

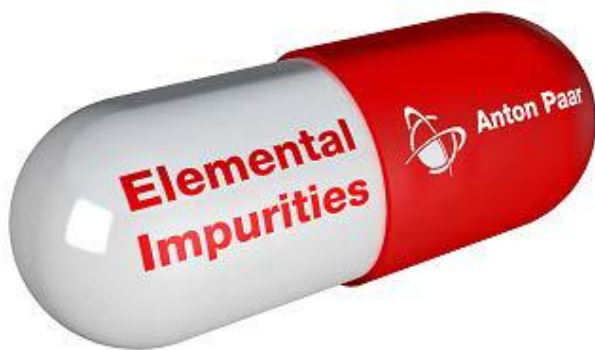
基于加压消解腔 (PDC)的微波消解在杂质元素分析中的应用

-根据法规 ICH Q3D, USP <232>, <233>, Ph. Eur. 5.20

安东帕中国

2018年1月，ICH, USP 和 Ph.Eur 等法规进行了修订，其中元素杂质的分析已作为药物产品的强制性检测项目。

Multiwave 7000 系列以其优越的性能，可覆盖符合 GMP 的各种药品的消解。



1 简介

由于杂质元素不仅对病人构成中毒危险，也会影响药品的质量和药效。这些杂质元素的分析在药物的研发和质控中都扮演十分重要的角色。

1.1 法规背景

到目前为止，根据 USP<231>, Ph.Eur.2.4.8 规定中的限制测试，重金属分析采用的是硫化物沉淀法。这项超过 100 年的旧版操作规程是不明确的，而且不允许确定具体的量化结果。终于，经过一段密集的发展期后，在相关的法律法规中，过时的湿法化学分析已逐步被现代仪器分析取代。

由于 ICP-OES 和 ICP-MS 的使用，随之相关的样品前处理技术，例如微波辅助消解，目前已成为定量元素分析的主流前处理方式。

国际协调会议-ICH

自从 2014 年 12 月，ICH 指导手册中 Q3D 步骤 4 生效，并且市场中的所有产品都必须遵循遵循（从 2018 年 1 月开始，新的提案已提交并且已获批准）。

该指导根据元素杂质的毒性和它们在药物中产生毒性的可能性，将其分为四类 – 1, 2A, 2B 和 3，并且详细说明了元素的种类，剂型（口服，注射以及吸入）以及允许日常接触量（PDE）。

值得注意的是，等级 1 中的 Cd, Pb, As, Hg 和等级 2 种的 Co, V, Ni。它们是人体致毒物，所有 PDE 较低。对于这些元素，即使这些金属没有人为添加，也必须进行风险分析，以防超过其 PDE。根据这些评估结果，定义一个合理的控制策略，从没有任何分析到定期研究，再到最终成品的理性测试。

美国药典-USP

2015 年 12 月，USP 232 章节中元素杂质-限制和 233 章节元素杂质-规程正式生效，并在 2018 年 1 月，已经取代了所有对旧 USP 的引用。232 章节中所规定的限制完全符合 ICH Q3D 的要求。

对于膳食补充剂，USP 章节<2232>自从 2013 年 8 月已正式生效。它参考了 USP<233>关于全元素污染物的分析规程，也自 2018 年 1 月起开始执行。

欧洲药典-Ph.Eur.

欧洲药典委员会决定重新逐字修订 Ph. Eur. chapter 5.20 中的 ICH Q3D 指导方针，自 2018 年 1 月开始，欧盟市场上的所有现有产品都需考虑此问题。

1.2 Multiwave 7000 的应用

为了完美演示 Multiwave 7000 优越的消解性能，共选择 4 种代表性药品（包括一种膳食补充剂和一种药物活性成分-API）作为样品进行消解，这 4 种样品覆盖多种配方，并在消解过程中体现不同的反应行为：

止痛药片：包含作为活性成分的乙酰水杨酸和难消化的作为辅料的二氧化硅。

膳食补充胶囊：包含欧米伽-3 脂肪酸和鱼油

感冒糖浆：包含三重活性成分复合物和高含量的酒精，糖分和甘油

烟酸：芳香族药物活性成分，需在 200°C 度以上全消解。

根据 USP<233>，在样本中加入 50% 到 150% 的 J 等级元素标物（样品处理后的目标浓度需稀释至分析仪器的的工作范围内）。为了评估这些水平，我们考虑了产品的包装单上所列的每一份的 PDE 和每日剂量的最大剂量。对于烟酸，每日最大剂量为 10 g/天。

