

HPLC – ECD 测定重酒石酸去甲肾上腺素的有关物质

金薇¹, 彭兴盛^{1,2}, 陈阳¹, 杨永健¹

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 第二军医大学, 上海 200433)

摘要 目的:建立重酒石酸去甲肾上腺素有关物质的高效液相色谱 – 电化学检测方法(HPLC – ECD)。**方法:**采用 TSK C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 0.05% 庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节 pH 至 2.2) – 乙腈(925:75)为流动相, 玻碳圆盘电极为工作电极, 银 – 氯化银电极为参比电极, 工作电位为 +0.6 V。**结果:**去甲肾上腺素、肾上腺素、去甲肾上腺酮、多巴胺和 2 – 氯 – 1 – (3,4 – 二羟基苯基)乙酮均在 0.05 ~ 5 μg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数分别为 0.9998, 0.9999, 1.0000, 0.9999, 0.9994 (n = 7); 检测限分别为 0.07, 0.07, 0.08, 0.1 和 0.2 ng (S/N ≥ 3)。4 种有关物质的平均加样回收率为 97.2%, 100.4%, 98.2%, 103.1%; RSD 为 1.6%, 1.5%, 1.3%, 2.8% (n = 6)。**结论:**采用高效液相色谱 – 电化学检测法测定重酒石酸去甲肾上腺素有关物质, 方法灵敏度高, 选择性强, 重现性好, 能够用于重酒石酸去甲肾上腺素的质量控制。

关键词:肾上腺素激动药; 重酒石酸去甲肾上腺素; 有关物质; 高效液相色谱; 电化学安培检测

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 – 1793(2011)08 – 1485 – 04

HPLC – ECD determination of related substances of norepinephrine bitartrate

JIN Wei¹, PENG Xing – sheng^{1,2}, Chen Yang¹, YANG Yong – jian¹

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 2. The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC – electrochemical detection (HPLC – ECD) method for the determination of norepinephrine bitartrate and its related substances. **Method:** An ODS column (TSK C₁₈, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with a mixture of 0.05% sodium heptanesulfonate solution (adjust to pH 2.2 with phosphoric acid) – acetonitrile (925:75) as mobile phase. A glassy carbon disc electrode was used as the working electrode at the potential of +0.6 V. **Results:** The calibration curves of norepinephrine, epinephrine, noradrenaline, dopamine, 2 – chloro – 1 – (3,4 – dihydroxyphenyl) ethanone were linear in the concentration range of 0.05 – 5 μg · mL⁻¹. The detection limits were 0.07, 0.07, 0.08, 0.1 and 0.2 ng, respectively. The average recovery of epinephrine, noradrenaline, dopamine, 2 – chloro – 1 – (3,4 – dihydroxyphenyl) ethanone were 97.2%, 100.4%, 98.2% and 103.1% with RSD of 1.6%, 1.5%, 1.3% and 2.8% (n = 6). **Conclusion:** The proposed method shows high sensitivity, repeatability and stability. It can be employed for the quality control of related substances of norepinephrine bitartrate. **Key words:** adrenergic agonist; norepinephrine bitartrate; related substances; HPLC; electrochemical detection (ECD)

去甲肾上腺素为肾上腺素受体激动药, 常用重酒石酸盐。主要兴奋 α 受体, 可收缩血管, 升高血压, 主要用于休克早期及小动脉扩张、外周阻力降低所致血压下降, 如因麻醉引起的休克、中毒性休克、心源性休克等。还可用于上消化道止血。

中国药典 2010 年版收载的重酒石酸去甲肾上腺素新增了 HPLC – UV 法以梯度洗脱的方式采用自身对照对去甲肾上腺酮和其他杂质进行控制^[1]。

EP 6.0 收载的本品原料项下采用 HPLC – UV 法, 以梯度洗脱的方式对各种已知杂质和未知杂质进行控制^[2]。均规定限度为单个杂质不得过 0.1%, 杂质总量不得过 0.3%。

