HPLC-UV 法测定磷酸特地唑胺原料药中的有关物质

孟冬朔[1,2,3,4]，张晓雯[1,2,3,4]，张子学[1,3,4]，刘家玉[5]*，刘　育[1,2,3,4]*

（1. 中国医药工业研究总院有限公司上海医药工业研究院有限公司，化学制药新技术中心，上海 201203；2. 中国医药工业研究总院有限公司上海医药工业研究院有限公司，科技成果转化中心，上海 201203；3. 中国医药工业研究总院有限公司上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203；4. 上海药物合成工艺过程工程技术研究中心，上海 201203；5. 国药集团国瑞药业有限公司药物工程研究中心，安徽淮南 232001）

摘要：建立了 HPLC-UV 法测定磷酸特地唑胺（**1**）原料药中的 15 个有关物质。采用 Welch Ultimate XBridge C_{18} 色谱柱，流动相 A 为 0.01 mol/L 磷酸二氢铵和 0.01 mol/L 磷酸氢二铵的水溶液（pH 5.5），B 为乙腈，梯度洗脱，检测波长为 235 nm。同时建立了 HPLC-UV 法测定 **1** 原料药中的异构体杂质。采用 Daicel Chiralpak OJ-H 色谱柱，以正己烷 - 乙醇 - 二乙胺（体积比 35 ∶ 65 ∶ 0.1）为流动相，等度洗脱，检测波长为 300 nm。结果表明，各有关物质在 0.2 ～ 7.0 μg/mL 内线性关系良好，回收率为 90%～ 108%。建立的方法灵敏度好、选择性强、重复性好，可为 **1** 的质量控制研究提供参考。

关键词：磷酸特地唑胺；高效液相色谱法；有关物质；方法验证

中图分类号：R917；R978.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1556-09

引用：孟冬朔 , 张晓雯 , 张子学 , 等．HPLC-UV 法测定磷酸特地唑胺原料药中的有关物质［J］．中国医药工业杂志 , 2024, 55(11): 1556-1564．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.013

Determination of Related Substances in Tedizolide Phosphate by HPLC-UV

MENG Dongshuo[1,2,3,4], ZHANG Xiaowen[1,2,3,4], ZHANG Zixue[1,3,4], LIU Jiayu[5]*, LIU Yu[1,2,3,4]*

(*1. Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., Shanghai 201203; 2. Incubation Center of Science and Technology Achievements, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., Shanghai 201203; 3. National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co. Ltd., Shanghai 201203; 4. Shanghai Engineering Research Center of Pharmaceutical Process, Shanghai 201203; 5. China National Medicines Guorui Pharmaceutical Co., Ltd., Huainan 232001*)

ABSTRACT: A HPLC-UV method was established to determine 15 related substances in tedizolide phosphate (**1**) bulk drug. The Welch Ultimate XBridge C_{18} chromatography column was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with 0.01 mol/L ammonium dihydrogen phosphate and 0.01 mol/L ammonium dihydrogen phosphate aqueous solution (pH 5.5) as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B. The detection wavelength was 235 nm. And another HPLC-UV method was established to determine the isomer impurity in **1** bulk drugs. The Daicel Chiralpak OJ-H chromatographic column was used, and the analysis was carried out with an isocratic elution mobile phase composed of *n*-hexane, ethanol and diethylamine in a volume ratio of 35 ∶ 65 ∶ 0.1. The detection wavelength was 300 nm. The results showed that it was linear for the relevant substances in the concentration range of 0.2 − 7.0 μg/mL, and the method recovery rate was 90% − 108% . The established method has good sensitivity, strong selectivity, and high repeatability, which can provide a reference for quality control research in **1**.

Key Words: tedizolide phosphate; HPLC; related substance; method validation

磷酸特地唑胺（tedizolide phosphate，**1**），化学名为（5*R*）-[3-[3-氟-4-[6-(2-甲基-2*H*-四唑-5-基)-嘧啶-3-基]苯基]-2-氧代噁唑烷-5-基]甲基二氢磷酸酯，具有在体内阻断氨酰基tRNA结合、抑制细菌蛋白合成的作用[1]。作为第二个噁唑烷酮抗菌药，**1**于2014年由美国FDA批准上市，用于治疗由革兰阳性菌引起的急性感染，近年在国内一直是热门的被仿制药物。

本课题组参考相关文献[2]对**1**的合成工艺进行了优化，并结合优化后的工艺路线和强制降解试验结果，针对**1**原料药的杂质谱进行了全面分析，并通过定向合成等方法得到了相关的工艺杂质[3]和降解杂质。目前关于**1**有关物质的研究，战玉芳等[4]开发了一种HPLC法用以测定**1**中的有关物质，但检出的多为Suzuki偶联合成路线[5]中的原料及中间体残留产物。KATARZYNA等[6]使用HPLC串联质谱联用法分离**1**二钠盐在固态及溶液状态下强制降解生成的杂质，检出的多为**1**的离子化碎片杂质。

