

HPLC 测定盐酸氯胺酮原料药中的有关物质

晏海军^{1,2}, 陈一波², 张福利², 林丽娅^{2*}, 王禄³(1.上海工程技术大学化学化工学院, 上海 201620, 2.上海医药工业研究院有限公司, 上海 201203; 3.国药集团工业有限公司廊坊分公司, 河北 廊坊 065000)

摘要:目的 建立HPLC检测盐酸氯胺酮原料药中有关物质的方法。方法 采用Waters Xbridge C₁₈色谱柱,以0.005 mol·L⁻¹己烷磺酸钠水溶液-乙腈-磷酸(90:10:0.1)为流动相A,乙腈为流动相B,梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长215 nm,柱温30℃。结果 主成分与各杂质间最小分离度>1.5;主成分以及其6个杂质在各自的浓度范围内呈良好的线性关系($r>0.999$);平均回收率为97.6%~103.0%,RSD为0.8%~2.8%。结论 本方法准确、灵敏、可靠,适用于盐酸氯胺酮有关物质的测定。

关键词: 盐酸氯胺酮;高效液相色谱法;有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)05-0633-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.05.010

引用本文: 晏海军, 陈一波, 张福利, 等. HPLC 测定盐酸氯胺酮原料药中的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 633-637.

Determination of the Related Substances in Ketamine Hydrochloride by HPLC

YAN Haijun^{1,2}, CHEN Yibo², ZHANG Fuli^{2*}, LIN Liya^{2*}, WANG Lu³(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China; 2.State Pharmaceutical Administration of Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 3.China National Pharmaceutical Industry Corporation Ltd., Langfang Company, Langfang 065000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of the related substances in ketamine hydrochloride. **METHODS** Waters Xbridge C₁₈ column was used; the mobile phase A consisted of 0.005 mol·L⁻¹ sodium hexanesulfonate aqueous solution-acetonitrile-phosphoric acid (90:10:0.1), the mobile phase B was acetonitrile, with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 215 nm; the column temperature was 30℃. **RESULTS** The minimum separation between the main component and each impurity was >1.5; ketamine and its six impurities showed a good linear relationship in the self-concentration range ($r>0.999$); and the average recoveries were 97.6%~103.0% with RSDs of 0.8%~2.8%. **CONCLUSION** The method is accurate, sensitive and reliable, which is suitable for the determination of related substances in ketamine hydrochloride.

KEYWORDS: ketamine hydrochloride; HPLC; related substance

盐酸氯胺酮(ketamine hydrochloride, **1**), 化学名为2-(2-氯苯基)-2-(甲氨基)环己酮盐酸盐, 1962年由Calvin Stevens首次合成,并在70年代初被作为麻醉药用于临床^[1]。**1**是一种非巴比妥类具有镇痛作用的静脉麻醉药,具有起效快、麻醉时间短、可较好保留患者呼吸和维持心血管循环系统稳定等优点^[2]。此外,**1**还被发现有快速抗抑郁作用,对于难治性抑郁症也有良好的治疗效果^[3]。

本研究团队设计优化**1**的合成工艺^[4],合成路线见图1。根据合成路线进行分析,**1**可能存在的有关物质包括:

①工艺杂质:**2**为合成**1**的关键中间体;②副产物杂质:合成**2**的过程中产生副产物**4**和**5**,同时**4**经AlCl₃高温重排生成**3**;③杂质**6**由**SM1**

中的杂质2,4-二氯苯甲酰氯经与**SM1**相同的反应历程得到;④杂质**7**由**SM1**中的杂质2,5-二氯苯甲酰氯经与**SM1**相同的反应历程得到。

目前**1**原料药被中国药典2020年版、美国药典(USP 43)、欧洲药典(EP 10.3)等多国药典收录,中国药典有关物质均按未知杂质控制,USP仅控制了杂质**2**,EP对有关物质**2,3,4**进行了研究^[5-7]。鉴于各国药典对**1**原料药的杂质谱研究尚不全面,且本实验室对药典方法进行验证,发现存在分离度差、峰型不佳、基线噪音高等问题,故在EP方法的基础上进行改进,建立**1**的有关物质HPLC测定方法,并根据ICH指导原则进行系统性方法学验证^[8],该方法能有效评价药物质量,保障原料药的生产质量,同时亦为制剂的质量控制提供参考。

