

HPLC 法测定肾上腺素和去甲肾上腺素原料药中有关物质

李 佩¹, 李银峰², 王杰晶³, 张园园¹, 靳朝东^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

3. 河南大学, 河南 开封 475001

摘要: **目的** 建立肾上腺素、去甲肾上腺素原料药中有关物质的 HPLC 分析方法。**方法** 采用五氟苯基柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.03 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇 (98:2), 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 20 ℃。**结果** 肾上腺素、去甲肾上腺素两种物质与其降解产物均能达到基线分离, 重复性好, 且呈现较好的线性关系。**结论** 该方法操作简单、快速、灵敏度高, 可用于肾上腺素、去甲肾上腺素原料药中有关物质的测定。

关键词: 肾上腺素; 去甲肾上腺素; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)05-0720-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.016

Determination of related substances in adrenaline and noradrenaline crude drugs by HPLC

LI Pei¹, LI Yin-feng², WANG Jie-jing³, ZHANG Yuan-yuan¹, JIN Chao-dong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of related substances in adrenaline and noradrenaline crude drugs. **Methods** The samples were performed on PFP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of 0.03 mol/L ammonium dihydrogen phosphate-methanol (98:2). The detection wavelength was 280 nm and column temperature was 20 ℃ with injection volume of 20 μL at a flow rate of 1.0 mL/min. **Results** Two components adrenaline, noradrenaline and their degradation products were well separated with good repeatability and linearity. **Conclusion** The method is simple, rapid, and sensitive, which could be applied for the determination of the related substances in adrenaline and noradrenaline crude drugs.

Key words: adrenaline; noradrenaline; related substances; HPLC

肾上腺素可使心脏收缩力增强, 心率加快, 骨骼肌血管、支气管平滑肌舒张, 去甲肾上腺素常用重酒石酸盐, 两者均为儿茶酚胺类物质^[1-2]。文献报道的测定该类物质所用的色谱柱多为 C₁₈ 柱^[3-8], 但是保留时间太短; 另外, 《中国药典》2010 年版二部收载的肾上腺素测定方法中, 所用的流动相含有离子对庚烷磺酸钠, 对色谱柱损伤较大, 且平衡时间长^[9]。新型色谱柱五氟苯基 (PFP) 柱不需要添加离子对试剂, 却可以达到很好的分离效果, 分离度

高, 出峰时间适中。本实验建立了同一种色谱条件下测定肾上腺素和重酒石酸去甲肾上腺素中有关物质的方法, 并对该实验进行了方法学验证, 为该类药物的质量控制提供了更简单易行的检测方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (惠普 1100 高压四元泵液相系统); HP8453 型紫外可见分光光度计 (美国安捷伦公司); Milli-Q 超纯水; 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 其余为分析纯; 肾上腺素 (天

收稿日期: 2013-03-18

作者简介: 李 佩 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: lipei621852@163.com

*通信作者 靳朝东 Tel: (022) 23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

津药物研究院提供, 质量分数 $>99.8\%$, 批号分别为 120312、120313、120314); 重酒石酸去甲肾上腺素(天津药物研究院提供, 质量分数 $>99.5\%$, 批号分别为 110106、110107、110108); 肾上腺酮(质量分数 99.89%)、盐酸多巴胺(质量分数 99.76%)对照品由湖北共展科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

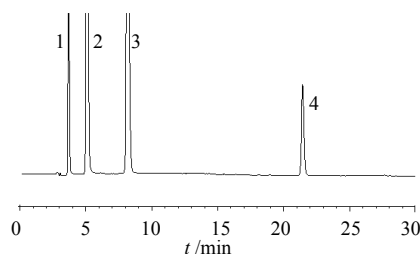
色谱柱为 PFP 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.03 mol/L 磷酸二氢铵-甲醇(98:2), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 20 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

分别精密称取肾上腺素、重酒石酸去甲肾上腺素适量, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 混匀, 即得。肾上腺素和重酒石酸去甲肾上腺素溶液的质量浓度分别约为 0.6、1.0 mg/mL。

