

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.013

高效液相色谱法检测对乙酰氨基酚片中有关物质*

肖江^{1,2}, 王辉², 帅海涛^{1,2}, 章泽恒^{3△}, 黄致远^{1,2}

(1. 湖南省药用辅料工程技术研究中心有限公司, 湖南长沙 410331; 2. 国家药用辅料工程技术研究中心, 湖南长沙 410331; 3. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心, 湖南长沙 410013)

摘要:目的 建立测定对乙酰氨基酚片中对氨基酚、对氯苯乙酰胺、杂质 A-I 和杂质 L-N 14 个有关物质含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Xbridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 冰醋酸水溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 254 nm, 进样量为 5 μL。结果 杂质 A-I 与杂质 L-N 的相对校正因子分别为 1.15, 1.27, 1.26, 1.48, 2.79, 1.24, 0.97, 1.33, 1.27, 1.84, 2.13, 1.02。对乙酰氨基酚与 14 个有关物质色谱峰的分离度良好。14 个有关物质的质量浓度均在各自的线性范围内与峰面积线性关系良好($R^2 > 0.999 0$); 检测限为 0.02~0.11 μg/mL, 定量限为 0.07~0.34 μg/mL; 中间精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 4.0%; 平均加样回收率为 98.74%~100.29%, RSD 为 0.26%~1.30% ($n=9$)。12 批不同厂家的样品中 14 个有关物质含量为 0.008 0%~0.070 4%, 均检出对氨基酚、杂质 A-D、杂质 F、杂质 H、杂质 L、杂质 N, 均未检出对氯苯乙酰胺、杂质 E、杂质 G、杂质 I、杂质 M。结论 该方法操作简便、专属性强、灵敏度和准确度均高, 可用于对乙酰氨基酚片中有关物质的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 对乙酰氨基酚片; 有关物质; 自身对照法

中图分类号: R917; R971⁺.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)21-0055-05

Determination of Related Substances in Paracetamol Tablets by HPLC

XIAO Jiang^{1,2}, WANG Hui², SHUAI Haitao^{1,2}, ZHANG Zeheng³, HUANG Zhiyuan^{1,2}

(1. Hunan Pharmaceutical Excipients Engineering and Technology Research Center Co., Ltd., Changsha, Hunan, China 410331; 2. National Engineering and Technology Research Center of Pharmaceutical Excipients, Changsha, Hunan, China 410331; 3. Hunan Drug Evaluation and Certification and Adverse Reaction Monitoring Center, Changsha, Hunan, China 410013)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of 14 related substances in Paracetamol Tablets, including *p*-aminophenol, *p*-chloroacetanilide, impurities A-I and impurities L-N. **Methods** The chromatographic column was Xbridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% acetic acid aqueous solution-methanol (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 5 μL. **Results** The relative correction factors (RCFs) of impurities A-I and impurities L-N were 1.15, 1.27, 1.26, 1.48, 2.79, 1.24, 0.97, 1.33, 1.27, 1.84, 2.13 and 1.02, respectively. The chromatographic peaks of paracetamol and 14 related substances were well separated. The 14 related substances had a good linear relationship with the peak area within their respective mass concentration range ($R^2 > 0.999 0$). The limit of detection (LOD) of the above 14 related substances was in the range of 0.02-0.11 μg/mL, and their limit of quantitation (LOQ) was in the range of 0.07-0.34 μg/mL. The RSDs of intermediate precision, stability and repeatability tests were all lower than 4.0%. The average recovery of the above 14 related substances was in the range of 98.74%-100.29%, and the RSD was in the range of 0.26%-1.30% ($n=9$). The content of 14 related substances in 12 batches samples from different manufacturers was in the range of 0.008 0%-0.070 4%, and *p*-aminophenol, impurities A-D, impurity F, impurity H, impurity L and impurity N were all detected in the above samples, while *p*-chloroacetanilide, impurity E, impurity G, impurity I and impurity M were all not detected in the above samples. **Conclusion** The method is simple, specific, sensitive and accurate, which can be used for the content determination of related substances in Paracetamol Tablets.

