

HPLC法测定阿托伐他汀钙片中的有关物质

张学燕^{1*}, 田晓彤², 张轶华^{2#}(1. 石家庄市第四医院, 石家庄 050021; 2. 河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)28-2673-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.28.28

摘要 目的: 建立测定阿托伐他汀钙片中有关物质的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(氨水调节 pH 至 4.0)-乙腈-四氢呋喃(50:30:20, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 244 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μl。结果: 已知杂质 H 和未知杂质均能与阿托伐他汀钙片中的主要成分完全分离。已知杂质 H 的检测质量浓度在 0.002~0.05 mg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$), 检测限为 0.2 ng, 定量限为 0.6 ng。结论: 该方法操作简单, 重复性好, 专属性强, 可用于阿托伐他汀片的质量控制。

关键词 阿托伐他汀; 高效液相色谱法; 杂质 H; 有关物质

Determination of Related Substances in Atorvastatin Calcium Tablets by HPLC

ZHANG Xue-yan¹, TIAN Xiao-tong², ZHANG Yi-hua²(1. Shijiazhuang Forth Hospital, Shijiazhuang 050021, China; 2. Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the determination of related substances in Atorvastatin calcium tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Diamonsil C₁₈ column with 0.05 mol/L citric acid buffer (pH adjusted to 4.0 using ammonia)-acetonitrile-tetrahydrofuran (50:30:20, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 244 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: Impurity H and unknown impurity can be completely separated from main component of Atorvastatin calcium tablets. The linear range of impurity H was 0.002 mg/ml-0.05 mg/ml ($r=0.9999$). The detection limit was 0.2 ng and quantification limit was 0.6 ng. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible and specific, and can be used for the quality control of Atorvastatin calcium tablets.

KEYWORDS Atorvastatin; HPLC; Impurity H; Related substances

阿托伐他汀钙为新一代调节血脂药, 是一种高选择性 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 适用于原发性高胆固醇血症、混合性高脂血症和高胆固醇血症伴有动脉粥样硬化患者, 该药可降低总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平。阿托伐他汀钙片的现行标准被收载于《国家药品标准新药转正标准》^[1], 标准中采用自身对照法对杂质总和进行了检测, 未对已知杂质和单个杂质进行检测。目前, 高效液相色谱(HPLC)法已广泛应用于检测药物质量^[2-6], 且已有文献报道了 HPLC 法检测阿托伐他汀钙含量及有关物质^[7-10], 但未有对已知杂质对照品进行有关物质检测。因此, 在本试验中, 笔者建立了采用 HPLC 法测定阿托伐他汀钙片中有关物质的方法, 以更好地控制产品质量。

1 材料

1.1 仪器

Dionex ultimate3000 HPLC 仪, 包括四元低压梯度泵、全自动进样器、柱温箱和紫外检测器(美国戴安公司); XS105 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

阿托伐他汀钙对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100590-200802); 杂质 H 对照品(美国洛克菲尔公司, 批号:

F0k120); 阿托伐他汀钙片(A 公司, 规格: 10 mg, 批号: 130201、130202、130203; 规格: 20 mg, 批号: 130301、130302、130303); 乙腈、四氢呋喃为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(氨水调节 pH 至 4.0)-乙腈-四氢呋喃(50:30:20, V/V/V); 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 244 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 取阿托伐他汀钙对照品、杂质 H 对照品适量, 制成质量浓度分别为 0.1 mg/ml 和 0.01 mg/ml 的溶液, 即得。

2.2.2 对照品溶液 取阿托伐他汀钙对照品适量, 用乙腈-水(30:70)定量稀释制成质量浓度为 0.1 mg/ml 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液 精密称取阿托伐他汀钙细粉适量, 置于 100 ml 量瓶中, 加乙腈-水(30:70)适量, 溶解, 加乙腈-水(30:70)定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下系统适用性溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 色谱见图 1。结果, 阿托伐他汀峰与杂质 H 峰

