

HPLC 测定拉坦前列素滴眼液复杂系统中的有关物质及含量

陈悦¹, 王玲², 高芳³, 王建^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江昌明药业有限公司, 浙江 台州 317200; 3.浙江工业大学, 杭州 310014)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定拉坦前列素滴眼液复杂系统中的有关物质及含量的方法。方法 采用糖涂敷型手性色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 有关物质测定以 0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 2.7)-乙腈(56:44)为流动相, 含量测定以 0.005 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 2.7)-乙腈(54:46)为流动相, 检测波长为 200 nm, 流速为 0.5 mL·min⁻¹。结果 有关物质测定中 2 个已知杂质与主峰之间的分离度良好, 线性关系良好, 5,6-反式-拉坦前列素和 15S-拉坦前列素的平均回收率分别为 101.5%和 99.5%, 拉坦前列素、5,6-反式拉坦前列素和 15S-拉坦前列素的定量限(S/N≈10)分别为 0.12、0.13 和 0.12 μ g·mL⁻¹; 含量测定线性关系良好, 重复性 RSD=0.90%, 拉坦前列素平均回收率为 98.8%。结论 建立的方法准确可靠, 可用于拉坦前列素滴眼液的质量控制。

关键词: 拉坦前列素滴眼液; 高效液相色谱法; 有关物质; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)12-1743-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.022

引用本文: 陈悦, 王玲, 高芳, 等. HPLC 测定拉坦前列素滴眼液复杂系统中的有关物质及含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1743-1746.

Determination of the Related Substances and Content in the Complex System of Latanoprost Eye Drops by HPLC

CHEN Yue¹, WANG Ling², GAO Fang², WANG Jian^{1*} (1.Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Changming Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 317200, China; 3.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the determination of the related substances and content in the complex system of Latanoprost Eye drops. **METHODS** The conditions of detection were Sugar Chiral column C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), related substances measured using the isocratic mobile phase consisted of 0.005 mmol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (adjust with phosphate to pH 2.7)-acetonitrile(56:44), and the mobile phase for content determination was 0.005 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted with phosphoric acid to pH 2.7)-acetonitrile(54:46) with a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, the UV detection wavelength was 200 nm. **RESULTS** The resolution of 5, 6-trans-Latanoprost and 15S-Latanoprost was good. The method for determination of the related substances of Latanoprost Eye drops had a good linearity. The average recovery of 5,6-trans-Latanoprost and 15S-Latanoprost were 101.5% and 99.5%. The limit of quantitation of Latanoprost, 5,6-trans-Latanoprost and 15S-Latanoprost were 0.12, 0.13 and 0.12 μ g·mL⁻¹. The method for determination of Latanoprost Eye drops had a good linearity, the repeatability was good (RSD=0.90%). The average recovery of Latanoprost was 98.8%. **CONCLUSION** The method is accurate and reliable, which can be used to control the quality of Latanoprost Eye drops.

KEY WORDS: Latanoprost Eye drops; HPLC; related substances; content determination

拉坦前列素是一种新型苯基替代的丙基酯前列素 F2a, 为选择性 F2a 受体激动剂。它是一种无活性但能迅速渗透到角膜里的物质, 在角膜和血浆中可水解为具有活性的游离酸。拉坦前列素滴眼液临床上用于降低开角型青光眼和高眼压症患者升高的眼压^[1]。拉坦前列素滴眼液国内有成都恒瑞制药有限公司、鲁南贝特制药有限公司、北京紫竹药业有限公司和大连美罗大药厂 4 家药厂生产。

另已有比利时辉瑞制药有限公司(适利达, 进口药品注册标准编号: JX19980038)、印度太阳药业有限公司和联邦化学制药股份有限公司获得进口注册证。韩国 Taejoon Pharm 公司在申请进口注册中。

调研发现, 拉坦前列素滴眼液的处方极复杂, 各厂家的产品处方各不相同, 生产中添加的防腐剂就有苯扎氯铵、苯扎溴铵和吐温 80 等多种, 而这些不同的防腐剂在该药的含量测定或有关物质

作者简介: 陈悦, 男, 主任药师 Tel: (0571)86459427
(0451)87180358 E-mail: wangjianhw2000@aliyun.com

E-mail: 13868057010@163.com

*通信作者: 王建, 男, 主任药师 Tel:

检查的色谱系统中会出现 2 个或多个杂质峰,从而干扰该药活性成分的测定。查阅相关资料发现,该药在各国药典中均未见收载,现行的拉坦前列素滴眼液国内外质量标准和参考文献中,也没有一个合适的方法能适用所有厂家的产品^[2-6]。但是,该药的主药成分拉坦前列素对热不稳定,需冷藏保存,再加之复杂的处方工艺,使得该药的有关物质相对也较复杂。为了进一步严格控制该药的产品质量,本研究考察了拉坦前列素的主要降解产物和实际存在的主要工艺杂质 15S-拉坦前列素和 5,6-反式拉坦前列素,并对其进行了限度控制。

