低浓度肾上腺素注射液中微量未知杂质的发现与探究

李 想[1,2], 孟 雅[2], 谭晓川[2], 张宇佳[2], 山广志[3], 王旭东[4], 刘洪卓[1*], 郑稳生[2*]

(1. 沈阳药科大学无涯创新学院, 辽宁 沈阳 110000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院, 药物研究所, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 中国医学科学院北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 北京 100050; 4. 武汉久安药物研究院有限公司, 湖北 武汉 100730)

摘要: 在低浓度肾上腺素注射液开发研究中新发现了两个未见报道的微量杂质 (分别命名为杂质H、杂质M), 其含量低、稳定性差、分离困难等使分析鉴定的挑战极大。对于保留时间短、分离度差、含量低、稳定性差的杂质H, 采用2DLC-MS/MS柱切换技术在线分离、脱盐与采用质谱结构鉴定; 对于分离度、稳定性较好的杂质M通过富集、浓缩的方法分离制备, 通过LC-HRMS、NMR等技术进行结构鉴定, 从而获得更丰富的结构信息。杂质H在一维和二维色谱中分别实现了良好分离、脱盐及在线切割, 并通过多级质谱数据分析鉴定了其可能的结构。另外成功富集、浓缩了杂质M, 并通过LC-HRMS分子质量及碎片信息及NMR数据等确证了杂质M的结构。两个研究对比了2DLC-MS/MS柱切换技术与传统的杂质浓缩鉴定技术, 为复杂基质样品中微量杂质的分析鉴别提供了思路, 同时也为低浓度肾上腺素注射液中微量杂质的质量控制提供了有效的方法。

关键词: 肾上腺素注射液; 微量杂质; 结构鉴定; 2DLC-MS/MS; 毒性评估

中图分类号: R944 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0569-08

Discovery and exploration of trace unknown impurities in low concentration epinephrine injections

LI Xiang[1,2], MENG Ya[2], TAN Xiao-chuan[2], ZHANG Yu-jia[2], SHAN Guang-zhi[3], WANG Xu-dong[4], LIU Hong-zhuo[1*], ZHENG Wen-sheng[2*]

(*1. Wuya College of Innovation, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China; 2. Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 4. Wuhan Jiuan Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Wuhan 100730, China*)

Abstract: During the development and analysis of low-concentration epinephrine injections, two unreported trace impurities (impurity H and impurity M) have been newly identified. Their analysis and identification were particularly difficult due to their low content, poor stability, and difficult separation in some cases. For impurity H with short retentiontime, poor separation, low content and poor stability, a two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2DLC-MS/MS) with column switching technique was employed. This enabled on-line separation, desalination and structure characterization. In contrast, impurity M which exhibits better separability and stability, was isolated and prepared through enrichment and concentration processes. Its structure was then identified using techniques such as liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and NMR, enabling the acquisition of more comprehensive structural information. Experimental results showed that

收稿日期: 2025-09-30; 修回日期: 2025-11-14.

基金项目: “十三五”国家重大新药创制重大专项 (2018ZX09721003-008-018).

*通讯作者 E-mail: liuhongzhuo@syphu.edu.cn; zhengwensheng@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1172

impurity H achieved effective separation in the first-dimensional chromatography and successful on-line desalination and fraction cutting in the second-dimensional chromatography. Its potential chemical structure was deduced through multi-stage mass spectrometry data analysis. For impurity M, efficient enrichment and concentration were accomplished; its structure was further confirmed by combining molecular weight and fragment information from LC-HRMS with spectral data from NMR. This study compared the performance of 2DLC-MS/MS with column switching technology with the traditional impurity concentration and identification technology. The experimental results not only provide a valuable strategy for analyzing and identifying trace impurities in complex matrix samples, but also offer an effective analytical tool for the quality control of trace impurities in low concentration epinephrine injections.

Key words: epinephrine injection; trace impurity; structure identification; 2DLC-MS/MS; toxicity assessment

药品全生命周期中杂质的研究与控制非常重要[1]。杂质的存在会降低药品纯度, 给患者带来安全风险[2]。杂质可能有很多来源: 原料药 (active pharmaceutical ingredients, API)、辅料来源的杂质, 工艺中产生的杂质 (如残留溶剂、残留试剂或残留金属)、降解杂质等等[3-5]。对杂质的结构进行鉴定确证, 对其来源进行归属, 有利于产品质量的提高。

肾上腺素 (epinephrine, 图 1) 属于儿茶酚胺类药物, 易被氧化, 暴露于光和空气中时易产生降解[6]。区别于已上市的 1 mg·mL^{-1} 肾上腺素注射液, 用于儿童的 0.1 mg·mL^{-1} 规格的肾上腺素注射液, 主药的浓度低, 其杂质浓度更低, 且有研究表明低浓度肾上腺素注射液较高浓度肾上腺素注射液降解更快[7], 这对于有关物质控制提出了更高的挑战。

