doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.03.021

高效液相色谱法检测乙酰半胱氨酸原料药中有关物质*

张承志，谢育媛，郭江红△

（湖北省药品监督检验研究院·国家药品监督管理局血液制品重点实验室·湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心，湖北 武汉 430064）

摘要：目的 建立检测乙酰半胱氨酸原料药中*L*-胱氨酸、*L*-半胱氨酸、*N*,*N*′-二乙酰-*L*-胱氨酸、*N*,*S*-二乙酰-*L*-胱氨酸4种已知杂质及其他未知杂质的高效液相色谱（HPLC）法。**方法** 色谱柱为Thermo ODS Hypersil C_{18}柱（250 mm×4.0 mm，5 μm），流动相为水（用磷酸调pH至3.0）-乙腈（97∶3，*V*/*V*），流速为1.0 mL/min，检测波长为220 nm，柱温为35 ℃，进样量为20 μL。**结果** *L*-胱氨酸、*L*-半胱氨酸、*N*,*N*′-二乙酰-*L*-胱氨酸、*N*,*S*-二乙酰-*L*-胱氨酸的进样量分别在80.32～2 409.59 ng、81.58～2 447.38 ng、83.84～2 515.20 ng、80.64～2 419.20 ng范围内与峰面积线性关系良好；检测限分别为5.04，8.64，3.70，5.69 ng，定量限分别为60.48，28.80，12.32，18.96 ng；精密度试验的*RSD*均小于2.0%（*n*=6）；供试品溶液稳定性不好，需临用现配；平均加样回收率分别为101.03%，93.90%，98.23%，97.96%，*RSD*分别为5.21%，3.34%，4.91%，5.65%（*n*=6）。**结论** 该方法灵敏度高，准确度和重复性均较好，可用于检测乙酰半胱氨酸原料药中有关物质。

关键词：乙酰半胱氨酸；高效液相色谱法；有关物质；杂质

中图分类号：R927.2；R974+.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1006-4931(2022)03-0087-05

Determination of Related Substances in Acetylcysteine APIs by HPLC

ZHANG Chengzhi, XIE Yuyuan, GUO Jianghong

(Hubei Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory of Quality Control of Blood Products · Hubei Pharmaceutical Quality Inspection and Control Engineering Technology Research Center, Wuhan, Hubei, China 430064)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of four known impurities (*L*-cystine, *L*-cysteine, *N*,*N*′-diacetyl-*L*-cystine, *N*,*S*-diacetyl-*L*-cysteine) and other unknown impurities in acetylcysteine active pharmaceutical ingredients (APIs). **Methods** The chromatographic column was Thermo ODS Hypersil C_{18} column (250 mm×4.0 mm, 5 μm), the mobile phase was water (pH was adjusted to 3.0 with phosphoric acid)-acetonitrile (97∶3, *V*/*V*), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of *L*-cystine, *L*-cysteine, *N*,*N*′-diacetyl-*L*-cystine, *N*,*S*-diacetyl-*L*-cysteine were 80.32-2 409.59 ng, 81.58-2 447.38 ng, 83.84-2 515.20 ng, 80.64-2 419.20 ng, respectively. The limits of detection (LOD) were 5.04, 8.64, 3.70 and 5.69 ng, and the limits of quantitation (LOQ) were 60.48, 28.80, 12.32 and 18.96 ng, respectively. The *RSD* of the precision test was less than 2.0% (*n*=6). The stability of the test solution was not good, which needed to be prepared the solution immediately before use. The average recoveries of *L*-cystine, *L*-cysteine, *N*,*N*′-diacetyl-*L*-cystine, *N*,*S*-diacetyl-*L*-cysteine were 101.03%, 93.90%, 98.23% and 97.96% with *RSD*s of 5.21%, 3.34%, 4.91%, 5.65% (*n*=6), respectively. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and reproducible, which can be used for the determination of related substances in acetylcysteine APIs.