2.3 专属性试验

2.3.1 分离度试验 分别取肾上腺素和去甲肾上腺素供试品溶液 5、2 mL, 0.2 mg/mL 多巴胺 1 mL, 0.17 mg/mL 肾上腺酮 2 mL, 混匀, 进样 20 μ L, 记录色谱图。结果表明肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺和肾上腺酮 4 个峰分离效果良好, 见图 1。



1-多巴胺 2-去甲肾上腺素 3-肾上腺素 4-肾上腺酮
1-dopamine 2-noradrenaline 3-adrenaline 4-adrenalone

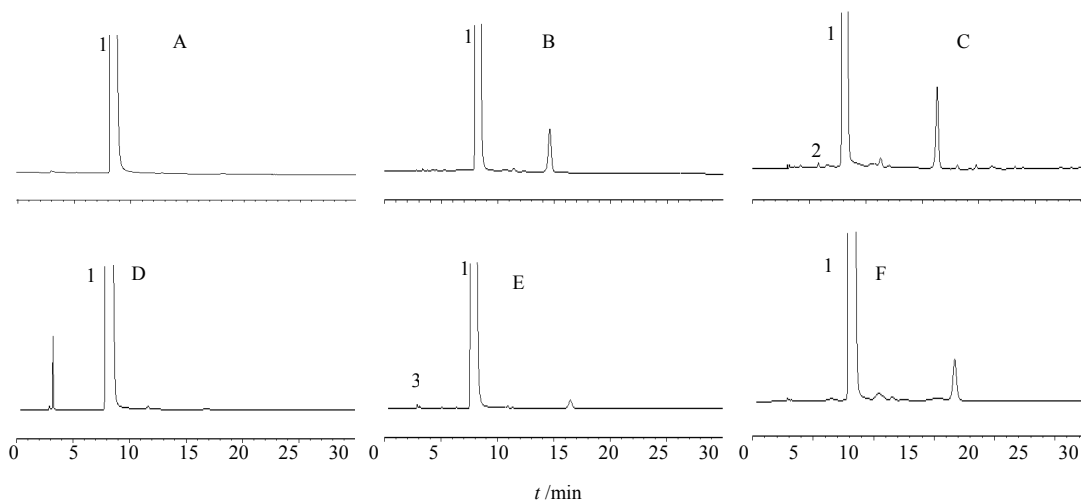
图1 分离度测定图谱

Fig. 1 Chromatogram of separation

2.3.2 破坏性试验 分别称取肾上腺素和去甲肾上腺素供试品适量, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加适量流动相溶解, 分别加 1 滴饱和氢氧化钠、2 滴浓盐酸, 并加流动相至刻度, 混匀。

分别于 35 $^{\circ}$ C 加热 10、30 min, 中和至中性; 取供试品溶液适量, 加 30% 过氧化氢溶液 1 滴, 常温分别放置 1、2 h; 取上述供试品溶液于 65 $^{\circ}$ C 水浴中分别加热 0.75、2.5 h; 取上述供试品溶液, 置 4 500 lx 光强度下, 分别光照 45、68 h; 同时分别做各自供试品溶液的空白对照溶液。

取以上各试验的样品溶液, 分别进样 20 μ L, 记录色谱图, 并与未破坏的样品进行对照。结果见图 2、3。



A-肾上腺素样品 B-加热破坏 C-光照破坏 D-氧化破坏 E-酸破坏 F-碱破坏 1-肾上腺素 2-肾上腺酮 3-多巴胺
A-adrenaline sample B-heat destruction C-strong light destruction D-hydrogen peroxide destruction E-acid destruction F-alkali destruction
1-adrenaline 2-adrenalone 3-dopamine

图2 肾上腺素降解产物的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of degradation products of adrenaline

