

RP-HPLC 法测定阿托伐他汀钙原料药

刘 静, 丁红雨, 董 斌

大连市食品药品检验所, 辽宁 大连 116021

摘 要: 目的 建立 RP-HPLC 梯度洗脱法测定阿托伐他汀钙原料药中阿托伐他汀钙。方法 Symmetry shield RP-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以磷酸盐缓冲液 (pH 值 2.5) 为流动相 A, 乙腈-甲醇-水 (770:50:180) 为流动相 B, 进行线性梯度洗脱; 检测波长 246 nm; 柱温 40 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL。结果 阿托伐他汀钙线性范围为 10.655~31.965 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 98.2%, RSD 值为 0.23% ($n=6$)。结论 该方法准确可靠, 专属性强, 稳定性高, 可更好地控制阿托伐他汀钙原料的质量。

关键词: 阿托伐他汀钙原料药; 阿托伐他汀钙; RP-HPLC 法

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)03-0338-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.019

Determination of atorvastatin calcium bulks drug by RP-HPLC

LIU Jing, Ding Hong-yu, Dong Bin

Dalian Institute for Food and Drug Control, Dalian 116021, China

Abstract: Objective To establish a gradient elution method of RP-HPLC to determine atorvastatin calcium in atorvastatin calcium bulks drug. **Methods** The column was Symmetry shield RP-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of a KH₂PO₄ buffer (adjust the pH value to 2.5) (A) and methanol - acetonitrile - water (50 : 770 : 180) (B). The detection wavelength was 246 nm and the column temperature was 40 ℃. The flow rate was 1.0 mL/min with 20 μL injection volume. **Results** Atorvastatin calcium had a good linearity in the range of 10.655 — 31.965 μg/mL ($r=0.999\ 8$). The average recovery was 98.2% with RSD 0.23% ($n=6$). **Conclusion** The method is accurate, reliable, sensitive, and reproducible, which could be used for the quality control of atorvastatin calcium bulks drug.

Key words: atorvastatin calcium bulks drug; atorvastatin calcium; RP-HPLC

阿托伐他汀钙为 $[R-(R^*,R^*)]-2-(4\text{-氟苯基})-\beta,\delta\text{-二羟基-5-(1-甲基乙基)-3-苯基-4-[(苯胺)羰基]-1H-吡咯-1-庚酸钙}$ (2:1) 三水合物。是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶的选择性和竞争性抑制剂, 主要通过抑制肝脏内 HMG-CoA 还原酶及胆固醇的合成, 从而降低血液中胆固醇和脂蛋白水平, 并通过增加细胞表面的肝脏低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体以增加 LDL 的摄取和代谢。其制剂阿托伐他汀片主要用于治疗原发性高胆固醇血症和混合性高血脂症。因疗效显著, 近年来在临床上得到广泛的应用^[1-2]。张亚平等^[3]采用 HPLC 法检测阿托伐他汀钙中 3 种有关物质双胺、脱氟体和

非对映异构体; 阿托伐他汀钙原料测定方法在《中国药典》2010 年版二部中未收载; 《美国药典》(USP36 2013 版) 系统适用性试验要求阿托伐他汀钙与阿托伐他汀非对映异构体分离度符合规定^[4]; 《英国药典》(BP2013) 系统适用性试验要求阿托伐他汀钙与阿托伐他汀脱氟、阿托伐他汀非对映异构体、阿托伐他汀二氟、阿托伐他汀环氧乙烷 4 种相关杂质分离度符合规定^[5]。本实验建立了采用高效液相色谱测定阿托伐他汀钙的方法, 该方法实现了阿托伐他汀钙与其合成工艺中的 7 种相关主要杂质的有效分离, 为测定阿托伐他汀提供了一种更加有效的方法。该方法结果准确可靠, 专属性强, 稳定性好, 可更好地控制该产品的质量。