Key words: acetylcysteine; HPLC; related substances; impurities

乙酰半胱氨酸又称*N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸，作为一种经典化痰药物，常用于治疗呼吸道感染性疾病。研究发现，乙酰半胱氨酸有较强的抗氧化应激和促肺表面活性物质生成等作用，目前广泛用于呼吸系统、消化系统、心血管系统、泌尿系统疾病的防治[1-5]。药物中的杂质除了影响其纯度外，还可能影响药理活性或稳定性，造成药效偏差，甚至导致严重不良反应[6-7]。乙酰半胱氨酸是由盐酸半胱氨酸与醋酐的乙酰化反应生成的产物，原料药和生产工艺均可能产生*L*-胱氨酸、*L*-半胱氨酸、*N*,*N*′-二乙酰-*L*-胱氨酸、*N*,*S*-二乙酰-*L*-胱氨酸4种已知杂质。2020年版《中国药典（二部）》[8]收载的乙酰半胱氨酸中，尚未要求有关物质的检查；收载的乙酰半胱氨酸颗粒的有关物质采用高效液相色谱（HPLC）法控制单个未知杂质和总杂质的含量，未涵盖上述4种已知杂质。《英国药典2020版》（BP2020）[9]、《欧洲药典9.0版》（EP9.0）[10]、《日本药局方17版》（JP 17）[11]均收载了乙酰半胱氨酸原料药及其有关物质的检查项，《美国药典42版》（USP42）[12]仅收

*基金项目：国家药典委员会2019年度国家药品标准提高项目[2019H082]。

第一作者：张承志，女，硕士，主管药师，研究方向为生化药品和生物制品质量控制，（电子信箱）19129284@qq.com。

△通信作者：郭江红，女，硕士，副主任药师，研究方向为生化药品和生物制品质量控制，（电子信箱）guojh26@hotmail.com。

载了乙酰半胱氨酸原料药。本研究中参考EP9.0，建立了测定乙酰半胱氨酸原料药中4种已知杂质及其他未知杂质的HPLC法，并开展相关方法学验证，以提高乙酰半胱氨酸原料药的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695/2489型高效液相色谱仪-紫外检测器（美国Waters公司）；XP205型精密分析天平（瑞士梅特勒-托利多有限公司，精度0.01 mg）；Milli-Q IQ7000型超纯水机（美国Millpore公司）；LC-250型超声仪（济宁市中区鲁超仪器厂，功率250 W，频率33 kHz）。

1.2 试药

L-胱氨酸（杂质A）对照品（批号为LRAC3784，含量为99.9%），*L*-半胱氨酸（杂质B）对照品（批号为BCBZ1870，含量为99.1%），均购自德国Sigma-Aldrich公司；*N*，*N*′-二乙酰-*L*-胱氨酸（杂质C）对照品（批号为11.0，含量为100%），*N*，*S*-二乙酰-*L*-胱氨酸（杂质D）对照品（批号为7.0，含量为100%），均购自European Pharmacopoeia Reference Standard；乙酰半胱氨酸对照品（中国食品药品检定研究院，批号为140671-201903，含量为99.8%）；乙酰半胱氨酸原料药（湖北新生源生物工程有限公司，批号分别为180701，180702，180703；武汉远大弘元股份有限公司，批号分别为202003003，202003004，202003005；浙江诚意药业股份有限公司，批号分别为0902-2020-03004，0902-2020-03005，0902-2020-03006）；乙腈（色谱纯，德国默克公司）；盐酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

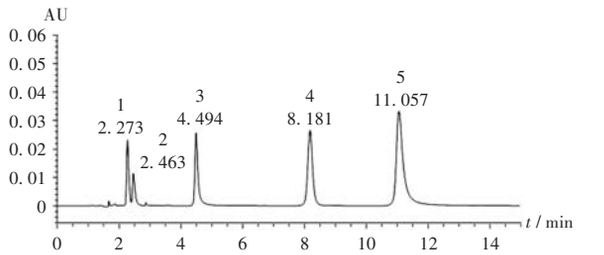
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Thermo ODS Hypersil C_{18}柱（250 mm×4.0 mm，5 μm）；流动相：水（用磷酸调pH至3.0）-乙腈（97∶3，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：220 nm；柱温：35 ℃；进样量：20 μL。混合对照品溶液在此色谱条件下的色谱图见图1。结果表明，4种已知杂质和乙酰半胱氨酸均能良好分离，各溶剂峰均无干扰。

2.2 溶液制备

取杂质A对照品21.09 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，加0.1 mol/L盐酸溶液10 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，作为对照品溶液①；取杂质B对照品15.47 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，加0.1 mol/L盐酸溶液10 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，作为对照品溶液②；取杂质C对照品10.51 mg，精密称定，置5 mL容量瓶中，加1 mol/L盐酸溶液0.5 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，作为对照品溶液③；取杂质D对照品10.64 mg，精密称定，置50 mL容量瓶中，加0.1 mol/L盐酸溶液5 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，作为对照品溶液④；分别精密量取对照品溶液①②③④各2，1，1，1 mL，置同一50 mL容量瓶中，加水稀释并定容，摇匀，即得对照品贮备液。取杂质A对照品、杂质B对照品、杂质C对照品、杂质D对照品、乙酰半胱氨酸对照品各10 mg，精密称定，置250 mL容量瓶中，加0.1 mol/L盐酸溶液25 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，即得混合对照品溶液。取乙酰半胱氨酸原料药0.8 g，精密称定，置100 mL容量瓶中，加0.1 mol/L盐酸溶液10 mL超声使溶解，加水稀释并定容，摇匀，临用现配，即得供试品溶液①。将供试品溶液①于室温放置至少1 h，即得供试品溶液②。



