

醋酸亮丙瑞林杂质谱研究和有关物质 HPLC 分析方法建立

赵丽佳^{1,2}, 俞炯², 蒋惠娣^{1*}

(1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 中肽生化有限公司, 杭州 310018)

摘要 目的: 通过对醋酸亮丙瑞林的杂质谱研究, 建立基于杂质谱的有关物质 HPLC 分析方法。**方法:** 采用全覆盖键合硅胶色谱柱 [Sepax GP-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm)], 以三乙胺缓冲液 - 正丙醇乙腈混合溶液为流动相, 等度洗脱 90 min, 流速 0.9 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL。**结果:** 醋酸亮丙瑞林与各已知杂质及强制破坏产生的降解产物分离良好; 杂质 B (2-D-His-leuprorelin) 和杂质 M (缺失肽 4-Ser-leuprorelin) 质量浓度在 0.001~0.02 mg · mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系 ($r^2 \geq 0.999$, $n=6$), 且校正因子 (相对于醋酸亮丙瑞林) 均为 1.09; 杂质 B 和 M 的平均回收率 ($n=9$) 分别为 96.1% 和 108.3%, RSD 分别为 1.6% 和 3.0%; 重复性试验杂质 B、杂质 M 和总杂质 RSD ($n=6$) 分别为 0.85%、1.9% 和 1.7%; 各考察项下进样精密度试验中峰面积的 RSD ($n=5$) 最大值为 1.4%, 保留时间 RSD ($n=5$) 最大值为 0.34%。经检测表明, 稳定工艺的 3 批产品中, 单个杂质均不大于鉴定限 0.5%, 总杂质均不大于 0.6%。**结论:** 本法可用于醋酸亮丙瑞林有关物质的检测。

关键词: 抗肿瘤药; 醋酸亮丙瑞林; 线性九肽; 促性腺激素; 激素释放激动剂; 杂质谱分析; 降解产物; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 08-1423-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.10

Impurity profile study and HPLC method development for related substances determination of leuprorelin acetate

ZHAO Li-jia^{1,2}, YU Jiong², JIANG Hui-di^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Chinese Peptide Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract Objective: To study the impurity profile of leuprorelin acetate and develop an HPLC method for the determination of related substances. **Methods:** The analysis was conducted on a full coverage chemically bonded silica column [Sepax GP-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm)] with a mobile phase of triethylamine buffer, *n*-propyl alcohol and acetonitrile mixed solution by isocratic at the flow rate of 0.9 mL · min⁻¹ for 90 min. The column temperature was 35 °C, the detection wavelength was 220 nm and the injection volume was 20 μL. **Results:** The known impurities and degraded products by forced degradation were completely separated from leuprorelin acetate. The

* 通信作者 Tel: (0571) 88208408; E-mail: hdjiang@zju.edu.cn

第一作者 Tel: (0571) 86737118; E-mail: lisha.zhao@chinesepeptide.com

calibration curves of impurity B (2-D-His-leuprorelin) and impurity M (deletion 4-Ser-leuprorelin) were linear in the self-concentration range of 0.001–0.02 mg · mL⁻¹ ($r^2 \geq 0.999$, $n=6$) and the correction factors were 1.09. The average recoveries of the impurities B and M ($n=9$) were 96.1% and 108.3%, respectively, and the RSDs ($n=9$) were 1.6% and 3.0%, respectively. The RSDs of repeatability ($n=6$) for impurity B, impurity M and total impurities were 0.85%, 1.9% and 1.7%, respectively. The RSD of peak area ($n=5$) for all validation items was no more than 1.4%, and the RSD of retention time was no more than 0.34%. The results showed that all the impurities were less than identification limit of 0.5% and the total impurities level was no more than 0.6% in the three batches leuprorelin acetate. **Conclusion:** The established method is suitable for the determination of the related substances in leuprorelin acetate.

