

基于高效液相色谱法分析非奈利酮杂质种类及含量

李强森^{1,2} 易明月¹ 刘沐为¹ 沈超² (通讯作者)

1. 浙江树人学院生物与环境工程学院化学系 浙江 杭州 310015

2. 浙江科聚生物医药有限公司 浙江 杭州 310016

【摘要】：本文介绍了一种利用 HPLC 对非奈利酮 (1) 中的相关杂质进行检测的方法。实验中采用了 Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱 (规格为 4.6mm×250mm, 填料粒径 5μm), 并选择 0.02mol 磷酸二氢钾缓冲盐作为流动相 A, 同时以乙腈作为流动相 B 进行梯度洗脱分离。实验数据表明, 该检测手段具备较高的精准度与敏感度, 同时在耐用性、专属性以及线性关系方面表现优异, 能够为非奈利酮原料药的质量评估工作提供坚实可靠的技术保障。

【关键词】：非奈利酮; HPLC; 有关物质; 强制性降解

DOI:10.12417/2705-098X.26.11.047

1 引言

作为一种新型口服的选择性非甾体盐皮质激素受体拮抗剂, 非奈利酮由拜耳公司研发。该药物于 2021 年 7 月 9 日获得美国食品药品监督管理局的批准并上市, 该药物主要用于治疗成人因 II 型糖尿病 (T2D) 引发的慢性肾病 (CKD)^[1]。

专利中关于非奈利酮杂质及其含量的检测方法较为简略: HPLC 仪器类型: HP 1100 系列; UV DAD; 柱: Phenomenex Gemini 3u 30mm×3.00mm; 洗脱液 A: 1 升的水加 0.5 毫升的 50%甲酸, 洗脱液 B: 1 升的乙腈加 0.5 毫升的 50%甲酸; 柱温: 50°C; UV 检测器: 210nm^[2]。因此一种可靠的分析方法对非奈利酮原料药的质量评估显得尤为重要。

本研究探讨了高效液相色谱技术在非奈利酮原料药中杂质分析方面的应用情况。

2 仪器与试剂

2.1 仪器

高效液相色谱仪和万分之一分析天平。

2.2 试剂

本研究中所涉及的相关杂质共计七种, 具体为编号 2 至 8 的物质 (其详细的化学结构可参见图 1), 同时还包含了三批原料药样品, 其批号依次为 241101、241102 以及 231103。实验中使用的对照品包括: 非奈利酮对照品 (纯度 99.8%), 2 的对照品 (纯度 97.5%), 3 的对照品 (纯度 96.8%), 4 的对照品 (纯度 97.2%), 5 的对照品 (纯度 95.8%), 6 的对照品 (纯度 96.6%), 7 的对照品 (纯度 99.0%), 8 的对照品 (纯度 97.1%), 上述对照品均来自浙江科聚生物医药有限公司。乙腈 (HPLC); 超纯水, 磷酸二氢钾 (AR), 氢氧化钾 (AR)。

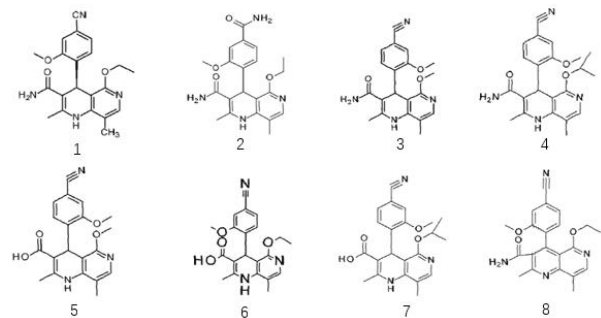


图 1 非奈利酮 1 及其杂质 2-8 的结构

3 检测方法和试液制备

3.1 色谱条件

实验选用的色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18 柱。流动相 A 为磷酸盐缓冲溶液, 其具体制备方法为在 1000mL 蒸馏水中加入 20mmol 的磷酸二氢钾, 随后用 10%氢氧化钾溶液调节溶液的 pH 值至 7.0; 流动相 B 则选用乙腈, 梯度洗脱的条件设定如下: 在 1 至 3 分钟的时间段内, 流动相 A 的比例保持在 90%; 3 至 35 分钟, A90%变到 20%; 35 至 40 分钟, A20%; 40 至 41min, A20%变到 90%; 41 至 50 分钟, A90%; 流速 1.0mL/min; 检测波长 255nm, 柱温 30°C; 进样量 5μL。

