

## 反相高效液相色谱法同时测定丁酸氯维地平中 10 种相关杂质

刘艳华<sup>1</sup> 吕狄亚<sup>2</sup> 宋志勇<sup>3</sup> 郑滨兴<sup>1,2</sup>  
张倩倩<sup>1,2</sup> 陆峰<sup>2</sup> 许激扬<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> (中国药科大学 生命科学与技术学院 南京 210009)

<sup>2</sup> (第二军医大学药学院, 上海 200082) <sup>3</sup> (太原理工大学化学化工学院, 太原 030024)

**摘要** 建立反相高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(RP-HPLC)法同时测定丁酸氯维地平原料药中的 10 种杂质。色谱柱为 Symmetry C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液(pH 2.5)-乙腈/甲醇(3:2, V/V) 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速为 1.5 mL/min, 检测波长 220 nm。丁酸氯维地平及其 10 个已知杂质能够达到良好的分离, 且各组分在各自测定浓度范围内与峰面积的线性关系良好( $r \geq 0.9970$ ); 丁酸氯维地平及杂质 1~10 的检出限( $S/N=3$ ) 在 0.15~0.90 mg/L 之间。本方法快速、简便、有效, 可用于丁酸氯维地平原料药的质量控制管理。

**关键词** 丁酸氯维地平; 高效液相色谱; 质量控制

### 1 引言

丁酸氯维地平(Clevipidine butyrate, CLE), 其化学名为 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二甲酸甲基(1-丁酰氧基)甲酯(图 1), 是由英国 AstraZeneca 公司研制开发的一种新型的静脉注射用抗高血压药物, 于 2008 年 8 月经美国 FDA 批准上市<sup>[1]</sup>, 主要用于急性高血压的治疗及术后血压的控制<sup>[2]</sup>。

丁酸氯维地平是一种超短效二氢吡啶类钙离子通道拮抗剂, 可选择性抑制动脉血管平滑肌细胞外的钙离子内流<sup>[3]</sup>, 其起效迅速, 剂量响应呈线性, 半衰期短(1~2 min), 作用结束也迅速, 因此可以通过对剂量的精细调节起到降压效果, 有助于医生在临床使用中根据患者的具体血压监测值采取个体化用药, 还可以避免一次用药过量导致过度降压却无法纠正的危险<sup>[4]</sup>。与硝酸甘油、硝普钠相比, 丁酸氯维地平维持血压更为有效且更加安全<sup>[5,6]</sup>。

丁酸氯维地平原料药在合成及储存过程中有可能产生反应副产物及降解产物, 经分析及自行合成鉴定, 主要有水解杂质(以下简称为杂质 1): 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸单甲酯; 双脞杂质(杂质 2): 二氰基乙基-4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸酯; 重排杂质 1(杂质 3): 6-(2,3-二氯苯基)-2-甲基-4-氧代环己烯-2-甲酸甲酯; 脱羧氧化杂质(杂质 4): 4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-3-吡啶甲酸甲酯; 重排杂质 2(杂质 5): 6-(2,3-二氯苯基)-4-甲基-2-氧代环己烯-3-甲酸甲酯; 双甲酯杂质(杂质 6): 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸二甲酯; 脱羧杂质(杂质 7): 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3-吡啶甲酸甲酯; 氧化杂质(杂质 8): 4-(2,3-二氯苯基)-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸甲基(1-氧代丁氧基)甲基酯; 乙酯杂质(杂质 9): 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸乙基(1-氧代丁氧基)甲基酯; 双丁酯杂质(杂质 10): 4-(2,3-二氯苯基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸双(1-氧代丁氧基)甲酯, 各种杂质的结构见图 1。

目前, 对丁酸氯维地平的安全性考察及血/尿样处理及含量测定方法的报道较多<sup>[7,8]</sup>, 主要集中在血药浓度及生物利用度上, 而关于有关物质测定方法的报道并不多见, 袁慧雅等<sup>[9]</sup>仅对丁酸氯维地平及其中间体(杂质 1)进行了研究, 并未对其它有关物质进行分析, 不能全面分析该药物的质量。本研

2014-08-30 收稿; 2014-10-30 接受

本文系“重大新药创新”科技重大专项资助项目(No. 2012ZX09020101-001)

