



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115950999 A

(43) 申请公布日 2023.04.11

(21) 申请号 202211652696.7

(22) 申请日 2022.12.21

(71) 申请人 武汉嘉诺康医药技术有限公司

地址 430200 湖北省武汉市光谷生物医药
企业加速器3.1期2栋5楼

(72) 发明人 蒋潇潇

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通
合伙) 42001

专利代理师 陈玲玲 余晓雪

(51) Int. Cl.

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中API
游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法

(57) 摘要

本发明属于药物分析技术领域,具体涉及一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中API游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法。该检测方法为:采用二羟丙基键合相的亲水相互作用色谱柱,以磷酸盐和乙酸铵混合液为强洗脱流动相,以乙腈为弱洗脱流动相,以强洗脱流动相:弱洗脱流动相=20:80,v/v,进行等度洗脱,所述强洗脱流动相为5mM磷酸二氢钾和10mM乙酸铵,并用乙酸调节pH至4.4~4.5;其色谱条件:流动相流速为0.9~1.1mL/min;色谱柱温度为30~45℃;检测器所用紫外检测器,检测波长为210~220nm。该检测方法操作简单、成本低,能够同时分离游离碱和有机酸,二者之间的分离度远大于2.0,且游离碱和有机酸的峰型良好,拖尾因子均在0.8~1.5之间,为产品的研发和生产提供了简便、稳定、可靠的分析检测方法。

1. 一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中活性药物成分游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法,其特征在于:采用二羟丙基键合相的亲水相互作用色谱柱,以磷酸盐和乙酸铵混合液为强洗脱流动相,以乙腈为弱洗脱流动相,以强洗脱流动相:弱洗脱流动相=20:80,v/v,进行等度洗脱,所述强洗脱流动相为5mM磷酸二氢钾和10mM乙酸铵混合液,其pH=4.4~4.5;

检测采用如下的色谱条件:

流动相流速为0.9~1.1mL/min;

色谱柱温度为30~45℃;

检测器所用紫外检测器,检测波长为210~220nm。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述色谱柱为广州菲罗门Titank HILIC。

3. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述色谱柱的规格为:250mm*4.6mm, 5um。

4. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述色谱柱温度为40℃。

5. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述流动相流速为1.0mL/min。

6. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述检测波长为210nm。

7. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述进样量为10μL。

8. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,待测样品经洗脱流动相配制成样品溶液后,注入至色谱柱中进行检测。

一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中API游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物分析技术领域,具体涉及一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中API(活性药物成分)游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法。

背景技术

[0002] 重酒石酸去甲肾上腺素为肾上腺素受体激动药,注射液由HOSPIRA开发,于1950年7月首次在美国获批上市,商品名为LEVOPHED。是强烈的 α 受体激动药,同时也激动 β 受体。通过 α 受体激动,可引起血管极度收缩,使血压升高,冠状动脉血流量增加;通过激动 β 受体,使心肌收缩加强,心排出量增加。早在20世纪50年代,去甲肾上腺素是休克治疗主要升压药。国内一项Meta分析结果显示:在感染性休克患者中,与多巴胺相比,去甲肾上腺素能使住院期间死亡风险降低12%,其差异具有统计学意义;多巴胺组感染性休克患者心律失常事件发生风险是去甲肾上腺素组的2.63倍;多巴胺组心脏指数较去甲肾上腺素组增加;但在心率及平均动脉压方面,两组差异无统计学意义。根据系统评价结果,去甲肾上腺素在改善感染性休克患者血流动力学、降低病死率及安全性等方面均优于多巴胺。近年来的一些研究还表明:对于容量复苏效果不理想的感染性休克患者,去甲肾上腺素与多巴酚丁胺合用,可以改善组织灌注与氧输送,增加冠状动脉和肾脏的血流以及肌酐清除率,降低乳酸水平,而不加重器官的缺血。

[0003] 据报道,大约50%的药物都能与某种形式的盐结合。许多API缺乏治疗性生物利用度所需的溶解度。因此,将不溶性API与可溶性盐结合,可以提高生物利用度并减少达到治疗效果所需的API用量。鉴定并定量游离碱和配对有机酸是制药行业非常重要的质控环节。

[0004] 去甲肾上腺素和酒石酸均为极性较大的物质,但酸碱性具有较大的差异。各国药典中对于去甲肾上腺素有关物质的检测方法是通过使用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,在流动相中添加离子对试剂例如庚烷磺酸钠,来增强游离碱去甲肾上腺素在酸性条件下的保留。但在该条件下,酒石酸几乎没有保留,因此无法分析酒石酸。且各国药典该品种项下没有收载配对有机酸L-酒石酸的检测方法。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本申请发明人通过大量理论调研和实验探索,提供了一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中活性药物成分(API)游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法,从而更好地控制重酒石酸去甲肾上腺素产品质量。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供的技术方案是:

