

# GC-MS 测定富马酸卢帕他定中痕量杂质偶氮二异丁腈

牛明玉, 胡丽娜\*, 印嘉佳(扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司, 江苏 泰州 225321)

**摘要:** 目的 采用气相色谱-质谱联用法测定富马酸卢帕他定中偶氮二异丁腈(azodiisobutyronitrile, AIBN)杂质的含量。方法 采用 DB-624 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 1.4 μm), 程序升温, 初始温度为 70 °C, 以 12 °C·min<sup>-1</sup>升到 250 °C, 以氮气为载气, 流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 采用电子轰击电离源(EI), 在单离子检测模式(SIM)下选择 *m/z* 69、*m/z* 54 和 *m/z* 41 进行检测。结果 AIBN 浓度在 0.155 2~3.103 μg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好(*r*<sup>2</sup>=0.999 8); 检测限为 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>, 定量限为 0.15 μg·mL<sup>-1</sup>, 样品中杂质 AIBN 测定结果的重复性良好, RSD(*n*=6)为 0.31%; 杂质 AIBN 低、中、高浓度的加样回收率(*n*=3)分别为 103.9%, 101.0%, 99.4%, RSD(*n*=3)分别为 0.03%, 0.11%和 0.08%。经检测, 3 批富马酸卢帕他定供试品中 AIBN 均未检出。结论 本方法操作简便, 结果准确, 灵敏度高, 可用于富马酸卢帕他定中 AIBN 的检测。

**关键词:** 富马酸卢帕他定; 偶氮二异丁腈(AIBN); 气相色谱-质谱联用; 基因毒性杂质

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)04-0426-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.009

引用本文:牛明玉, 胡丽娜, 印嘉佳. GC-MS 测定富马酸卢帕他定中痕量偶氮二异丁腈[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 426-429.

## Trace Determination of Azodiisobutyronitrile in Rupatadine Fumarate by GC-MS

NIU Mingyu, HU Lina\*, YIN Jiajia(Yangtze River Pharmaceutical Group, Jiangsu HAI-CI Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 225321, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a GC-MS analytical method for the trace determination of azodiisobutyronitrile (AIBN) in Rupatadine Fumarate. **METHODS** The analytical column was DB-624(30 m×0.25 mm, 1.4 μm). The column temperature was maintained at 70 °C, then was raised to 250 °C at the rate of 12 °C·min<sup>-1</sup>, and the flow rate was 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, the conditions of GC-MS were optimized. The detection was achieved in EI, and the selected ions were *m/z* 69, *m/z* 54 and *m/z* 41. **RESULTS** The calibration curve of AIBN was in a good linearity over the range of 0.155 2~3.103 μg·mL<sup>-1</sup>(*r*<sup>2</sup>=0.999 8). The limit of detection was 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>, and the limit of quantification was 0.15 μg·mL<sup>-1</sup>. Repetition of AIBN was fine, with RSD(*n*=6) of 0.31%. The recoveries of low, middle and high adding concentrations of AIBN were 103.9%, 101.0% and 99.4%, respectively, and the RSD(*n*=3) were 0.03%, 0.11% and 0.08%. AIBN was not detected in 3 batches of samples. **CONCLUSION** The method has been proved to be simple, rapid and reliable, which is applicable for the quality control of AIBN in Rupatadine Fumarate.

**KEYWORDS:** rupertadine fumarate; azodiisobutyronitrile(AIBN); GC-MS; genotoxic impurity

富马酸卢帕他定是由西班牙 Uriach 制药公司于 2003 年首次上市的新一代三环类长效抗过敏药, 具有抗组胺能神经 H1 受体和拮抗血小板活化因子的双重功效, 在炎症发生的不同阶段抑制过敏反应<sup>[1]</sup>, 对中枢神经系统影响较小, 在治疗过敏性疾病中处于较优势的地位。目前本品杂质测定方法已见报道, 且其质量标准已收录于欧洲药典(EP9.0)<sup>[2]</sup>中, 但工艺中作为自由基引发剂的偶氮二异丁腈(azodiisobutyronitrile, AIBN)残留量的测定方法还未见报道。AIBN 结构中含有的氮氮双键, 是遗传毒性、致癌性杂质的警示结构<sup>[3-4]</sup>,