\* E-mail: jiyangx@126.com

究建立的 RP-HPLC 测定有关物质的方法,能够很好地分离丁酸氯维地平及各个杂质,且方法准确可靠,耐用性良好,可简便、快速地测定丁酸氯维地平中的 10 种有关物质。

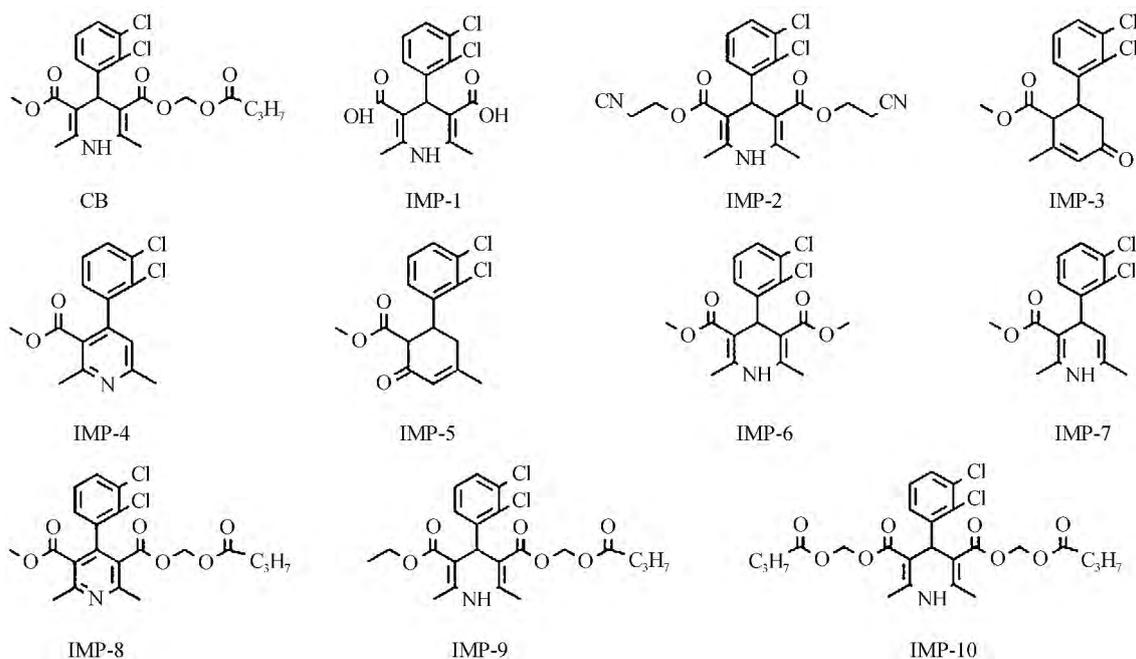


图 1 丁酸氯维地平 (CB) 及各杂质 (IMP) 结构

Fig. 1 Structures of clevidipine butyrate (CB) and impurities (IMP)

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)配 DAD 检测器;电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);pH 计(丹佛仪器有限公司);KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);涡旋混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)。

杂质 1、杂质 2、杂质 4、杂质 6、杂质 7、杂质 8、杂质 9、杂质 10 均为自制,杂质 3 和杂质 5 为深圳市倍索特科技有限公司提供,批号分别为 20131226-3、20131226-5;经上海医药工业研究院鉴定,杂质 1~10 纯度分别为 97.61%、94.34%、85.05%、99.17%、98.48%、99.56%、90.54%、99.25%、98.48% 和 98.61%;丁酸氯维地平对照品为自制,纯度为 99.81%;各自制杂质对照品及丁酸氯维地平对照品均按规定标化。

无水  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  (分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水;乙腈、甲醇(HPLC 级,Merck 公司)。

### 2.2 溶液配制

**2.2.1 系统适用性溶液** 准确称取各杂质标准品,加 50% 乙腈溶解并定容,摇匀,配制成 2000 mg/L 单标储备液;准确移取各标准储备液 0.5 mL 混合于 10 mL 量瓶中,50% 乙腈定容,配制成 100 mg/L 混合标准工作液。另准确称取丁酸氯维地平对照品 40 mg,置 10 mL 量瓶中,加入 0.4 mL 混合标准工作液,加入 50% 乙腈溶解并定容,即得每 1 mL 含丁酸氯维地平对照品 4.0 mg,各杂质 4.0  $\mu\text{g}$  的适用性溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 准确称取本品适量,加 50% 乙腈溶解并定容,配制成每 1 mL 含丁酸氯维地平 4.0 mg 的供试品溶液。

