

LCMS-2050 检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量

LCMS-046

摘要： 本文建立了一种使用岛津高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050 检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量的新方法。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 1~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内，相关系数大于 0.999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.05~0.07% 和 0.37~1.26% 之间。该方法灵敏可靠，4- 氯苯胺定量限为 1 ppm，远低于浓度限度值 17 ppm；三个浓度样品加标回收率在 93.1~97.4% 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： 单四极杆质谱 4- 氯苯胺 扑热息痛 遗传毒性杂质

技术特点：

- ❖ 使用 LCMS-2050 建立了一种检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺含量的新方法。
- ❖ 方法定量限为 1 ppm，远低于浓度限值 17 ppm，灵敏度高。

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。据荷兰媒体报道，曾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。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。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》附录中所规定的 4- 氯苯胺可接受摄入量为 34 $\mu\text{g/day}$ ，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。

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单四极杆液质联用仪 LCMS-2050 定量检测扑热息痛中遗传毒性杂质 4- 氯苯胺的分析方法。LCMS-2050 标配加热 DUIS 源，灵敏度高、耐用性好、节省空间、操作简单、维护方便，适合用于药物杂质的定性定量分析，可显著提高分析效率。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40B XR	自动进样器：	SIL-40 XR
柱温箱：	CTO-40C	二极管阵列检测器：	SPD-M40
质谱仪：	LCMS-2050	色谱工作站：	LabSolutions Ver.5.114



图 1 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

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 μ m;
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

流 速： 0.4 mL/min 柱 温： 40°C

进 样 体 积： 2 μ L 检 测 波 长： 254 nm

洗 脱 方 式： 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.30	Oven	CTO.RVR	1*
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.01	Pumps	Pump B Conc.	10
8.00	Controller	Stop	

注：* “1” 表示流路切换至质谱。

质谱条件

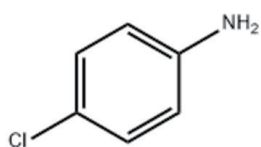
离子化模式： DUIS, 正离子模式 脱溶剂温度： 450°C

雾化气流速： 3 L/min D L 温 度： 200°C

加热气流速： 5 L/min 接 口 电 压： 0.5 kV

干燥气流速： 7 L/min 扫 描 模 式： SIM

采 样 周 期： 0.3 sec



4- 氯苯胺

- 英文名： 4-chloroaniline
- 简称： PCA
- CAS 号： 103-90-2
- 分子量： 127.57
- [M+H]⁺： m/z 128.00

1.3 标准溶液配制

取 4- 氯苯胺标准贮备液 (100 mg/L) , 以 50% 甲醇水逐级稀释为 1、 2、 5、 10、 20、 50、 100、 200、 500 μ g/L 的九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 μ m 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 $\mu\text{g/L}$ 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 2.3 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 SIM 谱图见图 2。

