

HPLC法测定盐酸乌拉地尔原料药中有关物质

王从娟¹, 陆赛花², 周自桂², 秦勇^{1, 2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 燃点(南京)生物医药科技有限公司, 江苏 南京 210031

摘要: 目的 建立盐酸乌拉地尔原料药中有关物质的HPLC检测方法。方法 采用Agilent XDB C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢铵溶液(含0.02%三乙胺, 磷酸调pH值至6.0)为流动相A, 乙腈为流动相B, 梯度洗脱; 体积流量为1.0 mL·min⁻¹, 柱温为30 °C, 检测波长为270、236 nm, 进样量为10 μL。进行方法专属性、稳定性、检测限与定量限、线性关系、精密性、耐用性考察。应用所建立的方法进行3批盐酸乌拉地尔原料药样品检测。结果 盐酸乌拉地尔与相邻杂质之间、各杂质之间的色谱峰均分离良好; 各个组分的检测限和定量限分别为0.059 7~0.090 0 μg·mL⁻¹、0.198 9~0.299 9 μg·mL⁻¹。各组分在相应浓度范围内均有良好的线性关系, *r*均在0.999 8~1.000 0。加样回收率均在92.2%~103.2%, RSD均≤5.37%。3批盐酸乌拉地尔原料药样品检测结果显示, 已知杂质质量分数均小于0.15%、最大未知单杂均小于0.10%, 杂质总质量分数小于0.50%。结论 经方法学验证, 所建立方法灵敏、高效、专属性强、准确度高, 可用于盐酸乌拉地尔原料药有关物质的测定。

关键词: 盐酸乌拉地尔; 有关物质; 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 杂质

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1613-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.020

Determination of related substances in urapidil hydrochloride by HPLC

WANG Congjuan¹, LU Saihua², ZHOU Zigui², QIN Yong^{1, 2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Burning Point (Nanjing) Biomedical Technology Co., Ltd., Nanjing 210031, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of related substances in urapidil hydrochloride. **Method** Agilent XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was chosen for analysis. Gradient elution was used to determine the related substances of urapidil hydrochloride with 0.05 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate (containing 0.02% triethylamine, and pH adjusted to 6.0 with phosphoric acid), and acetonitrile as mobile phase B. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30 °C. The detection wavelengths were 270, 236 nm, and the sample injection volume was 10 μL. The specificity, stability, limit of detection and limit of quantification, linear relationship, precision and durability of the method were investigated. Three batches of urapidil hydrochloride API samples were detected by the established method. **Results** The resolution between urapidil and all other impurities were good. The limits of detection of urapidil hydrochloride and impurities were 0.059 7—0.090 0 μg·mL⁻¹ and the limits of quantitation of them were 0.198 9—0.299 9 μg·mL⁻¹. All known impurities had good linearity in appropriate concentration ranges and the correlation coefficients were all in the range of 0.999 8—1.000 0. The average recoveries of all known impurities were in the range of 92.2%—103.2%, with RSD of less 5.37%. The determination results of three batches of urapidil hydrochloride samples showed that the known impurities and the maximum unknown impurity were less than 0.10% and the total impurities were less than 0.5%. **Conclusion** The method was simple, rapid and accurate, which can be used to control the quality of urapidil hydrochloride.

Key words: urapidil hydrochloride; related substances; HPLC; gradient elution; impurity

盐酸乌拉地尔(urapidil hydrochloride)的化学名为6-[[[3-4-(2-甲氧基苯基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-1-二甲基-2,4(1*H*,3*H*)嘧啶二酮盐酸盐,在20

世纪初合成,到20世纪70年代开始上市。其最初由德国Byk Gulolen Lombery公司开发并研制成缓控释胶囊和注射剂^[1],1989年日本成为其第2个市

收稿日期: 2022-02-01

第一作者: 王从娟(1995—),女,研究生,主要从事药品质量控制研究。Tel:18856968693 E-mail:18856968693@163.cm

*通信作者: 秦勇,男,研究员,主要从事新药研究与开发。Tel:18651866668 E-mail: qyjason@bpbiopharm.com

场,目前已在英、法等30多个国家批准上市^[2]。该药是第1个上市的具有外周和中枢活性的双重降压机制的降压药,对外周血管平滑肌和交感神经末梢突触后膜上的T1-受体具有阻滞作用,并直接兴奋脑干5-羟色胺受体,产生中枢性降压作用^[3]。在临床上主要用于治疗重症原发性高血压^[4]、高血压危象^[5]、围手术期高血压^[6]及高血压伴心力衰竭^[7]等。