[0007] 一种同时检测重酒石酸去甲肾上腺素中活性药物成分(API)游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法:采用二羟丙基键合相的亲水相互作用(HILIC)色谱柱,以磷酸盐和乙酸铵缓冲液为强洗脱流动相,以乙腈为弱洗脱流动相,以强洗脱流动相:弱洗脱流动相=20:80(v/v)混合液进行等度洗脱,所述高效液相色谱分析方法检测采用如下的色谱条件:

- [0008] 流动相流速为0.9~1.1mL/min;
- [0009] 色谱柱温度为30~45℃;
- [0010] 检测器所用紫外检测器,检测波长为210~220nm;
- [0011] 优选的,所述色谱柱为广州菲罗门Titank HILIC (250mm*4.6mm,5um);
- [0012] 优选的,所述强洗脱流动相为5mM磷酸二氢钾和10mM乙酸铵混合液(磷酸二氢钾和乙酸铵的浓度均指在混合液中的浓度),pH=4.4~4.5(用乙酸调节);
- [0013] 优选的,色谱柱温度为40℃;
- [0014] 优选的,所述检测波长为210nm;
- [0015] 优选的,所述流动相流速为1.0mL/min;
- [0016] 优选的,进样量为10μL。
- [0017] 进一步的,所述检测方法包括如下步骤:
- [0018] 1.1用稀释剂配制待测样品溶液,所述稀释剂与所述洗脱流动相相同,为5mM磷酸二氢钾和10mM乙酸铵混合液(用乙酸调节pH至4.4~4.5):乙腈=20:80;
- [0019] 1.2将步骤1.1所得的待测样品溶液注入到高效液相色谱仪的色谱柱中进行检测。
- [0020] 本发明方法与现有技术相比具有以下优点和有益效果:
- [0021] 1、实现了对重酒石酸去甲肾上腺素中活性药物成分(API)游离碱与配对有机酸的HPLC检测方法,因此本发明的检测方法能够更好地实现对原料药重酒石酸去甲肾上腺素的质量控制,提高最终产品的品质,保证了其临床用药的安全有效。
- [0022] 2、检测方法操作简单、成本低,能够同时分离游离碱和有机酸,二者之间的分离度远大于2.0,且游离碱和有机酸的峰型良好,拖尾因子均在0.8~1.5之间,为产品的研发和生产提供了简便、稳定、可靠的分析检测方法。
- [0023] 需要说明的是:本发明中单位“mM”均是指mmol/L。

附图说明

- [0024] 图1为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(10mM乙酸铵,pH4.40)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0025] 图2为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(30mM乙酸铵,pH4.50)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0026] 图3为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(50mM乙酸铵,pH4.46)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0027] 图4为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾,pH4.70)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0028] 图5为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(10mM磷酸二氢钾,pH4.75)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0029] 图6为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾+50mM乙酸铵,pH4.4)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0030] 图7为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾+40mM乙酸铵,pH4.4)中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;
- [0031] 图8为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,

pH4.4) 中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;

[0032] 图9为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵, pH4.2) 中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况;

[0033] 图10为重酒石酸去甲肾上腺素原料药在缓冲液(5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵, pH4.5) 中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况。

具体实施方式

[0034] 为便于本领域技术人员理解本发明内容,下面结合具体实施例进一步描述本发明的技术方案,但以下内容不应以任何形式限制本发明权利要求书请求保护的范围。

[0035] 本发明实施例中所涉及的参数项的调整测试,包括缓冲液种类、浓度及pH的筛选与优化,柱温的优化,流速与有机相比比例的研究,逐一阐述如下:

[0036] 以下诸实施例中,所用仪器与试剂如下:

[0037] 仪器:热电U3000高效液相色谱仪。

[0038] 试剂:甲醇、乙腈、磷酸、磷酸二氢钾均为色谱级;

[0039] 乙酸铵为分析级;

[0040] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药为申请人自制。L-酒石酸对照品购自麦克林。以下化合物为重酒石酸去甲肾上腺素原料药中可能产生的杂质:EP-A(肾上腺素)、EP-B(去甲肾上腺酮)、EP-C(多巴胺)、NEL-SI-05-IMP-11(肾上腺酮)、NEL-SI-05-IMP-14(去甲肾上腺素磺化物)对照品为申请人自制;EP-D((R)-4-(2-氨基-1-甲氧乙基)苯-1,2-二醇盐酸盐)对照品购自QCS。

[0041] 色谱柱Titank HILIC(250mm*4.6mm,5um)购自广州菲罗门科学仪器有限公司。

[0042] 实施例1考察重酒石酸去甲肾上腺素原料药在不同缓冲液中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型情况,步骤如下:

[0043] 稀释剂:乙腈:A相=80:20,v/v;

