

HPLC法测定尼鲁米特原料药的含量和杂质

仲 婕*, 朱德领#, 李保山, 钱宗明, 张金钟, 陈炜龙, 施明珠(杭州天龙药业有限公司, 杭州 310021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0061-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.21

摘要 目的:建立测定尼鲁米特原料药含量和杂质的方法。方法:采用高效液相色谱法。尼鲁米特和杂质(总杂质、杂质 I)的流动相体系分别采用乙腈-磷酸二氢钾溶液(pH 7.5)梯度洗脱和等度洗脱,二极管阵列检测波长分别为 267、230 nm,其余条件均相同,色谱柱为 WondaSil C₁₈-WR,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:尼鲁米特、杂质 I 的检测质量浓度线性范围分别为 0.1~1.25 mg/ml、0.64~6.40 μg/ml($r=0.999\ 6$ 、 $0.999\ 9$);平均回收率分别为 94.2%(RSD=0.57%, $n=2$)、98.6%(RSD=2.1%, $n=2$)。杂质 I 的限度应控制在 0.2% 以下,总杂质不得大于 2.0%。结论:本方法快速、简便、专属性强,能有效控制尼鲁米特原料药质量。**关键词** 尼鲁米特原料药;杂质 I;总杂质;含量测定

Content Determination and Related Impurities in Nilutamide Raw Material by HPLC

ZHONG Jie, ZHU De-ling, LI Bao-shan, QIAN Zong-ming, ZHANG Jin-zhong, CHEN Wei-long, SHI Ming-zhu (Hangzhou Tianlong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of nilutamide and impurities. METHODS: HPLC method was adopted. WondaSil C₁₈-WR column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate solution (adjust pH to 7.5, gradient elution and isocratic elution), along with a diode array detector (DAD) to control nilutamide and impurity. The detection wavelength was set at 267 nm and 230 nm. Other detection conditions were same to each other. The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of nilutamide and impurity I were 0.1-1.25 mg/ml ($r=0.999\ 6$) and 0.64-6.40 μg/ml ($0.999\ 9$); average recoveries were 94.2% (RSD=0.57%, $n=2$) and 98.6% (RSD=2.1%, $n=2$). The impurity I was not more than 0.2%, and total impurity was less than 2.0%. CONCLUSIONS: The method is rapid, simple and specific, and suitable for the quality control of nilutamide raw material.

KEYWORDS Nilutamide raw material; Impurity I; Total impurity; Content determination

尼鲁米特{5,5-二甲基-3-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-2,4-咪唑烷二酮, Nilutamide, C₁₂H₁₀F₃N₃O₄, 分子质量为 317.2}是一种非甾体抗雄激素类药物,由法国 Roussel-Uclaf 公司首家研制^[1],用于前列腺癌治疗。其作用机制是尼鲁米特与雄性激素受体结合,阻止雄性激素与相应的受体结合,发挥抗雄性激素作用^[2-8]。因自制的尼鲁米特原料药的合成路线和精制方法与原研厂不同,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法、高效毛细管电泳法和离子色谱法对尼鲁米特原料药的有关物质进行了全面研究,建立了本品的含量测定方法,并将建立的 HPLC 法收载入企业质量标准中。本文在此仅报道了 HPLC 法部分的研究内容。

1 材料

1.1 仪器

Dionex UltiMate 3000 钛系统 HPLC 仪,带 TCC-3000 自动进样器、四元低压梯度洗脱系统、在线脱气机、UltiMate 3000 二极管阵列检测器(美国戴安公司)。

1.2 药品与试剂

样品尼鲁米特原料药(自制,批号:20121201、20120821-

47、20121018、20120824、20120821-1、20120913、20120801、20120723、20120821-2、20120821-3,含量待检测);尼鲁米特粗品(自制,批号:20121018、20120824);尼鲁米特对照品(批号:1.0,纯度:100%)、杂质 I(尼鲁米特主峰左临杂质峰 3-三氟甲基-4-硝基苯胺,批号:1.0,纯度:≥99%)均为市售的《欧洲药典》标准用对照品;杂质 II 为反应时取样中间体 3-三氟甲基-4-硝基碘苯;甲醇、乙腈均为色谱纯;磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 主成分与杂质结构

