HPLC 法测定来曲唑中苄基氯类基因毒性杂质

潘再秀[1]，常天歌[1]，朱　建[1]，赵冬梅[2]，曹志凌[1]*
（1. 江苏海洋大学，江苏连云港 222005；2. 连云港贵科药业有限公司，江苏连云港 222000）

摘要：建立了 HPLC 法测定来曲唑（**1**）原料药中苄基氯类基因毒性杂质对氰基二氯苄（**2**）和 4-（1*H*-1,2,4- 三唑 -1- 基氯甲基）苯甲腈（**3**）。色谱柱采用 Alltima C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A 为水，B 为乙腈，梯度洗脱，检测波长为 230 nm，柱温为 25 ℃，流速为 1.0 ml/min。结果显示，**2** 和 **3** 分别在 0.014 8 ～ 0.933 7 μg/ml、0.028 6 ～ 0.871 5 μg/ml 内线性良好，平均回收率（*n*=9）分别为 99.9%和 98.9%，RSD 分别为 0.59%和 0.52%。建立的方法准确性好、灵敏度高，适用于 **1** 原料药中苄基氯类基因毒性杂质的检测。

关键词：高效液相色谱；来曲唑；基因毒性杂质；对氰基二氯苄；4-（1*H*-1,2,4- 三唑 -1- 基氯甲基）苯甲腈
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）09-1318-04
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.09.013

Determination of the Genotoxic Benzyl Chlorides in Letrozole by HPLC

PAN Zaixiu[1], CHANG Tiange[1], ZHU Jian[1], ZHAO Dongmei[2], CAO Zhiling[1]*
(*1. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Lianyungang Guike Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000*)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of the genotoxic impurities: *p*-cyano-benzyl dichloride (**2**) and 4-[chloro(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)methyl]benzonitrile (**3**) in letrozole (**1**). The Alltima C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with water as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B. The detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 25 ℃, and the flow rate was 1.0 ml/min. The results showed that it was linear for **2** and **3** in the ranges of 0.014 8 – 0.933 7 μg/ml and 0.028 6 – 0.871 5 μg/ml, respectively. And the average recoveries (*n*=9) of **2** and **3** were 99.9% and 98.9%, with the RSDs of 0.59% and 0.52%. The established method has good accuracy and high sensitivity, which is suitable for the detection of the genotoxic benzyl chlorides in **1**.

Key Words: HPLC; letrozole; genotoxic impurity; *p*-cyano-benzyl dichloride; 4-[chloro(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-methyl]benzonitrile

来曲唑（letrozole，**1**，化学结构式见图 1），化学名为 1-[双（4- 氰基苯基）甲基]-1,2,4- 三唑，是由瑞士 Novartis 公司首先开发、上市的第三代高选择性芳香化酶抑制剂[1]，通过竞争性结合芳香化酶的细胞色素 P450 亚单位的血红素，抑制外周和肿瘤组织中的芳香化酶，从而有效降低血浆雌激素水平，是用于绝经后晚期乳腺癌以及激素阳性的乳腺癌早期患者术后辅助治疗的一线药物[2—3]。

杂质的定性定量分析是原料药质量控制的关键环节，**1** 原料药的中、外药品标准中，均对 **1** 中的杂质制订了质量检验规程。在美国药典（USP 43）、欧洲药典（EP 10.0）中，只对 4,4',4''- 亚甲基三苯甲腈、4,4'-（4*H*-1,2,4- 三唑 -4- 基亚甲基）双苯腈这 2 种杂质要求进行限度检查，而《中华人民共和国药

收稿日期：2021-12-28
基金项目：江苏省产学研合作项目（BY2020579）、江苏省研究生科研与实践创新项目（SJCX20-1232、SJCX20-1220、SJCX20-1225）
作者简介：潘再秀（1998—），女，硕士研究生，专业方向：药物分析与质量研究。
通信作者：曹志凌（1974—），男，副教授，硕士生导师，从事药物研究与开发。
E-mail：zhilingcao2013@163.com