[0044] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,用稀释剂稀释并定容,摇匀即得。

[0045] 色谱柱:Titank HILIC(250mm*4.6mm,5um)

[0046] 色谱仪器:Thermo U3000高效液相色谱仪

[0047] B相为乙腈;采集波长220nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;

[0048] A相为不同种类的缓冲液;

[0049] 以A相:B相=20:80等度洗脱;

[0050] A相种类与浓度:

	乙酸铵	磷酸盐
[0051]	10mM 乙酸铵 pH4.40	5mM 磷酸二氢钾 pH4.70
	30mM 乙酸铵 pH4.50	10mM 磷酸二氢钾 pH4.75
	50mM 乙酸铵 pH4.46	

[0052] 注:缓冲液配制方式:

[0053] 10mM 乙酸铵 pH4.40: 称取乙酸铵 0.77g 加入 1L 纯化水中, 用乙酸调节 pH 至 4.40。

[0054] 30mM 乙酸铵 pH4.50: 称取乙酸铵 2.31g 加入 1L 纯化水中, 用乙酸调节 pH 至 4.50。

[0055] 50mM 乙酸铵 pH4.46: 称取乙酸铵 3.85g 加入 1L 纯化水中, 用乙酸调节 pH 至 4.46。

[0056] 5mM 磷酸二氢钾 pH4.70: 称取磷酸二氢钾 0.68g 加入 1L 纯化水中, 溶解后超声脱气, 测得 pH 为 4.70。

[0057] 10mM 磷酸二氢钾 pH4.75: 称取磷酸二氢钾 1.36g 加入 1L 纯化水中, 溶解后超声脱气, 测得 pH 为 4.75。

[0058] 结果如下图 1-图 5 及表 1 所示:

[0059] 表 1 重酒石酸去甲肾上腺素原料药在不同缓冲液中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸 L-酒石酸的保留与峰型实验结果汇总

条件	保留时间/min		拖尾因子	
	L-酒石酸	去甲肾上腺素	L-酒石酸	去甲肾上腺素
10mM 乙酸铵 pH4.40	5.825	10.790	0.74	2.18
30mM 乙酸铵 pH4.50	10.630	8.038	1.80	2.11
50mM 乙酸铵 pH4.46	13.852	7.773	1.07	1.51
5mM 磷酸二氢钾 pH4.70	3.721	14.628	0.64	0.81
10mM 磷酸二氢钾 pH4.75	5.478	9.827	0.78	0.71

[0061] 从图 1~5 及表 1 结果可以看出: 使用磷酸盐时, 去甲肾上腺素与 L-酒石酸峰型均前沿; 使用乙酸铵时, 去甲肾上腺素峰拖尾, 不对称度随盐浓度增加, 有所改善。因此考虑使用磷酸盐和乙酸铵的混合体系。无论是使用乙酸铵还是磷酸盐, 在所使用的 pH4.40~4.75 之间, 随着盐浓度增加, L-酒石酸的保留增强, 去甲肾上腺素的保留减弱; 且在使用乙酸铵时, 该现象更为明显, 致使二者的出峰顺序 10mM 乙酸铵与 30mM 乙酸铵条件下发生反转, 50mM 乙酸铵与 10mM 乙酸铵相比, 出峰顺序也发生了反转。该现象可能的原因为: 去甲肾上腺素含氨基, 有弱碱性, 其 pKa 为 8.3; L-酒石酸为弱酸, 其 pKa 为 3.1; 在 pH4.40~4.75 时, 去甲肾上腺素氨基质子化带正电, L-酒石酸 90% 以上的羧基发生电离带负电。所使用的色谱柱 Titank HILIC 键合相为二羟丙基, 为中性官能团, 不带电。当缓冲盐浓度增加时, 固定相和溶质之间的离子相互作用会受到干扰, 使离子交换对保留行为的作用降低, 而液液分配则起着更为主导的作用。对于碱性化合物而言, 较多的配对阴离子可促使中性离子对的形成, 而使其在疏水流动相中的溶解度提高, 因此, 固定相上碱性分析物的保留时间随缓冲溶液的浓度升高而缩短。对于酸性化合物而言则相反, 此时流动相的摩尔强度升高可导致酸性分析物的保留时间延长。随着流动相的摩尔浓度升高, 来自带负电的硅醇的离子排斥作用就减弱, 从而促使酸性化合物进一步与固定相作用, 导致保留时间增加。

[0062] 实施例 2 考察使用磷酸盐和乙酸铵的混合体系时, 乙酸铵的浓度对于重酒石酸去甲肾上腺素原料药中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸 L-酒石酸的保留与峰型的影响:

- [0063] 稀释剂:乙腈:A相=80:20,v/v;
- [0064] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,用稀释剂稀释并定容,摇匀即得。
- [0065] 色谱柱:Titank HILIC (250mm*4.6mm,5um)
- [0066] 色谱仪器:Thermo U3000高效液相色谱仪
- [0067] B相为乙腈;采集波长220nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;
- [0068] A相为不同磷酸盐和乙酸铵的混合体系;
- [0069] 以A相:B相=20:80,v/v等度洗脱;
- [0070] A相种类与浓度:
- [0071] 5mM磷酸二氢钾+50mM乙酸铵,pH4.4;
- [0072] 5mM磷酸二氢钾+40mM乙酸铵,pH4.4;
- [0073] 5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,pH4.4。
- [0074] 注,缓冲液配制方式:
- [0075] 5mM磷酸二氢钾+50mM乙酸铵,pH4.4:称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵3.85g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.4。
- [0076] 5mM磷酸二氢钾+40mM乙酸铵,pH4.4:称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵3.08g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.4。
- [0077] 5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,pH4.4:称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵0.77g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.4。结果如下图6-图8及表2所示:
- [0078] 表2使用磷酸盐和乙酸铵的混合体系时,乙酸铵的浓度对于重酒石酸去甲肾上腺素原料药中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型的影响实验结果汇总

条件	保留时间/min		拖尾因子	
	L-酒石酸	去甲肾上腺素	L-酒石酸	去甲肾上腺素
[0079] 5mM 磷酸二氢钾 +50mM 乙酸铵 pH4.4	14.517	8.053	0.68	0.99
5mM 磷酸二氢钾 +40mM 乙酸铵 pH4.4	13.068	8.110	0.68	1.01
5mM 磷酸二氢钾 +10mM 乙酸铵 pH4.4	7.258	9.590	1.29	1.04

- [0080] 从图6~8及表2结果可以看出:使用5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵pH4.4时,即乙酸铵浓度为10mM时,L-酒石酸和去甲肾上腺素的拖尾因子分别为1.29和1.04,满足在0.8~1.5的范围内,峰型良好。因此选择磷酸盐浓度为5mM,乙酸铵浓度为10mM。
- [0081] 实施例3考察缓冲液pH的影响:
- [0082] 稀释剂:乙腈:A相=80:20,v/v;
- [0083] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,用稀释剂

稀释并定容,摇匀即得。

[0084] 色谱柱:Titank HILIC (250mm*4.6mm,5um)

[0085] 色谱仪器:Thermo U3000高效液相色谱仪

[0086] B相为乙腈;采集波长220nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;

[0087] A相为5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,pH分别用乙酸调节为4.2、4.4与4.5;

[0088] 注缓冲液配制方式:

[0089] 5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵 (pH4.2):称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵0.77g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.2。

[0090] 5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵 (pH4.4):称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵0.77g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.4。

[0091] 5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵 (pH4.5):称取磷酸二氢钾0.68g和乙酸铵0.77g加入1L纯化水中,用乙酸调节pH至4.5。

[0092] 以A相:B相=20:80,v/v等度洗脱;

[0093] 结果如下图8-10及表3所示:

[0094] 表3使用5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵在不同pH条件下,对于重酒石酸去甲肾上腺素原料药中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型的影响实验结果汇总

条件	保留时间/min		拖尾因子	
	L-酒石酸	去甲肾上腺素	L-酒石酸	去甲肾上腺素
[0095] 5mM 磷酸二氢钾 +10mM 乙酸铵 pH4.2	7.527	9.267	1.92	1.07
5mM 磷酸二氢钾 +10mM 乙酸铵 pH4.4	7.258	9.590	1.29	1.04
5mM 磷酸二氢钾 +10mM 乙酸铵 pH4.5	7.937	10.260	1.31	1.16

[0096] 从图8~10及表3结果可以看出:5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵缓冲液在pH4.2、4.4、4.5条件下,去甲肾上腺素峰型均良好,L-酒石酸拖尾因子在pH4.2时较大,pH4.4与4.5差异不大。

[0097] 实施例4柱温的优化及专属性考察:

[0098] 稀释剂:乙腈:A相=80:20,v/v;

[0099] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,用稀释剂稀释并定容,摇匀即得。

[0100] L-酒石酸定位溶液:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0101] 杂质EP-A(肾上腺素)定位溶液:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0102] 杂质EP-B(去甲肾上腺酮)与EP-C(多巴胺)定位溶液:称取杂质EP-B及EP-C各5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0103] NEL-SI-05-IMP-11(肾上腺酮)定位溶液:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0104] NEL-SI-05-IMP-14(去甲肾上腺素碘化物)定位溶液:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0105] EP-D((R)-4-(2-氨基-1-甲氧乙基)苯-1,2-二醇盐酸盐)定位溶液:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,并稀释定容,摇匀即得。

[0106] 色谱柱:Titank HILIC(250mm*4.6mm,5um)

