

RP-HPLC 法测定阿齐沙坦的有关物质

吴 标 王 娟 崔红晓 潘显道

摘 要 **目的** 建立用高效液相色谱法测定阿齐沙坦中有关物质方法。**方法** 采用 Agilent C₁₈ 柱(250mm×4.6mm, 5μm), 以乙腈:水:冰醋酸(57:42:1)为 A 相,以乙腈-水-冰醋酸(90:9:1)为 B 相,梯度洗脱,流速为 0.8ml/min,检测波长为 250nm。**结果** 在选定色谱条件下,阿齐沙坦与各杂质之间分离良好,杂质 A、杂质 B、杂质 C 浓度分别在 0.122~8.114mg/L($r=0.9999$)、0.121~8.064mg/L($r=0.9998$)、0.122~8.156mg/L($r=0.9993$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系。上述杂质的平均回收率分别为 97.50%、96.82%、96.09%,RSD 分别为 5.10%、3.02%、2.99% ($n=9$)。**结论** 本方法专属性好,可用于测定阿齐沙坦中的有关物质。

关键词 阿齐沙坦 RP-HPLC 有关物质

中图分类号 R9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.044

Determination of the Related Substances in Azilsartan by RP-HPLC. Wu Biao, Wang Juan, Cui Hongxiao, et. al. Hefei Jiunuo Medical Technology Co., Ltd., Anhui 230088, China

Abstract Objective To establish a HPLC method for the determination of related substances of azilsartan. **Methods** The determination was performed on a Agilent C₁₈ (250mm×4.6mm, 5μm), with a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile, water and Acetic acid glacial by gradient elution. The flow rate and the detection were 0.8ml/min and 250nm respectively. **Results** Under the selected chromatographic conditions, related substances were completely separated from macitentan. The calibration curves for impurity A, impurity B, impurity C revealed good linearities over the ranges of 0.122~8.114mg/L($r=0.9999$), 0.121~8.064mg/L($r=0.9998$), 0.122~8.156mg/L($r=0.9993$), respectively. The recoveries of the above compounds were 97.50% with RSD of 5.10%, 96.82% with RSD of 3.02%, 96.09% with RSD of 2.99%, respectively. **Conclusion** A specific method is established for determination of azilsartan related substances.

Key words Azilsartan; RP-HPLC; Related substances

阿齐沙坦(azilsartan)与其前药阿齐沙坦酯(azilsartan medoxomil)一样,均为日本武田药品工业株式会社开发的血管紧张素 II 受体 AT₁ 亚型受体拮抗剂,均用于治疗高血压^[1-4]。阿齐沙坦 2012 年首次在日本上市(商品名 azilva),而其前体药物阿齐沙坦酯(azilsartan medoxomil)已于 2011 年在美国上市(商品名 edarbi)。目前,阿齐沙坦尚未列入国内外药典,其杂质尤其是降解物的研究仍处于积累和完善阶段^[5]。吴强等^[6]采用 LC-MS 法鉴定了阿齐沙坦在 50% 乙腈中的两个强制降解杂质:三元环物和脱乙基物(杂质 A)。隋立朋等^[7]鉴定了阿齐沙坦微粉化过程中产生的两个降解杂质,杂质 A 和乙酯化物(杂质 B)。笔者曾根据阿齐沙坦制备工艺,对其工艺杂质

和降解杂质作了全面总结和分析,并建立 HPLC 法对 10 个已知杂质进行分离鉴定^[8]。但该分析方法缺乏系统方法学验证,且定位杂质较多,生产监测不便,分析成本高。笔者通过 36 个月稳定性研究,进一步搜集阿齐沙坦在生产和贮运过程中产生的降解杂质,发现主要降解杂质有 3 个:杂质 A、杂质 B 及杂质 C(图 1)。由此,本文在原分析方法基础上,参考相关杂质研究文献及指导原则,通过系统方法学验证,建立了 RP-HPLC 法测定阿齐沙坦中以上 3 个主要降解杂质及其他有关物质的方法,结果表明该方法操作简便,专属性好,可用于控制阿齐沙坦中的有关物质^[9-11]。

