

培哌普利叔丁胺中差向异构体分离测定方法研究

周怡¹, 金薇^{2,3}, 杨永健^{2,3*}

(1. 国家药典委员会, 北京 100061; 2. 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203;

3. 国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室, 上海 201203)

摘要 目的: 建立一种快速液相色谱方法分离培哌普利叔丁胺及(±)-1''-差向-培哌普利叔丁胺(差向异构体), 并对该差向异构体进行测定。**方法:** 采用 Agilent Poroshell CS - C₁₈ (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以 0.15% 庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节 pH 2.0) - 乙腈/戊醇(217:3)(82:18) 为流动相, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 50 °C, 进样量 2 μL, 在 215 nm 波长处分离培哌普利及(±)-1''-差向-培哌普利。结果: 培哌普利及(±)-1''-差向-培哌普利在 25 min 内依次出峰, 峰谷比和分离度满足测定要求。培哌普利叔丁胺及其差向异构体均在 2~2 000 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r > 0.999$), 定量限(S/N 约 10) 和检测限(S/N 约 3) 均分别约为 1.0 μg · mL⁻¹ 和 0.3 μg · mL⁻¹。差向异构体低、中、高 3 个浓度的平均加样回收率为 97.2% (RSD = 1.8%, $n = 9$)。10 批样品中(±)-1''-差向-培哌普利叔丁胺含量均在 0.025%~0.078%。**结论:** 建立的培哌普利叔丁胺中(±)-1''-差向-培哌普利叔丁胺的液相色谱测定方法, 与现行药典收载色谱方法相比可极大缩短平衡与分离时间, 提高分离效率和检测灵敏度, 重现性好, 可有效用于培哌普利叔丁胺的生产质量控制。

关键词: 培哌普利叔丁胺; (±)-1''-差向-培哌普利叔丁胺; 差向异构体; 高效液相色谱; 异构体分离; 杂质测定; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)04 - 0721 - 08

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.04.19

Separation of perindopril tert - butylamine and (±) - 1'' epi - perindopril by high performance liquid chromatography

ZHOU Yi¹, JIN Wei^{2,3}, YANG Yong - jian^{2,3*}

(1. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

3. National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for the separation of perindopril tert - butylamine and its epimer [(±) - 1'' - epi - perindopril tert - butylamine] and the determination of the epimer. **Methods:** Perindopril and (±) - 1'' - epi - perindopril were separated on an Agilent Poroshell CS - C₁₈ column (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) maintained at 50 °C with the mobile phase containing a mixture of 0.15% sodium heptanesulfonate solution (adjusted to pH 2.0 with phosphoric acid) and acetonitrile - pentanol (217:3)(82:18, V/V) at 0.8 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was set at 215 nm. The injection volume was 2 μL.

* 通信作者 Tel:(021)38839900 - 26302; E - mail:yongjianyang@163.com

第一作者 Tel:(010)67079556; E - mail:zhouyi@chp.org.cn

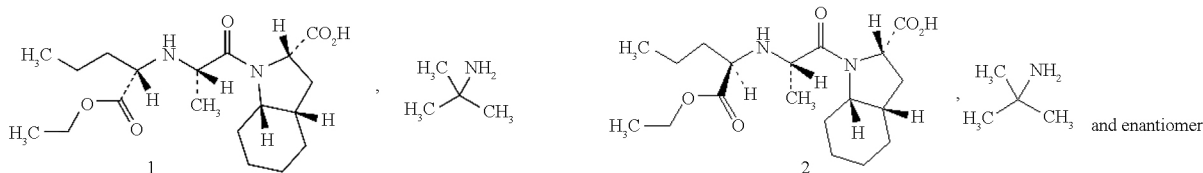
Results: $(\pm) - 1'' - epi - perindopril$ and perindopril were separated successfully in 25 min with peak to valley ratio more than 3.0 or a resolution factor of 1.7. Good linear relationships were established between the peak response and the concentration in the range of 2 – 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for the epimer and perindopril tert – butylamine ($r > 0.999$). The quantitative limits ($S/N = 10$) were both about $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the detection limits ($S/N = 3$) were both $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The spiked recovery of the epimer was 97.2% ($RSD = 1.8\%$, $n = 9$). The content of $(\pm) - 1'' - epi - perindopril$ tert – butylamine in 10 batches of samples ranged from 0.025% to 0.078%. **Conclusion:** The proposed method enhances the resolution efficiency, shows high accuracy, repeatability and stability. It can be effectively employed for the quality control of perindopril tert – butylamine.

