

# 中心切割二维液相色谱-质谱法定性鉴别盐酸特比萘芬乳膏中的未知杂质及其校正因子的测定

赵敬丹, 秦峰, 刘浩(上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

**摘要:** 目的 采用中心切割在线二维液相色谱四级杆飞行时间质谱法定性鉴别盐酸特比萘芬乳膏中相对保留时间(relative retention time, RRT)0.4的杂质并对其校正因子进行测定。方法 一维液相色谱采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱, 以三乙胺缓冲液(0.2%三乙胺溶液, 用冰醋酸调节 pH 值至 7.5)-甲醇-乙腈(30 : 42 : 28)为流动相 A, 以三乙胺缓冲液-甲醇-乙腈(5 : 57 : 38)为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm; 二维液相色谱采用 Tsk gel ODS 100 V 色谱柱, 以 0.1%甲酸水溶液-甲醇(20 : 80)为流动相; 质谱采用大气压化学电离离子源(APCI), 正离子模式检测。根据一维液相色谱条件, 对该杂质的校正因子进行测定。结果 根据质谱定性结果并结合对照品比对, 确认盐酸特比萘芬乳膏中 RRT 0.4 的杂质为工艺杂质, 可为后续精制工艺的改进提供依据。该杂质相对于特比萘芬的校正因子为 0.21, 提示定量时选择加校正因子的主成分自身对照法较为合理。结论 研究建立的中心切割在线二维液相色谱质谱法可用于盐酸特比萘芬乳膏中弱极性杂质的在线定性鉴别, 为特比萘芬中其他弱极性杂质的鉴定提供了研究思路, 也为复杂基质样品中微量杂质的分析鉴别提供了思路, 可以为更好地监测盐酸特比萘芬乳膏的质量提供技术借鉴。

**关键词:** 盐酸特比萘芬; 中心切割; 杂质; APCI; 校正因子

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)14-1717-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.14.010

引用本文: 赵敬丹, 秦峰, 刘浩. 中心切割二维液相色谱-质谱法定性鉴别盐酸特比萘芬乳膏中的未知杂质及其校正因子的测定[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(14): 1717-1722.

## Qualitative Analysis of an Unknown Impurity in Terbinafine Hydrochloride Cream by Heart-cutting 2D-LC-MS and Determination of Its Correction Factor

ZHAO Jingdan, QIN Feng, LIU Hao(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method of heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with Quadrupole time-of flight mass spectrometry(2D-LC-Q/TOF) to identify an impurity with relative retention time(RRT) of 0.4 in terbinafine hydrochloride cream and determine its correction factor. **METHODS** One-dimensional chromatographic conditions were as listed. A Diamonsil C<sub>18</sub> was used, and 0.2% triethylamine buffer(adjust pH to 7.5 with glacial acetic acid)-methanol-acetonitrile (30 : 42 : 28) as the mobile phase A, and triethylamine buffer-methanol-acetonitrile(5 : 57 : 38) as the mobile phase B, in gradient mode, at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 280 nm. Two-dimensional chromatographic conditions were as listed. A Tsk gel ODS 100 V was used, with 0.1% formic acid solution-methanol(20 : 80) as the mobile phase, APCI source was used at positive ion detection mode. The correction factor of the detected impurity was determined in the one-dimensional chromatographic system. **RESULTS** According to the qualitative results of mass spectrometry and the comparison of reference substance, the RRT 0.4 impurity in terbinafine hydrochloride cream was confirmed as the process impurity, which could provide the basis for the improvement of subsequent refining process. The correction factor of the impurity was 0.21 compared with terbinafine, which suggested that the method of self-control of main component with correction factor was more reasonable. **CONCLUSION** The 2D-LC-MS method can be used to identify weak polarity impurities in terbinafine hydrochloride cream, which provides ideas for the research of other weak polarity impurities in terbinafine hydrochloride cream and impurities of the similar preparations with complex matrix, and it is also an effect technology to control the quality of terbinafine hydrochloride cream.

