

· 技术与方法 ·

## 应用高效液相色谱法测定缬沙坦氨氯地平片有关物质

彭熙琳<sup>1,2</sup>, 吴品江<sup>2△</sup>, 周唯兰<sup>2</sup>, 周芯宇<sup>2</sup>, 李元波<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西药学院, 成都 610044; 2. 扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司, 四川都江堰 611830)

**摘要:**目的 建立一种高效液相色谱(HPLC)法测定缬沙坦氨氯地平片有关物质。方法 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以三乙胺溶液(用磷酸调 pH 值至 2.8)-甲醇-乙腈作为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 40 ℃,检测波长 238 nm,进样量 10 μL。结果 其降解产物与主峰在该色谱条件下能够有效分离。结论 该方法简便、准确,系统适用性好,可作为缬沙坦氨氯地平片有关物质的检验方法。

**关键词:**缬沙坦氨氯地平片;有关物质;高效液相色谱

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2175-03

## Determination of related substances of valsartan and amlodipine tablets by HPLC

Peng Xilin<sup>1,2</sup>, Wu Pinjiang<sup>2△</sup>, Zhou Weilan<sup>2</sup>, Zhou Xinyu<sup>2</sup>, Li Yuanbo<sup>2</sup>

(1. Huaxi Pharmacy College, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610044, China; 2. Yangtze River

Pharmaceutical Group Sichuan Hairong Pharmaceutical Company Limited, Dujiangyan, Sichuan 600830, China)

**Abstract: Objective** To establish a HPLC method for determining the related substances of valsartan and amlodipine tablets. **Methods** With octadecylsilane chemically bonded silica as the filler, the mixture of triethylamine (adjusting pH to 2.8 with phosphoric acid)-methanol-acetonitrile was acted as the mobile phase by the gradient elution. The flow rate: 1.0 mL/min. The temperature: 40 ℃. The detection wavelength: 238 nm. The injection volume: 10 μL. **Results** With octadecylsilane chemically bonded silica as the filler, the mixture of triethylamine (adjusting pH to 2.8 with phosphoric acid)-methanol-acetonitrile was acted as the mobile phase by the gradient elution. The flow rate: 1.0 mL/min. The temperature: 40 ℃. The detection wavelength: 238 nm. The injection volume: 10 μL. **Conclusion** This method is simple and accurate with good system suitability and can be used as the test method for the related substances of valsartan and amlodipine tablets.

**Key words:** valsartan and amlodipine tablets; related substances; HPLC

缬沙坦氨氯地平片为瑞士诺华公司(Novartis)产品,商品名:倍博特,规格为缬沙坦 80 mg 和氨氯地平 5 mg,2007 年在美国获批准上市,2009 年在中国获批准进口上市,为抗高血压药。血管紧张素 II AT1 受体拮抗剂(缬沙坦)和钙离子拮抗剂(苯磺酸氨氯地平)是较好的联合抗高血压药物的治疗方案<sup>[1-4]</sup>。缬沙坦氨氯地平片临床疗效优于单方,而且安全性和耐受性较单方好<sup>[5]</sup>,拟开发的产品剂型、规格与原研市售品一致,有着较广阔的市场前景。

目前该药质量标准缬沙坦氨氯地平片进口药品注册标准 JX20080182(以下简称标准<sup>[7]</sup>),在对该药品进行检验时,发现该标准中有关物质检测规定有值得探讨之处,采用标准中色谱条件检测样品,发现其缬沙坦出峰时间在 18 min 左右,而该色谱条件采集时间为 25 min,因此可能导致 25 min 后的杂质峰无法检出,或造成漏判。因此本文对缬沙坦氨氯地平片的有关物质进一步的研究,在试验基础上对检查方法和标准规定提出建议。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** DE54627713 型高效液相色谱仪(美国安捷伦);BP61 型 Sartorius 电子分析天平(上海精科仪器厂);氨氯地平杂质 D(批号:F0I143, USP);缬沙坦杂质 B(批号:H0K089, USP);缬沙坦杂质 C(批号:H1J021, USP),苯磺酸氨

氯地平(批号:100374-200903,中国药品生物制品检定所);缬沙坦(批号:100651-200902,中国药品生物制品检定所);甲醇和乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水,其余试剂为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件** 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;取三乙胺 10 mL 加水至 1 000 mL,用磷酸调节 pH 值至 2.8 作为流动相 A,甲醇作为流动相 B,乙腈作为流动相 C,按表 1 进行梯度洗脱,检测波长为 238 nm;柱温 40 ℃。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流动相 C(%)
0	50	35	15
3	50	35	15
15	40	40	20
25	30	50	20
35	20	40	40
40	50	35	15
45	50	35	15

