

Research on the Application of Three Different Digestion Methods in ICP-MS Determination of Heavy Metals in Entecavir

Juan Wen

Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing, 400000, China

Abstract

Entecavir is currently one of the most commonly used anti HBV drugs, it is a first-line nucleoside drug that inhibits hepatitis B virus with high efficiency and low resistance, it is an important weapon for humans to control chronic hepatitis B. Heavy metals are used as catalysts in the synthesis process and production process. Monitoring and controlling the content of metal impurities is the focus of product quality control. The United States Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, and Chinese Pharmacopoeia do not include the detection method of entecavir. The heavy metals in the import registration standard adopt the visual method. The color of the sample solution is compared with the standard solution to determine the content of heavy metals, which is semi-quantitative inaccuracy. The paper discusses the newly developed ICP-MS detection method for heavy metals in entecavir raw materials, and discusses the impact of three different digestion methods (electric heating plate digestion, automatic graphite digestion and microwave digestion) on the results, the final detection method is highly sensitive and low limit, good accuracy and precision, suitable for the determination of residual heavy metals titanium and vanadium in entecavir.

Keywords

ICP-MS; Entecavir; residual heavy metal detection; electric hot plate digestion method; fully automatic graphite digestion method

三种不同消解方法在 ICP-MS 测定恩替卡韦中重金属含量的应用研究

文娟

重庆药友制药有限责任公司, 中国·重庆 400000

摘要

恩替卡韦是目前最常用的抗乙型肝炎病毒治疗药物之一, 是高效、低耐药抑制乙型肝炎病毒的一线核苷类药物, 是人类控制慢性乙型肝炎的重要武器。其合成工艺及生产工艺中用到了重金属作为催化剂, 监测和控制金属杂质含量是控制产品质量的重点。美国药典、欧洲药典、英国药典和中国药典均未收录恩替卡韦的检测方法, 进口注册标准中重金属采用目视法, 根据样品溶液颜色与标准溶液比较判定重金属的含量, 属于半定量不准确。论文论述新开发的恩替卡韦原料中重金属的 ICP-MS 检测方法, 并探讨三种不同消解方式(电热板消解、全自动石墨消解和微波消解)对结果的影响, 最后确定的检测方法灵敏度高、检出限低、准确度和精密度均较好, 适合恩替卡韦中残留重金属钛和钒的测定。

关键词

ICP-MS; 恩替卡韦; 残留重金属检测; 电热板消解法; 全自动石墨消解法

1 引言

监测和控制药物制剂中的金属杂质是制药行业的重点, 因为药物合成及生产工艺中往往会涉及直接添加金属(作为催化剂), 或者通过受污染的试剂、生产过程中药物成分接触金属表面等原因无意引入金属。大多数法规中重金属检测主要采用比色法, 通过样品溶液颜色与标准颜色较, 是半定量分析方法。不过这种方法现已确认是不准确的, 且不能全

面检测出所有相关金属成分。电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)具有灵敏度高、线性范围宽、选择性好、可测元素覆盖面广、检出限低、能进行多元素同时检测和同位素比测定等优点。是一种具有广阔前景的痕量或超痕量无机多元素分析技术。

恩替卡韦是一种用于治疗慢性乙肝的应用于临床治疗的特效药, 是一种选择性鸟嘌呤核苷类似物, 其药效良好, 并且病人不容易对此产生耐药性, 治疗效果好且副作用小, 且疗效明显, 所以在临床中应用广泛, 受到了业内的一致好评。其合成工艺及生产工艺中用到了重金属钛和钒^[1]。为准确考

【作者简介】文娟(1984-), 女, 中国重庆人, 中级工程师, 从事药物分析实验室管理及药物分析方法开发研究。

察原料中钛和钒的残留量，企业开发了 ICP-MS 定量测定方法，其中前处理消解方式是 ICP-MS 检测的重要影响因素。一般情况下，ICP-MS 分析一个样品只需几分钟，而样品前处理过程比较复杂，需要花几个乃至几十个小时。而且 ICP-MS 对基体的耐受性要比原子吸收、原子荧光等要差，高基体的样液极易造成干扰，而且对仪器本身的损耗也更为严重。合适的前处理方法不但能够保证测试结果的准确性，也能减小分析对仪器造成的伤害。因此 ICP-MS 样品前处理方法与技术的研究极为重要。

