)，以乙腈 - 水为流动相，0.5 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 225 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对甲苯磺酸乙酯对照品溶液 S/N 大于 50。对甲苯磺酸乙酯在 0.01~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好，相关系数达 0.9999 以上，精确度在 95.8%~103.5% 之间。0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液连续进样 6 针，保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.29% 和 1.77%，仪器精密度良好。对照品溶液室温 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置 8 h，溶液稳定性良好。待测盐酸普拉格雷原料中对甲苯磺酸乙酯的含量为 7 ppm，低于毒理学关注阈值。低中高浓度加标回收率范围在 94.96% ~ 101.19% 之间，RSD 为 0.31% ~ 2.32%，准确度良好，该方法能准确高灵敏地检测盐酸普拉格雷中的对甲苯磺酸乙酯。