为潜在基因毒性杂质, 结构式见图 1。因此, 本实验建立了一种富马酸卢帕他定中 AIBN 的定量测定方法, 为 AIBN 的质量控制提供参考。

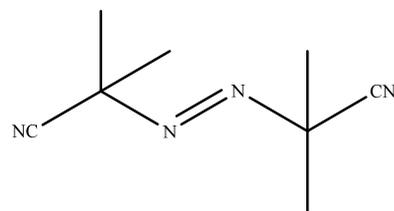


图 1 偶氮二异丁腈结构式

Fig. 1 Structural formula of azodiisobutyronitrile

作者简介: 牛明玉, 男, 博士, 工程师 Tel: 18262348309  
工程师 Tel: 15005267925 E-mail: hulina@yangzijiang.com

E-mail: niumingyu@yangzijiang.com \*通信作者: 胡丽娜, 女, 硕士,

## 1 仪器与试剂

Agilent 7697A-7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); XPE205DR 型电子天平(瑞士梅特勒托利多公司)。

富马酸卢帕他定原料药(扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司, 批号: 16092101, 17040801, 17041501, 17041901); AIBN 对照品(上海试四赫维化工有限公司, 批号: 14111101; 纯度: 100%); 甲醇(MERCK 公司, 色谱级)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

以 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷为固定液的 DB-624 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 1.4 μm) 为色谱柱, 以氦气为载气, 汽化温度 220 °C, 采用程序升温, 初始温度为 70 °C, 以 12 °C·min<sup>-1</sup> 升到 250 °C, 流速为 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 分流比 30:1, 进样量 1 μL。

### 2.2 质谱条件

采用电子轰击电离源(EI), 进样口温度 280 °C, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 扫描模式: SCAN 和 SIM 模式。

### 2.3 溶液配制

**2.3.1 对照品溶液** 精密量取 AIBN 对照品 15 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 1.5 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液** 取富马酸卢帕他定适量, 用甲醇超声溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 10 mg 卢帕他定的溶液, 作为供试品溶液。

### 2.4 目标离子的选择

取对照品溶液在  $m/z$  100~400 内进行全扫描, 由质谱数据可知, AIBN( $m/z$  165)在进样口受热分解脱去氮气产生  $m/z$  69(脱氮后氢重排)的异丁腈自由基, 电荷中心引发  $\beta$  断裂过程产生  $m/z$  54 和  $m/z$  41 的弱峰<sup>[5-6]</sup>, 故提取  $m/z$  69、 $m/z$  54 和  $m/z$  41 3 个离子进行检测, 因  $m/z$  69 分子离子峰强度高、干扰小、选择性及灵敏度最好, 因此作为定量分析离子, 按峰面积以外标法进行定量计算, 质谱图见图 2。

### 2.5 系统适用性试验

取 1.56 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 连续进样 6

次, 记录色谱图, 以 AIBN 峰面积计, 连续进样 6 次峰面积 RSD 为 0.45%。

### 2.6 专属性试验

分别取 15.49 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液和含富马酸卢帕他定 12.83 mg·mL<sup>-1</sup>、AIBN 1.55 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合溶液及空白溶液各 1 μL, 进样分析, 记录色谱图见图 3。结果显示, AIBN 的保留时间为 8.795 min, 空白溶剂和富马酸卢帕他定均不干扰 AIBN 检测。

### 2.7 定量限、检测限

取 1.56 μg·mL<sup>-1</sup> 的 AIBN 对照品溶液, 逐级稀释合适的倍数后进样测试, 采集 9.5~10.3 min 基线噪音值计算信噪比, 当信噪比约为 10:1 时的浓度即为定量限溶液, 继续稀释, 当信噪比约为 3:1 时的浓度即为检测限溶液, 结果显示 AIBN 的定量限为 0.15 μg·mL<sup>-1</sup> (RSD=2.96%,  $n=6$ ), 检测限为 0.045 μg·mL<sup>-1</sup>。

