

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)16-0068-06  
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.16.015



## 2D-LC-QTOF-MS法鉴定酒石酸托特罗定片辅料中未知杂质及来源分析\*

刘晓佳<sup>1,2</sup>, 潘芳芳<sup>2,3</sup>, 徐东海<sup>2,3</sup>, 柳文媛<sup>1,4</sup>, 邵鹏<sup>2,4,5△</sup>

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052; 3. 国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室, 浙江 杭州 310052; 4. 浙江省原料药安全研究中心, 浙江 杭州 310051; 5. 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 浙江 杭州 310051)

**摘要:**目的 建立鉴定酒石酸托特罗定片辅料中未知杂质的中心切割在线二维液相色谱-四极杆飞行时间质谱(2D-LC-QTOF-MS)法, 并归属杂质来源。方法 一维液相色谱采用 Waters XBridge-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-高氯酸(200:800:1.5, V/V/V)-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 65 °C, 进样量为 10 μL; 二维液相色谱采用 Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 流动相为甲酸铵缓冲液(20 mmol/L 甲酸铵溶液, 用甲酸调 pH 至 3.0)-乙腈(55:45, V/V), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 25 °C; 质谱采用电喷雾离子源(ESI), 正离子检测模式。结果 鉴定了 1 个未知杂质的可能结构, 确认该杂质由制剂的预混包衣剂辅料羟丙甲纤维素引入; 检测了 8 家羟丙甲纤维素生产企业的产品, 有 1 家企业检测出该杂质。结论 该方法可用于酒石酸托特罗定片中未知杂质的在线定性鉴别。

**关键词:** 酒石酸托特罗定片; 二维液相色谱-四极杆飞行时间质谱法; 中心切割; 辅料; 羟丙甲纤维素

### Identification and Source Analysis of Unknown Impurities in the Excipients of Tolterodine Tartrate Tablets by 2D-LC-QTOF-MS Method

LIU Xiaojia<sup>1,2</sup>, PAN Fangfang<sup>2,3</sup>, XU Donghai<sup>2,3</sup>, LIU Wenyan<sup>1,4</sup>, SHAO Peng<sup>2,4,5</sup>

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China 210009; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou, Zhejiang, China 310052; 3. NMPA Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation, Hangzhou, Zhejiang, China 310052; 4. Zhejiang Research Center for API Security, Hangzhou, Zhejiang, China 310051; 5. Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang, China 310051)

**Abstract: Objective** To establish an online heart-cutting two-dimensional liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (2D-LC-QTOF-MS) method for identifying the unknown impurities in the excipients of Tolterodine Tartrate Tablets, and to analyze the sources of impurities. **Methods** The one-dimensional liquid chromatography was performed on the Waters XBridge-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water-perchloric acid (200:800:1.5, V/V/V)-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 65 °C, the injection volume was 10 μL. The two-dimensional liquid chromatography was performed on the Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), the mobile phase was ammonium formate buffer (20 mmol/L ammonium formate solution, adjusted to pH 3.0 with formic acid)-acetonitrile (55:45, V/V), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 25 °C. The electron spray ionization (ESI) was adopted with positive ion detection mode. **Results** The possible structure of an unknown impurity was identified, and it was confirmed that the impurity was introduced by hydroxypropyl methylcellulose, a film-coated premix in the formulation. The hydroxypropyl methylcellulose of eight manufacturing enterprises was tested, and that of one enterprise was detected. **Conclusion** This method can be used for online qualitative identification of unknown impurities in Tolterodine Tartrate Tablets.

