

HPLC 法测定琥珀酸索利那新原料药中有关物质

李艳贞¹, 王成港^{2,3*}

1. 国家食品药品监督管理总局 药品审评中心, 北京 100022
2. 天津药物研究院, 天津 300193
3. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立琥珀酸索利那新原料药中有关物质的 HPLC 测定方法。方法 建立了高效液相色谱 (HPLC) 法, Agilent ZORBAX SB-Phenyl 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈 (70 : 20 : 10) 为流动相 A, 以磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈 (30 : 30 : 40) 为流动相 B, 进行梯度洗脱; 检测波长为 220 nm; 柱温 35 °C; 体积流量为 1.5 mL/min; 进样体积 20 μL。采用加校正因子自身对照法计算琥珀酸索利那新原料药中杂质 1~5。结果 琥珀酸索利那新中杂质 1~5 的相对保留时间分别为 0.34、0.39、1.2、1.7、2.3, 校正因子分别为 1.3、0.86、0.49、0.94、0.47。各杂质定量限相当于主成分浓度的 0.005%~0.007%。杂质回收率在 93.0%~94.4%。结论 该方法的专属性、线性、灵敏度、准确度、重复性、溶液稳定性均符合要求, 可用于琥珀酸索利那新原料药中有关物质测定。

关键词: 琥珀酸索利那新原料药; 索利那新; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2018)07 - 1573 - 06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.07.004

Determination of related substances in solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient by HPLC

LI Yan-zhen¹, WANG Cheng-gang^{2,3}

1. Center for Drug Evaluation, CFDA, Beijing 100022, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
3. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of related substances in solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient. **Methods** The determination was carried out on ZORBAX SB-Phenyl chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of phosphate buffers - methanol - acetonitrile (70 : 20 : 10) (A) and Phosphate buffers - methanol - acetonitrile (30 : 30 : 40) (B) with gradient elution. The detection wavelengths were set at 220 nm. The flow rate was 1.5 mL/min, temperature of column was set at 35 °C, and volume of injection was 20 μL. The self-contract method of principle component using the correction factor method was used to calculate the content of the related substances 1 — 5. **Results** The relative retention time of impurities 1 — 5 were 0.34, 0.39, 1.2, 1.7, and 2.3, respectively, and the correction factors were 1.3, 0.86, 0.49, 0.94, and 0.47, respectively. Limits of detection (LOD) of impurities were in the range of 0.005% — 0.007%. The recoveries were 93.0% — 94.4% for all impurities. **Conclusion** The specificity, linearity, sensitivity, accuracy, repeatability, and solution stability of the method meet the requirements, and can be used for the determination of the related substances in solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient.

Key words: solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient; solifenacin succinate; related substance; HPLC

琥珀酸索利那新是口服毒蕈碱 M3 受体拮抗剂, 用于膀胱过度活动症患者伴有的尿失禁和/或尿频、尿急症状的治疗^[1]。其原料药质量标准收载于

《英国药典》2018 年版、《欧洲药典》9.3。《英国药典》、《欧洲药典》有关物质方法和限度一致, 均收载了杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I 9 种杂质,

收稿日期: 2018-05-17

作者简介: 李艳贞 (1985—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事制剂研发和化学药品审评。Tel: (010)85242606 E-mail: liyzh@cde.org.cn

*通信作者 王成港 E-mail: wangcg@tjipr.com

其中异构体杂质(杂质F、G、H)和杂质E采用单独方法进行控制,有关物质项下方法对杂质A、B、C、D、I进行了控制^[2-3]。由于合成路径的差异,琥珀酸索利那新原料药中所含杂质除异构体杂质和杂质E外,其余杂质种类与《英国药典》收录的杂质有较大差异。采用《英国药典》方法无法有效检测原料药中的杂质。因此本实验建立了琥珀酸索利那新原料药中有关物质的HPLC测定方法,并按照相关指导原则的要求对方法进行了验证,采用加校正因子的自身对照法测定本品中有关物质^[4-5]。通过对琥珀酸索利那新原料药的合成路径和降解途径分析,结合中间体粗品检测,确定了本品原料药中所含杂质种类,杂质名称和结构见图1。