本课题组确定的杂质谱多为**1**的工艺杂质，包括原料、中间体副产物及其参与后续反应得到的新工艺杂质，种类较多、结构相似、理化性质相近。由于这些杂质与上述方法的检测物均有较大不同，如使用文献方法检测，存在杂质分离度不佳、部分杂质拖尾的问题。故本研究参照ChP 2020年版和ICH指导原则，建立了HPLC-UV法测定**1**原料药中的有关物质，并进行系统的分析方法验证，以期为**1**的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

Ultimate 3000型高效液相色谱仪（包括二极管阵列检测器，变色龙网络版色谱软件，美国Thermo Fisher Scientific公司）；XS205型十万分之一天平（瑞士Mettler Toledo公司）；CPA225D型十万分之一天平和PB-10型pH计（德国Sartorius公司）。

1样品（国药集团国瑞药业有限公司，批号2107001、2108002、2108003）；有关物质C（山东博洛德生物科技有限公司，含量97.43%，批号TDZA20180614）；有关物质K（含量98.07%，批号20190608）、有关物质M（含量98.40%，批号20190905）均购于深圳卓越生物医药科技有限公司；有关物质A（含量95.48%，批号CPTB1727-20200506-01）、有关物质D（含量92.64%，批号CPTB1733-20180625-01）、有关物质G（含量97.98%，批号CPTB1730-20180502-01）、有关物质N（含量97.08%，批号CPTB1741-20180828-01）、有关物质O（含量99.66%，批号CPTC1707-20190727-01）、有关物质P（含量99.49%，批号CPTC1704-20190815-01）均购于天津卡普希科技有限公司；**1**对照品、有关物质B、E、F、H、I、J、L均由上海医药工业研究院有限公司化学制药新技术中心合成；碱性磷酸单酯酶（4KU，北京华威锐科化工有限公司）；甲醇、乙腈、乙醇均为色谱纯，正己烷为色谱纯，二乙胺为分析纯；其余试剂均为分析纯，试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 1原料药中的有关物质分析

1的合成路线及可能产生的有关物质如图1所示。以（5*R*）-3-(4-溴-3-氟苯基)-5-羟甲基噁唑烷-2-酮（**5**）和2-(2-甲基-2*H*-四唑-5-基）吡啶-5-硼酸频哪醇酯（**6**）为原料，通过Suzuki偶联反应得到3-[3-氟-4-[6-(2-甲基-2*H*-四唑-5-基)-3-吡啶基]苯基]-5-(羟基甲基)-2-噁唑烷酮（**4**），**4**再经磷酸化、成盐和酯化得到**1**。从合成路线可知，**6**经Suzuki反应自身偶联得到有关物质J；残留的**4**脱氟杂质参与后续反应进程，得到有关物质G；在磷酸化、酯化反应过程中，可能生成的一系列工艺杂质如氟异构杂质、甲基异构杂质、甲酯化杂质、双磷酸酯化杂质等[3]。

2.2 1的杂质控制策略

根据**1**的工艺路线及分析强制降解试验结果，确定相关杂质共16个，其中有关物质O、P为工艺路线中残留的起始原料**5**、**6**，有关物质H为工艺路线中残留的关键中间体**4**。有关物质B～P均具有较强的紫外吸收，因此通过筛选能满足各杂质检测灵敏度的波长进行测定。有关物质A为**1**的异构体