作者简介: 晏海军,男,硕士生 E-mail: 1508604023@qq.com

*通信作者: 林丽娅,女,硕士 E-mail: lly3008@163.com

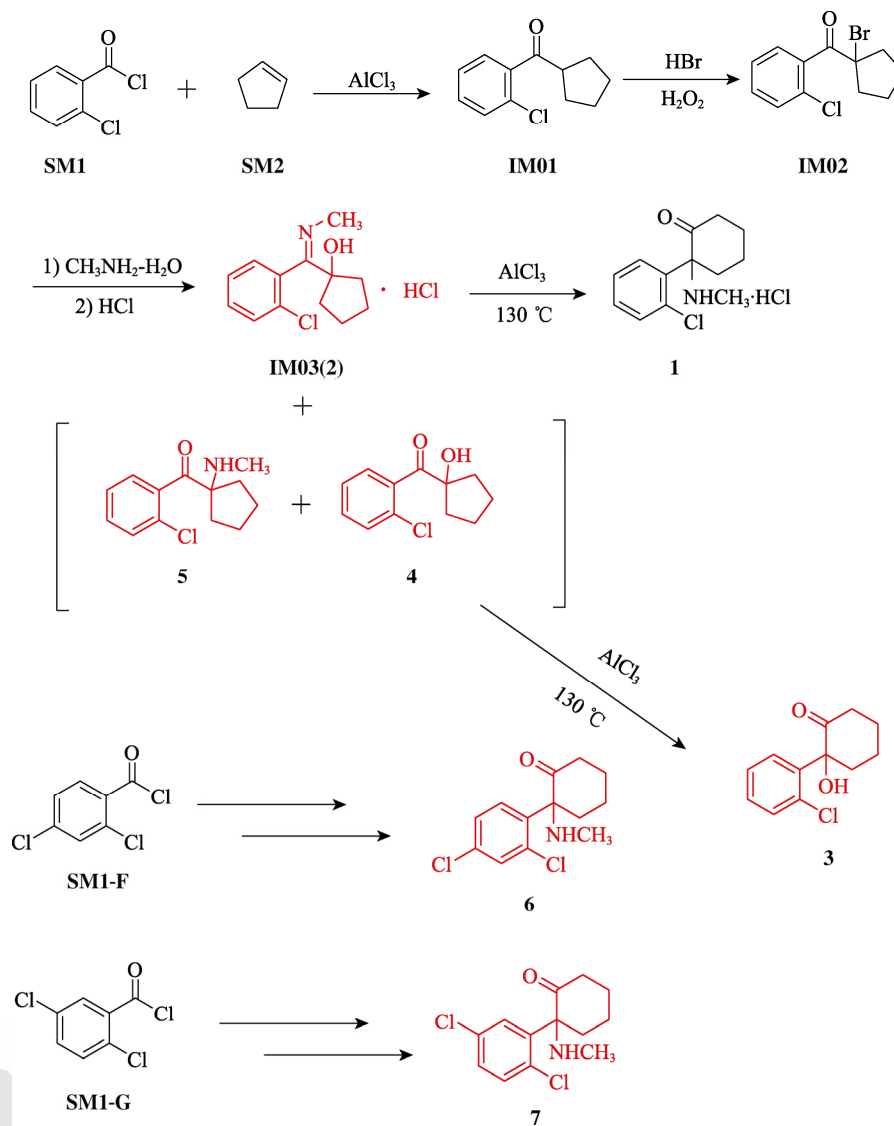


图 1 1 合成路线以及有关物质的产生途径

Fig. 1 Synthetic route of **1** and its related substances

1 仪器与试剂

Thermo U3000 高效液相色谱仪(采用二极管阵列检测器,美国赛默飞公司); Sartorius CPA225D 分析天平(德国赛多利斯)。

1 对照品(纯度: 99.96%; 批号: 200714)、**1** 原料药(批号: 190919, 190920, 190922)、**2**(纯度: 95.6%; 批号: 190420-2)、**3**(纯度: 99.7%; 批号: 191120)、**4**(纯度: 96.8%; 批号: 20190831)、**5**(纯度: 99.7%; 批号: 20191023)、**6**(纯度: 97.3%; 批号: 191120)、**7**(纯度: 95.1%; 批号: 210421)均由中国医药工业研究总院制药工艺优化与产业化研究中心提供; 乙腈(色谱级, 霍尼韦尔); 己烷磺酸钠(色谱级, 赛默飞世尔试剂); 磷酸(分析纯, 国药沪试)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Waters Xbridge C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.005 mol·L⁻¹ 己烷磺酸钠水溶液-乙腈-磷酸(90 : 10 : 0.1), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱(0~15 min, 90%A→85%A; 15~30 min, 85%A→50%A; 30~35 min, 50%A; 35.1~45 min, 90%A), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 215 nm, 柱温 30 °C, 样品盘温度 4 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的配制

