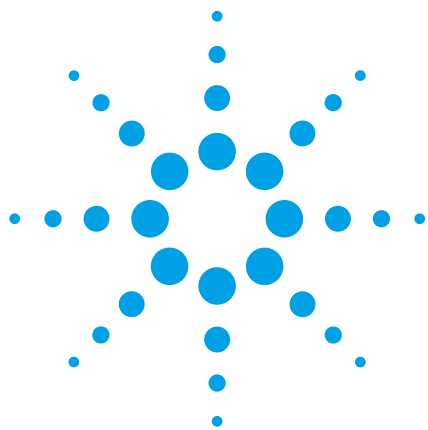




# 用安捷伦 1200 系列快速分离液相色谱系统和安捷伦 6410B 三重串联四极杆 LC/MS 系统定量测定氯己定中的 4-氯苯胺

## 应用报告

药物研发

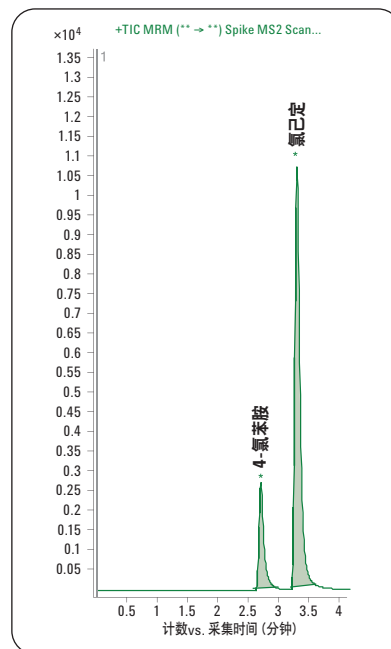
### 作者

Siji Joseph  
安捷伦科技公司  
印度班加罗尔

### 摘要

基因毒性杂质的测定是制药行业非常关注的问题，定量测定的主要难点在于实现足够高的灵敏度。由于多反应监测（MRM）具有高灵敏度和高选择性，串联质谱（QQQ）技术被用于对这类杂质进行定量。采用快速色谱可以实现高通量，并耗费较短的分析时间，并且可以提高色谱分离度。

本研究使用安捷伦 6410 QQQ 和 1200 系列 RRLC，对氯己定中的 4-氯苯胺（一种降解产物）进行了定量测定。在 0.3 ng/mL 到 1000 ng/mL 的宽浓度范围内线性相关系数 > 0.9998。检测限（LOD）为 0.2 ng/mL，定量限（LOQ）为 0.3 ng/mL。



Agilent Technologies

## 前言

芳香胺类由于具有亲电性，能与 DNA 形成强共价键，从而阻止了 DNA 的正确复制，被认为可以导致基因突变。4-氯苯胺是氯己定 (1, 1'-(己烷-1, 6-)双 [5-(4-氯苯基) 双胍基]) 的降解产物，后者是牙科广泛使用的活性组分。加热可以促进 4-氯苯胺的生成<sup>1</sup>。该化合物毒性很强，可以导致溶血和高铁血红蛋白血症<sup>2,3</sup>。这说明了建立一种对氯己定中 4-氯苯胺稳定而灵敏的定量方法非常重要。

本应用报告报导了一种简便而灵敏的 LC/ESI/MSMS 方法，能够检测氯己定中 0.2 ng/mL 浓度水平的 4-氯苯胺。氯己定和 4-氯苯胺的分子结构如图 1 所示。

## 实验

### 化学药品及试剂

氯己定和 4-氯苯胺购自 Sigma-Aldrich 公司。所有溶剂均为 HPLC 级。甲醇购自 Merck 公司，甲酸购自 Fluka 公司，采用 Millipore 超纯水。

### 仪器和色谱条件

所有分析均使用安捷伦 6410B 三重串联四极杆质谱与 1200 系列 RRLC 系统联用。RRLC 系统组件包括安捷伦 1200 系列二元泵 SL，配置脱气机，安捷伦 1200 系列自动进样器 SL 和安捷伦 1200 系列柱温箱 SL。用安捷伦 MassHunter 工作站软件（版本：B.01.04）进行系统控制和数据采集。

