

HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量^Δ

周燕丽^{1*}, 余永华^{2#}, 马佳丽³, 顾超群³, 谢明华¹(1. 杭州市余杭区第一人民医院药剂科, 杭州 311100; 2. 杭州新诺华医药有限公司, 杭州 310015; 3. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310403)

中图分类号 R927.2; O657.72 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0627-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.10

摘要 目的: 建立测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质含量的方法。方法: 采用高效液相色谱加校正因子的主成分自身对照法。色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 流动相为乙腈-高氯酸溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 246 nm, 进样量为 20 μL, 柱温为 50 ℃; 绘制盐酸特拉唑嗪和杂质 A、B、C 的线性方程, 以斜率计算各杂质相对于盐酸特拉唑嗪的校正因子, 用相对保留时间确定各杂质位置, 测定 3 批盐酸特拉唑嗪片中杂质 A、B、C 的含量, 并与杂质对照品法测得的结果进行比较。结果: 盐酸特拉唑嗪杂质 A、B、C 的相对保留时间分别为 0.39、0.74、2.77, 检测质量浓度线性范围均为 0.25~3.0 μg/mL, 校正因子分别为 0.75、1.09、0.84, 检测限分别为 0.35、0.51、0.43 ng, 定量限分别为 0.70、1.02、0.86 ng。3 批盐酸特拉唑嗪片中杂质 A、B、C 的含量分别为 0.11%~0.13%、0.03%、0.09%~0.12%, 杂质 B 未检出; 与杂质对照品法测定结果一致。结论: 该方法简便快速, 可准确测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量。

关键词 盐酸特拉唑嗪片; 有关物质; 高效液相色谱法; 校正因子

- of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22 (12) : 5877-5887.
- [17] GARCIA-ALBENIZ X, CHAN AT. Aspirin for the prevention of colorectal cancer[J]. *Progress in Chemistry*, 2013, 25(4):461-472.
- [18] XIAO Y, ZHENG L, MEI Z, et al. The impact of metformin use on survival in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (59) : 100449-100458.
- [19] NAMBARA S, MASUDA T, NISHIO M, et al. Antitumor effects of the antiparasitic agent ivermectin via inhibition of yes-associated protein 1 expression in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64):107666-107677.
- [20] PRADELLA D, NARO C, SETTE C, et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression[J]. *Molecular Cancer*, 2017.DOI:10.1186/s12943-016-0579-2.
- [21] BANYARD J, BIELENBERG DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination[J]. *Connective Tissue Research*, 2014, 56(5) : 403-413.
- [22] KUPHAL S, BOSSERHOFF AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma[J]. *Oncogene*, 2005, 25 (2):248-259.
- [23] ONDER TT, GUPTA PB, MANI SA, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(10) : 3645-3654.
- [24] NEUZILLET C, TIJERAS-RABALLAND A, COHEN R, et al. Targeting the TGF-β pathway for cancer therapy[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015.DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- [25] LOVICU FJ, SHIN EH, MCAVOY JW. Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF-β signaling prevents lens EMT leading to cataract[J]. *Experimental Eye Research*, 2016.DOI:10.1016/j.exer.2015.02.004.
- [26] 倪鑫. PCGEM1 通过 TGF-β/smad 通路调节胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[D]. 南京: 江苏大学, 2016.
- [27] THAKUR AK, NIGRI J, LAC S, et al. TAp73 loss favors Smad-independent TGF-β signaling that drives EMT in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2016, 23(8) : 1358-1370.
- [28] YI EY, PARK SY, JUNG SY, et al. Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF-β/Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5) : 1845-1853.

Δ 基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(No.2016ZA007)

* 主管药师。研究方向: 临床药学。电话: 0571-88369284。E-mail: 154321525@qq.com

通信作者: 工程师。研究方向: 药品研发。电话: 0571-88073919。E-mail: yhua85@sina.com

(收稿日期: 2018-09-16 修回日期: 2019-01-14)

(编辑: 邹丽娟)

Determination of Related Substance in Terazosin Hydrochloride Tablets by HPLC and Principal Component Self-control with Correction Factor

