

盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究

冼芷然¹, 孙春萌², 骆雪芳^{1*}, 钟文英^{1**}(¹中国药科大学理学院药物质量研究中心, 南京 211198; ²中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要 确定2,6-二甲基苯胺为盐酸利多卡因注射液中遗传毒性杂质, *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺为潜在遗传毒性杂质, 建立LC-MS/MS方法, 用色谱柱Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 对原料、自制制剂及原研制剂进行遗传毒性杂质研究。研究结果表明自制制剂中杂质2,6-二甲基苯胺与*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺除由原料引入外, 可能分别由氧化条件或碱性条件下降解引入, 为盐酸利多卡因注射液的遗传毒性风险评估和工艺优化提供参考与指导。

关键词 盐酸利多卡因注射液; 遗传毒性杂质; LC-MS/MS

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0466-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200412

引用本文 冼芷然, 孙春萌, 骆雪芳, 等. 盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 466 - 471.

Cite this article as: XIAN Zhiran, SUN Chunmeng, LUO Xuefang, et al. Profiling of genotoxic impurities in a lidocaine hydrochloride injection[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 466 - 471.

Profiling of genotoxic impurities in a lidocaine hydrochloride injection

XIAN Zhiran¹, SUN Chunmeng², LUO Xuefang^{1*}, ZHONG Wenying^{1**}¹Drug Quality Research Center, College of Science, China Pharmaceutical University;²School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, China

Abstract 2,6-dimethylbenzenamine was determined as a genotoxic impurity in lidocaine hydrochloride injection, and 2-chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl) acetamide was determined as potential genotoxic impurity. An LC-MS/MS method was established to research the profiling of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (API), homemade preparation and reference preparation on column Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The results show that in the homemade preparation the 2,6-dimethylbenzenamine and the 2-chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl) acetamide may be degraded under oxidation condition and alkaline condition in addition to the introduction from API preparation process. This study provides guidance for genotoxic risk assessment and prescription process optimization of lidocaine hydrochloride.

Key words lidocaine hydrochloride injection; genotoxic impurities; LC-MS/MS

盐酸利多卡因(lidocaine hydrochloride)为临床上常制成盐酸利多卡因注射剂应用于局部麻醉药^[1]和抗心律失常药物等^[2-3]。作为国内一致性评价药物目录的基本药物, 原料及制剂的系统杂质研究尚无文献报道, 对制剂中高风险杂质进行系统研究十分必要。

在小分子化学药物一致性评价中, 遗传毒性杂质因其毒性危害大, 在极微量水平即能与体内DNA分子反应诱发DNA突变或致癌, 是药物安全

性评价的重要内容。遗传毒性杂质在药物制剂中主要来源于原料工艺及原辅料降解, 本文根据盐酸利多卡因的结构及合成工艺, 结合相关文献及研究资料确定了2,6-二甲基苯胺为遗传毒性杂质, *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺为潜在遗传毒性杂质。已有测定盐酸利多卡因中杂质2,6-二甲基苯胺的文献报道^[3-4], 现有药品标准中《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(2015)^[5]收录的盐酸利多卡因注射液中杂质2,6-二甲基苯胺质控限度为

收稿日期 2020-03-20 通信作者 *Tel: 13770599176 E-mail: liuluo21998@126.com

**Tel: 025-86185180 E-mail: wenyingzhongnj@163.com

0.04%,《中国药典》(2015)、欧洲药典 9.0^[6]收录盐酸利多卡因原料中杂质 2,6-二甲基苯胺质控限度为 0.01%,美国药典 40^[7]对盐酸利多卡因原料中杂质 2,6-二甲基苯胺(质控限度:0.01%)与杂质 2,6-二甲基苯基乙酰胺(质控限度:0.1%)均进行了控制。暂无文献报道对遗传毒性杂质和潜在遗传毒性杂质同时进行控制。本研究通过建立 LC-MS/MS 方法,检测 2,6-二甲基苯胺和潜在遗传毒性杂质 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺在原料、自制制剂及原研制剂中的检出数量及含量,并通过强制降解试验确定遗传毒性杂质的来源和降解途径,评估降解风险,为该制剂的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

