

非那雄胺有关物质及经化学降解产物的反相高效液相检测

胡晓渝¹ 夏亚君² 姚彤炜^{1*} (¹杭州 310006 浙江大学药学院; ²杭州 310006 浙江康恩贝集团研究开发中心)

摘要 目的:建立分离非那雄胺有关杂质的反相高效液相色谱法。方法:以 ODS 柱(25cm×4.6mm,5μm)为固定相,乙腈-0.04mol/L 磷酸(用 NaOH 溶液调至 pH=4.0)(55:45)为流动相,215nm 为检测波长,分离非那雄胺有关杂质及中间体、酸、碱、过氧化氢强烈破坏产物。结果:非那雄胺有关杂质及合成中间体、酸、碱、过氧化氢强烈破坏产物分离良好。结论:本方法专属性强,灵敏度高。可用于检查非那雄胺有关杂质。

关键词 反相高效液相色谱;非那雄胺;有关杂质

RP-HPLC Determination of Related Impurities in Finasteride

Hu Xiaoyu¹, Xia Yajun², Yao Tongwei^{1*} (¹ Department of pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310006; ² Zhejiang CONBA Group Center of Research and Development, Hangzhou, 310006)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** A RP-HPLC method was established for the separation of finasteride and related impurities. **METHOD:** Chromatographic column: ODS column(250×4.6mm,5μm); mobile phase: acetonitrile-0.04mol/L phosphoric acid(adjust to pH=4.0 with sodium hydroxide)(55:45, v/v); flow rate: 1.0ml/min; wavelength of UV detector: 215nm. The impurities in finasteride and intermediate products and the products of violent ruin by acid, alkali, hydrogen peroxide respectively were separated. **RESULTS:** All the impurities and the products was base-line separated with finasteride. **CONCLUSION:** This paper provides a specific and sensitive method for detection of impurities in finasteride.

KEY WORDS RP-HPLC, finasteride, related impurities.

非那雄胺(Finasteride, FN)是一种 4-氮杂-5-α-雄甾-1-烯-3-酮化合物,具有抑制 II 型 5α-还原酶的活性,从而降低前列腺二氢睾酮水平,主要用于治疗良性前列腺增生,其含量测定通常采用 HPLC 法^[1,2],本文采用反相高效液相色谱法建立了非那雄胺中有关杂质的检查方法,考察强烈破坏条件下本品与杂质的色谱选择性,为该药纯度检查提供了一个高效、快速、简便的分析手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪,SPD-10A v_p 紫外-可见检测器,N2000 色谱工作站软件。

非那雄胺对照品(HPLC 归一化法测得含量为 99.7%)及三批样品(>99.0%)、合成中间体均由浙江康恩贝集团研究开发中心提供。乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

分析柱:大连依利特 ODS 柱(250×4.6mm,5μm),流动相:乙腈-0.04mol/L 磷酸(用 NaOH 试液调至 pH=4.0)(55:45),流速:1ml/min,检测波长:215nm,进样量:20μl。

1.3 有关物质检查方法

1.3.1 中间体测定液

取 a、b、c、d 四种中间体分别用乙腈制成 0.25mg/ml 的溶液,取四种中间体溶液各 40μl 和非那雄胺对照品溶液 2ml(0.5mg/ml),配制成含非那雄胺及 a、b、c、d 的混合溶液。

1.3.2 强烈破坏试验溶液

取 0.1ml 非那雄胺对照品溶液(5mg/ml)3 份,分别加入 0.5ml 0.1mol/L NaOH,0.1mol/L HCl,3% H₂O₂ 2 滴,水浴煮沸 15min,中和其中的酸碱,并稀释成 0.5mg/ml 的溶液,作为酸处理、碱处理、过氧化氢处理的样品。

1.3.3 有关物质检查测定液

取非那雄胺样品适量,用乙腈配制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液作为样品测定液。取此液用流动相稀释 100 倍作为自身对照液。

