

HPLC 法测定氯氮平片中有关物质

屈 琴, 石中琪*

巴中市产品质量检验检测中心, 四川 巴中 636000

摘 要: **目的** 建立 HPLC 法测定氯氮平片中有关物质。**方法** 采用 Hypersil BDS 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1 mol/L 冰醋酸- [甲醇- 乙腈 (1:1)], 梯度洗脱; 检测波长为 257 nm; 体积流量为 1.2 mL/min; 柱温为 25 ℃; 进样体积为 20 μL。**结果** 氯氮平、氯氮平 *N*-氧化物、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 分别在 0.075~15.000、0.076~15.200、0.076~15.200、0.076~15.200、0.122~24.400 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率分别为 95.42%、95.72%、95.44%、96.56%、103.48%、104.37%, RSD 值分别为 0.78%、0.92%、0.57%、0.65%、1.03%、1.77%。**结论** 建立了氯氮平片中有关物质检查的 HPLC 法, 简便、准确、专属性强, 适用于氯氮平片的质量控制。

关键词: 氯氮平片; 氯氮平; 氯氮平 *N*-氧化物; 杂质 A; 杂质 B; 杂质 C; 杂质 D; 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(2025)04-0903-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.04.011

Determination of related substances in Clozapine Tablets

QU Qin, SHI Zhongqi

Bazhong Product Quality Inspection and Testing Center, Bazhong 636600, China

Abstract: **Objective** To establish an RP-HPLC method for determination of related substances in Clozapine Tablets. **Methods** Hypersil BDS C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted. Mobile phase was 1 mol/L acetic acid solution - [methanol - acetonitrile (1:1)] with gradient elution. Detection wavelength was set at 257 nm, the flow rate was set at 1.2 mL/min, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** Clozapine, clozapine *N*-oxide, impurity A, impurity B, impurity C, and impurity D had good linear relationships within the concentration ranges of 0.075 — 15.000, 0.076 — 15.200, 0.076 — 15.200, 0.076 — 15.200, 0.122 — 24.400 μg/mL, respectively. And their average recovery rates were 95.42%, 95.72%, 95.44%, 96.56%, 103.48%, and 104.37%, with RSD values of 0.78%, 0.92%, 0.57%, 0.65%, 1.03%, and 1.77%. **Conclusions** An RP-HPLC method for the detection of related substances in Clozapine Tablets is established, which is simple, accurate, and highly specific, and is suitable for quality control of Clozapine Tablets.

Key words: Clozapine Tablets; clozapine; clozapine *N*-oxide; impurity A; impurity B; impurity C; impurity D; HPLC

精神分裂症是一种持续的神经精神疾病, 影响全球近 1% 的人群, 当前主要通过服用抗精神病类药物进行治疗, 但并非所有患者都对这些药物有反应。氯氮平片是一种非典型抗精神病药, 对脑内 5-羟色胺受体和多巴胺受体具有较强的阻滞作用, 对其他抗精神病药物无反应或不能容忍的患者来说是一种非常有效的药物^[1-2], 也是目前唯一的一种获批治疗难治性精神分裂症的抗精神病药。氯氮平片是首个进入我国的第 2 代抗精神病药, 《中国药典》从

1995 年版开始收录该品种, 但是当时未对有关物质进行检查, 2010—2020 年版增加了有关物质检查项, 采用 HPLC 法测定, 但仅规定了单杂 (不得过 0.5%) 和总杂 (不得过 1.0%) 的限量。陈爽等^[3]采用《中国药典》方法无法检测氯氮平片中 11,11'-(1,4-哌嗪二基)二(8-氯-5*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮杂草 (杂质 B)), 表明目前《中国药典》方法对于氯氮平片的质量控制和监管存在较高的潜在风险, 亟待提高。大多数文献报道^[3-6]均对氯氮平中 8-氯-5,10-二氢-

收稿日期: 2024-12-25

基金项目: 四川省药物制剂及装备工程技术研究中心开放课题 (ERCPEF2402)