Key words: HPLC; Paracetamol Tablets; related substances; self contrast method

对乙酰氨基酚又称扑热息痛, 化学名为 4'-羟基乙酰苯胺, 为乙酰苯胺类解热镇痛药, 临床广泛用于治疗各种轻、中度疼痛及儿童的发热疾病^[1-4]。对乙酰氨基酚于 1878 年在约翰·霍普金斯大学首次合成, 1951 年在美国获批上市, 1955 年成为非处方药, 并成为世界上应

用最广的解热镇痛药。我国最早于 1960 年开始生产^[5]。目前, 2020 年版《中国药典》^[6]、《欧洲药典》10.0 版^[7]和《美国药典》40 版^[8]均收载了对乙酰氨基酚的有关物质检查方法, 除对氨基酚与对氯苯乙酰胺采用外标法测定外, 其他杂质均采用不加校正因子的主成分自身对

* 基金项目: 湖南省自然科学基金[2020JJ9004]。

第一作者: 肖江, 男, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为药品质量与工艺, (电子信箱)xiao341@126.com。

△通信作者: 章泽恒, 男, 副主任中药师, 研究方向为中药质量控制与评价, (电子信箱)719563428@qq.com。

照法测定。根据对乙酰氨基酚的合成工艺推测,原料药中潜在的杂质有杂质A-I和杂质L-N,均含有基因毒性杂质的潜在结构^[9]。杂质L-N为《欧洲药典》10.0版中新增杂质^[8,10],杂质L由苯酚氯代产生的副产物杂质C与对乙酰氨基酚聚合而成,杂质M和杂质N分别为对氨基酚和对乙酰氨基酚在酸性高温条件下形成的聚合物。对氨基酚和对氯苯乙酰胺均为毒性杂质,具有潜在的基因毒性^[11-12]。目前,关于乙酰氨基酚原料药及制剂有关物质的研究多为对氨基酚、对氯苯乙酰胺、杂质A、杂质B、杂质D、杂质F,对大部分潜在杂质未开展系统性研究,且对国内制剂的质量也未进行考察^[11-17]。本研究中在各国药典方法的基础上建立了一种带校正因子的主成分自身对照法,对国内多个厂家的对乙酰氨基酚片与参比制剂进行了杂质对比研究,并根据2020年版《中国药典(四部)》^[18]和国际人用药品注册技术协调会(ICH)指导原则 *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*进行了全面的方法学考察。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配有紫外检测器;XS-205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz);Milli-Q型超纯水制水机(德国默克密理博公司)。

1.2 试剂

对乙酰氨基酚片(12批,规格均为每片0.5 g),样品信息及生产厂家见表1;有关物质对照品信息见表2(杂质A-I和杂质L-N由TLC Pharmaceutical Standards公司提供;对氨基酚,对氯苯乙酰胺,对乙酰氨基酚由中国食品药品检定研究院提供);冰醋酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);甲醇(色谱纯,德国默克公司);水为超纯水。

表1 对乙酰氨基酚片样品信息及生产厂家

Tab. 1 Information and manufacturers of Paracetamol Tablets samples

| 编号 | 生产厂家 | 批号 | 编号 | 生产厂家 | 批号 |
|-----|--------------|-----------|------|---------------|-----------|
| I | 英国葛兰素史克公司 | 9040990 | VII | 长春迪瑞制药有限公司 | 200301062 |
| II | 葵花药业集团股份有限公司 | 201206 | VIII | 四川省旺林堂药业有限公司 | 210601 |
| III | 北京曙光药业有限责任公司 | 201110 | IX | 石家庄新华药业有限责任公司 | 139210402 |
| IV | 多多药业有限公司 | 2103272 | X | 湖南尔康制药股份有限公司 | 20210301 |
| V | 石药集团欧意药业有限公司 | 016210302 | XI | 东北制药集团股份有限公司 | 20200801 |
| VI | 中美天津史克制药有限公司 | 7R4A | XII | 鲁安药业有限公司 | 20191210 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Xbridge C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%冰醋酸水溶液(A) - 甲醇(B), 梯度洗脱

