

HPLC 法测定替米沙坦中的有关物质

王春, 张素珍, 陶鸿珠, 彭亚, 赵斌锋*

(浙江金立源药业有限公司, 绍兴 312369)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定替米沙坦原料药中的有关物质。**方法:** 采用 Waters Symmetry Shield RP8 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 磷酸溶液 (用三乙胺调 pH 至 3.0) - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 230 nm。**结果:** 替米沙坦与 9 种已知杂质色谱峰之间的分离度均 > 1.5, 定量限均 < 40 ng · mL⁻¹, 检测限均 < 10 ng · mL⁻¹。替米沙坦及各杂质质量浓度在 30 ~ 600 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r > 0.9995$)。杂质 I ~ 杂质 IX 的平均回收率分别为 93.8%、99.8%、97.5%、99.2%、99.8%、98.3%、98.4%、99.2%、99.7%, RSD 均 < 2.0%。改变流速、柱温、波长、流动相比例及 pH 后, 对有关物质的检测结果无影响。3 批替米沙坦中最大单杂含量均为 0.02%, 杂质总量 < 0.10%。**结论:** 经方法学验证, 本方法专属性强, 灵敏、精密, 准确度高, 可用于替米沙坦原料药有关物质的测定。

关键词: 替米沙坦; 原料药; 有关物质; 药典标准; 质量控制; 高效液相色谱法; 梯度洗脱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024) 01 - 0126 - 08

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.01.13

Determination of related substances in telmisartan by HPLC

WANG Chun, ZHANG Su - zhen, TAO Hong - zhu, PENG Ya, ZHAO Bin - feng*

(Zhejiang Kinglyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 312369, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of the related substances in telmisartan.
Methods: Waters Symmetry Shield RP8 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column was adopted. The mobile phase A was 0.1% phosphoric acid solution (pH was adjusted to 3.0 with triethylamine), and the mobile phase B was acetonitrile. The gradient elution was performed. The flow rate, column temperature and wavelength were 0.8 mL · min⁻¹, 25 °C and 230 nm, respectively. **Results:** The resolutions between the peaks of telmisartan and nine known impurities were greater than 1.5. The limits of quantitation of all impurities were less than 40 ng · mL⁻¹, and the limits of detection of all impurities were less than 10 ng · mL⁻¹. The standard curves of telmisartan and its impurities were linear within the range 30 - 600 ng · mL⁻¹, and the correlation coefficients were all greater than 0.9995. The average recovery rates of impurities I - IX were 93.8%, 99.8%, 97.5%, 99.2%, 99.8%, 98.3%, 98.4%, 99.2% and 99.7%, respectively, and the RSDs of 9 results were all less than 2.0%. Changing the flow rate, column temperature, wavelength, mobile phase ratio and pH did not affect the detection results of the related substances. The results of maximum single impurity were 0.02% in three batches of telmisartan, and the results of total impurities were less than 0.10%. **Conclusion:** The method is highly specific, sensitive, precise and accurate, and can be used for the determination of related substances of telmisartan.

* 通信作者 Tel: (0575) 82738381; E - mail: zhj@kinglyuan.com

第一作者 Tel: (0575) 82738397; E - mail: jlywangchun@163.com

Keywords: telmisartan; active pharmaceutical ingredient; related substances; pharmacopoeia standard; quality control; HPLC; gradient elution

替米沙坦是一种强效、持久的非肽类血管紧张素 II 受体 (AT₁ 型) 拮抗剂, 用于成年人原发性高血压的治疗以及降低心血管风险^[1-2], 其结构区别于厄贝沙坦、坎地沙坦酯、奥美沙坦酯等其他沙坦类药物^[3-4], 未有四氮唑环结构, 避免了在制备过程中产生亚硝胺类杂质的风险^[5-6], 故近年来替米沙坦的市场份额也在逐年增加。

目前, 国内外药典标准均收录了替米沙坦, 但有关物质检测方法各异, 迄今为止均未有较大的修订, 已不能满足更高的检测需求。例如, 《中华人民共和国药典》(ChP 2020)^[7] 中的梯度洗脱不能将已知杂质全部有效分离, 系统适用性要求不合理等; 欧洲药典 (EP 10.0)^[8] 和美国药典 (USP 43)^[9] 不适用其他合成路线的替米沙坦有关物质检查, 方

