

HPLC 法测定注射用硝酸异山梨酯的有关物质

刘朝霞¹, 吴健敏¹, 何 兰¹, 丁丽霞²

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 中国药学会, 北京 100022

摘要:目的 采用梯度 HPLC 法测定注射用硝酸异山梨酯的有关物质。方法 采用 Agela Venusil MP C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以水-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温 30℃。结果 系统适用性试验 2-单硝酸异山梨酯峰与单硝酸异山梨酯峰分离良好, 样品中各杂质及主峰的分离度和检测灵敏度均能满足有关物质的测定要求。**结论** 本方法可用于测定注射用硝酸异山梨酯的有关物质, 为该品种的质量评价提供更具分辨力的方法。

关键词: 注射用硝酸异山梨酯; 有关物质; HPLC; 梯度洗脱; 校正因子

中图分类号: R917.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)04-0598-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.04.016

Determination of related substances in Isosorbide Dinitrate for Injection by HPLC

LIU Zhao-xia¹, WU Jian-min¹, HE Lan¹, DING Li-xia²

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Chinese Pharmaceutical Association, Beijing 100022, China

Abstract: Objective To determinate the related substances in Isosorbide Dinitrate for Injection by HPLC. **Methods** The Agela Venusil MP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the analysis column, the mobile phase composed of a mixture of water and methanol with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results** Under this condition, the resolutions between isosorbide mononitrate and isosorbide 2-nitrate could meet requirement. The sensitivity of the method was acceptable. **Conclusion** The method developed in the paper can provide an specific, efficient, and convenient method for quality control and evaluation of Isosorbide Dinitrate for Injection.

Key words: Isosorbide Dinitrate for Injection; related substances; HPLC; gradient elution; correction factor

注射用硝酸异山梨酯为国家基本药物目录(2010年)收录的血管扩张药。硝酸异山梨酯主要的药理作用为松弛血管平滑肌, 继而引起外周动脉和静脉回流, 起到对静脉血管和冠状动脉的扩张作用。适用于急性心梗后继发左心室衰竭, 各种不同病因所致左心室衰竭及严重或不稳定型心绞痛^[1-2]。依托国家药典委员会标准提高工作, 本文建立了该品种有关物质检查的梯度 HPLC 法, 不仅可满足质控需求, 同时也为质量评价提供更具区分力的检测方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪、2996 型 PAD 检测器(美国 Waters 公司), XP205 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

硝酸异山梨酯对照品(批号 100250-200503, 100.0%)、2-单硝酸异山梨酯对照品(批号 100695-200401, 100.0%)、单硝酸异山梨酯对照品(批号 100694-200401, 100.0%)均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇(HPLC 级, Fisher Scientific),

收稿日期: 2016-06-05

作者简介: 刘朝霞, 女, 助理研究员, 研究方向为化学药品质量控制研究。Tel: 13426314229 E-mail: Liuzhx@nifdc.org.cn

水 (Millipore 超纯水), 盐酸 (分析纯, 北京化学试剂公司), 氢氧化钠 (分析纯, 北京化学试剂公司), 过氧化氢水溶液 (分析纯, 北京化学试剂公司); 注射用硝酸异山梨酯样品 (共 4 批, ①北京四环科宝制药有限公司, 批号 10092007; ②长春国奥药业有限公司, 批号 20100301; ③天津君安生物制药有限公司, 批号 20100101; ④多菲制药 (中国) 有限公司, 批号 20110101)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

供试品溶液的制备: 取本品适量, 精密称定, 加甲醇-水 (25:75) 溶解并定量稀释制成约含硝酸异山梨酯 1 mg/mL 的溶液, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

对照品储备溶液的制备: 精密称取 2-单硝酸异山梨酯对照品和单硝酸异山梨酯对照品各约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇-水 (25:75) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液。

对照溶液的制备: 精密量取对照品储备溶液 1 mL, 置 200 mL 量瓶中, 再精密加入供试品溶液 1 mL, 用甲醇-水 (25:75) 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.2 色谱条件

采用 Agela Venusil MP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以水-甲醇为流动相梯度洗脱 (表 1), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30℃, 检测波长为 210 nm, 进样量 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient program