综合各厂家的产品处方,本研究考察了缓冲盐浓度、乙腈比例和柱温等因素对拉坦前列素、苯扎氯铵、吐温 80 和 5,6-反式-拉坦前列素色谱行为的影响,在拉坦前列素滴眼液申请进口注册标准(韩国 Taejoon Pharm Co., Ltd.公司)和进口注册标准 JX19980038 基础上,改进和优化了色谱条件,使各成分色谱峰间都得到了较好的分离。本实验所建立的 HPLC 方法能适用所有厂家生产的拉坦前列素滴眼液的有关物质检查和含量测定。该方法通过对已知的特定杂质的控制,可以达到对该药质量的控制,为今后该药的质量控制提供技术支持。

1 仪器和试剂

Agilent 1260 液相色谱仪(包括在线真空脱气机,四元泵,自动进样系统等),拉坦前列素滴眼液(鲁南贝特制药有限公司,批号:60120503,60131001,60131002,60131003;北京紫竹药业有限公司,批号:74131024;成都恒瑞制药有限公司,批号:130401,130402,130403;比利时辉瑞制药有限公司,批号:Z0832);苯扎氯铵、苯扎溴铵、拉坦前列素酸(批号:LTWS1101,纯度:99.6%)、15S-拉坦前列素(批号:LT1M11001,纯度:99.8%)和 5,6-反式-拉坦前列素对照品(批号:LT1M11201,纯度:99.8%)均由成都恒瑞制药有限公司提供。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

多糖涂敷型手性色谱柱(Chiralcel OD-R, 4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.005 mol·L⁻¹磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 2.7)-乙腈(56:44);检测波长:200 nm;柱温:25℃;流速:0.5 mL·min⁻¹。

2.2 溶液配制

取 5,6-反式-拉坦前列素对照品和拉坦前列素滴眼液各适量,加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中分别约含 0.5 μg 和 50 μg 的溶液,作为系统适用性溶液;分别取苯扎氯铵、苯扎溴铵和辅料(吐温 80、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠)各适量,加流动相制成 200 μg·mL⁻¹的溶液,作为防腐剂辅料溶液。分别取拉坦前列素合成工艺的中间体、副产物 15S-拉坦前列素和 5,6-反式-拉坦前列素对照品及拉坦前列素各适量,加流动相制成 2 μg·mL⁻¹的溶液,作为各杂质的定位溶液。

精密称取拉坦前列素对照品适量,加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 μg 的溶液,作为有关物质对照品溶液;取本品摇匀,取适量作为有关物质供试品溶液。精密称取拉坦前列素对照品约 10 mg,置 20 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 20 mL 量瓶中,加流动相 10 mL,加水稀释至刻度,作为含量测定的对照品溶液。精密量取本品 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,作为含量测定供试品溶液。

2.3 样品测定

取上述系统适用性溶液、杂质定位溶液、防腐剂辅料溶液、对照品及供试品溶液各 20 μL 用于 HPLC 分析,记录色谱图。结果见图 1,各批样品有关物质及含量测定结果见表 1。结果表明,拉坦前列素峰与 5,6-反式-拉坦前列素峰的分离度为 1.59,已实现良好分离,杂质 15S-拉坦前列素和 5,6-反式-拉坦前列素也完全分离。苯扎氯铵、苯扎溴铵和辅料峰(吐温 80、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠)对主峰含量测定无干扰。

2.4 方法学试验

2.4.1 破坏试验 分别精密量取 5 份拉坦前列素滴眼液样品 2 mL,其中 2 份分别加入 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 0.5 mL 和 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液 0.5 mL,放置 24 h 后中和,滤过;一份加 30%过氧化氢溶液 0.5 mL,放置 4 h;另外 2 份分别在 60℃下放置 6 h 和于强光下(4 500 lx)照射 48 h,取上述处理后的溶液各 20 μL 进样分析,结果拉坦前列素对酸、碱、高温、氧化破坏均不稳定,有降解产物产生,拉坦前列素的主要降解产物为拉坦前列素酸,对杂质 15S-拉坦前列素和 5,6-反式-拉坦前列素的测定无干扰。