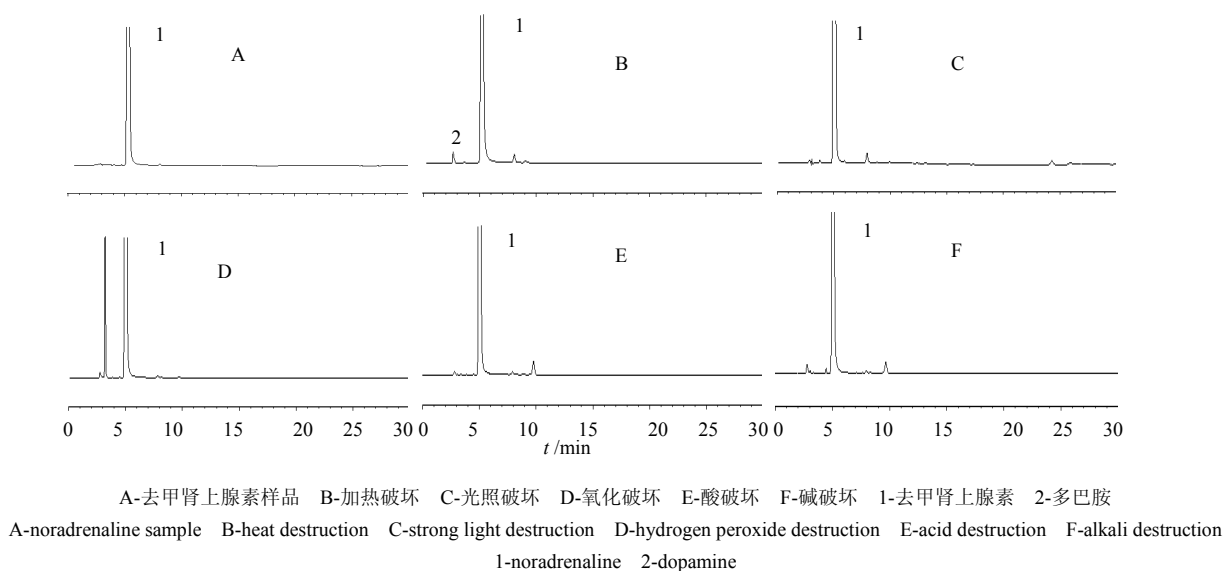


图 3 去甲肾上腺素降解产物的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of degradation products of noradrenaline

未破坏的供试品溶液中, 肾上腺素和去甲肾上腺素的出峰时间分别约为 8.0、5.0 min, 已知杂质多巴胺和肾上腺酮的出峰时间分别约为 3.6、20.0 min。破坏试验结果表明, 样品在上述强破坏条件下均有不同程度的降解产物生成, 且均能分别与肾上腺素、去甲肾上腺素峰达到完全分离, 表明该方法专属性良好。肾上腺素在加热、光照和碱破坏以及去甲肾上腺素在酸和碱破坏条件下不稳定, 杂质峰增加明显。重酒石酸去甲肾上腺素在加热条件下, 产生已知降解产物保留时间 3.6 min 处出现多巴胺的峰, 其他降解产物均为未知杂质。肾上腺素在光照条件下, 产生降解产物保留时间 19.8 min 处为肾上腺酮峰; 在酸破坏条件下, 产生降解产物保留时间 5.0 min 处为去甲肾上腺素峰。

2.4 线性关系考察

分别取肾上腺素和去甲肾上腺素样品适量, 精密称定, 分别加流动相溶解, 并稀释成质量浓度分别为 6.37、127.40、319.00、510.00、637.00、956.00、1 274.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.08、215.80、539.50、863.20、1079.00、1 618.50、2 158.00 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 吸取 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 按以上色谱条件分析, 记录色谱图。以质量浓度为横坐标, 吸收峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得肾上腺素标准曲线方程 $Y=16\,189X+5.898\,6$ ($r=0.999\,9$), 去甲肾上腺素标准

曲线方程 $Y=9\,031.8X+13.294$ ($r=0.999\,9$), 结果表明肾上腺素、去甲肾上腺素分别在 6.37~1 274.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.08~2 158.00 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.5 定量限及检测限

按信噪比 10:1 测得肾上腺素和去甲肾上腺素的定量限分别为 0.71、1.37 $\mu\text{g/mL}$ 。按信噪比 3:1 测得肾上腺素和去甲肾上腺素最小检测限分别为 14.20、137.00 ng/mL。

2.6 精密度试验

分别取肾上腺素和去甲肾上腺素供试品溶液各 1 份, 按以上色谱条件分析, 分别进样 20 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算得其主峰面积的 RSD 值分别为 0.22%、0.59%。

