

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

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the method for determining related substances in glimepiride by HPLC. **METHODS** The determination was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of 500 mL sodium dihydrogen phosphate solution (dissolve 0.5 g of sodium dihydrogen phosphate in 500 mL of water and adjust to pH 2.5 with phosphoric acid) and 50 mL of acetonitrile at the flow rate 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 228 nm. **RESULTS** The solvents had no effects on the impurity determination. An excellent separation was achieved. The LOQs of impurity 1 and 2 were both 10 ng·mL⁻¹. The linearity were found in the rang of 0.304 2–2.028 μg·mL⁻¹ and 0.316 2–2.108 μg·mL⁻¹ for impurity 1 and 2 respectively. The corresponding average recoveries were 100% with RSD 1.4% for impurity 1 and 99% with RSD 1.3% for impurity 2. **CONCLUSION** The improved method eliminated the solvent disturbance to impurity determination, and is suitable for the determination of impurities in glimepiride. **KEY WORDS:** glimepiride; related substance; impurity; HPLC

格列美脲是第 3 代磺酰脲类抗糖尿病药, 适用于单纯饮食控制和锻炼未能控制血糖的 2 型糖尿病患者。收载于国家药品标准[WS1-(X-054)-2004Z]、BP2012^[1], USP34^[2], JP16^[3]及 EP7.0^[4]。国家标准采用高效液相色谱法对杂质 1{4-[2-(3-乙基-4-甲基-2-氧-3-吡咯啉-1-甲酰胺基)乙基]苯磺酰胺甲酯}和杂质 2{4-[2-(3-乙基-4-甲基-2-氧-3-吡咯啉-1-甲酰胺基)乙基]苯磺酰胺}进行控制。实验中发现, 国家标准有关物质检验方法, 溶剂对杂质 1 的检验有干扰, 影响杂质的正常检测, 方法的耐用性较差。本实验在参考 BP2012 标准的基础上, 对色谱条件进行了适当的改进, 消除了溶剂的干扰, 为样品的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20at 高效液相色谱仪(日本岛津有限公司); BP211D 电子天平(德国赛多利斯有限公司)。格列美脲(徐州万邦金桥制药有限公司, 0906C04, 0907C01, 0907C02; 山东达因海洋生物制药股份有限公司, 081102, 100401, 100402; 重庆康刻尔制药股份有限公司, 091202, 100401, 100603)。格列美脲对照品, 批号: 100674-200301, 杂质 1 对照品: 100781-200501, 杂质 2 对照品: 中检所, 批号: 100675-200301, 对照品均由中检所提供。甲醇及乙腈均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 国家标准方法

国家标准方法采用 C₁₈ 柱, 甲醇-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(pH 3.5)(70:30)为流动相, 样品稀释液为甲醇, 检测波长为 228 nm。系统适用性无分离度的要求。按照杂质限度, 配制每 1 mL 中含格列美脲 0.2 mg、杂质 1 和 2 分别为 1.0 μg 的系统适用性溶液, 采用不同品牌及填料的色谱柱进行考察。Agilent Extend C₁₈, Agilent Zorbax C₁₈, Waters Symmetry C₁₈, Shimadzu VP-ODS, Shiseido

C₁₈, Luna C₁₈ 及 Ultima XB-C₁₈ 色谱柱上, 溶剂对杂质 1 的色谱峰存在较大干扰, 只有在 Inertsil ODS-3 色谱柱且柱温控制在 25 °C 时, 溶剂与杂质的分离度恰好符合要求。由此可见, 本方法的耐用性较差, 因此参考国外药典方法, 对流动相及稀释液进行调整。

2.2 色谱条件与系统适用性

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 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), 检测波长: 228 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 20 μL。稀释液为水-乙腈(1:4)。

2.3 溶液的制备

2.3.1 系统适用性溶液的制备 精密称取格列美脲、杂质 1 和杂质 2 对照品适量, 用稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 中含格列美脲 0.2 mg、含杂质 1 和 2 分别为 1 μg 的溶液。按“2.2”项下色谱条件进样测定。杂质 2 与杂质 1 分离度为 9.2, 杂质 1 与格列美脲分离度为 22.0, 分离度良好, 结果见图 1。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取杂质 1 和杂质 2 对照品适量, 用稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 中含杂质 1 和 2 分别为 1 μg 的溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取格列美脲适量, 用稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 中含格列美脲 0.2 mg 的溶液。

2.3.4 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 1 mL, 用稀释液稀释至 200 mL。

