

RP-HPLC 法测定丁酸氯维地平原料药中有关物质

林秀云¹, 李银峰², 陈晓雨¹, 樊玉丹¹, 黄凤芸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

摘要:目的 建立测定丁酸氯维地平原料药中有关物质的 RP-HPLC 法。方法 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-环己烷-水(70:0.5:30); 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 240 nm; 进样体积为 20 μL。结果 丁酸氯维地平及其 14 种杂质能够达到良好的分离; 丁酸氯维地平及其杂质 I、III、IV、V 的质量浓度与峰面积的线性关系良好; 丁酸氯维地平及其 14 种杂质的检测限(S/N≥3)在 0.57~3.13 ng。结论 该方法简便准确、重复性好, 专属性强, 精密度高, 可用于丁酸氯维地平原料药中有关物质的测定。

关键词: 丁酸氯维地平; 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(2015)12-1446-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.12.004

Determination of related substances in clevidipine butyrate bulks drug by RP-HPLC

LIN Xiu-yun¹, LI Yin-feng², CHEN Xiao-yu¹, FAN Yu-dan¹, HUANG Feng-yun¹, 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

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for determination of related substances in clevidipine butyrate bulks drug.

Methods The separation was performed on a Welchrom C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol - cyclohexane - water (70 : 0.5 : 30) as mobile phase. The detection wavelength was set at 240 nm and the injection volume was 20 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃. **Results** Clevidipine butyrate and 14 kinds of its impurities could be achieved good separation. There were good linear relationships of clevidipine butyrate and impurity I, III, IV, and V between concentration and peak, and the detection limits (S/N ≥ 3) were 0.57 — 3.13 ng. **Conclusion** This method is simple, accurate, reproducible, specific, and suitable for the determination of related substances in clevidipine butyrate bulks drug.

Key words: clevidipine butyrate; related substances; HPLC

丁酸氯维地平的化学名为 4-(2,3-二氯苯基)-1-4-二氢-2-6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸甲基-(1-氧代丁氧基)甲酯, 是由英国 AstraZeneca 公司研制开发的第 3 代新型短效二氢吡啶类静脉注射用钙通道拮抗剂, 于 2008 年 8 月经美国 FDA 批准上市, 主要用于急性高血压的治疗及术后血压的控制^[1]。目前各国药典均未收录丁酸氯维地平的药典标准, 其中关于丁酸氯维地平中有关物质测定方法的报道中, 熊野娟等^[2]采用有缓冲盐的流动相体系, 使用梯度洗脱, 测定了丁酸氯维地平和 7 种杂质; 袁慧雅等^[3]仅对丁酸氯维地平进行了研究, 并未对专属性试验

中产生的降解杂质进一步研究; 刘艳华等^[4]采用有缓冲盐的流动相体系, 并使用梯度洗脱法测定丁酸氯维地平和 10 种杂质。本实验选用丁酸氯维地平及其 14 种杂质来优化色谱方法, 有 5 种杂质(杂质 II、IV、VII、XIII、XVI)尚未见文献报道, 其中杂质 IV 是丁酸氯维地平水解脱去丁酸酯形成的杂质, 对丁酸氯维地平原料药的质量具有重要影响, 杂质 II、XIII、XVI 是工艺杂质, 杂质 VII 是丁酸氯维地平脱氢氧化和水解形成的杂质。经过色谱条件的优化, 本实验采用甲醇-环己烷-水(70:0.5:30)作为流动相, 并根据样品检测及强制降解

收稿日期: 2015-09-15

作者简介: 林秀云(1989—), 女, 河北省唐山市, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: 18222135779 E-mail: linxy1117@126.com

*通信作者 靳朝东, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (022) 23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

试验结果,在进行方法学验证过程中,研究了杂质 I、III、IV、V。结果表明,此方法专属性高,操作简单、分离度好,重复性好,准确度、精密度高。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括 G1311B 二元泵、G1329 B 自动进样器、G1316C 柱温箱和 G4212B DAD 检测器。

1.2 药品和试剂

丁酸氯维地平对照品(批号 130306,质量分数 99.85%)、原料药(批号 130715、130816、130817、130818)以及 14 个杂质对照品均由天津药物研究院化学制药部提供。甲醇为色谱纯(天津市康科德科技发展有限公司),环己烷为分析纯(天津市凯信化学工业有限公司),水为 Milli-Q 超纯水。