1.3.4 分析测定

取自身对照液按色谱条件进样,调节检测灵敏度,使主成分峰高为记录仪满量程的 25%左右。取自身对照液和样品测定液各 20μl,分别注入高效液相色谱仪,记录至主成分

胡晓渝 女 1977 年 11 月 浙江大学药学院药物分析专业硕士研究生

* 联系人 Tel:0571-87217203 E-mail: Yaotw@zjue.m.zju.edu.cn

峰保留时间的 2 倍,计算有关物质的含量。取中间体测定液,强烈破坏试验溶液各 20 μ l,分别注入高效液相色谱仪,记录至主成分峰保留时间的 2 倍。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

非那雄胺的含量测定美国药典采用的流动相系统为水-四氢呋喃-乙腈(8:1:1)^[1],文献报道的方法是乙腈-水系统^[2]。本文对两种系统下色谱峰进行了比较,发现乙腈-水条件下所得的峰形状较 USP 方法结果好,故采用乙腈-水系统作为流动相,同时比较了不同的缓冲液 pH 值、不同乙腈浓度对色谱参数的影响。

取 0.04 mol/L 的磷酸溶液,以 NaOH 试液调节 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0,分别与乙腈以相同配比(45:55)混合后作为流动相,比较了不同 pH 值对非那雄胺色谱行为的影响。发现当 pH=4 时,峰的对称性、柱效均较理想,故选择 pH4 为流动相 pH 值。

同时将乙腈稀释成浓度分别为 45%、50%、55% 的溶液作为流动相,比较不同乙腈浓度对非那雄胺色谱行为的影响,结果见表 1。

表 1 不同乙腈浓度对非那雄胺色谱行为的影响

乙腈浓度(%)	45	50	55
柱效	2874	3584	6112
拖尾因子	1.04	1.05	1.03
保留时间(min)	17.765	6.548	5.232

表中数据表明:乙腈含量为 55% 时,柱效、拖尾因子均较好,保留时间也较合适,故选择流动相中乙腈浓度为 55%。

2.2 分析柱和测定波长的选择

分析柱选择:采用不同生产厂家、不同规格的分析柱,比较了不同固定相的色谱参数。结果见表 2。

表 2 不同分析柱的色谱参数比较

生产厂家	大连依利特科学仪器有限公司	同左	美国 Supelco 公司
柱效	6112	7804	4015
分析柱规格	20cm $\times$ 4.6mm (5 μ m)	25cm $\times$ 4.6mm (5 μ m)	15cm $\times$ 6mm (5 μ m)
拖尾因子	1.032	1.050	1.333
保留时间 (min)	5.232	6.315	3.957

发现当柱效达到 7000 以上时,非那雄胺主峰左右的杂峰可以分离,同时综合柱效、拖尾因子、保留时间三种因素,选择国产大连依利特科学仪器有限公司的 ODS 柱(250 $\times$ 4.6mm,5 μ m)作为分析柱。

检测波长选择:根据非那雄胺的 4 个合成中间体在流动相中的紫外吸收光谱(见图 1),比较了非那雄胺在 205nm、215nm、230nm 三个检测波长处的吸收情况。在 230nm 波长处,非那雄胺及多数有关物质的吸收峰显著低于其余两个波长,而 215nm 与 205nm 处样品及有关物质均有较大吸收值,考虑到流动相在低波长处可能对样品检测的影响,选择波长 215nm 为测定波长。

2.3 方法的灵敏度

将非那雄胺对照品溶液用流动相分别稀释 100、200、500、1000 倍,各自进样分析。其中稀释 1000 倍(相当于供试液中主成分含量的 0.1%)后的主成分吸收峰的峰高为噪音的 2 倍,该灵敏度表明本法完全可以检测出大于 0.1% 的杂质。