收稿日期：2024-06-11

作者简介：孟冬朔（1998—），男，硕士研究生，专业方向：药物质量控制。

通信作者：刘家玉（1971—），男，执业药师，从事药品生产制造的研究与开发。

E-mail：gryy-ljy2008@163.com

刘　育（1981—），男，研究员，从事创新药物及药物合成工艺研究。

E-mail：liuyu_tianjin@163.com

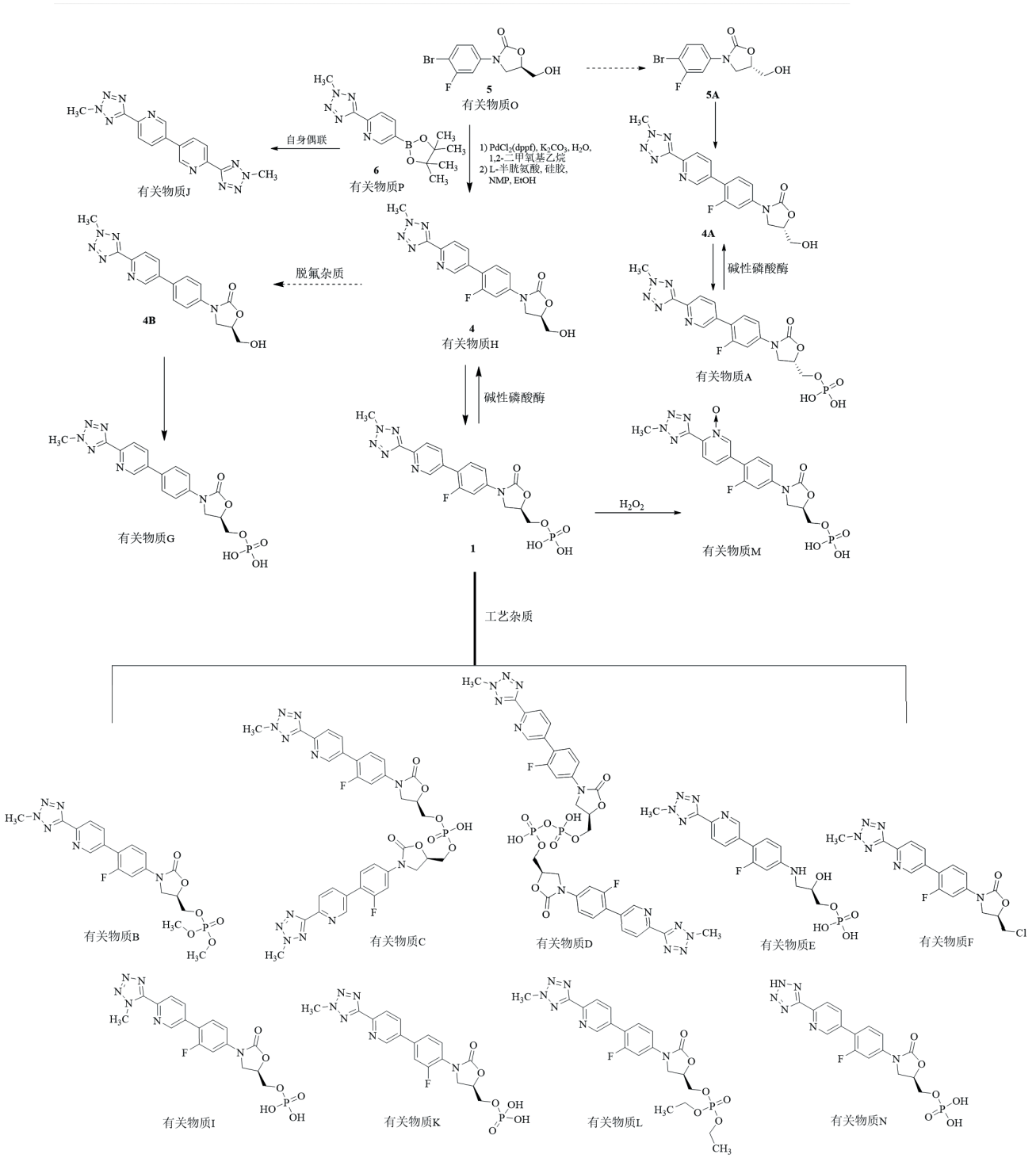


图 1　1 的合成路线及杂质谱分析

Fig.1　Synthetic Route of **1** and Its Impurity Profile Analysis

杂质，由 **5** 的异构体 **5A** 通过相同路线反应得到，在工艺路线中并不会发生构型翻转，可通过柱前衍生化法进行手性分析。

2.3　有关物质 B ～ P 的分析方法与结果

2.3.1　色谱条件

色谱柱 Waters Ultimate XBridge C_{18} 柱（4.6 mm×

250 mm，5 μm)；流动相 A 为 0.01 mol/L 磷酸二氢铵和 0.01 mol/L 磷酸氢二铵的水溶液（pH 5.5），B 为乙腈，梯度洗脱（0—17 min，A 90%—35%；17—25 min，A 35%；25—30 min，A 35%—15%；30—35 min，A 15%—90%；35—45 min，A 90%）；柱温 30 ℃；检测波长 235 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 10 μL。

2.3.2 溶液配制

空白溶剂①：乙腈、水和氨水（体积比 15 ∶ 85 ∶ 0.1）。

有关物质 B ～ P 对照品贮备液：精密称取有关物质 B ～ F、I、K、L、O 各 10 mg，分别置 10 mL 量瓶中，用乙腈和水（体积比 50 ∶ 50）溶解并定容，混匀即得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液。精密称取有关物质 M、N、P 各 10 mg，分别置 10 mL 量瓶中用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液。精密称取有关物质 H 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用乙腈、水和氨水（体积比 50 ∶ 50 ∶ 0.1）溶解并定容，混匀即得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液。精密称取有关物质 G、J 各 10 mg，分别置 50、250 mL 量瓶中，用乙腈和水（体积比 50 ∶ 50）溶解并定容，混匀即得质量浓度分别为 200、40 μg/mL 的对照品贮备液。

混合杂质对照品贮备液：分别精密量取有关物质 J 对照品贮备液 25 mL、有关物质 G 对照品贮备液 5 mL、其余杂质对照品贮备液各 1 mL，置同一 100 mL 量瓶中，用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得质量浓度为 10 μg/mL 的混合杂质对照品贮备液。

有关物质 B ～ P 对照品定位溶液：精密量取除有关物质 G、J 的各有关物质对照品贮备液 100 μL，分别置 10 mL 量瓶中，用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得质量浓度为 10 μg/mL 的杂质对照品定位溶液。精密量取有关物质 G、J 对照品贮备液 500 μL，分别置 10 和 2 mL 量瓶中，用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得质量浓度为 10 μg/mL 的杂质对照品定位溶液。

系统适用性溶液：精密称取 **1** 对照品 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加入少量空白溶剂①溶解，精密加入混合杂质对照品贮备液 1 mL，用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得 **1** 质量浓度为 1 mg/mL、各杂质对照品质量浓度为 1 μg/mL 的系统适用性溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.3.3 系统适用性试验

