

HPLC 法测定坎地沙坦酯片中有关物质

房思萌, 苏慕君*, 臧可昕

天津药物研究院 天津 300193

摘要: 目的 分析对比多国药典改进 HPLC 法测定坎地沙坦酯及其片剂中有关物质的方法。方法 采用 HPLC 法对坎地沙坦酯及其片剂中 9 个杂质进行测定。Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: [乙腈-水-冰醋酸 (57:43:1)]-[乙腈-水-冰醋酸 (90:10:1)], 梯度洗脱; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 35 °C; 样品仓温度: 10 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 254 nm。结果 在选定的色谱条件下, 坎地沙坦酯与有关物质分离良好。试验专属性、线性、耐用性良好。结论 本研究可为坎地沙坦酯片的质量标准的制订和提高提供参考和依据。

关键词: 坎地沙坦酯片; 坎地沙坦酯; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)07-0729-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.07.007

Determination of related substances in Candesartan Cilexetil Tablets

FANG Si-meng, SU Mu-jun, ZANG Ke-xin

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the HPLC method to determinate the related substances in candesartan cilexetil and its tablets compared with the national pharmacopoeias. **Methods** Nine impurities in Candesartan Cilexetil Tablets were separated and identified by HPLC. Chromatographic separation was carried out on an Waters Symmetry C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) at a flow rate of 0.9 mL/min. [Acetonitrile - water - acetic acid glacial (57 : 43 : 1)]-[acetonitrile - water - acetic acid glacial (90 : 10 : 1)] was used as mobile phase. It was monitored at a wavelength of 254 nm, the temperatures of column and sample chamber were 35 and 10 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** There was good separation among candesartan cilexetil and related substances under the chromatographic conditions. The method had good specificity, linearity, and durability. **Conclusion** It provides reference and basis to develop and improve the quality control of Candesartan Cilexetil Tablets.

Key words: Candesartan Cilexetil Tablets; candesartan cilexetil; related substances; HPLC

坎地沙坦酯系血管紧张素 II 受体阻断剂 (ARB), 由日本武田公司开发, 1998 年首先在瑞典上市, 2005 年成为日本首个可用于治疗慢性心力衰竭的 ARB^[1-2]。坎地沙坦酯化学名为(±)-1-[(环己氧代)羰基]氧代]乙基-2-乙氧基-1-[[2'-(1*H*-四氮唑基-5)-[1,1'-联苯基]-4-基]甲基]-1*H*-苯并咪唑-7-羧酸酯, 选择性地与 AT 受体的亚型 I (AT₁) 结合, 为非肽类 AT₁ 受体拮抗药, 通过与血管平滑肌 AT₁ 受体结合而拮抗血管紧张素 II 的血管收缩作用, 其结合能力强, 且结合牢固, 解离缓慢, 从而抑制 AT₁ 的作用, 降低末梢血管阻力^[3-5]。现行的《中国药典》未收载坎地沙坦酯原料及制剂的质量标准。本实验室

已有相关报道采用 HPLC 法测定坎地沙坦酯中有关物质^[6]。在此基础上本实验对比分析了多国药典中坎地沙坦酯相关品种中有关物质检查方法, 建立了一种更优的有关物质检查方法, 选定的色谱条件下, 坎地沙坦酯与有关物质分离良好、耐用性良好。

1 仪器与试药

Waters e2695—2998 高效液相色谱仪, Empower 色谱工作站, Thermo Fishier LCQ Advantage Max 离子阱液质联用仪, SB—5200D 超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), Anke TGL—16C 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

坎地沙坦酯 (自制, 质量分数 > 99.5%); 坎地

收稿日期: 2013-11-25

作者简介: 房思萌 (1987—), 女, 吉林长春人, 研究实习员, 硕士, 从事药品质量控制工作。Tel: (022) 23006839 E-mail: fangsm@tjipr.com

*通信作者 苏慕君 Tel: (022) 23006880 E-mail: sumj@tjipr.com

沙坦酯杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I 均为自制对照品；欧盟药典系统适用性对照品 (European Pharmacopoeia Reference Standard)；欧盟药典鉴别对照品 (European Pharmacopoeia Reference Standard)；坎地沙坦酯片批号分别为 018B、019A、020B、021A、022A、023A，由天津武田药品有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相 A：乙腈 - 水 - 冰醋酸 (57 : 43 : 1)，流动相 B：乙腈 - 水 - 冰醋酸 (90 : 10 : 1)；梯度洗脱：0~30 min，流动相 A 的比例从 100% 降至 0%，30~40 min，流动相 A 的比例保持 0% 不变，40~50 min，流动相 A 的比例从 0% 增加至 100%；

