ICP-MS 法测定富马酸丙酚替诺福韦中 8 种元素杂质

李亚雷，李月华，韩　飞*
（沈阳药科大学药学院，辽宁沈阳 110016）

摘要：建立了电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法测定富马酸丙酚替诺福韦（**1**）中铅（Pb）、钒（V）、砷（As）、汞（Hg）、镉（Cd）、钴（Co）、镍（Ni）、铬（Cr）8 种元素杂质。样品经溶解后，加入内标溶液［含铋（Bi）、钇（Y）、铟（In）和钪（Sc）元素］，稀释后直接进样。结果显示，8 种元素杂质的线性关系良好，检测限为 0.21 ～ 7.69 μg/kg，定量限为 0.71 ～ 25.60 μg/kg；加样回收率（*n*=9）在 93.41%～ 108.88%；重复性试验 RSD（*n*=6）为 0.64%～ 1.56%；溶液在室温 2 h 内稳定性良好。多批次样品中各元素杂质含量均远小于其限度值。该研究建立的方法专属性好、灵敏度高、准确度与精密度良好，可满足 **1** 中元素杂质的质量控制。

关键词：富马酸丙酚替诺福韦；乙型肝炎；元素杂质；电感耦合等离子体质谱；内标法
中图分类号：R917；R978.7　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255（2025）04-0536-05
引用：李亚雷，李月华，韩　飞．ICP-MS 法测定富马酸丙酚替诺福韦中 8 种元素杂质［J］．中国医药工业杂志，2025, 56（4）：536-540．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.015

Determination of 8 Elemental Impurities in Tenofovir Alafenamide Fumarate by ICP-MS

LI Yalei, LI Yuehua, HAN Fei*
(*School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016*)

ABSTRACT: An inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method was established to determine 8 elemental impurities, namely Pb, V, As, Hg, Cd, Co, Ni, and Cr, in tenofovir alafenamide fumarate (**1**). The sample was dissolved and diluted with an internal standard solution (containing Bi, Y, In, and Sc elements). Then, the sample was directly injected into the ICP-MS system. The results showed that it was linear for the 8 elements in the corresponding concentration ranges. The detection limits were 0.21 – 7.69 μg/kg, and the quantification limits were 0.71 – 25.60 μg/kg. The sample recovery rates (*n*=9) were 93.41% – 108.88%, the RSDs (*n*=6) of the repeatability test were 0.64% – 1.56%. The solution had good stability within 2 hours at room temperature. The content of each element impurity in multiple batches of samples was far below its limit value. The established method has good specificity, high sensitivity, and good accuracy and precision, which can meet the quality control of element impurities in **1**.

Key Words: tenofovir alafenamide fumarate; viral hepatitis B; elemental impurity; inductively coupled plasma mass spectrometry; internal standard method

富马酸丙酚替诺福韦（tenofovir alafenamide fumarate，**1**），为新型核苷类逆转录酶抑制剂替诺福韦的靶向前药，化学名为 9-［（*R*）-2-［（*S*）-1-（异丙氧基羰基）乙基］氨基］苯氧基氧膦基］甲氧基］丙基］-腺嘌呤半富马酸盐，化学结构如图 1 所示，由美国吉利德科学公司开发，是近 10 年来唯一一款被 FDA 获批上市的乙肝新药，用于治疗成人和青少年（12 岁及以上、体质量至少为 35 kg）乙型肝炎和慢性乙型肝炎[1]。与富马酸替诺福韦二吡呋酯相比，有效成分相同，但 **1** 具有更高的血浆稳定性和更强的抗

收稿日期：2024-04-03
作者简介：李亚雷（1987—），男，硕士，从事药品质量研究。
通信作者：韩　飞（1979—），男，博士，教授，从事高分辨质谱及其成像技术在药学研究领域的应用研究工作。
E-mail：hanfei_spu@163.com

