

苯磺酸氨氯地平片主要杂质的定性与定量分析

赵霞¹, 李博^{2,3*}, 陈伯玮², 王岁楼²

(¹无锡市第二人民医院医疗发展部, 江苏 无锡 214002; ²中国药科大学食品质量与安全教研室, ³教育部药物质量与安全预警重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:建立苯磺酸氨氯地平片中主要杂质的定性与定量分析方法。方法:采用 LC-MS、NMR 及色谱方法确认苯磺酸氨氯地平片中主要杂质结构。以 C18 柱为固定相, pH3.0 缓冲液-甲醇-乙腈 50:35:15 为流动相, 检测波长 237 nm, 外标法定量测定苯磺酸氨氯地平片中杂质。结果:苯磺酸氨氯地平片中主要杂质为氨氯地平氧化脱氢的产物(杂质 A)。杂质 A 定量方法分离良好, 杂质 A 与氨氯地平及其他杂质峰完全分离; 在 0.5~10.0 μg/ml 的范围内杂质 A 的峰面积和浓度线性相关, 方法定量限 10 ng/ml, 回收率 98.2%($n=9$), RSD 为 0.2%($n=6$)。结论:苯磺酸氨氯地平片中主要杂质为氨氯地平氧化脱氢的产物(杂质 A)。该分析方法准确可靠, 简便易行, 可用于苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 的测定。

[关键词] 苯磺酸氨氯地平片; 杂质; 定性; 定量

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1314-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130934

Identification and quantification of impurities in amlodipine besylate tablets

Zhao Xia¹, Li Bo^{2,3*}, Chen Bowei², Wang Suilou²

(¹Department of Medical Development, Wuxi No2 People's Hospital, Wuxi 214002; ²Department of Food Quality and Safety, ³Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To identify and determine the impurities in amlodipine besylate tablets. **Methods:** The main impurities in amlodipine besylate tablets were identified with LC-MS, NMR and chromatographic methods. Then the main impurities were determined with C18 column as stationary phase and buffer (pH 3.0)-methanol-acetonitrile 50:35:15 as mobile phase. **Results:** The main impurity in amlodipine besylate tablets was proved to be the dehydration product of amlodipine (Impurity A, IM A). IM A could be completely separated with the established method. It was a linear correlation between the area and the concentration in the range of 0.5~10.0 μg/ml. The Limit of Quantification of the method was 10 ng/ml, recovery was 98.2%($n=9$) and the RSD of the method was 0.2%($n=6$). **Conclusion:** The main impurity in amlodipine besylate tablets was IM A. The established method is accurate, simple and is suitable for determination of IM A in amlodipine besylate tablets.

[Key words] amlodipine besylate tablets; impurity; identification; quantification

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1314-1317]

苯磺酸氨氯地平(amlodipine)是二氢吡啶类钙拮抗剂^[1-2]。由于其血管选择性高,作用时间长,且能抑制交感神经及肾素-血管紧张素系统,临床应用

非常广泛^[3-6]。苯磺酸氨氯地平片国家标准中仅包括溶出度、含量和含量均匀度等项目,而缺乏对苯磺酸氨氯地平片中杂质的质量控制^[7]。文献报道^[8-13]中对苯磺酸氨氯地平片中总有关物质进行了研究,而缺乏对其中主要杂质的定性、定量研究。

本文研究了苯磺酸氨氯地平片中主要杂质,进行了定性和定量,为研究氨氯地平片中主要杂质,保证苯磺酸氨氯地平片的质量提供依据。

[基金项目] 无锡市医院管理中心科研项目(YGM1011)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: libocpu@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料

岛津 LC-2010 高效液相色谱仪;LC-Solution 工作站;TSQ 型 LC-MS/MS 联用仪 (Finnigan 公司,美国);Xcalibur1.1 数据处理系统;岛津 LC-8A 制备液相色谱仪。

苯磺酸氨氯地平对照品(中国药品生物制品检定所),脱氢氨氯地平对照(北京百灵威公司),苯磺酸氨氯地平片(中国药科大学药物制剂教研室提供)。甲醇、乙腈为色谱纯,水为 Milli-Q 去离子水,其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

供试溶液:取苯磺酸氨氯地平片,研细后取约相当于苯磺酸氨氯地平 25 mg 的片粉,精密称定,置 50 ml 量瓶。加流动相溶解并稀释至刻度,混匀后 0.45 μm 滤膜过滤,即得。