稀释剂为流动相 A。

对照品溶液: 精密称取 **1**~**7** 对照品各 20 mg, 分置于 20 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释定容, 摇匀, 制成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。

混合对照品贮备液：分别量取以上 1~7 对照品溶液各 1 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，加稀释剂溶解并定容，摇匀，制成浓度均为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的贮备液。

系统适用性溶液：精密称取 1 对照品 20 mg 置于 20 mL 量瓶中，加入以上混合对照品贮备液 2 mL，加稀释剂溶解并定容，摇匀，即得。

供试品溶液：精密称取 1 原料药 20 mg，置于 20 mL 量瓶中，加稀释剂溶解并定容，摇匀，制成浓度为 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

自身对照溶液：精密量取供试品溶液 1 mL，置于 100 mL 量瓶中，加稀释剂定容，摇匀，即得。

2.3 系统适用性试验

取系统适用性溶液和空白溶液(流动相 A)，按“2.1”项下色谱条件进样，结果表明，系统适用性溶液中各色谱峰间最小分离度 >1.5 ，按照 1 峰计算理论板数 $\geq 5\ 000$ ，空白溶液对 1 及各杂质色谱峰均无干扰，典型色谱图见图 2。

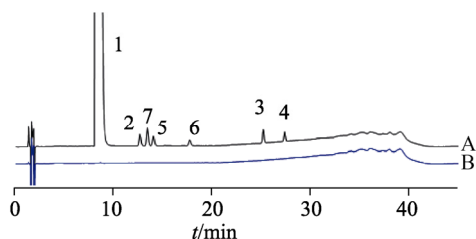


图 2 典型色谱图

A—系统适用性溶液；B—空白溶液；1—盐酸氯胺酮；2~7—有关物质。

Fig. 2 Typical chromatograms

A—system suitability solution; B—blank solution; 1—ketamine hydrochloride; 2~7—related substance.