Keywords: antitumor drug; leuprorelin acetate; linear nine peptide; gonadotropin; hormonereleasing agonist; impurity profile analysis; degradation products; HPLC

醋酸亮丙瑞林是一种合成的线性九肽,它是强效促性腺激素释放激素激动剂,临床上用于激素依赖性肿瘤的治疗,主要用于前列腺癌、子宫内膜异位、中枢性性早熟等症,还可用于良性纤维瘤引起的贫血患者的术前治疗^[1]。其注射剂 Eligard 用于晚期前列腺癌患者的姑息治疗。本品在美国药典 39 (USP 39-NF 34) 和欧洲药典 8.0 (EP 8.0) 均有收载,相关原料药和制剂在国内已经有上市产品,但中国药典尚未收载。

国内对醋酸亮丙瑞林注射剂的有关物质测定已有文献报道^[2],但对醋酸亮丙瑞林的杂质谱研究^[3]和基于杂质谱的有关物质分析方法还未见文献报道。合成多肽类药物属于特殊的化学药物,目前对此类药物有关物质的控制国内还停留在限度控制阶段^[4-6],未对多肽类药物的杂质谱进行深入的研究,本文以醋酸亮丙瑞林工艺路线中的中间体、潜在副产物、降解产物和文献报道的已知杂质^[7-8]为研究对象,依据欧洲药典 8.0 附录“Substances for pharmaceutical use”中化学合成多肽有机杂质研究限度推荐^[9]、多肽药物研究指导原则^[10-12]和分析方法验证指导原则^[13-14],对本品的杂质谱进行研究,并建立了检测所有可能杂质的有关物质分析方法,为醋酸亮丙瑞林的质量控制提供有效保障。

1 仪器与试剂

安捷伦公司 1100 和 1260 型高效液相色谱仪, EZChrom 色谱软件; 安捷伦公司 1100- 热电 LCQ Advantage 质谱仪 (ESI), Xcalibur 软件; 布鲁克公司 MADLI-TOF/TOF (FLEX™ Series autoflexspeed™), FlexControl 软件; Waters ACQuity UPLC 超高效液相

色谱仪, EMPOWER 软件; 赛分公司 Sepax GP-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm; 填料: 全覆盖键合硅胶); 赛多利斯公司 ME215P 十万分之一电子天平, 梅特勒托利多公司 FE20 pH 计。

醋酸亮丙瑞林对照品 (批号 CK-04-0001, 由中肽生化有限公司标化, 可溯源至 Leuprolide Acetate USP 对照品 / 批号 H0L044); 醋酸亮丙瑞林原料药供试品 (批号 CK-04-0002、CK-04-0003、CK-04-0004、方法验证批 CK-03-0001), 中间体 (批号 CK-01-0001), 杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、M 对照品 (批号和序列信息详见表 1), 均为中肽生化有限公司提供。乙腈、正丙醇、三乙胺和磷酸为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 全覆盖键合硅胶色谱柱, Sepax GP-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相: 三乙胺缓冲溶液 (取三乙胺 15.2 g 溶解于 800 mL 水中, 用磷酸调节 pH 至 3.0, 加水稀释至 1 000 mL) - 正丙醇乙腈混合溶液 [(正丙醇 - 乙腈 (2:3)) (83:17)], 等度洗脱 90 min; 流速: 0.9 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 杂质谱研究

2.2.1 杂质分析策略

醋酸亮丙瑞林工艺过程可能产生的杂质: 合成过程中带入的工艺杂质, 如因起始物料带入或反应过程中产生的消旋杂质 (本肽链中的氨基酸均具有手性, 特别是组氨酸 His 为易消旋的氨基酸), 因部分氨基酸未连接上产生的缺失肽 (肽链经多步反应可能

表 1 亮丙瑞林和研究杂质的批号和氨基酸序列信息

Tab. 1 The batch number and sequence information for leuprorelin and impurities

杂质 (impurity)	批号 (lot No.)	序列 (sequence)
亮丙瑞林 (leuprorelin)	CK-03-0001	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 A (impurity A)	CK-03-0002	Glp-His-Trp-DSer-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 B (impurity B)	CK-03-0003	Glp-DHis-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 C (impurity C)	CK-03-0004	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 D (impurity D)	CK-03-0005	Glp-His-Trp-Ser (O-acetyl) -Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 E (impurity E)	CK-03-0006	Glp-His-DTrp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 F (impurity F)	CK-03-0007	Glp-DHis-Trp-DSer-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 G (impurity G)	CK-03-0008	Glp-His-Trp-Ser-DTyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 H (impurity H)	CK-03-0009	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-DLeu-Arg-Pro-NHEt
杂质 I (impurity I)	CK-03-0010	DGlp-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt
杂质 M (impurity M)	CK-03-0011	Glp-His-Trp-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHEt

* 表格中蓝色标注为杂质序列中不同于亮丙瑞林序列的氨基酸 (The blue labeling for amino acid in impurities sequence means the difference amino acid from leuprorelin sequence)

存在反应不完全的情况),因肽键断裂产生的断裂肽,氨基酸侧链的不完全脱保护所形成的副产物等肽类相关物质;肽链中存在大量的酰胺键,与一般药物相比更不稳定,容易由于多肽脱酰胺、氧化、水解、消旋等不稳定因素而产生降解产物。美国药典和欧洲药典中醋酸亮丙瑞林各论项下均提及的指定杂质:杂质 A、B、C、D;欧洲药典亮丙瑞林各论项下列出的其他杂质:杂质 E、F、G、H、I。欧洲药典 8.0 附录^[9]中规定合成多肽的杂质报告限度 0.1%,鉴定限度 0.5%和质控限度 1.0%。基于工艺和相关文献报道,开展醋酸亮丙瑞林的杂质谱研究。

2.2.2 待研究杂质定向合成和确证

根据“2.2.1”项的杂质分析,对有关杂质进行定向合成,用美国药典方法对各杂质进行纯度控制和相对保留时间(RRT)定位,使用热电 ESI 质谱对各杂质进行分子量测定,采用 Waters UPLC 法氨基酸分析专用试剂包和色谱柱 (Accq Tag Ultra C₁₈ 1.7 μm 100 mm × 2.1 mm) 对各序列氨基酸组成进行分析确证,确保定向合成杂质的正确性。

2.2.3 醋酸亮丙瑞林中杂质确证

2.2.3.1 杂质收集分析

通过对醋酸亮丙瑞林各批次 HPLC 有关物质检测图谱杂质比对分析,确认无大于 0.5% 的杂质,大

于 0.1% 的杂质主要是主峰相邻前杂质和相邻后杂质,见图 1。对主峰前杂质和后杂质进行富集,通过氨基酸组成和质谱分析,初步确认主峰相邻前杂质为醋酸亮丙瑞林同分异构体,主峰相邻后杂质为序列中 4 号位少丝氨酸 (Ser) 的残缺肽 (杂质 M)。

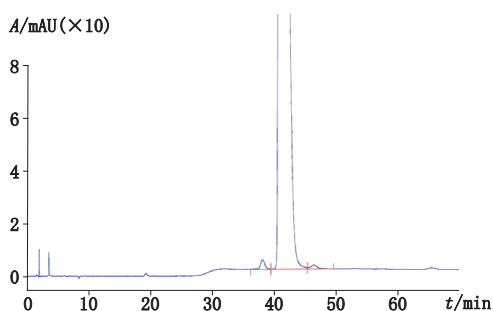


图 1 醋酸亮丙瑞林供试品溶液 (1 mg · mL⁻¹) 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of leuprorelin acetate tested solution (1 mg · mL⁻¹)

2.2.3.1.1 主峰相邻前杂质收集 分析收集的主峰前杂质相对分子量测定结果为 1 209.7,和亮丙瑞林的相对分子量 1 209.4 一致;且氨基酸分析结果也和亮丙瑞林的理论序列一致;可判定为亮丙瑞林的同分异构体。根据药典已经报道的主峰相邻前杂为杂质 B (RRT0.9) 和杂质 I (RRT0.94),杂质 B 和杂质 I 均为异构体杂质;而在色谱条件下前杂质的 RRT 也约为 0.9,故可以初步推断主峰前杂质为杂质 B 或杂质 I。