法中的流动相和梯度洗脱容易引起基线波动等。本文替米沙坦的合成采用图 1 的路线, 主要杂质信息见表 1, 均为工艺杂质。杂质 I、II、III、VII (EP 10.0 替米沙坦杂质 E) 均是由起始原料 B 中杂质与起始原料 A 反应产生, 杂质 IV (EP 10.0 替米沙坦杂质 B) 是副反应产物, 杂质 V (EP 10.0 替米沙坦杂质 F) 和杂质 VI (EP 10.0 替米沙坦杂质 G) 均是由起始原料 A 中杂质与起始原料 B 反应产生, 杂质 VIII (EP 10.0 替米沙坦杂质 A) 是起始原料 B, 杂质 IX (EP 10.0 替米沙坦杂质 I) 是中间体。为了满足实际的检测需求, 本研究建立了 HPLC 法测定替米沙坦中的有关物质, 该法专属性强, 灵敏度和准确度高, 可有效、准确地检测本文替米沙坦中的杂质。

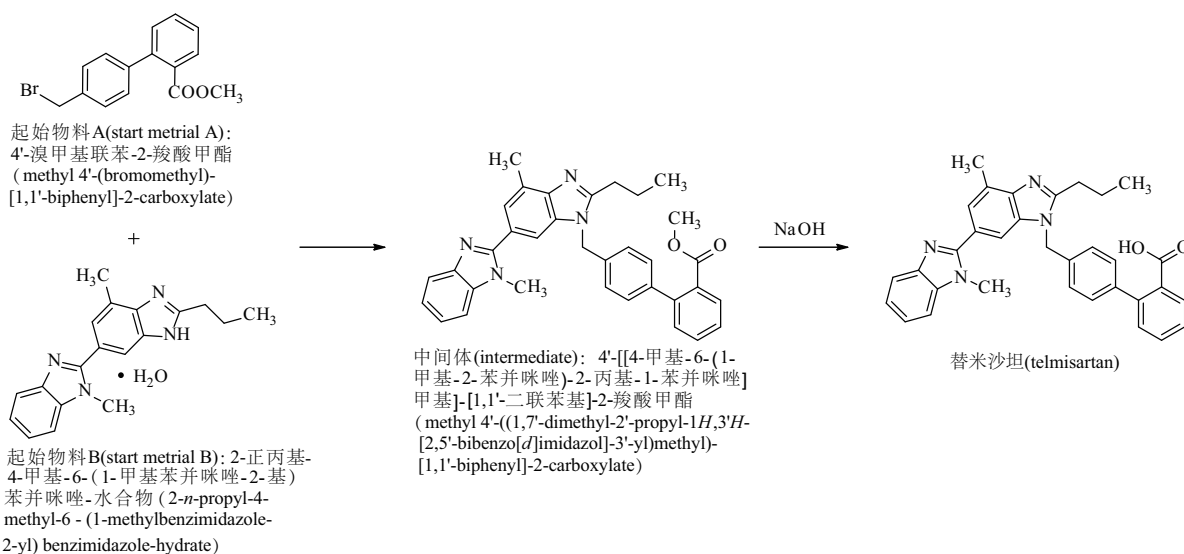


图 1 替米沙坦合成路线

Fig. 1 The synthetic route of telmisartan

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦公司 Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (配备 DAD、VWD 检测器); 梅特勒-托利多公司 XS205DU 型十万分之一电子天平; 上海仪电科学仪器股份有限公司 PHS-3C 型 pH 计。

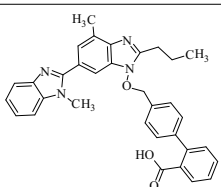
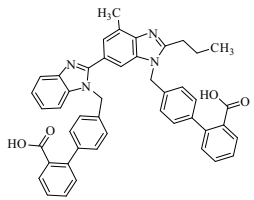
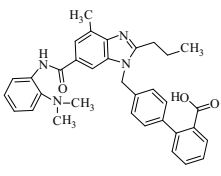
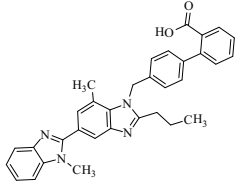
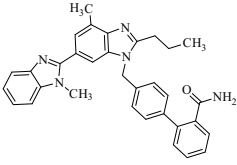
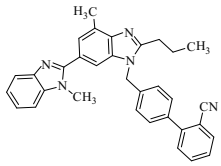
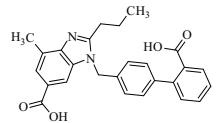
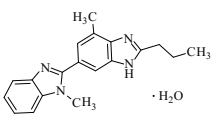
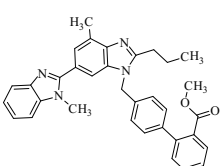
1.2 试剂

