

引用本文:黄美容,曹阳,黄顺旺,等.高效液相色谱法测定盐酸伐地那非原料药中的有关物质[J].安徽医药,2021,25(7):1290-1294.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.005.



◇ 药物分析 ◇

## 高效液相色谱法测定盐酸伐地那非原料药中的有关物质

黄美容,曹阳,黄顺旺,曹明成

作者单位:合肥创新医药技术有限公司,安徽 合肥 230088

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法(HPLC)测定盐酸伐地那非中的有关物质。**方法** 采用反相HPLC,色谱柱为Agilent HC-C<sub>18</sub>(2),流动相A为0.5%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0)-乙腈(90:10),流动相B为0.5%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0)-乙腈(10:90),梯度洗脱,检测波长242 nm,以外标法计算已知杂质的含量,主成分自身对照法计算未知杂质的含量。**结果** 盐酸伐地那非和杂质A、B、C、D、E、F、G 7个已知杂质的分离度均符合要求( $\geq 1.5$ );盐酸伐地那非与7个杂质的浓度与峰面积呈良好的线性关系,相关系数均在0.998以上;杂质A、B、C、D、E、F、G杂质的平均回收率分别为99.8%、101.6%、102.4%、99.5%、100.5%、101.7%、103.6%,在99.5%~103.6%范围内,RSD分别为1.8%、0.6%、1.2%、1.4%、0.9%、1.5%、0.9%,均 $< 2\%$ 。**结论** 该方法准确、灵敏、精密度高,可定量分析7个工艺杂质和降解杂质,可作为盐酸伐地那非原料有关物质的检测方法。

**关键词:** 伐地那非; 色谱法,高压液相; 药物污染; 主成分分析

### Determination of related substances in Vardenafil hydrochloride by HPLC

HUANG Meirong, CAO Yang, HUANG Shunwang, CAO Mingcheng

Author Affiliation: Hefei Innovative Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088, China

**Abstract:** **Objective** To establish HPLC method for the determination of the related substances in Vardenafil hydrochloride. **Methods** An RP-HPLC method was used, the column was Agilent HC-C<sub>18</sub>(2), the mobile phase A was 0.5% triethylamine solution (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid)-acetonitrile(90:10), the mobile phase B was 0.5% triethylamine solution (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid)-acetonitrile(10:90), gradient elution, detection wavelength 242 nm. The content of known impurities was calculated by external standard method, and the content of unknown impurities was calculated by principal component self-control method. **Results** The separation of Vardenafil hydrochloride and seven known impurities A, B, C, D, E, F and G all met the requirements ( $\geq 1.5$ ); there was a good linear relationship between the concentration and peak area of vardenafil hydrochloride and seven impurities, and the correlation coefficients were all above 0.998; The average recoveries of impurities A, B, C, D, E, F and G were 99.8%, 101.6%, 102.4%, 99.5%, 100.5%, 101.7% and 103.6%, respectively. Within the range of 99.5% - 103.6%, RSD were 1.8%, 0.6%, 1.2%, 1.4%, 0.9%, 1.5% and 0.9%, respectively, all less than 2%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and precise. It can be used for the quantitative analysis of seven process impurities and degradation impurities. It can be used for the determination of related substances in vardenafil hydrochloride.

**Key words:** Vardenafil; Chromatography, high pressure liquid; Drug contamination; Principal component analysis

盐酸伐地那非,英文名为 Vardenafil hydrochloride, CAS:224785-91-5,化学名为2-[2-乙氧基-5-(4-乙基-哌嗪-1-磺酰基)苯基]-5-甲基-7-丙基-3H-咪唑[5,1-f]-[1,2,4]三联氮-4-酮单盐酸盐,于2003年8月在美国获得批准上市,它是由德国拜耳和葛兰素史克公司共同开发研制,伐地那非对PDE5的抑制作用远远高于对其他PDE的作用(高于PDE6的1.5倍,PDE1的130倍,PDE11的300倍)。适应症:治疗男性阴茎勃起功能障碍(ED),其作用机制是通过抑制人体阴茎海绵体内降解cGMP的磷酸二酯酶5型(PDE5),增加性刺激作用下海绵体局部内源性的一氧化氮的释放,使得平滑肌松弛,增加人体阴茎海绵体血流,最终作用于阴茎海绵体,使海绵体平滑