Keywords: perindopril tert – butylamine; $(\pm) - 1'' - epi - perindopril$ tert – butylamine; epimer; HPLC; stereoisomer separation; impurity determination; quality control

培哌普利叔丁胺是一种不含巯基的长效血管紧张素转换酶抑制剂,用于治疗高血压和充血性心衰,临床疗效佳,安全性高,副作用小。培哌普利叔丁胺为手性化合物,具有5个手性中心。5个手性中心的碳原子均为S构型^[1-2]。分子结构式详见图1。原研企业为法国施维雅(LES LABORATOIRES SERVI-ER)。国内有上药东英(江苏)药业有限公司、浙江美诺华药物化学有限公司、江苏永达药业有限公司等原料供应商。

《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)、欧洲药典(EP)和英国药典(BP)均收录了培哌普利叔丁胺,均需要对包括对映异构体和非对映异构体在内的一系列立体异构体进行质量控制,难度较大。2020年版《中国药典》、EP11和BP2023的色谱条件一致,

均采用HPLC等度洗脱,培哌普利峰的保留时间约为100 min,分析时间约为150 min^[3-5],此外,EP11版和BP2023还要求色谱系统至少平衡4 h。由于分离难度大,系统适用性要求差向异构体杂质峰的峰高和该异构体与主成分峰之间的峰谷比(peak to valley ratio)应 >3 。目前培哌普利质量控制方面的文献集中在溶出度、有关物质检查和含量测定^[6-14],而包括差向异构体在内的异构体方面的研究报道^[15]很少。为克服现有立体异构体杂质检测方法存在的分析时间长,分离难度大,系统稳定性差等不足,本研究开发了一种适用于碱性化合物分析的基于表面带正电荷的杂化颗粒小粒径十八烷基硅烷键合表面多孔型硅胶色谱柱的液相色谱紫外检测方法,该方法分离时间短,分离良好,系统稳定,具有实际应用价值。



1. 培哌普利叔丁胺(perindopril tert – butylamine) 2. $(\pm) - 1'' - 差向 - 培哌普利叔丁胺 [(\pm) - 1'' - epi - perindopril$ tert – butylamine]

图1 培哌普利叔丁胺及其差向异构体结构式

Fig. 1 Chemical structures of perindopril tert – butylamine and its epimer

1 仪器和试剂

Agilent 1260 液相色谱仪,紫外检测器; Agilent 1290 液相色谱仪,二极管阵列检测器; Agilent OpenLAB CDS v2.6 计算机化系统(安捷伦科技公司)。Waters Acquity Arc 液相色谱仪,Empower 3 数据库系统(沃特斯公司)。BP211D 型十万分之一精密天平(Sartorius公司)。Bluepard DHG – 9140A 型电热鼓

风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), Binder KBF 240 恒温恒湿箱(Binder公司), STARITECH 光照箱(北京天星科仪科技有限公司)。Labonova Ultra Pro 超纯水系统(Think – Lab公司)。

立体异构体检查用培哌普利叔丁胺对照品(含0.1%的 $(\pm) - 1'' - 差向 - 培哌普利叔丁胺$),批号2.1,由EDQM提供。差向异构体 $[(\pm) - 1'' - 差$

向-培哌普利叔丁胺]对照品,批号 C4X-12521-1807,纯度 90.8%,由 CATO 提供。培哌普利叔丁胺对照品,批号 101072-201902,纯度 99.3%,由中国食品药品检定研究院提供。

培哌普利叔丁胺原料药 7 批,批号分别为 802008401、801700531、801609823、801700518 (Glenmark Pharmaceuticals Limited 公司) 和 DY-PDP-2020036、DY-PDP-2020037、DY-PDP-2020038 (上药东英(江苏)药业有限公司)。培哌普利叔丁胺原料药粗品 3 批,批号分别为 DY-7-23-2020021、DY-7-23-2020024、DY-7-23-2020025 (上药东英(江苏)药业有限公司)。

乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇(色谱纯,默克公司)。庚烷磺酸钠(色谱纯,东京化成公司)。戊醇、磷酸、高氯酸、盐酸、冰醋酸(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Poroshell CS-C₁₈ (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱,以 0.15% 庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节 pH 2.0)-乙腈/戊醇(217:3)(82:18) 为流动相,流速 0.8 mL · min⁻¹,柱温 50 °C,检测波长 215 nm,进样量 2 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 称取立体异构体检查用