[0107] 色谱仪器:Thermo U3000高效液相色谱仪

[0108] A相为5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,pH为4.5;

[0109] B相为乙腈;采集波长210nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃、40℃、45℃;

[0110] 以A相:B相=20:80,v/v等度洗脱;

[0111] 结果如下:

[0112] 表4不同柱温条件下,对于重酒石酸去甲肾上腺素原料药中游离碱去甲肾上腺素与配对有机酸L-酒石酸的保留与峰型的影响实验结果汇总

条件	保留时间/min		拖尾因子	
	L-酒石酸	去甲肾上腺素	L-酒石酸	去甲肾上腺素
[0113] 30℃	7.937	10.260	1.31	1.16
40℃	6.735	10.107	1.19	1.20
45℃	6.198	9.943	1.06	1.24

[0114] 从表4中可以看出,柱温在30℃~45℃时,去甲肾上腺素拖尾因子差异不大;L-酒石酸的拖尾因子在柱温为40℃和45℃时比30℃更优,接近于1.0;但考虑到色谱柱对于最高耐受温度为50℃,故将柱温设置为40℃。

[0115] 在柱温40℃时,对原料药中可能出现的杂质进行定位,各杂质的保留时间如表5所示,各杂质在L-酒石酸与去甲肾上腺素保留时间处不出峰,不干扰二者出峰,专属性良好。

[0116] 表5柱温40℃时,其他杂质的保留时间

化合物名称	保留时间/min
肾上腺素	9.140
去甲肾上腺酮	7.845
多巴胺	8.782
肾上腺酮	7.787
去甲肾上腺素碘化物	5.798
(R)-4-(2-氨基-1-甲氧乙基)苯-1,2-二醇盐酸盐	8.162

[0118] 实施例5耐用性考察-考察方法中柱温、流速、乙腈比例的耐受空间:

[0119] 稀释剂:乙腈:A相=80:20,v/v;

[0120] 重酒石酸去甲肾上腺素原料药:称取5mg于10mL量瓶中,加稀释剂溶解,用稀释剂稀释并定容,摇匀即得。

[0121] 正常色谱条件:

[0122] 色谱柱:Titank HILIC (250mm*4.6mm,5um)

[0123] 色谱仪器:Thermo U3000高效液相色谱仪

[0124] A相为5mM磷酸二氢钾+10mM乙酸铵,pH为4.5;

[0125] B相为乙腈;采集波长210nm;流速:1.0mL/min;柱温:40℃;

[0126] 以A相:B相=20:80,v/v等度洗脱;

[0127] 改变的条件:流速为0.9mL/min和1.1mL/min;柱温为35℃和45℃;A相:B相体积比为18:82和22:78。

[0128] 结果如表6所示:

[0129] 表6改变流速、柱温及乙腈比例对于L-酒石酸和去甲肾上腺素保留和峰型的影响结果汇总

条件	保留时间/min		不对称度	
	L-酒石酸	去甲肾上腺素	L-酒石酸	去甲肾上腺素
正常条件	6.735	10.107	1.19	1.20
0.9ml/min	7.447	11.150	1.16	1.20
1.1ml/min	6.087	9.125	1.12	1.19
35℃	7.247	10.145	1.24	1.18
45℃	6.198	9.943	1.06	1.24
A相: B相 22:78	5.460	8.752	1.04	1.21
A相: B相 18:82	8.078	11.798	1.08	1.21

[0131] 流速在0.9mL/min~1.1mL/min、柱温在35℃~45℃、乙腈比例在78~82v/v%之间,L-酒石酸与去甲肾上腺素的不对称度均在0.8~1.5之间,均可以满足定量分析的需求。

