

文章编号 1006-8147(2016)01-0073-03

论 著

丁酸氯维地平注射乳剂中依地酸二钠的含量测定

赵亚绘^{1,2}, 王彦竹², 宋丽明², 张赫然², 王杏林², 田沛^{1,2}

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津药物研究院有限公司, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193)

摘要 目的: 建立测定丁酸氯维地平注射乳剂中微量依地酸二钠的高效液相色谱法。方法: 采用 Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 梯度洗脱流动相 A 为 0.66% 四丁基氢氧化铵溶液-乙腈 (3:1) (pH 6.5), B 相为甲醇-水 (9:1), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 50 μL, 检测波长为 254 nm。结果: 依地酸二钠峰不受辅料干扰, 在 8.04~80.37 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 加样回收率为 97.78% ($n=9$, $RSD=0.62\%$), 定量限 0.402 μg, 供试品中依地酸二钠含量分别为 46.7 μg·mL⁻¹、47.0 μg·mL⁻¹、49.6 μg·mL⁻¹。结论: 该方法准确可靠、专属性强, 可用于丁酸氯维地平注射乳剂中依地酸二钠的含量测定。

关键词 丁酸氯维地平; 注射乳剂; 依地酸二钠; 高效液相色谱法; 含量

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

Determination of EDTA-2Na in clevipine butyrate injectable emulsion

ZHAO Ya-hui^{1,2}, WANG Yan-zhu², SONG Li-ming², ZHANG He-ran², WANG Xing-lin², TIAN Pei^{1,2}

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of tracing EDTA-2Na in clevipine butyrate injectable emulsion.

Methods: The determination was performed on Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with gradient elution, mobile phase A was 0.66% tetrabutylammonium hydroxide solution-acetonitrile (3:1) (pH was adjusted to 6.5), and mobile phase B was methanol-water (9:1), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the injection volume was 50 μL and the detection wavelength was 254 nm.

Results: EDTA-2Na in clevipine butyrate injectable emulsion could be detected without excipients interfering. Calibration curve was linear range of 8.04~80.37 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), the average recovery rate was 97.78% ($n=9$, $RSD=0.62\%$), and the limit of quantitation was 0.402 μg and the determination of EDTA-2Na in the three batches of tests were 46.7 μg·mL⁻¹, 47.0 μg·mL⁻¹, 49.6 μg·mL⁻¹ respectively.

Conclusion: This method is accurate, reliable, exclusive, so it can be used for the determination of EDTA-2Na in clevipine butyrate injectable emulsion.

Key words clevipine butyrate; injectable emulsion; EDTA-2Na; HPLC; content

丁酸氯维地平 (clevipine butyrate) 属 L 型短效二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 可选择性作用于动脉血管以实现精确降压^[1-3], 临床常用其注射乳剂以减少药物的血管刺激性^[4-5], 实际生产中常加入适量金属离子螯合剂 EDTA-2Na 以提高乳剂稳定性, 但体内 Ca²⁺ 易与其形成配合物引起骨钙流失或低血钙^[6], 因此, 对注射剂中 EDTA-2Na 含量进行监测至关重要。目前, 中国药典仅收录了 EDTA-2Na 原料药的含量测定方法^[7], 尚未收录注射液中 EDTA-2Na 的控制标准, 通常认为注射液中 EDTA-2Na 安全有效浓度为 5~100 μg·mL⁻¹^[8]。本试验建立了准确、方便、快速测定丁酸氯维地平注射乳剂中 EDTA-2Na 含量的高效液相色谱法, 为该药质量控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、UV 检测器、ChemStation 工作站, 美国); XS205 电子分析天平 (梅特勒-托利多公司, 瑞士); FE20 pH 计 (梅特勒-托利多公司, 瑞士)。

丁酸氯维地平注射乳剂 (批号: 141110, 141111, 141112, 规格 50 mL:25 mg, 自制), 空白丁酸氯维地平注射乳剂 (不加 EDTA-2Na, 规格 50 mL:25 mg, 自制); EDTA-2Na 对照品 (纯度 99.9%, 中国药品生物制品检定所), 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件及系统适用性 色谱柱 Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 相为 0.66% 氢氧化四丁基铵溶液-乙腈 (3:1)