本品开发研究中对已经报道的杂质 (表 1) 包括肾上腺素杂质 F (肾上腺素磺化物)、杂质 B (去甲肾上腺素)、杂质 C (肾上腺酮) 等进行控制。但在长期稳定性研究中关注到两个缓慢增长的未见报道过的新未知杂质, 分别命名为杂质 H 及杂质 M。两个杂质都属于微量杂质, 但由于结构未知还是具有一定的安全性风险, 为保证药物的安全性, 也有必要对其进行鉴定并根据结果制定相应的控制策略[8]。

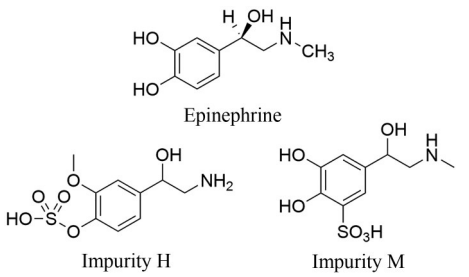
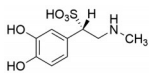
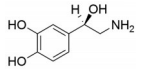
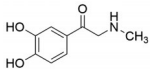
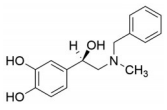
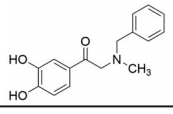


Figure 1 Structure of epinephrine, impurity H, and impurity M

杂质 H 含量约 0.4%, 绝对量低, 属于微量杂质, 同时其稳定性差, 在脱离制剂环境后会转换消失; 而且该杂质 H 在有关物质方法下保留时间靠前, 与已知的杂质 F 分离较差难以制备纯化。二维柱切换技术具有在线组分切割优势, 将二维液相色谱与质谱技术联用能够同时发挥二者的优势, 被广泛应用于药物分析领域[9-12]。因此, 作者通过中心切割−二维柱切换技术将组分有效分离, 并采用 2DLC-MS/MS 联用技术简便、有效地对杂质 H 进行了分离和结构鉴定。

Table 1 Summary of specific impurities in epinephrine injection. API: Active pharmaceutical ingredient

Known specific impurity	Structure	Source	Recorded in Pharmacopoeia
F		Reaction product of API and sodium pyrosulfite	Chinese Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia
B		By-products in the synthesis process of API	Chinese Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia
C		By-products in the synthesis process of API	Chinese Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia
D		Intermediates for the synthesis of API	British Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia
E		The starting material for the synthesis of API	British Pharmacopoeia, United States Pharmacopeia

另外一种未报道的杂质M含量约0.6%, 相对易分离纯化, 尝试摸索其最适增长条件, 制备高浓度杂质M溶液, 并通过制备液相收集、浓缩, 成功制备了其对照品溶液, 并通过LC-HRMS及NMR进行分析, 鉴定其结构。

材料与方法

仪器　双三元高效液相色谱仪、质谱仪 (Thermo UltiMate-3000、Thermo LTQ Orbitrap XL, 赛默飞世尔科技有限公司); 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪 (Bruker AVANCE NEO 600, 布鲁克公司); 电子分析天平 (Mettler Toledo ME204)、pH计 (Mettler Toledo Seven Easy) 购自瑞士梅特勒-托利多公司; 纯水仪 (Milli-Q Integral, 美国Millipore公司)。

试药　肾上腺素注射液 (23082211, 规格为0.1 mg·mL^{-1})、肾上腺素磺化物 (杂质F) 对照品 (1020-RD-0030) 购自广州佳途科技股份有限公司; 磷酸二氢钾 (D2314399, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 辛烷磺酸钠 (D2371456, 北京伊诺凯科技有限公司); 磷酸、甲酸 (20240709、20230227, 北京市通广精细化工公司); 乙腈 (LNA0Y02, 北京百灵威科技有限公司); 水为超纯水 (电导率为0.09 μs·cm^{-1})。

测定杂质H

一维色谱条件　考察不同色谱柱对此杂质的分离情况, 色谱条件优化后, 可以将杂质H保留时间延后, 同时使其与肾上腺素磺化物分离度提高, 专属性增强。优化后色谱条件如下, 色谱柱: CAPCELL PKA C18 4.6 mm × 250 mm, 5 μm (填料: 高纯度硅胶基质); 流动相: 取5.0 g磷酸二氢钾和1.5 g辛烷磺酸钠, 加水1 000 mL, 用磷酸调节pH值至2.8为流动相A, 以乙腈∶流动相A (45∶55) 为流动相B; 梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0～15 min, 100% A; 25 min, 40% A; 25 min～35 min, 40% A; 45 min, 100% A; 45～70 min, 100% A; 检测波长为210 nm; 流速: 0.5 mL·min^{-1}, 柱温为25 ℃; 进样体积20 μL。

