

伊潘立酮片有关物质一致性评价研究

米楠^{1,2}, 房思萌^{1,2}, 华东东^{1,2}, 臧可昕^{1,2}

1. 天津药物研究院有限公司 制剂中心, 天津 300193

2. 天津药物研究院有限公司 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 建立伊潘立酮片的有关物质测定方法, 与参比制剂进行有关物质一致性评价研究。**方法** 建立高效液相色谱法(HPLC)测定伊潘立酮片有关物质, 并考察方法的专属性、线性、精密度、准确性及耐用性等。采用 Agela Venusil MP C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.02 mol/L 磷酸氢二铵缓冲液(磷酸调 pH 至 7.0±0.1) 为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 229 nm, 柱温 40℃。**结果** 在选定的色谱条件下, 伊潘立酮与杂质分离良好, 辅料无干扰。自研伊潘立酮片与参比制剂杂质谱相似。**结论** 该方法准确、可靠、耐用性好, 自研伊潘立酮片与参比制剂具有有关物质一致性。

关键词: 伊潘立酮片; 有关物质; 一致性; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 11-2015-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.015

Evaluation of related substances in Iloperidone Tablets

MI Nan^{1,2}, FANG Simeng^{1,2}, HUA Dongdong^{1,2}, ZANG Kexin^{1,2}

1. Centre of Pharmceutics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193

Abstract: Objective To establish high performance liquid chromatography (HPLC) methods for determination of related substances in Iloperidone tablets. **Methods** The related substances were determined on a Agela Venusil MP C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), Mobile phase A: 0.02 mol/L diammonium hydrogen phosphate buffer (adjust pH value to 7.0 with phosphoric acid), mobile phase B: acetonitrile, The flow rate was 1.0 ml/min and the detection wavelength was 229 nm, column temperature was 40℃. **Results** Under the chromatographic conditions, the resolution of Iloperidone and related substances was great, and excipients without interference. The related substances of reference preparation and self-preparation have significant similarity. **Conclusion** The method is accurate, reliable and durable, and the related substances of the two preparations are similar.

Key words: Iloperidone Tablets; related substances; similarity; HPLC

2009年5月,由美国Vanda制药公司开发的伊潘立酮片(商品名为FANAPT),获得了FDA的批准并在美国上市,在临床上用于治疗成年人的精神分裂症,共分为7种规格1、2、4、6、8、10、12 mg,推荐剂量范围为12~24 mg/d。作为一种新型的非典型广谱抗精神病药物,伊潘立酮不仅能减轻精神分裂症患者的阴性症状,同时有利于改善患者情绪和认知功能,提高了治疗的安全性和耐受性,为精神分裂症患者提供了新的治疗选择^[1-2]。

杂质控制是药品质量控制的核心内容之一,药品在临床使用中产生的不良反应往往与产品中的杂质有关,杂质研究贯穿于药品研究的全过程,直接关系到药品的安全性和质量的可控性^[3],有关物质一致性评价是药品质量一致性评价工作的重要内容之一,本文建立一种伊潘立酮片有关物质的测定方法,并与参比制剂进行有关物质一致性评价研究,结果表明,该液相方法准确、可靠,自研制剂与参比制剂有类似杂质谱,具有有关物质一致性。

收稿日期: 2018-06-01

第一作者: 米楠(1985—),女,硕士,助理研究员,主要从事药物制剂及质量研究。Tel: (022)23006839 E-mail: minan518@126.com

*通信作者: 臧可昕, Tel: (022)23006839 E-mail: zangkx@tjpr.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AL104 天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); waters e2695-e2998 高效液相色谱仪(沃特世公司); FE20 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); SB-5200D 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药物与试剂

伊潘立酮原料药(天津药物研究院化药部,批号 R121217);伊潘立酮自研制剂(天津药物研究院制剂中心,规格为每片 6 mg,批号:14092307、14092408、14092509);伊潘立酮参比制剂 FANAPT(美国 Vanda 制药公司,规格为每片 6 mg,批号:LOT GGFV);杂质 D、E、M、N、U 对照品(天津药物研究院化药部);磷酸氢二铵(天津市光复科技发展有限公司,分析纯);乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯),水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 伊潘立酮有关物质测定方法

