

HPLC 测定 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯中的手性杂质

刘萍, 张锁庆*, 张文胜, 郭金丽, 焦云飞, 孙玉双(华北制药河北华民药业有限责任公司, 石家庄 052165)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯中潜在的手性杂质[杂质 1: *L*-对羟基苯甘氨酸, 杂质 2: *L*-对羟基苯甘氨酸甲酯, 杂质 3: *D*-对羟基苯甘氨酸]的含量和限度。方法 采用 Crownpak CR(-)手性色谱柱(150 mm×4.0 mm, 5 μm); 流动相: 高氯酸溶液(pH 1.7)-甲醇(90:10); 检测波长为 226 nm; 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C。结果 杂质 1、杂质 2 和杂质 3 均在其定量限浓度~2.400 μg·mL⁻¹ 内线性良好(*r* 分别为 1.000 0, 0.999 9, 0.999 9), 平均回收率分别为 99.97%, 100.30% 和 103.18%, RSD 分别为 0.30%, 0.64% 和 0.62%(*n*=9)。结论 该方法专属性强, 准确、方便, 可以作为 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯中手性杂质 1、杂质 2 和杂质 3 的液相分析方法。

关键词: *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯; 手性杂质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)12-1731-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.019

引用本文: 刘萍, 张锁庆, 张文胜, 等. HPLC 测定 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯中的手性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1731-1733.

Determination of Chiral Impurities in *D*-hydroxyphenylglycine Methyl Ester by HPLC

LIU Ping, ZHANG Suoqing*, ZHANG Wensheng, GUO Jinli, JIAO Yunfei, SUN Yushuang(NCPC Hebei Pharma Co., Ltd., Shijiazhuang 052165, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of HPLC to determine the limit and content of potential chiral impurities: *L*-hydroxy phenyl glycine (impurity 1), *L*-hydroxyphenylglycine methyl ester (impurity 2) and *D*-hydroxyphenylglycine (impurity 3) in active pharmaceutical substance *D*-hydroxyphenylglycine methyl ester qualitatively and quantitatively. **METHODS** A Crownpak CR(-) chiral column (150 mm×4.0 mm, 5 μm) was used, with perchlorate solution (pH 1.7) -methanol (90:10) as the mobile phase with a flow rate at 0.7 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 226 nm, and the temperature of column was 25 °C. **RESULTS** The calibration curve for impurity 1, impurity 2 and impurity 3 were well linear in the range of LOQ concentration~2.400 μg·mL⁻¹ (*r* were 1.000 0, 0.999 9 and 0.999 9, respectively). Average recoveries for impurity 1, impurity 2 and impurity 3 were 99.97%, 100.30% and 103.18%, and RSDs were 0.30%, 0.64% and 0.62% (*n*=9), separately. **CONCLUSION** The method is highly specific, accurate and convenient, it can be used for the quality control of the chiral impurities 1, impurities 2 and impurities 3 of *D*-hydroxyphenylglycine methyl ester.

KEY WORDS: *D*-hydroxyphenylglycine methyl ester; chiral impurity; HPLC

D-对羟基苯甘氨酸甲酯是一种重要的医药中间体, 用于制备羟苄青霉素、羟苄头孢菌素和羟唑头孢菌素等 β-内酰胺类抗菌药物, 同时它也用于多种多肽类激素及农药的合成^[1]。作为中间体, 其中的手性杂质参与反应, 易造成后续 API 中产生手性杂质, 而国内外对其手性杂质的拆分鲜有文献报道, 仅有通过 HPLC 对对羟基苯甘氨酸甲酯中 *L*-对羟基苯甘氨酸甲酯拆分的研究^[2]。文献报道有对对羟基苯甘氨酸光学异构体的拆分, 但用到的方法是化学拆分法, 优先结晶法等, 并未采用 HPLC 拆分^[3]。本实验通过 HPLC 测定 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯中的手性杂质 *L*-对羟基苯甘氨酸(杂质 1)、*L*-对羟基苯甘氨酸甲酯(杂质 2)和

