HPLC-CAD 法测定舒更葡糖钠中的有关物质

冯 中[1,2]，朱冬青[1]，庞余江[2]，朱志祥[2]，宋玉鹏[1]，张贵民[1*]
（1. 山东新时代药业有限公司，山东省药物国际化工程实验室，山东临沂 273400；2. 中国海洋大学医药学院，山东青岛 266003）

摘要：建立了 HPLC-CAD 法测定舒更葡糖钠（**1**）原料药中的 7 种有关物质（**2** ～ **8**）。色谱柱采用 Poroshell 120 SB-C_8 柱（4.6 mm×150 mm，2.7 μm），流动相 A 为 0.5%甲酸溶液，B 为甲醇，线性梯度洗脱，流速为 0.5 mL/min，柱温为 35 ℃。电雾式检测器（CAD）雾化器温度为 35 ℃，过滤常数为 3.6 s，数据采集速率为 5 Hz。结果表明，**3** 在 5 ～ 300 μg/mL 内线性关系良好，**1** 及其他有关物质均在 2 ～ 40 μg/mL 内线性关系良好。**1** 原料药及各杂质（**2** ～ **8**）的定量限为 0.985 ～ 1.145 μg/mL，检测限为 0.493 ～ 0.573 μg/mL；**2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=9）为 95.6%～ 99.4%，RSD 为 1.21%～ 3.32%。该方法准确、重现性好、精密度高，可检测 **1** 原料药中的有关物质，为 **1** 的质量控制提供了可靠的检测方法。

关键词：舒更葡糖钠；有关物质；HPLC；电雾式检测器（CAD）
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2023）05-0785-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.05.020

Determination of the Related Substances in Sugammadex Sodium by HPLC-CAD

FENG Zhong[1,2], ZHU Dongqing[1], PANG Yujiang[2], ZHU Zhixiang[2], SONG Yupeng[1], ZHANG Guimin[1*]
(*1. International Pharmaceutical Engineering Lab. in Shandong Province, Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003*)

ABSTRACT: An HPLC-CAD method was established for the determination of seven related substances (**2** – **8**) in sugammadex sodium (**1**) bulk drug. The Poroshell 120 SB-C_8 column (4.6 mm×150 mm, 2.7 μm) was used, and the analysis was carried out in the linear gradient elution mode with 0.5% formic acid solution as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. The flow rate was 0.5 mL/min and the column temperature was 35 ℃. The temperature of the atomizer of the charged aerosol detector (CAD) was 35 ℃, the filtration constant was 3.6 s, and the data acquisition rate was 5 Hz. The results showed that it was linear for **3** in the range of 5 – 300 μg/mL, and it was linear for **1** bulk drug and other related substances in the range of 2 – 40 μg/mL. The LOQs and LODs of **1** – **8** were 0.985 – 1.145 μg/mL and 0.493 – 0.573 μg/mL, respectively. The average recoveries (*n*=9) of **2** – **8** were 95.6% – 99.4%, with the RSDs of 1.21% – 3.32%. This method is accurate, reproducible, and highly precise, which can be used to detect the related substances in **1** bulk drug, and also provides a reliable detection method for the quality control of **1**.

Key Words: sugammadex sodium; related substance; HPLC; charged aerosol detector (CAD)

舒更葡糖钠（sugammadex sodium，**1**）是由美国默沙东公司生产的一种新型氨基甾类肌松药特异性拮抗药，于 2008 年首次在瑞典上市，2015 年 12 月 15 日获美国 FDA 批准上市[1—3]，商品名 Bridion（布瑞亭）。**1** 可用 γ- 环糊精（**8**）为起始原料，对糖环上 6- 位羟基进行溴代，得到的中间体与 3- 巯基丙酸在氢化钠的存在下进行偶联并成盐制得[4—6]，合成路线如图 1 所示。**1** 的合成工艺中可能会产生多个有关物质（**2** ～ **7**，各杂质的化学结构如表 1 所示）：在溴代反应过程中，因溴代试剂 *N*- 溴代琥珀酰亚胺中存在的 *N*- 氯代琥珀酰亚胺杂