**2.2.3 对照品溶液** 准确称取适量丁酸氯维地平对照品,用 50% 乙腈溶解并定容,配制 200 mg/L 对照品储备液,准确移取储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 50% 乙腈定容,制成 20.0 mg/L 对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 进样体积: 20 μL; 柱温: 35 °C; 流动相 A 为 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调至 pH 2.5), B 为乙腈-甲醇 (3: 2, V/V) 梯度洗脱: 0.0 ~ 14.0 min, 50% ~ 60% B; 14.0 ~ 42.0 min, 60% B; 42.0 ~ 44.0 min, 60% ~ 70% B; 44.0 ~ 63.0 min, 70% B; 63.0 ~ 65.0 min, 70% ~ 50% B。检测波长: 220 nm; 流速: 1.5 mL/min。

### 2.4 强制破坏处理

分别取本品 40 mg 于 10 mL 容量瓶中, 经高温、光照、强酸、强碱和氧化破坏。各破坏条件如下: (1) 高温破坏: 120 °C 保温 24 h; (2) 光照破坏: (4500 ± 500) lx 光照 20 d; (3) 强酸破坏: 加入 1 mL 2 mol/L HCl, 70 °C 保温 4 h; (4) 强碱破坏: 加入 1 mL 1 mol/L NaOH, 室温放置 1 h; (5) 氧化破坏: 加入 30% (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL, 70 °C 保温 4 h。将破坏后样品加 50% 乙腈溶解并定容 (酸、碱破坏样品需先分别中和) 即得。

## 3 结果与讨论

### 3.1 杂质来源解析

根据丁酸氯维地平合成路线及其破坏性实验结果, 对各杂质的来源进行分析, 见图 2。

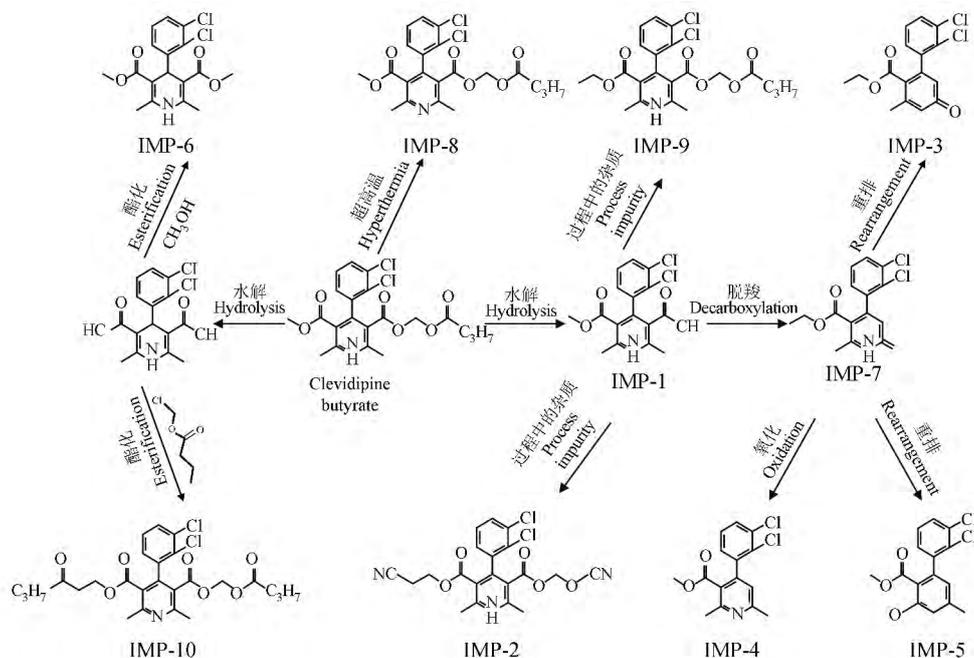


图2 各杂质降解途径解析

Fig. 2 Showing potential impurities arising from side reaction and degrading

### 3.2 高效液相色谱条件的优化

本研究系统地优化了检测波长、色谱柱、流动相、流速及柱温等参数, 结果见表 1。对丁酸氯维地平及其 10 种杂质实现了有效分离 (各杂质间分离度 ≥ 1.5; 杂质与主峰间分离度 ≥ 2.0) 并对本方法进行了方法学验证, 为丁酸氯维地平原料药的有关物质测定提供了较为便捷的分析方法。