EX125DZH 电子天平(美国奥豪斯公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪配紫外检测器、柱温箱及自动进样器(美国安捷伦公司);AB API3000 单四极杆质谱检测器,配有电喷雾电离源(美国应用生物系统公司);MILLIPAK Millipore 超纯水仪(德国默克公司)。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯,德国默克公司);水(超纯水,德国默克超纯水仪自制)。盐酸利多卡因原料药(山西新宝源制药有限公司,批号:201811009、201811012、201811016);盐酸利多卡因注射液自制制剂(实验室自制,批号:190502、190503,规格:100 mg:5 mL,原料批号 201811009);盐酸利多卡

因注射液参比制剂(德国费森尤斯集团,批号:6120311,规格:100 mg:5 mL)。*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(欧洲药典,批号:1366080,纯度 99%);2,6-二甲基苯胺(英国政府化学家实验室,批号:108951,纯度 99.8%)、2,6-二甲基苯基乙酰胺(批号:154427,纯度 99.98%)、*N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(批号:142855,纯度 99.5%)、杂质 2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(批号:833116,纯度 98.4%)(英国政府化学家实验室)。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 检测色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORB-AX Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(80:20)等度洗脱,流速 0.3 mL/min,柱温 30 ℃,进样体积 20 μL。

2.1.2 检测质谱条件 正离子模式;采集模式:MRM;雾化器指数:8;气帘:8;碰撞气:4;离子源压力:5 000 psi;离子源温度:400 ℃。质谱参数见表 1。

2.1.3 强制降解试验色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 A:4.85 g/L 磷酸二氢钾(氢氧化钠调节 pH 至 8.00),流动相 B:乙腈,流动相梯度:25% B→60% B;流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长:230 nm;进样体积 20 μL。

Table 1 Mass spectrometer of genotoxic impurities.

Name	Q1(Da)	Q3(Da)	DP(volts)	FP(volts)	EP(volts)	CE(volts)	CXP(volts)
2,6-Dimethylbenzenamine	122	105.2	47.26	385.93	9.85	22.28	15.00
2-Chloro- <i>N</i> -(2,6-dimethylphenyl) acetamide	198	122.3	47.33	260.92	14.70	28.78	15.00

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别取杂质 A 与杂质 B 对照品适量,以甲醇-水(80:20)的混合溶液溶解并定量稀释制成含杂质各 100 ng/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 原料药供试品溶液 取盐酸利多卡因原料药约 25 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇-水(80:20)的混合溶液,振摇使溶解,定容并摇匀即得。

2.2.3 制剂供试品溶液 另取自制制剂与参比制剂各适量(约相当于盐酸利多卡因 50 mg),置

50 mL 量瓶中,加甲醇-水(80:20)的混合溶液,定容并摇匀即得。

2.2.4 强制降解试验供试品溶液 取盐酸利多卡因原料药各约 50 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别加入 1 mol/L HCl 溶液 2 mL、1 mol/L NaOH 溶液 2 mL、1% 双氧水 2 mL,于常温避光环境下各放置 24 h 进行酸、碱、氧化强制降解,另取各约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入超纯水 2 mL 振摇使溶解,于 60 ℃ 烘箱、5 000 Lx 的光照试验箱下放置 24 h 进行高温

与光照强制降解。上述强制降解溶液破坏结束后加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定容并摇匀即得。另取盐酸利多卡因原料药约50 mg,置于10 mL量瓶中,加入超纯水2 mL振摇使溶解,于常温避光环境下放置24 h后加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定容并摇匀,得未破坏供试品溶液,精密量取上述溶液适量,加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定量稀释,配制0.1%的自身对照溶液。

3 结果与讨论

3.1 遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质的筛选

据文献[8-10]报道,利多卡因主要由两条合成

路线制备,其中最常用合成路线见图1^[8],根据该合成路线推测降解杂质可能含起始物料2,6-二甲基苯胺(图2-A)、中间体*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(图2-B)及二乙氨基键断裂后降解产物*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(图2-C);Li等^[11]指出叔胺易氧化形成*N*-氧化物,故含叔胺结构的利多卡因易氧化降解形成2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(图2-D);Li等^[12]指出,利多卡因一步代谢可形成代谢产物2,6-二甲基苯胺与*N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(图2)。