时间/min	水/%	甲醇/%
0	75	25
7	75	25
17	10	90
22	10	90
23	75	25
30	75	25

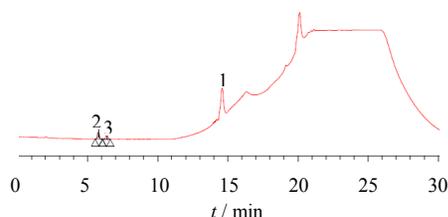
2.3 专属性考察

2.3.1 系统适用性试验 取“2.1”项下对照溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图 (图 1), 2-单硝酸异山梨酯峰和单硝酸异山梨酯峰的分度度为 2.8, 同时考察了其他品牌的色谱柱, 分度度均大于 2.0, 见表 2。

表 2 系统适用性溶液在不同色谱柱上的分析结果

Table 2 Analysis results of system suitability solution on different columns

色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	单硝酸异山梨酯峰和 2-单硝酸异山梨酯峰的分度度
Agela Venusil MP C ₁₈	2.8
Inertsil ODS-3	2.8
Agilent ZORBAX Eclipse XDB C ₁₈	2.4
Inertsil ODS2	3.3



1- 硝酸异山梨酯; 2- 2-单硝酸异山梨酯; 3- 单硝酸异山梨酯
1- isosorbide dinitrate; 2- isosorbide 2-nitrate; 3- isosorbide mononitrate

图 1 系统适用性试验溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of system suitability test solution

2.3.2 强制降解试验

储备液的制备: 精密称取硝酸异山梨酯对照品 100 mg, 加溶剂溶解并稀释至 20 mL, 摇匀, 即得。

酸降解溶液: 量取储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 室温放置 2 h, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中和后, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀。

碱降解溶液: 量取储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 2 h, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液中和后, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀。

氧化降解溶液: 量取储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 30%过氧化氢溶液 1 mL, 室温放置 1 h, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀。

热降解溶液: 量取储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 水浴加热 2 h, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀。

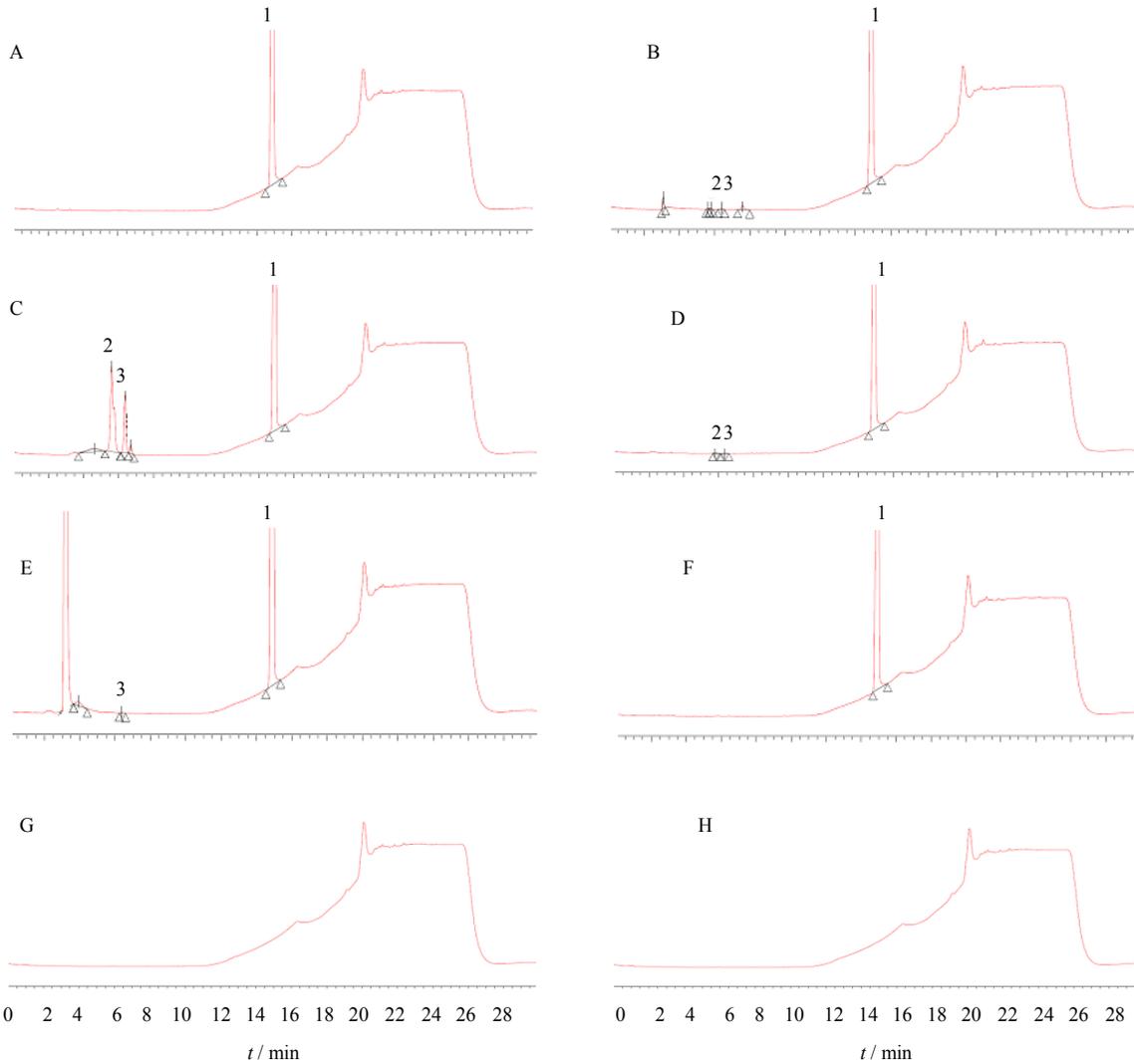
光降解溶液: 量取储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 在强光下 (4 500 lx) 放置 12 h, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀。