二维色谱条件　一维色谱条件流动相中含有磷酸二氢钾及离子对试剂辛烷磺酸钠, 属于不挥发性盐类。离子对试剂质谱响应强且信号经久不衰, 持续抑制目标化合物的电离, 其具有较强的疏水性, 在普通C18色谱柱上吸附较强, 常规梯度洗脱拖尾显著, 因此不易被常规二维反相色谱系统在线脱盐去除。二维在线分析使用的SCX色谱柱, 表面键合了磺酸基团, 其对阳离子有离子交换作用, 对阴离子有离子排斥作用, 可用于辛烷磺酸基、磷酸根较快洗脱, 并将目标杂质峰分离。可通过柱切换将离子对等导入废液后, 目标峰进入质谱仪。色谱柱: CAPCELL PKA SCX 250 mm × 4.6 mm, 5 μm (采用在多孔球形硅胶填料表面包覆单层有机硅聚合物薄膜, 并在其表面键合离子交换基团的高性能填料填充而成的一款聚合物包被型强阳离子交换色谱柱, 该填料既具有硅胶类填料的高分离性能和耐压性, 又具有聚合物填料的耐久性); 流动相A (水), 流动相B (乙腈), 等度洗脱 (A∶B = 45∶55); 检测波长210 nm; 流速每分钟0.5 mL, 柱温为室温; 进样体积20 μL, 运行时间: 25 min。

质谱条件　采用ESI电喷雾离子源, 正负离子模式采集, 鞘气流速为30 arb, 辅助气流速为10 arb, 吹扫气流速为0 arb, 电喷雾电压为4 500 V; 加热毛细管温度为400 ℃; 高分辨数据采集分辨率15 000, 其中正离子模式毛细管电压为13 V; Tube Lens为50 V; 负离子模式毛细管电压为−9 V; Tube Lens为−35 V; 全扫描模式 (Full Scan), 扫描范围为*m*/*z* 50～2 000; 二级离子采用数据依赖性扫描, 碰撞诱导解离 (collision-induced dissociation, CID) 数据采集, CID归一化能量35%。

实验过程　柱切换-质谱分析技术是通过二维色谱分析技术实现, 该分析系统由2台色谱泵通过接入2个六通阀连接构成 (图2)。实验步骤概括如下: ① 切换阀1和切换阀2置于位置A, 样品组分由进样器与泵1流动相进行通过色谱柱1 (分析柱) 一维UV数据采集, 阀位置在位置B, 目标组分转移至Loop环中; ② 六通阀再次切回位置A, 目标组分转移至色谱柱2脱盐后进行质谱分析, 脱盐结束后, 切换阀2从位置A切换至位置B, 切换阀1保持在位置A, 此时保留在色谱柱2中的目标杂质由泵2被送至质谱仪采集质谱数据。

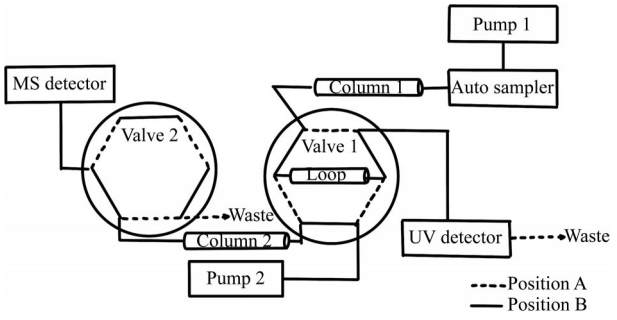


Figure 2　Column switching 2DLC-MS analysis system diagram

测定杂质M

制备方法　取肾上腺素原料、焦亚硫酸钠及其他辅料适量, 加水溶解并调pH, 50 ℃水浴, 后续持续搅拌至较高的杂质浓度。

质谱条件　以0.1%甲酸水溶液为流动相A, 乙腈为流动相B, 采用ESI电喷雾离子源, 正离子模式采集, 鞘气流速为60 arb, 辅助气流速为20 arb, 吹扫气流速

为0 arb, 电喷雾电压为3 500 V; 加热毛细管温度为350 ℃; 高分辨数据采集分辨率35 000; 全扫描模式(Full Scan), 扫描范围为*m*/*z* 100～1 500。

结果

1　杂质H

1.1　色谱分析　采用一维色谱分析条件, 确定LC-MS解析的杂质为保留时间等于6.692 min的色谱峰, 该峰标记为杂质H (图3A, 为提高杂质H质谱检测灵敏度, 一维进样体积调整为100 μL)。实验结果如图3B、C所示, 柱切换之后, 在二维分离柱上杂质H峰与离子对试剂峰分离良好, 实现了离子对试剂的在线去除, 有效降低质谱中离子对试剂对杂质H的干扰。