尼鲁米特、杂质 I、杂质 II 的化学结构式见图 1。

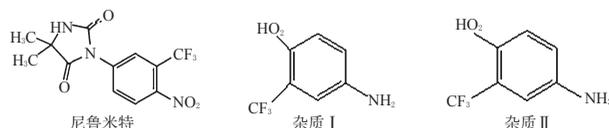


图 1 主成分与相关杂质的化学结构

Fig 1 Chemical structure of main component and related impurities

2.2 测定波长的选择

经紫外分光光度计扫描,尼鲁米特最大吸收在 267 nm 波长处,所以含量测定选择其为测定波长。

取尼鲁米特粗品配制成 1 mg/ml 的溶液,取 10 μl 进样,用

* 副研究员。研究方向:药品质量标准。电话:010-66931423。

E-mail: law1022@163.com

通信作者:教授级高级工程师。研究方向:药品质量标准。电

话:0571-81635678。E-mail: delinzh@163.com

二极管阵列检测器在200~500 nm波长内全波段检测。结果显示,230 nm波长处杂质最多;单个提取230、267、214 nm波长处的色谱图进行比较,发现也是在230 nm波长下显示的杂质吸收较大,故杂质检测波长定为230 nm,详见图2。

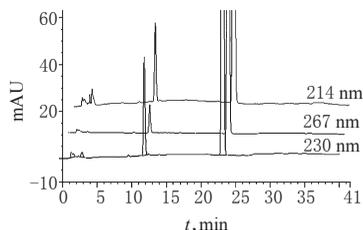


图2 不同波长下的杂质色谱图

Fig 2 Impurity chromatograms in different wavelength

2.3 总杂质测定

2.3.1 溶液制备:取样品约100 mg,精密称定,加甲醇溶解并稀释至100 ml,作为供试品溶液;精密量取此溶液2.0 ml置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得对照溶液a;称取尼鲁米特对照品和杂质I对照品各2 mg,加甲醇溶解并稀释至50 ml,即得对照溶液b。

2.3.2 色谱条件:色谱柱为WondaSil C₁₈-WR (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为乙腈,流动相B为2.0 g/L磷酸二氢钾溶液(用1 mol/L的氢氧化钠调节pH至7.5),梯度洗脱(0~5 min, 35% A; 5~40 min, 35% A~60% A;流速为1.0 ml/min);二极管阵列检测器检测,检测波长为230 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μl。

2.3.3 系统适用性试验:取对照溶液b注入色谱仪,结果杂质I与主成分峰间的分离度为5.32,见图3。

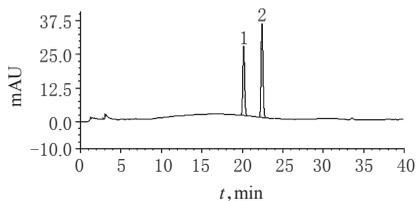


图3 系统适用性试验色谱图

1.杂质I; 2.尼鲁米特

Fig 3 Chromatograms of system suitability test

1. impurity I; 2. nilutamide

2.3.4 精密性试验:取对照溶液a连续进样5次,结果主成分峰面积的RSD=1.48% (n=5)。

2.3.5 总杂质限度确定:取对照溶液a注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分峰的峰高约为满量程的20%;再精密量取供试品溶液和对照溶液a分别注入色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的1.5倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,其杂质峰面积的和不得大于对照溶液a的主峰面积(2.0%)。

