

# GC-MS 测定地氯雷他定中基因毒性杂质氯甲酸乙酯的含量

施俊伟<sup>1,2</sup>, 于晓敏<sup>3</sup>, 王晋星<sup>4</sup>, 刘倩<sup>4,5</sup>, 周权<sup>6\*</sup> (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.杭州市中医院, 杭州 310007; 3.温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035; 4.贵州医科大学第二附属医院, 贵州 凯里 556000; 5.中山大学药学院, 广州 510006; 6.浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009)

**摘要:** 目的 建立地氯雷他定中基因毒性杂质氯甲酸乙酯含量的 GC-MS 方法。方法 采用 CNW CD-ACIDWAX 色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) 进行分离, 载气为氦气, 气体流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>。通过 20 : 1 分流顶空进样, 顶空温度为 70 °C, 程序升温: 50 °C 柱温箱条件下保持 5 min, 再以 10 °C·min<sup>-1</sup> 升温至 80 °C, 保持 3 min。在 SIM 扫描方式下, 检测氯甲酸乙酯的含量, 定量离子为 *m/z* 63。结果 氯甲酸乙酯浓度在 0.05~4.00 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性良好, 分析方法的重复性、中间精密密度、回收率、溶液稳定性、耐用性等均在相关验证指导原则的规定范围内。结论 该定量方法准确、可靠、重复性好, 可用于地氯雷他定原料药中氯甲酸乙酯的杂质检测。

**关键词:** 地氯雷他定; 氯甲酸乙酯; 基因毒性杂质; 气相色谱-质谱联用法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)06-0726-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.016

引用本文: 施俊伟, 于晓敏, 王晋星, 等. GC-MS 测定地氯雷他定中基因毒性杂质氯甲酸乙酯的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 726-729.

## Content Determination of Genotoxic Impurity Ethyl Chloroformate in Desloratadine by GC-MS

SHI Junwei<sup>1,2</sup>, YU Xiaomin<sup>3</sup>, WANG Jinxiang<sup>4</sup>, LIU Qian<sup>4,5</sup>, ZHOU Quan<sup>6\*</sup> (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Kaili 556000, China; 5. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 6. The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop the GC-MS quantitative method for genotoxic impurity ethyl chloroformate in desloratadine. **METHODS** CNW CD-ACIDWAX(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) column was used with the helium as the carrier gas, the gas flow rate was set at 1.2 mL·min<sup>-1</sup>. Through 20 : 1 split head space injection, the headspace temperature was set at 70 °C. The temperature was programmed by holding it for 5 min in a column temperature chamber at 50 °C and then heat up to 80 °C at a rate of 10 °C·min<sup>-1</sup>, and kept at 80 °C for 3 min. Determined by SIM mode, the quantitative ion of ethyl chloroformate was *m/z* 63. **RESULTS** The calibration curve of ethyl chloroformate showed good linearity within the concentration range of 0.05–4.00 μg·mL<sup>-1</sup>. All the validation parameters about the method including repeatability, intermediate precision, accuracy, solution stability and durability met the required acceptance of relevant method validation guidance. **CONCLUSION** The method is accurate, reliable and reproducible, and it is suitable for the determination of ethyl chloroformate in desloratadine.

**KEYWORDS:** desloratadine; ethyl chloroformate; genotoxic impurity; GC-MS

地氯雷他定为非镇静性长效三环类抗组胺药, 是氯雷他定的活性代谢物<sup>[1-2]</sup>, 可通过选择性拮抗外周 H<sub>1</sub> 受体, 缓解过敏性鼻炎或慢性特发性荨麻疹的相关症状<sup>[3-4]</sup>。在地氯雷他定的合成过程中, 氯雷他定的制备需加入氯甲酸乙酯<sup>[5]</sup>。氯甲酸乙酯有剧毒, 具有刺激性气味<sup>[6]</sup>, 属于酰卤类基因毒性杂质。尽管目前尚无证据证明酰氯化合物具有基因毒性和致癌性, 但这类化合物含有结构警示基团, 是潜在的基因毒性杂质<sup>[7]</sup>。基因毒性杂质在极低浓度水平下均具有致癌、致畸或致突变的性质, 因此在药物的生产过程中对基因毒性杂质的含量控制已成为医药企业在药物研发过程中关注的重点<sup>[8-9]</sup>。原料药中的杂质含量很低, 因此建立灵敏度高、专属性强、基质干扰小、重复性好的基因毒性杂质定量分析方法显得十分关键。在定量检测中, 氯甲酸乙酯常作为衍生剂<sup>[6-7,10-11]</sup>, 而已报道的氯甲酸乙酯测定方法中, 采用银量法及液相色谱法进行定量, 灵敏度均较低<sup>[12-13]</sup>。质谱的专属性强、灵敏度高, 为监控地氯雷他定原料药中氯甲酸乙酯的含量, 本实验建立了 GC-MS 定量方

