

超快速液相色谱法同时准确测定 硝酸异山梨酯片中的主要成分和杂质

No.LC-045

摘要：建立超快速液相色谱法同时准确测定硝酸异山梨酯片中的主要成分和杂质的方法该方法简便快速，易操作。硝酸异山梨酯线性范围1.0~100.0 mg/L，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.28、0.93 mg/L，回收率88.4~94.5 %。5-单硝酸异山梨酯线性范围0.5 ~ 50.0 mg/L，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.17、0.57 mg/L，回收率96.6~98.0%。2-单硝酸异山梨酯线性范围0.5~50.0 mg/L，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.16、0.53 mg/L，回收率96.8~101.6 %。

关键词：硝酸异山梨酯片 含量 杂质 超快速液相色谱法

硝酸酯类药物是临床上最古老的心血管药物之一，到今天硝酸酯仍然是治疗冠心病和心绞痛疗效可靠的重要药物。其代表药物为硝酸甘油，硝酸异山梨酯(消心痛)和5-单硝酸异山梨酯。

硝酸异山梨酯主要药理作用是松弛血管平滑肌。它在体内代谢生成5-单硝酸异山梨酯，后者释放一氧化氮，松弛血管平滑肌，使外周动脉和静脉扩张，总的效应是使心肌耗氧量减少，供氧量增多，心绞痛得以缓解。

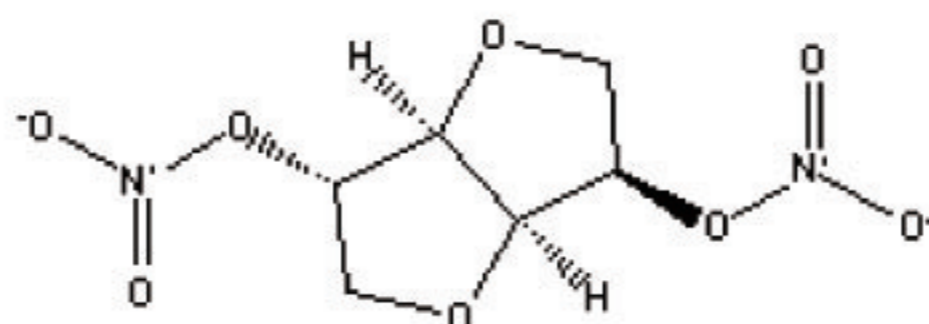


图1 硝酸异山梨酯结构图

在生产和储存的过程中，硝酸异山梨酯可能会产生杂质：5-单硝酸异山梨酯和2-单硝酸异山梨酯。2010年版《中国药典》中规定：“供试品溶液中如有与2-单硝酸异山梨酯与5-单硝酸异山梨酯保留时间相一致的色谱峰，按外标法以峰面积计算，均不得超过0.5%。”

岛津的超快速液相色谱可以以更快的速度和更高的质量完成以往HPLC的工作，为用户节省宝贵的时间和日常溶剂消耗，从而获得最大的投资回报。UFLC_{XR}的高分离度可以帮助用户从容面对复杂组份（如天然产物或中草药等）分离的挑战；UFLC_{XR}的高灵敏度帮助用户检测痕量的目标化合物；UFLC_{XR}快速分离能力使用户轻松分析大量样品，实现高通量分析。

本文采用岛津超快速液相色谱建立了一种同时准确测定硝酸异山梨酯片中的主要成分（硝酸异山梨酯）和杂质（2-单硝酸异山梨酯与5-单硝酸异山梨酯）的方法。

实验部分

1、仪器与试剂

仪器：Shimadzu UFLC_{XR}和紫外检测器。具体配置为：输液泵LC-20AD_{XR}×2，在线脱气机DGU-20A₃，自动进样器SIL-20AC_{XR}，柱温箱CTO-20AC，控制器CBM-20A，紫外检测器SPD-20AV（配半微量池），工作站LCsolution V1.24。

试剂：甲醇，HPLC级，Merck公司；纯水，Millipore纯水机制得；硝酸异山梨酯标准品、2-单硝酸异山梨酯标准品和5-单硝酸异山梨酯标准品购自中国药物生物制品研究所。

