

HPLC测定非萘利酮片中非萘利酮的含量

熊俊龙, 毕金御

浙江树人学院生物与环境工程学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2024年7月21日; 录用日期: 2024年8月12日; 发布日期: 2024年8月23日

摘要

目的: 建立非萘利酮片中非萘利酮的含量测定。方法: 色谱柱为和谱科学AceChrom AQ C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.03 mol/L的醋酸铵水溶液(45:55), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为255 nm, 柱温为35°C。结论: 非萘利酮浓度在2~100 mg/L范围内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。本实验采用高效液相色谱法对非萘利酮的含量进行了研究, 为其质量控制提供了快速、有效的分析手段。该方法准确可靠, 操作简便易行, 可作为非萘利酮片的质量控制方法。

关键词

高效液相色谱法, 非萘利酮片, 非萘利酮

Determination of Finerenone in Finerenone Tablets by HPLC

Junlong Xiong, Jinyu Bi

College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou Zhejiang

Received: Jul. 21st, 2024; accepted: Aug. 12th, 2024; published: Aug. 23rd, 2024

Abstract

Objective: To establish the determination of finerenone in finerenone tablets. **Methods:** The determination was performed on AceChrom AQ C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol-0.03 mol/L ammonium acetate aqueous solution (45:55) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 255 nm. The column temperature was 35°C. **Conclusion:** The concentration of finalidone in the range of 2~100 mg/L has a good linear relationship with the peak area, and the correlation coefficient $R^2 = 0.9998$. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to study the content of finalidone, which provided a rapid and effective method for quality

control. The method is accurate, reliable, easy to operate, and can be used as a quality control method for finalidone tablets.

Keywords

High-Performance Liquid Chromatography, Finerenone Tablets, Finerenone

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

可申达®(非奈利酮)是一种非甾体选择性盐皮质激素受体拮抗剂[1],在临床前研究中显示可阻断盐皮质激素受体过度激活造成的有害影响[2]。在糖尿病患者中,盐皮质激素受体过度激活被认为会通过靶器官的炎症[3]和纤维化而导致慢性肾病进展和心血管受损[4]。2021年7月,基于FIDELIO-DKD III期临床研究在慢性肾病伴2型糖尿病成人患者中的阳性结果[5][6],美国FDA批准非奈利酮(finerenone, Kerenidia®)上市,目前非奈利酮已经在中国和全球多个其他国家地区递交上市申请,正在进行审评。非奈利酮片中的有效成分为非奈利酮(finerenone)(结构见图1),其结构中含有一个芳香环以及一个羧酸官能团,它们赋予了非奈利酮其生物活性。这种药物用于治疗关节炎、痛经、头痛等疾病,通过抑制炎症和疼痛的发生机制来提供缓解。

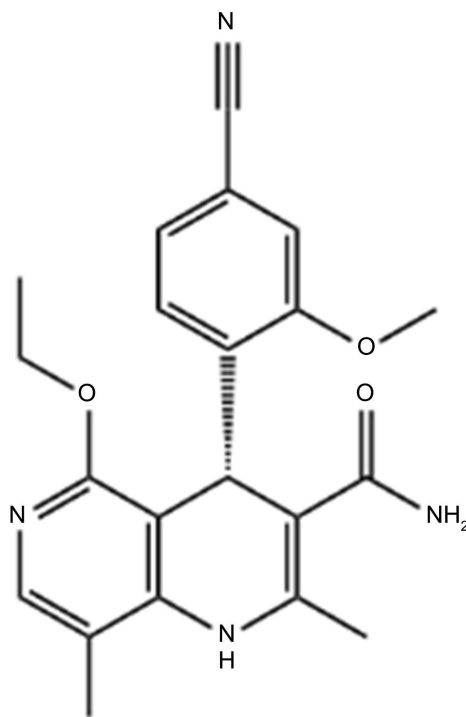


Figure 1. Structural formula of finerenone

图1. 非奈利酮结构式

本文通过高效液相色谱法, 根据非萘利酮纯品作为对照品, 对非萘利酮含量进行检测, 经过检测结果分析, 可以作为非萘利酮生产质量控制的标准, 检测报道如下。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