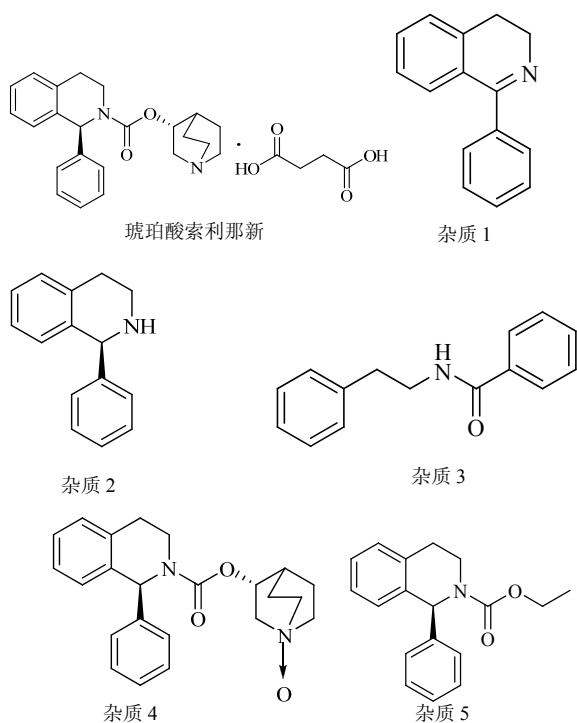


图1 琥珀酸索利那新及其杂质1~5结构

Fig. 1 Chemical structures of solifenacin succinate and its impurities 1 — 5

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(LabAlliance series 1500 系统,紫外检测器,自动进样器); Shimadzu 高效液相色谱仪(LC-20AB 泵, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 二极管阵列检测器, LabSolution 工作站, 日本岛津公司)。

琥珀酸索利那新对照品(质量分数 $\geq 98\%$, TRC 公司, 批号 1-GRS-3), 琥珀酸索利那新原料药(天

津药物研究院自制, 批号 SF-1、SF-2、SF-3), 杂质 1、2、3、4、5(天津药物研究院自制, 经结构确认, 质量分数 $\geq 98\%$)、磷酸、磷酸二氢钾、三乙胺、甲醇、乙腈均为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

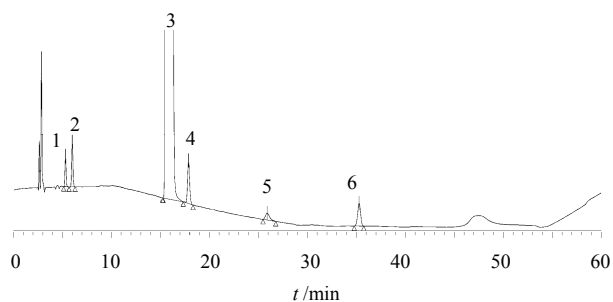
Agilent ZORBAX SB-Phenyl 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 以磷酸盐缓冲液(溶解 4.1 g 磷酸二氢钾于 1 L 水中, 加 1 mL 三乙胺, 用磷酸调 pH 4.0) - 甲醇 - 乙腈(70:20:10)为流动相 A, 以磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈(30:30:40)为流动相 B, 进行梯度洗脱: 0~5 min 75% A, 5~25 min 30% A, 25~50 min 35% A, 50~55 min 75% A, 55~60 min 75% A; 检测波长为 220 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量为 1.5 mL/min; 进样体积 20 μ L。

2.2 系统适应性

取琥珀酸索利那新及各杂质适量, 用稀释液溶解, 并定量稀释制成约含琥珀酸索利那新 1.5 mg/mL、各杂质 1.5 μ g/mL 的溶液, 作为系统适用性溶液。取系统适用性溶液按上述色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍。各峰的出峰顺序分别为琥珀酸(忽略不计)、杂质 1、杂质 2、索利那新、杂质 3、杂质 4、杂质 5, 各杂质的相对保留时间分别为 0.34、0.39、1.2、1.7、2.3。杂质 1 与杂质 2 之间的分离度 ≥ 1.5 ; 索利那新峰与杂质 3 峰之间的分离度 ≥ 2.0 , 主成分峰面积 RSD 值 $\leq 2.0\%$, 见图 2。