2、标准品溶液的配制及样品前处理

储备液配制：称取硝酸异山梨酯标准品固体25 mg，加入甲醇溶解，最后定容到25 mL，得到浓度为1 mg/mL的储备液。按照上述方法，配制浓度为0.5 mg/mL的2-单硝酸异山梨酯储备液和5-单硝酸异山梨酯储备液。

标准溶液配制：分别移取三种储备液各0.1 mL到同一个100 mL的容量瓶中，用流动相定容到刻度，摇匀后得到硝酸异山梨酯浓度为1 mg/L，2-单硝酸异山梨酯和5-单硝酸异山梨酯浓度均为0.5 mg/L的混合标准溶液。依此法，配制硝酸异山梨酯浓度为5 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L和100 mg/L混合标准溶液。

前处理步骤：取药片若干，用研钵研磨至粉末状，按照2010年版《中国药典》中规定，称取对应质量的粉末（精确至0.0001 g），置于100 mL容量瓶中，加入流动相定容。振荡并使用超声波浴辅助溶解。取该样品溶液，经0.45 μm滤膜过滤后进样分析。

3、分析条件

流动相：甲醇/水 = 15/85 (v/v)

流速：0.5 mL/min

进样体积：5 μL

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II,
2.0 mm I.D. × 75 mm L., 2.2 μm

柱温：45°C

检测波长：210 nm

结果与讨论

1、线性范围和检出限

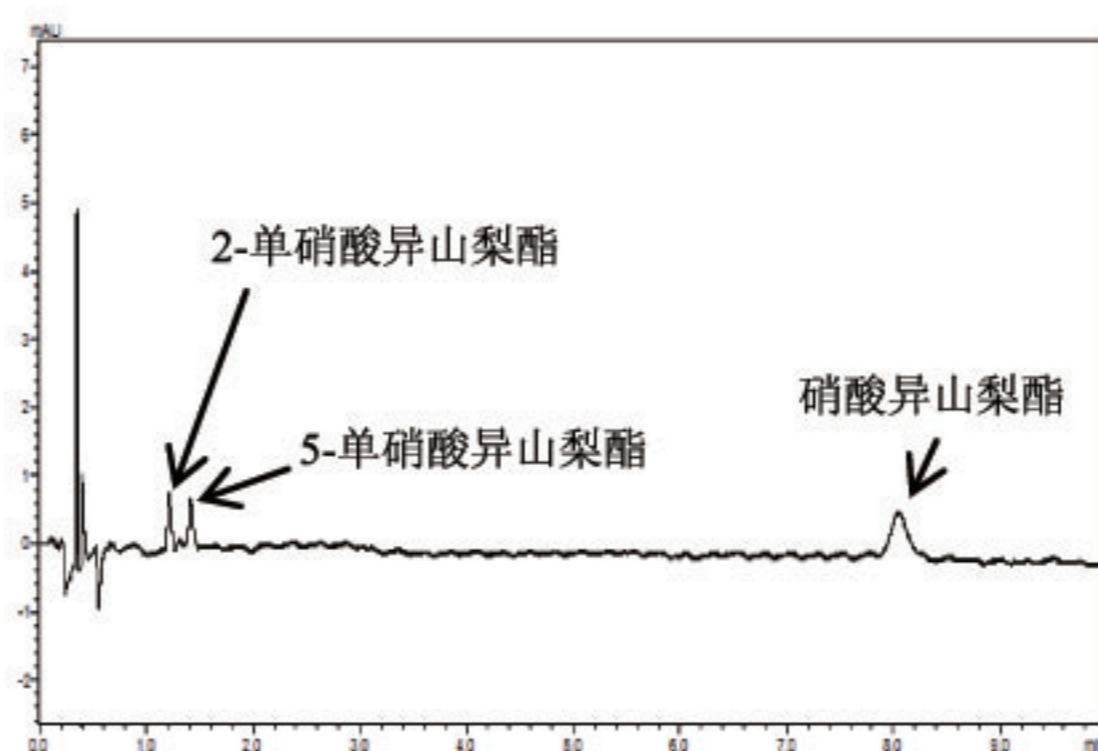


图2. 混合标准溶液色谱图
(2-单硝酸异山梨酯 0.5 mg/L, 5-单硝酸异山梨酯 0.5 mg/L, 硝酸异山梨酯 1.0 mg/L)