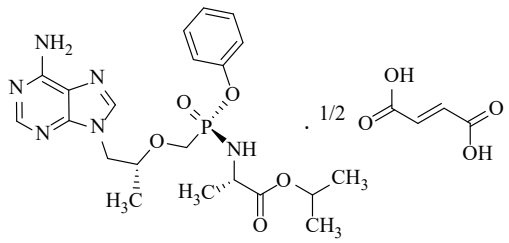


图 1 1 的化学结构

Fig.1 Chemical Structure of **1**

病毒功效，能大幅减轻骨密度降低与肝功能损伤等不良反应[2—3]。

药品中的元素杂质可由多种途径引入，可能是合成中有意添加的催化剂的残留，也可能是与生产设备或包装系统相互作用产生的杂质。大部分杂质不能提供任何治疗作用，且部分杂质具有毒性，所以在药品中的含量需要被控制在可接受的限度内[4]。近年来，各国药典及 ICH 中的相关指导原则均对药品中元素杂质的控制提出了更高的要求，其中 ICH《Q3D(R2)：元素杂质指导原则》[4] 中根据毒性将元素杂质分为 4 类，再根据不同的给药途径（口服、注射、吸入）给出了不同的控制限度。

市售 **1** 制剂为口服固体制剂，根据 ICH《Q3D(R2)：元素杂质指导原则》[4] 中对元素杂质的风险评估要求，口服给药途径需要考虑 1 类、2A 类及生产过程中有意添加的元素。通过分析 **1** 原料药的生产工艺可知，**1** 生产工艺过程中无刻意添加的金属催化剂，但在生产过程中会接触到不锈钢设备，可能引入 3 类元素杂质铬 (Cr)。

经综合评估，为保证药品的安全性与质量可控性，本研究对 **1** 原料药中的 1 类元素杂质镉 (Cd)、铅 (Pb)、砷 (As)、汞 (Hg)，2A 类元素杂质钴 (Co)、钒 (V)、镍 (Ni)，以及 3 类元素杂质 Cr 共 8 种元素杂质进行研究。通过比较元素杂质不同检测方法［如原子吸收光谱 (atomic absorption spectrum，AAS) 法、X 射线荧光光谱术 (X-ray fluore-scence spectrometry，XRF)、仪器中子活化分析 (instrumental neutron activation analysis，INAA)、电感耦合等离子体 - 发射光谱 (inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy，ICP-OES) 和 ICP-MS 等］的优缺点，并结合 **1** 原料药的理化性质[5—7]，确定采用 ICP-MS 法测定 **1** 原料药中 8 种元素杂质 (Pb、V、As、Hg、Cd、Co、Ni、Cr] 的含量，以期为 **1** 原料药中各元素杂质的准确测定和质控提供参考。

1 仪器与试药

NexION 350 型 ICP-MS 仪（美国珀金埃尔默公司）；BT125D 型电子天平（德国赛多利斯公司）。

Cd（批号 185002-1）、Pb（批号 184042-3）、As（批号 184020-3）、Hg（批号 184053-2）、Co（批号 183079-2）、V（批号 183076-1）、Ni（批号 183065-4）、Cr（批号 185031-3）、金 (Au，批号 184041-1) 的单元素标准溶液（质量浓度均为 1 000 μg/mL)，以及混合内标贮备液［含钇 (^{89}Y)、铟 (^{115}In)、铋 (^{209}Bi)、钪 (^{45}Sc) 元素，质量浓度均为 100 μg/mL］均购于国家有色金属及电子材料分析测试中心；原料药（国内企业 A，批号 129171001、129171101、129171102、129180801、129180802、129180901）；硝酸与盐酸均为优级纯，试验用水均为超纯水；试验所用容器材质均为聚四氟乙烯。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 工作条件

雾化器 玻璃同心雾化器；雾化室温度 2.7 ℃；射频功率 1 300 W；载气和辅助气 高纯氩气；辅助气流速 1.2 L/min；等离子体气流速 15 L/min；蠕动泵管材 聚氯乙烯 (polyvinyl chloride，PVC)；蠕动泵转速 40 r/min；采样深度 15 mm；扫描次数 20 次；采用氦气碰撞反应模式，碰撞气流量 3 mL/min。待测元素同位素与内标元素的选择如表 1 所示。