2.1.1 色谱条件 照高效液相色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0512)进行测定。色谱柱为 Agela Venusil MP C₁₈ 150 mm×4.6 mm, 5 μm;以 0.02 mol/L 磷酸氢二铵缓冲液(磷酸调 pH 至 7.0±0.1)为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱条件见表 1;检测波长 229 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 40 ℃;进样体积 20 μL。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	75	25
20	40	60
30	40	60
35	75	25
50	75	25

2.1.2 溶液的配制 溶媒:流动相 A-B(62.5:37.5)。

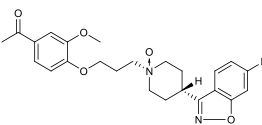
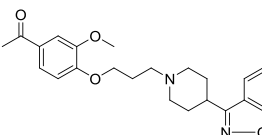
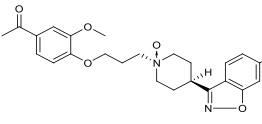
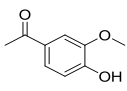
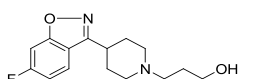
混辅溶液:称取处方比例混合辅料适量,置 10 mL 量瓶中,加溶媒适量,超声 10 min,放至室温,用溶媒稀释至刻度,11 000 r/min 离心 7 min,取上清液。

伊潘立酮对照品溶液:精密称取伊潘立酮对照品 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加溶媒适量,超声使溶解,放至室温,用溶媒稀释至刻度,摇匀作为 100% 伊潘立酮对照品溶液,准确移取 1 mL 伊潘立酮对照品溶液置 100 mL 量瓶中,用溶媒稀释至刻度,摇匀,作为 1% 伊潘立酮对照品溶液。

杂质对照品溶液:精密称取杂质 D、E、M、N、U 对照品 15 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,加溶媒适量,超声使溶解,放至室温,用溶媒稀释至刻度,摇匀,分别作为 100% 杂质对照品溶液,取上述杂质溶液各 1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加溶媒稀释至刻度,摇匀,作为 1% 杂质对照品溶液。见表 2。

表 2 伊潘立酮有关物质杂质结构

Table 2 Related substances of IPLT

名称	化学名	结构式	来源
杂质 D	1-[4-[3-[顺式-4-(6-氟-1,2-苯并异噁唑-3-基)-1-氧代-哌啶基]丙氧基]-3-甲氧基苯基]乙酮		降解杂质
杂质 E	4'-[3-[4-(1,2-苯并异噁唑-3-基)哌啶基]丙氧基]-3'-甲氧基苯乙酮		潜在工艺杂质
杂质 M	1-[4-[3-[反式-4-(6-氟-1,2-苯并异噁唑-3-基)-1-氧代-哌啶基]丙氧基]-3-甲氧基苯基]乙酮		降解杂质
杂质 N	4-羟基-3-甲氧基苯乙酮		合成起始原料 降解杂质
杂质 U	6-氟-3-[1-(3-羟丙基)-4-哌啶基]-1,2-苯并异噁唑		潜在杂质

1%伊潘立酮杂质混合对照品溶液:取伊潘立酮对照品储备溶液1 mL,杂质D、E、M、N、U储备液各1 mL,置于100 mL量瓶中,加溶媒稀释至刻度,摇匀,作为1%伊潘立酮杂质混合对照品溶液。

供试品溶液:取伊潘立酮自研片及对照片研细粉适量(相当于含伊潘立酮3 mg)置10 mL量瓶中,加溶媒适量,超声10 min使溶解,放至室温,溶媒稀释至刻度,离心,取上清液,制成每1 mL中约含伊潘立酮300 μ g的供试品溶液。