替米沙坦 (批号 20201101、20201102、20201103),

浙江金立源药业有限公司。对照品替米沙坦 (批号 100629-201803, 含量 99.9%), 中国食品药品检定研究院; 杂质 I (批号 20191201, 含量 96.1%)、杂质 II (批号 20191202, 含量 97.9%)、杂质 III (批号 20191201, 含量 96.6%)、杂质 IV (批号 20191201, 含量 97.8%)、杂质 V (批号 20191101, 含量 98.0%)、杂质 VI (批号 20191101, 含量 97.5%)、杂质 VII (批号 20191201, 含量 95.2%)、杂质 VIII (批号 20190901,

表 1 替米沙坦有关物质信息

Tab. 1 Information on the related substances of telmisartan

杂质名称 (impurity name)	化学结构 (structure)
杂质 I (impurity I)	
杂质 II (impurity II)	
杂质 III (impurity III)	
杂质 IV (impurity IV)	
杂质 V (impurity V)	
杂质 VI (impurity VI)	
杂质 VII (impurity VII)	
杂质 VIII (impurity VIII)	
杂质 IX (impurity IX)	

含量 91.6%)、杂质 IX (批号 20191201, 含量 99.4%)、4'-二溴甲基联苯-2-羧酸甲酯(批号

20181201, 含量 95.9%), 浙江金立源药业有限公司; 4'-溴甲基联苯-2-羧酸甲酯(批号 E1731062, 含量 98.0%), 阿拉丁试剂公司。乙腈为色谱纯, 购自上海星可高纯溶剂有限公司; 水为纯化水; 磷酸、三乙胺均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters SymmetryShield RP8 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 磷酸溶液 (用三乙胺调 pH 至 3.0) - 乙腈为流动相, 按表 2 程序进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 230 nm, 进样体积 10 μL。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 The gradient elution program

时间 (time)/min	流动相比例 (ratio of mobile phase) / %	
	流动相 A (mobile phase A)	流动相 B (mobile phase B)
0	80	20
3	80	20
30	50	50
40	20	80
50	20	80
50.1	80	20
60	80	20

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液 取本品 300 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇约 80 mL 与 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 100 μL 使溶解, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得供试品储备液。精密量取储备液 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 再精密量取 1 mL, 用甲醇稀释至 20 mL, 摇匀, 即得。

2.2.3 对照品储备溶液 取杂质 I 的对照品 30 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质 I 对照品储备溶液。同法制备杂质 II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX 的对照品储备溶液。取替米沙坦的对照品 30 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇约 80 mL 与 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 100 μL 使溶解, 用甲醇稀释至刻度,

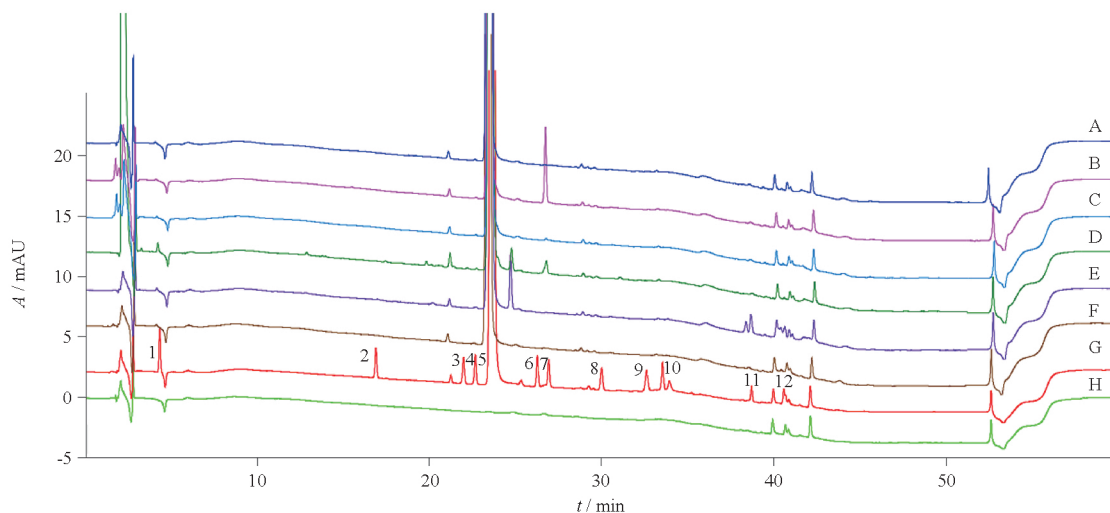
摇匀,精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得替米沙坦对照品储备溶液。