体积流量：0.9 mL/min；柱温：35 ℃；样品仓温度：10 ℃；进样量：20 μL；检测波长：254 nm。

2.2 质谱条件

离子化模式 ESI，离子检测模式：全扫描，分析模式：正离子模式，采集范围： m/z 100~2 000，毛细管温度：220 ℃，喷雾电压：4.5 kV，毛细管电压：25 V，鞘气流体积流量：35 L/min，辅助气流体积流量：20 L/min。

2.3 杂质的结构、相对分子质量及质量分数的测定

采用高效液相色谱条件测定坎地沙坦酯及 9 个杂质的 HPLC 质量分数，再按照同一方法调整体积流量为 0.4 mL/min，采用液 - 质联用测定杂质对照品的分子离子峰，确定相对分子质量，结果见图 1、表 1。

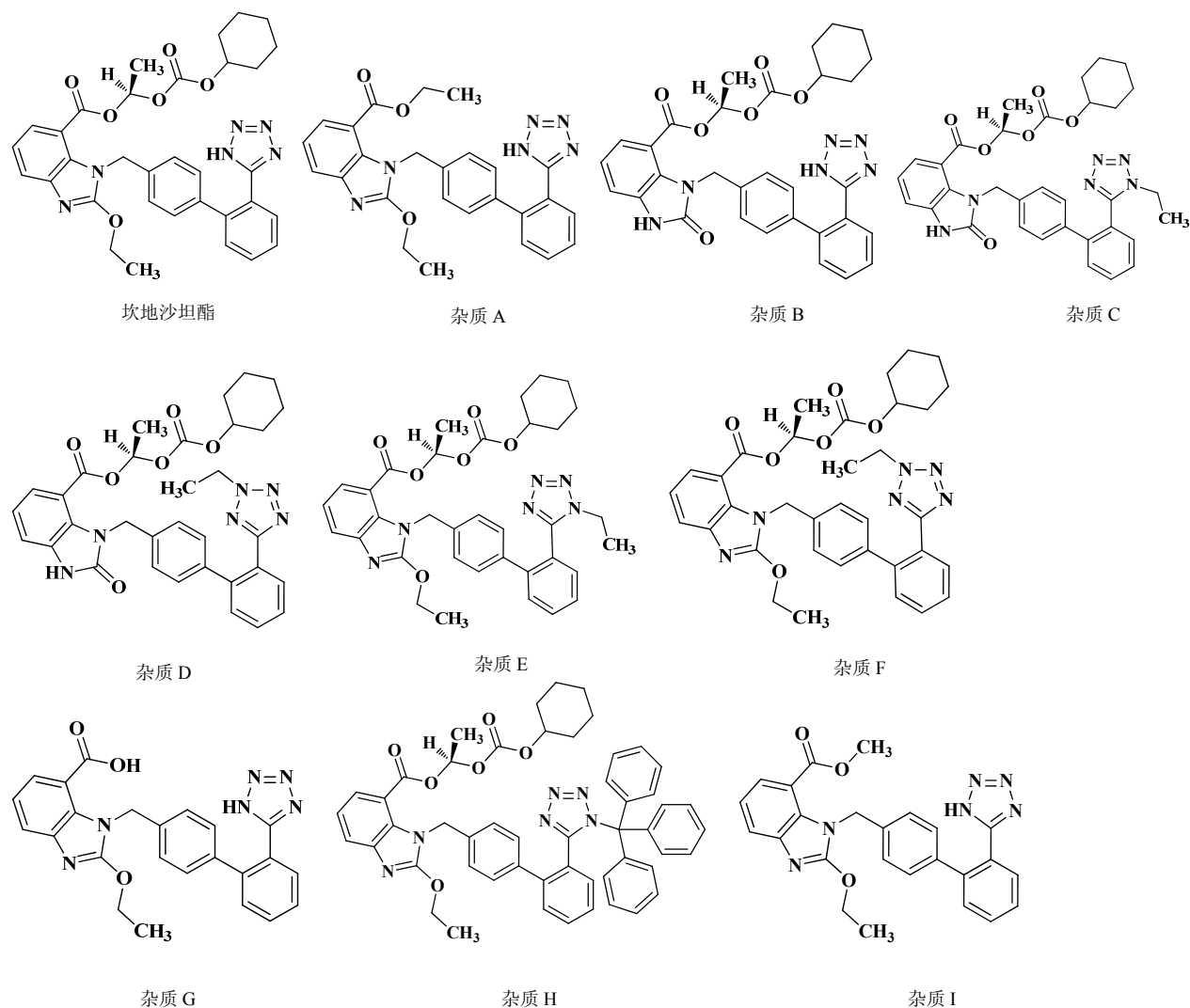


图 1 坎地沙坦酯及杂质的结构式

Fig. 1 Structures of candesartan cilexetil and its impurities

表 1 坎地沙坦酯及其杂质的相关数据

Table 1 Data of candesartan cilexetil and its impurities

名 称	分子式	理论相对分子质量	分子离子峰	质量分数/%
坎地沙坦酯对照	C ₃₃ H ₃₄ N ₆ O ₆	610.66	610.98 (坎地沙坦酯+H ⁺)	99.75
杂质 G	C ₂₄ H ₂₀ N ₆ O ₃	440.45	441.01 (G+H ⁺)	98.81
杂质 I	C ₂₅ H ₂₂ N ₆ O ₃	454.48	455.04 (I+H ⁺)	97.83
杂质 A	C ₂₆ H ₂₄ N ₆ O ₃	468.51	469.03 (A+H ⁺)	99.50
杂质 B	C ₃₁ H ₃₀ N ₆ O ₆	582.61	582.85 (B+H ⁺)	99.02
杂质 C	C ₃₃ H ₃₄ N ₆ O ₆	610.66	610.94 (C+H ⁺)	95.74
杂质 D	C ₃₃ H ₃₄ N ₆ O ₆	610.66	610.94 (D+H ⁺)	99.40
杂质 E	C ₃₅ H ₃₈ N ₆ O ₆	638.71	638.99 (E+H ⁺)	95.69
杂质 F	C ₃₅ H ₃₈ N ₆ O ₆	638.71	638.97 (F+H ⁺)	97.85