**1.2.2 溶液的配制** 取本品细粉适量(相当于缬沙坦 80 mg 和氨氯地平 5 mg),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解

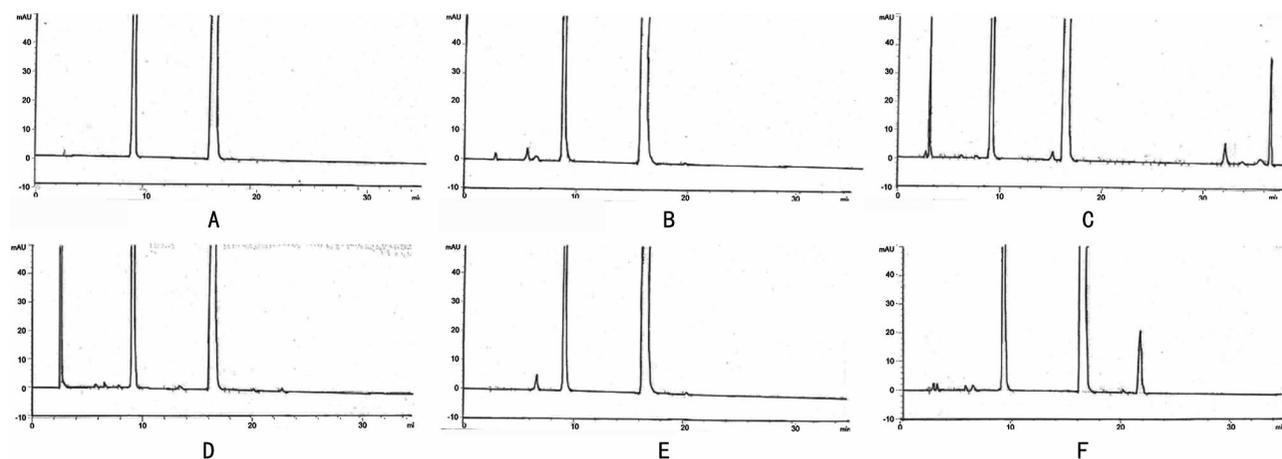
并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液,另取苯磺酸氨氯地平对照品、氨氯地平杂质 D 对照品、缬沙坦杂质 B、缬沙坦杂质 C 以及缬沙坦对照品各适量,精密称定,加流动相溶解并制成每 1 mL 约含苯磺酸氨氯地平 70  $\mu\text{g}$ 、氨氯地平杂质 D 20  $\mu\text{g}$ 、缬沙坦杂质 B 10  $\mu\text{g}$ 、缬沙坦 C 10  $\mu\text{g}$  和缬沙坦 800  $\mu\text{g}$  的混合溶液作为系统适应性溶液。

**1.2.3 波长的选择** 对供试品溶液采用 DAD 在 200~400 nm 全波长扫描,发现本品在 238 nm 波长处其杂质个数及杂质检出量最大,同时各已知杂质在 238 nm 波长处有较大吸收,故选择 238 nm 作为本品有关物质的检测波长。

**1.2.4 系统适用性试验** 精密量取空白溶剂、供试品溶液及对照溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪。

**1.2.5 专属性试验** (1)对照试验:取本品细粉适量,精密称定,加流动相适量超声溶解,放冷,加流动相相稀释制成每 1 mL 含有 1.6 mg 缬沙坦和 0.1 mg 氨氯地平的溶液,摇匀,作为未破坏样品溶液;另取苯磺酸氨氯地平原料适量、缬沙坦原料适量,同法试验。(2)光照试验:取本品细粉适量,置太阳光

