

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.011

高效液相色谱法测定依达拉奉注射液中有关注物质含量

杨清举¹, 张弘²

(1. 四川省金堂县第一人民医院·四川大学华西医院金堂医院, 四川 成都 610400;

2. 成都瑞特恩科技有限公司, 四川 成都 611731)

摘要:目的 建立检测依达拉奉注射液中有关注物质含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Tianhe Kromail C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以 0.02 mol/L 磷酸二氢铵溶液-甲醇(55:45, V/V, 用 20% 磷酸溶液调 pH 至 3.0)为流动相 A, 以 0.02 mol/L 磷酸二氢铵溶液-甲醇(25:75, V/V, 用 20% 磷酸溶液调 pH 至 3.0)为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35℃, 检测波长为 245 nm。以主成分自身对照法计算有关注物质含量。结果 主成分与有关注物质能完全分离, 各杂质峰分离良好;各已知杂质不同质量浓度的平均回收率均在 99.46%~101.57% 之间, RSD 均小于 4.1% (n=9);各批次依达拉奉注射液中总杂质含量均不大于 0.3%。结论 该方法专属性强、灵敏度高、重复性好, 可用于依达拉奉注射液中有关注物质的检测。

关键词:高效液相色谱法;依达拉奉注射液;双吡唑啉酮;杂质 P1;杂质 P3;三聚物;含量测定

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)10-0031-04

Content Determination of Related Substances in Edaravone Injection by HPLC

YANG Qingju¹, ZHANG Hong²

(1. Jintang First People's Hospital, Jintang Hospital Affiliated to West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China 610400;

2. Rakon Technologies Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China 611731)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of related substances in Edaravone Injection. **Methods** The chromatographic column was Tianhe Kromail C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase A consisted of 0.02 mol/L ammonium dihydrogen phosphate-methanol(55:45, V/V, 20% phosphoric acid was used to adjust pH to 3.0), the mobile phase B consisted of 0.02 mol/L ammonium dihydrogen phosphate-methanol(25:75, V/V, 20% phosphoric acid was used to adjust pH to 3.0), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃, the detection wavelength was 245 nm. The content of related substance was calculated by self-control with main components. **Results** The main components and related substances were completely separated, and the impurity peaks were separated well from each other. The average recoveries of all known impurities in different concentrations ranged from 99.46% to 101.57%, and RSDs were less than 4.1% (n=9). The content of total impurities in Edaravone Injection in each batch was not more than 0.3%. **Conclusion** The method is specific, sensitive and reproducible, which can be used for the content determination of related substances in Edaravone Injection.

Key words: HPLC; Edaravone Injection; bis-pyrazolone; impurity P1; impurity P3; trimers; content determination

依达拉奉(edaravone), 化学名 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮, 是以苯肼和乙酰乙酸乙酯为原料合成的吡唑啉酮类化合物, 是首个用于治疗急性缺血性脑卒中的强效自由基清除剂, 可作用于脑梗死前期, 抑制脑水肿, 缩小脑梗死区面积, 减轻神经症候群的程度, 保护脑组织结构和功能^[1-5]。近年来, 有关依达拉奉治疗肌萎缩侧索硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病^[6-8]等的临床研究正在进行, 而其抗癫痫、抗类风湿关节炎和抗纤维化作用开发前景广阔^[9-10]。该药自 2001 年由日本三菱田边制药公司研发上市后, 在全球范围内得到了广泛使用。药物制剂中有关注物质的检测是其质量研究的重要方面, 现参考国内外文献^[11-15], 建立高效液相色谱(HPLC)法测定依达拉奉注射液中有关注物质含量, 以促进该制剂质量的提高。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型和 1160 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂

依达拉奉注射液(成都天台山制药有限公司, 批号分别为 140101, 140201, 140202, 140203);依达拉奉对照品(中国食品药品检定研究院, 纯度 99.9%);杂质 P1(纯度 99.63%)、杂质 P3(纯度 99.07%)均由成都瑞特恩科技有限公司提供;双吡唑啉酮(Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, 纯度为 98.00%);依达拉奉三聚物(深圳振强生物科技有限公司, 批号为 Z20130225)。磷酸二氢铵、磷酸均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Tianhe Kromail C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以 0.02 mol/L 磷酸二氢铵溶液-甲醇(55:45, V/V, 用 20% 磷酸溶液调 pH 至 3.0) 为流动相 A, 以 0.02 mol/L 磷酸二氢铵溶液-甲醇(25:75, V/V, 用 20% 磷酸溶液调 pH 至 3.0) 为流动相 B, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 245 nm; 进样量: 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序(%)

