

高效液相色谱法同时测定 长春西汀3种中间体杂质残留

李锐*

(河南中帅医药科技股份有限公司, 河南 郑州 450001)

摘要:建立了高效液相色谱(HPLC)同时测定长春西汀3种中间体杂质残留的分析方法。采用Agilent 5 HC-C18色谱柱,以醋酸铵溶液-乙腈作为流动相,检测波长280 nm,流速1.0 mL/min,柱温35℃,进样量15 μL。结果表明,长春西汀可与阿朴长春胺酸、长春胺酸和长春胺达到完全分离;3种中间体杂质均有良好线性关系($R \geq 0.9999$),平均回收率均达99.5%以上。本法灵敏、准确、专属性强,可用于长春西汀3种中间体杂质残留的同时测定。

关键词:高效液相色谱法;长春西汀;中间体杂质;阿朴长春胺酸;长春胺酸;长春胺

中图分类号:O656.3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)03-0225-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.03.049

Simultaneous determination of three intermediate impurities residues in vinpocetine by HPLC

LI Rui*

(Zhongshuai Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of three intermediate impurities residues in vinpocetine is established. The chromatographic separation is performed on an Agilent 5 HC-C18 column (5 μm, 4.6 mm×250 mm). The mobile phase consists of ammonium acetate solution-acetonitrile (57:43), the flow rate is 1.0 mL/min, the detection wavelength is 280 nm, the column temperature is maintained at 35℃, and the injection volume is 15 μL. It is shown that vinpocetine and the intermediate impurities such as apovincamine acid, vincamine acid and vincamine are separated completely. The calibration curves of three intermediate impurities show good linearity, with average recovery rates all above 99.5%. This method exhibits accurate, sensitive and specific, and can be applied in simultaneous determination of three intermediate impurities residues in vinpocetine.

Key words: high performance liquid chromatography; vinpocetine; intermediate impurities; apovincamine acid; vincamine acid; vincamine

长春西汀(Vinpocetine)化学名为乙基(13aS, 13bS)-13a-乙基-2,3,5,6-13a, 13b 六氢-1H-吡啶[3,2,1-de]吡啶[3,2,1-ij][1,5]-二氮杂萘-12-羧酸,最早由匈牙利吉瑞(Gedeon Richter)药物公司研发并于1978年上市,后授权世界上多家制药公司生产,在欧美许多国家上市,国内已有多家进口和国产原料及制剂获批^[1-2]。该物质是一种吡啶类生物碱,是生物碱长春胺的合成衍生物,比长春胺有更高活性和更小毒性,对细胞增殖及心脑血管和神经系统功能具有药理活性,普遍应用于脑血管病、糖尿病并发症、精神、神经、五官等系统疾病的治疗。此外,长春西汀在多种类型细胞中可以发挥独特的抗炎作用^[3-6]。

中间体杂质是药物合成和制备过程中一类比较

常见的杂质,产生主要途径为原料合成过程所用物料或中间体无法完全转化成目标产物,而后续的分离和纯化过程又无法完全去除,最终导致这些杂质引入到原料成品或制剂中,这一类杂质的研究和控制在药学研究中备受关注。长春西汀合成过程中使用或经过了起始物料或中间体长春胺、长春胺酸、阿朴长春胺酸^[7-9],结构见表1,现有药典^[10-12]虽有长春西汀有关物质的高效液相检测方法,但同时作为本文中提到的3种中间体杂质残留检测方法却无法满足有效分离的要求,现有的药典检测方法也未将长春胺、长春胺酸、阿朴长春胺酸作为已知杂质进行控制并给出明确的检测方法和残留限度,而中间体杂质残留检测和控制是近年来药学研究和评审关注的重点。已有文献报道^[13-20]采用高效液相(HPLC)、

收稿日期:2019-06-05;修回日期:2019-12-26

基金项目:河南省口服微丸缓控释制剂工程技术研究中心(142102313106)

作者简介:李锐(1981-),男,硕士,工程师,从事药物化学与药物分析研究,通讯联系人,402499145@qq.com。

气相(GC)、液质联用(HPLC-MS/MS)技术对长春西汀原料及制剂已知杂质、异构体杂质、溶剂残留、基因毒性杂质进行检测,未见利用高效液相色谱同时对长春西汀合成工艺中涉及的3种中间体杂质长春胺、长春胺酸、阿朴长春胺酸进行定量检测和监控的报道。