培哌普利叔丁胺对照品(含 0.1% 的(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺)适量,或者分别称取培哌普利叔丁胺与(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺的对照品适量,加乙醇适量溶解并稀释制成每 1 mL 含培哌普利叔丁胺 2 mg 和(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺 2 μg 的溶液。

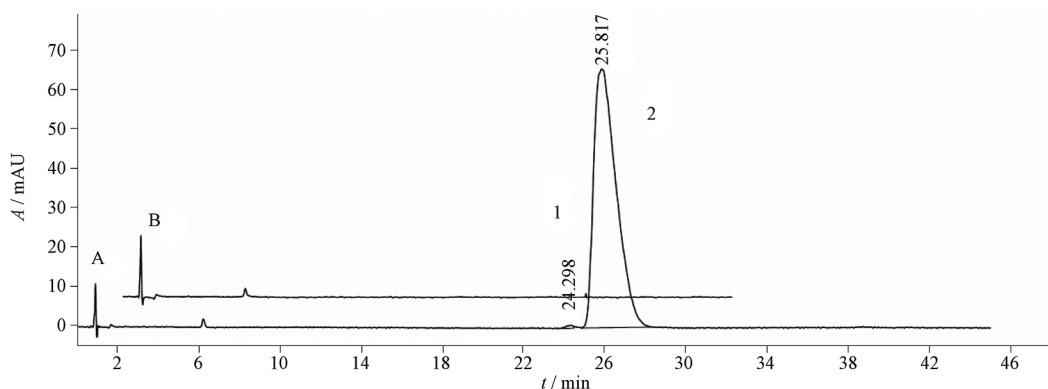
2.2.2 差向异构体对照品储备液 取(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺对照品适量,精密称定,加乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 2 mg 的差向异构体对照品储备液。

2.2.3 混合对照品储备液 分别取培哌普利叔丁胺和(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺的对照品适量,精密称定,加乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含培哌普利叔丁胺和(±)-1"-差向-培哌普利叔丁胺各约 2 mg 的混合对照品储备液。

2.2.4 供试品溶液 取培哌普利叔丁胺原料药或粗品约 20 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,制得每 1 mL 约为 2 mg 的供试品溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

取系统适用性溶液和空白溶液(乙醇)分别进样 2 μL,典型色谱图见图 2,(±)-1"-差向-培哌普利与培哌普利在 Agilent 1260、Agilent 1290 上的峰谷比分别为 4.89 和 6.18,满足峰谷比 > 3 的分离度要求。在 Waters Acquity Arc 上的分离度为 1.71,可实现基线分离。空白乙醇对分离检测无干扰。



1. (±)-1"-差向-培哌普利[(±)-1"-*epi*-perindopril] 2. 培哌普利(perindopril)

图 2 系统适用性溶液(A)和空白溶液(B)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of system suitability solution (A) and blank solution (B)

2.4 线性关系考察与定量限、检测限测定

分别精密量取混合对照品储备液适量,用乙醇定量稀释成含差向异构体和含培哌普利叔丁胺质

量浓度为 2、10、20、40、100、400、1 000 和 2 000 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。照“2.1”项色谱条件测定,以浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,分

别进行线性回归。差向异构体和培哌普利叔丁胺质量浓度在 $2 \sim 2\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内的线性回归方程分别为

$$Y = 1.929\,6X - 4.434\,5 \quad r = 1.000\,0 \quad (n = 8)$$

$$Y = 1.932\,7X - 2.229\,0 \quad r = 1.000\,0 \quad (n = 8)$$

差向异构体和培哌普利叔丁胺质量浓度在 $2 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内的线性回归方程分别为

$$Y = 1.821\,3X - 0.046\,3 \quad r = 1.000\,0 \quad (n = 5)$$

$$Y = 1.857\,5X + 0.267\,0 \quad r = 0.999\,8 \quad (n = 5)$$

由上述差向异构体线性回归方程斜率/培哌普利叔丁胺线性回归方程线斜率, 计算得到差向异构体的相对响应因子 (F) 分别为 1.00 和 0.98。此外, 根据二者低、中、高浓度对照品溶液的相对响应值, 计算得到 F 平均值为 0.99。2 种计算得到的一致, 可以采用峰面积归一化方法进行定量。

将混合对照品储备液用乙醇逐步稀释后进样, 得到差向异构体和培哌普利叔丁胺的定量限 (S/N 约为 10) 为 0.9 和 $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于供试品溶液浓度的 0.045% 和 0.06%), 检测限 (S/N 约为 3) 均为 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于供试品溶液浓度的 0.015%)。

