

HPLC 分离阿立哌唑有关物质的方法学研究

查建蓬, 许慧君, 王云志, 杨双革, 贾彩霞, 侯志飞(河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立阿立哌唑有关物质分离的 HPLC。方法 采用反相 C₈ 色谱柱, 在室温条件下, 以甲醇 211.5% 三乙胺(用醋酸调节 pH 5.6)(80B20)为流动相, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 257 nm, 进样体积 10 LL。结果 阿立哌唑与中间体 Ñ、中间体 Ò 及其降解产物均能较好的分离, 理论板数大于 4 200, 且线性良好(r 分别为 0.999 0, 0.999 6, 0.999 8)。中间体 Ñ 和中间体 Ò 的最低检测限分别为 31.0 和 31.3 ng。日内、日间 RSD 分别为 21.3% 和 31.1%。结论 本法可有效分离阿立哌唑有关物质及降解产物, 灵敏度高, 专属性强, 可用于阿立哌唑有关物质及降解产物检查。

关键词: 阿立哌唑; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1001- 2494(2005)02- 0137- 03

Study on a high performance liquid chromatographic method for the separation of substances related to aripiprazole

ZHA Jianpeng, XU Hu2jun, WANG Yun2zhi, YANG Shuang2ge, JIA Cai2xia, HOU Zhi2fei(School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high performance liquid chromatographic method for the separation of substances related to aripiprazole with UV detection. METHODS The chromatographic column of Inertsil C₂₃ was used. The mobile phase consisted of methanol 211.5% triethylamine (80B20, adjusted to pH 5.6 with acetic acid) and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 257 nm. RESULTS Aripiprazole, intermediate Ñ, Ò and degradation products were separated. The calibration curves of aripiprazole, intermediate Ñ and Ò were linear (r = 0.999 0, 0.999 6, 0.999 8). The detection limits were 31.0 ng for intermediate Ñ and 31.3 ng for intermediate Ò, respectively. Good results were obtained for the within day and day to day validation (21.3% and 31.1%, respectively). CONCLUSION The method was proved to be sensitive and selective for the separation of aripiprazole. It may be applied in pharmaceutical preparations for the examination of the impurities and degradation products.

KEY WORDS: aripiprazole; related substances; HPLC

阿立哌唑(aripiprazole, {4-[4-(2, 3-二氯苯基)-2-哌嗪基]-丁氧基}-2, 3, 4-二氢-2H-1, 2-喹啉酮) 为喹啉酮衍生物, 属于第三代非典型抗精神病药物, 2002 年底在国外首次上市^[1~2]。目前国内尚无厂家生产, 阿立哌唑有关物质的分析方法也未见报道。为了控制合成工艺中带入的杂质和降解产物, 保证阿立哌唑用药安全有效, 本实验建立了 HPLC 分离阿立哌唑合成中间体及降解产物的方法, 该方法简便快速、专属性好、灵敏度高。

1 材料与仪器

1.1 仪器与试剂

KNAUER 液相色谱仪(北京绿绵科技有限公司); 泵 K 21001、UV 检测器 K 22501、溶剂组合器 K 21500 (北京绿绵科技有限公司); BF 22002 色谱工作站。

阿立哌唑(河北医科大学药学院药化教研室

20030701, 20030702, 20030703); 阿立哌唑对照品(自制, 由原料用乙醇回流重结晶制得, 纯度为 99.17%); 72-(4-溴代丁氧基)-2, 3, 4-二氢喹啉酮(简称中间体 Ñ) 和 12-(2, 3-二氯苯基)-哌嗪(简称中间体 Ò)(合成中间体, 河北医科大学药学院药化教研室, 纯度均为 99.10%); 三乙胺、冰醋酸为分析纯; 甲醇为色谱纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Inertsil C₂₃ 柱(416 mm @250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 211.5% 三乙胺(用冰醋酸调节 pH 5.6)(80B20); 检测波长: 257 nm; 进样体积 10 LL。