取各浓度的混合标准溶液分别进样分析，得到标准曲线如下图，标准曲线方程如表1。

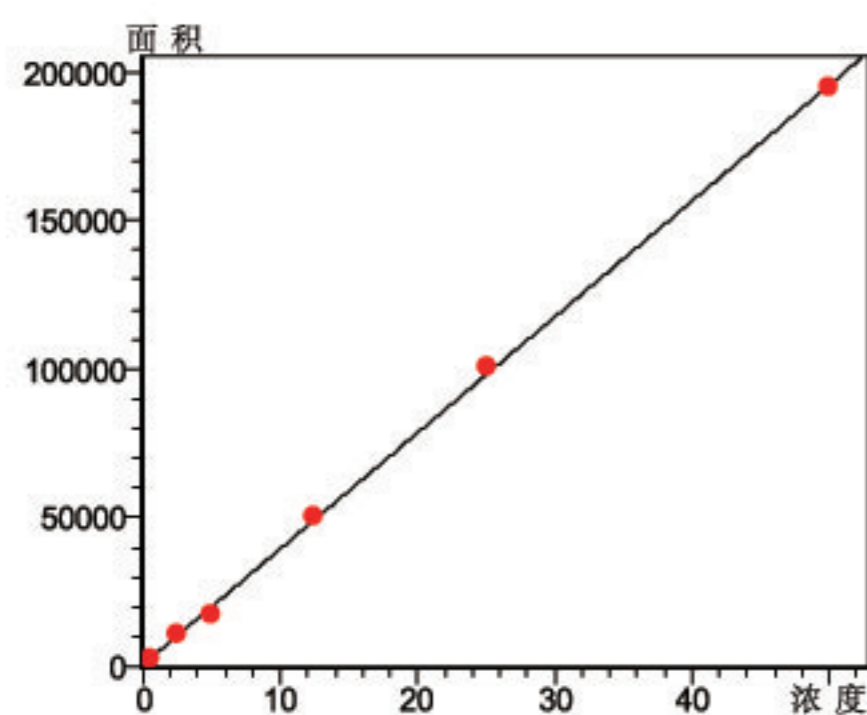


图3 2-单硝酸异山梨酯的校准曲线

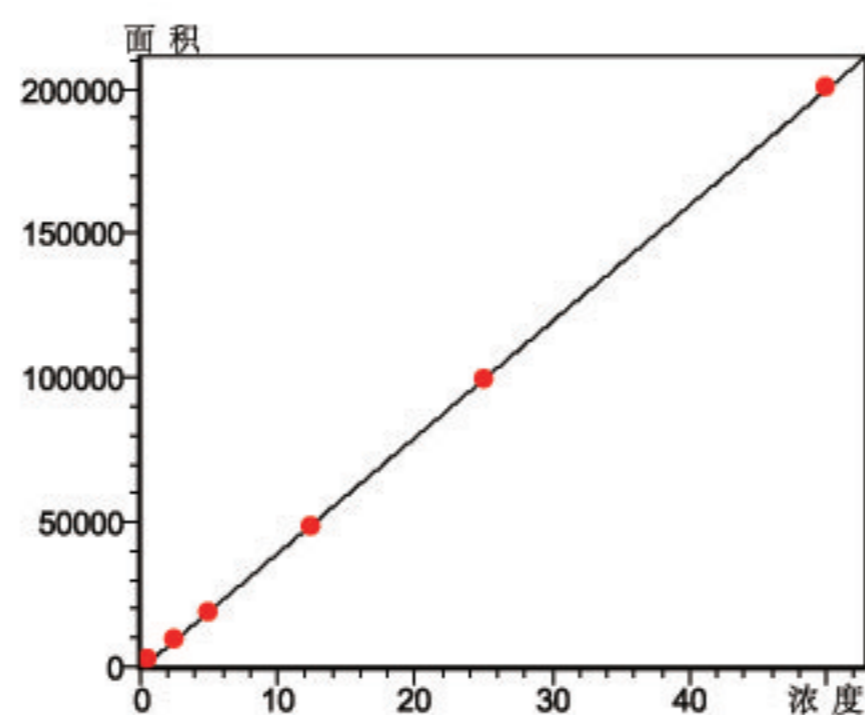


图4 5-单硝酸异山梨酯的校准曲线

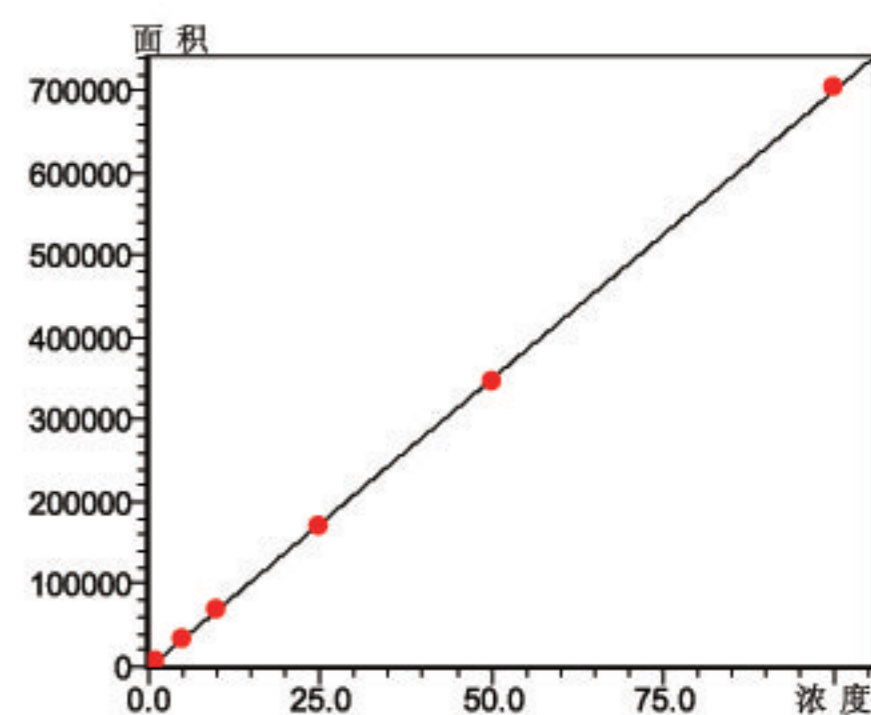


图5 硝酸异山梨酯的校准曲线

<http://shimadzu.com.cn>

表1 标准曲线方程

组分	Y=AX+B		R
	A	B	
2-单硝酸异山梨酯	3900.193	582.6738	0.9997
5-单硝酸异山梨酯	4014.691	-854.7006	0.9999
硝酸异山梨酯	7028.439	-2111.583	0.9999

2、精密度考察试验

同一日内连续进样分析,混合标准溶液中硝酸异山梨酯浓度分别为5.0、25.0和100.0 mg/L,考察各化合物的保留时间和峰面积日内精密度,分析结果见表3,保留时间RSD%< 0.2%,峰面积RSD%< 1.3%。

表3 日内精密度考察结果 (n=6)

组分	浓度(mg/L)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
2-单硝酸异山梨酯	2.5	0.115	0.734
	12.5	0.074	0.618
	50.0	0.151	0.287
5-单硝酸异山梨酯	2.5	0.098	1.280
	12.5	0.050	0.683
	50.0	0.151	0.777
硝酸异山梨酯	5.0	0.083	0.556
	25.0	0.089	0.358
	100.0	0.071	0.233

各组分的检出限和定量限,见表2。

表2 各组分的检出限和定量限

组分	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
2-单硝酸异山梨酯	0.16	0.53
5-单硝酸异山梨酯	0.17	0.57
硝酸异山梨酯	0.28	0.93

连续三天进样分析,混合标准溶液中硝酸异山梨酯浓度分别为5.0、25.0和100.0 mg/L,考察各化合物的保留时间和峰面积日间精密度,分析结果见表4,保留时间RSD%< 1.0%,峰面积RSD%< 1.6%。