乌拉地尔在《中国药典》^[8]和《日本药典》^[9]中均有收载,刘玉真等^[10]仅对合成过程中原料、中间体、

酸降解杂质3种有关物质进行研究;其余相关报道^[11-12]也对该药降解杂质进行研究,但是未能全面监控盐酸乌拉地尔原料合成过程中可能产生的工艺杂质及降解杂质。为更好控制盐酸乌拉地尔原料药质量,保证其用药的安全性和有效性,本研究建立高效液相色谱法监控盐酸乌拉地尔原料药中有关物质的含量,为控制盐酸乌拉地尔原料药的质量提供参考。盐酸乌拉地尔原料药合成路线见图1,有关物质基本信息见表1。

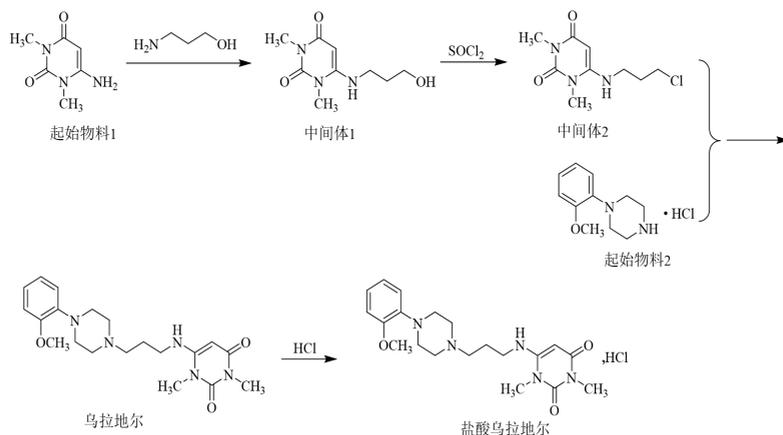


图1 盐酸乌拉地尔合成路线

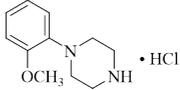
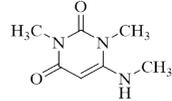
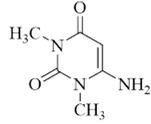
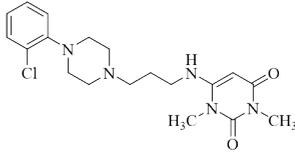
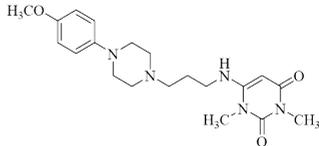
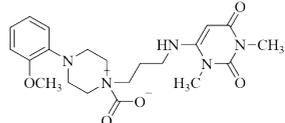
Fig. 1 Synthesis routes of urapidil hydrochloride

表1 盐酸乌拉地尔及杂质信息

Table 1 Information of urapidil hydrochloride and related substances

杂质	名称	结构式	来源
A (中间体2)	6-(3-chloropropylamino)-1,3-dimethyluracil		工艺杂质
B (中间体1)	6-(3-hydroxypropylamino)-1,3-dimethyluracil		工艺杂质
C	1-(3-aminopropyl)-4-(2-methoxyphenyl)piperazine		降解杂质
D	6-hydroxy-1,3-dimethyluracil		降解杂质
E	6-[[3-[4-(2-hydroxyphenyl)-1-piperazinyl]propyl]amino]-1,3-dimethyluracil		降解杂质

续表1

杂质	名称	结构式	来源
F	1-(2-methoxyphenyl) piperazine hydrochloride		工艺杂质
G	6-aminomethyl-1,3-dimethyluracil		工艺杂质
H (起始物料1)	1,3-dimethyl-6-aminouracil		工艺杂质
I	6-[[3-[4-(2-chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]amino]-1,3-dimethyluracil		工艺杂质
J	6-[[3-[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]propyl]amino]-1,3-dimethyluracil		工艺杂质
O	1-[3-[(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-4-yl)amino]propyl]-4-(2-methoxyphenyl)piperazine-1-carboxylate		工艺杂质

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(配备低压四元泵、进样器、柱温箱、二极管阵列检测器)、Labsolutions 工作站; FE28 pH 计(Mettler Toledo 公司); ALC-210.3 电子天平(0.001 g, Sartorius 公司); BT125D 电子天平(0.01 mg, Sartorius 公司); XP6 电子天平(0.001 mg, Mettler Toledo 公司)。