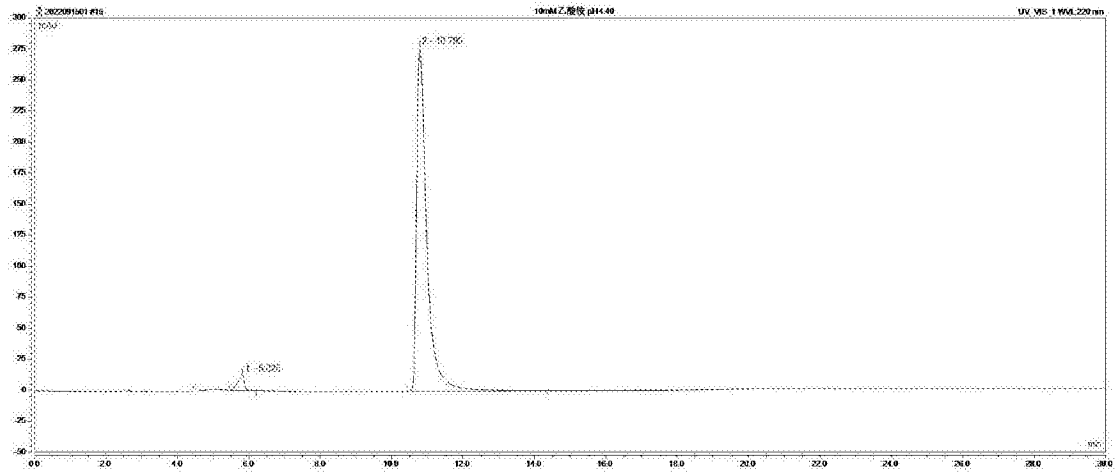


图1

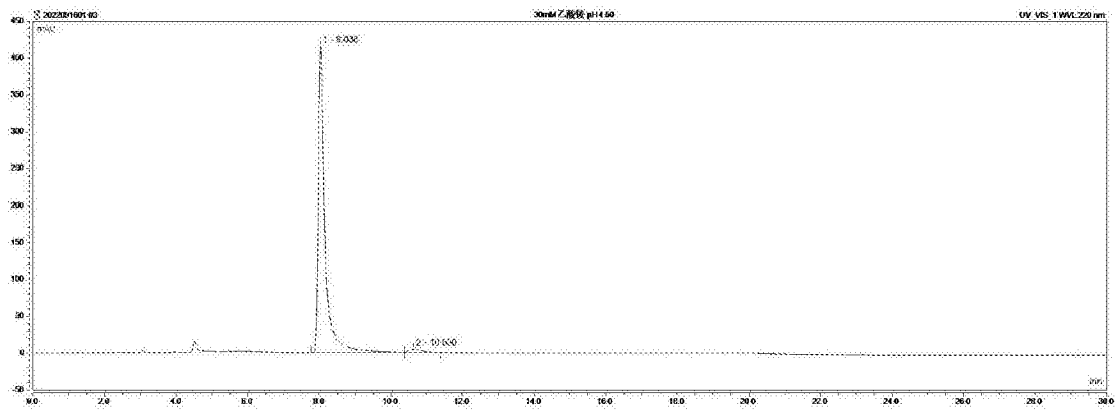


图2

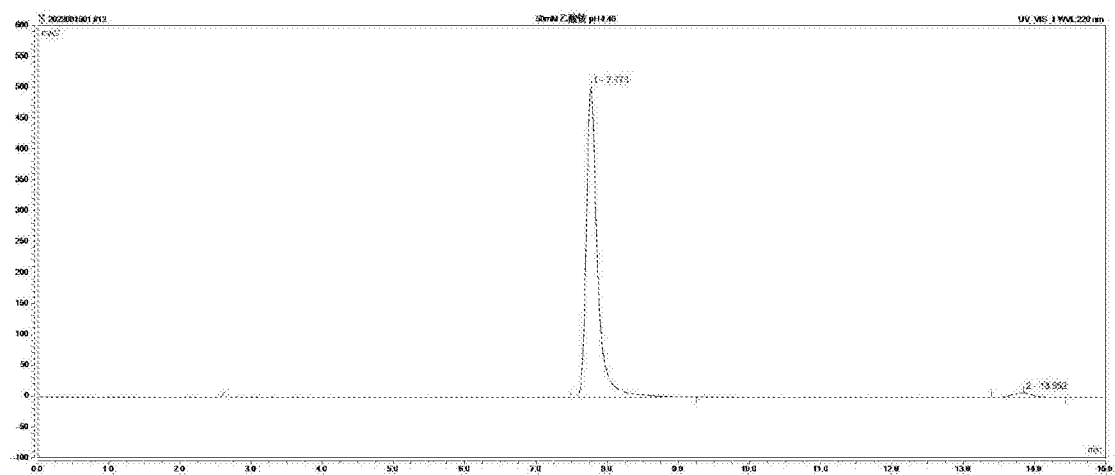


图3

