

## HPLC 法测定硝苯地平原料药有关物质

李成文, 刘静, 马浩, 刘秀朋, 王文波

(德州德药制药有限公司, 德州 253019)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱法测定硝苯地平原料药的有关物质。方法: 采用 PFP(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 20 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾和甲醇为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 265 nm。结果: 硝苯地平以及杂质 D、邻硝基苯甲醛、单酰胺、内酯、杂质 C、去氢-N-氧化物、杂质 A、杂质 B、对硝苯地平和间硝苯地平 10 个已知杂质色谱峰之间的分离度良好, 已知杂质间分离度均 ≥ 1.5, 硝苯地平前后杂质峰与主峰分离度均 ≥ 2.0。以上各杂质的质量浓度在 0.000 2 ~ 0.015 mg · mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好 ( $r > 0.999$ ,  $n = 7$ ), 相关系数分别为 1.000、1.000、1.000、1.000、0.999 9、0.999 9、0.999 9、1.000、0.999 9、0.999 9, 平均回收率 ( $n = 9$ ) 分别为 93.1% (RSD = 2.3%)、110.6% (RSD = 1.9%)、109.2% (RSD = 2.0%)、111.0% (RSD = 2.1%)、108.1% (RSD = 1.9%)、112.4% (RSD = 1.8%)、110.8% (RSD = 1.9%)、91.5% (RSD = 3.1%)、98.9% (RSD = 2.7%)、110.1% (RSD = 2.6%), 检测限为 0.000 06 mg · mL<sup>-1</sup>, 定量限为 0.000 2 mg · mL<sup>-1</sup>。3 批硝苯地平原料药样品测定结果显示, 已知杂质及其他最大单个杂质的含量均 < 0.1%, 杂质总含量 < 0.5%。结论: 经方法学验证, 本方法灵敏度高, 专属性好, 可用于硝苯地平原料药有关物质测定。

**关键词:** 硝苯地平; 有关物质; 工艺杂质; 降解杂质; 质量控制; 高效液相色谱; 梯度洗脱; 抗高血压药物

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2095 - 10

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0261

## Determination of related substances in nifedipine by HPLC

LI Cheng - wen, LIU Jing, MA Hao, LIU Xiu - peng, WANG Wen - bo

(Dezhou Deyao Pharmacy Co., Ltd., Dezhou 253019, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the determination of related substances in nifedipine. **Methods:** HPLC was adopted on a PFP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution system of 20 mmol · L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution and methanol, the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the column temperature was maintained at 30 °C. The detection wavelength was set at 265 nm. **Results:** The resolutions were good between the peaks of nifedipine and ten known impurities, including impurity D, 2 - nitrobenzaldehyde, monoamide, hydroxy dehydro lactone, impurity C, dehydro - N - oxide, impurity A, impurity B, *m* - nifedipine, *p* - nifedipine. The resolutions between the known impurity peaks were not less than 1.5, the resolutions between the main peak of nifedipine and its front and back impurity peaks were not less than 2.0. The calibration curves of mass concentration of above known impurities were linear respectively in their concentration range of 0.000 2 - 0.015 mg · mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.999$ ,  $n = 7$ ). The correlation coefficients of above known impurities were

1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 9, 1.000, 0.999 9, 0.999 9, respectively. The average recovery rates of above known impurities were 93.1% (RSD = 2.3%), 110.6% (RSD = 1.9%), 109.2% (RSD = 2.0%), 111.0% (RSD = 2.1%), 108.1% (RSD = 1.9%), 112.4% (RSD = 1.8%), 110.8% (RSD = 1.9%), 91.5% (RSD = 3.1%), 98.9% (RSD = 2.7%), 110.1% (RSD = 2.6%), respectively. The detection limit of above known impurities was  $0.000\ 06\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the quantification limit of above known impurities was  $0.000\ 2\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The impurity determination results of the three batches of nifedipine samples showed that the content of the known impurities and the maximum single unknown impurity were less than 0.1%, the total impurities contents were less than 0.5%. **Conclusion:** The method has good sensitivity and specificity, and it is suitable for the quality control of nifedipine.

**Keywords:** nifedipine; related substances; process impurity; degradation impurity; quality control; HPLC; gradient elution; antihypertensive drug

硝苯地平临床上主要用于治疗高血压和冠心病等心脑血管疾病,属二氢吡啶类化合物,化学名为 2,6-二甲基-4-(2-硝基苯基)-1,4-二氢-3,5-吡啶二甲酸二甲酯。硝苯地平是第 1 代二氢吡啶类钙离子拮抗剂,1968 年由 Bossert 和 Vater 首次合成,德国拜耳公司在 1975 年以新药上市销售<sup>[1]</sup>,目前我国治疗高血压药物中销量位居首位。硝苯地平的主要合成路线是由邻硝基苯甲醛、乙酰乙酸甲酯和氨通过 Hantzsch 反应制备而成<sup>[2]</sup>。

有关物质控制是保障药品质量的重点环节,从化学特性、合成路线以及降解途径对硝苯地平原料药合成中可能形成的有关物质进行系统分析,从而全面掌握它在生产中的杂质状况。硝苯地平有关物质主要分为工艺杂质和降解杂质,工艺杂质主要包括杂质 C、杂质 D、单酰胺杂质、邻硝基苯甲醛杂质、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质,降解杂质主要包括杂质 A、杂质 B、内酯杂质和去氢-N-氧化物杂质,化学结构式见图 1。