表 1 待测元素同位素及内标元素的选择

Tab.1 The Mass Selection of the Analytes and the Internal Standard Elements

测定元素同位素	内标元素
^{51}V ^{52}Cr ^{59}Co ^{60}Ni	^{89}Y
^{111}Cd	^{115}In
^{208}Pb ^{202}Hg	^{209}Bi
^{75}As	^{45}Sc

2.2 溶液配制

稀释液：精密量取 70%硝酸 20 mL、35%盐酸 20 mL、金标准溶液 0.4 mL，加至水 2 L 中，混匀即得。

空白基质溶液：精密量取内标溶液 1 mL，置 50 mL 塑料量瓶中，用稀释液定容，摇匀，即得。

混合标准贮备液：精密量取 Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Cr 的单元素标准溶液适量，加入稀释液稀释制成含 Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Cr 质量浓度分别为 125、125、375、750、1 250、2 500、5 000、2 500 ng/mL 的混合标准贮备液。

内标溶液：精密量取混合内标贮备液适量，加入稀释液稀释制成含 ^{89}Y、^{115}In、^{209}Bi、^{45}Sc 质量浓度分别为 1 000 ng/mL 的内标溶液。

供试品溶液：取本品约 250 mg，精密称定，置 50 mL 塑料量瓶中，精密移入内标溶液 1 mL，用稀释液溶解定容，摇匀，即得。

线性溶液：精密量取混合标准贮备液各 0.25、0.5、1、1.5、2 mL，分置 50 mL 塑料量瓶中，精密加入内标溶液 1 mL，用稀释液定容，摇匀，制得线性溶液（相对限度浓度分别为 25%、50%、100%、150%和 200%）。

2.3 限度要求

1 制剂为口服固体片剂，最大日剂量为 25 mg，根据 ICH《Q3D(R2)：元素杂质指导原则》[4] 规定的口服给药途径时每日允许暴露量 (permitted daily exposure，PDE)，采用“方法 1：药品日摄入剂量不超过 10 g 的药品组分中元素的通用允许浓度限值”计算 **1** 原料药中不同元素杂质的限度浓度，具体如表 2 所示。

2.4 系统适用性试验

USP 43“Elemental Impurity-Procedures” 中要求，采用 ICP-MS 法测定元素杂质时，在样品测定前后，标准溶液中的各待测元素响应值的漂移不得过 20%。

本试验选用“**2.2**”项下线性溶液中相对限度浓度 100%的溶液作为标准溶液，测定其在样品测试前后的漂移值，以考察系统适用性。结果显示，Cd、Pb、As、Hg、Co、V、Ni、Cr 的漂移值分别为 4.4%、3.5%、6.1%、4.3%、6.4%、9.1%、6.2%、4.1%，均低于 20%，表明本方法系统适用性满足 USP 43 的要求。

表 2　1 原料药中不同元素杂质的限度浓度

Tab.2　The Limit Concentrations of Different Elemental Impurities in Bulk Drug **1**

测定元素同位素	分类	限度 /(μg·g^{-1})
^{111}Cd	1	0.5
^{208}Pb	1	0.5
^{202}Hg	1	3
^{75}As	1	1.5
^{59}Co	2A	5
^{60}Ni	2A	20
^{51}V	2A	10
^{52}Cr	3	1 100

2.5 线性试验和检测限（LOD）、定量限（LOQ）

分别取“**2.2**”项下稀释液、空白基质溶液与线性溶液，按“**2.1**”项下工作条件进样检测。以待测元素与内标响应的比值（y）为纵坐标、各元素的质量浓度（x）为横坐标，绘制标准曲线。结果显示，各元素杂质相关系数均大于 0.999，表明所考察的各待测元素在各自限度浓度的 25%～200%内，线性关系良好，结果如表 3 所示。

取“**2.2**”项下空白基质溶液，连续进样 11 针，计算各元素质量浓度的 SD 值，将 3 倍的 SD 值所对应的浓度作为检测限，将 10 倍的 SD 值所对应的浓度作为检测限。结果显示，各元素杂质的 LOD 与 LOQ 均低于限度的 10%，结果如表 3 所示。