2.2.4 混合溶液 取本品 30 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇约 80 mL 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL 使溶解,再精密加入各杂质对照品储备溶液

1 mL,并用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 专属性试验

分别精密量取供试品溶液、混合溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图(见图 2)。各峰间的分离度均 >1.5 。



A. 未破坏溶液(undestroyed solution) B. 酸破坏溶液(destroyed solution by acid) C. 碱破坏溶液(destroyed solution by alkali) D. 氧化破坏溶液(destroyed solution by oxidation) E. 强光破坏溶液(destroyed solution by strong light) F. 高温破坏溶液(destroyed solution by heat) G. 混合溶液,1~12 分别为杂质Ⅷ、杂质Ⅴ、杂质Ⅶ、杂质Ⅳ、替米沙坦、杂质Ⅵ、杂质Ⅸ、杂质Ⅰ、杂质Ⅲ、杂质Ⅲ、methyl 4'-bromomethyl biphenyl-2-carboxylate and methyl 4'-(dibromomethyl)-2-biphenylcarboxylate, respectively) H. 空白溶剂(blank solvent)

图 2 专属性试验和强制降解试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of specificity test and forced degradation test

2.4 强制降解试验

(A) 未破坏溶液:精密量取供试品储备液 2 mL,用甲醇稀释至 20 mL,摇匀,即得;(B) 强酸破坏溶液:精密量取供试品储备液 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL,避光放置 24 h 后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和,再用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得;(C) 强碱破坏溶液:精密量取供试品储备液 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL,避光放置 24 h 后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和,再用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得;(D) 氧化破坏:精密量取供试品储备液 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加 3% 过氧化氢溶液 2 mL,避光放置 24 h 后用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得;(E) 强光破坏溶液:精密量取供试品储备液 5 mL,置透明玻璃皿中,置照度 6 000 lx、近紫外能量 $1.3 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 的光照仪中放置 48 h,将该溶液和用甲醇润洗皿的润洗液置 50 mL 量

瓶中,再用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得;(F) 高温破坏溶液:取本品适量,置称量瓶中,半敞口在 $130 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中放置 8 h,取出冷却至室温后精密称取 30 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇约 80 mL 与 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL 使溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。精密量取上述溶液各 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样分析。试验结果见表 3。

替米沙坦在酸条件下未产生新的未知杂质,杂质 IX 含量增大的原因是替米沙坦在酸性条件下与溶液中的甲醇发生酯化反应,并非自身降解产生,而在实际生产、贮存、运输、检测等过程中,替米沙坦同时接触酸和醇类试剂的可能性微乎其微;替米沙坦在碱和高温条件下有着优越的稳定性,为制剂的制备工艺提供了科学依据;替米沙坦在氧化和强光条件下有着不同程度的破坏,最大的降解杂质峰保留时间相同,可能为同一种物质,与主峰的分离度符合

表3 强制降解试验结果

Tab. 3 Results of forced degradation tests

化合物 (compound)	相对保留时间 (relative retention time)	有关物质含量(content of related substance)/%					
		未破坏 (undestroyed)	酸破坏 (destroyed by acid)B	碱破坏 (destroyed by alkali)	氧化破坏 (destroyed by oxidation)	强光破坏 (destroyed by strong light)	高温破坏 (destroyed by heat)
杂质Ⅷ(impurity Ⅷ)	0.17	0.007	0.006	0.006	0.006	0.01	0.007
杂质Ⅴ(impurity Ⅴ)	0.71	ND	ND	ND	ND	ND	ND
杂质Ⅶ(impurity Ⅶ)	0.93	ND	ND	ND	ND	ND	ND
杂质Ⅳ(impurity Ⅳ)	0.96	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005
替米沙坦(telmisartan)	1.0	99.93	99.65	99.92	99.67	99.71	99.93
降解杂质(degraded impurity)	1.05	ND	ND	ND	0.09	0.20	ND
杂质Ⅵ(impurity Ⅵ)	1.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
杂质Ⅸ(impurity Ⅸ)	1.14	ND	0.28	0.012	0.064	ND	ND
杂质Ⅰ(impurity Ⅰ)	1.27	0.007	0.007	0.007	0.008	0.008	0.007
杂质Ⅲ(impurity Ⅲ)	1.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND
杂质Ⅱ(impurity Ⅱ)	1.42	0.005	0.007	0.005	0.006	0.005	0.006
杂质总量(total impurities)	/	0.07	0.35	0.08	0.33	0.29	0.07
主峰纯度(peak purity)	/	999.44	999.39	999.40	998.58	999.53	999.41
主成分含量(content of major compound)	/	100.1	103.6	99.5	100.4	98.1	98.9