**3.2.1 紫外波长的考察** 由各物质的紫外吸收特性可知, 杂质 4、杂质 7、杂质 8 仅在末端有吸收, 考虑基线稳定, 选用 220 nm 为检测波长, 在此检测波长下, 主成分及其它杂质也有良好吸收。

**3.2.2 色谱柱的考察** 分别考察了 LP-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 3.0 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent SB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、XDB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 及 ODS-2 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 对适用性溶液中各物质峰之间分离度的影响, 结果表明, Waters Symmetry C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 能够很好地满足分离要求。

表1 方法优化结果

Table 1 Results of method optimization

可接收标准 Acceptable standard	参数 Parameter	具体变化 Specific changes	各峰分离度 Peak separation*									
			1&2	2&3	3&4	4&5	5&6	6&7	7&8	8& CLE	CLE &9	9&10
各成分峰的分 离度符合规定 Peak separation compliance	水相浓度 Concentration of aqueous phase	0.02 mol/L	2.08	13.54	2.61	2.56	3.30	7.76	1.22	2.21	11.30	10.31
		0.04 mol/L	2.32	15.26	3.92	1.61	3.46	9.15	1.37	1.99	11.74	10.38
		0.05 mol/L	2.44	15.91	3.66	1.58	3.75	9.46	1.55	1.89	11.57	10.62
	水相 pH 值 pH of aqueous phase	2.0	2.09	9.42	4.97	5.34	3.59	8.65	1.25	2.21	8.71	10.28
		2.5	2.35	15.26	3.75	1.85	3.61	9.32	1.52	2.12	12.97	9.21
		3.0	2.34	14.27	5.13	0.71	2.47	18.03	0	1.96	6.81	10.34
	流速 Flow rate	1.1 mL/min	2.28	15.26	3.69	1.79	3.51	9.11	1.24	2.17	11.82	10.78
		1.3 mL/min	2.37	15.17	3.38	2.05	3.52	8.93	1.28	2.18	11.65	10.28
		1.5 mL/min	2.32	15.24	2.94	2.61	3.52	8.94	1.52	2.17	11.95	10.97
	柱温 Column temperature	30 °C	2.67	15.03	2.83	2.93	3.47	8.22	1.04	2.74	11.81	10.95
		35 °C	2.27	14.48	3.47	1.84	3.33	8.68	1.29	1.97	11.26	10.11
		40 °C	2.05	14.75	4.19	0.94	3.24	9.82	2.61	0	11.26	9.85
	最佳条件 Optimum condition	—	3.45	20.02	4.12	2.32	4.14	9.01	1.64	2.07	12.51	9.16

\* : 1~10. 杂质 (Impurity 1~10); CLE. 丁酸氯维地平 (Clevidipine butyrate)。

**3.2.3 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液的浓度及其 pH 的考察** 使用 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液作为流动相的水相,并对其浓度(0.02, 0.04 和 0.05 mol/L)及 pH 值(2.0, 2.5 和 3.0)进行优化。结果表明,随着 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度增加,杂质 7 与杂质 8 的分离度增大,且当 pH=2.5 时,各成分间的分离度最佳,故选择 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液(pH 2.5)作为水相。

**3.2.4 流速的考察** 考察流速为 1.1, 1.3 和 1.5 mL/min 时,各峰的分离情况。实验表明,随着流速增大,杂质 7 与杂质 8 及杂质 8 与主峰之间分离度均有所改善,并考虑到柱压及色谱柱的耐用性,并没有继续升高流速,最终选择 1.5 mL/min 为最佳流速。

