

RP-HPLC 测定依折麦布原料药中的有关物质

周增慧, 庄贺飞, 于鑫, 曾颜, 毕开顺, 陈晓辉*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立测定依折麦布原料药中有关物质的 RP-HPLC 测定法。方法: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 0.01% 磷酸 (A), 乙腈 (B), 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 231 nm, 柱温 35 °C。结果: 依折麦布与有关物质分离良好; 有关物质 A, B, C 在 0.035 ~ 0.8 mg·L⁻¹ 峰面积与浓度呈良好的线性关系, *r* 分别为 0.999 7, 0.999 4, 0.999 9 (*n* = 6)。结论: 方法操作简便, 灵敏度高, 专属性强, 重复性好, 可用于依折麦布原料药中有关物质的检查。

[关键词] 依折麦布; 有关物质; 高效液相色谱; 梯度洗脱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0159-05

[doi] 10.11653/syjf2013190159

Determination of Related Substances in Ezetimibe by RP-HPLC

ZHOU Zeng-hui, ZHUANG He-fei, YU Xin, ZENG Yan, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for the determination of related substances in ezetimibe. **Method:** The method was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of 0.01% phosphoric acid as the mobile phase A, acetonitrile as the mobile phase B with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 231 nm. The column temperature was set at 35 °C. **Result:** Related substances were completely separated from ezetimibe. The standard curves of substances A, B and C were linear in the range of 0.035-0.8 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 7, 0.999 4, 0.999 9) (*n* = 6), respectively. **Conclusion:** The method is simple, sensitive with high specificity and repeatability. It is suitable for the determination of related substances in ezetimibe.

[Key words] ezetimibe; related substances; RP-HPLC; gradient elution

依折麦布 (ezetimibe), 化学名为 1-(4-氟苯基)-3(*R*)-[3-(4-氟苯基)-3(*S*)-羟丙基]-4(*S*)-(4-羟苯基)-2-氮杂环丁酮 (结构式见图 1), 是一种新型的选择性胆固醇吸收抑制剂。其主要通过阻断胆固醇的外源性吸收途径, 降低血浆低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 从而发挥调节血脂的功效^[1-4]。

在依折麦布合成过程中, 主要涉及的中间体有有关物质 B { (3*R*, 4*S*)-1-(4-氟苯基)-3-[(3*S*)-3-(4-氟苯基)-3-羟丙基]-4-(4-苄氧基苯基)-2-氮杂环丁

酮} 和有关物质 C { (3*R*, 4*S*)-1-(4-氟苯基)-3-[3-(4-氟苯基)-3-氧代丙基]-4-(4-苄氧基苯基)-2-氮杂环丁酮}, 依折麦布的主要降解产物为有关物质 A ((2*R*, 3*R*, 6*S*)-*N*, 6-二(4-氟苯基)-2-(4-羟苯基)-3, 4, 5, 6-四氢-2*H*-吡喃-3-甲酰胺)。目前对于依折麦布有关物质的测定方法未见文献报道, 相关国外文献^[5-8]中也未见关于中间体 C 的报道。本文拟采用外标法测定 3 种已知杂质的含量, 采用不加校正因子的主成分自身对照法测定其他未知杂质的含量^[9-11]。

1 材料

HITACHI L-2000 型高效液相色谱仪 (L-2130 泵, L-2200 自动进样器, L-2300 柱温箱, L-2400 紫外检测器, D-2000 elite 工作站, 日本日立公司),

[收稿日期] 20130107(020)

[第一作者] 周增慧, 硕士研究生, 从事药物质量控制研究, Tel: 13609818463, E-mail: zhouzenghui@live.cn

[通讯作者] * 陈晓辉, 教授, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 024-23986259, E-mail: cxh_syphu@hotmail.com

