

高效液相色谱法测定卡巴他赛注射液的有关物质^Δ

冯菊*,任凤英#,杨晨,李江红,汪锡佳,陈林,石克金(药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室/四川抗菌素工业研究所/成都大学,成都 610052)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1209-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.14

摘要 目的:建立测定卡巴他赛注射液中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈,流动相为水-乙腈-乙醇(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,检测波长为230 nm,进样量为20 μL。采用建立的方法测定3批卡巴他赛注射液的有关物质。结果:卡巴他赛检测质量浓度线性范围为0.039~11.60 μg/mL($r=0.999\ 8$, $n=7$),检测限为 2×10^{-4} μg,定量限为 8×10^{-4} μg;精密度试验和重复性试验的RSD<10.0%($n=6$)。3批样品单杂量为0.07%~0.08%,总杂量为0.26%~0.29%。结论:建立的方法操作简便,结果准确可靠,可用于卡巴他赛注射液的有关物质检查。

关键词 卡巴他赛注射液;高效液相色谱法;有关物质;梯度洗脱

Determination of Related Substances in Cabazitaxel Injection by HPLC

FENG Ju, REN Fengying, YANG Chen, LI Jianghong, WANG Xijia, CHEN Lin, SHI Kejin (Key Lab of Medicinal and Edible Plants Resources Development in College of Sichuan/Sichuan Industrial Institute of Antibiotics/Chengdu University, Chengdu 610052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Cabazitaxel injection. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile-ethanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was set at 230 nm. The sample size was 20 μL. Established method was used to determine related substances in 3 batches of Cabazitaxel injection. RESULTS: The linear relationship of cabazitaxel were 0.039-11.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$, $n=7$). The detection limit was 2×10^{-4} μg, and quantitation limit was 8×10^{-4} μg. RSD of precision and reproducibility tests were all lower than 10.0% ($n=6$). The amount of single impurity in 3 batches of samples ranged 0.07%-0.08%, and total amount of impurities were 0.26%-0.29%. CONCLUSIONS: Established method is simple, accurate and reliable, can be used for the determination of related substances in Cabazitaxel injection.

KEYWORDS Cabazitaxel injection; HPLC; Related substance; Gradient elution

前列腺癌是临床中较为常见的一种男性泌尿生殖系统肿瘤。在我国随着人们生活方式的改变、人口老龄化、通过逐渐普及的前列腺特异抗原(PSA)筛查,发现前列腺癌发病率在逐年升高^[1]。有研究^[2-4]报道,卡巴他赛不仅对多西他赛敏感的肿瘤株有活性,对多西他赛不敏感的肿瘤也有活性,应用范围更广,因此具有较好的发展前景。卡巴他赛(Cabazitaxel)是一种紫杉烷类药,多由红豆杉经萃取的前体半合成制备而成^[5],用于治疗晚期、抗激素型前列腺癌^[6]。卡巴他赛具有抗肿瘤作用强的特点^[7],其作用机制为抑制微管蛋白^[8],与多烯紫杉

醇相似。在2010年6月17日获美国FDA批准上市,是获得批准用于转移性激素难治性前列腺癌的二线治疗中首个及唯一一个提供显著生存获益的治疗药物^[9-13]。其原料药的有关物质检查方法已有相关文献报道^[14]。笔者采用已报道原料药的有关检查方法,对卡巴他赛注射液的有关物质进行检查试验,但是该报道的原料药有关物质的分析方法未检测出主峰,所以得出该分析方法可能不适用于卡巴他赛注射液制剂分析。结合卡巴他赛原料在合成过程中会引入一些副产物和中间体^[15-16],其制剂过程中加入的辅料和制剂工艺中也可能引入的杂质,这些有关物质可能是无效或者危害人的生命,亦或者影响药物的稳定性,进而影响药物的质量^[17]。到目前为止,在各国药典中还未收载此药。根据以上原因,笔者采用反相高效液相色谱法对卡巴他赛注射液的有关物质进行分析^[18],筛选出了能够达到控制其有关物质

Δ 基金项目:四川省科技计划项目(No.2017HH0011);药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室开放基金项目(No.10Y201609)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:028-84216578。E-mail:510519996@qq.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:药物分析。电话:028-84216578。E-mail:rfy75@tom.com

的分析方法,为卡巴他赛注射液有关物质分析提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);XS205 电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);AS5150A 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);Agilent Eclipse XDB 色谱柱(美国 Agilent 公司);Capcell Pak MG II 色谱柱(日本资生堂公司);Swell Chromplus 色谱柱(成都思为科学仪器有限公司);Agilent SB 色谱柱(美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂

卡巴他赛对照品(批号:ws-120901,纯度:98.55%)、卡巴他赛注射液(批号:150409、150410、150411,规格:1.5 mL:60 mg)以及杂质对照 ZJTI(批号:141205,纯度:95.60%)、DXTS(批号:141207,纯度:95.79%)、CI-12(批号:141103,纯度:95.81%)、CI-23(批号:141219,纯度:96.10%)、CI-24(批号:150121,纯度:95.89%)均为自制。乙腈、乙醇均为色谱纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);水为流动相 A,乙腈为流动相 B,乙醇为流动相 C,梯度洗脱,见表 1;流速:1.0 mL/min;柱温:35 °C;检测波长:230 nm;进样量:20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %	C, %
0~2	50	45	0
2.01~30	30	45	25
30.01~60	15	55	30
60.01~70	55	45	0

2.2 溶液的制备

2.2.1 溶剂 取 200 mL 的去离子水与 800 mL 乙腈混合,制成水-乙腈(2:8, V/V)的混合液,超声混匀,即可。

2.2.2 对照品溶液 取卡巴他赛工作对照品 25 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,用溶剂超声(功率:120 W,频率:40 kHz,10 min)溶解并稀释至刻度,摇匀,再取 1.0 mL 置于 100 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀,即可。

2.2.3 供试品溶液 精密称取卡巴他赛注射剂供试品适量(约相当于卡巴他赛 25 mg),置于 50 mL 量瓶中,用溶剂超声(功率:120 W,频率:40 kHz,10 min)溶解并稀释至刻度,摇匀,即可。

2.3 系统适用性试验和检测方法

2.3.1 系统适用性试验 取“2.2.2”项下对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,调节检测灵敏度,使卡巴他赛峰高约为满量程的 10%~20%。取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,连续进样 6 次,其峰面积的 RSD 不得超过 2.0%,卡巴他赛峰的拖尾因子不得超过 1.5。

2.3.2 检测方法 取“2.2.2”“2.2.3”项下对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至卡巴他赛峰保留时间的 2 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,按外标法以峰面积计算,任一单个杂质峰面积的 RSD 均不得超过 0.2%,总杂质峰面积的 RSD 不得超过 1.0%。

2.3.3 系统适用性试验结果 取对照品溶液,按“2.3.1”项下方法进行试验,连续 6 次进样。结果,主峰面积的 RSD 为 0.17%,主峰拖尾因子为 1.14~1.15,符合系统适用性试验的要求。色谱图见图 1 的 A 图。

2.4 色谱柱耐用性试验

选择 Agilent XDB、Capcell Pak MG II、Swell Chromplus、Agilent SB 等色谱柱进行试验,对分离度、杂质峰个数、拖尾因子等进行比较。结果表明,采用 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱检出杂峰个数最多,分离度最大,主峰对称性最好,故选用 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱检测卡巴他赛的有关物质。色谱柱筛选结果见表 2。

表 2 色谱柱筛选结果

Tab 2 Screening results of chromatographic column

色谱柱	杂质峰个数	分离度	拖尾因子
Agilent Eclipse XDB C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	11	1.95	1.12
Capcell Pak MG II C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	10	1.44	0.85
Swell Chromplus C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	10	1.84	1.18
Agilent SB C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	9	1.16	1.18

2.5 专属性考察

2.5.1 本品主组分与杂质、中间体、辅料的分离 取按处方比例配制的不含主成分的混合空白辅料溶液(吐温 80)约 625 mg,置于 50 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液。分别取中间体 ZJTI、DXTS、CI-12、CI-23、CI-24 适量,加溶剂制成浓度均为每 1 mL 中含 0.02 mg 的溶液,取此溶液少量(1 mL)和供试品溶液(5 mL)混合置于 10 mL 量瓶中,按“2.1”项下色谱条件进行试验。结果表明,空白辅料不干扰本品的测定,中间体能与卡巴他赛完全分离。色谱图见图 1 的 B、C、D 图。

2.5.2 降解试验 取供试品(批号:150409)适量(约相当于卡巴他赛 25 mg),置于 50 mL 量瓶中,分别经强酸(0.1 mol/L 的盐酸溶液,室温放置 2 h)、强碱(0.1 mol/L