1.2 药品与主要试剂

盐酸乌拉地尔对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100842-200501,质量分数 100.0%); 盐酸乌拉地尔(批号 20042101、20042901、20042902)、杂质 A 对照品(批号 19080701,质量分数 98.1%)、杂质 B 对照品(批号 19112704,质量分数 98.0%)、杂质 C 对照品(批号 19070206,质量分数 98.4%)、杂质 D 对照品(批号 19070209,质量分数 98.8%)、杂质 E 对照品(批号 19080901,质量分数 95.9%)、杂质 F 对照品(批号 19112501,质量分数 99.7%)、杂质 G 对照品(批号 19070201,质量分数 99.0%)、杂质 H 对照品(批号 19041201,质量分数 99.8%)、杂质 I 对照品(批号 19070501,质量分数 99.4%)、杂质 J 对照

品(批号 19070502,质量分数 99.7%)、杂质 O 对照品(批号 20041502,质量分数 92.1%),均由燃点(南京)生物医药科技有限公司提供。

磷酸二氢铵(分析纯)、磷酸(分析纯)、盐酸(分析纯)、国药集团化学试剂有限公司; 三乙胺(阿拉丁化学试剂有限公司,色谱级); 乙腈(北京百灵威科技有限公司,色谱级); 氢氧化钠(西陇科学股份有限公司,分析纯); 双氧水(南京化学试剂股份有限公司,分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵(含 0.02% 三乙胺, 磷酸调 pH 至 6.0), 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 270、236 nm, 进样量为 10 μL; 洗脱程序见表 2。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取盐酸乌拉地尔适量, 用空白溶剂[0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(pH 5.6)-乙腈(85:15)]溶解并稀释制成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的

表2 洗脱程序
Table 2 Gradient elution program

t/min	流动相A/%	流动相B/%
0	85	15
6.0	85	15
35.0	65	35
45.0	65	35
45.1	85	15
55.0	85	15

溶液。

2.2.2 杂质对照品储备液 分别取杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、O对照品各适量,精密称定,用空白溶剂稀释制成约含杂质A、F $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质B、C、D、E、G、H、I、J、O $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.2.3 主成分对照品储备液 精密称取盐酸乌拉地尔对照品适量,用空白溶剂溶解并稀释制成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.2.4 对照品溶液 精密量取主成分和杂质对照品储备液各适量,用空白溶剂稀释制成约含盐酸乌拉地尔、杂质A和F $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质B、C、D、E、G、H、I、J、O $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.2.5 系统适用性溶液 取盐酸乌拉地尔约10 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加入杂质对照品储备液1 mL,用空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得约含盐酸乌拉地尔 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质A和F $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质B、C、D、E、G、H、I、J、O $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 取空白溶液、供试品溶液、系统适用性溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。空白溶液对供试品测定无干扰;系统适用性溶液中主峰与相邻杂质峰之间、各杂质峰之间分离良好,分离度均 >1.5 ,理论板数均 >2000 。系统适用性试验色谱图见图2(杂质C、F在236 nm下考察,其余杂质均在270 nm下考察)。

2.3.2 破坏实验 (1)精密称取盐酸乌拉地尔原料药(20042101批,下同)约10 mg,共6份,分别置于6个10 mL量瓶中,进行以下条件的降解实验:A:加入3%双氧水溶液1 mL,室温放置1 h;B:以照度 $(5000 \pm 500)\text{Lx}$ 、紫外灯能量 $90 \mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ 照射7 d;C:样品密封后加不透光的铝箔纸遮光,置与B项相同条件的光照试验箱中放置7 d;D:加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液1 mL,室温下放置8 h后加入等量的