本品为儿茶酚胺类药物, 其合成和降解过程中可能存在的主要已知杂质有肾上腺素、2 – 氨基 – 1 – (3,4 – 二羟基苯基)乙酮(去甲肾上腺酮)、多巴胺和 2 – 氯 – 1 – (3,4 – 二羟基苯基)乙酮(氯乙酰

第一作者 Tel: 13601843404; E – mail: kingweifh@yahoo.com.cn

儿茶酚), 为邻苯二酚结构, 均具有一定的电化学活性。对于有电化学活性的物质, 电化学检测灵敏度要比紫外检测灵敏度高很多。文献有报道采用 HPLC-ECD 对生物样本中的儿茶酚胺类物质进行测定^[2-3], 但采用 HPLC-ECD 对有关物质进行控制则鲜有研究。为满足药物中微量有关物质的检测灵敏度高、检测限低的要求, 拟采用 HPLC-ECD 方法对去甲肾上腺素的有关物质进行分离测定, 掌握原料药中各有关物质的真实含量, 与紫外检测相互补充。

1 仪器与试药

Waters 2695/2465 型高效液相色谱仪, 包括 2695 分离系统(真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱), 2465 电化学检测器, Empower 化学工作站(Waters 公司)。三电极工作系统: 玻碳圆盘工作电极, 银-氯化银参比电极, 铂丝对电极。KU-DOS SK2510 LHC 超声波清洗仪。

重酒石酸去甲肾上腺素对照品(批号 N⁰ 4a), 2-氯-1-(3,4-二羟基苯基)乙酮对照品(批号 N⁰ 1) 由欧洲药典会提供, 肾上腺素原料(批号 061105), 去甲肾上腺酮中间体(批号 061007) 由武汉武药制药有限公司提供。重酒石酸去甲肾上腺素原料(批号 071203, 071204, 071205, C11-L080310, C11-L080301, C11-L080307) 为武汉武药制药有限公司提供。磷酸为优级纯, 庚烷磺酸钠为东京化成离子对试剂, 水为经 Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(Millipore) 滤过去离子水, 乙腈为色谱纯。流动相使用前用 0.45 μm 滤膜过滤。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

供试品溶液: 取本品 50 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, 即得。

对照品储备液: 取重酒石酸去甲肾上腺素、肾上腺素、去甲肾上腺酮、多巴胺和 2-氯-1-(3,4-二羟基苯基)乙酮各适量, 精密称定, 用流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别含 1 mg 的溶液, 摇匀。精密量取适量, 用流动相定量稀释制成每 1 mL 中分别含 10 μg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件

采用 TSK ODS(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以 0.05% 庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节 pH 至 2.2) - 乙腈(925:75) 为流动相; 流速为 1.5 mL $\cdot$

min⁻¹; 采用电化学安培检测器, 以玻碳圆盘电极为工作电极, 以银-氯化银电极参比电极, 工作电位 + 0.6 V; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

试验前, 对玻碳圆盘电极用氧化铝混悬液进行抛光, 再用乙醇和水超声(250 W, 59 kHz) 清洗, 以达到高的检测灵敏度和重复性。

在上述色谱条件下, 分别取对照品溶液(取对照品储备液用流动相定量稀释制成每 1 mL 中分别含 0.5 μg 的溶液) 和供试品溶液进样, 色谱图见图 2。结果表明, 各杂质分离完全, 各组分的理论板数均大于 9000, 空白溶液无干扰。见图 1。

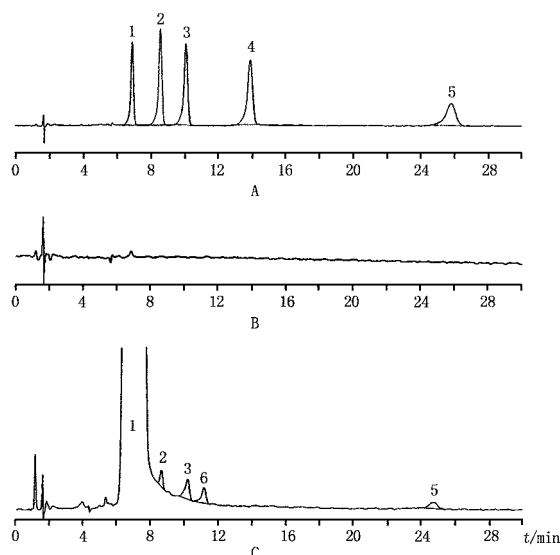


图1 对照品溶液(A)、流动相(B)和供试品溶液(C)的 HPLC-ECD 色谱图

Fig 1 HPLC-ECD chromatograms of reference solution(A), mobile phase(B) and test solution(C)

