

HPLC 法测定对乙酰氨基酚片有关物质方法的优化

林美龄 郑小锋* 熊莉平 马睿 蓝昊宁 吴沈宸

(西南药业股份有限公司 重庆 400038)

摘要:目的 优化中国药典对乙酰氨基酚片中有关物质方法,采用一种方法检测对氨基酚、对氯苯乙酰胺和其他有机杂质,并能与制剂中的特定辅料分开。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱采用 Agilent ZORBAX XDB-C8,流动相 A、B 分别为甲醇-水-冰醋酸(50:950:1)和甲醇-水-冰醋酸(500:500:1)(梯度洗脱),流速为 0.9ml/min;检测波长为:0~8.1min 前 272nm,8.1min 后 245nm;柱温为 40℃;进样量为 20 μ L。结果 在该色谱条件下,对乙酰氨基酚片中的主药(对乙酰氨基酚)、11 个已知杂质(杂质 A、B、C、D、F、H、J(对氯苯乙酰胺)、K(对氨基酚)、L、M、N)和制剂特定辅料的分离度均大于 1.5。在考察的浓度范围内,线性关系良好($r \geq 0.9994$);平均回收率为 96.56%~114.62%(RSD 为 0.7%~6.1%);各杂质定量限浓度远低于控制限度。结论 该方法专属性强、准确度高,可用于对乙酰氨基酚片有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法;对乙酰氨基酚片;有关物质;方法优化

对乙酰氨基酚片在《中国药典》^[1]中有收载,为《国家基本药物目录》品种。国务院印发的《国家药品安全“十二五”规划》^[2]和《国务院关于改革药品医疗器械审评审批制度的意见》^[3]明确对乙酰氨基酚片为一致性评价品种。中国药典原料药对乙酰氨基酚的有关物质采用两个方法分别控制对氨基酚和对氯苯乙酰胺,制剂对乙酰氨基酚片的有关物质仅控制对氨基酚。美国药典原料标准也采用两个方法分别控制对氨基酚和有机杂质,制剂仅控制对氨基酚。查询欧洲药典^[4]和美国药典^[5],潜在的杂质有杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J(对氯苯乙酰胺)、K(对氨基酚)、L、M、N,根据原料药厂家提供的合成路线,我们对可能产生的杂质进行剖析,确定杂质 A、B、C、D、F、H、J(对氯苯乙酰胺)、K(对氨基酚)、L、M、N 为原料可能引入的杂质,对其进行研究。将上述可能产生的杂质配制成系统适用性溶液筛选合适的方法,结果各国药典原料与制剂的方法均未能同时将上述杂质基线分离,且满足微量杂质对氨基酚和对氯苯乙酰胺(限度 0.001%)的灵敏度要求。故在美国药典原料标准有机杂质的方法上进行优化,首先优化梯度洗脱,使得各杂质和制剂中的抑菌剂都能达到基线分离,然后采用分段波长的方式优化基线提高微量杂质的检测灵敏度,取得理想的试验结果,现报道如下。

1 材料

1.1 主要仪器 XPE26 电子天平(梅特勒);ME204T/02 电子天平(梅特勒);SCQ-Y500A 超声波清洗机(上海声彦);Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦)。

1.2 试剂 对乙酰氨基酚片(西南药业股份有限公司,批号:Y180304,规格:0.5 g);对乙酰氨基酚片(德国 GSK,批号:6400152,规格:0.5 g);对乙酰氨基酚原料(河南安丘鲁安,批号:1751211);对乙酰氨基酚对照品(中检院,批号:100018-201610,纯度:99.9%);对氨基酚对照品(中检院,批号:100802-201203,纯度:100%);对氯苯乙酰胺对照品(中检院,批号:100850-201803,纯度:100%);杂质 A 对照品(LGC,批号:36404,纯度:99.8%);杂质 B 对照品(LGC,批号:43849,纯度:99.9%);杂质 C 对照品(LGC,批号:78797,纯度:99.7%);杂质 D 对照品(LGC,批号:76103,纯度:100%);杂质 F 对照品(LGC,批号:66550,纯度:99.9%);杂质 H 对照品(LGC,批号:123344,纯度:99.4%);杂质 L 对照品(SINCO,批号:19-03-2515,纯度:95.88%);杂质 M 对照品(SINCO,批号:18-04-0814,纯度:97.57%);杂质 N 对照品(LGC,批号:142216,纯度:99.99%);甲醇为色谱纯;冰醋酸等其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Agilent ZORBAX XDB-C8 4.6*250mm 5 μ m 或效能相当的色谱柱);检测波长为:0~8.1min 前 272nm,8.1min 后 245nm;柱温为 40℃;流速为 0.9ml/min;流动相 A 为甲醇:水:冰醋酸(50:950:1);流动相 B 为甲醇:水:冰醋酸

