

降压物质检查剂量的限值确定为临床静脉给药公斤体重剂量的 1/4 倍, 即 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (供试品和对照品注射体积同为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 较为合理。

2.7 降压物质检查

表 2 注射用克林霉素磷酸酯降压物质检查结果

Tab 2 Determination results of test for depressor substances in Clindamycin Phosphate Injection

厂家	批号	规格/g·瓶 ⁻¹	ds/mmHg	dt/mmHg	dt/mmHg	ds/mmHg	结论
安徽 A	100801	0.3	31.3	5.5	5.1	29.5	符合规定
	100802	0.6	29.1	4.0	3.2	28.8	符合规定
	100805	0.9	28.5	4.8	4.9	29.1	符合规定
安徽 B	1105068	0.3	28.9	1.9	1.7	31.9	符合规定
湖北 C	1104112	0.3	31.5	2.3	2.5	32.7	符合规定

3 结论

注射用克林霉素磷酸酯拟增加降压物质检查项, 拟定方法为: 取本品, 依法检查(中国药典 2010 年版附录 XI G), 剂量按猫体重每 1 kg 注射 5 mg, 应符合规定。与原料药的降压物质制定的限值一致。按拟定方法检验, 所试样品均符合规定, 方法可行。

4 讨论

从降压物质检查结果可见, 注射用克林霉素磷酸酯在静脉注射时有较明显的降压作用。本研究建立了注射用克林霉素磷酸酯降压物质检查法, 确定的限值为 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 供试品和对照品注射体积同为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。该检查法与标准中原有的热原检查法, 以及笔者已经考察的异常毒性检查法组成较系统的安全评价体系, 可以减少或避免注射用克林霉素磷酸酯由于质量问题在临床用药时引起热原反应、急性毒性反应和急性降压等急

按确定的限值, 依法进行了厂家提供的 3 个规格批次样品的验证实验, 猫血压下降反应值均小于对照品组织胺所致的反应值一半, 均符合规定。结果见表 2。

性不良反应的发生, 从而确保临床用药的安全性。

REFERENCES

- [1] LIANG J M, WANG Z J, RUAN H, et al. HPLC gradient elution determination of related substances of clindamycin phosphate and its injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(8): 726-730.
- [2] FAN G Q, ZUO Y, DU J. Analysis and countermeasures of adverse drug reaction induced by clindamycin phosphate for injection in our hospital [J]. J China Pharm(中国药房), 2012, 23(16): 1517-1518.
- [3] CHEN J M, WANG S M, WANG Y D, et al. Clinical application and adverse reactions of clindamycin and its phosphate [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2011, 27(1): 55-58.
- [4] DENG L J, YAN A Z, FAN H H. Test for depressor substance and establishment of its limit to depressor substances in thymosin injections [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(8): 1493-1498.
- [5] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 版·二部) [S]. 2010: Appendix 103, 212.

收稿日期: 2012-05-29

HPLC 测定三苯甲基氯沙坦的有关物质

李美君, 汪秀林, 姚仙珍(浙江天宇药业股份有限公司, 浙江 台州 318020)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定三苯甲基氯沙坦有关物质。方法 采用 Lichrospher RP-select B 60A(250 mm×4.0 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相: 采用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钠溶液(20%的磷酸调节 pH 2.5)和乙腈为流动相进行梯度洗脱; 流速: $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长: 230 nm。结果 样品中的杂质均能很好检出, 各杂质与主峰之间的分离度良好。结论 该方法简单快速, 专属性强, 结果准确, 可用作三苯甲基氯沙坦有关物质检查。

作者简介: 李美君, 女, 药师 Tel: (0576)84172829 E-mail: limeijun@tianyupharm.com

关键词: 三苯甲基氯沙坦; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0308-05

Determination of Related Substances in Trityl Losartan by HPLC

LI Meijun, WANG Xiulin, YAO Xianzhen(Zhejiang Tianyu Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of related substances in trityl losartan. **METHODS** Lichrospher RP-select B 60A column (250 mm×4.0 mm, 5 μm) was used, the gradient mobile phase consisting of 0.01 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate(pH=2.5)-acetonitrile with a flow rate of 1.5 mL·min⁻¹ was used. The column temperature was kept at 35 °C and the detection wavelength was set at 230 nm. **RESULTS** Trityl losartan and related substances could be well isolated. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and suitable for determining the related substances in trityl losartan.