表2 有关物质对照品信息

Tab. 2 Information of references of related substances

| 有关物质 | 批号 | 纯度(%) | 有关物质 | 批号 | 纯度(%) |
|------|--------------|-------|--------|---------------|-------|
| 杂质A | 1-JSH-88-1 | 98.0 | 杂质I | 1-NJL-8-1 | 100.0 |
| 杂质B | 1-LDO-20-2 | 98.0 | 杂质L | 2929-005A5 | 98.7 |
| 杂质C | 5-SCC-154-1 | 97.0 | 杂质M | 1-TBN-41-1 | 99.4 |
| 杂质D | 2-JLW-64-1 | 98.0 | 杂质N | 1-M00-13-1 | 98.0 |
| 杂质E | 12-ABY-53-1 | 98.0 | 对氨基酚 | 100802-202005 | 100.0 |
| 杂质F | 11-MWC-191-1 | 99.98 | 对氯苯乙酰胺 | 100850-201803 | 100.0 |
| 杂质G | 1-ZJM-14-4 | 98.0 | 对乙酰氨基酚 | 100018-201610 | 99.9 |
| 杂质H | 2-JLW-73-1 | 98.0 | | | |

(程序见表3);流速: 0.8 mL/min;检测波长: 254 nm;柱温: 30 °C;进样量: 5 μL。在此色谱条件下的系统适用性试验结果见表4。

表3 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 3 Program of gradient elution of mobile phase (%)

| 时间(min) | 流动相A | 流动相B | 时间(min) | 流动相A | 流动相B |
|---------|------|------|---------|------|------|
| 0 | 85 | 15 | 60 | 20 | 80 |
| 10 | 85 | 15 | 65 | 85 | 15 |
| 25 | 80 | 20 | 75 | 85 | 15 |
| 50 | 20 | 80 | | | |

表4 系统适用性试验结果

Tab. 4 Results of the system suitability test

| 成分 | 相对保留时间 | 平均峰面积 | 峰面积的RSD(%) | 分离度 | 理论板数 |
|--------|--------|---------|------------|-------|--------|
| 对乙酰氨基酚 | 1.00 | 1865.22 | 1.33 | 23.81 | 15340 |
| 对氨基酚 | 0.41 | 47.64 | 3.71 | | 12152 |
| 对氯苯乙酰胺 | 5.53 | 1460.04 | 0.67 | 3.05 | 546740 |
| 杂质A | 2.12 | 106.75 | 0.24 | 3.74 | 21691 |
| 杂质B | 1.91 | 138.44 | 0.18 | 20.51 | 19185 |
| 杂质C | 2.58 | 194.05 | 0.34 | 8.29 | 27312 |
| 杂质D | 3.47 | 465.43 | 1.12 | 12.14 | 28637 |
| 杂质E | 3.71 | 476.22 | 0.25 | 2.48 | 38874 |
| 杂质F | 4.52 | 352.18 | 1.03 | 5.29 | 135528 |
| 杂质G | 4.08 | 304.11 | 0.34 | 6.88 | 116852 |
| 杂质H | 4.33 | 212.93 | 0.22 | 4.37 | 215178 |
| 杂质I | 5.40 | 369.34 | 0.14 | 2.54 | 426728 |
| 杂质L | 4.72 | 329.14 | 0.11 | 5.36 | 533326 |
| 杂质M | 4.89 | 132.62 | 1.52 | 6.13 | 460234 |
| 杂质N | 5.31 | 502.05 | 0.48 | 16.67 | 708982 |