在已经研究确定了仪器参数的情况下，本文对比电热板消解、全自动石墨消解法和微波消解三种消解方法对金属钛和钒元素含量的测定结果的影响，最后得到最优的检测线、重复性、准确度、回收率等，建立了一种精密度好、准确度高、消耗少、可快速检测恩替卡韦中重金属含量的方法。

2 实验过程

2.1 仪器

仪器设备如表 1 所示。

表 1 仪器设备

仪器	厂家	型号
ICP-MS	Agilent	7700x
电子天平(万分之一)	Mettler	XS204
微波消解仪	CEM	Mars 6
微控数显电热板	莱伯泰科	EG35APLUS
全自动石墨消解仪	THOMAS CAIN Deena	II 型

2.2 试剂试剂及样品

试剂与试剂如表 2 所示。

表 2 试剂与试剂

试剂	厂家	级别
硝酸	重庆川东化工(集团)有限公司	GR
超纯水	自制	18.2 兆欧
调谐液	Thermo	1.0 μg/L

样品和对照品如表 3 所示。

表 3 样品和对照品

样品 / 对照品	来源	规格
恩替卡韦	重庆凯林制药有限责任公司	原料
国家标准样品 (多元素标准溶液)	国家有色金属及电子材料分析测试中心	含钒和钛的浓度均为 100 μg/mL
内标原液	Agilent	100mg/L

2.3 试验方法

2.3.1 试样溶液的制备

溶剂：5% 硝酸溶液。

标准品储备液：取国家标准样品稀释至浓度 5 μg/mL。

内标溶液：取内标原液稀释成 0.2mg/L。

系列标准品线性溶液：精密量取标准品储备液，用溶剂配制成含钒和钛分别为 0ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.5ng/mL、5.0ng/mL、10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 及 150ng/mL 的标准溶液。

2.3.2 样品前处理

电热板消解法：精密称取恩替卡韦约 0.1g，置 100mL 锥形瓶中，放入玻璃珠，加溶剂 10mL 后低温加热 (95 ± 5℃)，待蒸发至约剩 2~3mL，冷却到 50℃ 以下，加入 3mL 硝酸、3mL 氢氟酸、1mL 高氯酸，加盖，120 ± 5℃ 加热 1h，然后降温到 50℃，开盖，直至变为淡黄色透明液体约 2~3mL。视消解情况，加适量硝酸、氢氟酸及高氯酸，重复以上步骤。消解完成溶液移至 10mL 容量瓶中，用超纯水稀释至刻度，备用。

全自动石墨消解法：精密称取恩替卡韦约 0.1g 置于特氟隆消解管中，依次加入 4mL 盐酸、2mL 硝酸、3mL 氢氟酸、1mL 高氯酸，在自动消解仪中震动 (高度 100% 及强度 50%) 15s，加回流盖 150℃ 恒温加热 2h，赶酸，直至变为淡黄色透明液体约 2~3mL，取下冷却，消解完成，溶液移至 10mL 容量瓶中，用超纯水稀释至刻度，备用。

微波消解法：精密称取恩替卡韦约 0.1g，置 100mL 高压微波消解罐中，加硝酸 1mL，加盖密封，置微波消解仪中。程序升温：在 10min 里匀速由室温升至 120℃，保持 10min，继续在 10min 里匀速由 120℃ 升至 160℃，保持 10min，然后在 10min 里匀速由 160℃ 升至 180℃，保持 10min，待消解完成后，将消解罐置于可调温电热板上加热赶酸，直至消解罐内溶液至近干，放冷，将内容物转入 10mL 容量瓶中，并用超纯水冲洗消解罐 2~3 次，再用超纯水稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.3 仪器工作条件

采用 HeHe 模式中的高灵敏度等离子体模式进行调谐，调谐后的参数如表 4 所示，均满足仪器安装标准要求的各项指标^[2,3]。

表 4 ICP-MS 仪器的操作条件及参数

参数	设定值
功率 (W)	1500
等离子体气流量 (L/min)	14.9
辅助气流量 (L/min)	0.9
载气流量 (L/min)	1.0
补偿气流量 (L/min)	0.9
雾化室温度 (°C)	2
采样深度 (mm)	8.0
分析模式	HeHe 模式
积分时间 (s)	Ti: 5s; V: 2s
氧化物 (%)	< 2.0
双电荷 (%)	< 3.0