下照射 10 h,取样品适量,加流动相溶解稀释定容,摇匀,取续滤液测定;另取苯磺酸氨氯地平原料适量,缬沙坦原料适量,空白辅料适量,同法试验。(3)高温试验:取本品细粉适量,加流动相适量,于 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴中放置 4 h 后,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,取续滤液即得高温破坏样品溶液;另取苯磺酸氨氯地平原料适量,缬沙坦原料适量,空白辅料适量,同法试验。(4)氧化试验:取本品细粉适量,加入双氧水(10%)10 mL,在 60  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min 左右,冷却后用流动相稀释至刻度,摇匀,取续滤液即得氧化破坏样品溶液;另取苯磺酸氨氯地平原料适量,缬沙坦原料适量,空白辅料适量,同法试验。(5)碱破坏试验:取本品细粉适量,精密称定,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL,于 60  $^{\circ}\text{C}$  加热 25 min 后,并用 1 mol/L 盐酸溶液 5 mL 中和后,并用流动相稀释至刻度,摇匀,取续滤液即得碱破坏样品溶液;另取苯磺酸氨氯地平原料适量,缬沙坦原料适量,空白辅料适量,同法试验。(6)酸破坏样品:取本品细粉适量,精密称定,加 1 mol/L 盐酸溶液 5 mL,于 60  $^{\circ}\text{C}$  加热 20 min 后,并用 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL 中和,用流动相稀释至刻度,摇匀,取续滤液即得酸破坏样品溶液;另取苯磺酸氨氯地平原料适量,缬沙坦原料适量,空白辅料适量,同法试验。



A:未破坏;B:光照试验图;C:高温试验;D:氧化试验;E:碱破坏试验;F:酸破坏样品。

图 1 降解试验 HPLC 图

**1.2.6 检测限和定量限测定** 取缬沙坦对照品、苯磺酸氨氯地平对照品、氨氯地平杂质 D 对照品、缬沙坦杂质 B 对照品、缬沙坦杂质 C 对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成较低浓度的溶液,精密量取 10  $\mu\text{L}$ ,分别注入液相色谱仪。

**1.2.7 杂质的线性关系考察及校正因子计算** 取氨氯地平杂质 D、缬沙坦杂质 B、缬沙坦杂质 C 的对照品适量,加流动相配制成一系列浓度的溶液,在有关物质测定条件下进样测定,记录峰面积,以浓度为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,进行线性回归。氨氯地平杂质 D 校正因子计算方法:采用标准曲线法测定氨氯地平杂质 D 对氨氯地平的相对响应因子,即将两回归曲线方程斜率之比即为校正因子。同法计算缬沙坦杂质 B 和缬沙坦杂质 C 校正因子。

**1.2.8 溶液稳定性和精密度的试验** 取供试品溶液、自身对照溶液、氨氯地平杂质 D 对照品溶液、缬沙坦杂质 B 对照品溶液和缬沙坦杂质 C 对照品溶液,测定有关物质溶液稳定性和进样精密度。

**1.2.9 样品测定** 取三批样品,精密称定,研细,分别称取相当于缬沙坦 80 mg 和氨氯地平 5 mg 的粉末,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为自身对照溶液;取系统适应性溶液作为已知杂质对照品溶液,取上述溶液进高效液相色谱仪分析,记录色谱图,采用加校正因子主成分自身对照法计算已知单个杂质,最大单个杂质以及总杂质。

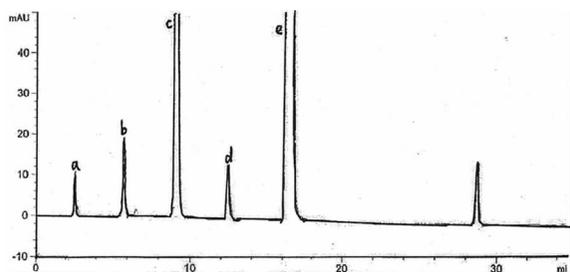
## 2 结果

**2.1 系统适用性试验** 空白溶剂无干扰,系统适用性溶液各相邻杂质峰与供试品主峰分离,符合规定。

**2.2 专属性试验** 结果表明,本品两个主成分原料及制剂在各破坏条件下的降解产物峰均能与氨氯地平及缬沙坦的主峰实现良好的分离,且各已知杂质与未知杂质之间分离度均符合要求。

**2.3 检测限和定量限测定** 分别记录各仪器色谱图,使其 S/

N 约为 3 时的进样量作为检测限,使其 S/N 约为 10 时的进样量作为定量限,结果见表 2。



a: 氨氯地平杂质 D; b: 氨氯地平; c: 缬沙坦杂质 B; d: 缬沙坦; e: 缬沙坦杂质 C。

图 2 系统适应性溶液色谱图

表 2 检测限和定量限测定结果 (ng)

样品	检测限	定量限
氨氯地平	0.59	1.77
缬沙坦	1.01	2.52
氨氯地平杂质 D	1.28	4.08
缬沙坦杂质 B	0.99	2.97
缬沙坦杂质 C	1.05	2.63