针对以上文献信息,本研究从5个降解杂质中筛选出一个遗传毒性杂质与一个潜在遗传毒性杂质,详细说明如下。

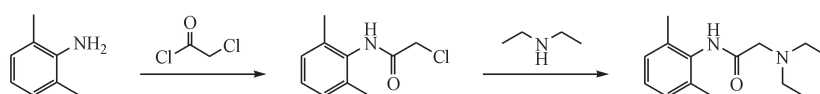


Figure 1 Synthesis route of lidocaine

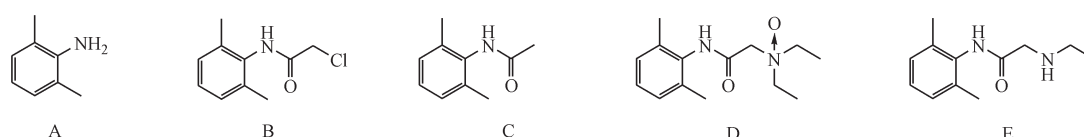


Figure 2 Structures of possible degradation products in lidocaine hydrochloride

A: 2,6-Dimethylaniline; B: 2-Chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; C: *N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; D: 2-(Diethylaziridinyl)-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; E: *N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-(ethylamino)acetamide

3.1.1 2,6-二甲基苯胺(下文简称杂质A) 杂质A为合成盐酸利多卡因的关键起始物料,其主要致突变/致癌基团为芳香胺,芳香胺易形成亲电氮离子与DNA反应产生基因突变和/或致癌。Kobets等^[13]提出,大鼠慢性生物试验中表明杂质A会增加腺瘤和鼻腔癌的发生率,致癌性及体内遗传毒性均显示阳性。Koujitani等^[14]的毒性研究数据表明,连续52周对大鼠的饮食中施以3 000 mg/kg的杂质A后,组织病理学评估结果显示该组的肿瘤发生率为33%,即TD₅₀(median toxic dose,半数中毒剂量)大于3 000 mg/kg,根据ICH M7指导原则^[15]按照TD₅₀进行线性外推计算限度的方法,代入该值计算该杂质的限度为1%。而在已有药品标准中,《中国药典》(2015)^[5]规定杂质2,6-二甲基苯胺在盐酸利多卡因注射液中的限度为0.04%,在盐酸利多卡因原料药中的限度为0.01%,欧洲药典9.0^[6]、美国药典40^[7]均规定盐酸利多卡因原料药中2,6-二甲基苯胺的限度为0.01%,在各国

药品标准对该杂质的质控要求更权威及更严格的背景下,本研究按照从严控制原则,选择各药典中规定的最低限度0.01%对盐酸利多卡因注射液中该杂质进行控制。

3.1.2 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(下文简称杂质B) 杂质B结构中含脂肪族氯代基团,电负性的氯使其邻位的α-C易失电子形成亲电基团,该亲电基团易与DNA等亲核物质发生反应,产生基因突变^[16]。该杂质目前无确切致癌性及致突变性数据,本研究参考文献[17]中卤代物典型化合物的致癌性及致突变性试验数据中化学结构较相近的化合物4'-氯乙酰基乙酰胺苯胺的毒性数据来评估杂质B的遗传毒性风险。文献表明该化合物无致癌性TD₅₀数据,但存在致突变性(AMES试验阳性),即无致癌性、有致突变性。根据ICH M7指导原则^[14]中的分类标准,可将杂质B列为2类遗传毒性杂质,需将其控制在合适的毒理学阈值(threshold of toxicological concern, TTC)以下。按照指导原则

中相关说明,用于麻醉的药品,其药物治疗时长不超过 1 个月,遗传毒性杂质的可接受摄入量为 120 $\mu\text{g/d}$,结合盐酸利多卡因注射液最大日剂量 0.3 g 计算,杂质限度为 PDE/最大日剂量即 0.04%。因杂质 B 与杂质 A 同为利多卡因的可能降解产物,且其潜在遗传毒性未能准确评估,为更严格地控制杂质水平,将该杂质限度与遗传毒性的杂质 A 限度保持一致,即按 0.01% 控制。

3.1.3 *N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(下文简称杂质 C) 本研究暂未查到杂质 C 相关毒性资料,根据 ICH 的指导原则,在缺乏安全性数据的支持下,可采用“警示结构”^[18]对杂质进行遗传毒性筛选并进行分类。经比对,发现杂质 C 中含有警示结构“芳胺的酰化物”,该结构在盐酸利多卡因原料药中亦存在。由于杂质 C 与原料药具有相同的警示结构,按照 ICH M7 的分类原则,应对其按 4 类杂质进行控制,即按非致突变杂质进行控制。