2.1.3 专属性试验 分别取流动相、溶媒、混合辅料、100%伊潘立酮对照品溶液、100%杂质对照品溶液、1%伊潘立酮杂质混合对照品溶液、供试品溶液各20 μ L,注入液相色谱仪,开启二极管阵列PDA检测器3D通道,记录色谱图,杂质归属见表3。

结果表明,流动相、溶媒、混合辅料、伊潘立酮、杂质N、U、D、M、E均有明确归属,相互之间分离度良好,主峰及各杂质纯度均符合要求。自研制剂与对照品杂质谱特征基本一致;自研制剂与原研制剂杂质谱特征基本一致。

2.1.4 检测波长的选择 取1%伊潘立酮及杂质N、U、D、E、M混合对照品溶液20 μ L,注入液相色谱仪,开启PDA检测器,记录色谱图,光谱指数图见图1,3D图谱见图2。

结果表明,伊潘立酮及杂质N、D、M在229 nm波长处均有最大吸收,杂质U、E在229 nm波长处也有较大吸收,因此选择229 nm作为伊潘立酮杂质研究的检测波长。

2.1.5 强制降解试验 取伊潘立酮片研细粉溶液

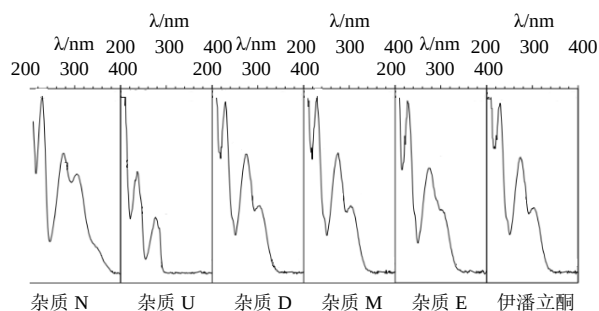


图1 伊潘立酮及杂质光谱指数图
Fig. 1 Spectrogram of IPLT and related substance

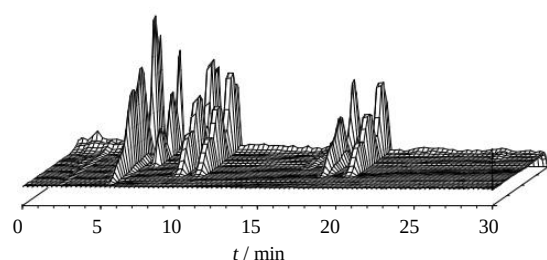


图2 伊潘立酮及杂质3D图谱
Fig. 2 3D figure of IPLT and related substance

及处方比例混合辅料溶液,分别经光照、紫外光照、2 mol/L盐酸60℃加热、2 mol/L氢氧化钠60℃加热破坏7 d,有关物质均无显著变化。

取伊潘立酮片研细粉适量(约含伊潘立酮3 mg),置10 mL量瓶中,加溶媒适量,超声10 min使溶解,放至室温,溶媒稀释至刻度,离心,取上清液,为伊潘立酮片溶液。取伊潘立酮片研细粉适量(约

表3 伊潘立酮片有关物质检查方法专属性试验
Table 3 Specificity results of IPLT tablets resolution method

样品名称	含量/%	纯度角	阈值	保留时间/min							
				背景	N	U	D	M	E	IPLT	未知
流动相	—	—	—	2.3	—	—	—	—	—	—	—
溶媒	—	—	—	2.3	—	—	—	—	—	—	—
混辅	—	—	—	2.3	—	—	—	—	—	—	—
杂质N	99.97	0.362	2.017	2.2	5.23	—	—	—	—	—	—
杂质U	98.85	0.414	2.046	2.2	—	6.43	—	—	—	—	—
杂质D	99.80	0.288	2.007	2.3	—	—	8.83	—	—	—	—
杂质M	99.94	0.557	2.020	2.2	—	—	—	10.05	—	—	—
杂质E	98.54	0.303	2.007	2.3	—	—	—	—	17.99	—	—
IPLT	99.99	0.191	2.008	2.3	5.20	—	—	—	—	19.70	—
参比制剂	99.79	0.297	2.006	2.3	5.22	—	8.83	10.07	—	19.67	23.57
自研制剂	99.75	0.290	2.005	2.3	5.25	—	8.86	10.09	—	19.65	—

