

ICP-Mass Spectrometry

作者:

Lee Davidowski

Ewa Pruszkowski

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT USA

NexION 300X ICP-MS与 prepFAST自动稀释/校准联用 系统分析新实药典 (USP) 中杂质元素

引言

2012年4月,美国药典(USP)推出了一个全新的ICP-OES / ICP-MS方法测定医药产品中金属污染物。该法归纳了章节< 232 >和< 233 >题为“元素杂质-限量和步

骤”^{1,2}, 取代了基于金属硫化物沉淀的重金属测定方法的第< 231 >章节, 新方法是一个相对先进的Pb测定标准³。尽管原有的测试方法已经使用了一百多年, 也为更多的人所接受, 并已被证明了容易出错, 且需要熟练的分析师来准确地判断颜色。

本研究将侧重于NexION 300X ICP-MS与prepFAST在线联用完成自动稀释、自动校准功能, 并用于测定各种医药产品中与毒理相关的一组有害元素。并会给USP方法综述, 尤其强调杂质水平和所推荐的分析方案。还将测定一些常见的医药产品, 如口服, 静脉注射和吸入等方式的药物, 基于USP方法验证本法的分析性能、系统的优点等。

医药产品中杂质元素

UPS< 232 >章节指定的列表元素及其毒性限制, 定义为不同药物类别的最大每日剂量-口服、注射(静脉注射), 吸入和大剂量注射。而< 233 >章节规定了测定元素时的样品制备、分析步骤和QC验证协议, 另外包括电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-OES)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS) 或相当完全可靠的其它替代技术。下面让我们更详细的看看这两章。

< 232 >章节

表1显示了每日最大容许剂量(PDE) 值(单位 $\mu\text{g}/\text{天}$), 基于“平均”50公斤的一个人⁴。杂质元素的毒性与生物利用率相关。“慢性”暴露的程度决定了每个杂质元素按照兴趣分为三个路线: 口服、静脉(注射) 和吸入。当每日注射的剂量> 100毫升, 必须通过控制用于生产药物产品的单个成分的元素数量。此为大容量注射剂(LVP) 成分(单位 $\mu\text{g}/\text{天}$) 限制, 表1的最后一列所示即为限量值。

表1药品产品的最大每日容许剂量(PDE) 值(单位 $\mu\text{g}/\text{天}$), 基于“平均”50公斤的个体。

元素	口服日剂量PDE ($\mu\text{g}/\text{天}$)	注射日剂量PDE ($\mu\text{g}/\text{天}$)	吸入日剂量PDE ($\mu\text{g}/\text{天}$)	LVP组分限量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Cd	25	2.5	1.5	0.25
Pb	5	5	5	0.5
无机As	1.5	1.5	1.5	0.15
无机Hg	15	1.5	1.5	0.15
Ir	100	10	1.5	1.0
Os	100	10	1.5	1.0
Pd	100	10	1.5	1.0
Pt	100	10	1.5	1.0
Rh	100	10	1.5	1.0
Ru	100	10	1.5	1.0
Cr	*	*	25	*
Mo	100	10	10	1.0
Ni	500	50	1.5	5.0
V	100	10	30	1.0
Cu	1000	100	70	25

注: *表示无需安全考虑

本章还定义了元素杂质的最大限量值, 主要基于材料最终用量。用于确保药品生产企业对一定范围内的药物杂质分析, 主要基于典型的最大每日剂量 $\leq 10 \text{ g}/\text{天}$ 。这些值应将单个化学物质、活性成分和辅料化合物(填料) 等用于生产最后药品产品的总和都考虑进去, 因为新规定的是为了在药物制造商和原材料供应商之间进行基本讨论。

< 233 >章节

本章节描述了ICP-OES/MS分析方案(含样品预处理) 与之前描述的药物产品中杂质元素测定可靠性^{5,6}。让我们先看看ICP-MS方法与推荐的样品前处理过程。