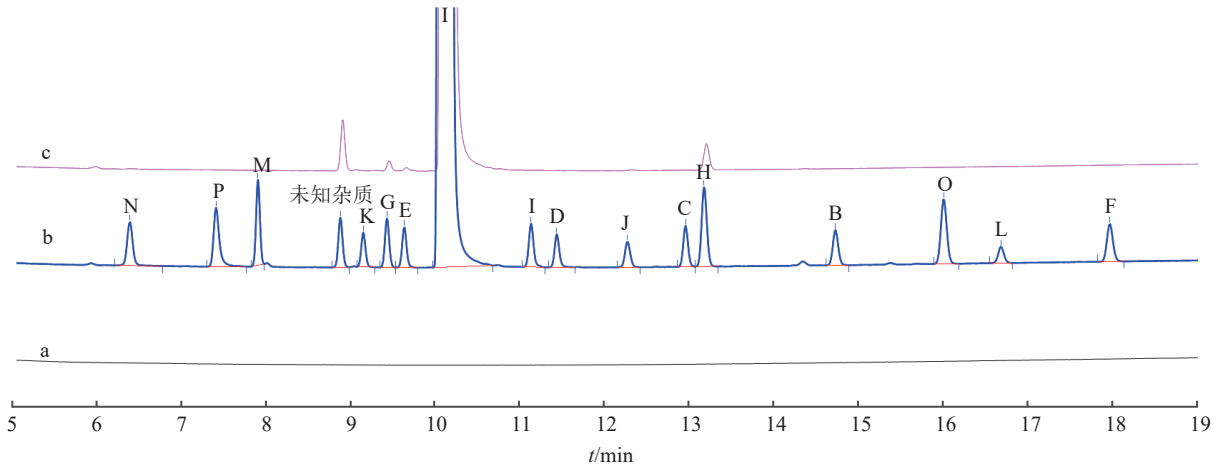
精密量取“**2.3.2**”项下空白溶剂①、供试品溶液、有关物质 B ～ P 对照品定位溶液、系统适用性溶液各 10 μL，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，结果如图 2 所示。有关物质 B ～ P 的保留时间分别为 14.7、12.9、11.4、9.6、17.9、9.4、13.2、11.1、12.2、9.1、16.7、7.9、6.4、16.0、7.4 min，**1** 的保留时间为 10.0 min，各峰之间的分离度均大于 2，实现了完全分离，空白溶剂①不干扰各有关物质及 **1** 的测定，有关物质与 **1** 之间互不干扰。

2.3.4 专属性试验

参考 ICH Q1A(R2) 药品稳定性研究指导原则[7]对 **1** 进行强制降解试验以考察方法专属性。取 **1** 样品（批号 2107001），分别进行酸（1 mol/L 盐酸）、碱（100 mmol/L 氢氧化钠溶液）、氧化（10% 过氧化氢溶液）、高温（80 ℃）及光照（总照度 1.2×10^6 lx·h，近紫外能量 200 w·h/m^2）破坏，其中酸、碱破坏样品须中和。按“**2.3.2**”项下方法配制供试品溶液后，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，结果如图 3 所示。可见，**1** 在光照条件下较为稳定；在酸、碱条件下，主要产生有关物质 E；高温条件下主要产生有关物质 H；氧化条件下主要产生有关物质 M 和 1 个未知杂质。在本试验色谱条件下，各降解产物峰与 **1** 峰的分离度良好，即本方法专属性良好。

2.3.5 线性试验

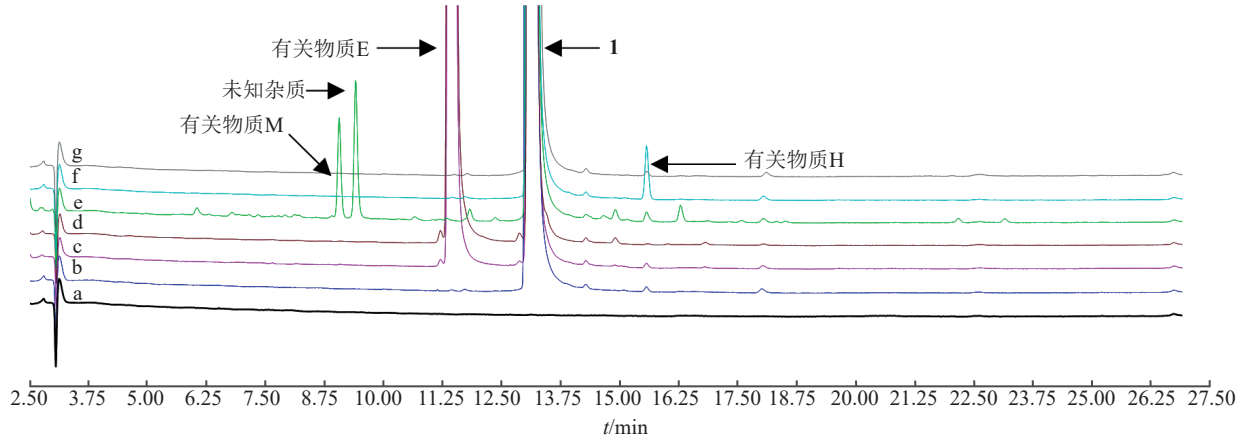
精密称取 **1** 对照品 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用“**2.3.2**”项下混合杂质对照品贮备液溶解并定容，混匀得到溶液；再精密量取所得溶液 100 μL，置 10 mL 量瓶中，用“**2.3.2**”项下混合杂质对照品贮备液溶解并定容，混匀即得质量浓度为 10 μg/mL 的线性贮备液。