BP 2020<sup>[3]</sup>和 EP 11.0<sup>[4]</sup>中对硝苯地平杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 进行了控制,其中对杂质 A 和杂质 B 利用高效液相色谱法进行控制,杂质 C 和杂质 D 利用化学分析法进行控制;USP 43<sup>[5]</sup>和 2020 年版《中华人民共和国药典》二部<sup>[6]</sup>仅对硝苯地平杂质 A 和杂质 B 利用高效液相色谱法进行了控制。

孙晓岩等<sup>[7]</sup>利用高效液相色谱法对硝苯地平杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 进行了检测分析研究,郭常川等<sup>[8]</sup>利用超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法对间硝苯地平杂质、对硝苯地平杂质以及去氢硝苯地平-N-氧化物杂质进行了检测分析

研究,朱培曦等<sup>[9]</sup>利用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法对硝苯地平杂质 A、杂质 B 和单酰胺杂质进行了检测分析研究,Kondo 等<sup>[10]</sup>利用气相色谱法对硝苯地平内酯杂质进行了检测分析研究。

硝苯地平不稳定,在贮存中易产生光解产物和氧化产物,在合成中易产生多种工艺杂质。综合以上硝苯地平杂质分析文献中的杂质种类,结合各国药典对硝苯地平杂质重点控制的情况,本试验对硝苯地平原料药合成的起始原料、中间体、工艺杂质以及降解杂质等 10 个杂质进行系统地分析研究,按照有关物质分析方法研究指导原则<sup>[11-13]</sup>,创新性地建立了专属性好、准确度高、检测能力强的高效液相色谱分析方法,能够更有效地检测以上 10 个杂质和其他未知杂质,更全面地控制硝苯地平原料药产品质量。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱仪(Thermo Scientific 公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);AB135-S 型十万分之一分析天平(Mettler Toledo 公司);CT15RT 型高速冷冻离心机(上海天美生化设备仪器设备有限公司);SHH-100GD-2 型药品强光照箱(重庆市永生实验仪器厂);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

硝苯地平原料药(批号 052210001、052210002、052210003,河北广祥制药有限公司),对照品硝苯地平(批号 100338-202107,含量 99.8%)、杂质 A(批号 100339-202005,含量 99.1%)、杂质 B(批号