杂质对照品分别为 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(杂质 I)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-乙氧基-5-甲酯(杂质 II)、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(杂质 III)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-甲酯(杂质 IV)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-丁酰氧基甲基酯-5-甲酯(杂质 V)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3-羧酸甲酯(杂质 VI)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-3,5-二羧酸-3-甲酯(杂质 VII)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-3-吡啶羧酸甲酯(杂质 VIII)、6-(2,3-二氯苯基)-4-甲基-2-氧代环己基-3-烯-甲酸甲酯(杂质 IX)、二氰基乙基-4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸酯(杂质 XI)、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(杂质 XII)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-氰基乙氧基-5-乙酯(杂质 XIII)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-丁酰氧基甲基酯-5-乙酯(杂质 XV)、4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸-3-氰基乙氧基酯-5-甲酯(杂质 XVI),峰面积归一化法测定质量分数分别为 98.23%、96.29%、98.12%、98.46%、98.18%、95.13%、97.58%、95.39%、95.79%、95.54%、96.49%、97.51%、95.15%、96.30%。

2 方法与结果

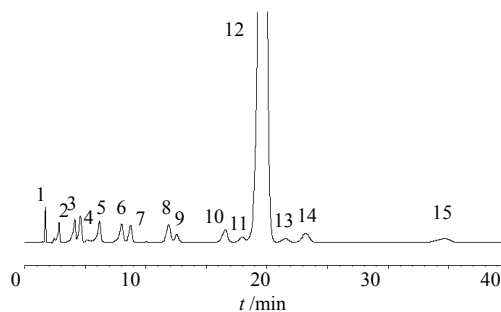
2.1 色谱条件

Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5

μm);流动相为甲醇-环己烷-水(70:0.5:30);体积流量为 1 mL/min;柱温为 30 ℃;检测波长为 240 nm;进样体积为 20 μL。

2.2 专属性试验

2.2.1 样品+1%杂质的溶液 称取丁酸氯维地平及各杂质适量,用甲醇溶解并稀释制成混合溶液。其中丁酸氯维地平质量浓度为 0.3 mg/mL,各杂质质量浓度为 0.003 mg/mL,色谱图见图 1。



1-杂质 VII 2-杂质 XII 3-杂质 XI 4-杂质 IV 5-杂质 XVI 6-杂质 XIII 7-杂质 IX 8-杂质 III 9-杂质 VIII 10-杂质 II 11-杂质 V 12-丁酸氯维地平 13-杂质 VI 14-杂质 XV 15-杂质 I
1-impurity VII 2-impurity XII 3-impurity XI 4-impurity IV 5-impurity XVI 6-impurity XIII 7-impurity IX 8-impurity III 9-impurity VIII 10-impurity II 11-impurity V 12-clevidipine butyrate 13-impurity VI 14-impurity XV 15-impurity I

图1 丁酸氯维地平与各杂质的分离色谱图

Fig. 1 Chromatogram of separation of clevidipine butyrate with its impurities

2.2.2 强制降解试验 (1) 未降解试验 称取丁酸氯维地平适量,用甲醇溶解,制成质量浓度为 1.5 mg/mL 的储备液。量取 2 mL 样品储备液于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度;(2) 酸降解试验 量取样品储备液 2 mL 于 10 mL 量瓶中,在室温下,加入 0.5 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL,立即用 20%氢氧化钠调 pH 值至中性,并用甲醇稀释至刻度,同法做空白溶液;(3) 碱降解试验 量取样品储备液 2 mL 于 10 mL 量瓶中,在室温下,加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 2 滴,立即用 20%盐酸调 pH 值至中性,并用甲醇稀释至刻度,同法做空白溶液;(4) 氧化降解试验 量取样品储备液 10 mL 于 50 mL 圆底烧瓶中,加 30%过氧化氢 0.5 mL,水浴 90 ℃下加热 5 min,放置至室温,再定量转移至 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,同法做空白溶液;(5) 加热降解试验 量取样品储备液 10 mL 于 50 mL 圆底烧瓶中,加热回流 4.5 h,再放置至室温,定量转移至 50

mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，同法做空白溶液；
(6)光照降解试验 量取样品储备液 2 mL 于 10 mL 透明量瓶中，用甲醇稀释至刻度，于光照试验箱 (4 500±500) lx 中放置 16 d，同法做空白溶液。