1.3 样品溶液的配制

取阿立哌唑样品 8 mg 用适量稀醋酸溶解, 并以流动相精密加至 10 mL, 为甲液。精密吸取甲液 110 mL 于 100 mL 量瓶中, 加流动相定容, 为乙液。

作者简介: 查建蓬, 男, 教授 Tel: (0311)6266335 Fax: (0311)6052053 E2mail: zjp60@sina.com

2 方法与结果

211 色谱条件的建立

阿立哌唑为含氮化合物,以 Hypersil C₁₈柱为固定相,以不同比例的甲醇、乙腈、水作为流动相,进行色谱实验,阿立哌唑均有不同程度的拖尾。采用 Inertsil C₈23 柱(416 mm @250 mm, 5 Lm),以甲醇211 5% 三乙胺(用醋酸调节 pH 516) (80B20) 为流动相,阿立哌唑峰形对称,阿立哌唑及杂质峰的保留时间适中,且分离效果良好。见图 1。

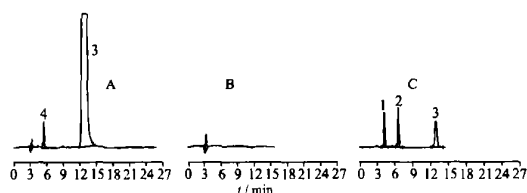


图 1 色谱图

A- 供试品溶液; B- 空白溶液; C- 对照品溶液; 1- 中间体 $\tilde{\text{O}}$; 2- 中间体 $\tilde{\text{N}}$; 3- 阿立哌唑; 4- 杂质

Fig 1 Chromatograms of the assay

A- sample solution; B- blank solution; C- standard; 1- intermediate $\tilde{\text{O}}$; 2- intermediate $\tilde{\text{N}}$; 3- aripiprazole; 4- impurity

212 有关物质检查方法及其限量的确定^[3]

取乙液 10 LL 进样,调整系统灵敏度,使色谱峰为满量程的 30%。阿立哌唑保留时间约为 12 min,拖尾因子 1123,与相邻杂质峰的分度大于 213,理论塔板数大于 4 200。以流动相为空白,甲液、乙液各分别进样 10 LL。在甲液色谱图中,任何 1 个杂质峰的面积不得大于乙液色谱中主峰面积的一半(有关物质小于 015%),各杂质峰面积之和不得大于乙液色谱中主峰面积(有关物质小于 110%)。计算中扣除溶剂峰。

213 专属性实验

将中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和 $\tilde{\text{O}}$ 及阿立哌唑对照品,用流动相制成适宜浓度的溶液,进样记录色谱图。阿立哌唑与中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和 $\tilde{\text{O}}$ 有较好的分离,见图 1C。

214 破坏性实验

取本品适量,分别加 011 mol#L⁻¹ 盐酸溶液和 011 mol#L⁻¹ 氢氧化钠溶液,于 100 e 水浴加热 45 min,中和至中性;取本品适量,加流动相溶解,于 100 e 水浴加热 45 min;取本品适量,加 30% 过氧化氢 1 mL,分别于室温条件避光放置 2 h 和 3 d;取本品适量,置 4 500 lx 强光下 5 d。以上试样取 10 LL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。在加热、强光照破坏试验中均未见阿立哌唑降解产物峰;而在强酸、强碱破坏试验中可见少量降解产物峰;氧化破坏产生降解产物较明显。在确定的色谱条件下,阿立哌唑与

其降解产物的分离良好。

215 线性关系

分别取阿立哌唑及中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和 $\tilde{\text{O}}$ 适量,制成浓度为 40, 916, 1218 Lg#mL⁻¹ 的溶液,用流动相对半稀释成 6 个浓度,精密吸取 10 LL 进样,记录峰面积,进行线性回归。结果见表 1。