1. 去甲肾上腺素(norepinephrine) 2. 肾上腺素(epinephrine) 3. 去甲肾上腺酮(noradrenalone) 4. 多巴胺(dopamine) 5. 2-氯-1-(3,4-二羟基苯基)乙酮[2-chloro-1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanone] 6. 其他杂质(other impurity)

2.3 线性试验

分别精密量取混合对照品储备液适量, 加流动相稀释各化合物浓度均为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 依法进样测定。以峰面积 A 为纵坐标, 对照品浓度 C 为横坐标, 进行线性回归。取浓度均为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 分别稀释不同倍数后依法进样测定, 根据信噪比分别计算其检测限。所得回归方程、线性范围、定量限($S/N=10$) 及检测限($S/N=3$) 见表 1。

表1 5个化合物的回归方程、线性范围、定量限及检测限

Tab1 Regression equation, correlation coefficients, linearity ranges and limit of detection for 5 compounds

化合物 (compound)	回归方程 (egression equation)	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	r	定量限 (LOQ) /ng	检测限 (LOD) /ng
去甲肾上腺素 (norepinephrine)	$A = 1.06 \times 10^6 C + 1.10 \times 10^4$	0.06 ~ 6.0	0.9998	0.2	0.07
肾上腺素 (epinephrine)	$A = 1.79 \times 10^6 C + 3.59 \times 10^3$	0.05 ~ 5.2	0.9999	0.2	0.07
去甲肾上腺酮 (noradrenalone)	$A = 1.87 \times 10^6 C + 3.75 \times 10^4$	0.05 ~ 4.9	1.0000	0.2	0.08
多巴胺 (dopamine)	$A = 2.00 \times 10^6 C - 1.89 \times 10^4$	0.05 ~ 5.2	0.9999	0.3	0.1
2-氯-1-(3,4-二羟基苯基)乙酮 [2-chloro-1-(3,4-dihydroxy-phenyl) ethanone]	$A = 1.10 \times 10^6 C - 9.02 \times 10^4$	0.05 ~ 5.4	0.9994	0.6	0.2

在相同色谱条件下,采用 UV 检测(检测波长 280 nm),5 个化合物的检测限分别为 6,6,2,8,5 ng,可见相同条件下 ECD 检测的灵敏度是 UV 检测的 30~80 倍。

2.4 精密度试验 同上配制含主药和各化合物分别为 $1.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以及 $1.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,连续进样 6 次,结果峰面积的 RSD 分别为 0.4%,0.4%,0.5%,0.5%,2.4%。另外分别于 24 h 内测定,得日内 RSD 分别为 1.8%,2.7%,0.5%,0.6%,2.9% ($n=11$)。

2.5 破坏试验 取样品分别进行酸、碱、氧化、高温、光照等强破坏试验后配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液后进样,考察方法的专属性。结果本品在上述强破坏条件下均有不同程度的降解产物生成,且均能与去甲肾上腺素主峰和各已知杂质峰达到完全分离,表明方法专属性良好。光照破坏后样品色谱图中杂质峰无明显增加,样品经碱破坏后不稳定,溶液显深棕色。但在加热条件下杂质峰面积增加明显(图2)。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液,每间隔一定时间分别进样测定,以杂质峰面积的变化考察溶液的稳定性,结果 13 h 内杂质峰面积 RSD 分别为 3.0%,3.3%,2.4%,4.6% ($n=5$)。表明,13 h 内供试品溶液中杂质峰面积无明显变化,溶液稳定性良好。