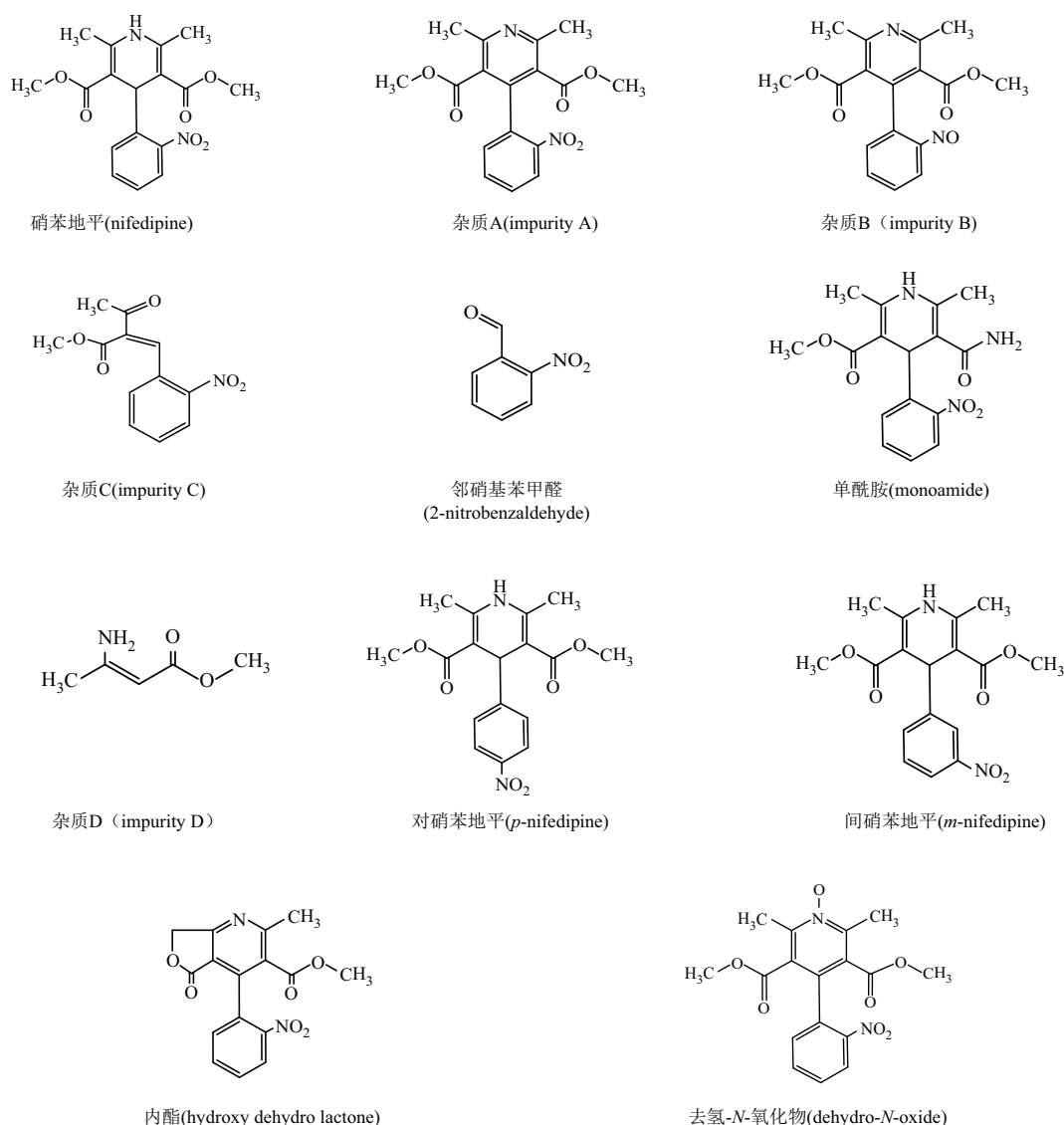


图1 硝苯地平及其各杂质成分的化学结构式

Fig. 1 Structures of nifedipine and its impurities

100340-202005,含量99.4%)来自中国食品药品检定研究院;杂质C(批号5-CWA-37-1,含量99.44%)来自TRC公司;单酰胺杂质(批号WDS-XBDP15,含量98.00%)、硝苯地平杂质D(批号WDS-G21122005,含量98.56%)、邻硝基苯甲醛杂质(批号WDS-LXJBJQ05,含量99.91%)、去氢-N-氧化物杂质(批号WDS-XBDP17,含量97.99%)、内酯杂质(批号WDS-XBDP12,含量98.27%)、间硝苯地平杂质(批号WDS-XBJ005,含量98.33%)和对硝苯地平杂质(批号WDS-XBDP01,含量97.56%)均来自山东沃德森生物科技有限公司,甲醇(色谱纯)来自默克股份两合公

司,磷酸二氢钾(分析纯)来自天津市科密欧化学试剂有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用以五氟苯基硅烷键合硅胶为填充剂,Welch Ultimate PFP(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相为20 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱程序见表1,流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长为265 nm,柱温为30℃,进样体积为10 μL。

### 2.2 限度标准

供试品溶液的色谱图中如有与杂质D峰、邻硝基苯甲醛杂质峰、单酰胺杂质峰、内酯杂质峰、

表 1 HPLC 梯度洗脱程序  
Tab. 1 The gradient elution procedure for HPLC

t/min	流动相比例(ratio of mobile phase)/%	
	A	B
0	55	45
35	30	70
45	55	45
60	55	45

杂质 C 峰、去氢 - *N* - 氧化物杂质峰、杂质 A 峰、杂质 B 峰、对硝苯地平杂质峰、间硝苯地平杂质峰保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,均不得过 0.1%;其他单个杂质峰面积不得大于对照品溶液中硝苯地平峰面积(0.1%);杂质总量不得过 0.5%。

### 2.3 溶液制备

**2.3.1 供试品溶液** 称取硝苯地平约 50 mg,置 25 mL 量瓶中,加混合溶剂[乙腈 - 甲醇(50:50)]适量,超声(500 W,40 kHz)约 30 min,并不时振摇使溶解,放冷至室温,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,即得。

**2.3.2 对照品溶液** 分别取杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢 - *N* - 氧

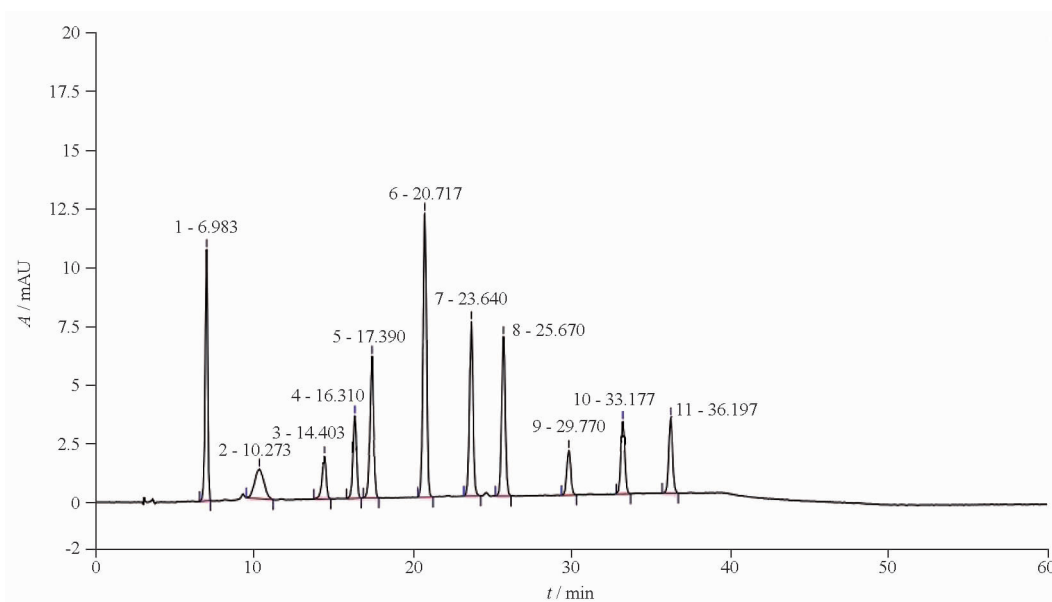
化物杂质、杂质 A、杂质 B、硝苯地平、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质的对照品,精密称定,各置 20 mL 量瓶中,分别加混合溶剂制成每 1 mL 中约含 1 mg 的对照品储备液。

精密量取各对照品储备液适量,用混合溶剂稀释制成每 1 mL 中分别约含杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢 - *N* - 氧化物杂质、硝苯地平、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质各 4 μg 和杂质 A、杂质 B 各 10 μg 的混合对照品溶液。

**2.3.3 系统适用性溶液** 精密量取以上各对照品储备液适量,用混合溶剂稀释制成每 1 mL 中含杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢 - *N* - 氧化物杂质、杂质 A、杂质 B、硝苯地平、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质各 1 μg 的混合溶液。

