

HPLC法测定阿托伐他汀钙3种中间体的含量和有关物质

张明颖*, 孙国祥#(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0083-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.30

摘要 目的:建立测定阿托伐他汀钙3种中间体的含量和有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。3种中间体4-氟苯基苄基酮(FPAP)、苯基戊酰胺类化合物(M-2)和乙酸叔丁酯类化合物(L-1)分别使用乙腈-四氢呋喃-50 mmol/L 枸橼酸铵溶液(pH 4.0, 3:2:5)、甲醇-50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(60:40)和甲醇-水(85:15)为流动相;FPAP以Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱分析,M-2和L-1以Century SIL C₁₈ BDS柱分析;流速均为1.0 ml/min;柱温为(30±0.15)℃;检测波长均为244 nm;进样量为20 μl。结果:FPAP、M-2和L-1检测质量浓度线性范围分别为5~100、5~150、5~150 μg/ml($r=0.999\ 9\sim 1.000\ 0$),平均回收率分别为99.27%、99.43%、99.97%,RSD分别为0.07%、0.37%、0.11%;FPAP、M-2、L-1 3种中间体的含量应分别不低于98%、98%、99%,有关物质应分别小于0.5%、1%、0.5%。结论:所建立的方法简单、准确、重复性好,可用于阿托伐他汀钙3种中间体的质量控制。

关键词 HPLC法;阿托伐他汀钙;中间体;含量测定;有关物质

Content Determination and Related Substances of 3 Kinds of Intermediates of Atorvastatin Calcium by HPLC
ZHANG Ming-ying, SUN Guo-xiang (College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination and related substances of 3 intermediates of atorvastatin calcium. METHODS: HPLC method was adopted. 3 Intermediates including 4-fluoro-2-phenylacetophenone (FPAP), phenyl pentanamide compound (M-2), and tertiary butyl acetate compound (L-1). The separation of FPAP was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column with acetonitrile-tetrahydrofuran-50 mmol/L ammonium citrate (pH=4.0, 3:2:5) as the mobile phase. The separation of M-2 and L-1 were performed on Century SIL C₁₈ BDS column with mobile phase consisted of methanol-50 mmol/L sodium dihydrogen phosphate (60:40) for M-2 and methanol-water (85:15) for L-1. The flow rate was 1.0 ml/min, and column temperature was set at (30±0.15)℃. The detection wavelengths were set at 244 nm and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear ranges were 5-100 μg/ml for FPAP, 5-150 μg/ml for M-2, and 5-150 μg/ml for L-1 (r of 0.999 9-1.000 0). The average recoveries were 99.27% (RSD=0.07%), 99.43% (RSD=0.37%) and 99.97% (RSD=0.11%). The content and the related substances of FPAP, M-2, L-1 were more than 98%, 98%, 99% and lower than 0.5%, 1%, 0.5%, respectively. CONCLUSION: The established method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of 3 intermediates of atorvastatin calcium.

KEY WORDS HPLC; Atorvastatin calcium; Intermediates; Content determination; Related substances

阿托伐他汀钙是羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂类调血脂药,可降低血清胆固醇和甘油三酯水平,副作用小,临床用于治疗多种高胆固醇血症和混合性脂代谢紊乱症^[1]。阿托伐他汀钙原料药在合成过程中的中间体有4-氟苯基苄基酮(FPAP)、4-甲基-3-氧代-N-苯基戊酰胺(M-2)和(4*R*-cis)-6-[2-[2-(4-氟苯基)-5-(1-异丙基)-3-苯基-4-(苯胺)羰基]-1*H*-吡咯-1-基]乙基]-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯(L-1)^[2-4],3种中间体的化学结构式见图1。

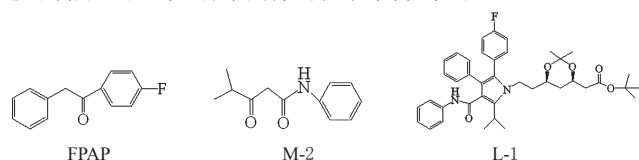


图1 3种中间体的化学结构

Fig 1 Chemical structures of 3 intermediates

* 硕士研究生。研究方向:药物质量标准。电话:024-23988288。E-mail:mandyzmy@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:中药指纹学体系和药物质量标准。电话:024-23988288。E-mail:gxswmwys@163.com

为控制该原料药质量,笔者参照有关文献^[5-11]采用高效液相色谱(HPLC)法对FPAP、M-2和L-1这3种中间体进行含量测定和有关物质检查,制定3种中间体的合适的质量限度以保证阿托伐他汀钙产品的质量合格。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100型HPLC仪,配有二极管阵列检测器(DAD)、四元低压梯度泵和自动进样器、ChemStation工作站(美国Agilent科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