收稿日期: 2013-03-26

作者简介: 刘 静, 女, 药物分析专业本科, 研究方向为药物分析。Tel: 15042455791 E-mail: ljgy7830@sina.com

1 仪器与试药

Waters UV 2695/2487 型高效液相色谱仪；Sartorius BP211D 型电子天平。

含量测定用对照品：阿托伐他汀钙（批号 130590-200802，质量分数 95.0%）；系统适用性试验用对照品：阿托伐他汀脱氟（质量分数 95.15%）、阿托伐他汀 3S,5R 异构体（质量分数 73.14%）、阿托伐他汀二氟（质量分数 95.41%）、阿托伐他汀内酯（质量分数 98.14%）、阿托伐他汀甲酯（质量分数 94.58%）、阿托伐他汀环氧乙烷（质量分数 84.24%）、阿托伐他汀叔丁酯对照品（质量分数 95.2%），均由厂家提供；阿托伐他汀钙原料药（批号 ABEH001006、ABEH001045、ABEH001068）；甲醇、乙腈均为色谱纯；水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Symmetry shield RP-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；以磷酸盐缓冲液（取 1.36 g 磷酸二氢钾加水至 1 000 mL，加三乙胺 1.0 mL，用稀磷酸调节 pH 值至 2.5）为流动相 A，乙腈-甲醇-水（770：50：180）为流动相 B，进行线性梯度洗脱见表 1；检测波长 246 nm；柱温 40 ℃；体积流量 1.0 mL/min；进样体积 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	50	50
40	35	65
48	10	90
55	10	90
60	50	50
70	50	50

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性试验溶液的制备 精密称取各杂质托伐他汀脱氟、阿托伐他汀异构体、阿托伐他汀二氟、阿托伐他汀内酯、阿托伐他汀甲酯、阿托伐他汀环氧乙烷、阿托伐他汀叔丁酯对照品各 5 mg，置 100 mL 量瓶中，加 20 mL 甲醇使溶解，用流动相 B 稀释至刻度。精密量取续滤液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用 0.02 mg/mL 阿托伐他汀钙对照品溶液稀释至刻度。

2.2.2 对照品溶液的制备 取阿托伐他汀钙对照品约 20 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加甲醇 20 mL 使溶解，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液；精密量取上述对照品储备液 10 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，作为对照品溶液（约含阿托伐他汀钙 0.02 mg/mL）。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密取阿托伐他汀钙原料药供试品约 20 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加甲醇 20 mL 使溶解，用流动相 B 溶解并稀释至刻度；摇匀，精密量取 10 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，作为供试品溶液（约含阿托伐他汀钙 0.02 mg/mL）。

2.2.4 溶剂空白溶液的制备 量取甲醇 20 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 10 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，作为空白溶液。

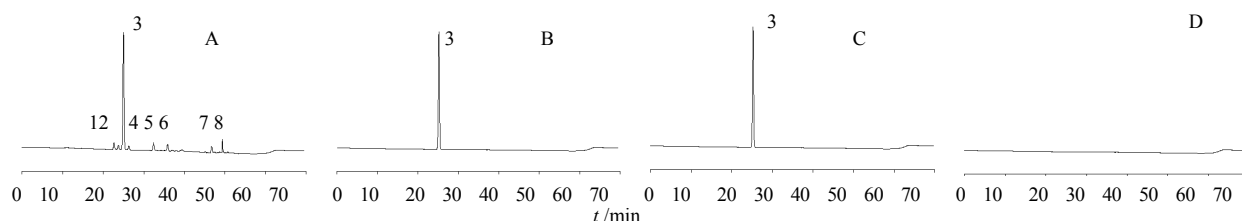
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别取系统适用性试验溶液、对照品溶液、供试品溶液和溶剂空白溶液，按上述色谱条件分别进样，色谱图见图 1。结果表明，色谱图的基线平稳，空白溶剂对测定无干扰；阿托伐他汀钙主峰的保留时间为 25.11 min，理论板数为 18 941，拖尾因子为 1.02，各相邻杂质峰与阿托伐他汀钙主峰均达到基线分离。

2.3.2 线性关系考察 精密量取对照品储备液 5、7.5、10、12.5、15 mL，分别置 100 mL 量瓶中，用流动相 B 溶解并稀释至刻度，摇匀，分别制成 10.66、15.98、21.31、26.64、31.97 μg/mL 的系列标准溶液，按上述色谱条件分别进样。以峰面积为横坐标，质量浓度为纵坐标绘制标准曲线，得线性回归方程 $Y=1.0044X+0.02439$ ($r=0.9998$)。结果表明，阿托伐他汀钙在 10.66~31.97 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 检测限和定量限 取 0.02 mg/mL 阿托伐他汀钙对照品溶液，采用逐步稀释法，按上述色谱条件分别进样。结果阿托伐他汀钙定量限为 0.14 μg/mL (S/N=10)，检测限为 0.04 μg/mL (S/N=3)。