### 2.4 系统适用性试验

取“2.3.3”项下系统适用性溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图 2 和表 2。系统干净稳定,各已知杂质出峰没有干扰并且已知杂质峰之间分离度均 ≥ 1.5,硝苯地平主峰前后杂质峰与主峰分离度均 ≥ 2.0。



1. 杂质 D (impurity D) 2. 邻硝基苯甲醛杂质 (2-nitrobenzaldehyde impurity) 3. 单酰胺杂质 (monoamide impurity) 4. 内酯杂质 (hydroxy dehydro lactone impurity) 5. 杂质 C (impurity C) 6. 去氢 - *N* - 氧化物杂质 (dehydro - *N* - oxide impurity) 7. 杂质 A (impurity A) 8. 杂质 B (impurity B) 9. 硝苯地平 (nifedipine) 10. 间硝苯地平杂质 (*m*-nifedipine impurity) 11. 对硝苯地平杂质 (*p*-nifedipine impurity)

图 2 系统适用性色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability

表 2 系统适用性试验结果

Tab. 2 Results of system suitability test

化合物 (compound)	$t_R$ / min	分离度 (resolution)
杂质 D(impurity D)	6.983	4.24
邻硝基苯甲醛杂质(2-nitrobenzaldehyde impurity)	10.273	4.65
单酰胺杂质(monoamide impurity)	14.403	4.31
内酯杂质(hydroxy dehydro lactone impurity)	16.310	2.64
杂质 C(impurity C)	17.390	8.11
去氢-N-氧化物杂质(dehydro-N-oxide impurity)	20.717	7.16
杂质 A(impurity A)	23.640	4.85
杂质 B(impurity B)	25.670	9.32
硝苯地平(nifedipine)	29.770	7.60
间硝苯地平杂质(m-nifedipine impurity)	33.177	6.85
对硝苯地平杂质(p-nifedipine impurity)	36.197	\

结果表明,硝苯地平峰与杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A、杂质 B、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质各杂质的色谱峰均能基线分离,硝苯地平

峰与相邻杂质峰分离度均 $\geq 2.0$ ,上述各已知杂质相邻峰间分离度均 $\geq 1.5$ ,本高效液相色谱方法系统性试验符合要求。

## 2.5 线性关系试验

分别精密称取杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A、杂质 B、硝苯地平、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质的对照品适量,照“2.3.2”项方法取各杂质对照品储备液各 1 mL 置同一 20 mL 量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀。再分别量取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、7.5 mL 上述溶液置不同的 10 mL 量瓶中,分别用混合溶剂稀释至刻度,摇匀。制备成硝苯地平及各杂质浓度从定量限(LOQ)到指标浓度的 0.75% (0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5% 和 0.75%) 的线性试验混合溶液。取上述线性试验混合溶液各 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,以杂质质量浓度  $X$  ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和峰面积  $Y$  计算回归方程、线性范围、相关系数和校正因子,试验结果见表 3。

表 3 回归方程、线性范围和校正因子

Tab. 3 Regression equations, linear ranges and relative correction factors

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range)/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$r$	相对校正因子 (relative correction factor)
杂质 D(impurity D)	$Y = 503.1X + 0.0149$	0.0002 ~ 0.015	1.000	0.28
邻硝基苯甲醛杂质(2-nitrobenzaldehyde impurity)	$Y = 157.8X + 0.0055$	0.0002 ~ 0.015	1.000	0.88
单酰胺杂质(monoamide impurity)	$Y = 133.7X + 0.0094$	0.0002 ~ 0.015	1.000	1.04
内酯杂质(hydroxy dehydro lactone impurity)	$Y = 246.4X + 0.0197$	0.0002 ~ 0.015	1.000	0.57
杂质 C(impurity C)	$Y = 724.8X + 0.0144$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	0.19
去氢-N-氧化物杂质(dehydro-N-oxide impurity)	$Y = 448.1X + 0.0115$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	0.31
杂质 A(impurity A)	$Y = 218.2X + 0.0051$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	0.64
杂质 B(impurity B)	$Y = 186.2X + 0.0104$	0.0002 ~ 0.015	1.000	0.75
硝苯地平(nifedipine)	$Y = 139.5X + 0.0040$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	1.00
间硝苯地平杂质(m-nifedipine impurity)	$Y = 234.2X + 0.0063$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	0.60
对硝苯地平杂质(p-nifedipine impurity)	$Y = 245.3X + 0.0066$	0.0002 ~ 0.015	0.9999	0.57

结果表明,杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A、杂质 B、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质各杂质及硝苯地平质量浓度与峰面积呈线性并且相关系数均 $\geq 0.999$ ,以上各已知杂质质量浓度与液相色谱峰面积具有良好的线性关系。

## 2.6 回收率

取“2.3.2”项下各杂质对照品储备液,其中杂质

A、杂质 B 的对照品储备液各 5 mL,其余杂质对照品储备液各 2 mL 置同一 50 mL 量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀,即得回收率对照品溶液。分别按杂质限度的 80% (低浓度)、100% (中浓度) 和 120% (高浓度) 将对照品溶液加入至供试品溶液中,每个浓度制备 3 份加标溶液,测定各已知杂质的回收率,试验结果见表 4。