KEY WORDS: trityl losartan; related substances; HPLC

氯沙坦钾(losartan potassium)为选择性血管紧张素 II 受体 1(AT1)受体拮抗药, 可用于治疗轻、中、重度高血压, 具有药效强、耐受性好、不良反应少及作用持续时间长等优点, 同时还具有对肾脏的保护作用^[1-2]。其化学名为 2-丁基-4-氯-1-[[2'-(1H-四唑-5-基)[1, 1'-联苯基]-4-基]甲基]-1H-咪唑-5-甲醇单钾盐。三苯甲基氯沙坦(trityl losartan)是新一代抗高血压药氯沙坦钾的高级医药中间体, 其化学名为[2-丁基-4-氯-1-[(2'-(1-三苯甲基-1H-四氮唑-5-基)联苯-4-基)甲基]-1H-咪唑-5-基]甲醇, 分子结构见图 1。在众多已经报道的氯沙坦钾的合成工艺研究资料中, 由三苯甲基氯沙坦脱三苯甲基合成目标化合物氯沙坦是一种比较常见的工艺^[3-7], 为了保证氯沙坦钾的质量与收率, 三苯基甲基氯沙坦作为氯沙坦钾的关键中间体, 对其有关物质进行有效地控制极为重要。本实验采用 HPLC 对三苯基甲基氯沙坦进行了纯度和有关物质的测定, 使主成分和杂质能完全分离, 方法专属性强, 结果准确, 操作方便。

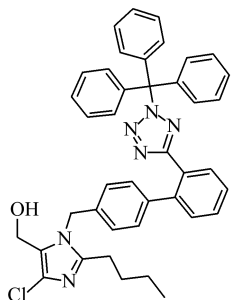


图 1 三苯甲基氯沙坦结构式

Fig 1 Structure of trityl losartan

1 仪器与试剂

带梯度泵的 Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); XS105DU 分析天平(METTLER TOLEDO); 紫外检测器; Agilent ChemStation 色谱工作站。

乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 天地试剂公司); 超纯水(自制); 磷酸(色谱纯, 美国 TEDIA 天地试剂公司); 二水合磷酸二氢钠(分析纯, 上海凌峰化学试剂厂); 三苯甲基氯沙坦对照品(批号: IBL080801, 含量为 99.7%)、样品(批号: 20090901, 20090902, 20090903)、各有关物质对照品(批号见表 2, 纯度均>98.0%)均由浙江天宇药业股份有限公司自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Lichrospher RP-select B 60A 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm)。流动相 A: 0.01 mol·L⁻¹的磷酸二氢钠溶液(20%的磷酸调节 pH=2.5); 流动相 B: 乙腈; 流速: 1.5 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样温度: 5 °C; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 230 nm; 运行时间: 40 min; 平衡时间: 10 min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient table

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	60	40
30	60→10	40→90
40	10	90
45	10→60	90→40
50	60	40

2.2 方法

2.2.1 溶液的制备

2.2.1.1 对照品溶液 精密称定三苯甲基氯沙坦对照品 10 mg, 置 10 mL 的量瓶中, 先加入 8 mL 的乙腈放入超声波清洗器中超声 5 min, 取出, 待其冷却至室温后用乙腈稀释至刻度, 摇匀。溶液宜现配现用。

2.2.1.2 供试品溶液 精密称定供试品 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 先加入 20 mL 的乙腈放入超声波清洗器中超声 5 min, 取出, 待其冷却至室温后用乙腈稀释至刻度, 摇匀。溶液宜现配现用。

2.2.2 检测 待仪器稳定后, 注入空白溶液和对照品溶液并记录色谱图。三苯甲基氯沙坦的拖尾

因子应 ≤ 1.5 , 符合规定后注入供试品溶液并记录色谱图。采用面积归一法计算各有关物质的结果。

2.3 实验结果

2.3.1 专属性试验

2.3.1.1 各杂质的分离 对三苯甲基氯沙坦合成途径和生产工艺进行分析, 三苯甲基氯沙坦的杂质见表 2。取三苯甲基氯沙坦对照品和各杂质对照品适量, 用乙腈配成适当浓度的溶液, 将此溶液按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 见图 2。结果显示, 三苯甲基氯沙坦与杂质的分离度 >2.0 , 能有效分离, 杂质与杂质也能达到基线分离, 专属性强, 可用于三苯甲基氯沙坦及其有关物质的检测。

