

HPLC法测定洛伐他汀分散片中的有关物质

孙婷^{1*}, 杨浩天², 刘红莉¹, 盖宾杰¹, 耿 韞¹, 盖 成¹(1.河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2.河北医科大学药物分析教研室, 石家庄 050017)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1683-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.33

摘要 目的:建立测定洛伐他汀分散片中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters XTerra[®] MS C₁₈, 流动相A为0.01%磷酸溶液、流动相B为乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为40℃,检测波长为238 nm,进样量为10 μl。结果:各杂质成分与主成分间分离良好;洛伐他汀检测质量浓度线性范围为17.5~700 μg/ml($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;回收率为99.30%~100.67%,RSD=0.4%($n=9$)。结论:该方法重复性和耐用性好、准确度高,适用于洛伐他汀分散片的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;洛伐他汀分散片;有关物质

Determination of Related Substances in Lovastatin Tablet by HPLC

SUN Ting¹, YANG Haotian², LIU Hongli¹, GE Binjie¹, GENG Yun¹, GE Cheng¹(1.Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.Dept. of Pharmaceutical Analysis, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Lovastatin tablet. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters XTerra[®] MS C₁₈ with mobile phase A of 0.01% Phosphoric acid solution and B of acetonitrile (gradient elution) at a flow rate 1.0 ml/min, column temperature was 40℃, the detection wavelength was 238 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The impurity components were well separated in principal components; the linear range of lovastatin was 17.5-700 μg/ml ($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 99.30%-100.67% (RSD=0.4%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is reproducible with good durability and high precision, and can be used for the quality control of Lovastatin tablet.

KEYWORDS HPLC; Lovastatin dispersible tablet; Related substance

洛伐他汀(Lovastatin)为美国默克公司研发,是20世纪80年代上市的第一个他汀类调血脂药,由于其独特的疗效,被誉为治疗心血管系统疾病的里程碑,深受广大患者的欢迎。该药主要作用部位在肝脏,在体内可竞争性地抑制胆固醇合成过程中的限速酶羟甲戊二酰辅酶A还原酶,使胆固醇合成减少,并使低密度脂蛋白受体合成增加,从而使血清总胆固醇和

低密度脂蛋白胆固醇水平降低,由此对动脉粥样硬化和冠心病具有防治作用。同时,该药还可降低血清三酰甘油水平和增高高密度脂蛋白胆固醇水平^[1]。洛伐他汀系发酵产品,发酵液中含有的与其结构功能相似的同类化合物较多,在现有的提取工艺下,洛伐他汀原料药中常含有美伐他汀、加氢洛伐他汀、脱水洛伐他汀和洛伐他汀二聚体等杂质。同时,由于其片

- 维C银翘片中4种组分的含量[J].色谱,2010,28(2):204.
- [6] 杨晓,杨钊,李新荣,等.LC-MS/MS法同时测定维C银翘片中6种成分[J].中成药,2013,35(10):2153.
- [7] 邵艳玲,孙国祥,李婷婷,等.高效液相色谱数字化定量指纹图谱评价维C银翘片的中药组份物质均一性[J].中南药学,2011,9(8):623.
- [8] 高光伟,冯向东,黄海欣,等.HPLC同时测定维C银翘片中绿原酸、对乙酰氨基酚、维生素C、马来酸氯苯那敏的含量[J].中成药,2008,30(2):207.
- [9] 黄婧,马健雄.RP-HPLC法同时测定维C银翘片中绿原酸和牛蒡苷的含量[J].中国民族民间医药,2013,22(14):17.
- [10] 周天祥,周嵩煜.运用NIR对维C银翘片中异性有机物的

- 应急检验研究[J].中国药事,2012,26(4):390.
- [11] 俞志东,于湘.LC-MS法测定维C银翘片中有效组分含量[J].广州化工,2012,40(15):142.
- [12] 魏丽萍,吴春敏.HPLC法测定维C银翘片中马来酸氯苯那敏的含量及含量均匀度[J].中国药品标准,2011,12(6):424.
- [13] 严妍,郝秀艳,姜波,等.HPLC测定维C银翘片中甘草酸的含量[J].科技创新与应用,2012(22):70.
- [14] 黄道.用正交试验法优选维C银翘片的生产工艺研究[J].中国民族民间医药,2012,21(16):56.
- [15] 于洪英,李泰琴,尹东峰.维C银翘片制备工艺的研究[J].中国医药指南,2012,10(28):64.
- [16] 邓锡有.改进维C银翘片稳定性的生产工艺研究[J].中国医药指南,2008,6(19):84.