注(note):ND. 未检出(no detected); /. 不适用(not applicable)

要求。各破坏溶液主成分峰纯度均 > 998, 按外标法计算主成分含量, 结果均 > 98.0%, 说明破坏后物料质量守恒, 未产生与主峰重叠的降解杂质。

2.5 检测限和定量限试验

精密量取杂质Ⅷ对照品储备溶液 2.4 mL、替米沙坦和其他杂质对照品储备溶液各 1.5 mL, 用甲醇逐级稀释至 2×10^4 mL 体积, 摇匀, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 各化合物信噪比为 10, 替米沙坦、杂质Ⅰ、杂质Ⅱ、杂质Ⅲ、杂质Ⅳ、杂质Ⅴ、杂质Ⅵ、杂质Ⅶ、杂质Ⅷ、杂质Ⅸ 定量限分别为 22.75、21.55、22.13、21.90、22.38、22.20、22.08、21.54、33.12、22.72 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 精密量取稀释后的定量限溶液 3 mL, 用甲醇稀释 10 mL, 摇匀, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 各化合物信噪比为 3, 替米沙坦、杂质Ⅰ、杂质Ⅱ、杂质Ⅲ、杂质Ⅳ、杂质Ⅴ、杂质Ⅵ、杂质Ⅶ、杂质Ⅷ、杂质Ⅸ 检测限分别为 6.83、6.47、6.64、6.57、6.71、6.66、6.62、6.46、9.94、6.82 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明, 本方法测定替米沙坦及各杂质的灵敏度高, 能满足检测需求。

2.6 线性关系考察

精密量取对照品储备溶液各 5 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为线性储备溶液。分别精密量取线性储备溶液 4.0、3.4、2.4、2.0、1.6、

1.0 mL, 分别置 6 个 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得相对浓度 200%、170%、120%、100%、80%、50% 的线性溶液。精密量取 100% 线性溶液 1 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, 摇匀, 即得相对浓度 10% 的线性溶液。精密量取上述线性溶液各 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 采用最小二乘法以进样浓度对峰面积进行线性回归, 相对校正因子采用斜率比值法计算。试验结果见表 4, 各杂质约在定量限至 2 倍限度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均 > 0.999, 各杂质相对响应因子均在 1.0 ± 0.2 范围内。

2.7 准确度试验

精密量取杂质对照品储备溶液各 5 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质混合储备溶液。精密量取 1 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, 摇匀, 即得杂质对照品溶液。精密量取供试品储备溶液 10 份, 各 1 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 其中 1 份为本底溶液, 另外 9 份平均分成 3 组, 每组分别精密加入杂质混合储备溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得相对浓度 80%、100%、120% 的回收率溶液。精密量取上述溶液各 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 采用外标法计算各杂质的加样回收率。试验结果见表 5, 结果表明本法测定杂质的准确度高。

表4 线性试验结果

Tab. 4 Results of linearity tests

化合物 (compound)	线性范围 (linear range)/(ng · mL ⁻¹)	回归方程 (regression equation)	r	相对响应因子 (relative response factor)
杂质 I (impurity I)	29.04 ~ 580.90	$Y = 5.412 \times 10^{-2}X + 5.033 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.19
杂质 II (impurity II)	29.51 ~ 590.20	$Y = 5.788 \times 10^{-2}X + 0.747 2$	0.999 9	1.11
杂质 III (impurity III)	29.04 ~ 580.83	$Y = 6.238 \times 10^{-2}X + 0.402 9$	0.999 9	1.03
杂质 IV (impurity IV)	29.35 ~ 587.09	$Y = 6.197 \times 10^{-2}X + 1.135 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.04
杂质 V (impurity V)	29.70 ~ 593.95	$Y = 6.132 \times 10^{-2}X - 2.144 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.05
杂质 VI (impurity VI)	29.44 ~ 588.79	$Y = 7.007 \times 10^{-2}X + 3.866 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.92
杂质 VII (impurity VII)	28.77 ~ 575.45	$Y = 6.227 \times 10^{-2}X + 2.712 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.03
杂质 VIII (impurity VIII)	27.61 ~ 552.23	$Y = 7.652 \times 10^{-2}X + 0.270 8$	0.999 7	0.84
杂质 IX (impurity IX)	29.68 ~ 593.64	$Y = 6.072 \times 10^{-2}X + 7.412 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.06
替米沙坦 (telmisartan)	29.78 ~ 595.60	$Y = 6.418 \times 10^{-2}X + 1.483$	0.999 7	1.00

