

HPLC 法测定注射用特利加压素中有关物质

王培, 段玺玉, 鲁鑫, 马冰, 覃婷婷, 白海娇, 韩晓捷*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定注射用特利加压素中有关物质。方法 采用 Agilent Poroshell 120EC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈 (90:10) 为流动相 A, 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈 (60:40) 为流动相 B, 梯度洗脱; 检测波长为 210 nm; 体积流量为 0.7 mL/min; 进样量为 20 μL; 柱温为 35 °C。按照主成分对照品外标法计算。结果 杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 在 0.04~40.8 μg/mL 线性关系良好; 平均回收率分别为 99.46%、98.35%、98.24%、99.15%、100.01%、99.34%、99.56%、99.42%、98.79%、98.64%、99.16%、98.22%、99.31%、98.11%、99.38%, RSD 值分别为 0.98%、1.23%、1.45%、0.85%、1.21%、1.09%、1.16%、0.94%、1.25%、0.79%、1.42%、0.92%、0.88%、1.72%、1.26%。结论 建立的方法准确、专属性强, 可用于注射用特利加压素中有关物质的质量控制。

关键词: 注射用特利加压素; 有关物质; 杂质 L; 杂质 K; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)10-2537-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.10.011

Determination of related substances in Terlipressin for injection by HPLC

WANG Pei, DUAN Xiyu, LU Xin, MA Bing, QIN Tingting, BAI Haijiao, HAN Xiaojie

Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of substances in Terlipressin for injection. **Methods** Agilent Poroshell 120EC-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) was used. Mobile phase A was potassium dihydrogen phosphate buffer - acetonitrile (90:10), mobile phase B was potassium dihydrogen phosphate buffer - acetonitrile (60:40), and gradient elution was carried on. Detection wavelength was set at 210 nm, volume flow rate was 0.7 mL/min, and injection volume was 20 μL. Column temperature was 35 °C. The related substances were calculated using the principal component reference standard external standard method. **Results** The linear range of impurities L, K, G, I, D, H, E, F, Y, P, M, B, T, J, and N was 0.04 — 40.80 μg/mL. The average recovery was 99.46%, 98.35%, 98.24%, 99.15%, 100.01%, 99.34%, 99.56%, 99.42%, 98.79%, 98.64%, 99.16%, 98.22%, 99.31%, 98.11%, and 99.38%, respectively, and the RSD value was 0.98%, 1.23%, 1.45%, 0.85%, 1.21%, 1.09%, 1.16%, 0.94%, 1.25%, 0.79%, 1.42%, 0.92%, 0.88%, 1.72%, and 1.26%. **Conclusion** The established method is accurate and highly specific, and can be used for quality control of related substances in Terlipressin for injection.

Key words: Terlipressin for injection; related substance; impurity L; impurity K; HPLC

特利加压素是由 12 个氨基酸组成的多肽类药物, 用于治疗食管静脉曲张出血和肝肾综合征肾衰竭^[1-2]。特利加压素采用固相合成法制备, 以二氯甲烷溶胀的氨基树脂为载体, N 端受保护的甘氨酸羧基与树脂游离氨基进行缩合反应, 再脱除 N 端保护基, 裸露的氨基与 2 位赖氨酸羧基缩合^[3]。重复缩合-脱保护过程, 按照 Gly→Lys→Pro→Cys→Asn→Gln→Phe→Tyr→Cys→Gly→Gly→Gly 顺序从 C 端

反应至 N 端。企业大多采用 *N,N'*-二异丙基碳二亚胺为缩合试剂、六氢吡啶为脱保护剂。特利加压素含多个侧链活泼基团, 合成中保持侧链被保护状态, 合成完成后, 切肽试剂断裂与树脂连接的酰胺键, 同时脱除侧链保护基团, 获得还原态特利加压素, 再经双氧水氧化巯基形成二硫键, 生成特利加压素。切肽步骤使用切肽试剂三氟乙酸和保护基捕获剂巯基乙酸、苯酚^[4-5]。特利加压素的结构式见图 1。

收稿日期: 2024-07-16

基金项目: 2023 年国家药品抽检项目 (国药监药管 (2023) 2 号)