ICP-MS方法：仪器方法在本质上是非常通用的，无推荐的仪器详细参数或使用最佳的同位素。它主要包含许多QC / QA验证协议，用以确保该方法准确度。指定的方法：

- 目标（元素）的限量（称为“J”值）定义为被评估的杂质元素可接受值，基于体重、剂量和药物使用/管理频率。
- 校准采用两个基体匹配校准标准和一个基体匹配空白。每个元素的标准溶液：高标为两倍(2J)的目标限量，低标为1/2倍 (0.5J) 的目标限量。
- 样品稀释以保证浓度不超过2倍 (2J) 目标限量。
- 样品分析根据仪器制造商所推荐的仪器条件和同位素选择，并采取合适方法校准基体导致的多原子离子干扰。
- 碰撞/反应池可以被用于消除多原子离子干扰。
- 一系列QC验证协议，包括回收率、准确度、精密度和稳定性等参数，确保得到可靠的数据。

样品预处理可以采用以下四种不同的方法：

- 直接分析澄清、未稀释的液态样品。
- 如样品溶于水，可用酸溶液稀释样品。
- 如果样品不溶于水，用适当的有机溶剂稀释。
- 使用密闭微波酸消解消化不溶性的样品。

需要小心选择酸，因为在等离子体中可能产生由基体引入的质谱干扰。

仪器

本研究的目的是评估NexION 300X ICP质谱仪(珀金埃尔默公司, 谢尔顿, CT)与加上prepFAST自动稀释和自动校准系统(元素科学公司, 奥马哈市东北)的联用可行性。前人的文献中已对NexION 300技术进行了描述, 但它是基本的ICP-MS系统可提供简单方便的一个传统碰撞池, 加上一个真正通过反应得到低检测限的反应池技术。使用专利的通用电池技术™ (UCT)，用户可根据特定的

的应用选择最合适的碰撞或反应池技术。结合仪器独特的三锥接口 (TCI) 和四极离子偏转 (QID) 技术, 使仪器漂移最小化, 接口区的污染减少, 日常维护和清洁次数减少至最低。NexION 300X ICP-MS为单通道的仪器, 除标准(常规) ICP-MS操作模式⁷, 仪器选用单一池气体来完成碰撞模式或反应模式。

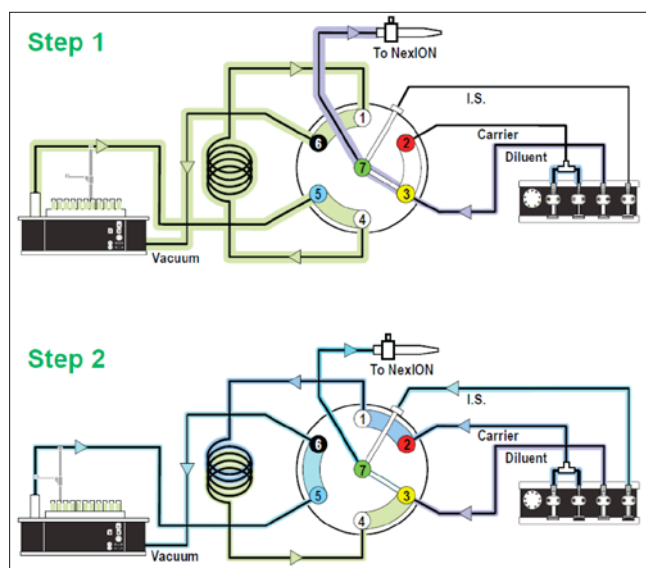


Figure 1. The prepFAST system illustrating a two-step process of loading sample into a loop and in-line dilution.