本文中在长春西汀药典有关物质检测方法的基础上建立了高效液相色谱同时定量检测和控制长春西汀3种中间体杂质残留的方法,进行了详细的方法学研究,并将其应用于企业自制和进口长春西汀原料及市售制剂检测,该研究弥补了现有药典方法无法有效对中间体杂质残留进行定量检测的不足,可用于长春西汀原料及成品制剂3种中间体杂质残留的同时控制。

1 材料与方法

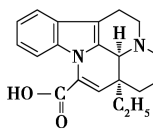
1.1 材料

阿朴长春胺酸对照品(vincamine acid, Lot #: 1166-002A3, 纯度 99.4%)、长春胺酸对照品(apovincamine acid, Lot #: 2688-029A2, 纯度 92.0%)购自 TLC PharmaChem., Inc., 长春胺对照品(vincamine)购自 LGC 英国政府化学家实验室(Lot #: 7700, 纯度 97.8%), 长春西汀对照品购自中国食品药品检定研究院(Lot #: 100947-201203, 纯度 99.4%), 长春西汀注射液进口样品来自 Gedeon Richter Plc(批号 A69012A), 长春西汀自制原料样品(vinpocetine)3批(批号 14042306、14042506、14042806), 长春西汀进口原料样品来自西班牙 COVEX, S.A(批号 CV/CP160315), 各对照品化学名及结构见表 1。

表 1 长春西汀及其 3 种中间体杂质的化学名及结构

对照品	化学名	结构
长春西汀	乙基(13aS, 13bS)-13a-乙基-2,3,5,6,13a,13b-六氢-1H-吡啶[3,2-de]吡啶[3,3,1-ij][1,5]二氮杂萘-12-羧酸酯	
长春胺	(4 ¹ S, 12S, 13aS)-甲基-13a-乙基-12-六氢-2,3,4,1,5,6,12,13,13a-八氢-1H-吡啶[3,2,1-de]吡啶[3,2,1-ij][1,5]二氮杂萘-12-羧酸酯	
长春胺酸	(4 ¹ S, 12S, 13aS)-13a-乙基-12-羧基-2,3,4,1,5,6,12,13,13a-八氢-1H-吡啶[3,2,1-de]吡啶[3,2,1-ij][1,5]二氮杂萘-12-羧酸	

阿朴长春胺酸 (4¹S, 13aS)-13a-乙基-2,3,4,1,5,6,13a,13b-六氢-1H-吡啶[3,2,1-de]吡啶[3,2,1-ij][1,5]二氮杂萘-12-羧酸



1.2 仪器与试剂

U3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); MS105D 梅特勒-托利多分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司)。乙腈购自德国默克公司(色谱纯); 醋酸铵和冰醋酸为分析纯, 水为超纯水。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

采用 Agilent 5 HC-C18(5 μm, 4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 以醋酸铵溶液(15.4 g/L, 加冰醋酸调节 pH 至 5.0)-乙腈(体积比 57:43)作为流动相进行等度洗脱, 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35℃, 进样量 15 μL。

1.3.2 溶液的配制

对照品溶液: 分别取阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺、长春西汀对照品适量, 精密称定, 置于不同容量瓶中, 加流动相溶解并定量稀释制成 10 μg/mL 对照品溶液。

混合对照溶液: 分别取阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺、长春西汀对照品适量, 精密称定, 置于同一容量瓶中, 加流动相溶解并定量稀释制成浓度为 1 μg/mL 的混合对照溶液。

供试品溶液: 取长春西汀进口原料、自制原料或市售进口长春西汀注射剂适量, 精密称定, 加流动相溶解并定量稀释成 1 mg/mL 的溶液, 作为供试品溶液。

2 结果

2.1 系统适用性试验

按 1.3.1 项下色谱条件, 取流动相作为空白溶剂进样。分别取 1.3.2 项下 10 μg/mL 的阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺、长春西汀对照品溶液, 1 μg/mL 混合对照溶液进样, 记录色谱图。结果显示, 空白溶剂无干扰, 阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺、长春西汀出峰时间分别为 2.53、2.71、4.44、16.23 min, 理论塔板数分别为 16 857、19 608、20 222、20 238, 峰形均良好, 混合对照溶液中相邻色谱峰的分离度均符合要求, 表明该系统稳定, 方法满足要