1.2　质谱　在杂质H分离鉴定中, 使用在线二维液相−质谱联用技术, 采用ESI-MS与ESI-MSn相结合的手段, 在线脱除分析流动相中盐类等不挥发性组分, 对杂质H进行柱切换质谱采集分析, 并结合源内碰撞诱导解离技术, 通过碎片信息及相关的处方组成、辅料等信息, 进一步对有关物质的结构信息进行解析。通过LC-MS/MS方法, 对杂质H峰进行质谱分析, 如图4A、B所示: 结合正离子模式下高分辨质谱数据*m*/*z* 264.052 92 ($C_9H_{14}NO_6S$ $[M+H]^+$, 偏差值−2.70 ppm), 推测可能的元素组成为C、H、N、O、S, 根据色谱保留行为和二级碎片信息 (*m*/*z* 182.00/246.18), 并结合肾上腺素结构及杂质光谱信息, 推断杂质H为$C_9H_{14}NO_6S$, 可能的结构如图1所示, 裂解途径如图4C所示。

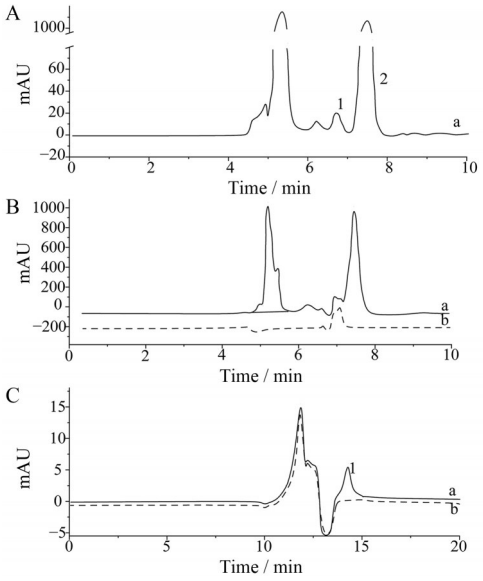


Figure 3　Chromatogram of impurity H. A: Retention time of high performance liquid chromatography (HPLC); B: One-dimensional HPLC; C: 2DHPLC. 1: Impurity H; 2: Impurity F; a: Test solution; b: Blank solution

2　杂质M

2.1　制备　取该破坏样品, 在制备液相上使用0.1%

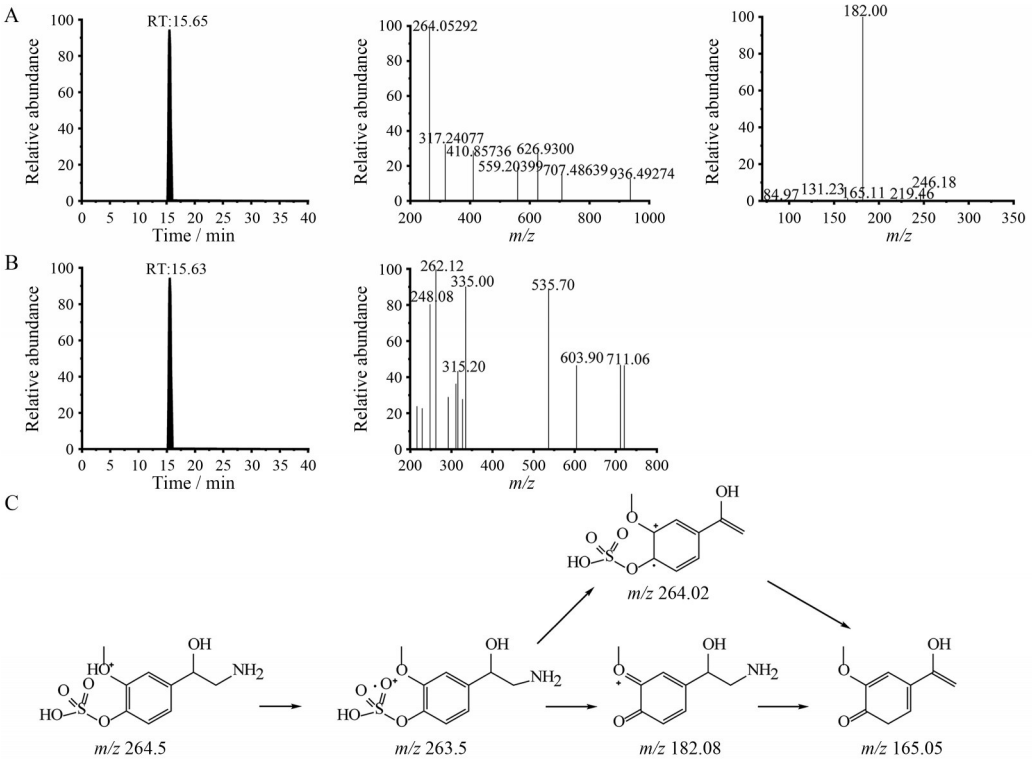


Figure 4　Related pictures of impurity H. A: Ion chromatogram and mass spectrum under 2DLC-MS/MS (ESI^+); B: Ion chromatogram and mass spectrum under 2DLC-MS/MS (ESI^-); C: Possible fragmentation pathway in the mass spectrometry

TFA-ACN流动相体系, 进行反相色谱制备, 收集目标物组分, 冻干。高效液相法检测其纯度为98.11%, 高效液相图如图5A所示。采用定量核磁法标定杂质浓度, 马来酸作为内标物, 用D_2O稀释后测定量核磁, 最后通过定量核磁计算其含量为90.38%。