含伊潘立酮3 mg)及相应处方比例混合辅料,分别置10 mL量瓶中,加溶媒适量,超声10 min使溶解,加3%双氧水溶液0.2 mL,溶媒稀释至刻度,室温放置3 h,离心,取上清液,为伊潘立酮片及混辅的氧化降解溶液。取上述溶液各20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图3。

结果表明,伊潘立酮片溶液在氧化降解条件下,主峰降解明显;杂质D、M显著增长。在3%双氧水氧化3 h条件下,主峰降解约8.4%,总杂质增加约7.6%,基本实现物料平衡,主峰纯度符合要求。采用该液相方法能够对降解产物有效分离和检测。

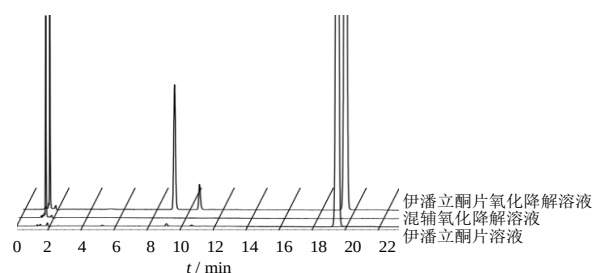


图3 伊潘立酮片溶液氧化降解

Fig. 3 The chromatograms of IPLT sample solution under accelerating decomposition with oxidation

2.1.6 线性和范围 精密移取伊潘立酮对照品储备液、杂质N、杂质D、杂质M储备液适量,置100 mL量瓶中,加溶媒依次稀释制成约含伊潘立酮及杂质分别为30.0、15.0、7.50、3.00、1.50、0.750、0.300、0.075 0、0.030 0、0.015 0 μ g/mL的系列混合溶液,依次注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表4。按信噪比约为10:1确立定量限浓度,按信噪比约为3:1确立检测限浓度,结果见表5。

2.1.7 精密度 伊潘立酮供试品溶液,重复配制6

表4 伊潘立酮及杂质校正因子试验结果

Table4 Regression equations and correction factors of IPLT and impurities

样品名称	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回归方程	相关系数	校正因子
伊潘立酮	0.306~30.60	$A=612.88C+4091.6$	0.999 9	—
杂质N	0.309~30.92	$A=63.956C+692.8$	0.999 9	1.04
杂质D	0.318~31.78	$A=51.097C+524.29$	0.999 9	0.83
杂质M	0.298~29.90	$A=49.497C+1381.9$	0.999 9	0.81

表5 伊潘立酮及杂质灵敏度结果

Table5 Sensitivity results of IPLT and impurities

样品名称	定量限		检出限	
	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出量/ng	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出量/ng
伊潘立酮	0.306	6.12	0.076 5	1.53
杂质N	0.309	6.18	0.077 3	1.55
杂质D	0.318	6.36	0.079 5	1.59
杂质M	0.298	5.96	0.074 5	1.49

份,各取20 μ L,依次注入液相色谱仪,按外标法以峰面积计算,验证方法精密度。复核实验人员在不同时间,使用不同仪器及不同的色谱柱重复试验,验证方法中间精密度。N为12时,总杂质均值为0.25%,RSD为1.79%;两人测定有类似的杂质谱,中间精密度良好。

2.1.8 稳定性 取1%伊潘立酮对照品溶液、伊潘立酮供试品溶液分别置于15℃样品仓内,于不同时间点分别取20 μ L,依次注入液相色谱仪,每个样品平行进样2针,按外标法以峰面积计算,验证溶液的稳定性。

结果表明,将对照品溶液、供试品溶液样品仓内放置约162 h,总杂质的RSD为6.75%,单一杂质质量RSD均小于10%,符合规定;杂质谱特征一致,溶液稳定性良好。

