

HPLC 测定异维 A 酸有关物质

唐杨(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定异维 A 酸有关物质的方法。方法 色谱柱为 NUCLEOSIL 100-3 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3 μm), 以甲醇-水-冰醋酸(770:225:5)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 25 °C, 检测波长为 355 nm。结果 异维 A 酸峰与杂质 H、I、维 A 酸、强制降解杂质峰分离良好; 异维 A 酸、杂质 H、I 和维 A 酸的线性范围分别为 0.000 545 5~21.82 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.002 856~7.14 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 0$), 0.002 789~6.97 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 1$), 0.017 07~22.76 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 6$); 检测限分别为 0.27, 0.60, 0.65, 5.50 ng·mL⁻¹, 定量限分别为 0.55, 2.85, 2.80, 17.00 ng·mL⁻¹; 杂质 H、I 和维 A 酸的平均回收率分别为 101.57%, 102.02%, 101.03%, RSD 分别为 0.5%, 0.8%, 1.5%。结论 建立的 HPLC 方法准确、专属性强, 可用于异维 A 酸有关物质的测定。

关键词: 异维 A 酸; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)01-0041-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.01.009

引用本文: 唐杨. HPLC 测定异维 A 酸有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 41-44.

Determination of Related Substances of Isotretinoin by HPLC

TANG Yang(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for related substances determination of isotretinoin by HPLC. **METHODS** NUCLEOSIL 100-3 C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 3 μm) was used. The mobile phase was consisted of methanol-water-glacial acetic acid(770:225:5) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 25 °C, and detection wavelength was 355 nm. **RESULTS** Chromatographic peaks of isotretinoin and impurity H, I, tretinoin, degradation impurities were separated. Linear ranges of isotretinoin, impurity H, I and tretinoin were 0.000 545 5-21.82 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.002 856-7.14 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 0$), 0.002 789-6.97 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 1$), 0.017 07-22.76 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 6$), respectively; LODs were 0.27, 0.60, 0.65, 5.50 ng·mL⁻¹; LOQs were 0.55, 2.85, 2.80, 17.00 ng·mL⁻¹. Average recoveries of impurity H, I and tretinoin were 101.57%, 102.02%, 101.03%, and RSDs were 0.5%, 0.8%, 1.5%. **CONCLUSION** The HPLC method is accurate, specific and reliable for determination of related substances of isotretinoin.

KEYWORDS: isotretinoin; related substances; HPLC

异维 A 酸又名 13-顺式维 A 酸, 最早由瑞士 Roche 公司开发, 于 1983 年 7 月首次在美国上市, 用于治疗中重度痤疮、恶性肿瘤等^[1-2]。本品收载于中国药典 2015 年版^[3]、EP 9.0^[4]、USP40-NF35^[5], 其有关物质测定的研究尚未见报道。现行质量标准中有关物质缺少已知杂质 H、I 和其他单个杂质的控制。为提高我国药典标准, 笔者参考 EP 收载的有关物质测定方法, 结合我国原料药的实际情况, 建立了 HPLC 测定异维 A 酸有关物质的方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters 2489 UV 检测器, Waters 2998 PDA 检测器; XPE205 十万分之一分析天平(梅特勒-托利多公司); BSA224S-CW 万分之一分析天平(赛多

利斯公司); Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

甲醇(色谱纯, 安徽时联特种溶剂股份有限公司); 冰醋酸(分析纯, 重庆川东化工有限公司); 水(自制超纯水); 其他试剂均为分析纯。异维 A 酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100224-200903; 含量: 99.8%), 杂质 H 对照品(TLC 公司, 批号: 1693-045A2; 含量: 100.0%); 杂质 I 对照品(TLC 公司, 批号: 2659-023A1; 含量: 100.0%); 维 A 酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100307-201403; 含量: 99.9%), 异维 A 酸分别来自 A, B, C 公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 避光操作。取维 A 酸

基金项目: 国家药典委员会国家药品标准提高研究项目(食药监办药化管[2016]141 号)

作者简介: 唐杨, 女, 硕士, 主管药师

Tel: (023)86072743

E-mail: tutt_007@163.com

对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成每1 mL中含5 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的配制 避光操作。取本品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释制成每1 mL中含1 mg的溶液,作为供试品溶液。