表 2 三苯甲基氯沙坦杂质列表

Tab 2 Impurities list of trityl losartan

组分名	代号	对照品批号
三苯甲基氯沙坦	L-2	IBL080801
氯沙坦	L-3'	IRL080501
三苯基甲醇	TPC	A0242241
2-丁基-4-氯-3-[[2'-[1-(三苯甲基)-1-氢-四唑-5-基][1,1'-联苯]-4-基]甲基]-1-氢-咪唑-5-甲醇	ISO-L-2	ICL090601
N-(三苯基甲基)-5-(4'-溴甲基联苯-2-基)四氮唑	MBB-Br	ICU080101
N-(三苯基甲基)-5-(4'-甲基联苯-2-基)四氮唑	MBB	IEU090601
2-丁基-4-氯-1-[[2'-[1-(三苯甲基)-1-氢-四唑-5-基][1,1'-联苯]-4-基]甲基]-1-氢-咪唑-5-甲醛	Intermediate	IEL090601
双三苯基甲基氯沙坦	Di-L-2	IDL090601

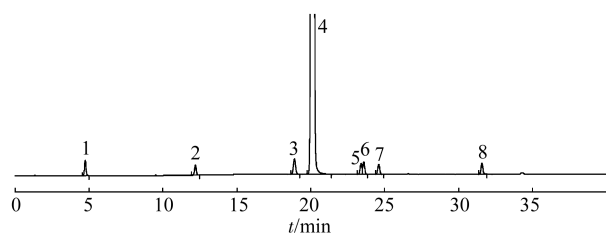


图 2 三苯甲基氯沙坦和各杂质的分离色谱图

1-L-3'; 2-TPC; 3-ISO-L-2; 4-L-2(三苯甲基氯沙坦); 5-MBB-Br; 6-MBB; 7-intermediate; 8-Di-L-2

Fig 2 Chromatogram of trityl losartan and impurities

1-L-3'; 2-TPC; 3-ISO-L-2; 4-L-2(trityl losartan); 5-MBB-Br; 6-MBB; 7-intermediate; 8-Di-L-2

2.3.1.2 破坏性试验 精密称取三苯甲基氯沙坦样品 25 mg 于 25 mL 量瓶中, 共 4 份。其中 3 份分别加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 2 mL, $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL 和 30% 双氧水 2 mL, 放置 2 h 后, 将 pH 调至 7。将这 4 份样品用乙腈完全溶解并稀释至刻度, 摇匀。另取 2 份适量三苯甲基氯沙坦样品, 1 份在 80°C 条件下放置 2 h, 取出、放冷; 另

一份在 $(4\ 500 \pm 500)\text{Lx}$ 照度下放置 24 h, 取出; 将高温和光照降解样品用乙腈配制成浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。待仪器稳定后, 将上述各溶液按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 见图 3)。实验结果表明, 在强酸、强碱、氧化、高温及强光条件下, 主峰与相邻有关物质峰的分度均 >1.5 , 说明三苯甲基氯沙坦降解后的产物能有效分离, 表明拟订的色谱条件可用于三苯甲基氯沙坦的有关物质检查。

2.3.2 检测限和定量限 取三苯甲基氯沙坦对照品和各杂质对照品适量, 配制成混合溶液, 将此溶液按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪中, 记录色谱图。查看混合溶液色谱图的信噪比, 然后根据信噪比, 将混合溶液逐步稀释到各组分的信噪比分别为 3:1 的各组份浓度作为最低检测浓度, 将混合溶液逐步稀释到各组分的信噪比分别为 10:1 时的各组名浓度作为最低定量检测浓度。各组分的检测限和定量限见表 3。