的性质, 因此在药物的生产过程中对基因毒性杂质的含量控制已成为医药企业在药物研发过程中关注的重点<sup>[8-9]</sup>。原料药中的杂质含量很低, 因此建立灵敏度高、专属性强、基质干扰小、重复性好的基因毒性杂质定量分析方法显得十分关键。在定量检测中, 氯甲酸乙酯常作为衍生剂<sup>[6-7,10-11]</sup>, 而已报道的氯甲酸乙酯测定方法中, 采用银量法及液相色谱法进行定量, 灵敏度均较低<sup>[12-13]</sup>。质谱的专属性强、灵敏度高, 为监控地氯雷他定原料药中氯甲酸乙酯的含量, 本实验建立了 GC-MS 定量方

作者简介: 施俊伟, 男, 硕士生, 主管药师 Tel: (0571)85827588  
任药师 Tel: (0571)87784615 E-mail: zhouquan142602@zju.edu.cn

E-mail: sjweist1314@163.com \*通信作者: 周权, 男, 博士, 主任药师

法,对地氯雷他定中氯甲酸乙酯的含量进行测定,为地氯雷他定原料药的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 7820A-5977E GC-MS 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);IPS-40A 超声波清洗机(浙江石浦海天电子仪器厂);Epo5 DeltaRange 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);16700 涡旋混合器(美国 Scinetific Industries 公司)。

### 1.2 试剂

浓盐酸(广州化学试剂厂);乙醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯,批号:20190801);氯甲酸乙酯对照品(天津市大茂化学试剂厂,批号:20120628;纯度:100.0%);地氯雷他定原料药(国内某制药企业提供,批号:16001,16002,16003)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 空白溶液配制** 精密量取浓盐酸 30 mL,缓慢加入 70 mL 乙醇中,搅拌,使溶液混合均匀,即得 30%盐酸乙醇溶液。

**2.1.2 对照品溶液配制** 精密称量氯甲酸乙酯对照品 16 mg 于 20 mL 量瓶中,加入 30%盐酸乙醇溶液定容至刻度,再用 30%盐酸乙醇溶液梯度稀释配制浓度为  $8.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液,最后用 30%盐酸乙醇溶液稀释至  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,即得。

**2.1.3 供试品溶液配制** 精密称取地氯雷他定原料药 50 mg 于 5 mL 量瓶中,再加入适量 30%盐酸乙醇溶液,超声振荡使溶解,冷却后定容至刻度即得供试品溶液。

### 2.2 色谱质谱条件

**2.2.1 色谱条件** CNW CD-ACIDWAX 色谱柱 ( $30 \text{ m}\times 0.25 \text{ mm}$ ,  $0.25 \mu\text{m}$ );程序升温:柱温箱初始温度  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,保持 5 min,以  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升温至  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ,保持 3 min;进样口温度:  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ;顶空瓶平衡温度:  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;色谱柱流量  $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,载气为氦气,分流比 20:1。精密量取供试品溶液 5 mL 至顶空进样瓶中进行分析,记录色谱图。

**2.2.2 质谱条件** 电子轰击离子源(EI),电离能量  $70 \text{ eV}$ ;离子源温度:  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ ;四级杆温度:  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ;扫描模式:SIM;定量检测离子质荷比( $m/z$ )为 63。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 仪器精密度及专属性考察** 取“2.1”项下空白溶液、对照品溶液及供试品溶液,按“2.2”项下方法进行分析。其中对照品溶液平行测定 6 次,进行仪器精密度考察。分别取空白溶液、对照品溶液及供试品溶液进样,考察专属性。仪器精密度结果表明 6 次进样的峰面积 RSD 为 1.6%。专属性见图 1,结果表明,空白溶液在氯甲酸乙酯出峰位置无干扰,地氯雷他定原料药样品中未出现氯甲酸乙酯的干扰峰,无质荷比相同的杂质干扰。

