

# UPLC – MS/MS 法测定硫辛酸中催化剂四丁基溴化铵的残留量

刘继华, 吴凡, 刘屹, 李志远, 陈祖芬

(1. 云南省食品药品检验所, 昆明 650011)

**摘要** 目的: 建立超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)检测硫辛酸原料药中催化剂四丁基溴化铵残留量的方法。方法: 色谱柱为 Waters Atlantis HILIC Silica (2.1 mm × 100 mm, 3 μm), 流动相: 乙腈-0.1 mol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液 (pH = 3.5) 95 : 5, 流速 0.2 mL · min<sup>-1</sup>。经氯仿和水(1 : 1) 提取出的四丁基溴化铵通过 UPLC-MS/MS 进行检测。结果: 本法的线性范围为 5 ~ 100 ng · mL<sup>-1</sup> (r = 0.996); 最低检测限为 1 × 10<sup>-14</sup> g; 回收率为 99.4%。结论: 本法操作简便, 结果准确, 可用于硫辛酸中催化剂四丁基溴化铵的质量控制。

**关键词:** 超高效液相色谱-质谱联用; 硫辛酸; 四丁基溴化铵; B 族维生素; 催化剂; 残留

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1361-03

## UPLC – MS/MS determination of tetrabutyl ammonium bromide in lipoic acid

LIU Ji-hua, WU Fan, LIU Yi, LI Zhiyuan, CHEN Zhu-fen

(1. Yunnan Institute for Food and Drug Control; Kunming 650011, China)

**Abstract Objective:** To establish an UPLC-MS/MS method for determination of Tetrabutyl ammonium bromide (TBAB) in lipoic acid. **Methods:** A Waters Atlantis HILIC SILICA (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) column was used with acetonitrile-0.1 mol · L<sup>-1</sup> ammonium formate (pH = 3.5) (95 : 5) as the mobile phase. The flow rate was 0.2 mL · min<sup>-1</sup>. TBAB in lipoic acid extracted by chloroform-water (1 : 1) was detected by UPLC-MS/MS. **Result:** The standard curve was linear over the range of 5-100 ng · mL<sup>-1</sup> (r = 0.996), with the detection limit of 1 × 10<sup>-14</sup> g; The average recovery was 99.4%. **Conclusion:** this method is simple, rapid and precise enough to control the remain of TBAB in lipoic acid.

**Key words:** UPLC-MS/MS; lipoic acid; tetrabutyl ammonium bromide (TBAB); vitamin B; catalyst; residue

硫辛酸是 B 族维生素, 在欧洲是用于治疗糖尿病性神经病或神经系统并发症的药物。可用于急性及慢性肝炎、肝硬化、糖尿病、帕金森氏症等方面的疾病及风湿性关节炎、红斑性狼疮等疾病的治疗及疗效保健。

随着食品药品安全意识的提高, 国家对食品药品的监管力度也在不断的加大, 在新药的质量标准控制中, 对投入的反应物、溶剂及催化剂的监控也更加严格。四丁基溴化铵作为季铵盐型阳离子表面活性剂广泛用于日用化工和用做相转移催化剂, 吸入、摄取和皮肤接触有一定毒性, 对皮肤、眼睛和呼吸系统均有刺激性。因其无紫外吸收, 也不具挥发性, 无法用 LC-UV 或 GC 这些常规的方法监测, 目前

其测定方法主要有核磁法以及电化学方法(电位滴定法, 离子选择电极法<sup>[5]</sup>和极谱法<sup>[6-8]</sup>)等, 这些方法主要用于常量分析。催化剂尤其是季铵盐类表面活性剂作为催化剂使用时, 成品中残留量较少。而液相色谱-质谱(LC-MS)联用集液相色谱的高分离效能与质谱的强鉴定能力于一体, 灵敏度高、选择性强, 还能给出一定的结构信息, 分析快速方便, 具有其他分析方法所不能比拟的优点<sup>[4]</sup>。本文建立了用 UPLC-MS/MS 直接测定一类新药 F351 中微量四丁基溴化铵的方法。本法简便快速、选择性好、灵敏度高。