FPAP、M-2、L-1对照品(批号:091025、091026、091027,纯度:99.7%、99.1%、99.8%)与FPAP、M-2和L-1样品(各3批,批号均为:20100101、20100102、20100103,纯度:均>98.0%)均为自制;甲醇、乙腈、四氢呋喃均为色谱纯,枸橼酸为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液。精密称取FPAP、M-2和L-1对照品适量,分别使用乙腈-50 mmol/L枸橼酸铵溶液(pH7.4)(1:1, V/V)、甲

醇-水(80:20, V/V)和甲醇为配样溶液制成质量浓度分别为20、50、50 μg/ml的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液。精密称取FPAP、M-2和L-1样品适量(分别约10、25、25 mg),置于50 ml量瓶中,分别取“2.1.1”项下配样溶液溶解并定容,摇匀,过滤;取续滤液适量用配样溶液制备成质量浓度分别为20、50、50 μg/ml的供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

测定3种中间体的色谱柱和流动相组成条件见表1。

表1 测定3种中间体的色谱条件和理论板数

Tab 1 Chromatographic conditions and theory plate number of 3 intermediates

化合物	色谱柱	流动相	理论板数
FPAP	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈	乙腈-四氢呋喃-50 mmol/L 枸橼酸铵溶液(pH4.0)(3:2:5, V/V/V)	5 600
M-2	Century SIL C ₁₈ BDS	甲醇-50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(60:40, V/V)	1 100
L-1	Century SIL C ₁₈ BDS	甲醇-水(85:15, V/V)	5 300

其余条件为:流动相流速为1.0 ml/min,柱温为(30 ± 0.15) °C,检测波长为244 nm,进样量为20 μl。精密吸取3种中间体对照品溶液在相应色谱条件下进样测定,理论板数结果见表1,表明本色谱条件适用性良好。

2.3 方法专属性考察

分别取3种中间体各自的配样溶液、对照品溶液和供试品溶液进样测定,结果表明配样溶液不干扰中间体的含量测定,色谱图见图2。

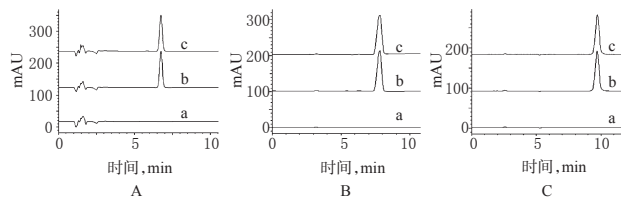


图2 3种中间体的高效液相色谱图

A.FPAP; B.M-2; C.L-1; a.配样溶液; b.供试品; c.对照品

Fig 2 HPLC chromatograms of 3 intermediates

A.FPAP; B.M-2; C.L-1; a. blank solvent; b. test sample; c. substance control

另取3种中间体供试品溶液分别在酸、碱、氧化、高温和光照条件下进行破坏试验,结果表明主成分峰与各降解产物能达到很好的分离。

2.4 线性关系考察

精密称取FPAP、M-2、L-1对照品各10 mg,置于50 ml量瓶中,各自加入相应的配样溶液溶解并定容,摇匀,作为贮备液。精密量取各贮备液适量用配样溶液按表2制备成系列质量浓度的标准溶液。分别精密吸取5种系列质量浓度的标准溶液各20 μl,在选定的色谱条件下进样测定2次,记录色谱图,以平均峰面积(A)对质量浓度(c)进行回归得到3种中间体的线性方程;调整对照品溶液的质量浓度按3倍信噪比确定检测限,按10倍信噪比确定定量限,结果见表2。

2.5 进样精密性、稳定性、重复性和回收率试验

精密称取FPAP、M-2和L-1对照品按“2.1.1”项下方法制成3种中间体的对照品溶液,分别精密吸取3种中间体对照品溶液连续进样分析5次以考察精密性;FPAP对照品溶液分别在0、2、4、5、6 h进样测定,M-2和L-1对照品溶液分别在0、1、3、5、7 h进样测定以考察稳定性;按供试品溶液质量浓度的80%、100%、120%分别制备3种中间体的对照品溶液,各浓度

表2 3种中间体的线性方程、相关系数、检测限和定量限

Tab 2 Linear equation, correlation coefficient, LOD and LOQ of 3 intermediates

化合物	质量浓度, μg/ml	线性方程	r	检测限, ng	定量限, ng
FPAP	5, 10, 20, 50, 100	$A=75.217c-26.206$	0.999 9	3.2	9.2
M-2	5, 15, 50, 100, 150	$A=77.596c+40.649$	0.999 9	0.3	1.0
L-1	5, 15, 50, 100, 150	$A=43.824c-30.844$	1.000 0	1.2	3.6