2.3 专属性试验

取琥珀酸索利那新原料药和杂质 1、2、3、4、



1-杂质 1 2-杂质 2 3-索利那新 4-杂质 3 5-杂质 4 6-杂质 5
1-impurity 1 2-impurity 2 3-solifenacin succinate 4-impurity 3
5-impurity 4 6-impurity 5

图2 系统适用性图谱

Fig. 2 Chromatogram of system suitability

5 对照品适量，用乙腈 - 磷酸盐缓冲液 (50 : 50) 溶解，分别制成 15 mg/mL 的原料药储备液、15 μg/mL 的杂质储备液。

取琥珀酸索利那新原料药储备液适量，分别放置于高温、光照、酸、碱、氧化条件下进行强制降解后，制成适当的溶液，进样，按上述色谱条件进样测定，采用二极管阵列检测器检测 (检测波长范围 190~400 nm)。

取空白溶剂、稀释液以及各破坏试验供试品溶液进样测定，考察空白溶剂、稀释液的干扰以及各破坏试验条件下降解杂质与已知杂质、主成分分离情况。结果显示，在各破坏条件下未出现新杂质；氧化条件下杂质 4 (索利那新氮氧化物) 增长显著，由 0.06% 增长至 2.5%，总杂由 0.25% 增长至 2.62%，含量由 99.4% 降为 93.1%；其余强制降解条件下杂质 4 也有增长趋势，最大由 0.06% 增长至 1.3%，总杂最大由 0.25% 增长至 1.41%，含量最大由 99.4% 降为 95.10%。

二极管阵列检测结果表明，各降解条件下主峰纯度因子均大于 995，相邻色谱峰之间分离度均大于 1.5，物料平衡均在 95.7%~105.1%，符合专属性要求 (图 3)。

2.4 线性试验和杂质校正因子

分别取琥珀酸索利那新原料药和各杂质储备液适量，逐级稀释制成 0.15、0.3、0.6、1.2、1.5、2.4、3 μg/mL 的线性溶液，进样测定。以峰面积对质量浓度进行线性回归，得各组分线性方程，见表 1。主成分和杂质的斜率之比即为杂质校正因子。由结果可知，琥珀酸索利那新和各杂质在 0.15~3 μg/mL 线性关系良好，线性相关系数大于 0.999。杂质 4 的校正因子实测值为 0.94，在 0.9~1.1 可直接采用自身对照法计算，即校正因子视为 1.0^[6]，其余杂质校正因子按照实测值计算。

2.5 定量限、检测限

取琥珀酸索利那新原料药和各杂质的线性溶液，逐级稀释制备成系列质量浓度的供试品溶液，按上述色谱条件进行测定，分别以信噪比 (S/N) 3、10 计算琥珀酸索利那新和各杂质的检测限和定量限，结果见表 2。可见各杂质定量限相当于主成分质量浓度的 0.005%~0.007%。