### 1 仪器与试剂

仪器: Acquity TM UPLC; Quattro Premier XE

QQQ( Waters 公司)。

试剂: 水为纯化水, 乙腈为色谱纯, 氯仿、甲酸铵为分析纯。

四丁基溴化铵及硫辛酸为常熟富士莱医药化工有限公司提供。

## 2 测定条件

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Waters Atlantis HILIC Silica( 2.1mm × 100mm, 3μm); 流动相: 乙腈 - 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液( pH = 3.5) 95 : 5; 流速: 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 40℃; 进样量: 5μL。

**2.2 质谱参数** 电喷雾接口, 正离子检测模式, 毛细管电压: 3.00kV, 锥孔电压: 35.00V, 源温: 105℃, 脱溶剂温度: 350℃, 脱溶剂气 N<sub>2</sub>: 400L · h<sup>-1</sup>; 锥孔气: 50L · h<sup>-1</sup>。取四丁基溴化铵对照品乙腈溶液( 0.1 μg · mL<sup>-1</sup>) 直接注入质谱仪, 获得 *m/z* 为 242.3 为四丁基溴化铵( 分子量 322.38) 脱去一个溴的离子; 再收集其碎片信息, 碎片中以 *m/z* 为 142.1 最大, *m/z* 为 100.0 次之, 故选取 *m/z* 为 242.3、*m/z* 为 142.1 及 *m/z* 为 100.0 的离子对, 通过多级反应模式( MRM) 方式进行测定。四丁基溴化铵在 ESI + 模式下的质谱图见图 1。

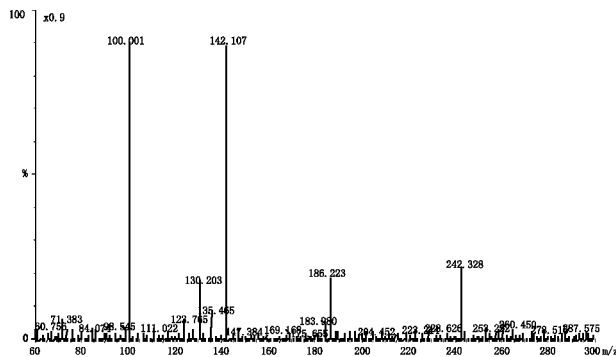
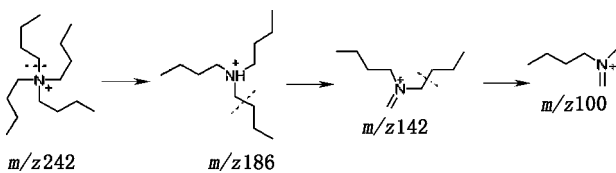


图 1 四丁基溴化铵的质谱图

Fig 1 MS spectra( ESI + ) of TBAB

裂解方式为:



**2.3 空白溶剂的制备** 取氯仿及水以 1 : 1 的比例混合 振摇 10min 按样品处理项下方法取水相作为空白溶剂。空白溶剂的质谱离子流图见图 2A。

## 3 标准曲线

取四丁基溴化铵加乙腈制成 10μg · mL<sup>-1</sup> 的溶

液, 作为储备液, 精密量取一定量的储备液加空白溶剂分别稀释制成每 1mL 空白溶剂中含四丁基溴化铵 5, 10, 20, 50, 100ng 的对照品溶液, 按“2”项下方法进行测定, 以四丁基溴化铵的峰面积为 Y 轴, 浓度为 X 轴做标准曲线, 方程为:

$$Y = 82.551X - 370.34 \quad r = 0.996$$

线性范围 5 ~ 100ng · mL<sup>-1</sup>。

## 4 精密度

取四丁基溴化铵 10ng · mL<sup>-1</sup> 的对照溶液, 按“2”项下方法进样 5 次, 测定其峰面积, 多次测定的峰面积 RSD 为 1.3%, 说明其精密度良好。