2.2.3.1.2 主峰相邻后杂质收集 分析收集的主峰后杂质相对分子质量测定结果为 1 122.0, 和亮丙瑞林的相对分子质量 1 209.4 相比少了 87.4, 通过计算分析可能为亮丙瑞林序列中少了 1 个丝氨酸 Ser; 且氨基酸分析结果和亮丙瑞林序列中少 Ser 的氨基酸种类和个数一致; 亮丙瑞林序列中只有 4 位有 Ser, 故初步推断主峰后杂质为杂质 M。

2.2.3.2 已知杂质定位

将定向合成杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、M 各自用流动相配制成 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当 1% 供试品溶液浓度) 的杂质定位溶液, 按“2.1”项色谱条件检测定位。再分别称取以上杂质各 0.1 mg 和醋酸亮丙瑞林 10 mg 至 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 作为供试品杂质混合溶液, 按“2.1”项色谱条件检测。结果表明, 各杂质在本色谱条件下均能被检出, 且供试品中未检出杂质 A、D、E、F、G、H; 杂质 C 和杂质 M 均在主峰后出峰, 但不能很好分离, 由于“2.2.3.1”项已经确认主峰相邻后杂质收集液为杂质 M, 故认为供试品中不含杂质 C。见图 2。

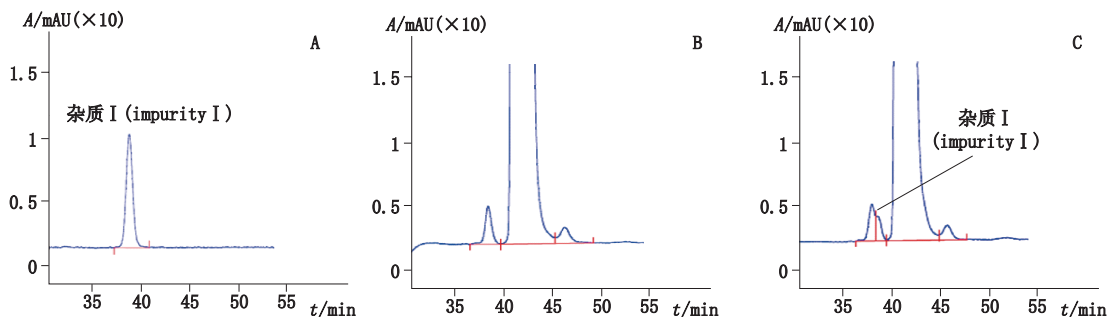


图 3 杂质 I 溶液 (A)、供试品溶液 (B)、供试品和杂质 I 混合溶液 (C) 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of impurity I (A), tested sample solution (B), tested sample solution spiked with impurity I (C)

2.2.4 小结

通过系列杂质谱研究, 最终确定采用本生产工艺的醋酸亮丙瑞林, 无大于 0.5% 的杂质, 大于 0.1% 的杂质如下: 主峰相邻前杂质, 即杂质 B (2-D-His-leuprorelin); 主峰相邻后杂质, 即杂质 M (序列中 4 号位的 Ser 缺失)。且本色谱条件能将各可能杂质有效分离和检出。

2.3 专属性试验

2.3.1 系统适用性试验

分别取空白溶液 (流动相)、系统适用性溶液 (按 USP 各论项下描述的碱和 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴破坏后的溶液), 按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果表明, 在上述色谱条件下, 系统适用性溶液中主