作者简介: 王培 (1981—), 女, 主管药师, 硕士, 从事生化药品检验与质量研究。E-mail: ritaw_81@163.com

*通信作者: 韩晓捷 (1980—), 女, 天津人, 副研究员, 本科, 从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: hxjtcd@163.com

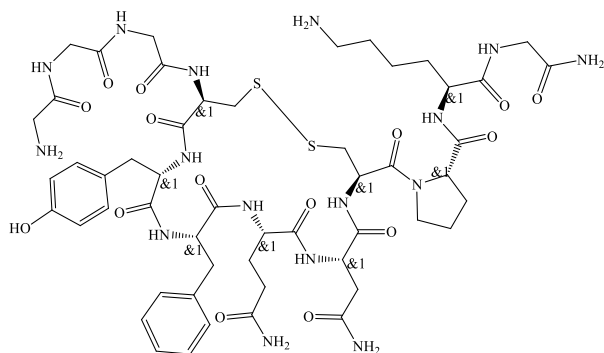


图 1 特利加压素结构式

Fig. 1 Structural formula of terlipressin

特利加压素合成工艺的复杂性决定了其杂质谱的难预测性和多样性。合成过程中可能生成差向肽、缺失肽和错结肽等杂质，很多杂质与目标产物结构、化学性质相近，需经过复杂的提纯过程才能得到合格产品^[6-8]。有关物质对多肽药物的安全性、有效性具有直接影响，属于产品关键质量属性，是该类产品质量研究重点关注内容^[9]。查阅各国药典均未收载注射用特利加压素^[10-14]。醋酸特利加压素原料药仅在《英国药典》(2023)、《欧洲药典》(11.0)中收载。国内仿制药企业、原研企业执行各自的质量标准，已有文献报道采用液相色谱方法测定特利

加压素中 10 种有关物质^[15]。但以上标准、方法仍存在杂质质控种类不全面、结构特点针对性不强、不能根据杂质产生机制优化生产工艺的问题。本研究建立了 RP-HPLC 法同时测定注射用特利加压素中 15 种杂质，建立的方法准确、专属性强，可用于注射用特利加压素中有关物质的质量控制。

1 仪器与试药

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (沃特世公司), MS-205 电子天平 (梅特勒-托利多公司), MilliQ 型超纯水仪 (美国 Milli-Q 公司)。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水。醋酸特利加压素对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 150701-202002, 质量分数为 86.4%); 杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 对照品 (中肽生化有限公司, 质量分数均大于 98%), 信息见表 1。注射用特利加压素购自辉凌制药 (中国) 有限公司 (批号 T16767C)、深圳翰宇药业股份有限公司 (批号 1260220611)、苏州天马医药集团天吉生物制药有限公司 (批号 2212011)、南京星银药业集团有限公司 (批号 115221201)、福建省闽东力捷迅药业股份有限公司 (批号 221001A), 规格均为 1 mg (相当于 0.86 mg 特利加压素)。

表 1 杂质信息

Table 1 Impurity information

成分	名称	氨基酸序列	属性	来源
杂质 B	[des-Gly ¹ ,Gly ²]特利加压素	H-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	断裂肽	降解杂质
杂质 L	[Asp ⁸ ,Gly ¹² -OH]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asp-Cys-Pro-Lys-Gly-OH	水解肽	降解杂质
杂质 K	[Glu ⁷ ,Gly ¹² -OH]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Glu-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-OH	水解肽	降解杂质
杂质 I	[Gly ¹² -OH]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-OH	水解肽	降解杂质
杂质 F	[Glu ⁷]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Glu-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	水解肽	降解杂质
杂质 H	[Asp ⁸]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asp-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	水解肽	降解杂质
杂质 D	[Ac-Gly ¹]特利加压素	Ac-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	乙酰化杂质	降解杂质
杂质 G	[β-Asp ⁸]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-β-Asp-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	环化水解杂质	降解杂质
杂质 J	[Gly ¹² -OEt]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-OE	酯化杂质	降解杂质
杂质 E	[D-Phe ⁶]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-D-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	消旋肽	工艺杂质
杂质 N	硫桥二聚体	Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂ H ₂ N-Gly-Lys-Pro-Cys-Asn-Gln-Phe-Tyr-Cys-Gly-Gly-Gly	聚合肽	降解杂质
杂质 M	[des-Gly ¹²]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-NH ₂	缺失肽	工艺杂质
杂质 P	[add-Gly ¹²]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-Gly-NH ₂	插入肽	工艺杂质
杂质 T	[D-Cys ⁹]特利加压素	H-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-D-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	消旋肽	工艺杂质
杂质 Y	[add-Gly ¹]特利加压素	Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	插入肽	工艺杂质

