

利拉萘酯乳膏有关物质方法建立

赵建江

(广西壮族自治区妇幼保健院药剂科, 广西 南宁 530003)

摘要: **目的** 建立一种快速、简便、准确的高效液相色谱法,用于测定利拉萘酯乳膏的有关物质。**方法** 色谱柱为 A-pollo C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长:225 nm,流速:1.0 ml·min⁻¹。**结果** 采用选定的流动相,以 225 nm 作为测定波长,可有效检测出样品中含有的中间体、降解产物等有关物质,各种降解产物破坏条件下所产生的杂峰,在此条件下均可有效检测和分离,方法专属性良好。**结论** 所建立的利拉萘酯乳膏有关物质的测定方法简单可靠、准确有效,可用于利拉萘酯乳膏的质量控制。

关键词: 利拉萘酯乳膏;有关物质;高效液相色谱法

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)06-0824-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.06.023

利拉萘酯,化学名为(6-甲氧基-2-吡啶基)甲基氨基硫代甲酸 O-(5,6,7,8-四氢)-2-萘酯,是由日本 Tosoh 公司和 Zenyaku Kogyo 公司共同研制开发的角鲨烯环氧化酶抑制剂,于 2000 年 8 月由 Torii 公司首次在日本上市。它是用于皮肤局部感染的新一代抗真菌药,具有抗菌活性强、疗效高、疗效长,而用药次数少、用量少、不良反应小等特点,从而改善了患者的顺应性^[1-2]。目前,国内对利拉萘酯乳膏有关物质分析报道较少,作者使用十八烷基硅烷键合硅胶(C18)为固定相,以甲醇-水(稀磷酸调 pH 4.5±0.05)为流动相,采用反相高效液相色谱法建立了利拉萘酯乳膏有关物质分析方法,利用该方法测定利拉萘酯乳膏样品,结果表明,该测定条件下利拉萘酯峰对称性良好,与中间体和降解杂质获得基线分离,本法适用于利拉萘酯乳膏剂有关物质分析。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(LC-20AT 泵;CBM-20A 控制器;SPD-M20A 检测器;SILC-20TL-20AT 自动进样器;CTO-10AS vp 柱温箱;LC solution 工作站);AB104 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);0.45 μm 有机滤膜(天津津腾实验设备有限公司);利拉萘酯原料药(批号:130912)、辅料(批号未提供)及利拉萘酯制剂(批号:20131103)由国内某制药公司提供;甲醇(色谱纯, Fisher);水(双蒸水);磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);纯化水(Milli-Q Plus 纯水器自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的筛选

2.1.1 色谱条件

日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪,色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以水(稀磷酸调 pH 4.5±0.05)-甲醇为流动相,梯度洗脱,洗脱梯度见表 1,检

测波长为 225 nm,进样量:20 μl。

表 1 梯度洗脱表

时间(min)	水相(%)	有机相(%)
0	40	60
5	40	60
10	15	85
20	15	85
25	40	60
30	40	60

2.1.2 检测波长的选择

有关物质系药品中除主成分以外的杂质,主要来源于原料合成中的前体、中间体、试剂、分解产物及副产物等^[3-4]。由利拉萘酯的合成工艺推断,合成过程中可能产生的主要杂质为:合成中未反应完全的中间体、前体。此外,经影响因素试验发现,本品可产生水解杂质。因此,本实验根据杂质分析的结果,对中间体 2-甲氧基-6-甲胺基吡啶、2-(5,6,7,8-四氢萘氧基)氯化硫代甲酸酯及水解杂质进行了研究。

取利拉萘酯原料、中间体及水解杂质适量,分别用分别用甲醇溶解配制成溶液。在 200~400 nm 范围内进行紫外扫描。波长扫描结果见表 2。考虑到原料、起始物料及降解杂质的紫外吸收在 225 nm 较接近且吸收相对较强;使用流动相及溶剂为甲醇,在低波段有干扰,故不选择 225 nm 以下波段;检测波长在 240 nm 时,水解杂质吸收较弱,故不选择,最后确定检测波长为 225 nm。