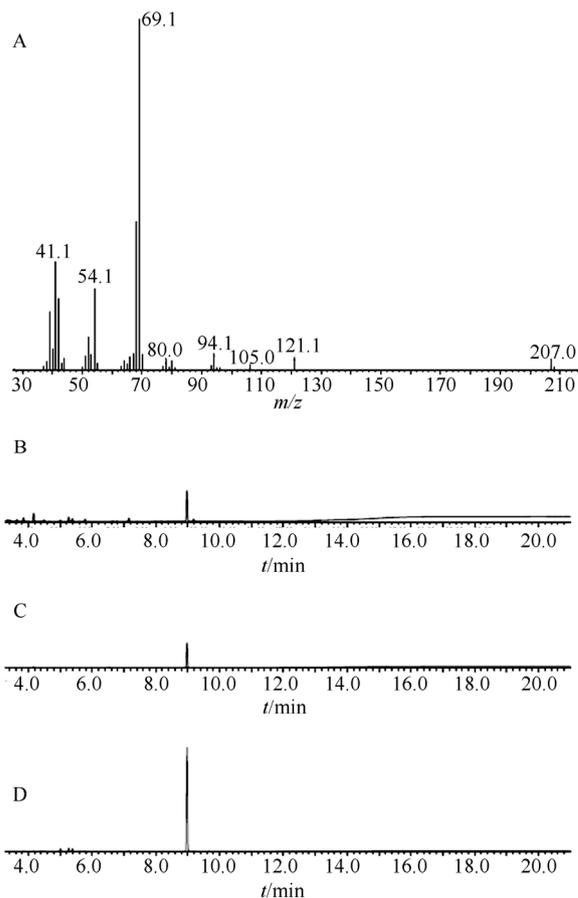


图 2 AIBN 的 MS 图

A-SCAN; B-SIM( $m/z$  41); C-SIM( $m/z$  54); D-SIM( $m/z$  69)。

Fig. 2 The mass spectrum of azodiisobutyronitrile

A-SCAN; B-SIM( $m/z$  41); C-SIM( $m/z$  54); D-SIM( $m/z$  69)。

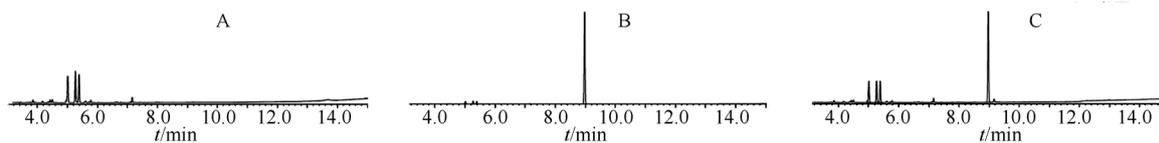


图3 专属性试验结果

A-空白溶液; B-AIBN 对照品溶液; C-混合溶液。

Fig. 3 Results of specificity tests

A-blank; B-AIBN standard solution; C-mixed solution.

## 2.8 线性关系考察

精密称取 31.03 mg AIBN 对照品, 逐级稀释成浓度为 0.155 2, 0.930 9, 1.241 2, 1.551 5, 2.327 3, 3.103  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液, 依法测定, 记录色谱图, 以 AIBN 的峰面积对浓度进行线性回归计算, 线性方程为  $y=70\ 852x-3\ 166.3(n=6)$ ,  $r^2=0.999\ 8$ 。结果表明 AIBN 浓度在 0.155 2~ 3.103  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

## 2.9 重复性试验

取本品约 256 mg(批号: 16092101), 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加少量甲醇超声溶解, 移取 2 mL AIBN 对照品溶液(浓度 15.20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 平行配制 6 份, 记录色谱图, 结果杂质 AIBN 的检出量为 1.53  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , RSD 为 0.31%。结果表明, 本方法具有良好的重复性。

## 2.10 回收率试验

称取富马酸卢帕他定约 256 mg, 共 9 份, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 分别加入浓度为 0.155 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LOQ)、1.551 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (100%)和 2.327 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (150%)的 AIBN 对照品溶液, 超声溶解并稀释至刻度, 作为低、中、高浓度水平的加样回收试验溶液, 每个浓度水平平行配制 3 份, 依法进样测定, 经计算低、中、高 3 种加入水平 AIBN 的加样回收率分别为 103.9%, 101.0%, 99.4%, RSD 分别为 0.03%, 0.11%和 0.08%。结果表明本方法回收率良好, 可准确检测出样品中残留的 AIBN。