2.7 稳定性试验

分别取肾上腺素和去甲肾上腺素供试品溶液各 1 份, 按以上色谱条件分析, 每间隔一定时间 (0、1、2、4、8 h) 分别进样 20 μL 测定, 记录色谱图, 以有关物质峰面积考察溶液的稳定性, 结果肾上腺素溶液在 1 h 内稳定, RSD 值为 1.02%; 去甲肾上腺素溶液不稳定, 需要现配现用。

2.8 重复性试验

分别配制肾上腺素和去甲肾上腺素供试品溶液各 6 份, 按以上色谱条件分析, 分别进样 20 μL , 记录色谱图, 计算得肾上腺素和重酒石酸去甲肾上腺素

腺素峰面积的 RSD 值分别为 1.06%、0.72%。

2.9 样品测定

分别取肾上腺素和去甲肾上腺素的 3 批样品, 制备供试品溶液, 按上述条件进行测定, 结果见表 1、2。

表 1 肾上腺素样品有关物质测定结果

Table 1 Determination of related substances in adrenaline samples

批 号	主成分/%	有关物质/%	
		单个最大杂质	总杂质
120312	99.93	0.07	0.07
120313	99.94	0.06	0.06
120314	99.94	0.06	0.06

表 2 去甲肾上腺素样品有关物质测定结果

Table 2 Determination of related substances in norepinephrine samples

批 号	主成分/%	有关物质/%	
		单个最大杂质	总杂质
110106	99.77	0.23	0.23
110107	99.85	0.15	0.15
110108	99.87	0.13	0.13

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

在流动相及其他色谱条件不变的情况下, 分别选用 C₄、C₈、C₁₈、C₃₀、氨基柱、二醇基柱及五氟苯基柱对样品进行分离测定, 结果发现其他色谱柱在水相比比例很高时, 出峰时间仍很靠前, 只有五氟苯基柱出峰时间适中, 且对肾上腺素和去甲肾上腺素能达到基线分离, 故最终选择五氟苯基柱做为样品分离色谱柱。

3.2 流动相的选择

因样品在碱性条件下不稳定, 在流动相其他条

件一致时, 配制一系列不同 pH 值的流动相, 供试品溶液随着 pH 值的增高, 出峰时间后移, 但是当 pH 值为 5.5 时, 峰型变宽, 且样品溶解时间较长。而 pH 值为 4.8 左右时, 出峰时间比较适中, 且峰型均较好, 因此, pH 值选择 4.8。

3.3 缓冲盐的选择

磷酸二氢钾主峰拖尾; 使用醋酸铵缓冲盐时, 肾上腺素和去甲肾上腺素峰不能达到基线分离; 磷酸二氢铵的分离效果较好, 综合考虑选择磷酸二氢铵缓冲盐溶液。

参考文献

- [1] 龙 梅. 儿茶酚胺类物质的分离分析方法研究进展 [J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2011, 27(3): 1-3.
- [2] 金 薇, 彭兴盛, 陈 阳, 等. HPLC-ECD 测定重酒石酸去甲肾上腺素的有关物质 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1485-1488.
- [3] 廖亚玲, 董登贤, 周 俊. 高效液相色谱法测定复方盐酸阿替卡因注射液的含量 [J]. 医药导报, 2005, 24(10): 940-941.
- [4] 孙克刚, 施建国, 蒋宇丹. HPLC 法同时测定盐酸异丙肾上腺素注射液和盐酸肾上腺素注射液的含量及有关物质 [J]. 上海医药, 2012, 33(5): 41-44.
- [5] 彭 婕. 高效液相色谱法测定血浆中儿茶酚胺类物质含量 [A]. 第十一届江苏省药师周大会论文集 [C]. 常州: 第十一届江苏省药师周大会, 2011.
- [6] 黄 露. 高效液相色谱法分离检测四种肾上腺素类化合物 [J]. 科技信息, 2011(29): 14.
- [7] 吴延晖, 许 泓, 肖亚兵, 等. 高效液相色谱法检测化妆品中儿茶酚胺类药物的残留量 [J]. 日用化学工业, 2009, 39(6): 439-441.
- [8] 曹全胜, 胡 敏, 黄 伟, 等. 盐酸异丙肾上腺素及注射液的有关物质研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 838-842.
- [9] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 459.