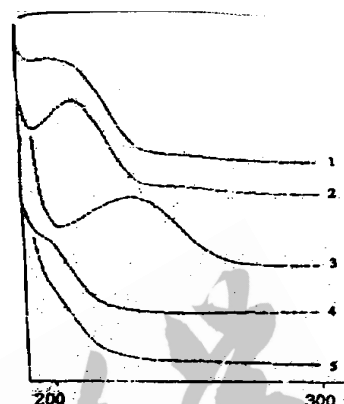


图 1 非那雄胺合成中间体在流动相中的紫外吸收光谱

1. 非那雄胺 2. 中间体 a 3. 中间体 b 4. 中间体 c 5. 中间体 d

2.4 方法选择性

取合成中间体溶液、合成中间体与非那雄胺混合溶液、强烈破坏的溶液分别进样测定,结果见图 2 - 图 4。图 2 为非那雄胺合成中间体色谱图。图 3 为非那雄胺与合成中间体混合溶液色谱图,其中非那雄胺主峰与各杂质峰分离良好,中间体 b、d 重叠成一个峰。作者在实验中发现当流动相中乙腈含量变为 30% 时,中间体 b、d 方得以基线分离,而在该条件下,非那雄胺的保留时间为 50 多 min,故在实际应用中无意义。图 4 中 a 为非那雄胺经酸破坏色谱图, b 为非那雄胺经碱破坏色谱图, c 为非那雄胺经过氧化氢破坏色谱图。由于经酸、过氧化氢破坏后所产生的杂质峰基本位于主成分峰之前,而经碱破坏后的杂质也在主成分峰保留时间的 2 倍时间内出峰,故采用非那雄胺保留时间的 2 倍为样品分析时间。

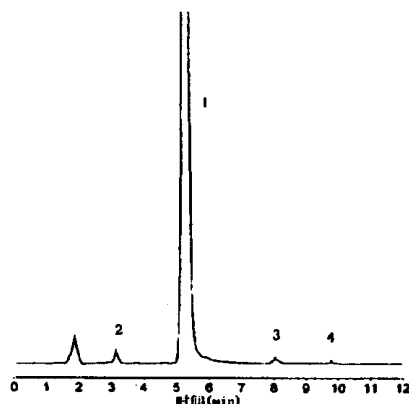


图 3 非那雄胺与合成中间体混合溶液色谱图

1. 非那雄胺 2. 中间体 b+d 3. 中间体 a 4. 中间体 c

2.5 样品的有关物质检查结果

在上述选定的色谱条件下,取样品测定液重复进样 5 次,色谱柱的理论板数大于 7000,5 次测定峰面积 RSD 小于 2%,4 批样品的有关物质检查结果见表 3。

表 3 非那雄胺样品的有关物质检查结果

样品号	按对照液计算的杂质含量	按归 - 化法计算的杂质含量
	(%)	(%)
1	0.930	1.14
2	0.620	0.78
3	0.634	0.78
4	0.640	0.79