(500:500:1),梯度洗脱见下表:

表 1 对乙酰氨基酚片有关物质梯度洗脱

洗脱时间	流动相 A	流动相 B
0	100	0
20	0	100
50	0	100
51	100	0
65	100	0

2.2 溶液的配制

溶剂:甲醇-水(4:6)

供试品溶液:含对乙酰氨基酚约 25mg/ml 的溶液

对照品溶液:含对乙酰氨基酚和杂质 A、B、C、D、F、H、L、M、N、对氨基酚约 25 μ g 和对氯苯乙酰胺约 0.25 μ g 的混合杂质溶液

2.3 系统适用性试验

精密量取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果各杂质能有效分离,空白溶剂不干扰测定,自制制剂与参比制剂供试品中的抑菌剂不干扰杂质测定,专属性符合要求。

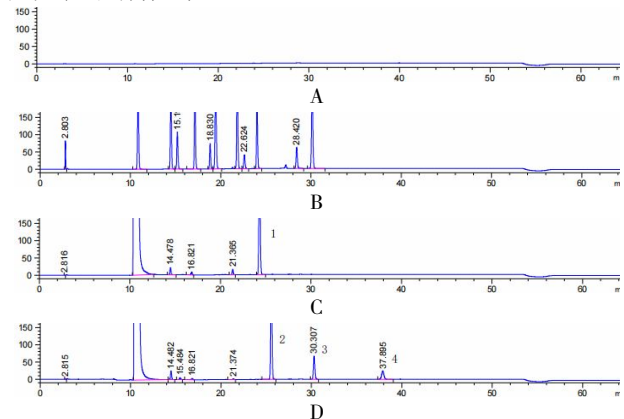


图 1. 方法专属性色谱图

A.空白溶剂色谱图 B.对照品溶液色谱图 C.自制供试品溶液色谱图 D.参比制剂供试品溶液色谱图

1.抑菌剂山梨酸钾 2.抑菌剂羟苯甲酯 3.抑菌剂羟苯乙酯 4.抑菌剂羟苯丙酯

2.4 检测限和定量限

用溶剂逐步稀释各已知杂质对照品储备溶液,获得的色谱图中,信噪比约为 10:1 时,确定为定量限;信噪比约为 3:1 时,确定为检测限。各杂质定量限远低于控制限度要求,表明本方法能满足杂质检测灵敏度的要求,具体详见表 2。

表 2 定量限和检测限结果

名称	项目	浓度 mg/ml	相对浓度%	绝对进样量 ug	S/N	控制限度%
杂质 L	定量限	0.00004467	0.00018	0.89	14.8	0.1%
	检测限	0.00001340	0.00005	0.27	3.7	
杂质 M	定量限	0.00021022	0.00084	4.20	14.4	0.1%
	检测限	0.00008759	0.00035	1.75	3.7	
杂质 N	定量限	0.00001381	0.00006	0.28	10.1	0.1%
	检测限	0.00000414	0.00002	0.08	3.2	
对氨基酚	定量限	0.00002933	0.00012	0.59	11.4	0.1%
	检测限	0.00001466	0.00006	0.29	4.6	
对乙酰氨基酚	定量限	0.00015860	0.00063	3.17	12.6	0.1%
	检测限	0.00003172	0.00013	0.63	3.3	
杂质 B	定量限	0.00011290	0.00045	2.26	10.1	0.1%
	检测限	0.00002258	0.00009	0.45	4	
杂质 A	定量限	0.00023840	0.00095	4.77	13.7	0.1%
	检测限	0.00004768	0.00019	0.95	3.2	
杂质 C	定量限	0.00012160	0.00049	2.43	14.2	0.1%
	检测限	0.00002432	0.00010	0.49	3.1	
杂质 D	定量限	0.00011250	0.00045	2.25	15.6	0.1%
	检测限	0.00002250	0.00009	0.45	3.5	
杂质 F	定量限	0.00057460	0.00230	11.49	15.6	0.1%
	检测限	0.00011493	0.00046	2.30	3.8	
杂质 H	定量限	0.00011680	0.00047	2.34	10.4	0.1%
	检测限	0.00002336	0.00009	0.47	2.9	
对氯苯乙酰胺	定量限	0.00003512	0.00014	0.70	13.3	0.001%
	检测限	0.00001756	0.00007	0.35	3.9	