t(min)	A	B	t(min)	A	B
0	100	0	45	0	100
5	100	0	46	100	0
40	15	85	56	100	0

2.2 溶液制备

系统适用性溶液: 1) 双吡唑啉酮贮备液, 称取双吡唑啉酮对照品约 12.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加 N, N-二甲基甲酰胺超声使溶解并稀释至刻度, 再精密量取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。2) 杂质 P1 贮备液, 称取杂质 P1 对照品约 10 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀。3) 杂质 P3 贮备液, 称取杂质 P3 对照品约 12.5 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 再精密量取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。称取依达拉奉对照品 5 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 精密加入上述 3 种贮备液各 1 mL, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 即得系统适用性溶液。因三聚物结构式的空间位阻较大, 不易形成, 且在本品稳定性研究中三聚物均未检出, 故将三聚物按未知杂质控制。三聚物对照品只用于色谱条件专属性研究。

供试品溶液: 精密量取依达拉奉注射液 3.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

自身对照溶液: 精密量取供试品溶液 0.5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

空白辅料溶液: 按依达拉奉注射液处方比例及工

艺, 制得不含依达拉奉的溶液, 即得。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取空白辅料溶液、系统适用性溶液及供试品溶液各 20 μL, 进样, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。结果空白辅料对各有关物质的测定均无干扰, 依达拉奉与各已知杂质(双吡唑啉酮、三聚物、杂质 P1 和杂质 P3) 之间分离均良好, 杂质与杂质间的分离度均符合要求, 依达拉奉峰与杂质 P3 峰的分离度为 3.94, 表明本方法的专属性良好。色谱图见图 1。

破坏性试验: 取样品(批号为 140101) 1.0 mL, 共 5 份, 分别置 5 个 25 mL 容量瓶中, 进行不同条件下的降解试验。第 1 份为未经破坏的样品; 第 2 份加 10% H₂O₂ 1 mL, 80 °C 水浴中放置 15 min, 作为氧化破坏试验样品; 第 3 份加 6 mol/L HCl 1 mL, 于 80 °C 水浴中加热 26.5 h 后调 pH 至 7.0, 作为酸破坏试验样品; 第 4 份加 6 mol/L NaOH 1 mL, 于 80 °C 水浴中加热 5 h 后调 pH 至 7.0, 作为碱破坏试验样品; 第 5 份加水 5 mL 后置 80 °C 水浴中加热 25.5 h, 作为热破坏试验样品。上述 5 种条件下的样品均用流动相 A 定容。另取 2.2 项下空白辅料溶液 1.0 mL 进样。结果空白辅料在主峰相对保留时间约 0.35 倍处有峰出现, 但酸、碱、热及氧化条件下降解产物保留时间均在辅料峰后, 表明测定有关物质时, 可扣除辅料峰, 即主峰相对保留时间约 0.35 倍之前的峰。结果显示, 不同破坏性条件下产生的杂质对依达拉奉有关物质的测定无干扰, 且各降解产物之间及与主峰之间的分离均较好, 物料平衡, 辅料无干扰且无明显降解产物; 在酸、碱、热条件下, 样品较稳定。表明拟订色谱条件能有效检出本品有关物质。色谱图见图 2。

检测限和定量限: 取样品及各已知杂质对照品适量, 加甲醇溶解作为各贮备液, 取适量, 用流动相 A 逐级稀释, 进样量均为 20 μL。当信噪比(S/N) 为 10:1 时, 测定定量限; 当 S/N 为 3:1 时, 测定检测限。结果各杂质的检测限均较低, 本品拟订的进样质量浓度为 0.45 mg/mL, 进样体积为 20 μL; S/N 为 3:1, 能保证含量大于 0.02% 的杂质能被检出; 能保证样品中含量