prepFAST一个自动稀释系统,可完全匹配NexION 300X ICP-MS用于自动稀释样品和标准储备液⁸。真空系统快速和重现地将分析溶液从自动进样器位置加载至定量样品环中。该过程如图1所示,当注射器重置至步骤1,样品环被样品迅速(真空)冲洗并加载,同时ICP-MS雾化器和雾化室被载液冲洗;步骤2,样品沿着流路在内阀中与稀释剂(第3口)和内标溶液(第7口)混合后进入NexION ICP-MS中。注射泵可保证所有溶液地准确度与稀释精度,同时确保总流速维持不变。稀释、内标加入和各种混合均在线发生在混合阀中。高分辨的基于注射传输系统保证精确的稀释倍数,同时维持总样品流速。该系统用于NexION 300自动校准溶液和在线稀释样品。该法在高通量药物测试实验室中的优势包括:

- 实时稀释倍数达到200倍
- 稀释阀内完成
- 消除手动稀释步骤带来误差
- 减少高稀释因子时试剂用量
- 快速提升和清洗
- 降低污染的风险

药物产品评价

调查药物列于表2,代表了表1中指定的三类不同的药物产品-口服、吸入和大剂量注射(静脉注射)。

表2 本研究评价药物列表

药物	类型	形态	样品预处理	稀释因子
关节炎疼痛的药物	口服	药片	微波消解	1g至50mL
感冒和流感治疗药物	口服	粉状	电热板消解	1g至50mL
过敏症和哮喘喷雾剂(a)	吸入	溶液	稀释	1g至50mL
乳酸林格氏液(b)	大剂量注射	溶液	稀释	1g至50mL

(a) 过敏症和哮喘喷雾剂含有大量公认的顺势疗法的药物包括碳酸铵、苦芥锑、金属态锡、烷基氯和碳酸钾。

(b) 乳酸林格氏液是一种与人类血液具有相同渗透压和粘度的液体,用于静脉注射的药物化合物。该溶液溶液有多种,但通常含有钠、钾和/或氯化钙(~1%),以乳酸钠和葡萄糖的形式存在的乳糖溶液。

样品前处理

取1克样品,用溶解于2%硝酸与0.5%HCl的混酸溶液中。关节炎疼痛的药物碎成粉末并采用Multiwave 3000微波消解系统(珀金埃尔默公司,谢尔顿,CT)消解,最终稀释至50mL。感冒和流感治疗药物溶解于混合酸,并在电热板上加热后稀释至50mL。过敏症和哮喘喷雾剂和乳酸林格氏液各取1g直接稀释至50mL溶液态即可。口服药采用在线prepFAST系统进一步稀释10倍,使最终稀释倍数为500:1。需要强调的是,如果很多不同的药剂的日限量差异太大,导致目标值(J)改变,需要额外的稀释或新建校准曲线。prepFAST在线自动稀释系统的主要优势之一为完全自动化,即无需任何手工稀释。

仪器参数

实验仪器的操作参数列于表3。

表3 分析医药化合物的ICP-MS仪器条件	
部件/参数	型号/值/模式
雾化器	PFA自吸微流
雾化室	石英旋流
三锥接口材质	Ni
等离子体气速	16.0 L/min
辅助气流速	1.1 L/min
雾化气流速	0.99 L/min
样品提升率	400 µL/min
RF功率	1600W
分析物 (He碰撞模式)	⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu , ⁷⁵ As, ⁹⁵ Mo, ¹⁰¹ Ru, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹¹⁴ Cd, ¹⁸⁹ Os, ¹⁹³ Ir, ¹⁹⁵ Pt, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb
内标	⁶⁹ Ga, ⁷⁴ Ge ¹¹⁵ In, ¹⁵⁹ Tb
自动稀释/ 校准系统	ESI prepFAST
重复次数/样	3
测量时间 (重复3次)	1分35秒
分析时间 (样品间)	2分40秒

校准

依据所选元素的目标值 (J) 和不同药物的样品预处理技术, USP规定了校准溶液浓度为1/2 (0.5J) 和2倍 (2J) 目标值。表4显示了口服药的PDE值 (µg/天) 和目标浓度值 (µg/L) , 上述值是基于10g/天日剂量和500: 1的最终稀释倍数 (在线稀释1g/50mL的10倍) 。表4可见, 通过1个标准储备液的在线稀释 (2%硝酸/0.5%盐酸) 获得的所有校准曲线的相关系数优于0.9999。图2-4显示了三种分析物的校准曲线。它们代表了低浓度 (Pb) 、中等浓度 (Ir) 和高浓度 (Cu) , PDE元素杂质。