2.5 精密度试验

分别取“2.4”项下差向异构体和培哌普利叔丁胺均分别为 2 、 10 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 各连续进样 6 次, 差向异构体低、中、高浓度的 (\pm) -1” - 差向 - 培哌普利峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 5.5% 、 4.2% 和 1.4% , 培哌普利叔丁胺低、中、高浓度的培哌普利峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 5.9% 、 5.4% 和 2.5% 。

精密称取样品 (批号 802008401) 6 份, 按“2.2.4”项方法制备供试品溶液, 进行测定, 按照峰面积外标法和归一化法计算, 差向异构体含量 ($n = 6$) 分别为 0.044% 和 0.042% , 均略小于定量限 (0.045%), 不再考察样品测定重复性。

2.6 回收率试验

取原料 (批号 802008401) 9 份各 6 mg , 精密称定, 分别精密加入 2 、 10 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度水平的差向异构体对照品溶液 3 mL , 每个浓度各 3 份, 定量溶解制成每 1 mL 含培哌普利叔丁胺 2 mg 和差向异构体 1.88 、 9.39 和 $18.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的回收率试验溶液, 进样测定。按外标法计算回收率, 结果见表 1。低、中、高 3 个浓度的平均加样回收率 ($n = 9$) 为 97.2% , RSD 为 1.8% 。

表 1 差向异构体的回收率测定

Tab. 1 Recovery of (\pm) -1” - *epi* - perindopril tert - butylamine in perindopril tert - butylamine crude drug

编号 (No.)	测得量 (detected)/mg	标准加入量 (spiked)/mg	本底量 (original)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
R1	0.008 0	0.005 6	0.002 5	97.0	97.8	0.87
R2	0.008 1	0.005 6	0.002 5	97.8		
R3	0.008 1	0.005 6	0.002 6	98.7		
R4	0.029 2	0.028 2	0.002 5	94.6	96.5	3.2
R5	0.029 3	0.028 2	0.002 6	94.9		
R6	0.030 7	0.028 2	0.002 5	100.0		
R7	0.057 2	0.056 3	0.002 6	96.9	97.3	0.76
R8	0.057 1	0.056 3	0.002 6	96.8		
R9	0.057 8	0.056 3	0.002 6	98.1		
平均值 (average)/%				97.2		
RSD/%				1.8		

2.7 稳定性试验

考虑到乙醇溶液的挥发性, 分别取“2.6”项下低、中、高浓度回收率试验溶液, 在 $12 \text{ }^\circ\text{C}$ 控温进样器中放置, 分别在放置后 0、31 和 55 h 各进样 $2 \mu\text{L}$,

低、中、高浓度回收率试验溶液的 (\pm) -1” - 差向 - 培哌普利峰面积的 RSD ($n = 9$) 分别为 9.4% 、 3.4% 和 1.2% , 在 $12 \text{ }^\circ\text{C}$ 控温进样器中连续放置 55 h 稳定性较好。

2.8 耐用性试验

按照“2.1”项下色谱条件,分别对有机相比例、柱

温和流速进行小的变动,考察 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 差向异构体的回收率试验溶液不受影响的承受程度。结果见表 2。

表 2 方法耐用性试验结果 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 差向异构体回收率试验溶液)Tab. 2 Method robustness in spiked solution containing $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of (±)-1"-epi-perindopril tert-butylamine

色谱条件 (chromatography condition)	差向异构体含量 (content of epimer)/%	峰谷比 (peak to valley ratio)	分离度 (resolution)
流速(flow rate)/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	0.7	0.49	6.46
	0.8	0.50	两峰分开(separated peaks)
	0.9	0.46	8.42
有机相比例(ratio of organic phase)/%	17	0.46	两峰分开(separated peaks)
	18	0.50	两峰分开(separated peaks)
	19	0.48	2.59
柱温(column temperature)/ $^{\circ}\text{C}$	48	0.54	3.24
	50	0.50	两峰分开(separated peaks)
	52	0.49	8.95

略微改变柱温、流速和有机相比例,差向异构体峰面积归一化法测得结果无明显差异,系统适用性分离满足要求。改变流动相中有机相比例对分离影响较大,建议流动相中有机相仅在 17% 和 18% 的比例之间调整。

2.9 样品测定

取供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行检测,样品的典型色谱图见图 3,按照外标法和归一化法计算,10 批样品中差向异构体含量均在 0.025%~0.078%,测定结果如表 3。2 种计算结果基本一致。