a—空白溶剂①；b—系统适用性溶液；c—供试品溶液。

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms



a—空白溶剂①；b—未破坏溶液；c—酸破坏性试验样品；d—碱破坏性试验样品；e—氧破坏性试验样品；f—高温破坏性试验样品；g—光破坏性试验样品。

图 3　强制降解试验结果

Fig.3　Results of Forced Degradation Tests

分别精密量取线性贮备液 0.2、0.4、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、7.0 mL，置不同 10 mL 量瓶中，用空白溶剂①稀释并定容，即得质量浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、7.0 μg/mL 的线性溶液。精密量取上述线性溶液 10 μL 分别进样检测，记录色谱图。以峰面积 *A* 为纵坐标、质量浓度 *c* 为横坐标，进行线性回归，所得回归方程及相关系数 *r* 如表 1 所示。分别以 **1** 的回归方程的斜率与各杂质的回归方程斜率相比，得各有关物质的相对校正因子。结果显示，各有关物质的校正因子均在 0.5 ～ 3.0，可用加校正因子的主成分自身对照法计算各杂质的含量；各有关物质在 0.2 ～ 7 μg/mL 内线性关系良好。

2.3.6　LOD 和 LOQ

取“**2.3.2**”项下有关物质 B ～ P 对照品贮备液适量，稀释到较低浓度，将其测出的信号与空白处的信号（基线噪声）进行比较，以信噪比（*S*/*N*）大于 10 时的溶液浓度作为 LOQ，大于 3 时的溶液浓度作为 LOD。结果显示，有关物质 B ～ P 的检测限均约为 0.2 μg/mL，相当于限度（0.1％）的 20％，定量限均约为 0.4 μg/mL，相当于限度（0.1％）的

表 1 有关物质线性关系考察结果

Tab.1 Linear Relationship Results of Related Substances

化合物	回归方程	*r*	*y* 轴截距相当于 100% 响应值的百分比 /%	化合物	回归方程	*r*	*y* 轴截距相当于 100% 响应值的百分比 /%
1	*A*=0.276*c* − 0.015	0.999 9	5.6	有关物质 I	*A*=0.278*c* − 0.001	0.999 8	0.4
有关物质 B	*A*=0.251*c*+0.001	0.999 8	0.4	有关物质 J	*A*=0.172*c* − 0.003	0.999 8	1.8
有关物质 C	*A*=0.250*c* − 0.000 1	0.999 8	0.1	有关物质 K	*A*=0.197*c* − 0.000 1	0.999 8	0.1
有关物质 D	*A*=0.227*c* − 0.001	0.999 8	0.5	有关物质 L	*A*=0.114*c*+0.001	0.999 7	0.8
有关物质 E	*A*=0.234*c*+0.001	0.999 8	0.4	有关物质 M	*A*=0.439*c*+0.001	0.999 8	0.2
有关物质 F	*A*=0.302*c* − 0.004	0.999 9	1.4	有关物质 N	*A*=0.156*c* − 0.003	0.999 7	1.9
有关物质 G	*A*=0.237*c*+0.001	0.999 8	0.5	有关物质 O	*A*=0.449*c*+0.002	0.999 8	0.4
有关物质 H	*A*=0.338*c*+0.001	0.999 8	0.3	有关物质 P	*A*=0.457*c* − 0.005	0.999 9	1.1

40%。

2.3.7 精密度和稳定性试验

取“**2.3.2**”项下系统适用性溶液，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定，连续进样 6 针，结果显示，保留时间的 RSD（*n*=6）<1.0 %，**1** 峰面积的 RSD（*n*=6）<2.0 %，各杂质峰峰面积的 RSD（*n*=6）<5.0%，表明试验进样精密度良好。

取上述系统适用性溶液，于室温放置；分别于 0、5、10、18、26 h 时取样，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，在 26 h 内，样品中 **1** 响应值的 RSD（*n*=5）小于 2%，各杂质响应值的 RSD（*n*=5）均小于 5%，表明系统适用性溶液在 26 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验

精密称取 **1** 样品（批号 2108003）10 mg，置 10 mL 量瓶中，加入“**2.3.2**”项下混合杂质对照品贮备液 1 mL，并用空白溶剂①溶解并定容，混匀即得 **1** 质量浓度为 1.0 mg/mL、各杂质对照品质量浓度为 1.0 μg/mL 的加样回收溶液。平行制备 6 份，分别按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定。经计算得各有关物质含量的 RSD（*n*=6）均不大于 6%，表明方法重复性良好。

2.3.9 中间精密度试验

由不同分析人员在不同时间进行重复性试验，综合 2 次重复性试验的结果，回收率在 90%～ 108%内，计算中间精密度的 RSD（*n*=12）均不大于 6%，表明方法的中间精密度良好。