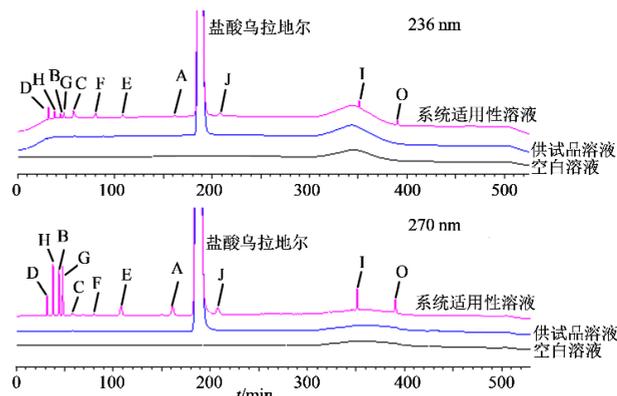
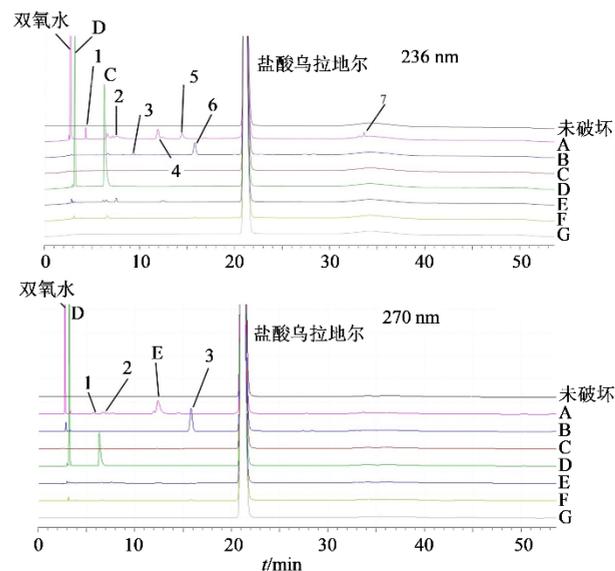


图2 系统适用性试验色谱图

Fig. 2 System suitability test chromatogram

$1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液进行中和;E:加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液1 mL,室温下放置8 h后加入等量的 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液进行中和;F: $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热8 h;G: $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥8 h。7个条件下样品均用稀释液定容。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图3。



A~G-不同降解条件;数字均代表未知杂质

A ~ G- different degradation conditions; numbers represent unknown impurities

图3 强制降解重叠图

Fig. 3 Overlapping chromatograms of forced degradation solutions

结果表明,盐酸乌拉地尔在高温破坏(固体)、碱破坏条件下较稳定,未见明显的降解杂质,氧化破坏、酸破坏、高温液体及光照破坏均有不同程度的降解,其中氧化破坏和酸破坏最为剧烈;各降解杂质均不干扰各已知杂质与主成分的测定,各破坏溶液的主成分峰纯度(岛津设备 >0)均满足要求,方法专属性良好。强制降解数据见表3,降解图见图4。

表3 强制降解数据

Table 3 Data of forced degradation

名称	杂质 C/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 I/%	最大未知单杂/%	主峰峰纯度指数/%
未破坏	0.01	ND	0.00	0.00	0.01	1
酸破坏	8.26	5.20	0.00	0.00	0.00	11
碱破坏	0.17	0.03	ND	0.00	0.29	147
氧化破坏	0.57	0.11	1.20	0.00	1.07	8
光照破坏	0.13	ND	0.02	ND	1.25	10
高温固体	0.01	ND	0.00	0.00	0.01	10
高温液体	0.21	0.09	0.00	0.00	0.05	11