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Poroshell 120EC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 磷酸二氢钾缓冲液 (取磷酸二氢钾 6.8 g, 庚烷磺酸钠 2 g, 加水至 1 L) - 乙腈 (90:10) 为流动相 A, 磷酸二氢钾缓冲液 - 乙腈 (60:40) 为流动相 B, 梯度洗脱 (0~60 min, 16%→24% B; 60~85 min, 24%→60% B; 85~86 min, 60%→16% B; 86~95 min, 16% B); 检测波长为 210 nm; 体积流量为 0.7 mL/min; 进样量为 20 μL; 柱温为 35 °C; 样品室温度 10 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液的制备 精密称取杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 对照品各适量, 分别用 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释, 制成含各杂质 40 μg/mL 的杂质定位溶液。精密称取醋酸特利加压素对照品适量, 用 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释, 制成 20 mg/mL 对照贮备液。分别精密量取杂质定位溶液、醋酸特利加压素对照贮备液各 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.9%氯化钠溶

液溶解并稀释至刻度, 作为系统适用性溶液。

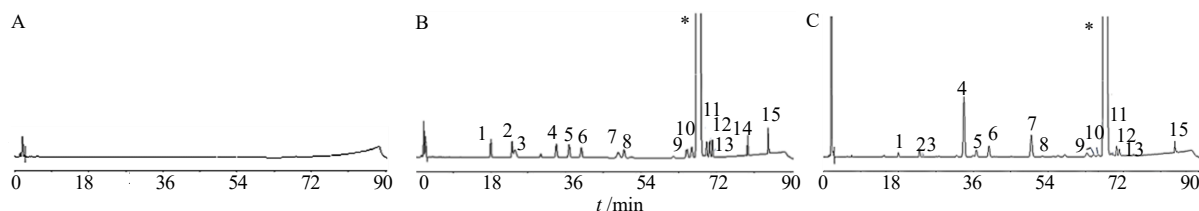
2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取醋酸特利加压素对照品适量, 用 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释, 制成 10 μg/mL 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取注射用特利加压素 1 瓶, 加 0.9%氯化钠溶液 1 mL 溶解, 混匀, 即得。

2.2.4 空白辅料溶液的制备 精密称取甘露醇 1 g, 置 100 mL 量瓶中, 加适量 0.9%氯化钠溶液溶解, 用盐酸调节 pH 值至 3.7, 加 0.9%氯化钠溶液稀释至刻度, 即得。

2.3 系统适用性试验

分别取空白辅料溶液、系统适用性溶液和供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。结果空白辅料不干扰有关物质的测定, 杂质 G 与杂质 K 分离度为 1.0, 杂质 F 与杂质 E 分离度为 1.4, 杂质 P 与杂质 Y 分离度为 1.6, 杂质 P 与特利加压素分离度为 1.3, 特利加压素与杂质 M 分离度为 2.9, 杂质 M 与杂质 B 分离度为 1.7, 杂质 B 与杂质 T 分离度为 1.5, 各相邻色谱峰均能有效分离。特利加压素主峰保留时间为 66.204 min, 色谱图见图 1。



1-杂质 L; 2-杂质 K; 3-杂质 G; 4-杂质 I; 5-杂质 D; 6-杂质 H; 7-杂质 E; 8-杂质 F; 9-杂质 Y; 10-杂质 P; 11-杂质 M; 12-杂质 B; 13-杂质 T; 14-杂质 J; 15-杂质 N; *-特利加压素。

1-impurity L; 2-impurity K; 3-impurity G; 4-impurity I; 5-impurity D; 6-impurity H; 7-impurity E; 8-impurity F; 9-impurity Y; 10-impurity P; 11-impurity M; 12-impurity B; 13-impurity T; 14-impurity J; 15-impurity N; *-terlipressin.