从降解前后的物料平衡和色谱峰质量分数两个方面考察降解试验结果，见表 1、2，图谱见图 2。结果表明：降解前后物料平衡结果在 90%~110%，符合要求。在酸、碱条件下本品易水解为杂质 IV；在长时间光照情况下，易氧化为杂质 V，部分杂质 V 经水解可转化为杂质 VII；故本品在保存及运输过程中应避免与水 and 酸碱接触，避光，密封保存。

表 1 强制降解试验物料平衡结果

Table 1 Results material balance in forced degradation test

降解试验	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	峰面积之和	物料平衡/%
降解前	0.300	14 249.7	—
酸降解	0.300	14 117.3	99.07
碱降解	0.300	12 984.3	91.12
加热降解	0.300	13 229.2	92.84
氧化降解	0.300	13 618.4	95.57
光照降解	0.300	13 858.3	97.25

表 2 强制降解试验结果

Table 2 Results of forced degradation test

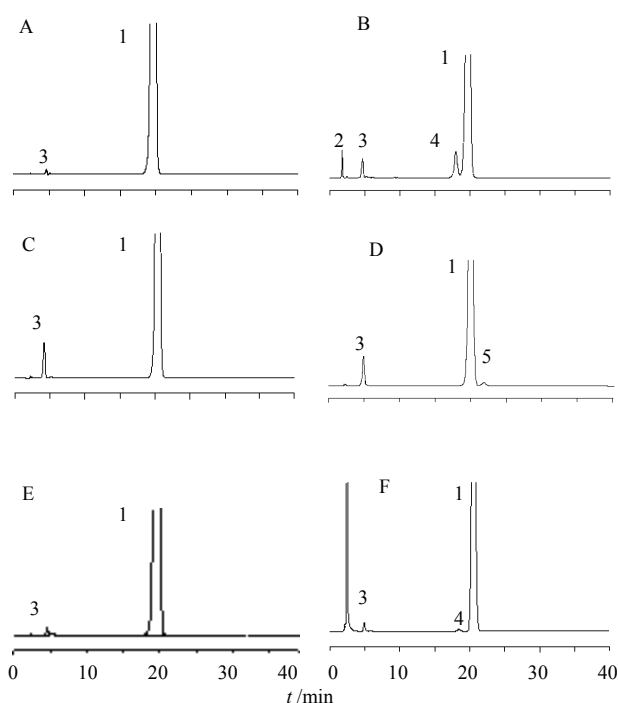
试验	质量分数/%				
	杂质 IV	杂质 V	杂质 VI	杂质 VII	主峰
降解前	0.34	—	—	—	99.66
酸降解	3.13	—	—	—	96.87
碱降解	3.61	—	0.58	—	95.81
加热降解	0.86	—	—	—	99.14
氧化降解	0.76	0.27	—	—	98.97
光照降解	1.81	5.12	—	1.37	91.70

— 未检出

— not detected

2.3 线性关系考察

分别称取丁酸氯维地平对照品以及杂质 I、III、IV、V 对照品约 15 mg，置不同 25 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度；然后各取 0.5 mL 置同一 100 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 1%储备液（混合）；分别量取 1%储备液（混合）0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0 mL 于不同 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度。再量取杂质 V 溶液 0.5 mL 置 100 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 1%储备液；分别量取 1%储备液 0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、3.0 mL



1-丁酸氯维地平 2-杂质 VII 3-杂质 IV 4-杂质 V 5-杂质 VI
1-clevetidipine butyrate 2-impurity VII 3-impurity IV 4-impurity V 5-impurity VI

图 2 未降解 (A)、光照降解 (B)、酸降解 (C)、碱降解 (D)、加热降解 (E)、氧化降解 (F) 的样品色谱图
Fig. 2 Chromatograms of samples before degradation (A), destroyed by illumination degradation (B), acid degradation (C), alkaline degradation (D), heat degradation (E), and oxide degradation (F)

于不同 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度。上述溶液即为相应质量浓度的丁酸氯维地平以及杂质 I、III、IV、V 溶液，取相应质量浓度的溶液 20 μL 进样，记录色谱图。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，结果见表 3。