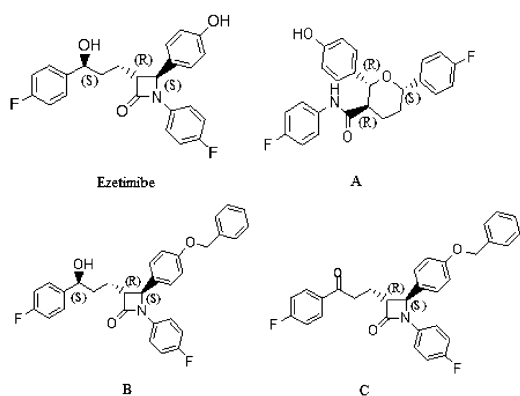


图 1 依折麦布及其有关物质 A,B,C 的结构式

Sartorius CP225D 型电子天平(德国赛多利斯公司);依折麦布对照品(含量 >99.9%),依折麦布原料药(批号 120101, 120107, 120109),有关物质 A, B, C 对照品(含量 >98.5%)均由天津科洛医药有限公司提供,乙腈和磷酸为色谱纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 0.01% 磷酸(A), 乙腈(B), 梯度洗脱, 程序见表 1, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 231 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。在上述色谱条件下, 取系统适用性溶液进样, 理论塔板数按依折麦布峰计算不低于 6 000, 依折麦布峰与相邻色谱峰间的分离度 >2.0, 拖尾因子符合要求, 如图 2 所示。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	A/%	B/%
0	55	45
10	55	45
60	30	70
61	55	45
70	55	45

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取有关物质 A, B, C 对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液[0.01% 磷酸-乙腈(55:45)]溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取该溶液 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀, 得 10 mg·L⁻¹ 的混合杂质对照品储备液。精密量取该储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.1 mg·L⁻¹ 的混合杂质对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取依折麦布原料药约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液溶解

并稀释至刻度, 摇匀, 即得 100 mg·L⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.3 系统适用性溶液的制备 取依折麦布原料药约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入混合杂质对照品储备液 1 mL, 加稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得系统适用性溶液。

2.2.4 线性储备液的制备 分别取依折麦布对照品约 10 mg, 有关物质 A, B, C 对照品各约 1 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得线性储备液。

2.3 方法学考察

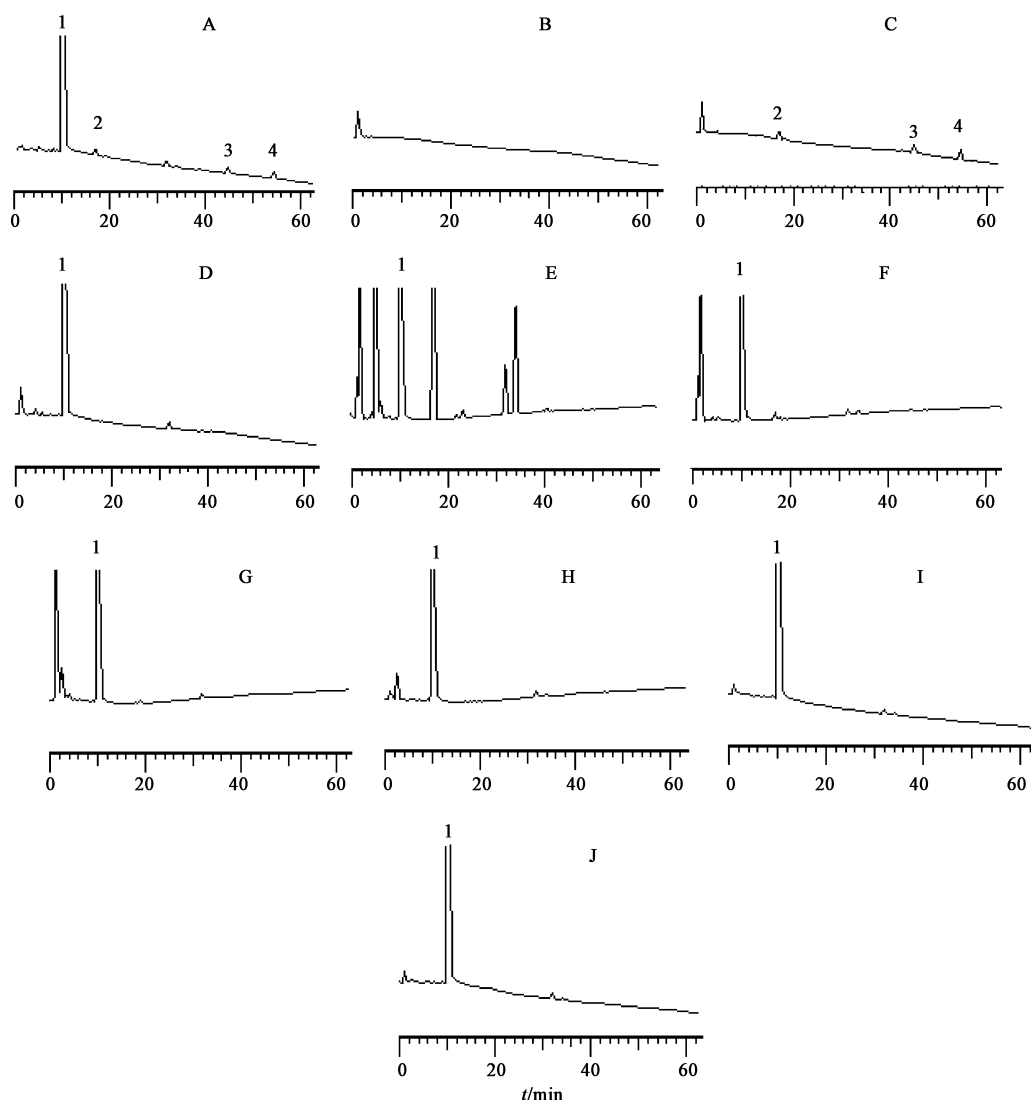
2.3.1 专属性试验 取空白溶剂、杂质对照品溶液及供试品溶液各 20 μL, 在上述色谱条件下, 进样分析, 色谱图见图 2。结果表明, 空白溶剂对样品测定无干扰。