2.2　质谱　样品采用电喷雾 (heated electrospray ionization, HESI) 进行质谱分析, 在正离子模式下进行一级MS全扫描, 得其准分子离子峰$[M+H]^+$为*m/z* 264.11, 计算其分子式为$C_9H_{13}NO_6S$ ($[M+H]^+$理论值: *m/z* 264.05)。得到的碎片离子有*m/z* 245.97、168.85等, 质谱图及碎片离子峰的可能裂解途径分别如图5B、C所示。

2.3　^{1}H NMR　^{1}H NMR结果如图5D所示, 样品的氢谱数据归属如下, δ_H: 7.30 (s, 1H), 7.10 (d, 2H), 5.7 (m, 1H), 3.1 (m, 2H), 2.69 (s, 3H)。基于NMR数据, 结合LC-HRMS分析提供的分子质量及碎片信息, 可确证杂质M样品的结构 (图1), 分子式为$C_9H_{13}NO_6S$, 分子质量为263.11。

讨论

杂质H ($C_9H_{14}NO_6S$)、F ($C_9H_{13}NO_5S$)、M ($C_9H_{13}NO_6S$)的相对保留时间分别约为0.096、0.102、0.140, 3个杂质保留时间相近 (图6), 两个未知杂质在有关物质图谱中分别位于杂质F两侧, 这也间接性说明杂质H与杂质M的基础结构与杂质F相似性的可能。

杂质H与已知杂质F ($C_9H_{13}NO_5S$) 紧邻, 根据鉴定

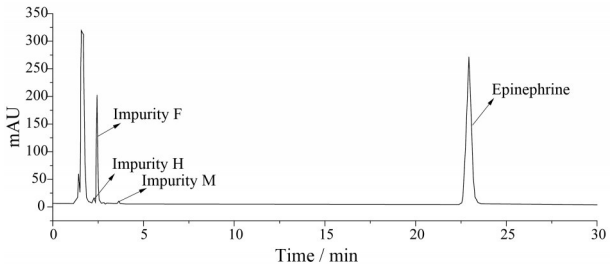


Figure 6　HPLC chromatogram of impurities in epinephrine injection

的杂质H的结构来看, 其与杂质F有很大的相关性。低浓度的肾上腺素注射液中使用了焦亚硫酸钠作为抗氧剂来增加其稳定性, 抑制本品的氧化降解速度, 但肾上腺素可与亚硫酸氢根离子 (源于偏亚硫酸氢盐) 反应, 主要生成磺酸衍生物, 即1-(3,4-二羟基苯基)-2-(甲氨基)乙磺酸 (肾上腺素磺化物)。通过杂质H鉴定得到的可能结构推断, 其很有可能是此反应产生的微量副产物 (即肾上腺素与焦亚硫酸钠反应所产生), 反应机制如图7A所示。同时也有可能是杂质F进一步反应使官能团或原子在分子内发生迁移、重排从而生成微量的杂质H。

杂质H的含量同样与焦亚硫酸钠有关, 焦亚硫酸钠的结构中包含杂质H构成所需的硫氧键, 同时数据显示其含量与焦亚硫酸钠的含量成正比, 单独对原料药及焦亚硫酸钠进行强降解处理, 则无杂质H生成 (图7B)。从杂质H的裂解途径来看H^+会影响其结构