表 3 样品中差向异构体的测定结果

Tab. 3 Contents of (±)-1"-epi-perindopril tert-butylamine in perindopril crude drug

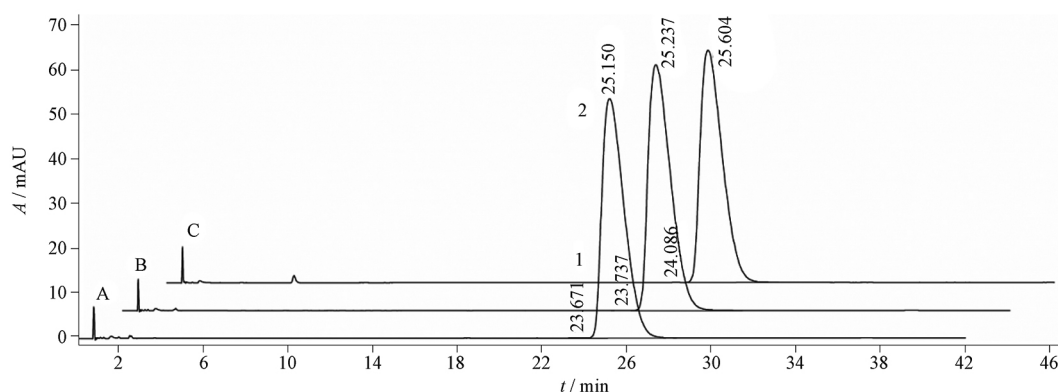
批号 (batch No.)	外标法结果 (content, external standard)/%	归一化法结果 (content, normalization)/%
802008401	0.044	0.042
801700531	0.026	0.025
801609823	0.041	0.040
801700518	0.043	0.041
DY-PDP-2020036	0.073	0.071
DY-PDP-2020037	0.050	0.049
DY-PDP-2020038	0.078	0.075
DY-7-23-2020021	0.054	0.052
DY-7-23-2020024	0.060	0.057
DY-7-23-2020025	0.058	0.055

3 讨论

3.1 色谱条件的优化与建立

3.1.1 固定相对分离度的影响 本研究以 0.15% 庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节 pH 2.0)-乙腈/戊醇(217:3)(75~82:25~18)为初筛流动相,流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 50°C ,取系统适用性溶液 $2 \mu\text{L}$ 进样,在 Poroshell HPH-C₁₈(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱上基本无分离,在 Pursuit XRs Ultra(150 mm × 3.0 mm, 2.8 μm)、Poroshell CS-C₁₈(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm)、Poroshell Bonus-RP(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 和 Zorbax SB-C₁₈(100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm) 色谱柱上有可分离的趋势,以 Poroshell CS-C₁₈(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱上分离效果为最好。经定位,(±)-1"-差向-培哌普利和培哌普利依次出峰。故采用 Poroshell CS-C₁₈(100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) 色谱柱继续进行色谱条件优化。详见色谱图 4。Poroshell CS-C₁₈ 为表面带正电荷的十八烷基硅烷键合表面多孔型杂化颗粒硅胶色谱柱,表面多孔型硅胶传质效率和柱效高;表面带正电荷对分离碱性药物可改善峰形,提高分析效率。

3.1.2 流动相中不同有机相对分离度的影响 照“2.1”项下色谱条件,仅改变有机相分别为 18% 的甲醇、乙腈或乙腈/戊醇(217:3),分别取系统适用性溶液进样,如图 5。有机相为 18% 的乙腈/戊醇(217:3)时,(±)-1"-差向-培哌普利和培哌普利