2.3.2 破坏性试验 称取依折麦布原料药 6 份, 各约 10 mg, 分别按以下条件处理①碱破坏: 加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 10 mL, 于室温下放置 10 min, 用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液调至中性, 平行配制碱空白溶液; ②酸破坏: 加入 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液 10 mL, 于 70 °C 水浴中加热 2 h, 冷却, 用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调至中性, 平行配制酸空白溶液; ③氧化破坏: 加入 3% H₂O₂ 溶液 10 mL, 于 70 °C 水浴中加热 2 h, 冷却, 平行配制氧化空白溶液; ④高温破坏: 于 105 °C 恒温干燥箱中放置 24 h; ⑤高湿破坏: 在相对湿度 90% ± 5% 条件下放置 10 d; ⑥光照破坏: 于照度为 4 500 ± 500 lx 的条件下放置 10 d。将 6 份破坏后的样品分别转移到 100 mL 量瓶中, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 见图 2。利用二极管阵列检测器对各破坏条件下的依折麦布峰进行峰纯度检查, 主峰纯度因子均 > 990, 峰纯度符合要求。

结果表明, 依折麦布在酸破坏、碱破坏、氧化破坏条件下均有不同程度的降解, 其中在碱破坏条件下, 产生的降解产物最多, 并且各破坏条件下的降解产物均与主峰达到良好的分离, 说明本法专属性较强。

2.3.3 检测限与定量限 取对照品溶液逐级稀释, 在上述色谱条件下进样分析, 按信噪比为 3 计算检测限, 有关物质 A, B, C 和依折麦布的检测限分别为 12, 10, 10, 4 μg·L⁻¹, 按信噪比为 10 计算定量限, 有关物质 A, B, C 和依折麦布的定量限分别为 40, 35, 35, 15 μg·L⁻¹。

2.3.4 线性关系考察 分别精密量取线性储备液



A. 系统适用性; B. 空白溶剂; C. 对照品; D. 供试品; E. 碱破坏; F. 酸破坏; G. 氧化破坏;
H. 高温破坏; I. 高湿破坏; J. 光照破坏; 1. 依折麦布; 2. 有关物质 A; 3. 有关物质 B; 4. 有关物质 C

图 2 依折麦布有关物质 HPLC

0.35, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液, 在上述色谱条件下测定, 记录色谱图。以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标作图, 分别得回归方程 $A_A = 4.83 \times 10^4 C - 4.69 \times 10^2$ ($r = 0.9997$), $A_B = 5.66 \times 10^4 C + 3.26 \times 10^2$ ($r = 0.9994$), $A_C = 7.75 \times 10^4 C - 3.86 \times 10^2$ ($r = 0.9994$), $A_{\text{依折麦布}} = 4.66 \times 10^4 C + 2.96 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。

有关物质 A, B, C 在 $0.035 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 依折麦布在 $0.35 \sim 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 仪器精密度试验 取同一杂质对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 有关物质 A, B, C 峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.4%, 0.8%。表明仪器精