2.4 强制降解试验

精密称取 1 原料药 20 mg，共 5 份，分别进行

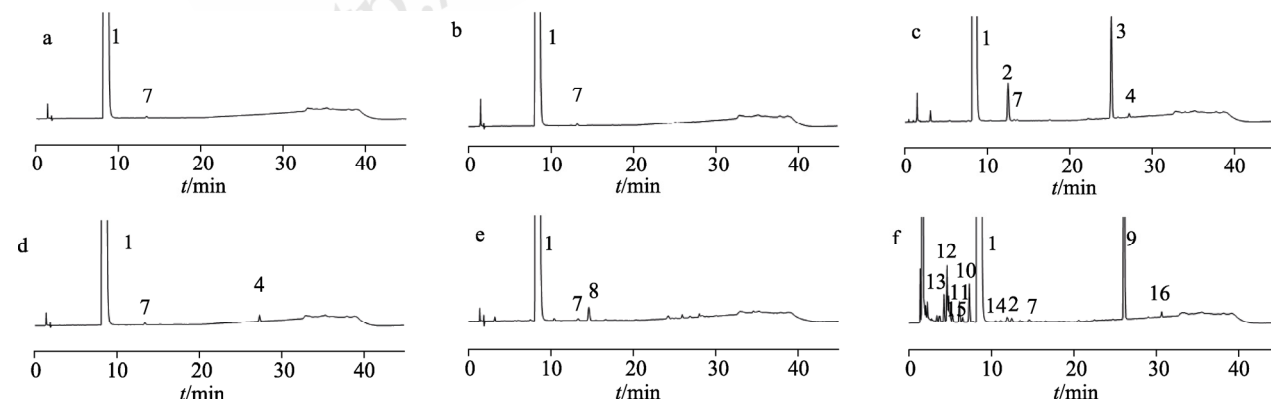


图 3 强制降解试验色谱图

a—未破坏溶液；b—酸破坏溶液；c—碱破坏溶液；d—高温破坏溶液；e—光照破坏溶液；f—氧化破坏溶液；1—盐酸氯胺酮；2~7—有关物质；8~16—未知杂质。

Fig. 3 Chromatograms of forced degradation

a—no degradation; b—degradation in acid solution; c—degradation in alkali solution; d—degradation at high temperature in solution; e—degradation light damage in solution; f—oxidative degradation; 1—ketamine hydrochloride; 2~7—related substance; 8~16—unknown impurities.

酸($1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{HCl}$)、碱($1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaOH}$)、高温($90\ ^\circ\text{C}$)、光照($4\ 500\ \text{lx}$)以及氧化($10\%\ \text{H}_2\text{O}_2$)破坏，其中酸、碱破坏样品需中和。按“2.2”项下方法制备供试品溶液，精密量取各溶液 $10\ \mu\text{L}$ ，注入液相色谱仪，同时采用二极管阵列检测器在 $200\sim 400\ \text{nm}$ 内进行扫描，实验结果表明 1 在酸性条件下较稳定，杂质个数和总量无明显变化；碱性条件下主要降解杂质为杂质 2 和杂质 3；高温条件下降解出少量杂质 4；光照条件下主要降解杂质为未知杂质 8；氧化条件下主要降解杂质为未知杂质 9 以及 10~16 等众多小杂质。各破坏条件下产生的降解产物与主成分之间均有良好的分离度，各破坏产物与已知杂质之间也能较好地分离，峰纯度分析显示各破坏溶液中 1 色谱峰的峰纯度均 >980 ，为单一峰，且物料保持平衡。色谱图见图 3。

2.5 线性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品贮备液适量，加稀释剂制成浓度分别为 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, $2.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。将各物质浓度与其对应峰面积进行线性回归分析，计算线性方程和相关系数 r ，结果见表 1。

表 1 线性试验结果

Tab. 1 Results of linearity test

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	校正因子
1	$y=0.286\ 6x+0.012\ 2$	0.999 9	0.202~10.123	—
2	$y=0.337\ 1x-0.000\ 1$	1.000 0	0.189~9.454	0.82
3	$y=0.354\ 9x+0.000\ 4$	1.000 0	0.198~9.879	0.81
4	$y=0.441\ 7x-0.005\ 3$	1.000 0	0.235~11.742	0.65
5	$y=0.319\ 3x-0.002\ 2$	1.000 0	0.210~10.490	0.90
6	$y=0.339\ 4x-0.006\ 6$	1.000 0	0.216~10.798	0.84
7	$y=0.220\ 5x-0.007\ 0$	0.999 9	0.181~9.044	1.30

分别以 1 的回归方程的斜率比各杂质的回归方程斜率,得各有关物质的相对校正因子。结果显示,各有关物质的校正因子均在 0.6~1.4,可用加校正因子的主成分自身对照法计算含量,结果见表 1。

2.6 检测限和定量限

取“2.2”项下混合对照品贮备液,采用逐步稀释法制成一定浓度的溶液,进样分析,按信噪比 $S/N>3$ 计算检测限,1~7 检测限为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,相当于样品浓度的 0.01%。以信噪比 $S/N>10$ 计算定量限,1~7 定量限为 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,相当于样品浓度的 0.02%。定量限浓度下连续进样 6 针,1~7 的峰面积 RSD 分别为 5.0%, 7.7%, 2.7%, 1.5%, 7.6%, 9.2%, 2.3%, 结果表明本方法灵敏度较好。