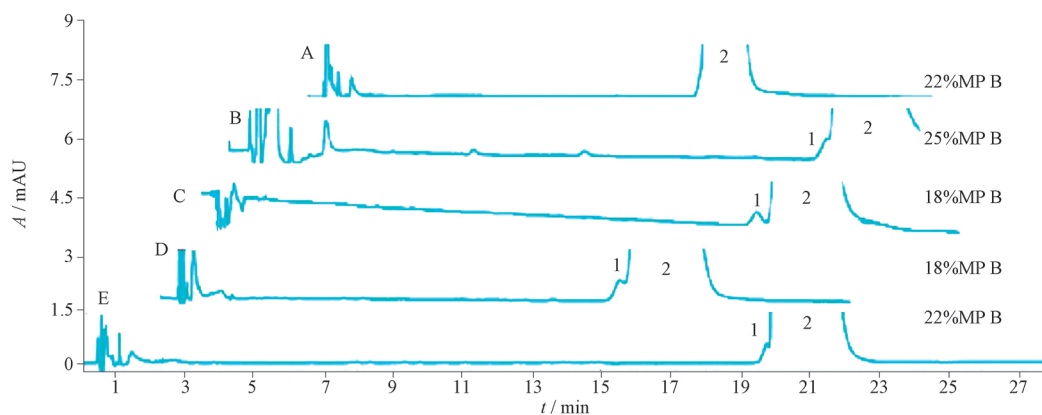


1. (±)-1"-差向-培哌普利[(±)-1"-*epi*-perindopril] 2. 培哌普利(perindopril)

A. batch 801609823 B. batch DY-PDP-2020038 C. batch DY-7-23-2020024

图3 样品的典型色谱图

Fig. 3 Chromatograms of test samples



1. (±)-1"-差向-培哌普利[(±)-1"-*epi*-perindopril] 2. 培哌普利(perindopril)

MP B. 流动相中有机相比例(ratio of organic phase in mobile phase)

A. Poroshell HPH-C₁₈(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm) B. Pursuit XRs Ultra(150 mm×3.0 mm, 2.8 μm) C. Poroshell CS-C₁₈(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm) D. Poroshell Bonus-RP(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm) E. Zorbax SB-C₁₈(100 mm×3.0 mm, 1.8 μm)

图4 采用不同色谱柱的系统适用性溶液的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of system solution on different columns

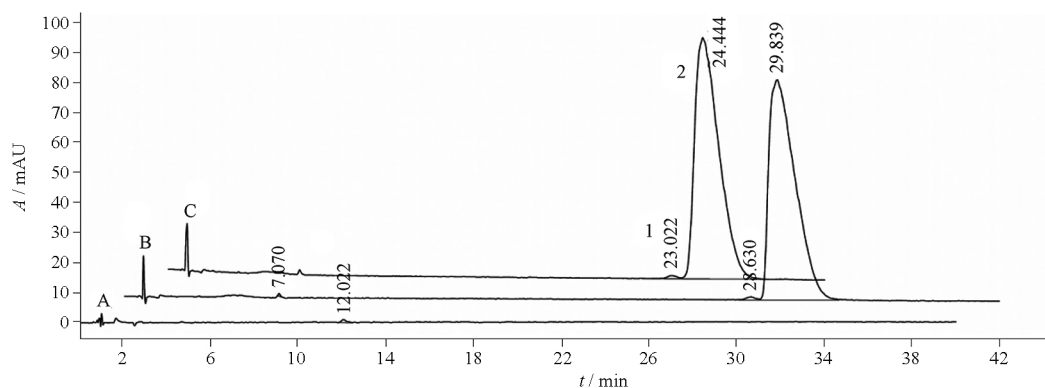
2个异构体的峰谷比>3,保留时间适中,满足分离要求。而选择甲醇时40 min未出峰。

仅改变有机相中乙腈/戊醇的比例分别为217:3、217:5和217:8,取系统适用性溶液进样。结果乙腈/戊醇比例为217:3时,峰谷比最高;比例为217:5和217:8时,流动相极性增加,保留减弱,峰谷比<3。故本文选择有机相为乙腈/戊醇(217:3)。

仅改变有机相比例,分别为14%、16%、18%、20%和22%,取系统适用性溶液进样。结果有机相比例增加,流动相极性增加,保留减弱,峰谷比减小。有机相比例为14%时,2个异构体保留太强,40 min未出峰;有机相比例为16%时,峰谷比>7,2个异构