2.1.9 耐用性 改变高效液相色谱条件,考察色谱系统参数变化耐用性,包括:梯度时间 $\pm 10\%$ 、柱温 $\pm 2^\circ\text{C}$ 、体积流量 $\pm 0.1\text{ mL/min}$ 、波长 $\pm 2\text{ nm}$ 、流动相 $\text{pH}\pm 0.2$ 。设置高效液相色谱系统参数,分别取对照品溶液和供试品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图。

结果表明各微调条件下,伊潘立酮单一杂质测定结果的RSD值均小于10%($n=6$),总杂质RSD均小于15%,符合规定,色谱图杂质谱特征一致,高效液相色谱系统参数耐用性良好。

2.2 伊潘立酮有关物质一致性

取自制样品和原研产品,按市售包装置于稳定性试验箱(温度: $25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$,湿度: $60\%\pm 10\%$;温度: $30^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$,湿度: $65\%\pm 5\%$)中放置12个月^[4],分别于第6、9、12个月取样,考察有关物质变化情况,按加校正因子的自身对照法^[5]计算,单个杂质峰面积不得大于1%伊潘立酮对照品峰面积的(0.5%),各杂质峰面积的和不得大于1%伊潘立酮对照品峰面积(1.0%)。结果见表6、7,色谱图见图4。

表6 伊潘立酮片有关物质一致性评价

Table 6 The determination results of related substances

时间	样品	有关物质/%				总杂质
		杂质 N	杂质 D	杂质 M	未知杂质($R_t=24.0$ min)	
0 个月	对照片	0.03	0.08	0.04	0.03	0.19
	自研片	0.04	0.13	0.08	—	0.25
6 个月	对照片	0.04	0.16	0.07	0.04	0.31
	自研片	0.05	0.17	0.11	—	0.33
9 个月	对照片	0.04	0.21	0.07	0.04	0.36
	自研片	0.07	0.19	0.12	—	0.39
12 个月	对照片	0.05	0.27	0.08	0.05	0.45
	自研片	0.08	0.20	0.13	—	0.41

表7 伊潘立酮片有关物质一致性评价

Table 7 The determination results of related substances

时间	样品	有关物质/%				总杂质
		杂质 N	杂质 D	杂质 M	未知杂质($R_t=24.0$ min)	
0 个月	对照片	0.03	0.08	0.04	0.03	0.19
	自研片	0.04	0.13	0.08	—	0.25
6 个月	对照片	0.04	0.17	0.07	0.05	0.33
	自研片	0.08	0.18	0.14	—	0.40
9 个月	对照片	0.06	0.28	0.08	0.03	0.44
	自研片	0.10	0.19	0.14	—	0.43
12 个月	对照片	0.11	0.32	0.10	0.04	0.57
	自研片	0.14	0.19	0.17	—	0.49