实验所需仪器见表 1。

Table 1. Instruments required for the experiment

表 1. 实验所需仪器

仪器	用途	制造商
赛默飞 U-3000 型高效液相色谱仪	检测	赛默飞世尔科技公司
电子分析天平	称量	METTLER TOLEDO 仪器公司
超声波清洗机	使溶液分散均匀	宁波恒科超声波设备有限公司

2.2. 试剂(剂)

实验所需试剂(剂)见表 2。

Table 2. Test drugs (agents) required for the experiment

表 2. 实验所需试剂(剂)

试剂	纯度/型号	商家
0.03 mol/L 醋酸铵溶液	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	分析纯	阿拉丁
乙腈	分析纯	阿拉丁
丙酮	分析纯	阿拉丁
非萘利酮片	国药准字 HJ20220057	拜耳医药保健有限公司
非萘利酮对照品	-	-
超纯水	-	-

3. 溶液的配制使用须知

3.1. 对照品溶液

精密称取非萘利酮适量, 用甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 含非萘利酮 100 μg 。

3.2. 供试品溶液

取非萘利酮片 5 片(每片平均 0.1389 g), 精密称定, 研细, 精密称取 0.1 g, 置于 250 mL 容量瓶中, 精密加入乙腈 250 mL, 称定重量, 超声处理(功率 230 W, 频率 26.5 ± 1 kHz) 40 min, 放置至室温, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.2 μm)滤过, 此滤液作供试品溶液。

4. 色谱条件与系统适用性实验

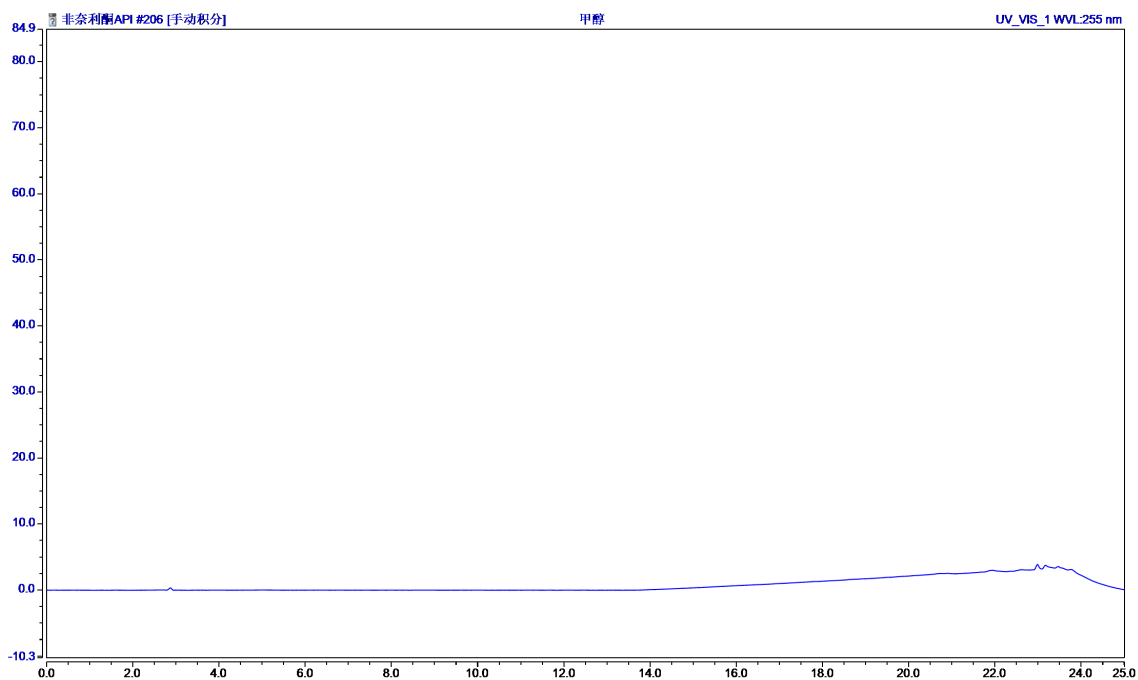
色谱柱为和谱科学 AceChrom AQ C18 (250 \times 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇-0.03 mol/L 的醋酸铵水溶液(45:55), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 255 nm, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

在上述色谱条件下, 分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 5 μL , 进样。结果如图 2 所示, 表明非萘利酮与其杂质峰分离好, 理论板数非萘利酮峰计不少于 10,000。图中纵坐标单位为 t/min, 横坐标单位为 mAU。