2.1.3 对照溶液的配制 避光操作。精密量取供试品溶液1 mL,置100 mL棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.1.4 系统适用性溶液的配制 避光操作。称取杂质H和杂质I对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成每1 mL中各含3 μg 的混合溶液,作为系统适用性溶液。

2.2 HPLC分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 NUCLEOSIL 100-3 C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 3 μm), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为355 nm, 柱温为25 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为20 μL , 流动相为甲醇-水-冰醋酸(770:225:5)。

2.2.2 系统适用性试验 精密量取系统适用性溶液20 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件测定,结果见图1。杂质H、I的分离度应>1.5。

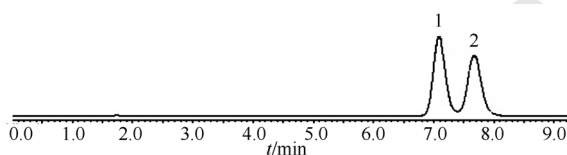


图1 系统适用性色谱图

1-杂质H; 2-杂质I。

Fig. 1 HPLC chromatogram of system suitability

1-impurity H, 2-impurity I.

2.2.3 专属性试验 取本品约10 mg,精密称定,

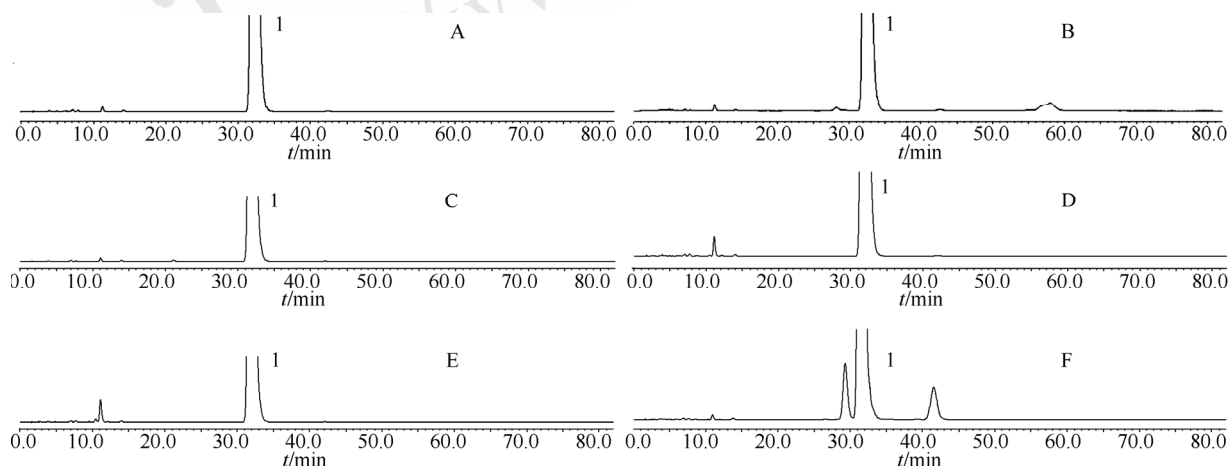


图2 专属性试验色谱图

A-未降解样品溶液; B-酸降解; C-碱降解; D-氧化降解; E-高温降解; F-光照降解; 1-异维A酸。

Fig. 2 HPLC chromatogram of specificity test

A-undegraded sample solution; B-acid degradation; C-alkaline degradation; D-oxidative degradation; E-high temperature degradation; F-light degradation; 1-isotretinoin.

置10 mL具有刻线的离心管中(除光照外,其他降解条件均需避光操作),按以下方法进行强制降解试验①酸降解:加0.5 mol·L⁻¹盐酸甲醇溶液0.1 mL,室温放置7 h,中和后,加甲醇适量超声使溶解并稀释至刻度;②碱降解:加0.5 mol·L⁻¹氢氧化钠甲醇溶液0.1 mL,室温放置7 h,中和后,加甲醇适量超声使溶解并稀释至刻度;③氧化降解:加30%过氧化氢溶液0.2 mL,室温放置7 h,加甲醇适量超声使溶解并稀释至刻度;④高温降解:取本品适量于110 $^{\circ}\text{C}$ 破坏1 h,放冷,精密称取约10 mg置10 mL具有刻线的离心管中,加甲醇适量超声使溶解并稀释至刻度;⑤光照降解:取供试品溶液适量置透明进样瓶中,置3 000 lx白炽灯光下破坏3 min。精密量取20 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件测定,结果见图2。