表 1 阿立哌唑、中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和中间体 $\tilde{\text{O}}$ 线性关系

Tab 1 Results of linearity

样品	浓度范围/Lg#mL ⁻¹	线性方程	相关系数
阿立哌唑	1125~ 40	A= 1 4211 3c+ 5 10217	01999 0
中间体 $\tilde{\text{N}}$	013~ 916	A= 15 464c- 2 1761 6	01999 6
中间体 $\tilde{\text{O}}$	014~ 1218	A= 11 995c- 1 2831 2	01999 8

216 精密度实验

取/2130项下实验用溶液重复进样 5 次,进样量 10 LL,按峰面积计算中间体 $\tilde{\text{N}}$,中间体 $\tilde{\text{O}}$ 和阿立哌唑的 RSD 分别为 018%, 111% 和 110%。

217 最低检测限实验

当信噪比为 3 时,中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和中间体 $\tilde{\text{O}}$ 的最低检测限分别为 310 和 313 ng,当阿立哌唑纯度检查采用的浓度为 018 mg#mL⁻¹ 时,各有关物质最低检测限为 0102%。

218 重复性实验

取同一供试品溶液(018 mg#mL⁻¹),分别进样 5 次,进样量 10 LL,按总杂质峰面积计算日内及日间差异,结果日内差异 RSD 为 213%,日间差异 RSD 为 311%。

219 有关物质测定

取适量原料样品用稀醋酸振摇溶解,加流动相定容,制成 018 mg#mL⁻¹ 的溶液,过滤(0145 Lm 滤膜),取续滤液进样,进样体积 10 LL。未检测到中间体 $\tilde{\text{N}}$ 和中间体 $\tilde{\text{O}}$ 。各批样品有关物质按不加校正因子的主成分自身对照法进行计算,结果均小于 1%。样品 20030701, 20030702, 20030703 中总杂质量分别为 0139%, 0143%, 0139%。

本法可检出阿立哌唑有关物质和降解产物,因此可作为其杂质及降解产物的检查方法。

3 讨论

311 阿立哌唑在甲醇介质中,最大紫外吸收波长为 218 和 257 nm。经二极管阵列检测器三维色谱图确认,257 nm 对杂质峰的检测也是适宜的。

312 本品在水中不溶,在乙醇中微溶,在丙酮中略溶,在氯仿中易溶。用流动相作溶剂,样品溶解度较小,达不到有关物质测定对样品浓度的要求。实验表明,加入适量的稀醋酸[醋酸2水(1B1)]能增加本品的溶解度。因此,选择用适量稀醋酸先将样品溶

解,再加流动相定容的方法溶解样品。

313 用乙腈为流动相,也可以达到较好的分离,但乙腈价格较高,最终选用甲醇2115%三乙胺(80B20)(醋酸调至 pH 516)作为流动相。

314 加入 115%的三乙胺溶液可以消除阿立哌唑的拖尾现象。阿立哌唑为胺碱性化合物, pH 对保留时间影响较大,而三乙胺与醋酸形成的缓冲体系可以起到稳定 pH 的作用。

315 用二极管阵列检测器对供试品溶液中阿立哌

唑及其破坏性试验中的阿立哌唑色谱峰进行了峰纯度检查,阿立哌唑色谱峰的纯度均符合要求。

316 通过实验发现,阿立哌唑样品中检测出的杂质(见图 1 中峰 4)既不是合成中间体,也不是降解产物,因此有可能是合成中的反应副产物。

参考文献

- [1] 瞿发林,王焕林 1 抗精神病药阿立哌唑[J]1 世界临床药物, 2003, 24(9): 5711
 - [2] 孙爱凤,吴范宏 1 阿立哌唑[J]1 中国新药杂志,2003, 12(7):5711
 - [3] 中国药典 2000 年版1 二部[S]1 2000:附录 0 D1
- (收稿日期:20040623)