典》2020 年版 (ChP 2020) 中只收录了 4,4'-(4*H*-1,2,4-三唑 -4- 基亚甲基）双苯腈 1 种杂质。

1 的产业化生产工艺路线通常以对氰基氯苄为起始原料 [4]，而对氰基二氯苄 (**2**) 则是对氰基氯苄中可能存在的二氯取代物；4-(1*H*-1,2,4- 三唑 -1- 基氯甲基）苯甲腈 (**3**) 则可能由 **2** 与原料三氮唑反应生成，**2** 和 **3** 的化学结构式见图 1。上述 2 种杂质均含苄氯基团，属于潜在基因毒性杂质，可能会被带入最终产品中，对用药安全性产生了强烈的威胁 [5]。因此，须采用合适的分析方法对 **1** 中的 **2** 和 **3** 进行定性定量分析。

本研究参考药典标准和文献中的检测方法 [6—11]，建立了 **1** 中 2 种苄基氯类基因毒性杂质的定量测定方法，并对其进行方法学考察，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

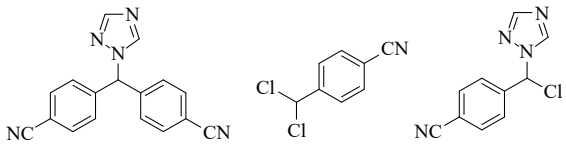


图 1　1 ～ 3 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1** – **3**

1　仪器与试药

U-3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；XS105-DU 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 对照品（欧洲药典标准品，含量 99.9%，批号 4.0）；**2** 对照品（含量 98.8%，批号 QP181001）和 **3** 对照品（含量 99.0%，批号 QP002-93-01）（连云港贵科药业有限公司研究所）；**1** 原料药纯品（含量 99%，批号 201101、201102、201103）和 **1** 原料药粗品（含量 98 %，批号 201001、201101、201102）（连云港贵科药业有限公司）；乙腈为色谱纯，水为纯净水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Alltima C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相 A 为水，B 为乙腈，梯度洗脱 (0—4 min，A 80%；4—29 min，A 80%—30%；29—35 min，A 30%；35—36 min，A 30%—80%；36—40 min，A 80%）；检测波长 230 nm；柱温 25 ℃；流速 1.0 ml/min；进样量 20 μl。

2.2　溶液配制

空白溶液：30%乙腈。

对照品贮备液：称取 **2**、**3** 对照品各 15 mg，置同一 25 ml 量瓶中，加入乙腈 7.5 ml 溶解，并用水定容，摇匀；移取上述溶液 1 ml，置 100 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，即得对照品贮备液。

对照品溶液：取上述对照品贮备液 1 ml，置 10 ml 量瓶中，用空白溶液定容，摇匀，即得对照品溶液。

供试品溶液：称取 **1** 原料药 25 mg，置 25 ml 量瓶中，加入乙腈 7.5 ml 溶解后，再用水定容，摇匀，即得供试品溶液。

2.3　专属性试验

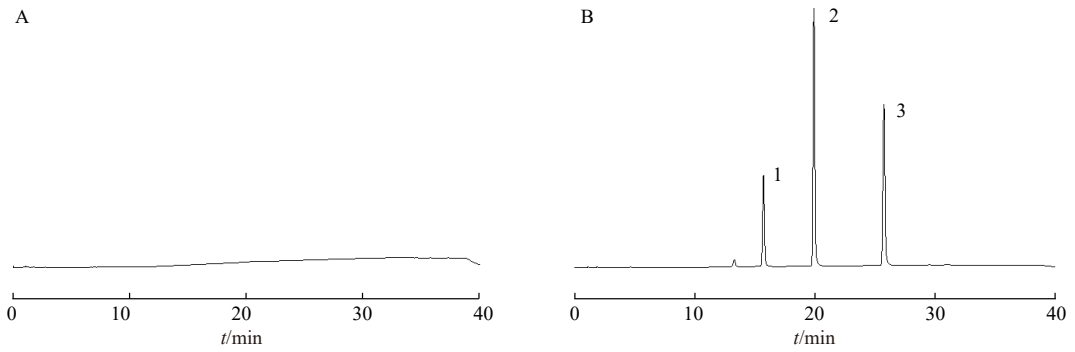
分别称取 **2**、**3** 对照品各 5 mg，和 **1** 对照品 10 mg，置同一 50 ml 量瓶中，加入乙腈 15 ml 溶解后用水定容，摇匀，作为系统适用性溶液；另取“**2.2**”项下空白溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果见图 2，可见 **2**、**3** 与 **1** 主峰分离度良好，空白溶液对样品的测定无干扰，表明该方法专属性良好。