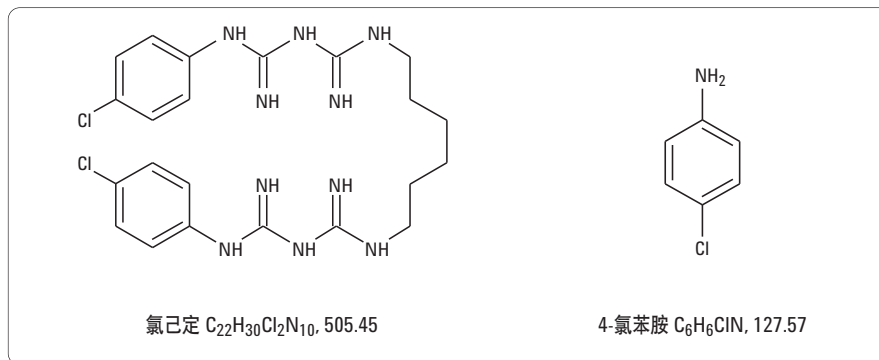


图 1  
氯己定和 4-氯苯胺的分子结构

所有色谱分离均采用安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱。流动相有机相为含 0.1% 甲酸的甲醇，水相为含 0.1% 甲酸的水。线性梯度从 50% 有机相开始，三分钟至 70%。继续维持 B 百分含量 1 分钟。梯度后时间为 3 分钟。用自动进样器进样 6 μL，打开冲洗口冲洗 10 秒钟。样品温度设置为 15°C。二元泵流速为 700 μL/min。柱温箱设置在 40°C。稀释液是水相和有机相 1:1 预先混合的溶液。质谱参数列于表 1。

4-氯苯胺的监测离子为  $m/z$ : 128 和 93 (定量)、 $m/z$ : 128 和 111 (定性)，氯己定为  $m/z$ : 505.4 和 184.3。所有离子的驻留时间均为 200 ms/离子。

### 样品制备

用稀释剂将浓度为 500 μg/mL 的 4-氯苯胺储备液稀释成需要的浓度。配制的线性浓度分别为 0.2 (LOD), 0.3 (LOQ), 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 ng/mL 4-氯苯胺。每个浓度重复进样 3 次，用其响应值绘制线性曲线。

| 参数       | 设定值     |
|----------|---------|
| 雾化气体流量   | 12 L/分钟 |
| 喷雾器压力    | 40 psi  |
| 干燥气温度    | 325 °C  |
| 毛细管电压    | 1500 V  |
| 电离模式     | 电喷雾正离子  |
| 氯苯胺的裂解电压 | 110 V   |
| 氯苯胺的碰撞能量 | 18 V    |
| 氯己定的裂解电压 | 150 V   |
| 氯己定的碰撞电压 | 24 V    |

表 1  
质谱参数

结果和讨论

分析时间仅用了4分钟左右，4-氯苯胺在2.8分钟洗脱，氯己定在3.5分钟洗脱。感兴趣组分的色谱峰与干扰峰因保留时间不同而彼此分离。包含氯己定和4-氯苯胺测试混合物的总离子流图如图2所示。

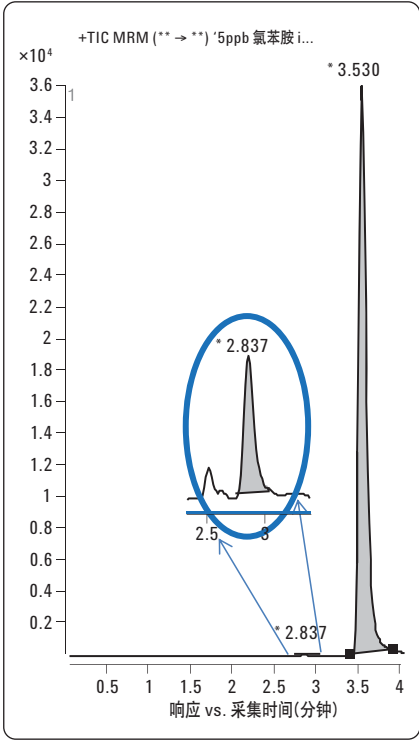


图2  
添加0.5 ppb 4-氯苯胺的1000 ppb 氯己定的总离子流图 (TIC)