脱氢氨氯地平对照溶液:精密称取脱氢氨氯地平对照品,加流动相溶解并稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,即得。

系统适用性溶液:取苯磺酸氨氯地平对照品和脱氢氨氯地平对照品,加流动相溶解并稀释制成每 1 ml 中约脱氢氨氯地平 5 μg 、苯磺酸氨氯地平 5 μg 的混合溶液。

1.2.2 色谱条件

色谱柱采用 Lichrospher C18 柱 (150.0 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为缓冲液(量取 7.0 ml 三乙胺于 1 L 水中,用磷酸调节 pH 至 3.0 \pm 0.1)-甲醇-乙腈 50:35:15;流速 1.0 ml/min;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 237 nm。

1.2.3 杂质的鉴定

LC-MS 法以水(甲酸调节 pH 至 3.0)-甲醇-乙腈 50:35:15 为流动相,色谱柱为 Lichrospher C18 柱 (150.0 mm \times 4.6 mm, 5 μm),采用气动辅助电喷雾离子化方式(ESI),正离子检测;离子化电压:5 000 V;雾化室压力:20psi;干燥气温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。取供试溶液进样,LC-MS 法测定氨氯地平片中主要有关物质的分子量。

杂质的分离和 NMR 鉴定 以水(醋酸调节 pH 至 4.0)-甲醇 40:60 为流动相,采用制备液相分离并收集该杂质,旋转蒸发除去溶剂后,以 BRUKER AV-500 核磁共振光谱仪测定该化合物的氢谱($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)。

1.2.4 杂质的测定

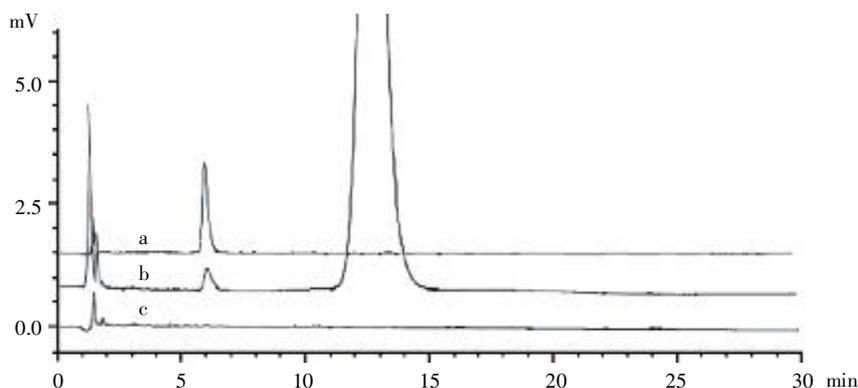
取系统适用性溶液 20 μl 注入液相色谱仪,色谱条件参照 1.2.2 节。氨氯地平与杂质的分离度应不低于 2.0。分别取苯磺酸氨氯地平片供试溶液和脱氢氨氯地平对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪,记录供试溶液和脱氢氨氯地平对照溶液中脱氢氨氯地平的峰面积,外标法计算苯磺酸氨氯地平片中杂质的含量。

2 结果

2.1 杂质的鉴定

由液相色谱图(图 1)可见,保留时间 6.2 min 的杂质(杂质 A,IM A)为苯磺酸氨氯地平片中的主要杂质。采用 LC-MS 法进一步对杂质 A 进行鉴定,可见该杂质的[M+H]⁺准分子离子 407.1,其分子量比氨氯地平的分子量低 2,可能为氨氯地平脱氢降解产物。同时 409 的同位素峰强度为准分子离子峰的 1/3,表明杂质 A 分子中含有一个氯原子。

采用制备液相分离并收集杂质 A 后,500 M



a:杂质 A 对照溶液;b:氨氯地平供试溶液;c:空白。

图 1 氨氯地平 HPLC 色谱图

Figure 1 Chromatogram of amlodipine tablet a

NMR 测定该化合物的氢谱和碳谱, 结果分别见表1、表2。与氨氯地平 1,4-二氢吡啶环的脱氢产物。进一步通过脱氢氨氯地平对照品色谱图(图1a)可见, 该化合物与苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 色谱行为一致。综合以上质谱、核磁及色谱试验结果, 可确定苯磺酸氨氯地平片中的杂质 A 为氨氯地平脱氢降解产物, 即脱氢氨氯地平。