ZHOU Yanli¹, YU Yonghua², MA Jiali³, GU Chaoqun³, XIE Minghua¹ (1.Dept. of Pharmacy, Hangzhou Yuhang District First People's Hospital, Hangzhou 311100, China; 2.Hangzhou SINOVO Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310015, China; 3.College of Pharmacy, Zhejiang College of TCM, Hangzhou 310403, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of related substance in Terazosin hydrochloride tablets. METHODS: HPLC and principal component self-control with correction factor were adopted. The determination was performed on Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-perchloric acid solution (20:80, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 246 nm, and sample size was 20 μL. The column temperature was 50 °C. The linear equations of terazosin hydrochloride, impurity A, B, C were drawn. The correction factors of each impurity related to terazosin hydrochloride were calculated by slope, and relative retention time was used to determine the position of impurities. The contents of impurity A, B and C in 3 batches of Terazosin hydrochloride tablets were determined and compared with the results of impurity control method. RESULTS: The relative retention time of impurity A, B, C was 0.39, 0.74, 2.77, respectively; the linear range of them were 0.25-3.0 μg/mL, respectively. The correction factors were 0.75, 1.09, 0.84, respectively. The detection limits were 0.35, 0.51, 0.43 ng, and the limits of quantification were 0.70, 1.02, 0.86 ng, respectively. The contents of impurity A, B and C in 3 batches of Terazosin hydrochloride tablets were 0.11% -0.13%, 0.03% and 0.09% -0.12%; impurity B did not detected. The results are consistent with the determination of impurity control method. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate for the content determination of related substances A, B, C in Terazosin hydrochloride tablets.

KEYWORDS Terazosin hydrochloride tablets; Related substances; HPLC; Correction factor

特拉唑嗪是一种 α -肾上腺受体拮抗药,临床上可用于治疗轻度或中度高血压,还适用于良性前列腺增生(BPH)和男性下尿路症状(LUTS)^[1]。2015年版《中国药典》(二部)中收录了盐酸特拉唑嗪片^[2],采用高效液相色谱(HPLC)法检测其有关物质,但只对未知单杂和总杂质进行了限定,未对已知杂质进行控制;而在英国药典^[3]和美国药典^[4]中,其有关物质的检测对已知杂质A[化学名为1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-唑啉基)哌嗪二盐酸盐]、杂质B(化学名为2-氯-4-氨基-6,7-二甲氧基唑啉)、杂质C[化学名1,4-二(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-唑啉基)哌嗪二盐酸盐]的含量进行了规定且在计算上更加严格。

有研究表明,盐酸特拉唑嗪片可在光、酸或碱条件下水解产生杂质A,在生产过程中可产生副产物杂质B、C^[5]。目前检测药品中有关物质的方法有内标法、杂质对照品法、面积归一化法、无校正因子自身对照法、加校正因子的主成分自身对照法^[6-12],鉴于特拉唑嗪的杂质对照品较难获得且价格较贵,以及现行2015年版《中国药典》检测方法存在的不足,笔者参考美国药典等盐酸特拉唑嗪片中有关物质的检测方法^[4,9],采用HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量,为更准确、有效地控制盐酸特拉唑嗪片的质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);XS 205DU 千分之一电子分析天平、AL 204 万分之一电子分析天平、FE20 pH 计均购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 药品与试剂

盐酸特拉唑嗪对照品(批号:100375-201103,纯度:92.3%)、杂质A对照品(批号:F0C245,纯度:85%)、杂质B对照品(批号:Y0000622,纯度:100%)、杂质C对照品(批号:G0H361,纯度:92%)均购自中国食品药品检定研究院;盐酸特拉唑嗪片(上海雅培制药有限公司,批号:6001414、6028590、6011419,规格:每片2 mg);高氯酸、三乙胺为分析纯,乙腈为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-高氯酸溶液(20:80, V/V);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 246 nm;柱温为 50 °C;进样量为 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 盐酸特拉唑嗪对照品溶液 取盐酸特拉唑嗪对照品适量,精密称定后,加溶剂[乙腈-水-盐酸溶液(200:800:0.9, V/V/V),下同]溶解,制成质量浓度为 625 μg/mL 的盐酸特拉唑嗪对照品溶液。

2.2.2 单一杂质对照品溶液 分别取杂质 A、B、C 对照品适量,置于不同量瓶中,加入溶剂溶解,制成质量浓度

均为500 μg/mL的单一杂质对照品溶液。

2.2.3 混合杂质对照品溶液 分别取“2.2.2”项下单一杂质对照品溶液,置于同一量瓶中,用溶剂稀释制成每1 mL中含杂质A、B、C各2 μg的混合杂质对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液 将盐酸特拉唑嗪片研磨成细粉,称取细粉适量(约相当于特拉唑嗪12.5 mg),置于25 mL量瓶中,加溶剂适量溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 自身对照溶液 精密量取供试品溶液适量,用溶剂稀释400倍后,即得。