**Key words:** Tolterodine Tartrate Tablets; two-dimensional liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; heart-cutting; excipient; hydroxypropyl methylcellulose

酒石酸托特罗定化学名为(R)-N,N-二异丙基-3-(2-羟基-5-甲基苯基)-3-苯丙胺L(+)-酒石酸盐, 临床主要用于治疗膀胱过度活动症引起的尿急、尿频和尿失禁等症状<sup>[1-4]</sup>。酒石酸托特罗定片在生

产过程中使用了薄膜包衣预混剂、填充剂、黏合剂、崩解剂等多种辅料<sup>[5]</sup>。辅料质量直接影响制剂的质量及临床疗效, 进而可能影响仿制药一致性评价结果<sup>[6]</sup>。酒石酸托特罗定片收载于卫生部药品标准<sup>[7]</sup>, 但标准中未控

\*基金项目: 2022年国家药品抽检计划[国药监药管[2022]1号]。

第一作者: 刘晓佳, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析, (电子信箱)1697536929@qq.com。

△通信作者: 邵鹏, 男, 博士, 副主任药师, 研究方向为药物分析与相关标准起草, (电子信箱)shaopeng@zjyj.org.cn。

制有关物质,中国、美国、欧洲、日本等国/地区药典未收载该品种。为此,本研究中依托2022年国家药品抽检计划,依据现行酒石酸托特罗定片法定标准,结合探索性研究评价国内市场该药质量现状。参考2021版美国药典(USP 2021)酒石酸托特罗定原料药色谱方法对制剂有关物质进行检验,发现A企业生产的部分批次酒石酸托特罗定片中可见1个未知杂质特征峰,该未知杂质含量超出杂质的检测限度要求(0.10%)<sup>[8]</sup>,且未见相关文献报道<sup>[9-10]</sup>。在此,对该杂质进一步进行结构确认与来源分析,同时为制剂质量安全控制和标准提高研究提供一定参考。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

XPE205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);Agilent 1290-6538型四极杆飞行时间质谱仪、Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

### 1.2 试药

酒石酸托特罗定片(批号分别为202301、202302、202303、202304、202305、202306、202307,记为T1-T7,规格为每片2 mg)及其他药用辅料(辅料a-1),均由A制药企业提供;羟丙基甲基纤维素(1-8号企业,其中8号企业为A企业辅料供应商);酒石酸托特罗定对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100723-201802,含量100%);甲酸铵、甲酸、高氯酸、甲醇和乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

#### 2.1.1 有关物质色谱条件<sup>[11]</sup>

色谱柱:Waters XBridge-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:以乙腈-水-高氯酸(100:900:1.5, V/V/V)为流动相A,乙腈-水-高氯酸(500:500:1.5, V/V/V)为流动相B,乙腈为流动相C,梯度洗脱(洗脱程序见表1),流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:65 °C;进样量:20 μL。

#### 2.1.2 中心切割在线二维液相色谱(2D-LC-QTOF-MS)分析条件

第一维液相:色谱柱为Waters XBridge-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水-高氯酸(A', 200:800:1.5, V/V/V)-乙腈(B'),梯度洗脱

(0~5 min时100%A', 5~22 min时62.5%A', 22~57 min时0A', 57~70 min时100%A'),流速为1.0 mL/min;检测波长为220 nm;柱温为65 °C;进样量为10 μL。

第二维液相:色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub>柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相为甲酸铵缓冲液(20 mmol/L甲酸铵溶液,用甲酸调pH至3.0)-乙腈(55:45, V/V);流速为0.3 mL/min;检测波长为220 nm;柱温:25 °C。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,喷雾电压4000 V,雾化气压力35 psi,干燥气流量10 L/min,去溶剂温度350 °C。质量扫描范围m/z 50~1000。

### 2.2 溶液配制

取样品适量,研细,取粉末10.0 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,用50%乙腈溶解并定容,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。分别取7种成型辅料(a-g)和薄膜包衣预混剂(h)中的4种辅料(i-1)10.0 mg,精密称定,12份,分别置10 mL容量瓶中,分别用50%乙腈溶解并定容,滤过,取续滤液,即得辅料溶液a-1。分别取8家企业的羟丙甲纤维素10.0 mg,精密称定,8份,分别置10 mL容量瓶中,加50%乙腈溶解并定容,滤过,取续滤液,即得羟丙甲纤维素溶液1-8。

