UPLC-MS/MS 法测定依托度酸中的基因毒性杂质 2- 乙基苯肼

孙建合[1]，侯继鹏[1]，时晓燕[2]，冯　中[2]，张贵民[1]*
（1. 鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400；
2. 中山大学药学院（深圳），广东深圳 518107）

摘要：建立了超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定依托度酸（**1**）中的基因毒性杂质 2- 乙基苯肼（**2**）。色谱柱采用 ACQUITY HSS T_3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以 0.1% 甲酸为流动相 A，含 0.1% 甲酸的乙腈为流动相 B，梯度洗脱。采用电喷雾电离源（ESI），正离子模式采集，选择反应监测模式（SRM）。选择 *m*/*z* 137.14→108.13 为定性离子对，*m*/*z* 137.14→120.05 为定量离子对。结果显示，**2** 在 12.25 ～ 122.5 pg/ml 内线性关系良好，检测限和定量限分别为 3.68、12.25 pg/ml。平均回收率（*n*=9）为 85.46%，RSD 为 3.56%，可为 **1** 中 **2** 的测定提供参考。

关键词：依托度酸；基因毒性杂质；2- 乙基苯肼；超高效液相色谱 - 串联质谱
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)04-0564-03
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.020

Determination of the Genotoxic Impurity 2-Ethylphenyl Hydrazine in Etodolac by UPLC-MS/MS

SUN Jianhe[1], HOU Jipeng[1], SHI Xiaoyan[2], FENG Zhong[2], ZHANG Guimin[1]*
(*1. National Engineering Research Center of Chiral Drugs, Lunan Pharmaceutical Group, Linyi 273400;
2. School of Pharmaceutical Science (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107*)

ABSTRACT: A UPLC-MS/MS method was established for the determination of the genotoxic impurity 2-ethylphenyl hydrazine (**2**) in etodolac (**1**). The ACQUITY HSS T_3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with 0.1% formic acid as mobile phase A, and acetonitrile containing 0.1% formic acid as mobile phase B. Electron spray ionization (ESI), positive ion mode acquisition and selective reaction monitoring (SRM) mode was used. The *m*/*z* 137.14→108.13 was selected as qualifier transition, and *m*/*z* 137.14→120.05 was selected as quantifier transition. The results showed that it was linear for **2** in the range of 12.25 − 122.5 pg/ml, and the LOD and LOQ were 3.68 and 12.25 pg/ml, respectively. The average recovery (*n*=9) was 85.46%, with the RSD of 3.56%, which could provide a reference for the determination of **2** in **1**.

Key Words: etodolac; genotoxic impurity; 2-ethylphenyl hydrazine; UPLC-MS/MS

依托度酸（etodolac，**1**，结构式见图 1）为新一代环氧化酶 -2 高选择性非甾体抗炎药物，主要通过抑制环氧化酶的活性，减少前列腺素 E_2 的生成，从而控制炎症和减轻疼痛，临床上广泛应用于治疗术后疼痛，缓解类风湿性关节炎和骨关节炎的症状，延缓关节炎所引起的骨病理改变[1—3]。

1 的起始物 7- 乙基色醇的合成过程中会引入工艺杂质 2- 乙基苯肼（2-ethylphenyl hydrazine，**2**，结构式见图 1），其结构中含有基因毒性警示结构肼基团[4]，且 **2** 可能会被带入终产品中[5—6]，从而影响 **1** 产品的质量。根据人用药品技术要求国际协调理事会（The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use，ICH）M7 中关于遗传毒性杂质限度

收稿日期：2021-09-24
作者简介：孙建合（1975—），男，高级工程师，从事药物质量研究。
通信作者：张贵民（1969—），男，研究员，从事新药的研究与开发。
E-mail：lunanzhangguimin@163.com

要求[7]，保守控制基因毒性杂质毒理学关注阈值（TTC）为每天 1.5 μg，而 **1** 的每日最大给药剂量为 1.2 g，故 **2** 的限度须≤ 1.25×10^{-6}。

