UPLC-MS 法测定注射用盐酸表柔比星丁基橡胶塞中 3 个酰胺化合物的迁移量

郝贵周，陈晓杰，孙建合，侯继鹏，冯　中，张贵民*
（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）

摘要：建立了超高效液相色谱 - 质谱（UPLC-MS）法测定注射用盐酸表柔比星丁基橡胶塞中十六碳酰胺（**2**）、油酸酰胺（**3**）和硬脂酰胺（**4**）的迁移量。色谱柱采用 Thermo Hypersil GOLD 柱（2.1 mm×100 mm，3 μm），以 0.1%甲酸溶液∶甲醇（15 ∶ 85）为流动相，等度洗脱。采用电喷雾离子源（ESI），正离子模式采集，单离子检测模式（SIM）。结果显示，**2**、**3**、**4** 分别在 0.039 2 ～ 0.783 6 μg/ml、0.040 0 ～ 0.800 2 μg/ml、0.037 3 ～ 0.746 0 μg/ml 内线性关系良好。检测限分别为 0.011 8、0.012 0、0.011 2 μg/ml；平均回收率（n=12）分别为 96.28%、97.21%和 94.11%，RSD 分别为 3.39%、4.22%和 5.63%。建立的方法灵敏度高，专属性好，为注射用表柔比星的质量控制和安全性评价提供了参考。

关键词：注射用盐酸表柔比星；丁基橡胶塞；十六碳酰胺；油酸酰胺；硬脂酰胺；超高效液相色谱-质谱
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)07-1034-04
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.016

Determination of the Migration Quantity of Three Amides in Butyl Rubber Stopper for Injection of Epirubicin Hydrochloride by UPLC-MS

HAO Guizhou, CHEN Xiaojie, SUN Jianhe, HOU Jipeng, FENG Zhong, ZHANG Guimin*
(*National Engineering Research Center of Chiral Drugs, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400*)

ABSTRACT: An ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) method was established for the determination of migration quantity of hexadecanamide (**2**), oleamide (**3**) and stearamide (**4**) from butyl rubber stopper for injection of epirubicin hydrochloride. The Thermo Hypersil GOLD column (2.1 mm×100 mm, 3 μm) was used, and the analysis was carried out in the isocratic elution mode with 0.1% formic acid solution∶methanol (15∶85) as the mobile phase. Electrospray ionization (ESI), positive ion mode acquisition and single ion detection mode (SIM) were used. The results showed that it was linear for **2**, **3** and **4** in the ranges of 0.039 2 − 0.783 6 μg/ml, 0.040 0 − 0.800 2 μg/ml and 0.037 3 − 0.746 0 μg/ml, respectively. The detection limits of **2**, **3** and **4** were 0.011 8, 0.012 0, and 0.011 2 μg/ml, respectively, the mean recoveries (n=12) were 96.28%, 97.21%, and 94.11%, with the RSDs of 3.39%, 4.22%, and 5.63%, respectively. The established method has high sensitivity and good specificity, which provides a reference for the quality control and safety evaluation of epirubicin hydrochloride for injection.

Key Words: epirubicin hydrochloride for injection; butyl rubber stopper; hexadecanamide; oleamide; stearamide; UPLC-MS

注射用盐酸表柔比星（epirubicin hydrochloride，**1**）为新一代蒽环类抗肿瘤药物，对多种实体肿瘤及血液肿瘤具有良好的治疗作用，其治疗指数高且不良反应小[1−2]。丁基橡胶塞是药品包装中瓶装密封材料的重要组成部分，具有吸湿率低、化学性好、气密性好、无生理毒性作用等优点，常用于密封药品，为药物的质量控制提供了可靠保证。但是，在丁基橡胶塞的生产过程中，会加入填充剂、橡胶助剂、硫化剂、硫化活性剂、硅油等辅料，当胶塞与

收稿日期：2021-07-13
作者简介：郝贵周(1977—)，男，高级工程师，从事新药的研究与开发。
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