密度良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批次的依折麦布原料药 (批号 120107), 按 2.2.2 项下方法操作, 制备 6 份供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 计算样品中单个最大杂质含量的 RSD 1.9%, 总杂质含量的 RSD 1.7%, 表明方法重复性良好。

2.3.7 回收率试验 取 9 份依折麦布原料药各约 10 mg, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 分别加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的杂质对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5 mL, 每个浓度各 3 份, 加稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀 (配制成相当于杂质对照品溶液浓度 50%, 100%, 150% 的溶液)。在上述色谱条件下进样分析, 计算有关物质 A, B, C 的平均回收率和 RSD, 如表 2 所示, 表明方法准确度良好。

表 2 依折麦布杂质回收率试验

成分	称样量 /mg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
有关物质 A	10.0	5	5.04	100.8	101.2	1.6
	10.2	5	4.98	99.7		
	9.9	5	4.91	98.2		
	9.8	10	10.40	104.0		
	10.3	10	10.06	100.6		
	10.1	10	10.17	101.7		
	10.1	15	15.34	102.3		
	9.8	15	15.24	101.6		
	10.0	15	15.28	101.9		
有关物质 B	10.0	5	4.94	98.8	99.8	0.9
	10.4	5	4.99	99.9		
	9.9	5	5.01	100.2		
	9.7	10	9.96	99.6		
	10.3	10	10.12	101.2		
	10.1	10	9.86	98.6		
	10.1	15	15.12	100.8		
	9.8	15	15.06	100.4		
	10.0	15	14.83	98.9		
有关物质 C	10.0	5	4.99	99.9	100.9	0.7
	10.4	5	5.04	100.8		
	9.9	5	5.04	100.9		
	9.7	10	10.15	101.5		
	10.3	10	10.08	100.8		
	10.1	10	10.17	101.7		
	10.1	15	14.94	99.6		
	9.8	15	15.19	101.3		
	10.0	15	15.18	101.2		

注:样品中含量均为 0 μg。

2.3.8 稳定性试验 取同一杂质对照品溶液,分别在 0,2,4,6,8,12,24 h 进样分析,记录有关物质 A, B, C 的峰面积,计算 RSD 分别为 1.0%, 1.9%, 1.7%, 表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

取同一供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8,12 h 进样分析,各杂质和杂质总量均无明显变化,最大单个杂质峰面积的 RSD 1.8%,总杂质峰面积的 RSD 1.5%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.9 耐用性试验 分别考察了不同色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 和 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流速变化 ± 10%, 柱温变化 ± 5 °C, 磷酸比例变化 ± 10%,

流动相比比例变化 ± 5% 条件下,系统适用性和有关物质含量的变化,表明系统适用性均符合要求,有关物质含量无明显变化,方法耐用性良好。

2.4 样品测定 精密量取供试品溶液 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,制得 1 mg·L⁻¹ 的对照溶液。按上述色谱条件,取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使依折麦布峰的峰高约为满量程的 20%,再分别取杂质对照品溶液、供试品溶液、对照溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法计算,有关物质 A, B, C 的含量均不得超过 0.1%,按不加校正因子的主成分自身对照法计算,其他单个杂质不得大于对照溶液主峰面积的 0.1 倍(0.1%),总杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍(0.5%)。3 批样品中均未检测到有关物质 A, B, C, 单个最大杂质的含量分别为 0.079%, 0.063%, 0.080%, 总杂质的含量分别为 0.096%, 0.078%, 0.092%。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 取依折麦布和有关物质 A, B, C 对照品,分别在 190 ~ 400 nm 进行紫外扫描,显示依折麦布在 231, 249 nm 处有最大吸收,有关物质 A, B, C 的最大吸收波长分别为 226, 246, 246 nm。利用 DAD 检测器测定供试品溶液,考察未知杂质的吸收波长,最终选择 231 nm 为检测波长,在此波长条件下,检测到的杂质数最多、响应较大。

3.2 色谱条件的选择 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸-水、乙腈-冰醋酸-水、乙腈-磷酸-水等流动相系统,发现当乙腈-0.01% 磷酸水(45:55) 作为流动相时,依折麦布色谱峰出峰时间适宜,峰形较好。由于有关物质 B, C 极性较小,在等度条件下,洗脱时间太长,因此选择梯度洗脱,以缩短有关物质出峰时间。同时考察了梯度程序中流动相比比例的变化速率,最后确定了在 50 min 内有机相比比例增加 25% 条件为宜。另外,还比较了不同柱温对分离效果的影响,最终选用柱温 35 °C 作为测定条件。