**KEYWORDS:** terbinafine hydrochloride; heart-cutting; impurity; APCI; correction factor

盐酸特比萘芬属于烯丙胺类抗真菌药物, 由瑞士山德士药厂开发, 20 世纪 80 年代由瑞士诺华制药研制成功, 1991 年首先在英国上市, 1994 年在中国上市, 2000 年进入了中国公布的第一批

OTC 目录。其原料合成工艺为在甲醛和硼氢化钠存在下, 萘甲胺和 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛还原胺化制得<sup>[1-2]</sup>, 反应式见图 1。其乳膏剂是国内上市种类最多的剂型, 规格多为 1%。采用中国

作者简介: 赵敬丹, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 18001677205

E-mail: dannyzhaoj@163.com

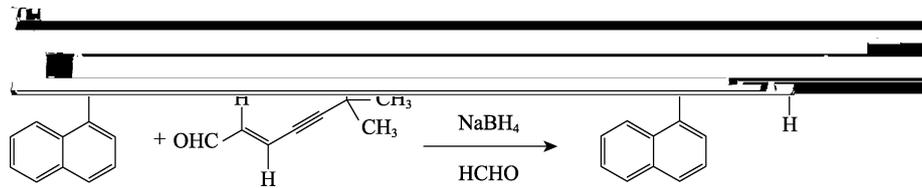


图1 特比萘芬的合成工艺  
Fig. 1 Synthesis process of terbinafine

药典2015年版二部项下有关物质分析方法对某企业生产的盐酸特比萘芬乳膏进行检测时,其单个最大杂质(约为0.6%)为相对保留时间(relative retention time, RRT)为0.4的未知杂质(以杂质1表示,下同,典型色谱图见图2)。专属性试验研究发现:其峰面积和未破坏样品相比,未见增加,推测为特比萘芬合成工艺中引入。由于该杂质的含量远超出杂质的鉴定限度要求(0.10%)<sup>[3]</sup>,因此有必要对其进行结构确认。随着对杂质研究的逐渐深入,越来越倾向于对杂质采用外标法或加校正因子的主成分自身对照法定量<sup>[4]</sup>。为了增加定量结果的准确度,有必要对杂质1的校正因子进行测定。

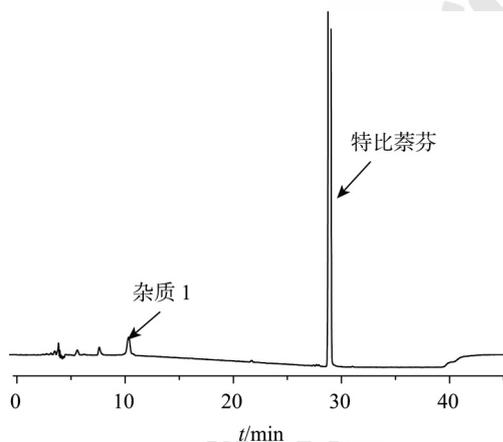


图2 样品溶液典型色谱图  
Fig. 2 Chromatogram of sample solution

二维液相色谱-质谱联用技术(2D-LC-MS)通过在线联用的自动化操作,可在一维色谱体系中使用质谱不兼容的流动相,通过中心切割技术对目标杂质进行捕集,再转移至流动相与质谱兼容的第二维色谱体系中,然后直接进入质谱仪实现杂质的分析<sup>[5]</sup>。与传统的LC-MS相比,2D-LC-MS有着更强的分离能力,在药品杂质谱分析及复杂基质的生物大分子分析中有着广泛应用<sup>[6-10]</sup>。由于盐酸特比萘芬乳膏基质较为复杂,为了避免乳膏

基质对杂质1质谱响应的影响,同时避免流动相中高浓度三乙胺对质谱系统的影响,本研究采用中心切割在线二维液相色谱质谱法对杂质1进行了定性鉴别。

为了提高定量结果的准确度,对盐酸特比萘芬乳膏中杂质1的校正因子进行了测定。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1290-6550 Q/TOF(配备紫外检测器和二极管阵列检测器)、Agilent 1260液相色谱仪(配备二极管阵列检测器)均购自美国Agilent; Waters 2695液相色谱仪(美国Waters公司,配备紫外检测器); LC-2030C液相色谱仪(日本Shimadzu公司,配备二极管阵列检测器)。

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱级,购自Merk公司;异丙醇(色谱级, Fisher公司);其他试剂均为分析纯;实验用水为Millipore超纯水。盐酸特比萘芬乳膏(批号:A~D,规格1%),6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛对照品(批号:1;纯度:98.0%)均由某企业提供。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

**2.1.1 一维液相色谱条件** 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm); 流动相: 以三乙胺缓冲液(0.2%三乙胺溶液,用冰醋酸调节pH值至7.5)-甲醇-乙腈(30:42:28)为流动相A,以三乙胺缓冲液-甲醇-乙腈(5:57:38)为流动相B,按0~4 min, 100%A; 4~25 min, 100%→0%A; 25~30 min, 0%A; 30~31 min, 0%→100%A; 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 20 μL; 紫外检测波长: 280 nm。