收稿日期：2022-12-01
作者简介：冯 中（1983—），男，正高级工程师，硕士生导师，从事新药的研究与开发。
通信作者：张贵民（1969—），男，研究员，主要从事新药的研究与开发。
E-mail：lunanzhangguimin@163.com

质，可能会生成氯代杂质 **6**；因溴代不完全，可能会生成单羟基杂质 **3**；在硫代烷化反应过程中，反应液中的残留氧可能会导致亚砜异构体杂质 **4** 和 **5** 的生成；氯代杂质 **6** 可能会进一步转化为溴代杂质 **2**；3- 巯基丙酸中的硫酯杂质可能会导致二硫代杂质 **7** 的生成。上述有关物质均未见相关检测方法的报道。

有关物质 **2** ～ **7** 的极性相近，且均为末端吸收，紫外吸收检测器的检测噪声大，难以实现所有杂质完全基线分离，而且起始物 **8** 无紫外吸收，难以采用常规的 HPLC-UV 法进行准确的定性与定量测定，故选择通用型检测器来解决此问题。而电雾式检测器（charged aerosol detector，CAD）是一种新型通用型检测器，对大部分非挥发性或半挥发性有机物可实现准确的定量或半定量分析，且具有对不同化合物响应一致、灵敏度高、重现性好、检测范围宽等优点。本研究建立了 HPLC-CAD 法同时测定 **1** 原料药中的有关物质 **2** ～ **8**，并对 **1** 及其工艺中潜在的有关物质 **2** ～ **8** 进行分析，以期为 **1** 原料药的质量控制提供参考。