3.2 溶液配置

A、空白溶液: 乙腈

B、2~8 对照品储备液: 分别精密称取杂质 2~8 对照品适量, 各加入适量乙腈溶解, 制成约 0.5mg/mL。

C、2~8 对照品溶液: 精密量取 B 适量, 分别用乙腈稀释成每约 1μg/mL。

D、混合杂质对照品储备液: 精密量取 B 适量, 用乙腈稀释成约 20μg/mL。

作者简介: 李强森, 男 (1982 年 12 月), 汉, 浙江省杭州市, 本科, 中级工程师, 研究方向: 质量管理、色谱分析。

通讯作者: 沈超, 男 (1983 年 5 月) 汉, 浙江省杭州市, 博士, 教授, 研究方向: 有机合成、药物化学。

E、混合杂质对照品溶液：精密量取 D 适量，用乙腈稀释成约 1 μ g/mL。

F、适用性溶液：精密称取 1 对照品 50mg，置 100ml 容量瓶中，加入适量乙腈溶解，并精密加入 D 5mL，用乙腈稀释至刻度，摇匀即得。

G、供试品溶液：精密称取适量非奈利酮原料药，加入适量乙腈溶解，制成约 1mg/mL 供试品溶液。

H、加标供试品溶液：精密称取 100mg 非奈利酮原料药，加入适量乙腈溶解，并精密 D 5mL，用乙腈稀释至刻度，摇匀即得。

4 试验与分析

4.1 系统适应性试验和专属性试验

实验过程中，需依次对空白溶液、系统适用性溶液、混合杂质对照品溶液及加标供试品溶液进行处理，按照指定的色谱分析条件完成进样操作并记录相应的色谱图谱。经检测发现，空白溶液不会对测定过程产生干扰，并且各检测峰之间的分离度均达到规定标准。

4.2 强制性降解试验

准确称取六份 50 毫克的样品，每份样品将按如下步骤操作：未受破坏：采用乙腈进行溶解后定容至 50mL，充分摇匀；酸破坏：加入 0.1mol/L 盐酸溶液 5mL，于常温条件下静置 24 小时，随后加入 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 5mL 进行中和处理，接着用乙腈溶解并定容至 50mL，充分摇匀；碱破坏则是取 5mL 浓度为 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液，在室温条件下静置 24 小时，之后添加 5mL 浓度为 0.1mol/L 的盐酸溶液进行中和处理，接着用乙腈溶解并定容至 50mL，充分摇匀；氧化破坏：取适量样品，加入 30%过氧化氢溶液 5mL，在室温条件下静置 24 小时，之后用乙腈进行溶解并定容至 50mL，充分摇匀；光照破坏：固体样品需置于光照强度 (4500 \pm 500) lx 的光照稳定箱内持续 24 小时，随后与未破坏样品一样稀释；高温破坏：将固体样品铺平放置在 80 $^{\circ}$ C 烘箱中 24h，再用乙腈溶解并定容至 50mL，摇匀。对已进行破坏性处理的样品进行检测时，需依照“3.1”章节所规定的色谱分析参数开展实验操作。在此过程中，将运用 DAD 对样品的紫外吸收光谱进行扫描，扫描的波长范围设定为 190 至 500nm，同时对分离后的各组分色谱图进行记录。实验数据显示，化合物 1 在遭遇酸性或碱性环境时，其结构会发生分解，进而产生杂质 2 以及若干新的未知杂质；在氧化破坏环境中，其会分解产生杂质 2 以及较多的未知杂质；而在光照与高温的破坏实验中，虽未观察到新的杂质生成，但杂质 8 的含量却出现了不同程度的增加。值得注意的是，各破坏条件下生成的降解产物与目标物质均能有效分离，同时与已知杂质之间也具备良好的分离效果。从峰纯度的检测结果来看，在各项破坏性试验所记录的色谱图形中，目标物 1 均呈

