

RP-HPLC法检查丁酸氯维地平原料药中的有关物质

熊野娟^{1*}, 陈秋芬², 姜玲², 沈国兵², 张军东^{2#} (1.上海医药高等专科学校, 上海 201318; 2.上海信谊药厂有限公司药物研究所, 上海 201206)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4287-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.20

摘要 目的:建立检查丁酸氯维地平原料药中有关物质含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry Shield™, 流动相为磷酸二氢钠水溶液与乙腈, 采用梯度洗脱, 流速为 1.2 ml/min, 检测波长为 220 nm, 进样量为 20 μl, 柱温为 35 ℃。分别采用不加及加校正因子的主成分自身对照法计算 3 批样品中 6 种及 1 种已知杂质(杂质 B、C、D、E、F、G 及 H)的量。结果:7 种杂质在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好(r 为 0.997~1.000); 回收率为 94.96%~97.79% (RSD 小于 4.7%, $n=3$); 丁酸氯维地平检测限为 5 ng, 杂质 B~H 的定量限依次为 4、4、8、8、4、8、8 和 8 ng; 3 批样品中均未检出杂质 B、C、D, 总杂质量小于 0.12%。结论:建立的方法简便、灵敏、准确, 可用于丁酸氯维地平原料药中有关物质的检查。

关键词 丁酸氯维地平; 有关物质; 反相高效液相色谱法

Determination of Related Substances in Clevidipine Butyrate Drug Substance by RP-HPLC

XIONG Ye-juan¹, CHEN Qiu-fen², JIANG Ling², SHEN Guo-bing², ZHANG Jun-dong² (1.Shanghai Institute of Health Sciences, Shanghai 201318, China; 2.Institute of Materia Medica, Shanghai Sine Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201206, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the content determination of related substances in clevidipine butyrate drug substance. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Symmetry Shield™ column with mobile phase consisted of sodium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.2 ml/min. The determination wavelength was set at 220 nm, and sample size was 20 μl. The column temperature was 35 ℃. The contents of 6 and 1 kinds of known impurities (impurity B, C, D, E, F, G and H) in 3 batches of samples were calculated by main component self-compare without or with calibration factor. RESULTS: 7 kinds of impurity from clevidipine butyrate revealed good linearity ($r=0.997-1.000$); average recoveries were 94.96%-97.79% (RSD<4.7%, $n=3$). The lowest detection limit of clevidipine butyrate was 5 ng, and the limits of quantity of impurities B-H were 4, 4, 8, 8, 4, 8 and 8 ng, respectively. Impurities B, C and D were not found in 3 batches of samples, and total amount of impurity was lower than 0.12%. CONCLUSIONS: Established method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the determination of related substances in clevidipine butyrate.

KEYWORDS Clevidipine butyrate; Related substance; RP-HPLC

丁酸氯维地平(Clevidipine butyrate)系第3代新型短效二氢吡啶类注射用钙通道拮抗剂,治疗不宜口服或口服无效的高血压患者,尤其是对手术期间血压急性升高的降压效果明显。地平类降压药是降压药中市场占有率最大、应用最广泛的药物^[1-2],由于丁酸氯维地平受到专利限制(商品名 Clevidiprex,注射乳剂,上市时间为2008年8月,临床用于降血压,尤其适用心脏手术期间的血压急性升高),国内外相关文献资料

极少,国内外药典也均未收载丁酸氯维地平原料药有关物质分析方法。随着其专利期临近,国内外会有更多关于丁酸氯维地平的研究陆续开展。为规范丁酸氯维地平原料药的合成与使用^[3-5],提高其相关制剂的安全性和有效性^[6-7],笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法检查丁酸氯维地平原料药中的有关物质,对丁酸氯维地平工艺中可能产生的工艺杂质和降解杂质等进行研究,并计算已知杂质相对于主成分的校正因

325.

[6] 成都第一药业有限公司. 氢溴酸山莨菪碱注射液说明书[S]. 2010-12-31.

* 讲师, 硕士。研究方向: 药物制剂与质量控制。E-mail: dai-syxyj@163.com

通信作者: 教授, 高级工程师, 博士。研究方向: 药学。E-mail: zhangjd534@163.com

[7] 周筱莉. 我国细菌内毒素检查法的应用进展[J]. 中国医药导报, 2010, 7(23): 14.

[8] 范治云, 王春芳, 张娟. 注射用雷贝拉唑钠细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药业, 2013, 22(15): 47.

[9] 范治云, 国明. 眼用平衡盐溶液细菌内毒素检查标准的制订[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(8): 454.