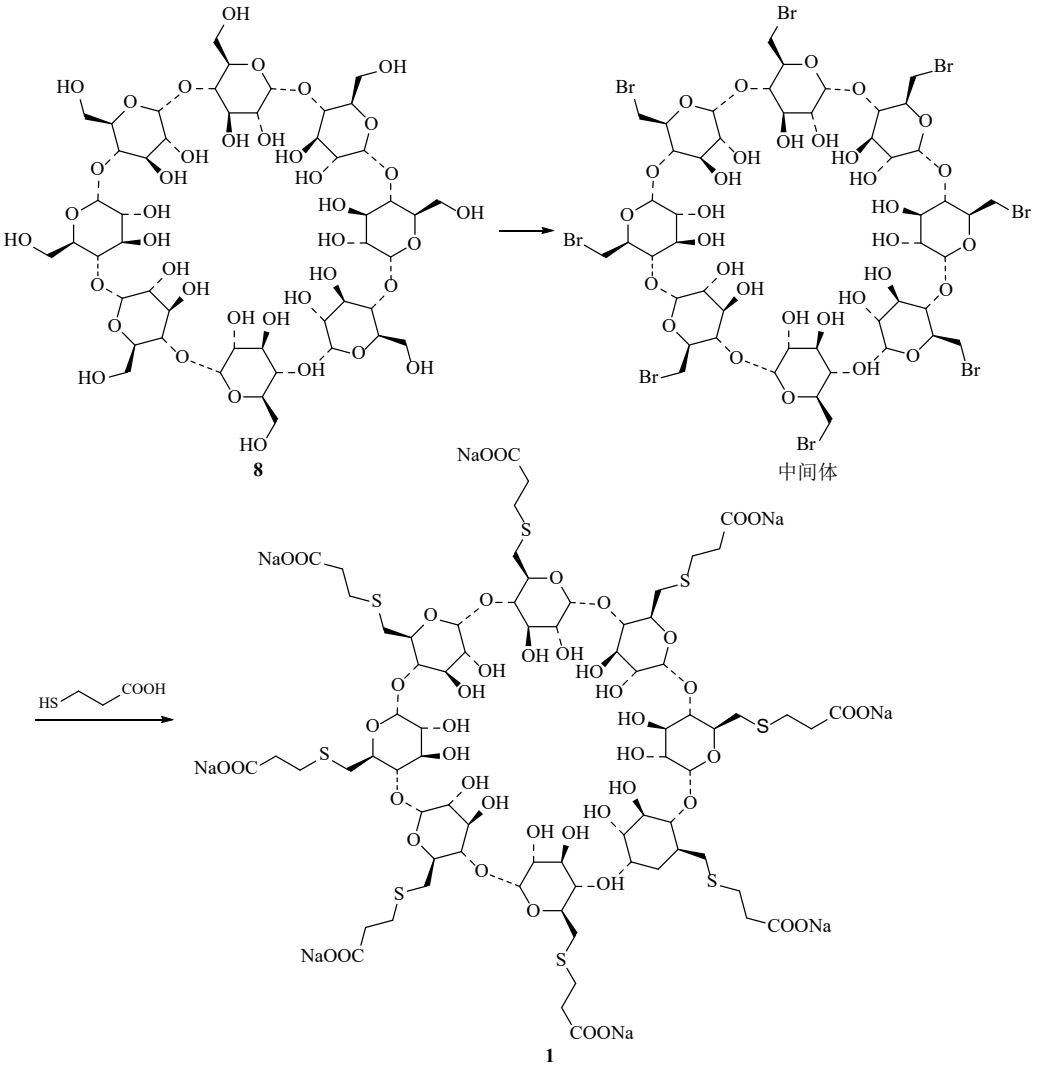
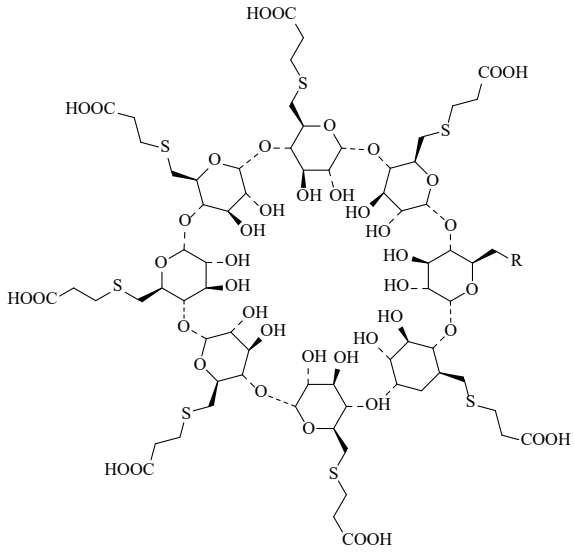


图 1　1 的合成路线

Fig.1　Synthetic Route of **1**

表 1 有关物质 2 ～ 7 的化学结构式

Tab.1 Chemical Structures of the Related Substances **2** – **7**



化合物编号	化合物结构
2	R=—Br
3	R=—OH
4	R= –S(=O)(O⁻)–CH₂CH₂COOH
5	R= –S(=O)(O⁻)–CH₂CH₂COOH
6	R=—Cl
7	R=—S-SCH_2CH_2COOH

1 仪器与试药

UltiMate3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，配有 CAD 检测器）；XS205DU 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；SHH-200GD-2 型强光照射试验箱（重庆永生实验仪器厂）。