现为独立的色谱峰，其峰纯度数值超过了 990。从上述实验数据可以看出，该方法具备较强的专属性，能够对样品里的降解产物进行有效识别与检测。

4.3 检测限和定量限

实验中，需先对“3.2”所述的混合杂质对照品储备液进行处理，采用乙腈进行逐步稀释操作，随后进行进样检测与分析，通过测定信噪比 (S/N) 分别达到 3 和 10 时的情况，进而计算出检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果如表 1 所示。

4.4 线性和范围

取“3.2”中的混合杂质对照品储备液，采用乙腈进行定量稀释操作，制备成包含各有关杂质定量限 (LOQ)、50%、100%、150%、200%浓度水平的溶液。随后，按照“3.1”章节规定的色谱分析条件对上述溶液进行检测，并对获得的峰面积数据进行记录。随后，将所记录的峰面积 (以 A 表示) 作为纵轴变量，对应的质量浓度 (以 c 表示) 作为横轴变量，进行线性回归分析。基于上述线性回归分析，各杂质 2 至 8 的回归方程、相关系数 (r)、线性范围、检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ) 的具体数据汇总于表 1 中。

表 1 线性试验结果

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围, μ g/mL	LOD, μ g/mL	LOQ, μ g/mL
2	$A=11.216c+0.1255$	0.9997	0.36~2.01	0.12	0.36
3	$A=13.983c+0.2305$	0.9993	0.30~2.03	0.10	0.30
4	$A=15.046c+0.0169$	0.9994	0.33~2.02	0.11	0.33
5	$A=15.479c+0.0229$	0.9996	0.30~2.02	0.12	0.36
6	$A=12.718c+0.0627$	0.9995	0.30~2.00	0.10	0.30
7	$A=11.455c+0.0282$	0.9994	0.39~2.02	0.13	0.39
8	$A=18.271c+0.1247$	0.9997	0.27~2.03	0.09	0.27

4.5 准确度试验

取原料药 1 (批号 241101) 50mg 共 9 份，精密置于 50mL 容量瓶中，随后向各容量瓶中加入“3.2”项下混合杂质对照品储备液的适宜体积，再以乙腈定容至刻度，从而制备出低、中、高三个浓度梯度 (分别为 50%、100%和 150%) 的加标溶液，每个浓度梯度设置 3 份平行样，同时另取 2 份容量瓶仅用乙腈定容作为不含杂质的对照溶液。随后，采用“3.1”项下的色谱分析条件进行检测，并运用外标法对杂质 2 至 10 的回收率进行计算。结果显示，杂质 2~10 的平均回收率 (n=9) 分别为 95.5%、96.3%、103.5%、96.9%、98.1%、104.9%、97.6%；RSD 分别为 4.4%、6.3%、4.9%、3.8%、5.1%、5.6%、6.6%。说明该方法的准确度良好。

4.6 精密度试验

(1) 重复性试验：为开展重复性试验，需依据“4.4”章

节中关于中浓度水平（即 100%各杂质限度）溶液的制备要求，平行制备六份样品溶液，从而获得试验所需的重复样本。随后，依据“3.1”部分规定的色谱操作条件对上述溶液进行定量分析，计算每份溶液中单个杂质及总杂质的百分含量，并进一步统计这些含量数据的相对标准偏差。结果如表 2 所示，说明该方法重复性良好。