2.3.4 精密度试验 取 0.02 mg/mL 阿托伐他汀钙对照品溶液，按上述色谱条件重复进样 6 次，记录色谱图，结果阿托伐他汀钙峰面积的 RSD 值为 0.20%。



1-阿托伐他汀脱氟 2-阿托伐他汀异构体 3-阿托伐他汀钙 4-阿托伐他汀二氟 5-阿托伐他汀内酯 6-阿托伐他汀甲酯 7-阿托伐他汀环氧乙烷 8-阿托伐他汀叔丁酯

1-atorvastatin defluoro 2-atorvastatin isomer 3-atorvastatin calcium 4-atorvastatin difluoro 5-atorvastatin lactone 6-atorvastatin methyl ester 7-atorvastatin oxirane 8-atorvastatin tertiary butyl ester

图 1 系统适用性试验溶液 (A)、对照品溶液 (B)、供试品溶液 (C) 和空白溶剂 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of system suitability solution (A), reference substance solution (B), sample solution (C), and blank solvent (D)

2.3.5 稳定性试验 取室温放置的供试品溶液, 按上述色谱条件, 在 0、4、8、12、16、20、24 h 分别进样, 记录色谱图, 结果阿托伐他汀钙峰面积的 RSD 值为 0.96%, 表明溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.3.6 回收率试验 分别精密称取 10 mg 含量已知的阿托伐他汀钙供试品 9 份, 分别精密加入相当于供试品检测质量浓度 80%、100%、120% 的对照品各 3 份, 用空白溶液稀释后, 按上述色谱条件分别进样, 测定阿托伐他汀钙的峰面积, 计算回收率, 结果平均回收率为 98.2%, RSD 值为 0.23%。

2.4 样品的测定

取 0.02 mg/mL 阿托伐他汀钙对照品溶液和供试品溶液, 按上述色谱条件分别进样, 记录色谱图, 按无水物计算阿托伐他汀钙原料中阿托伐他汀钙 ($C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$) 含量, 结果见表 2。

表 2 阿托伐他汀钙原料中阿托伐他汀钙的测定结果

Table 2 Determination of atorvastatin calcium in atorvastatin calcium bulks drug

批 号	阿托伐他汀钙/%
ABEH001006	99.6
ABEH001045	99.8
ABEH001068	99.7

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取阿托伐他汀钙对照品及 7 种阿托伐他汀钙相关杂质, 用空白溶剂溶解并稀释, 进行紫外扫描。

结果表明, 阿托伐他汀钙对照品在 246 nm 波长处有最大吸收, 同时, 7 种杂质在 246 nm 波长处也均有相对较大的响应, 因此选择 246 nm 作为本测定方法的检测波长。

3.2 流动相的选择

在建立实验方法的过程中, 对磷酸盐缓冲液 pH 值, 甲醇-乙腈-水系统中各组分不同比例, 及梯度洗脱的不同程序进行了考察。结果表明, 本方法中确立的实验条件实现了主成分与其相关的 7 种已知杂质的有效分离, 且色谱峰形较好。

3.3 检测方法的优越性

本实验建立的方法保证了阿托伐他汀峰与合成工艺中常见的 7 种杂质的有效分离, 解决了相关方法在测定阿托伐他汀钙时无法实现杂质与主成分有效分离的难题, 提高了阿托伐他汀钙含量测定的专属性, 从而避免含量过高的弊端, 可更好的控制阿托伐他汀钙的质量。

参考文献

- [1] 孙吉叶, 蔡旭东, 康秀娟, 等. 治疗高脂血症的新药研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 435-441.
- [2] 刘 巍, 张 庆. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆苯磺酸氨氯地平与阿托伐他汀钙浓度 [J]. 医药导报, 2010, 29(6): 698-701.
- [3] 张亚平, 杨淑莲, 陈芬儿. HPLC 法检测阿托伐他汀钙有关物质的含量及光学纯度 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2311-2313.
- [4] USP36-NF31 [S]. 2013: 2553-2555.
- [5] BP [S]. 2013: 197-199.