表4 口服药的允许日剂量 (PDE) 值 (µg/天) 及低、高浓度的标准溶液及各分析物的相关系数					
元素/质量数	口服药PDE (µg/天)	J (µg/L)	0.5J (µg/L)	2.0J (µg/L)	线性 (相关系数)
基于10g/天的日剂量与样品最终的1g/500mL稀释倍数					
Cd 114	25	5	2.5	10	0.999886
Pb 208	5	1	0.5	2	0.999927
As 75	1.5	0.3	0.15	0.6	0.999854
Hg 202	15	3	1.5	6	0.999967
Ir 193	100	20	10	40	0.999980
Os 189	100	20	10	40	0.999977
Pt 195	100	20	10	40	0.999703
Pd 105	100	20	10	40	0.999949
Rh 103	100	20	10	40	0.999914
Ru 101	100	20	10	40	0.999919
Mo 95	100	20	10	40	1.000000
N i60	500	100	50	200	0.999932
V 51	100	20	10	40	0.999898
Cu 63	1000	200	100	400	1.000000

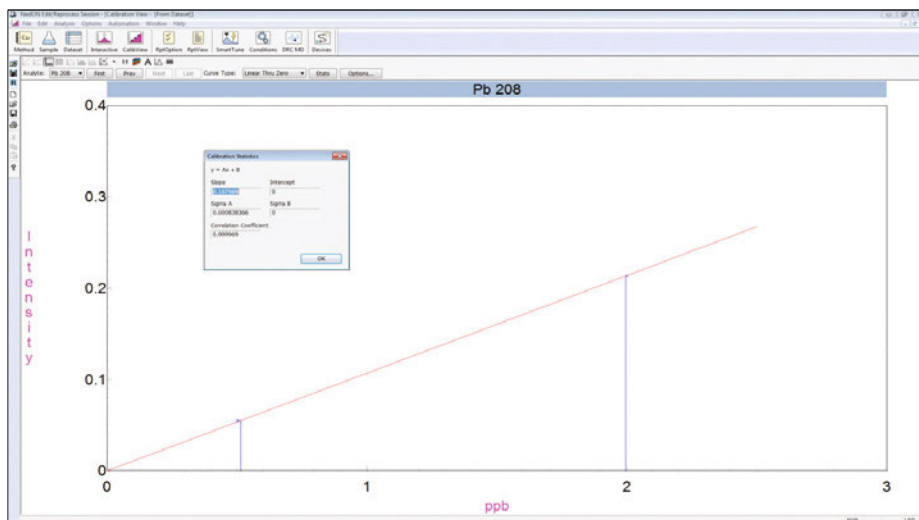


图2 Pb校准曲线，一种低浓度元素杂质 (PDE-5 μ g/天)

