

LC-MS/MS 测定硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵

何佳佳, 黄巧巧*, 朱培曦, 潘芳芳(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 测定硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵。方法 采用 Waters Atantis HILIC silica 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 5 μm), 以甲酸铵缓冲液(0.05 mol·L⁻¹ 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液)-乙腈(15:85)为流动相, 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样体积 1 μL。采用三重四级杆质谱仪在正离子模式下多反应监测(MRM)模式对硫酸氢氯吡格雷中的四乙基溴化铵进行定量检测。结果 四乙基溴化铵在 0.005 0~1.993 3 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 加标回收率为 94.9%($n=9$), 重复性 RSD 为 1.8%, 定量限为 0.14 ng·mL⁻¹。6 批样品中四乙基溴化铵均未超出检出限。结论 本方法准确、快速、灵敏、重复性好, 适用于硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵的测定。

关键词: 四乙基溴化铵; 硫酸氢氯吡格雷; 高效液相色谱-质谱联用法; 亲水色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)10-1424-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.013

引用本文: 何佳佳, 黄巧巧, 朱培曦, 等. LC-MS/MS 测定硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1424-1426.

Determination of Residual Tetraethyl Ammonium Bromide in Clopidogrel Sulfate by LC-MS/MS

HE Jiajia, HUANG Qiaoqiao*, ZHU Peixi, PAN Fangfang(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an LC-MS/MS method for the determination of residual tetraethyl ammonium bromide in clopidogrel sulfate. **METHODS** The separation was performed on a Waters Atantis HILIC silica column(2.1 mm×100 mm, 5 μm), the mobile phase was the 0.1% formic acid solution of 0.05 mol·L⁻¹ ammonium formate-acetonitril(15:85) at the flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C and the sample volume was 1 μL. The detection of tetraethyl ammonium bromide in clopidogrel sulfate was achieved by triple quadrupole mass spectrometry with positive ionization using MRM mode. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.005 0~1.993 3 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$), the average recovery was 94.9%($n=9$), RSD of repeatability was 1.8%, the LOQ was 0.14 ng·mL⁻¹. The residual tetraethyl ammonium bromide were less than LOD in 6 batches of samples. **CONCLUSION** The method is accurate, rapid, sensitive, and reproducible to determine the residual tetraethyl ammonium bromide in clopidogrel sulfate.

KEY WORDS: tetraethyl ammonium bromide; clopidogrel sulfate; LC-MS/MS; HILIC

硫酸氢氯吡格雷是由法国赛诺菲安万特与美国百施美施贵宝联合开发的新型噻吩吡啶类二磷酸腺苷受体拮抗剂, 其抗血小板聚集作用特异而强效, 可用于预防和治疗因血小板高聚集状态引起的心、脑及其他动脉的循环障碍疾病, 目前已经成为临床上治疗和预防血栓性栓塞的一线药物^[1-2]。本品在合成过程中引入了相转移催化剂四乙基溴化铵, 而四乙基溴化铵吸入、摄取和皮肤接触有毒, 对皮肤、眼睛和呼吸系统有刺激。人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)Q3A 指导原则中明确指出, 在新药的研制过程中应对残留在原料

药中的催化剂进行评估。四乙基溴化铵作为催化剂, 在原料药中的残留量一般是微量甚至是痕量的, 因此要求所建立的检测方法具有较高的灵敏度。由于四乙基溴化铵水溶性较好、极性大, 亲水色谱(HILIC)法、离子对色谱法及离子色谱法等^[3-5]常被用于测定该物质。本研究参考相关文献^[6-8]并综合考虑硫酸氢氯吡格雷与四乙基溴化铵(图 1)的理化性质, 结合高检测灵敏度的要求, 建立了采用亲水相互作用色谱柱的 LC-MS/MS 联用方法, 该方法前处理简便, 灵敏度高, 可用于测定硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵。

基金项目: 浙江省公益技术应用研究(分析测试)项目(2016C37020)

作者简介: 何佳佳, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)87180312 E-mail: hjj1217@126.com *通信作者: 黄巧巧, 女, 副主任药师 Tel: (0571)86459413 E-mail: 1637043879@qq.com

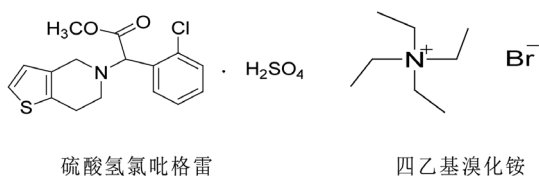


图1 硫酸氢氯吡格雷与四乙基溴化铵结构图
Fig. 1 Structure of clopidogrel sulfate and tetraethyl ammonium bromide