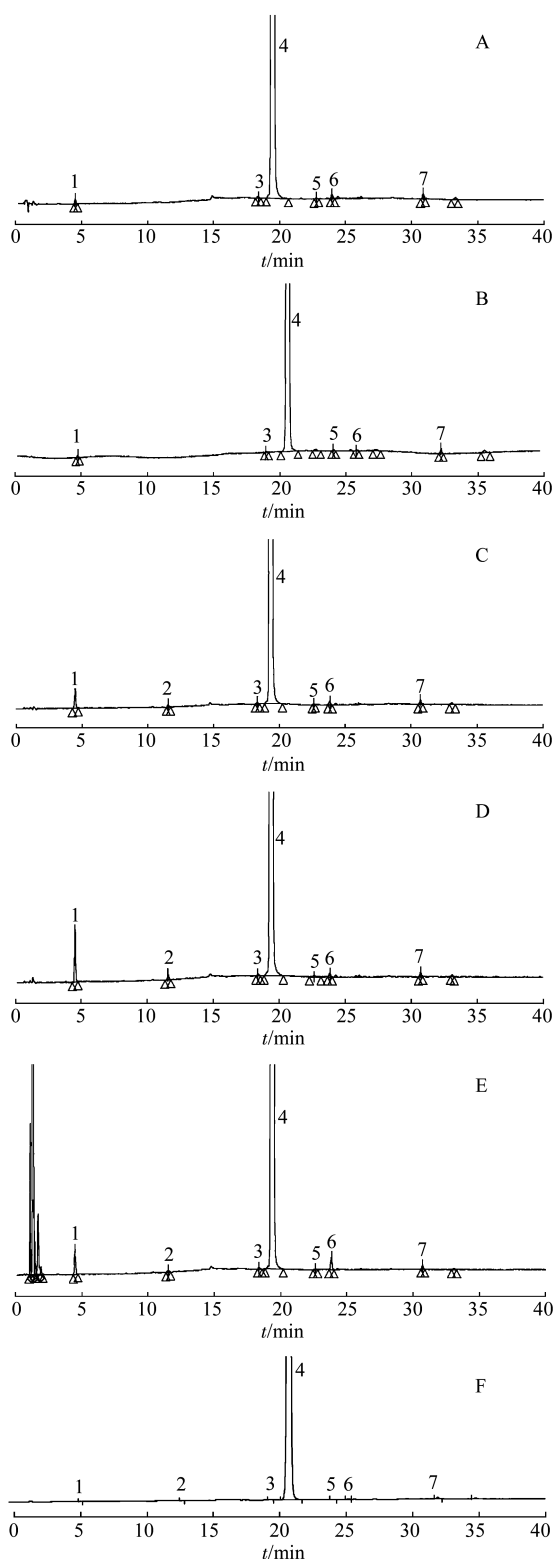


图3 破坏性试验色谱图

A-正常样品; B-高温破坏; C-强酸破坏; D-强碱破坏; E-氧化破坏; F-强光破坏; 1-L-3'; 2-TPC; 3-ISO-L-2; 4-L-2(三苯甲基氯沙坦); 5-MBB-Br; 6-intermediate; 7-Di-L-2

Fig 3 Chromatogram of stress test

A-normal; B-treated by high temperature; C-treated by strong acid; D-treated strong base; E-treated by oxidation; F-treated by photolysis; 1-L-3'; 2-TPC; 3-ISO-L-2; 4-L-2(trityl losartan); 5-MBB-Br; 6-intermediate; 7-Di-L-2

表3 各组分的检测和定量限

Tab 3 LOD and LOQ of trityl losartan and impurities

名称	最低检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	最低定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
L-2	0.023 1	0.076 1
L-3'	0.015 1	0.051 4
TPC	0.024 2	0.075 5
ISO-L-2	0.025 2	0.085 9
MBB-Br	0.021 2	0.071 2
MBB	0.018 9	0.064 0
Intermediate	0.021 1	0.071 3
Di-L-2	0.021 3	0.073 0

2.3.3 线性关系考察 按表3中所列的最低定量限配制LOQ溶液,按表4配制5个浓度的混合溶液。将这6个浓度的溶液按“2.1”项下色谱条件依次注入液相色谱仪中,记录色谱图。以浓度为横坐标(X),以对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。三苯甲基氯沙坦和各杂质的线性方程见表5。在6个浓度范围内,三苯甲基氯沙坦和各杂质的浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 按表3中所列的最低定量限浓度配制LOQ溶液,按表4中所列的100%溶液和150%溶液配制混合溶液,每个浓度配制3份,共9份。将这9份溶液按“2.1”项下色谱条件依次注入液相色谱仪中,记录色谱图。各组分9份溶液的响应因子RSD如表6所示。

2.3.5 溶液稳定性试验 取三苯甲基氯沙坦样品适量,用乙腈溶解配制成 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液,将该样品溶液在自然条件下放置,分别于0,1,2,4,8h取样测定,比较各次测定的各组分峰面积的相对标准偏差。结果显示,三苯甲基氯沙坦在自然条件下放置8h内,杂质个数不变,主峰RSD<2.0%,有关物质峰的RSD均<10.0%,稳定性很好。

2.3.6 样品的测定 取本品3批样品进行检测,结果见表7。

3 讨论

3.1 测定波长的选择

对三苯甲基氯沙坦样品进行二极管阵列检测的波长扫描,结果显示在230nm条件下,样品和杂质具有最大紫外吸收,且离溶剂的截止波长较远。

3.2 色谱柱的选择

三苯甲基氯沙坦的分子量不超过500,因而首选反相色谱柱,为了达到更好的分离效果,采用内径为4.6mm,柱长是25cm的多孔的高纯球形硅胶填料。

表 4 线性关系试验 7 份溶液浓度列表

Tab 4 List of concentration of solutions of linearity test

组分名称	L-2	L-3'	TPC	ISO-L-2	MBB-Br	MBB	Intermediate	Di-L-2
40%溶液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	400	1.2	1.2	2.0	1.2	1.2	1.2	1.2
70%溶液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	700	1.4	1.4	3.5	1.4	1.4	1.4	1.4
100%溶液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 000	3.0	3.0	5.0	3.0	3.0	3.0	3.0
130%溶液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 300	3.9	3.9	6.5	3.9	3.9	3.9	3.9
150%溶液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 500	4.5	4.5	7.5	4.5	4.5	4.5	4.5