杂质 H	C ₅₂ H ₄₈ N ₆ O ₆	852.97	875.17 (H+Na ⁺)	99.72
欧盟系统适用性对照品			469.05、582.84、610.95、638.99	
欧盟鉴别对照品			441.00、610.96、875.09	
坎地沙坦酯片 (021A)			582.81、610.96、639.00、639.01	

根据液质联用测定结果可知,各杂质的单独测定值与欧盟对照品、坎地沙坦酯+9个杂质(A、B、C、D、E、F、G、H、I)、坎地沙坦酯和相应杂质的测定值一致,各杂质分子离子峰与理论相对分子质量结果一致,各峰归属明确,分离度良好,峰质量分数较好,作为杂质定位符合要求。

2.4 专属性试验

2.4.1 1%坎地沙坦酯对照品溶液的制备 取坎地沙坦酯对照品适量,加乙腈-水(3:2)溶解,配制成质量浓度为4 μg/mL的溶液。

2.4.2 辅料溶液的制备 按处方比例取混合辅料适量,加乙腈-水(3:2)溶解,离心取上清液,即得。

2.4.3 1%杂质A~I溶液的制备 分别取各杂质对照品适量,加乙腈-水(3:2)溶解,配制成质量浓度为4 μg/mL的溶液。

2.4.4 坎地沙坦酯与杂质混合溶液的制备 分取坎地沙坦酯及9个杂质对照品适量,加乙腈-水(3:2)溶解,使坎地沙坦酯终质量浓度为400 μg/mL,各杂质终质量浓度为4 μg/mL。

2.4.5 供试品溶液的制备 取坎地沙坦酯片(批号018B)研细粉适量(相当于坎地沙坦酯4 mg),加乙腈-水(3:2)溶解,离心,取上清液作为供试品溶液(坎地沙坦酯质量浓度为400 μg/mL)。

2.4.6 测定 取流动相、溶媒及上述溶液各20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图2。可见流动

相、溶媒、辅料色谱图中有背景峰,背景峰与坎地沙坦酯及各杂质峰分离度良好,不干扰坎地沙坦酯中有关物质检查。坎地沙坦酯+1%杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I混合对照品溶液色谱图中,出峰顺序为杂质G、I、A、B、C、坎地沙坦酯、D、E、F、H,杂质A、B的分离度为10.4,分离良好。结果表明,在选定的液相色谱条件下,流动相峰、溶媒峰、坎地沙坦酯峰、9个已知杂质峰、未知杂质峰均有明确归属,相互之间分离度良好。