作者简介: 屈 琴 (1982—), 女, 四川南江人, 副主任药师, 硕士, 研究方向为药品质量控制。E-mail: 9223408@qq.com

*通信作者: 石中琪 (1988—), 男, 四川巴中人, 主管中药师。E-mail: 568750720@qq.com

11*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮杂草-11-酮(杂质 A)、杂质 B、8-氯-11-(哌嗪-1-基)-5*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮杂草(杂质 C)、2-[(2-氨基-4-氯苯基)氨基]苯基(4-甲基-1-哌嗪基)甲酮(杂质 D)进行了有效分离和控制。杂质 A 为氯氮平合成起始物料,同时也是其降解产物。氯氮平的化学结构中含有脒基团和三级胺结构,其中脒基团在酸或碱条件下易水解,分别生成相应的非环酰胺杂质 D 和内酰胺杂质 A,而杂质 A、D 还可以进一步水解产生 11-(4-甲基哌嗪基)-5*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮杂草,由于该杂质结构中含有羧基,理化性质与其他杂质差异显著,容易去除,因而未纳入各国药典的质量标准;而三级胺结构易被氧化,因此氯氮平的结构中甲基哌嗪取代基上的三级胺可能发生氧化,产生 4-(8-氯-5*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮杂草-11-基)-1-甲基哌嗪 1-氧化物(氯氮平 *N*-氧化物),并在氧化破坏实验中得到验证。杂质 B、C 均为氯氮平合成工艺中的副产物,此外杂质 C 和氯氮平 *N*-氧化物还是氯氮平在人体内的主要代谢产物。本研究将氯氮平 *N*-氧化物、杂质 A、B、C、D 纳入质量标准,建立了氯氮平片中有关物质检查的高效液相色谱法,简便、准确、专属性强,适用于氯氮平片的质量控制。

1 材料

LC-20AB 液相色谱仪、LC-solution 色谱工作站、SPD-M20A 检测器(日本岛津),BS224S 电子天平(德国赛多利斯),FE28 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多)。

氯氮平对照品(质量分数 99.8%,批号 100323-201703)购自中国食品药品检定研究院;氯氮平 *N*-氧化物(质量分数 99.97%)、氯氮平杂质 A(质量分数 99.29%)、杂质 B(质量分数 96.71%)、杂质 C(质量分数 99.18%)和杂质 D(质量分数 99.35%)均购自英国 PCL 公司;氯氮平片(Clozaril®,规格 25 mg/片,批号 T19039)由诺华制药生产;氯氮平片(规格 25 mg/片,批号 200708)由万邦德制药集团股份有限公司生产;氯氮平片(规格 25 mg/片,批号 20210105)由江苏云阳集团药业有限公司生产。甲醇、乙腈为色谱纯,由 Fisher 公司提供;磷酸二氢钾、磷酸等均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil BDS 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 1 mol/L 冰醋酸(A)-[甲醇-乙腈

(1:1)](B),梯度洗脱(0~4 min, 80%A; 4~24 min, 80%~20%A; 24~30 min, 20%A; 30.1~35 min, 20%~80%A);检测波长为 257 nm;体积流量为 1.2 mL/min;柱温为 25 ℃;进样体积为 20 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的配制 取氯氮平对照品 19 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 80%甲醇适量,超声使溶解,用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,再精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的配制 取氯氮平片 20 片,研细,取细粉适量,精密称定(约相当于氯氮平 37.5 mg),置 50 mL 量瓶中,加 80%甲醇 40 mL,超声使溶解,用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 系统适应性试验溶液的配制 分别精密称取氯氮平杂质 A、B、C、D 和氯氮平 *N*-氧化物适量,加 80%甲醇超声溶解,并稀释成 0.05 mg/mL 的溶液,作为杂质贮备液。取杂质贮备液 1 mL 和对照品贮备液 5 mL,置同一个 10 mL 量瓶中,用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

取空白溶剂(80%甲醇)、系统适用性试验溶液各 20 μL,进样测定,记录色谱图,见图 1。可见空白溶剂不干扰氯氮平片中有关物质的测定,氯氮平及其各杂质峰之间分离度均大于 2.5,均达到完全分离。

2.4 降解试验

取氯氮平片粉末(批号 20210105,约相当于氯氮平 37.5 mg)适量,置 50 mL 量瓶中,平行制备 5 份:一份加 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,室温放置 2 h 后加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL 中和;一份加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,室温放置 2 h 后加 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL 中和;一份加水 2 mL,于 80 ℃放置 4 h;一份加 30%双氧水溶液 1 mL,于室温放置 10 min;一份样品不进行破坏处理。所有样品均用 80%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取 20 μL 进样测定,记录色谱图,采用面积归一法计算质量分数,结果见表 1。