专属性试验结果表明,本品在酸、碱、氧化、高温、光照下均有不同程度的降解,各降解杂质与主峰分离良好,主峰纯度符合要求。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系及杂质校正因子 避光操作。精密称取异维A酸对照品10.91 mg,置10 mL量瓶中;维A酸对照品11.38 mg,置100 mL量瓶中;杂质H、I对照品11.90, 11.62 mg,分别置200 mL量瓶中;各加甲醇适量超声使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为线性储备液。分别精密量取上述溶液适量,加甲醇逐级稀释制成线性梯度溶液,以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,得各自的线性方程,并计算校正因子,结果见表1。

表 1 线性试验结果和相对校正因子

Tab. 1 Results of linearity test and relative correction factor

组分名称	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性方程	相关 系数	校正 因子
异维 A 酸	0.000 545 5~21.82	$Y=154\ 734\ 825X-10\ 891$	0.999 9	/
杂质 H	0.002 856~7.14	$Y=156\ 984\ 987X-9\ 015$	0.999 0	0.99
杂质 I	0.002 789~6.97	$Y=149\ 300\ 765X-9\ 028$	0.999 1	1.04
维 A 酸	0.017 07~22.76	$Y=172\ 838\ 963X-22\ 796$	0.999 6	0.90

2.3.2 检测限及定量限 分别取异维 A 酸、杂质 H、I 和维 A 酸对照品,用甲醇逐级稀释后,按 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 测定检测限和定量限。结果检测限分别为 0.27, 0.60, 0.65, 5.50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量限分别为 0.55, 2.85, 2.80, 17.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 重复性试验 取 A 公司同一批供试品(批号: IST-20151207),按“2.1.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析。结果杂质 H、I 和维 A 酸及其他最大单杂、除维 A 酸外的其他总杂含量的 RSD 分别为 1.3%, 4.4%, 4.9%, 6.4%, 3.7%。

2.3.4 仪器精密度试验 取“2.3.3”项下的自身对照溶液,连续进样 6 次,主成分的峰面积 RSD 为 0.3%。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样,结果供试品溶液于 2 h 最大单杂超过限度 0.2%,其他已知杂质无明显增长,供试品溶液需临用新配。

2.3.6 耐用性试验 分别考察了多根不同批号、粒径、长度的色谱柱,包括 NUCLEOSIL 100-3 C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm); Waters[®] SPHERISORB[®] ODS1 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm); Waters[®] SPHERISORB[®] ODS2 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm); HYPERSIL C_{18} (4.6 mm $\times$ 100 mm, 3 μm); CAPCELL PAK C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); Sunfire TM C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),结果仅 NUCLEOSIL 100-3 C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm) 对杂质 H、I 分离度 >1.5 ,且主峰保留时间适宜(30 min 左右),故建议指定色谱柱。波长变化 $\pm 2\text{ nm}$ 、流速变化 $\pm 0.1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、不同型号 HPLC 仪(Waters 2695、Agilent1100)对测定结果基本无影响;增加水相比比例、降低柱温有利于杂质 H、I 的分离,反之分离度可能不符合要求。

2.3.7 加样回收试验 避光操作。称取 9 份 A 公司样品(批号: IST-20151207)适量,置 10 mL 棕色量瓶中,分别精密加入低、中、高 3 个浓度杂质对照品储备液各 3 份,按拟定的方法处理和测定。结果见表 2。

表 2 杂质 H、I 和维 A 酸回收率试验结果($n=9$)Tab. 2 Recovery results of impurity H, I and tretinoin($n=9$)

组分名称	称样量/ mg	加入量/ μg	测定量/ μg	回收率/ %	平均回收率/%	RSD/ %
杂质 H	10.32	17.85	18.20	101.96	101.57	0.5
	10.37	17.85	18.08	101.29		
	10.73	17.85	18.14	101.62		
	10.13	35.70	36.17	101.32		
	10.76	35.70	36.41	101.99		
	10.26	35.70	36.24	101.51		
	10.52	53.55	53.94	100.73		
	10.25	53.55	54.80	102.33		
	10.21	53.55	54.29	101.38		
杂质 I	10.32	17.43	17.93	102.87	102.02	0.8
	10.37	17.43	17.99	103.21		
	10.73	17.43	17.99	103.21		
	10.13	34.86	35.38	101.49		
	10.76	34.86	35.35	101.41		
	10.26	34.86	35.27	101.18		
	10.52	52.29	53.19	101.72		
	10.25	52.29	53.23	101.80		
	10.21	52.29	52.98	101.32		
维 A 酸	10.41	26.87	27.37	101.86	101.03	1.5
	10.15	26.87	26.87	100.00		
	10.40	26.87	26.88	100.04		
	10.07	55.65	55.69	100.07		
	10.79	55.65	55.18	99.16		
	10.33	55.65	55.55	99.82		
	10.20	83.48	85.83	102.82		
	10.07	83.48	85.53	102.46		
	10.20	83.48	86.00	103.02		