2.4 单杂质测定

2.4.1 杂质I限度确定:分别精密吸取“2.3.1”项下供试品溶液及杂质I对照品溶液(取杂质I对照品,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成3.5 μg/ml的溶液)注入色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算,杂质I的含量不得大于0.2%。

2.4.2 灵敏度试验:配制系列质量浓度的杂质I对照品溶液进样10 μl测定,以信噪比分别为3:1、10:1时的进样量确定检测限和定量限,结果分别为2.4、6.0 ng。

2.4.3 杂质I标准曲线的建立:取杂质I对照品加甲醇溶解

并定量稀释制成0.64、0.80、1.60、3.20、6.40 μg/ml的对照品溶液,分别注入色谱仪中,记录色谱图。以杂质I质量浓度为x、杂质I峰面积为y轴绘制标准曲线。结果表明,杂质I检测质量浓度线性范围为0.64~6.40 μg/ml,回归方程为 $y=0.0699x-0.0028$ ($r=0.9999$)。

2.4.4 精密性试验:取杂质I对照品溶液(3.20 μg/ml)进样5次,测得峰面积的RSD=2.1% (n=5)。

2.4.5 回收率试验:取样品50 mg(批号:20120824),精密称定,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。分别取此溶液10 ml共6份,各置于25 ml量瓶中,分别加杂质I对照品溶液(80 μg/ml)0.8、0.8、1.0、1.0、1.2、1.2 ml,用甲醇稀释至刻度。分别测定杂质I峰面积,计算回收率,结果平均回收率为98.6% (RSD=2.1%, n=2)。

2.5 专属性研究

2.5.1 粗品检测:取粗品(批号20120824精制前的样品),配制成1 mg/ml的溶液,进样,用二极管阵列检测器在200~500 nm下全波段检测,提取230 nm波长下的色谱图,观察杂质的分离情况。结果显示,主成分峰与相邻杂质、杂质与杂质峰之间都能完全分离,说明本文选择的色谱条件测定尼鲁米特的杂质方法可行,见图4A。

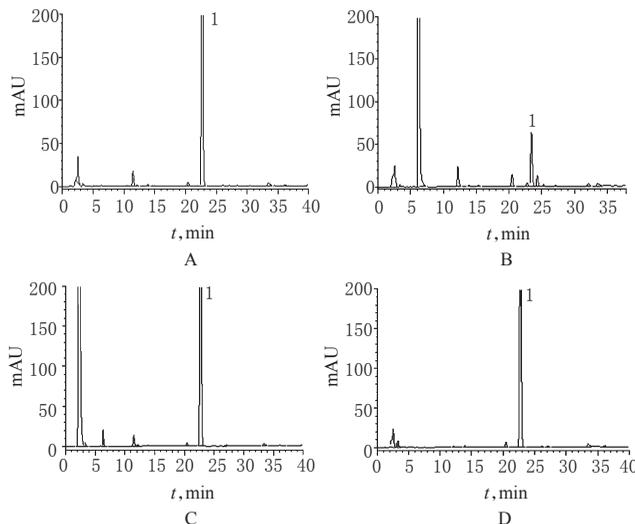


图4 专属性试验色谱图

A.粗品;B.碱降解样品;C.氧化降解样品;D.酸降解样品;1.尼鲁米特

Fig 4 Chromatograms of specificity test

A. crude sample; B. samples degraded by alkali; C. samples degraded by oxidation; D. samples degraded by acid; 1. nilutamide

2.5.2 降解产物的检出:取样品(批号:20120824)50 mg置于试管中,共3份,分别进行以下操作:①碱降解:加1 mol/L NaOH溶液1 ml,再加1 mol/L HCl溶液1 ml,即刻用甲醇定容至50 ml;②酸降解:加入5%硝酸于80 ℃水浴中放置30 min,用碱调至中性,用甲醇定容至50 ml;③氧化降解:加入3% H₂O₂ 1 ml,于80 ℃水浴中放置30 min,用甲醇定容至50 ml。取以上降解后溶液各进样10 μl,结果显示,碱破坏样品主成分峰基本消失,产生大量降解产物,见图4B;经氧化和酸降解产生了不同降解产物峰,各峰间能够完全分离,见图4C、D。另外,样品在粉末状态下经60 ℃高温试验后,未产生明显新的杂质(图略)。