氯己定和4-氯苯胺的裂解图谱分别见图3和图4。

4-氯苯胺的校准曲线显示在0.3到1000 ng/mL的宽浓度范围内(21个浓度点,各进样3次,见图5)具有良好的线性 $R^2 > 0.9998$ 。所测LOD为0.2 ng/mL (S/N约等于7), LOQ (S/N约等于11)为0.3 ng/mL。

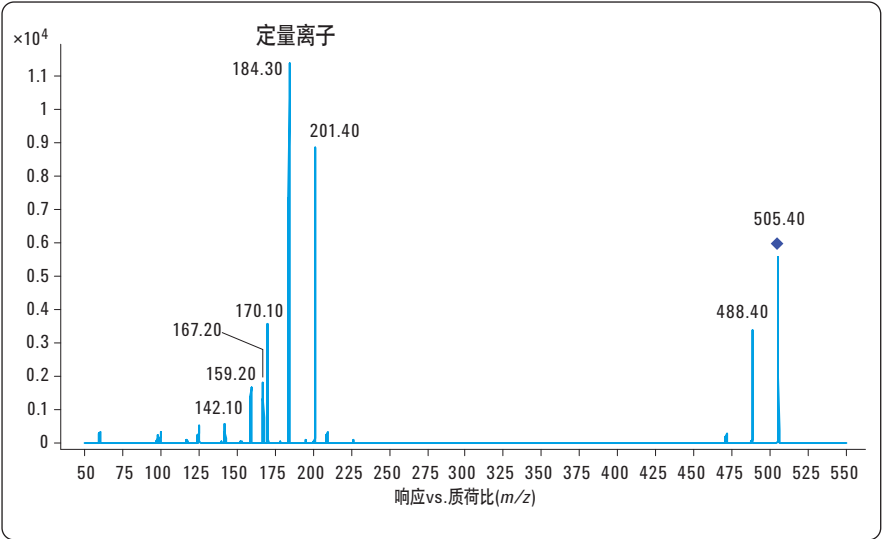


图3  
氯己定的裂解图谱

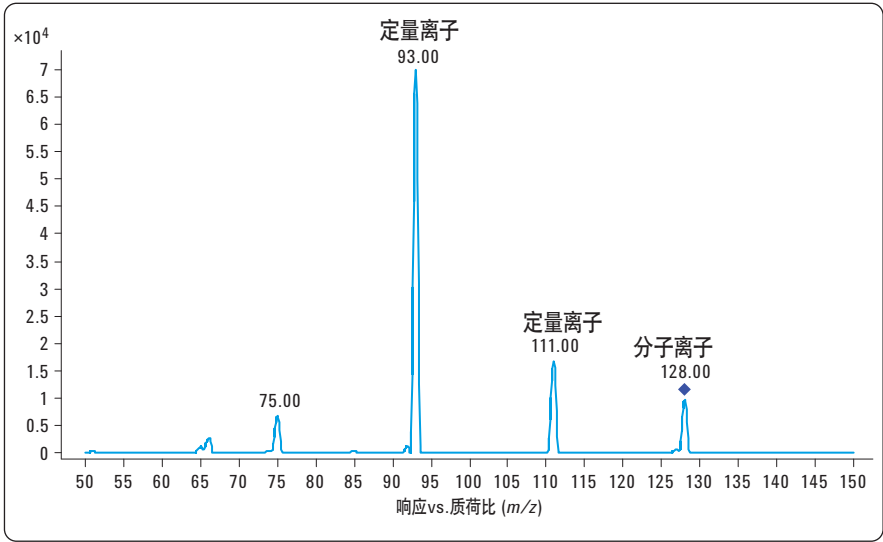


图4  
4-氯苯胺的裂解图谱

线性范围内各浓度的准确度（以百分比表示）良好，平均值为  $102.2 \pm 9\%$ 。所有浓度的准确度值列于表 2。

### 结论

我们建立了稳定而灵敏的氯己定中 4-氯苯胺的 LC/ESI/MSMS 定量测定方法。该方法具有较宽的线性范围 0.3 ng/mL (LOQ) 到 1000 ng/mL，相关系数  $>0.9998$ 。所测 LOD 为 0.2 ng/mL。各线性水平的浓度准确度约为  $102.2 \pm 9.7\%$ 。实验表明，安捷伦 6410B 三重四极杆 LC/MS 能够精确测定痕量基因毒性杂质 4-氯苯胺。