### 2.3 色谱分析

取2.2项下供试品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱峰。结果除已知的5个杂质(相关信息见表2、图1)外<sup>[8,11]</sup>,发现该企业产品中保留时间约为10 min(相对保留时间为0.5)处存在1个未知杂质峰;按面积归一化法计算,其中7批次未知杂质含量为0.05%~0.16%(相关信息见表3、图2)。存在杂质超过鉴定测限的现象,需严格控制。

### 2.4 未知杂质结构确证

采用2.1.2项下分析条件,将一维色谱图(见图3)中保留时间为14 min的未知杂质通过阀切换技术富集于80 μL的定量环中,然后切入二维色谱柱,得二维系统总离子流图(见图4),分别扫描一级质谱图(见图5)和二级质谱图(见图6、图7),对未知杂质进行结构推测鉴定,发现与m/z 236.1129结构单元的碎片一致,与离子式C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>相吻合。其中[M+H]<sup>+</sup>离子主要碎片包括m/z 159, 117, 99, 57,其中碎片m/z 159为[M+H]<sup>+</sup>失去2分子水和乙腈得到;碎片m/z 117可由[M+H]<sup>+</sup>失去侧链以及水分子和羟基得到,再失去1分子水得到碎片m/z 99,裂解途径见图8。因此鉴定该杂质为6-(2-亚氨基丙氧基)甲基四氢吡喃-2,3,4,5-四醇(命名为杂质I),结构式见图9。

### 2.5 杂质I来源分析

结合制剂中主成分托特罗定结构与工艺处方,发现杂质I与主成分结构式差异较大,推测可能由生产

表1 液相洗脱梯度

Tab.1 Program of gradient elution

t(min)	流动相(%)			t(min)	流动相(%)		
	A	B	C		A	B	C
0~5	75	25	0	47~57	0	0	100
5~22	0	100	0	57~70	75	25	0
22~47	0	0	100				

表2 5个已知杂质信息

Tab. 2 Information of five known impurities

编号	名称	结构式	分子式和相对分子质量
1	N-异丙基-3-(2-羟基-5-甲基苯基)-3-苯丙胺		C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO 283.41
2	6-甲基-4-苯基色胺-2-醇		C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> 240.3
3	6-甲基-4-苯基色胺-2-酮		C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> 238.28
4	3-(2-甲氧基-5-甲基苯基)-3-苯丙醇		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> 256.34
5	N,N-二异丙基-3-(2-羟基-5-甲基苯基)-3-苯丙胺氧化物		C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>2</sub> 341.49

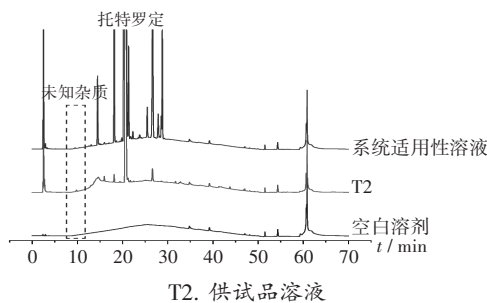


图1 酒石酸托特罗定片有关物质液相色谱图  
T2. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of related substances in Tolterodine Tartrate Tablets

表3 7批样品未知杂质含量测定结果

Tab. 3 Results of content determination of unknown impurities in seven batches of samples

批号	保留时间(min)	峰面积	总峰面积	含量(%)
202301	9.533	24.3	14 852.0	0.16
202302	9.538	20.7	14 232.1	0.12
202303	9.624	10.3	14 178.7	0.07
202304	9.624	11.9	14 186.4	0.08
202305	9.623	9.5	14 262.3	0.06
202306	9.627	12.4	14 155.4	0.09
202307	9.542	10.3	14 317.0	0.07