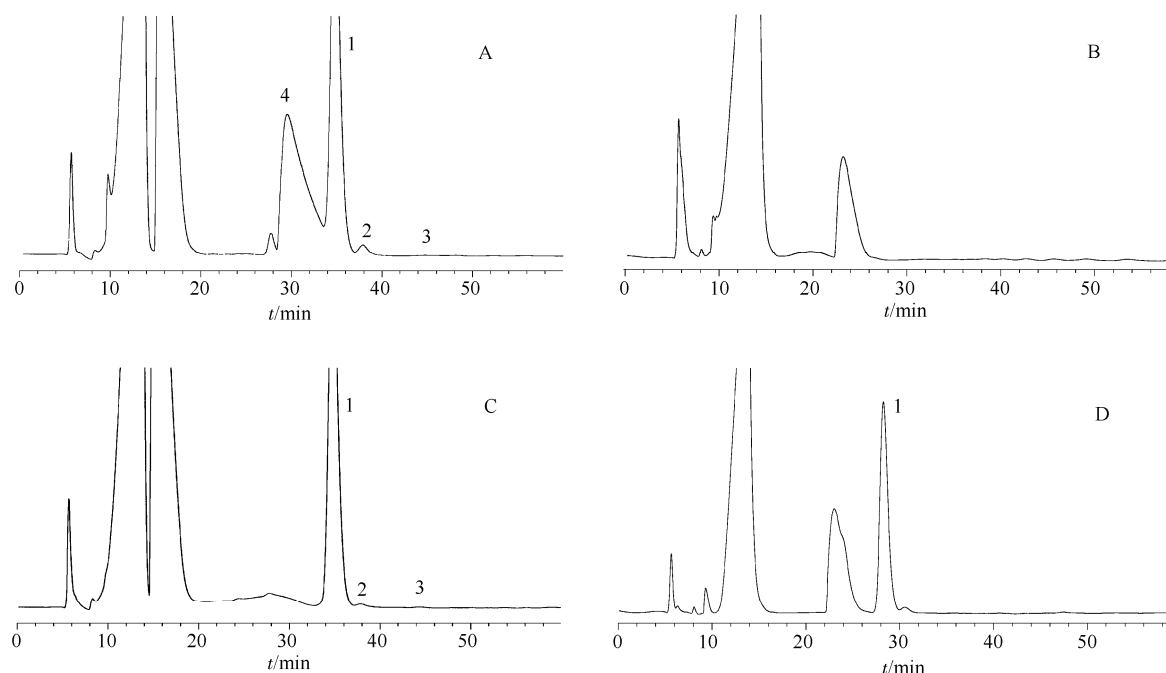


图1 HPLC 色谱图

A-系统适用性溶液；B-防腐剂辅料溶液；C-供试品溶液有关物质；D-供试品溶液；1-拉坦前列素；2-5,6-反式-拉坦前列素；3-15S-拉坦前列素；4-苯扎氯铵。

Fig. 1 The HPLC chromatogram

A-system suitability test solution; B-antiseptic and accessories solution; C-related substances; D-sample; 1-latanoprost; 2-5,6-trans-latanoprost; 3-15S-latanoprost; 4-benzalkonium chloride.

表1 有关物质和含量测定结果

Tab.1 Results of the related substances and assay

检测成分	批号									%
	60120503	60131001	60131002	60131003	74131024	130401	130402	130403	Z08325	
5,6-反式拉坦前列素	未检出	未检出	未检出	未检出	0.6	未检出	未检出	未检出		2.6
15S-拉坦前列素	未检出	未检出	未检出	未检出	0.3	未检出	未检出	未检出		0.2
拉坦前列素含量	94.3	91.9	92.5	92.9	94.3	93.9	94.3	95.4		97.4

2.4.2 线性关系考察 精密称取拉坦前列素、5,6-反式-拉坦前列素和 15S-拉坦前列素对照品各适量，加流动相溶解并稀释，制成一系列浓度的杂质对照品溶液，进样测定，色谱峰面积(A)与浓度(C)呈良好的线性关系，结果见表 2。本品中可能存在的已知杂质为 15S-拉坦前列素和 5,6-反式-拉坦前列素均能与拉坦前列素完全分离，与拉坦前列素的相对响应因子分别为 1.0 和 1.1，因此采用自身对照法测定，同时将 5,6-反式-拉坦前列素峰与主峰的分度度订入系统适用性要求。考虑到 15S-拉坦前列素对照品的难获得性，因此以相对保留时间定位。

2.4.3 定量限 通过逐级稀释，进样测定，确定拉坦前列素、5,6-反式拉坦前列素和 15S-拉坦前列素的定量限(S/N≈10)分别为 0.1, 0.1, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

本法设计的供试品溶液浓度，可满足有关物质检测的要求。

表2 线性关系

Tab. 2 Linear relationship

成分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	r
拉坦前列素	0.1~2.4	$A=1.73+73.66C$	0.999 3
5,6-反式-拉坦前列素	0.1~2.5	$A=1.63+74.23C$	0.999 5
15S-拉坦前列素	0.1~2.5	$A=-0.39+81.03C$	0.999 9