2.2.6 空白辅料溶液 取空白辅料适量,照“2.2.4”项下方法制备,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 分别取“2.2”项下各溶液(除自身对照品溶液外),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,空白辅料无干扰,特拉唑嗪峰与各杂质峰间无干扰,分离度均大于1.5,理论板数以特拉唑嗪计均大于3 000,杂质A、B、C相对保留时间分别为0.39、0.74、2.77。系统适用性试验色谱图见图1。

2.3.2 专属性试验 取盐酸特拉唑嗪片(批号:6001414)细粉适量(约相当于特拉唑嗪12.5 mg),分别置于10 mL量瓶中,共6份,一份为未破坏样品,另5份按以下条件进行破坏。(1)酸破坏:加0.1 mol/L盐酸溶液1 mL,放置17 h后,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL中和,然后用流动相稀释至刻度,摇匀,作为酸破坏样品。(2)碱破坏:加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,放置1 h后,加0.1 mol/L盐酸1 mL中和,然后用流动相稀释至刻度,摇匀,作为碱破坏样品。(3)高温破坏:加入流动相适量,置于60 °C下10 d后,放冷,再用流动相稀释至刻度,摇匀,作为高温破坏样品。(4)光照破坏:5 000 Lx条件下放置10 d后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为光照破坏样品。(5)氧化破坏:加3% H₂O₂溶液1 mL,放置17 h后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为氧化破坏样品。取上述6种样品20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,盐酸特拉唑嗪片在酸性和碱性条件下主要降解杂质为杂质A;在氧化、光照和高温条件下主要降解成杂质A及其他未知杂质,主成分峰与各杂质峰之间的分离较好,表明本法专属性良好。专属性试验色谱图见图2。

2.3.3 线性关系与校正因子考察 精密量取“2.2.1”项下溶液0.2、0.8、1.6、3.2、4.0 mL分别置5个量瓶中,另各取“2.2.2”项下各杂质对照品溶液0.25、0.5、1.0、2.0、3.0 mL,分别依次置于上述量瓶中,加入流动相稀释,即得盐酸特拉唑嗪含量为0.25、1.0、2.0、4.0、5.0 μg/mL,杂质A、B、C含量均分别为0.25、0.5、1、2、3 μg/mL的系列溶液。精密吸取上述溶液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进