材料与方法

1. 仪器:SSI 1500 高效液相色谱仪;SSI Series 1500 PUMP, Series 1500 二极管阵列检测器及 CSCrom Plus 色谱工作站购自美国科学仪器公司。

2. 试药:阿齐沙坦对照品(批号 D111001,含量为

作者单位:230088 合肥久诺医药科技有限公司(吴标、王娟、崔红晓);100050 中国医学科学院/北京协和医学院(潘显道)

通讯作者:潘显道,电子信箱:xdp@imm.ac.cn

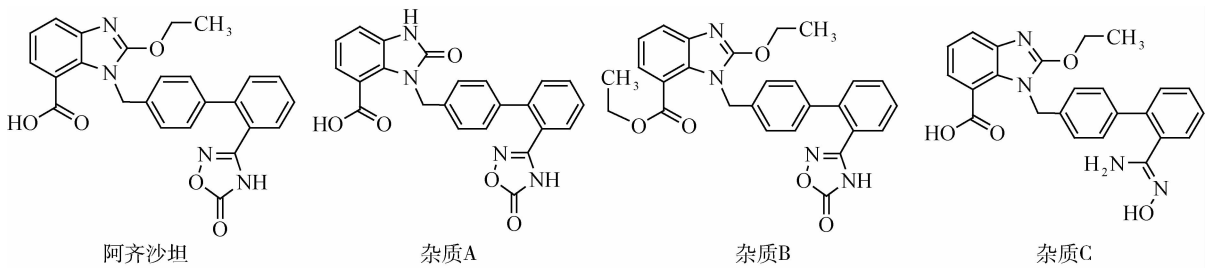


图 1 阿齐沙坦及其有关物质的结构式

99.90%), 杂质 A 对照品(批号 B110901, 纯度为 98.89%), 杂质 B 对照品(批号 G110901, 纯度为 98.44%), 杂质 C 对照品(批号 F110901, 纯度为 99.15%) 均为合肥久诺医药科技有限公司自制; 乙腈为色谱纯, 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

3. 有关物质检查方法: (1) 色谱条件: Agilent C₁₈ 色谱柱(250 × 4.6mm, 5μm); 流动相: 以乙腈: 水: 冰醋酸(57:42:1) 为 A 相, 以乙腈: 水: 冰醋酸(90:9:1) 为 B 相, 梯度洗脱(表 1); 流速: 0.8ml/min; 检测波长: 250nm; 进样量 10μl。 (2) 供试品溶液的制备: 取本品约 20mg, 精密称定, 置 50ml 棕色量瓶中, 加稀释剂[乙腈: 水(60:40)] 适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀。 (3) 对照溶液的制备: 精密量取供试品溶液 1ml, 置 100ml 棕色量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀。 (4) 阿齐沙坦和各杂质对照品贮备液的制备: 取阿齐沙坦及杂质 A、B、C 对照品各约 20mg, 精密称定, 分别置 50ml 棕色量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5ml, 分别置 50ml 棕色量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀。 (5) 系统适用性溶液的制备: 取阿齐沙坦对照品约 20mg, 精密称定, 置 50ml 棕色量瓶中, 精密加入杂质 A、B、C 对照品贮备液各 5ml, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
30	0	100
50	100	0
60	100	0

结 果

1. 有关物质研究方法学: (1) 系统适用性: 取系统适用性溶液 10μl 注入色谱仪, 杂质 C、杂质 A、阿齐沙坦和杂质 B 依次出峰, 阿齐沙坦与相邻杂质(杂质 B、C) 及各杂质之间的分离度 > 1.5; 理论板数以阿