结果表明,杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、单酰胺

表 4 回收率试验结果( $n=9$ )  
Tab. 4 The results of recovery experiments

化合物 (compound)	回收率(recovery)/%			平均回收率 (averagerecovery)/%	RSD/ %
	低浓度 (low concentration)	中浓度 (medium concentration)	高浓度 (high concentration)		
杂质 D(impurity D)	94.3	93.9	91.0	93.1	2.3
邻硝基苯甲醛杂质(2-nitrobenzaldehyde impurity)	110.3	111.9	109.7	110.6	1.9
单酰胺杂质(monoamide impurity)	107.4	110.4	109.9	109.2	2.0
内酯杂质(hydroxy dehydro lactone impurity)	109.2	112.8	111.0	111.0	2.1
杂质 C(impurity C)	106.7	109.3	108.2	108.1	1.9
去氢-N-氧化物杂质(dehydro-N-oxide impurity)	111.1	113.9	112.3	112.4	1.8
杂质 A(impurity A)	109.8	112.4	110.2	110.8	1.9
杂质 B(impurity B)	89.8	90.3	94.4	91.5	3.1
间硝苯地平杂质(m-nifedipine impurity)	97.5	100.9	98.2	98.9	2.7
对硝苯地平杂质(p-nifedipine impurity)	108.2	111.2	112.5	110.6	2.6

杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A、杂质 B、对硝苯地平杂质和间硝苯地平杂质各杂质回收率在 91.5%~112.4%, RSD 均 $\leq$ 3.1%, 符合有关物质分析方法验证接受标准<sup>[14]</sup>中回收率 80%~120% 和 RSD $\leq$ 10% 的标准限度要求, 各杂质回收率结果良好。

### 2.7 检测限与定量限

取各杂质储备液适量, 加入混合溶剂配制成含各杂质浓度  $0.000\ 06\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液作为检测测定用溶液, 按高效液相色谱法进行检测试验。结果表明, 各杂质  $0.000\ 06\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的信噪比( $S/N$ )均 $>3$ , 各杂质  $0.000\ 06\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的检测浓度均符合检测限要求。

取各杂质储备液适量, 加入混合溶剂配制成含各杂质浓度  $0.000\ 2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液作为定量测定用溶液, 按高效液相色谱法进行检测试验。结果

表明, 各杂质  $0.000\ 2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的信噪比( $S/N$ )均 $>10$ , 连续进样 6 次各杂质峰峰面积的 RSD $\leq$ 10%, 各杂质  $0.000\ 2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的检测浓度均符合定量限要求。

### 2.8 稳定性试验

取供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件检测, 分别在室温下放置 0、6、12、18、24、36 h, 分别取各放置时间点供试品溶液并计算杂质含量。试验结果见表 5。按照有关物质分析方法验证可接受标准<sup>[14]</sup>进行分析, 各时间点硝苯地平主峰面积 RSD $<2\%$ , 符合要求; 各时间点单酰胺杂质和间硝苯地平杂质含量 $<0.05\%$ ; 其他单个杂质含量在  $0.05\% \leq X < 0.10\%$ , 各时间点与 0 h 差值符合不得过 0.05% 要求; 总杂质含量在  $0.10\% \sim 0.50\%$ , 各时间点与 0 h 差值符合不得过 0.10% 要求。结果表明, 供试品溶液 36 h 内稳定性良好。

表 5 稳定性试验结果  
Tab. 5 Results of stability investigation

$t/h$	主峰面积 (principal peak area)	杂质含量(impurity content)/%					杂质数 (number of impurity)
		单酰胺 (monoamide)	间硝苯地平 (m-nifedipine)	其他定性杂质 (other impurity)	最大未知杂质 (maximum unknown impurity)	总杂质 (total impurity)	
0	285.490	0.02	0.04	-	0.06	0.18	6
6	283.660	0.02	0.04	-	0.06	0.16	6
12	284.105	0.02	0.04	-	0.06	0.18	6
18	284.022	0.02	0.04	-	0.06	0.16	6
24	283.553	0.02	0.04	-	0.06	0.16	6
36	283.770	0.02	0.02	-	0.07	0.14	6
平均值(mean)	284.101	0.02	0.04	-	0.06	0.16	-
RSD/%	0.25	0.00	0.22	-	0.07	0.09	-

## 2.9 重复性试验

按“2.2”项下方法,平行制备6份供试品溶液,并按“2.1”项下的色谱条件进行分析并计算各杂质含量的RSD。以上重复性试验按照有关物质分析方法验证接受标准<sup>[14]</sup>进行分析,6份供试品溶液中单酰胺杂质、间硝苯地平杂质、对硝苯地平杂质以及2个未知杂质含量 $< 0.05\%$ ;1个未知杂质含量在 $0.05\% \sim 0.10\%$ ,RSD为7.7%,符合RSD不得过10%的要求;1个未知杂质含量在 $0.10\% \sim 0.50\%$ ,RSD为4.1%,符合RSD不得过5.0%的要求。各杂质的所有验证结果均符合重复性验证要求。

## 2.10 精密度试验

以不同人员、不同时间和不同高效液相色谱仪,按重复性试验项下方法进行试验并按照有关物质分析方法验证接受标准<sup>[14]</sup>进行分析。由精密度试验表明,(实验员1)6份供试品溶液中单酰胺杂质、间硝苯地平杂质、对硝苯地平杂质以及2个未知杂质含量均 $< 0.05\%$ ;1个未知杂质含量在 $0.05\% \sim 0.10\%$ ,RSD为7.7%,符合RSD不得过10%的要求;1个未知杂质含量在 $0.10\% \sim 0.50\%$ ,RSD为

4.1%,符合RSD不得过5.0%的要求。(实验员2)6份供试品溶液中单酰胺杂质、间硝苯地平杂质、对硝苯地平杂质以及2个未知杂质含量均 $< 0.05\%$ ;1个未知杂质含量在 $0.05\% \sim 0.10\%$ ,RSD为7.1%,符合RSD不得过10%的要求;1个未知杂质含量在 $0.10\% \sim 0.50\%$ ,RSD为3.9%,符合RSD不得过5.0%的要求。各杂质的所有验证结果均符合精密度验证要求。