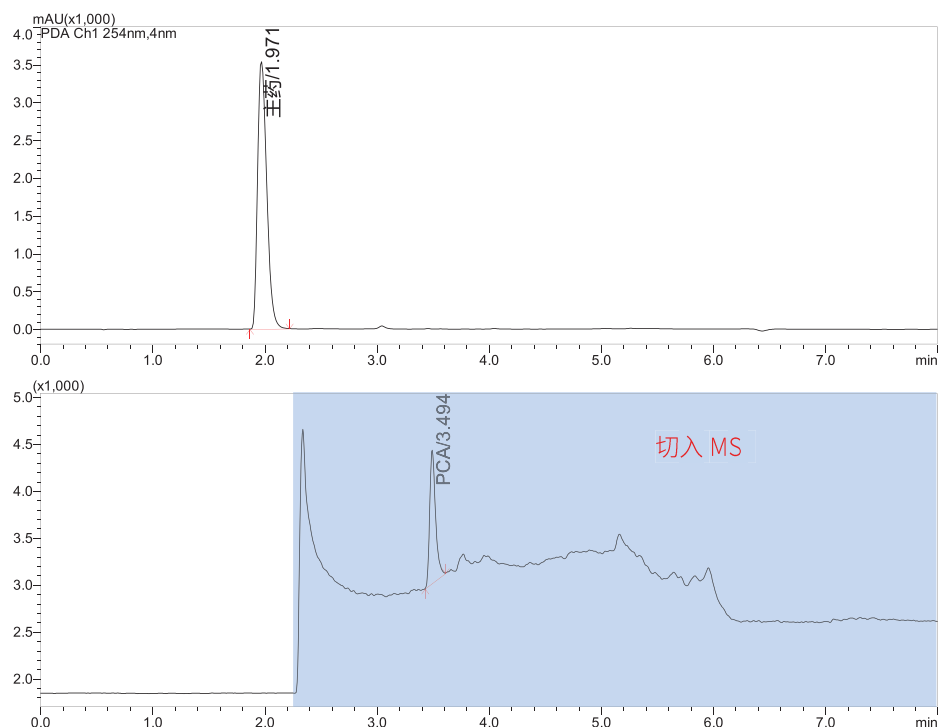


图 2 扑热息痛片样品 PDA 色谱图（上，主药浓度 1 mg/mL）
 和 4- 氯苯胺 SIM 色谱图（下，4- 氯苯胺浓度 1 $\mu\text{g/L}$ ）

2.2 专属性

溶剂空白样品与 4- 氯苯胺标准溶液（1 $\mu\text{g/L}$ ）SIM 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。

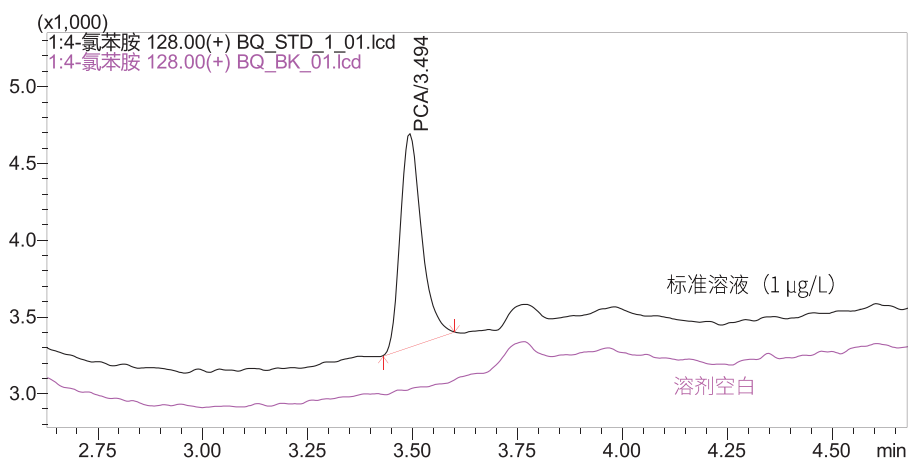


图 3 4- 氯苯胺标准溶液（1 $\mu\text{g/L}$ ）和溶剂空白的重叠色谱图（基线移位模式）

2.3 线性关系

按照 1.3 配制九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，外标法绘制校准曲线。4- 氯苯胺校准曲线见图 4，线性方程、相关系数和定量限见表 2。

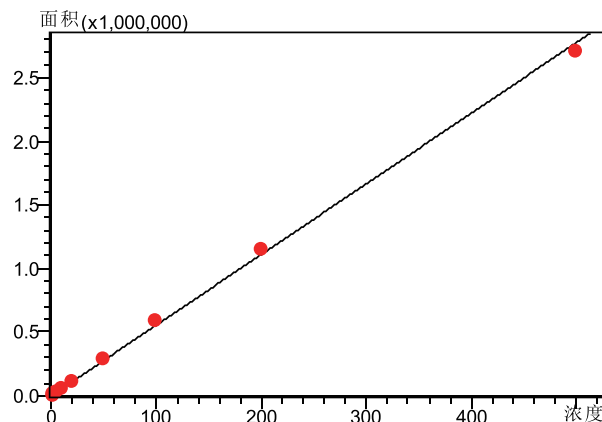


图 4 4- 氯苯胺校准曲线

表 2 线性关系和定量限 (权重: 1/C)

名称	线性范围 (μg/L)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 (μg/L)	定量限 S/N
4- 氯苯胺	1~500	93.7~105.3	0.9994	1	20.6

