

HPLC法测定泊沙康唑原料药中的有关物质

李晓琴*, 李楠, 张晓, 刘宇, 贾爱琼, 刘瑜*(成都大学四川抗菌素工业研究所, 成都 610052)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5157-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.31

摘要 目的:建立测定泊沙康唑原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax Eclipse Plus C₁₈,流动相为0.05 mol/L醋酸铵溶液(加醋酸调节pH为4.0)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为262 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。结果:中间体 I 检测质量浓度线性范围为0.05~5.0 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限为0.05 μg/mL,检测限为0.013 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;回收率为98.00%~101.69%(RSD=1.22%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,适用于泊沙康唑原料药中有关物质的测定。

关键词 泊沙康唑;原料药;有关物质;高效液相色谱法

Determination of Related Substance in Posaconazole Raw Material by HPLC

LI Xiaoqin, LI Nan, ZHANG Xiao, LIU Yu, JIA Aiqiong, LIU Yu (Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substance in posaconazole raw material. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.05 mol/L ammonium acetate solution (pH adjusted to 4.0 using acetic acid)-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 262 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range of intermediate I was 0.05-5.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$); the limit of quantitation was 0.05 μg/mL, the limit of detection was 0.013 μg/mL; RSDs of precision test, stability test and repeatability test were lower than 2.0%; the recoveries was 98.00%-101.69% (RSD=1.22%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for the determination of related substance in posaconazole raw material.

KEYWORDS Posaconazole; Raw material; Related substances; HPLC

泊沙康唑(Posaconazole)是一种新型广谱三唑类抗真菌药物,2006年于美国上市,主要用于预防侵袭性真菌感染^[1-2],对念珠菌、曲霉菌、球孢子菌、裴氏着色芽生菌和部分茄病镰刀菌等有抗菌活性^[3],甚至对极难治愈的接合菌(如毛霉菌、根霉菌等)感染也有抗菌活性^[4]。目前,《美国药典》《欧洲药典》《中国药典》均未收载泊沙康唑的相关质量标准。国外对于其有关物质的研究多见于原料药^[5-8]及制剂^[9]的降解产物,着重有关物质结构解析;国内关于泊沙康唑的有关物质检测方法还未见报道。因此,本文采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定泊沙康唑原料药中有关物质的方法,以期完善其质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC-20AT泵、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-20A检测器、Chromato-Solution Light色谱工作站(日本Shimadzu公司);FE20型pH酸度计(瑞士Mettler-Toledo公司);

*硕士研究生。研究方向:药物质量控制。E-mail:1712116106@qq.com

#通信作者:工程师。研究方向:化学药物的研究开发。E-mail:28370545@qq.com

CPA225D型Sartorius AG十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);优普UPT-II-5型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);SB25-12DTDN型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

泊沙康唑原料药(四川抗菌素工业研究所自制,批号:20160801、20160802、20160901);泊沙康唑对照品(四川抗菌素工业研究所自制,批号:20160802,纯度:99.5%);中间体 I 对照品(四川抗菌素工业研究所自制,批号:20160725,纯度:99.7%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.05 mol/L醋酸铵溶液(加醋酸调节pH为4.0)(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min,95%→65% A;4~17 min,65%→40% A;18~35 min,40%→10% A;36~40 min,10%→95% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:262 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取中间体 I 对照品10 mg,置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解,定容,摇匀,作为中间

体 I 对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液 1 mL,加乙腈稀释 1 000 倍,制成中间体 I 质量浓度约为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