药品接触时，这些成分复杂的辅料就有可能缓慢迁移至药品中，从而影响药品的质量、稳定性及安全使用[3—4]。本课题组前期在注射用**1**的丁基橡胶塞的提取研究中发现，使用比注射用**1**实际放置及药液配制pH更剧烈的条件，胶塞提取溶液中可检测出十六碳酰胺（hexadecanamide，**2**）、油酸酰胺（oleamide，**2**）和硬脂酰胺（stearamide，**4**）3种润滑剂。因此在注射用**1**样品的放置过程中，**2**、**3**、**4**有可能缓慢迁移至药品中，需要对这3种物质在药品中的浸出进行研究。

《药品与包装相容性理论与实践》中规定注射液中**2**的每日允许暴露量（PDE）为1 400 μg，**3**和**4**的PDE则均为120 μg[5]。为了更严格地控制杂质，**2**、**3**、**4**的PDE均按120 μg计。文献中注射液PDE值在计算时，人的体质量按60 kg计，根据人用药品技术要求国际协调理事会（ICH）Q3C指导原则，按体质量50 kg计算时的用药安全性更高[6]，故将**2**、**3**、**4**的PDE值折算为100 μg。根据药品使用说明书中**1**的每日最大用量为250 mg计算，则**2**、**3**、**4**的限度为0.04%。

目前仅见单独检测**2**、**3**和**4**的方法[7—10]，尚未见同时对胶塞中**2**、**3**和**4**的检测报道。因此，本研究以注射用**1**为研究对象，建立了超高效液相色谱-质谱（UPLC-MS）法测定丁基橡胶塞中**2**、**3**和**4**，并对在40 ℃恒温箱正置、倒置放置3个月的3批样品中的迁移量进行了分析测定，以期为**1**的质量控制和安全性评价提供参考。

1 仪器与试药

Acquity H-class-QDA型超高效液相色谱-质谱联用仪（美国Waters公司）。

注射用**1**（山东新时代药业有限公司，规格10 mg，批号0020201101、0020201102、0020201103）；**2**对照品（含量95.0%，批号HBL01-KKPF）和**4**对照品（含量90.0%，批号HHALH-JQ）均购于日本TCI公司；**3**对照品（美国Sigma-Aldrich公司，含量99.0%，批号SLCD1178）；甲醇和二氯甲烷均为色谱纯，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Thermo Hypersil GOLD柱（2.1 mm×100 mm，3 μm）；流动相0.1%甲酸溶液∶甲醇（15 ∶ 85），等度洗脱；流速0.3 ml/min；柱温25 ℃；进样量1 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源（ESI），正离子模式采集，单离子检测模式（SIM）；锥孔电压15 V，毛细管电压0.8 kV；监测离子对 *m/z* 分别为282.40（**2**）、284.40（**3**）、256.35（**4**）。

2.2 溶液配制

对照品溶液：精密称取**2**、**3**、**4**对照品适量，置同一量瓶中，加入二氯甲烷2 ml超声溶解，用甲醇定量稀释，制成每1 ml中含**2**～**4**各约4 μg的对照品贮备液；精密量取上述对照品贮备液1 ml，置10 ml量瓶中，用50%甲醇定容，摇匀，即得对照品溶液。

供试品溶液：取注射用**1** 1瓶，加水1 ml超声溶解，转移至10 ml量瓶中，用50%甲醇定容，摇匀，即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

取空白溶液（50%甲醇）和“**2.2**”项下对照品溶液、供试品溶液（批号0020201101），按“**2.1**”项下色谱质谱条件分别进样测定。结果见图1，**2**、**3**和**4**的保留时间分别为4.4、5.0、7.4 min；空白溶液及供试品溶液不干扰**2**、**3**和**4**的测定。