表1 杂质 A 的 ¹H-NMR 谱数据

Table 1 The ¹H-NMR data of IM A

氢原子序号	化学位移(ppm)	多重性	质子数
3	7.40	d	1
4,5	7.38	m	2
6	7.24	d	1
19	4.88	d	2
16	4.10	m	2
20	3.83	t	2
14	3.56	s	3
21	3.27	t	2
18	2.65	s	3
17	0.91	t	3

表2 杂质 A 的 ¹³C-NMR 谱数据

Table 2 The ¹³C-NMR data of IM A

碳原子序号	化学位移(ppm)	碳原子序号	化学位移(ppm)
13	171.0	3	131.4
15	170.3	8	129.6
11	159.9	5	129.1
9	158.0	19	74.3
7	148.5	20	69.6
1	136.6	16	65.7
2	134.7	14	55.7
6	133.5	21	41.9
4	133.1	18	4.7
12	132.0	17	15.5

2.2 杂质 A 测定方法的验证

2.2.1 专属性

通过比较可能的杂质 A 和杂质 A 对照品的保留时间作为定性依据。如果杂质峰的保留时间与相应的杂质对照品的保留时间一致, 则此杂质可被确定。色谱图见图 1 和图 2。

2.2.2 线性

分别精确称取杂质 A 对照品和氨氯地平对照品适量, 配制成每 1 ml 中含 10 μg 杂质 A 对照品和 10 μg 氨氯地平对照品的混合溶液。分别稀释成浓度为 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μg/ml 的混合溶液。根据以上色谱条件, 分别将稀释液注入色谱仪, 以杂质 A

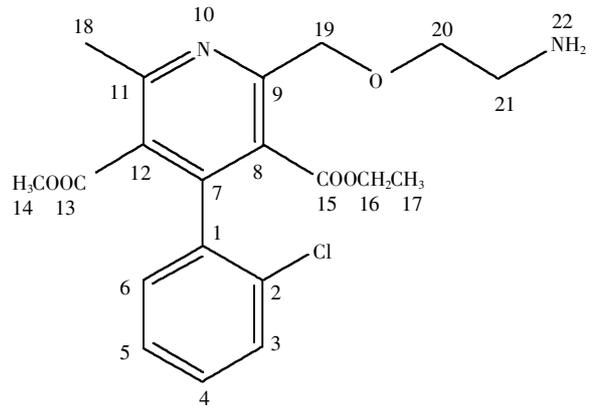


图2 杂质 A 的结构式

Figure 2 The structure of IM A

浓度对峰面积进行线性回归(图3), 回归方程 $A = 1.204 \times 10^4 \times C - 1.733 \times 10^3$, 相关系数 $r = 0.9983$, 回归系数 95% 置信区间为斜率 [11 628.28, 12 524.85] 截距 [-4 583.78, 602.79]。方差分析和 *t* 检验均表明 Y 与 X 之间的线性关系显著。表明杂质 A 在 0.5~10.0 μg/ml 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

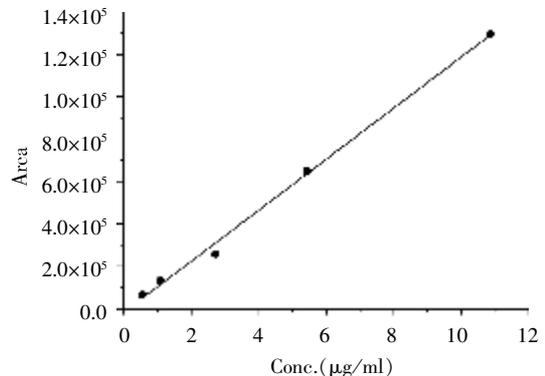


图3 杂质 A 的标准曲线

Figure 3 The standard curve of IM A

2.2.3 定量限

配制浓度为 0.5 μg/ml 的杂质对照品溶液, 逐步稀释, 以信噪比 10:1 测定其定量限, 结果为 10 ng/ml。

2.2.4 回收率

取氨氯地平片, 定量加入杂质 A 对照并依法测定杂质 A 含量, 计算回收率。测定结果见表 3, 由结果可见, 方法回收率均值为 99.2%, 表明方法具有良好的准确性。

