

LCMS-8050 检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量

LCMSMS-532

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量的方法。样品以 50% 甲醇水溶液溶解定容，滤过后上机分析。采用外标法定量，在 0.1~100 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.9999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.02~0.08% 和 1.50~2.22% 之间。该方法灵敏可靠，4- 氯苯胺定量限为 0.1 ppm，远低于浓度限度值 17 ppm；三个浓度样品加标回收率在 97.8~98.3% 之间，每个浓度平行处理三次，测试结果的 RSD 在 0.83~3.22% 之间；残留实验结果为阴性，可为扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量测定提供参考。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 4- 氯苯胺 扑热息痛 遗传毒性杂质

遗传毒性杂质（Genotoxic Impurity, GTI）是指化合物本身直接或间接损伤细胞 DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能。其在极低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤，导致基因突变并促使肿瘤发生。因其毒性很强，对药物的安全性造成巨大威胁。

扑热息痛又名对乙酰氨基酚，具有解热镇痛作用，是感冒药中的主要成分。2020 年 7 月初，荷兰媒体报道，在一家制药公司生产的扑热息痛中检测到 4- 氯苯胺。4-

氯苯胺是苯胺类遗传毒性杂质，作为药物合成的起始物料和中间体而被广泛应用，但因为 4- 氯苯胺对细胞存在潜在毒性，因此需要控制其在药物中的含量。

目前尚无质量标准收录 4- 氯苯胺遗传毒性杂质含量测定方法。本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪定量检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺的分析方法，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

质谱仪：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver.5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm；

P/N: 227-32001-03；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A-0.1% 乙酸水溶液；B-0.1% 乙酸甲醇溶液

洗针模式：进样前后洗针，External only（进样针外壁清洗），Rinse Port

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样体积：2 μL

洗针液：甲醇 / 水 = 1/1 (v/v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.75	Oven	CTO.RVR	0*
4.00	Pumps	Pump B Conc.	50
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.51	Pumps	Pump B Conc.	5
8.00	Controller	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至质谱。

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 400 °C

接口温度: 300 °C

DL 温度: 250 °C

加热气流速: 10 L/min

干燥气流速: 10 L/min

碰撞气: 氩气 270 kPa

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	简称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	4- 氯苯胺	4-chlooraniline	PCA	103-90-2	128.00	93.10*	-21.0	-18.0	-17.0
						75.05	-12.0	-34.0	-13.0

* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液配制

取 4- 氯苯胺标准贮备液 (100 µg/mL), 以 50% 甲醇水逐级稀释为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 十个标准系列工作溶液, 待测。

1.4 样品前处理

准确称取扑热息痛片 (规格: 每片含扑热息痛 0.3 g) 粉末样品 (含扑热息痛 10.0 mg) 至 10 mL 容量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液, 摇匀至样品溶解, 定容至刻度, 过 0.22 µm 尼龙滤膜后, 上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 色谱条件选择

本实验针对扑热息痛片剂进行遗传毒性杂质分析, 主药 (扑热息痛) 的浓度约为 mg/mL 级别, 遗传毒性杂质浓度约为 ng/mL 级别。为了准确测定低浓度的遗传毒性杂质, 并且避免高浓度的主药和辅料进入质谱, 造成污染, 需要通过流路切换阀将此类物质切至废液, 只让待测杂质进入质谱检测, 故主药及辅料与待测杂质的分离度至关重要。本文对流动相组成和梯度时间程序进行了优化, 优选的乙酸流动相体系以及缓和梯度时间程序, 实现了主药等与待测杂质的良好分离。本方法中通过设置阀切换程序将 3.75 min 以后洗脱液切入质谱进行分析, 其余时间切入废液。扑热息痛样品 PDA 色谱图和 4- 氯苯胺 MRM 谱图见图 1。

