

改进HPLC法测定阿那曲唑原料药中的有关物质

周丽云^{1,2*}, 胡婷霞², 李宏², 姚彤炜^{1#} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 杭州华东医药集团新药研究院有限公司, 杭州 310011)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1275-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.34

摘要 目的:改进高效液相色谱法测定阿那曲唑原料药中的有关物质。方法:色谱柱为Welch Materials XB C₁₈,改进后的流动相为乙腈-水(35:65, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:阿那曲唑原料药中仅检测出1个杂质(杂质A),检测质量浓度线性范围为0.1~1.6 μg/mL($r=0.999\ 6$);定量限为0.1 μg/mL,检测限为0.02 μg/mL;精密、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为98.95%~105.29%(RSD=1.78%, $n=9$)。结论:改进后的方法操作简便、结果准确,可用于测定阿那曲唑原料药中的有关物质。

关键词 阿那曲唑原料药;有关物质;高效液相色谱法

Determination of the Related Substances in Anastrozole by Improving HPLC

ZHOU Liyun^{1,2}, HU Tingxia², LI Hong², YAO Tongwei¹ (1. School of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. New Drug Research Institute Co. Ltd., Hangzhou Huadong Medicine Group, Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in anastrozole. METHODS: HPLC was performed on the column of Welch Materials XB C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (35:65, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 210 nm, column temperature of 25 ℃, and the injection volume was 20 μL. RESULTS: Only one impurity (impurity A) was detected in anastrozole, the linear range was 0.1-1.6 μg/mL ($r=0.999\ 6$); limit of quantitation was 0.1 μg/mL, limit of detection was 0.02 μg/mL; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 98.95%-105.29% (RSD=1.78%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, and can be used for the determination of related substances in anastrozole.

KEYWORDS Anastrozole; Related substance; HPLC

阿那曲唑是一种有效的、高选择性的第三代芳香酶抑制剂,主要用于绝经后妇女乳腺癌的治疗,在全球应用广泛。作为晚期乳腺癌的一线治疗药物,其比原有乳腺癌治疗金标准(他莫昔芬)具有更好的疗效和耐受性^[1-3]。阿那曲唑原料药通过合成后精制获得,但合成过程中产生的有关物质如果没有有效去除至合理限度,会产生一定的毒副作用。2015年版《中国药典》(二部)^[4]收录了阿那曲唑原料中有关物质的检测方法为高效液相色谱法(HPLC),但上述有关物质检测方法的分离度不够理想。本试验对流动相进行改进^[5-6],建立了测定阿那曲唑原料药中有关物质的方法,以期阿那曲唑原料药的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200 型 HPLC 仪,包括 G1314A 型紫外检测器、G1313A 型自动进样器、G1311A 型泵(美国 Agilent 公司);XS105DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪

(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

阿那曲唑原料药(杭州华东医药集团新药研究院有限公司,批号:AN091001、AN091101、AN091102);杂质 A 对照品(杭州华东医药集团新药研究院有限公司,批号:AN100101-A,纯度:96.85%);乙腈为色谱纯,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

色谱柱:Welch Materials XB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(35:65, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μL^[7-9]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取杂质 A 对照品约 20 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,制成每 1 mL 中约含杂质 A 0.2 mg 的对照品贮备液;精密量取上述贮备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,制成每 1 mL 中约含杂质 A 0.02 mg 的对照品溶液^[10]。

2.2.2 供试品溶液 取样品约 20 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得^[11]。

2.2.3 空白对照溶液 取流动相适量,置于 10 mL 量瓶

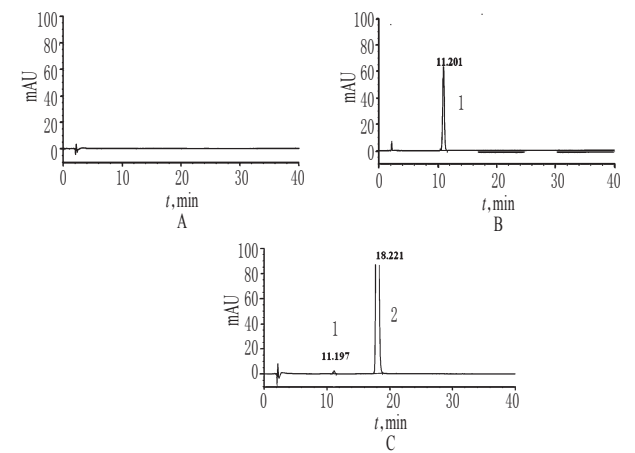
*研究员。研究方向:药物分析。E-mail:zhouliyun716@126.com