ND-未检出

ND-not checked out

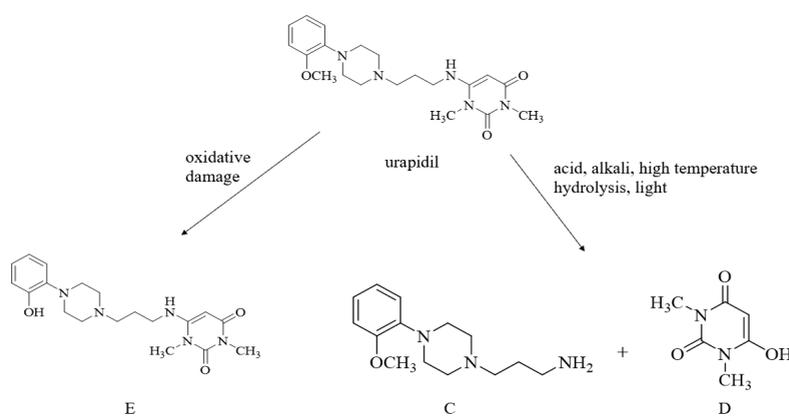


图4 盐酸乌拉地尔主要降解途径

Fig. 4 Main degradation pathways of urapidil hydrochloride

2.4 溶液稳定性

取“2.8”项下 LOQ 回收率溶液作为供试品溶液,于室温放置 0、2、4、6、8、12 h 后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算峰面积的 RSD。供试品溶液在室温下放置 12 h,各时间点杂质个数一致(均为 12 个),杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、O 峰面积的 RSD 分别为 2.36%、0.97%、3.47%、3.92%、1.74%、3.16%、0.67%、1.26%、1.40%、3.25%、2.43%。结果表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定性良好。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.5”项下对照品溶液适量,逐渐稀释,按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,以信噪比(S/N) ≥ 3 计算检测限,以 $S/N \geq 10$ 计算定量限。结果表明,盐酸乌拉地尔的检测限为 $0.0623 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、O 检测限分别为 0.0597 、 0.0890 、 0.0889 、 0.0891 、 0.0872 、 0.0603 、 0.0891 、 0.0899 、 0.0896 、 0.0900 、 $0.0863 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;盐酸乌拉地尔的定量限为 $0.2078 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、O 定量限分别为 0.1989 、

0.2965 、 0.2964 、 0.2969 、 0.2908 、 0.2010 、 0.2970 、 0.2998 、 0.2986 、 0.2999 、 $0.2875 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 线性关系考察

精密移取“2.2.3”项下杂质对照品贮备液和“2.2.4”项下主成分对照品贮备液适量,置同一量瓶中,加入空白溶剂稀释至刻度后,按不同比例配制相当于杂质限度浓度的 20%、50%、80%、100%、120%、150%、200% 的线性溶液。精密移取上述溶液各 $10 \mu\text{L}$,按“2.1”项下色谱条件分别于 2 台岛津设备进样,记录峰面积,以各组分质量浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程和相关系数,并以方程斜率(K)计算校正因子。盐酸乌拉地尔和各杂质的线性回归方程与校正因子见表 4、5。

$$\text{校正因子} = K_{\text{盐酸乌拉地尔}} / K_{\text{杂质}}$$

结果表明,杂质 E、I、J 校正因子均在 $0.9 \sim 1.1$,可用不加校正因子的主成分对照品法计算;杂质 A、B、C、F、G、H 校正因子小于 0.9,杂质 D、O 校正因子在 $1.1 \sim 2.0$,可按加校正因子的主成分对照品法计算。

表4 盐酸乌拉地尔和各已知杂质线性关系

Table 4 Regression equations of urapidil hydrochloride and impurities

波长/nm	杂质名称	线性方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
270	A	$y=55\ 167.589\ 2\ x-135.041\ 1$	1.000 0	0.198 9~1.988 6
	B	$y=60\ 594.527\ 6\ x-62.268\ 5$	1.000 0	0.296 5~2.965 4
	D	$y=23\ 751.637\ 3\ x-1\ 935.731\ 8$	1.000 0	0.296 9~2.968 6
	E	$y=32\ 315.067\ 5\ x-442.105\ 3$	1.000 0	0.290 8~2.907 6
	G	$y=69\ 453.359\ 4\ x-343.188\ 4$	1.000 0	0.297 0~2.970 0
	H	$y=67\ 132.286\ 0\ x-276.191\ 0$	1.000 0	0.299 8~2.998 0
	盐酸乌拉地尔	$y=32\ 365.487\ 9\ x-386.677\ 4$	0.999 9	0.207 8~2.078 0
	I	$y=31\ 250.493\ 7\ x-64.043\ 9$	1.000 0	0.298 6~2.986 0
	J	$y=32\ 304.407\ 4\ x-276.504\ 9$	0.999 9	0.299 9~2.999 0
	O	$y=26\ 202.471\ 9\ x+23.301\ 8$	0.999 9	0.287 5~2.875 4
236	C	$y=16\ 160.499\ 6\ x-32.614\ 2$	0.999 9	0.296 4~2.963 8
	F	$y=16\ 921.380\ 2\ x+150.556\ 1$	0.999 9	0.201 0~2.010 0
	盐酸乌拉地尔	$y=12\ 825.427\ 7\ x+85.505\ 8$	0.999 8	0.207 8~2.078 0

表5 各已知杂质校正因子

Table 5 Correction factors of impurities

波长/ nm	杂质名称	校正因子 (仪器1)	校正因子 (仪器2)	校正因子 平均值
270	A	0.59	0.58	0.59
	B	0.53	0.52	0.53
	D	1.36	1.38	1.37
	E	1.00	0.98	0.99
	G	0.47	0.45	0.46
	H	0.48	0.46	0.47
	盐酸乌拉地尔	/	/	/
	I	1.04	1.03	1.04
	J	1.00	0.99	1.00
	O	1.24	1.24	1.24
236	C	0.79	0.79	0.79
	F	0.76	0.77	0.77
	盐酸乌拉地尔	/	/	/