图 2 空白辅料 (A)、系统适用性溶液 (B) 和注射用特利加压素 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of blank excipient (A), system suitability solution (B), and Terlipressin for injection (C)

2.4 线性关系考察

精密称取醋酸特利加压素和杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 对照品适量, 加 0.9%氯化钠溶液稀释成 0.05、0.10、1.00、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00 μg/mL 的混合对照品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 计算回归方程, 用标准曲线法计算杂质校正因子, 见表 2。可见特利加压素及其杂质在 0.04~40.8 μg/mL 线性关系良好, 校正因子均在 0.9~1.0。杂质对照品制备难度高, 且价格昂贵, 有关物质检查可以按照主成分对照品外标法计算。

2.5 定量限和检测限

取系统适用性溶液、对照品溶液, 用 0.9%氯化钠溶液稀释至信噪比约为 10:1 相对应质量浓度, 为定量限试验溶液; 用 0.9%氯化钠溶液稀释至信噪比约为 3:1 相对应质量浓度, 为检测限试验溶液。取各溶液进样测定, 结果见表 2。

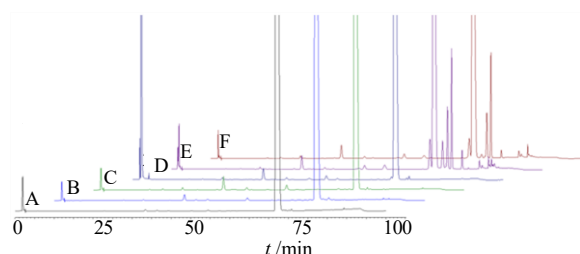
2.6 强制降解试验

取注射用特利加压素各 1 支, 分别进行高温 (60 °C 放置 12 h)、强酸 (0.1 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL, 室温放置 1 h, 中和)、强碱 (0.02 mol/L 氢氧化钠溶液 0.5 mL, 室温下放置 20 min, 中和)、强

表 2 线性关系、检测限和定量限的考察结果
Table 2 Results of linear relationship, LOD, and LOQ

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	校正因子	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
特利加压素	<i>Y</i> =53 114 <i>X</i> +782	1.000 0	0.04~40.44	—	0.003	0.01
杂质 L	<i>Y</i> =52 156 <i>X</i> +1 024	0.999 9	0.04~40.23	0.95	0.004	0.01
杂质 K	<i>Y</i> =515 672 <i>X</i> +498	0.999 7	0.05~39.96	0.98	0.003	0.02
杂质 G	<i>Y</i> =53 475 <i>X</i> +994	0.999 8	0.04~40.66	0.92	0.004	0.02
杂质 I	<i>Y</i> =525 445 <i>X</i> +112	0.999 9	0.04~40.54	0.93	0.003	0.02
杂质 D	<i>Y</i> =53 415 <i>X</i> +876	0.999 9	0.04~40.83	1.02	0.003	0.01
杂质 H	<i>Y</i> =51 414 <i>X</i> +772	0.999 9	0.04~39.85	0.93	0.003	0.01
杂质 E	<i>Y</i> =52 368 <i>X</i> +648	0.999 9	0.05~40.67	0.96	0.004	0.02
杂质 F	<i>Y</i> =51 114 <i>X</i> +549	0.999 9	0.04~40.79	0.92	0.004	0.01
杂质 Y	<i>Y</i> =52 357 <i>X</i> +1 002	0.999 9	0.04~40.48	0.99	0.004	0.01
杂质 P	<i>Y</i> =51 334 <i>X</i> +846	0.999 9	0.04~39.79	1.04	0.003	0.02
杂质 M	<i>Y</i> =52 478 <i>X</i> +312	0.999 9	0.04~40.42	1.08	0.004	0.01
杂质 B	<i>Y</i> =51 179 <i>X</i> +779	0.999 9	0.05~40.41	0.93	0.004	0.01
杂质 T	<i>Y</i> =52 489 <i>X</i> -149	0.999 9	0.04~39.92	1.05	0.004	0.02
杂质 J	<i>Y</i> =51 489 <i>X</i> +962	0.999 9	0.04~40.23	1.00	0.003	0.01
杂质 N	<i>Y</i> =52 456 <i>X</i> +888	0.999 8	0.04~40.44	1.10	0.004	0.01