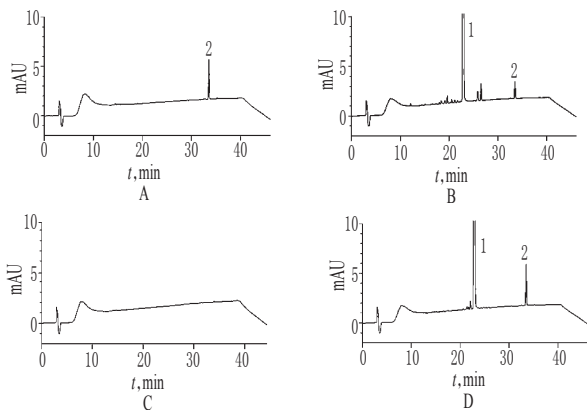
2.2.2 供试品溶液 精密称取样品 6 mg,置于 25 mL 量瓶中,加乙腈适量,超声(功率:300 W,频率:40 kHz,下同)处理 5 min,加乙腈定容,摇匀,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取乙腈适量作为空白对照溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取泊沙康唑对照品和中间体 I 对照品各适量,置于同一 25 mL 量瓶中,加乙腈溶解并定容,制成泊沙康唑质量浓度为 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中间体 I 质量浓度为 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性溶液。

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、空白对照溶液和系统适用性溶液各适量,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,各成分均能达到基线分离,分离度均 >1.5 ;理论板数以泊沙康唑峰计 $\geq 17\ 000$,保留时间约为 23 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A. 中间体 I 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; D. 系统适用性溶液; 1. 泊沙康唑; 2. 中间体 I

A. intermediate I control solution; B. test sample solution; C. negative control solution; D. system suitability solution; 1. posaconazole; 2. intermediate I

图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability tests

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:20160801)6 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 1 mol/L 的盐酸溶液 2 mL,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 3 h,冷却至室温,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和,加入乙腈适量,超声处理 5 min 使溶解,再加乙腈定容,摇匀,即得。

2.4.2 碱破坏样品溶液 精密称取样品(批号:20160801)6 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 3 h,冷却至室温,用 1 mol/L 的盐酸溶液中和,加入乙腈适量,超声处理 5 min 使溶解,再加乙腈定容,摇匀,即得。

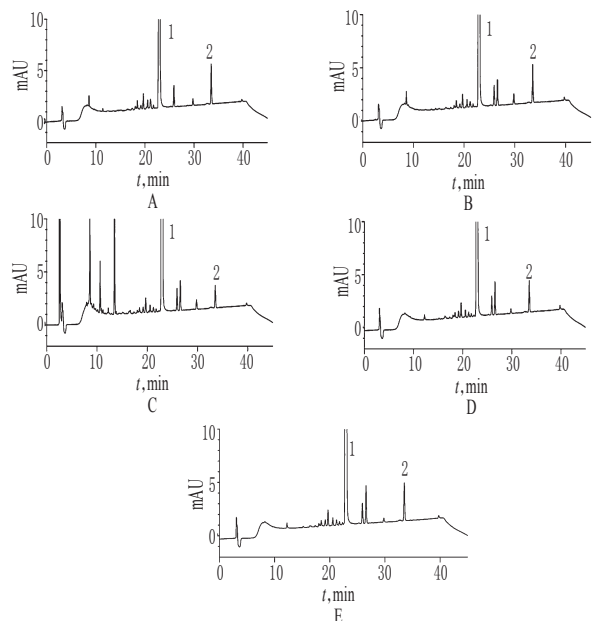
2.4.3 氧化破坏样品溶液 精密称取样品(批号:

20160801)6 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 20% 过氧化氢溶液 2 mL,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 3 h,冷却至室温,加入乙腈适量,超声处理 5 min 使溶解,再加乙腈定容,摇匀,即得。

2.4.4 高温破坏样品溶液 精密称取样品(批号:20160801)6 mg,置于 25 mL 量瓶中,在 120 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 24 h,冷却至室温,加入乙腈适量,超声处理 5 min 使溶解,再加乙腈定容,摇匀,即得。

2.4.5 光照破坏样品溶液 精密称取样品(批号:20160801)6 mg,置于 25 mL 量瓶中,在强光(4 500 \pm 500)lx 照射条件下放置 24 h,加入乙腈适量,超声处理 5 min 使溶解,再加乙腈定容,摇匀,即得。

取上述各破坏样品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 2。由图 2 可知,样品在酸、碱、高温和光照条件下均比较稳定,对氧化条件比较敏感,但样品在各破坏条件下产生的降解产物峰与主峰均能达到基线分离,且各有关物质间的分离度良好。