辅料溶液: 取甘露醇与聚山梨酯 80 各适量, 加

溶剂溶解并定量稀释制成含甘露醇约 30 mg/mL 和聚山梨酯 80 约 16 mg 的混合溶液，作为辅料溶液。

取上述各降解溶液，注入液相色谱仪，典型色谱图见图 2，本品在热、酸和碱破坏条件下不稳定，

除了不同程度地产生 2-单硝酸异山梨酯和单硝酸异山梨酯外，还检测了其他未知色谱峰。各降解产物与主成分均分离良好，且相邻色谱峰之间均能得到有效分离，表明该色谱系统专属性良好。



A-未降解；B-酸降解；C-碱降解；D-热降解；E-氧化降解；F-光降解；G-空白溶剂；H-辅料；1- 硝酸异山梨酯；2- 2-单硝酸异山梨酯；3- 单硝酸异山梨酯

A-no destroyed；B-destroyed by acid；C-destroyed by base；D-destroyed by heat；E-destroyed by oxidation；F-destroyed by UV light；G-blank solution；H-excipients；1- isosorbide dinitrate；2- isosorbide 2-nitrate；3- isosorbide mononitrate

图 2 专属性考察色谱图

Fig.2 Chromatograms of specificity test

2.4 线性关系及校正因子

取 2-单硝酸异山梨酯对照品、单硝酸异山梨酯对照品及硝酸异山梨酯对照品各适量，用溶剂溶解并定量稀释制成质量浓度分别为 1.0232、1.1528、1.098 mg/mL 的线性储备溶液；用溶剂分别定量稀

释线性储备溶液，得到浓度百分数分别为 10%、5%、1%、0.5%、0.2% 的系列溶液，按“2.2”中的色谱条件测定。以峰面积为纵坐标，以进样质量 (μg) 为横坐标作图，并进行线性回归。线性方程见表 3，2-单硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯标准曲线的斜

率分别与硝酸异山梨酯标准曲线斜率的比值即为前二者的校正因子, 见表3。

2.5 最低检出限

取“2.4”项下0.2%标准曲线溶液, 逐级稀释, 进样测试, 按信噪比(S/N)大于3, 可作为最低检出限, 结果测得2-单硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯和硝酸异山梨酯的检出限分别为6.2、6.9、3.4 ng。

2.6 精密度试验

取“2.5”项下0.5%线性溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样6次, 记录色谱图, 硝酸异山梨酯、2-单硝酸异山梨酯、硝酸异山梨酯的峰面积的RSD分别为0.41%、0.22%、0.20%, 表明仪器的精密度良好。