**2.1.2 二维液相色谱条件** 色谱柱: Tsk gel ODS 100 V(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%甲酸溶液(80:20), 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; Loop环体积: 80 μL。

**2.1.3 质谱条件** 电离源: APCI, 正离子模式检测; 干燥气温度: 250 °C; 气化室温度: 350 °C; 干燥气流速: 14 L·min<sup>-1</sup>; 雾化器压力: 35 psig;

毛细管电压: 3 500 V; 电晕电流: 4  $\mu$ A。

**2.1.4 样品溶液的制备** 取盐酸特比萘芬乳膏适量, 精密称定, 加异丙醇溶解制成每 1 mL 中约含盐酸特比萘芬 5 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液即得。

**2.1.5 样品中杂质 1 的分析结果** 按“2.1.1”项下色谱条件对样品溶液进行分析, 将一维色谱图中的杂质 1 切入二维色谱柱中, 质谱分别扫描一级质谱图和二级质谱图, 流路及杂质 1 在二维色谱系统中的色谱和质谱图见图 3。一级质谱信息显示, 杂质 1 的 $[M+H]^+$ 为 137, 表明分子式不含氮原子或含有偶数氮原子。由试验知, 当采用电喷雾离子源(ESI)时, 未检测到杂质 1 的质谱信号, 推测该杂质中不含氮原子。为了降低乳膏基质及特比萘芬和其他含有氮原子的工艺杂质或降解杂质对杂质 1 质谱检测的影响, 采用上述中心切割在线二维液相色谱, 采用 APCI 源, 可有效避免杂质 1 质谱响应的问题。杂质 1 二级质谱的主要碎片离子为  $m/z$  109.10, 107.05, 91.05, 67.05 等。根据杂质 1 质谱响应特性, 推测为弱极性化合物, 进一步地由特比萘芬的合成工艺, 推测该杂质可能为合成工艺中残留的原料 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛, 有待采用对照品验证。

**2.1.6 采用 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛对照品验证推测结果** 取 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛对照品适量, 精密称定, 加异丙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 10  $\mu$ g 的溶液, 作为验证用对照品溶液。

按“2.1.1”项下的色谱条件对 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛对照品溶液进行分析; 将一维色谱中 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛的色谱峰切入二维色谱柱中, 质谱分别扫描其一级质谱图和二级质谱图。一级质谱信息显示, 其 $[M+H]^+$ 为 137, 二级质谱的主要碎片离子为  $m/z$  109.10, 107.05, 91.05, 67.05 等, 由一级及二级质谱图推测其质谱裂解规律, 见图 4。

根据在线二维液相色谱-质谱获得的信息: 样品中杂质 1 与 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛对照品相比, 两者在一维液相色谱系统中的保留时间基本一致; 二维液相中的紫外光谱图及一级质谱信息基本一致; 二级主要质谱碎片信息基本一致。因此, 基本确认样品中含有 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛, 杂质 1 可能为 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛。

由于杂质 1 的分子结构和特比萘芬的分子结构存在较大差异, 紫外吸收特征不同, 因此, 对杂质 1 的定量方式不宜采用供试品溶液自身对照法, 有必要对杂质 1 的校正因子进行测定, 以提高定量结果的准确度。

## 2.2 校正因子的测定

**2.2.1 专属性考察** 取本品适量, 加适量异丙醇溶解后, 分别经 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液、1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液、30%过氧化氢溶液、80  $^{\circ}$ C 水浴及紫外灯(254 nm)照射等条件破坏后, 加异丙醇稀释制成每 1 mL 中分别约含盐酸特比萘芬 0.5 mg 的溶液, 按“2.1.1”项下的色谱条件, 分别进样分析, 降解产物及其他杂质均不干扰杂质 1 的测定。

**2.2.2 线性范围** 取杂质 1 对照品和盐酸特比萘芬对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 加异丙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为线性对照品贮备液; 分别精密量取适量, 用异丙醇定量稀释制成每 1 mL 中各约含 0.2, 0.5, 1, 2.5, 4, 5 和 10  $\mu$ g 的混合溶液, 分别相当于供试品(0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)的 0.04%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%和 2.0%, 按“2.1.1”项下的色谱条件, 分别考察在 3 根不同品牌色谱柱及 3 个色谱系统中的线性关系。分别以杂质 1 与特比萘芬线性方程的斜率计算杂质 1 相对于特比萘芬的校正因子  $f_c$ ( $f_c$ =特比萘芬线性斜率/杂质线性斜率)。结果见表 1~2。

