

# 利用高动态范围二极管阵列检测器同时测定盐酸氨溴索主成分和有关物质

## 应用简报

制药行业

### 作者

余彦海 杨新磊

安捷伦科技(中国)有限公司

### 摘要

药物在合成、制剂过程中，往往会生成副产物或引入外来杂质，因此各国药典都会对原料\制剂中的主成分和有关物质进行含量\限量规定，并采用相应的方法进行测定。以紫外型检测器为例，由于检测器动态范围限制以及主成分和有关物质在原料\制剂中的含量差异巨大，现有的法规一般都是采用主成分和有关物质分开测定的方法。本文基于安捷伦高动态范围二极管阵列检测器 (HDR-DAD) 技术，可以在准确测定有关物质的同时保证主成分响应也在检测器的线性范围内，使得在一次运行中可同时测定主成分和有关物质，从而改进了现行方法中对于主成分和有关物质必须分开测定的操作，极大提高了分析效率与数据质量。

### 前言

化学原料药及其制剂是保证人体健康的重要药用物质，通常我们主要关注其产生治疗作用的主成分含量。但随着药物的使用，会观察到药物的许多与治疗无关的副作用或毒性作用，这通常是药物合成、制剂过程中产生的副产物和杂质引起或导致的。因此，法规对药物原料\制剂都规定了主成分及有关物质的含量\限量。高效液相色谱连接紫外型检测器是药物主成分和有关物质测定最为常用的方法，但是由于检测器的动态范围限制以及主成分和有关物质在原料\制剂中的含量差异巨大，测定两者的含量不可能在一次运行中完成，因而现有的法规方法一般都是采用主成分和有关物质分开测定。

安捷伦创新的高动态范围二极管阵列检测器 (HDR-DAD) 技术，串联两个 DAD 模块，分别使用 60 mm 超高灵敏度流通池来检测低含量组分，使用 3.7 mm 流通池来检测高含量组分，再将两个检测器所得信号拟合合成 10 mm 流通池信号。采用这种技术后，可使检测器线性范围比传统紫外型检测器提高近 30 倍，如图 1 所示。本文将该技术运用到盐酸氨溴索<sup>[1]</sup>主成分和有关物质的含量测定中，将原有法规方法两次测定优化改进为一次测定，大大降低了测定时的人工、时间和试剂成本，提高了效率<sup>[2]</sup>。



Agilent Technologies

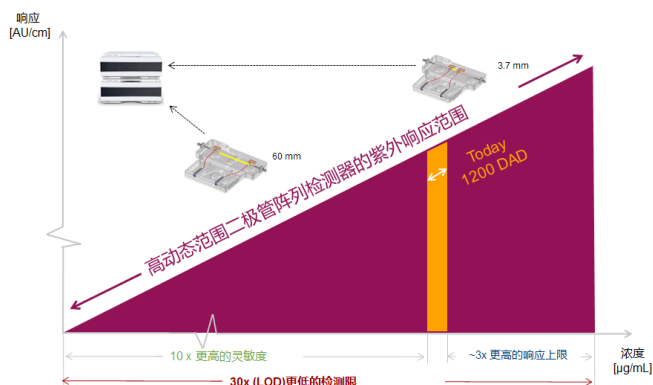


图 1. HDR-DAD 技术示意图

## 实验部分

### 材料与试剂

盐酸氨溴索，由上海市药品检验所提供；乙腈，购自德国默克 (MERCK)；磷酸氢二铵、磷酸，购自上海安谱 (ANPEL)；超纯水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水。

### 仪器配置

本实验所使用的 Agilent 1260 Infinity UHPLC/ HDR-DAD 系统由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 四元泵：部件号 G1311B
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器：部件号 G1329B
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱：部件号 G1316A
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器：部件号 G4212A，配 60 mm 超高灵敏度流通池
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器：部件号 G4212B，配 3.7 mm 流通池
- 软件：Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition C01.05

### 液相色谱条件

色谱柱： Agilent Zorbax SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm

流动相： A, 0.01 mol/L 磷酸氢二铵溶液  
(用磷酸调节 pH 值至 7.0)