(收稿日期: 2014-02-13 修回日期: 2014-04-17)

子,最后以不加校正因子的主成分自身对照法来计算单个杂质和总杂质的量,从而为丁酸氯维地平原料药的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200 型 HPLC 仪,包括 G1314 可变波长检测器(VWD)、Chemstation 色谱工作站等(美国 Agilent 公司);BP-211D 电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

丁酸氯维地平对照品[简称对照品 A,4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二甲酸甲基(1-丁酰氧基)甲酯,批号:120929,纯度:99.6%]、样品丁酸氯维地平原料药(批号:20130801,20130802,20130803,纯度:99.90%、99.85%、99.90%)、杂质 B 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸单甲酯,批号:130311,纯度:98.7%]、杂质 C 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-烟酸甲酯,批号:130112,纯度:99.1%]、杂质 D 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸二甲酯,批号:130429,纯度:98.4%]、杂质 E 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基吡啶-3,5-二羧酸-3-丁酰氧甲基酯-5-甲酯,批号:130506,纯度:98.6%]、杂质 F 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3-羧酸甲酯,批号:130303,纯度:99.0%]、杂质 G 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-丁酰氧甲基酯-5-乙酯,批号:130321,纯度:99.2%]、杂质 H 对照品[4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸二丁酰氧甲基酯,批号:130402,纯度:99.3%],均来源于上海信谊药厂有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 系统适用性溶液。精密称取对照品 A 20 mg,置于 10 ml 量瓶中,定量加入杂质 B~H 的对照品溶液(“2.1.4”项下溶液)1 ml,用乙腈溶解并稀释制成含丁酸氯维地平质量浓度约为 2.0 mg/ml、各杂质质量浓度约为 2 μg/ml 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液。精密称取样品丁酸氯维地平原料药约 20 mg,置于 10 ml 量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,即得(2.0 mg/ml)。

2.1.3 对照溶液。精密量取“2.1.2”项下供试品溶液 1.0 ml,置于 100 ml 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即得 1% 对照溶液。

2.1.4 杂质对照品溶液。分别取杂质 B~H 对照品约 10 mg,置于 50 ml 量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度;精密量取该溶液 1.0 ml,置于 10 ml 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,制成各杂质质量浓度为 20.0 μg/ml 的溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters Symmetry Shield™(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器为可变波长检测器(VWD);流动相:A 相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(加 10 ml 四丁基氢氧化铵,制成 1 000 ml,并用磷酸调 pH=5.0),B 相为乙腈,梯度洗脱,流速:1.2 ml/min;检测波长:220 nm;进样量:20 μl;柱温:35 ℃。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution progress

时间,min	A相,%	B相,%
0	60	40
25	45	55
60	45	55
61	60	40
70	60	40

精密量取 20 μl 系统适用性溶液注入液相色谱仪,记录色谱图。结果,主成分峰、已知杂质峰与各自相邻杂质峰的分离度均不低于 1.5,理论板数均大于 2 000,详见图 1、表 2。

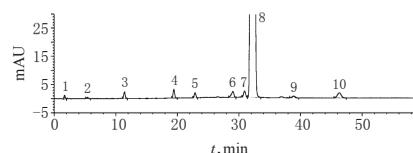


图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

1、2. 溶剂;3. 杂质 B;4. 杂质 C;5. 杂质 D;6. 杂质 E;7. 杂质 F;8. 丁酸氯维地平;9. 杂质 G;10. 杂质 H

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

1, 2. solvent; 3. impurity B; 4. impurity C; 5. impurity D; 6. impurity E; 7. impurity F; 8. clevidipine butyrate; 9. impurity G; 10. impurity H

表 2 各峰保留时间、对称因子、分离度

Tab 2 Relevant retention time, symmetry factor and resolution of each peak

名称	B	C	D	E	F	A	G	H
保留时间,min	11.424	19.445	22.896	29.035	30.926	32.188	38.913	46.305
对称因子	1.07	1.00	1.03	1.64	1.02	0.88	1.09	0.99
理论板数	10 880	28 734	34 532	26 902	42 980	27 930	30 244	27 269
分离度	14.03	17.86	7.24	10.21	2.89	1.84	8.06	7.32

2.3 检查方法

取对照溶液 20 μl 注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的 20%~25%。再精密量取对照溶液和供试品溶液各 20 μl,分别注入色谱仪中,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。扣除溶剂峰,与系统适用性色谱图中保留时间相对应,B~H 杂质峰面积均不得大于对照溶液主峰面积的 1/10(0.1%);其他单一杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 1/10(0.1%);各杂质峰面积总和不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍(1.5%)。