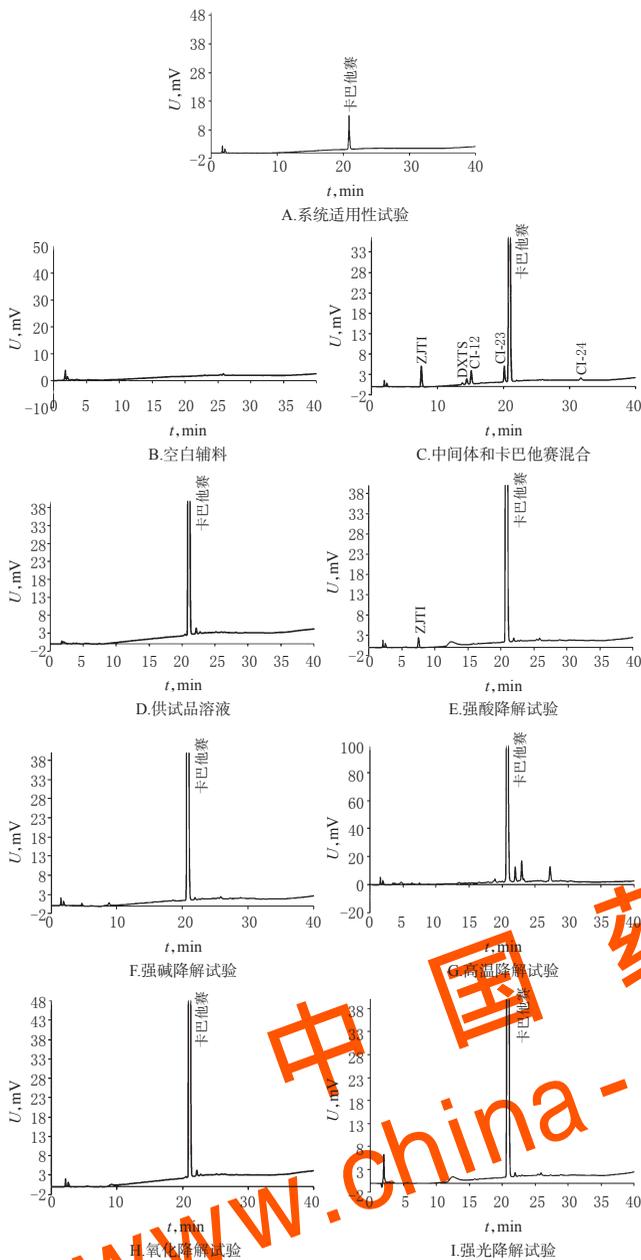


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

的氢氧化钠溶液,室温放置10 min)、高温(120 ℃时放置2.5 h)、氧化(1 mL的双氧水溶液,在120 ℃放置20 min)、强光[(4 500 ± 500) lx, 2 h]降解,酸碱破坏样品分别中和后,均用溶剂稀释至刻度,分别取20 μL注入液相色谱仪,记录色谱。结果表明,降解物质与主峰均能较好地分离。色谱图见图1的E、F、G、H、I图。

2.6 线性关系考察

取卡巴他赛工作对照品适量,加溶剂依次配制成11.60、7.73、3.87、1.93、0.77、0.39、0.039 μg/mL浓度的溶液。按“2.1”项下色谱条件测其主峰面积分别为360 964、243 926、122 223、66 348、24 852、12 390、1 218。以对照品质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线

性回归,线性回归方程为 $y=31\ 105x+1\ 850.49$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,卡巴他赛在0.039~11.60 μg/mL浓度范围内线性关系良好。

2.7 检测限与定量限考察

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。结果,卡巴他赛的检测限为 2×10^{-4} μg,定量限为 8×10^{-4} μg。

2.8 精密度试验

2.8.1 进样精密度 称取625 mg供试品(主药量约25 mg)于50 mL量瓶中,用溶剂稀释定容配成含卡巴他赛0.5 mg/mL的供试液,按“2.2.2”项下方法配制对照液,连续进样6次,记录色谱图,按外标法以峰面积计算。结果,最大单杂的RSD为8.94% ($n=6$),总杂的RSD为4.76% ($n=6$),表明进样精密度良好。

2.8.2 中间精密度 对同一样品不同日期、不同操作人员按有关物质检查方法测定,进行中间精密度试验。结果,最大单杂的RSD分别为9.27%、8.21% ($n=6$),总杂的RSD分别为6.38%、5.39% ($n=6$),表明中间精密度试验良好。

2.9 重复性试验

称取625 mg供试品(批号:150409)(主药量约25 mg)6份,分别置于50 mL量瓶中,用溶剂稀释定容配成含卡巴他赛0.5 mg/mL的供试液,并按“2.2.2”项下方法配制对照液,取20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算。结果,最大单杂的RSD为8.21% ($n=6$),总杂的RSD为5.39% ($n=6$),表明重复性试验良好。

