

元素杂质的 USP 新通则 <232> 和 <233>： ICP-MS 在药物分析中的应用

白皮书

作者

Amir Liba 和 Ed McCurdy

安捷伦科技公司

美国



摘要

美国药典（USP）正在开发药品及其成分中有机杂质的新检测方法。人们普遍认为目前的 USP<231> “重金属限量检测”在范围、准确性、灵敏度和专属性等方面均存在不足，将在 2013 年被新通则 USP<232>（限度）和 <233>（方法）所取代。新方法将克服当前方法的局限，特别是关于分析物列表、样品制备、挥发性分析物的保留以及密闭容器样品消解和现代仪器技术的应用，以实现单个分析物的精确回收和浓度测定。本白皮书提供了新通则的开发背景，并介绍了安捷伦 700x ICP-MS 如何应对该新方法的要求。



Agilent Technologies

前言

药品中杂质的存在受到关注，不仅是由于某些污染物具有毒性，而且还因为它们可能对药品的稳定性、保质期产生不利影响，或可能引发有害的副作用。因此，必须对药品生产所用原料、中间体和活性成分（API）、赋形剂（稳定剂、填充剂、粘结剂、着色剂、调味剂、糖衣等），以及最终药物产品中所含的有机和无机（元素）杂质进行监测和控制。对生产过程中可能引入的杂质，如催化剂和来自生产工艺设备的污染物，也必须进行监测。

在美国，用于监测制药材料中污染物（包括元素杂质）的限度和方法由美国药典（USP）制定，但负责强制执行的监管部门是 FDA。现在 USP 正在开发监测药物材料中无机（元素）杂质的新方法。提出的新通则 USP<232>（限度）和 <233>（方法）将于 2013 年起执行。

监测药物样品中有机污染物的现行方法是有着 100 年历史的比色法，USP 通则 <231> 中有明确规定。该方法被称为“重金属限度检测法”，其原理是 10 种元素（Ag、As、Bi、Cd、Cu、Hg、Mo、Pb、Sb 和 Sn）与硫代乙酰胺反应生成硫化物沉淀。产生的有色沉淀物与 10 ppm Pb 标准品进行颜色对比，以确定是否超出重金属限度。

除了与主观的目测颜色对比相关的明显误差以外，USP<231> 是基于 10 种元素总和的限度检测方法，不能给出单个元素的浓度。而且，也不能测定许多感兴趣的元素，如 Cr，以及生产催化剂中常用的铂系元素（PGE）。另外，世界上的许多地区都不允许使用硫代乙酰胺和 H₂S。

USP<232> 包括含催化剂在内的广泛的分析物，并且最大许可限是根据分析物毒性，而不是方法性能而制定的。USP<233> 规定了样品制备方法选择，包括密闭容器微波消解，并且推荐使用现代仪器，如多元素 ICP-MS 和 ICP-OES 技术，代替 USP<231> 中使用的比色检测法。

USP<231> 另一个公认的问题是其样品制备方法，需要在高达 600 °C 的马弗炉中灼烧样品。如此高的温度不可避免地会造成挥发性分析物的损失，包括重要的有毒元素 Hg [1、2、3]。

在 1995 年第一届药典论坛（PF）的“修订过程的促进因素”主题下发表的一篇文章中，Blake 指出，“由于灼烧过程中金属的损失，现行 USP、JP（日本药典）和 EP（欧洲药典）通用检测方法所得结果的正确性很成问题” [1]。在 2000 年的另一篇文章中，Wang 提出用一种现代仪器方法（ICP-MS）代替 USP<231> 中规定的比色检测法。Wang 的文章指出了 USP<231> 的一些缺陷，认为，“这些基于硫化物沉淀颜色强度的方法 [USP<231>]，是非特异、不灵敏、费时费力的，通常回收率很低或根本没有回收率。” [4]

这些问题的存在引发了用更可靠、准确、灵敏、特异和耐用的新仪器方法代替 USP<231> 的计划。三个关于元素杂质检测的新 USP 通则正在平行开发中，分别是 USP <232>/<233> 和 <2232>。USP <2232> 仅针对膳食补充剂，而 USP <232> 和 <233> 则针对药物成分和产品。