小结:根据上述实验结果,本文作者认为文中所述的高效液相色谱系统条件可用于检测非那雄胺原料中有关物质和降解产物。

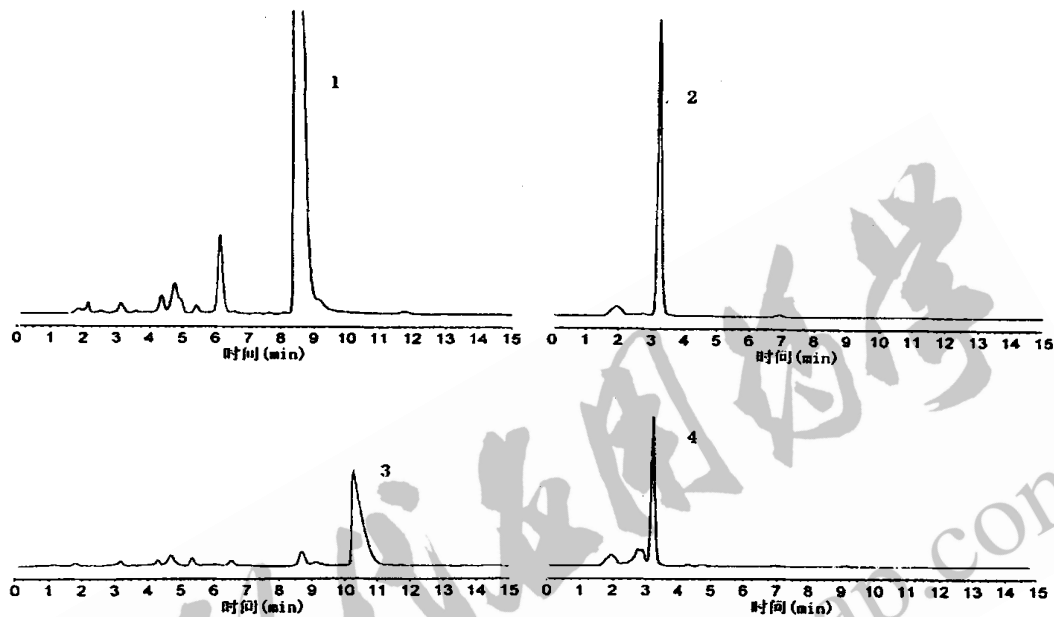


图 2 非那雄胺合成中间体色谱图

1. 中间体 a 2. 中间体 b 3. 中间体 c 4. 中间体 d

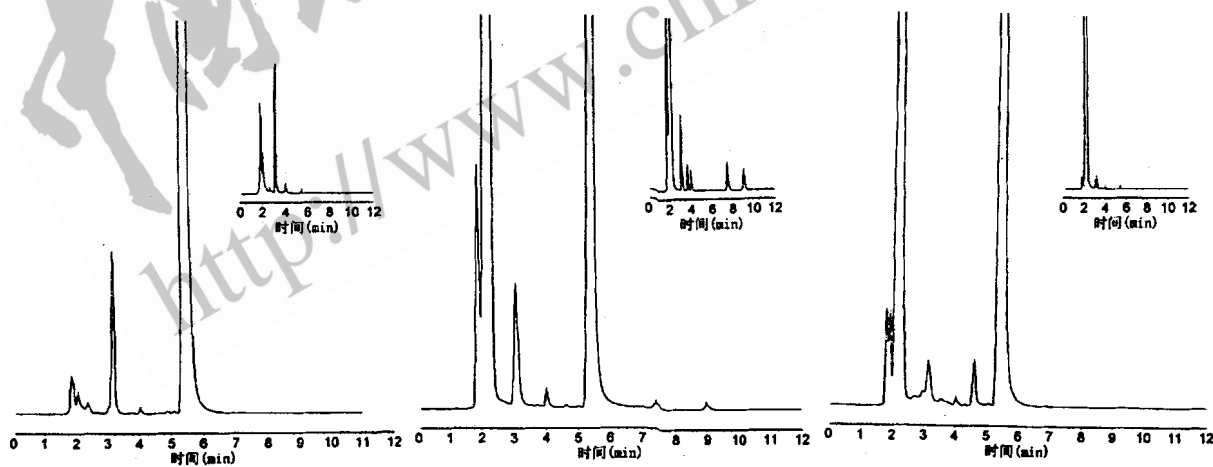


图 4 非那雄胺经酸(左)碱(中)过氧化氢(右)破坏色谱图
(右上角的小图为各自的空白色谱图)

参考文献

1 USP. XX IV [S], 2000 :2615 .
2 Takano T, Hata S. High-performance liquid chromatographic determination of finasteride in human plasma using direct injection with column switching. J Chromatogr B[J], 1996, 676 :141 .

收稿日期:2001 - 05 - 08