2.4　线性试验

取“**2.2**”项下对照品贮备液适量，用空白溶液稀释制成 **2** 质量浓度分别为 0.014 8、0.311 2、0.498 0、0.622 4、0.746 9、0.933 7 μg/ml 和 **3** 质量浓度分别为 0.028 6、0.290 5、0.464 8、0.581 0、0.697 2、0.871 5 μg/ml 的系列浓度线性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以峰面积 (*A*) 为纵坐标、质量浓度 (*c*) 为横坐标，进行线性回归。结果显示，**2** 和 **3** 分别在 0.014 8 ～ 0.933 7 μg/ml、0.028 6 ～ 0.871 5 μg/ml 内线性良好，回归方程分别为 A=183.1c+0.955 (r=0.999 9) 和 A=95.06c+0.113 (r=0.999 6)。

2.5　定量限与检测限

分别取 **2**、**3** 对照品，用空白溶液逐级稀释后测定，将信噪比为 3 和 10 时的测定结果作为杂质的检测限和定量限。结果显示，**2** 和 **3** 的检测限分别为 5.9 和 11.4 ng/ml，定量限则分别为 15 和 29 ng/ml。



A：空白溶液，B：系统适用性溶液

1－**3**；2－**1**；3－**2**

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms

2.6　稳定性试验

取“**2.2**”项下的对照品溶液于室温放置，分别于 0、3、6、9、12、24 h 时按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算得 **2**、**3** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 0.23%和 0.38%，表明在室温下 24 h 内溶液稳定性良好。

2.7　精密度与重复性试验

取“**2.2**”项下的对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件重复进样 6 次。结果显示，**2**、**3** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 0.14%和 0.28%。称取 **1** 原料药纯品（批号 201101），按“**2.2**”项下方法配制 6 份供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图。结果显示，6 份供试品溶液中均未检出 **2**、**3**。

2.8　回收率试验

精密称取 **1** 对照品 10 mg，共 3 份，分别置 10 ml 量瓶中；再分别精密量取“**2.2**”项下对照品贮备液 0.8、1、1.2 ml，置上述 3 个量瓶中，加入乙腈 3 ml 溶解，并用水定容，得 80%、100%、120%加样回收率测定溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，**2**、**3** 的平均回收率（n=9）分别为 99.9%和 98.9%，RSD 分别为 0.59%和 0.52%。

2.9　耐用性考察

取“**2.3**”项下系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件，分别改变柱温（±5 ℃）、色谱柱品牌（Alltima C_{18} 柱、大连依利特 ODS-BP 柱）和流动相流速（±0.2 ml/min）等进行分析。结果表明，上述条件下各组分均能得到较好分离，表明该方法耐用性好。

2.10　样品测定

分别称取 3 批 **1** 原料药粗品和 3 批 **1** 原料药纯品，按“**2.2**”项下方法配制成供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，按外标法计算 **1** 中 **2** 和 **3** 的含量。结果显示，3 批 **1** 原料药纯品中，**2**、**3** 均未检出；3 批 **1** 原料药粗品的测定结果见表 1。

表 1　不同批次 1 粗品中杂质测定结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Determination Results of the Impurities in Different Batches of **1** Crude Product（$\bar{x}\pm s$, n=3）

批号	**2**/%	**3**/%
201001	0.02±0.042	0.26±0.028
201101	0.02±0.056	0.21±0.052
201102	0.03±0.082	0.25±0.033