1. 杂质A　2. 杂质B　3. 乙酰半胱氨酸　4. 杂质C　5. 杂质D

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Impurity A　2. Impurity B　3. Acetylcysteine　4. Impurity C　5. Impurity D

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

2.3 方法学考察

线性关系考察：取2.2项下混合对照品溶液适量，作为对照品溶液①，取适量，加0.01 mol/L盐酸溶液准确稀释10倍，作为对照品溶液②。分别精密量取对照品溶液② 20 μL，对照品溶液① 10，20，40，60 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量（*X*，ng）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得杂质A，B，C，D的回归方程分别为$Y_A = 143.22X_A + 733.97$（$R_A^2 = 0.9999$），$Y_B = 76.09X_B - 2991.43$（$R_B^2 = 0.9994$），$Y_C = 333.50X_C - 2535.59$（$R_C^2 = 1.0000$），$Y_D = 764.74X_D - 26888$（$R_D^2 = 0.9997$）。结果表明，杂质A，B，C，D的进样量分别在80.32～2 409.59 ng、81.58～2 447.38 ng、83.84～2 515.20 ng、80.64～2 419.20 ng范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定：取2.2项下混合对照品溶液适量，用0.01 mol/L盐酸溶液逐步稀释，按2.1项下色谱条件进样测定。杂质A，B，C，D及乙酰半胱氨酸的检测限分别为5.04，8.64，3.70，5.69，8.34 ng，定量限分别为60.48，28.80，12.32，18.96，19.17 ng。

精密度试验：精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果杂质A，B，C，D峰面积的*RSD*分别为0.15%，0.33%，0.15%，0.33%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，共 6 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算各杂质的含量。结果杂质 A，B，C，D 含量的平均值分别为 0.010%，0.004%，0.040%，0.004%，由于杂质含量较低，测得 6 份结果几乎无差异，表明方法重复性良好。

稳定性试验：取同一批（批号为 202003003）样品，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加 0.1 mol / L 盐酸溶液 10 mL 使溶解，加水稀释并定容，摇匀，作为稳定性试验溶液，分别于 0，1，3，5，7，9，11，13，15 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果在 15 h 内，乙酰半胱氨酸和杂质 A 的峰面积均下降，杂质 B，C，D 的峰面积均增加，并出现 1 个保留时间约在 3.6 min 的降解杂质，表明供试品溶液极不稳定，需临用现配。

加样回收试验：取同一批（批号为 202003003）样品 0.4 g，精密称定，共 6 份，分别置 100 mL 容量瓶中，加 0.1 mol / L 盐酸溶液 10 mL 使溶解，精密加入对照品贮备液 5 mL，加水稀释并定容，依法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算加样回收率。结果杂质 A，B，C，D 的平均加样回收率分别为 101.03%，93.90%，98.23%，97.96%，*RSD* 分别为 5.21%，3.34%，4.91%，5.65%（$n = 6$）。

破坏性试验：1）酸破坏。取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加 2 mol / L 盐酸溶液 5 mL，室温放置 90 min，加 2 mol / L 氢氧化钠溶液调 pH 至中性，加 0.01 mol / L 盐酸溶液稀释并定容，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。详见图 2 A。2）碱破坏。取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加 2 mol / L 氢氧化钠溶液 5 mL，室温放置 90 min，加 2 mol / L 盐酸溶液调 pH 至中性，加 0.01 mol / L 盐酸溶液稀释并定容，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。详见图 2 B。3）氧化破坏。取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加 5% 过氧化氢溶液 5 mL，室温放置 90 min，加 0.01 mol / L 盐酸溶液稀释并定容，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。详见图 2 C。4）高温破坏。取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，沸水浴 1 h，放冷，加 0.01 mol / L 盐酸溶液稀释并定容，摇匀，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。详见图 2 D。5）强光破坏。取同一批（批号为 202003003）样品 0.8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，2 600 lx 照度下放置 10 d，加 0.1 mol / L 盐酸溶液 10 mL 使溶解，加水稀释并定容，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。详见图 2 E。正常条件下，供试品溶液及空白溶剂色谱图见图 2 F 至图 2 G。结果乙酰半胱氨酸在氧化破坏条件下极不稳定，在酸、碱破坏试验条件下，主峰峰面积下降明显，在高温、强光破坏试验条件下，主峰峰面积略有下降，表明该色谱条件能有效分离已知杂质峰及各相邻杂质峰，专属性良好。