2.4.4 重复性试验 取批号为Z08325的拉坦前列素滴眼液的样品 6 份，平行测定 6 次，杂质 5,6-反式-拉坦前列素含量 RSD 为 2.2%；拉坦前列素的含量 RSD 为 0.9%，表明重复性良好。

2.4.5 溶液的稳定性 取有关物质供试品溶液，分别于 0, 3, 6, 12 h 进样测定，结果杂质总量分别为 0.87%, 0.87%, 0.87%, 0.88%，12 h 内杂质

总量没有明显增加；拉坦前列素峰面积分别为 792.8, 789.3, 793.1, 799.3, 796.8, 12 h 内拉坦前列素峰面积基本无变化，表明溶液稳定。

2.4.6 回收率试验 取有关物质供试品溶液适量，平均分成 9 份，分别加入设计的 3 个不同浓度的 5,6-反式-拉坦前列素和 15S-拉坦前列素对照品溶液，每个浓度 3 份，9 个测定结果，计算回收率，结果见表 3，平均回收率为 80%~120%，符合有关物质测定准确度的要求。

表 3 加样回收率测定结果

Tab. 3 Analysis results of recoveries (n=9)

有关物质	模拟浓度范围/%	加入量/mg	测定量/mg	回收率 %	平均回收率 %	RSD/%
5,6-反式-拉坦前列素	80	8.14	8.20	100.73	101.5	1.5
		8.14	8.19	100.66		
		8.14	8.19	100.67		
	100	10.18	10.42	102.36		
		10.18	10.40	102.19		
		10.18	10.68	104.97		
	120	12.22	12.39	101.40		
		12.22	12.15	99.43		
		12.22	12.39	101.41		
15S-拉坦前列素	80	9.38	9.24	98.54	99.5	1.1
		9.38	9.23	98.46		
		9.38	9.18	97.84		
	100	11.72	11.87	101.24		
		11.72	11.71	99.89		
		11.72	11.77	100.40		
	120	14.06	13.94	99.17		
		14.06	14.14	100.60		
		14.06	13.93	99.11		

按处方比例分别精密称取相当于标示量 80%，100%，120%的拉坦前列素对照品及相应量的辅料(苯扎氯铵、苯扎溴铵、吐温 80、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠)，加乙腈适量，振摇使拉坦前列素溶解，照确定的实验方法测定。设计 3 个不同的浓度进行测定，9 个测定结果，计算回收率，结果见表 4。可见本法的回收率较高，可用于拉坦前列素的含量测定。

表 4 拉坦前列素回收率测定结果(n=9)

Tab.4 Analytical results of latanoprost recoveries (n=9)

模拟浓度/%	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
80	9.78	9.74	99.61	98.8	0.6
	9.78	9.74	99.57		
	9.78	9.74	99.63		
100	12.22	12.02	98.38		
	12.22	11.99	98.12		
	12.22	12.00	98.21		
120	14.66	14.47	98.68		
	14.66	14.47	98.74		
	14.66	14.44	98.51		

3 讨论

本研究综合了各厂家的产品处方，考察了缓冲盐浓度、乙腈比例和柱温对拉坦前列素、苯扎氯铵 C14、吐温 80、5,6-反式-拉坦前列素色谱行为的影响，在拉坦前列素滴眼液原有进口注册标准基础上，改进和优化了色谱条件，使各成分峰间都得到了较好的分离。运用所建立的 HPLC，测定了来自国内 4 个厂家共 9 批拉坦前列素滴眼液中的有关物质和含量，方法切实可行，结果准确可靠，该方法基本可适用于国内所有厂家生产的拉坦前列素滴眼液的有关物质和含量测定，为该药品质量标准的提高提供了可靠的科学依据和参考。

REFERENCES

[1] 赵军梅, 钱军. 拉坦前列素滴眼液治疗青光眼[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 22(1): 38-40.

[2] 张禹华, 于海岩, 宋成君, 等. HPLC 法测定拉坦前列素滴眼液中苯扎氯铵的含量[J]. 中国科技博览, 2010, 22(1): 49-50.

[3] 中国药典. 四部[S]. 2015: 通则 9101.

[4] WIDOMSKI P, BARAN P, GOŁĘBIEWSKI P, et al. Validated liquid chromatographic method for analysis of the isomers of latanoprost [J]. Acta Chromatogr, 2008, 20(2): 157-164.

[5] PAN D J, CHEN Q F, ZHANG J D, et al. Determination of the related substances in Latanoprost Eye drops by NP-HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(9): 932-934.

[6] 郭妍, 殷莉莉, 廉英, 等. 反相高效液相色谱法测定拉坦前列素滴眼液的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(5): 475-477

收稿日期: 2017-02-11

(本文责编: 曹粤锋)