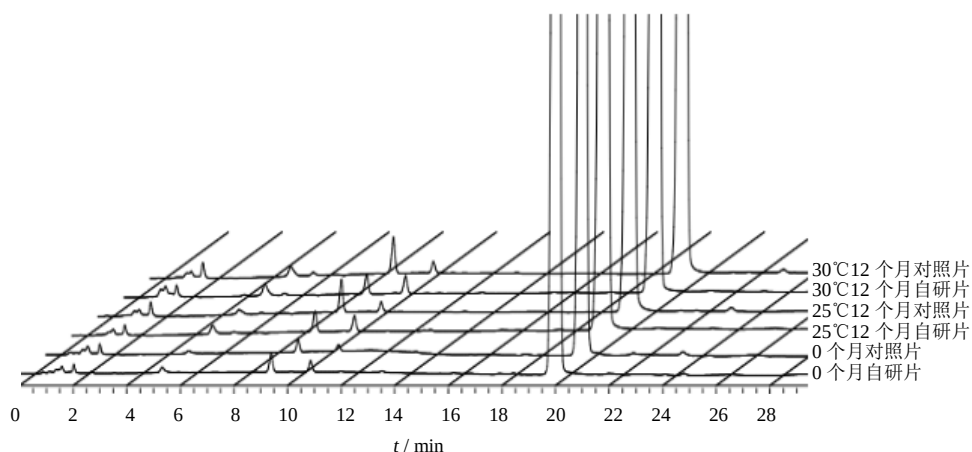


图4 伊潘立酮片有关物质一致性评价

Fig. 4 The determination results of related substances

结果表明,自研伊潘立酮片与原研产品色谱图比较,均检出杂质N、D、M,

原研产品检出未知杂质($R_t=24.0$ min),自制样品与原研产品有关物质特征基本一致。

3 讨论

本文通过PDA检测器在200~400 nm波长范

围内对伊潘立酮及杂质进行光谱扫描,结果显示伊潘立酮的最大吸收波长是229 nm,其杂质D、M、N在229 nm波长处均有最大吸收,杂质N、E也有较大吸收,且辅料在该波长处几乎无吸收,因此选择229 nm作为伊潘立酮有关物质检查的检测波长。

破坏试验通常在敏感条件下使主成分降解

10%~30%, 过分降解有可能产生在生产和贮存条件下不可能生成的二级甚至三级降解产物, 不利于色谱条件的筛选。由于降解产物和主药的响应可能存在差异、降解产物可能进一步降解以及存在多条降解途径等因素, 使破坏试验中常出现物料不平衡的现象^[6], 本研究中, 伊潘立酮片溶液在氧化降解条件下, 主成分降解约 10%, 能够基本实现物料平衡。

伊潘立酮片推荐剂量范围为一日 12~24 mg, 根据《化学药物杂质研究的技术指导原则》, 对于最大日剂量在 10~100 mg 范围内的制剂, 报告限度为 0.1%, 鉴定限度为 0.2% 或 2 mg (取最小值), 质控限度为 0.5% 或 200 μg (取最小值)^[7-8], 已知杂质 D 在稳定性放置 12 个月时, 含量为 0.2% 小于质控限度, 化学结构确定, 且小于对照片中杂质 D 含量, 符合要求。

自研制剂检出杂质 N、D、M, 参比制剂检出杂质 N、D、M 及未知杂质 ($R_t=24.0\text{ min}$), 自研制剂与参比制剂杂质谱相似, 按市售包装置于稳定性试验箱中放置 12 个月, 比较自研制剂与参比制剂杂质变化情况, 结果显示参比制剂特有杂质 ($R_t=24.0\text{ min}$) 在放置过程中几无变化, 非降解杂质且杂质含量小于等于 0.05%, 参比制剂与自研制剂共同杂质 N、D、M 均有一定程度的增加, 自研制剂与参比制剂具有

有关物质一致性。

本文建立了一种伊潘立酮片有关物质的测定方法, 该方法准确、可靠, 能够有效检出伊潘立酮片中的有关物质, 伊潘立酮自研片及对照片有相似的杂质谱, 且在稳定性放置过程中, 杂质有相似的变化趋势, 伊潘立酮自研片与对照片具有有关物质一致性。

参考文献

- [1] 刘岩, 翟金国, 杨涛. 新型非典型抗精神病药伊潘立酮临床应用新进展 [J]. 精神医学杂志, 2015, 28(5): 384-387.
- [2] Arif S A, Mitchell M M. Iloperidone: A new drug for the treatment of schizophrenia [J]. Am J Health Syst Pharm, 2011, 68(4): 301-308.
- [3] 张哲峰. 我国药物研发中杂质研究面临的挑战与思考 [J]. 药品评价, 2010, 7(18): 12-19.
- [4] 中国药典 [S]. 2015.
- [5] 张宁, 于红. 化学药品杂质研究思路探析 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23): 2074-2077.
- [6] 陈震. 有关物质的研究与新药注册 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(11): 872-876.
- [7] 化学药物杂质研究的技术指导原则 [S]. 2005.
- [8] ICH. Q3B(R2): Impurities in New Drug Products [S]. 2006.