## 2.11 耐用性考察

取供试品溶液,通过改变“2.1”项下的色谱条件(包括流速、柱温、色谱柱、检测波长和流动相比例),考察对有关物质测定结果的影响。试验结果见表6,表明各条件下供试品溶液按照有关物质分析方法验证的接受标准<sup>[14]</sup>进行分析,单酰胺杂质和间硝苯地平杂质含量 $< 0.05\%$ ;最大未知杂质含量在 $0.05\% \sim 0.10\%$ ,改变色谱条件与原色谱条件差值最大值为0.01%,符合不得过0.05%的要求;总杂质含量在 $0.10\% \sim 0.50\%$ ,改变色谱条件与原色谱条件差值最大值为0.04%,符合不得过0.10%的要求。试验结果表明,符合耐用性要求。

表6 耐用性考察结果

Tab. 6 Results of robustness investigation

色谱条件 (chromatographic condition)	含量(content)/%					
	单酰胺 (monoamide)	间硝苯地平 ( <i>m</i> -nifedipine)	其他定性 杂质(other impurity)	最大未知杂质 (maximum unknown impurity)	总杂质 (total impurity)	
流速(flow rate)/ (mL · min <sup>-1</sup> )	0.95	0.02	0.03	-	0.05	0.19
	1.0	0.02	0.04	-	0.06	0.21
	1.05	0.02	0.03	-	0.05	0.17
柱温(column temperature)/°C	25	0.02	0.04	-	0.07	0.18
	30	0.02	0.04	-	0.06	0.21
	35	0.02	0.03	-	0.07	0.17
色谱柱 (chromatographic column)	shimadzu	0.02	0.04	-	0.05	0.16
	月旭科技(Yuesu Science)	0.02	0.04	-	0.06	0.21
	Waters	0.02	0.04	-	0.05	0.17
检测波 长(detection wavelength)/nm	263	0.02	0.05	-	0.06	0.18
	265	0.02	0.04	-	0.07	0.21
流动相比 例(ratio of mobile phase)/%	267	0.02	0.05	-	0.06	0.22
	A + 2% : B - 2% (57:43, 32:68, 57:43, 57:43)	0.02	0.04	-	0.05	0.17
	A: B(55:45, 30:70, 55:45, 55:45)	0.02	0.04	-	0.05	0.21
	A - 2% : B + 2% (53:47, 28:72, 53:47, 53:47)	0.02	0.04	-	0.05	0.17

## 2.12 专属性试验

**2.12.1 溶剂干扰试验** 取混合溶剂、定位溶液(取“2.3.2”项下各杂质对照品储备液,其中杂质A和杂质B各0.5 mL,其余杂质各0.2 mL分别置50 mL量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀)、空白辅料溶液[称取空白辅料(约相当于硝苯地平主成分50 mg的处方配比量),置25 mL量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀]各10  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示空白辅料和溶剂不影响本方法对有关物质的测定,定位溶液各杂质间的分离度均 $>1.5$ ,表明本方法符合有关物质的测定要求。

**2.12.2 破坏性试验** 未破坏试验供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置10 mL量瓶中,用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

固体光照破坏供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置透明瓶中密封,4 500 Lx放置1 h后取出,转移至10 mL量瓶中,用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

固体高温破坏供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置透明瓶中密封,105  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置24 h后取出,放冷至室温,转移至10 mL量瓶中,用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

酸破坏试验供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置10 mL量瓶中,加1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 盐酸1 mL,室温放置24 h,再加1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 氢氧化钠1 mL中和,

用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(同法制备空白溶液)。

碱破坏试验供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置10 mL量瓶中,加1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 氢氧化钠溶液1 mL室温,放置24 h,加1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 盐酸1 mL中和,用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(同法制备空白溶液)。

氧化破坏试验供试品溶液:称取硝苯地平原料药约20 mg,置10 mL量瓶中,加3%双氧水溶液1 mL,室温放置1 h,用混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(同法制备空白溶液)。

液体光照破坏供试品溶液:取未破坏供试品溶液于透明进样小瓶中4 500 Lx放置5 min后取出,即得。

固体光照破坏供试品溶液:取未破坏供试品溶液于透明进样小瓶中60  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置2 h取出,即得。

精密量取以上各破坏性试验溶液10  $\mu\text{L}$ ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。试验结果见表7。试验结果按照有关物质分析方法验证可接受标准<sup>[14]</sup>进行分析,光照、高温(液体60  $^{\circ}\text{C}$ 、固体105  $^{\circ}\text{C}$ )、酸、碱、氧化等强制降解条件下样品中主峰前后杂质与主峰分离度均 $>2.20$ (均 $\geq 1.5$ ),光破坏的主要降解杂质为杂质B,氧化破坏的主要降解杂质为杂质A,主峰匹配因子为990以上,主成分降解前后的物料平衡均在93%~102%,物料基本守恒,杂质与主成分的分离度均符合要求,表明该色谱方法具有较强的专属性。

表7 物料守恒试验数据

Tab.7 Mass balance data

试验条件 (condition of experiment)	样品含量 (sample content)/(ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )	主峰面积 (principal peak area)	杂质峰面积 (impurities peak area)	百分比 (percentage)/%
未破坏(undamaged)	2.087	288.582	0.651	-
固体光照破坏(solid photodamage)	2.063	273.136	17.993	101.0
固体高温破坏(solid high-temperature damaged)	2.050	272.769	0.861	96.3
酸破坏(acidification damaged)	2.042	286.909	0.584	101.6
碱破坏(alkalization damaged)	2.032	260.385	0.504	92.6
氧化破坏(oxidation damaged)	2.093	282.581	1.673	98.0
液体光照破坏(liquid photodamage)	2.087	273.658	18.862	101.1
液体高温破坏(liquid high-temperature damaged)	2.087	276.389	0.790	95.8