基金项目 国家重大新药创制课题基金资助 (2014ZX09507005-001)

作者简介 赵亚绘 (1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 药物制剂; 通信作者: 王杏林, E-mail: wangxl@tjipr.com。

(pH6.5), B相为甲醇-水(9:1), 梯度洗脱条件见表1, 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 35°C , 检测波长 254 nm , 进样体积 $50 \mu\text{L}$, 理论板数按 EDTA-2Na 峰计算不低于 3 000。

表1 梯度洗脱条件

Tab 1 The condition of gradient elution

| 时间/min | A /% | B /% |
|--------|------|------|
| 0 | 100 | 0 |
| 6 | 100 | 0 |
| 6.5 | 0 | 100 |
| 16 | 0 | 100 |

1.2.2 对照品溶液配制 取 EDTA-2Na 对照品适量, 精密称定, 加水制成约 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。精密量取该溶液 1 mL , 置 50 mL 离心管中, 加空白丁酸氯维地平注射液(不含 EDTA-2Na) 9 mL , 混合均匀。精密加入混合液[异丙醇-正庚烷(8:2)] 10 mL 振摇 1 min , 再加入 25 mL 正庚烷振摇 1 min , 于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 精密量取下层水相 5 mL , 置 10 mL 量瓶中, 加入 1.0 mL 0.08% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 加水至刻度, 制得 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液配制 精密量取丁酸氯维地平注射液 10 mL , 置 50 mL 离心管中, 按“1.2.2 对照品溶液配制”项下自“精密加入混合液”起同法操作。

1.2.4 方法专属性 精密量取空白丁酸氯维地平注射液(不含 EDTA-2Na) 10 mL , 置 50 mL 离心管中, 按“1.2.2 对照品溶液配制”项下自“精密加入混合液”起同法操作, 制得空白溶液。分别取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液进样测定, 记录色谱图。

1.2.5 线性关系考察 精密称定 EDTA-2Na 对照品 50 mg , 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。精密量取储备液 $2, 3, 5, 7, 8 \text{ mL}$ 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。再精密量取配制好的 $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EDTA-2Na 溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得到 $200, 300, 500, 700, 800, 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EDTA-2Na 溶液。精密量取上述溶液 1 mL , 按“1.2.2 对照品溶液制备”项下同法操作, 以 EDTA-2Na 浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.6 耐用性试验 分别改变流动相流速($1.1, 0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、柱温($32^\circ\text{C}, 38^\circ\text{C}$)、缓冲液 pH($\text{pH} 6.4$ 和 7.0)、检测波长($250 \text{ nm}, 260 \text{ nm}$), 其他条件不变, 评估测定条件发生微小变动时测定结果不受影响的承受程度。

1.2.7 定量限 以信噪比 $10:1$ 对应浓度为定量限, 取 EDTA-2Na 的对照溶液逐级稀释, 各精密量取 1 mL , 同“1.2.2 对照品溶液配制”项下操作, 记录色谱图。

1.2.8 精密度试验 按“1.2.2 对照品溶液配制”项下制备对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算 *RSD*。

1.2.9 重复性试验 取丁酸氯维地平注射乳剂(141110 批), 按“1.2.3 供试品溶液配制”项下制备 6 份供试品溶液, 连续进样, 计算 *RSD*。

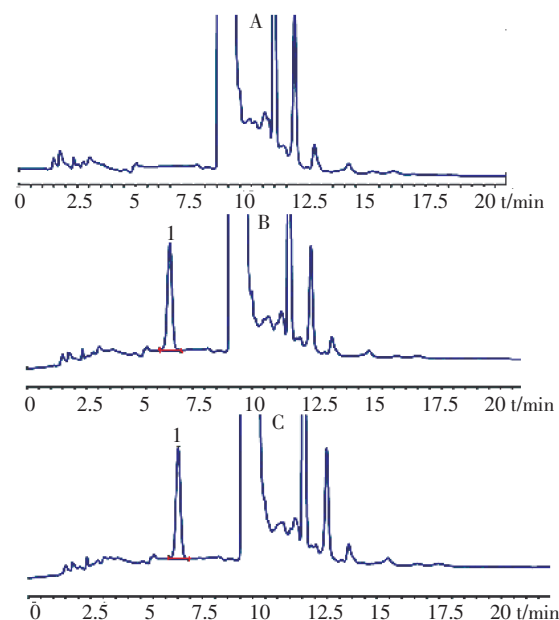
1.2.10 稳定性试验 取对照品溶液, 分别于 $0, 5, 12$ 和 24 h 测定 EDTA-2Na 峰面积。取供试品溶液, 分别于 $0, 4$ 和 16 h 测定 EDTA-2Na 峰面积。