肌舒张,促进勃起<sup>[1-4]</sup>。最新文献报道,伐地那非还具有治疗慢性前列腺炎、肺动脉高压等作用<sup>[5-11]</sup>。

盐酸伐地那非的合成是以邻乙氧基苯甲脒盐酸盐、N-乙基哌嗪等为起始物料,经过取代、缩合、环合、磺酰化、取代和成盐等一系列化学反应制成盐酸伐地那非<sup>[12-15]</sup>。本实验结合合成工艺路线及降解途径分析,对以下杂质进行定量研究。

目前,国内相关文献报道<sup>[16-19]</sup>,均是采用乙腈-醋酸铵溶液体系,测定盐酸伐地那非原料药及制剂中的有关物质且最多控制了5个已知杂质(杂质A、杂质B、杂质C、杂质F、杂质G,各杂质结构见图1)。本实验采用乙腈-磷酸三乙胺缓冲液体系,新增了2个杂质(杂质D、杂质E,杂质结构见图1),进行梯度

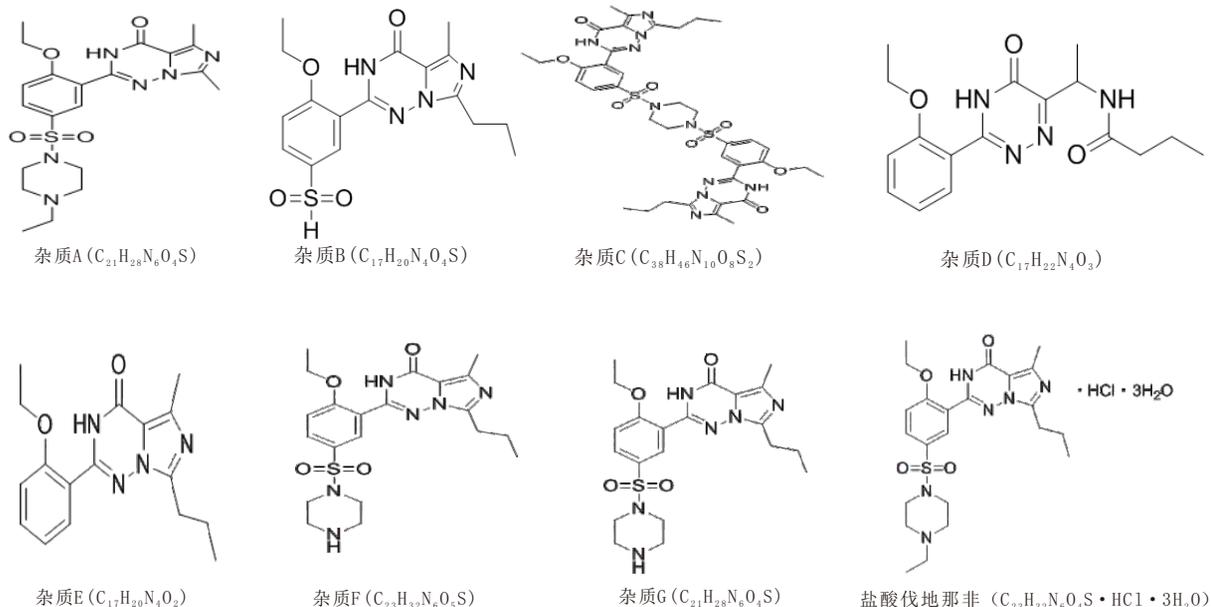


图1 盐酸伐地那非及各杂质结构示意图

洗脱,结果7个杂质峰之间、杂质与主成分(盐酸伐地那非结构见图1)峰之间的分离度均符合要求( $\geq 1.5$ ),其灵敏度好、准确度高,可作为原料药有关物质检查的测定方法。该研究尚未见文献报道。