相对于未降解样品,酸降解样品的杂质峰增

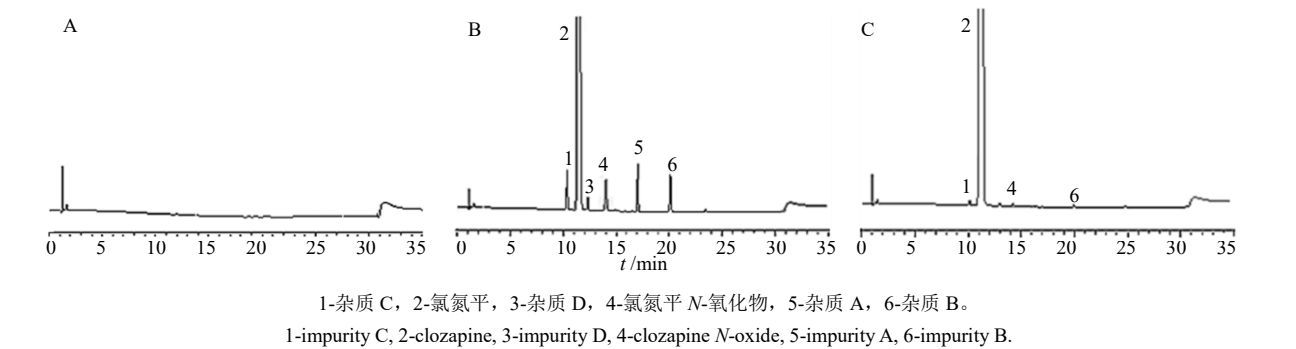


图 1 空白溶剂 (A)、系统适用性试验溶液 (B) 和氯氮平片 (批号 20210105) 供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solvent (A), system suitability test solution (B), and Clozapine Tablets (batch 20210105, C)

表 1 破坏性试验氯氮平片中有关物质的测定结果

Table 1 Results of related substances in Clozapine Tablets in destructive test									
样品	杂峰 个数	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	杂质 D/%	氯氮平 N- 氧化物/%	其他最大杂 峰/%	主峰质量 分数/%	质量平 衡/%
未降解样品	5	0.00	0.03	0.03	0.00	0.01	0.06	99.00	100.00
酸降解样品	11	0.92	0.03	2.35	2.73	0.02	0.14	99.00	89.35
碱降解样品	8	0.03	0.03	0.04	0.00	0.02	0.08	99.00	99.52
高温降解样品	5	0.00	0.03	0.04	0.00	0.01	0.06	99.00	99.78
氧化降解样品	8	1.31	0.03	0.04	0.00	4.10	0.05	99.00	96.21

多, 主要有保留时间为 9.1 min 的未知杂质、杂质 C、D、A; 碱破坏样品的杂质峰数量增加, 主要为杂质 A; 高温降解样品稳定, 未出现新杂质峰; 氧化降解样品有杂质峰产生, 主要为杂质 A 和氯氮平 N-氧化物。所有破坏样品的主峰与相邻杂质峰分离度均符合规定。

2.5 线性关系和校正因子

精密称取氯氮平及杂质 A、B、C、D 和氯氮平 N-氧化物对照品适量, 用 80% 甲醇制成含氯氮平 0.075、0.375、0.750、1.500、3.750、7.500、15.000

μg/mL, 含氯氮平 N-氧化物和杂质 A、B、C 0.076、0.380、0.760、1.520、3.800、7.600、15.200 μg/mL, 含杂质 D 0.122、0.610、1.220、3.050、6.100、12.200、24.400 μg/mL 的系列混合工作溶液, 分别精密吸取各溶液 20 μL 注入色谱仪, 记录色谱图。以各组分的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 采用最小二乘法对各组分进行线性回归分析, 得标准曲线, 并计算相关系数 (r^2), 将各杂质的回归方程的斜率除以氯氮平的斜率得到各杂质的校正因子, 结果见表 2。

表 2 氯氮平和各杂质的线性方程和校正因子

Table 2 Linear equations and correction factors for clozapine and its impurities				
成分	回归方程	r^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	校正因子
氯氮平	$Y=57\,412\,X-1\,318.6$	0.999 3	0.075~15.000	
杂质 A	$Y=61\,479\,X-1\,818.1$	1.000 0	0.076~15.200	1.0
杂质 B	$Y=60\,542\,X-2\,846.3$	1.000 0	0.076~15.200	1.0
杂质 C	$Y=54\,113\,X-1\,847.5$	0.999 0	0.076~15.200	1.0
杂质 D	$Y=21\,073\,X-973.5$	0.999 5	0.122~24.400	2.7
氯氮平 N-氧化物	$Y=50\,807\,X-1\,131.2$	0.999 1	0.076~15.200	1.1