表 1 显示了 USP<232> 规定的新列表中 16 种分析物（As、Cd、Hg、Pb、V、Cr、Ni、Mo、Mn、Cu、Pt、Pd、Ru、Rh、Os 和 Ir）的每日允许暴露（PDE）限量 [5]。在最近（2011 年 5 月）版本的 USP<232> 中，将以前 I 组和 II 组的分析物结合到一张表格中，而强毒性元素（As、Cd、Hg 和 Pb，有时称为“四大”）则控制在比其它分析物低得多的水平，并且在所有样品中都必须进行检测。

分析物列表和限度的制定依据毒理数据，而不是方法性能，而且列表中第一次包含了催化剂元素（铂族元素 Pt、Pd、Ru、Rh、Os 和 Ir）。催化剂金属如果可能在样品加工过程中添加，则必须对其进行检测。

表 1. USP<232> 规定的药物产品分析物和每日允许暴露（PDE）限量。大体积注射类（LVP）药物的限量值在此基础上降低 100 倍 [5]

| 元素 | 每日剂量 PDE (µg/日) |
|-----|-----------------|
| 镉 | 5 |
| 铅 | 10 |
| 无机砷 | 15 |
| 无机汞 | 15 |
| 铍 | 100 |
| 铕 | 100 |
| 钇 | 100 |
| 铂 | 100 |
| 铈 | 100 |
| 钕 | 100 |
| 钨 | 250 |
| 钼 | 250 |
| 镍 | 250 |
| 钒 | 250 |
| 铜 | 2500 |
| 镁 | 2500 |

虽然 USP<232> 中制定的 PDE 限度用任何 USP<233>（ICP-OES 或 ICP-MS）中参考的仪器技术都可以测定 [6]，但许多新药中使用越来越复杂而珍贵的原料药，可能只包含非常少的量。对这些毫克级样品进行大比例稀释制备，意味着使用检测限尽可能低的仪器非常重要。低检测限和宽动态范围线性校正（安捷伦 7700 系列达到 9 个数量级）是 ICP-MS 最非常可贵的特性。低检测限对于 USP<232> 要求必须以最低限量进行控制的潜在毒性痕量元素（特别是 As、Cd、Hg 和 Pb）尤为重要。

USP<232> 包括一个涉及元素形态的章节，指出 As 和 Hg 的某些形态值得关注，因为其毒性比其它形态要大得多。As 的 PDE 是指无机 As，如果总 As 浓度超出限度，必须用一种能够对不同 As 形态进行分离和定量的方法对样品进行重新分析。这样做的原因是无机 As 比常见的有机形式（如，砷甜菜碱）毒性大得多，因此形态分析必须能够分离其不同化学形态，确定无机 As（亚砷酸盐（三价 As）和砷酸盐（四价 As））的总量低于限量。同样，Hg 限量也是指无机 Hg（Hg²⁺），虽然甲基汞（MeHg）是毒性更大的形态，但通常认为药物中不可能存在 MeHg。但如果样品来自于可能含有相当量甲基汞的原料（如，鱼组织），也必须对其进行特别的分离和测定。

USP<232> 中规定的 PDE 限量（表 1）必须根据药品类型和给药途径进行调整。例如，注射或吸入给药的 PDE 必须调整为比口服限量低 10 倍，而大体积注射（LVP）药物（每日剂量大于 100 mL）PDE 必须比基础 PDE 低 100 倍。

USP<232> 还为药物成分和赋形剂提供了单独的组分限量，假设每日最大剂量小于或等于 10 g/日，如表 2 所示。这些组分的限量可用于生产质量控制，使药品生产商能够控制最终药物产品的原料和中间体中的杂质含量。表 2 还显示了消解溶液中的组分浓度限量，以及 7700x ICP-MS 的仪器检测限，用于比较。