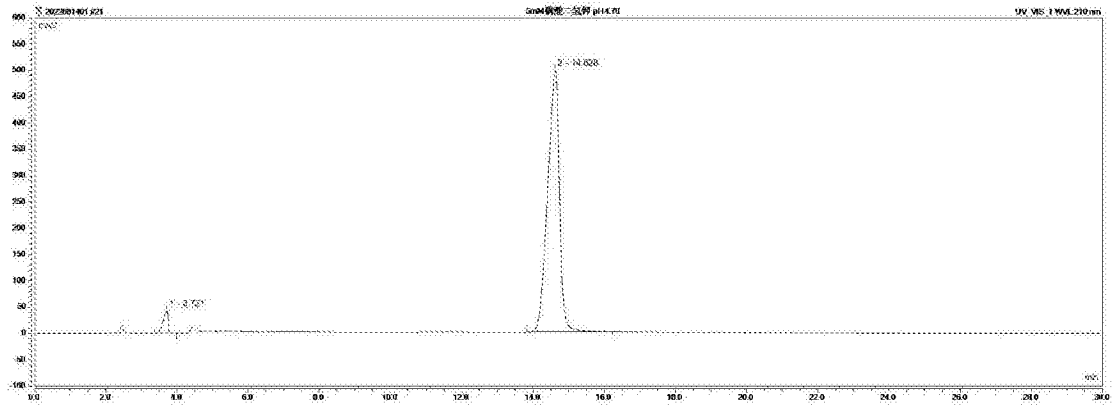


图4

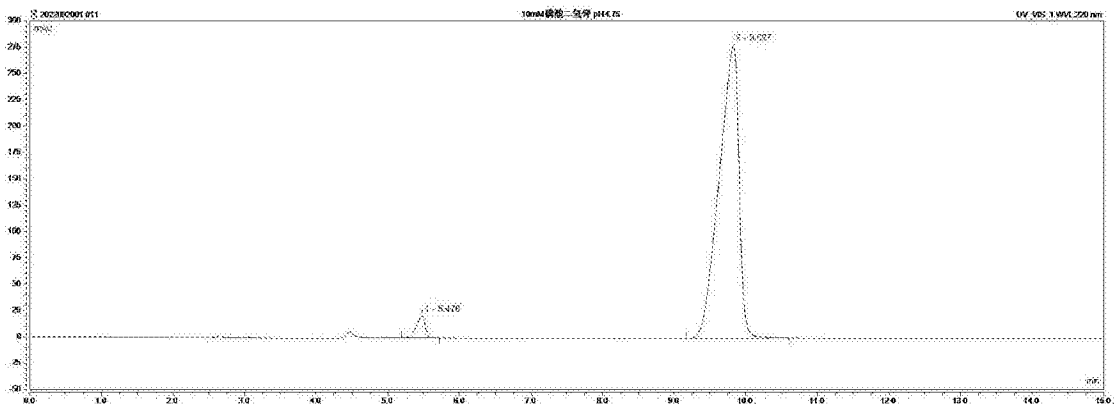


图5

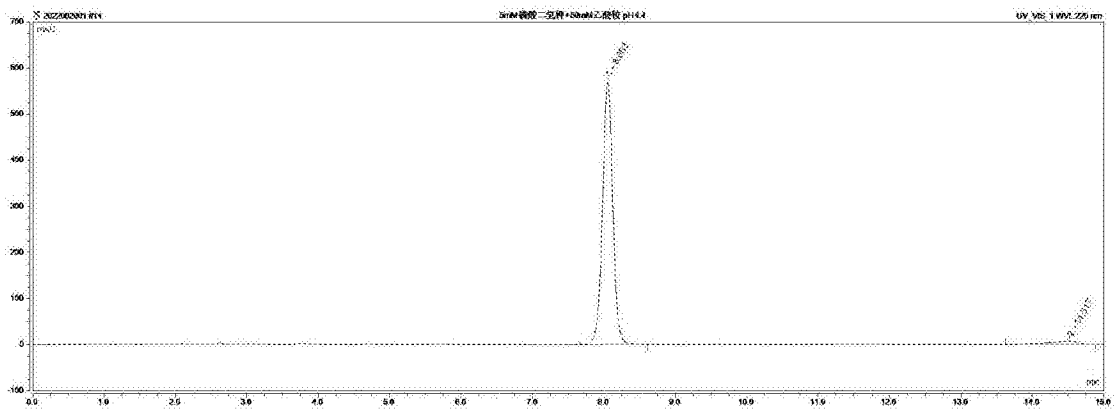


图6

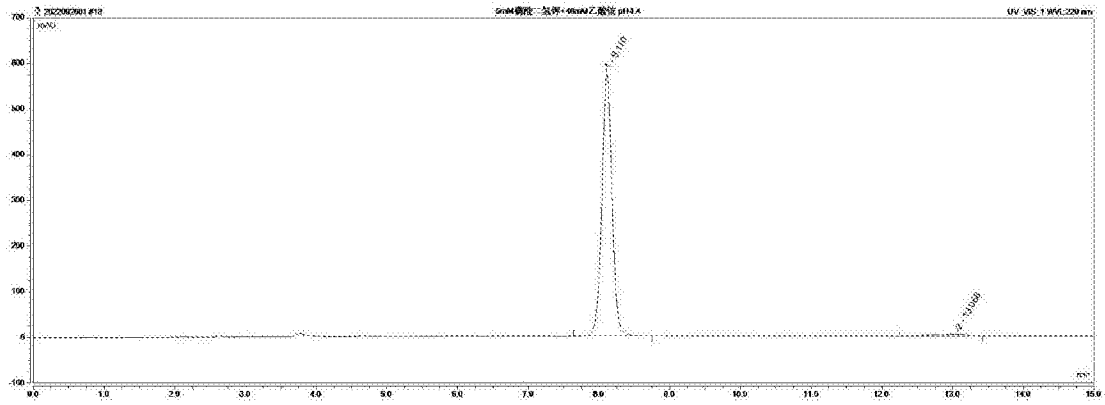