2.6 主成分含量测定

2.6.1 色谱条件:除流动相为乙腈-2.0 g/L磷酸二氢钾溶液(pH 7.5) (40:60)及检测波长为267 nm外,其余条件均同

“2.3.2”项。

2.6.2 溶液的制备:取样品或对照品各50 mg,精密称定,加甲醇溶解并稀释至100 ml,即分别得供试品溶液和对照品溶液。

2.6.3 系统适用性试验:取供试品溶液注入色谱仪,记录色谱图。结果以主成分计理论板数为105 989,拖尾因子为1.077。取对照品溶液连续进样5次,主成分峰面积的RSD=0.2% ($n=5$)。

2.6.4 标准曲线的建立:取尼鲁米特对照品用甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.75、1.0、1.25 mg/ml的对照品溶液,分别进样,记录色谱图。以尼鲁米特质量浓度为(x)、峰面积为(y)轴绘制标准曲线。结果表明,尼鲁米特检测质量浓度线性范围为0.1~1.25 mg/ml,回归方程为 $y=201.99x-9.4981$ ($r=0.9996$)。

2.6.5 重复性试验:取样品(批号:20120824)50 mg,平行制备5份供试品溶液,另配制尼鲁米特对照品溶液(0.5 mg/ml)。测得本品含量的RSD=1.3% ($n=5$)。

2.6.6 精密度的试验:取供试品溶液(批号:20120824)进样5次,测得主成分峰面积的RSD=1.01% ($n=5$)。

2.6.7 耐用性试验:研究过程中,试用过3种色谱柱,即Diamonsil C₁₈、Eurospheer 100-5 C₁₈和WondaSil C₁₈-WR,三者规格均相同(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。以主成分峰与主成分峰左相邻杂质峰的分度度来考察,结果发现WondaSil C₁₈-WR为色谱柱时分度度最大(5.32),更适合本品的分析。在两台色谱仪上(美国Dionex UltiMate 3000 钛系统HPLC仪和德国Knauer HPLC仪)进行比对研究,结果表明两个厂家色谱仪在峰形和分度度方面的结果未见明显差别。

2.6.8 稳定性试验:取“2.6.6”项下的溶液,分别在0、0.5、1、2、4、6、8、10、20、24 h进样测定。结果含量的RSD=0.99% ($n=10$),杂质I的含量均为0,提示供试品溶液配制后在24 h内稳定。

2.6.9 回收率试验:取样品50 mg(批号:20120824),精密称定,置于50 ml量瓶中,平行6份,加甲醇溶解并稀释至刻度。分别取此溶液5 ml,各置于25 ml量瓶中,分别加尼鲁米特对照品溶液(1 mg/ml)4、4.5、5、6 ml,用甲醇稀释至刻度,测定峰面积,计算回收率。结果平均回收率为94.2% (RSD=0.57%, $n=2$)。

2.7 样品含量及有关物质测定

2.7.1 总杂质:取“2.3.1”项下供试品溶液和对照溶液a,按“2.3.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图至主成分峰保留时间的1.5倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,计算230 nm波长下总杂质峰面积的和。10批样品总杂质质量检测结果见表1。

2.7.2 杂质I:取“2.3.1”项下的供试品溶液和“2.4.1”项下杂质I对照品溶液进样分析,记录色谱图,按外标法以峰面积计算杂质I的含量。10批样品杂质I量检测结果见表1。

2.7.3 主成分:取“2.6.2”项下供试品溶液和对照品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,计算主成分的含量。10批样品主成分含量测定结果见表1。