表 5 各组分的线性方程列表

Tab 5 Linearity equation of trityl losartan and impurities

名称	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	名称	线性方程	相关系数(<i>r</i>)
L-2	$Y=20.090\ 23X+171.819\ 45$	0.999 8	MBB-Br	$Y=19.171\ 18X+0.279\ 139$	1.000 0
L-3'	$Y=22.127\ 11X+0.080\ 440$	1.000 0	MBB	$Y=22.573\ 23+0.203\ 360$	1.000 0
TPC	$Y=18.046\ 01X-0.079\ 239\ 8$	1.000 0	Intermediate	$Y=20.041\ 68+0.176\ 323$	1.000 0
ISO-L-2	$Y=19.945\ 84X+0.124\ 821$	1.000 0	Di-L-2	$Y=20.089\ 36X+0.176\ 749$	1.000 0

表 6 精密度试验结果

Tab 6 Precision test result

组分名称	L-2	L-3'	TPC	ISO-L-2	MBB-Br	MBB	Intermediate	Di-L-2
响应因子 RSD/%	1.35	2.10	1.70	1.73	4.25	6.07	1.42	1.22

表 7 3 批样品检测结果列表($n=2$)

Tab 7 Related substances test result of 3 batches of trityl losartan($n=2$)

批号	L-2/%	L-3'/%	TPC/%	ISO-L-2/%	MBB-Br/%	MBB	Intermediate/%	Di-L-2/%	其他单一杂质/%	总杂/%
20090901	99.8	0.03	0.01	0.02	0.01	未检出	0.04	0.04	0.02	0.20
20090902	99.8	0.03	0.01	0.02	0.01	未检出	0.04	0.04	0.02	0.20
20090903	99.8	0.03	0.01	0.02	0.01	未检出	0.04	0.04	0.02	0.20

3.3 流动相和溶剂的选择

考虑到三苯甲基氯沙坦可能存在的杂质较多,因而采用梯度洗脱,另外根据三苯甲基氯沙坦的 P_{ka} 值选择 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钠溶液(20%的磷酸调节 $\text{pH}=2.5$)作为流动相 A,同时选择低粘度的乙腈作为流动相 B。

3.4 流速的选择

因柱效是柱中流动相线性流速的函数,使用不同的流速可得到不同的柱效。为了达到最佳柱效,选择流速为 $1.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

3.5 柱温的选择

根据样品的性质和色谱柱的使用说明,为了达到更好的柱效和确保样品的保留时间具有更好的重复性,选择 $35\ ^\circ\text{C}$ 作为色谱柱的柱温。

本实验建立了 HPLC 测定三苯甲基氯沙坦的有关物质,通过对专属性,检测限度,定量限度,线性,精密度试验和样品在溶液中的稳定性考察,结果表明,在此实验条件下,该分析方法能够准确

可靠地检测三苯甲基氯沙坦的有关物质的含量。

REFERENCES

- [1] LI G C, HUANG X W. Study progress of losartan application in China [J]. China Pharm(中国药师), 2005, 8(11): 952- 954.
- [2] PAN Y B, BAO L F. Effect of losartan on blood pressure variability and brachial-ankle pulse wave velocity in essential hypertensive patients complicated with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 479-481.
- [3] XU J Y, ZHAO S B, WU X M, et al. Synthesis of a new type hypotensive drug losartan [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 1998, 8(4): 271- 276.
- [4] NADIMPALLY S R, KOILKONDA P, SUTHRAPU S, et al. Process for preparation of losartan: US, 2006/0020005 [P]. 2006-01-26.
- [5] ARAVA V R, SIRIPALLI U B R, CHINNAPILLAI R, et al. Alternative process for the preparation of losartan: US, 792356 [P]. 2011-04-12.
- [6] BAKULESH M K, INDRAVADAN A M, MADHUSUDANA R G, et al. Process for the preparation of losartan potassium form I: US 0249839 [P]. 2007-10-25.
- [7] ASHOK K, RAJESHKUMAR S, NALINAKSHYA P, et al. Losartan potassium synthesis: US, 6916935 [P]. 2005-07-12.

收稿日期: 2012-06-15