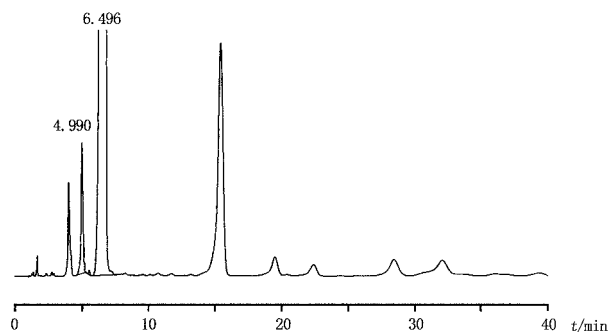


图2 高温破坏样品

Fig 2 Chromatogram of heated test solution

2.7 回收率试验 精密称取已知杂质含量的供试品约 50 mg,分别置 50 mL 量瓶中,精密加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液 5 mL,加流动相定容,摇匀,配制相当于杂质限度 0.1% 的溶液 3 份,分别进样 2 次平行测定,结果平均回收率分别为 97.2%,100.4%,98.2%,103.1%; RSD 为 1.6%,1.5%,1.3%,2.8% ($n=6$)。

2.8 样品测定 取供试品溶液进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算 4 种已知杂质,按去甲肾上腺素的校正因子计算其他未知杂质的量,结果见表 2。而相同条件下在 UV280 nm 下未能检出有关物质;且当供试品溶液浓度提高为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,仅有 1~3 号样品检出去甲肾上腺酮,含量均为 0.01%,未检出其他杂质。

表2 有关物质测定结果(%, $n=3$)

Tab 2 Results of related substances

样品编号 (No.)	肾上腺素 (epinephrine)	去甲肾上腺酮 (noradrenalone)	多巴胺 (dopamine)	2-氯-1-(3,4-二羟基苯基)乙酮 [2-chloro-1-(3,4-dihydroxy phenyl) ethanone]	单个最大未知杂质 (other impurity)
1	0.005	0.007	0.001	0.006	0.001
2	0.003	0.003	0.001	0.007	0.001
3	0.003	0.007	/	0.006	0.008
4	0.006	/	/	/	0.014
5	0.006	0.004	/	/	0.007
6	0.006	/	/	0.005	0.001

2.9 耐用性试验 取系统适用性溶液选用 Ultimate XB-C₁₈(150 mm×4.6 cm, 5 μm) 色谱柱进样测定, 考察方法的耐用性。结果系统适用性试验溶液中去甲肾上腺素峰、肾上腺素峰、去甲肾上腺酮峰、多巴胺峰和 2-氯-1-(3,4-二羟基苯基) 乙酮峰均能达到完全分离, 分离度均符合规定。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 去甲肾上腺素及其有关物质为极性化合物, 在非极性色谱柱上保留较弱。在酸性流动相条件中加入离子对试剂后, 去甲肾上腺素及其有关物质与庚烷磺酸钠形成不同离子对, 在固定相上保留增强, 因此得到有效分离。而目标化合物均为具有电活性的酚类物质, 因此选择电化学安培检测的方式可提高其检测灵敏度。

3.2 工作电极电位的选择 考察了酸性条件下工作电位 +0.2 ~ +0.9 V 范围内对灵敏度的影响, 结果显示随着电位的增加, 5 个物质的电流响应逐渐增加, 在 +0.6 V 处达到最大; 之后随着工作电位的继续增加, 各物质的电流响应显著下降, 信噪比降低 (图 3)。根据文献报道^[6,7], 在碳电极上酸性范围内, 去甲肾上腺素的电极过程为吸附控制。综合考虑, 实验中选择 +0.6 V 为最佳工作电位。

