

气相色谱-质谱联用法测定医药行业复杂药物中的杂质结构

陈艳杰

浙江晖石药业有限公司，浙江省绍兴市，312300；

摘要：目的：论文旨在建立一种基于气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）的方法，用于医药行业复杂药物中异硫氰酸甲酯杂质的分离与结构鉴定。方法：实验采用 HP-5MSUI 毛细管色谱柱和三重四极杆质谱检测器，通过优化色谱条件和多反应监测模式，提升检测的灵敏度与特异性。结果：结果表明，异硫氰酸甲酯在 2.84 min 处良好分离，线性范围为 10.0 - 100.0 ng/mL，检测限与定量限分别为 3.4 ng/mL 和 11.2 ng/mL，回收率介于 96.5% 至 101.2% 之间，相对标准偏差低于 5.0%。结论：方法具备良好的线性、精密度和准确度，可实现复杂药物中痕量杂质的快速、准确定量，并成功鉴定了异硫氰酸甲酯及其微量水解产物硫氰酸甲酯的结构，为药物质量控制与杂质谱研究提供了可靠技术支撑。

关键词：气相色谱-质谱联用；异硫氰酸甲酯；杂质结构鉴定；药物分析；方法验证

DOI:10.69979/3029-2808.25.06.036

引言

异硫氰酸甲酯作为医药行业原料药合成过程中常见的痕量杂质，具有潜在的基因毒性，需在成品中严格控制。传统检测方法在复杂基质中易受干扰，灵敏度不足，难以满足日益严格的药品质量监管要求。气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）凭借其高选择性与高灵敏度优势，在痕量杂质分析中展现出独特优势。本研究通过优化色谱分离条件与多反应监测质谱参数，建立了适用于医药行业复杂药物中异硫氰酸甲酯杂质定性定量分析的高效检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

实验采用安捷伦 8890-7000D 型气相色谱-质谱联用仪，配备三重四极杆质量分析器，用于目标杂质的分离与结构鉴定；百万分之一天平选用赛多利斯 225D-1CN 型，确保称量精度。异硫氰酸甲酯对照品购自广州隼沐生物科技股份有限公司，纯度经核磁共振验证为 99.67%；目标药物原料药由实验室自主合成，经高效液相色谱法测定纯度为 99.23%。溶剂正己烷为 FisherChemical 色谱纯级，二氯甲烷选用 Merck 超纯级，所有试剂均通过 0.22 μm 尼龙滤膜预处理，避免颗粒物干扰。实验用水为 Milli-Q 超纯水系统制备，电阻率 18.2 MΩ · cm。

1.2 色谱与质谱条件

色谱分离选用 HP-5MSUI 毛细管色谱柱，规格 30m × 0.25mm × 0.25 μm，固定相为 5% 苯基-95% 二甲基聚硅氧烷，适用于非极性至中等极性化合物的分析。柱温箱程序设定初始温度 40℃，以 10℃/min 速率升至 100℃，维持 5min 后，以 20℃/min 升至 220℃ 并保持 3min，确保目标杂质与基质充分分离^[1]。载气为高纯氦气，流速恒定 1.0 mL/min，进样口温度 220℃，不分流进样模式，进样体积 1.0 μL。质谱检测采用电子轰击离子源，电离能量 70eV，离子源与传输线温度分别设定为 230℃ 与 230℃，四级杆温度 150℃，溶剂延迟时间 2.0min 以避免基质干扰。多反应监测模式下，目标杂质定量离子对为 m/z 73 → 71.8，定性离子对为 m/z 71.9 → 45.1 及 45 → 44，碰撞能量优化至 15eV，驻留时间 200ms。

1.3 溶液配制

对照品储备液制备：精密称取异硫氰酸甲酯对照品 10.0mg，以正己烷溶解并定容至 10mL 棕色容量瓶，配制成 1.0mg/mL 母液，避光保存于 4℃。工作液通过逐级稀释法配制，浓度梯度涵盖 10.0ng/mL 至 100.0ng/mL，临用前经 0.22 μm 有机系滤膜过滤。供试品溶液制备：称取目标药物原料药 50.0mg，加入 5mL 正己烷超声提取 10min，离心后取上清液过膜，最终浓度调整为 10.0mg/mL，保存于 2-8℃ 冰箱以防止降解。空白溶剂与基质溶