2.4 专属性考察

2.4.1 溶剂干扰 取稀释液, 按“2.2”项下方法进样测定, 稀释液对杂质无干扰。

2.4.2 破坏性试验 光照射试验: 将样品置于培养皿中, 摊成≤3 mm 厚的薄层, 在(5 000±500)Lx

强光下照射 2 d 后,精密称取 20 mg,置于 100 mL 量瓶中,加稀释液溶解并稀释到刻度,摇匀;强碱试验:精密称取样品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL,放置 30 min,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中和后,用稀释液稀释至刻度,摇匀;氧化破坏试验:精密称取样品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加 1% 双氧水溶液 5 mL,放置 30 min,用稀释液稀释至刻度,摇匀;强酸试验:精密称取样品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL,放置 30 min,用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液中和后,用稀释液稀释至刻度,摇匀;高温试验:将样品置于培养皿中,摊成≤3 mm 厚的薄层,在 105 °C 烘箱中放置 2 h,精密称取 20 mg,置于 100 mL 量瓶中,加稀释液溶解并稀释到刻度,摇匀。

取上述各溶液,按“2.2”项下色谱条件测定。结果表明,格列美脲在光照、高温及氧化条件下稳定,无明显降解产物。酸、碱条件下产生明显的降解产物,降解产物的色谱峰均在主峰保留时间的 2 倍内,并能与主峰基线分离,结果见图 1。

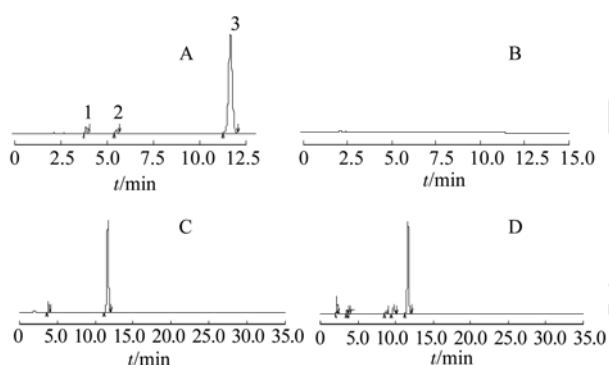


图 1 色谱图
A-系统适用性溶液; B-溶剂; C-酸破坏; D-碱破坏; 1-杂质 2; 2-杂质 1; 3-格列美脲

Fig 1 Chromatograms
A-system suitability solution; B-solvent; C-destroyed by acid; D-destroyed by alkali; 1-impurity 1; 2-impurity 2; 3-glimepiride

2.5 定量限

精密量取杂质对照品溶液 1 mL,用稀释液稀释至 100 mL,摇匀,进样 20 μL,以信噪比为 10 计算,杂质 1 和 2 定量限均为 10 ng·mL⁻¹。

2.6 线性关系考察

精密称取杂质 1 和杂质 2 对照品适量,用稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 中含杂质 1 和 2 分别为 10 μg 的溶液,精密量取 3, 5, 10, 15, 20 mL,分别用稀释液稀释至 100 mL。按“2.2”项下方法

进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,以进样浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标,进行线性回归,结果表明,杂质 1 在 0.304 2~2.028 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。 $Y=250\ 591X+14\ 118$ ($r=0.999\ 5$),杂质 2 在 0.316 2~2.108 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。 $Y=24\ 334X+12\ 138$ ($r=0.999\ 7$)。

2.7 精密度试验

取杂质对照品溶液,进样 6 次,杂质 1 与 2 峰面积 RSD 分别为 0.06% 与 0.05%,仪器精密度良好。另取格列美脲(批号: 100603),按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下方法,在不同的仪器上测定(Agilent1200 高效液相色谱仪),连续测定 3 d,杂质 1 均未检出,杂质 2 的平均含量为 0.07% (RSD=0.1%, $n=6$),表明中间精密度良好。

2.8 回收率试验

取格列美脲(批号: 100603, 杂质 1 含量: 0, 杂质 2 含量: 0.08%) 20 mg,共 9 份,分别用稀释液溶解,每 3 份分别加入杂质对照品贮备液(每 1 mL 中含杂质 1 和 2 分别为 20 μg) 0.8, 1.0 和 1.2 mL 的溶液,摇匀。精密量取 20 μL 进样,以外标法计算,结果见表 1,表明回收率良好。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery

杂质	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
杂质 1	0	17.78	17.68	99	100	1.4
			18.02	101		
			17.54	99		
	0	22.22	21.96	99		
			22.54	101		
			22.46	101		
杂质 2	20.61	16.25	15.77	97		
			16.21	100		
			16.41	101		
	20.14	20.32	20.55	101		
			20.76	20.11	99	
			20.44	20.19	99	
	20.61	24.38	24.06	99		
			20.51	24.51	101	
			20.73	23.99	98	

2.9 稳定性与重复性考察

取格列美脲(批号: 100603),按“2.2”项下方法,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样测定,杂质 2 峰面积 RSD 为 0.3%,其他杂质峰面积基本不变

且无新杂质出现,供试品 8 h 内稳定。另取格列美脲(批号:100603)6 份,按“2.2”项下方法,分别进样测定,杂质 1 均未检出,杂质 2 峰面积 RSD 为 0.1%,样品重复性良好。