## 1 仪器与试药

仪器:AG135电子天平、XP-6电子天平(METTLER TOLEDO);LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-20A检测器,SIL-20AC进样器,岛津LabSolutions DB Essentia 工作站。试药:盐酸伐地那非对照品(批次20190301-J,99.7%)、杂质A(批次20190101,98.6%)、杂质B(批次20190112,98.4%)、杂质C(批次20190124,98.2%)、杂质D(批次20181214,98.4%)、杂质E(批次20181226,97.6%)、杂质F(批次20181206,99.2%)、杂质G(批次20181025,96.8%);盐酸伐地那非原料(批次20190501、20190502、20190503),以上对照品及供试品均来源于合肥创新医药技术有限公司。除乙腈、三乙胺为色谱纯、水为超纯水外,其他均为分析纯。

## 2 实验方法

**2.1 溶液的制备** 混合杂质对照品溶液:精密称取杂质A、B、C、D、E、F、G各约5 mg,置同一50 mL容量瓶中,加乙腈适量振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为混合杂质对照品贮备液;精密量取0.3 mL置100 mL量瓶中,加流动相A稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液:取盐酸伐地那非原料适量,精密称取20 mg,置100 mL量瓶中,加流动相A适量振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。1%对照溶液:

精密量取上述供试品溶液1 mL,置100 mL量瓶中,加流动相A稀释至刻度,摇匀,即得。

系统适用性溶液:精密称取盐酸伐地那非对照品约20 mg,置100 mL量瓶中,再精密量取杂质对照品贮备溶液0.3 mL,置同一100 mL量瓶中,加流动相A适量振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2 色谱条件及系统适用性** 流动相A:0.5%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0)-乙腈(90:10),流动相B:0.5%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0)-乙腈(10:90),Agilent C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温40 ℃;检测波长242 nm;流速1.0 mL/min;进样量20 μL;采用梯度洗脱,洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	90	10
15	70	30
20	70	30
30	10	90
40	10	90
40.1	90	10
50	90	10

精密称取杂质A、B、C、D、E、F、G适量,分别制备各杂质的对照品溶液,精密量取20 μL,注入液相色谱仪,进行定位,再进注系统适用性溶液进行液相色谱分析。见图2,3。

