

HPLC 测定盐酸苯海拉明注射液中二苯甲醇和二苯甲酮含量

冯淑玲¹, 庄波阳², 王凌¹(1.福建医科大学省立临床学院, 福建省立医院药学部, 福州 350001; 2.福建省药品检验所, 福州 350001)

摘要:目的 采用高效液相色谱法建立同时测定盐酸苯海拉明注射液中二苯甲醇和二苯甲酮的方法。方法 色谱柱 Agilent 氨基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)流动相为乙腈-20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH 值至 6.5)(50:50), 检测波长为 255 nm。结果 二苯甲醇浓度在 0.531 0~53.10 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系, r 为 1.000; 二苯甲酮浓度在 0.021 22~53.05 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系, r 为 1.000; 二苯甲醇加样回收率的平均值为 99.8%, RSD=0.8%; 二苯甲酮加样回收率的平均值为 100.4%, RSD=1.3%。结论 本方法简便、准确可靠, 适用于盐酸苯海拉明注射液中二苯甲醇和二苯甲酮两个主要有关物质的控制。

关键词: 盐酸苯海拉明注射液; 高效液相色谱法; 有关物质; 二苯甲醇; 二苯甲酮

中图分类号: R917.101 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)05-0519-04

Determination of Diphenylmethanol and Diphenylmethanone in Diphenhydramine Hydrochloride Injection by HPLC

FENG Shuling¹, ZHUANG Boyang², WANG Ling¹(1.Department of Pharmacy, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.Fujian Provincial Institute For Drug Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determining the contents of diphenylmethanol and diphenylmethanone in diphenhydramine hydrochloride injection. **METHODS** The condition of detection were: Agilent CN column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (adjust with formic acid to pH 6.5) (50:50), the UV detection wavelength was 255 nm. **RESULTS** The calibration curves were linear in the range of 0.531 0~53.10 μg·mL⁻¹ for diphenylmethanol ($r=1.000$); the calibration curves were linear in the range of 0.021 22~53.05 μg·mL⁻¹ for diphenylmethanone ($r=1.000$). The average recovery of diphenylmethanol was 99.8%(RSD=0.8%); the average recovery of diphenylmethanone was 100.4%(RSD=1.3%). **CONCLUSION** The method is simple, accurate, reliable and can be used for the quality control of diphenylmethanol and diphenylmethanone in diphenhydramine hydrochloride injection.

KEYWORDS: diphenhydramine hydrochloride injection; HPLC; related substances; diphenylmethanol; diphenylmethanone

盐酸苯海拉明为组胺 H₁ 受体拮抗剂, 主要用于治疗帕金森病。中国药典^[1]和英国药典^[2]均有收载, 盐酸苯海拉明注射液的主要杂质为二苯甲醇和二苯甲酮, 中国药典^[1]2010 版采用自身对照法在 258 nm 波长处测定盐酸苯海拉明注射液的有关物质, 但是二苯甲酮在 258 nm 紫外吸收强度显著大于苯海拉明, 采用自身对照法来控制样品中二苯甲酮杂质显得不太合理, 容易造成二苯甲酮的含量虚高, 从而使有关物质检查项不合格, 对产品的质量产生误判。虽然已经有测定盐酸苯海拉明制剂有关物质的文献报道^[3-4], 但是未见盐酸苯海拉明注射液有关物质研究及同时测定 2 个主要杂质的研究, 因此笔者建立 HPLC-UV 同时测定盐酸苯海拉明注射液中二苯甲醇和二苯甲酮, 从而更

合理反映盐酸苯海拉明注射液中有关物质的情况。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Agilent1290 高效液相色谱仪, 包括: 真空脱气机, 二元梯度泵, 自动进样器, 二极管阵列检测器, Agilent 色谱工作站(美国 Agilent 公司); Milli-QA 超纯水器(Millipore); ALP-204 电子天平(梅特勒)。

1.2 药品和试剂

二苯甲醇(Aladdin, 批号: 24030, 纯度: 99.5%)、二苯甲酮(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20091211, 纯度: 99.5%); 盐酸苯海拉明注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 0907062, 0910141, 0907071; 贵州光正制药有限责任公司, 批号:

作者简介: 冯淑玲, 女, 副主任药师 Tel: 13665032186 E-mail: fling72@163.com

091015, 100517; 广州白云山明兴制药有限公司, 批号: 091004, 100202, 100501), 乙腈和甲酸为色谱纯; 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent 氰基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Waters 氰基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH 值至 6.5)(50 : 50); 柱温: 25 °C; 检测波长: 255 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL(自动进样)。