2.4 专属性试验

取对照品 A 20 mg,置于 10 ml 量瓶中,共 6 份,1 份为未破坏,另 5 份分别按下列条件进行破坏。(1)高温破坏:在温度 120 ℃ 烘箱中放置约 8 h。(2)光破坏(紫外灯):在紫外灯(4 500 lx)中放置约 15 d。(3)酸破坏:加 1 mol/L 盐酸 1 ml,放置约 8 h;用 1 mol/L 氢氧化钠 1 ml 中和酸。(4)碱破坏:加 0.1 mol/L 氢氧化钠 1 ml,放置约 8 h;用 0.1 mol/L 盐酸 1 ml 中和碱。(5)氧化破坏:加 30% H₂O₂ 溶液 1 ml 后,在室温下放置约 8 h。取各破坏后样品溶液进样分析,结果未破坏及各破坏后样品的主峰含量分别为 100%、88.57%、93.76%、92.22%、91.53%、89.81%,主峰纯度分别为 999.934、999.949、999.951、999.745、999.946、999.962,色谱图见图 2。

由图 2 可见,未破坏样品与破坏后的样品图谱比较,主峰

面积有所下降,杂质峰有所增多,杂质峰面积也有所增大,但各自分离度均大于1.5,符合要求。破坏后样品主峰纯度都大于990,表明本方法专属性良好,可满足有关物质检查的要求。

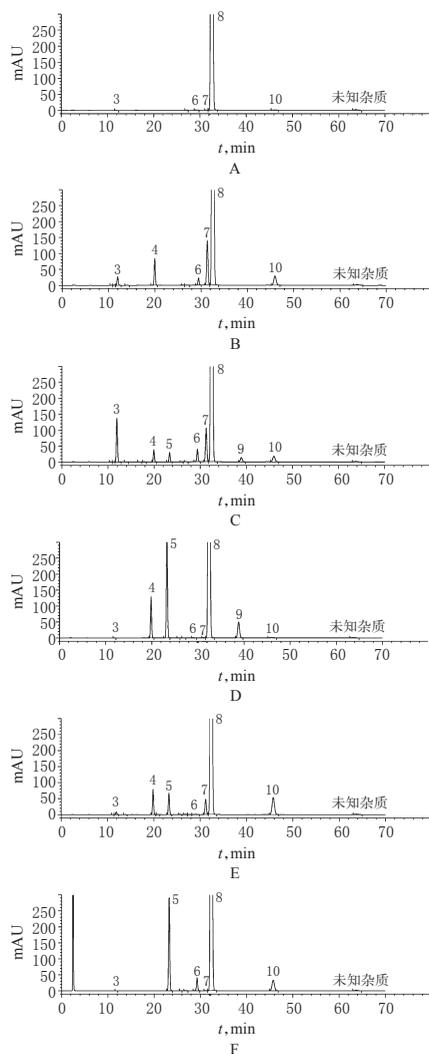


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.未破坏样品;B.酸破坏样品;C.碱破坏样品;D.高温破坏样品;E.光破坏样品;F.氧化破坏样品;3.杂质B;4.杂质C;5.杂质D;6.杂质E;7.杂质F;8.丁酸氯维地平;9.杂质G;10.杂质H;其余峰均为未知杂质

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. untreated sample; B. sample treated with acid; C. sample treated with alkali; D. sample treated with high temperature; E. sample treated with light; F. sample treated with oxidation; 3. impurity B; 4. impurity C; 5. impurity D; 6. impurity E; 7. impurity F; 8. clevidipine butyrate; 9. impurity G; 10. impurity H; other peaks mean unknown impurities

2.5 检测限与定量限试验^[8]

取0.1 mg/ml对照品A溶液不断稀释,信噪比为3时测得丁酸氯维地平检测限为5 ng。

分别取2.0 μg/ml杂质B~H对照品不断稀释,信噪比为10时测得杂质B~H的定量限依次为4、4、8、8、4、8、8 ng。

2.6 线性关系试验

分别取杂质B~H对照品适量,用乙腈溶解并制成每1 ml中含20.0 μg的混合溶液,摇匀。精密量取该溶液0.2、0.5、0.8、

1.0、1.2 ml,分别置于10 ml量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀。分别量取上述溶液各20 μl,注入色谱仪,记录色谱图,以各杂质检测质量浓度为横坐标(x, μg/ml),以峰面积为纵坐标(y),进行线性回归,得各杂质的回归方程如下:杂质B为 $y=28.594x+0.6568$ ($r=0.999$);杂质C为 $y=28.01x+0.0375$ ($r=0.999$);杂质D为 $y=28.013x+1.5906$ ($r=0.997$);杂质E为 $y=26.393x+0.052$ ($r=0.998$);杂质F为 $y=28.037x-0.4612$ ($r=0.998$);杂质G为 $y=26.041x-1.5475$ ($r=0.997$);杂质H为 $y=39.325x+0.2194$ ($r=0.999$)。结果表明,各杂质B~H在质量浓度0.4~2.4 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 加样回收率试验