## 5 检测限及定量限

取四丁基溴化铵储备液逐步稀释, 进行测定, 检测限为 1 × 10<sup>-14</sup>g( 以 3 倍信噪比计), 定量限为 4 × 10<sup>-14</sup>g( 以 10 倍信噪比计)。

## 6 回收率

硫辛酸在水中极微溶解, 在氯仿中微溶, 四丁基溴化铵溶于水、醇和丙酮, 微溶于氯仿, 故利用其在不同溶剂中溶解度差异, 设计了样品处理方法, 以达到富集四丁基溴化铵的目的。取硫辛酸粗品适量, 精密加入氯仿 10 mL 使溶解, 分别精密加四丁基溴化铵对照液 7.5, 10, 12.5 ng · mL<sup>-1</sup> 各 10 mL, 振摇 10 min, 放置分层, 取上层水层滤过, 精密量取续滤液 5μL 注入液相质谱联用仪, 按“2”项下方法进行测定, 带入标准曲线进行计算回收率, 平均回收率 99.4%, RSD 为 1.8%, 可准确测定硫辛酸中四丁基溴化铵的残留量。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Result of recovery

加入量 ( added amount) /ng	测得量 ( determinationed amount) /ng	回收率 ( average recovery) /%	RSD /%
7.78	7.12	96.73	
7.78	7.32	97.68	0.49
7.78	7.16	97.24	
10.38	9.97	100.63	
10.38	9.98	99.55	0.54
10.38	9.93	100.18	
12.98	12.46	101.28	
12.98	12.64	101.33	0.82
12.98	12.49	99.87	

## 8 样品测定

取硫辛酸 0.2 g 精密加氯仿 10 mL 使溶解, 精密加水 10 mL, 振摇 10 min, 放置分层, 取上层水层滤过,

精密量取续滤液 5  $\mu\text{L}$  注入液相质谱联用仪 按“2”项下方法进行测定。3 批硫辛酸样品检测到的四丁基溴化铵峰仅略高于检测限 未到定量限。样品中含有四丁基溴化铵的量低于 1 亿分之一 残留量非常低。四丁基溴化铵对照品及样品的质谱图见图 2。