2.4 检测限

称取丁酸氯维地平对照品、各杂质适量，用甲醇溶解并逐步稀释至信噪比≥3 (S/N≥3) 相对应的质量浓度，作为检测限，结果见表 4。

2.5 定量限

分别称取丁酸氯维地平对照品以及杂质 I、III、IV、V 约 15 mg，置不同 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度。将上述溶液分别逐步稀释至信噪比≥10 相对应的质量浓度。每份样品进样 20 μL，连续进样 6 次，测定峰面积值，结果其 RSD 值分别为 1.89%、1.94%、1.56%、1.57%、1.38%。

表 3 丁酸氯维地平 and 杂质 I、III、IV、V 的线性方程

Table 3 Regression equations of clevidipine butyrate and impurity I, III, IV, and V

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
丁酸氯维地平	$Y=0.0515 X-0.0087$	0.999 3	150.0~600.0
杂质 I	$Y=0.0428 X-0.4208$	0.999 3	147.5~590.0
杂质 III	$Y=0.0547 X+0.7575$	0.999 5	148.0~592.0
杂质 IV	$Y=0.0555 X+0.3783$	0.999 7	149.0~596.0
杂质 V	$Y=0.0206 X+1.0247$	0.999 2	244.8~918.0

表 4 检测限测定结果

Table 4 Results of detection limit

名称	<i>t_R</i> /min	峰面积	检测限/ng
丁酸氯维地平	20.82	1.80	0.61
杂质 I	37.30	1.81	1.24
杂质 II	17.36	1.32	0.61
杂质 III	12.36	1.44	0.60
杂质 IV	4.70	1.31	0.61
杂质 V	19.09	1.44	1.26
杂质 VI	22.65	1.64	3.13
杂质 VII	1.66	1.73	1.28
杂质 VIII	13.15	1.60	1.27
杂质 IX	9.07	1.34	0.57
杂质 XI	4.18	1.2	0.62
杂质 XII	2.86	1.49	1.25
杂质 XIII	8.27	1.29	0.63
杂质 XV	24.58	1.28	0.63
杂质 XVI	6.31	1.30	0.61

2.6 回收率试验

分别精密称取杂质 I、III、IV、V 对照品 15.08、15.10、15.08、15.14 mg，置不同 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度。分别取各杂质对照品溶液 0.5 mL 于同一 50 mL 量瓶中，即得 1% 杂质储备液；取 1% 杂质储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 0.1% 杂质对照溶液；称取丁酸氯维地平原料药（批号 130715）约 3 mg，于 10 mL 量瓶，用甲醇溶解并稀释刻度，平行配制 9 份。分别加入 1% 杂质储备液 0.8、1、1.2 mL，各 3 份。分别取上述供试品溶液进样测定，记录色谱图。结果表明，杂质 I、III、IV、V 的平均回收率分别为 101.62%、97.54%、110.24%、102.16%，RSD 值分别为 3.28%、1.68%、6.20%、6.41% ($n=9$)。杂质 IV 回收率较高是由于丁酸氯维地平溶液不稳定，在放置过程中

主成分易水解为杂质 IV。

2.7 精密度试验

称取丁酸氯维地平（批号 130715）3 mg 于 10 mL 量瓶，按 0.1% 的杂质限度（杂质质量浓度为 0.3 μg/mL）加入杂质 I、III、IV、V，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得混合溶液；将该混合溶液平行进样 6 次，进样 20 μL，记录色谱图，计算各杂质峰面积的 RSD 值，结果杂质 I、III、IV、V 峰面积的 RSD 值分别为 4.45%、0.004%、12.56%、0.003%。

在不同时间由不同操作人员，按上述重复性试验，同法配制混合溶液并进样，记录色谱图，计算各杂质峰面积的 RSD 值，结果杂质 I、III、IV、V 的峰面积的日间 RSD 值分别为 4.08%、0.003%、10.17%、9.12%。

2.8 耐用性试验

通过考察不同批次色谱柱、检测波长、柱温的微小变化对混合溶液（混合溶液使用 2.2.2 强制降解试验项下“样品+1% 杂质的溶液”）中各峰分离度的影响，并同时测定样品（批号 130715）+0.1% 杂质的供试品溶液（该供试品溶液配制方法见 2.7 精密度项下混合溶液的配制方法。）研究后表明，杂质 V 与丁酸氯维地平之间分离度不小于 1.5，各峰之间分离度符合要求，并且在各微小变化情况下，杂质总量都在 0.5% 左右，杂质总量的 RSD 值为 2.90%，杂质个数没有发生变化。