2.10 耐用性考察

取“2.1”项下系统适用性溶液,采用 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱,按“2.1”项下色谱条件进样测定,杂质 2 与杂质 1 分离度为 8.2,杂质 1 与格列美脲分离度为 30.5。溶剂对杂质检测无干扰,耐用性良好。

2.11 供试品测定

取格列美脲,按“2.2”项下方法及国家标准 WS₁-(X-054)-2004Z 测定。杂质 1 均未检出,杂质 2 及其他杂质见表 2。

表 2 样品检测结果

Tab 2 Results of samples

批号	拟定方法			WS ₁ -(X-054)-2004Z		
	杂质 2/ %	单个 杂质/%	总杂质 (杂质个数)	杂质 2/ %	单个 杂质/%	总杂质 (杂质个数)
0906C04	0.05	0.02	0.04(3)	0.04	0.02	0.02(1)
0907C01	0.02	0.03	0.04(2)	0.03	0.03	0.03(1)
0907C02	0.03	0.04	0.08(3)	0.04	0.04	0.04(2)
081102	0.03	0.03	0.05(4)	0.03	0.03	0.03(1)
100401	0.03	0.07	0.09(2)	0.04	0.07	0.07(1)
100402	0.04	0.04	0.06(2)	0.04	0.04	0.04(1)
091202	0.06	0.06	0.08(4)	0.04	0.06	0.06(1)
100401	0.05	0.01	0.02(3)	0.04	0.02	0.02(2)
100603	0.08	0.06	0.11(4)	0.06	0.06	0.06(1)

3 讨论

国家标准色谱条件耐用性差,在大多数的色谱柱上,溶剂对杂质 1 的检测有干扰,从样品检测对比结果来看,国家标准检出杂质的个数也少于拟定标准,不利于产品的质量,参照 BP2012 对流动相及稀释液进行了调整,方法专属性强,溶剂无干扰,格列美脲与各杂质峰的分离度均符合要求,可更好的控制产品的质量。

杂质 2 为 BP2012 及 USP34 的杂质 B。BP2012 及 USP34 均未考察杂质 1,而是考察 4-[2-(3-乙基-4-甲基-2-氧-3-吡咯啉-1-甲酰胺基)乙基]苯磺酰胺甲酸甲酯,该杂质与合成工艺有关,国内合成中间体均为甲酸乙酯,故参照国家标准对杂质 1 进行控制。

样品检测结果显示,拟定方法较原国家标准方法检出的杂质个数更多,更准确的反映产品的杂质实际情况,能更好的控制产品的质量。

格列美脲制剂包括片剂和胶囊剂,其有关物质检测方法与原料基本一致,同样存在上述溶剂干扰问题,因此,在进行必要的方法学验证后,亦可采用上述方法对杂质进行控制。

REFERENCES

- [1] BP 2012 [S]. 2012: 1001-1003.
- [2] USP34-NF29 [S]. 2012: 2968-2970
- [3] JP 16 [S]. 2012: 884-886.
- [4] EP 7.0 [S]. 2008: 2097-2098.

收稿日期: 2012-07-24

本刊斜体的使用说明

通常,斜体适用于下述情况:

(1)数学变量符号,如 a, b, c, x, y, z 等;变动附标如 $\sum_{i=1}^n a_i$ 中的 i 与 n 。

(2)点 A 、线段 AB 及弧 CD 。

(3)坐标图中的原点 O 及 x, y, z 轴。

(4)函数符号 f, g, D, N, F, E 等。

(5)物理量符号,如 $p, P, V, T, \eta, I, R, S$ 等。

(6)化合物英文名称、缩写符号或少数中文名称前表示位置、异构方式、结合方式等意义的词汇。如 n -(正), i -(异), cis -(顺式), $trans$ -(反式), o -(邻), m -(间), p -(对), sec -(仲), $tert$ -或 t -(叔), sym -(对称,均), $unsym$ -(不对称,偏), d -(右旋), dl -(外消旋), l -(左旋)、(E)-苯甲醛肟中的 E 、(Z)-2-甲基-2-丁烯酸中的 Z 、(R)-甘油醛中的 R 、(S)-甘油-1-甲醚中的 S 等。

(7)化合物名称中表示与特定原子相连的符号。如 N -(与氮原子连接,大斜), O -(与氧原子连接,大斜), S -(与硫原子连接,大斜)等。

(8)化学命名中表示基团位置的 $\alpha, \beta, \gamma, \omega$, 稠环化合物中母体各边编号用 a, b, c 等表示。

(9)配合物配体中的 π 键以及配体名称前所冠的词头 η, σ 均为斜体。

(10)其他有关学科中的有关符号。如 β -相, γ -结构等。晶体中平面与方向的符号,如密勒指数 h_1, h_2, h_3 或 h, k, l 。

(11)生物分类学中属名和种名的拉丁字母。这在动物学、植物学、微生物学、中草药和病名中较为常见。