B, 乙腈

梯度：	时间 (min)	%B
	0	10
	1	20
	4	50
	8	70
	20	70

流速： 1.0 ml/min

进样量： 20 µL

柱温： 35 °C

检测器波长： 248 nm

后运行时间： 10 min

### 对照品和供试品溶液的制备

参考 2015 年版《中国药典》二部中所述盐酸氨溴索有关物质测定方法<sup>[1]</sup>，取盐酸氨溴索适量，精密称定，加等体积流动相 A 和流动相 B 溶解并稀释成每 1 mL 含有 1 mg 盐酸氨溴索的溶液，作为供试品溶液；精密量取 1 mL 供试品溶液，置 100 mL 容量瓶中，用等体积流动相 A 和流动相 B 稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

## 结果与讨论

### 自身对照法测定结果 (药典方法)

使用常规液相色谱系统，按照上述色谱条件分别对供试品溶液和对照溶液进行分析，所得结果如图 2 所示。结果显示，供试品溶液中盐酸氨溴索主峰响应值大于 3500 mAU，远远超过检测器线性范围，导致有关物质不能用面积归一化法直接计算出含量，必须采用自身对照的方式在同等条件下再运行对照溶液，取对照溶液的主峰作为有关物质含量判断的依据。取供试品溶液各有关物质峰面积与对照溶液主峰面积，计算有关物质百分含量，结果见表 1。

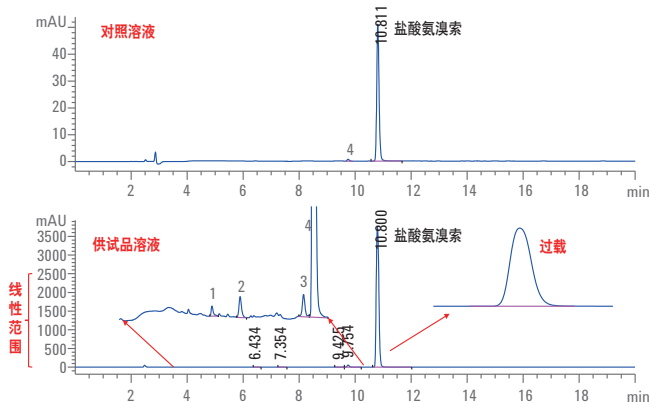


图 2. 采用自身对照法测定盐酸氨溴索主成分和有关物质所得色谱图

表 1. 采用自身对照法测定有关物质所得结果

色谱峰	有关物质峰峰面积	自身对照主峰峰面积	有关物质含量 (%)
杂质 1	2.1	299.6	0.007
杂质 2	4.8	299.6	0.016
杂质 3	5.5	299.6	0.018
杂质 4	308	299.6	1.028

### HDR-DAD 法测定结果

使用配置了 HDR-DAD 检测器的液相色谱系统，按照上述实验条件对供试品溶液进行分析，所得结果如图 3 所示。采用 HDR-DAD 检测器检测的线性响应值最高可达 6700 mAU，而供试品溶液中盐酸氨溴索的主峰响应值为 5000 mAU 左右，因此可直接采用面积归一化法计算得出有关物质的百分含量，如表 2 所示。

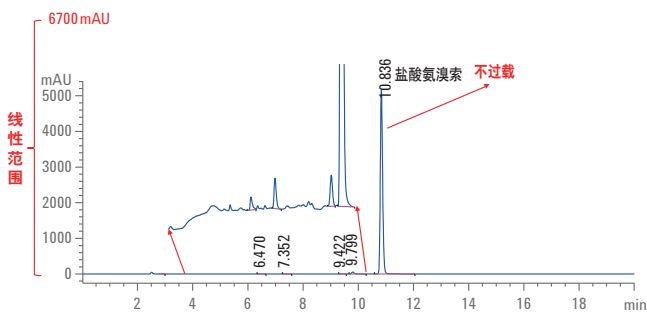


图 3. 采用 HDR-DAD 方法测定盐酸氨溴索主成分和有关物质所得色谱图

### 测定方法的比较

如表 2 所示，比较 HDR-DAD 法、自身对照法、常规法这三种测定方法所得有关物质含量，其中常规法是指通过供试品溶液色谱图中有关物质峰和主峰的面积归一化直接计算出含量的方法。可以看出采用 HDR-DAD 方法和自身对照法所得的有关物质含量很接近，最大误差小于 0.01%，而采用常规法所得结果与另外两种方法相比差异较大，最大相差 0.2%。