2.1.3 流动相的选择

根据利拉萘酯的化学性质,初步选择甲醇水流动相,以本品原料药作为样品。筛选过程中分别试用了甲醇-水作为流动相等度及梯度洗脱,结果显示,等度洗脱时,原料中的氧化降解杂质和辅料的色谱峰未完全分离;分别通过有机相、水相比例的调节,并试用稀磷酸调节水相 pH 值后进行分析仍

表 2 紫外扫描试验结果

物质	利拉 萘酯	2-甲氧基 -6-甲胺 基吡啶	2-(5,6,7,8- 四氢萘氧基)氯 化硫代甲酸酯	水解 杂质
最大吸收波长(nm)	207	240	207	206
称样量(mg)	5.77	5.54	6.04	5.22
稀释倍数	50	50	50	50
200	3.27	3.18	2.04	2.12
205	7.24	3.48	5.15	6.91
210	7.27	3.21	5.19	6.59
215	6.34	2.92	4.67	5.21
220	5.55	2.93	3.70	5.12
225	4.46	3.48	2.39	4.52
230	3.32	4.65	1.75	3.38
235	2.46	6.11	1.67	1.77
240	2.11	7.24	1.77	0.55

未达到理想分离效果,但分离度有很大改善;故以磷酸水溶液(稀磷酸调 pH 4.5±0.05)和甲醇作为流动相,

结果显示在表 1 梯度洗脱程序下,各色谱峰分离良好,主峰出峰时间适宜,峰形较好,因此作为检测条件。

2.2 方法学研究

2.2.1 专属性试验

2.2.1.1 空白试验 取利拉萘酯乳膏适量(约相当于利拉萘酯 20 mg),精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇 60 ml,置热水浴中加热,不断振摇使利拉萘酯溶解,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1 ml,置 100 ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;精密量取相应量空辅,置热水浴中加热,不断振摇使其溶解,放冷,用甲醇稀释至 100 ml,取续滤液作为空辅溶液。精密量取溶剂、空辅溶液及供试品溶液各 20 μl,分别注入液相色谱仪,如果供试品溶液中有杂峰,应扣除相应的空白辅料峰,记录色谱图见图 1。结果显示:空白辅料在此条件下不干扰利拉萘酯的测定。