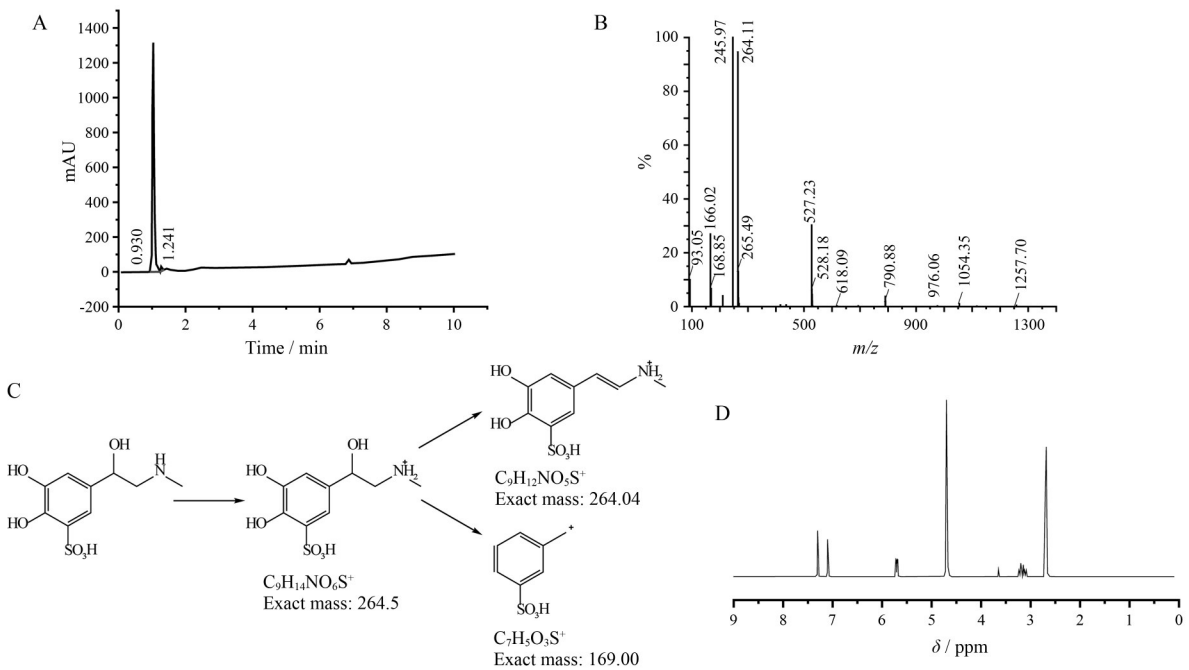


Figure 5　Related pictures of impurity M. A: Retention time of HPLC chromatogram; B: Mass spectrum; C: Possible fragmentation pathway in the mass spectrometry; D: Hydrogen spectrum

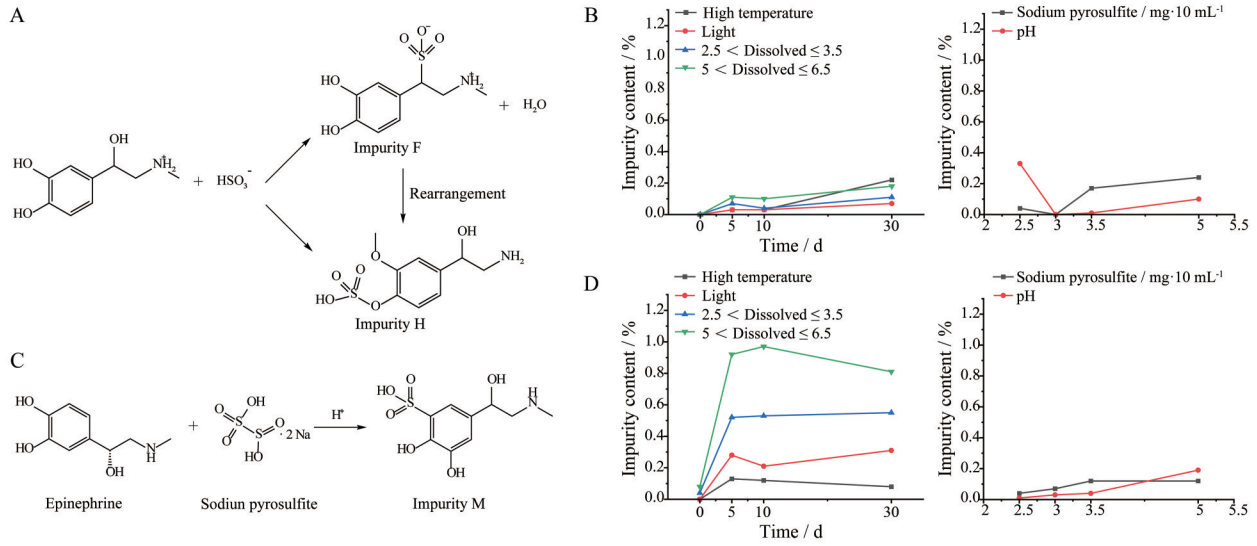


Figure 7 The formation mechanism of impurities and the change trend of impurity content under different factors. A: The formation mechanism of impurity H; B: The influence of different factors on the content of impurity H (n = 2; Lot number: 20231211, 20231215, 20231217); C: The formation mechanism of impurity M; D: The influence of different factors on the content of impurity M (n = 2; Lot number: 20231211, 20231215, 20231217)

的存在形式, 根据已有数据分析也可以发现, 作为缓冲剂的无水枸橼酸及枸橼酸钠的比例也会对其含量产生影响。相同条件下, pH 2.5时, 其含量最高, pH 3.0时未检出杂质H, 继续增加pH后其含量又会有小幅度的增加 (图7B)。杂质H主要来源于制剂辅料中焦亚硫酸钠或者已知杂质F, 而杂质F是肾上腺素原料药与焦亚硫酸钠反应的主要产物。基于此设计合适的杂质H的控制策略: 首先, 杂质F与高温有关, 且根据已知数据可知高温对杂质H的含量有影响, 随着高温放置时间的延长其增长速率也会有所增加, 光照对其也会有影响, 但较高温影响较小 (图7B)。因此本品应尽量在避光温度适宜的条件下储存; 其次, 抗氧剂焦亚硫酸钠可以起到拮抗氧化作用, 在低浓度肾上腺素注射液中必不可少, 但其加入量和杂质F与杂质H的生成量呈正相关关系, 因此在产品开发和验证阶段可以通过处方优化平衡这一矛盾, 在满足其抗氧作用的同时较参比制剂降低了焦亚硫酸钠的加入量, 可以明显减少杂质F与杂质H的产生。再则, pH值对肾上腺素制剂的稳定性有显著影响, pH值增大, 肾上腺素与抗氧剂的磺化反应速度加快, 杂质F又明显增加, pH在3～3.3范围内杂质H的含量控制较好。因此可以在产品开发和验证阶段平衡产品的pH变化, 来控制杂质F和杂质H的生成。另外, 在产品开发中对各辅料 (尤其是焦亚硫酸钠) 制定相应的质量标准, 在产品研究过程中根据产品稳定性数据等及时更新完善标准。