2.3.10 回收率试验

精密称取 **1** 样品（批号 2108003）10 mg，共 9 份，置 10 mL 量瓶中，分别加入“**2.3.2**”项下混合杂质对照品贮备液 0.5、1.0、1.5 mL，以空白溶剂①溶解并定容，配制各杂质对照品质量浓度为 0.5、1.0、1.5 μg/mL 的低、中、高浓度加样回收溶液，每个浓度各 3 份，精密量取上述低、中、高浓度加样回收溶液 10 μL，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定，结果如表 2 所示。

表 2 有关物质 B ～ P 的回收率试验结果（*n*=9）

Tab.2 Recovery Test Results of Related Substances B − P（*n*=9）

化合物	平均回收率 /%	RSD/%	化合物	平均回收率 /%	RSD/%
有关物质 B	99.6	3.2	有关物质 J	101.9	4.5
有关物质 C	100.9	3.4	有关物质 K	101.3	3.6
有关物质 D	98.2	3.4	有关物质 L	99.5	3.6
有关物质 E	100.7	5.9	有关物质 M	99.0	3.5
有关物质 F	98.6	3.2	有关物质 N	98.5	3.6
有关物质 G	99.3	3.7	有关物质 O	99.4	3.3
有关物质 H	100.3	3.2	有关物质 P	96.8	3.8
有关物质 I	100.2	3.3			

2.3.11 耐用性试验

分别精密量取“**2.3.2**”项下空白溶剂①、供试品溶液以及“**2.3.10**”项下中浓度加样回收率溶液，按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定。采用外标法，以峰面积计算待测物的含量。改变色谱柱温度（±2 ℃）、流速（±0.1 mL/min）、流动相初始比例（±2%）、检测波长（±2 nm）等，测得样品中总杂含量均在 0.5%以内，空白溶剂①不干扰待测物的测定，待测物与相邻杂质的分离度良好，说明本法耐用性较好。同时比较了同种填料、同种规格、不同批号的色谱柱，上述指标均符合要求。

2.3.12 样品测定

分别精密称取 3 批 **1** 样品，用空白溶剂①溶解得到质量浓度为 1 mg/mL 的溶液，分别按“**2.3.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。采用加校正因子的主成分自身对照法计算已知杂质含量，采用不加校正因子的主成分自身对照法计算未知杂质含量。3 批 **1** 样品中，有关物质 B ～ P 的检测结果如表 3 所示。

2.4 异构体有关物质 A 的分析方法与结果

2.4.1 色谱条件

色谱柱 Daicel Chiralpak OJ-H 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 正己烷、乙醇和二乙胺（体积比 35 ∶ 65 ∶ 0.1）；柱温 30 ℃；自动进样器样品盘温度 5 ℃；检测波长 300 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 5 μL。

2.4.2 溶液配制

有关物质 A 对照品贮备液：精密称取有关物质 A 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用空白溶剂②（0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液，用 1 mol/L 盐酸调至 pH 8.0）溶解并定容；再精密量取所配制溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用空白溶剂②溶解并定容，混匀即得有关物质 A 质量浓度为 10 μg/mL 的对照品贮备液。

有关物质 A 对照品溶液：精密量取有关物质 A 对照品贮备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用空白溶剂②溶解并定容，混匀即得有关物质 A 质量浓度为 1 μg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 样品 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用空白溶剂②溶解并定容，混匀即得质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.4.3 柱前衍生化方法

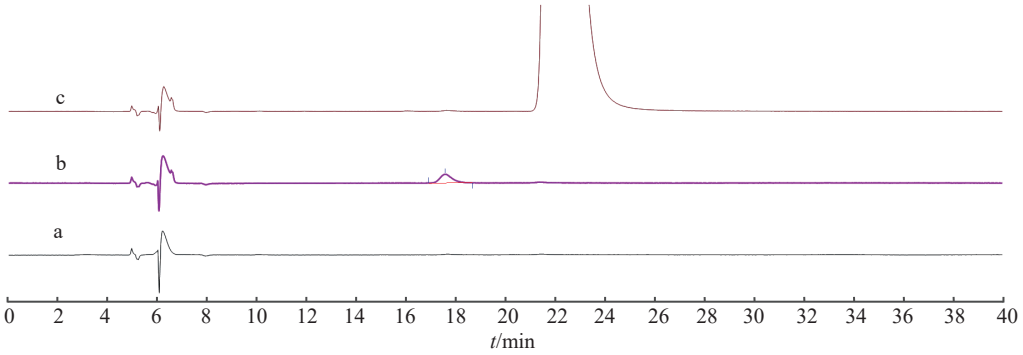
分别取“**2.4.2**”项下空白溶剂②、有关物质对照品溶液、供试品溶液各 100 μL，置 1.5 mL 离心管中，加入酶反应液（精密称取 4KU 适量，用空白溶剂②溶解并稀释制成 200 u/mL）100 μL，于 37 ℃、200 r/min 条件下反应 12 h，取出后，浓缩挥干，加入 *N*- 甲基吡咯烷酮 20 μL，超声 3 min，再加入乙醇 180 μL，超声 3 min，离心（16 172×*g*）3 min，取上清液即得。