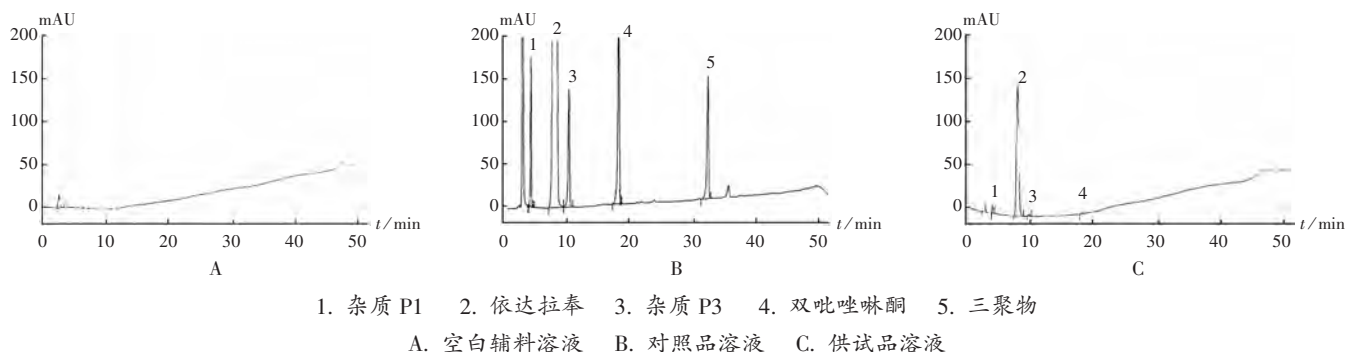
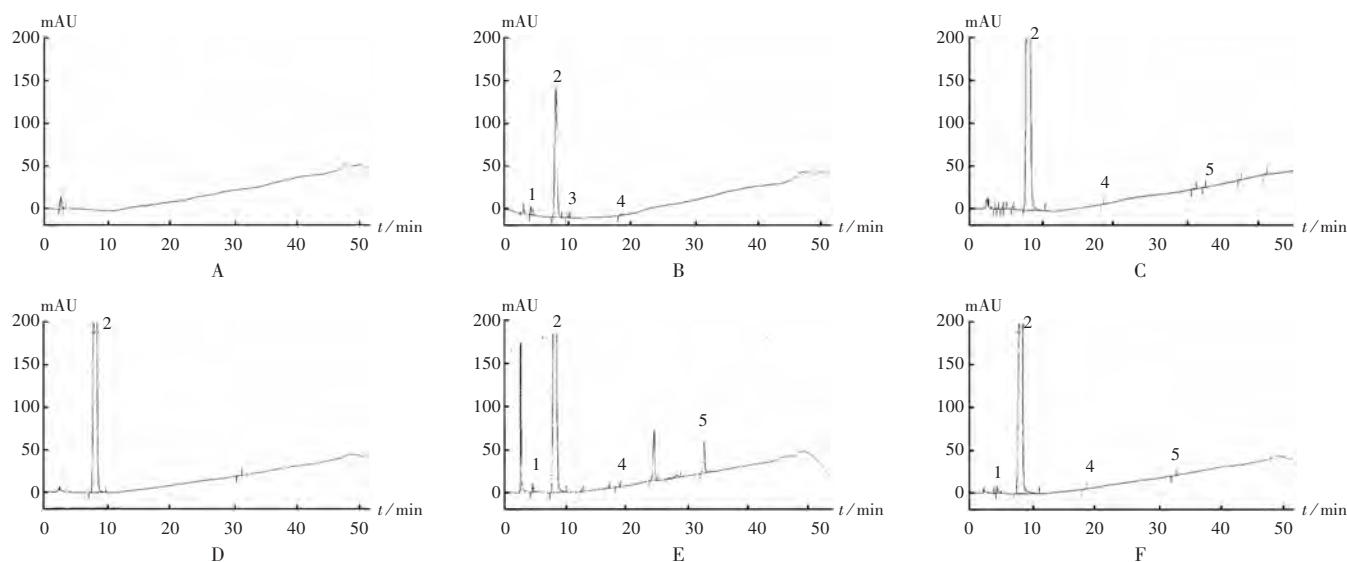


图 1 专属性试验高效液相色谱图



1. 杂质 P1 2. 依达拉奉 3. 杂质 P3 4. 双吡唑啉酮 5. 三聚物
A. 空白辅料溶液 B. 破坏前样品溶液 C. 碱破坏试验样品溶液 D. 酸破坏试验样品溶液
E. 氧化破坏试验样品溶液 F. 热破坏试验样品溶液

图2 破坏试验高效液相色谱图

大于 0.01% 的未知杂质、0.006% 的双吡唑啉酮、0.001% 的 P1、0.01% 的 P3、0.01% 的三聚物被检出。表明拟订进样量及进样质量浓度能保证本品各杂质的有效检出,满足质量控制要求。