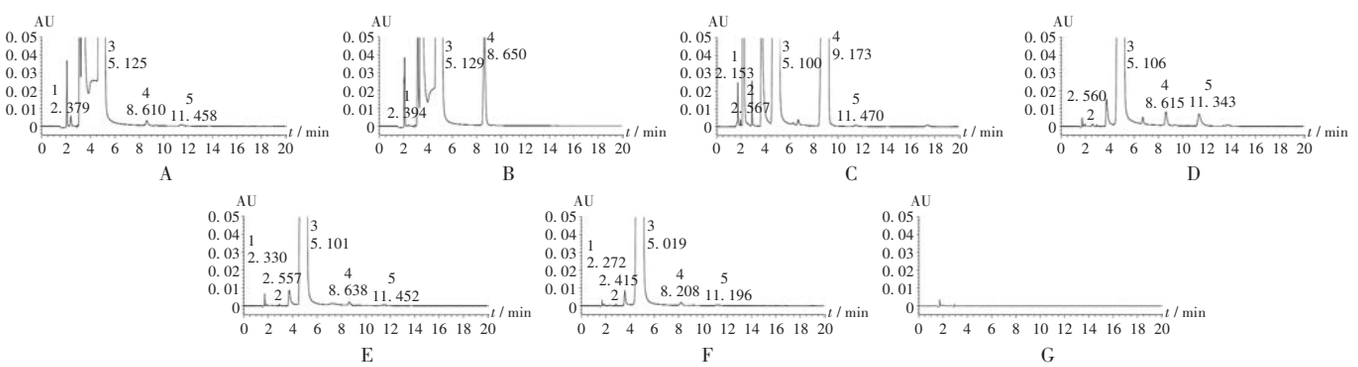
2.4 样品含量测定

取 9 批样品各适量，分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法分别计算杂质 A，B，C，D 的含量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 质量标准

EP10.3[13] 与 EP9.0 收录色谱条件相同，在 EP9.0 的基础上严控了杂质限度，由各单个杂质不得过



1. 杂质 A　2. 杂质 B　3. 乙酰半胱氨酸　4. 杂质 C　5. 杂质 D

A – F. 供试品溶液（条件分别为酸破坏、碱破坏、氧化破坏、高温破坏、强光破坏、正常条件）　G. 空白溶剂

图 2　破坏性试验高效液相色谱图

1. Impurity A　2. Impurity B　3. Acetylcysteine　4. Impurity C　5. Impurity D

A – F. Test solution (conditions are acid destruction, alkali destruction, oxidation destruction, high – temperature destruction, strong – light destruction and normal conditions respectively)　G. Blank solvent

Fig. 2　HPLC chromatograms of the destructive test

表1 乙酰半胱氨酸原料药中4种杂质含量测定结果(%)

Tab. 1 Results of content determination of four impurities in acetylcysteine APIs(%)

批号	杂质A	杂质B	杂质C	杂质D
180701	0.010	0.010	0.100	0.003
180702	0.003	0.010	0.100	0.003
180703	0.010	0.010	0.100	0.002
202003003	0.010	0.010	0.050	0.010
202003004	0.010	0.005	0.030	0.010
202003005	0.010	0.010	0.030	0.010
0902-2020-03004	0.020	0.010	0.050	0.100
0902-2020-03005	0.010	0.010	0.010	0.010
0902-2020-03006	0.010	0.010	0.020	0.010

0.50%、总杂质不得过0.50%，改为不控制杂质A，杂质B，C，D依次不得过0.30%，0.20%，0.15%，单个未知杂质不得过0.10%，总杂质不得过0.50%。BP2020的标准同EP9.0。JP17采用HPLC法控制未知杂质和总杂质，依次不得过0.30%和0.60%。本研究中参考EP9.0，要求各单个杂质不得过0.50%，总杂质不得过0.50%，溶剂峰和灵敏度小于溶液主峰面积的单个杂质忽略不计。按拟订方法检测9批原料药，4种已知杂质含量均不超过0.10%，表明现行生产工艺较好。