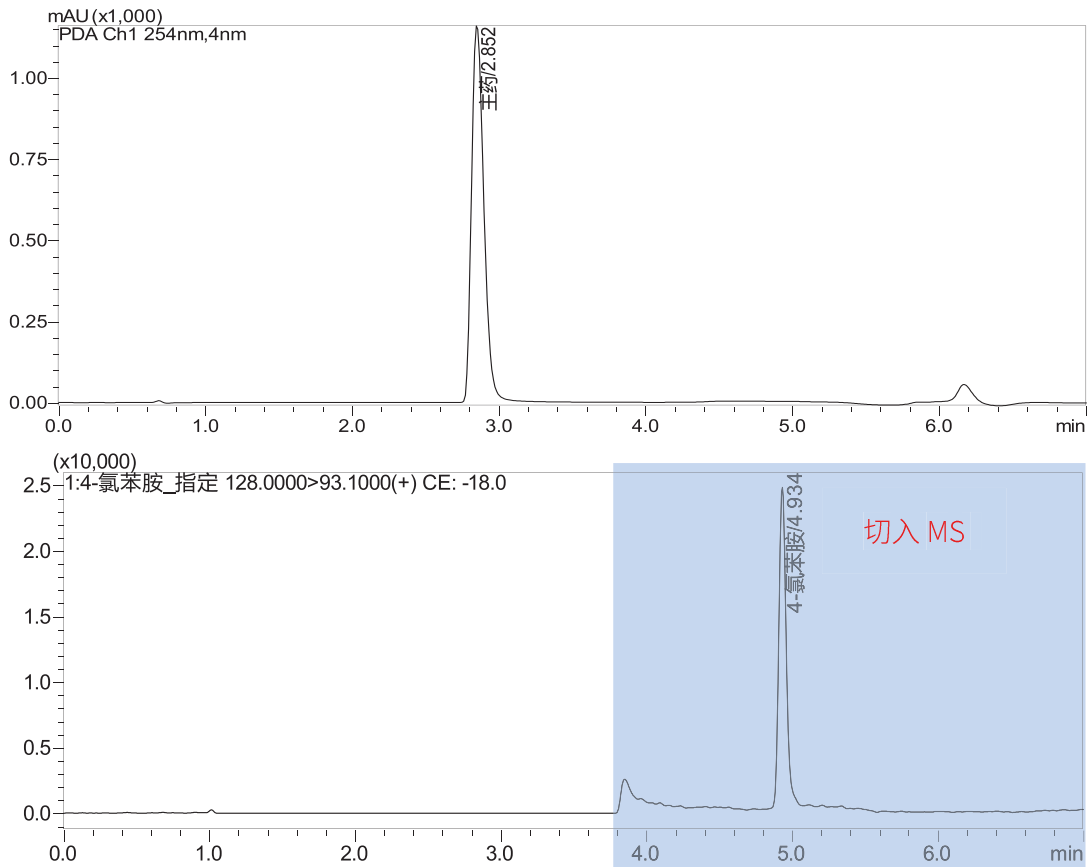


图1 扑热息痛片样品 PDA 色谱图 (上, API 浓度 1 mg/mL) 和 4- 氯苯胺 MRM 谱图 (下, 4- 氯苯胺浓度 1 ng/mL)

2.2 专属性

溶剂空白样品与 4- 氯苯胺标准溶液 (0.1 ng/mL) MRM 重叠谱图显示, 目标峰保留时间处, 未见明显干扰, 方法专属性好。

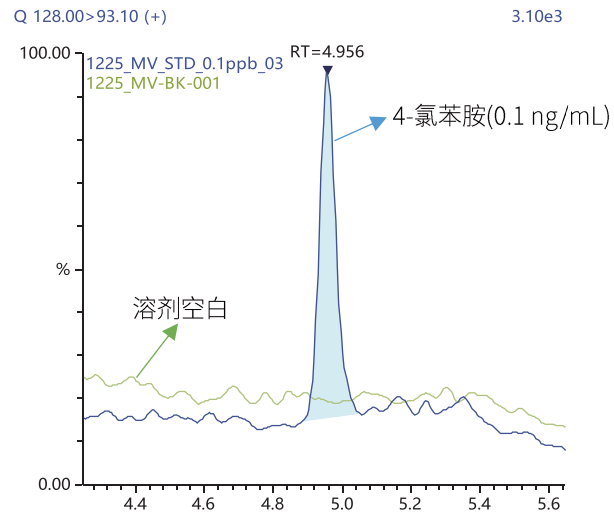


图2 4- 氯苯胺标准溶液 (0.1 ng/mL) 和溶剂空白 MRM 重叠色谱图

2.3 线性关系

按照 1.3 配制十个不同浓度的标准系列溶液, 按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标, 外标法绘制标准曲线。4- 氯苯胺标准曲线见图 3, 线性方程、相关系数和定量限见表 3。