* 主治医师。研究方向: 药品质量。E-mail: 49567976@qq.com

通信作者: 主管药师, 硕士。研究方向: 药品质量及药品标准。

E-mail: zhangyihua0915@163.com

的分离度大于2.0。理论板数按阿托伐他汀峰计算应不低于3 000。

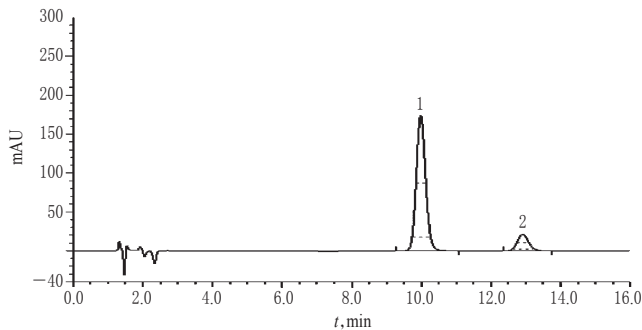


图1 高效液相色谱图

1. 阿托伐他汀钙; 2. 杂质H

Fig 1 HPLC chromatograms

1. atovastatin; 2. impurity H

2.4 专属性试验

(1)酸破坏:精密称取阿托伐他汀25.12 mg,置于25 ml量瓶中,加0.5 mol/L盐酸溶液25 ml,室温放置12 h,用0.5 mol/L氢氧化钠溶液中和至中性,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(2)碱破坏:精密称取阿托伐他汀25.12 mg,置于25 ml量瓶中,加0.5 mol/L氢氧化钠溶液25 ml,室温放置12 h,用0.5 mol/L盐酸溶液中和至中性,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(3)氧化破坏:精密称取阿托伐他汀25.12 mg,置于25 ml量瓶中,加10%过氧化氢溶液10 ml,室温放置12 h,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(4)高温破坏:精密称取阿托伐他汀25.12 mg,于90 °C烤箱中加热12 h,取出,放至室温,置于25 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,备用;(5)光照破坏:精密称取阿托伐他汀25.12 mg,于(4 500 ± 50)lx条件下照射12 h,放冷,置于25 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,备用。精密量取上述5种溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,记录色谱,详见图2。由图2可见,本品在强酸、强碱、氧化、高温、光照条件下,样品均被破坏并产生降解产物,所产生的降解产物在“2.1”项色谱条件下均能达到较好的分离。

2.5 线性关系考察

精密称取杂质H对照品适量,用乙腈-水(30:70)溶解制备成质量浓度依次为0.002、0.005、0.01、0.03和0.05 mg/ml的溶液。分别精密量取上述溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以质量浓度(x , mg/ml)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程为 $y=84.426x+0.9773$ ($r=0.9999$)。结果表明,杂质H检测质量浓度在0.002~0.05 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.6 检出限和定量限

以信噪比 $S/N=3$ 测得杂质H的检出限为0.2 ng,以信噪比 $S/N=10$ 测得杂质H的定量限为0.6 ng。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下系统适用性溶液适量,连续进样6次。结果,测定杂质H峰面积的RSD为0.1%,说明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取样品(规格:10 mg,批号:130201)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在常温下放置0、2、4、8、12 h后进样测定。结果,杂质H峰面积的RSD为0.56%,说明12 h内供