3 讨论

前期试验中,笔者以主成分峰与杂质I峰分度度为考察指标,筛选并建立了杂质的分离体系:系统一、系统二均以Eurospheer 100-5 C₁₈为色谱柱,流动相梯度洗脱程序分别为:系统一(0~8 min, 45% A; 8~30 min, 45% A~70% A),系统二(0~5 min, 40% A; 5~30 min, 40% A~70% A),结果主成分峰与杂质I峰分度度分别为1.288、1.632;系统三、系统四分别以Di-

表1 10批样品含量及有关物质测定结果

Tab 1 Content determination of main component and related impurities in 10 batches of samples

| 批号 | 总杂质质量, % | 杂质 I 量, % | 主成分含量, % |
|-------------|----------|-----------|----------|
| 20121201 | <2.0 | 0 | 101.3 |
| 20120821-47 | >2.0 | 0 | 86.9 |
| 20121018 | <2.0 | 1.74 | 112.1 |
| 20120824 | <2.0 | 0 | 101.4 |
| 20120821-1 | <2.0 | 0 | 109.3 |
| 20120913 | <2.0 | 0 | 90.9 |
| 20120801 | >2.0 | 0.68 | 98.2 |
| 20120723 | <2.0 | 0.15 | 91.3 |
| 20120821-2 | >2.0 | 0 | 91.9 |
| 20120821-3 | >0.2 | 0 | 94.7 |

amonsil C₁₈和WondaSil C₁₈-WR为色谱柱,流动相梯度洗脱程序均为:0~5 min, 35% A; 5~40 min, 35% A~60% A,结果主成分峰与杂质I峰的分度度分别为2.418、5.320。由此确定系统四为最佳分离条件。

在笔者进行的对尼鲁米特有关物质的全面研究中,在本文建立的色谱条件下能够检测出样品(10批样品中杂质叠加)中杂质1、杂质2、杂质I(主峰左临杂质峰)、杂质3和杂质II(中间体)等。目前已归属和标识出10批样品中可能出现的杂质I(保留时间20.5 min)和杂质II(保留时间39 min);同时,规定杂质I的限度应小于0.2%,总杂质质量不得大于2.0%。后续研究将另文报道。

综上所述,本方法快速、简便、专属性强,能有效控制尼鲁米特原料药质量。

参考文献

- [1] Anon. Nilutamide approved for metastatic prostate cancer [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 1996, 53(23): 2784.
- [2] Sanofi-Aventis Canada Inc. *ANANDRON(nilutamide): product monograph*[S]. (2012-10-19)[2013-04-01]. http://www.drugfuture.com/fda/nda020169_002.html.
- [3] Wassim K, Simon T, Armen GA. Nilutamide as second line hormone therapy for prostate cancer after androgen ablation ablation fails[J]. *The Journal of Urology*, 2003, 169(5): 1742.
- [4] Dennis Bigg, Serge Auvin, Christophe Lanco, et al. *Imidazolidine-2, 4-dione derivatives and use thereof as a medicament*: USA, US20120095068 A1[P]. 2012-04-19.
- [5] Gregoire Prevost, Serge Auvin, Christophe Lanco, et al. *Imidazolidine-2, 4-dione derivatives, and use thereof as a cancer drug*: USA, US20120083514 A1[P]. 2012-04-05.
- [6] Andreas Kreipl, Nicolas Boege, Werner R. Thiel. *Method for coupling halogen-substituted aromatic compounds with organic compounds comprising trialkylsilyl-substituted heteroatoms*: USA, US20120142937 A1[P]. 2012-06-07.
- [7] Yehia Daaka, Chapel Hill, Jonathan S. Stamler. *Treating sex steroid responsive disorders*: USA, US20080025972 A1[P]. 2008-06-31.
- [8] Mare Diamod, Jeremy Jones, Adam Renslo. *Small-molecule inhibitors of the androgen receptor*: USA, US20080293766 A1[P]. 2008-11-27.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-06-05)