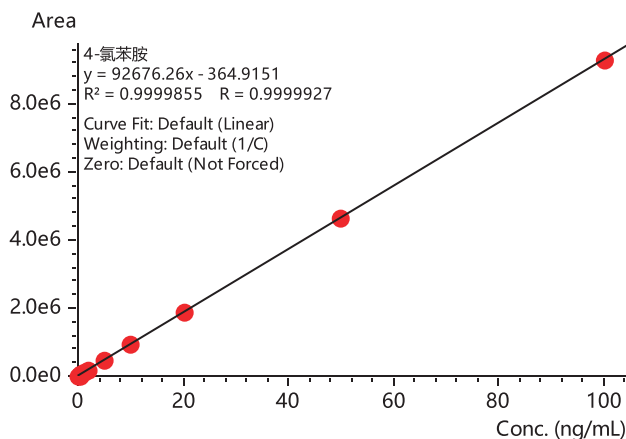


图 3 4- 氯苯胺标准曲线

表 3 线性关系、检出限和定量限 (权重: 1/C)

名称	定量方法	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 (ng/mg)	定量限 S/N
4- 氯苯胺	外标法	Y=92676.26X-364.9151	0.1~100	95.0~102.4	0.9999	0.1	20.2

2.4 精密度实验

对三个浓度的标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.02~0.08% 和 1.50~2.22% 之间, 仪器精密度良好。

表 4 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
4- 氯苯胺	0.07	2.22	0.08	1.50	0.02	1.77

2.5 加标回收实验

在扑热息痛片样品中添加三个不同浓度的标准溶液, 每个浓度的加标样品平行处理三份, 加标回收结果见表 5。所测扑热息痛片样品中未检测出 4- 氯苯胺杂质。三个不同浓度加标回收率在 97.8~98.3% 之间, 测试结果的 RSD 在 0.83~3.22% 之间。

表 5 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品测定结果 (ng/mg)	0.5 ng/mg		5 ng/mg		50 ng/mg	
		回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
4- 氯苯胺	未检出	98.1	3.22	97.8	0.83	98.3	1.35

2.6 残留实验

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后, 进样分析溶剂空白, 分析结果与定量下限 (0.1 ng/mL) 比对, 残留考察结果表明, 4- 氯苯胺检测通道中无干扰。

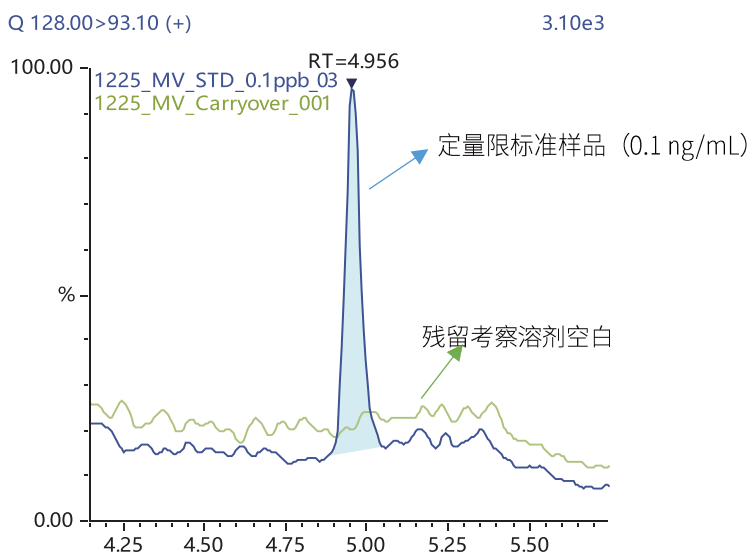


图 4 残留考察溶剂空白样品色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用定量测定扑热息痛片中 4-氯苯胺遗传毒性杂质的新方法。ICH M7 指南（评估和控制药品中 DNA 反应性 / 诱变性杂质以限制潜在致癌风险）附录所规定的 4-氯苯胺可接受摄入量（API）为 34 $\mu\text{g}/\text{day}$ ，通常成人服用扑热息痛的最大日摄入量为 2 g，故 4-氯苯胺浓度限度为 17 ppm。本方法 4-氯苯胺定量限为 0.1 ppm，远低于浓度限度值。本方法线性范围宽、重复性好、准确度高、前处理简单，可实现扑热息痛中痕量遗传毒性杂质 4-氯苯胺的高灵敏度、快速检测。

岛津应用云