2.4.4 专属性试验

精密量取空白溶剂②、有关物质 A 对照品溶液和供试品溶液柱前衍生化后的上清液各 5 μL 进样，记录色谱图。结果（图 4）显示，有关物质 A 的衍生化产物（**4A**）和 **1** 的衍生化产物（**4**），二者的保留时间分别为 17.6 和 22.1 min，理论塔板数分别是 6 876 和 5 985。在所设色谱条件下，空白溶剂②和供试品溶液均不干扰有关物质 A 的测定。

2.4.5 线性试验和灵敏度试验

分别精密量取“**2.4.2**”项下有关物质 A 对照品贮备液 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、4.0、5.0 mL，置不同 10 mL 量瓶中，用空白溶剂②稀释并定容，即得质量浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、4.0、5.0 μg/mL 的线性溶液。精密量取上述线性溶液 100 μL，按“**2.4.3**”项下柱前衍生化法操作，精密量取所得上清液 5 μL，分别进样检测，记录色谱图。以峰面积



a—空白溶剂②；b—有关物质对照品溶液；c—供试品溶液。

图 4　典型色谱图

Fig.4　Typical Chromatograms

A 为纵坐标、质量浓度 *c* 为横坐标，进行线性回归，得回归方程 *A*=0.372*c*+0.038，*r*=0.997 3。结果表明，有关物质 A 在 0.2 ～ 5.0 μg/mL 内线性关系良好。LOD 为 0.2 μg/mL（信噪比 >3），LOQ 为 0.4 μg/mL（信噪比 >10）。

2.4.6 回收率试验

精密称取 **1** 样品（批号 2108003）10 mg，共 9 份，各置 10 mL 量瓶中，分别加入有关物质 A 贮备液 0.5、1.0、1.5 mL，并以空白溶剂②溶解并定容，配制有关物质 A 质量浓度为 0.5、1.0、1.5 μg/mL 的低、中、高浓度加样回收溶液，每个浓度各 3 份，精密量取上述低、中、高浓度加样回收溶液 100 μL，按“**2.4.3**”项下柱前衍生化操作，精密量取所得上清液 5 μL，分别进样检测。按面积归一化法计算不同浓度的有关物质 A 的回收率，计算得平均回收率为 100.89%，RSD（*n*=9）小于 6%。

2.4.7 样品测定

分别精密称取 3 批 **1** 样品，用空白溶剂②溶解得到质量浓度为 1 mg/mL 的溶液，按“**2.4.3**”项下柱前衍生化操作，精密量取所得上清液 5 μL 进样检测，记录色谱图。采用面积归一化法计算已知杂质含量。3 批 **1** 样品中有关物质 A 的检测结果如表 3 所示。

3 讨论

3.1 流动相种类的筛选

使用单一的磷酸盐缓冲液作为流动相水相时，有关物质 M、N、P，以及主峰之前存在 1 个未知杂质无法完全分离。在尝试磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、乙二胺四乙酸二钠、磷酸氢二铵、磷酸二氢铵后，以 0.01 mol/L 磷酸氢二钾和 0.01 mol/L 磷酸二氢铵的水溶液为流动相水相，分离度较好。

3.2 梯度洗脱程序的优化

研究过程中发现，高比例有机相的洗脱梯度较缓时，多个杂质出现出峰时间接近甚至共出峰的问题；而有机相洗脱梯度过高，也会出现柱压过高的问题。为了解决分离度问题，进行了多个梯度洗脱条件的优化。当按“**2.3.1**”项下梯度洗脱程序时，可满足各杂质与 **1** 之间的分离。

3.3 流动相 pH 值的筛选

当流动相 pH 值为 7.0 时，有关物质 P 拖尾严重；流动相 pH 值为 3.5 时，多个杂质峰形差；而流动相 pH 值为 4.0 和 6.0 时，**1** 的峰形较好，且有关物质 I 和 D、有关物质 C 和 H 有完全分离趋势。同时在尝试了 pH 4.0 ～ 6.0 中间的多个 pH 值后，结果如图 5 所示。可见，流动相 pH 值降低，有关物质 N 的保留时间后延，与有关物质 P 间的分离度减小；而 pH 值升高，分离度增加，但有关物质 N 峰形拖尾。当流动相 pH 值为 5.5 时，有关物质 N 的峰形及其与有关物质 P 的分离度良好；并且，各杂质间、各杂质与主峰分离度良好。