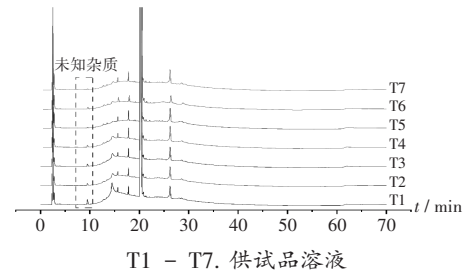


图2 7批酒石酸托特罗定片有关物质液相色谱图  
T1 - T7. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of related substances in seven batches of Tolterodine Tartrate Tablets

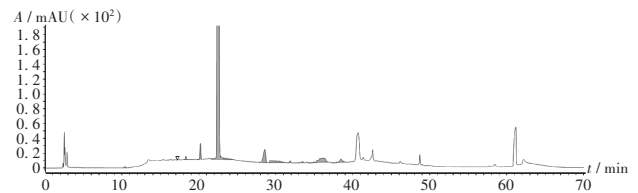


图3 酒石酸托特罗定片一维液相色谱图  
Fig. 3 One - dimensional HPLC chromatograms of Tolterodine Tartrate Tablets

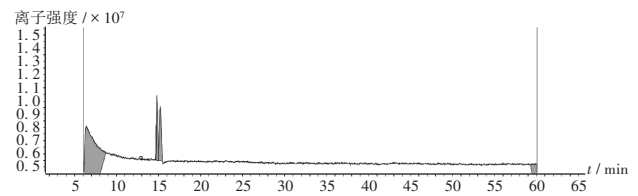


图4 未知杂质二维系统总离子流色谱图  
Fig. 4 Total ion chromatograms of unknown impurities in 2D system

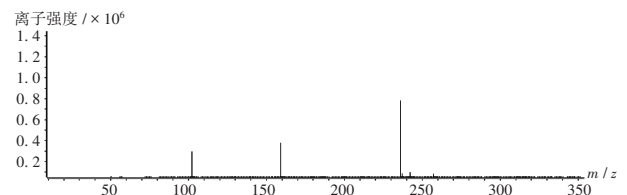


图5 未知杂质一级质谱图  
Fig. 5 Primary mass spectra of unknown impurities

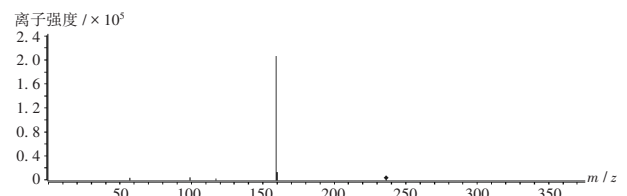


图6 未知杂质二级质谱图  
Fig. 6 Secondary mass spectra of unknown impurities

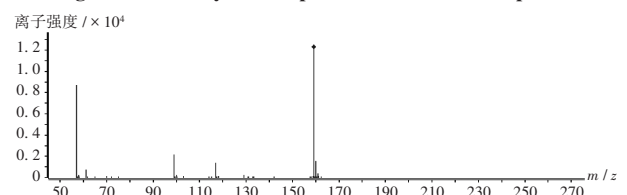


图7 未知杂质m/z 159碎片二级质谱图  
Fig. 7 Secondary mass spectra of m / z 159 fragment of unknown impurity