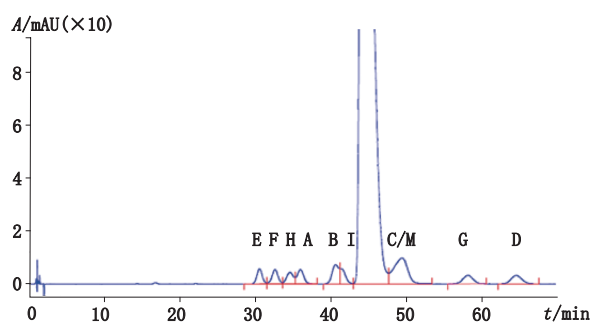


图 2 供试品溶液添加杂质后的溶液色谱图

Fig. 2 Chromatogram of tested sample solution spiked with the impurities

2.2.3.3 主峰相邻前杂质确证

从图 2 可见主峰相邻前杂质峰为杂质 B 或杂质 I, 且两者均为醋酸亮丙瑞林异构体, 从相对分子质量和氨基酸组分分析都无法识别, 故单独将 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 I 溶液、供试品溶液、供试品溶液和 $0.0025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 I 混合溶液 (称取供试品 1 mg, 加入 1 mL 的 $0.0025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂质 I 溶液溶解, 即得), 按“2.1”项色谱条件检测。结果表明, 供试品主峰相邻前杂质不可能是杂质 I。见图 3。

峰与杂质 B 和杂质 M 之间均能得到良好分离 (分离度 2.6 和 2.3), 且空白对测定无干扰, 方法专属性良好, 结果见图 4。

2.3.2 强降解试验

称取醋酸亮丙瑞林进行如下试验:

(1) 酸破坏: 取本品 10 mg 置玻璃容器中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1 mL, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 1 h 后, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和, 将溶液转移入 10 mL 量瓶中, 加流动相定容至刻度, 摇匀; (2) 碱破坏: 取本品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 0.5 h 后, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中和, 加流动相定容至刻度, 摇匀; (3) 氧化破坏: 取本品 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 室

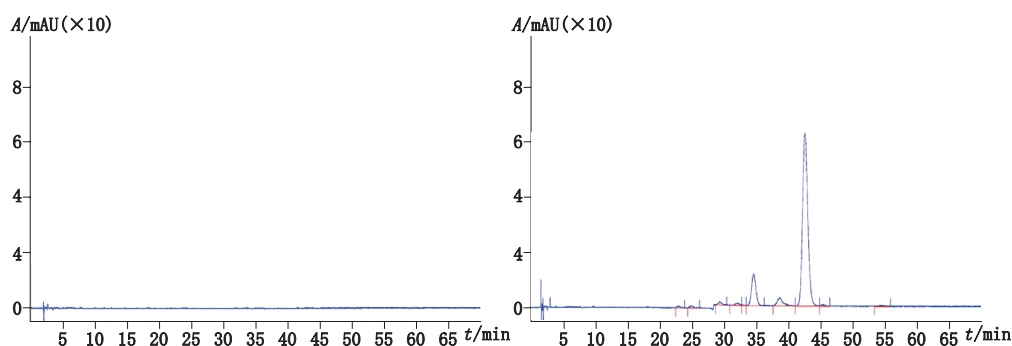
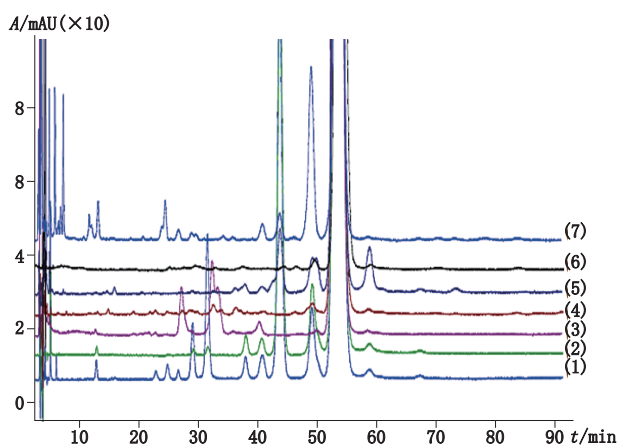


图4 空白溶液(A)、系统适用性溶液(B)色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the blank sample solution (A) and system stability sample solution (B)

温放置 2 h 后,加流动相定容至刻度,摇匀;(4)光照破坏:取光照 ($4\ 500 \pm 500$) lx 14 d 后的样品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀;(5)高温破坏:取高温 ($130\ ^\circ\text{C}$) 24 h 后的样品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀;(6)高湿破坏:取湿度 (92.5%) 5 d 后的样品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀;(7)称取中间体(粗品) 1 mg 加入流动相 1 mL 溶解、混匀。取上述制得的溶液按照“2.1”项色谱条件进行测定,记录色谱图。结果表明,醋酸亮丙瑞林在光照和高湿条件下较稳定,在其他各破坏条件下均有不同程度的新杂质产生;且在各破坏条件下产生的杂质峰与主峰均基线分离(分离度 ≥ 2.3),通过峰纯度扫描确认降解后色谱主峰仍为单峰(峰纯度 1.000)。见图 5。