对于任何需要消解或稀释的样品，其 PDE 限量必须根据样品制备过程中的稀释倍数进行校正。例如，固体药品和赋形剂中的 Cd 限量是 0.5 µg/g（ppm），在样品消解过程中的稀释因子是 250 倍（例如，0.2 g 稀释和消解后的最终体积为 50 mL），那么样品消解液中，Cd 的 PDE 限量（“J”值）应为 2 ng/mL（ppb）。而 0.5J（1 ng/mL）浓度下必须能得到准确的回收，意味着所需检测限至少低于该值（用 ICP-MS 能轻松测定的最低浓度）10 倍（0.1 ng/mL），如表 2 所示。注射或吸入给药的药品和赋形剂的组分限量必须比表中的值再低 10 倍，即意味着消解样品需要 0.01 ng/mL 的检测限，仍在 ICP-MS 的测量范围内。

表 2. 每日最大剂量 ≤10 g/日的药品各组分（药物成分和赋形剂）USP<232> 浓度限量 [5]，以及安捷伦 7700x ICP-MS 的仪器检测限

*注射或吸入给药的药物组分限量在此基础上降低 10 倍

† 7700x IDL 针对各元素首选同位素，在 1% HNO₃ 和 1% HCl 基体中进行测量

| 元素 | 组分浓度 限量 (µg/g, ppm) * | 溶液中的浓度限量 (ng/mL, ppb) 250 倍稀释后 | 7700x 仪器检测 限 (ng/mL) † |
|-----|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 镉 | 0.5 | 2 | 0.0001 |
| 铅 | 1 | 4 | 0.0002 |
| 无机砷 | 1.5 | 6 | 0.005 |
| 无机汞 | 1.5 | 6 | 0.001 |
| 铊 | 10 | 40 | 0.0002 |
| 铍 | 10 | 40 | 0.0005 |
| 钡 | 10 | 40 | 0.0001 |
| 铂 | 10 | 40 | 0.0002 |
| 铯 | 10 | 40 | 0.0001 |
| 钷 | 10 | 40 | 0.0002 |
| 铬 | 25 | 100 | 0.002 |
| 钼 | 25 | 100 | 0.0002 |
| 镍 | 25 | 100 | 0.002 |
| 钒 | 25 | 100 | 0.005 |
| 铜 | 250 | 1000 | 0.002 |
| 镁 | 250 | 1000 | 0.001 |

样品制备

范围广泛的各种样品都可以用 USP<232>/<233> 进行分析，所以提供适合所有样品类型的详细样品处理方法并不现实。有些药物样品可以直接分析（不用溶解），而其他样品可以用水性溶剂（如水或稀酸）或适当的有机溶剂（如 2-丁氧乙醇：水（25：75）[3]，DMSO 或 DGME）简单稀释或溶解进行制备。用水性或有机溶剂进行简单稀释或溶解的方法必须考虑样品的化学稳定性，并且对于有机溶剂溶解，还要考虑样品中组分化合物的不同挥发性。对许多 API 来说，用有机溶剂稀释是首选方法，这种情况下有必要采取有助于稳定分析物的方法，以避免因较高或较低挥发性（与校正标准品相比）成分的存在而造成的回收率波动 [7]。

许多原料、赋形剂、中间体、API 和最终产品在常用的水性或有机溶剂中不能溶解，因此需要进行酸消解。USP<233> 规定用“强酸”对这些不溶性样品进行消解，酸组成和消解方法要留待各实验室去开发和验证，包含样品可接受的回收率和样品稳定性。不过，对需要消解的大多数样品类型还是有一些共通点需要注意：

- USP<232> 中的元素列表包括 Hg 和 PGE 类。这些元素低浓度条件下在氧化性基体，如硝酸（HNO₃）或硝酸/过氧化氢（HNO₃/H₂O₂）中化学不稳定 [10、11]，只有消解溶液中含有络合剂（如 HCl），才能在较长时间内稳定并被可靠测定。USP<233> 规定，用 ICP-MS 分析的样品如需要测定 Hg 时，必须包含适当的稳定剂（在修订的通则中 Hg 是所有样品都需要测定的分析物）

- 药物制品可能是 API 加上填充剂、粘合剂、着色剂和糖衣的复杂组合。糖衣可能是具有抗胃酸作用的有机聚合物，因此能使药物成分在小肠中受控释放。鉴于样品类型广泛且基体复杂多变，通常要确保药物样品完全消解可使用微波消解，USP<233> 针对固体样品给出的首选消解技术是密闭容器微波消解。密闭容器还避免了挥发性元素（如，Hg）的损失问题，这是 USP<231> 的一个遗留问题，已经过了充分认证