表5 杂质回收率

Tab. 5 The recovery of impurities

化合物 (compound)	平均回收率 (average recovery)/% (n = 3)			RSD/ %
	80% 回收率溶液 (80% recovery solution)	100% 回收率溶液 (100% recovery solution)	120% 回收率溶液 (120% recovery solution)	
杂质 I (impurity I)	94.1	94.3	93.1	1.0
杂质 II (impurity II)	99.5	100.2	99.6	0.45
杂质 III (impurity III)	96.7	97.5	97.8	0.69
杂质 IV (impurity IV)	99.0	99.4	99.3	0.30
杂质 V (impurity V)	98.8	100.2	100.4	1.0
杂质 VI (impurity VI)	97.6	98.5	98.9	0.72
杂质 VII (impurity VII)	98.0	98.6	98.6	0.49
杂质 VIII (impurity VIII)	99.6	100.3	97.6	1.6
杂质 IX (impurity IX)	100.8	100.8	97.5	1.7

2.8 精密度试验

2.8.1 重复性 取同批次(20201101)替米沙坦适量,按“2.2.1”项下方法配制6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,按面积归一化法计算杂质含量。结果杂质 I、II、IV 的平均含量分别为 0.007%、0.008%、0.004%,RSD 依次为 5.5%、5.5%、2.7%;6 份溶液中杂质 III、V、VI、VII、VIII、IX 均未检出;其他最大杂质平均为 0.03%,杂质总和平均为 0.07%,RSD 依次为 2.0%、2.6%。结果表明,本方法重复性良好。

2.8.2 中间精密度 由另一实验人员在不同日期配制6份供试品溶液,注入另一高效液相色谱仪(Agilent 1260型,VWD检测器)中,记录色谱图。结果杂质 I、II、IV 的平均含量分别为 0.008%、0.007%、0.004%,RSD 依次为 5.0%、4.5%、5.7%;

6 份溶液中杂质 III、V、VI、VII、VIII、IX 均未检出;其他最大杂质平均为 0.03%,杂质总和平均为 0.07%,RSD 依次为 2.3%、1.2%。与重复性试验测得的6组数据合并后,12 份杂质 I、II、IV 以及其他最大杂质和总杂含量结果的 RSD 依次为 11%、8.8%、6.4%、2.2%、1.9%,说明该方法中间精密度良好。

2.9 溶液稳定性试验

制得供试品溶液后立即在“2.1”项色谱条件下进样测定,按 0 h 计,供试品溶液再在室温下放置 1、2、4、8、12、16、20 h 后再次注入液相色谱仪,考察杂质峰面积的变化。结果最大单一杂质平均含量为 0.03%,平均峰面积为 5.594,RSD 分别为 1.6%、2.1%;杂质总量平均为 0.08%,杂质峰面积和的平均值为 15.49,RSD 分别为 1.3%、2.1%,结果说明替米沙坦及其杂质在溶液中稳定性良好。

2.10 耐用性试验

取“2.7”项下相对浓度 100% 的回收率溶液作为耐用性供试溶液,考察不同流速(0.75、0.8、0.85 mL·min⁻¹)、不同柱温(24、25、26 °C)、不同波长(229、230、231 nm)、不同初始流动相比比例(81:19、80:20、79:21)及不同流动相 pH(2.95、3.0、3.05)对杂质测定结果的影响。结果表明,不同色谱条件下各杂质含量一致,各峰间的分离度均 > 1.5,本方法耐用性良好。

2.11 样品测定

取杂质对照品溶液、对照溶液、3 批供试品溶液各 10 μL,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用外标法计算已知杂质含量,采用主成分自身对照法计算未知杂质含量,结果见表 6。

表 6 样品测定结果

Tab. 6 Results of sample tests

化合物 (compound)	有关物质含量 (content of related substance)/%		
	lot No.	lot No.	lot No.
	20201101	20201102	20201103
杂质 I (impurity I)	0.01	ND	ND
杂质 II (impurity II)	0.007	0.006	ND
杂质 III (impurity III)	ND	ND	ND
杂质 IV (impurity IV)	0.004	0.005	0.003
杂质 V (impurity V)	ND	ND	ND
杂质 VI (impurity VI)	ND	ND	ND
杂质 VII (impurity VII)	ND	ND	ND
杂质 VIII (impurity VIII)	0.004	0.004	0.005
杂质 IX (impurity IX)	ND	ND	ND
其他单杂 (other individual impurity)	0.02	0.02	0.02
杂质总和 (total impurities)	0.06	0.04	0.03