结果表明, 在一定的条件下, 色谱柱的规格和来源及不同的液相色谱系统对杂质 1 校正因子的测定结果未见显著影响。

**2.2.3 杂质 1 测定结果的回收率** 分别取盐酸特比萘芬乳膏适量, 共 9 份, 分别加“2.2.2”项下浓度为 0.5, 2.5, 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的线性溶液, 按“2.1.1”项下的色谱条件进样分析, 记录色谱图。杂质 1 的平均回收率为 101.8%(RSD=1.3%), 回收率良好。

**2.2.4 杂质 1 测定结果的重复性** 分别取盐酸特比萘芬乳膏适量, 共 6 份, 分别加异丙醇溶解并稀释制成每 1 mL 中分别约含盐酸特比萘芬 0.5 mg 的溶液, 按“2.1.1”项下的色谱条件, 进样分析, 记录色谱图。按加校正因子的主成分自身对照法计算杂质 1 的平均含量约为 0.1%(RSD=1.0%), 重复性良好。

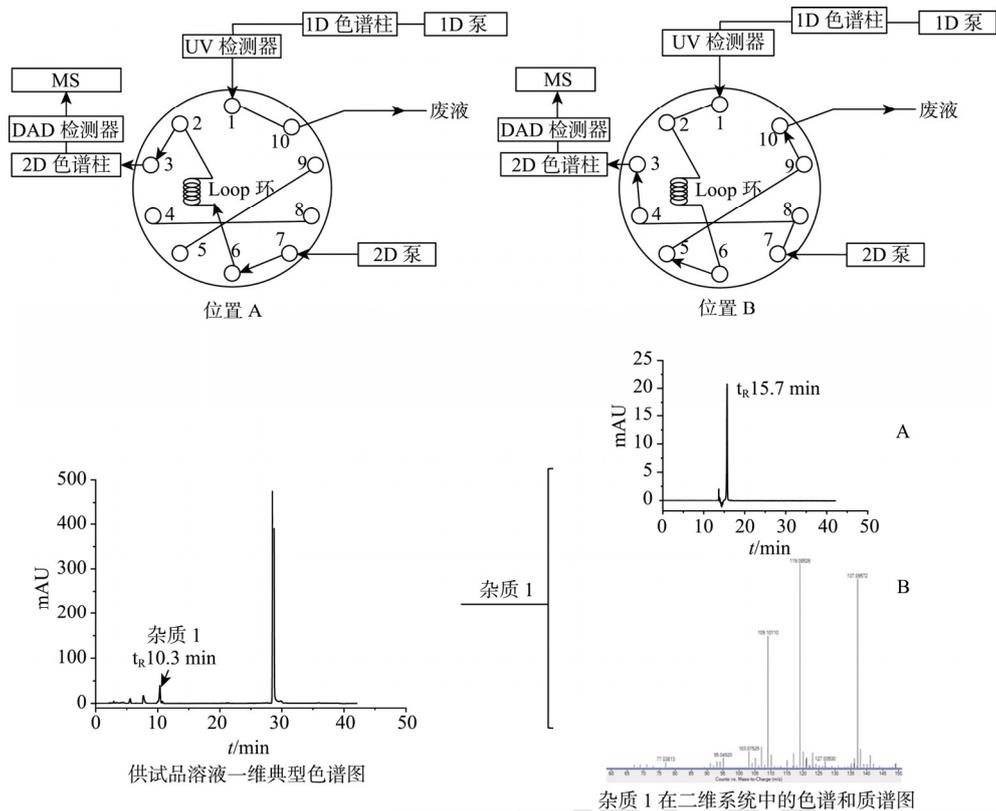


图 3 中心切割流路及杂质 1 在一维色谱系统中的色谱图、二维色谱系统中的色谱和质谱图

Fig. 3 Diagrams of 2D-LC and Chromatograms of impurity 1 in 1D and 2D systems

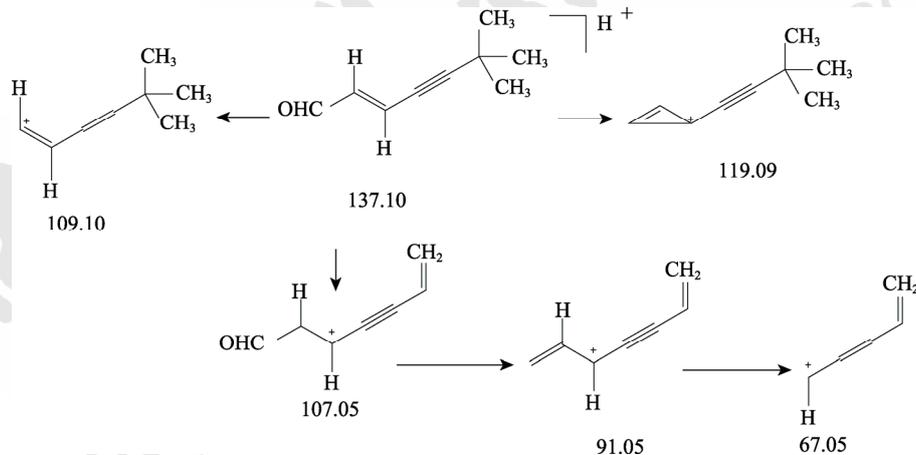


图 4 杂质 6,6-二甲基庚-2-烯-4-炔-1-醛可能的质谱裂解途径

Fig. 4 Mass spectrometry behavior of 6,6-dimethylhept-2-en-4-yn-1-aldehyde

表 1 同一色谱系统中不同品牌色谱柱杂质 1 校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 1 Correction factor and relative retention time of impurity 1 on three different columns

色谱柱	化合物	相对保留时间	线性方程	$r$	$f$	平均	RSD/%
1	杂质 1	0.36	$A=171.03C+0.494\ 6$	1.000 0	0.205	0.21	0.6
	特比萘芬	/	$A=35.134C-0.086\ 8$	1.000 0			
2	杂质 1	0.41	$A=269.93C+4.651\ 2$	1.000 0	0.207	0.21	0.6
	特比萘芬	/	$A=55.779C+0.445\ 9$	0.999 9			
3	杂质 1	0.39	$A=323.42C+4.861\ 3$	1.000 0	0.207	0.21	0.6
	特比萘芬	/	$A=66.937C-0.004\ 9$	1.000 0			

注: 色谱系统为 Agilent 1260; 色谱柱 1 为 Diamonsil  $C_{18}$  色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 色谱柱 2 为 Alltech 5  $\mu\text{m}$   $C_{18}$  色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 色谱柱 3 为 Tsk gel ODS 100V 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。