齐沙坦峰计 ≥ 5000(图 2)。 (2) 专属性考察: 取阿齐沙坦 20mg(共 6 份) 进行如下试验: ① 未经破坏样品(即供试品); ② 光照破坏: 取强光(10000Lx) 照射 72h 的样品适量, 加稀释剂溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.4mg 的溶液; ③ 高温破坏: 取 150℃ 加热 3h 的样品适量, 加稀释剂溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.4mg 的溶液; ④ 酸破坏: 取本品 20mg, 置 50ml 棕色量瓶中, 加 1mol/L 盐酸溶液 5ml, 60℃ 水浴加热 2h, 放冷, 用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至中性, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀; ⑤ 碱破坏: 取本品 20mg, 置 50ml 棕色量瓶中, 加 1mol/L 氢氧化钠溶液 5ml, 60℃ 水浴加热 2h, 放冷, 用 1mol/L 盐酸溶液调 pH 值至中性, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀; ⑥ 氧化破坏: 取本品 20mg, 置 50ml 棕色量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 10ml, 100℃ 水浴加热 3h, 放冷, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。照上述色谱条件试验。结果表明, 阿齐沙坦峰与光照、高温、酸、碱、氧化破坏产生的降解产物峰均能有效分离, 方法专属性较强; 阿齐沙坦对光、热、酸及氧化均不太稳定, 主要降解产物为杂质 A、B、C(图 3)。 (3) 线性关系: 精密量取阿齐沙坦和各杂质对照品的贮备液 0.15、1、3、5、7、10ml, 分别置 50ml 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀。分别进样 10μl, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y), 以浓度(mg/L) 为横坐标(X), 得阿齐沙坦与各杂质的回