通过计算被测元素的回收率（未加标和加标）来评价仪器的消解性能。由于 Cd, Pb, As, Hg 的允许日常接触剂量值较低，重点考察这 4 种元素。由于 As, Hg 化合物具有挥发性，故对它们的分析要求较高。

2 仪器



Figure 1: Multiwave 7000



Figure 2: Rack 18 for Multiwave 7000

采用 Multiwave 7000 微波消解仪，配备 18 位支架（可配 18ml 石英管和 18ml PTFE-TFM 管）来进行样品的消解。

采用 ICP-MS 作为定量分析手段，Agilent 7900 和 8800，配备碰撞反应池。

3 实验

3.1 样品

止痛药片

- 活性成分：
乙酰水杨酸
- 辅料：
二氧化硅，碳酸钠，巴西棕榈蜡，羟丙甲纤维素，硬脂酸锌

膳食补充胶囊

- 配方
70.4% 鱼油浓缩液（至少 50% 三文鱼油，明胶，甘油，维生素 E）

感冒糖浆

- 活性成分：
琥珀酸多西拉敏，麻黄碱半硫酸盐，氢溴酸右美沙芬，对乙酰氨基酚（扑热息痛）
- 辅料：
纯水，蔗糖（27.5 g/100 ml），96% 乙醇（共 18 vol%），甘油，聚乙二醇 6000，无水柠檬酸钠，一水柠檬酸，苯甲酸钠，茴香脑，喹啉黄，孔雀蓝

烟酸: API

消解和加标实验

各样品加标和未加标共做 3 份。

下表显示了 USP<232> 规定的口服剂量限制：

USP 232 中的 PDE 限制	口服 PDE [ug/day]
Cd	5
Pb	5
As	15
Hg	30

Table 1: PDL limits, oral dosage form

通过计算得到，每类样品的 4 种元素的限值[ug/g]:

	止痛药片	膳食补充 胶囊	膳食补充 胶囊	API:烟酸	
每日最大剂量	6 片	2 个	30ml	10g*)	
单位剂量质量 [mg]	660	710	1120**)	-	
每日最大剂量[g]	4	1.4	34	10	
目标限值 [ug/g]	Cd	1.26	3.52	0.149	0.500
	Pb	1.26	3.52	0.149	0.500
	As	3.79	10.6	0.446	1.50
	Hg	7.58	21.1	0.893	3.00

Table 2: Target limits

*) 含烟酸作为 API 的成品被认为每天剂量为 10 毫克/天。

**) 大约 1g/ml

每种元素的 **J level** 也考虑每种产品的样品量和消化后的稀释程度，等同于样品处理后的元素浓度。下表显示了各样品在进入 ICP 测量的最终稀释之前各元素的浓度，因为加标时应用了不同的稀释因子。这些不同的稀释因子 (1:10 到 1:200) 是由于在 ICP 测量时，溶液中 Hg 的含量不能超过 5ug/L。

	止痛药片	膳食补充 胶囊	膳食补充 胶囊	API:烟酸	
称样量	1 片 约 660mg	1 个 约 710mg	1ml 约 1120mg	500 mg	
消解后定容体积 [mL]	20	20	20	20	
J level [ug/g]	Cd	41.7	125	8.33	12.5
	Pb	41.7	125	8.33	12.5
	As	125	375	25.0	37.5
	Hg	250	750	50.0	75.0

Table 3: J level

在消解前，分别加入 1,10,100mg/L 的 Cd, Pb, As 和 Hg 标准溶液至已称量好的样品，以获得 50%, 100% 和 150% 的加标溶液 (J level)。每种加标溶液用 10% HNO3 通过 1000 mg / L 储备溶液的重量稀释制备。

所使用的试剂量如下表所示:

	止痛药片	膳食补充 胶囊	膳食补充 胶囊	API:烟酸
H2O*)	1.4	1.4	1.4	5
HNO3	5	7	3	5

HF	0.5**)	-	-	-
HCl***)	1	1	1	1

Table 4: Used Amounts of Reagents

*) H2O 的体积适用于未加标样品。对于加标样品，加入相应体积的水以达到总共相同的体积。(加标量和加水量= 1.4mL)