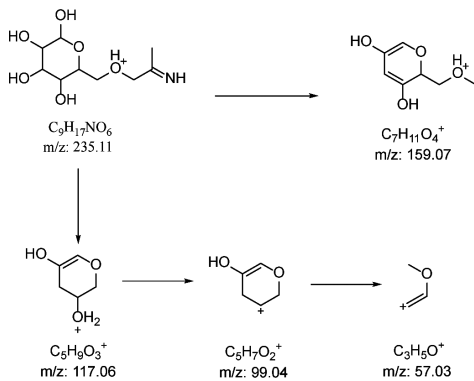


图8 未知杂质裂解途径

Fig. 8 Cleavage pathway of unknown impurities

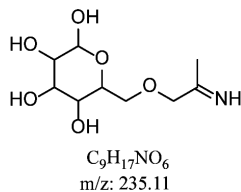


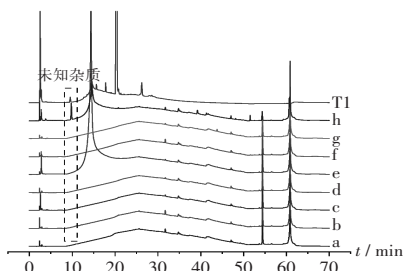
图9 杂质 I 结构式

Fig. 9 Structural formula of impurity I

过程中或贮存过程中外源性物料引入;故对生产过程中所使用的相关辅料进行高效液相色谱分析,进一步确定杂质 I 来源。

经与企业沟通,酒石酸托特罗定片在生产过程中共使用7种成型辅料(辅料 a - g)和1种薄膜衣预混剂(辅料 h),其中薄膜衣预混剂中又包含4种药用辅料成分(辅料 i - l)。分别取2.2项下辅料溶液 a - l 适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果在辅料羟丙甲纤维素色谱图(见图10、图11)中发现与杂质 I 保留时间(约为10 min)一致的色谱峰,其他辅料均未见此色谱峰,结合羟丙甲纤维素结构特征(图12),初步推断杂质 I 来源于羟丙甲纤维素。

羟丙甲纤维素属非离子型纤维素混合醚,为半合成的、不活跃的黏弹性聚合物<sup>[6]</sup>,故按2.1.2项下分析条件对辅料羟丙甲纤维素中发现的未知杂质进行了质谱

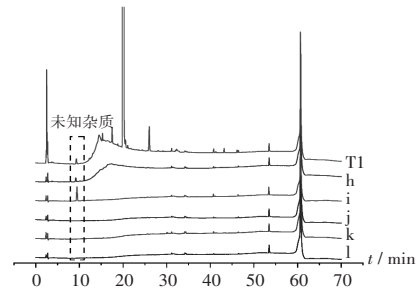


T1. 供试品溶液 a - g. 辅料溶液 h. 薄膜衣预混剂溶液

图10 A企业酒石酸托特罗定片辅料液相色谱图

T1. Test solution a - g. Excipient solution h. Film - coated premix solution

Fig. 10 HPLC chromatograms of the excipients of Tolterodine Tartrate Tablets from enterprise A



T1. 供试品溶液 h. 薄膜衣预混剂溶液 i. 羟丙甲纤维素

j. 二氧化钛 k. 滑石粉 l. 聚乙二醇

图11 薄膜包衣预混剂4种成分液相色谱图

T1. Test solution h. Film - coated premix solution i. Hydroxypropyl methylcellulose j. Titanium dioxide k. Talcum powder l. Polyethylene glycol