**3.2.5 柱温的考察** 在 30~40 °C 进行分析,随着温度升高,杂质 7 与杂质 8 的分离度增大,而杂质 8 与主峰的分离度减小;结果表明,在 35 °C 时,分离度良好。

**3.2.6 溶剂的考察** 选择流动相作为溶剂,丁酸氯维地平及各杂质的溶解性较差,供试品溶液在 4 °C 放置数小时后会析出固体;选择乙腈作为溶剂,杂质 1 和杂质 2 的色谱峰对称性差,对称因子约为 2.0;选择 50% 乙腈作为溶剂,各母液在 4 °C 放置数天均未见析出固体;故最终确定使用 50% 乙腈作为溶剂。

### 3.3 专属性实验

**3.3.1 杂质分离度及空白溶剂实验** 取 2.2 节系统适用性溶液、供试品溶液、对照品溶液及空白溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,按出峰前后,对杂质命名,分别为杂质 1~10,各自保留时间分别为 7.657, 8.485, 13.962, 15.316, 16.018, 17.527, 26.385, 28.232, 41.299 和 48.341 min;丁酸氯维地平出峰时间为 29.911 min;各峰之间均能达到良好分离(各杂质峰之间分离度≥1.5,杂质 8 与主峰分离度≥2.0);空白溶剂对有关物质的测定无干扰(图 3)。

**3.3.2 强制降解实验** 将本品经高温、光照、酸、碱和氧化破坏,结果表明,本品在高温及光照环境中较稳定,基本无降解;对碱性环境极不稳定,主要的降解产物为杂质 1 和杂质 7。在各降解条件下,丁酸氯维地平与各杂质峰及降解产物均能达到良好分离,方法专属性良好(图 4)。并且,在强制降解条件下,杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 为丁酸氯维地平主要的降解杂质,对以上 4 种杂质进行重点分析。

### 3.4 线性范围 检出限和定量限

称取各杂质及丁酸氯维地平对照品适量,配制成不同浓度的线性溶液,按 2.3 节操作,测定并考察各成分的线性关系及相对校正因子。以进样浓度(mg/L)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归曲线分析(表 2)。由表 2 可知,杂质 2 与杂质 9 相对于主成分的校正因子在 0.9~1.1 之间,可采用不加校正因子的主成分外标法测定该物质;对于其它杂质,其校正因子均超出此范围,因此选用加校正因子的主成分外标法进行研究<sup>[10]</sup>。

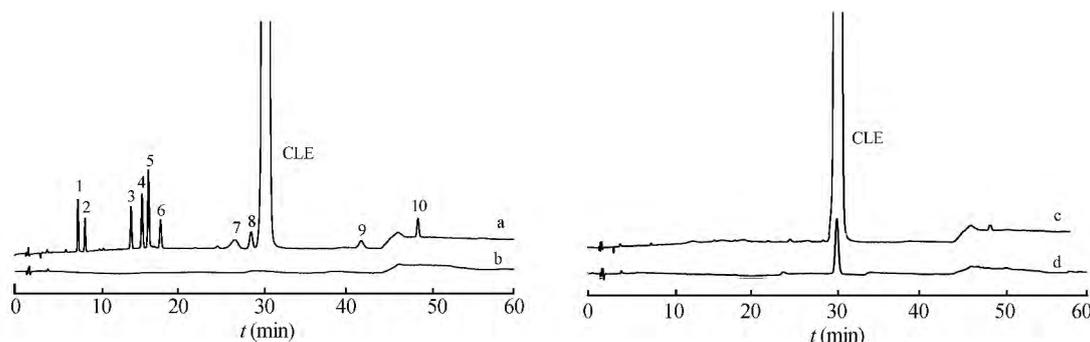


图 3 系统适用性溶液 ( a )、空白溶剂 ( b )、供试品溶液 ( c ) 和对照品溶液 ( d ) 的色谱图

Fig.3 Chromatograms of system suitability solution ( a ) , blank solvent ( b ) , sample solution ( c ) and reference solution ( d )