图7

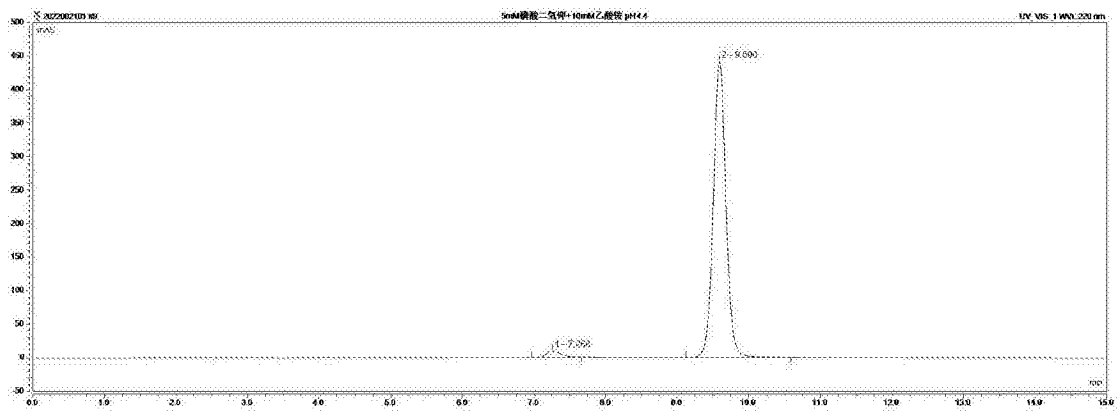


图8

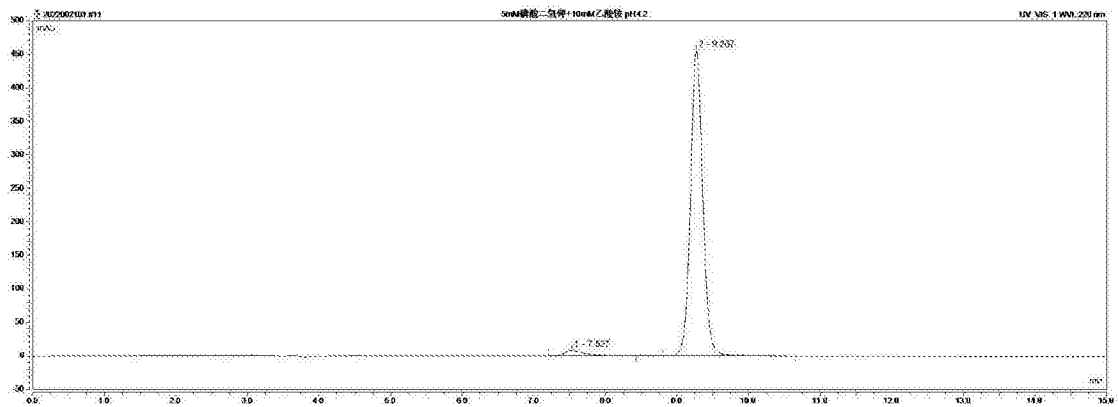


图9

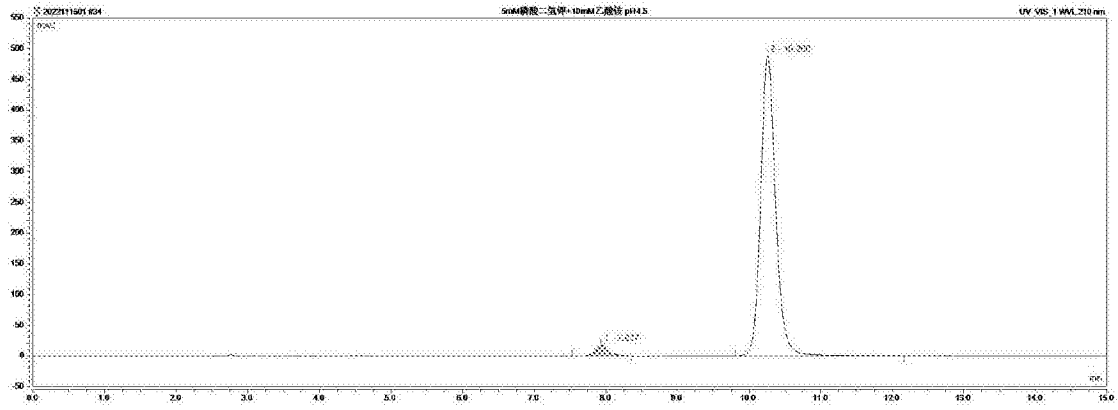


图10