3　讨论

3.1　杂质的基因毒性评估

采用基于定量构效关系（QSRA）模型的毒性预测软件 Toxtree（v3.1.0.1851）评估 **1** 中杂质 **2** 和 **3** 的潜在基因毒性。经致癌性（遗传毒性和非遗传毒性）、体外遗传毒性［污染物致突变性检测（Ames 试验）］预测分析，上述杂质的苄基氯基团均有遗传毒性和致癌性结构预警。

3.2 稀释溶剂的选择

分别采用不同比例的乙腈：水混合溶液稀释制备杂质贮备液和系统适用性溶液时，发现直接使用不同比例含水的混合溶剂时，**3** 会发生降解；而采用乙腈先将 **2**、**3** 和 **1** 溶解后，再用水稀释定容，杂质贮备液和系统适用性溶液的稳定性均良好，因此选择先用乙腈溶解，再加水稀释定容的溶解方法。

3.3 洗脱程序的选择

1 与 **2**、**3** 的结构中均含有氰基，但三者极性不一。为了达到良好的分离并缩短保留时间，采用梯度洗脱程序逐步提高乙腈浓度，使三者分离度均大于 2.0。同时增加洗脱时间与平衡时间，达到在实际生产检测中，能够检出苄基氯类基因毒性杂质的目的。

3.4 基因毒性杂质限度的确定

基因毒性杂质限度控制常用的方法为毒理学关注阈值法（threshold of toxicological concern，TTC），该法要求原料药及制剂中基因毒性杂质的 TTC 值为 1.5 μg/d。在对 **1** 的研究中，按 **1** 片的最大日剂量计算控制限度，市售 **1** 片的最大日剂量为 2.5 mg[14]，因此苄基氯类杂质的控制限度为 0.06%。

参考文献：

[1] 崔中立, 张沐新, 杨晓虹, 等. 芳香化酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2010, **20**(1): 70-76.

[2] 邢 丽, 马 迎. 芳香化酶抑制剂来曲唑的研究进展[J]. 天津药学, 2010, **22**(6): 48-51.

[3] 方仁杏, 陈振东. 来曲唑治疗绝经后乳腺癌的进展[J]. 实用癌症杂志, 2008, **23**(1): 100-101.

[4] 卢定强, 王新仙, 严国荣, 等. 抗乳腺癌药来曲唑的合成工艺改进[J]. 生物加工过程, 2017, **15**(2): 41-44.

[5] 王 萍, 徐彩虹, 陈 仙, 等. 原料药中基因毒性杂质控制的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2015, **32**(1): 119-126.

[6] 顾 萍, 李语如, 吴玉霞, 等. 来曲唑及片剂中有关物质的 TLC 和 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2001, **32**(7): 317-318.

[7] MONDAL N, PAL T K, GHOSAL S K. Development and validation of RP-HPLC method to determine letrozole in different pharmaceutical formulations and its application to studies of drug release from nanoparticles [J]. *Acta Pol Pharm*, 2009, **66**(1): 11-17.

[8] 沈 芩. 反相高效液相色谱法同时测定来曲唑含量及有关物质[J]. 上海医药, 2010, **31**(3): 136-137.

[9] 陈 炳. HPLC测定来曲唑片有关物质[J]. 海峡药学, 2014, **26**(9): 70-72.

[10] NATARAJ K, KIRAN K, REDDY R, *et al*. Stability indicating analytical method development and validation for related substances for letrozole tablets by RP-HPLC [J]. *RJPBCS*, 2012, **3**(4): 658-676.

[11] GANESH M, RAJASEKAR K, BHAGIYALAKSHMI M, *et al*. Determination of letrozole in tablet formulations by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Trop J Pharm Res*, 2010, **9**(5): 505-510.

[12] MUNRO I C, RENWICK A G, DANIELEWSKA-NIKIEL B. The threshold of toxicological concern (TTC) in risk assessment [J]. *Toxicol Lett*, 2008, **180**(2): 151-156.

[13] 汪 生, 杭太俊. 药物中基因毒性杂质检测策略的研究[J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(23): 2840-2846.

[14] BHATNAGAR A S. The discovery and mechanism of action of letrozole [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, **105**(S1): 7-17.