3.2 色谱条件优化

流动相pH选择：调节流动相A（水相）的pH分别为2.5，2.8，3.0，3.2，3.5，流动相水-乙腈（97∶3，*V*/*V*），其余色谱条件不变。结果显示：1）溶剂峰、杂质A峰与杂质B峰三者较难分离，随着pH的升高，溶剂峰与杂质A峰的分离度逐渐增加，当pH为3.0时，溶剂峰与杂质A峰才可分离；但随着pH的升高，杂质A峰与杂质B峰的分离度逐渐降低。2）主峰及4个杂质峰的对称性随pH的增加逐渐下降，主峰的理论板数从17 829（pH 3.0）降至3 308（pH 3.5）。综合考虑，最终选择流动相A为水（用磷酸调pH至3.0）。

流动相比例确定：设置流动相水（用磷酸调pH至3.0）-乙腈的比例分别为96∶4，97∶3，98∶2（*V*/*V*），结果表明，当有机相比例减少时，有利于杂质A与杂质B的分离［比例为98∶2（*V*/*V*）时，分离度为1.66］，由于Hypersil ODS柱填料无法耐受高水相，故选择流动相比例为97∶3（*V*/*V*）。

色谱柱选择：由于杂质A极性较大，出峰较早，易包裹溶剂峰，故色谱柱需满足溶剂不干扰杂质A的测定，才能很好分离已知杂质峰和主峰。考察了Waters，Shiseido，GL，Thermo等品牌共10款C_{18}柱[14]，发现同时能满足以上要求的有Thermo ODS Hypersil C_{18}柱和ODS-2 Hypersil C_{18}柱，且前者分离效果更好，故被选用。

3.3 高效液相色谱仪选择

系统适用性试验中发现，同一系统适用性溶液在相同色谱条件下，杂质A与杂质B用戴安品牌高效液相色谱仪比Waters品牌的分离度更好，这可能与2种品牌仪器的管路体积、长度及色谱峰积分方式等因素有关。但考虑到杂质的检查方法应符合普遍适用性原则，较多企业使用Waters液相色谱仪，故选择Waters品牌。

3.4 溶液制备的优化

专属性试验考察中发现，强酸（2 mol/L盐酸溶液）会引起乙酰半胱氨酸主峰峰面积下降，故将EP9.0中供试品溶液配制“加1 mol/L盐酸溶液1 mL”改为“加0.1 mol/L盐酸溶液10 mL超声使溶解”。

3.5 待解决的问题

破坏性试验中发现，供试品溶液随放置时间的延长会产生相对保留时间（保留时间约3.6 min）约0.7的杂质，该杂质的峰面积随放置时间的延长而增大。EP9.0要求供试品溶液①临用现配，供试品溶液①至少放置1 h后产生的保留时间约为3.3 min的杂质峰（2-甲基-2-噻唑啉-4-羧酸峰）可忽略不计。JP17也要求供试品溶液临用现配。考虑是样品溶于盐酸溶液后不稳定导致降解杂质产生，并非样品本身的降解杂质，故未将降解杂质纳入限度考虑，并忽略不计。由于时间仓促，本研究中未进一步研究相对保留时间约0.7的降解杂质。

3.6 方法评价

本方法灵敏度高，准确度和重复性均较好，可用于检测乙酰半胱氨酸原料药中有关物质。

参考文献

[1] 王振花，李潮生，李晓丽. *N*-乙酰半胱氨酸在各系统疾病防治中的研究进展[J]. 医学综述，2019，25(11)：2138-2141.
[2] 王　科，李荣山. *N*-乙酰半胱氨酸研究进展[J]. 国际移植与血液净化杂志，2016，14(1)：11-14.
[3] 杨琳琳，王玉洁，刘　刚，等. *N*-乙酰半胱氨酸对膜性肾病大鼠肾脏的保护作用[J]. 实用医学杂志，2019，35(6)：848-854.
[4] 高爱华，王新丽，孙艳芹，等. 肝苏片联合乙酰半胱氨酸注射液治疗慢性重型乙型肝炎临床观察[J]. 河北中医，2019，41(1)：74-78.
[5] 付　伟，辛丽云，陈乾华. 乙酰半胱氨酸注射溶液雾化吸入对COPD患者免疫功能及肺功能的影响[J]. 实用药物与临床，2019，22(6)：597-600.
[6] 何文秀，陆恩浩，陈依婷，等. 吸入用乙酰半胱氨酸溶液中有关物质的检测和质量评价[J]. 中国药物经济学，2019，14(8)37-41.
[7] 陈　刚，章　蔷. 浅析我国药物研发中杂质研究面临的挑战与思考[J]. 科技资讯，2018，16(32)：227.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（二部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：7-8.
[9] British Pharmacopoeia Commission. BP2020(Volume Ⅰ)[M]. London：The Stationery Office，2020：62-64.