2.5 线性 and 校正因子

在定量限到 300%限度水平配制线性溶液进样，以峰面积为纵坐标（y）、进样质量浓度为横坐标（x）进行线性回归，并按以下公式计算校正因子，校正因子 = 对乙酰氨基酚线性方程的斜率/杂质线性方程的斜率。线性范围和校正因子考察结果详见表 3。

表 3 线性范围和校正因子考察结果

杂质	线性关系	相关系数 r	线性范围 mg/ml	校正因子
对氨基酚	$y=13914x-8.4211$	0.9999	0.005865 ~ 0.07038	6.07
杂质 B	$y=77029x+1.6527$	1	0.005645 ~ 0.06774	1.10
杂质 A	$y=36902x+0.5309$	1	0.00596 ~ 0.07152	2.29
杂质 C	$y=70512x+0.4343$	1	0.00608 ~ 0.07296	1.20
杂质 D	$y=93576x+14.995$	1	0.005625 ~ 0.0675	0.90
杂质 H	$y=80524x-32.505$	1	0.00584 ~ 0.07008	1.05
杂质 F	$y=19630x+0.8732$	1	0.00719 ~ 0.0862	4.30
对氯苯乙酰胺	$y=112074x-0.3437$	1	0.0000351 ~ 0.0010534	0.75
对乙酰氨基酚	$y=84448x+33.69$	1	0.00793 ~ 0.09516	-
杂质 L	$y=91199x+20.738$	0.9999	0.00004467 ~ 0.072592666	0.90
杂质 M	$y=24075x+1.0597$	0.9994	0.00021022 ~ 0.070074774	3.39
杂质 N	$y=96695x+21.366$	0.9999	0.00001381 ~ 0.082851714	0.84

2.6 精密度

由试验员 A 在 A 时间采用 A 仪器，平行测定 6 份供试品，作为重复性结果。由试验员 B 在 B 时间采用 B 仪器平行测定 6 份供

试品，合并重复性样品共 12 份样品作为精密度结果。因本品检出杂质较低，故不采用 RSD 值评价，改用绝对值差评价，最大测定绝对值差不超过 0.005%，精密度良好，结果详见表 4。

表 4 精密度考察结果

样品	杂质 K%	杂质 J%	杂质 B	杂质 C	其他单杂%	其他总杂%	总杂%
1	0.000082	未检出	0.010	0.005	0.013	0.015	0.030
2	0.000215	未检出	0.010	0.004	0.012	0.014	0.029
3	0.000249	未检出	0.010	0.003	0.012	0.014	0.028
4	0.000192	未检出	0.010	0.004	0.012	0.014	0.029
5	0.000190	未检出	0.010	0.004	0.012	0.014	0.029

6	0.000229	未检出	0.010	0.004	0.012	0.014	0.028
6 份平均值	0.000193	—	0.010	0.004	0.012	0.014	0.029
6 份绝对值差	0.0002	—	0	0.002	0.001	0.001	0.002
7	0.000133	未检出	0.011	0.004	0.013	0.018	0.033
8	0.000120	未检出	0.011	0.004	0.013	0.018	0.032
9	0.000060	未检出	0.011	0.005	0.013	0.018	0.033
10	0.000088	未检出	0.011	0.005	0.013	0.015	0.031
11	0.000079	未检出	0.011	0.004	0.013	0.014	0.029
12	0.000049	未检出	0.011	0.005	0.013	0.015	0.030
12 份平均值	0.000141	—	0.011	0.004	0.013	0.015	0.030
12 份绝对值差	0.0002	—	0.001	0.002	0.001	0.004	0.005

2.7 加样回收率

精密称取供试品 10 份, 其中一份作为空白供试品, 其余 9 份, 依次加入 50%限度水平杂质对照品溶液(3 份), 100%限度水平杂质对照品溶液(3 份), 200%限度水平杂质对照品溶液(3 份)。10 份样品按浓度由低到高依次进样, 各进一针。记录色谱图, 平均加样回收率