D-对羟基苯甘氨酸(杂质 3), 对 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯进行质量考察。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UV2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Crownpak CR(-) 手性色谱柱(150 mm×4.0 mm, 5 μm)(大赛璐公司)。

D-对羟基苯甘氨酸甲酯样品(山东汉兴医药科技有限公司, 批号: 1007-1609105, 1007-1609106, 1007-1609107); 杂质 1: *L*-对羟基苯甘氨酸对照品(批号: 6-JNT-5H, 含量: 98.0%); 杂质 2: *L*-对羟基苯甘氨酸甲酯对照品(批号: 169317L-HB-08, 含量: 83.69%)购自深圳斯坦德化工科技有限公司;

作者简介: 刘萍, 女, 硕士, 工程师 Tel: (0311)88152865 E-mail: zhangsqing@163.com

Tel: (0311)88152553 E-mail: lp5391253@126.com

*通信作者: 张锁庆, 男, 硕士, 高级工程师

杂质 3: *D*-对羟基苯甘氨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 130435-200502, 含量: 99.4%); *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯对照品(深圳斯坦德化工科技有限公司, 批号: 163317D-HB-08, 含量: 83.68%)。高氯酸为分析纯(天津市东方化工厂); 甲醇为色谱纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Crownpak CR(-) 手性色谱柱 (150 mm×4.0 mm, 5 μm); 流动相: 高氯酸溶液 (pH1.7)-甲醇(90:10); 检测波长: 226 nm; 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

杂质 1 溶液: 精密称取杂质 1 10 mg, 加流动相溶解并定容至 50 mL, 作为杂质 1 贮备液; 精密量取上述溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 浓度为 0.002 mg·mL⁻¹ 杂质 1 溶液。杂质 2、杂质 3 溶液的配制同杂质 1。

D-对羟基苯甘氨酸甲酯对照溶液: 精密称取 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯对照品 10 mg, 加流动相溶解并定容至 50 mL, 作为对照贮备液; 精密量取上述溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 浓度为 0.002 mg·mL⁻¹。

系统适用性溶液: 精密量取杂质 1、杂质 2、杂质 3 和 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯对照贮备液各 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得, 浓度为 0.002 mg·mL⁻¹。

供试品溶液: 精密称定 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯样品 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 检测波长选择

通过仪器全波长扫描, *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯和 *D*-对羟基苯甘氨酸的最大吸收波长均在 (226±2)nm, 因此选择最佳检测波长为 226 nm。

2.4 流动相选择

由于杂质 1、杂质 2、杂质 3 及 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯在水中的溶解度较小, 易溶于酸性溶液中, 本实验比较了 pH 值为 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6 的高氯酸溶液-甲醇(95:5)的流动相对分离度的影响, 结果显示当高氯酸溶液的 pH 值为 1.7 时分离度较好, 但杂质 2 峰形中包裹空白溶液中的溶剂峰, pH 值继续降低分离度改善不大且不能将杂质 2 与空白溶液中的溶剂峰分离, 故对高氯酸

溶液-甲醇的比例进行优化。该色谱柱明确规定有机溶剂只能用甲醇, 体积比要<15%。优化确定高氯酸溶液(pH 1.7)-甲醇(90:10)作为流动相, 溶剂峰对杂质 2 无干扰, 且主峰与这 3 种杂质能达到有效分离。

2.5 系统适用性试验

取空白溶液、系统适用性溶液和供试品溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1。在该色谱条件下出峰顺序依次为 *L*-对羟基苯甘氨酸、*L*-对羟基苯甘氨酸甲酯、*D*-对羟基苯甘氨酸和 *D*-对羟基苯甘氨酸甲酯。各杂质及其相邻峰之间的分离度>1.5, 主峰与这 3 种杂质能达到有效分离, 空白溶剂不干扰测定。结果见表 1。