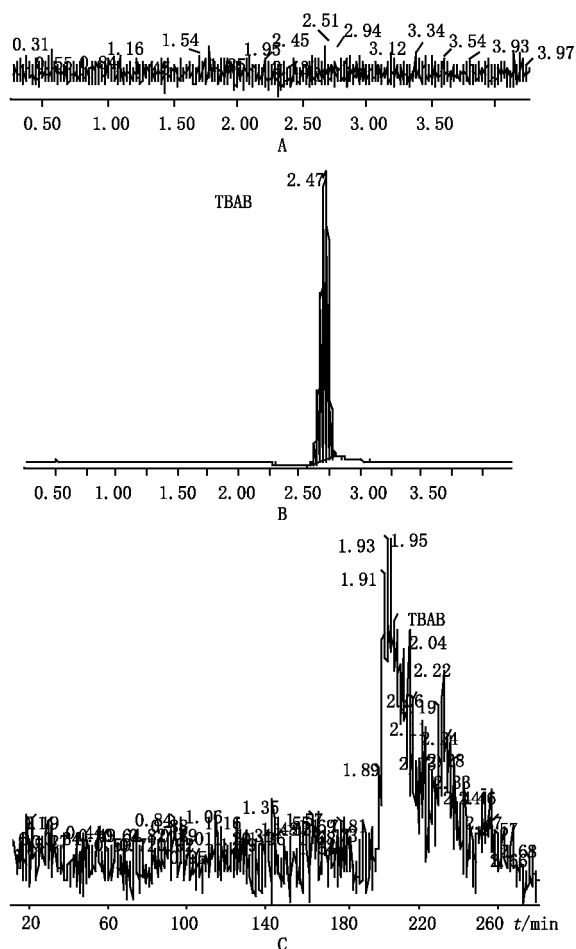


图 2 多反应监测质谱色谱图

Fig 2 MRM Chromatograms

A. 空白溶剂( blank) B. 对照品( standard) C. 样品( sample)

## 9 讨论

9.1 超高效液相色谱( UPLC) 是在传统的高效液相色谱( HPLC) 技术上的一个重大飞跃。UPLC 能保持分离度而追求更快的分析速度, 在相同时间内分离更多的样品, 或优化分离度在同样时间内再分出更多的色谱峰。液质联用的特点是离子碎片特征性强, 提供的信息丰富。利用其 MS 的特征离子峰, 可

以作为四丁基溴化铵准确性的依据, 采用二级子离子做定量离子, 利用多级反应模式( MRM) 可以进行准确定量, 并大大提高检测灵敏度。实验结果表明, 采用 UPLC - MS/MS 作为新药 F351 中四丁基溴化铵残留量的检测, 从定性和定量二个方面的要求看, 均为较理想的检测手段。

9.2 Atlantis HILIC ( Hydrophilic Interaction Chromatography) 是未键合的硅胶基质色谱柱, 适用于超强极性的化合物, 尤其适用于极性很大的碱性化合物, 这些碱性化合物即使用 Atlantis  $\text{dC}_{18}$ , YMC AQ 或 X Terra 这样的反相柱也不易分离, HILIC 是适合非常特殊应用的色谱柱, Atlantis HILIC 类似于正相色谱柱, 但是它又与正相柱不同 - 可以使用含水流动相, 四丁基溴化铵为强极性的碱性化合物, 在常规的色谱柱上没有保留, 使用 Atlantis HILIC 能在柱上有一定保留, 使四丁基溴化铵可以较好的检测到。

9.3 由于四丁基溴化铵为相转移催化剂, 四丁基溴化铵溶于水、醇和丙酮, 微溶于氯仿, 硫辛酸在水中极微溶解, 在氯仿中微溶, 故利用其在不同溶剂中溶解度差异, 设计了样品处理方法, 以达到富集四丁基溴化铵的目的。

## 参考文献

- 1 TIAN Song - jiu( 田颂九), HU Chang - qin( 胡昌勤), MA Shuang - cheng( 马双成). The Application of Pharmaceutical Analysis by Chromatography( 色谱在药物分析中的应用). Beijing( 北京): Chemical Industry Press( 化学工业出版社) 2006. 167
- 2 WANG Zheng - fan( 汪正范). Hyphenated Technology of Chromatography( 色谱联用技术). Beijing( 北京): Chemical Industry Press( 化学工业出版社) 2001. 151
- 3 ZHONG Jing - feng( 钟静芬). The Application of Pharmacy by Surfactant( 表面活性剂在药学中的应用). Beijing( 北京): People's Medical Publishing House( 人民卫生出版社) 1996. 543
- 4 Egorov V V, Repin V A, Ovsyannikova T A. The effect of ion association on the selectivity of electrodes reversible with respect to organic cations. *Zh Anal Khim*, 1992, 47 (9) : 1685
- 5 Gasparic J, Koula V, Kucova D. Indirect determination of organic bases by ion - pair extraction polarography. *Chem Listy*, 1990, 84 (4) : 437
- 6 Ciszewski A, Lukaszewski. The influence of long - chain amine and ammonium salts on the anodic stripping voltammetry of thallium lead, tin, cadmium and indium. *Z Talanta*, 1985, 32 (12) : 1101
- 7 Hohyun Kim, Hyeongjin Roh, Seung - Bock Yeom. Sensitive determination of felodipine in human and dog plasma by use of liquid - liquid extraction and LC - ESI - MS - MS. *Chromatographia*, 2003, 58 (324) : 235

( 本文于 2010 年 8 月 18 日收到)