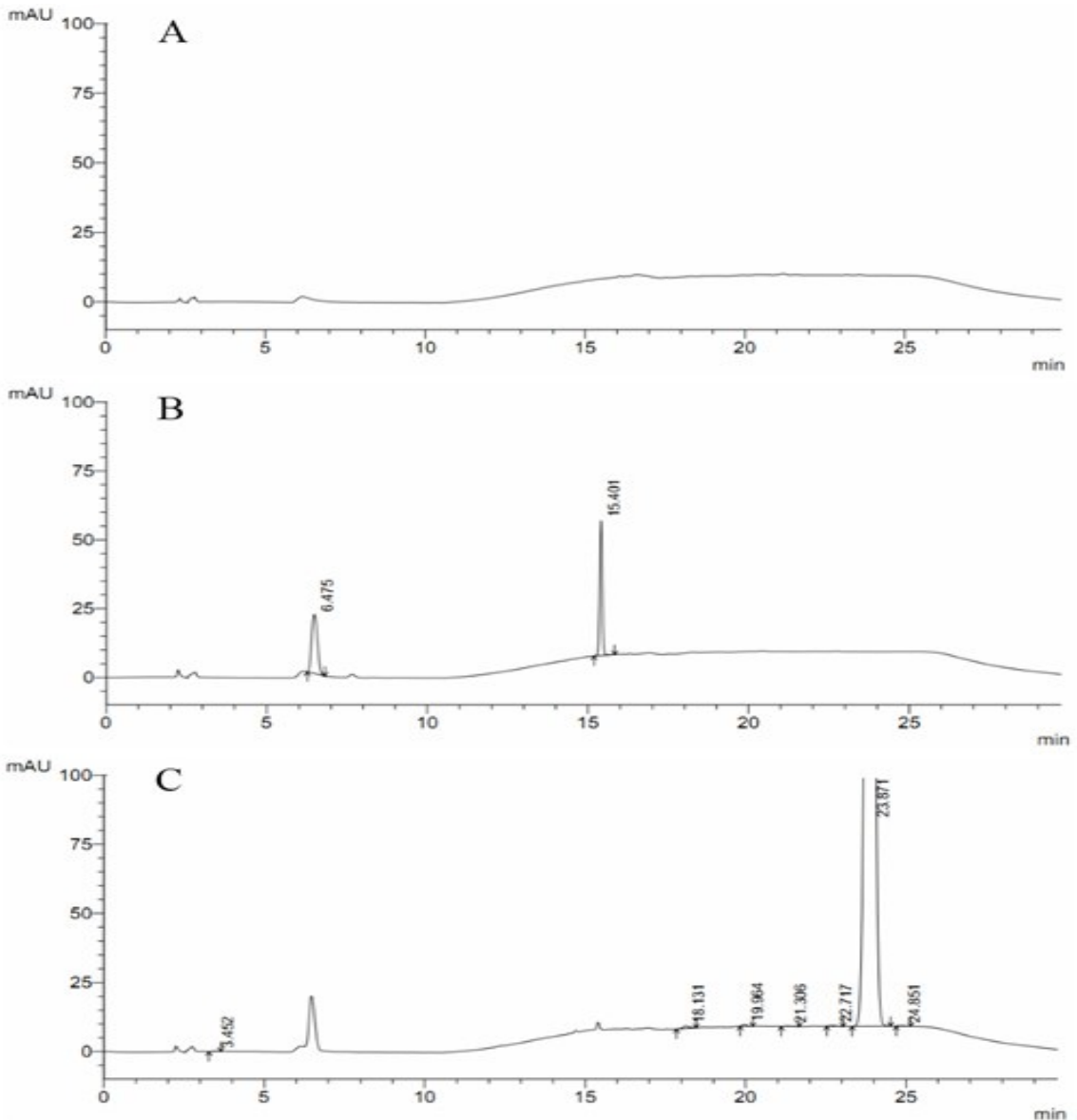


图 1 梯度条件下样品色谱图
A 为溶剂,B 为空辅,C 为供试品

2.2.1.2 强制降解试验 酸破坏试验:取本品适量(约相当于利拉萘酯 20 mg),精密称定,置 100 ml 量瓶中,加入 1 mol/L 盐酸溶液 1 ml,摇匀,80℃水浴 4 h,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至中性,加甲醇 60 ml,置水浴中加热,不断振摇,使利拉萘酯溶解,放冷,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液。碱破坏试验:取本品适量(约相当于利拉萘酯 20 mg),精密称定,置 100 ml 量瓶中,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml,摇匀,80℃水浴 4 h,用 1 mol/L 盐酸溶液调

pH 至中性,加甲醇 60 ml,置水浴中加热,不断振摇,使利拉萘酯溶解,放冷,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液。氧化破坏试验:取本品适量(约相当于利拉萘酯 20 mg),精密称定,置 100 ml 量瓶中,加入 30% 双氧水 1 ml,摇匀,避光放置 1 h,加甲醇 60 ml,置水浴中加热,不断振摇,使利拉萘酯溶解,放冷,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液。分别精密量取上述测试液各 20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图见图 2。