(1) 酸破坏(acid hydrolysis) (2) 碱破坏(alkaline hydrolysis) (3) 氧化破坏(oxidative degradation) (4) 光照破坏(photolytic degradation) (5) 高温破坏(thermo degradation) (6) 高湿破坏(moisture degradation) (7) 中间体(intermediate)

图5 醋酸亮丙瑞林经强降解试验后的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of leuprorelin acetate after forced degradation

2.4 检测限和定量测定

称取醋酸亮丙瑞林供试品、杂质 B 和杂质 M 对照品适量,用流动相溶解并逐步定量稀释,进样分析,按 $S/N \approx 3$ 和 $S/N \approx 10$, 确定醋酸亮丙瑞林、杂质 B 和杂质 M 的检测限均为 16 ng, 定量限均为 50 ng。

2.5 线性关系考察及校正因子测定

分别精密称取醋酸亮丙瑞林对照品、杂质 B 和杂质 M 对照品各 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀; 精密量取上述溶液 2.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 作为线性最高浓度点溶液 ($0.02\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 取该溶液用流动相逐步稀释成系列浓度对照品溶液 (0.001 、 0.002 、 0.004 、 0.008 、 $0.01\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。按最小二乘法, 以浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归, 得到醋酸亮丙瑞林和各杂质的回归方程即为标准曲线。以杂质标准曲线的斜率和醋酸亮丙瑞林标准曲线的斜率比值计算校正因子, 同时计算 Y 轴截距相当于 100% 响应值的比例 (X 用 $0.01\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 代入忽略截距的计算结果即为 100% 响应值)。结果显示, 醋酸亮丙瑞林和各杂质浓度从 $0.001\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 至 $0.02\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好, 各杂质相对于醋酸亮丙瑞林的校正因子均在 0.9~1.1 范围内, 见表 2。

2.6 回收率试验

考察杂质限度 (0.5%) 50%~150% 的回收率。精密称取杂质 B 和杂质 M 对照品各 25 mg 至 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为杂质对照品储备液 ($0.25\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 精密量取上述杂质对照品储备液 1.0、2.0、3.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别作为杂质对照品 50%、

表 2 醋酸亮丙瑞林及其有关物质的回归方程、相关系数 (r^2)、校正因子和 Y 轴截距相当于 100% 响应值的比例Tab. 2 The regression equation, correlation coefficient (r^2), correction factor, the ratio between Y-axis intercept and 100% response value of leuprorelin acetate and related substances

样品 (Sample)	回归方程 (regression equation)	相关系数 (r^2)	校正因子 (correction factor)	Y 轴截距相当于 100% 响应值的比例 (the ratio between Y-axis intercept and 100% response value)
醋酸亮丙瑞林 (leuprorelin acetate)	$Y=1.087 \times 10^8 X+15\ 435$	0.999 0	1.00	1.4%
杂质 B (impurity B)	$Y=1.186 \times 10^8 X+3\ 061$	0.999 4	1.09	0.26%
杂质 M (impurity M)	$Y=1.186 \times 10^8 X+18\ 869$	0.999 3	1.09	1.6%

100%、150% 的标准工作液。精密称取醋酸亮丙瑞林 10 mg, 共 9 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别以 50%、100%、150% 的标准工作液溶解并稀释定容至刻度, 每个浓度各 3 份。按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图, 分别计算 50%、100%、150% 浓度下的加样回收率。结果显示, 50% 浓度水平杂质 B、杂质 M 的平均回收率 ($n=3$) 分别为 96.2%、109.1%; 100% 浓度水平杂质 B、杂质 M 的平均回收率 ($n=3$) 分别为 97.2%、110.0%; 150% 浓度水平杂质 B、杂质 M 的平均回收率 ($n=3$) 分别为 94.8%、105.8%; 杂质 B、杂质 M 的平均回收率 ($n=9$) 分别为 96.1%、108.3%, RSD 分别为 1.6%、3.0%。上述结果提示, 本方法准确度符合要求。