1 对照品（加拿大 TLC 公司，含量 97.0%，批号 2413-058A4）；**2** 对照品（含量 93.2%，批号 SUG/IMP/2-77）、**3** 对照品（含量 64.7%，批号 SUG/IMP/2-073）、**4** 对照品（含量 86.7%，批号 SUG/IMP/2-66）、**5** 对照品（含量 89.8%，批号 SUG/IMP/2-092）、**6** 对照品（含量 85.7%，批号 SUG/IMP/2-84）、**7** 对照品（含量 92.2%，批号 SUG/IMP/2-087）均购于印度 Dr. Reddy's Lab. 公司；**8** 对照品（美国药典委员会，含量 99.9%，批号 F0D396）；**1** 原料药（本公司自制，含量 98.65%，批号 170801、180301、180302、180303）；甲酸为 LC/MS 级，甲醇为色谱纯，盐酸、氢氧化钠和过氧化氢均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent Poroshell 120 SB-C_8 柱（4.6 mm×150 mm，2.7 μm）；流动相 A 为 0.5%甲酸溶液（甲酸 5 mL 溶于水 1 000 mL 中），B 为甲醇，线性梯度洗脱（0—5 min，A 90%—60%；5—50 min，A 60%—40%；50—60 min，A 40%；60—61 min，A 40%—90%；61—70 min，A 90%）；检测器 CAD；雾化器温度 35 ℃；过滤常数 3.6 s；数据采集速率 5 Hz；流速 0.5 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液配制

对照品贮备液：分别精密称取 **1**、**2**、**4**、**5**、**6**、**7** 和 **8** 对照品各 20 mg，分别置 10 mL 量瓶中，用适量甲醇溶解后用水定容，摇匀，即得 **1**、**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8** 对照品贮备液；精密称取 **3** 对照品 50 mg，置 50 mL 量瓶中，用适量甲醇溶解后加水定容，摇匀，即得 **3** 对照品贮备液。

对照品贮备液 A：分别精密量取 **1**、**2**、**4**、**5**、**6**、**7** 和 **8** 对照品贮备液各 2 mL，置同一 20 mL 量瓶中，用水定容，摇匀，即得对照品贮备液 A。

对照品贮备液 B：精密称取 **3** 对照品贮备液 25 mL，置 50 mL 量瓶中，用水定容，摇匀，即得对照品贮备液 B。

对照品贮备液 C：分别精密称取 **2**、**4**、**5**、**6**、**7** 和 **8** 对照品贮备液各 2 mL，置同一 20 mL 量瓶中，用水定容，摇匀，即得对照品贮备液 C。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药（批号 170801）40 mg，置 10 mL 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，作为供试品溶液。

加标溶液：精密称取 **1** 原料药（批号 170801）40 mg，置 10 mL 量瓶中，加入对照品贮备液 A 1 mL、对照品贮备液 B 0.4 mL，并用水稀释定容，摇匀，作为加标溶液。

2.3 系统适用性试验

精密称取 **1** 原料药（批号 170801）40 mg，置 10 mL 量瓶中，加水 2 mL 使溶解，再加入 0.05%

过氧化氢溶液 1 mL，于室温（25 ℃）放置 10 min，用水定容，作为系统适用性溶液；并取“**2.2**”项下供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结果如图 2 所示，保留时间最接近的 **4** 与 **5** 之间的分离度不小于 1.5，说明本法检测的各杂质分离度均满足要求。

2.4 专属性试验

精密称取 **1** 原料药（批号 170801）40 mg，共 5 份，各置 10 mL 量瓶中，依次进行以下试验。①酸破坏试验：精密加入 1 mol/L 盐酸，于 25 ℃放置 72 h，再加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和，用水定容，摇匀；②碱破坏试验：精密加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液，于 25 ℃放置 72 h，再加入 1 mol/L 盐酸中和，用水定容，摇匀；③氧化破坏试验：精密加入 0.1％过氧化氢溶液，于 25 ℃放置 20 min，用水定容，摇匀；④光照破坏试验：将样品于 4 500 lx 照度的强光照射箱中放置 10 d，用水溶解并定容，摇匀；⑤高温破坏试验：将样品平铺于称量瓶中，于 105 ℃加热 72 h，用水溶解后转移至 10 mL 量瓶中，用水定容，摇匀。将以上破坏性试验样品按“**2.1**”项下色谱条件分别进样测定，并记录色谱图，结果如图 3 所示。

结果表明，**1** 原料药在酸、碱、光照和高温条件下相对稳定，而在氧化条件下，**4** 和 **5** 的含量明显增加；在各降解条件下，待测杂质与相邻色谱峰、**1** 原料药与相邻色谱峰的分离度均符合要求。