目前，关于 **2** 的分析方法研究仍较少，仅有研究建立了 HPLC 法测定 **2**[6]，但是因 **2** 的限度较低，HPLC 法抗干扰能力差，分析时间较长，无法一次完成定性定量检测，易出现假阳性结果。本研究建立了超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定 **1** 原料药中的基因毒性杂质 **2**，可最大程度地排除基质干扰，同时实现定性定量，大幅提高结果准确度并缩短了检测时间，以期为 **1** 的质量控制提供参考。

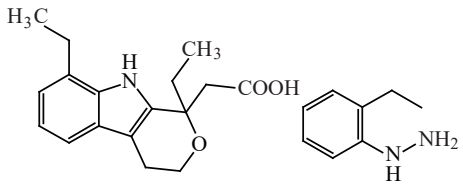


图 1　1 和 2 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1** and **2**

1　仪器与试药

Vanquish TSQ Altis 型超高效液相色谱 - 质谱联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

1 原料药（山东新时代药业有限公司，含量 >98.0%，批号 500191227、500191228、500191229、500191230）；**2** 对照品（东京化成工业株式会社，含量 98.0%，批号 MP6UH-QT）；乙腈为色谱纯，甲酸为质谱级，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 ACQUITY HSS T_3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸，B 为含 0.1%甲酸的乙腈，梯度洗脱（0—2.5 min，A 80%；2.5—3 min，A 80%—10%；3—6 min，A 10%；6—6.1 min，A 10%—80%；6.1—11 min，A 80%）；流速 0.2 ml/min；柱温 25 ℃，进样量 10 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源（ESI），正离子模式采集，选择反应监测（SRM）模式；喷雾电压 3 500 V；定量离子对 *m/z* 137.14→120.05；定性离子对 *m/z* 137.14→108.13。

2.2　溶液配制

空白溶液：0.4%盐酸：乙腈（90 ∶ 10）。

2 对照品溶液：精密称取 **2** 对照品适量，用空白溶液溶解并定量稀释，制成 1.25 ng/ml 的 **2** 对照品贮备液；精密量取 **2** 对照品贮备液 0.5 ml，置 10 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，过滤即得 **2** 对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药适量，用空白溶液溶解并定量稀释，制成 50 μg/ml 的溶液，过滤即得供试品溶液。

2.3　专属性试验

取“**2.2**”项下空白溶液、**2** 对照品溶液和供试品溶液（批号 500191227），按“**2.1**”项下色谱质谱条件分别进样，结果见图 2。**2** 的保留时间为 2.2 min，空白溶液及供试品溶液不干扰 **2** 的测定。