2.7 回收率

精密称取 1 原料药 20 mg 于 20 mL 量瓶中,平行 9 份,分别加入杂质对照品 2~7 溶液适量,加稀释剂定容,制成杂质浓度为限度浓度 50% ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、100% ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、200% ($2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的溶液,每个浓度水平各 3 份。再同法配制 2 份不加杂质的背景对照溶液。进样检测,计算各杂质回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Recovery test results

项目	回收率/%					
	2	3	4	5	6	7
低浓度 (50%限度)	102.6	96.2	96.5	98.3	97.0	93.8
	103.6	97.4	96.5	98.3	96.8	99.5
	103.0	96.9	96.4	97.1	96.4	95.2
中浓度 (100%限度)	103.7	97.5	97.7	98.2	97.1	98.6
	102.9	98.2	97.4	97.7	98.9	99.8
	101.8	97.0	96.6	97.6	95.4	103.0
高浓度 (200%限度)	102.6	98.3	98.2	98.8	97.8	97.3
	102.5	99.0	99.3	99.8	98.8	100.1
	104.5	100.4	100.7	101.2	100.1	100.3
平均回收率/%	103.0	97.9	97.7	98.6	97.6	98.6
RSD/%	0.8	1.3	1.5	1.3	1.5	2.8

2.8 重复性试验

按“2.7”项下制备溶液杂质浓度为限度浓度(100%)的方法配制加标样品溶液,平行配制 6 份,并为每份溶液制备 1%自身对照溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果杂质 2~7 含量的 RSD 分别为 2.4%, 3.0%, 2.3%, 2.6%, 2.2%, 1.6%, 总杂质含量的 RSD 为 1.9%, 重复性良好。

2.9 中间精密度试验

换另一分析人员在不同日期,使用不同仪器重复“2.8”项下试验操作,结果杂质 2~7 回收率的 RSD 分别为 4.3%, 1.5%, 2.7%, 4.0%, 1.4%, 1.2%, 总杂质 RSD 为 2.3%。将 2 位分析人员的 12 份样品检测结果汇总,杂质 2~7 含量 RSD 分别为 7.0%, 2.4%, 3.7%, 3.3%, 2.1%, 1.7%, 总杂质 RSD 为 1.8%。

2.10 耐用性试验和溶液稳定性试验

按“2.7”项下制备溶液杂质浓度为限度浓度(100%)的方法配制加标溶液,并制备 1%自身对照溶液。在“2.1”项下色谱条件的基础上,分别考察了不同批次的色谱柱、流速[(1.0 ± 0.1) $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$]、检测波长[(215 ± 2)nm]、柱温[(30 ± 5) $^{\circ}\text{C}$]、流动相 A 中磷酸加入量[(0.10 ± 0.01)%]改变对检测结果的影响。结果表明,在以上耐用性色谱条件下,主峰与杂质峰、杂质峰和杂质峰之间的分离度都 >1.5 ,且与“2.1”项下色谱条件相比,所测样品溶液单个杂质含量的偏差 $\leq 0.02\%$,总杂质含量的偏差 $\leq 0.06\%$,方法耐用性良好。

按“2.7”项下制备溶液杂质浓度为限度浓度(100%)的方法配制加标溶液,分别置于 4, 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存,间隔一定时间(0, 12, 24, 48, 72 h)进样检测,计算样品溶液在不同时间点的杂质含量。结果表明,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,样品溶液在各时间点的单个杂质绝对差值 $\leq 0.02\%$,总杂质绝对差值为 0.03%,未出现新的大于定量限(0.02%)的杂质,说明样品溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下 72 h 内稳定;样品溶液在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,杂质 2 和 4 的含量在 12 h 内的绝对差值 $\geq 0.03\%$,这是因为 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,含有亚胺结构的杂质 2 易降解为杂质 4。

2.11 样品检测

取 3 批 1 原料药,按“2.2”项下方法配制供试品溶液和自身对照溶液,依法测定,检测结果见表 3。

表 3 盐酸氟胺酮有关物质检测结果

Tab. 3 Results of related substances of ketamine hydrochloride %

批次	杂质检测结果						总杂质
	2	3	4	5	6	7	
190919	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.05
190920	ND	ND	ND	ND	ND	0.07	0.07
190922	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.05

注: ND-未检出。

Note: ND-not detected.