表 5 回收率考察结果

杂质	回收率区间	平均回收率	RSD
杂质 K (对氨基酚)	93.73% ~ 110.61%	100.15%	5.9%
杂质 B	98.83% ~ 101.52%	99.97%	0.8%
杂质 A	98.47% ~ 101.10%	99.73%	0.8%
杂质 C	97.79% ~ 100.10%	98.95%	0.7%
杂质 M	108.41% ~ 119.53%	114.62%	3.3%
杂质 D	98.26% ~ 102.12%	99.68%	1.1%
杂质 H	99.58% ~ 102.13%	101.18%	0.7%
杂质 F	98.54% ~ 102.41%	101.13%	1.2%
杂质 L	98.27% ~ 100.69%	99.29%	0.7%
杂质 J (对氯苯乙酰胺)	92.84% ~ 107.52%	96.56%	6.1%
杂质 N	97.70% ~ 100.55%	99.40%	1.0%

2.8 耐用性

耐用性实验中对流速 ($\pm 0.2\text{ml/min}$)、柱温 ($\pm 5^\circ\text{C}$)、色谱柱批号、流动相比比例进行微调, 微调色谱条件后, 系统适用性符合要求; 其中流速的变化对保留时间影响是最大的; 流动相 B 有机相增加有提高杂质 A 与杂质 B、杂质 F 与杂质 H 分离度的趋势。色谱柱耐用性中三根色谱柱均为 Agilent ZORBAX XDB-C8 4.6*250mm, 5 μm 。色谱柱 Agilent Eclipse plus C8 4.6*250mm, 5 μm 不适用本品

表 6 样品中有关物质测定结果

标准规定	自制品					参比制剂	
	Y180302 检验结果	Y180303 检验结果	Y180304 检验结果	Y180601 检验结果	Y180602 检验结果	Y180603 检验结果	6400152 检验结果
对氨基酚不得过 0.1%	ND	0.0001%	0.0002%	ND	ND	ND	0.0004%
杂质 B 不得过 0.1%	0.005%	0.005%	0.005%	0.009%	0.009%	0.009%	0.005%
杂质 A 不得过 0.1%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.013%
杂质 H 不得过 0.1%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.002%
其他单杂不得过 0.1%	0.003%	0.002%	0.003%	0.003%	0.003%	0.003%	0.002%
其他总杂不得过 0.3%	0.005%	0.007%	0.007%	0.004%	0.004%	0.004%	0.003%
总杂不得过 0.3%	0.011%	0.012%	0.012%	0.013%	0.013%	0.013%	0.023%

3 讨论

对乙酰氨基酚片中对氨基酚为毒性杂质和降解杂质, 对氯苯乙酰胺为基因毒性杂质和工艺杂质, 各国药典中原料标准均采用两种方法对上述杂质分别进行控制, 而制剂仅控制降解杂质对氨基酚。

率在 96.56% ~ 114.62% 范围内, RSD 在 0.7%~6.1% 范围内, 表明本方法准确度良好, 详见表 5。需要注意的是, 对氨基酚为不稳定杂质, 处溶液状态时会降解, 进行加样回收时, 采用冷藏进样会优化回收率结果。

供试品检测。故需指定色谱柱为 Agilent ZORBAX XDB-C8 4.6*250mm, 5 μm 。耐用性条件下各杂质含量与正常条件下的测定结果的绝对差值不超过 0.006%, 说明本方法耐用性较好。

2.9 样品测定

采用拟定标准测定 6 批自制样品和 1 批参比制剂, 均检出了对氨基酚、杂质 B 和未知杂质, 均未检出杂质 C、D、F、对氯苯乙酰胺、L、M、N。结果详见表 6。

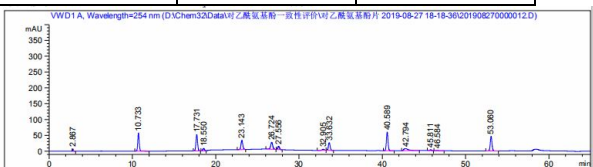
经实验证明各国药典原料和制剂标准对制剂中可能含有的杂质 (杂质 A、B、C、D、F、H、J (对氯苯乙酰胺)、K (对氨基酚)、L、M、N) 分离能力不佳, 或对杂质对氨基酚的检测灵敏度不够, 故有必要开发一种有关物质测定方法对上述杂质进行有效检测和控