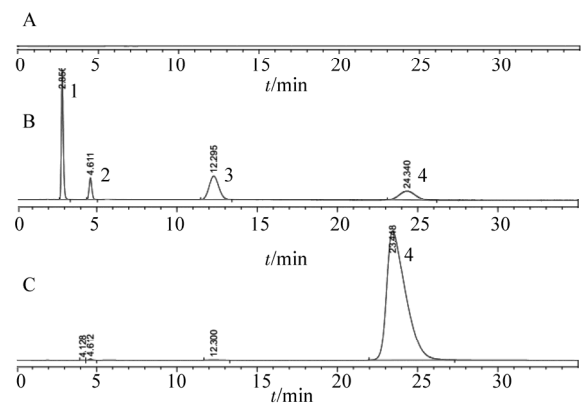


图 1 HPLC 色谱图

A-空白溶液; B-系统适用性溶液; C-供试品溶液; 1-*L*-对羟基苯甘氨酸; 2-*L*-对羟基苯甘氨酸甲酯; 3-*D*-对羟基苯甘氨酸; 4-*D*-对羟基苯甘氨酸甲酯。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank; B-system solution; C-sample solution; 1-*L*-hydroxy phenyl glycine; 2-*L*-hydroxyphenylglycine methyl ester; 3-*D*-hydroxy phenyl glycine; 4-*D*-hydroxy phenyl glycine methyl ester.

表 1 系统适用性试验结果

Tab. 1 Results of system applicability test

名称	<i>t</i> /min	分离度
<i>L</i> -对羟基苯甘氨酸	2.856	/
<i>L</i> -对羟基苯甘氨酸甲酯	4.611	1.61
<i>D</i> -对羟基苯甘氨酸	12.295	2.67
<i>D</i> -对羟基苯甘氨酸甲酯	24.340	1.98

2.6 耐用性试验

精密吸取系统适用性溶液和供试品溶液, 分别在流速变化(±0.1 mL·min⁻¹)、色谱柱温度变化(±5 °C)、检测波长变化(±5 nm)、流动相比比例变化(±20%)等色谱条件下进行测定。测得系统适用性均满足要求, 杂质 1、杂质 2、杂质 3 含量变化均<±0.1%。结果表明在其他条件不变的前提下, 流速、柱温、检测波长、流动相比比例的微小变化

对样品中手性杂质含量测定和色谱峰分离均无明显的影响,说明该方法的耐用性较好。

2.7 检测限与定量限

分别取杂质 1、杂质 2 和杂质 3 贮备液,用流动相逐级稀释成不同浓度,按“2.1”项下色谱条件分别进样检测,观察色谱峰与噪声的响应,测得检测限(信噪比(S/N)=3)和定量限(信噪比(S/N)=10)。取定量限溶液重复进样 6 次,计算主峰峰面积的 RSD 值作为定量限重复性的结果。检测限、定量限及定量限重复性试验结果见表 2。

表 2 检测限、定量限及定量限重复性试验结果

Tab. 2 Result of LOD, LOQ and LOQ repeatability test

名称	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
杂质 1	0.005 052	0.016 30	6.48
杂质 2	0.009 371	0.028 40	3.83
杂质 3	0.023 890	0.095 56	8.07

2.8 线性试验

分别精密称取杂质 1、杂质 2 和杂质 3 贮备液,加流动相稀释制成定量限~120%杂质溶液浓度的溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样检测,记录色谱图。以浓度(x)对峰面积(y)作线性回归,回归方程及相关系数(r)见表 3。结果表明在此范围内其线性关系良好。