体保留时间较长,分别为36和39 min;有机相比例为18%时,保留时间适中,峰谷比>3。本文选择有机相比例为18%。

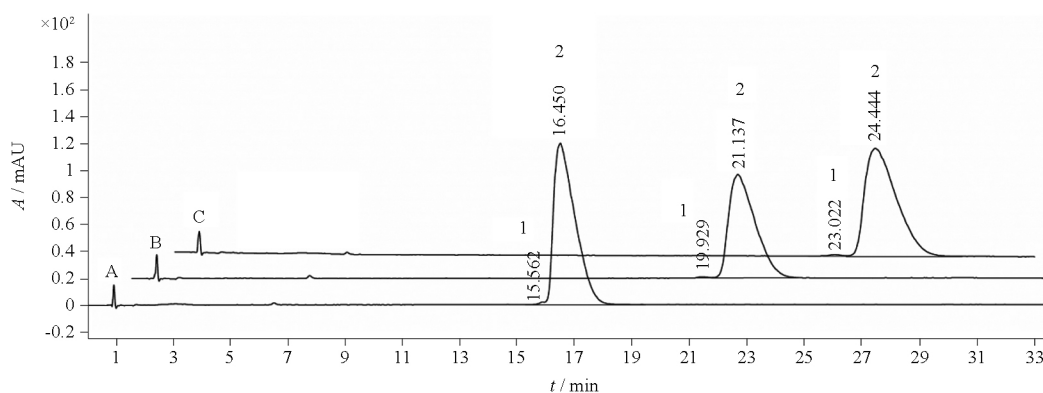
3.1.3 流动相中离子对试剂浓度对分离度的影响 离子对试剂作为添加剂分离生物碱时,兼具离子交换模式与离子对模式的效果。2种分离模式均随着离子对试剂浓度的增加而增强对待测成分的保留^[16]。分别以0.05%、0.10%和0.15%庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节pH 2.0)-乙腈/戊醇(217:3)(82:18)为流动相,其他照“2.1”项下色谱条件,取系统适用性溶液进样。结果庚烷磺酸钠溶液浓度增加,2个异构体保留增加,分离度和峰谷比增加。以0.10%



1. (±)-1"-差向-培哌普利[(±)-1"-*epi*-perindopril] 2. 培哌普利(perindopril)
A. 甲醇(methanol) B. 乙腈(acetonitrile) C. 乙腈(acetonitrile)/戊醇(pentanol) (217:3)

图5 流动相中不同有机相对分离的影响

Fig. 5 Effects of different organic phases on resolution



1. (±)-1"-差向-培哌普利[(±)-1"-*epi*-perindopril] 2. 培哌普利(perindopril)

图6 流动相中0.05% (A)、0.10% (B)和0.15% (C)庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节pH 2.0)对分离的影响

Fig. 6 Effects of 0.05% (A), 0.10% (B) and 0.15% (C) sodium heptanesulfonate solution (adjusted to pH 2.0 with phosphoric acid) in mobile phase on resolution

或0.15%庚烷磺酸钠溶液(磷酸调节pH 2.0)-乙腈/戊醇(217:3)(82:18)为流动相均可满足峰谷比>3的要求。

3.1.4 流动相中pH调节剂种类对分离度的影响 分别选择高氯酸、磷酸和盐酸、醋酸为pH调节剂,与不调节pH的0.10%庚烷磺酸钠溶液进行比较。结果,在其他条件相同情况下,用高氯酸和磷酸调节pH 2.0,两异构体保留时间和峰谷比基本一致,峰谷比均>3;以磷酸为pH调节剂得到的信噪比更高。离子对试剂溶液pH>2.0时,峰谷比均<3;离子对试剂溶液不调节pH,40 min未见峰洗脱。故本文选择调节离子对试剂溶液pH为2.0。

3.1.5 柱温、进样量和样品浓度对分离度的影响 照“2.1”项下色谱条件,分别在40、45、50、55和60℃柱

温时,取系统适用性溶液2 μL进样。结果上述柱温下2个异构体峰谷比均>3。随着柱温升高,2个异构体保留时间缩短,峰谷比增加。综合考虑,本文选择柱温50℃。

照“2.1”项下色谱条件,分别取系统适用性溶液1、2、5、8和10 μL进样。结果进样量增加,分离度和峰谷比下降,信噪比增加。进样量为1和2 μL时,峰谷比均>6。综合考虑,本文选择2 μL进样量。

照“2.1”项下色谱条件,分别在0.6、0.8和1.0 mL·min⁻¹流速时,取系统适用性溶液2 μL进样。结果流速增加,保留减弱,分离度和峰谷比下降。流速为0.6和0.8 mL·min⁻¹时,峰谷比均>3。综合考虑,本文选择0.8 mL·min⁻¹的流速。

照“2.1”项下色谱条件,分别取2和5 mg·mL⁻¹的系统适用性溶液2 μL进样。结果随着样品浓度增加,分离度和峰谷比略有下降,信噪比增加,均能满足测定要求。综合考虑,本文选择2 mg·mL⁻¹的样品浓度。