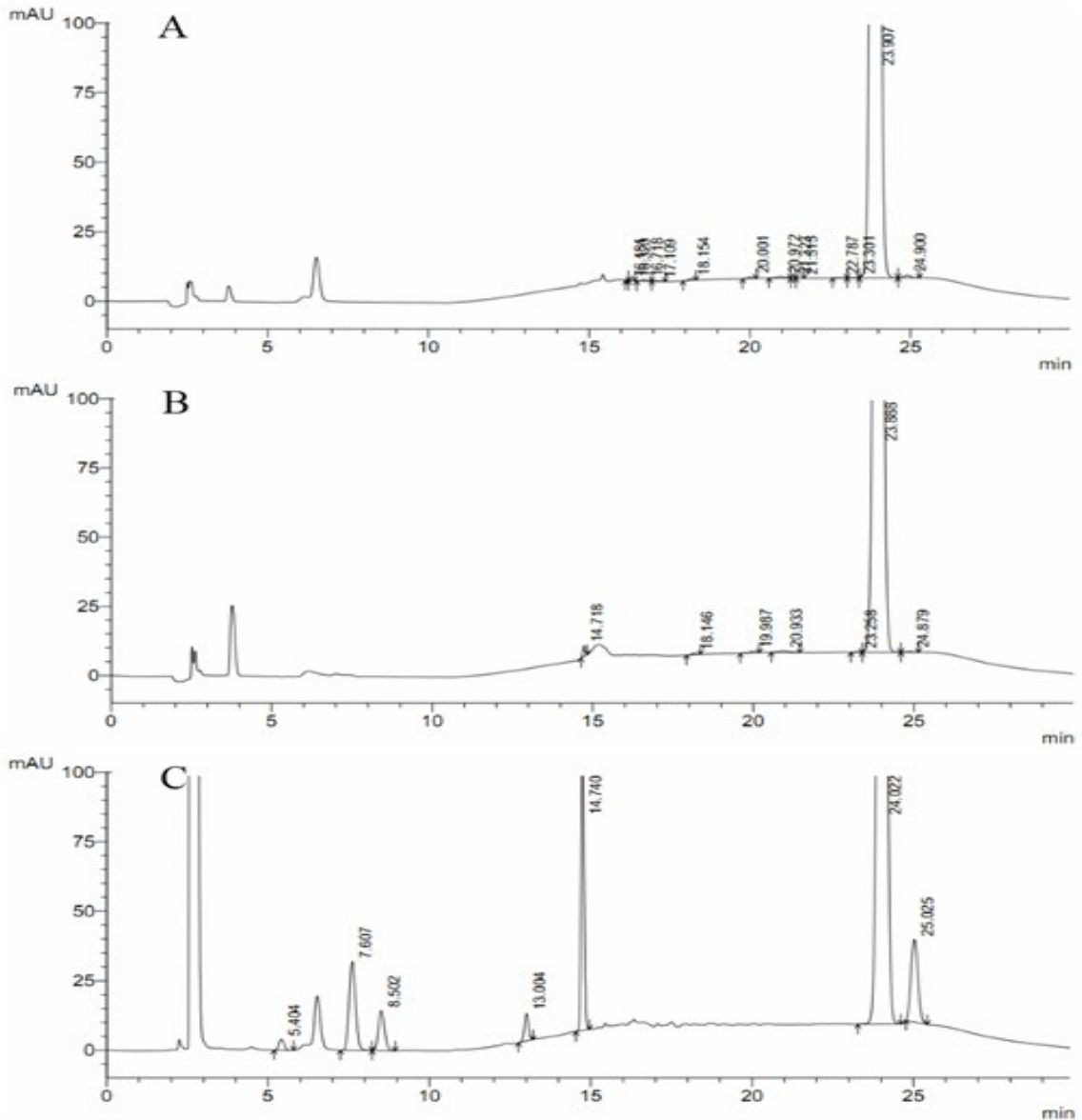


图 2 强制降解试验样品色谱图

A 为酸破坏,B 为碱破坏,C 为氧化破坏

由试验结果可知,在强氧化条件下,样品出现 5 个较明显的杂质峰,酸碱条件下样品均较为稳定,没有大的杂质峰出现。试验结果表明,各破坏试验产生的典型杂质峰在选定的条件下均可检出,并且与主成分峰能够良好分离,说明本方法专属性良好。

2.2.2 系统耐用性试验 取“2.2.1.1”中制剂有关物质供试品溶液,在表中各变动因素条件下,分别精密量取溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,观察主峰保留时间、分离度的数据,实验结果见表 3。耐用性试验结果表明,不同品牌色谱柱和 pH 对保留时间及分离度影响较

小,不同条件下主峰与其相邻峰分离度均符合要求,表明此方法的耐用性良好。

表 3 系统耐用性试验结果

变动因素	利拉萘酯		辅料峰 1		中间体 1		水解杂质		辅料峰 2		中间体 2		
	保留时间 (min)	分离度	保留时间 (min)	分离度	保留时间 (min)	分离度	保留时间 (min)	分离度	保留时间 (min)	分离度	保留时间 (min)	分离度	
原条件色谱图	23.961	3.955	6.484	—	7.591	3.225	14.732	21.236	15.431	3.632	22.534	27.143	
色谱柱品牌	Kromasil	23.523	4.675	6.291	—	7.275	2.460	14.318	19.827	15.263	3.577	22.218	26.660
	Diamonsil	23.277	5.054	5.704	—	6.541	2.434	14.319	9.142	15.955	6.298	21.295	15.013
pH 耐用性	pH4.3	23.878	3.959	6.468	—	7.019	1.724	14.697	31.837	15.404	4.066	22.46	29.184
	pH4.7	23.935	3.949	6.504	—	7.737	3.443	14.724	21.202	15.421	3.599	22.512	26.946