1~10. 杂质 1~10( IMP 1-10); CLE. 丁酸氯维地平( Clevidipine butyrate)。

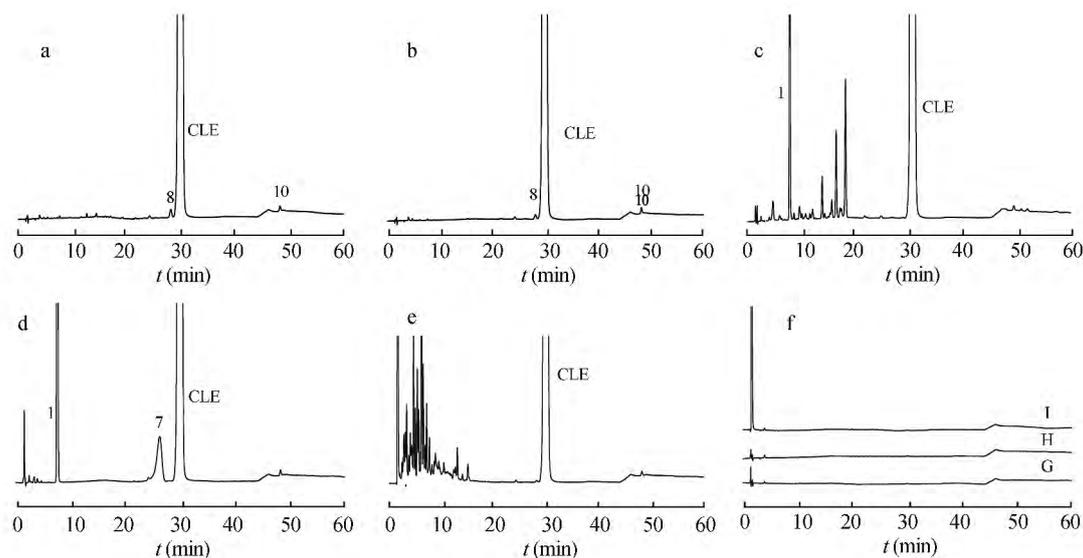


图 4 高温 ( a )、光照 ( b )、酸 ( c )、碱 ( d )、氧化 ( e ) 破坏及酸空白 ( G )、碱空白 ( H ) 和氧化空白 ( I ) 的色谱图

Fig.4 Chromatograms of heat ( a ) , light ( b ) , acid ( c ) , alkali ( d ) , oxidation ( e ) damage and acid blank ( G ) , base blank ( H ) and oxidation blank ( I )

1. 杂质 1 ( IMP-1); 7. 杂质 7 ( IMP-7); 8. 杂质 8 ( IMP-8); 10. 杂质 10 ( IMP-10); CLE. 丁酸氯维地平 ( Clevidipine butyrate)。

表 2 线性范围、回归方程与校正因子

Table 2 Linear range , regression equation and correction factor

组分名 Component name	线性范围 Linear range ( mg/L)	回归方程 Regression equation	线性相关系数 Correlation coefficient ( r )	校正因子 Correction factor	定量限 Limits of quantitation ( mg/L)	检出限 Limits of detection ( mg/L)
杂质 1 Impurity 1	0.80 ~ 5.97	$y = 10.613x + 0.074$	0.9999	1.34	0.80	0.24
杂质 2 Impurity 2	0.77 ~ 5.75	$y = 8.0731x + 0.1211$	0.9994	1.02	0.77	0.23
杂质 3 Impurity 3	0.51 ~ 5.10	$y = 16.149x - 0.2963$	0.9999	2.04	0.51	0.15
杂质 4 Impurity 4	0.60 ~ 5.98	$y = 16.661x - 0.0204$	0.9999	2.11	0.60	0.18
杂质 5 Impurity 5	0.59 ~ 5.91	$y = 28.113x - 3.3416$	0.9995	3.56	0.59	0.18
杂质 6 Impurity 6	0.90 ~ 6.00	$y = 10.087x + 2.9284$	0.9978	1.28	0.90	0.27
杂质 7 Impurity 7	2.73 ~ 7.28	$y = 12.685x - 5.5314$	0.9988	1.60	2.73	0.82
杂质 8 Impurity 8	1.49 ~ 5.96	$y = 10.438x - 2.2534$	0.9995	1.32	1.49	0.45
杂质 9 Impurity 9	2.95 ~ 17.73	$y = 7.5067x - 0.1611$	0.9997	0.95	2.95	0.89
杂质 10 Impurity 10	1.49 ~ 5.95	$y = 5.8855x + 0.7505$	0.9975	0.74	1.49	0.45
丁酸氯维地平 Clevidipine butyrate	3.01 ~ 24.05	$y = 7.9046x - 1.9199$	0.9999	—	3.01	0.90