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. 光照破坏样品; 1. 泊沙康唑; 2. 中间体 I

A. destroyed by acid; B. destroyed by alkali; C. destroyed by oxidation; D. destroyed by heat; E. destroyed by light; 1. posaconazole; 2. intermediate I

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

精密称取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,逐级稀释成质量浓度分别为 5.0、2.5、1.0、0.5、0.25、0.1、0.085、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液,取上述系列对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以中间体 I 质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=45\ 983x+52.47$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,中间体 I 检测质量浓度线性范围为 0.05~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 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”项下色谱条件进样测定,当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,中间体I的LOQ为0.05 μg/mL,LOD为0.013 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”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,中间体I峰面积的RSD=0.77%(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:20160801)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、22、24时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,中间体I峰面积的RSD=0.78%(n=8),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:20160801)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,记录峰面积并计算中间体I含量。结果,中间体I含量的平均值为0.31%,RSD=1.14%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验

取低、中、高质量的中间体I对照品适量,各3份,分别置于25 mL量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得。取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
16	15.68	98.00		
16	16.27	101.69		
16	15.91	99.44		
20	20.13	100.65		
20	19.92	99.60	99.78	1.22
20	20.21	101.05		
24	23.98	99.92		
24	23.89	99.54		
24	23.56	98.17		

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,记录峰面积并计算有关物质的含量,结果见表2。

表2 样品有关物质测定结果(n=3, %)

Tab 2 Results of related substance determination(n=3, %)

样品批号	中间体I	杂质总量
20160801	0.316	1.073
20160802	0.324	1.047
20160901	0.329	1.064

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者考察了不同浓度的磷酸盐缓冲溶液-乙腈、醋酸盐缓冲溶液-乙腈作为流动相进行梯度洗脱的情况。结果,醋酸盐缓冲溶液-乙腈流动相体系能改善色谱的分离度,使主峰与相邻杂质峰有效分离,进一步考察,最终确定0.05 mol/L 醋酸铵溶液(加醋酸调节pH为4.0)-乙腈为本试验的流动相。

3.2 中间体I和杂质总量的限度

中间体I是泊沙康唑原料药新合成路径下的关键中间产物,而且也是该原料药用本方法检测有关物质时最大的已知杂质,根据现有工艺及3批样品测定结果,将中间体I作为已知杂质进行控制,限度暂定为0.5%;同时,泊沙康唑原料药的杂质总量不应超过1.5%。由于该工艺目前仍处于研发阶段,将通过后续相关研究进一步确定泊沙康唑原料药的杂质控制限度。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,适用于泊沙康唑原料药中有关物质的测定。

参考文献

- [1] Keating GM. Posaconazole[J]. *Drugs*,2005,65(11): 1553-1567.
- [2] Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, et al. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal[J]. *Lancet Infect Dis*,2005,5(12): 775-776.
- [3] 梅丹,梅隆,刘梅,等.泊沙康唑的药学和药理学评价[J]. *临床药物治疗杂志*,2014,12(3): 15-22.
- [4] Kauffman CA, Malani AN, Easley C, et al. Posaconazole[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2007,6(3): 183-184.
- [5] Feng W, Liu H, Chen G, et al. Structural characterization of the oxidative degradation products of an antifungal agent SCH 56592 by LC-NMR and LC-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2001,25(3/4): 545-557.
- [6] Zhong W, Yang J, Yang X. Structural determination of an unknown degradation product in posaconazole drug product using CASI technology in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*,2011,25(23): 3650-3655.
- [7] Zhong W, Yang X, Tong W, et al. Structural characterization of a novel degradant of the antifungal agent posaconazole[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2012,66(1): 40-49.
- [8] Feng W, Hilton BD, Zhong W, et al. Characterization of an unusual ring-contraction degradant of the antifungal agent posaconazole[J]. *Magn Reson Chem*,2012,50(8): 576-579.
- [9] Yang Y, Zhu X, Zhang F, et al. Stability-indicating HPLC method development and structural elucidation of novel degradation products in posaconazole injection by LC-TOF/MS, LC-MS/MS and NMR[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2016,125: 165-177.

(收稿日期:2017-07-27 修回日期:2017-09-24)

(编辑:刘柳)