2.7 精密度试验

2.7.1 重复性试验

精密称取醋酸亮丙瑞林 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 作为供试品溶液; 精密量取 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为自身对照溶液。平行 6 份, 按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。计算杂质 B、杂质 M 和总杂质计算结果的 RSD, 结果杂质 B、杂质 M 和总杂质的 RSD 分别为 0.85%、1.9% 和 1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.7.2 中间精密度试验

不同天, 由另一名分析员, 使用另一台 HPLC 仪器, 按重复性试验项下的制备方法, 平行制备供试品溶液 6 份, 按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。取中间精密度和重复性项下 12 份样品中杂质 B、杂质 M 和总杂质的计算结果, 求此 3 个杂质 12 份结果的 RSD 值, 结果显示杂质 B、杂质 M 和总杂质的 RSD 分别为 2.0%、3.2% 和 2.6%, 表明该方法中间精密度良好。

2.8 进样精密度试验

取回收率试验、线性关系考察、重复性试验和中间精密度试验项下, 自身对照溶液和供试品溶液运

行 5 次的结果作为进样精密度评价, 记录自身对照、杂质 B 和杂质 M 峰面积和保留时间。结果显示, 自身对照、杂质 B 和杂质 M 峰面积的 RSD 分别为 0.38%、1.4% 和 0.38%, 自身对照、杂质 B 和杂质 M 保留时间的 RSD 分别为 0.13%、0.30% 和 0.34%, 说明检测仪器和系统进样精密度良好。

2.9 供试品溶液稳定性试验

取重复性试验项下供试品溶液和自身对照溶液, 分别在室温放置 0、6、12、24、48 和 72 h, 按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。按自身对照法计算供试品溶液中杂质含量, 比较样品待测杂质变化和新杂质产生情况。72 h 内杂质 B、杂质 M 和总杂质的 RSD 分别为 1.6%、0.82% 和 1.1%, 杂质 B、杂质 M 和总杂质的最大变化值分别为 0.01%、0.01% 和 0.02%。说明供试品溶液在室温放置 72 h 内稳定。

2.10 有关物质测定

分别精密称取醋酸亮丙瑞林 (批号 CK-04-0002、CK-04-0003、CK-04-0004) 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 按重复性试验项下方法配制供试品溶液和自身对照溶液。按照“2.1”项色谱条件进行测定, 记录色谱图。按自身对照法计算供试品溶液中杂质含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本方法以 USP 39-NF 34 和 EP 8.0 的 leuproreline 各论中的色谱条件为基础, 在 USP 和 EP 允许的变动范围内, 流动相比比例从三乙胺缓冲液-有机相 (85:15) 调整为三乙胺缓冲液-有机相 (83:17), 色谱柱长从 100 mm 调整为 150 mm, 色谱柱温度从 25 °C 调整为 35 °C, 从而使原药典方法不能分离的主峰相邻后杂质 (杂质 M) 得到基线分离。为考察方法耐用性, 分别调整柱温、流速、流动相比比例、流动相 pH、不同批号色谱柱, 结果表明, 本方法耐用性良好, 主峰前后杂质均基线分离 (分离度 ≥ 1.8)。

表 3 有关物质测定结果(%)

Tab. 3 The determination results of the related substances

有关物质 (related substance)	含量(content)/%		
	批号(lot No.)	批号(lot No.)	批号(lot No.)
	CK-04-0002	CK-04-0003	CK-04-0004
杂质 B (impurity B)	0.16	0.07	0.04
杂质 M (impurity M)	0.25	0.15	0.13
其他单一未指定杂质 (any other unspecified individual impurity)	0.04, 0.14	0.15, 0.07	0.09
杂质总量 (total impurities)	0.59	0.44	0.26