系统适用性溶液中各已知杂质峰之间及与主成分峰与相邻杂质峰之间的分离度均符合要求( $\geq 1.5$ )。

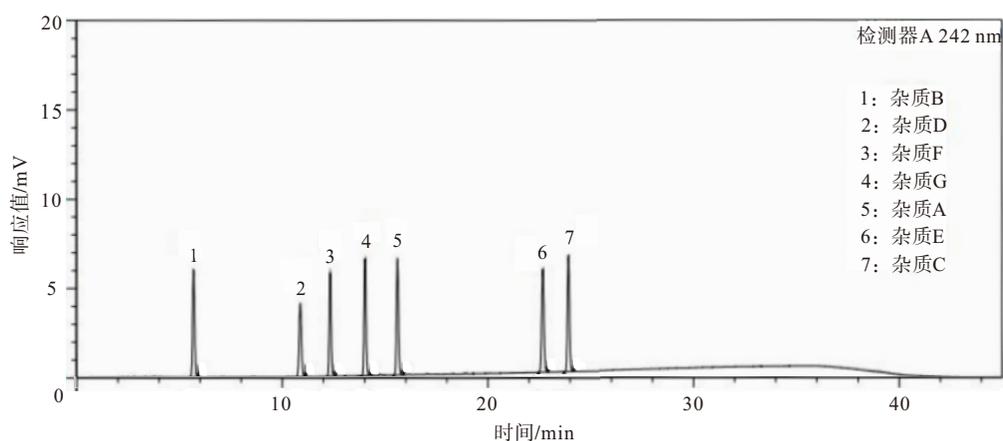


图2 各杂质定位色谱图

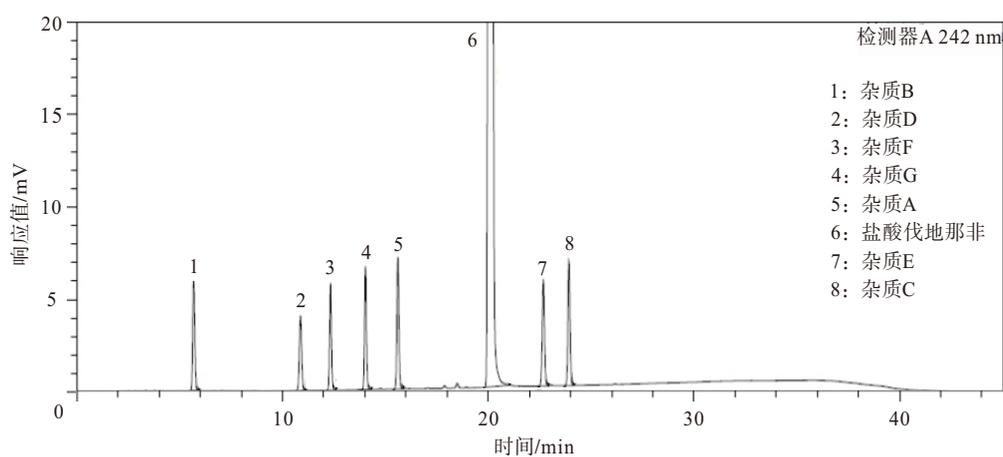


图3 系统适用性实验色谱图

### 3 实验结果

**3.1 专属性** 精密称取盐酸伐地那非原料约 20 mg, 6 份, 分别置 100 mL 量瓶中, 其中 1 份作为破坏对照, 另外 5 份分别进行 60 °C 高温破坏 10 d、光照 (4 500±500)lx 破坏 10 d、3% 过氧化氢溶液 (1 mL) 破坏 4 h、1 mol/L 盐酸溶液 (1 mL) 60 °C 水浴破坏 8 h、1 mol/L 氢氧化钠溶液 (1 mL) 60 °C 水浴破坏 8 h, 酸、碱破坏结束时分别加等量的碱、酸进行中和, 再用流动相 A 适量振摇使溶解并稀释至刻度, 摇匀。按“2.2”项下色谱条件进样分析。结果表明, 本品在高温、光照、酸、碱破坏条件下较稳定, 仅产生少量的降解杂质; 氧化破坏条件下不稳定, 能产生明显的降解杂质。高温、光照、酸、碱、氧化破坏色谱图显示, 本品主成分峰与相邻杂质峰之间分离度良好 ( $\geq 1.5$ ), 主成分峰纯度因子符合要求, 破坏前后物料基本守恒。

**3.2 定量限、检测限、线性范围与校正因子** 精密量取“2.1”项下的混合杂质对照品贮备液, 加流动相 A 稀释制成 0.04~1.00  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围的一系列混合对照品溶液, 精密量取 20  $\mu\text{L}$ , 注入色谱仪, 记录色谱图。以各成分的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标 (X), 峰

面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 并以回归方程的斜率计算各已知杂质相对于盐酸伐地那非的校正因子 (RCF), 同时测定各成分的定量限与检测限, 结果见表 2。

**3.3 重复性** 取盐酸伐地那非原料约 20 mg, 精密称定, 6 份, 按“2.1”项下供试品溶液制备方法制备, 在“2.2”色谱条件下进行测定, 以外标法计算已知杂质的含量, 主成分自身对照法计算未知杂质的含量, 结果单杂含量 ( $\geq 0.05\%$ ) 的 RSD 均  $< 10\%$  ( $n=6$ ), 总杂含量的 RSD 均  $< 5\%$  ( $n=6$ )。