2.9 系统适用性试验

通过耐用性试验结果可知，当杂质 V 与主峰的分离度较好时，其余杂质之间及杂质与主峰之间的分离度符合要求。故系统适用性试验主要考察杂质 V 与丁酸氯维地平之间的分离度。取杂质 V 和丁酸氯维地平适量，用甲醇溶解并稀释，制成含杂质 V 0.009 mg/mL、丁酸氯维地平 0.3 mg/mL 的溶液，进样测定，记录色谱图，结果杂质 V 与主峰分离度不

小于1.5。

2.10 稳定性试验

称取丁酸氯维地平样品(批号130715)适量,用甲醇溶解,制备0.3 mg/mL溶液,分别于0、2、4、7、10、12、24 h进样测定。结果表明,氯维地平、杂质IV、杂质III质量分数的RSD值分别为0.12%、97.15%、4.75%。杂质IV在2 h有所增加,表明样品溶液不稳定,容易水解成杂质IV,故样品应现配现用。

2.11 样品测定

取4批丁酸氯维地平原料药样品,精密称定,加甲醇适量,振摇使溶解,制成0.3 mg/mL丁酸氯维地平溶液,作为供试品溶液(供试品溶液需现配现用);精密量取供试品溶液1 mL,置100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为对照溶液;进样测定,用主成分1%自身对照法计算质量分数,结果见表5。

表5 丁酸氯维地平原料药中有关物质测定结果

Table 5 Determination of related substances in clevipine butyrate bulks drug

批号	质量分数/%			
	杂质 I	杂质 III	杂质 IV	杂质 V
130715	—	0.013	0.018	—
130816	0.025	0.016	0.010	—
130817	—	0.034	—	—
130818	—	0.018	0.013	—

—未检出

— not detected

3 讨论

3.1 流动相中水相的考察

分别考察了不同pH值情况下测定混合样品,结果显示pH值对分离度和峰形影响较小;另外考察了在缓冲盐和纯水的条件下测定混合样品,结果显示不加缓冲盐情况下分离度和峰形均较好,故选择纯水作为流动相中的水相。

3.2 柱温的考察

分别考察了不同柱温(30、35、40℃)条件下

测定混合样品,结果显示随着柱温的升高,杂质I峰形变差,杂质II、V与主峰之间分离度变小,且柱温高影响色谱柱使用寿命,故选择柱温为30℃。

3.3 色谱柱的考察

分别考察了不同厂家色谱柱(Thermo Scientific C₁₈、Agela Venusil XBP C₁₈、Cosmosil C₁₈、Welchrom C₁₈)测定混合样品,结果显示Welchrom C₁₈柱测定时杂质与杂质之间及杂质与主峰之间分离度及峰形均较好。

综上所述,在已有对丁酸氯维地平原料药的方法学研究中,文献中采用的方法有的采用了缓冲盐体系作为流动相,使用梯度洗脱,对色谱柱损耗较大,操作繁琐;有的对重要杂质研究不完善。本文在文献的基础上,重新摸索了新方法,采用等度洗脱,不采用缓冲盐体系作为流动相,并使用14种丁酸氯维地平杂质对方法进行验证,特别是对杂质IV的研究,填补了之前文献报道的空白。在方法学验证过程中,稳定性试验、强制降解试验和回收率试验均表明,丁酸氯维地平溶液在放置过程中,易水解为杂质IV;在强制降解试验中,在长期光照试验情况下,主成分易氧化后转化成杂质VII;所以丁酸氯维地平原料药的控制有重要的意义。验证结果表明,此方法专属性高,操作简单,重现性好,准确度高,精密度高,适用于丁酸氯维地平原料药中有关物质检查。

参考文献

- [1] 李 灵, 毕开顺, 胡 欣. 丁酸氯维地平注射乳的药理及临床研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(12): 1003-1006.
- [2] 熊野娟, 陈秋芬, 姜 玲, 等. RP-HPLC法检查丁酸氯维地平原料药中的有关物质 [J]. 中国药房, 2014, 25(45): 4287-4290.
- [3] 袁慧雅, 邓娅琳, 于 鑫, 等. 丁酸氯维地平及其有关物质的测定和处方前研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(5): 369-374.
- [4] 刘艳华, 吕狄亚, 宋志勇, 等. 反相高效液相色谱法同时测定丁酸氯维地平中10种相关杂质 [J]. 分析化学, 2015, 43(2): 257-263.