2.6 准确度试验

精密称取琥珀酸索利那新原料药和各杂质的储备液适量，加稀释液制备成琥珀酸索利那新质量浓

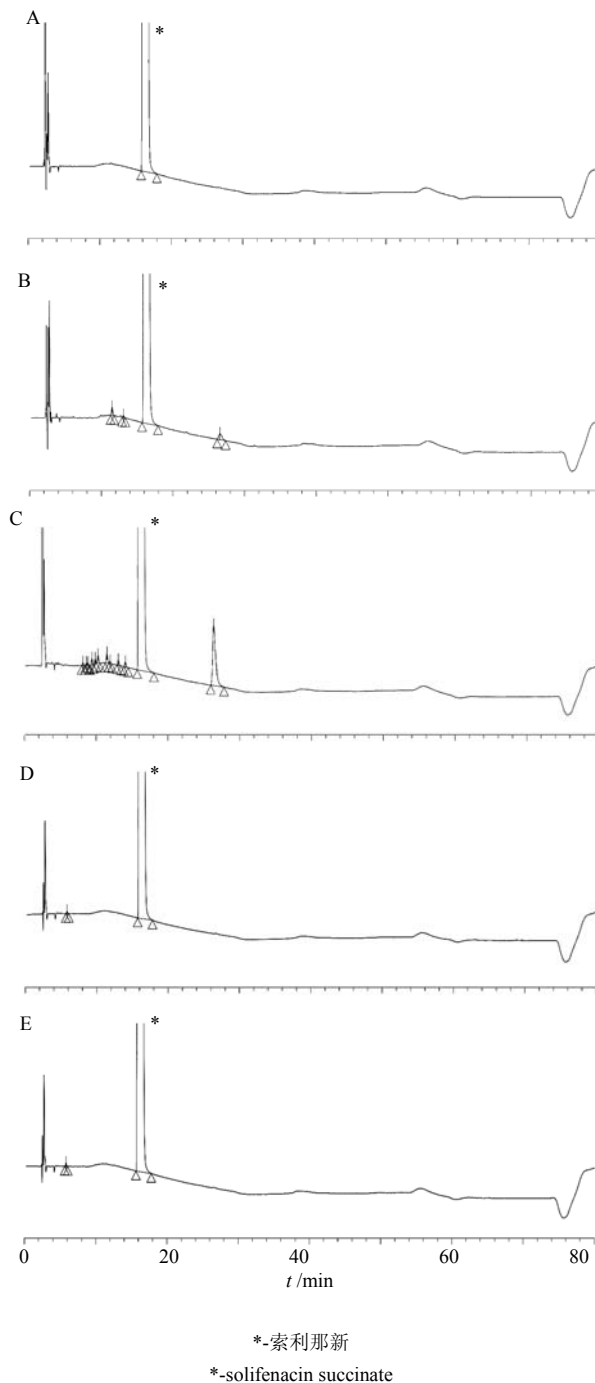


图 3 酸破坏原料(A)、碱破坏原料(B)、氧化破坏原料(C)、高温 10 d 原料 (D) 和光照 10 d 原料 (E) 的强制降解 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC Chromatograms of sample destroyed with acid (A), alkali (B), oxidation (C), high temperature for 10 d (D), and light for 10 d (E)

度为 1.5 mg/mL、各杂质质量浓度分别为 0.15、1.5、3 μg/mL 的供试品溶液，每个质量浓度的溶液配制 3 份。进样测定，计算杂质回收率。结果显示，杂质

表1 线性结果和校正因子

Table 1 Linearity and the relative correction factors

组分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	校正因子
索利那新	$Y=14\ 197 X-502$	0.999 8	0.15~3.00	
杂质1	$Y=11\ 034 X+141$	0.999 7	0.15~3.00	1.30
杂质2	$Y=16\ 478 X-602$	0.999 8	0.15~3.00	0.86
杂质3	$Y=29\ 135 X-323$	0.999 6	0.15~3.00	0.49
杂质4	$Y=15\ 112 X-611$	0.999 3	0.15~3.00	0.94
杂质5	$Y=30\ 147 X-752$	0.999 5	0.15~3.00	0.47

表2 定量限(LOQ)和检测限(LOD)测定结果

Table 2 Results of LOQ and LOD

名称	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限相当样品浓度比/%
杂质1	0.073	0.024	0.005
杂质2	0.038	0.013	0.003
杂质3	0.051	0.017	0.003
杂质4	0.106	0.053	0.007
杂质5	0.074	0.025	0.005
琥珀酸索利那新	0.108	0.036	0.007

1~5的平均回收率分别为93.4%、93.2%、93.5%、94.4%、93.0%，RSD值分别为3.8%、2.8%、3.7%、4.5%、3.4%。根据指导原则要求^[5]，待测成分含量在0.01%范围内时回收率需满足85%~110%，RSD值 \leq 8%；待测成分含量在0.1%范围内时回收率需满足90%~108%，RSD值 \leq 6%。本品方法的回收率能够满足测定要求。

2.7 精密度试验

2.7.1 重复性试验 按系统适用性溶液方法制备供试品溶液(琥珀酸索利那新原料药批号SF-1)，平行配制6份，进样测定，结果各杂质质量分数的RSD值分别为1.2%、1.3%、0.98%、1.1%、0.97%，检测结果RSD值 \leq 3%，符合要求^[5]。