**3.4 中间精密度** 由另一人, 取盐酸伐地那非原料约 20 mg, 精密称定, 6 份, 按“2.1”项下供试品溶液制备方法制备, 换另一台液相色谱仪, 在“2.2”色谱条件下进行测定, 以外标法计算已知杂质的含量, 主成分自身对照法计算未知杂质的含量, 结果单杂含量 ( $\geq 0.05\%$ ) 的 RSD 均  $< 15\%$  ( $n=12$ ), 总杂含量的 RSD 均  $< 10\%$  ( $n=12$ )。

**3.5 准确度** 精密称取盐酸伐地那非原料约 20 mg, 9 份, 每 3 份分别精密加入 2.1 项下的混合杂质对照品贮备液 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL, 按“2.1”项下供试品溶液制备方法制成低、中、高浓度的加样供

表2 盐酸伐地那非有关物质线性和校正因子

成分	线性范围/( $\mu\text{g/mL}$ )	回归方程	相关系数	校正因子	定量限/ng	检测限/ng
盐酸伐地那非	0.12~3.52	$\hat{y}=61\ 650x-1\ 432.6$	0.999 8		0.3	0.1
杂质A	0.15~3.77	$\hat{y}=62\ 424x+439.21$	0.999 9	1.0	0.4	0.1
杂质B	0.13~4.06	$\hat{y}=58\ 819x+432.92$	0.999 7	0.9	0.3	0.1
杂质C	0.12~3.85	$\hat{y}=58\ 220x-1\ 535.9$	0.999 5	0.9	0.3	0.1
杂质D	0.16~4.21	$\hat{y}=61\ 789x-904.34$	0.999 9	1.0	0.3	0.1
杂质E	0.11~4.03	$\hat{y}=64\ 252x-1\ 364.8$	0.999 6	1.0	0.5	0.2
杂质F	0.13~4.12	$\hat{y}=59\ 834x-1\ 210.8$	0.999 1	1.0	0.3	0.1
杂质G	0.10~3.96	$\hat{y}=62\ 322x-1\ 042.5$	0.999 3	1.0	0.4	0.1

试品溶液,精密量取 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算各已知杂质的回收率,杂质 A、B、C、D、E、F、G 的平均回收率分别为 99.8%、101.6%、102.4%、99.5%、100.5%、101.7%、103.6%,在 99.5%~103.6% 范围内,RSD 分别为 1.8%、0.6%、1.2%、1.4%、0.9%、1.5%、0.9%,均<2%。

**3.6 溶液稳定性** 按“2.1”项下制备混合杂质对照品溶液与供试品溶液,25  $^{\circ}\text{C}$  放置,分别于 0、2、4、8、12、24、48h 精密量取 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,记录色谱图,实验结果表明:混合杂质对照品溶液各测定时间点的单个杂质峰面积与 0 h 比较,其相对平均偏差均小于 2%;供试品溶液各测定时间点的单个杂质峰面积与 0 h 比较,大于 0.05% 的单个杂质峰面积的相对平均偏差均小于 5%,且无新的降解杂质产生。

**3.7 耐用性** 分别调整柱温(40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长(242 $\pm$ 2)nm、流速(1.0 $\pm$ 0.05)mL/min 及 pH(3.0 $\pm$ 0.2),同时更换不同品牌的色谱柱,考察色谱条件参数的变化对系统适用性溶液中杂质与主成分之间分离度的影响。实验结果表明,柱温、波长、流速及 pH、不同品牌的色谱柱等参数的变化对系统适用性测定结果无影响,即盐酸伐地那非和杂质 A、B、C、D、E、F、G 7 个已知杂质的分离度均符合要求( $\geq$ 1.5),方法的耐用性良好。

**3.8 样品测定** 按 2.2 项下的色谱条件及方法,对 3 批盐酸伐地那非原料进行有关物质测定,以外标法计算已知杂质的含量,主成分自身对照法计算未知杂质的含量,结果见表 3。

#### 4 讨论

进口药品注册标准 JX20030240 中收录了 3 个已知杂质,分别为硫代二噁酮酸-N-氧化物(Bay40-7424)、代谢物-1(Bay44-5576)。本研究在进口药品注册标准 JX20030240 的基础上,结合盐酸伐地那非的合成工艺路线,增加了中间体、反应副产物等工艺杂质的定量研究。另外,进口药品注册标准