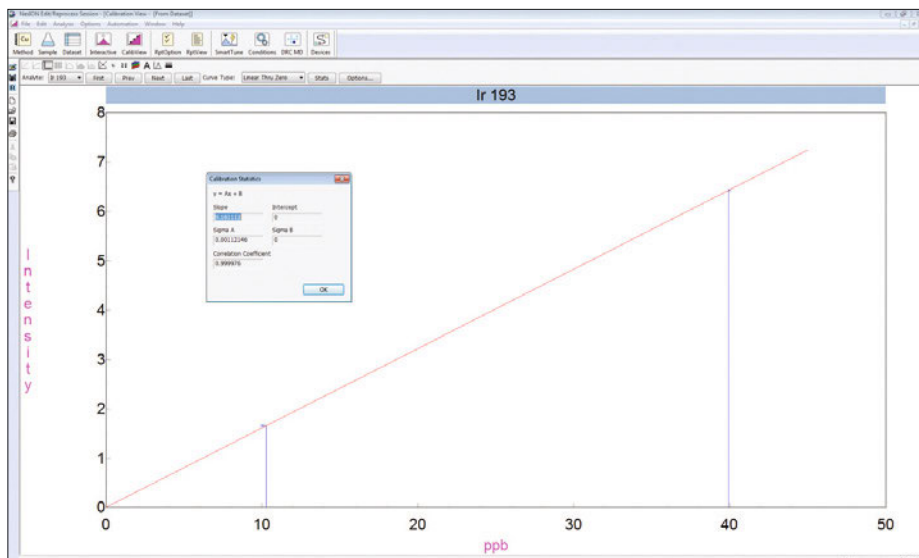


图3 Ir校准曲线，一种中等浓度元素杂质 (PDE-100 μ g/天)

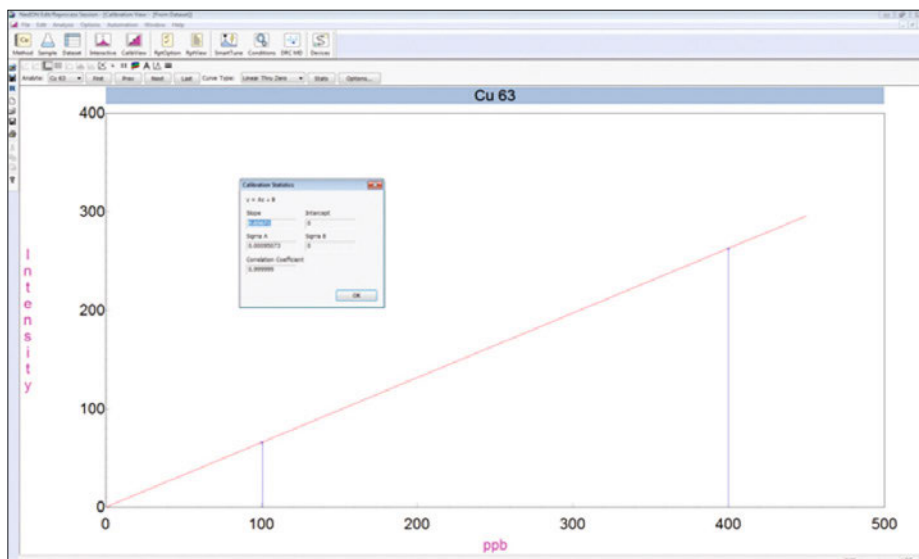


图4 Cu校准曲线，一种高浓度元素杂质 (PDE-1000 μ g/天)

结果

为保证方法的有效性, < 233 >章节还定义了一个QC/QA验证协议, 包括以下测试:

- 方法**准确度**, 通过添加与目标限量值相当的, 适合的浓度水平, 测定回收率%
- 方法**重复性**, 通过测定6个独立的添加了目标限量值的样品, 并测定回收率和精密度
- 方法**皮实耐用性**, 通过对不同日期、不同仪器和不同人员间的重复测定回收率和精密度
- 方法**稳定性**, 通过分析添加与目标限值相当浓度的标准, 分别在一批样品的前后两次分析

对所有四种药物样品中的痕量元素重复分析三次。表5~8分别给出了关节炎疼痛的药物、感冒和流感治疗药物、过敏症和哮喘喷雾剂和乳酸林格氏液中元素杂质浓度, 同时测定了添加80%目标限量 (0.8J) 样品的回收率。药典UPS标准规定每种元素的回收率可接受范围70~150%。每种药物产品的日最大剂量浓度限值、药物 (基于样品质量和稀释因子) 测定方法检测限 (MDL) 等也列于每个表中。相比于元素杂质污染物限量水平, 该法具有很好的检测能力。A<MDL值表示元素含量低于方法检测限。