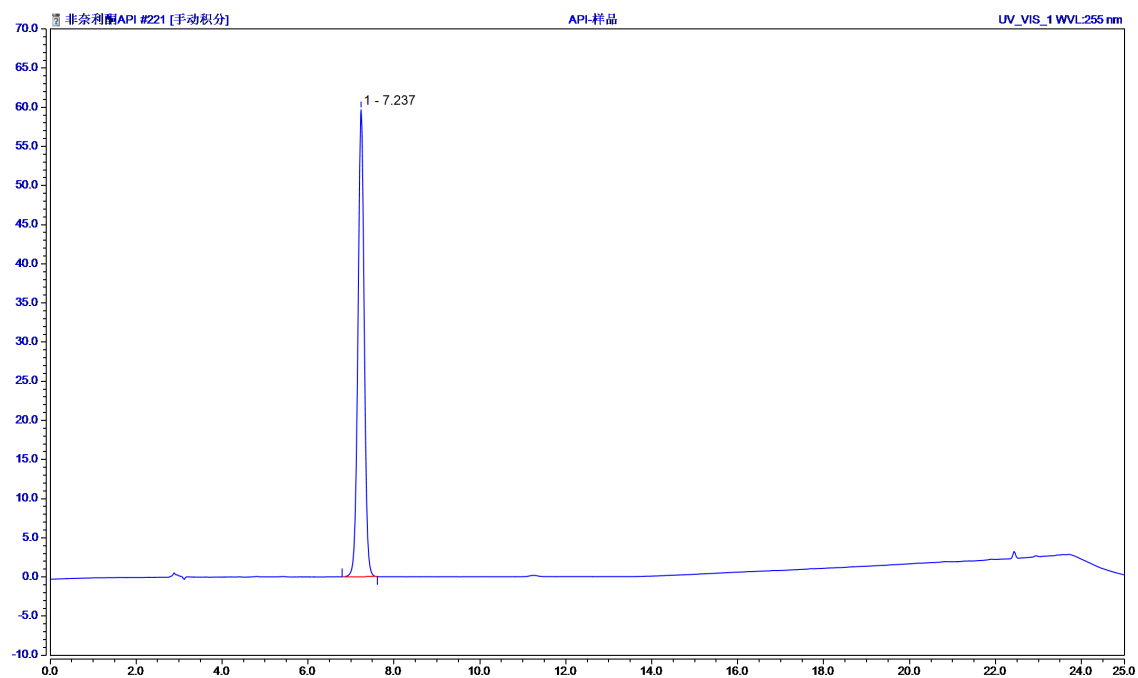
5. 方法学验证

5.1. 辅料干扰实验

按处方比例配制空白样品, 置于 250 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 在上述色谱条件下测定, 结果如图 2(a)所示, 结果表明, 辅料未对实验进行干扰。



(a)



(b)