求,空白及混合对照溶液色谱见图1。

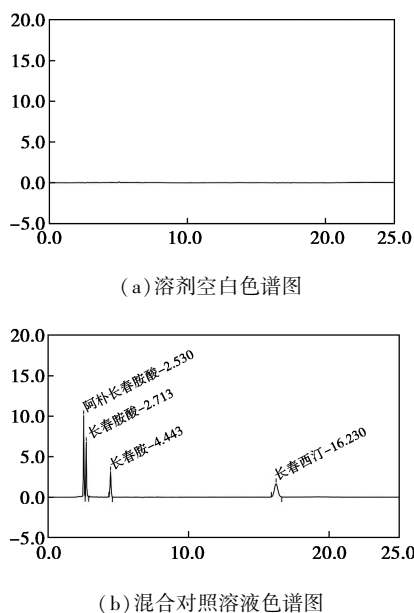


图1 溶剂空白、混合对照溶液色谱图

2.2 检测限与定量限

按1.3.1项下色谱条件,取阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺适量,各精密称定,分别以流动相逐步定量稀释至一定浓度进样。以3倍和10倍信噪比(S/N)确定方法的检出限和定量限。其中定量限浓度溶液连续进样6次,结果显示,阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺定量限溶液分别连续进样6次峰面积的 RSD 均小于5%,保留时间的 RSD 均小于2.0%,满足要求。阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺的检测限分别为0.24、0.33、0.30 ng,定量限分别为0.71、1.11、0.91 ng。方法的灵敏度完全满足要求。

2.3 线性和范围

按1.3.1项下色谱条件,精密称取长春西汀、阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺各适量,用流动相溶

解并定量稀释成含长春西汀浓度分别约为1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,含其他3个成分浓度分别约为0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液进样,以色谱峰面积对质量浓度进行线性回归。结果表明,阿朴长春胺酸在0.100~2.006 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好($R=0.9999$),长春胺酸在0.094~1.888 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性关系良好($R=0.9999$),长春胺在0.102~2.032 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性关系良好($R=1.0000$),长春西汀在0.995~19.900 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性关系良好($R=1.0000$),标准曲线回归方程分别为: $y=0.3204x-0.0028$, $y=0.3009x+0.0039$, $y=0.3229x+0.0010$, $y=0.3702x-0.0078$ 。

2.4 稳定性试验

按1.3.1项下色谱条件,取1.3.2项下1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合对照溶液作为稳定性试验样品,将该溶液室温放置进行稳定性考察,分别在0、3、6、9、12、24、48、72、96 h时取15 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果显示,混合溶液在96 h内,长春西汀及3个中间体杂质峰面积变化 RSD 均小于2.0%,且无新的杂质峰出现,溶液稳定性良好。

2.5 回收率试验

从阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺各对照品溶液中精密量取0.8、1.0、1.2 mL各3份,共9份,分别置于9个10 mL量瓶中,各加入长春西汀对照品约10 mg,加流动相稀释至刻度,摇匀,得到80%、100%、120%的供试品溶液,按1.3.1项下色谱条件进行加标回收率试验,结果显示,阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺平均回收率分别为101.8%、101.8%、100.6%,相对标准偏差(RSD)分别为2.4%、1.1%、0.8%, RSD 均小于3%,回收率良好,结果见表2。

表2 长春西汀中添加阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺的回收率和相对标准偏差

组分	测试浓度比例/%	加标量/ μg	测得值/ μg	回收率/%	RSD /%
阿朴长春胺酸	80	8.46, 8.46, 8.46	8.56, 8.42, 8.35	101.18, 99.53, 99.70	2.4
	100	10.58, 10.58, 10.58	11.04, 11.13, 10.55	104.35, 105.20, 99.72	
	120	12.69, 12.69, 12.69	13.24, 12.96, 12.88	104.33, 102.13, 101.50	
长春胺酸	80	7.85, 7.85, 7.85	8.00, 7.87, 7.98	101.91, 100.25, 101.66	1.1
	100	9.81, 9.81, 9.81	10.15, 10.03, 10.11	103.47, 102.24, 103.06	
	120	11.77, 11.77, 11.77	12.05, 11.83, 11.90	102.38, 100.51, 101.10	
长春胺	80	8.26, 8.26, 8.26	8.24, 8.37, 8.41	99.76, 101.33, 101.82	0.8
	100	10.33, 10.33, 10.33	10.39, 10.29, 10.44	100.58, 99.61, 101.06	
	120	12.39, 12.39, 12.39	12.38, 12.46, 12.44	99.92, 100.56, 100.40	

2.6 重复性试验

按 1.3.1 项下色谱条件,溶液配制及试验操作按 2.5 项下回收率试验 100% 浓度进行。阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺各连续进样 6 次,记录色谱峰面积,计算 *RSD* 值分别为 1.7%、1.4%、1.0%,表明该方法重复性良好。

2.7 样品测定

按 1.3.1 项下色谱条件,照 1.3.2 项下配制各供试品溶液,对自制长春西汀 3 批原料及市售进口长春西汀注射剂和原料中的 3 种中间体杂质残留进行检查。自制长春西汀 3 批原料及市售进口长春西汀注射剂和原料中均未检出阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺。