光照（4 500 lx 下照射 5 d）、强氧化（加入 10%过氧化氢溶液 0.5 mL 放置 4 h）作用后，加 0.9%氯化钠溶液制成含醋酸特利加压素 1 mg/mL 的溶液，进样测定。结果注射用特利加压素在各种条件下杂质均有明显增加，采用的梯度高效液相色谱法能够对已知杂质有效地分离和检测，见图 3。



A-注射用特利加压素样品（批号 T16767C）；B-强光照；C-高温；D-强氧化；E-强酸；F-强碱。
A-sample (batch T16767C); B-strong lighting; C-high temperature; D-strong oxidation; E-strong acid; F-strong base.

图 3 强制降解试验的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of mandatory degradation tests

2.7 重复性试验

取批号 T16767C 注射用特利加压素，平行配制 6 份供试品溶液，进样测定，记录色谱图，计算得杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、

T、J、N 质量分数的 RSD 值分别为 0.89%、1.24%、1.32%、0.77%、0.84%、1.11%、1.35%、0.99%、1.22%、1.32%、1.15%、0.87%、1.32%、1.58%、1.65%。

2.8 精密度试验

取系统适用性溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，结果杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 峰面积 RSD 值分别为 0.16%、0.24%、0.34%、0.24%、0.38%、0.12%、0.25%、0.35%、0.41%、0.35%、0.28%、0.34%、0.41%、0.35%、0.41%。取特利加压素对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，结果特利加压素峰面积 RSD 值为 0.12%。

2.9 稳定性试验

取新配制的对照品溶液和批号 T16767C 注射用特利加压素供试品溶液，分别于 10 ℃样品室条件下放置 0、5、10、16、24、36、120 h，进样测定，结果对照品溶液中特利加压素峰面积 RSD 值为 1.35%；供试品溶液中杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 的峰面积 RSD 值分别为 0.17%、0.28%、0.36%、0.22%、0.40%、0.20%、0.32%、0.38%、0.46%、0.33%、0.58%、0.38%、0.44%、0.47%、0.56%。说明溶液在 10 ℃放置 120 h 稳定。

2.10 回收率试验

精密量取各杂质定位溶液 0.4、0.5、0.6 mL，分

别置 10 mL 量瓶中,用 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释至刻度,分别作为 80%、100%、120%回收测定用加标溶液。取 9 支批号 T16767C 注射用特利加压素样品,每 3 支分别加入 1.0 mL 回收测定用加标溶液。每个质量浓度平行 3 份,进样测定,结果杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 平均回收率分别为 99.46%、98.35%、98.24%、99.15%、100.01%、99.34%、99.56%、99.42%、98.79%、98.64%、99.16%、98.22%、99.31%、98.11%、99.38%,RSD 值分别为 0.98%、1.23%、1.45%、0.85%、1.21%、1.09%、1.16%、0.94%、1.25%、0.79%、1.42%、0.92%、0.88%、1.72%、1.26%。

2.11 耐用性试验

高效液相色谱系统的参数分别考察体积流量变化±0.1mL/min、柱温变化±2℃、波长变化±2nm、流动相比比例变化±1%条件下对测定结果的影响,结果在各条件下系统适用性均符合要求,各已知杂质测定结果 RSD 值均小于 10%,色谱图杂质谱特征一致,色谱系统耐用性良好。

2.12 样品测定

准确量取注射用特利加压素供试品溶液、对照品溶液各 20 μL,分别进样,记录色谱图,结果色谱图主峰保留时间为(65±5)min。杂质 L、K、G、I、D、H、E、F、Y、P、M、B、T、J、N 和未知杂质按主成分对照品外标法以峰面积计算质量分数,见表 3。