3.1.4 *N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(下文简称杂质 D) 杂质 D 为盐酸利多卡因叔胺上 N 原子的氧化产物,目前暂未查到文献报道有关该杂质的遗传毒性数据,在 ICH M7 指导原则参考的警示结构列表中,无烷基叔胺氮氧化物结构,即表明在大量毒性试验中暂无证明此基团存在潜在遗传毒性的数据。综上所述,因杂质 D 不含警示结构,按遗传毒性分类原则将其分为 5 类杂质,不将其按照潜在遗传毒性杂质进行研究。

3.1.5 2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(下文简称杂质 E) 与杂质 D 同理,对于暂无文献报告杂质 E 的遗传毒性数据,本研究通过与指导原则中的“警示结构”^[18]比对来预测该杂质的遗传毒性,比对结果显示,杂质 E 亦无可匹配的警示结构,按遗传毒性杂质分类原则将其分为 5 类杂质,亦不列入潜在遗传毒性杂质范围。

综合以上分析,本研究最终确定盐酸利多卡因中遗传毒性杂质为 2,6-二甲基苯胺,潜在遗传毒性杂质为 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺,二者在盐酸利多卡因原料药及注射液中检出均不得过 0.01%。

3.2 遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质的检测

现行各国药典规定的盐酸利多卡因原料及注射液中 2,6-二甲基苯胺检查法所采用的流动相中均含磷酸盐^[5-7],不适用于质谱联用检测。本研究在建立遗传毒性杂质检测方法过程中,将流动相

中水相改为超纯水,有机相改为在质谱中较乙腈更易离子化的甲醇,流动相流速降为 0.3 mL/min,通过调整水相与有机相比比例使 API 与两个待测杂质实现良好分离。在优化的色谱条件下用液质联用仪进行一二级质谱碎片扫描,分别确定各杂质定量离子对并进行质谱参数优化,从而确定液相-质谱联用条件。由于 API 在两个待测杂质出峰后经色谱柱洗脱,因此在检测方法中杂质 A 与杂质 B 均出峰后设置通道切换,将后续含高浓度 API 的流出液作为废液排出,以保护质谱仪。在确定的色谱条件下,空白溶剂(80% 甲醇)、混合对照品溶液及供试品溶液杂质测定谱图见图 3,从图谱上看,在杂质 A 与杂质 B 特异性 Q1/Q3 定量离子对通道下,各相邻峰均不干扰该峰检测;该色谱及质谱条件下杂质 A 与杂质 B 的定量限分别为 43.91 与 40.39 ng/mL,约相当于 0.004% 的盐酸利多卡因,可满足本品质控限度要求。

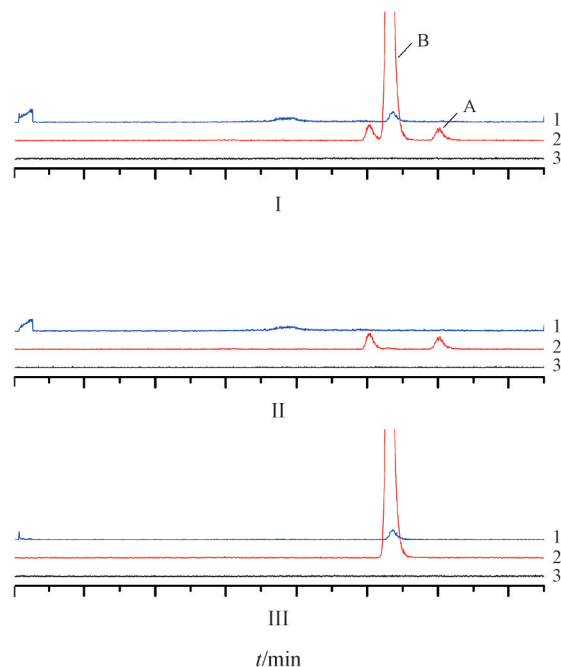


Figure 3 Chromatograms of potential genotoxic impurities tests

1: Test solution (Lot: 201811012); 2: Reference solution; 3: Blank solvent. A: Peak of impurity A; B: Peak of impurity B; I: Chromatogram of total ion current; II: Chromatogram of impurity A; III: Chromatogram of impurity B

取各杂质对照品及盐酸利多卡因原料药、自制制剂、原研制剂照“2.1”项下方法配制混合对照品溶液与供试品溶液,按照遗传毒性杂质检测方

法进样,以外标法计算各杂质含量,测定结果见表2。

Table 2 Results of content of potential genotoxic impurities of lidocaine hydrochloride API, homemade preparations and reference preparations