1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高压液相色谱仪、Agilent 6490 三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); Mettler XPE 205 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。硫酸氢氯吡格雷原料药(浙江燎原药业股份有限公司, 批号: A1071309001, A1071310001, A1071310002, A1131511001, A1131511002, A1131511003); 四乙基溴化铵(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: MKBR 7415 V, 含量: 99.0%)。水为超纯水, 乙腈、甲酸铵和甲酸均为色谱纯试剂。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

采用 Waters Atantis HILIC silica 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 5 μm), 以甲酸铵缓冲液 (0.05 mol·L⁻¹ 甲酸铵的 0.1%甲酸溶液)-乙腈(15:85)为流动相, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样体积 1 μL。

采用电喷雾(ESI)离子源, 正离子模式采集, 干燥气流速为 11 L·min⁻¹, 毛细管电压为 3 000 V, 碎裂电压为 380 V。采用 MRM 模式, 监测离子对 130.0→102.0。

2.2 溶液的配制

对照品贮备液: 取四乙基溴化铵适量, 加水超声溶解并稀释制成浓度约为 10 μg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

系统适用性溶液: 取硫酸氢氯吡格雷约 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入对照品贮备液 10 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀即得。

供试品溶液: 取硫酸氢氯吡格雷适量, 加水超声溶解并制成约含硫酸氢氯吡格雷 1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取系统适用性溶液, 按“2.1”项下条件直接测定, 氯吡格雷在 HILIC 柱上基本不保留(保留时间为 1.468 min, *m/z* 322.0), 四乙基铵约在 9.5 min 出峰(*m/z* 130.1), 2 种成分分离良

好, 符合测定要求, 结果见图 2。

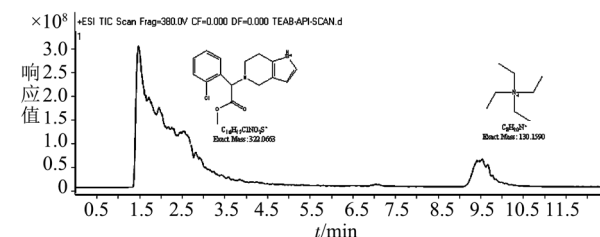


图2 系统适用性溶液总离子流图

Fig. 2 TIC of system suitability solution

在“2.1”项测定条件下, 四乙基铵较易失去一个乙基形成 *m/z* 102.0 碎片, 见图 3, 故本研究将其作为定量离子进行测定。同时, 在进行样品测定时, 由于样品浓度过大, 对质谱寿命有影响, 因此将保留时间为 6 min 前的流出物全部切换至废液, 从 6 min 以后开始进行采集数据。

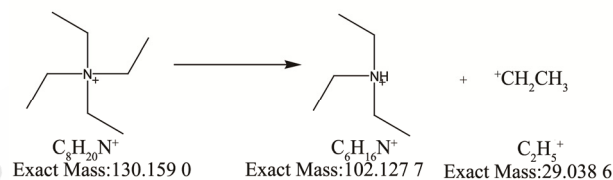


图3 四乙基铵质谱裂解图

Fig. 3 The fragmentation pathway of tetraethyl ammonium

2.3.2 线性试验 分别取对照品贮备液适量, 用水稀释制成浓度约为 0.005, 0.01, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μg·mL⁻¹ 的溶液, 作为线性溶液, 按“2.1”项下条件进样分析, 以浓度为横坐标(*x*)、峰面积(*y*)为纵坐标进行线性回归, 结果在 0.005 0~1.993 3 μg·mL⁻¹ 内, 四乙基溴化铵浓度与峰面积呈良好线性。线性方程为 $y=327\,514x+6\,768.2$ ($r=0.999\,8$)。

2.3.3 定量限(LOQ)与检出限(LOD) 以信噪比 10:1 与 3:1 分别计算, 本试验 LOQ 与 LOD 分别为 0.14, 0.04 ng·mL⁻¹。

2.3.4 回收率试验 分别取精密称取样品(批号: A1071309001)约 0.1 g 共 9 份, 置 100 mL 量瓶中, 1~3 份样品中加入对照品贮备液各 5.0 mL, 4~6 份样品中加入对照品贮备液各 10.0 mL, 7~9 份样品中加入对照品贮备液各 15.0 mL, 用水溶解并稀释至刻度, 分别作为低浓度(50%)、中浓度(100%)、高浓度(150%)回收率溶液; 按“2.1”项下条件测定, 记录色谱图, 利用“2.3.2”项下线性方程计算每份的回收率, 低、中、高浓度的加样回收率分别为 95.0%, 96.5%, 93.3%, 平均回收率为