2.7.2 中间精密度 分别于同一周内的第0、3天由不同分析人员配制供试品溶液，使用不同的高效液相色谱仪进样测定，结果样品中杂质质量分数的RSD值分别为4.1%、3.7%、2.5%、3.1%、2.8%。检测结果RSD值 \leq 6%^[5]。

2.8 稳定性试验

取精密度试验项下的供试品溶液(琥珀酸索利那新原料药批号SF-1)，分别于0、4、8、12、24、36 h进样测定，各杂峰面积RSD值分别为3.1%、

4.2%、2.7%、3.9%、3.5%，且未检出新杂质。结果显示供试品溶液在室温条件下放置36 h稳定。

2.9 耐用性试验

为了考察色谱条件波动对有关物质测定结果的影响，选择调节不同体积流量(0.8~1.2 mL/min)、波长(215~225 nm)、流动相的pH值(3.0~4.0)和色谱柱等因素来考察有关物质方法的耐用性。

按精密度试验项下方法配制供试品溶液，分别在不同色谱条件下进行测定，结果见表3、4。可见体积流量和色谱柱对系统适应性和杂质测定结果的影响较大，体积流量增大或降低时相邻色谱峰的分度显著降低，理论塔板数降低。同时杂质测定值也相应减小。其余色谱条件的变化对系统适应性和杂质测定无显著影响，各条件系统适用性中杂质1与2分离度均 >1.5 ，索利那新与杂质3分离度均 >2.0 ，相邻色谱峰分离度良好，满足要求。各耐用性条件下，供试品中已知杂质质量分数RSD值 $\leq 2.0\%$ 。

2.10 样品测定

取琥珀酸索利那新原料药(批号SF-1、SF-2、SF-3)适量，制成1.5 mg/mL供试品溶液，精密量取供试品溶液适量，稀释制备成1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，作为自身对照溶液。精密量取供试品溶液和自身对照溶液各20 μL ，进样测定，记录色谱图。供试品溶液色谱图中如有杂质峰(溶剂峰和琥珀酸峰除外)，按加校正因子的自身对照法计算。原料药中杂质的质量分数见表5、图4。从测定结果可知，3批琥珀酸索利那新原料药样品质量均一性较好。

3 讨论

高效液相色谱法是药品有关物质控制的常用方法，其杂质计算方法包括外标法、加校正因子的自身对照法、自身对照法和峰面积归一化法。其中加校正因子的自身对照法充分考虑了杂质与主成分的

表3 耐用性试验结果—系统适应性
Table 3 Durability test- System suitability

色谱条件	杂质1与2的分离度	索利那新峰与杂质3分离度	主峰理论塔板数
标准色谱条件	2.1	2.7	5 834
体积流量 0.8 mL/min	1.8	2.1	3 135
体积流量 1.2 mL/min	1.4	1.5	3 895
波长 215 nm	2.2	2.6	6 768
波长 225 nm	2.0	2.7	5 444
柱温 30 °C	2.1	2.7	9 685
柱温 40 °C	2.0	2.6	7 066
Phenomenex Luna 苯基柱	1.5	1.9	3 163
流动相 pH 3.0	1.9	2.5	4 521
流动相 pH 4.0	1.8	2.6	5 808

表4 耐用性试验-有关物质测定结果
Table 4 Durability test- the impurities test results

色谱条件	质量分数/%				
	杂质1	杂质2	杂质3	杂质4	杂质5
标准色谱条件	0.11	0.10	0.12	0.12	0.11
体积流量 0.8 mL/min	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08
体积流量 1.2 mL/min	0.14	0.15	0.15	0.14	0.16
波长 215 nm	0.12	0.12	0.10	0.09	0.09
波长 225 nm	0.12	0.11	0.11	0.10	0.08
柱温 30 °C	0.09	0.09	0.13	0.08	0.07
柱温 40 °C	0.07	0.08	0.11	0.13	0.12
Luna 苯基柱	0.07	0.08	0.06	0.06	0.09
流动相 pH 3.0	0.09	0.11	0.10	0.09	0.11
流动相 pH 4.0	0.12	0.09	0.07	0.11	0.13