仪器

新 USP 通则的主要目标之一就是现代仪器分析方法替代目前主观的比色检测法（USP<231>），ICP-MS 和 ICP-OES 是 USP<233> 中建议的仪器。ICP-MS 对所有监管元素都有低检测限的优点在前面已经讨论过了，7700x 系统尤为适合消解药物样品常见的多变、高氯基体的分析：

- 7700 系列提供了比任何商品化 ICP-MS 都高的等离子体温度（最低的 CeO/Ce 比例，1% 左右）。从而改善了基体解离，并使 As、Cd、Hg 和 PGE 类 Os、Ir 和 Pt 等难电离元素能够更好地电离。USP<233> 中指出，帕尔贴（Peltier）冷却雾化室是首选的 ICP-MS 硬件配置，所有 7700 系列仪器均将其作为标准配置。7700x 还包含安捷伦独特的高基体进样（HMI）系统，通过精密控制和可重现的气溶胶稀释，提供了无可比拟的基体耐受性。该技术进一步提高了等离子体的稳定性，改善了电离，降低了干扰程度，还显著降低了高盐样品分析时接口和离子透镜与未解离样品基体的接触
- 7700 包含第三代八极杆反应池系统（ORS³），在氦气（He）碰撞模式下操作，利用动能歧视（KED）去除干扰。He 碰撞模式不管样品组成如何，也不需要费时

的样品特异性或分析物特异性优化（利用反应性气体的碰撞池方法的特性），即可以去除来自于基体的多原子干扰 [12]。7700 的 He 碰撞模式能够检测含高浓度、大范围氯化物的样品（例如，来自一般药物样品消解液中的 HCl），而不影响受氯多原子干扰影响元素的检测。这些元素包括 ⁵¹V（与 ³⁵Cl¹⁶O 重叠）、⁵²Cr（³⁵Cl¹⁶O¹H）、⁵³Cr（³⁷Cl¹⁶O）和 ⁷⁵As（⁴⁰Ar³⁵Cl），7700 可以准确测定高浓度 HCl（>1%）存在下所有这些元素的含量

- 7700 He 碰撞模式的另一个优势是消除了来自每个分析物所有同位素的多原子干扰，从而可以用次要同位素或定性同位素进行分析物确证。这在药物分析中尤为有用，如 USP<233> 所述，分析方法必须能够在其它样品组分（如，其它分析物或基体组分）存在的情况下，对每个目标元素进行明确的测定。将次要同位素作为 ICP-MS 的定性离子是 He 模式下已成熟建立的独特分析功能 [13]
- 如果 API 或其它原料能够溶解在有机溶剂中，那么 ICP-MS 仪器就必须能够耐受对这种溶剂的常规分析。因为 Peltier 冷却雾化室是 7700 的标准配置，所以无需对标准雾化室进行改变，即可吸取有机溶剂。可以加上一个可选的第 5 个质量流控制器，以向等离子体中加入氧气，使有机基体分解，溶剂耐受型系统的样品导入和接口部件更容易更换。而且，7700 的高级频率匹配 RF 发生器和最新升级的炬管设计，以及等离子体点火参数，确保了该系统可以耐受挥发性有机溶剂；甚至与水不互溶的溶剂也可以直接运行

- 7700x 可以与安捷伦或第三方 HPLC（液相色谱/离子色谱）系统轻松联接成一个全面集成的系统，用于分离一个元素的不同“形态”或化学形式，例如，当 As 和 Hg 的元素总浓度超出 PDE 后，需要对其各形态进行分析
- 7700x He 碰撞模式还可以进行快速半定量筛查采集，对未知样品进行快速表征。该操作模式也可以用于任何过程污染物的测定，或用于生产故障分析

为了确定 7700x 的 He 碰撞模式是否能够有效地去除由于消解过程中使用的 HCl 所产生的基于氯的干扰，我们在无气体模式和标准的 He 模式下测定了最易受干扰的元素（V 和 As）。两种模式下的校正曲线如图 1 所示，表明这些受干扰元素的检测限得到了极大改善。