Form	Batch No.	Impurity A/%	Impurity B/%
API	201811009	0.000 3	0.001 1
	201811012	0.000 2	0.000 5
	201811016	ND*	0.001 0
Homemade	190502	0.000 7	0.001 4
Reference	6120311	0.000 2	ND

*ND:Not detected

表中结果显示,批号201811009的原料药和由该批次制成的自制制剂及批号201811012的原料药中杂质A与杂质B均有检出,批号201811016原料药仅检出杂质B。与原料及自制制剂相比,原研制剂仅检出少量的杂质A。比对各组数据,两个杂质检出量均呈现自制制剂>原料药>原研制剂的趋势。对原料药与原研制剂杂质检出量进行比对分析可知,杂质可能来源于原料生产过程中的工艺杂质,也可能来源于原料储运过程中产生的降解。而由自制制剂与原料药杂质检出量的差异判断,从原料储存—制剂制备—制剂储存的途径中,盐酸利多卡因均存在降解产生杂质A与杂质B的趋势。综合以上分析,原料生产工艺与杂质的降解均可能是导致自制制剂与原研制剂遗传毒性杂质检出情况不一致的原因。本研究主要从杂质的降解方面入手,设计原料药的强制降解试验,进一步探究上述杂质的主要降解途径和降解程度,为注射液的制备工艺和储存条件提供参考。

3.3 强制降解试验

照上述“2.2.4”项下配制方法进行酸、碱、氧化、高温及光照强制降解试验,取各溶液于“2.1.3”条件下进样,计算强制降解供试品溶液各杂质含量与未破坏供试品溶液各杂质含量的绝对偏差,为更全面分析盐酸利多卡因降解途径,本研究将“3.1”项下涉及的5个降解杂质均进行了降解含量分析,结果如见表3。

结果显示,碱降解及氧化降解为盐酸利多卡因的主要降解途径,在较极端的酸、高温及光照条件下盐酸利多卡因较稳定。在氧化破坏条件下,主要降解产物为杂质D,其次为杂质E与杂质A,

Table 3 Results of the forced degradation tests of lidocaine hydrochloride

Name	1 mol/L HCl	1 mol/L NaOH/%	1% H ₂ O ₂ /%	60 °C heat	Light
Impurity A	ND	ND	0.001	ND*	ND
Impurity B	ND	0.001	ND	ND	ND
Impurity C	ND	ND	ND	ND	ND
Impurity D	ND	ND	20.399	ND	ND
Impurity E	ND	ND	0.007	ND	ND

*ND:Not detected or changes of content ≤0.000%

据之前分析,杂质D与杂质E无潜在遗传毒性,对盐酸利多卡因遗传毒性风险影响较低。观察盐酸利多卡因化学结构,其中含有关键基团酰胺键,试验前期笔者初步预测盐酸利多卡因易发生酰胺键的水解反应降解形成杂质A而使原料药和制剂的遗传毒性风险大大增加,但根据试验结果可以看出,在各条件下杂质A均没出现较大的降解趋势,该现象的出现可能由于苯环上邻位的两个甲基形成的空间位阻对酰胺键起了一定的保护作用^[12]。在碱性条件下仅杂质B有少量降解。结合上述原料药与自制制剂中杂质的检测结果分析,杂质A与杂质B在自制制剂的含量与原料药相比有所增加,与强制降解试验二者均有少量降解的结果一致,证明了前述对于杂质A与杂质B除了来源于原料工艺杂质外还会来源于盐酸利多卡因的降解这一推断。

综合强制降解试验结果可知,盐酸利多卡因主要在碱性条件和氧化条件下产生降解,形成杂质A和杂质B,遗传毒性风险增加。针对以上结果,可在本品制备和储存过程中针对含氧量与酸碱度进行条件优化,以减少盐酸利多卡因的降解。本研究对盐酸利多卡因自制制剂储存过程中的氧气接触时间进行了优化,在安瓿瓶熔封前向瓶内灌入高纯氮气,将瓶内注射液与空气隔绝,再进行熔封,制成批号为190503的小试批自制制剂。照“3.2”项下步骤测定两个待测杂质的含量,杂质A与杂质B检出量分别为 $5 \times 10^{-4}\%$ 与 $1.6 \times 10^{-3}\%$ 。与批号为190502的杂质含量检测结果进行比对分析,经过充氮保护后,盐酸利多卡因降解出杂质A的趋势有所下降,说明充氮保护对形成杂质A的降解途径有一定的抑制作用。而杂质B的检出量未降低,说明充氮保护不能抑制杂质B的降解。