1.2.11 回收率 精密称取 EDTA-2Na 对照品适量, 配制 $4.0, 5.0, 6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EDTA-2Na 水溶液, 分别精密量取 $100 \mu\text{L}$ 上述溶液置于 50 mL 离心管中(即加入样品量的 $80\%, 100\%$ 和 120%), 量取丁酸氯维地平注射液 10 mL , 置 50 mL 离心管中, 按“1.2.2 对照品溶液配制”项下自“精密加入混合液”同法操作, 制得回收液。每个浓度样品平行测 3 份, 计算 EDTA-2Na 含量及回收率。

1.2.12 供试品中 EDTA-2Na 含量测定 取不同批号丁酸氯维地平注射液(141110、141111、141112)按“1.2.2 供试品溶液配制”项下方法配制, 平行 3 次测定 EDTA-2Na 含量。

2 结果

2.1 方法专属性 空白溶液、对照品溶液和供试品溶液进样测定结果见图 1, 结果表明 EDTA-2Na 峰不受其他组分干扰, 该法专属性良好。



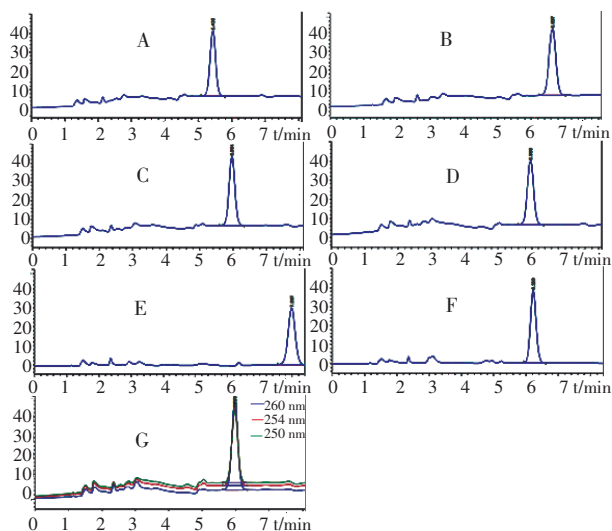
A-空白溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液

图1 专属性 HPLC 色谱图

Fig1 Specificity tests for HPLC chromatograms

2.2 线性关系考察结果 以 EDTA-2Na 浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A=8.7099C+6.8851(r=0.9999)$ 。结果表明,在 $8.04\sim 80.37\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,EDTA-2Na 浓度与峰面积线性关系良好。

2.3 耐用性试验结果 见图 2。正常情况下 EDTA-2Na 保留时间约 6.0 min,当流速为 $1.1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,EDTA-2Na 出峰稍提前,流速 $0.9\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时出峰稍延后,但均属合理范围且峰型基本不变;流动相 pH 为 6.4 和 7.0 时,EDTA-2Na 与其它成分的分离效果较好,但低于 6.4 时 EDTA-2Na 峰与溶剂峰重合,保留时间显著增加;柱温及检测波长稍变动时,EDTA-2Na 的保留时间及峰型均基本不变,且理论板数均大于 5 000,因此,本法耐用性良好。



A-流动相流速 $1.1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;B-流动相流速 $0.9\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;C-柱温 $32\ ^\circ\text{C}$;D-柱温 $38\ ^\circ\text{C}$;E-流动相 pH6.4;F-流动相 pH7.0;G-不同检测波长

图2 方法的耐用性试验

Fig2 The durability test

2.4 定量限结果 当对照品浓度为 $8.04\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其信噪比约为 10:1,EDTA-2Na 定量限为 $0.402\ \mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验结果 对照品中 EDTA-2Na 平均含量为 $49.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 1.47 %,说明该法精密度良好。

2.6 重复性试验结果 141110 批丁酸氯维地平注射乳剂中 EDTA-2Na 平均含量为 $46.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 0.07%,说明该法重复性良好。