3 讨论

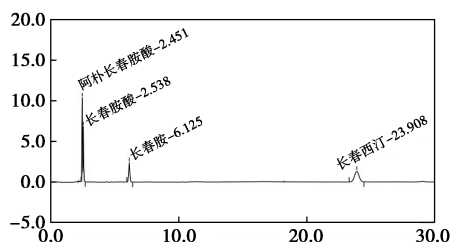
3.1 高效液相色谱条件的筛选和优化

长春西汀在《美国药典》(USP40)^[10]、《欧洲药典》EP9.0^[11]中均有收载,有关物质检查项下色谱条件和检测方法基本一致,均采用杂质对照品外标法对已知杂质乙基长春胺(杂质 A)、阿扑长春胺(杂质 B)、甲氧基长春西汀(杂质 C)和二氢长春西汀(杂质 D)进行控制,未明确关于长春西汀中间体杂质阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺的色谱条件和检测方法。直接运用 USP40 和 EP9.0 长春西汀有关物质的色谱条件和检测方法对 3 种中间体杂质对

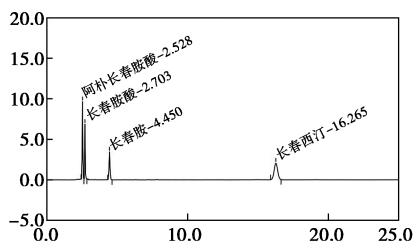
照品溶液和混合对照溶液进行检测,发现阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺的理论塔板数均符合规定且峰形良好,但混合溶液中阿朴长春胺酸和长春胺酸的分离度仅为 1.15 [图 2(a)],不能满足要求。考虑阿朴长春胺酸和长春胺酸的结构特点、溶解性及极性,通过调整流动相中乙腈和水相的比例并在水相中加入冰醋酸调整水相 pH 的方法来筛选和优化,结果见表 3,当水相 pH 为 5.0,乙腈:水相=43:57 时,阿朴长春胺酸与长春胺酸的分离度较为理想 [图 2(b)],主成分长春西汀的保留时间约为 16 min。

表 3 色谱条件的优化

水相 pH	乙腈-醋酸铵 溶液比例	阿朴长春胺酸和 长春胺酸分离度	长春西汀保留 时间/min
药典条件 ^[10-11]	55:45	1.15	23.9
	60:40	0.88	17.9
6.0	55:45	1.29	21.6
	60:40	1.01	16.7
5.5	55:45	1.14	16.4
	50:50	1.07	20.1
5.0	55:45	2.06	10.5
	50:50	2.10	12.0
	45:55	2.34	14.7
	40:60	2.75	19.6
	42:58	2.50	17.2
	43:57	2.46	16.3



(a) 混合对照品溶液在药典色谱条件下
(乙腈:水相=55:45,水相 pH=7.0)分离情况色谱图



(b) 混合对照品溶液在优化的色谱条件下
(乙腈:水相=43:57,水相 pH=5.0)分离情况色谱图

图 2 长春西汀和 3 种中间体杂质对照品混合溶液在不同色谱条件的分离情况比较

3.2 耐用性考察

按 1.3.1 项下色谱条件,取 1.3.2 项下 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺、长春西汀混合对照品溶液进样,通过改变流动相流速、柱温、检测波长、流动相比比例及更换色谱柱和色谱仪来评估测定条件有小的变动及仪器变更对测定结果的影响程度,结果见表 4,流速、流动相比比例、检测波长、柱温、色谱柱、色谱仪分别在相应范围内的微小变化对主成分及各杂质的检查结果无显著性影响,各条件下杂质之间的分离度均符合要求,该法耐用性良好。

4 结论

建立了高效液相色谱法(HPLC)同时测定长春西汀药物中 3 种中间体杂质残留的分析方法。所建立的定量检测方法灵敏度高、分离度好,回收率、精密密度及定量限等均能满足控制要求,是检测长春西