制备3份,每份测定2次以考察回收率;重复制备5份供试品溶液分别测定以考察重复性。各项试验结果表明FPAP供试品溶液在6 h内稳定,M-2和L-1供试品溶液在7 h内稳定;3种中间体的精密性、准确度、重复性及样品稳定性均合格,详见表3。

表3 3种中间体的精密性、稳定性、重复性和回收率结果(%)

Tab 3 Precision, stability, repeatability and average recovery of 3 intermediates (%)

项目	水平	中间体		
		FPAP	M-2	L-1
精密性RSD		0.07	0.37	0.11
稳定性RSD		0.40	0.46	0.19
重复性RSD		1.29	0.59	0.26
平均回收率	80%	99.43	99.70	100.09
平均回收率	100%	99.47	98.87	99.96
平均回收率	120%	98.92	99.71	99.86
总平均回收率		99.27	99.43	99.97
总平均回收率RSD		0.75	0.63	0.48

2.6 样品含量测定

分别精密吸取3种中间体供试品溶液测定2次,以平均峰面积按标准曲线计算3种中间体各3批样品的含量。结果,FPAP 3批样品中FPAP含量分别为98.54%、98.48%、98.77% (≥98%); M-2 3批样品中M-2含量分别为98.69%、99.38%、99.13% (≥98%); L-1 3批样品中L-1的含量分别为99.13%、99.77%、99.11% (≥99%)。根据试验结果规定FPAP、M-2和L-1 3种中间体的含量应分别不低于98%、98%和99%。

2.7 样品中有关物质测定

2.7.1 溶液制备。供试溶液制备:取FPAP、M-2和L-1样品适量以各自的配样溶液制成质量浓度分别为200、500、500 μg/ml的供试溶液。对照溶液制备:精密吸取上述1 ml供试溶液,置于100 ml量瓶中,分别加配样溶液溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.7.2 有关物质测定。分别吸取3种中间体的供试溶液进样测定,记录色谱图至主峰保留时间的3倍,再吸取对照溶液进样测定,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的20%,记录色谱图。按主成分自身对照法计算3种中间体中有关物质的含量,结果3批FPAP样品中的有关物质分别为0.27%、0.28%、0.28% (<0.5%),3批M-2样品中的有关物质分别为0.86%、0.95%、0.92% (<1%),3批L-1样品中有关物质分别为0.16%、0.18%、0.15% (<0.5%)。根据试验结果规定FPAP、M-2和L-1 3种中间体的有关物质应分别小于<0.5%、1%、0.5%。色谱图见图3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

中间体FPAP、M-2和L-1经紫外扫描最大吸收波长分别为244、243和240 nm。用相应的色谱条件对波长进行考察,结果发现3种中间体在244 nm波长处均有最大吸收,而且在此波长下由破坏试验所产生的降解产物均能被灵敏地检测出,故检测波长定为244 nm。

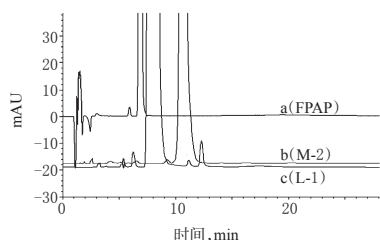


图3 3种中间体有关物质测定的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of related substances of 3 intermediates

3.2 流动相及配样溶液的选择

笔者对中间体FPAP的流动相进行筛选,发现在阿托伐他汀钙原料药的色谱条件下可以实现FPAP与其有关物质的有效分离,为了后续的相关研究,故采用乙腈-四氢呋喃-枸橼酸铵体系作为FPAP的流动相,并采用乙腈-枸橼酸铵为配样溶液。

对中间体M-2和L-1的流动相进行筛选考察时,发现原料药的色谱条件不能使二者与有关物质有效分离,因为M-2和L-1均易溶于甲醇,考虑到毒性及成本的因素故采用甲醇-水体系考察二者的流动相组成。结果发现,当M-2的流动相甲醇-水比例为60:40时主峰与有关物质分离良好,在此基础上提高有机相比比例主峰峰形变宽,降低有机相比比例主峰峰形不佳且分离度下降;向流动相中加入磷酸盐后可明显改善主峰拖尾现象,可能是因为磷酸盐对色谱柱的羟基有改性作用并且可以调节流动相的pH值使M-2与其有关物质分离度提高;另因为溶解性效应M-2峰形有前沿现象,向配样溶液甲醇中加入20%的水可以有效改善主峰前沿。因此M-2流动相选用甲醇-50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(60:40),配样溶液选用甲醇-水(80:20)。中间体L-1的流动相甲醇-水比例为85:15时主峰与其有关物质能有效分离且峰形较好,若减少有机相比比例则主峰峰形变宽且与有关物质的分离度降低,故L-1流动相选用甲醇-水(85:15),配样溶液选用甲醇。