表5 关节炎疼痛药物中元素杂质浓度、添加0.8J样品的回收率和原始样品的方法检测限

元素	根据口服药的10g/ 天的最大每日剂量 限量值计算出浓度 限量值 (µg/g)	关节炎疼痛药片 测定值 (µg/g)	添加0.8J 回收率(%)	方法检测限 (MDLs), 稀释 500倍 (µg/g)
Cd	2.5	<MDL	103	0.0004
Pb	0.5	0.016	102	0.007
As	0.15	<MDL	110	0.0045
Hg	1.5	<MDL	99	0.0080
Ir	10	0.031	102	0.0005
Os	10	<MDL	105	0.0010
Pd	10	<MDL	97	0.0025
Pt	10	<MDL	103	0.0019
Rh	10	<MDL	102	0.0002
Ru	10	0.006	106	0.0005
Mo	10	0.008	108	0.0029
Ni	50	0.141	105	0.0026
V	10	0.102	109	0.0053
Cu	100	0.011	101	0.0021

表6 感冒和流感治疗药物中元素杂质浓度、添加0.8J样品的回收率和原始样品的方法检测限

元素	根据口服药的10g/ 天的最大每日剂量 限量值计算出浓度 限量值 (µg/g)	感冒和流感治 疗药物测定值 (µg/g)	添加0.8J 回收率(%)	方法检测限 (MDLs), 稀释 500倍 (µg/g)
Cd	2.5	<MDL	105	0.0004
Pb	0.5	0.016	106	0.007
As	0.15	0.006	110	0.0045
Hg	1.5	<MDL	105	0.0080
Ir	10	<MDL	105	0.0005
Os	10	<MDL	105	0.0010
Pd	10	<MDL	98	0.0025
Pt	10	<MDL	105	0.0019
Rh	10	<MDL	105	0.0002
Ru	10	0.002	106	0.0005
Mo	10	<MDL	105	0.0029
Ni	50	<MDL	106	0.0026
V	10	0.054	105	0.0053
Cu	100	<MDL	103	0.0021

需要注意的是样品预处理过程中过敏症和哮喘喷雾剂和乳酸林格氏液使用2%硝酸进行50倍稀释。另外这两个样品中的V、Cr、Ni、Cu、As采用碰撞模式, 其它元素采用标准模式。尽管分析速度稍有降低, 但对于低浓度元素的检测限有所改善。

表7 过敏症和哮喘喷雾剂中元素杂质浓度、添加0.8J样品的回收率和原始样品的方法检测限

元素	根据吸入药的1g/ 天的最大每日剂量 限量值计算出浓度 限量值 (µg/g)	过敏症和哮喘 喷雾剂测定值 (µg/g)	添加0.8J 回收率(%)	方法检测限 (MDLs), 稀释 50倍 (µg/g)
Cd	1.5	<MDL	101	0.0001
Pb	5	<MDL	106	0.0003
As	1.5	<MDL	101	0.0001
Hg	1.5	0.0028	104	0.0002
Ir	1.5	<MDL	104	0.0005
Os	1.5	<MDL	107	0.0010
Pd	1.5	<MDL	102	0.0006
Pt	1.5	<MDL	103	0.0005
Rh	1.5	<MDL	102	0.0002
Ru	1.5	<MDL	100	0.0003
Mo	10	<MDL	103	0.0001
Ni	1.5	<MDL	102	0.0005
V	30	<MDL	104	0.0001
Cu	70	0.00054	102	0.0001

表8 乳酸林格氏液中元素杂质浓度、添加0.8J样品的回收率和原始样品的方法检测限

元素	根据大剂量注射药的浓度限量值 (µg/g)	乳酸林格氏液测定值 (µg/g)	添加0.8J回收率(%)	方法检测限 (MDLs), 稀释50倍 (µg/g)
Cd	0.25	<MDL	101	0.0001
Pb	0.5	<MDL	97	0.0003
As	0.15	<MDL	109	0.0001
Hg	0.15	<MDL	99	0.0002
Ir	1	<MDL	101	0.0005
Os	1	<MDL	102	0.0010
Pd	1	<MDL	95	0.0006
Pt	1	<MDL	101	0.0005
Rh	1	<MDL	101	0.0002
Ru	1	<MDL	101	0.0003
Mo	1	<MDL	106	0.0001
Ni	5	<MDL	92	0.0005
V	1	<MDL	99	0.0001
Cu	25	<MDL	94	0.0001