2.7 溶液稳定性

供试品溶液分别在室温条件下放置0、1、2、4、8、12 h进样测定, 杂质个数及含量均无明显变化, 主峰峰面积的RSD为1.08%, 表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 样品测定

取本品, 加甲醇-水(25:75)使溶解并定量稀释制成约含硝酸异山梨酯1 mg/mL的溶液, 滤过,

取续滤液作为供试品溶液; 另取2-单硝酸异山梨酯对照品和单硝酸异山梨酯对照品各适量, 精密称定, 加溶剂使解并定量稀释制成质量浓度各约1 mg/mL的混合溶液, 精密量取1 mL, 置200 mL量瓶中, 再精密加入供试品溶液1 mL, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。精密量取供试品溶液和对照溶液各20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。对照溶液中2-单硝酸异山梨酯峰和单硝酸异山梨酯峰的分离度应大于2.0。供试品溶液的色谱图中如有与2-单硝酸异山梨酯峰和单硝酸异山梨酯峰保留时间一致的色谱峰, 按外标法以峰面积计算, 均不得过硝酸异山梨酯标示量的0.5%, 其他单个杂质峰的峰面积不得大于对照溶液中硝酸异山梨酯峰面积的0.5%, 杂质总量不得超过1.0%。

采用上述梯度洗脱方法和中国药典^[3]硝酸异山梨酯有关物质检查项下的等度洗脱方法, 分别测定4批注射用硝酸异山梨酯的有关物质, 结果见表4, 供试品溶液典型色谱图见图3。比较两种洗脱方式测定结果可以看出, 在该梯度洗脱条件下, 能检出更多的杂质, 更真实地反映了各个企业产品的杂质控制水平。

表3 硝酸异山梨酯及其杂质的线性方程及校正因子

Table 3 Regression equations and correction factors of isosorbide dinitrate and impurities

组分	线性方程	r	线性范围/ μ g	校正因子
2-单硝酸异山梨酯	$Y = 8.17 \times 10^5 X + 1\ 649.8$	1.000 0	0.041~2.046	0.63
单硝酸异山梨酯	$Y = 7.79 \times 10^5 X + 629.4$	1.000 0	0.046~2.306	0.60
硝酸异山梨酯	$Y = 1.30 \times 10^6 X + 12\ 886.0$	0.999 9	0.022~2.196	1.00

表4 样品有关物质检查结果比较

Table 4 Results of samples

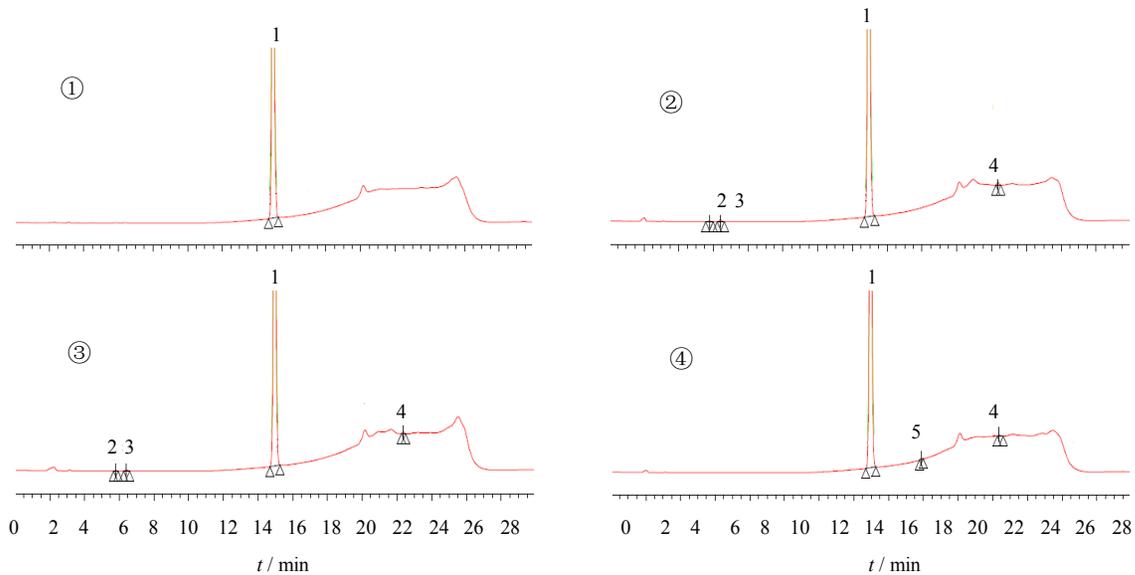
生产企业	批号	依据方法	有关物质/%			
			2-单硝酸异山梨酯	单硝酸异山梨酯	其他单个最大杂质	杂质总量
①	10092007	梯度	未检出	未检出	未检出	未检出
		等度	未检出	未检出	未检出	未检出
②	20100301	梯度	0.14	0.44	0.45	1.03
		等度	0.13	0.39	未检出	0.52
③	20100101	梯度	0.08	0.38	0.24	0.69
		等度	0.08	0.41	未检出	0.49
④	20110101	梯度	未检出	未检出	0.23	0.38
		等度	未检出	未检出	未检出	未检出