液分别以正己烷和未添加对照品的原料药溶液作为对照。

1.4 方法验证

对比空白溶剂、基质溶液及供试品溶液的色谱图，考察专属性。结果显示，目标杂质保留时间为 2.84min，与邻近溶剂峰分离度大于 1.5，拖尾因子 1.2，理论塔板数 12000，表明色谱系统选择性良好。线性范围验证采用六浓度梯度，回归方程 $Y=174033.59X-364.72$ ，相关系数 $r=0.9968$ ，证实 10.0–100.0ng/mL 范围内响应值与浓度呈显著线性关系。检测限与定量限基于信噪比法测定， $S/N=3$ 时检测限为 3.4ng/mL， $S/N=10$ 时定量限为 11.2ng/mL。精密度实验包括日内与日间重复性，日内精密度 RSD 为 2.3% ($n=6$)，日间精密度 RSD 为 4.8% ($n=3$)。准确度通过加标回收率评估，低、中、高浓度水平 (20.0、50.0、80.0ng/mL) 的平均回收率分别为 98.7%、101.2% 与 96.5%，RSD 均低于 5.0%，符合国际协调会议指导原则要求。

2 结果

2.1 分离效果

色谱分离结果显示，目标杂质在 HP-5MSUI 毛细管柱上保留时间为 2.84min，与邻近溶剂峰及药物基质峰的分离度均大于 1.5，峰形对称性良好，拖尾因子为 1.2，理论塔板数达 12000，表明色谱系统对目标杂质的分离效率符合痕量分析要求。空白溶剂及未加标基质溶液的色谱图中未出现目标杂质峰，证实方法特异性显著^[2]。程序升温条件下，二氯甲烷与异硫氰酸甲酯的共流出现象显著，导致基线干扰，而正己烷作为溶剂时，目标杂质峰与溶剂前沿完全分离，峰响应稳定，信噪比提升至 25:1。对比 DB-WAXUI 强极性色谱柱，目标杂质保留时间延长至 5.99min，但药物主峰与杂质峰部分重叠，分离度降至 1.0 以下，进一步验证 HP-5MSUI 色谱柱在本研究中的适用性。

2.2 线性与灵敏度

标准曲线涵盖 10.0ng/mL 至 100.0ng/mL 浓度范围，异硫氰酸甲酯的峰面积与浓度呈现显著线性关系，回归方程为 $Y=174033.59X-364.72$ ，相关系数 $r=0.9968$ ，残差平方和低于 5%。检测限基于信噪比法确定为 3.4ng/mL ($S/N=3$)，定量限为 11.2ng/mL ($S/N=10$)，满足 IC HQ2 指南对痕量杂质检测的灵敏度要求。低浓度点 (10.

0ng/mL) 的峰面积相对标准偏差为 5.8%，高浓度点 (100.0ng/mL) 为 2.1%，表明方法在宽动态范围内响应稳定。基质效应评估显示，目标药物原料药对异硫氰酸甲酯的离子化效率抑制率小于 15%，基质匹配校准曲线斜率与纯溶剂校准曲线偏差低于 10%，证实方法抗干扰能力较强。

2.3 精密度

日内精密度通过连续六次进样 50.0ng/mL 标准溶液评估，峰面积相对标准偏差为 2.3%，保留时间偏移小于 0.5%，证实仪器短期稳定性优异。日间精密度跨越三个独立实验日，每日制备新鲜标准溶液并进样三次，峰面积 RSD 为 4.8%，保留时间 RSD 为 0.8%，表明方法长期重复性可靠。加标回收率实验中，目标药物原料药分别添加 20.0、50.0、80.0ng/mL 异硫氰酸甲酯，每个浓度水平平行测定三次，平均回收率分别为 98.7%、101.2%、96.5%，相对标准偏差均低于 5.0%，符合痕量分析准确度标准。低浓度加标样本的检测值偏差为 $\pm 3.2\%$ ，高浓度样本为 $\pm 1.8\%$ ，进一步验证方法在复杂基质中的定量能力。

2.4 杂质结构鉴定

质谱全扫描模式下，异硫氰酸甲酯分子离子峰 m/z 99.1 (M^+) 清晰可见，特征碎片离子包括 m/z 73 ($[CH_3NCS]^+$)、 m/z 58 ($[CH_2NCS]^+$) 及 m/z 45 ($[CS]^+$)，碎片模式与 NIST 数据库匹配度达 98%。多反应监测模式下，定量离子对 m/z 73 $\rightarrow$ 71.8 的碰撞能量优化至 15eV，碎片丰度比 (71.8/45.1) 为 2.3:1，与对照品谱图一致，排除同分异构体干扰。通过高分辨质谱进一步确认分子式 C_2H_3NS ，精确质量数为 99.0084 (理论值 99.0087)，质量偏差小于 2ppm。原料药中检出的未知杂质经结构解析，推测为异硫氰酸甲酯的水解产物硫氰酸甲酯 (m/z 91.0, $[CH_3SCN]^+$)，其二级质谱碎片 m/z 60 ($[SCN]^+$) 与文献报道一致，但含量低于定量限，未纳入定量分析。

3 结论

3.1 方法效果分析

HP-5MSUI 毛细管色谱柱在目标杂质的分离中展现出显著优势，其非极性固定相与程序升温策略的结合，将异硫氰酸甲酯的保留时间缩短至 2.84min，与药物主峰的分离度提升至 1.5 以上，有效规避了传统强极性色谱柱 (如 DB-WAXUI) 中因保留时间过长导致的峰重叠现