以信噪比( $S/N=10$ ) 计算方法的定量限 以信噪比( $S/N=3$ ) 计算方法的检出限 结果符合要求(表 2)。

### 3.5 精密度实验

平行配制 6 份供试品溶液 按限度加入杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 按 2.3 节方法检测 记录色谱图 计算各杂质的 RSD 值。杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 的重复性 RSD 值分别为 0.6% , 2.3% , 1.3% 和 1.1% ( $n=6$ ) ; 结果表明 本方法重复性良好( $RSD \leq 10.0\%$ )。

连续两天 由两名操作人员 各平行配制 6 份样品溶液 按限度加入杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 按 2.3 节检测 记录色谱图 并计算各杂质的 RSD 值( $RSD \leq 15.0\%$ )。杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 的日间精密度 RSD 分别为 2.6% , 2.2% , 3.1% , 1.4% ( $n=12$ ) ; 结果表明 本方法的日间精密度良好。

### 3.6 溶液稳定性实验

取丁酸氯维地平对照品溶液及加入限度有关物质的样品溶液 分别在 0 , 5 , 10 , 17 , 24 h 按 2.3 节测定 每个时间点各测定 2 次。结果表明 对照品溶液峰面积 RSD 为 1.6% ( $n=10$ ) ; 杂质 1、杂质 7、杂质 8 及杂质 10 的峰面积 RSD 分别为 1.6% , 2.7% , 1.8% 及 3.1% ( $n=10$ ) ; 结果表明 对照品溶液及各杂质在室温放置 24 h 内稳定性良好( $RSD \leq 5.0\%$ )。

### 3.7 准确度实验

采用加标回收实验 制备加标浓度分别为限度浓度 50% , 100% 和 150% 水平的供试品溶液 每个水平平行制备 3 份。计算所得的回收率应为 80% ~ 120% ,  $RSD \leq 10.0\%$ 。结果表明 杂质 1 的回收率为 98.75% ~ 103.76% , 平均回收率为 101.06% ,  $RSD$  为 0.9% ( $n=9$ ) ; 杂质 7 的回收率为 96.26% ~ 108.74% , 平均回收率为 102.8% ,  $RSD$  为 4.9% ( $n=9$ ) ; 杂质 8 的回收率为 94.3% ~ 106.00% 范围内 , 平均回收率为 99.6% ,  $RSD$  为 3.3% ( $n=9$ ) ; 杂质 10 的回收率在 100.5% ~ 113.3% 范围内 , 平均回收率为 106.6% ,  $RSD$  为 3.1% ( $n=9$ )。结果表明 本方法的准确度良好。

### 3.8 耐用性实验

分别考察了不同批号色谱柱、流动相配比、流速和柱温的微小波动对系统适用性溶液中各峰分离度的影响。结果表明 上述条件微小变化及色谱柱批号变化后 各物质峰之间仍能达到基线分离 杂质峰之间分离度均不小于 1.5 杂质 8 与丁酸氯维地平之间分离度不小于 2.0 说明本方法的耐用性良好。

### 3.9 样品分析

取 3 批供试品 按 2.2 节制备供试品溶液 按 2.3 节测定 结果见表 3。

表 3 有关物质测定结果 (%)

Table 3 Determination results of related substances (%)

批号 Lot No.	杂质 1 Impurity 1	杂质 2 Impurity 2	杂质 5 Impurity 5	杂质 6 Impurity 6	其它最大单个杂质 Other largest impurity	总杂质 Total impurity
20140310-1-3j	0.007	—	0.040	—	0.018	0.065
20140311-1-3j	0.009	—	0.037	—	0.015	0.061
20140312-1-3j	—	—	0.038	—	0.018	0.05

综上所述 本研究建立了一种简单、快速、有效的 RP-HPLC 分析方法 对丁酸氯维地平进行有关物质的分析 并进行方法学验证<sup>[11]</sup> 结果表明 本方法能够使丁酸氯维地平及其 10 种杂质均达到良好的基线分离 且方法灵敏度、耐用性均良好 可以很好地适用于测定丁酸氯维地平中的有关物质。