线性关系考察:分别称取依达拉奉对照品及各已知杂质对照品适量,分别用甲醇和流动相 A 溶解并稀释制成系列质量浓度溶液,分别进样 20 μL ,以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表 2。可见,依达拉奉、双吡唑啉酮、杂质 P1、杂质 P3 及三聚物的线性关系均较好, $r \geq 0.9996$ 。

表2 线性关系考察结果

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
依达拉奉	$Y = 84.974X + 1.9049$	0.9998	1.5 ~ 12.0
双吡唑啉酮	$Y = 79.867X - 3.0889$	0.9999	0.3 ~ 1.7
杂质 P1	$Y = 42.508X + 3.4884$	0.9998	1.0 ~ 8.5
杂质 P3	$Y = 39.103X - 0.6789$	0.9996	0.3 ~ 2.3
三聚物	$Y = 77.8889X + 0.4768$	0.9997	0.2 ~ 3.0

加样回收试验:精密量取样品(批号为 140101) 3.0 mL,置 10 mL 容量瓶中,按样品定量限 80%, 100%, 120% 的量加入杂质对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定有关物质,每个浓度平行测定 3 次。结果见表 3,各已知杂质不同质量浓度的平均回收率均在 99.46% ~ 101.57% 之间, RSD 均小于 4.1% ($n=9$)。

精密度试验:取样品(批号为 140101)适量,按 2.2 项下方法分别制备 6 份供试品溶液和 0.5% 对照品溶液,依法测定有关物质含量,检出结果基本一致,表明本方法重复性良好。杂质 P1、杂质 P3、双吡唑啉酮、未知

表3 加样回收试验结果(% , $n=9$)

杂质	回收率			$\bar{X}$	RSD
	80%	100%	120%		
杂质 P1	99.30	98.60	99.49	100.11	1.99
	96.96	102.06	101.98		
	98.79	103.13	100.71		
杂质 P3	104.15	102.90	100.79	101.57	1.55
	101.32	101.36	102.69		
	98.84	101.91	100.19		
双吡唑啉酮	98.34	100.95	100.94	99.66	1.24
	100.03	100.34	100.03		
	97.15	99.37	99.82		
三聚物	108.29	96.42	101.83	99.46	4.08
	99.05	99.52	99.05		
	100.54	95.94	94.47		

杂质及总杂质的 RSD 均小于 2.4%;由不同试验人员分别建立不同色谱系统,分别连续测定 6 份同批(批号为 140101)样品,结果 12 份样品的有关物质检出结果基本一致,表明本方法精密度较好。分别取依达拉奉对照品和各已知杂质对照品适量,用甲醇和流动相 A 溶解并稀释成一定浓度的溶液,连续进样 6 次。结果进样精密度良好,已知杂质对照品溶液、自身对照溶液峰面积的 RSD 均小于 0.9% ($n=6$)。

稳定性试验:1)对照品溶液,取杂质 P1、杂质 P3 对照品各适量,用甲醇和流动相 A 溶解并稀释至分别含 4, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,室温放置 0, 1.0, 2.5, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 h 后取 20 μL 进样,记录色谱图;取依达拉奉对照品、双吡唑啉酮对照品各适量,用甲醇(其中双吡唑啉

酮用 N,N -二甲基甲酰胺溶解)和流动相 A 溶解并稀释成质量浓度为 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,将该杂质对照品溶液室温放置 0,2,4,6,7,8 h 后取 $20\ \mu\text{L}$ 进样,记录色谱图;结果各杂质峰面积的 RSD 均小于 1.1% ($n=6$),说明各对照品溶液室温放置 8 h 稳定。2)供试品溶液及自身对照溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液和自身对照溶液,分别在室温下放置 0,2.5,5.3,8.0,14.3,18.5 h 后,取 $20\ \mu\text{L}$ 进样,记录色谱图,并按主成分自身对照法计算峰面积的 RSD 值。结果各杂质峰面积的 RSD 均小于 5.0% ($n=6$),表明供试品溶液及自身对照溶液室温放置 18.5 h 稳定。

耐用性试验:在 2.1 项下色谱条件基础上,分别对流动相的组成及 pH、流速、柱温、检测波长进行耐用性考察。由于杂质 P3 与主峰最近,其他杂质与主峰及各杂质之间分离均较好,故耐用性试验中主要考察依达拉奉与杂质 P3 之间的分离度。结果本品有关物质检测方法中流速、柱温、流动相 pH、流动相 B 比例及检测波长等因素发生一定程度变化时,本方法均能满足试验要求,耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行有关物质检测,结果见表 4。可见,依达拉奉注射液中总杂质含量均不大于 0.3% 。