3.2 不加校正因子的主成分自身对照法

文献[15]中提出杂质相对于主成分响应因子在 0.9~1.1 之间,可使用不加校正因子的主成分自身对照法,否则需使用加校正因子的主成分自身对照法。本方法中杂质 B 和杂质 M 相对于主成分的响应因子为 1.09,因此日常检测可使用不加校正因子的主成分自身对照法。如果开发的色谱条件相对响应因子超出此范围,则必须使用加校正因子的主成分自身对照法,或建立以杂质对照品进行定性定量分析的方法。

3.3 杂质限度控制指标的制定

美国药典和欧洲药典对有关物质控制限度如下:指定杂质 A、B、C 限度分别 $\leq 0.5\%$,指定杂质 D 限度 $\leq 1.0\%$,其他各单一杂质限度 $\leq 0.5\%$,总杂质限度 $\leq 2.5\%$ 。本研究基于醋酸亮丙瑞林的杂质谱研究,确认规定生产工艺下制备的醋酸亮丙瑞林不含已知杂质 A、C、D、E、F、G、H、I。为严格控制本品中的杂质,特将控制限度提高,规定指定杂质 B 限度 $\leq 0.5\%$,其他各单一杂质限度 $\leq 0.5\%$,总杂质限度 $\leq 2.0\%$ 。

3.4 小结

本文建立了一种能将醋酸亮丙瑞林原料药中的可能杂质有效分离,并对有关物质进行准确检测的分析方法。本方法简单、灵敏、专属、准确,适用于醋酸亮丙瑞林原料药中有关物质放行检测和稳定性考察,同时为多肽药物杂质谱研究提供了参考。

参考文献

[1] 黄红萍. 醋酸亮丙瑞林的研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(7): 14
HUANG HP. Research progress of leuprorelin acetate [J]. Strait Pharm J, 2013, 25(7): 14

[2] 刘彤焱, 石涛, 张胜强. 醋酸亮丙瑞林注射液的高效液相色谱分析[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(1): 15
LIU DY, SHI T, ZHANG SQ. Determination of the leuprorelin acetate injection liquid by HPLC [J]. Jiangsu Pharm Clin Res, 2005, 13(1): 15

[3] 胡昌勤. 化学药品杂质控制的现状与展望[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(15): 679
HU CQ. Current situation and the trend in impurity profiling of chemical drugs [J]. Chin J New Drugs, 2015, 24(15): 679

[4] 田文静, 任雪, 廖海明. 多肽类药物质量控制研究进展[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1115
TIAN WJ, REN X, LIAO HM. Research progress of the quality control of peptide drugs [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(7): 1115

[5] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 1160
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 1160

[6] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 1533
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 1533

[7] EP 8.0 [S]. 2014: 2601

[8] USP 39-NF 34 [S]. 2016: 4514

[9] EP 8.0 [S]. 2014: 765

[10] 黄晓龙. 美国 FDA 关于合成多肽的指导原则[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(8): 626
HUANG XL. FDA guidance for the synthetic peptide [J]. Chin J New Drugs, 2001, 10(8): 626

[11] [H]GPH11-1 化学合成多肽药物药学研究技术指导原则[S]. 2007
[H]GPH11-1 Technology Guidance of Pharmaceutical Research for Synthetic Peptide [S]. 2007

[12] 王鹏. 合成多肽药物结构确证和质量研究[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(24): 2302
WANG P. Studies for structure determination and quality specification of synthetic peptide drugs [J]. Chin J New Drugs, 2009, 18(24): 2302

[13] [H]GPH5-1 化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则[S]. 2005
[H]GPH5-1 Analysis Method Validation Guidance of Chemical Drugs Quality Control [S]. 2005

[14] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 374
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 374

[15] 谢沐风, 罗霞萍, 陈亚美. 如何建立 HPLC 法测定有关物质的方法[J]. 中国药品标准, 2002, 3(6): 6
XIE MF, LUO XP, CHEN YM. How to build the method of the related substance analysis by HPLC [J]. Drug Stand China, 2002, 3(6): 6

(本文于 2016 年 8 月 14 日收到)