**2.4 杂质的线性关系考察及校正因子计算** 缬沙坦回归方程  $Y=27.671X+1.8806$ , 在  $0.10\sim 27.56\ \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,  $r=0.9999$ ; 氨氯地平回归方程:  $Y=23.608X+1.9772$ , 在  $0.08\sim 20.91\ \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,  $r=0.9999$ ; 氨氯地平杂质 D 回归方程:  $Y=11.697X+0.7845$ , 在  $0.13\sim 32.77\ \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,  $r=0.9999$ ; 缬沙坦杂质 B 回归方程:  $Y=28.28X+0.8544$ , 在  $0.09\sim 23.07\ \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,  $r=0.9999$ ; 缬沙坦杂质 C 回归方程:  $Y=20.804X+0.5451$  在  $0.11\sim 26.86\ \mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系,  $r=0.9999$ 。

氨氯地平杂质 D 校正因子为 2.0; 缬沙坦杂质 B 和缬沙坦杂质 C 校正因子为 1.0。

表 3 有关物质检查结果

批次	氨氯地平杂质 D	缬沙坦杂质 B	缬沙坦杂质 C	最大单个杂质	杂质个数	总杂质
S0034	未检出	0.01	未检查	0.02	3	0.04
S0038	未检出	0.01	未检查	0.02	3	0.04
S0042	未检出	0.01	未检查	0.02	3	0.04

**2.5 溶液稳定性和精密度试验** 结果显示溶液在 8 h 内稳定, RSD 为 1.38% ( $n=6$ ); 供试品溶液、自身对照溶液、氨氯地平杂质 D 对照品溶液、缬沙坦杂质 B 对照品溶液和缬沙坦杂

质 C 对照品溶液进样精密度良好, RSD 分别为 1.46%, 0.69%, 0.58%, 0.78%, 0.89% ( $n=6$ )。

**2.6 样品测定** 对三批样品进出测定, 结果如表 3 所示。

3 讨论

缬沙坦氨氯地平片主要含有苯磺酸氨氯地平和缬沙坦两种有效成分, 有关物质含量高低与药品质量和安全性相关, 因此控制制剂有关物质含量十分必要, 该制剂主要有有关物质缬沙坦杂质 B、缬沙坦杂质 C 和氨氯地平杂质 D 等的引入主要是原料和制剂工艺, 建立一套缬沙坦氨氯地平片有关物质检测方法控制缬沙坦氨氯地平片质量, 至关重要。在标准中, 主要对已知杂质缬沙坦杂质 B 和氨氯地平杂质 D 进行了检测, 方法采用外标法, 计算各杂质含量, 采用的操作方法较为复杂, 准确性较低; 而在文献[6]中, 主要对缬沙坦杂质 B 进行了检测和控制, 未对缬沙坦杂质 C 进行研究, 有一定缺陷性。本文采用加校正因子主成分自身对照法来建立一套缬沙坦氨氯地平片有关物质检测方法, 能够准确而有效的测定缬沙坦氨氯地平片中的有关物质, 能够控制该产品质量, 与加校正因子外标法计算杂质含量的方法相比较, 该法测定操作等相对简单便捷, 专属性强, 准确性高。

参考文献:

- [1] 刘晓云, 宋建国. 抗高血压单片复方制剂缬沙坦/氨氯地平临床药理学研究进展[J]. 中国执业药师, 2011, 8(12): 31-36.
- [2] 戴彤, 张抒扬. 缬沙坦/氨氯地平单片复方制剂在高血压治疗中的应用[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(9): 813-815.
- [3] Yuri Karpov, Neelesh Dongre et al. Amlodipine/Valsartan Single-Pill Combination: a Prospective, Observational Evaluation of the Real-Life Safety and Effectiveness in the Routine Treatment of Hypertension[J]. Adv Ther, 2012, 29(2): 134-147.
- [4] Destro M. Efficacy and safety of amlodipine/valsartan compared with amlodipine monotherapy in patients with stage 2 hypertension: a randomized, double-blind, multicenter study: the EX-EFFeCTS Study[J]. J Am Soc Hypertens, 2008, 18(2): 294-302.
- [5] 胡大一. 缬沙坦氨氯地平单片复方制剂对单药治疗血压控制不良的中国高血压患者疗效及安全性研究 II: 原理和设计[J]. 中华高血压杂志, 2010, 18(12): 1116-1119.
- [6] 魏春燕, 沈利, 王延松, 等. HPLC 法测定复方氨氯地平缬沙坦片有关物质[J]. 中国药师, 2011, 14(8): 1142-1144.

(收稿日期: 2013-11-08 修回日期: 2014-01-22)