## 2.13 样品检测

精密称取3批硝苯地平原料药适量按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”高效液相色谱条件进行测定分别将供试品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图。试验结果见表8。

检验结果表明,3批硝苯地平原料药有关物质中已知杂质仅检出单酰胺杂质、间硝苯地平杂质,其他已知杂质均未检出,其他最大未知单杂含量均 $<0.1\%$ ,杂质总量均 $<0.5\%$ ,均符合质量标准规定,总杂质含量较低,产品纯度较高。

表 8 样品检验结果

Tab. 8 Results of sample test

化合物 (compound)	指标限度 (limit)	有关物质含量(content of related substance)/%		
		批号(lot No.)052210001	批号(lot No.)052210002	批号(lot No.)052210003
杂质 D(impurity D)	≤0.1%	-	-	-
邻硝基苯甲醛杂质(2-nitrobenzaldehyde impurity)	≤0.1%	0.02	0.02	0.02
单酰胺杂质 monoamide impurity)	≤0.1%	-	-	-
内酯杂质(hydroxy dehydro lactone impurity)	≤0.1%	-	-	-
杂质 C(nifedipine impurity C)	≤0.1%	-	-	-
去氢-N-氧化物杂质(dehydro-N-oxide impurity)	≤0.1%	-	-	-
杂质 A(impurity A)	≤0.1%	-	-	-
杂质 B(impurity B)	≤0.1%	-	-	-
间硝苯地平杂质(m-nifedipine impurity)	≤0.1%	0.03	0.03	0.03
对硝苯地平杂质(p-nifedipine impurity)	≤0.1%	-	-	-
其他最大未知单杂(other maximum unknown impurity)	≤0.1%	0.09	0.07	0.06
总杂质(total impurities)	≤0.5%	0.26	0.26	0.23

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件优化

在试验过程中,先后用 C<sub>18</sub> 色谱柱和五氟苯基柱进行系列试验,由于硝苯地平及其杂质含有苯基和酯基结构,按照色谱分离相似相溶原理,五氟苯基柱对主成分和杂质的分离效果较好,故选用五氟苯基色谱柱进行试验研究。

在流动相选择试验中,参考硝苯地平有关物质检查相关文献<sup>[15-17]</sup>,分别考察了水-甲醇、水-乙腈、水-甲醇-乙腈、磷酸缓冲盐-甲醇、磷酸缓冲盐-乙腈等洗脱体系,等度洗脱体系和含有乙腈的洗脱体系均未实现 10 个杂质的有效分离,特别是杂质 C 和去氢-N-氧化物杂质的分离存在一定问题。通过系列试验,选择磷酸缓冲盐-甲醇体系的梯度洗脱,可实现以上 10 个杂质和主峰附近杂质的有效分离,并且有良好的耐用性,满足有关物质分析的各项要求。

#### 3.2 检测波长选择

利用高效液相色谱仪配置的 UV-DAD 检测器,测得杂质 D、邻硝基苯甲醛杂质、内酯杂质、杂质 C、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A、杂质 B 和对硝苯地平杂质的最大吸收波长分别为 275、256、278、270、270、271、281 和 284 nm,单酰胺杂质和间硝苯地平杂质的最大吸收波长分别为 232 nm 和 237 nm。为使杂质能够更有效地检测,参考 USP 43 硝苯地平有关物质检测波长,将杂质检测波长定为接近多个杂质最大吸收波长的 265 nm,通过不同波长对样品杂质的检测比较,在 265 nm 检测波长条件下,样品杂质的检测

量较多,能更准确全面地检测样品的杂质状况。

#### 3.3 色谱梯度条件优化

通过杂质对照品系统适用性试验以及酸、碱、氧化、光照以及高温等强制降解试验和原料药样品检测,降解产物峰大多在主峰以前,主要降解产物杂质 B 的相对保留时间为 0.86。通过系列流动相比比例调整试验,在 35 min 内将甲醇的比例由 45% 线性提高至 70% 后再进行系统平衡,能够在更短时间最有效率地实现杂质分离和分析检测。

#### 3.4 杂质分析及控制

对以上 10 个杂质的生成或降解途径分析如下:邻硝基苯甲醛系硝苯地平原料药合成起始原料;杂质 D(3-氨基巴豆酸甲酯)是由乙酰乙酸甲酯与氨生成的中间体;杂质 C(2-[(2-硝基苯基)亚甲基]-3-氧代丁酸乙酯)是邻硝基苯甲醛与乙酰乙酸甲酯发生缩合反应生成的中间体;单酰胺(2,6-二甲基-4-(2-硝基-苯基)-1,4-二氢吡啶-3-羧酸甲酯-5-甲酰胺)是在过量氨条件下,3-氨基巴豆酸甲酯与氨发生酰化反应生成 2-氨基-2-丙烯酰胺,再与邻硝基苯甲醛、氨通过加成和缩合反应生成;内酯杂质((4-(2-硝基-苯基)-2-(甲氧基羰基)-6-甲基吡啶-3-甲酸-γ-内酯))是硝苯地平在高温或光照条件下的氧化产物;去氢-N-氧化物杂质(2,6-二甲基-4-(2-硝基苯基)-3,5-吡啶二甲酸二甲酯-1-氧化物)是硝苯地平在高温或光照条件下的氧化产物;杂质 A(2,6-二甲基-4-(2-硝基苯基)-3,5-