**) 一组 (未加标, 加 50%, 100%, 150%) 加 HF, 一组不加

***) 盐酸在消解后加入

试剂加入顺序按照表格顺序加入

在样品管中加入样品，标液和试剂后，盖上插入式盖子。在将小瓶放入 Rack 18 之前，将所有样品在振荡器上充分混合。

一旦放热反应开始，冷糖浆必须在流水下冷却。当样品颜色从橙色变为绿色时，冷却即可停止。

在 TFM 内管中加入载荷液 (5ml HNO3 和 150ml H2O) 后，将支架 Rack 18 放入。将内管放置于加压消解腔内，开始程序。

冷却结束后，将支架拿出，可适当滴加 1ml HCl 从而稳定 Hg。随后，将样品转移，定容至 20ml 待分析。

根据不同的加标 J level，稀释倍数可从 10 倍至 200 倍，稀释液为 1%HCl 和 10%HNO3。

3.2 温度程序

起始压力: 30 bar

冷却温度: 80°C

压力释放速率: 10 bar/min

步骤	时间 [min]	温度 [°C]
1	17	250
2	8	250

Table 5: Temperature program

4 结果

不仅仅是涉及到过程验证中的限制 (70%-150% 的加标回收率，相对标准偏差 RSD 不超过 20%)，也考察了其绝对值，此研究获得了较好的结果 (见 Fig.4 和 Fig.5)。大体上看，回收率: 101 % Cd, 93 % Pb, 102 % As and 97 % Hg。每个元素的平均 RSD 在 2%。