2.2.5 精密度

取杂质 A 对照溶液, 依法连续进样测定 6 次, 记录杂质 A 峰面积。测得峰面积的 RSD 为 0.2%, 表

表 3 氨氯地平杂质 A 的回收率

Table 3 The recovery of IM A

加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)
2.72	2.68	98.5
2.72	2.66	97.9
2.72	2.70	99.6
5.43	5.50	101.3
5.43	5.35	98.6
5.43	5.38	99.1
8.15	8.21	100.8
8.15	7.99	98.1
8.15	8.04	98.6

明方法的精密度良好。

2.2.6 溶液稳定性

取供试溶液,分别于 0、0.5、1.0、2.0、4.0 h 测定,记录杂质 A 峰面积。不同时间杂质 A 峰面积变化情况见表 4,可见杂质 A 在 4h 内稳定。

2.2.7 样品中杂质 A 的测定

采用上述方法测定了 3 批苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 含量,结果见表 5。结果表明,苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 含量在 0.27%~0.46%。

表 4 溶液稳定性试验结果

Table 4 The stability of IM A

时间(h)	0	0.5	1.0	2.0	4.0
峰面积	61980	62242	62216	62237	62210

表 5 不同批次苯磺酸氨氯地平片样品中杂质 A 的含量

Table 5 The content of IM A in amlodipine beslyate tablets

批号	20110315	20110318	20110321
杂质 A(%)	0.27	0.46	0.30

3 讨论

氨氯地平为碱性药物,在反相色谱系统中由于硅羟基效应而导致色谱峰拖尾。实验中向流动相中添加了三乙胺作为流动相添加剂,可显著减小拖尾,从而提高柱效,改善分离^[14]。

参考苯磺酸氨氯地平原料的研究报道,杂质 A 为氨氯地平在光照、氧化条件下的主要降解产物。Ragno 等^[15]报道制剂中的辅料对于氨氯地平降解产生杂质 A 有非常重要的影响,因此对于苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 的定量测定对于苯磺酸氨氯地平制剂的质量评价具有重要意义。

本文采用 LC-MS、NMR 和色谱等方法确定了苯磺酸氨氯地平片中主要杂质为其氧化脱氢产物脱氢氨氯地平对照品。建立了苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 的 HPLC 测定法,方法准确(回收率 98.2%)、灵敏(定量限 10 ng/ml),可用于苯磺酸氨氯地平片中杂质 A 的定量测定,为评价苯磺酸氨氯地平片的质量提供依据。

[参考文献]

- [1] Parfitt K. Martindale[M]. 32th ed. London: Pharmaceutical Press, 1999: 77-80
- [2] 吴云珍, 吴宁苹, 李文辉. 苯磺酸氨氯地平的合成[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2): 140-141
- [3] 余炼红. 苯磺酸氨氯地平治疗高血压临床观察 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(6): 49-50
- [4] 姚晓颖, 张玉玺, 陈旭, 等. 苯磺酸氨氯地平治疗高血压的临床分析[J]. 当代医学, 2011, 17(17): 145-146
- [5] 郭岩林, 赵永贤. 苯磺酸氨氯地平治疗原发性高血压临床观察[J]. 中国医药导报, 2013, 10(6): 75-76
- [6] Henik RA, Snyder PS, Volk LM. Treatment of systemic hypertension in cats with amlodipine beslyate [J]. J Am Anim Hosp Assoc, 1997, 33(3): 226-234
- [7] 苯磺酸氨氯地平片质量标准[S]. 国家药品监督管理局国家药品标准 WS1(X-10)-2001Z
- [8] 秦书德, 马晓伟, 陈静, 等. 苯磺酸氨氯地平的有关物质检查方法研究[J]. 中国药业, 2011, 20(15): 23-24
- [9] 牛晓强, 赵亮. 高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平片的含量及有关物质[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(11): 1534-1537
- [10] 徐国津, 李新春. 高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平的含量及有关物质 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(1): 60-63
- [11] 唐杰, 邱幸琛. 苯磺酸氨氯地平片有关物质测定[J]. 海峡药学, 2012, 24(10): 96-98
- [12] 董煜, 钱小平, 孙晶晶. HPLC 法测定苯磺酸氨氯地平片的有关物质 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(3): 213-214
- [13] 孙发燕, 曾志敏. HPLC 法测定苯磺酸氨氯地平片的有关物质[C]//海南省药学会 2010 年学术年会会议论文集, 2010: 138-142
- [14] 丁黎. 药物色谱分析 [M]. 北京: 人民教育出版社, 2008: 178
- [15] Ragno G, Cione E, Garofalo A, et al. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2003, 265: 125-132

[收稿日期] 2013-03-29