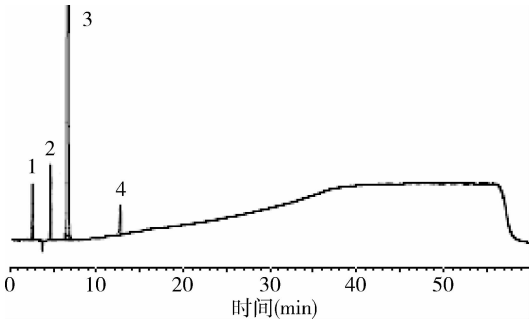


图 2 有关物质系统适用性色谱图

1. 杂质 C; 2. 杂质 A; 3. 阿齐沙坦; 4. 杂质 B

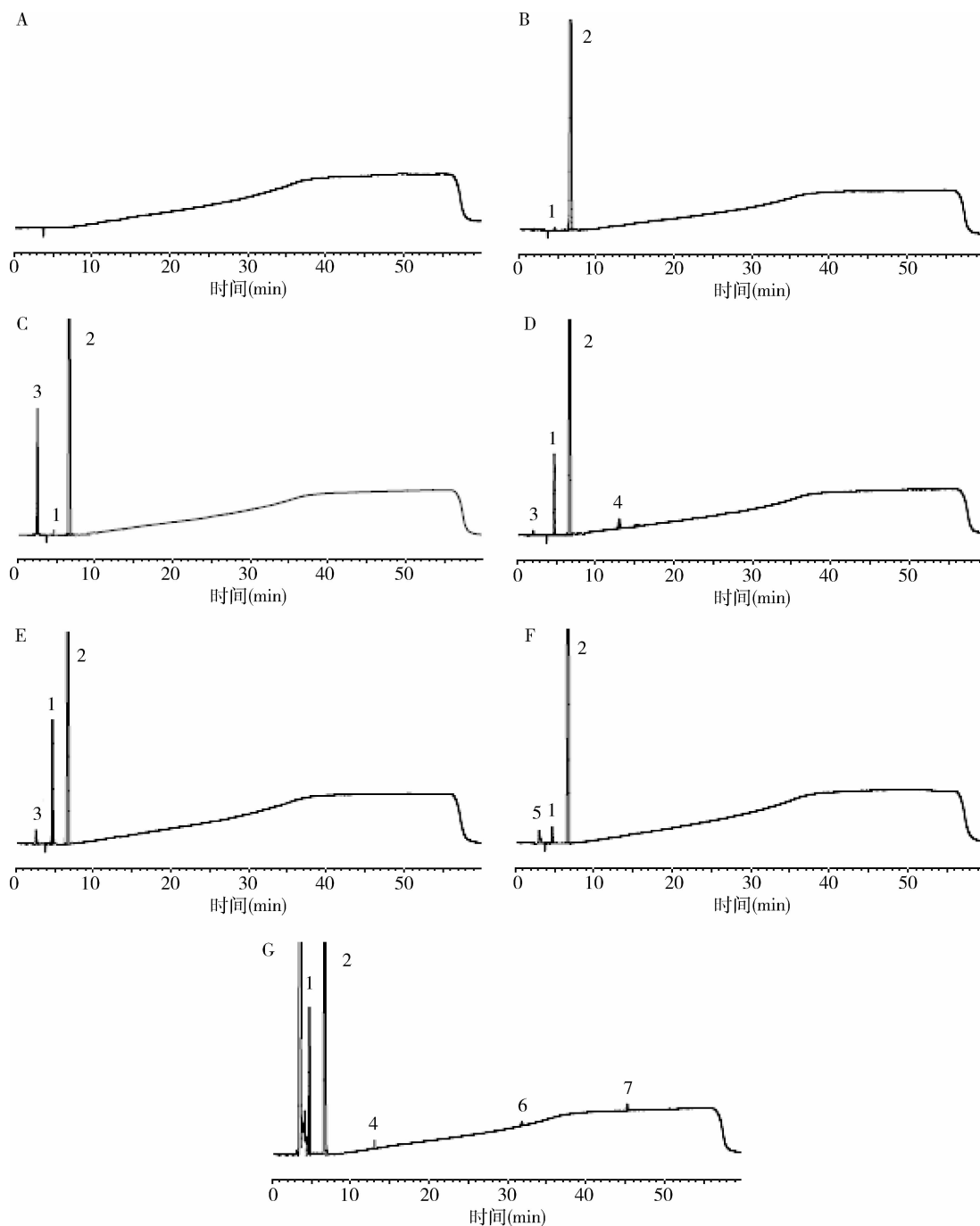


图3 高效液相色谱图

A. 空白溶剂; B. 未破坏样品; C. 光破坏; D. 高温破坏; E. 酸破坏; F. 碱破坏; G. 氧化破坏

归方程及线性范围(表2)。结果表明,阿齐沙坦及各杂质在规定浓度范围内,线性关系良好;杂质A、B、C的相对响应因子均在0.9~1.0,可以用面积归一化法计算其含量。(4)重复性:取同批号样品,按上述方法配制供试品溶液6份,分别进样10 μ l,记录色谱图,按面积归一化法计算含量的相对标准偏差。结果测得阿齐沙坦各杂质含量的RSD均<5.0%,杂质数

量及保留时间未变,重复性良好。(5)回收率:取阿齐沙坦对照品约20mg,精密称定,共3份,分别置50ml棕色量瓶中,精密量取各杂质对照品贮备液2.5、5、7.5ml,分别置上述棕色量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,分别作为加样回收率的低、中、高浓度,各平行配制3份;精密量取各杂质对照品贮备液5ml,分别置50ml棕色量瓶中,加稀释剂稀释至

刻度,摇匀。分别取样 10μl 注入色谱仪,记录色谱图,按外标法计算回收率及其 RSD 值。结果杂质 A、B、C 的平均回收率依次为 97.50%、96.82%、96.09%,RSD 依次为 5.10%、3.02%、2.99% (n = 9)。(6)检测限与定量限:取阿齐沙坦和各杂质对照品贮备液逐步稀释进样,记录色谱图。结果阿齐沙坦、杂质 A、B、C 的检测限分别为 0.02、0.02、0.04、

0.02μg/ml(S/N = 3),定量限分别为 0.05、0.08、0.12、0.08μg/ml(S/N = 10)。(7)溶液的稳定性:取阿齐沙坦和各杂质对照品测试液,于 0、2、4、8、12h 分别取样 10μl 注入色谱仪,记录色谱图。结果阿齐沙坦及杂质 A、B、C 的峰面积相对标准偏差分别为 0.47%、1.10%、1.13%、1.21%,说明样品及各杂质在 12h 内稳定。

表 2 标准曲线测定结果(n = 6)