2.2 对照品储备液、供试品溶液与空白辅料样品溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取二苯甲醇对照品适量, 加流动相制成每 1 mL 含二苯甲醇 0.531 0 mg 的溶液。精密称取二苯甲酮对照品适量, 加流动相制成每 1 mL 含二苯甲酮 0.530 5 mg 的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 2.5 mL 样品溶液置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 既得。

2.2.3 空白辅料样品溶液的制备 取盐酸苯海拉明注射液处方项下各种辅料, 制作空白样品, 并按“2.2.2”项下方法制备空白辅料样品溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 二苯甲醇、二苯甲酮和苯海拉明分离度均>3.0。

2.4 专属性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液和空白辅料样品溶液, 注入高效液相色谱仪进行测定, 实验结果空白辅料样品溶液在与对照品相应的保留时间处, 无色谱峰出现, 表明处方中辅料不干扰二苯甲醇和二苯甲酮的测定, 结果见图 1。

2.5 耐用性试验

选用 Agilent 氰基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 和 Waters 氰基柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 两根色谱柱, 分别注入供试品溶液 20 μL。结果显示, 上述 2 个厂家的色谱柱均达到基线分离, 分离度均>3.0。

2.6 破坏试验

分别精密量取 5 份盐酸苯海拉明注射液 1 mL (约含苯海拉明 25 mg), 置 10 mL 量瓶中, 其中 3 份分别加入 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL、6 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL 和 30% 双氧水 2 mL, 破坏 1 h

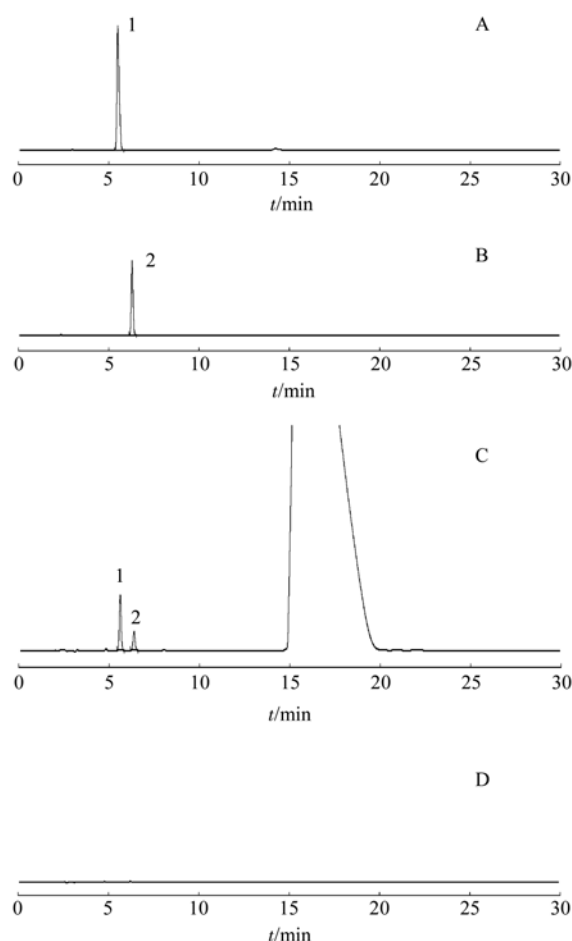


图 1 高效液相色谱图

A-二苯甲醇对照品溶液; B-二苯甲酮对照品溶液; C-供试品溶液; D-空白辅料; 1-二苯甲醇; 2-二苯甲酮

Fig 1 HPLC chromatograms

A-diphenylmethanol control solution; B-diphenylmethanone control solution; C-sample; D-excipient; 1-diphenylmethanol; 2-diphenylmethanone

后中和, 加流动相稀释至刻度。另外 2 份, 分别置 3 000 lx 光线下和 105 °C 放置 48 h 后, 加流动相稀释至刻度。取上述溶液 20 μL 进样, 分析。结果显示, 苯海拉明在酸碱条件下容易降解, 水解生成二苯甲醇; 在高温条件下容易产生二苯甲酮; 其他杂质无明显变化, 各杂质与主峰均能良好分离。

2.7 最低定量限和最低检测限

分别取二苯甲醇和二苯甲酮对照品溶液, 以不同比例稀释, 在上述液相条件下测定, 以 $S/N=10$ 确定二苯甲醇和二苯甲酮最低定量限分别为 0.531 0 μg·mL⁻¹ 和 21.22 ng·mL⁻¹; 以 $S/N=3$ 确定二苯甲醇和二苯甲酮最低检测限分别为 0.177 0 μg·mL⁻¹ 和 7.073 ng·mL⁻¹。