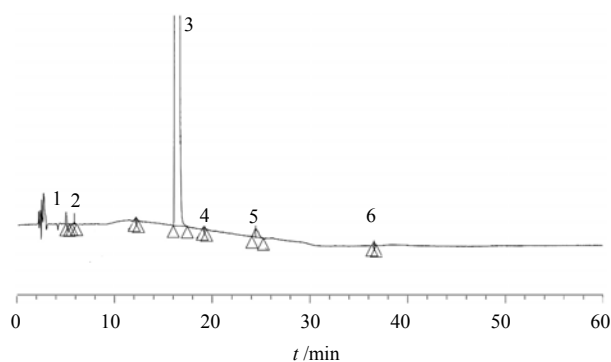
表5 琥珀酸索利那新原料药中有关物质测定结果
Table 5 Determination of related substances in solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient

批号	质量分数/%						
	杂质1	杂质2	杂质3	杂质4	杂质5	其他最大单杂	总杂
SF-01	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.23
SF-02	0.05	0.03	0.02	0.07	0.02	0.02	0.21
SF-03	0.05	0.02	0.05	0.04	0.03	0.01	0.2

绝对校正因子的不同所引起的测定误差，将标准物质的色谱信息转化为常数定入质量标准中，且不需长期提供标准物质，因而成为普遍应用的杂质计算方法^[6]。

本实验建立了琥珀酸索利那新原料药中有关物质1~5的高效液相色谱测定方法，并按照相关指导原

则的要求对方法进行了方法学验证，采用加校正因子的自身对照法测定有关物质。琥珀酸索利那新中5个已知杂质1~5的校正因子实测值分别为1.3、0.86、0.49、0.94、0.47，其中杂质4的杂质校正因子在0.9~1.1，校正因子可按1.0计算，其余杂质校正因子按照实测值计算。



1-杂质 1 2-杂质 2 3-索利那新 4-杂质 3 5-杂质 4 6-杂质 5
 1-impurity 1 2-impurity 2 3-solifenacin succinate 4-impurity 3
 5-impurity 4 6-impurity 5

图 4 琥珀酸索利那新原料药 (批号 SF-2) 的 HPLC 图谱
Fig. 4 HPLC Chromatogram of solifenacin succinate active pharmaceutical ingredient (Batch No SF-2)

耐用性试验结果显示体积流量和色谱柱对系统适应性和杂质测定结果影响较大, 体积流量增大或降低时相邻色谱峰的分度显著降低, 理论塔板数降低, 同时杂质测定值也相应减小。分析其主要原因因为上述色谱条件的变化引起系统适应性降低, 如体积流量降低或更换色谱柱时, 色谱峰宽度变大,

方法的灵敏度降低, 从而导致杂质检出量降低。当体积流量增大时, 相邻色谱峰之间的分离度减少, 存在较大的积分误差, 从而导致了杂质检出量出现显著性差异。从耐用性试验可知, 色谱条件的变化主要通过影响方法的系统适应性, 从而影响杂质检出量。由于体积流量和色谱柱对杂质检出有较显著影响, 因此需要在质量标准中明确体积流量和色谱柱型号等信息。

方法学验证结果显示, 该方法的专属性、线性、灵敏度、准确度、重复性、溶液稳定性均符合要求, 可用于琥珀酸索利那新原料药中有关物质测定。

参考文献

- [1] 吴士良, 肖云翔, 段继宏. 索利那新治疗尿急及急迫性尿失禁的有效性和安全性分析 [J]. 中华泌尿外科科学杂志. 2009. 30(9): 630-634.
- [2] *European Pharmacopoeia* [S]. 9.3:2779.
- [3] *British Pharmacopoeia* [S]. 2018.
- [4] ICH Guidelines on Validation of Analytical procedure: Text and Methodology Q2 (R1), (2011).
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 374.
- [6] 张哲峰. 浅析高效液相色谱法校正因子研究中存在的问题 [N]. 中国医药报, 2011-12-16(06).