试品溶液稳定性良好。

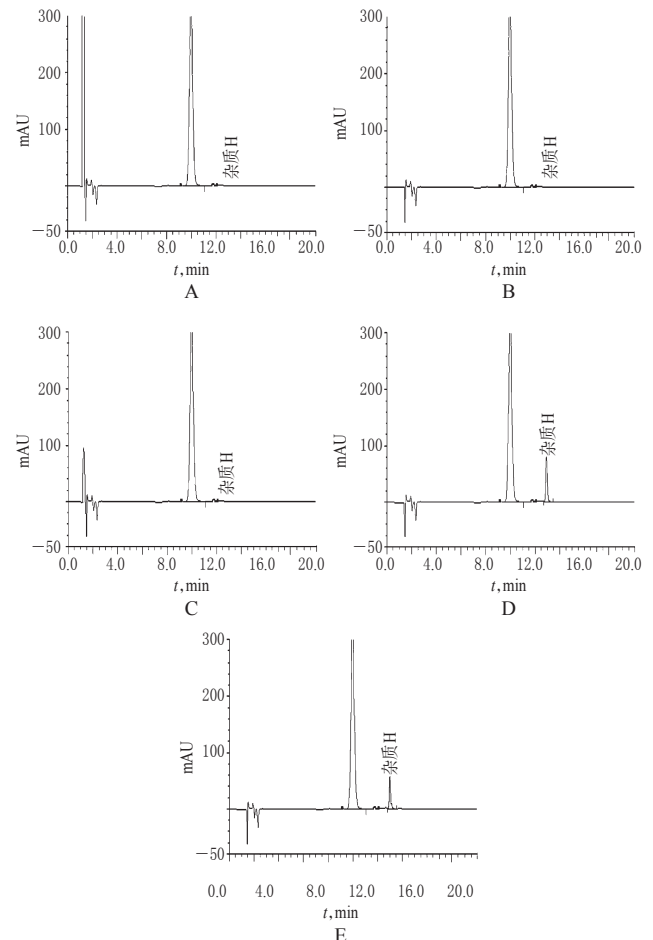


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏样品; B. 碱破坏样品; C. 氧化破坏样品; D. 高温破坏样品; E. 光照破坏样品

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity tests

A. destroyed by acid; B. destroyed by alkali; C. destroyed by oxidation; D. destroyed by heat; E. destroyed by light

2.9 重复性试验

取样品(规格:10 mg,批号:130201)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,杂质H峰面积的RSD为0.8%,说明本方法重复性较好。

2.10 回收率试验

精密称取样品(规格:10 mg,批号:130201)共9份,每份约10 mg,分别置于200 ml量瓶中,加入“2.2.2”项下对照品溶液适量,加乙腈-水(30:70)稀释至刻度,摇匀,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表1。

2.11 样品有关物质测定

精密称取样品细粉,约相当于阿托伐他汀10 mg,置于100 ml量瓶中,加乙腈-水(30:70)溶解并定量稀释制成每1 ml中约含0.1 mg的溶液,作为有关物质测定供试品溶液。再精密量取上述溶液1 ml,置100 ml量瓶中,加乙腈-水(30:70)溶解并定量稀释制成每1 ml中约含0.001 mg的溶液,作为有关物质测定对照品溶液。另精密称取阿托伐他汀钙对照品及杂

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

样品量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
0.11	8.04	8.01	99.62		
0.11	8.08	8.04	99.50		
0.11	8.02	8.01	99.87		
0.11	10.21	10.18	99.70		
0.11	10.05	10.01	99.60	99.80	0.40
0.11	10.06	10.03	99.71		
0.11	12.13	12.12	99.91		
0.11	12.06	12.10	100.33		
0.11	12.04	12.06	100.41		

质H对照品适量,用乙腈-水(30:70)溶解并定量稀释制成每1 ml中约含0.01 mg的溶液,作为分离度测定溶液。取上述对照品溶液20 μl,注入HPLC仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的20%。再精密量取上述供试品溶液、对照品溶液和分离度测定溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的3倍。已知杂质H按外标法以峰面积计算含量,未知杂质按自身对照法计算含量。结果表明,在244 nm波长和210 nm波长下的测定结果基本一致。样品有关物质测定结果见表2。

表2 样品有关物质测定结果(%)

Tab 2 Determination of related substances in samples(%)