#通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药物分析。E-mail:yaotw@zju.edu.cn

中作为空白对照溶液^[12]。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各 20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,杂质 A 色谱峰与其他色谱峰均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数按阿那曲唑峰计为 17 518,保留时间为 18.22 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.空白对照;B.对照品;C.供试品;1.杂质A;2.阿那曲唑
A. blank control; B. reference substance; C. test sample; 1. impurity A; 2. anastrozole

图1 系统适用性试验高效液相色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

2.4 破坏性试验

2.4.1 酸破坏样品溶液 精密称取样品(批号:AN091001)约 10 mg,置于 25 mL 试管中,加 6 mol/L 盐酸溶液 1 mL,于 90 ℃水浴加热 1 h,冷却至室温,加 6 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 中和,转移至 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得。

2.4.2 碱破坏样品溶液 精密称取样品(批号:AN091001)约 10 mg,置于 25 mL 试管中,加 6 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,于 90 ℃水浴加热 1 h,冷却至室温,加 6 mol/L 盐酸溶液 1 mL 中和,转移至 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得。

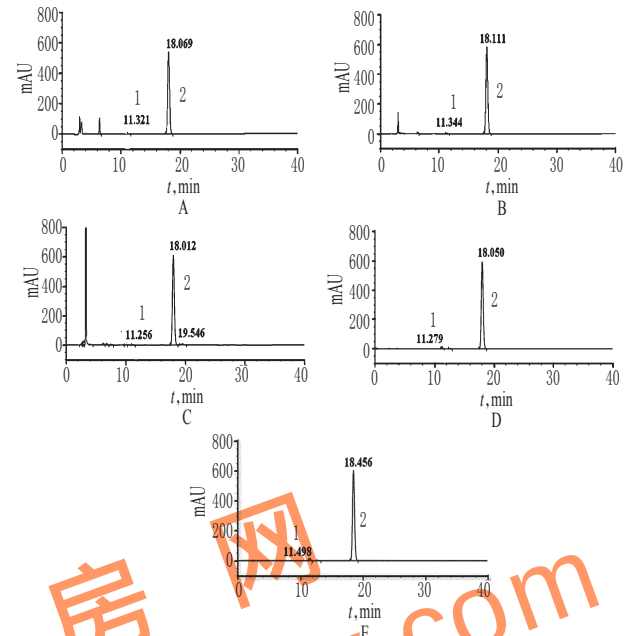
2.4.3 氧化破坏样品溶液 精密称取样品(批号:AN091001)约 10 mg,置于 25 mL 试管中,加 30%过氧化氢溶液 1 mL,于 90 ℃水浴加热 1 h,转移至 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得。

2.4.4 高温破坏样品溶液 精密称取样品(批号:AN091001)约 10 mg,置于 25 mL 试管中,在高温(105 ℃)下放置 4 h,冷却至室温,转移至 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得。

2.4.5 光破坏样品溶液 取样品(批号:AN091001)约 10 mg,置于 25 mL 试管中,置于(4 500±500)lx 光照强度下照射 10 d,转移至 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容,即得。

取上述破坏样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件

进样测定,记录色谱,详见图 2。结果表明,样品在高温、光照条件下,并没有降解出与主峰(阿那曲唑峰)和杂质 A 峰相邻的其他杂质峰;而样品在氧化、酸、碱条件下不稳定,产生了与主峰和杂质 A 相邻的降解杂质,但是降解杂质与主峰和杂质 A 的分离度良好。



A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.氧化破坏样品;D.高温破坏样品;E.光破坏样品;1.杂质A;2.阿那曲唑

A.samples destroyed by acid; B.samples destroyed by alkali; C.samples destroyed by oxidation; D.samples destroyed by heating; E.samples destroyed under light; 1. impurity A; 2. anastrozole

图2 破坏性试验高效液相色谱图
Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

2.5 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,用流动相稀释制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、1.2、1.6 μg/mL 的系列对照品溶液。分别精密量取上述系列对照品溶液 20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以杂质 A 质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得杂质 A 回归方程为 y=65.762x-0.668 6(r=0.999 6)。结果表明,杂质 A 检测质量浓度线性范围为 0.1~1.6 μg/mL。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限(LOQ);当信噪比为 3:1 时,得检测限(LOD)。结果,杂质 A 的 LOQ 为 0.1 μg/mL, LOD 为 0.02 μg/mL。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,杂质 A 峰面积的 RSD=1.73%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:AN091001)适量,分别于室温下放置0、3、5、7、9、11、14 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,只检出杂质A,杂质A峰面积的RSD=0.28%(n=7),表明供试品溶液在室温下放置14 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:AN091001)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积并计算含量。结果,只检出杂质A,杂质A峰面积的RSD=1.68%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取样品(批号:AN091001)适量,共9份,分别置于25 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的杂质A对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“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1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery test(n=9)

取样量, mg	样品含 量,μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
0.10	0.05	9.51	9.68	101.26		
0.10	0.05	9.51	9.76	102.10		
0.10	0.05	9.51	9.67	101.12		
0.03	0.15	30.43	30.58	100.00		
0.03	0.15	30.43	32.19	105.29	101.63	1.78
0.03	0.15	30.43	30.87	100.95		
0.04	0.20	38.04	38.98	101.95		
0.04	0.20	38.04	37.84	98.95		
0.04	0.20	38.04	39.38	103.00		

2.11 样品有关物质测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算杂质A的含量^[12-13]。阿那曲唑有关物质测定结果见表2。由表2可知,样品中的杂质A含量均<0.10%,未超过检测限^[14]。

表2 有关物质测定结果(n=3)

Tab 2 Determination results of the related substances (n=3)

样品批号	杂质个数	最大单个杂质,%	总杂质,%
AN091001	1	0.044	0.044
AN091101	1	0.097	0.097
AN091102	1	0.021	0.021

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

笔者考察了Agilent Zorbax SB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、依利特C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Welch Materials XB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)3种色谱柱,由于阿那曲唑极性较弱,在各种C₁₈色谱柱上均保留较好,测定有关物质时均能达到比较满意的分离效果,因此本试验选择较为常用的Welch Materials XB C₁₈色谱柱。

3.2 流动相的改进

在药典中阿那曲唑有关物质测定选用的流动相为乙腈-水(45:55,V/V),采用该流动相进行测定时色谱分离较差。在预试验中发现阿那曲唑对有机相比较敏感,提高有机相的比例,会显著减弱主成分及其有关物质在色谱柱固定相中的保留,从而使主成分与有关物质无法有效分离。因此,笔者改进乙腈-水的比例为35:65,调整比例后的流动相色谱分离较好。

3.3 检测波长的选择

笔者采用紫外检测器对阿那曲唑破坏性试验中产生的杂质、起始原料及中间体进行全波长扫描。结果,阿那曲唑及其有关物质只在200~220 nm波长处有吸收,因此本试验选择210 nm作为检测波长,能够较好的兼顾主峰和杂质峰的检测。

3.4 溶剂的选择

由于阿那曲唑在水中几乎不溶^[13,15],在乙腈中易溶,考虑到样品的溶解特性及消除溶剂效应,所以本试验选择流动相(乙腈-水)作为溶剂。

综上所述,改进后的方法操作简便、结果准确,可用于测定阿那曲唑原料药中的有关物质。

参考文献

[1] 安富荣,崔岚,曹惠明.阿那曲唑的药理作用及临床应用[J].中国临床药理学杂志,2001,17(5):367-370.

[2] 陈占红,王晓稼.晚期乳腺癌药物研究与治疗进展[J].临床药物治疗杂志,2014,12(2):1-5.

[3] 陈秀荣,陈强.乳腺癌内分泌治疗的药物选择与时机掌握[J].医学综述,2009,15(8):1168-1172.

[4] 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,2015:556.

[5] 赵春顺,崔升森,江荣高,等.RP-HPLC测定阿那曲唑含量及有关物质的方法学研究[J].中国药学杂志,2003,38(2):135-137.

[6] 曹靖,何花,田娟,等.HPLC-MS/MS法测定人血浆中阿那曲唑的浓度及生物等效性研究[J].湖南师范大学学报(医学版),2012,9(4):74-77.

[7] 夏天水,熊全红,罗云龙.HPLC法测定硫辛酸注射液中的有关物质[J].中国药房,2016,27(21):2980-2982.

[8] 王柳云,黎亮星,许丽媛,等.HPLC测定缙沙坦片中缙沙坦的含量及有关物质[J].食品与药品,2015,17(4):277-282.

[9] 李婵娟,龙芳,卢山,等.阿奇霉素眼用即型凝胶含量及有关物质的测定方法[J].海峡药学,2015,27(4):70-72.

[10] 马郑,彭涛,张艳华.HPLC法同时测定双氯芬酸钠滴眼液中的含量及有关物质[J].今日健康,2015,14(2):274.

[11] 陈妍蓓,将文玉.RP-HPLC测定琥珀酸美托洛尔缓释片的含量及有关物质[J].安徽医药,2015,9(12):2306-2309.

[12] 王建,李毓,陈红,等.反相HPLC法测定西洛他唑片的含量及有关物质[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(12):118-123.

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定脂必妥片中桔霉素的残留量

罗达龙*,王 华(广西梧州食品药品检验所,广西 梧州 543002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1278-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.35

摘 要 目的:采用固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定脂必妥片中桔霉素的残留量。方法:采用固相萃取法进行前处理,色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈,流动相为水(加 0.1% 甲酸)-乙腈(70:30, V/V)(梯度洗脱),流速为 0.30 mL/min,柱温为 40 ℃,分析时间为 7 min,进样量为 2 μL;离子化模式为正离子模式,离子源温度为 150 ℃,干燥气流速为 15 L/min,鞘气温度为 350 ℃,鞘气流速为 12 L/min,毛细管电压为 3 500 V,雾化器压力为 40 psi,喷雾电压为 0 V,工作模式为多反应监测模式。结果:桔霉素检测质量浓度线性范围为 0.1~20 ng/mL($r=0.999\ 4$);定量限和检测限分别为 0.05、0.01 ng/mL;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%;加样回收率为 98.868%~103.160%(RSD=1.5%, $n=6$)。结论:该方法简便快速、灵敏、结果准确,适用于脂必妥片中桔霉素的残留量测定。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法;固相萃取;桔霉素;残留量;脂必妥片

Determination of Residual Citrinin in Zhibituo Tablets by Solid Phase Extraction-UPLC-MS/MS LUO Dalong, WANG Hua(Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Guangxi Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine residual citrinin in Zhibituo tablet by solid phase extraction-UPLC-MS/MS. METHODS: The sample was processed preliminary by solid extraction. The determination was performed on Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisting of water (0.1% formic acid)-acetonitrile (70:30, V/V, gradient elution) at the flow rate of 0.30 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and analysis time was 7 min, the sample size was 2 μL. Ionization mode was positive ion mode. The ion source temperature was 150 ℃, drying gas velocity was 15 L/min, sheath gas temperature was 350 ℃, sheath gas flow rate was 12 L/min, capillary voltage was 3 500 V, atomization device pressure was 40 psi, atomization voltage was 0 V. The acquisition mode was MRM mode. RESULTS: The linear range of citrinin was 0.1-20 ng/mL($r=0.999\ 4$); the limits of quantitation and detection were 0.05 and 0.01 ng/mL. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%; recoveries were 98.868%-103.160% (RSD=1.5%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive, accurate and suitable for the determination of residual citrinin in Zhibituo tablet.

KEYWORDS UPLC-MS/MS; Solid phase extraction; Citrinin; Residual; Zhibituo tablets

脂必妥片具有健脾消食、除湿祛痰、活血化瘀等功效,可用于高脂血症、动脉粥样硬化及由此引起的头晕、头痛、胸痛、肢体麻木等症的治疗^[1]。其主要处方成分是红曲,而红曲是我国传统药材,是用特有的红曲霉菌在大米中培养发酵而成。然而,1995年法国学者 Blanc 等发现大多数红曲霉菌株能产生对肾脏有很强毒害作用和致癌作用的桔霉素(Citrinin)^[2],从而使红曲及含有红曲的相关制剂的安全性受到质疑。目前已有相关制剂中桔霉素残留量的报道^[3-14],但尚未有测定脂必妥片中桔霉素残留量的报道,因此笔者采用固相萃取-超高效

液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立了测定脂必妥片中桔霉素残留量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1290UPLC 型 UPLC-QQQ6490 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司);XA205DU 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);P180H 型超声波清洗器(德国 Elma Schmidbauer GmbH 公司,功率:300 W,频率:25 kHz);HLB 固相萃取柱(上海安谱科学仪器有限公司,填

[13] 赵新静,周慧,冯凯.二盐酸奎宁注射液质量标准的研究[J].中国现代药物应用,2010,4(14):1-2.
[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年

版.北京:中国医药科技出版社,2015:375.
[15] 李珏,梁鹏云,王立升,等.新型阿那曲唑衍生物的合成[J].合成化学,2013,4(21):450-453.

* 主管药师。研究方向:药品、食品检验。电话:0774-3882209。
E-mail:364634386@qq.com

(收稿日期:2016-07-21 修回日期:2016-12-11)
(编辑:刘 柳)