2.4　线性试验

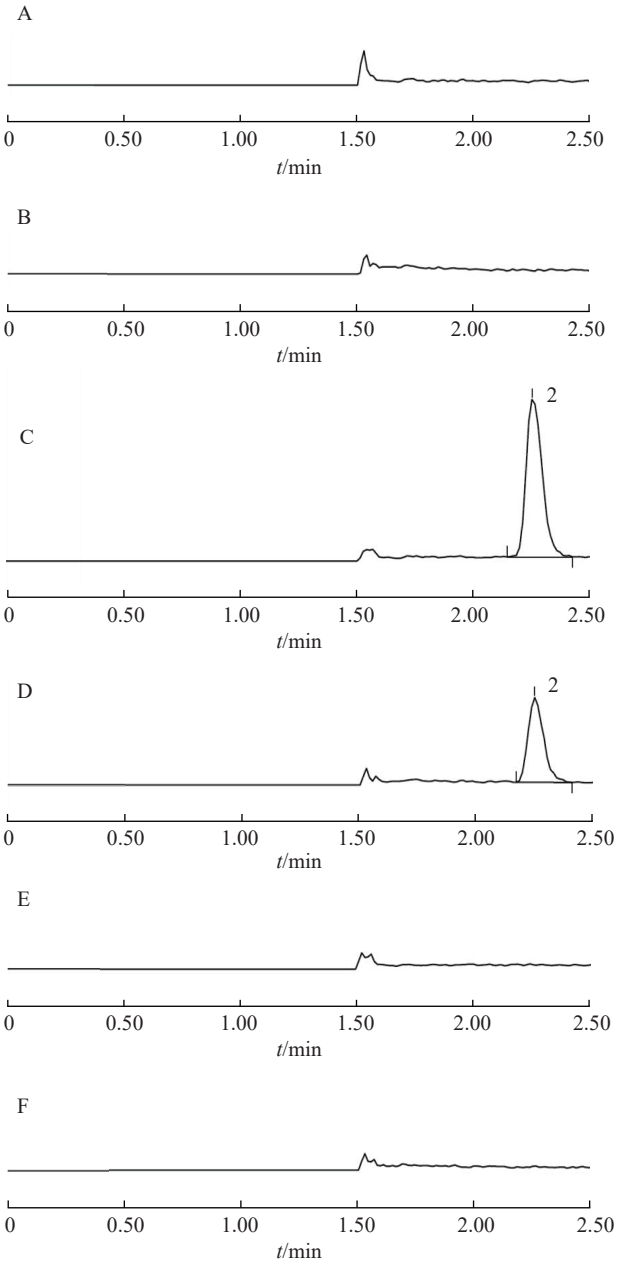
精密量取“**2.2**”项下 **2** 对照品贮备液 0.1、0.25、0.4、0.5、0.75、1 ml，分别置 10 ml 量瓶中，用“**2.2**”项下空白溶液定容，摇匀，作为线性试验溶液，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。以质量浓度 *c* 为横坐标，峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归，得标准曲线方程 A=380 237.52c+258.15，r=0.999 8，表明 **2** 在 12.25 ～ 122.5 pg/ml 内线性关系良好。**2** 的检测限（LOD）和定量限（LOQ）分别为 3.68、12.25 pg/ml。

2.5　回收率试验

精密称定 **1**（批号 500191227）适量，加入“**2.2**”项下空白溶液溶解并定量稀释制成 1 mg/ml 的溶液，精密量取上述溶液 0.5 ml 各 9 份，分别置 10 ml 量瓶中，各加入“**2.2**”项下 **2** 对照品贮备液 0.25、0.5、0.75 ml，用空白溶剂定容，摇匀，即得低、中、高浓度回收率试验溶液，每个浓度平行制备 3 份。按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，计算平均回收率。结果显示，**2** 的平均回收率（n=9）为 85.46%，RSD 为 3.56%。

2.6　精密度、稳定性和重复性试验

精密量取“**2.2**”项下 **2** 对照品贮备液 0.5 ml，置 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下空白溶剂定容，



A：空白溶液（定量），B：空白溶液（定性），
C：**2** 对照品溶液（定量），D：**2** 对照品溶液（定性），
E：供试品溶液（定量），F：供试品溶液（定性）
2－**2**

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms

摇匀，配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，计算 **2** 峰面积 RSD（*n*=6）为 1.87%。

取新配制的 **2** 对照品溶液，于 5 ℃放置，在 0、3、5、7、11 h 时分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。计算得 **2** 对照品溶液中 **2** 峰面积 RSD（*n*=5）为 3.66%，说明 **2** 对照品溶液于 5 ℃放置 11 h 内稳定。

精密称取 **1**（批号 500191227）适量，加入“**2.2**”项下空白溶剂溶解并定量稀释，制成 1 mg/ml 的溶液，精密量取上述溶液 0.5 ml，置 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下 **2** 对照品贮备液 0.5 ml，用“**2.2**”项下空白溶剂定容，摇匀，配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，结果显示，**2** 含量的 RSD（*n*=6）为 2.23%。

2.7　耐用性试验

精密称取 **1**（批号 500191227）适量，用空白溶剂溶解并定量稀释，制成 1 mg/ml 的溶液，精密量取上述溶液 0.5 ml，置 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下 **2** 对照品贮备液 0.5 ml，用空白溶剂定容，摇匀，配制 2 份。

通过改变“**2.1**”项下色谱质谱条件：柱温（±5 ℃）、流速（±0.03 ml/min）、初始流动相比例（±2%）、色谱柱［色谱柱 1 为 ACQUITY HSS T_3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），色谱柱 2 为 YMC Triart C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）］、喷雾电压（±100 V），进行试验。结果显示，**2** 含量的 RSD（*n*=11）为 3.35%，耐用性良好。