规格	批号	244 nm波长测定			210 nm波长测定		
		杂质H	其他单个杂质	其他杂质总和	杂质H	其他单个杂质	其他杂质总和
10 mg	130201	0.22	0.12	0.31	0.21	0.12	0.32
	130202	0.20	0.13	0.30	0.20	0.13	0.33
	130203	0.20	0.13	0.32	0.20	0.14	0.32
20 mg	130301	0.28	0.16	0.35	0.26	0.16	0.35
	130302	0.26	0.16	0.33	0.25	0.18	0.28
	130303	0.24	0.14	0.32	0.24	0.15	0.33

3 讨论

3.1 流动相的选择

本研究发现,当0.05 mol/L柠檬酸缓冲液pH为4.0时,阿托伐他汀钙与杂质H的分离度最大,因此确定0.05 mol/L柠檬酸缓冲液pH为4.0。四氢呋喃的加入使阿托伐他汀与杂质H的分离度变大,但使阿托伐他汀与主要降解产物的分离度变小,经每次试验发现,当加入四氢呋喃的比例为20%时,分离效果最好,因此,确定四氢呋喃的比例为20%。

3.2 检测波长的选择

本品以乙腈-水(30:70)为溶剂,在190 nm~400 nm波长范围进行光谱扫描,发现阿托伐他汀的最大吸收波长为244 nm,杂质H在该波长下也有较大吸收,因此选择244 nm波长为有关物质的检测波长。

3.3 杂质H的测定

笔者采用对照品法对杂质H进行定性定量分析,6批样品中均检出杂质H,含量较高,均约为0.3%,因此在质量标准中增加对杂质H的检测极为重要。

综上所述,本方法操作简单,重复性好,专属性强,可用于阿托伐他汀片的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准[S].2004年版.北京:人民卫生出版社:102.
- [2] 张轶华,韩学静,田兰.HPLC法测定甘草酸二铵胶囊含量及有关物质[J].中国药房,2011,22(20):1903.
- [3] 周健鹏,田勇.RP-HPLC法测定盐酸曲美他嗪的含量和有关物质[J].药物分析杂志,2009,29(3):464.
- [4] 王知斌,孙进,孙英华,等.RP-HPLC法测定盐酸曲美他嗪片的含量和有关物质[J].沈阳药科大学学报,2006,23(8):514.
- [5] 张轶华,姜建国,田兰,等.HPLC法测定小儿氨酚烷胺颗粒中马来酸氯苯那敏的含量[J].中国药品标准,2011,12(6):421.
- [6] 李菁,季怀萍.HPLC法测定甘草酸二铵肠溶胶囊的含量[J].实用预防医学,2007,14(4):1221.
- [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] 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.
- [9] 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(02):267.
- [10] 汪钦标,杨成钰.HPLC法测定阿托伐他汀钠含量及有关物质[J].轻工科技,2012,3(160):124.

(收稿日期:2014-01-27 修回日期:2014-04-29)

国家食品药品监督管理总局食品安全总监郭文奇出席西北五省区食品药品稽查打假区域协作签约仪式

本刊讯 2014年6月20日,食品药品稽查工作座谈会暨西北五省区食品药品稽查打假区域协作签约仪式在陕西省西安市举行。国家食品药品监督管理总局党组成员、食品安全总监郭文奇出席并讲话。

郭文奇对稽查工作取得的成效以及食品药品稽查打假区域协作机制的建立给予了肯定,并对深化区域协作提出了四方面要求;一是加大稽查联合办案力度,在重大食品药品案件查处上下功夫;二是构建部门联动协作机制,进一步加大行刑衔接等工作力度,严惩食品药品违法犯罪行为;三是不断创新

稽查办案方式,坚持有案必查、违法必究;四是加强能力建设,转变工作作风,打造一支高素质、高标准、高效率的稽查队伍。

座谈会上,陕西、甘肃、宁夏、青海和新疆食品药品监督管理局主要领导、分管领导和稽查部门的有关人士分别交流了本省(区)稽查工作经验,并就稽查打假协作课题、稽查工作考核办法等方面进行了研讨。五省(区)食品药品监管局签署了《西北五省区食品药品稽查打假区域协作协议》,西北区域食品药品打假机制正式建立。