* 主管药师。研究方向:药物分析、药品检验。E-mail: 122547652@qq.com

(收稿日期:2015-05-05 修回日期:2016-01-06)
(编辑:刘 柳)

剂在生产过程中需经过混料、压片等工艺,可能使原料药降解或带入一些其他杂质。通过对洛伐他汀分散片的研究发现,其中有关物质无论是单个杂质还是杂质总和,比照原料药都有所增加,故测定该制剂中的有关物质对于控制该制剂的生产和贮存期质量有十分重要的意义。为此,参考相关文献^[2-8],本试验建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定洛伐他汀分散片中有关物质的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括LC-20AT二极管阵列检测器(DAD)和Labsolution色谱工作站(日本岛津公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司);X105型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

洛伐他汀对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100600-200502,纯度:99.4%);洛伐他汀分散片(山东某企业生产,批号:090101、090102、090103);洛伐他汀原料药(山东某企业生产,批号:00323026);乙腈为色谱纯(德国Fisher Scientific公司),磷酸为优级纯(天津市风船化学试剂科技有限公司),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XTerra[®] MS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:流动相A为0.01%磷酸溶液、流动相B为乙腈,采用梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:238 nm;柱温:40℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
6	40	60
24	5	95
34	5	95
40	40	60
50	40	60

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取样品细粉适量,加乙腈溶解并稀释制成每1 ml中约含洛伐他汀0.4 mg的溶液,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.2 对照溶液 精密量取“2.2.1”项下供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.2.3 空白辅料溶液 精密称取生产企业处方所有辅料适量,按“2.2.1”项下方法进行制备,制备空白辅料溶液。

2.2.4 对照品贮备液 精密称取洛伐他汀对照品350 mg,置于100 ml量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。

2.2.5 对照品溶液 精密量取“2.2.4”项下对照品贮备液适量,加乙腈溶解并稀释制成每1 ml中约含洛伐他汀2 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 辅料干扰试验 取“2.2”项下空白辅料溶液、对照品溶液和供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,供试品色谱在与对照品色谱相应位置处显相同的色谱峰,其他成分与主成分间分离良好。

2.3.2 破坏试验 (1)酸破坏样品:取洛伐他汀原料药10 mg,

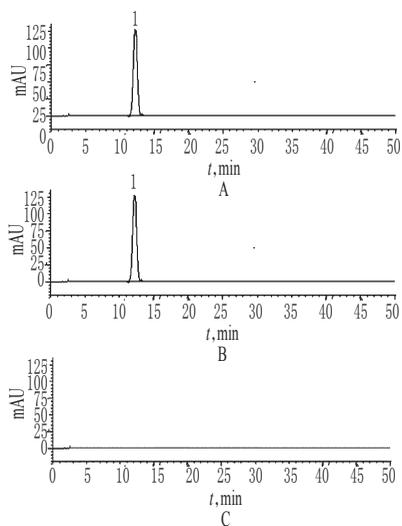


图1 辅料干扰试验高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.空白辅料;1.洛伐他汀

Fig 1 HPLC chromatograms of accessories interference test

A.reference substance;B.test sample;C.blank control;1.lovastatin

加入处方比例的辅料,置于25 ml量瓶中,加乙腈2 ml溶解,加0.1 mol/L盐酸溶液1 ml,室温放置10 min,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调至中性,加乙腈稀释至刻度,摇匀。(2)碱破坏样品:取洛伐他汀原料药10 mg,加入处方比例的辅料,置于25 ml量瓶中,加乙腈2 ml溶解,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,室温放置10 min,用0.1 mol/L盐酸溶液调至中性,加乙腈稀释至刻度,摇匀。(3)高温破坏样品:取洛伐他汀原料药10 mg,加入处方比例的辅料,在150℃下加热3 h,转移至25 ml容量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。(4)光照破坏样品 取洛伐他汀原料药10 mg,加入处方比例的辅料,置于25 ml量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,在紫外灯(4 500 lx)下放置约24 h。(5)氧化破坏样品:取洛伐他汀原料药10 mg,加入处方比例的辅料,置于25 ml量瓶中,加乙腈2 ml溶解,加30%过氧化氢溶液2 ml,室温放置6 h,加乙腈稀释至刻度,摇匀。(6)未破坏样品:取洛伐他汀原料药10 mg,置于25 ml量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。分别取上述各破坏样品溶液和未破坏样品溶液10 μl,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可见,经破坏后的样品与未破坏样品色谱比较,主峰面积有所下降,杂质峰有所增多。其中,经高温破坏后杂质较多,经强光破坏后降解产物较少;同时,各破坏条件下辅料均未对杂质分离造成影响,主峰与相邻杂质峰之间分离度均>1.5,符合对分离度的要求。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.4”项下对照品贮备液0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 ml,置于10 ml量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,分别精密量取10 μl,按“2.1”项下色谱条件注入HPLC仪,记录峰面积。以质量浓度为横坐标(x, μg/ml)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得洛伐他汀的回归方程为 $y = 3.3 \times 10^4 x + 8.0 \times 10^{-9}$ ($r = 0.9999$)。结果表明,洛伐他汀检测质量浓度线性范围为17.5~700 μg/ml。

2.5 精密度的试验

精密量取“2.2.5”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,洛伐他汀峰面积的RSD=0.3% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