2.6 准确度试验

精密称取原料药（企业 A，批号 129171001）约 250 mg，共 9 份，分别置 50 mL 量瓶中，分成 3 组，每组 3 份，加稀释液适量，超声使溶解，分别精密加入“**2.2**”项下混合标准贮备液 0.5、1、1.5 mL，再分别精密加入“**2.2**”项下内标溶液 1 mL，用稀释液定容，摇匀，即得相对限度浓度为 50%、100%、150%的回收率溶液，按“**2.1**”项下工作条件进样检测，计算加样回收率。结果显示，各元素杂质回收率均在 93.41%～108.88%，RSD(n=9) 均小于 5%，表明方法在相对限度浓度的 50%～150%，准确度良好，结果如表 3 所示。

2.7 重复性试验

精密称取原料药（企业 A，批号 129171001）约

250 mg，共 6 份，分别置 50 mL 量瓶中，加稀释液适量，超声使溶解，分别精密加入“**2.2**”项下混合标准贮备液 1 mL，再精密加入“**2.2**”项下内标溶液 1 mL，用稀释液定容，摇匀，即得相对限度浓度为 100%的重复性溶液，按“**2.1**”项下工作条件进样检测，计算各元素杂质测量值的 RSD。结果（表 3）显示，各元素杂质测量值 RSD（n=6）均小于 5%，表明方法重复性良好。

2.8 溶液稳定性

取“**2.7**”项下重复性溶液，于室温放置，分别于 0、0.5、1、1.5、2 h 时取样，按“**2.1**”项下工作条件进样检测，考察溶液稳定性。结果显示，含限度浓度的供试品溶液在 2 h 内，各元素杂质含量的 RSD（n=5）均小于 5%，表明供试品溶液的稳定性良好。

2.9 样品测定

取 6 批 **1** 原料药，按“**2.2**”项下制备供试品溶液，按“**2.1**”项下工作条件进样检测，分别计算 6 批原料药中 8 种元素杂质的含量。结果（表 4）显示，6 批样品中测得的各元素杂质含量均低于限度的 30%，满足 ICH《Q3D（R2）：元素杂质指导原则》[4] 规定的口服给药途径的限度要求。

3 讨论

3.1 样品前处理

因 **1** 原料药在稀酸溶液中溶解性好，且各待测元素杂质在稀酸溶液中较为稳定，故选用稀酸作为本研究的稀释液，处理方法优先采用直接溶解法。通过对不同浓度硝酸、盐酸的筛选，初步确定以 0.7%硝酸作为稀释剂，并进行准确度考察，结果显示 Hg 元素的回收率偏低。推测原因为 Hg 元素具有易挥发和记忆效应强的特点，影响了准确度的检测结果。故在稀释液中加入 0.35%盐酸，以起到对 Hg 元素的稳定作用，减少分析过程中因 Hg 挥发而造成的结果偏差；同时，利用“金汞齐”原理，在稀释液中加入一定浓度的 Au 溶液，抑制 Hg 元素的记忆效应，以消除因 Hg 的记忆效应导致的结果不准确[8—12]。最终确定稀释液为含有 0.2 μg/mL Au 的硝酸与盐酸的混合溶液。用确定的稀释液，采用样品直接溶解的处理方法进行准确度考察，结果显示，准确度良好，

表 3 方法学试验结果

Tab.3 Results of Methodology

待测元素	线性方程	检测限 /（μg·kg^{-1}）	定量限 /（μg·kg^{-1}）	重复性 RSD/%（n=6）	回收率 /%（n=9）	回收率 RSD/%（n=9）
^{111}Cd	y=0.006 0x − 0.000 05	0.53	1.75	0.99	93.41 ～ 97.82	1.57
^{208}Pb	y=0.033 4x+0.000 09	0.75	2.52	0.64	95.28 ～ 99.30	1.42
^{202}Hg	y=0.004 7x − 0.000 3	1.72	5.72	0.73	100.00 ～ 101.82	0.56
^{75}As	y=0.014 1x − 0.000 3	5.26	17.57	1.56	100.47 ～ 108.88	2.77
^{59}Co	y=0.039 8x − 0.000 2	0.21	0.71	0.89	100.13 ～ 103.22	1.02
^{60}Ni	y=0.011 2x+0.000 2	2.22	7.38	1.15	100.41 ～ 102.64	0.79
^{51}V	y=0.020 3x − 0.000 1	7.69	25.60	1.24	102.42 ～ 105.67	1.01
^{52}Cr	y=0.023 5x − 0.000 1	3.44	11.48	1.03	103.90 ～ 108.81	1.49