吡啶二甲酸二甲酯)是硝苯地平在高温或光照条件下的氧化产物;杂质 B(2,6-二甲基-4-(2-亚硝基苯基)-3,5-吡啶二甲酸二甲酯)是硝苯地平在高温或光照条件下的氧化产物;对硝苯地平(2,6-二甲基-4-(4-硝基苯基)-1,4-二氢-3,5-吡啶二甲酸二甲酯)是由苯和硝酸发生取代反应时生成对硝基苯甲醛,对硝基苯甲醛与乙酰乙酸乙酯、氨发生加成和缩合反应生成的副产物;间硝苯地平(2,6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1,4-二氢-3,5-吡啶二甲酸二甲酯)是由苯和硝酸发生取代反应时生成间硝基苯甲醛,对硝基苯与乙酰乙酸乙酯、氨发生加成缩合反应生成的副产物。各杂质的化学结构如图 1 所示。

以上杂质中,邻硝基苯甲醛、杂质 D、杂质 C、单酰胺、对硝苯地平、间硝苯地平 6 个杂质属于合成工艺杂质,内酯杂质、去氢-N-氧化物杂质、杂质 A 和杂质 B 4 个杂质属于降解杂质。

#### 4 结论

本试验创新性地以梯度洗脱技术建立了一种检测硝苯地平原料药的高效液相分析方法,对方法的检测能力以及准确性进行了系统地评价,试验结果表明该方法对硝苯地平 6 个合成工艺杂质、4 个降解杂质以及其他未知杂质能够有效分离并准确检测。用该分析方法能够更加全面准确地检测控制硝苯地平原料药质量,保证硝苯地平原料药的质量稳定性和临床用药安全性。

#### 参考文献

- [1] 张石革. 有关硝苯地平的药理学简述及对临床评价的几点意见[J]. 当代医学, 1998, 4(1): 123  
ZHANG SG. Introduction of pathology some suggestion in clinical evaluation about nifedipine[J]. *Contemp Med*, 1998, 4(1): 123
- [2] 李公春, 田源, 李存希, 等. 硝苯地平的合成[J]. 浙江化工, 2015, 46(3): 26  
LI GC, TIAN Y, LI CX, *et al.* Synthesis of nifedipine[J]. *Zhejiang Chem Ind*, 2015, 46(3): 26
- [3] BP 2020. Vol II [S]. 2020: 404
- [4] EP 11.0 [S]. 2023: 3510
- [5] USP 43-NF 38. Vol II [S]. 2020: 3160
- [6] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 374  
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 374
- [7] 孙晓岩, 李清. HPLC 法同时检测 29 家硝苯地平制剂的有关物质[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 36(6): 469  
SHUN XY, LI Q. Determination of impurities in nifedipine preparation of 29 enterprises by HPLC[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2018, 36(6): 469
- [8] 郭常川, 谭会洁, 刘琦, 等. 超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定硝苯地平中痕量基因毒性杂质[J]. 色谱, 2022, 4(3): 266  
GUO CC, TAN HJ, LIU Q, *et al.* Determination of trace genotoxic impurities in nifedipine by ultra high performance liquid chromatography-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 4(3): 266
- [9] 朱培曦, 丁丽霞, 何佳佳, 等. 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速鉴定硝苯地平原料药中的杂质[J]. 色谱, 2012, 30(10): 1026  
ZHU PX, DING LX, HE JJ, *et al.* Rapid characterization of impurities in the bulk drug of nifedipine by high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(10): 1026
- [10] KONDO S, KUCHIKI A, YAMAMOTO K, *et al.* Identification of nifedipine metabolites and their determination by gas chromatography[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1980, 28(1): 1
- [11] 夏振华, 井凤鸣, 周艳. HPLC 法测定药物主成分及杂质方法验证探讨[J]. 药学与临床研究, 2012, 20(4): 364  
XIA ZH, JING FM, ZHOU Y. Determination of principal components and impurities by HPLC[J]. *Pharm Clin Res*, 2012, 20(4): 364
- [12] 化学药品的杂质研究技术指导原则[S]. 2005: 1  
Guidelines for Research of Impurities in Chemical Drugs [S]. 2005: 1
- [13] 许明哲, 黄宝斌, 杨青云, 等. 分析方法验证转移和确认概念解析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 169  
XU MZ, HUANG BB, YANG QY, *et al.* Elaboration on the concepts of analytical method validation transfer and verification[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(1): 169
- [14] 李正邦. 浅谈有关物质分析方法验证的接受标准[J]. 中国药品标准, 2016, 17(4): 246  
LI ZB. Discussion on acceptance criteria of analytical method validation of related substances [J]. *Drug Stand China*, 2016, 17(4): 246
- [15] 陈凤岩, 李金锁. 硝苯地平有关物质检查方法探讨[J]. 河北医科大学学报, 2009, 30(4): 406  
CHEN FY, LI JS. Explore on determination method of nifedipine related substances[J]. *J Hebei Med Univ*, 2009, 30(4): 406
- [16] 陈龙华, 刘旺培. 硝苯地平制剂有关物质检查方法的改进[J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 54  
CHEN LH, LIU WP. Improvement of related substances test method for nifedipine preparations[J]. *Strait Pharm J*, 2017, 29(2): 54
- [17] 沙振芳, 高海, 孙文基, 等. 硝苯地平及有关杂质的 HPLC 测定法[J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(4): 176  
SHA ZF, GAO H, SUN WJ, *et al.* Quantitative analysis of nifedipine and related impurities[J]. *Chin J Pharm*, 1993, 24(4): 176

(本文于 2024 年 4 月 19 日收到)