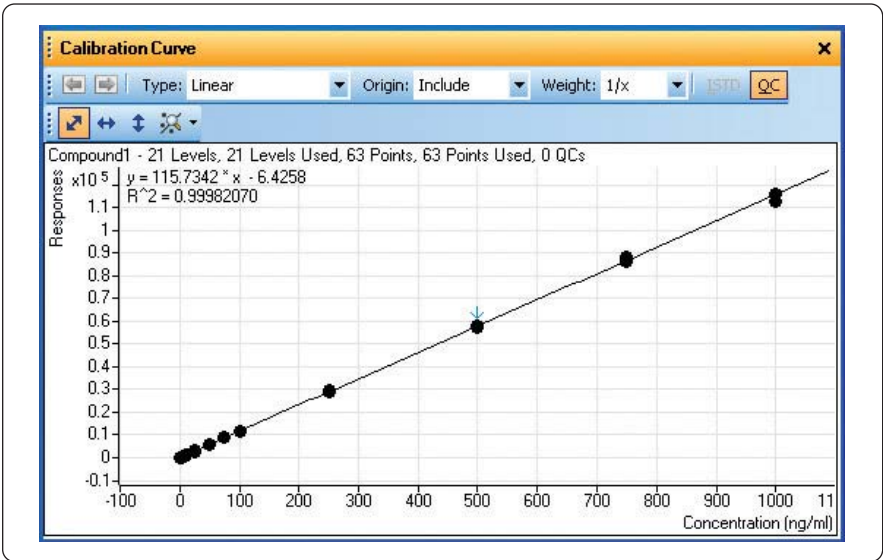


图 5  
4-氯苯胺的校准曲线

### 参考文献

1. Alfred E. Ciarlone, Louis P. Gangarosa, Bing C. Fong, "Detection of p-chloroaniline in chlorhexidine solutions using thin-layer chromatography," *J Dent Res*, 55(5):918, 1976
2. Marion N. Gleason, Robert E. Gosselin, Harold C. Hodge, Roger P. Smith, *Clinical Toxicology of Commercial Products: Acute Poisoning*, 3rd edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1969
3. A. I. Scott, E. Eccleston, Investigations of the general toxic and haematological effects of para-chloraniline in several species. *Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity*, 8:195-204, 1967

| 线性样品        | 浓度 (ng/mL) | 准确性   |
|-------------|------------|-------|
| 浓度: 1 (LOQ) | 0.30       | 111.9 |
| 浓度: 2       | 0.40       | 107.1 |
| 浓度: 3       | 0.50       | 92.5  |
| 浓度: 4       | 0.60       | 101.9 |
| 浓度: 5       | 0.70       | 97.7  |
| 浓度: 6       | 0.75       | 104.0 |
| 浓度: 7       | 0.80       | 93.7  |
| 浓度: 8       | 0.90       | 97.9  |
| 浓度: 9       | 1.00       | 95.3  |
| 浓度: 10      | 2.50       | 97.9  |
| 浓度: 11      | 5.00       | 97.6  |
| 浓度: 12      | 7.50       | 100.6 |
| 浓度: 13      | 10.00      | 99.6  |
| 浓度: 14      | 25.00      | 101.0 |
| 浓度: 15      | 50.00      | 97.8  |
| 浓度: 16      | 75.00      | 100.6 |
| 浓度: 17      | 100.00     | 99.9  |
| 浓度: 18      | 250.00     | 101.9 |
| 浓度: 19      | 500.00     | 99.7  |
| 浓度: 20      | 750.00     | 100.6 |
| 浓度: 21      | 1000.00    | 99.3  |

表 2  
所有线性浓度水平样品的准确度

[www.agilent.com/chem/qqq:cn](http://www.agilent.com/chem/qqq:cn)

© 安捷伦科技公司, 2009  
2009 年 3 月 15 日  
出版号 5990-3676CHCN