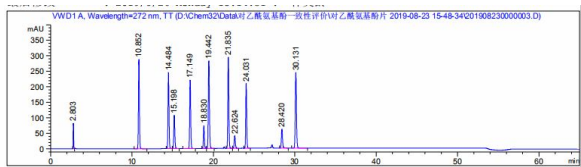
制, 保证产品的安全性。

3.1 优化梯度洗脱

各国药典标准中以美国药典对杂质分离效果最佳, 但其梯度时间较长, 在 53min 时流动相 B 增为 100%, 一般建议在 15~25min 内, 有机相由 10% 增为 100%, 对峰型较佳。因流动相 A 中含 5% 表 7 优化前后梯度方法对比

原梯度			优化后梯度		
时间	流动相 A	流动相 B	洗脱时间	流动相 A	流动相 B
0	82	18	0	100	0
8	82	18	20	0	100
53	0	100	50	0	100
58	0	100	51	100	0
59	82	18	65	100	0
73	82	18			





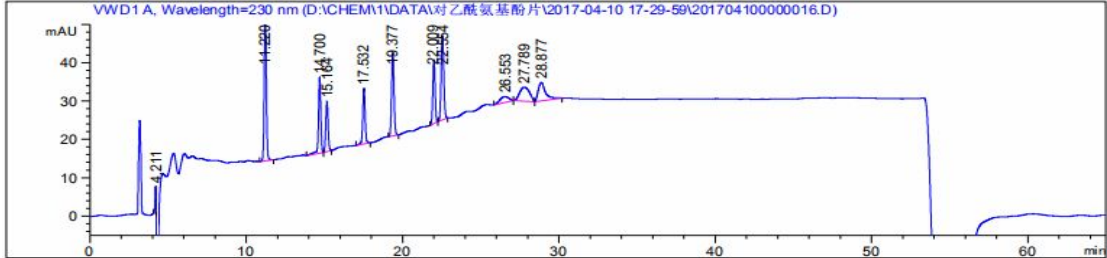
3.2 优化检测波长

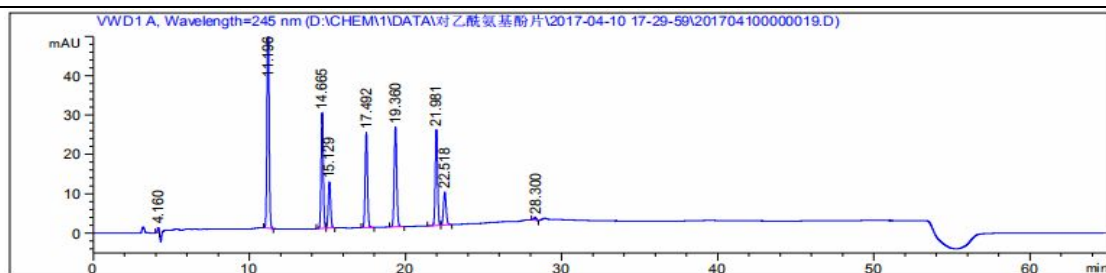
USP39 原料有机杂质检测方法检测对氨基酚 (杂质 K) 灵敏度低, 且对氨基酚是重点监控的降解杂质, 需改进方法提高对氨基酚检测灵敏度。在对比各国药典时, 发现检测波长不统一。ChP、EP、表 8 对乙酰氨基酚片有关物质波长筛选

杂质	溶剂	最大吸收波长(nm)	
对氨基酚	甲醇-水-冰醋酸 (500:500:1)	224	274
对氨基酚	甲醇-水 (4:6)	230	298
对氯苯乙酰胺	甲醇-水-冰醋酸 (500:500:1)	247	485
对氯苯乙酰胺	甲醇-水 (4:6)	246	658
对氨基酚	甲醇-水 (4:6)	231	—
A		278	—
B		244	—
C		202	—
D		239	—
F		441	—
H		241	—

