

高效液相色谱法测定格列吡嗪口崩片有关物质

★ 程奇珍 徐青春 熊蔚 (江西省食品药品检验所 南昌 330029)

关键词: 高效液相色谱法; 格列吡嗪口崩片

中图分类号: R 27.2 **文献标识码:** B

格列吡嗪口崩片为降血糖药,为了更好地控制有关物质的量,将原标准中有关物质的检查方法由薄层色谱方法提高为高效液相色谱方法,本方法简便快速、专属性好,灵敏度高,可用于格列吡嗪口崩片有关物质的控制。

1 仪器和试剂

岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪(紫外检测器);甲醇为色谱纯,冰醋酸、醋酸钠为分析纯;样品批号: 070801、070802、070803。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 6.00 ± 0.05)-甲醇(55:45)为流动相;检测波长为 225 nm,柱温为室温,进样量为 20 μ L。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取本品的细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加甲醇 25 mL 使溶解,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 另取 4-[2-(5-甲基吡嗪-2-甲酰氨基)乙基]苯磺酰胺对照品约 12.5 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.3 测定法

精密量取供试品溶液、对照溶液、对照品溶液各 20 μ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。结果见图 1、2、3。

2.4 专属性试验

2.4.1 辅料干扰试验 根据工艺模拟空白辅料,按上述色谱条件试验,结果空白辅料无干扰。

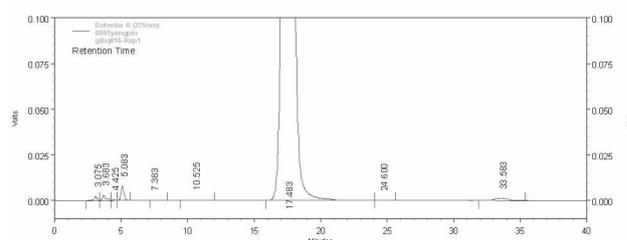


图 1 供试品溶液色谱图

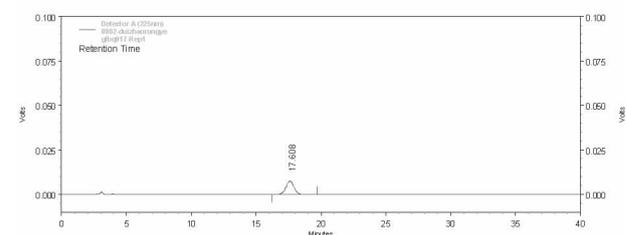


图 2 对照溶液色谱图

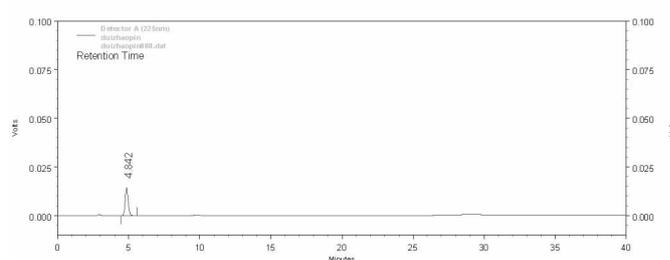


图 3 对照品溶液色谱图

2.4.2 强酸破坏 取本品的原料及细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),分别置 50 mL 量瓶中,加 1 mol/L 的盐酸溶液 10 mL,加甲醇 25 mL 使溶解,超声 30 分钟,放冷,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL 中和后,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.3 强碱破坏 取本品的原料及细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,加甲醇 25 mL 使溶解,超声 30 分钟,放冷,加 1 mol/L 盐酸溶液 10 mL 中和后,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.4 强氧化破坏 取本品的原料及细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加 30% 过氧化氢溶液 1 mL,加甲醇 25 mL 使溶解,超声 30 分钟,放冷,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.5 光照破坏 取本品的原料及细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,置灯照 4 500 Lx 光照 24 h,加甲醇 25 mL 使溶解,超声 30 分钟,放冷,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.6 高温破坏 取本品的原料及细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,置 120 °C 烤箱放 2 h,加甲醇 25 mL 使溶解,超声 30 分钟,放冷,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