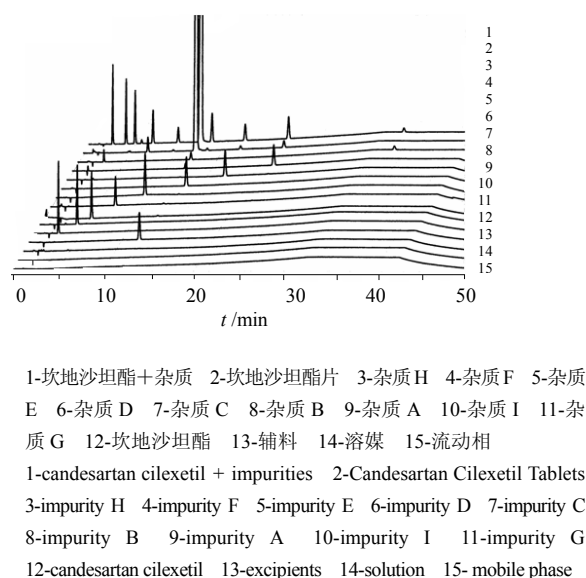


图 2 坎地沙坦酯专属性试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms of candesartan cilexetil in specificity test

2.5 线性关系、校正因子

分取坎地沙坦酯和杂质 A、B、C、D、E、F、G、I 对照品各 20 mg，杂质 H 40 mg，加乙腈-水 (3:2) 溶解配制混合贮备液。其中坎地沙坦酯和杂质 A、B、C、D、E、F、G、I 质量浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ ，杂质 H 质量浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 。依次稀释成坎地沙

坦酯和杂质 A、B、C、D、E、F、G、I 质量浓度分别为 40、20、10、4、0.4、0.2、0.04 $\mu\text{g/mL}$ ，杂质 H 质量浓度分别为 80、40、20、8、0.8、0.4、0.08 $\mu\text{g/mL}$ 系列溶液，依次注入液相色谱仪，记录色谱图，结果见表 2。以坎地沙坦酯线性方程的斜率与杂质斜率之比计算杂质校正因子^[7]，结果见表 2。

表 2 坎地沙坦酯和杂质的线性、校正因子试验结果

Table 2 Linearities and correction factors of candesartan cilexetil and its impurities

名 称	回归方程	相关系数 (R^2)	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	校正因子
坎地沙坦酯	$A=38\,384\,C+4\,762.9$	0.999 9	0.04~39.60	1.00
杂质 A	$A=50\,099\,C+4\,506.4$	0.999 9	0.04~39.80	0.77
杂质 B	$A=31\,101\,C+2\,661.0$	0.999 9	0.04~39.88	1.23
杂质 C	$A=39\,317\,C+2\,795.2$	0.999 9	0.04~40.04	0.98
杂质 D	$A=39\,749\,C+3\,125.3$	0.999 9	0.04~39.84	0.97
杂质 E	$A=38\,177\,C+2\,650.3$	0.999 9	0.04~39.96	1.01
杂质 F	$A=35\,227\,C+2\,222.7$	0.999 9	0.04~39.88	1.09
杂质 G	$A=50\,543\,C+4\,455.7$	0.999 9	0.04~39.60	0.76
杂质 H	$A=26\,628\,C+2\,336.1$	0.999 9	0.08~80.12	1.44
杂质 I	$A=49\,363\,C+4\,630.4$	0.999 9	0.04~39.92	0.78

杂质 C、D、E、F 的校正因子在 0.9~1.1，进行杂质计算时不需要校正因子，采用以坎地沙坦酯为对照的外标法进行计算。杂质 A、B、G、H、I 的校正因子在 0.9~1.1 之外，进行杂质计算时采用加校正因子的外标法进行计算^[8]。

2.6 重复性试验

1%坎地沙坦酯对照品溶液，重复进样 6 次，测定峰面积，结果 RSD 值为 0.45%。

2.7 精密度试验

取坎地沙坦酯片 (批号 018B) 样品适量，平行配制 6 份供试品溶液，进样 20 μL ，测定峰面积值，结果主峰峰面积 RSD 值为 0.00%，杂质 A、B、C、D、E、F 峰面积 RSD 值分别为 6.90%、0.89%、3.92%、2.75%、1.27%、0.65%，总杂质峰面积 RSD 值为 0.56%。