Note: Agilent 1260 HPLC System; Column 1: Diamonsil  $C_{18}$ (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Column 2: Alltech 5  $\mu\text{m}$   $C_{18}$ (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Column 3: Tsk gel ODS 100 V(150 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

表 2 不同液相色谱系统中杂质 1 校正因子和相对保留时间的测定结果

Tab. 2 Correction factor and relative retention time of impurity 1 in three different LC systems

色谱系统	化合物	相对保留时间	线性方程	<i>r</i>	<i>f</i>	平均	RSD/%
1	杂质 1	0.36	$A=171.03C+0.4946$	1.000 0	0.205		
	特比萘芬	/	$A=35.134C-0.0868$	1.000 0			
2	杂质 1	0.39	$A=337.899C+1.712.2$	1.000 0	0.213	0.21	2.1
	特比萘芬	/	$A=71.915C+1.136.2$	1.000 0			
3	杂质 1	0.42	$A=274.144C+1.971.5$	1.000 0	0.212		
	特比萘芬	/	$A=58.197C+403.62$	1.000 0			

注：色谱系统 1 为 Agilent 1260，配备二极管阵列检测器；色谱系统 2 为 Waters 2695，配备紫外检测器；色谱系统 3 为 Shimadzu LC-2030C，配备二极管阵列检测器。

Note: System 1: Agilent 1260, coupled with DAD detector; System 2: Waters 2695, coupled with UV detector; System 3: Shimadzu LC-2030C, coupled with DAD detector.

### 2.3 样品测定

取批号分别为 A~D 的盐酸特比萘芬乳膏适量，分别加异丙醇溶解并稀释制成每 1 mL 中分别约含盐酸特比萘芬 0.5 mg 的溶液，作为供试品溶液；精密量取适量，加异丙醇定量稀释制成每毫升中约含 2.5 μg 的溶液，作为自身对照溶液；取杂质 1 对照品适量，加异丙醇溶解并定量稀释制成每毫升中约含 1.5 μg 的溶液，作为对照品溶液。按“2.1.1”项下的色谱条件，进样分析，记录色谱图。按主成分自身对照法计算，杂质 1 的量分别约为 0.5%，0.5%，0.3%和 0.4%；按外标法计算杂质 1 的量分别约为 0.1%，0.1%，0.06%和 0.07%；按加校正因子的主成分自身对照法计算，结果分别约为 0.1%，0.1%，0.06%和 0.08%。结果证实，杂质 1 按加校正因子的主成分自身对照法计算所得量和按外标法计算所得量基本一致。因此，在没有对照品的前提下，杂质 1 的定量方式以按加校正因子的主成分自身对照法为宜。