2.4 样品有关物质的测定

精密量取“2.1”项下的系统适用性溶液、供试品溶液、对照溶液、对照品溶液各 20 μL 进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。供试品溶液的色谱图中如有与维 A 酸峰保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,不得过 0.5%;杂质 H、杂质 I 不得大于对照溶液主峰面积的 0.3 倍(0.3%),其他单个杂质不得大于对照溶液主峰面积的 0.2 倍(0.2%);除维 A 酸外,其他各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积(1.0%)。结果见表 3。

表 3 异维 A 酸有关物质的测定结果

Tab. 3 Results of related substances of Isotretinoin

生产商	批号	杂质 H/%	杂质 I/%	维 A 酸/%	其他最大单杂/%	除维 A 酸外的其他总杂/%
A 公司	IST-20151207	0.048	0.033	0.042	0.094	0.22
A 公司	IST-20150102	0.070	0.015	0.062	0.056	0.18
A 公司	IST-20151208	0.053	0.025	0.046	0.088	0.24
B 公司	20160504	0.039	0.029	0.006	0.17	0.33
B 公司	20160201	0.036	0.059	0.012	0.29	0.56
C 公司	160501	0.082	0.065	0.019	0.25	0.54
C 公司	170102	0.032	0.012	0.019	0.06	0.29

3 讨论

采用二极管阵列检测器,在 200~400 nm 内全波长扫描,采集异维 A 酸及其杂质光谱图。结果显示,杂质 H、I 和异维 A 酸及维 A 酸(杂质 A)最大测定波长分别为 362, 353, 356 和 356 nm,结合 EP 本品有关物质测定采用 355 nm,最终确定测定波长为 355nm。

已知杂质 H、I 在样品中均有检出,因出峰时间非常接近(相对保留时间 0.22 和 0.24),用相对保留时间定位不准确,故选用杂质对照品定位;当 H、I 的分离度达到 1.5,可以保证光降解杂质(相对保留时间 0.93)、维 A 酸(相对保留时间 1.32)与主峰的分离度也>1.5,故系统适用性试验仅规定杂质 H、I 的分离度。各已知杂质的校正因子均在 0.9~1.1 限度范围内,均可采用自身对照法定量;但鉴于维 A 酸杂质对照品中检院有售,优选对照品法定量。

供试品溶液的稳定性受室温影响大,夏季(室温 35 ℃左右)杂质 G(相对保留时间 0.35)增长明显,2 h 内从 0.14%增长至 0.30%,8 h 达到 0.84%,

冬季(室温 10 ℃左右)该杂质在 8 h 内从 0.09%增长至 0.14%;鉴于拟定标准中其他单杂限度低,杂质 G 作为其他单杂易超过限度,建议供试品溶液临用新配。杂质 H、I 对照品混合溶液的稳定性也受室温影响,夏季 1 d 左右 2 个杂质均有不同程度的降解,冬季可存放 2 d 以上;如果分别配制 H、I 杂质对照品储备液(约 50 μg·mL⁻¹),避光保存于冰箱冷藏室,至少可放置 2 个月(后续稳定性尚在考察中),临用前混合以配制系统适用性溶液。

REFERENCES

- [1] LUO Y. Study progress of isotretinoin its clinical application. [J]. J Zhejiang Ocean Univ(Nat Sci)(浙江海洋学院学报:自然科学版), 2006, 25(4): 457-460.
- [2] 忻祥法. 异维 A 酸临床研究的进展[J]. 上海医药, 2003, 24(9): 407-408.
- [3] 中国药典. 二部[S]. 2015: 415-416.
- [4] EP 9.0 Vol. II [S]. 2017: 2825-2826.
- [5] USP 40-NF35 [S]. 2017: 4720-4721.

收稿日期: 2018-03-26

(本文责编: 曹粤锋)