表3 盐酸伐地那非有关物质检测结果/%

批号	20190501	20190502	20190503
杂质A	0.06	0.03	0.05
杂质B	0.08	0.02	0.05
杂质C	ND	0.07	0.04
杂质D	0.05	—	0.04
杂质E	ND	0.07	0.07
杂质M	0.06	ND	ND
最大未知单杂	0.02	0.03	0.05
总杂	0.31	0.25	0.25

注:“—”代表未检出。

JX20030240 中流动相体系为醋酸铵缓冲液-乙腈,其缓冲盐浓度较高,盐酸伐地那非主峰与杂质 A 分离度未达到 1.5;为了改善杂质与杂质、杂质与主成分峰之间的分离度,本实验采用常规的 C18 柱(l=0.25 m,  $\Phi$ =4.6 mm)、乙腈-磷酸三乙胺缓冲液体系,进行色谱条件的筛选优化,最终确定梯度洗脱色谱条件,结果各杂质峰及主成分峰的峰形良好(拖尾因子均在 0.8~1.2 之间),分离度均符合要求( $\geq$ 1.5),色谱条件的耐用性良好,方法准确、灵敏、精密度良好,可作为盐酸伐地那非原料药有关物质的检测方法。

#### 参考文献

- [1] BURNETT AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology[J]. J Urol, 1997, 157(1): 320-324.
- [2] 李文华. 十一酸睾酮联合伐地那非治疗糖尿病性勃起功能障碍效果观察[J]. 中国乡村医药, 2017, 24(10): 14-15.
- [3] 时群峰, 冯亮. 持续口服盐酸伐地那非治疗勃起功能障碍的临床分析[J]. 江西医药, 2010, 45(8): 786-787.
- [4] WANG H, GUO B, HUANG Z, et al. Vardenafil in the treatment of male erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis[J]. Adv Ther, 2021, 38(2): 1301-1313.
- [5] 夏康, 庞然, 莫君甫, 等. 癧清片联合伐地那非治疗 III B 型慢性前列腺炎伴勃起功能障碍的临床研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(14): 2298-2301.
- [6] 周俊, 陈如, 马锋. 补肾填精汤联合伐地那非降阶梯治疗慢性前列腺炎合并勃起功能障碍疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(12): 1327-1330.

- [7] 甘雄, 王文茜, 方利娟, 等. 5型磷酸二酯酶抑制剂治疗肺动脉高压的网状 meta 分析[J]. 中南药学, 2021, 19(2): 331-337.
- [8] 姜栋, 张宇佳, 郑稳生. 伐地那非治疗儿童肺动脉高压研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(19): 2194-2199.
- [9] GAO C, LIU J, ZHANG R, et al. The efficacy of bosentan combined with vardenafil in the treatment of postoperative pulmonary hypertension in children with congenital heart disease: a protocol of randomized controlled trial [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(1): e23896. DOI: 10.1097/MD.00000000000023896.
- [10] JIANG D, TAN H, ZHANG R, et al. Borneol-mediated vardenafil hydrochloride patch for pediatric pulmonary arterial hypertension: Preparation, characterization and in vivo study [J]. *Int J Pharm*, 2020, 591: 119864. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119864.
- [11] 陈泽鹏, 余晓霞, 陈楚雄, 等. 伐地那非治疗肺动脉高压超药品说明书用法循证评价[J]. 今日药学, 2020, 30(6): 381-384, 393.
- [12] 李成文, 刘新泳. 伐地那非合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(2): 212-214.
- [13] 毛冀川. 甾体1,2位氧化消除脱氢反应及伐地那非合成工艺研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2017.
- [14] 刘志瑞, 李晓利, 吕佩, 等. 伐地那非的合成工艺改进[J]. 合成化学, 2016, 24(12): 1094-1097.
- [15] 肖江, 王向峰, 雷玉萍, 等. 伐地那非及其杂质的合成及工艺研究[J]. 化学工程与装备, 2015, (12): 13-16.
- [16] 周雨华, 汤丹, 周金花, 等. 盐酸伐地那非口腔崩解片有关物质的研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(20): 1790-1794.
- [17] 吴川彦, 罗霞. HPLC-CAD法测定伐地那非原料药的含量及有关物质[J]. 中国药师, 2018, 21(12): 2251-2254.
- [18] 国家药监局. 国家进口药品注册标准(JX20030240): 盐酸伐地那非片[S]. 北京: 国家药监局, 2003.
- [19] 袁静雨. 保健品中PDE-5抑制剂的液相色谱高灵敏检测研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.