3 讨论

有关物质稳定性试验显示,注射用特利加压素供试品溶液于 10℃条件下稳定。主成分特利加压素色谱峰应调整流动相比比例,使其在 65 min 处出峰,才能保证主峰后杂质的检测灵敏度。本研究考察的 15 种杂质,合成工艺复杂,成本较高,通过线性试验研究确定可采用主成分对照品外标法进行定量计算。结果显示,各杂质实测值在各企业间差异较大。依据化合物结构特点,结合原料药合成工艺、制剂工艺以及贮藏条件推测了各杂质产生的机制,以杂质反应机制追溯生产工艺,结果显示,杂质含量与生产工艺具有相关性。

[des-Gly¹,Gly²]特利加压素、[β-Asp⁸]特利加压素两种杂质产生机制:天冬酰胺侧链易被主链酰胺氮原子亲核进攻,在较高温度下,跨越能级壁垒,形成琥珀酰亚胺五元环状过渡态,再水解生成[β-Asp⁸]特利加压素异构化杂质;特利加压素 N 端为

表 3 注射用特利加压素中有关物质的测定结果 (n=2)

杂质	质量分数/%				
	批号	批号	批号	批号	批号
	T16767C	1260220611	2212011	115221201	221001A
杂质 L	0.14	0.13	0.01	0.12	0.09
杂质 K	0.16	0.21	0.01	0.14	0.12
杂质 G	0.02	0.02	未检出	0.02	0.01
杂质 I	1.32	1.11	0.12	1.32	0.69
杂质 D	0.09	0.03	0.16	0.08	0.08
杂质 H	0.32	0.24	0.02	0.22	0.15
杂质 E	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质 F	0.62	0.55	0.11	0.54	0.19
杂质 Y	0.05	0.05	0.01	0.05	0.04
杂质 P	0.04	0.05	0.02	0.11	0.03
杂质 M	0.01	0.01	0.01	0.09	0.05
杂质 B	0.18	0.14	0.03	0.13	0.09
杂质 T	0.01	未检出	0.04	未检出	0.02
杂质 J	未检出	未检出	未检出	0.02	未检出
杂质 N	0.18	0.02	0.04	0.13	0.11
最大单个杂质	0.14	0.15	0.04	0.14	0.09
总杂质	3.76	3.05	0.58	3.22	2.25

三甘氨酸结构,侧链空间位阻小,游离伯氨基未乙酰化,在较高温度下,亲核进攻 2、3 位间的酰胺键,跨越能级壁垒,形成二噁哌酮和[des-Gly¹,Gly²]特利加压素。两种杂质的产生均需要较高的温度,追溯生产工艺,发现冻干过程存在差异^[16]。天马医药解析干燥条件为 33℃、7 h,其余企业分别为 50℃、7 h,40℃、20 h。两种杂质含量在天马医药样品中显著低于其他企业。因此需要优化冻干工艺,从而降低上述两种杂质含量。

辉凌制药样品中硫桥二聚体杂质含量显著高于其他企业,而翰宇药业显著低于其他企业。分析各企业原料药合成工艺差异:辉凌制药合成工艺研发较早,半胱氨酸侧链巯基保护剂采用乙酰氨基,该保护基脱除效率低,残留未脱保护巯基在接触水相后脱除,形成游离巯基,分子间成键,形成硫桥二聚体;而翰宇药业采用先进的固相氧化法,在切肽之前脱除半胱氨酸保护基,完成氧化过程,避免分子间二硫键的形成,减少聚合物的生成。对

于关键步骤中的落后工艺,企业应更新生产工艺,降低有关物质关键杂质的含量。

天马医药样品中[add-Gly¹]特利加压素含量显著低于其他企业,分析杂质产生机制为:N端为连续3个甘氨酸,大多数企业逐个氨基酸合成,每一步都会积累甘氨酸插入肽,而天马医药采用三甘氨酸片段合成策略,避免了累加效应。建议其他企业调整该步骤合成策略,降低该杂质含量。