3 讨论

3.1 流动相梯度洗脱程序

《中国药典》2015年版^[4]注射用硝酸异山梨酯

有关物质检查, 仍以甲醇-水(25:75)为流动相等度洗脱, 该方法可准确检测工艺杂质2-单硝酸异山梨酯和单硝酸异山梨酯, 对于制剂, 其制备及放置



1-硝酸异山梨酯; 2-2-单硝酸异山梨酯; 3-单硝酸异山梨酯; 4、5-未知杂质
1-isosorbide dinitrate; 2-isosorbide 2-nitrate; 3-isosorbide mononitrate; 4、5-unknown impurity

图3 各生产企业供试品溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of sample solution

过程均可能引入或产生其他有关物质^[5], 对此, 本文在保证对工艺杂质检测能力的基础上, 通过梯度变化来改变流动相的洗脱能力, 以使更多杂质能被检测。同时, 通过梯度洗脱, 更有区分力地反映各个企业产品的杂质控制水平, 为产品质量评价提供技术平台。

3.2 杂质校正因子的计算

根据文献^[6-8]及 CDE 电子刊物中对校正因子的计算, 本研究利用五点标准曲线斜率比值确定了 2-单硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨及硝酸异山梨酯之间的相对校正因子。通过计算, 2-单硝酸异山梨相对于硝酸异山梨酯的校正因子为 0.63, 单硝酸异山梨相对于硝酸异山梨酯的校正因子为 0.60。

3.3 杂质定量方法的多种选择

本文建立的测定方法采用杂质对照品外标法计算已知杂质 2-单硝酸异山梨酯和单硝酸异山梨酯的含量, 采用自身对照法计算其他未知杂质的含量。在实际检验工作中, 可能会遇到杂质对照品获取困难的问题, 也可采用加校正因子的主成分外标法来计算杂质含量, 既能保证杂质含量测定值准确可靠,

又降低了质控对杂质对照品的依赖, 同时也简化了溶液制备操作。

参考文献

- [1] 周 权, 贾 丽. 硝酸异山梨酯治疗慢性心力衰竭临床观察 [J]. 航空航天医药, 2010, 9(21): 1671.
- [2] 王 志, 郑立文, 高 魏. 硝酸异山梨酯静脉泵入治疗高血压伴心力衰竭 [J]. 药物流行病学杂志, 2007, 3(16): 140-141.
- [3] 中国药典. 二部 [S]. 2010.
- [4] 中国药典. 二部 [S]. 2015.
- [5] 朱迎军, 刘 轶, 李 帅. 硝酸异山梨酯评价性抽样结果质量分析 [J]. 中南药学, 2012, 10(2): 158-160.
- [6] 余振喜, 庾莉菊, 黄海伟, 等. 浅谈 HPLC 法测定有关物质时已知杂质的计算方法 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(4): 278-282.
- [7] 刘 敏, 胡昌勤, 姚尚辰. 去甲万古霉素标准品量值传递方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 355-360.
- [8] 左文飞, 潘 娜, 范雪平, 等. 泮托拉唑钠杂质校正因子的测定 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(24): 2029-2031.