[参考文献]

- [1] 白元, 秦永文. 新型降脂药-依折麦布的研究进展[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(3):187.
- [2] 吴文静, 柯元南, 郑金刚. 新型降脂药-依折麦布的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(4):558.
- [3] 李中东, 焦正, 王宏图. 胆固醇吸收抑制剂-依折麦布[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(10):797.
- [4] 叶晓春. 调脂治疗的新途径-依折麦布的研究进展[J]. 中国医药导报, 2010, 15(7):11.

不同生长年限当归挥发油对比研究

唐文文¹, 李国琴², 晋小军^{2*}

(1. 铜仁职业技术学院, 贵州 铜仁 554300; 2. 甘肃农业大学农学院和理学院, 兰州 730070)

[摘要] 目的:对直播一年生和育苗移栽两年生当归挥发油进行比较分析,从而为一年生当归具有一定的应用价值提供理论支持。**方法:**水蒸气蒸馏法提取挥发油,挥发油成分分析用 GC-MS 法。**结果:**直播一年生当归挥发油得率达 1.042%, 二年生为 0.664%, 直播一年生挥发油含量远远高于两年生,且色泽不同;直播一年生当归和两年生当归挥发油的化学组成基本一致;直播一年生当归挥发油中藜本内酯含量为 54.01%, 两年生当归挥发油中藜本内酯含量为 46.06%;其另外 2 种主要成分 1,4-环己二烯-1,2-羧酸酐,3-正丁烯基苯酐,在两年生当归挥发油中的含量分别为 11.22%, 14.19%, 高于直播一年生中的 2.49%, 7.02%;萜烯类成分在直播一年生中的总含量为 27.85%, 显著高于两年生当归中的 12.58%。**结论:**直播一年生当归在挥发油的提取方面具有良好的开发前景。

[关键词] 直播一年生当归; 两年生当归; 挥发油; 气相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0163-04

[doi] 10.11653/syfy2013190163

Contrast Analysis on Volatile Oil of Radix Angelicae Sinensis in Different Growth Periods

TANG Wen-wen¹, LI Guo-qin², JIN Xiao-jun^{2*}

(1. Tongren Vocational Institute, Tongren 554300, China;

2. College of Agriculture and Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

[Abstract] **Objective:** To study the volatile oil in one-year-old and two-year-old of Radix Angelicae Sinensis (RAS). **Method:** The volatile oil is obtained by steam distillation, their chemical constituents is analyzed by GC-MS. **Result:** The content of volatile oil was 1.042% in one-year-old of RAS, which was much

[收稿日期] 20120507(023)

[基金项目] 甘肃省中药材产业科技攻关项目(GYC-09-09)

[第一作者] 唐文文, 硕士, 从事药用植物资源与利用研究, Tel:13765666267, E-mail: tangwenwen6362@163.com

[通讯作者] * 晋小军, 研究员, 从事中药材种植与保质储藏技术研究, Tel:13909312576, E-mail:jingxj@gsau.edu.cn

[5] Bhanu Raman, Brajesh A Sharma, Rahul Butala, et al. Structural elucidation of a process-related impurity in ezetimibe by LC/MS/MS and NMR [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010(52):73.

[6] Saranjit Singh, Baljinder Singh, Rakesh Bahuguna, et al. Stress degradation studies on ezetimibe and development of a validated stability-indicating HPLC assay [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006(41):1037.

[7] Katarzyna Filip, Krzysztof Bankowski, Katarzyna Sidoryk, et al. Physicochemical characterization of ezetimibe and its impurities [J]. J Mol Struct 2011, 991 (1-3):162.

[8] Anuradha K Gajjar, Vishal D Shah. Isolation and structure elucidation of major alkaline degradant of Ezetimibe [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011(55):225.

[9] 于翠翠, 刘军锋, 车鑫, 等. 丹酚酸 A 中有关物质含量的测定方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (19):94.

[10] 麻秀萍, 蒋朝晖, 贾先生, 等. HPLC 测定齐默酸钠含量及其有关物质 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):89.

[11] 刘加元, 何胜利. HPLC 测定长春西汀注射液的有关物质 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):137.

[责任编辑 顾雪竹]