天马医药的水解杂质[Asp⁸,Gly¹²-OH]特利加压素、[Asp⁸]特利加压素、[Gly¹²-OH]特利加压素、[Glu⁷,Gly¹²-OH]特利加压素、[Glu⁷]特利加压素低于其他企业,而乙酰化杂质[Ac-Gly¹]特利加压素又显著高于其他企业。分析杂质产生机制:羟基或水分子亲核进攻酰胺羰基,发生酰胺水解反应,该反应在碱性条件下更容易发生;而乙酰化反应更容易在酸性条件下发生。两类杂质受制剂酸度影响而相互关联。考虑到系列水解杂质是样品中主要杂质,且乙酰化杂质容易在体内脱乙酰基生成主成分,因此处理此平衡关系时应以水解杂质为主要考虑因素。制剂酸碱性在很大程度上取决于冻干前制剂中间体调节的pH值,应充分考虑在冻干过程中成盐酸根的挥发损失,控制制剂pH值不宜过高。

[des-Gly¹²]特利加压素、[add-Gly¹²]特利加压素杂质含量较高的企业具有一致性。推测两个杂质的产生互相关联,分析杂质产生机制为:在固相合成的起始阶段,与树脂相连的C端甘氨酸在酸性较强的合成环境下水解,产生游离甘氨酸和缺失肽,游离甘氨酸继而与另外一分子甘氨酸树脂偶联,形成C端插入肽。建议生产企业关注缩合试剂和制剂环境酸度。

多肽药物合成工艺的特殊性决定了其杂质谱的复杂性,仅靠纯化步骤和终控检测不能有效保证药品质量,还会加大生产成本。需要建立种类全面、针对性强的杂质质量控制方法,根据杂质测定结果反推关键生产工艺,优化工艺参数,建立合理的合成工艺方案,加强有效的过程控制,才能尽量减少多肽工艺杂质的产生;同时可以采用不同的质控手段,如离子对反相色谱法、排阻色谱法^[17-18]加强有

关物质的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 耿仕滔,许佑君.特利加压素[J].中国药物化学杂志,2023,33(2):158.
- [2] 陶国运,艾莉莎,张丽.特利加压素联合奥美拉唑治疗肝硬化上消化道出血的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(1):143-147.
- [3] 胡玉玺,蒋煜,韩天娇.制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响[J].中国新药杂志,2017,26(18):2143-2148.
- [4] 刘亚亚,马亚平,王宇恩,等.降糖多肽药物固相合成有关物质研究综述[J].当代化工研究,2024(10):5-7.
- [5] 付玉清,张建松,李新宇,等.普卡那肽的合成工艺[J/OL].合成化学:[2024-07-05].<https://doi.org/10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.24093>.
- [6] 姜喜凤,胡玉玺,章俊麟.《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则(试行)》解读[J].沈阳药科大学学报,2023,40(9):1207-1213.
- [7] 胡玉玺,韩天娇,胡延臣.多肽类仿制药研发和一致性评价的考虑[J].中国新药杂志,2020,29(8):875-880.
- [8] 胡玉玺,蒋煜,韩天娇,等.合成多肽物质谱及杂质谱研究[J].中国新药杂志,2018,27(5):502-508.
- [9] 王少戎,章俊麟,白玉.多肽化学仿制药质量研究技术要求及案例浅析[J].中国新药杂志,2023,32(9):886-892.
- [10] 中国药典[S].二部.2020.
- [11] 美国药典[S].USP41-NF36.2023.
- [12] 日本药典[S].JP18.2021.
- [13] 欧洲药典[S].EP10.0.2020.
- [14] 英国药典[S].2023.
- [15] 薛巧如,袁进烨,丁刘洋,等.UPLC法测定注射用特利加压素中有关物质的含量[J].中国药房,2020,31(9):1108-1112.
- [16] 孙珍珠,贾俊婷,王强,等.血浆冻干制剂的制备与质量评价[J].军事医学,2023,47(10):754-760.
- [17] 房思萌,隋玉荣,韩晓捷.HPLC法测定氢氯噻嗪原料药中有关物质[J].现代药物与临床,2022,37(9):1992-1996.
- [18] 邢文静,伏圣青,韩晓捷.HPLC法测定鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质[J].现代药物与临床,2024,39(2):348-352.

[责任编辑 解学星]