表 2. HDR-DAD 法、自身对照法、常规法测定有关物质所得结果的比较

色谱峰	有关物质含量 (%)		
	HDR-DAD 法	自身对照法	常规法
杂质 1	0.007	0.007	0.008
杂质 2	0.016	0.016	0.019
杂质 3	0.017	0.018	0.031
杂质 4	1.038	1.028	1.243

对比 HDR-DAD 法和自身对照法的色谱数据可以得到，取相同时间段的基线作为噪音标准，两种方法所得信噪比存在显著性差异，如表 3 所示。HDR-DAD 技术在相同色谱条件下，能够获得比常规检测技术高 4-5 倍的信噪比，对有关物质的分析而言，这将大大提高检测的灵敏度和准确度。

表 3. HDR-DAD 与自身对照法的信噪比比较

色谱峰	HDR-DAD 法信噪比	自身对照法信噪比	差距(倍率)
杂质 1	97.2	22.3	4.4
杂质 2	226.4	42.8	5.3
杂质 3	230.1	46.3	5.0
杂质 4	15000	3019.9	5.0

### HDR-DAD 法重复性结果

使用配置了 HDR-DAD 检测器的液相色谱系统，连续进样 3 针盐酸氨溴索供试品溶液，进行方法重复性讨论。如图 4 和表 4 所示，此方法的各有关物质峰和主峰重复性良好，保留时间 RSD < 0.05%，主成分含量 RSD < 0.005%，有关物质含量 RSD < 3.6%。

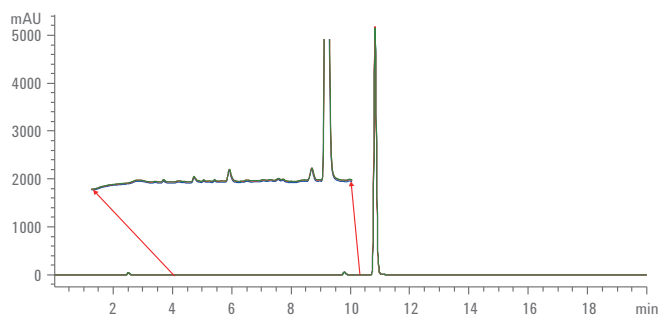


图 4. HDR-DAD 法重复性色谱图

表 4. HDR-DAD 法重复性结果 (n=3)

色谱峰	杂质 1	杂质 2	杂质 3	杂质 4	主峰	
保留时间 (min)	6.470	7.352	9.422	9.799	10.836	
	6.469	7.357	9.429	9.801	10.834	
	6.467	7.359	9.431	9.800	10.835	
	平均值	6.469	7.356	9.427	9.800	10.835
标准偏差	0.002	0.004	0.005	0.001	0.001	
相对标准偏差 (%)	0.024	0.049	0.050	0.010	0.009	
含量 (%)	0.007	0.016	0.017	1.038	98.923	
	0.007	0.017	0.017	1.042	98.917	
	0.007	0.016	0.017	1.046	98.914	
	平均值	0.007	0.016	0.017	1.042	98.918
	标准偏差	-	0.001	-	0.004	0.005
相对标准偏差 (%)	-	3.6	-	0.4	0.005	

## 结论

本文采用 HDR-DAD 技术分析盐酸氨溴索主成分和有关物质，只需一次运行就可以同时获得主成分和有关物质的含量，大大提高了日常分析检测效率，并且该结果与药典所述自身对照法所得结果高度一致。灵敏度方面，采用 HDR-DAD 技术进行检测时，各有关物质的信噪比提高 4-5 倍，不仅保证了低含量有关物质含量测定的准确性，同时还有利于更低含量有关物质的发现。结果表明，HDR-DAD 技术非常适用于药物有关物质和主成分含量的同时测定。

## 参考文献

1. 中国药典 2015 年版（二部），2015:1058 页
2. Impurity Testing of Fixed-Dose Combination Drugs Using the Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution, 5991-5743EN

查找当地的安捷伦客户中心：

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)**

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

**[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价：

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

**[www.agilent.com](http://www.agilent.com)**

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016年04月15日，中国印刷

5991-6843CHCN



**Agilent Technologies**