图 1a 和 1c 分别为无气体模式下 V 和 As 的校正曲线，而图 1b 和 1d 为这两个元素在 He 碰撞模式下的校正曲线。在无气体模式下，基于 Cl 的干扰提高了相应于两个元素的背景等效浓度（V 为 2.49 $\mu\text{g/L}$ ，As 为 2.55 $\mu\text{g/L}$ ）。He 碰撞模式使 V 和 As 的 BEC 至少降低了 100 倍（V 为 0.023 $\mu\text{g/L}$ ，As 为 0.005 $\mu\text{g/L}$ ），得益于 7700 ORS³ 的 He 模式有效去除了 ClO 和 ArCl 多原子。

将干扰降低到 ng/L (ppt) 级，确保了药物实验室常规分析的多变而复杂的基体中这些易受干扰元素能够在法规浓度水平得到可靠测定。

USP<233> 的方法验证要求取决于所使用的方法（指定的 ICP 方法之一，或替代方法），以及其是否是限度测定方法或定量方法。限度测定方法必须确证测量的检测能力、重现性和专属性，而定量方法必须证明其准确性、精密度（重现性和耐用性）和专属性。

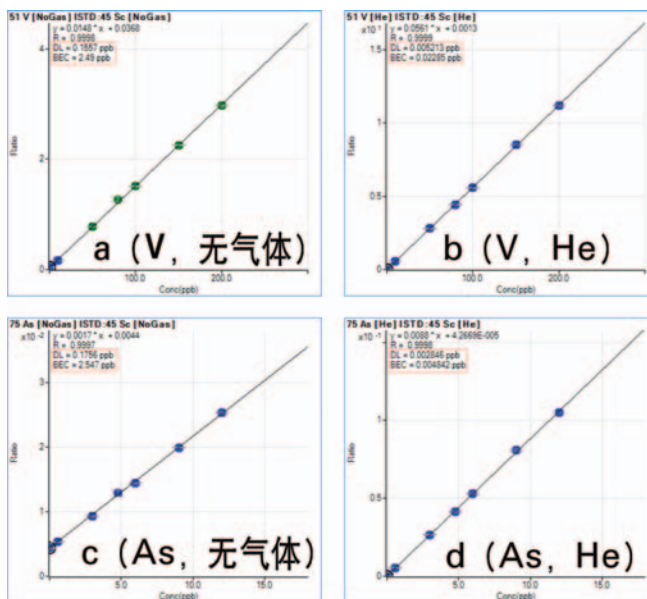


图 1. 无气体（a 和 c）和 He（b 和 d）模式下受干扰元素 V 和 As 的校正曲线，显示 He 模式有效地去除了基于 Cl 的干扰（所有元素碰撞池条件相同）

7700x 按 USP<233> 规定进行的限度和定量方法的系统适用性和性能测试验证，将在另外的应用报告中介绍 [14]。

药物生产的法规认证

遵循联邦法规是药物生产中样品分析的重要方面。美国联邦法规 21 章第 11 款（通常称为 21 CFR Part 11）对美国境内的食品和药品进行管控，包括保存和保护电子记录和使用电子签名的 US 联邦指南。该法规的目的是要确保与分析仪器操作相关的电子记录（包括数据、分析报告和其它记录（如日常性能检查））的完整性和可跟踪性。

有 4 个方面的法规认证与分析结果相关：

- 系统验证，包括分析仪器和软件的设计认证（DQ）、生产 QC、生命周期管理、安装和操作认证（IQ/OQ），以及性能验证（PV 或 PQ）
- 对仪器控制和数据处理工作站软件的访问限制（通过密码保护限制用户访问）
- 电子记录控制（安全保存、文件版本控制、审核跟踪、电子签名和归档/检索）
- 系统操作、适用性测试、操作规程和对实验室及记录的物理访问

第 1 方面必须通过仪器厂商的生产质量记录和设备验证证书进行证明。第 4 方面需要对实验室的物理访问进行相应控制，以及建立系统适用性测试（SST）和标准操作规程（SOP）的文件以便执行。