2.8 线性关系考察

精密量取二苯甲醇和二苯甲酮对照品贮备液

适量, 分别加流动相制成 53.10, 26.55, 4.248, 2.124, 1.062, 0.531 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 二苯甲醇对照品溶液和 53.05, 4.244, 2.122, 1.061, 0.530 5, 0.084 88, 0.042 44, 0.021 22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 二苯甲酮对照品溶液。精密吸取 20 μL , 分别注入高效液相色谱仪中, 按上述色谱条件进行测定。以对照品浓度为横坐标, 相应峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 二苯甲醇的线性方程: $A=14.297C+2.158 6$, $r=1.000$; 二苯甲酮线性方程: $A=323.35C+11.411$, $r=1.000$ 。结果表明二苯甲醇和二苯甲酮分别在 0.531 0~53.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.021 22~53.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈现良好的线性关系。

2.9 重复性试验

取同一批盐酸苯海拉明注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 0907071), 按“2.2.2”项下方法处理进样, 平行测定 6 次, 测得二苯甲醇含量为 41.95, 42.01, 42.19, 45.34, 44.42, 44.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 二苯甲酮含量为 0.375 4, 0.364 1, 0.365 2, 0.347 6, 0.352 3, 0.355 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其 RSD 分别为 3.4%和 2.8%。结果表明本法重复性良好。

2.10 回收率试验

已知含量的盐酸苯海拉明注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 0907071)9 份, 每份精密量取 1.25 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按已知杂质含量的 50%、100%和 150%分别精密加入高、中、低二苯甲醇和二苯甲酮对照品各 3 份, 加流动相稀释至刻度, 即得。取 20 μL 注入液相色谱仪测定并计算回收率, 结果二苯甲醇平均回收率为 99.8%, RSD 为 0.8%; 二苯甲酮平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.3%, 结果见表 1。

2.11 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 在室温下放置 0, 4, 8, 12, 24 h 后测定, 二苯甲醇峰面积为 56.82, 57.02, 57.37, 58.36, 58.68; 二苯甲酮峰面积为 22.41, 22.45, 23.05, 23.01, 23.41。其 RSD 分别为 1.4%和 1.9%, 说明样品溶液在配制好后 24 h 内稳定。

2.12 样品测定

取本品, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 外标法计算含量, 分别对 3 家盐酸苯海拉明注射液生产企业中 8 批样品进行二苯甲醇和二苯甲酮含量测定, 测定结果见表 2。

表 1 回收率试验

Tab 1 Results of recovery

有关物质	原有量/ μg	对照品 加入量/ μg	测得值/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
二苯甲醇	54.18	21.86	75.85	99.13		
	54.18	21.75	75.85	99.63		
	54.18	22.26	76.65	101.0		
	54.18	44.08	98.32	100.1		
	54.18	43.89	97.52	98.75	99.8	0.8
	54.18	41.25	95.91	101.2		
	54.18	65.76	119.99	100.1		
	54.18	68.94	122.40	98.96		
	54.18	66.04	119.99	99.66		
	54.18	66.04	119.99	99.66		
二苯甲酮	0.450 0	0.225 1	0.674 3	99.64		
	0.450 0	0.219 4	0.666 1	98.50		
	0.450 0	0.223 7	0.676 8	101.4		
	0.450 0	0.434 2	0.891 5	101.7		
	0.450 0	0.443 6	0.891 2	99.46	100.4	1.3
	0.450 0	0.438 6	0.896 5	101.8		
	0.450 0	0.674 2	1.127 9	100.5		
	0.450 0	0.653 5	1.113 8	101.6		
	0.450 0	0.661 7	1.102 9	98.67		
	0.450 0	0.661 7	1.102 9	98.67		

表 2 二苯甲醇和二苯甲酮含量结果

Tab 2 Determination results of diphenylmethanol and diphenylmethanone

批号	生产单位	二苯甲醇/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	二苯甲酮/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
0907062	天津金耀氨基酸有限公司	39.62	0.37
0910141	天津金耀氨基酸有限公司	37.85	0.52
0907071	天津金耀氨基酸有限公司	43.34	0.36
091015	贵州光正制药有限责任公司	18.96	0.57
100517	贵州光正制药有限责任公司	51.94	0.24
091004	广州白云山明兴制药有限公司	44.07	0.62
100202	广州白云山明兴制药有限公司	26.37	0.59
100501	广州白云山明兴制药有限公司	50.49	0.67