(收稿日期: 2019-12-20, 修回日期: 2020-01-08)

引用本文: 廖梅. 基于偏最小二乘回归法分析药用紫草抗肿瘤谱效关系[J]. 安徽医药, 2021, 25(7): 1294-1301.  
DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.006.



◇ 药物分析 ◇

## 基于偏最小二乘回归法分析药用紫草抗肿瘤谱效关系

廖梅

作者单位: 嘉应学院医学院, 广东 梅州 514031

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(U1603104); 广东省中医药局科研项目(20171267, 20181259);

广东省教育厅项目(2018KTSCX211); 梅州市社会发展科技计划项目(2017B069)

**摘要:** 目的 研究药用紫草高效液相色谱-质谱-多反应监测(UHPLC-QTRAP-MS/MS(MRM))特征轮廓谱与抗肿瘤活性的谱效关系, 为明确紫草抗肿瘤作用物质基础提供依据。方法 (2018年5月至2019年12月, 数据来源于嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所) 采用UHPLC-QTRAP-MS/MS(MRM)技术建立药用紫草的特征轮廓谱, 以A549细胞抑制率为药效指标, 采用偏最小二乘回归法分析其谱效关系, 并对部分化合物进行活性验证。结果 分析辨识了24个与紫草抗肿瘤作用具有重要影响的成分, 其作用相关性由高到低依次为峰59、9、66、32、62、45、46、58、43、71、13、63、41、44、5、39、34、65、49、21、12、3、22和60。验证结果显示紫草呋喃A(19.86±0.55) μmol/L、紫草素(1.10±0.05) μmol/L、紫草呋喃E(22.60±0.92) μmol/L、乙酰紫草素(2.53±0.11) μmol/L、去氧紫草素(5.43±0.24) μmol/L、异丁酰紫草素(2.16±0.10) μmol/L、β,β-二甲基丙烯酰紫草素(3.50±0.16) μmol/L和α-甲基丁酰紫草素(0.74±0.03) μmol/L对A549细胞均有一定抑制作用, 其IC<sub>50</sub>值为0.74~22.60 μmol/L, 而阳性药紫杉醇的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>值)为(3.45±0.16) μmol/L。结论 紫草的抗肿瘤药效是多种成分共同作用的结果, 该研究初步明确了紫草抗肿瘤药效物质基础, 为紫草后续研究和开发提供了科学依据。

**关键词:** 紫草; 高效液相色谱-质谱-多反应监测; 偏最小二乘回归; 抗肿瘤活性; 谱效关系

### Antitumor spectrum effect relationship of medicinal *Zicao* based on partial least squares regression analysis

LIAO Mei

Author Affiliation: School of Medicine, Jiaying University, Meizhou, Guang dong 514031, China

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between the UHPLC-QTRAP-MS/MS (MRM) characteristic chemical profile and anti-tumor effect, and to provide a basis for clarifying the material basis of anti-tumor effect of medicinal *Zicao*. **Methods** The characteristic chemical profile of medicinal *Zicao* from different habitats was established by UHPLC-QTRAP-MS/MS (MRM) technology (Data