3.4 有关物质 A 柱前衍生化法及处理方法的选择

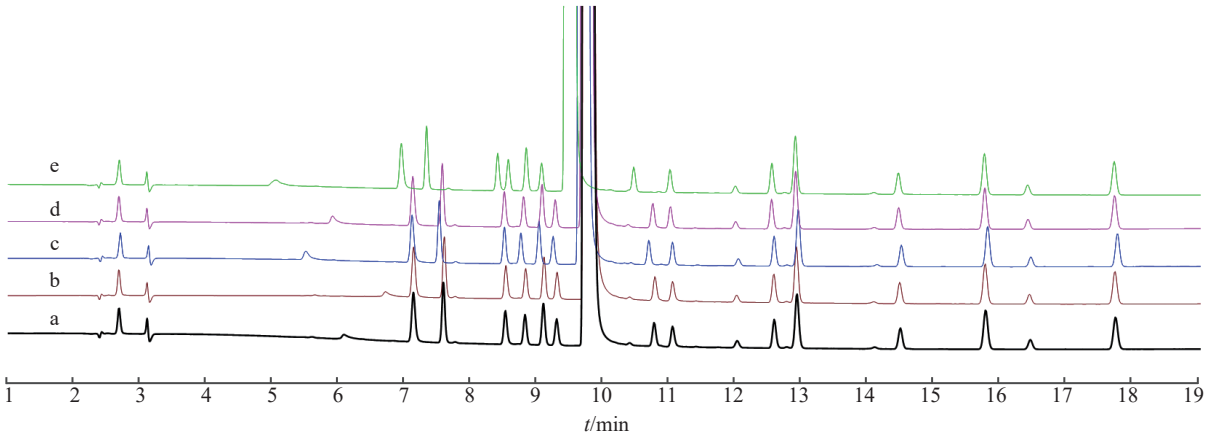
在检测 **1** 及其 *S* 型异构体有关物质 A 时，筛选了大赛璐科技的多种型号手性柱，发现二者分离度不佳，色谱峰严重拖尾。同时，因为 **1** 的有关物质较多，易出现干扰峰，等度洗脱条件下将样品中的

表 3 有关物质测定结果（*n*=3）[1)]/%

Tab.3 Determination Results of Related Substances（*n*=3）/%

化合物	批号			化合物	批号		
	2107001	2108002	2108003		2107001	2108002	2108003
有关物质 A	0.04	0.02	ND	有关物质 J	ND	ND	ND
有关物质 B	ND	ND	ND	有关物质 K	ND	ND	ND
有关物质 C	ND	ND	ND	有关物质 L	ND	ND	ND
有关物质 D	0.01	0.01	0.01	有关物质 M	ND	ND	ND
有关物质 E	0.02	ND	0.01	有关物质 N	ND	ND	ND
有关物质 F	ND	ND	ND	有关物质 O	ND	ND	ND
有关物质 G	0.01	0.02	0.02	有关物质 P	ND	ND	ND
有关物质 H	0.01	0.01	0.01	最大未知单杂	0.11	0.06	0.06
有关物质 I	ND	ND	ND	总杂	0.25	0.15	0.21

注：[1)]“ND”表示未检出。



a—pH 6.0；b—pH 5.0；c—pH 5.5；d—pH 4.5；e—pH 4.8。

图 5　不同流动相 pH 值下的典型色谱图

Fig.5　Typical Chromatogram under Different pH Mobile Phase

所有成分洗脱完全，需要 2 h 以上，效率极低且浪费试剂。因此，参考相关文献[8]，通过衍生化法酶解去除 **1** 和有关物质 A 的磷酸基团，释放其活性醇的 *R*、*S* 构型，即 **4** 和 **4A**，再通过手性 HPLC 法检测。

检测 **4** 和 **4A** 时，筛选出了 OJ-H 柱，同时混合 *N*- 甲基吡咯烷酮和乙醇作为溶媒。酶反应后，不同浓度下 **1** 和有关物质 A 的响应因子有所差异，但同浓度下变化规律保持一致。因此推测与样品处理方式有关，*N*- 甲基吡咯烷酮的加入量过少会导致部分样品无法和酶蛋白分离而被包裹起来，影响测定。对此，进行了不同处理方式的考察。经过对比研究，最终选择供试品溶液 100 μL 加酶反应液 100 μL；浓缩后加入 *N*- 甲基吡咯烷酮 20 μL 超声，再加入乙醇 180 μL 超声的处理方式。此方法下，基线噪声小，不干扰测定，分离度良好，满足各项要求。

参考文献：

[1] 陈本川. 新型抗菌药：特地唑胺磷酸酯 (tedizolid phosphate)[J]. 医药导报, 2014, **33**(12): 1679-1683.

[2] 曾　煌, 张子学, 刘　育, 等. 特地唑胺磷酸酯的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, **47**(12): 1491-1495.

[3] 李　林, 张子学, 陈　华, 等. 磷酸特地唑胺有关物质的合成及结构确证 [J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(5): 589-594.

[4] 战玉芳, 罗兆亮, 张　磊. 磷酸特地唑胺中有关物质的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(5): 749-753.

[5] WARE J A, COSTELLO C A, DUGUID R J, *et al*. Methods for preparing oxazolidinones and comositions containing them: WO, 2010042887 [P]. 2009-10-09.

[6] KATARZYNA M, WERONIKA W, KATARZYNA B, *et al*. The solution and solid-state degradation study followed by identification of tedizolid related compounds in medicinal product by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometry detection [J]. *J Pharm Bio Anal*, 2020, **194**: 113783-113790.

[7] ICH. Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products [EB/OL]. https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/0.

[8] 张　峰, 骆杨丽, 杨谋伟, 等. 一种检测磷酸特地唑胺异构体杂质的方法：中国, 107219312A [P]. 2017-09-29.