2.2 溶液制备

取甲醇150 mL,加水850 mL,混匀,作为稀释剂。

取对乙酰氨基酚片,研磨成粉,取细粉适量(相当于对乙酰氨基酚100 mg),精密称定,置10 mL容量瓶中,用稀释剂稀释并定容,振摇使溶解,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

取供试品溶液1.0 mL,置100 mL容量瓶中,用稀释

剂稀释并定容;取1.0 mL,置20 mL容量瓶中,再次用稀释剂稀释并定容,摇匀,即得自身对照溶液。

取有关物质对氨基酚、对氯苯乙酰胺、杂质A-I和杂质L-N对照品各适量,精密称定,加稀释剂制成质量浓度为0.5 mg/mL的混合对照品贮备液。取混合对照品贮备液1.0 mL,置100 mL容量瓶中,加稀释剂稀释并定容,摇匀,即得混合对照品溶液。

取对氨基酚对照品5 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,用稀释剂稀释并定容;取1.0 mL,置100 mL容量瓶中,再次用稀释剂稀释并定容,摇匀,即得对氨基酚对照品溶液。

取对氯苯乙酰胺对照品溶液5 mg,精密称定,置250 mL容量瓶中,用稀释剂稀释并定容;取1.0 mL,置200 mL容量瓶中,再次用稀释剂稀释并定容,摇匀,即得对氯苯乙酰胺对照品溶液。

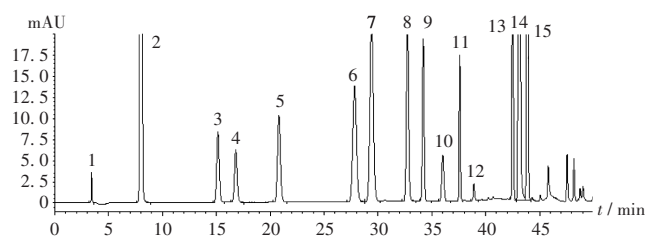
2.3 测定方法

精密量取2.2项下供试品溶液与各对照品溶液适量,分别注入高效液相色谱仪,按外标法以峰面积计算对氨基酚与对氯苯乙酰胺的含量,以加校正因子的自身对照法计算其他杂质的含量。

2.4 方法学考察

专属性试验:取2.2项下供试品溶液和混合对照品溶液各适量,置同一容量瓶中,混匀,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。可见,对乙酰氨基酚色谱峰与各有关物质色谱峰均能达到基线分离,且分离度良好。

线性关系考察与相对校正因子:取对乙酰氨基酚



1. 对氨基酚 2. 对乙酰氨基酚 3. 杂质B 4. 杂质A 5. 杂质C
6. 杂质D 7. 杂质E 8. 杂质G 9. 杂质H 10. 杂质F 11. 杂质L
12. 杂质M 13. 杂质N 14. 杂质I 15. 对氯苯乙酰胺

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. *P* - aminophenol 2. Paracetamol 3. Impurity B 4. Impurity A
5. Impurity C 6. Impurity D 7. Impurity E 8. Impurity G
9. Impurity H 10. Impurity F 11. Impurity L 12. Impurity M
13. Impurity N 14. Impurity I 15. *P* - chloroacetanilide

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

和有关物质对照品各适量,精密称定,配制系列质量浓度的标准曲线溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(*Y*)为纵坐标,各成分质量浓度(*X*, μg/mL)为横坐标进行线性回归,并按主成分线性方程的斜率比各杂质线性方程的斜率计算相对校正因子。结果见表5。

定量限与检测限确定:取2.2项下稀释剂,待仪器平衡后注入色谱仪,连续进样3次,记录基线噪音,根据系统适用性试验中各杂质的峰高逐级稀释,至信噪比(*S/N*)分别为 10 ± 1 和 3 ± 1 ,得到各杂质的定量限和检测限。结果见表5。