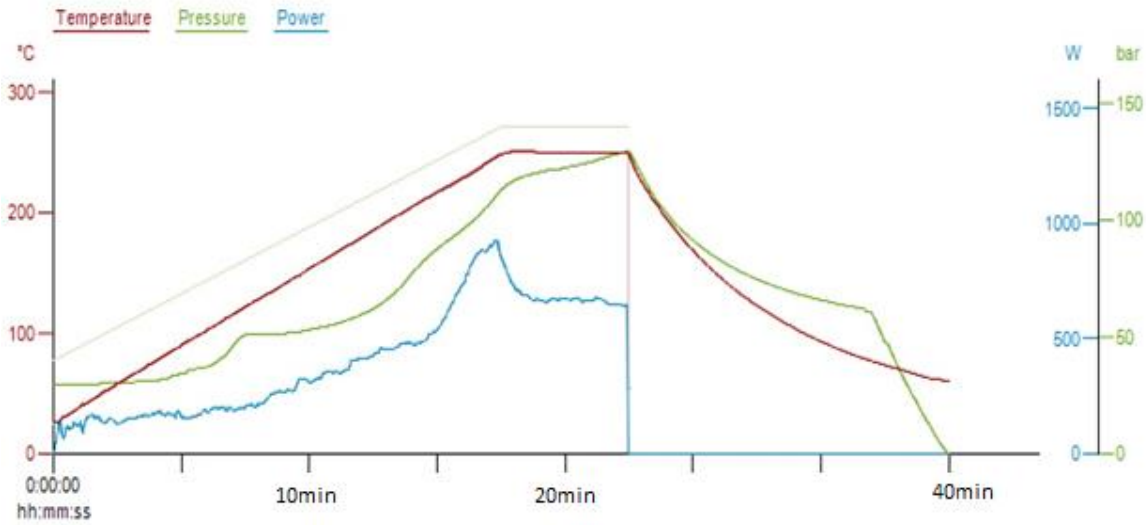


Figure 3: Run data

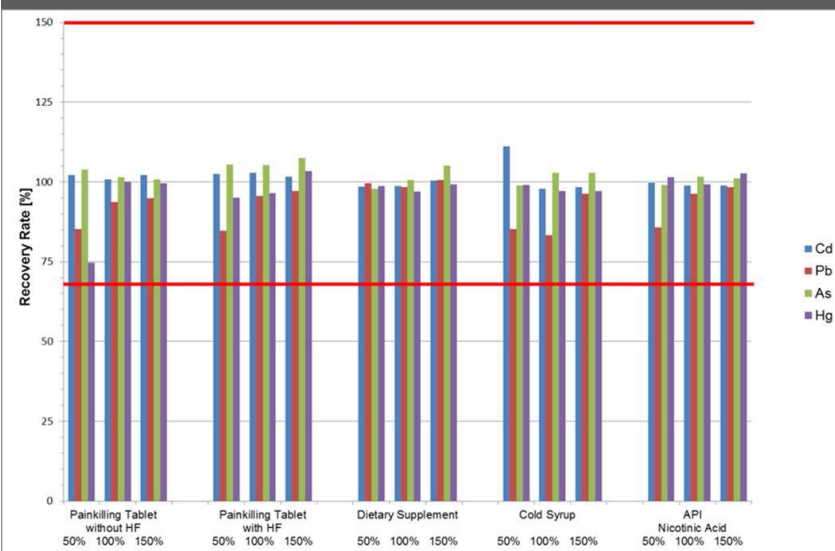


Figure 4: Recovery rates for all products and spiking levels

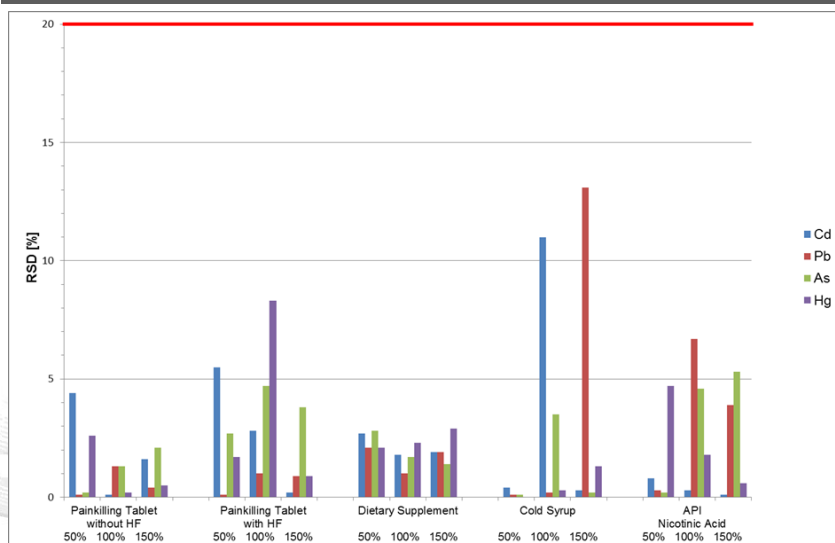


Figure 5 :RSDs for all products, rotors and spiking levels

ICP 的标液的定量限是由 0.05 µg/L Cd, 0.02 µg/L Pb , 0.1 µg/L for As 和 Hg 来确定的。

4.1 结果-止痛药片

SAMPLE / Spiking Level		Cd [µg/g]	Pb [µg/g]	As [µg/g]	Hg [µg/g]
Unspike		< 0.04 (LOQ)	0.05	< 0.09 (LOQ)	< 0.09 (LOQ)
50 % of Target Limit	Measured Value	0.61	0.54	1.88	2.74
	Theoretical Value	0.60	0.64	1.81	3.68
	Recovery [%]	102	85.2	103	74.6
	RSD [%]	4	0.1	0.2	2.6
100 % of Target Limit	Measured Value	1.20	1.16	3.70	7.33
	Theoretical Value	1.20	1.24	3.65	7.32
	Recovery [%]	100.7	93.7	102	100.1
	RSD [%]	0.1	1.3	1	0.2
150 % of Target Limit	Measured Value	1.87	1.72	5.53	11.01
	Theoretical Value	1.83	1.82	5.48	11.06
	Recovery [%]	102	94.9	101	99.6
	RSD [%]	2	0.4	2	0.5

Table 6: Recovery Rates for Painkilling Tablet, digested without HF (n=3)

量化极限根据称量转换为浓度值，稀释后的样品 Cd < 0.04 µg/g , Pb < 0.02 µg/g, As 和 Hg < 0.09 µg/g。因为未加标的样品没有显示任何元素（除 Pb）的信号峰，故以加标回收率作为考察项目。尽管消解后的液体有少量的残留，可能是由于 SiO₂ 未完全消解，

但是每种元素的加标回收率都在 75%到 104%之间，相对标准偏差未超过 4.4%。

当加入 0.5 ml 的 HF，消解后的液体未出现任何沉淀。在此条件下，回收率在 85%-108%之间，RSD 低于 8.3%。故当加入 HF 后，对样品的结果会有些微改善。