有效性验证

为更清楚, 选择1种药物样品进行QC验证测试, 本研究选取感冒和流感治疗药物。表9列出了重复性测试结果, 6个不同的感冒和流感药物各自添加了1J, 并通过自动稀释系统进行分析, 测定了%回收率和%RSD。结果清楚表明每种目标元素的%RSD值均在UPS可接受标准<20%RSD范围内。

表9 分别添加了1J的六件感冒和流感治疗药物的回收率 (%) 和精密度 (%)

元素	1#样品 (%Rec)	2#样品 (%Rec)	3#样品 (%Rec)	4#样品 (%Rec)	5#样品 (%Rec)	6#样品 (%Rec)	%RSD
Cd	103	100	103	102	102	104	1.4
Pb	99	98	99	98	99	99	0.6
As	105	102	106	105	106	104	1.8
Hg	105	102	103	102	104	105	1.2
Ir	102	101	101	101	103	103	0.9
Os	100	98	99	100	100	101	0.9
Pd	106	103	106	104	105	107	1.4
Pt	91	90	91	91	92	93	0.9
Rh	109	106	108	106	108	109	1.2
Ru	107	104	106	105	105	107	1.2
Mo	107	105	108	106	106	108	1.2
Ni	107	107	110	108	110	110	1.5
V	106	105	106	105	107	107	0.8
Cu	105	105	107	105	108	108	1.5

表10说明了方法的耐用性, 实验添加1J的感冒和流感治疗药物, 采用相同的样品前处理步骤分别三天测试。结果表明每个目标元素的%RSD值均在UPS可接受标准25%范围内。

表10 方法的耐用性, 即添加1J的感冒和流感药物样品分别三天周期内测试的回收率和精密度

元素	1#样品 (%Rec)	2#样品 (%Rec)	3#样品 (%Rec)	%RSD
Cd	102	100	103	1.2
Pb	98	100	101	1.0
As	105	103	107	1.6
Hg	104	106	106	1.0
Ir	102	104	103	0.8
Os	100	96	92	3.3
Pd	105	102	104	1.4
Pt	91	100	97	3.8
Rh	108	102	103	2.4
Ru	106	100	102	2.3
Mo	107	101	103	2.1
Ni	109	101	100	3.8
V	106	101	100	2.7
Cu	106	103	102	1.7

方法的长期稳定性见图5, 不采用内标添加1J水平的样品的7.5小时的稳定图。UPS对长期稳定性测试并无特别的说明, 仅表示在分析所有样品前和后的漂移可接受范围。7.5小时时间段的测试不仅代表一个典型的工作日运行时间, 也考察了在不使用任何内标信号补充下的仪器偏移特性。长期稳定性测试是一种公认的用于评价仪器的接口区域和离子透镜能否分析真实样品基体。结果表明每个目标元素的% RSD值均在USP可接受标准RSD< 20%范围内。