2.6 定量限和检测限

取各工作液,用 80%甲醇逐级稀释,进样测定,以 $S/N=10$ 计算定量限,以 $S/N=3$ 计算检测限,结果氯氮平、杂质 A、杂质 B、杂质 C、氯氮平 *N*-氧化物的检测限分别为 22.5、22.8、22.8、22.8、22.8 ng/mL,相当于供试品溶液(批号 20210105)的 0.003%水平;杂质 D 的检测限为 36.6 ng/mL,相当于供试品溶液的 0.005%水平。氯氮平、氯氮平 *N*-氧化物、杂质 A、杂质 B、杂质 C 的定量限分别为 0.075、0.076、0.076、0.076、0.076 $\mu\text{g/mL}$,相当于供试品溶液的 0.01%水平;杂质 D 的检测限为 0.122 $\mu\text{g/mL}$,相当于供试品溶液的 0.016%水平。

2.7 准确度试验

精密量取氯氮平 *N*-氧化物和杂质 A、D 各 7.5 mg 以及杂质 C 11.2 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀,为储备液(1);取杂质 B 7.5 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,为储备液(2)。取贮备液(1) 5.0 mL、储备液(2) 20 mL,置 100 mL 量瓶中,用甲醇-水(8:2)稀释至刻度,摇匀,为回收率试验溶液。取 9 份氯氮平片粉末(批号 20210105),置于 50 mL 量瓶中,分别加入回收率试验溶液 4.0、5.0、6.0 mL,各 3 份,分别取 20 μL 进样,记录色谱图,计算回收率。结果氯氮平、氯氮平 *N*-氧化物、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 的平均回收率分别为 95.42%、95.72%、95.44%、96.56%、103.48%、104.37%,RSD 值分别为 0.78%、0.92%、0.57%、0.65%、1.03%、1.77%。

2.8 精密度试验

取氯氮平片样品(批号 20210105)适量,平行制备供试品溶液 6 份,分别取 20 μL 进样,记录色谱图,计算有关物质的质量分数。结果 6 份样品中均未检测出氯氮平 *N*-氧化物、杂质 A 和杂质 D;杂质 B、杂质 C、其他最大杂峰和总杂峰质量分数的 RSD 值分别为 1.78%、1.56%、0.78%、0.68%。

2.9 稳定性试验

取氯氮平片样品(批号 20210105)制备的供试品溶液,分别于 0、4、6、8、10 h 进样分析,记录色谱图,杂质 B、杂质 C、其他最大杂峰和总杂峰峰面积的 RSD 值分别为 2.18%、1.12%、1.33%、0.47%,表明室温下供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.10 样品测定

精密量取供试品溶液和对照品溶液(平行制备 2 份,对照品溶液 1 采集 3 针,对照品溶液 2 采集 2 针)各 20 μL ,分别进样,记录色谱图。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,根据公式按外标法以峰面积计算,杂质 A 不得过 0.2%,杂质 B 不得过 0.2%,杂质 C 不得过 0.3%,杂质 D 乘以校正因子 2.7 不得过 0.2%,氯氮平 *N*-氧化物乘以校正因子 1.1 不得过 0.2%,其他单个杂质不得过 0.2%,各杂质总和不得过 0.6%。色谱图中小于 0.01%的峰忽略不计。测定结果见表 3。

$$\text{有关物质} = (A_{\text{样}} \times C_{\text{对}} \times \text{校正因子}) / (A_{\text{对}} \times C_{\text{样}})$$

$A_{\text{样}}$ 表示供试品杂质峰面积; $C_{\text{对}}$ 表示氯氮平对照品平均质量浓度; $A_{\text{对}}$ 表示氯氮平对照品溶液平均峰面积; $C_{\text{样}}$ 表示供试品质量浓度

表 3 氯氮平片中有关物质测定结果 ($n=2$)

Table 3 Results of related substances in Clozapine Tablets ($n=2$)

批号	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	杂质 D/%	氯氮平 <i>N</i> -氧化物/%	最大单杂/%	总杂/%
T19039	未检出	0.03	0.09	未检出	0.02	0.05	0.19
200708	未检出	0.02	0.04	未检出	0.03	0.05	0.18
20210105	未检出	0.01	0.03	未检出	0.01	0.02	0.11

3 讨论

20 世纪 70 年代初,氯氮平片在欧洲上市,成为全球第一种正式应用于临床的非典型抗精神病药。目前,它仍然是治疗难治性精神分裂症效果最佳的抗精神病药,并被纳入世界卫生组织基本药物标准清单。《中国药典》2020 年版^[6]、《欧洲药典》^[7]和《美国药典》^[8]均收录了氯氮平原料药的质量标准,

《中国药典》和《美国药典》还收录了氯氮平片。其中《中国药典》2020 年版采用 HPLC 等度洗脱法测定了原料药和片剂中有关物质,未按规定已知杂质的限量,限度宽,灵敏度低;《欧洲药典》和《美国药典》均采用 HPLC 梯度洗脱法测定有关物质,并对特殊杂质如杂质 A、B、C、D 进行单独控制,且对杂质种类和限度要求基本相似,故为了更加严格地