表 4 样品检测结果 /（μg·g^{-1}）

Tab.4 Determination Results of Samples/（μg·g^{-1}）

待测元素	限度	批号					
		129171001	129171101	129171102	129180801	129180802	129180901
^{51}V	10	—	—	—	—	—	—
^{52}Cr	1 100	3.8	2.9	2.2	9.1	11.7	1.2
^{59}Co	5	0.005	0.04	0.007	0.007	0.02	0.005
^{60}Ni	20	1.2	4.0	0.2	0.5	1.9	0.3
^{111}Cd	0.5	—	—	—	—	0.000 5	—
^{208}Pb	0.5	0.002	0.005	0.012	0.003	0.03	0.002
^{202}Hg	3	—	—	—	—	—	—
^{75}As	1.5	—	—	—	—	0.003	0.000 05

注：“—”表示“未检出”。

表明该稀释液与处理方法满足本试验的检测要求。

3.2 干扰消除

ICP-MS 法测定中的干扰大致可分为 2 类：一类是质谱型干扰，主要包括同质异位素、多原子离子、双电荷离子等；另一类是非质谱型干扰，主要包括物理干扰、基体效应、记忆效应等。本试验主要通过选择无干扰的同位素和采用氦气碰撞反应模式，以消除质谱型干扰；同时采用多内标技术，对不同待测元素选用质量数相近的内标元素，以消除非质谱型干扰。

参考文献：

[1] 王晓晨, 陆皞然. 富马酸磷丙替诺福韦的相关专利分析 [J]. 河南科技 , 2018, (18): 52-54.

[2] KOSH A, SCOTT K, FUNG T T, *et al*. Twenty-eight day safety, antiviral activity, and pharmacokinetics of tenofovir alafenamide for treatment of chronic hepatitis B infection [J]. *J Hepat*, 2015, **62**(3): 533-540.

[3] 顾留歌 , 李　梁 , 秦　燕. 核苷酸逆转录酶抑制剂替诺福韦艾拉酚胺 [J]. 中国新药杂志 , 2017, **26**(11): 1243-1248

[4] ICH. Q3D(R2) Guideline for elemental impurities [EB/OL]. (2022-04-26)[2022-07-29]. https ://database. ich. org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308. pdf.

[5] 朱　俐 , 赵　瑜 , 姚尚辰. 药物中元素杂质检测技术研究最新进展 [J]. 分析测试学报 , 2020, **39**(4): 547-554.

[6] 许雯雯 , 孙　震 , 周凤梅 , 等. ICP-MS 法测定盐酸安舒法辛缓释片中 7 个元素杂质含量 [J]. 药物分析杂志 , 2019, **39**(2): 319-327.

[7] 周雪芸 , 幸林广 , 童振桑 , 等. ICP-MS 法测定铝碳酸镁混悬液原料药中 7 种元素杂质 [J]. 化工技术与开发 , 2024, **53**(Z1): 72-78.

[8] 张军红. 消除 ICP-MS 测定汞的记忆效应 [J]. 济源职业技术学院学报 , 2015, **14**(2): 23.

[9] 李耀磊 , 金红宇 , 韩　笑 , 等. 电感耦合等离子体质谱测定法中汞元素记忆效应与稳定性研究 [J]. 中国药学杂志 , 2019, **54**(1): 53-57.

[10] 李延隆. ICP-MS 测汞元素稳定性及记忆效应方法比较 [J]. 当代化工研究 , 2021, (18): 30-31.

[11] 钟思伟. ICP-MS 法测定左氧氟沙星注射液中 10 种元素杂质的含量 [J]. 药物分析杂志 , 2023, **43**(11): 1914-1919.

[12] 王　玉 , 郑淑凤 , 贾艾玲 , 等. ICP-MS 法检测富马酸亚铁中 7 种元素杂质 [J]. 药物分析杂志 , 2023, **43**(8): 1423-1428.