精密称取样品适量(相当于50.0 mg,批号:20130801),置于25 ml量瓶中,共11份,分别精密加入“2.1.4”项下的杂质B~H对照品溶液1.25(3份)、2.5(3份)、5.0 ml(3份),剩下2份为空白溶液(只加入样品原料药,批号:20130801,检测此空白溶液的目的在于观察样品本身所含同类杂质质量情况,计算时应将检出量扣除空白样品溶液所含同类杂质质量)加乙腈溶解并定容。另制备杂质B~H混合对照品溶液2份(2.0 μg/ml)。得到杂质B~H质量浓度分别为1.0、2.0、3.0 μg/ml的加样回收供试品溶液,进样分析。用外标法分别计算得杂质B~H的平均加样回收率。

结果,9份样品在50%~150%范围内,杂质B~H低、中、高质量浓度平均回收率及总回收率平均值分别为94.45%、98.74%、94.46%、96.24% (RSD=3.7%, $n=3$), 96.77%、99.24%、97.35%、97.79% (RSD=3.1%, $n=3$), 95.16%、99.34%、98.30%、97.61% (RSD=3.9%, $n=3$), 94.24%、94.28%、96.88%、95.13% (RSD=4.5%, $n=3$), 93.25%、94.84%、96.79%、94.96% (RSD=4.7%, $n=3$), 94.95%、95.65%、99.91%、96.83% (RSD=3.4%, $n=3$), 96.93%、93.01%、99.06%、96.33% (RSD=4.5%, $n=3$),表明该方法准确度符合要求。

2.8 相对校正因子计算

取各杂质对照品各约10 mg,用乙腈制成1 mg/ml的溶液作为母液。精密量取母液适量,用乙腈制成各杂质质量浓度为0.2~20 μg/ml的线性溶液,进样测定,计算7个已知杂质相对主成分的校正因子。结果显示,各杂质的校正因子依次为0.96、0.98、0.98、1.04、0.98、1.05和0.70。由此可知,除杂质H相对校正因子为0.70外,其余B、C、D、E、F、G相对校正因子均在0.95~1.05内,因此可采用不加校正因子的主成分自身对照法计算6个已知杂质含量,H杂质以实测值乘以相对校正因子0.70来计算该杂质含量,使计算结果更准确。

2.9 溶液稳定性试验

配制样品溶液(批号:20130801),分别于0、4、8、18、24 h进样。结果表明,在24 h内,杂质B~H及最大单个杂质、总杂质的峰面积RSD分别为1.9%、1.5%、1.5%、1.3%、1.4%、1.2%、1.5%、1.4%、1.7% ($n=5$),表明样品溶液在24 h内稳定。但由于样品溶剂为乙腈,容易挥发,因此样品应在进样前配制,8 h内测定完毕。

2.10 耐用性试验

取系统适用性试验溶液和供试品溶液(批号:20130801),改变色谱条件中流速(1.1、1.3 ml/min)、柱温(33、37 ℃)、流动相缓冲盐溶液浓度(18、22 mmol/L)及pH(4.8、5.2)、检测波长(218、222 nm)、梯度变化(在原色谱梯度上,B相比例基础上变更 $\pm 2\%$)分别进行考察,结果如下:

(1)在规定的色谱条件下,主峰时间为32.188 min,杂质B、C、D、E、F、主峰、G、H与相邻杂质分离度均大于1.5。

(2)将流速、柱温、流动相缓冲盐溶液浓度、pH、检测波长进行相应改变后,各杂质含量的差值均不大于0.05%,杂质B、C、D、E、F、主峰、G、H与相邻杂质分离度均大于1.5。结果显示,该方法在上述条件变更范围内耐用性良好。

(3)在原色谱梯度上,B相比例基础上变更 $\pm 2\%$,结果各杂质含量的差值均大于0.05%,表明该方法需要严格控制梯度变化。

2.11 3批样品有关物质检查

取3批样品,按“2.3”项下方法分别进行有关物质检查,结果3批样品中均未检出杂质B、C、D,总杂质质量小于0.12%,见表3、图3。

表3 样品有关物质检查结果(%)

Tab 3 Determination of related substances in sample(%)