4.2 结果-膳食补充胶囊

SAMPLE / Spiking Level		Cd [µg/g]	Pb [µg/g]	As [µg/g]	Hg [µg/g]
Unspike		< 0.04 (LOQ)	0.06	< 0.09 (LOQ)	< 0.09 (LOQ)
50 % of Target Limit	Measured Value	1.72	1.82	5.19	10.52
	Theoretical Value	1.75	1.83	5.30	10.66
	Recovery [%]	98.5	99.6	97.8	98.7
	RSD [%]	2.7	2.1	2.8	2.1
100 % of Target Limit	Measured Value	3.48	3.54	10.62	20.41
	Theoretical Value	3.53	3.60	10.56	21.04
	Recovery [%]	98.7	98.4	101	97.0
	RSD [%]	1.8	1.0	2	2.3
150 % of Target Limit	Measured Value	5.28	5.32	16.76	31.14
	Theoretical Value	5.26	5.29	15.94	31.39
	Recovery [%]	100	101	105	99.2
	RSD [%]	2	2	1	2.9

Table 7: Recovery Rates for Dietary Supplement Capsule, (n=3)

考虑到样品的称量和稀释倍数，各元素的量化极限如下：
Cd < 0.04 µg/g, Pb < 0.02 µg/g, As 和 Hg < 0.09 µg/g。除了 Pb，未加标的样品没有显示任何元素的信

号峰，故以加标回收率作为考察项目。各元素的回收率在 97%-105%之间，RSD 低于 2.9%。

4.3 结果-感冒糖浆

SAMPLE / Spiking Level		Cd [µg/g]	Pb [µg/g]	As [µg/g]	Hg [µg/g]
Unspike		< 0.03 (LOQ)	0.02	< 0.05 (LOQ)	< 0.05 (LOQ)
50 % of Target Limit	Measured Value	0.08	0.08	0.22	0.43
	Theoretical Value	0.07	0.10	0.22	0.44
	Recovery [%]	111.2	85.2	98.8	99.1
	RSD [%]	0.4	0.1	0.1	0.0
100 % of Target Limit	Measured Value	0.14	0.13	0.45	0.86
	Theoretical Value	0.15	0.16	0.44	0.88
	Recovery [%]	97.8	83.3	103	97.2
	RSD [%]	11	0.2	4	0.3
150 % of Target Limit	Measured Value	0.21	0.23	0.67	1.27
	Theoretical Value	0.22	0.24	0.65	1.31
	Recovery [%]	98.3	96	102.9	97.1
	RSD [%]	0.3	13	0.2	1.3

Table 8: Recovery Rates for Cold Syrup, (n=3)

各元素加标回收率在 83%-111%之间，RSD 不超过 13.1%。

4.4 结果-API:烟酸

SAMPLE / Spiking Level		Cd [µg/g]	Pb [µg/g]	As [µg/g]	Hg [µg/g]
Unspike		< 0.06 (LOQ)	0.05	< 0.12 (LOQ)	< 0.12 (LOQ)
50 % of Target Limit	Measured Value	0.24	0.24	0.72	1.47
	Theoretical Value	0.24	0.28	0.72	1.45
	Recovery [%]	99.8	85.8	99.1	101.4
	RSD [%]	0.8	0.3	0.2	4.7
100 % of Target Limit	Measured Value	0.48	0.50	1.48	2.91
	Theoretical Value	0.48	0.52	1.45	2.94
	Recovery [%]	98.9	96.3	102	99.3
	RSD [%]	0.3	6.7	5	1.8
150 % of Target Limit	Measured Value	0.72	0.73	2.26	4.53
	Theoretical Value	0.73	0.74	2.23	4.42
	Recovery [%]	98.8	98.3	101	103
	RSD [%]	0.1	3.9	5	1

Table 9: Recovery Rates for API, Nicotinic Acid, (n=3)

各元素加标回收率在 86%-103%之间，RSD 不超过 7%。

5 结论

采用 Multiwave 7000 微波辅助密闭消解，结合 ICP-MS 成功验证了四中不同药物产品（包括一种膳食补充剂和一种活性成分）。回收率在 75 % 到 111 % 之间（平均 98%），平均相对偏差低于 2.2%。USP<232>规定回收率在 70% 到 150%之间，RSD 不超过 20%。

安东帕 Multiwave 7000 可根据所有当前法规要求（ICH, USP, Ph.Eur）为样品制备过程测定元素杂质提供了一个可靠，功能强大且完全符合 GMP 标准的系统。该仪器根据 USP <1058>和 GAMP 5 提供符合 FDA 21CFR Part 11 的软件和意义非凡的药品资质文件。

Contact Anton Paar GmbH

Tel: +43 316 257-0

application@anton-paar.com | www.anton-paar.com