3 讨论

3.1 流动相的选择

中国药典 2010 年版^[1]采用乙腈-水-三乙胺 (50:50:0.5)(用冰醋酸调节 pH 值至 6.5)作为流动相, 在此色谱条件下, 二苯甲醇和二苯甲酮保留时间较短, 约为 2.5~3.0 min 之间, 容易受到溶剂峰的干扰, 从而影响测定; 此外, 两峰保留时间比较靠近, 如果杂质较大时, 可能达不到基线分离。因此, 需要对流动相进行优化, 分别考察了乙腈-20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵和甲醇-20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵 2 种流动相系统, 结果表明采用乙腈-20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙

酸铵(用甲酸调 pH 值至 6.5)(50 : 50)时 2 个杂质峰保留时间明显延长, 并且达到较好的分离, 虽然苯海拉明主峰有一定的拖尾, 但是并不影响二苯甲醇和二苯甲酮的测定, 最终选择乙腈-20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(用甲酸调 pH 值至 6.5)(50 : 50)作为流动相。

3.2 检测波长的选择

二苯甲醇在 258 nm 波长处有最大吸收, 而二苯甲酮在 255 nm 波长处有最大吸收, 由于二苯甲酮相对含量较低, 因此, 选择 255 nm 波长处作为检测波长。

3.3 检验结果

对 3 家盐酸苯海拉明注射液生产企业的 8 批样品进行测定, 结果二苯甲醇含量在 18.96~51.94 μg·mL⁻¹ 内、二苯甲酮含量在 0.24~0.67 μg·mL⁻¹ 内; 平均含量分别为 39.08 μg·mL⁻¹ 和 0.49 μg·mL⁻¹。盐酸苯海拉明注射液标示量为 20 mg·mL⁻¹, 以苯海拉明折算二苯甲醇和二苯甲酮的相对百分含量: 二苯甲醇百分含量为 0.095%~0.26%, 二苯甲酮百分含量在 0.001 2%~0.003 4%; 平均含量分别为 0.20%和 0.0024%。而按中国药典 2010 版自身对照法测定, 二苯甲醇百分含量在 0.21%~0.38%内,

二苯甲酮百分含量在 0.07%~0.28%内; 平均含量分别为 0.29%和 0.16%。由上述 2 种方法测定结果可知, 二苯甲醇含量相差不大, 而二苯甲酮的测定结果相差悬殊, 主要由于二苯甲酮在 258 nm 波长处的紫外吸收强度明显大于苯海拉明, 造成现有药典的方法对二苯甲酮的测定结果显著偏高, 从而容易引起该制剂中有关物质项不合格, 产生误判。

本试验首次建立了 HPLC 测定盐酸苯海拉明注射液中二苯甲醇和二苯甲酮的含量, 可以更加有效准确地控制苯海拉明中主要有关物质的情况。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 725-726.
- [2] BP(2000) [S]. 2000: 565-566.
- [3] JIANG Y. Determination of the related substances and the dissolution of diphenhydramine hydrochloride tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2006, 23(4): 331-333.
- [4] WU A Q, DENG H, YEI J P. Determination of benzophenone in diphenhydramine hydrochloride soft capsules by HPLC [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm(广东药学院学报), 2003, 19(4): 314-315.

收稿日期: 2012-06-19

HPLC 测定格列美脲有关物质的改进

牛冲, 刘明洁, 凌霄, 张冬梅* (山东省食品药品检验所, 济南 250101)

摘要: 目的 改进格列美脲有关物质检测的高效液相色谱法。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以磷酸二氢钠溶液(取 0.5 g 磷酸二氢钠, 加水 500 mL 溶解, 用磷酸调 pH 至 2.5)-乙腈(50 : 50)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 228 nm。结果 溶剂对杂质检测无影响, 格列美脲与已知杂质分离度良好, 杂质 1 与杂质 2 的定量限均为 10 ng·mL⁻¹, 杂质 1 在 0.304 2~2.028 μg·mL⁻¹, 杂质 2 在 0.316 2~2.108 μg·mL⁻¹ 内呈良好线性关系(*r* 分别为 0.999 5 和 0.999 7), 平均回收率分别为 100%和 99%, RSD 为 1.4%和 1.3%。结论 改进的方法消除了溶剂对杂质检测的干扰, 可用于格列美脲中有关物质的检测。

关键词: 格列美脲; 有关物质; 杂质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)05-0522-04

Improvement of HPLC Determination Method for Related Substances in Glimepiride

NIU Chong, LIU Mingjie, LING Xiao, ZHANG Dongmei* (Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China)

作者简介: 牛冲, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0531)81216550
Tel: (0531)81216550 E-mail: zhangdm1000@163.com

E-mail: ncmilan@126.com *通信作者: 张冬梅, 女, 硕士, 主管药师