## 3 讨论

### 3.1 质谱定性方法的选择

中心切割在线二维质谱定性研究技术，将待鉴别的杂质经二维分离后，直接切入质谱系统，既避免了一维色谱系统中流动相中不挥发性盐的干扰，又可以实现杂质的直接鉴别。

杂质 1 的理化性质和特比萘芬存在一定的差异。原因为①在中国药典色谱系统中，流动相中含有质谱不兼容的三乙胺；②杂质 1 为非极性化合物；③存在较强的来自特比萘芬、其他含氮杂质及软膏基质等带来的本底干扰。因此，采用电喷雾离子源时，未检测到杂质 1 的质谱信号。为了降低软膏基质及特比萘芬和其他含氮原子杂质对杂质 1 质谱检测的影响，采用中心切割在线二

维液相色谱，质谱采用 APCI 源，可有效避免上述问题，且可得到较好的质谱响应。

### 3.2 样品溶液浓度的选择

由于杂质 1 含量较低，为了增加质谱检测的灵敏度，同时考虑到乳膏基质等的溶解性，当采用 10 倍于有关物质项下样品溶液的浓度时，可以获得较好的二维质谱响应。

### 3.3 色谱柱的选择

本研究发现，色谱柱的选择对于杂质 1 及特比萘芬其他相关杂质的保留行为存在较大影响，并且易受空白基质的干扰，为了获得较好的耐用性，应结合乳膏的处方组成及杂质结构选择适宜的色谱柱。

### 3.4 校正因子测定的必要性

杂质 1 的化学结构和特比萘芬存在较大差异，决定了两者最大紫外吸收特征的差异。该杂质的校正因子为 0.21，不宜采用主成分自身对照法定量，通过校正因子的测定，增加对该杂质定量测定结果的准确度，便于更加合理评价产品的质量。

## 4 小结

本研究建立的中心切割在线二维液相色谱质谱法可用于盐酸特比萘芬乳膏中不含氮原子的弱极性工艺杂质的在线定性鉴别，可以为复杂基质药物中弱极性工艺杂质的分析鉴别提供思路。由杂质 1 和特比萘芬结构知，两者紫外吸收特征不同，通过校正因子的测定，可以增加定量结果的准确度，更加合理有效评价药品的质量。

## REFERENCES

- [1] STUETZ, ANTON. propenyl amines, processes for their production, pharmaceutical compositions containing them and

- their use as pharmaceuticals: 1157023[P]. 1983-11-15.
- [2] WEI X Q. Study on synthetic method of a kind of terbinafine hydrochloride[D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [3] EP9.0[S].2019:3727.
- [4] ZHAO J D, ZHANG H Z, WEN H L, et al. Determination of the related substances in cefamandole nafate for injection by HPLC with correction factors[J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2018, 19(5): 382-387.
- [5] QIU Y, QIN F, WEN H L, et al. Impurity profile study of cefalotin sodium by two-dimensional liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2015, 33(12): 1314-1319.
- [6] GAO W, SONG H P, YANG H, et al. Application progress of on-line two-dimensional liquid-chromatography in the analysis of traditional Chinese medicines[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2017, 35(1): 121-128.
- [7] QIN F, DING Y, QIU Y, et al. Polymer impurities in cefotiam hydrochloride by online 2D-GFC-RPLC-TOFMS[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2016, 51(9): 742-750.
- [8] IGUINIZ M, CORBEL E, ROQUES N, et al. Quantitative aspects in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography for pharmaceutical applications[J]. Talanta, 2019(195): 272-280.
- [9] JI S, WANG S, XU H S, et al. The application of on-line two-dimensional liquid chromatography (2DLC) in the chemical analysis of herbal medicines[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018(160): 301-313.
- [10] YANG N, YU L Y, DENG Y H, et al. Identification and characterization of proteins that are differentially expressed in adipose tissue of olanzapine-induced insulin resistance rat by iTRAQ quantitative proteomics[J]. J Proteomics, 2020(212): 103570.

收稿日期: 2020-06-09

(本文责编: 李艳芳)

中国现代应用药理学  
http://www.chinjmap.com