表 3 线性试验结果

Tab. 3 Result of the linear test

名称	回归方程	相关系数(r)	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
杂质 1	$y=89\,957.17x+0.317\,5$	1.000 0	0.0163 0~2.400
杂质 2	$y=66\,197.54x-0.110\,6$	0.999 9	0.0284 0~2.400
杂质 3	$y=87\,039.99x+0.684\,1$	0.999 9	0.0955 6~2.400

2.9 仪器精密度试验

分别精密量取杂质 1、杂质 2 和杂质 3 溶液,重复进样 6 次,计算其峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.08%, 0.09%, 0.26%, 表明仪器精密度良好。

2.10 中间精密度试验

按“2.1”项下方法于不同时间、不同仪器及不同操作人员,取 D-对羟基苯甘氨酸甲酯样品(批号: 1007-1609105),平行制备 6 份供试品溶液进行测定,计算手性杂质峰面积 RSD;按面积归一化法计算供试品溶液手性杂质含量 RSD 值。重复性试验中杂质 2 和杂质 3 峰面积的 RSD($n=6$)分别为 2.75%和 6.56%,手性杂质含量 RSD($n=6$)分别为 0.29%和 3.45%。中间精密度试验中杂质 2 和杂质 3 峰面积的 RSD($n=12$)分别为 3.44%和 5.28%,手性杂质含量 RSD($n=12$)分别为 0.32%和 5.29%。

供试品溶液中均未检出 L-对羟基苯甘氨酸。说明该方法精密度较高。

2.11 稳定性试验

将供试品溶液于 4℃条件下放置,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h,按“2.1”项条件进样检测。杂质 2 和杂质 3 峰面积的 RSD($n=7$)分别为 0.44%和 12.95%,手性杂质含量变化绝对值分别为 0 和 0.05%,供试品溶液中未检出杂质 1。表明供试品溶液在 4℃条件下 12 h 内稳定性良好。

2.12 回收率试验

取 D-对羟基苯甘氨酸甲酯样品(批号: 1007-1609105)20 mg 与 100 mL 量瓶中,分别加入杂质 1、杂质 2 和杂质 3 贮备液 0.8, 1.0 和 1.2 mL,作为加样回收溶液,即 80%, 100%和 120%的回收率溶液($n=9$)。杂质 1、杂质 2 和杂质 3 的平均回收率分别为 99.97%, 100.30%和 103.18%, RSD 分别为 0.30%, 0.64%和 0.62%。表明其回收率好。

2.13 样品的测定

取 3 批 D-对羟基苯甘氨酸甲酯样品,按“2.2”项下的供试品溶液进行配制,进样检测,以面积归一化法计算含量。结果见表 4。

表 4 样品测定结果

Tab. 4 Result of the determination of sample %

名称	1007-1609105	1007-1609106	1007-1609107
杂质 1	未检出	未检出	未检出
杂质 2	0.14	0.17	0.13
杂质 3	0.12	0.11	0.11

3 讨论

本实验采用 Crownpak CR(-)手性色谱柱,以高氯酸溶液(pH 1.7)-甲醇(90:10)为流动相,能够有效检测 D-对羟基苯甘氨酸甲酯中手性杂质 1、杂质 2 和杂质 3 的含量。该方法专属性强,准确、方便,为 D-对羟基苯甘氨酸甲酯及相关药品质控提供了重要的科学依据。

REFERENCES

- [1] TAKAHASLI S, OHASAI T, KII Y, et al. Microbial transformation of hydantoins to N-carbamyl-D-amino acids [J]. J Ferment Technol, 1979, 57(4): 328.
- [2] LI C P. High performance liquid chromatographic separation of drug enantiomer using chiral mobile phase additives [D]. Hangzhou: Pharmaceutical Science College, Zhejiang University of Technology, 2003.
- [3] 任国宾, 詹予忠, 陈宜假, 等. 对羟基苯甘氨酸的合成及拆分技术进展[J]. 精细化工中间体, 2002, 32(1): 8-11.

收稿日期: 2017-06-05

(本文责编: 李艳芳)