2.5 线性试验

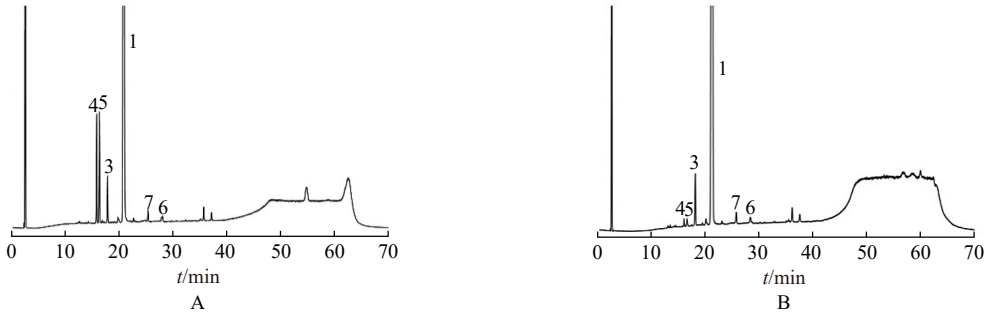
精密量取对照品贮备液 A 与对照品贮备液 B（按不同配比组合：0.1 和 0.1 mL、0.2 和 0.4 mL、0.4 和 1.0 mL、0.6 和 2.0 mL、1.2 和 4.0 mL、2.0 和 6.0 mL），分别置 10 mL 量瓶中，用水稀释并定容，制备线性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件分别进样测定，记录色谱图。以溶液中各化合物的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。结果如表 2 所示，**3** 在 5 ～ 300 μg/mL 内线性关系良好，**1** 及其他有关物质均在 2 ～ 40 μg/mL 内线性关系良好。

2.6 检测限（LOD）与定量限（LOQ）

分别以基线噪声的 10 倍和 3 倍作为 LOQ 与 LOD。结果如表 2 所示，**1** 原料药及各有关物质（**2** ～ **8**）的 LOQ 为 0.985 ～ 1.145 μg/mL，LOD 为 0.493 ～ 0.573 μg/mL，证明本法灵敏度较高。

2.7 回收率试验

精密称取 **1** 原料药（批号 170801）40 mg，各 9 份，分别置 10 mL 量瓶中，分别精密加入“**2.2**”项下的对照品贮备液 C（0.2、0.4、0.6 mL）、对照品贮备液 B（2.0、4.0、6.0 mL），制成低、中、高浓度回收率试验溶液，各 3 份，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，**2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=9）分别为 97.3％、95.6％、96.9％、99.4％、98.2％、97.1％、96.3％，RSD 分别为 1.21％、1.27％、2.68％、