2.3.4 测定方法

采用外标标准曲线法进行测定。取上述空白及标准品系列溶液进行直接测定，以内标溶液作校正，记录各响应值。以待测元素浓度 (ng/mL) 为横坐标，以各溶液待测元素响应值与内标元素响应值之比 (比率) 为纵坐标，作图，用最小二乘法进行线性回归分析，计算线性方程及相关系数 r。元素 ⁴⁷Ti 线性为 $y=0.00703+0.00064x$ ，r 值 0.99995；⁵¹V 线性为 $y=0.16708+0.0113x$ ，r 值 0.99992，线性结果均达到标准。样品数据代入方程，得出样品重金属含量结果。

3 结果与讨论

3.1 三种不同消解方法检出限对比

取同供试品配制方法一致的样品空白溶液连续测定 10 次，记录响应值。计算空白响应值标准偏差 (SD)。以连续测定空白样品溶液响应值的 3 倍标准偏差 (3SD) 所对应的待测元素浓度作为检测限，结果见表 5。

表 5 不同前处理方法检出限 (ng/mL)

消解方法	⁴⁷ Ti	⁵¹ V
电热板消解	0.52	0.10
全自动石墨消解	0.20	0.03
微波消解	0.11	0.02

如表 5 所示，三种消解方法中微波消解方法检出限最低，石墨消解其次，电热板消解最高。也就是说微波消解方法可以检出更低浓度的样品中钛和钒的含量，检测灵敏度最高。

3.2 三种不同消解方法重复性对比

按 2.3.2 步骤，采用三种消解方法进行样品处理，平均测定 6 次，计算 RSD，结果如表 6 所示。

表 6 不同前处理方法重复性

消解方法	⁴⁷ Ti		⁵¹ V	
	平均测试值 (PPB)	RSD (%)	平均测试值 (PPB)	RSD (%)
电热板消解	0.052	10.20	0.041	15.75
全自动石墨消解	0.089	6.34	0.055	9.38
微波消解	0.094	4.55	0.065	8.01

如表 6 所示，微波消解与全自动石墨消解的重复性结果差不多，电热板消解结果重复性更差。分析其原因，跟电热板消解过程中为敞口消解，人为影响多有关，如加酸、混匀、加热消解、赶酸、定容都需要人工进行，加大了污染及损样风险。

3.3 三种不同消解方法准确度加标回收结果对比

精密称取恩替卡韦 0.1g，置三种消解方法各自容器中，

分别加入浓度 (50ng/mL) 的标准溶液，按步骤 2.3.2 前处理，溶液平行配制 3 份。按照已经确定的检测方法，取上述溶液进行测定，记录响应值。用标准曲线法计算溶液中钒及钛的回收率，见表 7。

表 7 不同前处理方法重复性准确率和回收率

消解方法	样品	⁴⁷ Ti			⁵¹ V		
		加入量 (ng)	测得量 (ng)	回收率 (%)	加入量 (ng)	测得量 (ng)	回收率 (%)
电热板消解	1	500	420.3	84.1	500	411.8	82.4
	2		440.8	88.2		386.7	77.3
	3		394.7	78.9		468.5	93.7
全自动石墨消解	1	500	470.0	94.0	500	455.0	91.0
	2		453.5	90.7		440.0	88.0
	3		492.8	98.6		479.4	95.9
微波消解	1	500	468.1	93.6	500	482.8	93.8
	2		490.3	98.1		506.7	101.3
	3		512.6	102.5		478.5	95.7

从上表可以看出微波消解的平均回收率为 98.1% (钛元素) 及 96.9% (钒元素)，高于全自动石墨消解法的 94.4% (钛元素) 以及 91.6% (钒元素)，电热板消解法回收率最低为 83.7% (钛元素) 及 84.5% (钒元素)，说明样品用微波消解法前处理，准确度最高。

3.4 操作性的比较

从实验结果可以看出，三种不同消解方式 (电热板消解、全自动石墨消解和微波消解) 各有特点。

电热板消解法为敞开式消解，优点是所用仪器设备比较简单容易上手，设备比较便宜，缺点是整个过程受外界影响很大，敞开式可造成一定的易挥发性元素的损失，容易污染，且由于加热不均匀，需要经常手动摇动坩埚。且酸的用量很大，耗时长，受人为影响很大，容易损样，检测灵敏度，重现性和准确度均较低。另外消解过程中产生的酸雾，对实验室环境污染，有害健康。