2.7 精密度试验

2.7.1 重复性试验 按照“2.2.2”项下供试品溶液配制方法,平行制备6份,按“2.1”项下色谱条件进行测定,采用加校正因子的主成分对照品法计算各杂质含量,结果见表6。

2.7.2 中间精密度试验 由不同人员,于不同日期、不同仪器、采用不同批号色谱柱进行试验。按照“2.2.2”项下供试品溶液配制方法,平行制备6份,按“2.1”项下色谱条件进行测定,采用加校正因子的主成分对照品法计算各杂质含量,结果见表6。

由以上结果表明,双人12份供试品溶液均检出

3个已知杂质(杂质E、I、C),1个未知杂质(RRT1.75),采用加校正因子的主成分对照品法,各杂质含量的最大极差为0.002%($\leq 0.02\%$),总杂极差为0.005%($\leq 0.05\%$),表明本法精密度良好。

2.8 准确度试验

精密称取盐酸乌拉地尔约10 mg,置10 mL量瓶中,共12份,分别加入“2.2.3”项下杂质对照品贮备液0.2、0.8、1.0、1.2 mL,每个浓度点平行配制3份,加空白溶剂稀释至刻度,即得相当于杂质限度的定量限、80%、100%、120%的供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,采用加校正因子的主成分对照品法计算各杂质回收率。杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、O的平均回收率分别为100.7%、100.1%、103.2%、92.2%、98.3%、99.3%、100.0%、97.6%、98.7%、99.0%、103.1%,RSD分别为1.45%、1.06%、1.83%、5.37%、1.21%、1.55%、1.01%、1.52%、0.35%、1.81%、3.52%,准确度均良好。

2.9 耐用性考察

分别在波长变化($\pm 5\text{ nm}$)、柱温变化($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$)、流动相B初始比例($\pm 2\%$)、缓冲盐浓度变化($\pm 10\%$)、缓冲盐pH值变化(± 0.2)、缓冲盐中三乙胺浓度变化($\pm 10\%$),以及不同批号色谱柱的条件下考察样品中各成分的分离度及杂质的检出情况。结果表明在以上色谱条件发生变动的情况下,盐酸乌拉地尔与相邻杂质、各杂质之间的分离度均大于1.5。各条件下杂质个数一致、各含量极差均小于0.02%,见表7,表明本法的耐用性良好。

表6 精密度结果(加校正因子主成分对照品法)

Table 6 Precision results (API external standard method with correction factors)

样品名	C/%	E/%	I/%	最大未知单杂 RRT1.75	总杂/%	杂质个数	
重复性	供试品溶液1	0.013	0.003	0.002	0.006	0.024	4
	供试品溶液2	0.012	0.003	0.002	0.006	0.023	4
	供试品溶液3	0.011	0.002	0.002	0.007	0.022	4
	供试品溶液4	0.012	0.003	0.003	0.008	0.026	4
	供试品溶液5	0.012	0.003	0.002	0.006	0.023	4
	供试品溶液6	0.011	0.002	0.002	0.006	0.021	4
中间精密度	供试品溶液1	0.012	0.003	0.002	0.008	0.025	4
	供试品溶液2	0.012	0.003	0.002	0.008	0.025	4
	供试品溶液3	0.012	0.004	0.002	0.008	0.026	4
	供试品溶液4	0.013	0.003	0.002	0.007	0.025	4
	供试品溶液5	0.012	0.003	0.002	0.008	0.025	4
	供试品溶液6	0.011	0.003	0.002	0.007	0.023	4
12份平均值	0.012	0.003	0.002	0.007	0.024	/	
12份极差	0.002	0.002	0.001	0.002	0.005	/	

表7 耐用性结果

Table 7 Results of Robustness

参数	C/%	E/%	I/%	最大未知单杂/%	总杂/%	杂质个数
265 nm/231 nm	0.012	0.004	0.003	0.006	0.025	4
272 nm/241 nm	0.010	0.003	0.002	0.006	0.021	4
柱温 25 °C	0.012	0.003	0.002	0.006	0.023	4
柱温 35 °C	0.011	0.002	0.002	0.006	0.021	4
流动相B初始比例-2%	0.011	0.002	0.002	0.006	0.022	4
流动相B初始比例+2%	0.011	0.003	0.002	0.007	0.023	4
0.045 mol·L ⁻¹ 磷酸二氢铵	0.012	0.003	0.002	0.006	0.023	4
0.055 mol·L ⁻¹ 磷酸二氢铵	0.012	0.002	0.002	0.007	0.023	4
pH 5.4	0.009	0.002	0.001	0.009	0.021	4
pH 5.8	0.012	0.002	0.002	0.007	0.023	4
三乙胺 0.18%	0.010	0.003	0.002	0.005	0.020	4
三乙胺 0.22%	0.010	0.003	0.002	0.006	0.021	4
标准条件(色谱柱1)	0.013	0.003	0.002	0.007	0.025	4
标准条件(色谱柱2)	0.012	0.003	0.002	0.006	0.023	4
极差	0.004	0.002	0.002	0.004	0.005	/