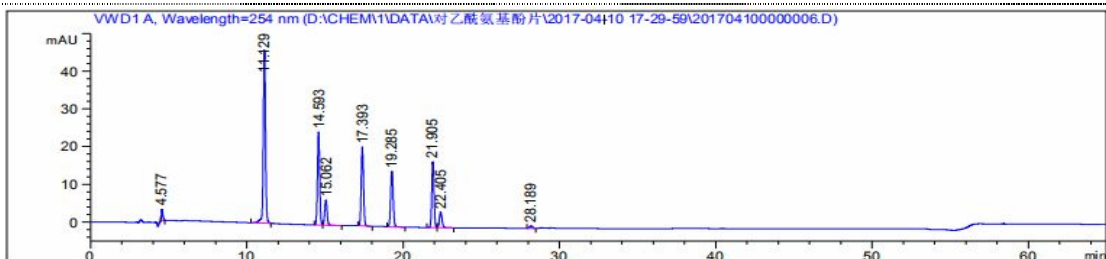
对氨基酚在不同溶剂的条件下表现出不同的最大吸收波长, 因此, 我们配制一份系统适用性溶液, 选择波长 230nm 245nm 254nm 272nm 四种波长对优化了梯度的有关物质方法进行梯度洗脱, 结果见表 9。

表 9 对乙酰氨基酚片有关物质不同波长杂质响应对比

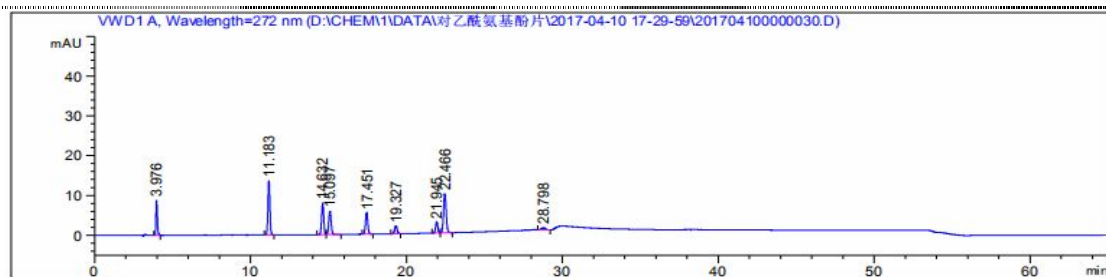
波长 nm	峰面积及色谱图								
	杂质 K	API	杂质 B	杂质 A	杂质 C	杂质 D	杂质 H	杂质 F	杂质 J
25	377	200	135	141	225	166	256	有干扰	
230									
	245	杂质 K	API	杂质 B	杂质 A	杂质 C	杂质 D	杂质 H	杂质 F
	8.5	514	282	123	245	280	242	98	7.3



杂质 K	API	杂质 B	杂质 A	杂质 C	杂质 D	杂质 H	杂质 F	杂质 J
21	448	239	71	212	166	173	49	7



杂质 K	API	杂质 B	杂质 A	杂质 C	杂质 D	杂质 H	杂质 F	杂质 J
54	119	76	63.1	54	21	27	113	8



254

272

用优化后的梯度在四种波长下检测系统适用性溶液,杂质K(对氨基酚)在272nm波长下响应强度最大,且基线平稳不干扰检测,其他各杂质和API在245nm波长下响应强度较大。综合以上信息,为了更全面并且高效地考察对乙酰氨基酚的杂质,最终选择0~8.1min前272nm,8.1min后245nm为检测波长。采用分段波长检测,避免了双波长检测对仪器的选择也减少了数据处理的工作量,并且能同时满足对氨基酚和有机杂质的检测要求,使检测更加高效便捷。

综上所述,优化后的有关物质方法与各国药典方法相比更加高效便捷,灵敏度更高,各项方法验证结果均较好,各已知杂质、未知杂质均能与主成分和制剂中的抑菌剂有效分离,可用于对乙酰氨基酚片的质量控制,有助于确保产品的安全性、有效性和质量可控。

参考文献:

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版。

北京:中国医药科技出版社,2015:318-320。

[2]国务院关于印发国家药品安全“十二五”规划的通知[J].中华人民共和国国务院公报,2012(05):27-33。

[3]国务院关于改革药品医疗器械审评审批制度的意见[J].中华人民共和国国务院公报,2015(25):22-25。

[4]European Pharmacopoeia Supplement. European Pharmacopoeia: 9.4[S]. 2017 edition. Strasbourg: the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2017: 5429-5430。

[5]The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia: General Chapters[S]. 41th Edition. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2017:34-36。

第一作者 林美龄(1990-),女,汉族,本科,工程师,主要从事药物开发质量研究工作

通讯作者 郑小锋,