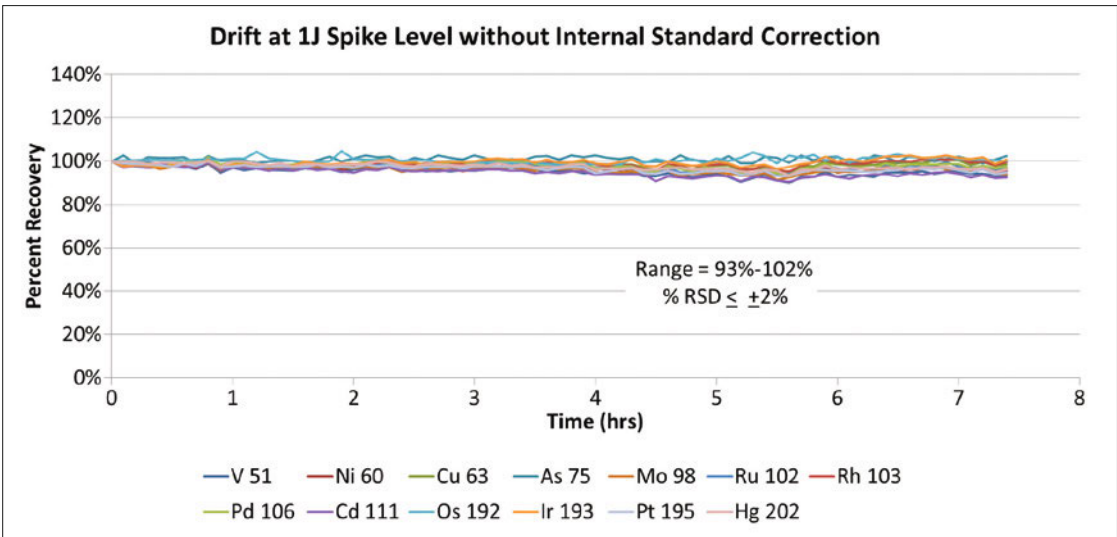


图5感冒和流感治疗药物中添加了1J15个元素的7.5小时长期稳定性图。所列数据均无内标校正证实了本系统优异的稳定性。

结论

本研究展示了采用NexION 300 ICP-MS与prepFAST自动在线稀释/校准样品的联机系统是一种理想的分析医药产品方法, 本法主要依据药典UPS的新章节<232> 和 <233>对元素杂质的法规要求。该技术能够很好完成<232>章中规定的四种主要药物的允许限日剂量 (PDE)。本研究的结果证实了此仪器可容易的达到<233>章节中所规定的质量控制和有效验证协议。

另外, 使用在线自动稀释/校准样品传递系统所建立的方法, 对于满足高通量检测的药物分析实验室非常合适, 通过自动完成耗人力的标准溶液配制、样品稀释和内标加入。而且, 可明显地降低人员的操作误差, 样品、标准或空白的沾污, 因为这些过程均由在线、非人工的系统完成。

参考文献

1. United States Pharmacopeia General Chapter <231> *Heavy Metals Test* in USP National Formulary (NF).
2. United States Pharmacopeia General Chapter <232> *Elemental Impurities – Limits*: 2nd Supplement of USP 35-NF 30.
3. United States Pharmacopeia General Chapter <233> *Elemental Impurities – Procedures*: 2nd Supplement of USP 35-NF 30.
4. United States Pharmacopeia General Chapter <1151> *Pharmaceutical Dosage Forms – Routes of Administration* in USP National Formulary (NF).
5. United States Pharmacopeia General Chapter <730> *Plasma Spectrochemistry Method* in USP National Formulary (NF).
6. United States Pharmacopeia General Chapter <1225> *Validation of Compendial Procedures* in USP National Formulary (NF).
7. E. Pruszkowski, C. Bosnak, The Analysis of Drinking Waters by U.S. EPA Method 200.8 Using the NexION 300X ICP-MS in Standard and Collision Modes, PerkinElmer Inc. Application Note.
8. PrepFAST On-line Auto-dilution and Auto-calibration Sample Delivery System: Elemental Scientific Inc. Application Note.

致谢

珀金埃尔默非常感谢元素科学公司 (ESI) 的Paul Field博士, Austin Shultz和Kyle Uhlmeyer, 他们对本工作作出了很大的贡献。ESI提供了高质量、革新的技术如prepFAST系统用于与珀金埃尔默痕量金属仪器进行联机。

珀金埃尔默仪器 (上海) 有限公司
地址: 上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表, 请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2013, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。