表4 耐用性试验结果

色谱条件	阿朴长春胺酸相对峰面积/%	阿朴长春胺酸和长春胺酸分离度	长春胺酸相对峰面积/%	长春胺酸和长春胺酸分离度	长春胺相和峰面积/%	长春胺和长春西汀分离度	长春西汀相对峰面积/%
1.3.1项下色谱条件	0.09	2.49	0.09	18.40	0.09	7.41	99.63
流速	0.8 mL/min	0.09	2.63	0.09	19.02	0.09	7.66
	1.2 mL/min	0.09	2.35	0.09	17.81	0.09	7.13
乙腈-醋酸铵溶液比例	40:60	0.09	2.75	0.09	20.36	0.09	8.48
	46:54	0.09	2.29	0.09	17.37	0.09	6.53
检测波长	278 nm	0.09	2.49	0.08	18.57	0.09	7.46
	282 nm	0.09	2.49	0.10	18.45	0.10	7.43
柱温	28℃	0.09	2.47	0.09	17.90	0.09	7.30
	32℃	0.09	2.54	0.09	19.22	0.09	7.57
更换色谱柱	同型号	0.09	1.98	0.07	16.18	0.09	7.09
更换仪器	同型号	0.09	2.4	0.09	17.7	0.09	7.3

汀药品中3种中间体杂质残留的有效方法。将所建方法应用于自制的长春西汀原料药和市售进口长春西汀注射剂和原料样品检测,样品均未检出阿朴长春胺酸、长春胺酸、长春胺。随着药学研究法规逐步健全,药政官方对药品杂质的监管要求越来越高,由于杂质控制研究不充分而导致的评审发补和退审、产品召回事件越来越多,充分的杂质研究已经成为产品能否上市的关键。本方法可为长春西汀原料及制剂生产企业3种中间体杂质残留控制提供依据和参考。

参考文献

- [1] 张兰华,曹文强,刘贺之.近年来长春西汀临床研究及应用进展[J].中华中医药杂志,2010,25(12):2070-2075.
- [2] 杨利鹏.长春西汀制剂及质量控制[D].开封:河南大学,2015.
- [3] 任骞,张杰.长春西汀药理作用机制研究进展[J].中草药,2013,44(11):1517-1520.
- [4] 谭小平,丁也,郭阳.长春西汀的抗炎作用机制及相关临床应用研究进展[J].医学综述,2018,24(21):4296-4301.
- [5] 王立波,孟天娇,姜佳风,等.长春西汀药理作用与血管性痴呆的治疗[J].中国老年学杂志,2017,37(2):513-515.
- [6] 谢珺超,刘学源.长春西汀治疗神经系统疾病的研究进展[J].同济大学学报:医学版,2015,36(4):124-127.
- [7] 刘素娜.长春西汀合成方法研究[A].沈阳市委、沈阳市人民政府.第八届沈阳科学学术年会论文集[C].沈阳市委、沈阳市人民政府、沈阳市科学技术协会,2011:3.
- [8] 姜华,陈蓉蓉,蒲含林.长春西汀的半合成工艺[J].暨南大学学报:自然科学与医学版,2012,33(1):65-68.
- [9] 刘永明,杨青.长春西汀的合成工艺改进[J].广东化工,2014,41(6):71,82.
- [10] The United States Pharmacopieial Convention. U. S. Pharmacopeia (40th Edition) [M]. New York: The United States Pharmacopieial Convention, 2016: 7245-7247.
- [11] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia (9. 0th Edition) [M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2016: 3914-3915.
- [12] 国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准(第78册)[M].北京:中国医药科技出版社,2011:167-168.
- [13] 张宇佳,相莉,陈少华,等.HPLC测定长春西汀注射液中4种有关物质含量[J].中国药师,2014,17(2):234-238.
- [14] 张霞.HPLC法测定长春西汀原料的有关物质研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2016,32(2):234-236.
- [15] 王荣耕.反相HPLC法同时测定长春西汀4种异构体[J].现代化工,2018,38(11):239-242,244.
- [16] 王一,王淼,袁丽华,等.HPLC法测定长春西汀氯化钠注射液中长春西汀的含量与有关物质[J].沈阳药科大学学报,2014,31(4):280-283,292.
- [17] 冯文字.长春西汀残留溶剂方法开发[A].中共沈阳市委员会、沈阳市人民政府、中国汽车工程学会.第十一届沈阳科学学术年会暨中国汽车产业集聚区发展与合作论坛论文集(农业环境与生物医药分册)[C].中共沈阳市委员会、沈阳市人民政府、中国汽车工程学会、沈阳市科学技术协会,2014.
- [18] 袁利杰,杨本霞,陈杰.RP-HPLC法测定注射用长春西汀的有关物质[J].中国药房,2013,24(13):1210-1212.
- [19] 张薇,陈夷花,郑枫.长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的LC-MS/MS法测定[J].中国医药工业杂志,2015,46(12):1334-1336.
- [20] 陈雪江,郭丽蓉,沈红娅,等.长春西汀注射液中的基因毒性杂质研究与含量测定[J].中国药物经济学,2018,13(2):42-44,57. ■