批号	杂质B	杂质C	杂质D	杂质E	杂质F	杂质G	杂质H	最大未知杂质	总杂质
20130801	未检出	未检出	未检出	0.03	0.01	未检出	0.04	0.01	0.09
20130802	未检出	未检出	未检出	0.02	0.02	0.01	0.06	0.01	0.12
20130803	未检出	未检出	未检出	0.03	0.01	未检出	0.04	0.01	0.09

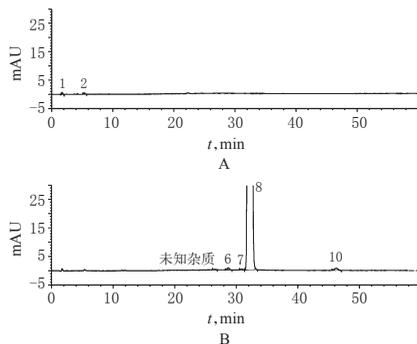


图3 样品有关物质检查高效液相色谱图

A. 空白溶剂; B. 供试品溶液(批号:20130801); 1、2. 溶剂; 6. 杂质E; 7. 杂质F; 8. 丁酸氯维地平; 10. 杂质H; 其余峰为未知杂质

Fig 3 HPLC chromatograms of related substances in sample

A. blank solvent; B. test sample solution (batch number: 20130801); 1, 2. solvent; 6. impurity E; 7. impurity F; 8. clevidipine butyrate; 10. impurity H; other peaks mean unknown impurities

3 讨论

3.1 建立丁酸氯维地平原料药中有关物质检查方法的意义

随着科技水平的提高,人们对药品质量、安全性的重要性有了更加充分的认识。而药物中的杂质与药品质量、安全性密切相关。目前国内对丁酸氯维地平研究重在合成工艺上,

其有关物质的研究未见报道。笔者希望通过对有关物质的研究和质量控制,实现对丁酸氯维地平原料药的质量监控。

3.2 检测波长的选择

取丁酸氯维地平原料药、对照品及各杂质对照品各适量制备成对应溶液,分别在190~400 nm波长范围内进行紫外扫描。结果显示,各对照品均在220 nm波长具有大吸收,且丁酸氯维地平样品溶液在220 nm以外波长处并无更多杂质峰出现,故选择220 nm为检测波长。另外,用二极管阵列检测器检测各溶液,得到的吸收光谱也证实了样品和其各杂质在220 nm波长处均有最大吸收或较强吸收。

3.3 流动相的选择

试验中曾配制流动相使其pH接近2、磷酸二氢钠缓冲盐溶液浓度为60 mmol/L,虽然主峰与相邻杂质及杂质间分离度达到要求,但其对色谱柱损伤较大。后采用甲醇-乙腈(3:2, pH=4),但主峰与相邻杂质峰的分度不佳。因此尝试降低其中甲醇比例。当缓冲液与甲醇比例达1:1时,丁酸氯维地平与相邻杂质的分离度符合要求,但杂质E峰对称性较差,且杂质G保留时间太长(约60 min)。为使主峰和杂质B~H的峰均达到理想的分离度和良好峰形,且溶剂峰在220 nm波长末端吸收良好,经一系列的摸索,最终采用水相为20 mmol/L磷酸二氢钠、有机相为乙腈的流动相系统,梯度洗脱,结果满意。

综上,本方法简便、可靠、灵敏,不但可用于检查丁酸氯维地平原料药中有关物质的量,同时还可将各有关物质与主成分有效分离,故本法可以作为丁酸氯维地平原料药中有关物质的质量控制方法。

参考文献

- [1] 万静萍,苏婧.静脉输注治疗高血压病的新药丁酸氯维地平[J].药物流行病学杂志,2011,20(7):371.
- [2] 黄璐,孙华君,耿海明.氯维地平的研究与临床应用[J].中国新药与临床杂志,2011,30(10):727.
- [3] 邓超,闫少杰.丁酸氯维地平成品中杂质的合成与结构鉴定[J].现代药物与临床,2011,26(1):43.
- [4] 黄璐,孙华君,杨波,等.丁酸氯维地平的波谱学数据与结构确证[J].波谱学杂志,2011,28(1):168.
- [5] 赵华堂,杨艺虹,张秀兰,等.抗高血压药丁酸氯维地平的合成研究[J].精细化工中间体,2013,43(5):26.
- [6] 郭兴辉,王倩雯.RP-HPLC法测定注射用磷酸肌酸钠有关物质的含量[J].中国药房,2013,24(9):840.
- [7] 张新事,付淑军,林小燕,等.HPLC法测定伏立康唑乳剂的含量及其有关物质[J].中国药房,2012,23(1):67.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录194-195.

(收稿日期:2014-02-18 修回日期:2014-04-17)