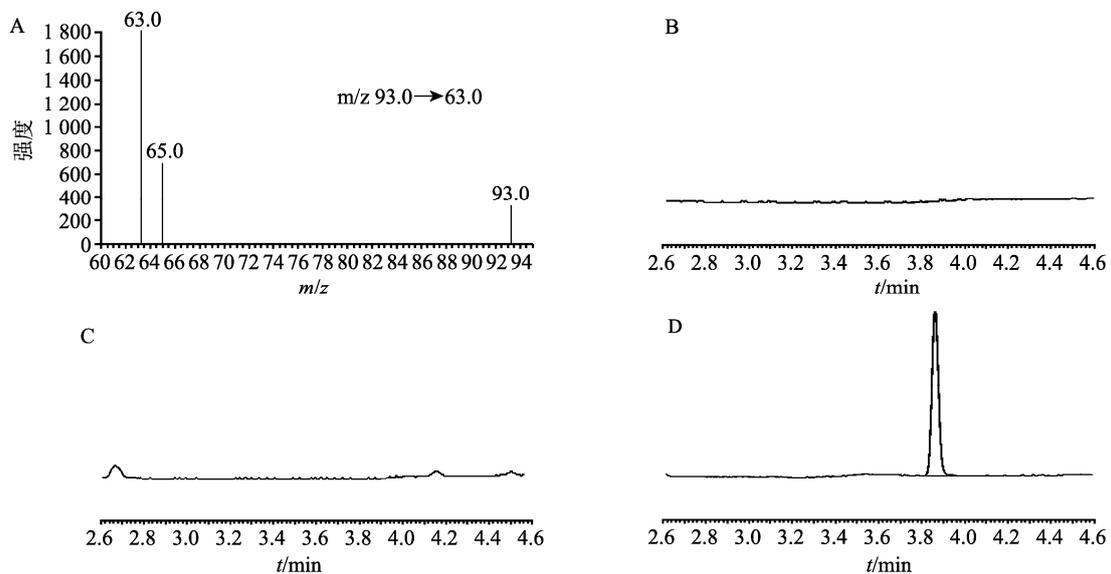


图 1 氯甲酸乙酯专属性考察图谱

A-氯甲酸乙酯二级离子扫描质谱图; B-空白溶液; C-地氯雷他定样品溶液色谱图; D-氯甲酸乙酯对照品溶液( $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )色谱图

Fig. 1 Chromatogram of ethyl chloroformate

A-mass spectrometry of ethyl chloroformate; B-chromatogram of blank sample; C-chromatogram of desloratadine sample; D-chromatogram of ethyl chloroformate at  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**2.3.2 检测限** 精密量取对照品溶液 0.5 mL 于 20 mL 量瓶中,用 30%盐酸乙醇溶液稀释至刻度,混匀得  $0.025 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液,精密量取 5 mL 于顶空进样瓶中进行分析。平行测定 3 个样本,记录色谱图及各自对应的信噪比( $S/N$ )。检测限结果显示,3 次检测限的  $S/N$  均在 3~4,且平均值为 3.8,因此本次定量方法氯甲酸乙酯的检测限为  $0.025 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.3.3 定量限** 精密量取对照品溶液 5 mL 于 100 mL 量瓶中,用 30%盐酸乙醇溶液稀释至刻度,混匀得  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液,精密量取 5 mL 于顶空进样瓶中进行分析,平行测定 6 份。定量限的结果显示,样品溶液的峰面积 RSD 为 6.6% ( $\text{RSD}\leq 10\%$ ), $S/N$  分别为 10.5, 10.8, 10.7, 9.8, 9.6, 10.7, RSD 为 5.0%,且  $S/N$  在 8~12,因此  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  可视为该 GC-MS 方法的定量限。

**2.3.4 线性范围考察** 取“2.1.2”项下对照品储备液,用 30%盐酸乙醇溶液分别稀释配制浓度为 0.05, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00,  $4.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线性溶液进样分析。以氯甲酸乙酯的峰面积与其对应的浓度绘制标准曲线,实验结果表明,氯甲酸乙酯浓度在  $0.05\sim 4.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性良好,其线性方程为  $Y=3738.1X-104.31$ ,线性系数  $R^2$  为 0.999 8。

**2.3.5 重复性及中间精密度试验** 精密量取“2.1.2”项下对照品储备液 2.5 mL 于 20 mL 量瓶中,用供试品溶液将其稀释并定容至刻度进行分析,平行测定 6 份上述溶液的含量。重复性结果显示,6 份溶液中氯甲酸乙酯的回收率分别为 102.7%, 105.2%, 102.0%, 102.4%, 101.2%, 101.2%,回收率的 RSD 为 1.4%。