注 (note): ND. 未检出 (no detected)

3 讨论

3.1 与药典方法的比较

ChP 2020^[7]、EP 10.0^[8]或 USP 43^[9]中替米沙坦有关物质检测方法均不能有效分离本品中所有的已知杂质,3 种方法与本方法有着明显的差异,除检测波长一致外,其他如溶液浓度、色谱柱、流动相、流速、杂质限度等均不一致。本方法中供试品溶液质量浓度为 0.3 mg·mL⁻¹,进样体积为 10 μL,在保证杂质有效检出的前提下使主成分在色谱柱中不过

载,而 ChP 2020 中的供试品溶液质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹,进样体积为 20 μL,主成分在色谱柱中已达过载状态,导致主峰较宽,容易包裹杂质峰。本方法选用的色谱柱为 Waters Symmetry Shield RP8 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm),该色谱柱的填料异于普通填料,是在靠近硅胶表面内嵌极性基团,减少了填料表面硅醇基活性,从而减少分析物与硅醇基的相互作用,在 pH 2 ~ 8 范围内使峰形与分离度显著改善;其他药典方法选用的色谱柱填料均为十八烷基硅烷键合硅胶,在分离度和峰拖尾方面不及本法选用的色谱柱,如 ChP 2020^[7]方法中规定替米沙坦峰拖尾因子不大于 2.0,USP 43^[9]方法中规定替米沙坦峰拖尾因子应在 0.9 ~ 1.5,而在耐用性试验下采用本方法所测替米沙坦峰拖尾因子在 0.94 ~ 1.06。EP 10.0^[8]和 USP 43^[9]色谱条件基本一致,流动相中含有离子对试剂——戊烷磺酸钠,配制不便,运行时可能会出现基线波动,不利于检测,而本方法中流动相基本不含缓冲盐,配制简便,溶剂峰不干扰主峰及各杂质峰的测定。根据实际控制要求,规定本品中单个杂质不得过 0.10%,杂质总量不得过 0.3%,限度相较于各药典中的杂质限度更严格。

3.2 流动相 pH 的选择

流动相 pH 是色谱条件中的关键参数。EP 10.0^[8]和 USP 43^[9]方法中的流动相 pH 均为 3.0,ChP 2020^[7]方法中的流动相 pH 为 5.0。经考察发现流动相 pH 的大小对替米沙坦峰有着较为明显的影响,当 pH 不小于 3.10 时,杂质 IV 峰与替米沙坦峰间的分离度约 > 5.0,但替米沙坦峰发生前延,拖尾因子 < 0.9;当 pH 不大于 2.90 时,杂质 IV 峰与替米沙坦峰间的分离度 < 1.5,替米沙坦峰发生拖尾,拖尾因子 > 1.1。本方法中流动相 pH 为 3.0,替米沙坦峰拖尾因子约为 1.0,与杂质 IV 峰间的分离度约为 3.0,为了有效检测本品中的有关物质,在系统适用性要求中规定替米沙坦峰拖尾因子应为 0.9 ~ 1.1,与杂质 IV 峰间的分离度应 > 2.0。

3.3 潜在的杂质分析

本品合成路线中的起始原料 A 即是 ChP 2020^[7]中的替米沙坦杂质 I,该原料中主要杂质为 4'-二溴甲基联苯-2-羧酸甲酯(起始原料 A 杂质 I),其化学结构中均含卤代烷烃的警示结构^[10],其中起始原料 A 经查询 Ames 试验结果呈阳性^[11]。参考 ICH M7^[12]中的方法 4 和文献 [13] 中的方法可推算杂质

的清除因子,结果残留至本品中的量远低于安全限度。为了更加具体证明清除效果,进行了杂质清除试验,在中间体中添加远超实际水平的起始原料 A (约 1.5%) 和其杂质 I (1.0%),并在实验室规模下按照本品工艺连续制备 6 批替米沙坦,结果 6 批产品中均未检出,与推算的清除效果一致。在制备本品最后一步反应中,体系中共投入了 3 次液碱,每一次的强碱都能轻易破坏卤烷烃结构^[14],在此又简单模拟了工艺过程,在杂质溶液中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液,并置 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中,结果在 1 h 内,起始原料 A 和其杂质 I 均完全被破坏,变成了极性相对较大且容易去除的无警示结构物质。起始原料 A 及其杂质 I 在本品中的痕量检测采用的是 UPLC-MS/MS 法^[15],结果在本公司生产的替米沙坦粗品及成品中均未检出,说明清除效果好,工艺中第 1 次投入的液碱即可完全破坏起始原料 A 和其杂质 I 杂质,保障替米沙坦质量可控性和安全性。