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用 DAD 检测器对 1~7 进行全波长扫描,结果显示 1~7 在 191~203 nm 间有最大吸收,在 200~220 nm 处吸收逐渐下降,但基本上都较强,在>240 nm 时几乎无吸收。中国药典和欧洲药典、美国药典分别选用 220, 215 nm 作为检测波长,通过对比发现 1~7 在 215 nm 处的响应更高,基线噪音无明显增大。因此,最终选择 215 nm 作为有关物质的检测波长。

3.2 流动相 pH 调节剂的选择

药典收录方法及相关文献报道均采用醋酸调节流动相 pH^[9],但在本实验色谱条件下,醋酸具有末端吸收,严重干扰杂质的检测。选用无紫外吸收的磷酸调节 pH,问题得到解决。

3.3 流动相体系的优化

重现中国药典、美国药典、欧洲药典中的方法,发现均无法将 2 和 5 有效分离,且 1, 2, 5 弱保留(5 min 内出峰), 3, 4 峰型差。将流动相分成 A、B 两相,对洗脱梯度进行优化,并调整流动相 A 的 pH。结果表明,流动相 A 的 pH 为 2.1(磷酸加入量为 0.1%)时, 1~7 峰型良好且最小分离度>1.5。

3.4 杂质限度的确定

参考各药典杂质的最严标准与实际检测结果,制定了各杂质的限度标准。中国药典要求单个杂质不得过 0.25%,总杂质不得过 0.5%;美国药典规定 2 的限度为 0.1%,其他未知单个杂质限度为 0.3%,总杂质限度为 1.0%;欧洲药典规定 2, 3, 4 的限度均为 0.2%,未知杂质限度为 0.1%,总杂质限度为 0.5%;参考 ICH 指导原则,根据给药剂量及生产安全严格质控,拟定 2~7 的限度≤0.1%,未知单个杂质限度≤0.10%,总杂质限度≤0.5%。

4 小结

本研究依据 1 原料药合成路线及样品实际检测结果,将杂质 5, 6, 7 也作为 1 的有关物质控制,并在此基础上考察药典收录方法的适用性,发现其不再适用故而进行方法的优化,最终建立了一个能同时检测 6 个杂质的分析方法,并且该法分离度好,灵敏度高,不仅丰富完善了杂质谱,确定了原料药的质量标准,为生产安全提供了有效的技术支持及保障,并且可为其他药物中相似结构杂质的检测提供重要参考。

REFERENCES

- [1] LI X J, XU W, WANG H F, et al. Detection of ketamine in the fingerprint[J]. Chin J Drug Abuse Prev Treat(中国药物滥用防治杂志), 2012, 18(2): 68-72.
- [2] 时向军. 氯胺酮在疼痛治疗中的临床应用及研究进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2013, 28(1): 51-53.
- [3] LI J M, SU W J, JIANG C L. The rapid antidepressant effect of ketamine and its mechanism[J]. Prog Physiol Sci(生理科学进展), 2018, 49(5): 389-392.
- [4] GAO S H, GAO X Z, YANG Z Z, et al. Process research and impurity control strategy of esketamine[J]. Org Process Res Dev, 2020, 24(4): 555-566.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2020: 1308-1309.
- [6] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[S]. [2021-05-07]. [https://pheur.edqm.eu/app/10-3/content/10-3/1020E.htm?highlight=on&terms=ketamine hydrochloride&terms=hydrochloride&terms=ketamine](https://pheur.edqm.eu/app/10-3/content/10-3/1020E.htm?highlight=on&terms=ketamine%20hydrochloride&terms=hydrochloride&terms=ketamine).
- [7] The United States Pharmacopeial Convention 43-NF38[S]. [2020-05-07]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GU-ID-67E52145-1649-4C46-B824-8AEB1FD6DB9E_4_en-US.
- [8] ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology[S]. 2005.
- [9] TA N, YIN J, NAN N, et al. Related substance detection and content determination of ketamine hydrochloride injection by RP-HPLC[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(7): 1284-1290.

收稿日期: 2021-05-22

(本文责编: 蔡珊珊)