中间精密度试验:在同一实验室,由不同实验员在不同日期进行重复性试验。结果的*RSD*均小于4.0%,表明方法中间精密度良好。

表5 方法学考察结果与相对校正因子

Tab. 5 Results of the methodological investigation and RCFs

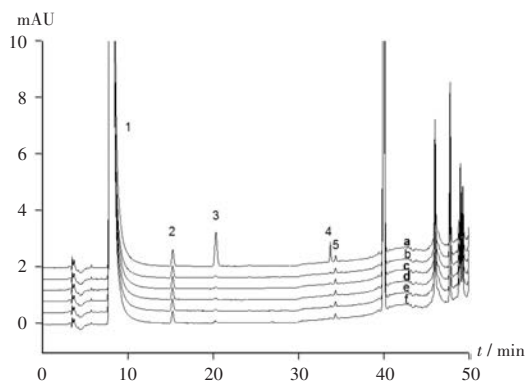
| 成分 | 回归方程 | <i>R</i> ² | 线性范围 (μg/mL) | <i>f</i> | 定量限 (μg/mL) | 检测限 (μg/mL) | 加样回收试验(% , <i>n</i> = 9) | | | |
|--------|--------------------------|-----------------------|-----------------|----------|----------------|----------------|--------------------------|--------|--------|---------------|
| | | | | | | | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 | \bar{X} RSD |
| 对乙酰氨基酚 | $Y = 33.3241X - 3.3707$ | 1.0000 | 7.54~75.40 | | | | | | | |
| 对氨基酚 | $Y = 11.6768X + 22.3279$ | 0.9991 | 1.02~20.34 | | 0.34 | 0.11 | 100.24 | 98.98 | 99.13 | 99.45 0.69 |
| 对氯苯乙酰胺 | $Y = 28.5514X - 0.7122$ | 0.9999 | 2.38~23.80 | | 0.12 | 0.04 | 99.32 | 99.55 | 98.24 | 99.04 0.71 |
| 杂质A | $Y = 28.9220X - 0.2293$ | 0.9999 | 0.50~5.05 | 1.15 | 0.18 | 0.06 | 100.04 | 98.36 | 98.67 | 99.02 0.90 |
| 杂质B | $Y = 26.3241X + 0.0390$ | 1.0000 | 0.71~7.06 | 1.27 | 0.14 | 0.05 | 99.20 | 99.25 | 98.31 | 98.92 0.54 |
| 杂质C | $Y = 26.4972X - 0.2878$ | 0.9999 | 0.99~9.90 | 1.26 | 0.07 | 0.02 | 98.66 | 99.74 | 101.24 | 99.88 1.30 |
| 杂质D | $Y = 22.4809X - 4.2293$ | 1.0000 | 2.12~21.20 | 1.48 | 0.07 | 0.02 | 100.25 | 99.58 | 98.64 | 99.49 0.81 |
| 杂质E | $Y = 11.9526X - 1.7488$ | 1.0000 | 3.26~32.60 | 2.79 | 0.22 | 0.07 | 99.54 | 99.87 | 98.05 | 99.15 0.98 |
| 杂质F | $Y = 2.4122X - 0.4756$ | 1.0000 | 4.52~45.20 | 1.24 | 0.30 | 0.10 | 98.34 | 100.24 | 98.67 | 99.08 1.02 |
| 杂质G | $Y = 34.2972X - 0.2878$ | 0.9999 | 1.18~11.80 | 0.97 | 0.12 | 0.04 | 98.62 | 98.95 | 99.33 | 98.97 0.36 |
| 杂质H | $Y = 24.9917X + 0.2707$ | 0.9999 | 1.18~11.80 | 1.33 | 0.15 | 0.05 | 99.69 | 98.85 | 99.91 | 99.48 0.56 |
| 杂质I | $Y = 26.2987X + 1.8659$ | 0.9998 | 8.38~83.80 | 1.27 | 0.10 | 0.03 | 98.24 | 98.96 | 99.77 | 98.99 0.77 |
| 杂质L | $Y = 18.0622X - 0.0049$ | 0.9999 | 0.98~9.80 | 1.84 | 0.12 | 0.04 | 98.57 | 99.04 | 98.62 | 98.74 0.26 |
| 杂质M | $Y = 15.7132X + 6.5098$ | 0.9998 | 0.81~8.10 | 2.13 | 0.20 | 0.07 | 99.22 | 98.65 | 100.02 | 99.30 0.69 |
| 杂质N | $Y = 32.7659X + 10.6610$ | 0.9990 | 1.46~14.60 | 1.02 | 0.06 | 0.02 | 100.02 | 100.58 | 100.27 | 100.29 0.28 |