除充氮保护外,有文献报道曾采用在制剂中添加如盐酸赖氨酸^[19]、亚硫酸氢钠^[20]等抗氧化剂或使用脱气水等手段来抑制注射剂的氧化降解,通过加入不同种类的pH调节剂并适当调节用量来抑制注射剂的酸降解或碱降解。若要实现上述技术在盐酸利多卡因注射液的制备工艺中的应用,需要多方面考察原辅料相容性、辅料自身的毒性与处方的详细用量等,目前仍有待进一步研究。

4 结 论

本研究确定了盐酸利多卡因中遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质,经检测原料药、自制制剂及原研制剂中遗传毒性杂质检出情况存在一定的差异,根据强制降解试验结果进一步确定该差异主要来源于原料生产工艺与原料药在氧化及碱性条件下的降解,通过充氮保护可一定程度减少杂质2,6-二甲基苯胺的降解,本研究对盐酸利多卡因注射液的遗传毒性风险评估和处方工艺优化提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] Long J, Etxeberria AE, Nand AV, *et al.* A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, **104**: 109873. doi: 10.1016/j.msec.2019.109873.
- [2] Chen YQ, Hong BH, Yi RZ. HPLC determination of contents and related substances in the tetrodotoxin lidocaine hydrochloride for injection [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2016, **35**(3): 67-75.
- [3] Wang X, Li X, Xiao Y. A novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method with high performance liquid chromatography for detection of 2,6-dimethylaniline in lidocaine hydrochloride injection [J]. *Se Pu*, 2018, **36**(3): 292-298. doi: 10.3724/SP.J.1123.2017.11049.
- [4] Deng ZH, Li AH, Hu WJ. Improvement of quality control of lidocaine hydrochloride injection [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2016(1): 72-75. doi: 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.019.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Part 2 (中华人民共和国药典: 二部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 979-980.
- [6] European Pharmacopoeia 9.0: Volume III (欧洲药典 9.0: 卷3) [S]. France: European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare, 2017: 2905-2906.
- [7] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia 40 [S]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2017: 4847-4848.
- [8] Yang RY, Yin XL, Liang M, *et al.* Microscale experimental study on preparation of lidocaine [J]. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2010, **37** (5): 137, 149. doi: 10.3969/j.issn.1007-1865.2010.05.058.
- [9] Zhejiang Huineng Biological Co., Ltd. *Method for preparing lidocaine hydrochloride*: 201510738390.7 [P]. 2016-02-03.
- [10] Bengbu Fengyuan Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd. *Method for preparing lidocaine*: 201010579590. X [P]. 2011-05-25.
- [11] Li M. Organic Chemistry of Drug Degradation [M]. United Kingdom: CPI Group (UK) Ltd, Croydon, CR04YY, UK, 2012.
- [12] Li Q, Magers T, King B, *et al.* Measurement of lidocaine and 2, 6-dimethylaniline in minipig plasma, skin, and dermal tapes using UHPLC with electrospray MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, **1087-1088**: 158-172. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.04.030.
- [13] Kobets T, Duan JD, Brunnemann KD, *et al.* DNA-damaging activities of twenty-four structurally diverse unsubstituted and substituted cyclic compounds in embryo-fetal chicken livers [J]. *Mutat Res*, 2019, **844**: 10-24. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.004.
- [14] Koujitani T., Yasuhara K., Kobayashi H., *et al.* Tumor-promoting activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine-treated rats [J]. *Cancer Lett*, 1999, **142**(2): 161-171.
- [15] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7 (R1) [S/OL]. (2017-05-01) [2019-01-28]. <https://www.ich.org/fileadmin/>.
- [16] Heewon L. *Pharmaceutical industry practices on genotoxic impurities* [M]. US: CRC, 2015: 87-88.
- [17] Andrew T. Genotoxic impurities strategies for identification and control [M]. Canada: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011: 44-46.
- [18] Benigni R, Bossa C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology [J]. *Mutat Res*, 2008, **659** (3): 248-261. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.05.003.
- [19] Xia YL, Zhang AJ, Liu JP. Optimization of tiopronin formulation [J]. *Centr South Pharm* (中南药学), 2015, **13**(7): 739-740, 779.
- [20] Lei XX, Wang Y, Zhang JL, *et al.* Analysis of the addition and measurement of bacteriostatics and antioxidants in injection and eye drops [J]. *Mod Chem Res* (当代化工研究), 2017 (4): 143-144.