结果表明,本方法能使格列吡嗪与上述各种条件下的分解产物有效分离。

2.5 已知杂质线性试验

精密称取已知杂质 4-[2-(5-甲基吡嗪-2-甲酰氨基)乙基]苯磺酰胺对照品 12.5 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,精密吸取 5、10、15、20、25、30、40 μ L 分别注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明已知杂质在进样量为 0.012 7~0.101 5 μ g 时,具有良好的线性关系,线性回归方程为 $y = 4\ 186\ 655.782\ 9x + 162.686\ 5$, $r^2 = 1.000\ 0$ 。

2.6 已知杂质回收试验

按工艺处方,模拟 6 份空白样品,置 50 mL 量瓶中,精密加入浓度为 0.2538 mg/mL 的已知杂质对照品溶液 500 μ L,加流动相使充分混匀溶解并稀释至刻度,摇匀,同供试品测定,结果平均回收率 100.3%, $RSD(\%) = 1.0$ 。

2.7 供试品稳定性试验

取本品的细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加甲醇 25 mL 使溶解,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液分别在 0、4、6、8、10、12、24 小时注入液相色谱仪,记录色谱图,结果供试品溶液在 24 小时内稳定,相对平均偏差为 0.21%。

2.8 重复性试验

取本品的细粉适量(约相当于格列吡嗪 25 mg)5 份,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 25 mL 使溶解,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;另取 4-[2-(5-甲基吡嗪-2-甲酰

氨基)乙基]苯磺酰胺对照品约 12.5 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,测定有关物质。结果该方法对同一批供试品具有良好的重复性,结果可靠。

2.9 检出限

经过试验,格列吡嗪口崩片中,已知杂质 4-[2-(5-甲基吡嗪-2-甲酰氨基)乙基]苯磺酰胺的检出限为 0.5 ng(精密称取 4-[2-(5-甲基吡嗪-2-甲酰氨基)乙基]苯磺酰胺对照品 12.69 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,再精密吸取 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 25.38 ng/mL 的对照品检出限溶液,精密吸取 20 μ L,注入高效液相色谱仪,即得)。

对照溶液的检出限为 6.69 ng(精密称取供试品 0.334 5 g,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 25 mL 使溶解,用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,再精密吸取 1 mL 置 100 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,即得浓度为 669 ng/mL 的供试品检出限溶液,精密吸取 10 μ L,注入高效液相色谱仪,即得)。

2.10 样品测定

根据上述试验条件,对三批样品进行有关物质测定,结果均符合规定见表。同时与原质量标准中 TLC 方法进行比较,结果显示:原标准方法灵敏度相对较低,详细结果见表 1、2、3。

表 1 三批样品已知杂质测定结果

批号	取样量/g	已知杂质峰面积	平均值	杂质对照峰面积	平均值	已知杂质所占百分比(%)
070801	0.3344	117720	116207.5	229794	231140	0.25%
		114695	116207.5	229794	231140	0.25%
		117769	117765.5	229794	231140	0.25%
070802	0.3336	117762	117765.5	232486	231140	0.25%
		118713	117465.5	232486	231140	0.25%
		116218	117465.5	232486	231140	0.25%
070803	0.3341					

表 2 三批样品中其他杂质测定结果

批号	取样量/g	其他杂质峰面积之和	平均值	对照溶液峰面积	平均值	其他杂质所占百分比(%)
070801	0.3344	150475	154227.5	310971	311295	0.50
		157980	154227.5	311619	311295	0.50
070802	0.3336	144759	142678	312096	310845	0.46
		140597	142678	309594	310845	0.46
070803	0.3341	161035	156011.5	308957	310317	0.50
		150988	156011.5	311677	310317	0.50

表 3 TLC 方法与 HPLC 方法的有关物质测定结果比较

批号	原标准方法(TLC 法)		修改后方法(HPLC 法)	
	已知杂质	其他杂质总量	已知杂质(%)	其他杂质总量(%)
70801	小于对照品斑点	未检出其他杂质斑点	0.25	0.50
70802	小于对照品斑点	未检出其他杂质斑点	0.25	0.46
70803	小于对照品斑点	未检出其他杂质斑点	0.25	0.50

3 讨论

本文提出的高效液相色谱方法能简便、灵敏、准确地检测格列吡嗪口崩片中的降解产物,重现性好。将原标准中有关物质检查方法由薄层色谱方法提高为高效液相色谱方法,可用于格列吡嗪口崩片有关物质的控制。

(收稿日期:2009-04-15 责任编辑:曹征)