按照重复性测定的方法,实验室另一实验员再次测定 6 份含氯甲酸乙酯的供试品溶液考察中间精密度。6 份溶液中氯甲酸乙酯的回收率分别为 98.9%, 98.1%, 97.1%, 96.1%, 94.6%, 93.7%,连同重复性结果的 12 份测试溶液,氯甲酸乙酯的回收率的 RSD 为 3.6%,符合验证方案要求 ( $\text{RSD}\leq 10.0\%$ )。

**2.3.6 加样回收率试验** 用“2.1.3”项下供试品溶液稀释对照品储备液,配制得到相当于氯甲酸乙酯浓度为 0.50, 1.00 及  $1.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的含对照品的供试品溶液,即为低中高 3 组溶液,每个浓度平行测定 3 份样本,计算样品中氯甲酸乙酯的回

收率。回收率结果见表 1,低中高 3 组的平均回收率分别为 103.9%, 96.4%, 104.0%,回收率 RSD 为 4.3%。

表 1 氯甲酸乙酯回收率试验结果

Tab. 1 Recovery results of ethyl chloroformate

样品名称	回收率/%	加入量/ $\mu\text{g}$	平均回收率/%	RSD/%
低浓度-1	104.6			
低浓度-2	104.7	75.30	103.9	1.2
低浓度-3	102.5			
中浓度-1	97.1			
中浓度-2	95.6	150.60	96.0	1.0
中浓度-3	95.4			
高浓度-1	107.0			
高浓度-2	104.2	225.90	104.0	3.0
高浓度-3	100.7			

**2.3.7 稳定性考察** 取“2.1.3”项下供试品溶液稀释对照品储备液,得到浓度为  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的含氯甲酸乙酯的供试品溶液,分别在配制后 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样分析,每个时间点平行测定 2 次。结果显示,各时间点样品中氯甲酸乙酯相对 0 h 的回收率为 92.1%~99.7%,RSD 为 3.5%。

**2.3.8 耐用性考察** 分别考察气体流速为 1.1,  $1.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,进样口温度为 75, 85  $^{\circ}\text{C}$ ,顶空加热温度为 65, 75  $^{\circ}\text{C}$  情况下,浓度为  $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  氯甲酸乙酯的供试品溶液的相对回收率,每个条件下平行检测 2 份样本。实验结果见表 2,各条件下样品中氯甲酸乙酯的回收率为 95.1%~104.5%,RSD 为 2.9%。

表 2 氯甲酸乙酯耐用性试验结果

Tab. 2 Durability results of ethyl chloroformate

测定条件	样品名称	回收率/%	RSD/%	
气体流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$				
1.1	sample 1-1	95.8		
	sample 1-2	95.5		
	1.3	sample 2-1	96.1	
		sample 2-2	95.1	
进样口温度/ $^{\circ}\text{C}$				
75	sample 3-1	102.0	2.9	
	sample 3-2	101.3		
85	sample 4-1	104.5		
	sample 4-2	97.6		
顶空加热温度/ $^{\circ}\text{C}$				
65	sample 5-1	98.6		
	sample 5-2	97.8		
75	sample 6-1	98.4		
	sample 6-2	98.3		

## 2.4 样品检测

按“2.1.3”项下方法配制样品溶液,分别检测3个批次地氯雷他定原料药(批号分别为16001,16002,16003),每批次平行检测2个样本,均未检出氯甲酸乙酯。

## 3 讨论

氯甲酸乙酯由乙醇与光气反应生成,盐酸为其产物之一<sup>[12]</sup>,因此盐酸可降低氯甲酸乙酯分解,因此本次研究在配制氯甲酸乙酯溶液过程中加入适量盐酸。在方法稳定性考察过程中,笔者发现氯甲酸乙酯在水溶液中易分解,因此本次研究考察了在不同溶液(包括甲醇、乙醇、乙腈等有机溶液)与不同盐酸体积比(10%,20%,30%,40%)的混合液中,不同放置时间下氯甲酸乙酯的稳定性(0,4,8,12,18,24 h),实验结果表明氯甲酸乙酯在30%盐酸乙醇溶液中稳定性最佳,因此,确定了30%盐酸乙醇溶液为对照品溶液的稀释液。