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液与混合对照品溶液,分别于室温下放置0,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果供试品溶液与混合对照品溶液中各有关物质峰面积的RSD均小于3.0%(n=5),表明供试品溶液与对照品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

重复性试验:取对乙酰氨基酚片,研磨成粉,取细粉适量(相当于对乙酰氨基酚100 mg),精密称定,置10 mL容量瓶中,加入2.2项下混合对照品贮备液1.0 mL,用稀释剂稀释并定容,振摇,滤过,取续滤液,平行6份,按2.1项下色谱条件分别进样测定,按2.3项下方法计算。结果的RSD均小于2.0%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取对乙酰氨基酚片,研磨成粉,取细粉适量(相当于对乙酰氨基酚100 mg),精密称定,共9份,置10 mL容量瓶中,分别加入80%,100%,120%限度的杂质A-I、杂质L-N、对氨基酚、对氯苯乙酰胺对照品,各3份,用稀释剂稀释并定容,摇匀,滤过,取续滤液,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。结果见表5。

破坏试验:取2.2项下供试品溶液,在酸(1 mol/L盐酸溶液2 mL破坏2 h)、碱(1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL破坏2 h)、高温(90 °C水浴破坏2 h)、氧化(30%过氧化氢溶液2 mL破坏2 h)及光照(4 500 lx破坏2 h)条件下进行强制降解试验。结果对乙酰氨基酚在酸、碱、氧化及光照条件下,降解过程中均未产生新的杂质;高温条件下降解产生了新的杂质,各杂质峰均基线分离,表明方法专属性良好。色谱图见图2。



1. 对乙酰氨基酚 2. 杂质B 3. 未知杂质 4. 杂质G 5. 杂质H
a. 高温破坏 b. 未破坏 c. 酸破坏 d. 碱破坏 e. 氧化破坏
f. 光照破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Paracetamol 2. Impurity B 3. Unknown impurity 4. Impurity G
5. Impurity H
a. Destroyed by high temperature b. No destroying c. Destroyed by acid
d. Destroyed by alkali e. Destroyed by oxidation f. Destroyed by light

Fig. 2 HPLC chromatograms of the destructive test

耐用性试验:取2.2项下供试品溶液与混合对照品溶液各适量,分别考察不同批次色谱柱,不同柱温(25,30,35 °C),不同流速(0.7,0.8,0.9 mL/min)和不同检测波长(250,254,258 nm)条件下各有关物质的分离度。结果各有关物质色谱峰的分离度均大于1.5,含量的RSD均小于4.0%,表明方法耐用性良好。

2.5 样品有关物质含量测定

取12批(编号为I-XII)样品各适量,精密称定,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,按2.3项下方法计算各样品中有关物质的含量。结果12批不同厂家的样品中14个有关物质含量为0.008 0%~0.070 4%。对乙酰氨基酚片参比制剂(编号为I)中检出杂质B与杂质H;国内11批(编号为II-XII)对乙酰氨基酚片中检出对氨基酚、杂质A-D、杂质F、杂质H、杂质L、杂质N,均未检出对氯苯乙酰胺、杂质E、杂质G、杂质I、杂质M。详见表6。

表6 样品有关物质含量测定结果(%)