## References

- 1 LI Ling , BI Kai-shun , HU Xin. *Chinese Journal of New Drugs* , **2010** , 19( 12) : 1003 - 1006  
李 灵 , 毕开顺 , 胡 欣. 新药评述 , **2010** , 19( 12) : 1003 - 1006
- 2 Michael S L , Cran M , John G T. *Augoustides* , M D , Faha F. *J. Cardiothor. Vasc. An.* , **2012** , 26( 3) : 526 - 531
- 3 Ndefo U A , Erowele G I , Eaiasah R , Green W. *Am. J. Health-Syst Pharm.* , **2010** , 67( 1) : 351 - 360
- 4 Awad A S , Goldberg M E. *Vascular Health and Risk Management* , **2010** ( 6) : 457 - 464

- 5 Aronson S , Dyke C M , Stierer K A , Levy J H , Cheung A T , Lumb P D , Kereiakes D J , Neman M F. *Anesth. & Analg.* , **2009** ( 5) : 34 - 46  
Aronson S , Dyke C M , Stierer K A , Levy J H , Cheung A T , Lumb P D , Kereiakes D J , Neman M F. 麻醉与镇痛( 中文版) , **2009** , ( 5) : 34 - 46
- 6 Pollack C V , Varon J , Garrison N A , Ebrahimi R , Dunbar L , W. Peacock F. *Ann. Emerg. Med.* , **2009** , 53( 3) : 329 - 338
- 7 Ericsson H , Tholander B , Regardh C G. *Eur. J. Pharm. Sci.* , **1999** , ( 8) : 29 - 37
- 8 Fakt C , Stenhoff H. *J. Chromatogr. B* , **1999** , ( 723) : 211 - 219
- 9 YUAN Hui-Ya , DENG Ya-Lin , YU Xin , WU Yu-Yu , CHEN Xiao-Hui. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* , **2014** , 31( 5) : 369 - 374  
袁慧雅 , 邓娅琳 , 于鑫 , 邬玉玉 , 陈晓辉. 沈阳药科大学学报 , **2014** , 31( 5) : 369 - 374
- 10 ChP. 2010. Vol II : Appendix X IX F  
中国药典 , 2010 版第二部: 附录 X IX F
- 11 ChP. 2010. Vol II : Appendix X IX A  
中国药典 , 2010 版第二部: 附录 X IX A

## Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Ten Process-related Impurities of Clevidipine Butyrate

LIU Yan-Hua<sup>1</sup> , LÜ Di-Ya<sup>2</sup> , SONG Zhi-Yong<sup>3</sup> ,

ZHENG Bin-Xing<sup>1, 2</sup> , ZHANG Qian-Qian<sup>1, 2</sup> , LU Feng<sup>2</sup> , XU Ji-Yang<sup>\* 1</sup>

<sup>1</sup>( School of Life Science and Technology , China Pharmaceutical University , Nanjing 210009 , China)

<sup>2</sup>( School of Pharmacy , the Second Military Medical University , Shanghai 200082 , China)

<sup>3</sup>( Institute of Coal Chemical Engineering , Taiyuan University of Technology , Taiyuan 030024 , China)

**Abstract** A reversed phase high performance liquid chromatographic ( RP-HPLC) method coupled with DAD was developed for the simultaneous determination of ten process-related impurities ( PRI) of Clevidipin Butyrate ( CLE) . The chromatographic separation was carried out on a Waters symmetry C<sub>18</sub> column ( 250 mm × 4.6 mm , 5 μm) and all components were monitored at 220 nm. The mobile phase consisted of 0.05 mol/L sodium dihydrogen phosphate with pH 2.5 adjusted by phosphoric acid ( MPA) and a mixed solution of acetonitrile and methanol ( 3: 2 , V/V) . Flow rate was kept at 1.5 mL/min , the injection volume was 20 μL for all injections , and the column temperature maintained at 35 °C. The method was further validated with respect to selectivity , linearity , limit of detection ( LOD) , limit of quantitation ( LOQ) , precision and accuracy. A good linearity was obtained in the measured concentration ranges for CLE and ten impurities (  $r \geq 0.9970$  ) , and the detection limits were 0.90 , 0.24 , 0.23 , 0.15 , 0.18 , 0.18 , 0.27 , 0.82 , 0.45 , 0.89 and 0.45 mg/L for CLE and ten impurities respectively.

**Keywords** Clevidipin Butyrate; High performance liquid chromatography; Quality control

( Received 30 August 2014; accepted 30 October 2014)