注:中间体 1 为 2-甲氧基-6-甲胺基吡啶,中间体 2 为 2-(5,6,7,8-四氢萘氧基)氯化硫代甲酸酯

2.2.3 方法检测限和定量限 取利拉萘酯对照品溶液,逐级稀释,进样 20 μ l,直至主峰峰高约为基线噪音的 10 倍,得利拉萘酯定量限为 12 ng;逐级稀释直至主峰峰高约为基线噪音的 3 倍,得利拉萘酯检测限为 5 ng。

3 有关物质检查方法

取本品适量(约相当于利拉萘酯 20 mg),精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇 60 ml,置热水浴中加热,不断振摇使利拉萘酯溶解,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1 ml,置 100 ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;精密量取相应量空辅,置热水浴中加热,不断振摇使其溶解,放冷,用甲醇稀释至 100 ml,取续滤液作为空辅溶液。取对照溶液 20 μ l,注入液相色谱仪,按“2.1.1”色谱条件进行测定,调节检测灵敏度,使主成分峰的峰高约为满量程的 20%;再精密量取供试品溶液、对照溶液及空辅溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,如果供试品溶液中有杂峰,应扣除相应的空白辅料峰。单个杂质峰面积应不得大于对照溶液主峰峰面积 0.5 倍(0.5%),各杂质峰面积的和应不得大于对照溶液主峰的峰面积(1.0%)。

4 供试品的测定

取批号为 20131103 的利拉萘酯乳膏待测样品,按上述建立方法进行测定,制剂样品中有关物质检查结果为:最大杂质为 0.093%,总杂质为 0.258%。结果可见,待测制剂单一杂质均在 0.5% 以下,总杂质不超过 1%。

5 讨论

试验中发现,水相 pH 对 2-甲氧基-6-甲胺基

吡啶的保留时间,及其与后面色谱峰的分离度有较大影响。因此,对水相的 pH 进行控制,发现当水相 pH 值为 4.5 时分离效果较理想,故确定水相控制 pH 值为(4.5 \pm 0.05)。此外,比较了使用国产甲醇和进口甲醇在相同色谱条件下的色谱图,发现使用进口甲醇时基线波动较小,故试验最终采用进口甲醇。

利拉萘酯乳膏经过酸、碱、氧化破坏后,有降解产物产生,且与利拉萘酯主峰完全分离,破坏前后色谱峰总面积守恒,说明本色谱条件可检出稳定性试验中可能出现的降解产物。在强氧化破坏条件下,样品出现 5 个明显的杂质峰,说明该样品容易氧化降解,在该产品研究、生产过程中应引起重视。

本文对有关物质测定的专属性、系统耐用性、检测限和定量限等相关内容进行了研究。结果显示,建立检测方法可有效检出利拉萘酯乳膏样品中的中间体、降解产物等杂质,而且方法专属性良好,适用性强,测定结果准确、可靠,该法可用于利拉萘酯乳膏有关物质检查及产品质量控制。

参考文献:

- [1] 钟倩.角鲨烯环氧化酶抑制剂抗真菌药利拉萘酯[J].国外医药:合成药、生化药、制剂分册,2001,22(3):190.
- [2] 罗荣,郭晟,刘晓峰.抗真菌新药利拉萘酯[J].中国新药杂志,2004,13(12):1411-1413.
- [3] 张晓燕,曲昌海,高永良.非布索坦片有关物质测定方法的建立[J].中国新药杂志,2011,20(22):2257-2261.
- [4] 谢沐风,罗霞萍,陈亚美.如何建立 HPLC 法测定有关物质的方法[J].中国药品标准,2011,3(6):6-8.

收稿日期:2015-10-30;修回日期:2015-11-03