在色谱条件摸索过程中,参照相关文献<sup>[12,14]</sup>,最初将色谱条件设置为:极性色谱柱,载气(氦气)流速为 $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,分流比为 $50:1$ ,柱温为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验发现分流比为 $50:1$ 时,色谱峰响应较低,不分流情况下质谱无响应,将分流比调整为 $20:1$ 时最佳。柱温为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 等度时,色谱峰不对称,将梯度条件调整为: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,保持 $5\text{ min}$ ,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,保持 $3\text{ min}$ 后,峰形得到明显改善。

虽然氯甲酸乙酯沸点为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,研究过程中发现,顶空温度设置到 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,氯甲酸乙酯已完全挥发。温度过高时,氯甲酸乙酯易降解。所以本次研究将顶空温度设为 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,进样口温度设为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

地氯雷他定原料药在合成过程中需加入氯甲酸乙酯,氯甲酸乙酯为基因毒性杂质,需严格控制其在原料药中的含量。

本次研究运用氯甲酸乙酯沸点低易挥发的特点,通过进样方法的摸索测试,最终确定了GC-MS顶空进样方法对其进行含量测定。本研究成功建立了地氯雷他定中氯甲酸乙酯含量测定的GC-MS方法,该方法准确度高、专属性好、稳定性强,可为其他药物中氯甲酸乙酯的含量测定提供参考。

## REFERENCES

- [1] BOER J, EDERVEEN E, GRUNDMARK B. Desloratadine and depression, a drug safety signal based on worldwide spontaneous reporting of side effects[J]. *Ups J Med Sci*, 2018, 123(3): 174-178.
- [2] TANG L C, GUO W B, ZHENG S F, et al. Determination of content and related substances of loratadine by HPLC[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2014, 31(8): 994-997.
- [3] NAKAMURA T, HIRAOKA K, HARADA R, et al. Brain histamine  $H_1$  receptor occupancy after oral administration of desloratadine and loratadine[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2019, 7(4): e00499.
- [4] ANTONIJOAN R, COIMBRA J, GARCÍA-GEA C, et al. Comparative efficacy of bilastine, desloratadine and rupatadine in the suppression of wheal and flare response induced by intradermal histamine in healthy volunteers[J]. *Curr Med Res Opin*, 2017, 33(1): 129-136.
- [5] LI F, XU Q L, ZHU Q H, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel desloratadine derivatives with anti-inflammatory and  $H_1$  antagonize activities[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(24): 126712.
- [6] KHUHAWAR M Y, ZARDARI L A. Ethyl chloroformate as a derivatizing reagent for the gas chromatographic determination of isoniazid and hydrazine in pharmaceutical preparations[J]. *Anal Sci*, 2008, 24(11): 1493-1496.
- [7] TAO X M, LIU Y M, WANG Y H, et al. GC-MS with ethyl chloroformate derivatization for comprehensive analysis of metabolites in serum and its application to human uremia[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391(8): 2881-2889.
- [8] ABDELWAHAB N S, ABDELRAHMAN M M, BOSHRA J M, et al. Different stability-indicating chromatographic methods for specific determination of paracetamol, dantrolene sodium, their toxic impurities and degradation products[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(9): e4598. Doi: 10.1002/bmc.4598.
- [9] JAIN D, BASNIWAL P K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013(86): 11-35.
- [10] REDDY B S, CHARY V N, PAVANKUMAR P, et al. Characterization of N-methylated amino acids by GC-MS after ethyl chloroformate derivatization[J]. *J Mass Spectrom*, 2016, 51(8): 638-650.
- [11] MANCA A, ALLADIO E, MASSARENTI P, et al. "One-pot" ethyl chloroformate derivatization and liquid-liquid extraction of reduced glutathione in erythrocyte and its quantitative GC-MS analysis[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017(1070): 15-22.
- [12] 姚湘江. 氯甲酸乙酯含量测定[J]. *科学通报*, 1975, 20(8): 378-379.
- [13] 陈连文, 刘敬兰. 氯甲酸乙酯和氯甲酸乙酯的气相色谱分析[J]. *分析化学*, 2001, 29(11): 1362.
- [14] ZHEN Y X. Determination of methyl chloroformate impurities in ethyl chloroformate and its accuracy analysis[J]. *Yunnan Chem Technol(云南化工)*, 2017, 44(12): 29-30.

收稿日期: 2020-06-01

(本文责编: 曹粤锋)