Fig. 11 HPLC chromatograms of four components in film - coated premix

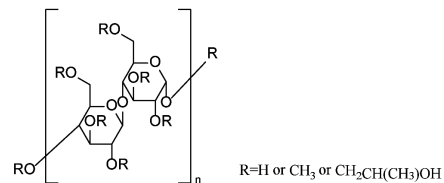


图12 羟丙甲纤维素结构式

Fig. 12 Structural formula of hydroxypropyl methylcellulose

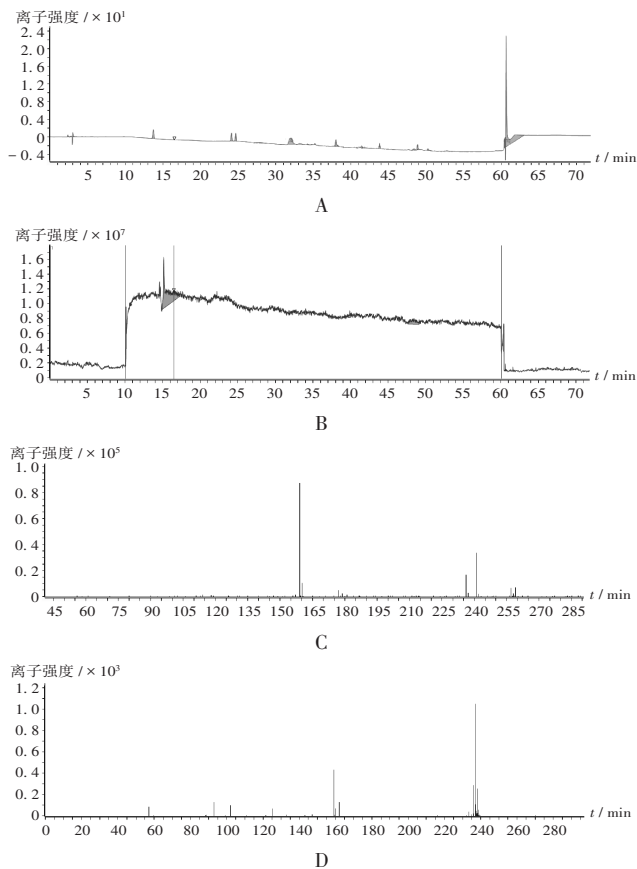
分析,其中一级质谱图中  $m/z$  236 的碎片离子与杂质 I  $[M + H]^+$  一致,二级质谱图中存在与杂质 I  $[M + H]^+$  一致的碎片离子  $m/z$  159 和 57,显示该未知杂质与酒石酸托特罗定片中杂质 I 分子量及裂解规律基本匹配一致,进一步证明杂质 I 来源于辅料羟丙甲纤维素。羟丙甲纤维素质谱分析见图13。

## 2.6 羟丙甲纤维素生产企业中杂质 I 研究评价

为明确杂质 I 与羟丙甲纤维素辅料生产企业产品的相关性,对征集到的国内外8家辅料企业生产的羟丙甲纤维素进行液相色谱分析与评价,仅8号辅料企业产品中检出杂质 I (见图14);经A制药企业反馈,该企业生产的酒石酸托特罗定片中所使用的羟丙甲纤维素也来源于8号企业。

## 3 讨论

由于酒石酸托特罗定结构复杂且杂质种类繁多,本研究中前期通过对比其原料药国内生产企业标准、第10版欧洲药典(EP 10.0)<sup>[12]</sup>和 USP 2021<sup>[11]</sup>,以及其原研企业标准中的色谱条件后,结合各杂质分离情况,采用 USP 2021 标准中有关物质测定方法进行初步分析。相对于 USP 标准其他标准中测定方法,目前主要存在以下问题:对酒石酸托特罗定的降解杂质分离效果欠佳,部分杂质相对保留时间较接近,用杂质对照品定位仍存在归属误判;部分杂质出峰保留时间易受流动相梯度变化干扰,主峰峰形变宽,影响杂质测定灵敏度。



A. 羟丙甲纤维素一维液相色谱图 B. 杂质 I 二维系统总离子流色谱图 C. 杂质 I 一级质谱图 D. 杂质 I 二级质谱图

图 13 羟丙甲纤维素质谱分析图(8号企业)

A. One - dimensional HPLC chromatograms of hydroxypropyl methylcellulose B. Total ion chromatograms of impurity I in 2D system  
C. Primary mass spectra of impurity I D. Secondary mass spectra of impurity I

Fig. 13 Mass spectra of hydroxypropyl methylcellulose (enterprise eight)