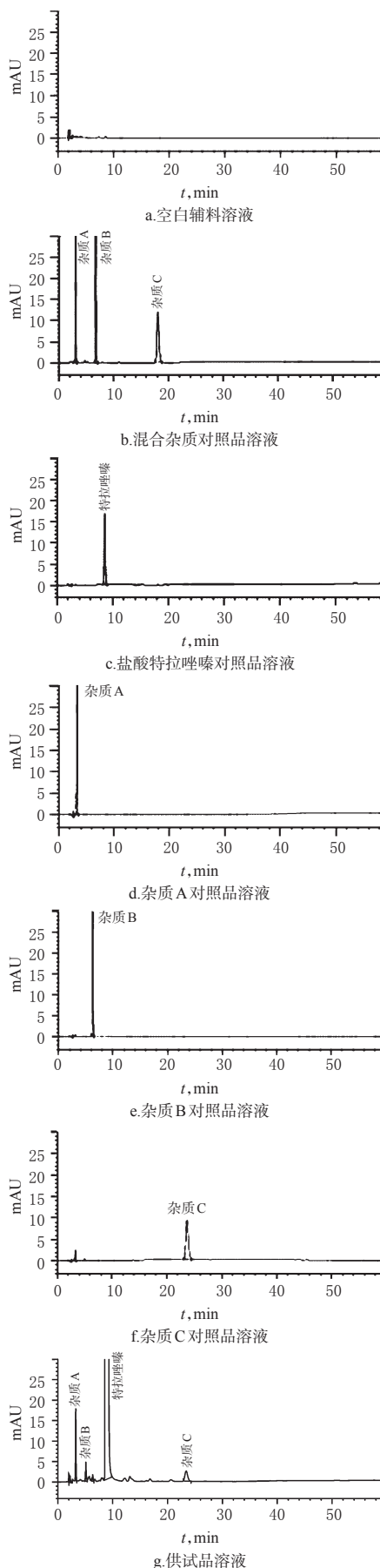


图1 系统适用性试验色谱图

Fig 1 System suitability test chromatogram

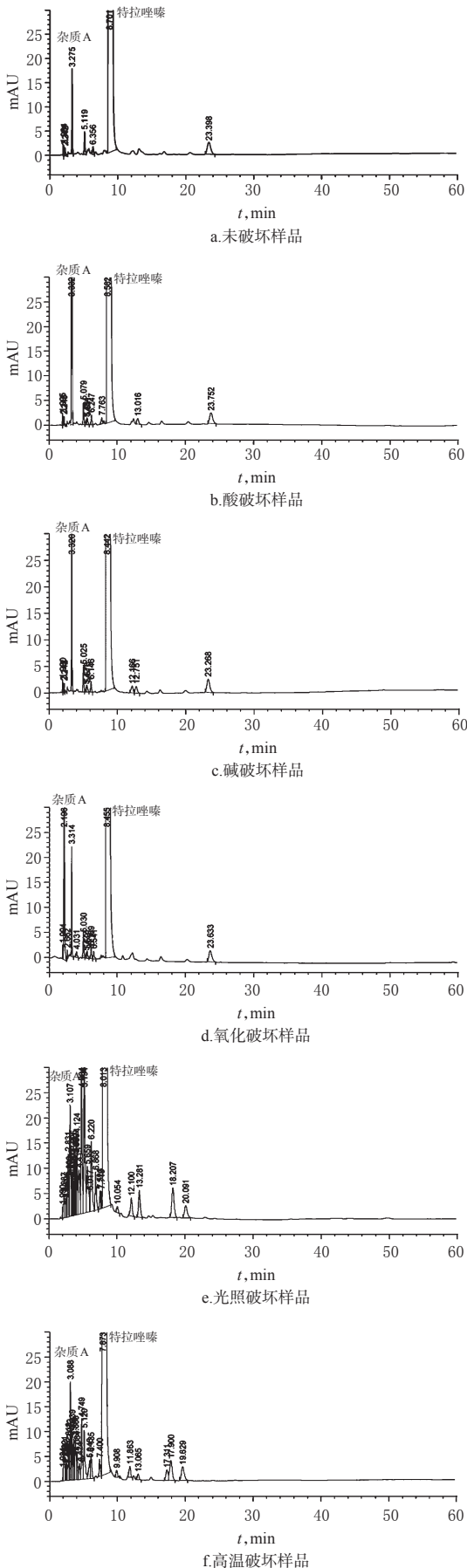


图2 专属性试验色谱图

Fig 2 Specific test chromatogram

样测定,记录各峰峰面积。以峰面积(y)对各杂质质量浓度(x)进行线性回归,并以方程斜率(K)计算校正因子= $K_{\text{盐酸特拉唑嗪}}/K_{\text{杂质}}$,线性关系与校正因子考察结果见表1。

表1 盐酸特拉唑嗪和杂质A、B、C的线性关系和校正因子

Tab 1 Linear relations and relative correction factors of terazosin hydrochloride and impurity A, B and C

成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	校正因子
盐酸特拉唑嗪	$y=154.6x+4.1$	0.999 7	0.25~5.0	
杂质A	$y=205.3x-2.4$	0.999 8	0.25~3.0	0.75
杂质B	$y=141.3x+0.1$	0.999 2	0.25~3.0	1.09
杂质C	$y=183.3x+2.1$	1.000 0	0.25~3.0	0.84

2.3.4 检测限与定量限考察 取“2.2.3”项下溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以信噪比为3:1计算检测限(LOD),以信噪比为10:1计算定量限(LOQ)。结果,杂质A、B、C的LOD分别为0.35、0.51、0.43 ng,LOQ分别为0.70、1.02、0.86 ng。

2.3.5 准确度试验 取盐酸特拉唑嗪片细粉适量(约相当于特拉唑嗪 12.5 mg,其中杂质A、B、C含量分别为0.11%、0.03%、0.11%,各杂质限量均为0.4%),分别加入杂质A、B、C对照品溶液适量,使杂质A、B、C含量均分别为0.32%、0.40%、0.48%,每个浓度平行配置3份,然后流动相稀释至刻度,摇匀。精密吸取各溶液 20 μL ,按“2.1”项下色谱条件,连续进样3次,测定并计算各杂质的平均回收率。结果,杂质A、B、C的平均回收率分别为99.9%、99.6%、99.2%(RSD均<1.0%, $n=9$)。