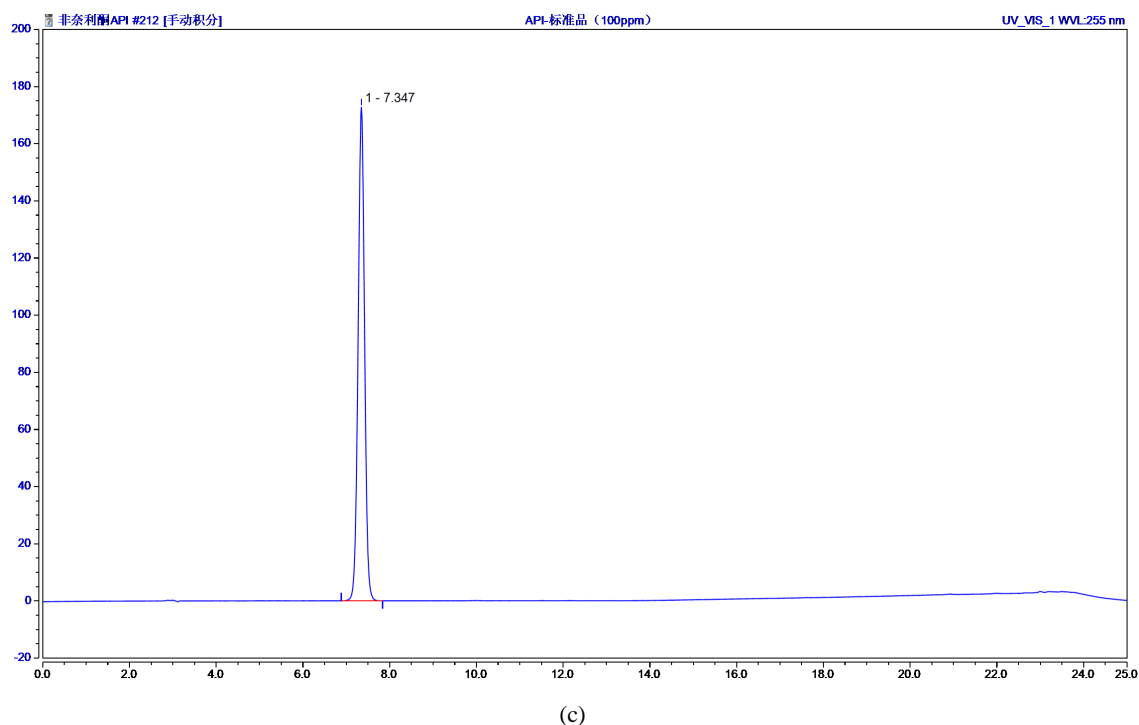


Figure 2. HPLC chromatogram of (a) Blank excipients; (b) Content determination reference solution; (c) Test solution
图 2. (a) 空白辅料; (b) 含量测定对照品溶液; (c) 供试品溶液的 HPLC 色谱图

5.2. 线性关系的考察

分别精密吸取对照品溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 mL 置进样小瓶中, 加乙腈稀释制定浓度, 摇匀。进样 5 μL , 记录色谱图, 以非萘利酮浓度为横坐标, 以非萘利酮峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 进行回归计算得非萘利酮的回归方程为:

$$Y = 0.2968X + 0.0495$$

$$R^2 = 0.9998$$

结论: 非萘利酮浓度在 2~100 mg/L 的范围内与峰面积呈良好的线性关系。

5.3. 精密度

这个部分评估了方法的精密度, 精密吸取“3.1”项下非萘利酮对照品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪, 通过连续四次进样相同浓度的非萘利酮对照品溶液。测得非萘利酮峰面积的平均值为 11,942, 而相对标准偏差(RSD)为 1.32%。这表明方法在重复性方面表现出较好的精密度。

5.4. 重复性

在这一部分, 使用相同批号的非萘利酮样品(批号为国药准字 HJ20220057)进行了多次测试, 以便评估方法的重复性。测得非萘利酮的每片含量的平均值为 9.512 mg/片, 而 RSD 为 0.96%。这说明该方法具有较好的重复性, 结果稳定。

5.5. 稳定性

稳定性测试用于评估供试品溶液在一定时间内的稳定性。按照“3.2”项下操作制备供试品溶液, 在 0、1、2、4、8 和 12 小时测定了非萘利酮的峰面积。测得非萘利酮的平均峰面积为 11,792, RSD 为

1.93%, 表明供试品溶液在 12 小时内是稳定的。

5.6. 回收率

回收率测试用于评估方法的准确性。取已知含量的非萘利酮片(批号为国药准字 HJ20220057)含量: 9.512 mg/片适量各 4 份, 按照“3.2”项下操作制备供试品溶液, 分别精密加入一定量的非萘利酮对照品溶液。按照“3”项下色谱条件进样 5 μ L, 测得非萘利酮平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.2%。表明该方法在分析非萘利酮含量时有很好的回收性。

6. 样品含量测定

取供试品溶液 4 份, 按照“3.2”项下操作制备供试品溶液进样, 按上述的色谱条件分析, 结果见表 3。

Table 3. Sample content determination results (mg/tablet, n = 4)