2.8　样品测定

取 4 批 **1** 原料药，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，并精密量取上述供试品溶液和“**2.2**”项下 **2** 对照品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，4 批 **1** 中均未检出 **2**。

3　讨论

根据 **2** 的化学结构，选择 ESI 离子源，正离子检测模式，使用三通连接注射泵、超高效液相色谱仪和质谱检测器，调整质谱参数使 **2** 的响应达到最大；同时根据仪器优化的离子对，选择 *m*/*z* 137.14→108.13 为定性离子对，*m*/*z* 137.14→120.05 为定量离子对。

（下转第571页）

参考文献：

[1] 李浩鹏, 杨 阳, 沈以凌, 等. 浅谈无菌屏障系统的现状及有效性验证[J]. 塑料包装, 2019, **29**(2): 25-26.

[2] 魏增江, 孙兆霞, 何泽文. 无菌医疗器械包装评价及审评要点[J]. 中国医疗器械信息, 2019, **25**(7): 4-6.

[3] 李梦媛, 沈以凌, 张 悦, 等. 无菌医疗器械包装生物负载对产品的影响[J]. 塑料包装, 2019, **29**(2): 27-29.

[4] 秦 蕾. 无菌医疗包装是无菌医疗器械安全的基本保证[J]. 中国医疗器械信息, 2015, **21**(4): 13-16.

[5] 杨朝银. TYVEK-未来包装的新材料[J]. 塑料科技, 1990, (3): 39-42.

[6] 佚名. 杜邦™Tyvek®在预防医院获得性感染(HAI)中的作用[J]. 中国医疗器械信息, 2012, **18**(11): 74-75.

[7] 国家标准化管理委员会. GB/T 19973. 1-2015医疗器械的灭菌 微生物学方法 第 1 部分产品上微生物总数的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[8] European Committee for Standardization. EN 14683: 2019《Medical face masks-Requirements and test method》[S]. European: BSI Standards Publication, 2019.

[9] Comité Européen de Normalisation. Sterilization of health care products-Microbiological methods-Part 1: Determination of a population of microorganisms on products (ISO 11737-1:2018)[S]. Switzerland, 2018.

[10] 马 妮, 董慧明, 刘 霓, 等. 医用一次性防护服生物负载量检测技术研究[J]. 中国医疗器械信息, 2020, **26**(11): 9-11.

(上接第566页)

2 的质谱响应较高，但其溶液状态极不稳定，通过不断调整稀释液，发现 **2** 在酸性条件下稳定性较好，通过比较 **2** 在甲酸、高氯酸、盐酸溶液中的稳定性，最终选择 0.4%盐酸：乙腈 (90 ： 10) 作为稀释液，且 **2** 在 5 ℃放置 11 h 内稳定。

在进行加标回收率试验时发现，**1** 的加入会对 **2** 的检测造成较大的基质效应，因 **2** 的响应较好，通过降低 **1** 的质量浓度可以降低基质效应的影响。最终选择 **1** 的加入浓度为 50 μg/ml，可同时满足 **2** 的检测灵敏度及检测准确度要求。

参考文献：

[1] 石劲敏, 李 端. 手性非甾体类抗炎新药依托度酸[J]. 中国临床药学杂志, 2000, **9**(5): 321-324.

[2] 彭朝权, 余步云, 赵长林, 等. 依托度酸治疗骨关节炎的临床观察[J]. 广东药学院学报, 2000, **16**(2): 138-140.

[3] 余 莲. 新型非甾体抗炎药物——依托度酸[J]. 中国药业, 2001, **10**(4): 30-31.

[4] 马 磊, 马玉楠, 陈 震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(18): 2106-2111.

[5] 张乃华, 鲍广龙, 聂建兵, 等. 依托度酸的合成工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(4): 495-498.

[6] 徐梅桔, 方晓萍, 史 磊. HPLC 法测定依托度酸中的邻乙基苯胺和邻乙基苯肼[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2020, **40**(20): 63-65.

[7] ICH. M7(R1). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2021-02-02]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m7-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential.