

改进HPLC法测定雷替曲塞原料药中的光学异构体

戴蓉^{1*},徐家根^{2#},刁岩忠³(1.南京医科大学附属妇产医院药学部,南京 210004;2.南京大学医学院附属口腔医院药学部,南京 210008;3.南京优科生物医药集团股份有限公司,南京 210009)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4295-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.32

摘要 目的:改进高效液相色谱法测定雷替曲塞原料药中的光学异构体。方法:对色谱柱、流动相和进样量进行改进,改进后的色谱柱为CHIRALPAK AD-H,流动相为正己烷-无水乙醇-三氟乙酸(70:30:0.1, V/V/V),进样量为100 μL,流速为1.0 mL/min,检测波长为226 nm,柱温为35 ℃。结果:光学异构体检测进样量线性范围为99.68~398.7 ng($r=0.999\ 9$);定量限为4.945 ng,检测限为1.648 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;加样回收率为99.43%~100.14%(RSD=0.25%, $n=9$)。结论:改进后的方法简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于测定雷替曲塞原料药中的光学异构体。

关键词 雷替曲塞原料药;光学异构体;高效液相色谱法;方法改进

Determination of Optical Isomers in Raltitrexed Raw Material by Modified HPLC

DAI Rong¹, XU Jiagen², DIAO Yanzhong³ (1. Dept. of Pharmacy, Obstetrics and Gynecology Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China; 2. Dept. of Pharmacy, Stomatological Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 3. Nanjing YOKO Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve HPLC method for determining optical isomers in raltitrexed raw material. METHODS: After improved, the column was CHIRALPAK AD-H with mobile phase consisted of *n*-hexane-anhydrous ethanol-trifluoroacetate (70:30:0.1, V/V/V). The sample size was 100 μL. The flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 226 nm, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear range of optical isomers was 99.68-398.7 ng ($r=0.999\ 9$). The quantitation limit was 4.945 ng, and detection limit was 1.648 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.0%; the recoveries ranged 99.43%-100.14% (RSD=0.25%, $n=9$). CONCLUSIONS: The optimized method is simple, accurate, sensitive and reproducible, which can be used for the determination of optical isomers in raltitrexed raw material.

KEYWORDS Raltitrexed raw material; Optical isomers; HPLC; Method improvement

雷替曲塞(Raltitrexed)最初是由英国Zeneca公司和Royal Marsden医院合作开发的一种喹唑啉叶酸盐类似物,于1996年首先在英国申请获准上市,商品名为Tomudex^[1]。2009年,我国原国家食品药品监督管理局批准南京正大天晴制药有限公司国产雷替曲塞制剂上市,商品名为赛维健。雷替曲塞属于细胞毒抗肿瘤药物,直接对胸苷酸合成酶(TS)起到抑制作用,可用于治疗不适合5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸与亚叶酸钙的晚期结肠癌患者^[2-3]。已有研究表明,雷替曲塞还可用于治疗恶性胸膜瘤、胰腺癌、头颈癌、食管癌、胃癌等实体瘤,疗效显著,耐受性好^[4-5],具有较好的临床应用前景。

雷替曲塞分子结构中存在一个手性中心,除雷替曲塞主成分外,只具有一个手性异构体,即光学异构体。大多数情况下,其中一种光学异构体具有药理活性,而另一种异构体活性很差,甚至有毒副作用,因此对光学异构体的分析控制极为重要^[6]。雷替曲塞原料药收载于

我国国家药品标准^[7-8]中,其采用高效液相色谱法(HPLC)测定其光学异构体,色谱柱填料为 α -酸性糖蛋白键合硅胶,该填料容易变性失活、发霉变质,使色谱柱耐用性差,从而增加检验成本;且对有机相的种类和浓度选择均有一定限制,对使用温度、压力及流动相中缓冲盐浓度和pH要求苛刻;同时,该色谱柱的载样量小,易受污染和累积残留,柱效低,导致方法重复性差,影响了其应用及推广^[9-10]。鉴于此,笔者参考文献^[11-18],改用CHIRALPAK AD-H色谱柱,并对流动相和进样量进行了改进,建立了以HPLC法测定雷替曲塞原料药中光学异构体的方法,以期为该原料药质量标准的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB型HPLC仪,包括CBM-20A系统控制器、DGU-20A3真空脱气机、SPD-M20A二极管阵列检测器、LC-20AB输液单元、SIL-20AC自动进样器、CTO-20AC柱温箱、LabSolutions色谱工作站(日本Shimadzu公司);XS205型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Biosafer SB25-12DTD型超声波清洗仪(上海诺顶仪器

* 副主任药师。研究方向:医院药学、药物分析。电话:025-52226272。E-mail:rongdai88@126.com

通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学、药物分析。电话:025-83620369。E-mail:Xjg.234@163.com

设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

雷替曲塞原料药(南京优科制药有限公司,批号:20150101、20150102、20150103);光学异构体对照品(南京优科制药有限公司,批号:20141022,纯度:98.6%);正己烷和无水乙醇为色谱纯,其作试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:CHIRALPAK AD-H(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:正己烷-无水乙醇-三氟乙酸(70:30:0.1, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:226 nm;柱温:35 ℃;进样量:100 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取光学异构体对照品约10 mg,精密称定,置于50 mL量瓶中,加甲醇1 mL,超声(功率:600 W,频率:40 kHz,下同)处理5 min使溶解,用流动相定容,摇匀,精密量取5 mL,置于50 mL量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得对照品贮备液;精密量取对照品贮备液5 mL,置于50 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约10 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇1 mL,超声处理5 min使溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 系统适用性溶液 取样品约10 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇1 mL,超声处理5 min使溶解,再加入“2.2.1”项下的对照品贮备液1 mL,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 取甲醇1 mL,置于10 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

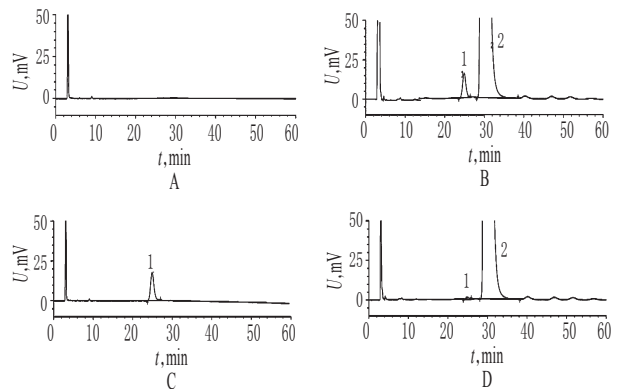
精密量取“2.2”项下阴性对照溶液、系统适用性溶液、对照品溶液和供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,光学异构体与雷替曲塞主成分峰之间能达到基线分离,分离度>2.5;理论板数以光学异构体峰计为8 226,保留时间为24.9 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,分别用流动相定量稀释制成每1 mL中约含光学异构体1.0、1.4、2.0、2.4、3.0、4.0 μg的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以光学异构体进样量(x , ng)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得光学异构体回归方程为 $y=1\ 932.9x-27\ 462(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,光学异构体检测进样量线性范围为99.68~398.7 ng。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”



A.阴性对照溶液;B.系统适用性溶液;C.对照品溶液;D.供试品溶液;1.光学异构体;2.雷替曲塞

A.negative control; B.system suitability test; C.substance control; D.test sample; 1.optical isomers; 2.raltitrexed

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ为4.945 ng;当信噪比为3:1时,得LOD为1.648 ng。

2.6 精密度试验

分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,光学异构体峰面积的RSD=0.41% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150101)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,光学异构体峰面积的RSD=0.73% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20150101)适量,共6份,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,记录峰面积并计算光学异构体的含量。结果,光学异构体含量的平均值为0.076%, RSD=0.62% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20150101)约10 mg,精密称定,共9份,分别置于10 mL量瓶中,各加入低、中、高质量的光学异构体对照品,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。

2.10 样品中光学异构体测定

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,记录峰面积并计算光学异构体含量,并与国家药品标准收载方法进行结果比较[该标准中色谱柱为 α -酸性糖蛋白键合硅胶色谱柱,流动相为0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液(用稀磷酸调节pH为6.5)-异丙醇(98:2, V/V),进样量为10 μL],详见

表2(注:“-”为未检出)。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(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,%
10.16	0.758 6	15.85	16.57	99.76		
10.04	0.749 6	15.85	16.54	99.62		
10.18	0.760 1	15.85	16.52	99.43		
10.13	0.756 3	19.82	20.58	100.02		
10.16	0.758 6	19.82	20.49	99.55	99.81	0.25
10.22	0.763 0	19.82	20.61	100.14		
10.11	0.754 8	23.78	24.56	100.11		
10.19	0.760 8	23.78	24.49	99.79		
10.27	0.766 8	23.78	24.51	99.85		

表2 样品中光学异构体测定结果(n=3, %)

Tab 2 Results of optical isomers determination in samples(n=3, %)

样品批号	原标准方法	改进后方法
20150101	-	0.007 6
20150102	-	0.007 9
20150103	-	0.007 7

3 讨论

3.1 色谱柱及流动相的选择

参考文献[12-14],采用CHIRALPAK AD-H手性色谱柱,该色谱柱以表面涂布直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)的硅胶为填料,对大多数消旋体均具有极高的手性识别能力。因此,选择上述色谱柱进行试验。

考虑到雷替曲塞化学结构中含有2个羧基,加入一定浓度的有机酸调节流动相的pH可以减弱手性固定相与主成分之间的分子间作用力,故加入酸性较强的三氟乙酸,从而可改善峰形,抑制色谱峰拖尾^[11]。经优化,最终选用的流动相为正己烷-无水乙醇-三氟乙酸(70:30:0.1, V/V/V)。

3.2 专属性考察

破坏性试验中用到的酸、碱、强氧化剂等都属于水溶液,含水样品进入正相色谱系统中,对手性色谱柱填料会造成不可逆的破坏,故为避免色谱柱受损伤,未进行破坏性试验相关研究。但在预试验中,笔者将起始物料、各步反应中间体、已知工艺杂质、降解杂质和反应粗品(含未知杂质)等,与光学异构体对照品按比例混合,进行专属性试验研究,考察各杂质与光学异构体峰之间的分离度是否符合要求。结果,各杂质在光学异构体保留时间处均未出峰,在二极管阵列检测器中显示,各溶液中光学异构体峰纯度指数均>0.998。说明各有关物质对光学异构体的检测无干扰,本法专属性良好。

综上所述,改进后的方法简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于测定雷替曲塞原料药中的光学异构体。

参考文献

[1] 黄荣华,马爱霞.雷替曲塞治疗结直肠癌的研究进展[J].中国药物评价,2014,31(1):14-16.

[2] 彭登付,王勇,胡冰.雷替曲塞治疗结直肠癌的临床应用[J].国际肿瘤学杂志,2013,40(12):933-935.

[3] Kelly C, Bhuvana N, Harrison M, et al. Use of raltitrexed as an alternative to 5-fluorouracil and capecitabine in cancer patients with cardiac history[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(10):2303-2310.

[4] 刘文稚,陈祥明.雷替曲塞临床应用研究进展[J].中华临床医师杂志,2012,6(8):2136-2138.

[5] 曹云娣,严文跃,刘宝瑞,等.雷替曲塞的研究进展及临床应用[J].临床医学研究与实践,2016,1(11):178-180.

[6] 张秋佳,陈雷,邹德超,等.HPLC法测定西他沙星异构体[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):237-239.

[7] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 YBH08242009 [S].2009.

[8] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 YBH08252009 [S].2009.

[9] 杜江波,陈笑艳,钟大放.蛋白质类手性固定相的研究进展及其在药物手性拆分中的应用[J].中国医药工业杂志,2015,46(10):1122-1130.

[10] 何健,季一兵.蛋白质类手性选择剂的研究进展[J].药学与临床研究,2013,21(2):166-171.

[11] 汪秋兰,施春阳,王文清,等.手性固定相HPLC法测定阿托伐他汀钙片中对映异构体的含量[J].中国药房,2013,24(16):1521-1523.

[12] 韦永爱,施宏刚,高聘,等.HPLC测定甲磺酸加雷杀星异构体[J].中国现代应用药学,2015,32(7):840-843.

[13] 张驰,逯多,杨放,等.HPLC测定硼替佐米原料药中的异构体[J].华西药学杂志,2014,29(5):577-579.

[14] 邹巧根,孙莉莉,韦萍.HPLC手性固定相法拆分恩替卡韦光学异构体[J].中国药科大学学报,2012,43(1):51-54.

[15] 扬子江药业集团有限公司.一种毛细管电泳法检测雷替曲塞对映异构体的方法:中国,200710131976.2 [P].2012-01-04.

[16] 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,2015:71-73.

[17] 刘翔,赵焱彬.高效毛细管电泳法在体内药物分析的应用[J].中国卫生产业,2011,8(6):108-110.

[18] 翁西伦,鲍宗必,罗飞,等.纤维素类手性色谱固定相的制备及其应用[J].化学进展,2014,26(Z1):415-423.

(收稿日期:2017-05-28 修回日期:2017-07-28)

(编辑:刘柳)