2.7 稳定性试验结果 EDTA-2Na 对照品溶液在室温条件下 24 h 内稳定,峰面积的 RSD 为 0.7 %,EDTA-2Na 供试品溶液在室温条件下 16 h 内稳定,峰面积的 RSD 为 0.5 %,符合要求。

2.8 回收率结果 见表 2。平均回收率为 97.78%

($RSD=0.62\%$, $n=9$)。

表2 加样回收试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery ($n=9$)

| 本底量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 均值 | RSD/% |
|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 0.47 | 0.38 | 0.845 | 98.63 | 97.78 | 0.62 |
| 0.47 | 0.38 | 0.842 | 97.81 | | |
| 0.47 | 0.38 | 0.844 | 98.49 | | |
| 0.47 | 0.47 | 0.927 | 97.22 | | |
| 0.47 | 0.47 | 0.931 | 98.15 | | |
| 0.47 | 0.47 | 0.929 | 97.91 | | |
| 0.47 | 0.57 | 1.026 | 97.64 | | |
| 0.47 | 0.57 | 1.022 | 96.77 | | |
| 0.47 | 0.57 | 1.025 | 97.38 | | |

2.9 供试品中 EDTA-2Na 含量测定结果 3 批丁酸氯维地平注射液 (141110、141111、141112) 中 EDTA-2Na 含量分别为 $46.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $47.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $49.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,均在含量限度范围内($5\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),符合辅料安全原则。

3 讨论

3.1 回收率对定量的影响 对照品及供试品溶液配制过程中异丙醇-正庚烷起到破乳及萃取作用,离心加速油水分层,以便准确量取溶有 EDTA-2Na 的水层,但实际操作中不可避免的有 EDTA-2Na 损失。直接以 EDTA-2Na 水溶液为对照的预试验存在回收率不足(低于 90%)的问题,因此,在预试验基础上进行改进,先向对照品水溶液中加入空白丁酸氯维地平微乳,然后破乳萃取,使对照溶液与供试品溶液制备过程保持一致,以便利用外标法相对准确计算供试品中 EDTA-2Na 的实际浓度,该法准确度及回收率显著提高(97.78% , $n=9$, $RSD=0.62\%$)。

3.2 流动相 pH 选择及梯度条件优化 EDTA 合铜离子与等摩尔的氢氧化四丁基铵定量反应,流动相 pH 是该定量反应关键,酸度较大时, H^+ 竞争性的结合 EDTA 合铜离子,使离子对作用减弱,峰型变差;流动相碱度较大时易减少色谱柱和液相系统使用寿命,因此,实验将流动相 A 相调至近中性,同时采用梯度洗脱充分、及时洗脱水相中残余的脂肪酸,弥补了传统等度洗脱柱效恶化,峰型拖尾等不足。

本试验采用优化的梯度洗脱结合全面的方法学验证,建立了可靠、高效、专属性强的测定丁酸氯维地平注射乳剂中微量 EDTA-2Na 的 HPLC 法,该法也为其他药品中 EDTA-2Na 含量监测提供了思路和依据。

(下转第 79 页)

合对照品在上述色谱条件下进行进样分析,两种主药分离度较低。调慢流速为 0.8 mL/min,分离度仍没有明显改善,调回流速为 1.0 mL/min,调节流动相的组成和比例,增加极性相对较小的甲醇,多次改变甲醇、乙腈和磷酸盐的比例后得到最终流动相为 0.05 mol/L KH_2PO_4 (调节 pH 至 3.0)–甲醇–乙腈 (45:5:50),流速为 1.0 mL/min。

3.2 测定波长的选择 经查阅文献^[9]得到同时测定阿托伐他汀和依折麦布含量时的检测波长为 236 nm,而试验中对混合对照品进行紫外扫描时,得到的检测波长为 246 nm。故分别在 246 nm 和 236 nm 两个波长处进行含量测定,结果显示,在 236 nm 时检测阿托伐他汀和依折麦布两个组份更加灵敏。因此我们选择 236 nm 为此 HPLC 法的检测波长。