Tab. 6 Results of content determination of related substances in samples (%)

| 有关物质 | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
|--------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 对氨基酚 | - | 0.0002 | - | - | 0.0004 | 0.0006 | - | - | - | - | - | 0.0014 |
| 对氯苯乙酰胺 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质A | - | 0.0200 | 0.009 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质B | 0.011 | 0.0100 | 0.010 | 0.022 | 0.0320 | 0.0250 | 0.021 | 0.008 | 0.017 | 0.010 | 0.018 | 0.0310 |
| 杂质C | - | - | 0.001 | - | - | 0.0030 | 0.002 | - | 0.002 | - | - | 0.0190 |
| 杂质D | - | 0.0010 | - | 0.001 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质F | - | 0.0010 | 0.005 | - | - | 0.0090 | 0.009 | - | - | - | - | - |
| 杂质G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质H | 0.004 | - | - | 0.007 | 0.0010 | - | - | - | 0.005 | 0.001 | - | 0.0190 |
| 杂质I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质L | - | - | - | - | - | 0.0020 | - | - | - | - | - | - |
| 杂质M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 杂质N | - | - | - | 0.001 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 未知杂质 | 0.004 | 0.0050 | 0.003 | 0.005 | 0.0020 | 0.0080 | 0.007 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | 0.002 | 0.0010 |
| 总杂质 | 0.019 | 0.0372 | 0.028 | 0.036 | 0.0354 | 0.0476 | 0.039 | 0.013 | 0.027 | 0.014 | 0.020 | 0.0714 |

注:- 为未检测到。

Note:- indicates that the corresponding substance is not detected.

3 讨论

3.1 色谱条件选择

《欧洲药典》10.0版中关于对乙酰氨基酚有关物质的分析较全面,但以HALO-C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)为色谱柱时杂质A与杂质B未能完全分离。由于色谱柱内径及粒径较小,液相色谱仪的柱压较高,长期使用会对仪器造成不良影响,且色谱柱的使用寿命不佳。调整色谱柱为Xbridge-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,

5 μm), 流动相为纯化水 - 甲醇, 但仅能分离 13 个杂质, 且对氨基酚与对乙酰氨基酚的色谱峰峰形稍有拖尾, 影响样品测定的准确性。最终将流动相调整为 0.1% 冰醋酸水溶液 - 甲醇, 分离效果良好。

3.2 测定和计算方法选择

除对氨基酚与对氯苯乙酰胺外, 国内外药典均采用自身对照法测定其他杂质的含量。但杂质 A - F、杂质 H - I、杂质 L - M 的相对校正因子分别为 1.15, 1.27, 1.26, 1.48, 2.79, 1.24, 1.33, 1.27, 1.84, 2.13, 均不在 0.9 ~ 1.1 范围内, 应采用更合理的带相对校正因子的自身对照法进行检测和计算, 以保障杂质检测的准确性。

3.3 杂质限度确认

2020 年版《中国药典》、《欧洲药典》10.0 版和《美国药典》40 版中均有收载对乙酰氨基酚有关物质的检测, 其中《欧洲药典》10.0 版中有关物质限度最严格。由表 6 可知, 12 家企业的对乙酰氨基酚片中的有关物质的含量均未超标。参照《欧洲药典》10.0 版制订对乙酰氨基酚片有关物质限度, 即对氨基酚不得过 0.005%, 对氯苯乙酰胺不得过 0.001%, 杂质 A - I 与杂质 L - N 均不得过 0.05%, 总杂质不得过 0.2%。

3.4 样品中杂质来源分析

由于对乙酰氨基酚一般以对硝基苯酚为原料, 还原为对氨基苯酚后经乙酰化制得, 其中对硝基苯酚由氯苯经硝化反应制得。由表 6 可知, 对乙酰氨基酚片中有关物质检出量大于 0.01% 的杂质主要为杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 H。其中, 杂质 A 为对硝基苯酚原料中邻硝基苯酚导致的杂质, 杂质 B 为丙酰化杂质, 杂质 C 由对硝基氯苯原料氯苯中的邻二氯苯引入, 杂质 H 为对氨基苯酚过度乙酰化产生。样品(编号 I)为仿制药一致性评价的参比制剂, 其杂质含量明显低于国内大部分制剂。可见, 对乙酰氨基酚片中有关物质主要来源于原料药合成过程中引入的杂质, 并非由存储环境或辅料导致, 故应从源头对原料药的质量进行控制, 以提升制剂的质量。