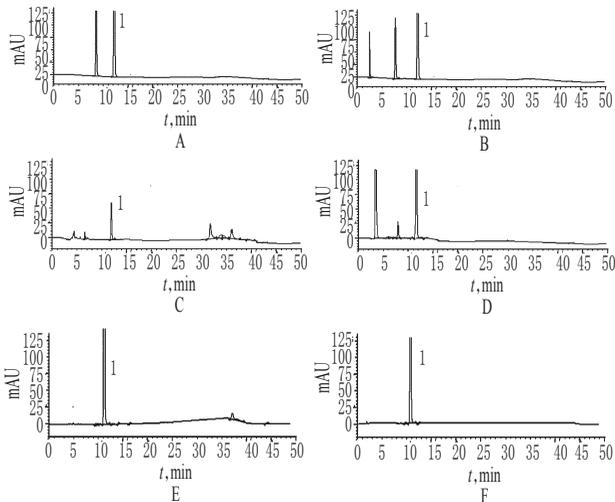


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.高温破坏样品;D.氧化破坏样品;E.光照破坏样品;F.未破坏样品;1.洛伐他汀

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. sample treated with acid; B. sample treated with alkali; C. sample treated with high temperature; D. sample treated with oxidation; E. sample treated with light; F. untreated sample; 1. lovastatin

2.6.1 对照品溶液 精密量取按“2.2.5”项下方法制备的对照品溶液适量,于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,洛伐他汀峰面积的RSD=0.3% (n=6),表明对照品溶液在12 h内质量基本稳定。

2.6.2 供试品溶液 精密量取按“2.2.1”项下方法制备的供试品溶液(批号:090101)适量,于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,洛伐他汀峰面积的RSD=0.9% (n=6),表明供试品溶液在12 h内质量基本稳定。

2.7 重复性试验

取样品(批号:090101)细粉适量,共6份,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,洛伐他汀峰面积的RSD=0.6% (n=6),表明本方法的重复性良好。

2.8 回收率试验

按处方量取空白辅料9份,分别置于50 ml量瓶中,每3份精密加入“2.2.4”项下对照品贮备液4、5、6 ml,加乙腈适量,振荡使溶解,并加乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test(n=9)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
7.98	8.01	100.38		
7.98	7.97	99.87		
7.98	7.98	100.00		
9.94	9.97	100.30		
9.94	9.89	99.50	100.0	0.4
9.94	9.87	99.30		
12.03	12.01	99.83		
12.03	12.11	100.67		
12.03	12.05	100.17		

2.9 样品有关物质测定

分别取3批样品各适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶

液和对照溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用自身对照法计算样品中有关物质的量,结果见表3。

表3 样品有关物质测定结果(n=3)

Tab 3 Determination results of related substances in samples(n=3)

批号	单个最大杂质,%	杂质总和,%
090101	0.28	0.94
090102	0.23	0.89
090103	0.21	0.92

3 讨论

3.1 流动相和洗脱方法的选择

本试验流动相选择了0.01%磷酸溶液-乙腈,有效避免了因缓冲盐沉积对HPLC仪的损耗,且该流动相配制较为便捷,有效提高了检验效率。通过进一步对比试验发现,与等度洗脱相比梯度洗脱能够洗脱出更多的杂质,且杂质之间、杂质与主峰之间分离度均能达到要求,故本试验最终选择梯度洗脱方式。

3.2 耐用性的考察

本试验分别以Waters XTerra® MS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agela C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamonsil™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3根不同厂家、不同填料的C₁₈色谱柱进行试验,发现均可对样品中各成分进行有效分离,表明所建立的有关物质测定方法耐用性良好。

3.3 本研究的价值

经查询,《美国药典》37版、《英国药典》2014版、《欧洲药典》8.0版和《日本药局方》现行版均未收载该剂型。通过方法学研究,可证明本试验所建立的色谱条件适用于测定洛伐他汀分散片中的有关物质,能够较好地控制产品质量,保证药品安全性。

综上所述,本方法重复性和耐用性好、准确度高,适用于洛伐他汀分散片的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 临床用药须知[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 305.
- [2] 纪红, 郭威早, 严之红. 洛伐他汀对心肌细胞外信号调节激酶信号传导水平及心脏营养素-1表达的影响[J]. 中国临床医学, 2011, 18(3): 310.
- [3] 黄孝闻, 陈平华, 陈莉君, 等. HPLC法测定水溶性红曲中Monacolin K的含量[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(9): 685.
- [4] 王丽娟, 陈四喜, 杨雁冰, 等. HPLC法测定血脂康胶囊中Monacolin类成分的含量[J]. 中国疗养医学, 2015, 24(5): 479.
- [5] 陈东洋, 冯家力, 张昊, 等. 不同前处理方法对保健食品洛伐他汀含量测定的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(11): 295.
- [6] 李兰生, 吴俊龙. 反相色谱法测定洛伐他汀含量的方法[J]. 青岛化工学院学报, 1999, 20(4): 353.
- [7] 吴永江, 朱炜, 邵青, 等. 高效液相色谱-质谱联用分析洛伐他汀中的杂质[J]. 分析化学, 2006, 34(1): 115.
- [8] 王冬, 周健鹏, 王晨. HPLC法测定甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物中有关物质的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(24): 3436.

(收稿日期: 2015-05-03 修回日期: 2016-03-15)

(编辑: 周 箐)