全自动石墨消解法全过程不需人工参与，比如可自动加酸、消解、赶酸、定容，减少了人为因素的影响，同时因消解仪上有至少 60 个消化管孔，同时可进行大批量的样品消解，效率很高。但因也是敞开式消解，仍然有污染及损样风险，不太适合超痕量的样品检测。从实验结果看出，该方法检测灵敏度，重现性和准确度均优于电热板消解法。

微波消解是封闭性消解，损样小，受外界影响小，且使用的样品和用酸量可以很少，大幅减少消化时间，交叉污染风险，消解过程产生的酸雾由仪器通风系统排出室外，对实

实验室环境污染小,消解结果重现性好,准确度高。缺点就是属于高温高压密闭系统,消解管是耗材,需要定期更换,成本相对比较高,且一次样品处理量小,一般不得超过0.5g。

4 讨论

4.1 选择前处理方式原则

①避免待测组分遭受损失;②不得引进干扰物质;③安全、快速,后续操作步骤简便;④消解后溶液便于检测。

4.2 前处理影响因素

①酸的纯度:前处理最常使用的溶剂是酸,所以酸的纯度对最终的测定结果影响大,需采用光谱级的酸。

②稳定剂:消解过程中酸与有机物会发生剧烈反应,对挥发性元素如砷、汞等的消解有一定的影响,所以若测砷、汞,需加入稳定剂。

③酸解体系:常见的酸解体系有硝酸-硫酸、硝酸-高氯酸、硝酸-盐酸、氢氟酸,过氧化氢、磷酸等,它们可将待测物中的有机物和还原性物质全部破坏。HCl、HClO₄、H₃PO₄和H₂SO₄将引起相当大的质谱干扰。Cl⁺、P⁺、S⁺离子将与其他基体元素Ar⁺、O⁺、H⁺结合生成多原子,例如³⁵Cl⁺⁴⁰Ar对⁷⁵As、³⁵Cl⁺¹⁶O对⁵¹V的叠加干扰。因此在ICP-MS的前处理中尽量少使用HCl、HClO₄、H₃PO₄和H₂SO₄。硝酸是样品前处理中使用最多,也是最好的消解溶剂,因为硝酸中含有的H、N、O这三种元素,在等离子体所携带的气体中均含有,不会再引入新的多原子离子干扰,其选择尤为重要。

④采用预消解:样品消解过程中会生成大量气体甚至会有酸溢出,导致损样。故若用敞开式消解法,样品经高温消解前均应进行预消解,常温进行放置一定的时间。

⑤消解温度控制:药物分析中样品可分为有机物含量高、有机物含量低、简单易消解的样品三大类。针对不同类别选择酸体系也不一样,盐酸适合在80℃以下的消解体系,硝酸适合在80-120℃的消解体系,硫酸适合在340℃左右的消解体系,盐酸-硝酸的混酸适合在95-110℃的消解体系,硝酸-高氯酸的混酸适合在140-200℃的消解体系,硝酸-硫酸的混酸适合120-200℃的消解体系,硝酸-过氧化氢适合95-130℃的消解体系。

5 结论

总之,恩替卡韦为有机高分子化合物,合成和工艺流程中加入钛和钒的量很少,属于痕量级别的检测。在仪器参数已经确定的情况下,前处理方式直接影响数据的准确性,根据实验结果得出,开发的ICP-MS方法若使用微波消解前处理,灵敏度高,检出限低,准确度和精密度均较好,适用于恩替卡韦原料药中钛和钒的含量检测。

参考文献

- [1] 杨守宁,张磊,胡文浩,等.恩替卡韦的合成[J].中国医药工业杂志,2013,44(7):657-659.
- [2] 符传武,韦瑶瑶,洪薇,等.ICP-MS测定明胶空心胶囊中的二氧化钛[J].药物分析杂志,2015,35(12):2209-2213.
- [3] 张兰,龙智翔,谢涛,等.ICP-MS法测定兰索拉唑中钒残留[J].现代仪器与医疗,2012(6):77-78.