3.2 影响因素试验

取原料样品(批号802008401、DY-PDP-2020036)和原料粗品(批号DY-7-23-2020025)各约1 g,一式3份共9份,置称量瓶中,分别于(4 500±500)1x光强、60℃恒温箱,25℃/(90±5)%RH条件下放置,于第5天和第10天进行取样配制供试品溶液。照“2.1”项色谱条件测定,不同放置条件差异异构体测定结果基本一致;与常规条件含量相比基本未发生变化。培哌普利叔丁胺样品在光、60℃以及25℃/(90±5)%RH环境中基本稳定,不会发生差异异构体的转化。

4 结论

本研究建立的培哌普利叔丁胺原料中培哌普利叔丁胺差异异构体测定方法快速准确,操作简便,耐用性好;与《中国药典》和欧洲药典150 min的分析时间和分析方法相比,分离时间显著缩短,分离良好,系统稳定,无须柱前长时间平衡时间,在不同液相色谱仪和不同批号的该类型带正电荷杂化颗粒表面多孔C₁₈色谱柱上均可以重现,可有效用于培哌普利叔丁胺的实际生产质量控制,同时,作为《中国药典》方法修订的依据,可以提高培哌普利叔丁胺中立体异构体的质量控制水平。

参考文献

[1] 金永君,韩铮,钱良伟,等.培哌普利叔丁胺盐的合成工艺改进[J].中国医药工业杂志,2020,51(10):1254
JIN YJ, HAN Z, QIAN LW, *et al.* Improved synthetic process of perindopril tert-butylamine salt[J]. *Chin J Pharm*, 2020, 51(10):1254

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部注释(2015年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2019:1915
Chinese Pharmacopoeia Commission. Annotation of Chinese Pharmacopoeia 2015. Vol II [M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Publishing House, 2019: 1915

[3] 中华人民共和国药典2020年版.二部[S].2020:1435
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1435

[4] EP 11. Vol III [S]. 2022: 3668

[5] BP 2023. Vol II [S]. 2023: 574

[6] 田勇,唐素芳.培哌普利的溶出度研究[J].药物分析杂志,2011,31(2):360
TIAN Y, TANG SF. Dissolution test of perindopril tablets [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(2):360

[7] 余永华,马敏康,杨仲杰,等.加校正因子的主成分自身对照法测定培哌普利片中有关物质的含量[J].中国现代应用药学,2017,34(10):1427
YU YH, MA MK, YANG ZJ, *et al.* Main component self-compare with calibration factor method for determination of related substances in perindopril tablets [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2017, 34(10):1427

[8] 李忠红,蔡梅,蔡美明,等.对培哌普利片有关物质检查方法的探讨[J].中国药品标准,2011,12(5):339
LI ZH, CAI M, CAI MM, *et al.* Discussion on the related substances detection method of perindopril tablets [J]. *Drug Stand China*, 2011, 12(5):339

[9] 李雅茹,李朝晖.旋光法测定培哌普利叔丁胺盐及培哌普利片含量[J].天津药学,2006,18(5):18
LI YR, LI ZH. Determination of the content of perindopril tert-butylamine salt and perindopril tablets by polarimetric analysis [J]. *Tianjin Pharm*, 2006, 18(5):18

[10] ERK N. Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 26(1):43

[11] ABDELLATEF HE. Utility of certain π-acceptors for the spectrophotometric determination of perindopril [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 17(8):1267

[12] KUMAR NS, SREENIVASULU V, RAMACHANDRA B, *et al.* A stability-indicating LC-MS method for determination of perindopril and its process related impurities [J]. *Pharm Chem J*, 2018, 52(4):378

[13] SZABÓ ZI, RÉTI ZZ, GAGYI L, *et al.* Simultaneous quantification of related substances of perindopril tert-butylamine using a novel stability indicating liquid chromatographic method [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(3):424

[14] PATHAK K, KAUSHAL M, PATEL H. Analytical techniques for the estimation of perindopril erbumine: a review [J]. *Curr Pharm Anal*, 2021, 17(2):185

[15] BOUABDALLAH S, TRABELSI H, DHIA MTB, *et al.* Kinetic study on the isomerization of perindopril by HPLC [J]. *Chromatographia*, 2012, 75(21-22):1247

[16] 史鹏杰,吴佳,辛振强,等.烷基磺酸钠类离子对试剂对槟榔中生物碱保留行为的影响研究[J].药物分析杂志,2023,43(6):975
SHI PJ, WU J, XIN ZQ, *et al.* Influence of sodium alkyl sulfonate ion-pair reagents on retention behavior of alkaloids in *Arecae Semen* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(6):975

(本文于2023年8月24日收到)