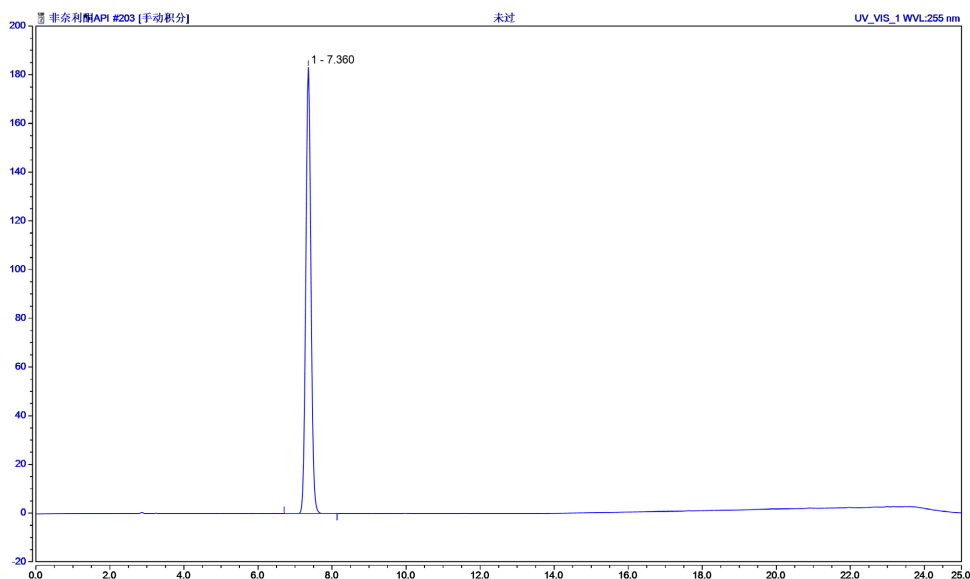
表 3. 样品含量测定结果(mg/片, n = 4)

批次	非萘利酮含量
1	9.512
2	9.491
3	9.540
4	9.505

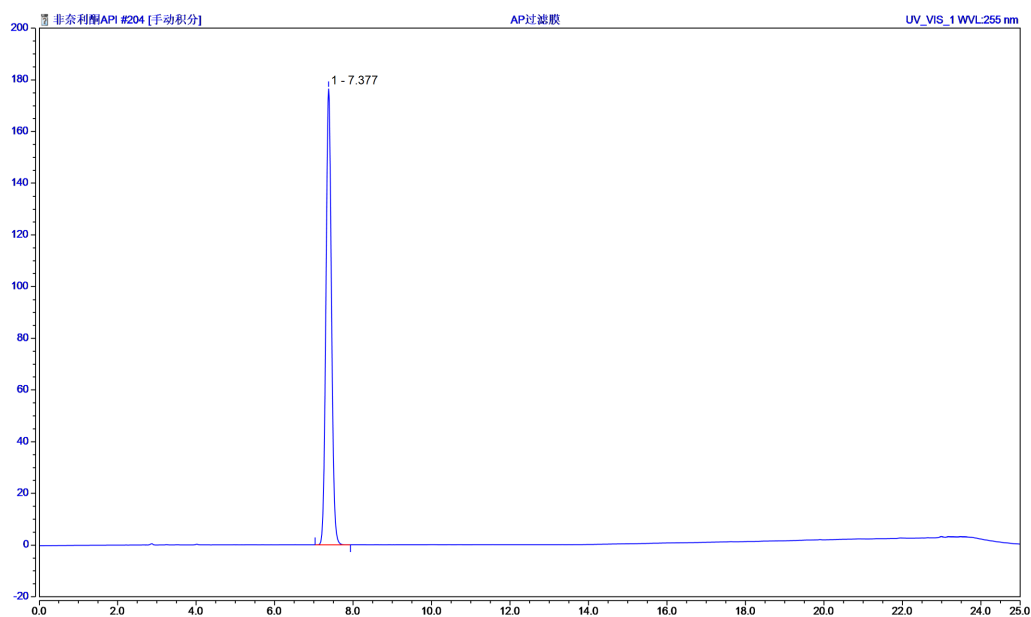
7. 讨论

7.1. 滤膜对溶液中非萘利酮含量的影响

针对采用滤膜过滤会不会对本实验造成影响, 本实验采用非萘利酮标准溶液与非萘利酮过膜标准溶液, 按照“3.1”项下操作制备供试品溶液, 按照“4”项下色谱条件进样 5 μ L。重复实验三次, 结果如图 3(a)、图 3(b)所示, 测得过膜前后非萘利酮峰面积相差不大, 得出滤膜对溶液中非萘利酮的含量无影响。图中纵坐标单位为 t/min, 横坐标单位为 mAU。



(a)



(b)

Figure 3. HPLC chromatograms of (a) Reference solution for uncoated determination; (b) Reference solution for over-coated determination