3.5 方法评价

本研究中建立了有效检测对乙酰氨基酚片中有关物质的高效液相色谱法, 方法专属性强、灵敏度和准确度均高, 可有效分离 14 种有关物质及主成分; 并考察了市售对乙酰氨基酚片及仿制药一致性评价参比制剂的有关物质, 可为相关生产厂家及检验机构提供参考, 有助于提升国内对乙酰氨基酚片的质量。

参考文献

[1] CONNELLY M, BICKEL J. Chronic daily headache in children and adolescents: science and conjecture[J]. Pain Management, 2013, 3(1): 47 - 58.

[2] 林 枫, 曾海德, 姚大洲. 患儿呼吸系统感染性发热治疗中布洛芬与对乙酰氨基酚的临床观察[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(4): 937 - 938.

[3] 袁 波, 张文兵. 布洛芬和对乙酰氨基酚治疗小儿感染性发热的效果观察[J]. 现代诊断与治疗, 2019, 30(20): 3549 - 3550.

[4] 曹 勇. 常见小儿退热药物的儿童药物利用指数评价[J]. 中国药业, 2018, 27(9): 89 - 91.

[5] 王晓辉, 袁 园, 董 培, 等. 对乙酰氨基酚制剂研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2012, 21(11): 941 - 945.

[6] 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: 246.

[7] European Directorate for the Quality of Medicine. The European Pharmacopeia 10.0th Edition(Vol III)[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2020: 3481 - 3483.

[8] The United States Pharmacopieial Convention. United States Pharmacopeia 40th Edition(Vol II)[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2016: 2542.

[9] 马 磊, 马玉楠, 陈 震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(18): 2106 - 2111.

[10] European Directorate for the Quality of Medicine. The European Pharmacopeia 9.0th Edition(Vol III)[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2016: 3267 - 3268.

[11] 杨 莉, 梅 勇, 龙 涛, 等. HPLC 法测定对乙酰氨基酚片中有关物质的含量[J]. 中国药房, 2020, 31(10): 1233 - 1238.

[12] 范保瑞, 张 悦, 张成志, 等. HPLC 法同时测定对乙酰氨基酚口服混悬液中有关物质及防腐剂[J]. 首都食品与医药, 2021, 28(8): 176 - 180.

[13] 余俊玲, 钟 瑜, 徐伟斌. HPLC 梯度洗脱法测定对乙酰氨基酚口服混悬液中有关物质[J]. 北方药学, 2016, 13(10): 5 - 7.

[14] EL - YAZBI AF, GUIRGUIS KM, BEDAIR MM, et al. Validated specific HPLC - DAD method for simultaneous estimation of paracetamol and chlorzoxazone in the presence of five of their degradation products and toxic impurities[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2020, 46(11): 1853 - 1861.

[15] ABDELALEEM EA, NAGUIB IA, HASSAN ES, et al. HPTLC and RP - HPLC Methods for Simultaneous Determination of Paracetamol and Pamabrom in Presence of Their Potential Impurities[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 114: 22 - 27.

[16] IBRAHIM H, HAMDY AM, MEREY HA, et al. Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual - Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods[J]. Journal of Chromatographic Science, 2021, 59(2): 140 - 147.

[17] ABDELWAHAB NS, ABDELRAHMAN MM, BOSHRA JM, et al. Different stability - indicating chromatographic methods for specific determination of paracetamol, dantrolene sodium, their toxic impurities and degradation products[J]. Biomedical Chromatography, 2019, 33(9): e4598.

[18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480.

(收稿日期: 2022 - 02 - 10; 修回日期: 2022 - 05 - 29)