本研究采用HPLC法建立了阿托伐他汀钙3种中间体FPAP、M-2和L-1的含量测定方法和有关物质检查方法,结果表明所建立的方法简单、准确、重复性好,可用于阿托伐他汀钙3种中间体的质量控制。控制好3种中间体的质量是确保阿托伐他汀钙有关物质含量低和产品纯度高的必要前提。本研究对于阿托伐他汀钙原料药生产过程的控制具有较重要的意义。

参考文献

- [1] 朱三华.阿托伐他汀的药理作用及临床应用进展[J].中国医药导报,2011,8(20):127.
- [2] 徐颂.阿托伐他汀钙合成路线[J].中国新药杂志,2006,15(22):1914.
- [3] 王正林,应俊,林圣超,等.阿托伐他汀钙的合成研究进展[J].中国现代应用药学,2011,28(5):423.
- [4] 饶历,刘凤嗣,官仕龙,等.阿托伐他汀钙中间体的合成工艺研究[J].武汉工程大学学报,2010,32(12):10.
- [5] 姜楠,杨永革,许雪廷,等.LC-MS-MS法测定人血浆中阿托伐他汀浓度[J].药学实践杂志,2011,29(1):15.
- [6] 胡晓玲,李焕德.阿托伐他汀的药物动力学研究进展[J].中南药学,2008,6(3):327.
- [7] 李文莉,钟庆元,文庆.HPLC法测定阿托伐他汀钙胶囊的含量及有关物质[J].药物分析杂志,2007,27(2):267.
- [8] 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.
- [9] 封宇飞,刘志鹤,吴学军,等.毛细管区带电泳法测定阿托伐他汀钙片的含量及降解产物[J].中国药学杂志,2003,38(6):456.
- [10] 蒲强红,姜成,吕秋菊.紫外可见分光光度法测定阿托伐他汀钙片含量[J].安徽医药,2009,13(3):273.
- [11] 沈海蓉,李中东,施孝金,等.阿托伐他汀钙自微乳的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2005,36(4):223.

(收稿日期:2012-02-22 修回日期:2012-03-20)

卫生部副部长陈啸宏出席吕梁山片区深化“医改”培训班开班仪式

本刊讯 为贯彻落实中央扶贫开发工作会议精神,扎实做好卫生部牵头联系吕梁山片区区域发展与扶贫攻坚工作,按照卫生部扶贫开发与对口支援工作领导小组的统一部署,2012年11月14—20日,卫生部联合国家行政学院举办“吕梁山片区深化医药卫生体制改革工作培训班”,组织片区内市、县两级政府分管卫生工作的负责同志以及省、市、县卫生厅局长开展集中学习培训。卫生部党组成员、部扶贫开发与对口支援工作领导小组常务副组长、副部长陈啸宏同志,国家行政学院党委委员、副院长杨克勤同志,山西省人民政府副秘书长巨宪华同志,陕西省人民政府副秘书长孟建国同志,卫生部扶贫开发与对口支援工作领导小组副组长、规划财务司司长李斌同志,卫生部扶贫开发与对口支援工作领导小组副组长、人事司副司长许立华同志出席了开班仪式。

陈啸宏副部长在开班仪式上作了动员讲话,他简要总结了1年来卫生部牵头联系吕梁山片区工作进展情况,分析了片区深化“医改”工作面临的形势任务,并就学员们如何圆满完成学习培训任务提出了具体要求。陈啸宏副部长强调,在深化“医改”和扶贫开发的新形势下,各种新情况、新问题层出不穷,

全面认识新情况、正确解决新问题,特别是深入贯彻落实“十八大”的新精神,都要求我们各级领导干部必须不断学习和掌握新知识、新技能。一要学习领会“十八大”精神实质,坚定正确的政治方向。坚持深化“医改”方向,不断明确工作目标,正确理解中央的决策部署,使自己成为政策的忠实拥护者和执行者。二要积极开展政策理论学习,增强自身的领导能力。深刻理解和掌握马克思主义、毛泽东思想、邓小平理论、“三个代表”重要思想以及科学发展观的精神实质和基本要求,用理论来武装头脑;认真学习党的路线方针政策和国家法律法规,重点加强对深化“医改”及扶贫开发方面政策的学习理解,不断增强驾驭局面的能力和领导工作的水平。三要不断加强专业知识学习,提高个人的业务能力。勤于思考,把学到的知识运用到日常的工作中去,积极推进改革的不断深入和事业的持续发展。四要坚持理论联系实际,增强改革创新的本领。注重用理论指导实践,针对一些困难问题,开动脑筋,运用所学理论知识和专业技能,积极主动地研究对策,千方百计加以解决,不断增强自身改革意识和创新能力,切实承担起所担负的工作职责。