杂质M同样与杂质F相邻, 位于杂质F保留时间之后。鉴定结构在分子式上看, 与杂质F分子相差一个氧原子, 与杂质H仅相差一个氢原子。杂质M与杂质H的区别主要在于甲基、磺酸基与氢原子的连接位置不同, 这也致使两个结构的化学性质和稳定性是不一样的。杂质H甲基连接在氮原子上, 氮原子的电负性比碳原子更强, 使得甲基上的电子云密度降低程度更大, 这使得其更易发生某些特定反应, 进而导致结构稳定性变差, 这也与两个杂质表现出的性质一致, 杂质M较杂质H更稳定一些。即使这样, 杂质M在某些特定的强制条件下, 例如高温、强酸或强碱环境, 化学键也可能会发生断裂。杂质H的磺酸基连接在苯氧基上, 而杂质M的磺酸基直接连接在苯环上, 最明显的影响则是两者的酸性, 杂质M的酸性可能会更强一些。苯氧基本身是给电子基团, 会削弱磺酸基的吸电子效应, 因此苯氧基上的磺酸基对苯环的钝化作用会弱一些, 进而说明杂质M相较于杂质H的化学稳定性会更强一些。杂质M的生成与肾上腺素和焦亚硫酸钠有很大的关系, 反应机制如图7C所示, 其比例会影响其含量, 焦亚硫酸钠含量越高, 其杂质含量也会相对高一些; 且其生成离不开酸性条件, pH值的不同对杂质M含量也会有影响 (图7D)。同时统计稳定性数据可知杂质M的含量在光照条件下较高温条件增长速度更快 (图7D)。从数据上看, 不同于杂质H, 溶解氧的浓度会对杂质M有更明显的影响 (图7D)。基于此, 杂质M的控制策略同杂质H一样, 应在避光及适宜的温度下存储; 同时也要在处方考察过程中, 平衡考虑各

因素对制剂的稳定性影响的前提下, 对焦亚硫酸钠及缓冲对的量进行控制, 选择最适用于本品的处方; 根据溶解氧对杂质M的影响, 再结合肾上腺素本身的邻苯二酚结构易被氧化的性质, 在灌封工艺上要对溶解氧进行严格控制。

根据基因毒性杂质ICH M7指导原则, 杂质H、杂质M的结构中不含基因毒性杂质警示结构。通过Derek Nexus、Sarah Nexus软件分析评估结果为3类。在未进行致突变试验的情况下, 直接按2类进行评估及限度计算。本品的治疗期小于1个月, 根据2类杂质的单个杂质的可接受摄入量为120 μg·d^{-1}, 结合本品说明书最大用量经计算为9支。计算得出杂质H、M控制在1.3%以内是可接受的, 因此依据对于已知最大日服用剂量已知的药物限度应控制在0.5%的原则, 将两个杂质的限度拟定按不超过0.5%进行控制。

随着表面多孔填料技术的革新, 先进色谱仪器的发展、检测灵敏度的提高, 越来越多的“老药”中未报道过的新杂质等安全隐患被发现, 解开了很多药品杂质引起的安全性谜团。肾上腺素是抢救心脏骤停和过敏性休克等疾病的危重患者的救命药, 其质量控制水平关乎患者安危。本研究在低浓度肾上腺素注射液开发研究中发现了两个未见报道的微量新杂质, 并且通过两种方式鉴别了其结构, 进一步分析讨论了杂质产生的化学反应机制, 为各种肾上腺素制剂杂质控制提供了参考, 为药品的全生命周期质量提升与用药安全提供了更多的保障。

首先, 利用二维液相色谱–质谱联用技术, 采用ESI-MS与ESI-MSn相结合的手段, 在线脱除分析流动相中盐类等不挥发性组分, 对杂质H进行柱切换质谱采集分析, 并结合源内碰撞诱导解离技术, 通过碎片信息、肾上腺素注射液处方组成及邻近杂质F的结构进一步对杂质H的结构信息进行解析, 鉴定了其可能结构, 并且分析出新鉴定的未知杂质H与焦亚硫酸钠和杂质F有较大关联性。二维色谱或者多维色谱可以解决常规色谱中峰容量低导致的分离度不足及稳定性差样品无法分离制备等问题, 在线脱盐技术可以解决复杂体系中不挥发性盐的干扰等问题进而实现利用质谱高灵敏度对杂质的直接鉴别研究, 这些已成为复杂样品分离分析的一种非常有效的工具。应用在线二维液相–质谱联用技术, 该方法简便、灵敏, 有效地解决了微量不稳定杂质难以富集及含不挥发性盐流动相的色谱体系不适用于质谱直接检测并鉴定杂质的难题。