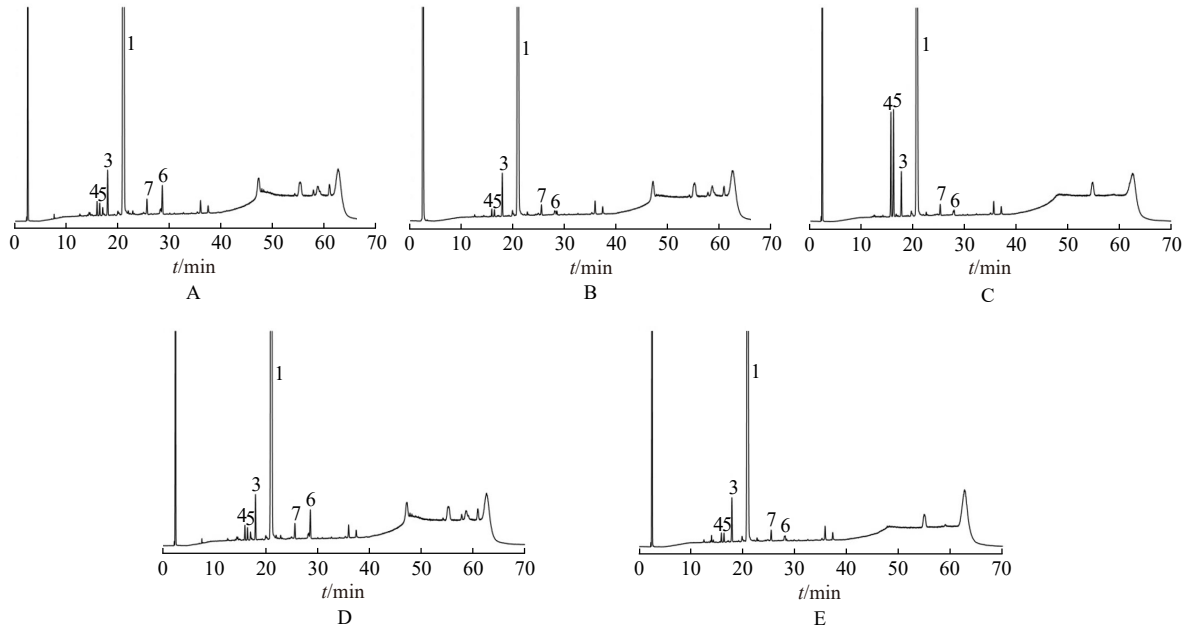


A—系统适用性溶液；B—供试品溶液。

1—**1**；3—**3**；4—**4**；5—**5**；6—**6**；7—**7**。

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms



A—酸破坏；B—碱破坏；C—氧化破坏；D—高温破坏；E—光照破坏。

1—**1**；3—**3**；4—**4**；5—**5**；6—**6**；7—**7**。

图 3 破坏性试验色谱图

Fig.3 Chromatograms of Stress Tests

表 2 线性试验、检测限与定量限结果

Tab.2 Results of Linearity Test, LODs and LOQs

化合物	回归方程	相关系数*r*	LOD/(μg·mL^{-1})	LOQ/(μg·mL^{-1})	相对校正因子(RF)[1)]
1	*A*=3.348 5*c*+1.186 5	0.999 9	0.506	1.012	—
2	*A*=3.376 6*c*+1.032 1	0.998 4	0.573	1.145	0.99
3	*A*=3.256 5*c*+0.998 0	0.995 3	0.522	1.043	1.03
4	*A*=3.441 5*c*+1.305 3	0.999 8	0.493	0.985	0.97
5	*A*=2.948 2*c*+1.235 7	0.999 9	0.498	0.996	1.14
6	*A*=2.954 6*c* − 0.272 9	0.999 7	0.534	1.068	1.13
7	*A*=3.577 4*c* − 0.876 6	0.995 0	0.541	1.082	0.94
8	*A*=3.155 4*c* − 0.404 1	0.998 9	0.513	1.026	1.06

注：[1)] 各有关物质的 RF 值均在 0.9 ～ 1.1，表明有关物质计算时可忽略不计。

1.98%、3.32%、2.54%、2.76%。

2.8 重复性和稳定性试验

分别取“**2.2**”项下的对照品贮备液 A 0.4 mL、对照品贮备液 B 4 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释并定容，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果显示，**2** ～ **8** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.36%、0.55%、0.69%、0.98%、1.26%、1.21%、1.19%，说明本法重复性良好。

取“**2.7**”项下的中浓度回收率试验溶液，于室温（25 ℃）放置 0、2、4、6、8、10、16、24 h 后，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结果显示，**2** ～ **8** 峰面积的 RSD（*n*=8）分别为 1.88%、0.76%、1.94%、2.08%、2.45%、1.92%、2.03%，表明其在室温下放置 24 h 内稳定。

2.9 耐用性试验

取“**2.2**”项下供试品溶液和系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件分别进样测定，以各色谱峰的分离度为指标，分别考察了柱温（25、30 和 35 ℃）、流速（0.5、0.6 和 0.7 mL/min）、流动相中甲酸浓度（0.4%、0.5% 和 0.6%）等条件变化对检测结果的