表4 日间精密度考察结果 (n=3)

组分	浓度 (mg/L)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
2-单硝酸异山梨酯	2.5	0.668	0.979
	12.5	0.898	0.703
	50.0	0.194	0.374
5-单硝酸异山梨酯	2.5	0.817	1.587
	12.5	0.963	1.467
	50.0	0.184	0.665
硝酸异山梨酯	5.0	0.836	0.326
	25.0	0.919	0.479
	100.0	0.064	0.593

3、加标回收率试验

按照上述方法处理样品,样品加标色谱图见图6,回收率结果见表5。

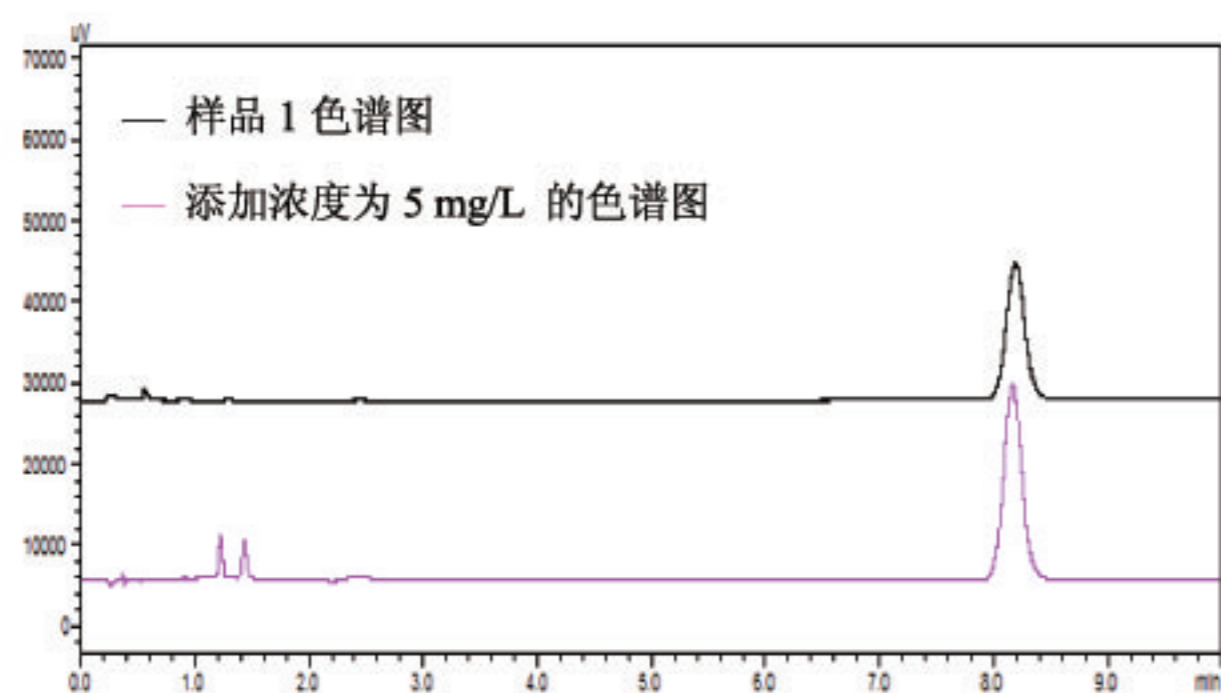


图6 样品加标色谱图

表5 样品加标回收率考察结果

组分	加标浓度(mg/L)	回收率(%)
2-单硝酸异山梨酯	0.5	97.3
	5.0	96.8
	50.0	101.6
5-单硝酸异山梨酯	0.5	96.6
	5.0	97.6
	50.0	98.0
硝酸异山梨酯	1.0	88.4
	10.0	88.1
	100.0	94.5

4、样品分析

按照1.2所述方法处理硝酸异山梨酯片（样品1）和单硝酸异山梨酯缓释片（样品2），测定各样品中硝酸异山梨酯、2-单硝酸异山梨酯、5-单硝酸异山梨酯的含量，样品色谱图见图7，测定结果见表6。