另外, 杂质M的分离度较高, 本课题组根据杂质性质摸索其产生条件, 制备其高浓度杂质溶液, 采用传统杂质分离技术对强制降解样品中的杂质进行富集, 基于此通过LC-HRMS及NMR进行分析, 鉴定了其结构。该方法相对于二维色谱在线技术在样品性质、色谱方法等方面的限制较多, 也有方法建立困难、制备时间较长等缺点, 但是由于得到了其高浓度样品可以进一步获得更多种仪器分析数据等, 能够对杂质结构做出更准确的解析。

传统的杂质富集技术通常采用结晶、萃取、制备色谱等方法, 借助物理或化学手段实现杂质的分离或富集。然而, 这种方法对杂质的结构、性质、分离度、稳定性都要求较高。而且对未知杂质更为重要的是要反复地、多方法地验证未知杂质或色谱中的目标峰与分离化合物是同物质, 有时甚至会落入自证循环。因此, 更适合用于对已知杂质的分离与纯化。例如, 在药物生产过程中, 可用于制备杂质对照品。

与之相比, 2DLC-MS/MS技术在效率、灵敏度和定性能力等方面优势显著。当分离基质复杂的样品时, 通常需要使用与质谱仪不兼容的流动相, 如磷酸盐缓冲液或离子对试剂。而2DLC-MS/MS通过在线脱盐并结合柱切换技术, 成功解决了这一难题。此外, 它能够在一针进样的过程中同时处理多个目标峰, 结合质谱高灵敏度的特性, 实现了对微量杂质的精准定性和定量分析。该技术可应用于多肽、蛋白质、核苷酸等生物大分子药物中杂质的分析, 以及中药、天然产物中活性成分及相关杂质的研究。

综合杂质H和M两个新杂质的结构鉴定研究过程, 2DLC-MS/MS柱切换技术与传统的杂质制备鉴定技术各具特点, 为复杂基质样品中微量杂质的分析鉴别提供了思路, 获得的结构信息结合处方组成及稳定性数据为相关的肾上腺素注射液产品的杂质控制、工艺优化等提供了有效方法。

作者贡献: 李想负责部分实验、杂质数据统计和文章的撰写及修改工作; 孟雅负责实验指导; 谭晓川、张宇佳负责文章的思路指导及审阅; 山广志、王旭东负责质谱氢谱的相关实验及结果统计; 刘洪卓、郑稳生教授负责最终定稿工作。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Vinod K, Vasudha B, Aravind M, et al. Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: a critical review of current biotechnological approaches [J]. Bioengineered, 2022, 13: 4309-4327.

[2] Szekely G, Amores de Sousa MC, Gil M, et al. Genotoxic impurities in pharmaceutical manufacturing: sources, regulations, and mitigation [J]. Chem Rev, 2015, 115: 8182-8229.

[3] Wang SM, Song Y, Chen L. Risk management and assessment of elemental impurities for pharmaceutical excipients based on ICH

guidelines [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2025, 49: 91-99.

[4] Oliveira DRSM, Maurício H, Dâmaris S, et al. Advice on degradation products in pharmaceuticals: a toxicological evaluation [J]. PDA J Pharmaceutical Sci Technol, 2014, 68: 221-238.

[5] Liana A, Hałuszczuk A, Gawor A, et al. Identification and structural characterization of degradation products of linagliptin by mass spectrometry techniques [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 2591.

[6] Hoellein L, Holzgrabe U. Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions [J]. Int J Pharm, 2012, 434: 468-480.

[7] Parish GH, Bowser SC, Morton RJ, et al. A systematic review of epinephrine degradation with exposure to excessive heat or cold [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2016, 117: 79-87.

[8] Cok I, Emerce E. Overview of impurities in pharmaceuticals: toxicological aspects [J]. Asian Chem Lett, 2012, 16: 87-97.

[9] Kula M, Głód D, Krauze-Baranowska M. Two-dimensional liquid chromatography (LC) of phenolic compounds from the shoots of *Rubus idaeus* ′glen ample′ cultivar variety [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 121: 99-106.

[10] Iguiniz M, Heinisch S. Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects, trends and applications [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145: 482-503.

[11] Jiang YF, Zhao XJ, Shan GZ. Development and application of valve interface technology in two-dimensional liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab (分析试验室), 2023, 42: 1127-1136.

[12] Ye CX, Huang WJ, Qin SY, et al. Application progress of 2D-LC in analysis and quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chem Reagents (化学试剂), 2022, 44: 1103-1110.