影响。结果表明，以上色谱条件发生微小变化时，对各有关物质的检测基本无影响。在系统适用性溶液的色谱图中，各有关物质色谱峰与主峰分离度均大于 1.5；各有关物质色谱峰与相邻杂质峰之间的分离度均大于 1.2；在供试品溶液的色谱图中，**1** 峰与 **2** ～ **8** 峰以及其他未知杂质峰之间的分离度均大于 1.5。

2.10 样品测定

取 **1** 原料药 3 批（批号 180301、180302、180303），按“**2.2**”项下方法分别配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，按主成分外标法计算各供试品中有关物质的含量，结果如表 3 所示。

原研制剂说明书中表述，本品对成人的建议使用剂量为 16 mg/kg。根据 ICH 指导原则《Q3A(R2)：新原料药中的杂质》中对杂质限度的要求，按成年人体质量为 50 kg 计算，本品杂质的鉴定限度为 0.10%；界定限度为 0.125%。而药品说明书中表述：“临床前药理研究显示，**3** 与罗库溴铵和维库溴铵之间的亲和力达到 **1** 的约 50%，含有达 7% **3** 的 **1** 对罗库溴铵或维库溴铵诱导阻滞显示了几乎相似的逆转作用。在 Ames 试验、人外周血淋巴细胞体外染色体畸变试验及小鼠和大鼠体内微核试验中，**1** 及 **3** 的试验结果为阴性，说明 **1** 和 **3** 均无遗传毒性。”由此可见，可将 **3** 按活性实体进行控制，其限度为 6.0%。由检测结果可知，**3** ～ **8** 均符合限度要求。

3　讨论

本研究对紫外吸收检测器与 CAD 进行了比较。结果显示，使用紫外吸收检测器时，**8** 无紫外吸收，无法测定；有关物质 **2** ～ **7** 基线噪声较大，且通过改变不同的洗脱梯度，供试品溶液中主峰与相邻色谱峰均不能完全分离。而采用 CAD 时，能有效地对 **8** 进行定性和定量检测，且通过对洗脱梯度的调整可以实现主峰与各有关物质峰之间的良好分离。

此外，对 0.5% 甲酸溶液与甲醇或乙腈组成的流动相系统进行了比较。结果显示，采用 0.5% 甲酸溶液与乙腈的混合溶液作为流动相时，**4** 与 **5** 不能达到完全基线分离；而采用 0.5% 甲酸溶液与甲醇的混合溶液作为流动相时，分离效果较好，各色谱峰的分离度良好。

致谢：国家手性制药工程技术研究中心（2016GGH4528）给予资助。

表 3　有关物质测定结果 /%

Tab.3　Determination Results of the Related Substances/%

批号	2	3	4	5	6	7	8	最大单杂	其他杂质总和
180301	—	0.85	0.04	0.05	0.07	0.06	—	0.06	0.19
180302	—	1.13	0.05	0.03	0.04	0.08	—	0.05	0.15
180303	—	0.93	0.03	0.06	0.03	0.05	—	0.06	0.21

注：“—”表示未检出。

参考文献：

[1] 蓝　岚, 欧阳葆怡. 舒更葡糖钠临床应用近况[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, **9**(10): 1953-1956.

[2] 魏　词, 王　红. 舒更葡糖钠的合成工艺[J]. 中国现代应用药学, 2016, **33**(4): 431-432.

[3] 葛新月, 程卯生. 舒更葡糖钠[J]. 中国药物化学杂志, 2016, **26**(5): 433-435.

[4] 刘妹女, 陈克研, 张铁铮. 甾体类肌松药物拮抗剂布瑞亭临床应用的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2015, **36**(1): 57-64.

[5] 杨家亮, 罗　杰, 谢永美. 舒更葡糖钠的合成工艺研究[J]. 化学工程与装备, 2016, (6): 4-6.

[6] 余承晏, 薛庆生, 于布为. 新型肌肉松弛药拮抗剂布瑞亭的临床研究进展[J]. 上海医学, 2018, (3): 185-189.