表6 实际样品测定结果

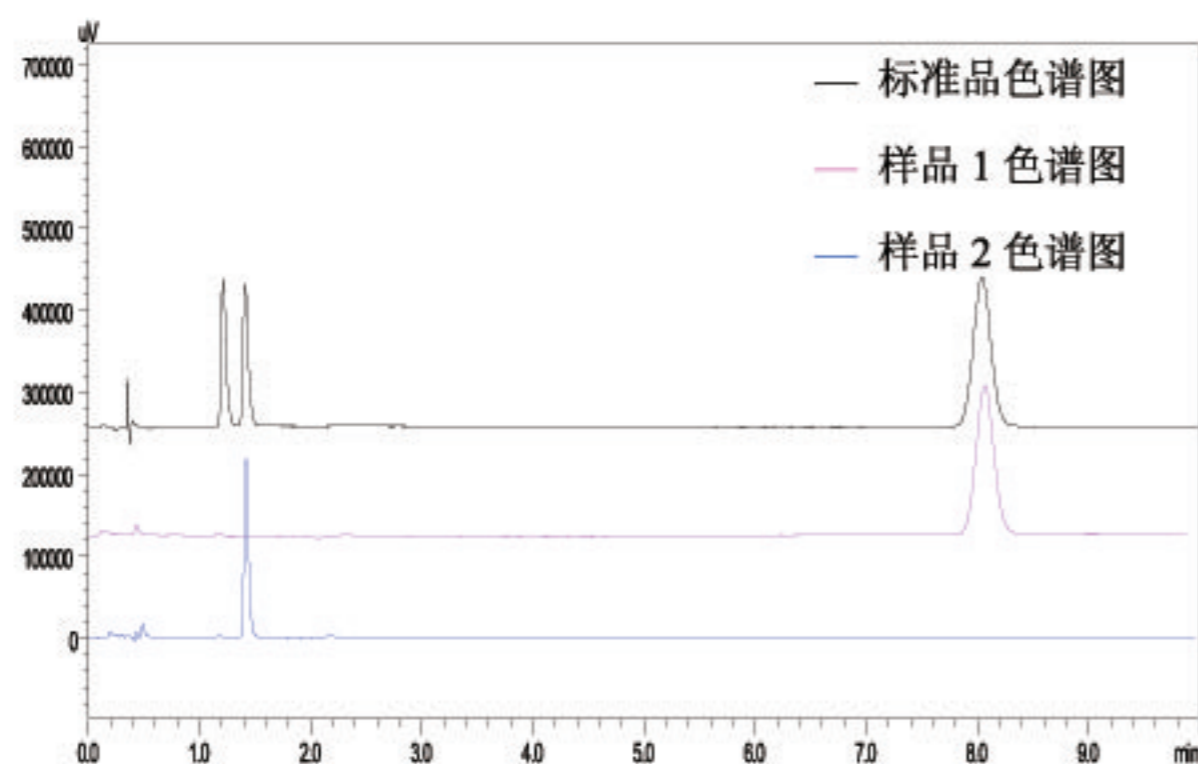


图7 标样和样品色谱图

组分	样品 1(mg/g)	样品 2(mg/g)
2-单硝酸异山梨酯	未检出	未检出
5-单硝酸异山梨酯	未检出	53.26
硝酸异山梨酯	72.40	未检出

■ 结论

本文使用岛津超快速液相色谱UFLCXR建立了一种同时准确测定硝酸异山梨酯缓释片中的主要成分（硝酸异山梨酯）和杂质（2-单硝酸异山梨酯和5-单硝酸异山梨酯）的方法。该方法的标准曲线线性关系良好，重现性好，可用于硝酸异山梨酯类药物或5-单硝酸异山梨酯类药物的分析检测。

与2010年版药典所规定的测定方法相比，单个样品的分析时间缩短到原来的一半，有机溶剂用量降低至原方法的三分之一。此外，该方法仅使用了甲醇和水作为流动相，方便直接将该方法转化为LC-MS联用方法，进一步改善该方法的灵敏度和选择性，并为该类药物确定杂质结构提供有力的定性依据。