（2）中间精密度试验：在不同的实验条件下，包括由不同操作人员、采用不同检测设备以及在不同时间点，对同一批次的“4.5.1”样品开展分析工作。随后，依据“3.1”章节规定的色谱分析条件对这些溶液进行检测，分别算出单个杂质与总杂质的含量数值，并进一步计算出相应的相对标准偏差（RSD）。结果见表 2。对 12 个样品实施检测后的数据显示，此分析方法具备优良的精密特性。

表 2 中间精密度试验结果

仪器/人员	仪器 A/人员 A(n=6)	仪器 B/人员 B(n=6)	12 份样品
2RSD,%	3.9	4.6	4.3
3RSD,%	4.1	3.8	3.9
4RSD,%	5.1	5.7	5.5
5RSD,%	5.5	5.1	5.3
6RSD,%	3.3	4.9	4.5
7RSD,%	4.0	6.2	5.3
8RSD,%	5.3	3.5	4.6
总杂质 RSD,%	4.7	5.3	5.1

4.7 溶液稳定性考察试验

实验过程中，将“3.2”章节所制备的供试品溶液及混合杂质对照品溶液置于室温环境并避免光照，随后在 0、2、6、12、24 小时这几个时间节点分别进行进样操作。实验数据显示，在室温避光条件下，供试品溶液经过 24 小时的放置后，其已知杂质及最大未知单杂的峰面积均未出现显著波动，证实该溶液具备良好的稳定性。

4.8 样品测试

在优化好的色谱分析条件下，研究人员对三批非奈利酮原料药样品中的各个有关物质进行了系统检测。该实验中，杂质 2 至 8 的含量通过外标法进行测定，而其他未明确标识的杂质则采用面积归一化法来计算其占比，具体数据结果呈现于表 3 中。

表 3 样品检测结果

批号	241101,%	241102,%	241103,%
2	未检出	未检出	未检出
3	0.01	0.01	0.01
4	0.05	0.04	0.06
5	未检出	未检出	未检出
6	未检出	未检出	未检出
7	0.01	未检出	0.01
8	0.01	0.01	0.01
未知最大单杂	0.02	0.02	0.02
总杂质	0.13	0.11	0.14

5 讨论

5.1 色谱条件

实验过程中，研究人员运用 DAD 对目标物质 1 及其各类杂质开展了全波长范围的光谱扫描。分析各对照品溶液的图谱数据后发现，目标物质 1 与所有杂质在 255nm 的波长条件下均呈现出较强的吸收特性，因此，255nm 被确定为该杂质分析检测的适宜波长。

在进行色谱柱的选择实验过程中，研究人员重点评估了 Zorbax Eclipse XDB-C18、Zorbax SB-C18、Zorbax RX-C18 这三种固定相在分离目标物 1 及其相关杂质时的表现，包括保留行为和分离效果等关键指标。通过系统对比分析，结果显示 Zorbax SB-C18 色谱柱在保留时间控制、分离度数值以及色谱峰形状等方面均展现出最佳性能。

在筛选流动相体系的过程中，研究人员对乙酸铵与乙腈、磷酸二氢钾和乙腈等多种组合进行了试验分析，结果表明当采用 pH 值设定为 7.0 的磷酸二氢钾水溶液与乙腈作为流动相时，目标物质的色谱峰形态更为理想，各组分之间的分离效果也达到最佳状态。

5.2 小结

本研究采用高效液相色谱技术，对非奈利酮原料药中的相关杂质进行了检测与分析。该检测方法的系统适用性、专属性、线性、线性范围、检测限和定量限、准确度、精密度、耐用性及溶液稳定性等指标均符合 ICH 标准中对方法学验证的各项规定，为非奈利酮原料药质量的科学评价提供了坚实的技术保障。

参考文献：

- [1] BAKRIS G L, AGARWAL R, ANKER S D, et al. Effect of finerenone on chronic kidney disease outcomes in type 2 diabetes. [J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 383(23): 2219-2229.
- [2] 拜耳知识产权有限责任公司. 取代的 4-芳基-1,4-二氢-1,6-萘啶酰胺和其用途 [P]. 中国专利. CN 101641352 B. 2013.11.20.