其它 2 项的执行一般是通过用户访问控制软件和管理实验室活动过程中产生的电子记录的集成系统来实现。

结合 7700 ICP-MS MassHunter 用户访问控制软件、安捷伦 OpenLAB ECM（企业内容管理系统），安捷伦为您提供了解决满足 21 CFR Part 11 所有要求的理想解决方案。用户访问控制提供了可跟踪性，而基于 OpenLAB ECM 的服务器文件管理则确保了安全性和完整性。采用 LCDF（位置、文件柜、抽屉、文件夹）结构，将分析结果和 PDF 报告文件安全地保存在校验保护的文件夹中。安捷伦灵活、多级权限的 ICP-MS 用户访问控制软件与安捷伦 OpenLAB ECM 集成，为 ICP-MS 数据提供了无可比拟的安全性、完整性和可跟踪性，满足了全部法规要求。结合 ICP-MS 硬件和软件的生产质量认证和全面的安装和操作认证服务（IQ 和 OQ），安捷伦为法规监管实验室提供了最全面的法规遵循服务。

结论

USP<232>/<233> 中描述的药物样品制备和分析新方法的建立，针对当前重金属限度检测的严重缺陷（USP<231>），为药物实验室提供了升级其方法和仪器的机会。新通则 USP<232> 和 <233> 推荐了新的样品制备和稳定化方法，并且概述了基于现代 ICP 仪器的新分析方法。

安捷伦 7700x ICP-MS 提供了适合 USP<232> 的理想分析功能，对所有监管元素都具有低检测限和宽动态范围（9 个数量级）。还有对药物实验室中常见的高基体和多变基体的良好耐受性（HMI 能提供进一步增强的耐受性）、有效的干扰去除和次要同位素确证等优势。

7700x ICP-MS 提供了进行形态分析的附加功能，能够对毒性与元素形态相关的元素的不同形态进行分离和定量。7700x 还提供了快速筛查或半定量分析功能，以检测其它元素污染物或进行工艺控制。质量认证、全面的验证服务和与安捷伦 OpenLAB ECM 的集成，确保 7700 提供药物厂商执行 USP<232>/<233> 需要的最全面的认证解决方案。

参考文献

1. K. B. Blake, Harmonization of the USP, EP, and JP heavy metals testing procedures, (*Pharm. Forum*, 1995), 21(6), pp 1632–1637.
2. R. Ciciarelli, D. Jäkel, E. König, R. Müller-Käfer, M. Röck, M. Thevenin and H. Ludwig, (*Pharm. Forum*, 1995), 21(6), pp 1638–1640.
3. N. Lewen, S. Mathew, M. Schenkenberger and T. Raglione, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35(4), 739–752 (2004).
4. T. Wang, J. Wu, R. Hartman, X. Jia and R. S. Egan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23(5), 867–890 (2000).
5. Elemental Impurities—Limits, (*Pharm. Forum*, 2011), 37(3), Chapter <232>.
6. Elemental Impurities—Procedures, (*Pharm. Forum*, 2011), 37(3), Chapter <233>.
7. A. S. Al-Ammar and J. Northington, *J. Anal. At. Spectrom.*, 26, 1531–1533 (2011).
8. J. Huang, X. Hu, J. Zhang, K. Li, Y. Yan and X. Xu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, 228–233 (2005).
9. S. Lira, P. Brush, L. Senak, C. Wu and E. Malawer, (*Pharm. Forum*, 2008), 34(6), pp 1613–1618.
10. S. E. Jackson, B. J. Fryer, W. Gosse, D. C. Healey, H. P. Longrich and D. F. Strong, *Chem. Geol.*, 83, 119–132 (1990).
11. A. Frimpong, B. J. Fryer, H. P. Longrich, Z. Chen and S. E. Jackson, *Analyst*, 120, 1675–1680 (1995).
12. E. McCurdy and G. Woods, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 607–615 (2004).
13. S. Wilbur and E. McCurdy, *Spectroscopy*, 25(5), 2–7 (2010).
14. Samina Hussain, Amir Liba and Ed McCurdy, Validating the Agilent 7700x ICP-MS for the determination of elemental impurities in pharmaceutical ingredients according to draft USP general chapters <232>/<233>, Agilent publication, 5990-9365EN (2011).

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011年11月21日，中国印刷

5990-9382CHCN



Agilent Technologies