2.10 有关物质测定

取3批盐酸乌拉地尔原料药,按照“2.2.1”项下配制供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定,采用加校正因子主成分对照品法计算,结果见表8(在236 nm下计算杂质C、F,其余杂质均在270 nm下计算)。

3 讨论

3.1 色谱条件选择与优化

盐酸乌拉地尔在存储的过程中遇酸会降解产

生杂质C、杂质D,氧化会降解产生杂质E,杂质A、B、F、G、H、I、J、O均为合成过程中可能产生的工艺杂质,上述杂质仅杂质A在《中国药典》2020年版中研究,其余杂质在《中国药典》、进口质量标准与《日本药典》JP18版中均未进行研究。

笔者在前期比较了《中国药典》2020年版、《日本药典》JP18版与进口质量标准WS1-(X-116)-2003Z对盐酸乌拉地尔原料药中有关物质的研究,《日本药典》JP18版中有关物质方法为薄层色

表8 样品有关物质检测结果
Table 8 Results of related substances

批号	236 nm					270 nm						最大未知单杂/%	总杂/%
	C/%	F/%	D/%	H/%	B/%	G/%	E/%	A/%	J/%	I/%	O/%		
20042101	0.009	ND	ND	ND	ND	ND	0.003	ND	ND	0.002	ND	0.006	0.020
20042901	0.006	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	0.004	ND	0.010	0.017
20042902	0.009	ND	ND	ND	ND	ND	0.009	ND	ND	0.003	ND	0.009	0.027

ND-未检出;20042101 数据来源于重复性1个样检测结果

ND-not detected; 20042101 data from one sample results in repeatable test

谱(TLC)法,无法定量;在《中国药典》2020年版和《盐酸乌拉地尔》进口注册标准(W51-(X-116)-2003Z)的方法中主峰与相邻杂质、杂质之间的分离较差。鉴于本研究中的几个杂质极性差别较大,无法采用现有标准的检测方法进行分析,笔者从色谱柱、洗脱梯度、体积流量及柱温等方面进行了筛选。首先,在2种方法下分别考察Agilent XDB C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、YMC-Pack ODS-A C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Analytical ZORBAX Extend-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种不同型号色谱柱,由于Agilent XDB C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)检出杂质最多且杂质峰形较好,因此,最终选择Agilent XDB C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);其次,以0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢铵溶液(含0.02%三乙胺,磷酸调pH值至6.0)-乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,并不断调整乙腈比例。杂质O在所有组分中极性最小,将乙腈比例提高至35%时才将其从色谱柱中洗脱,且柱温为30℃时,所有组分间分离最好,当体积流量变动±0.1 mL·min⁻¹时,杂质间分离受影响,因此,最终选择色谱条件中乙腈以35%的比例洗脱10 min,柱温30℃,体积流量1.0 mL·min⁻¹为本品检测方法。

3.2 检测波长选择

查阅相关文献,在进口质量标准中拟定本品检测波长为270 nm,《中国药典》2020年版中规定本品检测波长为268 nm,实验过程中考察各杂质在光电二极管阵列(PDA)检测器下的吸收波长,结果显示,盐酸乌拉地尔及杂质A、B、D、E、G、H、I、J的最大吸收波长在260~269 nm;杂质C、F的最大吸收波长在236 nm左右,在270 nm处吸收较低。因此,本品的有关物质暂拟定双波长检测,杂质A、B、D、E、G、H、I、J在270 nm下检测,杂质C、F在236 nm下检测。

3.3 各杂质限度控制

供试品溶液中检出4个杂质,结合合成工艺路

线、多批次供试品测定结果及破坏试验的结果,发现其中2个杂质为降解杂质(杂质C和E),初步推断为盐酸乌拉地尔原料药6-位胺基键断裂产生杂质C、苯环上甲氧基键断裂产生杂质E。在合成工艺杂质中仅检出杂质I,其余合成工艺杂质A、B、F、G、H、J、O均未检出,因此仅将降解杂质杂质C、D、E及合成工艺杂质杂质I作为特定杂质,其他杂质作为非特定杂质考察。