2.8 稳定性试验

配制 1%坎地沙坦酯对照品、坎地沙坦酯片供试品溶液 (批号 018B)，将其置于 10 $^{\circ}\text{C}$ 样品仓中放置，于 0、0.8、1.7、2.5、3.3、4.2、12、24、60 h 注入液相色谱仪，记录色谱图。结果 1%坎地沙坦酯对照品溶液峰面积 RSD 值为 0.92%。供试品溶液

中坎地沙坦酯、总杂质、杂质 A、B、E、F 峰面积的 RSD 值分别为 0.01%、2.55%、5.89%、2.82%、3.10%、1.38%。

2.9 耐用性试验

HPLC 系统参数变化包括流动相比比例 $\pm 10\%$ ；体积流量 $\pm 0.2\text{ mL/min}$ ；柱温 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；醋酸比例 $\pm 20\%$ 。考察 HPLC 系统参数微调对坎地沙坦酯及杂质混合对照液中各杂质与坎地沙坦酯的相对保留时间的变化。结果各杂质对坎地沙坦酯的相对保留时间的 RSD 值均小于 10%，符合规定，表明系统参数耐用性良好。

2.10 有关物质的测定

按坎地沙坦酯有关物质检查方法对坎地沙坦酯片 6 个批次样品进行检测，结果见表 3。结果显示，所采用的测定方法能有效检出、归属、定量测定各杂质，供试品中单一最大杂质为杂质 B，其质量分数为 0.36%~0.40%，总杂质为 0.8%~1.02%，符合各国药典的杂质限度要求，可为临床安全用药提供有力依据。

3 讨论

本研究建立了坎地沙坦酯中有关物质测定的方

表 3 坎地沙坦酯片中有关物质的测定结果

Table 3 Determination of related substances in Candesartan Cilexetil Tablets

批号	质量分数/%										总杂质
	杂质 A	杂质 B	杂质 C	坎地沙坦酯	杂质 D	杂质 E	杂质 F	杂质 G	杂质 H	杂质 I	
018B	0.04	0.37	0.03	99.14	0.05	0.12	0.25	—	—	—	0.86
019A	0.05	0.40	0.03	99.06	0.06	0.13	0.27	—	—	—	0.94
020B	0.01	0.37	0.02	99.18	0.04	0.12	0.26	—	—	—	0.82
021A	0.06	0.39	0.05	98.98	0.08	0.14	0.30	—	—	—	1.02
022A	0.02	0.37	0.02	99.18	0.04	0.12	0.25	—	—	—	0.82
023A	0.03	0.36	0.01	99.20	0.04	0.11	0.25	—	—	—	0.80

—未检测到

—not detected

法,并测定了坎地沙坦酯中 9 个杂质的质量分数、相对分子质量;通过坎地沙坦酯与 5 个已知杂质混合液的耐用性试验结果表明坎地沙坦酯中有关物质检查的高效液相色谱系统耐用性良好;对坎地沙坦酯片中坎地沙坦酯和各杂质进行了定位、定量测定,为坎地沙坦酯及其片剂中有关物质检查项下标准的提升提供参考和依据。

参考文献

- [1] 何颖娜,尚京川.抗高血压新药-坎地沙坦酯[J].重庆医学,2004,33(12):1896.
- [2] 张永东,魏秀华,王安发,等.HPLC 法测定坎地沙坦酯及其有关物质[J].中南药学,2004,2(2):80.
- [3] Joost A, Schunkert H, Radke P W. Candesartan cilexetil: an update [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2011, 12(11): 1769-1780.
- [4] Raman B, Sharma B A, Mahale G, *et al*. Investigation and structural elucidation of a process related impurity in candesartan cilexetil by LC/ESI-ITMS and NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(2): 256-263.
- [5] Fotakis C, Megariotis G, Christodouleas D, *et al*. Comparative study of the AT₁ receptor prodrug antagonist candesartan cilexetil with other sartans on the interactions with membrane bilayers [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(12): 3107-3120.
- [6] 马超,苏慕君,臧可昕.坎地沙坦酯片有关物质测定方法考察[J].医药导报,2013,32(2):208.
- [7] 张哲峰.浅谈“色谱方法验证原则”[C].药品技术审评论坛-第二届药品技术审评研讨会论文集.北京:国家食品药品监督管理局药品审评中心,2004:739.
- [8] 张哲峰.原料质量控制研究案例分析及技术要求[R].北京:2013 年国家食品药品监督管理局药品审评中心药物研发与评价研讨班,2013.