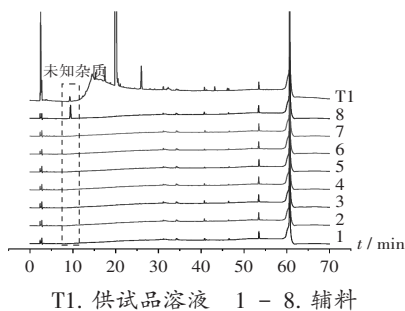


图 14 8家企业生产的羟丙甲纤维素色谱图

T1. 供试品溶液 1 - 8. 辅料

Fig. 14 HPLC chromatograms of hydroxypropyl methylcellulose produced by eight enterprises

进一步采用 2.1 项下色谱条件进样测定,发现 USP 2021 杂质 6 与 EP 10.0 杂质 A 保留时间一致(均约为 21.1 min),但通过杂质定位研究发现二者并非同一物质。提示在已有的法定标准基础上,需要进一步优化酒石酸托特罗定及片剂的有关物质测定色谱

条件,以便有效分离相关杂质,提高方法专属性和灵敏度。

基于 2D - LC - QTOF - M 技术通过在线自动化操作,可实现在线除盐、提高峰容量和多组分序列分析等效果。通过两种不同的互补分离系统一定程度上解决了复杂样品特别是高分子辅料样品的鉴定与分析。且与传统单一的液相色谱质谱联用技术相比,2D - LC - MS 法有更强的分离能力<sup>[13-16]</sup>。由于酒石酸托特罗定片中不同杂质可能来源于原料药合成、制剂降解、辅料杂质引入,故本研究中采取的技术既保证了辅料中的杂质分离效果,同时避免了流动相中非挥发性物质和强酸对质谱系统的影响;在第二维液相色谱系统中,使用耐高压的超高效液相色谱柱,使目标分析物进入质谱前在短时间内得到进一步纯化和分离,从而减少基质干扰;为得到更好的质谱响应,质谱采用正离子模式检测,使待测杂质与第二维色谱系统流动相中的氢离子结合为  $[M + H]^+$  形式,进而通过结构鉴定尽可能从多角度控制杂质。

近年来,辅料质量在药品质量控制中起到越来越重要的作用,对于有关物质检测过程中出现的未知杂质,未来杂质谱研究不仅要考虑杂质来源于主要活性成分,还需进一步关注其来源于辅料的可能,从而对杂质做出有效的判定和控制<sup>[17-18]</sup>。本研究中推断出杂质 I 来源于薄膜衣预混剂中羟丙甲纤维素,并鉴定出其结构。目前各国/地区药典收录的辅料羟丙甲纤维素质量标准中均尚未收录有关物质控制项目。故提示生产企业为更好地保证产品质量,应加强药物辅料质量控制与供应商审计,进一步提高制剂产品质量水平;而且建议后续应对辅料中杂质进行相关毒理学研究。

综上所述,本研究中通过建立 2D - LC - QTOF - MS 法对酒石酸托特罗定片中的 1 个未知杂质进行了结构鉴定,并对其来源进行了归属。该技术可为相关企业或监管部门对辅料质量标准健全完善方面提供了一定的解决思路和参考价值。

#### 参考文献

- [1] 刘娜. 托特罗定 PLGA 微球的制备及治疗膀胱过度活动症的研究[D]. 长春:吉林大学,2018.
- [2] 于舰,宋敏,周霞等. 酒石酸托特罗定有关物质的液质联用鉴定研究[J]. 中国新药杂志,2013,22(21):2561 - 2568.
- [3] CRANDALL C. Tolterodine: a clinical review [J]. J Womens Health Gend Based Med, 2001, 10(8): 735 - 743.
- [4] CLEMETT D, JARVIS B. Tolterodine: a review of its use in the treatment of overactive bladder [J]. Drugs Aging, 2001, 18(4): 277 - 304.
- [5] 鲁南制药集团股份有限公司. 一种酒石酸托特罗定片及其制备工艺:CN 114652694 A[P]. 2022 - 06 - 24.