图 3. (a) 未过膜的含量测定对照品溶液; (b) 过膜的含量测定对照品溶液的 HPLC 色谱图

7.2. 不同溶剂对非萘利酮吸收的影响

在这个实验中, 我们探究了不同溶剂对非萘利酮吸收效果的影响。首先, 我们制备了非萘利酮的试样溶液, 并选择了四种不同的溶剂进行比较, 包括水、甲醇、丙酮和乙腈, 每种溶剂使用了 250 mL。随后, 我们利用色谱技术进行了两次重复实验, 将 5 μ L 的试样溶液进行进样。实验结果显示, 当使用水作为溶剂时, 非萘利酮的吸收率仅为 40.98%。

而当使用丙酮作为溶剂时, 色谱分析中出现了干扰峰, 对实验结果造成了干扰, 使得分析结果不可靠。相比之下, 当我们使用甲醇和乙腈作为溶剂时, 观察到了图谱清晰且分离效果良好的情况。尽管甲醇和乙腈都可以作为有效的溶剂, 但针对此样品来说, 乙腈具有比甲醇更强的溶解能力, 这可能导致某些化合物在乙腈中更易溶解, 使得样品中未预期的成分溶解进去, 形成杂质小峰, 从而影响分析的准确性。

综合考虑实验结果和分析需求, 我们最终选择了甲醇作为后续实验的溶剂。这是因为甲醇在当前条件下表现出了更优秀的分离性能, 能够提供清晰的图谱和可靠的分析结果, 有助于确保实验的准确性和可重复性。

7.3. HPLC 分离条件的探索

在这一部分的实验中, 我们进行了多种流动相系统的尝试以及其他 HPLC 分离条件的优化, 以找到最适合的条件。我们尝试了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸铵和乙腈-醋酸铵等多种流动相系统。经过一系列实验, 我们最终确定了甲醇-醋酸铵的流动相比比例约为 45:55, 并且在醋酸铵浓度为 0.03 mol/L 时效果最佳。此外, 我们还确定了分离效果较好的流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}$ C。

这些优化条件可以提高非萘利酮的分离和检测效率, 确保实验结果的准确性。这种优化旨在确保 HPLC 分析能够有效地检测和定量非萘利酮, 以满足研究或分析的需求。

8. 结论

本研究采用高效液相色谱法(HPLC)成功建立了一种用于非奈利酮片中非奈利酮含量测定的分析方法。实验中使用的色谱柱为和谱科学 AceChrom AQ C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.03 mol/L 醋酸铵水溶液(45:55), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长设定为 255 nm, 柱温控制在 35°C。

通过对不同浓度的非奈利酮对照品溶液进行进样, 并绘制标准曲线, 我们发现非奈利酮在 2~100 mol/L 范围内与峰面积呈现出极佳的线性关系($R^2 = 0.9998$)。此外, 方法的精密度评估显示, 测得的非奈利酮峰面积平均值为 11,942, 相对标准偏差(RSD)为 1.32%, 重复性评估结果显示, RSD 为 0.96%, 稳定性测试表明在 12 小时内方法具有良好的稳定性(RSD 为 1.93%)。回收率测试显示, 平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.2%, 验证了方法对非奈利酮含量测定的准确性和可靠性。

综上所述, 本研究所建立的 HPLC 分析方法对非奈利酮片中非奈利酮含量的测定提供了快速、准确和可靠的手段。该方法操作简便、灵敏度高, 适用于药品质量控制和分析, 为相关领域的研究和实际应用提供了有力支持。

参考文献

- [1] 符灵智, 许剑峰, 马彦卓, 等. 盐皮质激素受体拮抗剂的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2024, 51(2): 69-73.
- [2] 周明双, 郑绍莹, 张雯, 等. 非奈利酮、钠-葡萄糖共转运蛋白-2 抑制剂及两者联合应用对心肾保护作用的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2024, 40(5): 416-421.
- [3] 余万乾, 沈文, 杨萍萍, 等. 非奈利酮在心血管及相关疾病的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2022, 38(11): 916-920.
- [4] 黄坤, 廖玉华. 2023 ESC 糖尿病合并心血管疾病管理指南解读[J]. 临床心血管病杂志, 2023, 39(10): 753-755.
- [5] 李雯静, 杨小娟. 非奈利酮在糖尿病肾病中的应用进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2023, 31(7): 127-130.
- [6] 颀晓铭, 刘永铭. 非奈利酮对 2 型糖尿病患者心肾保护作用的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2024, 27(2): 145-150.