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 3 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.05~0.07% 和 0.37~1.26% 之间，仪器精密度良好。

表 3 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (2 μg/L)		RSD% (20 μg/L)		RSD% (200 μg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
4- 氯苯胺	0.07	1.26	0.05	0.83	0.05	0.37

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，加标回收结果见表 4。所测扑热息痛片样品中未检测出 4- 氯苯胺杂质，色谱图见图 5。三个不同浓度加标回收率在 93.1~97.4% 之间。

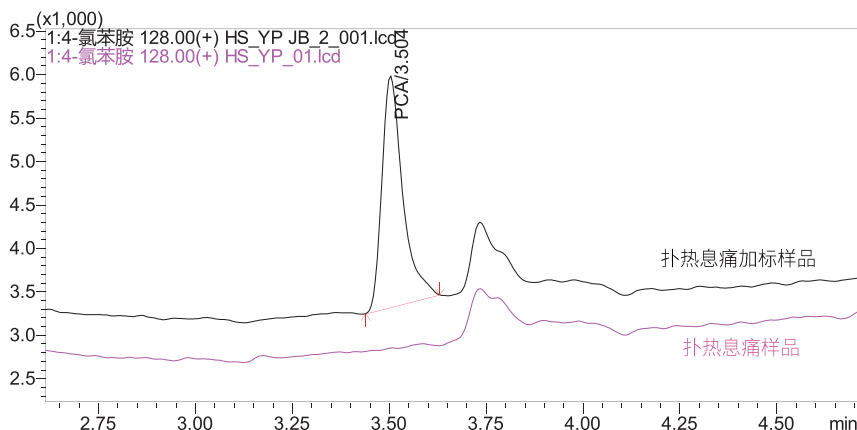


图 5 扑热息痛样品 (1 mg/mL) 和加标样品 (4- 氯苯胺加标浓度 2 μg/L) 重叠色谱图 (基线移位模式)

表 4 样品加标回收率

化合物名称	样品测定结果 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 /%		
		2 $\mu\text{g/g}$	20 $\mu\text{g/g}$	200 $\mu\text{g/g}$
4- 氯苯胺	N.D.	93.1	95.4	97.4

注：N.D. 表示未检出。

2.6 残留实验

高浓度标准样品 (500 $\mu\text{g/L}$) 分析完成后, 进样分析溶剂空白, 分析结果与定量限 (1 $\mu\text{g/L}$) 比对, 残留考察结果表明, 4- 氯苯胺检测通道中无干扰。

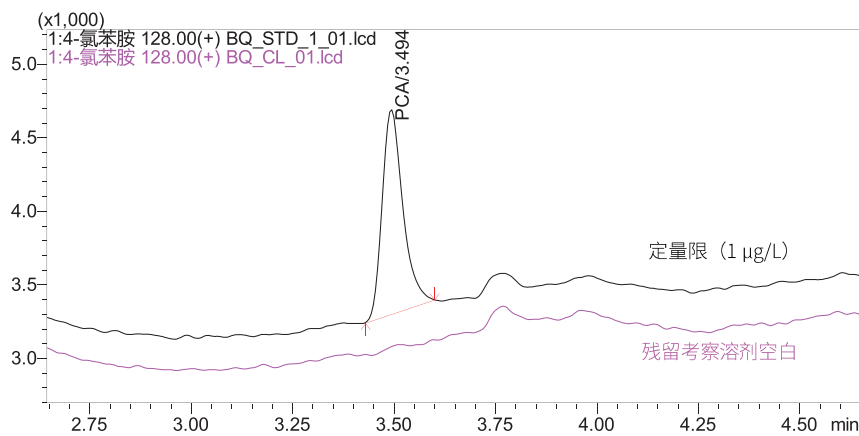


图 6 残留考察溶剂空白样品和定量限 (1 $\mu\text{g/L}$) 重叠色谱图 (基线移位模式)

■ 结论

本文建立了一种使用高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050 定量测定扑热息痛片中 4- 氯苯胺遗传毒性杂质的新方法。本方法线性范围宽、灵敏度高、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