## 2.11 稳定性试验

取 AIBN 对照品溶液, 于室温下放置 12 h, 每 2 h 取样检测, 记录色谱图; 取供试品溶液放置于室温下, 分别于 0, 1, 6, 8, 10, 12, 14 h

取样测定, 记录色谱图。结果显示, 对照品溶液在室温放置 12 h, 各时间点峰面积与 0 h 相比均在 95.0%~105.0%内, 表明对照品溶液在 12 h 内稳定; 供试品溶液在室温放置 14 h 后, 样品中 AIBN 检出量均在检测限以下, 无明显变化, 表明供试品在 14 h 内稳定。

## 2.12 耐用性试验

取供试品溶液和对照品溶液, 当色谱条件在升温速率 10~14  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 、初始柱温 65~75  $^{\circ}\text{C}$ 、离子源温度 220~250  $^{\circ}\text{C}$ 、流速 0.9~1.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、分流比 28:1~32:1 之间变动时, 供试品溶液 AIBN 均未检出, 色谱条件发生微小变化不影响 AIBN 的检测, 耐用性良好。

## 2.13 样品检测

取富马酸卢帕他定(批号: 17040801, 17041501, 17041901)适量, 用甲醇超声溶解并稀释成每 1 mL 中约含 10 mg 卢帕他定的溶液, 作为供试品溶液; 取 AIBN 约 15.30 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1.53  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 依法测定, 记录色谱图。按外标法以峰面计算本品中 AIBN 的含量。结果表明, 3 批富马酸卢帕他定供试品中均未检出 AIBN。

## 3 讨论

AIBN 是一种常用的含有氮氮双键的自由基引发剂, 引发的反应比较稳定, 故被应用于富马酸卢帕他定的生产中, 但因其结构中含有的氮氮双键是遗传毒性、致癌性杂质的警示结构。且本品主要用于治疗季节性过敏性鼻炎和常年性鼻炎, 服药周期较长, 故根据 EMEA 颁布的基因毒性杂质限度指导原则中毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)的方法,

用药周期按照>12个月计算,摄入量为 $1.5\ \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 的毒理阈值杂质的致癌风险小于十万分之一,该风险被认为是可接受的<sup>[7]</sup>。按照这个阈值,根据卢帕他定每天的摄入量为10 mg,可以计算出富马酸卢帕他定中允许的AIBN杂质限度为 $150\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,采用普通气相检测,该限度浓度的AIBN几乎无响应,而采用MS检测器,其检测灵敏度可达到 $0.045\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,灵敏度得到极大提高。考察耐用性时发现,当离子源温度在220~250 °C内变化时,AIBN的响应值随温度的升高略有增强,但样品中AIBN的检测结果基本一致,且检测所用色谱柱的最高使用温度为不得>260 °C。故综合考虑离子源及色谱柱的最佳使用状态,确定离子源温度为230 °C较为合理。经验证,本方法能够对富马酸卢帕他定原料药中残留的潜在基因毒性杂质AIBN进行有效控制,方法专属性强、灵敏度高,满足杂质定量测定要求,可作为富马酸卢帕他定中杂质AIBN的质量控制方法。

## REFERENCES

- [1] MANUEL M, MARTA G, DOLORS B, et al. Rupatadine, a new potent, orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor (PAF) [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 280(1): 114-121.
- [2] EP 9.3 [S]. 2018: 4987-4988.
- [3] MA L, MA Y N, CHEN Z, et al. Structural alerts of genotoxic impurities [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2014, 23(18): 2106-2111.
- [4] WANG P, XU C H, CHEN X, et al. Development of genotoxic impurities control in active pharmaceutical ingredient [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(1): 119-126.
- [5] LI Y P, NI J H. The CI-CAD mass spectrometric decomposition press of azodiisobutyronitrile [J]. *J Chin Mass Spec Soc(质谱学报)*, 1999, 20(2): 23-27.
- [6] MA C X, GONG L B, WEN L M, et al. Quantitative analysis method for low content of azobisisobutyronitrile by gas chromatography [J]. *Sci Technol Chem Indust(化工科技)*, 2015, 23(3): 66-68.
- [7] European Medicines Agency. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [S]. 2006: 1-8.

收稿日期: 2018-04-16

(本文责编: 曹粤锋)