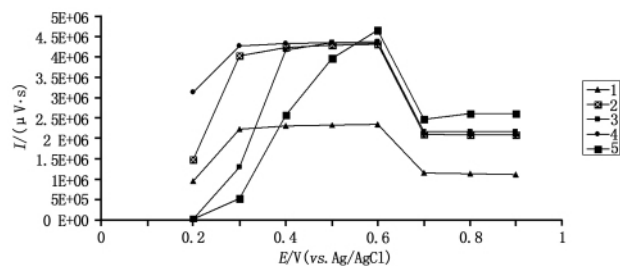


图 3 5 个化合物的流体动力学伏安图

Fig 3 Hydrodynamic voltammograms for 5 compounds

1~5. 同图 1 (same as Fig 1)

3.3 与紫外检测结果的比较 由图 3 和“2.8”结果可知, HPLC-ECD 比 UV 检测灵敏度高, 检出的已知杂质质量尽管远低于 0.1% 的限度规定, 但定量准确。因此可以降低供试品溶液的配制浓度, 避免柱容量过载, 而仍然达到高的检测灵敏度。另外 ECD 也检出了 UV 上未能检测出的未知杂质, 在后续研究中将进一步确认其结构。HPLC-ECD 的缺陷是无法检测无电化学活性的可能存在的有关物质如 N-苄基-1-苯甲胺。

在实际应用中 HPLC-ECD 和 UV 可以相辅相成, 提高检测的选择性和准确性, 更好地监控原料生

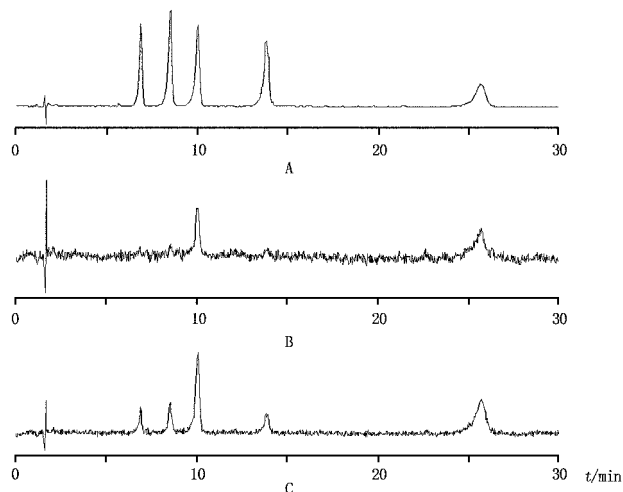


图 4 HPLC-ECD (A) 和 HPLC-UV (B-254 nm, C-280 nm) 色谱图

Fig 4 Chromatograms of HPLC-ECD (A) and HPLC-UV (B-254 nm, C-280 nm)

产和贮藏过程中有关物质由无到有、由少到多或反之的稳定性变化过程。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol II (二部): 570
- 2 EP. 6. 0: 2521
- 3 Lundberg U, Holmberg L, Frankenhaeuser M. Urinary catecholamines: Comparison between HPLC with electrochemical detection and fluorimetric assay. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 31 (2): 2871
- 4 Wang Y, Fice DS, Yeung PKF. A simple high performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxy phenyl acetic acid. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 21: 5191
- 5 LI Bing-yuan (李炳源), HUANG Hui-wei (黄慧伟), HUANG Yan (黄彦), et al. Determination of catecholamines in biological samples using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (高效液相色谱法 Atlantis C₁₈ 反相色谱柱检测生物样品中儿茶酚胺的研究). *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2006, 13(4): 299
- 6 DUAN Lian-sheng (段连生), ZENG Guo-ping (曾国平). Electrochemical behavior of norepinephrine at carbon nanotube powder microelectrode and its determination (去甲肾上腺素在碳纳米管粉末微电极上的电化学行为及测定). *J Hubei Univ (Nat Sci)* (湖北大学学报自然科学版), 2008, 30 (6): 195
- 7 LIN Li-qing (林丽清), YAO Hong (姚宏), ZHUANG Qian (庄茜), et al. Determination of norepinephrine in the presence of ascorbic acid with poly Evans Blue modified glassy carbon electrode (聚伊文思蓝膜修饰玻碳电极在抗坏血酸共存时测定去甲肾上腺素). *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2008, 28(2): 247

(本文于 2010 年 8 月 31 日收到)