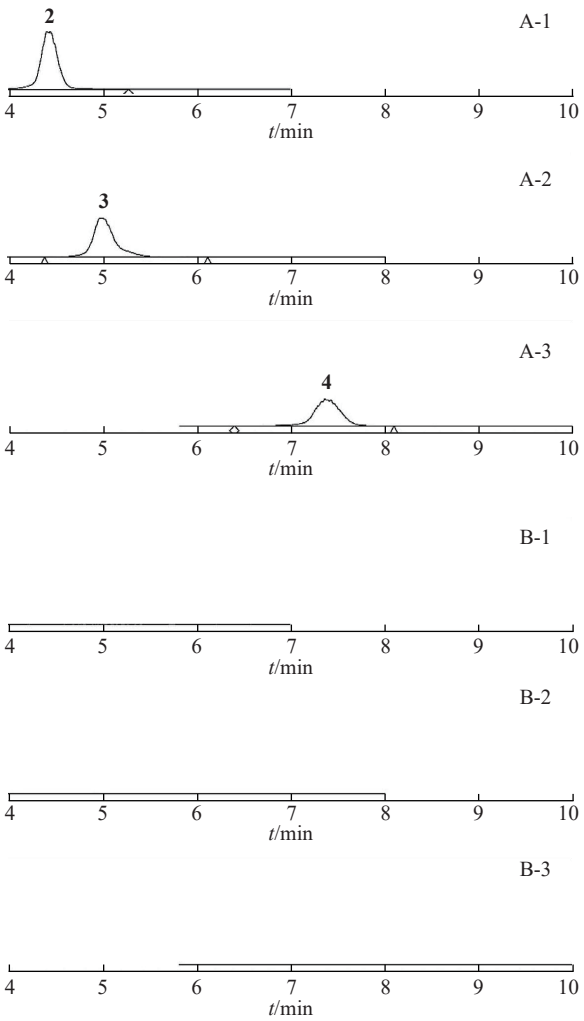
2.4 线性试验

精密量取“**2.2**”项下对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2 ml，分别置10 ml量瓶中，用50%甲醇定容，摇匀，作为系列线性试验溶液，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，并记录色谱图。以质量浓度 *c*（μg/ml）为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。

结果显示，**2**、**3**和**4**的标准曲线方程分别为 $A=2.363\times10^7c+3.442\times10^5$（$r=0.999\ 5$）、$A=1.924\times10^7c+3.803\times10^5$（$r=0.999\ 8$）、$A=1.189\times10^7c+6.942\times10^4$（$r=0.999\ 8$），说明**2**、**3**和**4**分别在0.039 2～0.783 6 μg/ml、0.040 0～0.800 2 μg/ml、0.037 3～0.746 0 μg/ml内线性关系良好。

2.5 检测限和定量限

取“**2.2**”项下对照品溶液，逐级稀释，分别以待测物信噪比（*S*/*N*）为10和3时的浓度作为定量



A－1：对照品溶液（**2**），A－2：对照品溶液（**3**），A－3：对照品溶液（**4**），
B－1：供试品溶液（**2**），B－2：供试品溶液（**3**），B－3：供试品溶液（**4**）

图 1　典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms

限（LOQ）和检测限（LOD），按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 的 LOD 分别为 0.011 8、0.012 0、0.011 2 μg/ml，LOQ 分别 0.039 2、0.040 0、0.037 3 μg/ml。

2.6　回收率试验

取注射用 **1**（批号 0020201101）1 瓶，加水 1 ml 超声溶解，转移至 10 ml 量瓶中，共制备 12 份，分别加入“**2.2**”项下对照品贮备液 0.1、0.5、1、1.5 ml，每个浓度平行配制 3 份，用 50％甲醇溶液定容，摇匀，制成 10％、50％、100％、150％浓度的回收率试验溶液，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**、**3** 和 **4** 的平均回收率（n=12）分别为 96.28％、97.21％和 94.11％，RSD 分别为 3.39％、4.22％和 5.63％。

2.7　精密度、稳定性和重复性试验

取“**2.5**”项下定量限溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件重复进样 6 次。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 峰面积 RSD（n=6）分别为 1.21％、1.68％、0.82％，表明本方法灵敏度较高。

精密量取“**2.2**”项下对照品贮备液 1 ml，置 10 ml 量瓶中，用 50％甲醇定容，摇匀，共配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，计算 **2**、**3** 和 **4** 的峰面积 RSD（n=6）分别为 1.24％、2.92％和 1.09％，说明方法精密度较好。

取新鲜配制的对照品溶液和供试品溶液，于室温（25 ℃）放置，分别在 0、1、2、4、6、8、10、12 h 时，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，并记录色谱图。结果显示，对照品溶液中 **2**、**3** 和 **4** 峰面积 RSD（n=8）分别为 1.73％、1.40％和 0.71％，供试品溶液中 **2**、**3** 和 **4** 在各时间点均未检出，说明对照品溶液及供试品溶液于室温条件下放置 12 h 内均稳定。