2.3.6 精密度试验 取“2.2.3”项下溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,重复测定6次,计算各杂质峰面积的RSD。结果,杂质A、B、C峰面积的RSD分别为0.5%、1.0%、0.6%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 滤膜吸附性试验 取“2.2.3”项下溶液分别过滤2、4、6、8 mL的续滤液,照上述色谱条件检测,记录峰面积,并以未过滤溶液为100%浓度计算各续滤液的回收率(即已过滤溶液浓度除以未过滤溶液浓度所得的百分比)。结果,初滤液为2、4 mL时,杂质A、B、C均存在不同程度的滤膜吸附,当弃去前4 mL初滤液后,各续滤液的杂质回收率均大于98%。

2.3.8 稳定性试验 取“2.2.4”项下供试品溶液,分别于常温和4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置0、2、4、6、8 h后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,在常温下,溶液不稳定;在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,溶液杂质A、B、C峰面积的RSD分别为1.7%、1.3%、1.1%,表明供试品溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置8 h稳定性良好。

2.3.9 样品有关物质测定 取盐酸特拉唑嗪片3批,按“2.2.4”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积,分别按加校正因子的主成分自身对照法和杂质对照品法计算有关物质的含量。结果,两种方法测定结果一致。盐酸特拉唑嗪片中有关物质检测结果见表2。

表2 盐酸特拉唑嗪片中有关物质检测结果(%)

Tab 2 Results of related substances determination in Terazosin hydrochloride tablet(%)

批号	杂质A		杂质B		杂质C	
	I	II	I	II	I	II
批1	0.13	0.13	0.03	0.03	0.09	0.10
批2	0.11	0.11	0.03	0.03	0.11	0.11
批3	0.11	0.11	0.03	0.03	0.12	0.13

注:“ I ”为杂质对照品法;“ II ”为加校正因子的主成分自身对照法

Note:“ I ” means impurity reference method;“ II ” means principal component self-control with correction factor

3 讨论

笔者在前期试验中发现当选择柱温为30℃时,杂质C的保留时间较长(大于70 min),且重复进样差异较大;增加柱温后发现,可减小其保留时间,故最终选用柱温为50℃,以有效分离各杂质。2015年版《中国药典》中并未考察所配溶液的滤膜吸附性,笔者在本研究中发现盐酸特拉唑嗪杂质存在着一定的滤膜吸附性,故参考美国药典方法对其进行考察。

本试验以盐酸特拉唑嗪为对照,采用标准曲线法测定各杂质的校正因子,可以很好地控制计算校正因子过程中的误差。结果表明,采用加校正因子的主成分自身对照法与杂质对照品法所测定的结果一致,说明本法可准确测定盐酸特拉唑嗪中有关物质的含量。

综上所述,本研究在现行2015年版《中国药典》中盐酸特拉唑嗪片有关物质检测的基础上,建立以HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸特拉唑嗪片中杂质A、B、C含量的方法,结果表明,该方法简便、快速,可作为盐酸特拉唑嗪片中有关物质的检测方法。

参考文献

- [1] 祝凌飞.特拉唑嗪治疗良性前列腺增生疗效的Meta分析[J].中国药房,2013,24(24):2279-2282.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015版.北京:中国医药科技出版社,2015:1065-1066.
- [3] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia*[S]. 2017 version. London: The Stationery Office, 2017:1-968.
- [4] The United States Pharmacopoeial Convention. *U.S. Pharmacopoeia*[EB/OL].[2018-09-01].<https://www.drugfuture.com/standard/search.aspx>.
- [5] 日本药品监管局.盐酸特拉唑嗪片[EB/OL].[2018-09-01].<http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015版.北京:中国医药科技出版社,2015:59-61.
- [7] 谢沐风.如何建立高效液相色谱法测定有关物质的方法[J].中国医药工业杂志,2007,38(1):45-48.
- [8] 胡丽娜,张毅,顾剑,等.加校正因子的主成分自身对照法测定阿托伐他汀钙中杂质D的含量[J].中国现代应用药学,2015,32(12):1476-1480.
- [9] *The international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*[EB/OL].(1996-11-06)[2018-09-01].<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>.
- [10] 张哲峰. HPLC法校正因子研究中的几个问题[EB/OL].(2011-12-07)[2018-09-01].<http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=312552>.
- [11] 刘小均,罗军波,李培海,等. RP-HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸多奈哌齐口腔崩解片中有关物质的含量[J].中国药房,2015,26(12):1702-1706.
- [12] 余永华,马敏康,杨仲杰,等.加校正因子的主成分自身对照法测定培哌普利片中有关物质的含量[J].中国现代应用药学,2017,34(10):1427-1431.

(收稿日期:2018-09-06 修回日期:2019-01-07)

(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