控制氯氮平片的质量,实验比较了《美国药典》、《欧洲药典》中的测定方法,建立氯氮平片中有关物质的检测方法,并进行相关方法学验证。

3.1 检测波长的筛选

取氯氮平及其杂质对照品适量,用甲醇溶解,在 200~400 nm 进行紫外全波长扫描,结果氯氮平及其杂质在 257 nm 波长处均有较高的吸收,确定检测波长为 257 nm。

3.2 破坏性实验

对氯氮平片进行酸、碱破、高温、氧化等破坏,杂质的数量、质量分数均有不同程度的增加,尤其在氧化破坏条件下出现 1 个新的未知杂质,质量分数达到 4.01%。实验建立了液-质联用色谱法确定该未知杂质的结构,采用电喷雾离子源 ESI,以甲醇-乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相体系,氯氮平的分子离子峰为 327.1,未知杂质的分子离子峰为 343.1,两者相差 16,推测该杂质可能为氯氮平 *N*-氧化物(别名:8-氯-4-甲基-5*H*-二苯并[b,e][1,4]二氮哌嗪),为氯氮平的主要代谢产物。将氯氮平 *N*-氧化物对照品和氯氮平片的氧化产物在有关物质测定条件下进行叠加试验,叠加图中氯氮平 *N*-氧化物峰的纯度角度小于纯度阈值,确证此杂质为氯氮平的 *N*氧化物。考虑到氯氮平片样品在放置过程中可能会氧化产生氮氧化物,将氯氮平的 *N*氧化物纳入到氯氮平片中的特殊杂质考察。

3.3 各国药典中杂质、限度对比分析

《欧洲药典》和《美国药典》均收录了氯氮平原料药,用相对保留时间确定已知杂质,采用加校正因子的主成分对照品法对 4 个已知杂质即杂质 A、B、C、D 进行控制,其中《欧洲药典》中各杂质的校正因子和限度分别为:杂质 A(校正因子 1.0,限度 0.1%),杂质 B(校正因子 1.0,限度 0.2%),杂质 C(校正因子 1.0,限度 0.3%),杂质 D(校正因子 2.7,限度 0.2%),其他单杂(限度 0.1%),总杂

(限度 0.6%);《美国药典》中杂质 A(校正因子 0.83,限度 0.1%),杂质 D(校正因子 2.86,限度 0.2%),其他杂质与《欧洲药典》一致。《美国药典》中氯氮平片各杂质的校正因子和限度分别为:杂质 A(校正因子 0.83,限度 0.2%),杂质 C(校正因子 1.0,限度 0.3%),杂质 D(校正因子 2.78,限度 0.2%),氯氮平 *N*-氧化物(校正因子 1.15,限度 0.2%),其他单杂(限度 0.2%),总杂(限度 2.0%)。标准中新增对氯氮平 *N*-氧化物的控制,但未对杂质 B 进行控制。参考《欧洲药典》和《美国药典》,结合国内氯氮平原料和制剂生产工艺以及本实验结果,最终将杂质限度确定为:氯氮平 *N*-氧化物(校正因子 1.1,限度 0.2%),杂质 A(校正因子 1.0,限度 0.2%),杂质 B(校正因子 1.0,限度 0.2%),杂质 C(校正因子 1.0,限度 0.3%),杂质 D(校正因子 2.7,限度 0.2%),其他单杂(限度 0.2%),总杂(限度 0.6%)。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙丽敏,付华东. 氯氮平片治疗精神分裂症疗效与 COMT 基因多态性关系研究 [J]. 精神医学杂志, 2020, 33(1): 46-49.
- [2] 冯健超,杨国璞. 利培酮联合氯氮平治疗难治性精神分裂症的临床疗效 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(7): 11-13.
- [3] 陈爽,陈悦,邵鹏,等. 《中国药典》氯氮平片有关物质检测方法问题探讨 [J]. 中国药品标准, 2018, 19(1): 12-15.
- [4] 戴琴,陈宇波,陈凯. 氯氮平片有关物质的测定 [J]. 云南化工, 2020, 47(5): 43-44.
- [5] 刘屹,王莹,李志远,等. 氯氮平片质量分析与研究 [J]. 中国药事, 2016, 30(7): 695-707.
- [6] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 1651.
- [7] 欧洲药典 [S]. EP11.0. 2023: 2397.
- [8] 美国药典/国家处方集 [S]. USP2024-NF42. https://doi.org/10.31003/USPNF_M19050_03_01.

[责任编辑 解学星]