表 4 依达拉奉注射液有关物质测定结果($\%, n=3$)

批号	杂质 P1	杂质 P3	双吡唑啉酮	最大单杂质	总杂质
140201	0.14	0.01	0.05	0.05	0.25
140202	0.12	0.01	0.05	0.04	0.22
140203	0.12	0.01	0.05	0.06	0.24

3 讨论

3.1 检测波长选择

通过对主药依达拉奉和各已知杂质(双吡唑啉酮、三聚体、杂质 P1 和杂质 P3)分别进行紫外扫描,结果发现,各成分在 $245\ \text{nm}$ 波长处吸收率接近;且样品破坏性试验结果表明 $245\ \text{nm}$ 波长处降解杂质的检出率略高于 $240\ \text{nm}$ 波长处的检出率,故以 $245\ \text{nm}$ 作为依达拉奉注射液有关物质的检测波长。

3.2 分析方法比较

取本品及原研制剂分别按自研方法及日本药局方^[16]收录的依达拉奉有关物质检测方法进行测定,对比考察不同方法下有关物质的检测情况,结果表明,自研方法中的杂质检出量较日本药典多,且各杂质间的分离度均较好;日本药典收录的检测方法没有明确检测的目标杂质,且色谱条件不能完全重现已知杂质的相对保留时

间;且苯肼作为合成本品的起始物料,其最大吸收波长($224\ \text{nm}$)与其他已知杂质及主药的最大吸收波长($240\sim 245\ \text{nm}$)相差较大,在同一色谱条件下不能检测出苯肼的真实量,因此单独建立方法测定苯肼含量。

参考文献:

- [1] 骆海坤,袁耀辉,王丽华. 自由基清除剂依达拉奉的作用机制及临床应用[J]. 北方药学杂志,2018,15(6):138-139.
- [2] WATANABE T, TAHARA M, TODO S. The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside[J]. Cardiovasc Ther, 2008, 26(2): 101-114.
- [3] 刘洪涛,刘又榕,梁海山,等. 依达拉奉治疗脑梗死的疗效及对血清炎症因子水平的影响[J]. 中国药业,2017,26(22): 47-49.
- [4] 刘峰,王晓野. 依达拉奉对重型颅脑外伤的治疗效果[J]. 中国医药指南,2018,16(14):156-157.
- [5] 胡庆华. 依达拉奉联合阿替普酶治疗急性脑梗死 23 例疗效观察[J]. 中国药业,2017,26(15):57-58.
- [6] YANG R, WANG QJ, LI F. Edaravone injection ameliorates cognitive deficits in rat model of Alzheimer's disease [J]. Neurological Sciences, 2015, 36(11):2067-2072.
- [7] 叶华,郭蕾,范录平,等. 联合依达拉奉治疗帕金森病的临床观察[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(23):1998-2002.
- [8] 李明秋,黄海华,牟鑫,等. 依达拉奉治疗轻、中度阿尔茨海默病的临床对照观察[J]. 实用医学杂志,2010,26(24): 4574-4576.
- [9] 陶焕唐. 依达拉奉注射液临床应用新进展[J]. 当代医学杂志, 2013, 19(15):314-315.
- [10] 马利萍,孙建国,彭英,等. 依达拉奉清除自由基机制及临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志,2011,16(3): 345-346.
- [11] 马利华,叶海英,张玫,等. HPLC 法测定依达拉奉氯化钠注射液中的有关物质[J]. 中国药师杂志,2018,21(6): 965-969.
- [12] 孙莹,姜波,林大专,等. 依达拉奉注射液中有物质检查方法的研究[J]. 中国医药指南,2015,13(4):66-67.
- [13] 陈楠,盖春燕,陈刚,等. 依达拉奉注射液质量标准 and 稳定性研究[J]. 河北医药,2014,36(14):2098-2100.
- [14] 谷铁波,陈贵平. 高效液相色谱法测定依达拉奉注射液依达拉奉及有关物质的含量[J]. 中国当代医药,2013,20(21): 61-65.
- [15] 赵珍珍,党晓伟,赵云丽,等. RP-HPLC 法测定依达拉奉的含量及有关物质[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(5): 359-363.
- [16] The Japanese Pharmacopoeia. JP17(Volumn I) [M]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016:852-853.

(收稿日期:2018-11-06)