94.9%($n=9$, $RSD=2.9\%$)。结果表明,回收率良好。

2.3.5 重复性试验 采用样品加标溶液作为供试品溶液考察重复性,分别取供试品(批号:A1071309001)6份,每份各约0.1 g,置100 mL量瓶中,加入对照品贮备液10.0 mL,加水溶解并定容至刻度,摇匀,平行测定。结果6份供试品测定结果平行性良好, RSD 为1.8%。

2.3.6 样品测定 精密称取本品约0.1 g,置100 mL量瓶中,加水超声溶解并稀释至刻度,按“2.1”项下条件测定,记录结果,6批样品中四乙基溴化铵均未超过检出限。

3 讨论

3.1 测定方法的选择

待测成分四乙基溴化铵具有极性、没有紫外吸收的特点,限制了常规紫外检测器对其的测定。离子色谱法是测定这类离子型化合物的较好选择,笔者曾尝试采用离子色谱法测定硫酸氢氯吡格雷中的四乙基溴化铵,以不同比例的甲烷磺酸溶液-乙腈为淋洗液进行洗脱,结果主成分硫酸氢氯吡格雷对四乙基溴化铵的出峰存在严重干扰。此时,LC-MS/MS成为另一个不错的选择。同时,由于主成分与待测成分均具有较强极性,其在常规反相色谱柱(RPLC)上保留较弱,而HILIC是一种用来改善在RPLC中保留较差的强极性物质保留行为的色谱技术,其发展有效弥补了RPLC的不足,使在RPLC上保留较弱或没有保留的物质在HILIC柱上具有合适的保留,笔者参考了相关文献最终选择了采用HILIC柱的LC-MS/MS进行测定。试验结果表明,本方法适用于硫酸氢氯吡格雷中的痕量四乙基溴化铵的测定。

3.2 溶剂的选择

硫酸氢氯吡格雷在水中溶解,而四乙基溴化铵在水溶液中也具有较好的溶解度,故采用水作为溶剂即可。

3.3 流动相的选择

LC-MS/MS要求使用的流动相具有易挥发的特点,本研究采用常用的甲酸铵-甲酸溶液-乙腈系统进行洗脱,同时结合HILIC系统有机相比比例提

高,洗脱能力减弱的特点,将水相与有机相比比例设定为15%:85%,结果表明该系统下硫酸氢氯吡格雷与四乙基溴化铵分离良好,且高比例的有机相有助于溶剂的挥发,提高质谱效率。

3.4 定量离子对的确定

本实验条件下四乙基铵离子($m/z=130.1$)主要的断裂方式为失去一个乙基侧链形成 $m/z=102.0$ 的碎片离子,故选择130.0 $\rightarrow$ 102.0作为监测离子对。

3.5 溶液浓度及限度的确定

ICH将日剂量 ≤ 2 g的原料药中杂质鉴定限度规定为0.10%,为提高检测灵敏度,本实验将供试品浓度设定为1.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$,相应的杂质对照品溶液的浓度按0.10%的限度设定为1 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

REFERENCES

- [1] SCHAFER A I. Antiplatelet therapy [J]. Am J Med, 1996, 101(2): 199-209.
- [2] JIANG J, YANG Q, SUN Y, et al. Application of clopidogrel in peri-percutaneous transluminal catheter angioplasty and stent implantation [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2002, 19(6): 444-446.
- [3] LIU X H, PAN H J, WEI J J. Research progress on analytical methods of residual quaternary ammonium salts as phase transfer catalyst in drug substances [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(11): 1166-1169.
- [4] TIAN Q P, LI W Y, XIE K C. Determination of quaternary ammonium salts by ion chromatography [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2009, 28(2): 21-23.
- [5] CHEN P P, WANG H L. Determination of residual tetrabutyl ammonium bromide in losartan potassium by ion chromatography [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2016, 30(7): 670-674.
- [6] AN J G, SUN M J, BAI L, et al. A practical derivatization LC/MS approach for determination of trace level alkyl sulfonates and dialkyl sulfates genotoxic impurities in drug substance [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(3): 1006-1010.
- [7] WEI R C, LI G F, GAO R, et al. Simultaneous determination of residual quaternary ammonium compounds in milk by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2014, 42(5): 711-716.
- [8] LIU J H, LI H Y, FENG F, et al. UPLC-MS/MS determination of tetrabutyl ammonium bromide in F351 [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(3): 443-446.

收稿日期: 2017-03-01

(本文责编: 李艳芳)