4 结论

替米沙坦的国内外合成路线基本相似^[16],不同的可能是起始原料 A 结构,如 4'-溴甲基联苯-2-羧酸叔丁酯也可作为合成替米沙坦的起始原料,该物质与起始原料 A 性质相似,在替米沙坦中检出的可能性也较低,故本方法也适用于该路线生产的替米沙坦有关物质检查。相比于各药典方法,本方法在基线波动、分离效果、峰拖尾方面更优,且灵敏度高、精密度好、准确度高,弥补了药典方法的不足之处,降低了杂质控制风险。

参考文献

- [1] WIENE W, ENTZEROTH M, VAN MEEL JCA, *et al.* A review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist[J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2000, 18(2): 127
- [2] GALZERANO D, CAPOGROSSO C, MICHELE SD, *et al.* New standards in hypertension and cardiovascular risk management: focus on telmisartan[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2010, 6: 113
- [3] 蔡鹏俊,李悦. 几种沙坦类药物的杂质谱研究现状[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(3): 377
CAI PJ, LI Y. Research progress of sartans' impurity profile[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(3): 377
- [4] 高迎香,庄红林,李香梅. 沙坦类药物的发展及市场状况[J]. *河北化工*, 2011, 34(3): 39
GAO YX, ZHUANG HL, LI XM. Development and market analy-
- sis of sartans[J]. *Hebei Chem Ind*, 2011, 34(3): 39
- [5] 叶倩,耿兴超,张河战,等. 亚硝胺类遗传毒性杂质的监管策略及思考[J]. *中国药事*, 2021, 35(2): 127
YE Q, GENG XC, ZHANG HZ, *et al.* Regulatory strategies and reflections on genotoxic impurities of nitrosamines[J]. *Chin Pharm Aff*, 2021, 35(2): 127
- [6] 于颖洁. 药物中 N-亚硝胺类杂质的检测方法研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2021
YU YJ. Research on Detection Method of Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals[D]. Beijing: National Institutes for Food and Drug Control, 2021
- [7] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1498
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1498
- [8] EP 10.0. Vol III [S]. 2019: 3970
- [9] USP 43. Telmisartan[DB/OL]. [2020-10-26]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUIG-BB230797-5FC3-4AC2-85DB-22B318AA7589_4_en-US
- [10] BENIGNI R, BOSSA C, JELIAZKOVA N, *et al.* The Benigni/Bossa rulebase for Mutagenicity and Carcinogenicity—A Module of toxtree[R]. Italy: European Commission, 2008
- [11] European Chemicals Agency. [1,1'-Biphenyl]-2-Carboxylic Acid, 4'-(Bromomethyl)-, Methyl Ester[DB/OL]. [2020-08-14]. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16522/7/7/2>
- [12] ICH M7 (R1): Assessment and Control of and Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk[S]. 2017
- [13] TEASDALE A, ELDER D, CHANG SJ, *et al.* Risk assessment of genotoxic impurities in new chemical entities: strategies to demonstrate control [J]. *Org Process Res Dev*, 2013, 17(2): 221
- [14] 杨芬,张永伍. 卤代烃亲核取代和消除反应影响因素教学思考[J]. *广州化工*, 2013, 41(5): 206
YANG F, ZHANG YW. Teaching reflection of factors affecting the nucleophilic substitution reactions and elimination reactions of alkyl halides[J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2013, 41(5): 206
- [15] 王春,陶鸿珠,赵斌锋,等. 一种采用液质联用仪检测替米沙坦中溴代烷烃类遗传毒性杂质的方法: 中国, 202210644288.0[P]. 2022-07-29
WANG C, TAO HZ, ZHAO BF, *et al.* A Method for Detecting Bromoalkanes Genotoxic Impurities in Telmisartan by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: China, 202210644288.0[P]. 2022-07-29
- [16] 李维思,黄双,曹亚运. 替米沙坦合成工艺研究进展[J]. *广州化工*, 2022, 50(18): 32
LI WS, HUANG S, CAO YY. Research progress on synthesis of telmisartan[J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2022, 50(18): 32

(本文于 2023 年 2 月 13 日收到)