在《中国药典》2020年版中规定乌拉地尔中单杂限度不得超过0.5%,总杂限度不得超过1.0%;《日本药典》JP18版中规定,单杂限度不得超过0.5%;进口标准中规定,总杂不得超过0.5%;同时结合人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)的指导原则^[13],控制盐酸乌拉地尔中已知杂质C、D、E、I的限度为不得超过0.15%;单个未知杂质不得超过0.10%;总杂不得超过0.50%。

本研究建立的HPLC有关物质测定方法灵敏、准确、可靠,可全面测定盐酸乌拉地尔原料中有关物质的含量,可为盐酸乌拉地尔原料药的质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周军红. 乌拉地尔的合成及多晶型分析[D]. 天津: 天津大学, 2006.
Zhou J H. Synthesis and polymorph analysis of Urapidil [D]. Tianjin: Tianjin University, 2006.
- [2] 许佑君, 杨治旻, 蒋清乾, 等. 乌拉地尔的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(7): 294-296.
Xu Y J, Yang Z M, Jiang Q Q, et al. Synthesis of urapidil [J]. Chin J Pharm, 2000, 31(7): 294-296.
- [3] Buch J. Urapidil, a dual-acting antihypertensive agent: Current usage considerations [J]. Adv Ther, 2010, 27(7): 426-443.
- [4] 关德明, 陈力, 黄永麟. 乌拉地尔注射液治疗重度原发性高血压的疗效与安全性[J]. 中国新药杂志, 2004, 13

- (1): 65-67.
Guan D M, Chen L, Huang Y L. Efficacy and safety of urapidil injection in treatment of severe essential hypertension [J]. Chin New Drugs J, 2004, 13(1): 65-67.
- [5] 郑三福. 探究与评价盐酸乌拉地尔治疗高血压危象的临床效果及安全性 [J]. 北方药学, 2019, 16(9): 125-126.
Zheng S F. To explore and evaluate the clinical effect and safety of Urapidil Hydrochloride in the treatment of hypertensive crisis [J]. J North Pharm, 2019, 16(9): 125-126.
- [6] 陈金容. 盐酸乌拉地尔用于围术期高血压患者中的效果观察 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(29): 583-584.
Chen J R. Effect of Urapidil Hydrochloride on patients with perioperative hypertension [J]. Guide China Med, 2012, 10(29): 583-584.
- [7] 林波. 乌拉地尔和硝酸甘油治疗急性左心衰临床疗效比较 [J]. 内科, 2012, 7(1): 21-22.
Lin B. Clinical comparison of Urapidil and nitroglycerin in the treatment of acute left heart failure [J]. Intern Med China, 2012, 7(1): 21-22.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 84-85.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 84-85.
- [9] 日本药典委员会. 日本药典 [S]. 18版. 2016: 1551-1552.
Japanese Pharmacopoeia Committee. Japanese Pharmacopoeia [S]. 18th Edition. 2021: 1551-1552.
- [10] 刘玉真, 聂新永, 米中茂, 等. 盐酸乌拉地尔及其注射液中有相关物质的 HPLC 测定研究 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(8): 978-980.
Liu Y Z, Nie X Y, Mi Z M, et al. Study on determination of related substances of urapidil hydrochloride and its injection [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(8): 978-980.
- [11] 阎卉, 姜峰, 王成港. RP-HPLC 法测定盐酸乌拉地尔注射液含量和有关物质 [J]. 天津药学, 2007, 19(4): 7-9.
Yan H, Jiang F, Wang C G. Determination of Urapidil hydrochloride injection and related substances by RP-HPLC [J]. Tianjin Pharm, 2007, 19(4): 7-9.
- [12] 王嫦鹤, 焦艳, 杜珊, 等. HPLC 法测定乌拉地尔不同制剂中的有关物质 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(3): 254-257.
Wang C H, Jiao Y, Du S, et al. Analysis of the related substances in different urapidil preparations by HPLC [J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(3): 254-257.
- [13] International Council for Harmonization. Harmonised tripartite guideline. Impurities in new drug substances Q3A (R2) (2006) [EB/OL]. (2018-06-09) [2021-12-01]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf.

[责任编辑 兰新新]