检测项目	线性方程	r	线性范围 (mg/L)	相对响应因子
阿齐沙坦	Y = 29562X - 406.51	0.9997	0.124 ~ 8.260	-
杂质 A	Y = 32026X - 408.76	0.9999	0.122 ~ 8.114	0.94
杂质 B	Y = 27725X - 111.4	0.9998	0.121 ~ 8.064	1.06
杂质 C	Y = 29840X - 648.65	0.9993	0.122 ~ 8.156	1.03

2. 有关物质检查结果:按照建立的方法测定阿齐沙坦样品 3 批。结果杂质 C 均未检出,杂质 A、B 均 <0.1%,其他单杂均 <0.1%,总杂质均 <0.2% (表 4)。

表 4 有关物质测定结果 (%)

有关物质	批号		
	111201	111202	111203
杂质 A	0.065	0.064	0.059
杂质 C	未检出	未检出	未检出
杂质 B	0.023	0.035	0.030
其他最大单杂	0.027	0.015	0.019
总杂质	0.115	0.113	0.108

讨 论

本研究是笔者在研究阿齐沙坦 10 个已知杂质 HPLC 分离鉴定条件的基础上,对流动相组成及比例进一步优化和微调而得到的^[8]。首先,通过专属性试验经 DAD 检测器检测提取了阿齐沙坦及其所有已知杂质与降解杂质的光谱图,结果显示,阿齐沙坦及大部杂质的流动相溶解液及稀释剂溶解液在 250nm 或附近有最大吸收;样品在 250nm 处测得的杂质个数略多,峰形较好,故选择 250nm 作为检测波长。其次,流动相优化过程以确保 10 个已知杂质完全分离为前提,以杂质分离效果、峰形、主成分保留时间及柱压等作为参考指标,在确保原有分离效果基础上简化操作,并根据专属性试验及稳定性研究结果适度控制特定降解杂质,降低检测成本,杂质控制针对性增强。

本研究使用的方法能提高检测的选择性和准确性,可用于阿齐沙坦生产和贮藏过程中的有关物质监控。结合多批原料的检测结果及专属性的试验结果,

在原料生产和贮藏过程中应主要监控杂质 A、杂质 B 及杂质 C 的含量变化,以保证原料的质量。

参考文献

- 1 邹寿涛,秦健. 阿齐沙坦的临床应用进展[J]. 药学与临床研究, 2015, 23(6):573-575
- 2 FDA 批准阿齐沙坦治疗成人高血压[J]. 临床合理用药, 2011, 4(3C):29
- 3 Kajiya T, Ho C, Wang J, *et al.* Molecular and cellular effects of azilsartan;a new generation angiotensin II receptor blocker[J]. J Hypertens, 2011, 29(12):2476-2483
- 4 张亚安,傅志贤,张征林. 抗高血压药选择性 AT1 亚型血管紧张素 II 受体拮抗剂——阿齐沙坦酯[J]. 药学与临床研究, 2011,19(3):262-264
- 5 Sui LP, Li RD, Song B, *et al.* Characterization of two degradation products of Azilsartan formed during the micronization process and development of a method to control the degradation[J]. J Chin Pharm Sci, 2014, 23(5):302-305
- 6 吴强,陈金嫚,何广卫. LC-MS/MS 鉴定阿齐沙坦降解产物[J]. 广州化工, 2014, 42(19):105-107
- 7 隋立朋,李日东,宋波,等. 通过微粉化工艺获得的阿齐沙坦两个降解杂质的定性以及对此降解过程控制的方法[J]. 中国药学, 2014, 23(5):302-305
- 8 吴标,崔红晓,王娟. 一种阿齐沙坦有关物质的高效液相色谱分析方法[S]. 2013
- 9 Surbhi M,Ravi PS, Rajkamal P, *et al.* LC and LC-MS/TOF studies on stress degradation behaviour of candesartan cilexetil [J]. J Pharm Biome Anal, 2010, 52:345-354
- 10 Bhanu R, Brajesh AS, Ganesh M, *et al.* Investigation and structural elucidation of a process related impurity in candesartan cilexetil by LC/ESI-ITMS and NMR [J]. J Pharm Biome Anal, 2011, 56:256-263
- 11 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015,374-378

(收稿日期:2016-06-21)
(修回日期:2016-07-07)