2.10 卡巴他赛注射液测定结果

取3批样品适量,各3份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算最大单杂(未知)量和总杂量。结果,批号为150409、150410、150411的卡巴他赛样品其最大单杂(未知)量分别为0.07%、0.07%、0.08%,总杂量分别为0.28%、0.29%、0.26%,测得结果稳定,表明本检测方法可行。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在筛选试验条件时,笔者发现柱温和流速对分离度和杂峰个数无影响,而柱温低或流速增大可使色谱柱的柱压会增加,故根据试验实际情况,选择柱温为35 ℃,流速为1 mL/min。

3.2 溶剂的选择

在选择溶剂的过程中,主要考虑到卡巴他赛几乎不溶于水,溶于乙醇、乙腈,辅料(吐温)易溶于水的性质,初步选择水、乙腈和乙醇3种试剂作为溶剂,而经试验比较发现有无乙醇对溶液稳定性没有影响,最终采用水-乙腈(2:8, *V/V*)为溶解样品的溶剂。

3.3 卡巴他赛主组分与杂质的分离

在专属性试验时,采用二极管阵列检测器,取经过各种降解后所得的样品溶液进行试验,卡巴他赛主峰的峰纯度因子均在999以上,表明卡巴他赛与杂质能够完全分离,故本法能准确、可靠地测定卡巴他赛的有关物质。

3.4 进样浓度的选择

以0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL的浓度梯度进行试验,随着浓度的增加检测到的杂质峰有所增加,但当浓度增加到0.5 mg/mL时,杂峰个数不再增加,又考虑到色谱柱使用寿命,最终选择0.5 mg/mL的溶液为进样浓度。

综上,本研究建立的方法操作简便,结果准确可靠,可用于卡巴他赛注射液的有关物质检查。

参考文献

- [1] 王志宏,钟旭丽.抗前列腺癌新药卡巴他赛的药理与临床评价[J].中国新药杂志,2011,20(9):763-765.
- [2] 李国,杜小莉.治疗晚期前列腺癌新药 cabazitaxel[J].中国药学杂志,2011,46(22):1773-1774.
- [3] SHAO Y, ZHANG C, YAO Q, et al. Improving cabazitaxel chemical stability in parenteral lipid emulsions using cholesterol[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 52(1):1-11.
- [4] 谢寅省,高红云,刘实.卡巴他赛的单晶培养和结构确认[J].现代药物与临床,2016,31(12):1879-1882.
- [5] 王春燕,俞明远,提文利,等.卡巴他赛的合成进展[J].中国新药杂志,2014,23(15):1779-1785.
- [6] 夏彪,邵波,杨巧宾,等.卡巴他赛关键中间体7 β ,10 β -二甲氧基-10-脱乙酰巴卡汀Ⅲ的合成新方法[J].中国药房,2013,24(1):47-48.
- [7] 李爽,刘阳,何海冰,等.卡巴他赛脂质微球注射液容器内残氧量对制剂稳定性影响[J].沈阳药科大学学报,2016,33(12):932-937.
- [8] 吴盼盼,卓立蒙,唐星,等.顶空气相色谱法测定卡巴他赛中有机溶剂的残留量[J].沈阳药科大学学报,2016,33(9):718-722.
- [9] 吕扬,杜冠华,徐薇,等.一种卡巴他赛吡啶合物结晶形式:中国,201310313587.7[P]. 2013-07-24.
- [10] 王力彬,王义仁,王杏子,等.卡巴他赛注射液在比格犬体内的药代动力学[J].中国药师,2016,19(8):1470-1472、1482.
- [11] 冯光.毛细管气相色谱法测定多西他赛中的残留溶剂[J].中国药师,2009,12(4):459-461.
- [12] 温伟添,卢沛珠.卡巴他赛注射液的处方及制备工艺研究[J].海峡药学,2013,25(10):20-22.
- [13] 李明玥.卡巴他赛有关物质检验方法研究[J].生物技术世界,2016(4):186、188.
- [14] 荆小燕,王勇军,徐丽洁,等.高效液相色谱法测定缙沙坦氨氯地平片中的有关物质[J].中国新药杂志,2013,22(19):2323-2328.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:59.
- [16] 张海军,王英杰,刘雷成.卡巴他赛脂质体制备、质量控制及稳定性研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(7):805-808.
- [17] 文琼芳,丁世家,赵华.高效液相色谱法同时测定血浆中吡哆美辛和布洛芬的浓度[J].分析实验室,2017,36(2):216-219.
- [18] 韦兰春,乔俊琴,练鸿振.反相高效液相色谱法测定对位酯工业品中的对位酯和对氯苯胺[J].分析实验室,2016,35(5):526-531.

(收稿日期:2017-12-23 修回日期:2018-03-15)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