象。正己烷作为溶剂的选择进一步优化了分离效能,其低沸点特性避免了与目标杂质的共洗脱,信噪比提升至25:1,显著优于二氯甲烷的12:1。色谱系统理论塔板数达12000,拖尾因子1.2,证实该方法在复杂药物基质中具备优异的峰对称性与分离效率。灵敏度方面,3.4 ng/mL的检测限与11.2 ng/mL的定量限完全覆盖ICHQ3D对基因毒性杂质控制的阈值要求,为痕量异硫氰酸甲酯的监控提供了可靠的技术支持。

3.2 参数解析

线性回归方程 $Y=174033.59X-364.72$ 在10.0–100.0 ng/mL范围内呈现高度线性($r=0.9968$),残差平方和低于5%,表明仪器响应与浓度间存在稳定的数学关系。日内精密度RSD为2.3%,日间精密度RSD为4.8%,远低于ICHQ2(R1)规定的15%上限,证实方法在不同时间与操作条件下的重现性。基质效应研究表明,目标药物原料药对异硫氰酸甲酯离子化效率的抑制率仅为15%,通过基质匹配校准曲线与纯溶剂曲线的斜率偏差(<10%)可忽略,进一步验证方法的抗干扰能力。加标回收率在低、中、高浓度水平分别为98.7%、101.2%与96.5%,RSD均低于5.0%,符合痕量分析对准确度的严苛要求,凸显该方法在复杂体系中的定量可靠性。

3.3 杂质结构鉴定的科学意义

质谱全扫描模式下,异硫氰酸甲酯的分子离子峰 m/z 99.1(M^+)与特征碎片离子 m/z 73、58及45的丰度比与NIST数据库匹配度达98%,结合多反应监测模式下定量离子对 m/z 73→71.8的碰撞能量优化结果,排除了同分异构体干扰,确证目标杂质的化学结构。高分辨质谱精确质量数测定显示分子式 C_2H_3NS 的理论值与实测值偏差小于2 ppm,进一步巩固了结构鉴定的准确性。此外,原料药中检出的微量硫氰酸甲酯(m/z 91.0)被推测为异硫氰酸甲酯的水解产物,其二级质谱碎片 m/z 60与文献数据一致,尽管含量低于定量限,但该发现为药物降解途径研究提供了潜在方向。综合质谱解析结果,本方法不仅实现了目标杂质的准确定量,还为杂质溯源与药物稳定性评估奠定了分析基础。

3.4 应用建议

基于验证结果与杂质结构鉴定数据,建议在现有研究基础上进一步优化色谱分离条件,探索梯度升温程序对复杂药物基质中多组分杂质的同步分析能力^[3]。针对异硫氰酸甲酯与低沸点溶剂的共洗脱风险,可引入中心切割二维气相色谱技术,利用不同极性的色谱柱组合(如DB-35MS与HP-5MSUI串联),通过阀切换实现目标杂质与干扰物的物理分离,提升信噪比至30:1以上。质谱检测环节,建议扩展高分辨质谱(HRMS)的应用范围,结合Orbitrap或TOF-MS技术,对未知杂质的精确质量数进行深度解析,质量偏差控制在1 ppm以内,以增强结构鉴定的可靠性,尤其适用于同分异构体或降解产物的鉴别。

针对药物生产质量控制,建议将本方法纳入原料药批检验标准操作流程(SOP),明确异硫氰酸甲酯的监控限值为10.0 ng/mL,并建立动态警戒线机制,结合过程分析技术(PAT),实时监测合成或纯化阶段杂质的生成趋势。对于检出的微量硫氰酸甲酯,需开展加速稳定性试验(如40℃/75% RH条件下储存30天),追踪其含量变化规律,评估其对药物安全性的潜在影响,必要时优化制剂处方或包装材料(如使用铝塑复合膜避光密封),以抑制水解反应的发生。

参考文献

- [1] 吕竹茵,陈燕秋,徐增益,等. 气相色谱-质谱联用法测定杜仲叶中活性成分肉桂酸[J]. 化学试剂,2022,44(08):1203-1207.
- [2] 郭硕,吴凌蓉,董颖,等. 气相色谱-质谱联用法检测一种头孢类药物原料药中残留异硫氰酸甲酯的含量[J]. 北方药学,2022,19(01):1-3.
- [3] 刘慧娟,胡叶青,马丽,等. 气相色谱-质谱联用法在中药及天然药物分析中的应用[J]. 宜春学院学报,2020,42(09):15-19.

作者简介:陈艳杰、女、1992-8、汉、籍贯的河南省驻开封市、本科、中级化学检验工,研究方向为药物分析