取注射用 **1**（批号 0020201101）1 瓶，加水 1 ml 超声溶解，转移至 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下对照品贮备液 1 ml，用 50％甲醇定容，摇匀，共配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 含量 RSD（n=6）分别为 1.85％、2.32％和 3.50％，说明方法重复性较好。

2.8　耐用性试验

取注射用 **1**（批号 0020201101）1 瓶，加水 1 ml 超声溶解，转移至 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下对照品贮备液 1 ml，用 50％甲醇定容，摇匀，配制 2 份。通过改变“**2.1**”项下色谱质谱条件，即柱温（±5 ℃），流速（±0.02 ml/min），流动相甲醇比例（±1％），色谱柱批号（16096 和 16178），进行试验。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 含量 RSD（n=9）分别为 1.82％、3.11％和 4.23％，说明方法耐用性良好。

2.9 样品测定

取于 40 ℃恒温箱中正置、倒置放置 3 个月的注射用 **1**，各 3 批，分别按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，并取“**2.2**”项下对照品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，所有批次的 **1** 中均未检出 **2**、**3** 和 **4**。

3 讨论

根据酰胺类化合物的性质，本试验初期曾尝试使用 GC-MS 法进行检测，发现 **2**、**3** 和 **4** 在 GC-MS 中响应较好，但在进行加标回收率试验时，发现 **1** 的加入会对 **2**、**3** 和 **4** 的检测有很大的基质影响，故改用 UPLC-MS 进行方法开发。

通过研究 **2**、**3** 和 **4** 的化合物结构，在 UPLC-MS 中采用 ESI 离子源，正离子模式采集，同时在流动相中加入甲酸，提高各化合物的离子化效率，进而提高检测灵敏度。通过试验改变流动相中甲醇的比例，最终选择采用 0.1% 甲酸溶液：甲醇 (15 ∶ 85)，等度洗脱，**1**、**2**、**3** 和 **4** 能够依次出峰，并且能够较好地分离。在该色谱条件下，**1** 的出峰时间约为 1.5 min。此外，通过切换阀控制 0 ～ 3 min 流出液从旁路流出，确保溶剂和高浓度的供试品主峰切换不进入质谱分析，防止了主峰因浓度较高进入质谱检测器而对离子源造成污染，同时降低了基质效应，进一步提高了各杂质的回收率。

参考文献：

[1] 何剑英. 表柔比星与多柔比星治疗老年非霍奇金淋巴瘤对比观察[J]. 山西职工医学院学报, 2005, **15**(4): 41.

[2] 刘亚贤, 赵宏然, 赵 海. 奥沙利铂联合表柔比星在原发肝癌介入治疗的疗效观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, **33**(1): 35-36.

[3] 赵 霞, 胡昌勤. 金少鸿药用丁基胶塞中易挥发性成分的成分分析[J]. 药物分析杂志, 2006, **26**(3): 315-318.

[4] 郑芳如, 黄 瑜, 周兰贞, 等. 丁基胶塞在注射剂领域中的选用策略[J]. 中国药事, 2016, **30**(2): 137-140.

[5] 马玉楠, 蔡 弘, 骆红宇. 药品与包装相容性理论与实践[M]. 1版, 北京: 化学工业出版社, 2019: 428-433.

[6] ICH. Q3C(R8). Impurities: guideline for residual solvents[S]. 2021.

[7] 蒙芳玲, 胡长鹰, 黎梓城, 等. 液相色谱串联质谱法测定铝塑复合膜中芥酸酰胺和油酸酰胺[J]. 食品与发酵工业, 2020, **46**(20): 208-213.

[8] 晏 嫣, 张 阳, 姜德玮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食品接触材料中油酸酰胺的迁移量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, **10**(6): 1710-1714.

[9] 房 宁, 王子剑, 赵劲松, 等. 气相色谱-质谱法测定食品接触材料润滑剂在脂类食品模拟物中迁移量[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, **28**(3): 319-322.

[10] 蔡开云, 陈 萍, 冯向东, 等. 食品接触用塑料中十六碳酰胺的检测方法: 中国, 109557202A [P]. 2019-04-02.