3.3 供试品溶液的制备方法 阿托伐他汀和依折麦布水溶性均较差,而易溶于甲醇^[14-16]。故本试验中用甲醇作为稀释溶液溶解药品颗粒,此时,药品稳定性好,且进样分析时色谱峰的峰形好。

参考文献:

- [1] 杜晓明,庞露,孙浩,等. 阿托伐他汀联合依折麦布降脂有效性及安全性 Meta 分析[J]. 医药导报,2012,31(8):1007
- [2] 刘龙华. 阿托伐他汀联合依折麦布治疗高脂血症疗效观察[J]. 右江医学,2013,41(4):534
- [3] 刘峰,刘海波. 依折麦布联合阿托伐他汀钙治疗高胆固醇血症的疗效观察[J]. 现代诊断与治疗,2013,24(17):3909
- [4] 崔祥祯,任英,吕永超. HPLC 法测定阿托伐他汀钙片的含量[J]. 药学研究,2013,32(6):340
- [5] 邱思婕. 高效液相法测定依折麦布片的含量[J]. 广州化工,2012,40(16):134
- [6] Sama J R, Kalakuntla R R, Rao V N, et al. Simultaneous estimation of atorvastatin and ezetimibe in pharmaceutical formulations by RP–HPLC method[J]. Der Pharmacia Lettre, 2010,2(1):427
- [7] 迟敏,黄文杰,张红,等. HPLC 法同时测定阿托伐他汀钙、阿司匹林、缬沙坦和苯磺酸氨氯地平制剂的含量[J]. 中国药房,2014,25(8):749
- [8] Kumar P. Stability indicating method development for simultaneous estimation of ezetimibe and atorvastatin in pharmaceutical formulations by RP–HPLC[J]. Pharm Anal Acta,2012(Suppl 7):S7
- [9] Goel A, Baboota S, Sahni J K, et al. Development and validation of stability –indicating assay method by UPLC for a fixed dose combination of atorvastatin and ezetimibe[J]. J Chromatogr Sci, 2013,51(3):222
- [10] 赖庆宽,王磊,谢婷,等. 依折麦布辛伐他汀片溶出度的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(12):1275
- [11] 汪秋兰,王文清,施春阳,等. 高效液相色谱法测定阿托伐他汀钙片中阿托伐他汀钙的含量[J]. 医药导报,2013,32(3):366
- [12] 于鑫,周增慧,袁慧雅,等. HPLC 同时测定依折麦布辛伐他汀片中两种成分的含量[J]. 中国现代应用药学,2013,30(9):1008
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010
- [14] 李丹丹,陶涛. 他汀类药物化学结构和理化性质对其药效及药动学特性的影响[J]. 中国医药工业杂志,2012,43(6):497
- [15] Taupitz T, Dressman J B, Klein S. New formulation approaches to improve solubility and drug release from fixed dose combinations: case examples pioglitazone/glimepiride and ezetimibe/simvastatin[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2013,84(1):208
- [16] Srivalli K R, Mishra B. Improved aqueous solubility and antihypercholesterolemic activity of ezetimibe on formulating with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and hydrophilic auxiliary substances [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2015, [Epub ahead of print]

(2015-05-22 收稿)

(上接第 75 页)

参考文献:

- [1] Keating G M. Clevidipine: a review of its use for managing blood pressure in perioperative and intensive care settings[J]. Drugs, 2014,74(16): 1947
- [2] Wei H H, Gu Y, Liu Y P, et al. Quantitation of clevidipine in dog blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 971: 52
- [3] Kurnutala L N, Soghomonian S, Bergese S D. Perioperative acute hypertension–role of clevidipine butyrate [J]. Front Pharmacol, 2014, 5: 197
- [4] Mirtallo J M, Dasta J F, Kleinschmidt K C, et al. State of the art review: Intravenous fat emulsions: Current applications, safety profile, and clinical implications[J]. Ann Pharmacother, 2010, 44(4): 688
- [5] He J Q, Zhang H Y, Yang L, et al. Preparation and evaluation of intravenous tetrandrine emulsion[J]. Chin Pharm J, 2011, 46(22): 1734
- [6] Xiao S G. The latest national standard pharmaceutical excipients[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2010: 50–50
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版 (二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010: 1206
- [8] 欧洲药典.6.0 版[S]. 2008:234

(2015-08-25 收稿)