

别嘌醇缓释片的含量测定和有关物质检查

陈红*,朱蓉(成都市食品药品检测中心,成都 610045)

中图分类号 R927.2;R971⁺.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0080-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.29

摘要 目的:建立别嘌醇缓释片的含量测定和有关物质的检查方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil[®]ODS-3,流动相为甲醇-0.125%磷酸二氢钾溶液(10:90, V/V),流速为1.0 ml/min,有关物质和主药检测波长分别为220、250 nm。对别嘌醇杂质A进行定量检查,对其他未知杂质采用自身对照法检查。结果:主药与杂质能完全分离;主药和杂质的检测质量浓度线性范围分别为1~100、0.02~4 μg/ml(*r*均为0.999 9),平均回收率分别为100.1%、95.3%,RSD分别为0.7%、14%;杂质A最低检测限为0.2 ng。结论:本法具有良好的专属性、灵敏度和重复性,适用于别嘌醇缓释片的质量控制。

关键词 别嘌醇缓释片;含量测定;有关物质;杂质A;高效液相色谱法

Content Determination of Allopurinol Sustained-release Tablets and Related Substances

CHEN Hong, ZHU Rong(Chengdu Center of Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of Allopurinol sustained-release tablets and related substances. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil[®]ODS-3 column with mobile phase consisted of methanol-0.125% monopotassium phosphate (10:90, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 220 nm and 250 nm for related substances and main component. The quantity of allopurinol impurity A was detected quantitatively and other impurities by self control method. RESULTS: Relative substances could be separated from main component completely. The linear ranges of main component and impurity were 1-100 μg/ml and 0.02-4 μg/ml (*r*=0.999 9). The average recoveries were 100.1% (RSD=0.7%) and 95.3% (RSD=14%). The lowest limit of detection for impurity A was 0.2 ng. CONCLUSION: The method is specific, sensitive and reproducible, and can be used for quality control of Allopurinol sustained-release tablets. **KEY WORDS** Allopurinol sustained-release tablets; Content determination; Related substance; Impurity A; HPLC

别嘌醇缓释片的主要成分为别嘌醇,是抑制尿酸合成的一种药物,临床上主要用于治疗高尿酸血症、痛风及尿酸性肾病等。别嘌醇缓释片现行质量标准为试行标准^[1],在执行过程中,笔者发现存在以下问题:含量测定原为紫外分光光度(UV)法,其方法专属性较差;有关物质未控制特殊杂质(如别嘌醇杂质A、B、C等,是制备中可能引入的中间体或降解产物)。“别

嘌醇缓释片质量标准提高研究项目”是我中心按国家药典委员会关于药典标准提高要求申请的项目,主要任务就是建立其含量测定方法,进一步优化色谱条件,从严控制别嘌醇杂质A(3-氨基吡唑-4-羧酰胺),增加该特殊杂质的定量测定方法,现介绍如下。

1 材料

(2)塑化剂成分对液相色谱和液质联用仪器的污染和残留比较大;而选用气相质谱联用法可以同时测定多种塑化剂成分,同时对仪器和色谱柱的污染和残留较小,且样品处理简单,方法快速、灵敏、简便易行。由于塑化剂的各成分存留于塑料制品中几率较大,因此整个试验过程中禁止使用塑料容器。

(3)本色谱条件下(见图1、图2)保留时间在20~25 min的一簇色谱峰为邻苯二甲酸二异壬酯、邻苯二甲酸二异癸酯等系列同系物的混合峰,若样品中明显检出色谱峰,应再进一步单标定位检测;定量时暂不考虑表1中的19、20号峰。

参考文献

[1] 赵文红. 酞酸酯类增塑剂毒理研究进展[J]. 环境与职业医

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 食品、药品监督检测和质量标准制订。E-mail: redchen333@sohu.com

学, 2003, 20(2): 135.

[2] 王小逸, 林光桃, 容慧明, 等. 北京地区家庭中邻苯二甲酸酯类环境污染物的调查[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(10): 820.

[3] 郑和辉, 赵立文, 刘玉敏, 等. 饮用水中邻苯二甲酸酯的气相色谱-质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2005, 22(5): 377.

[4] 蔡智鸣, 史馨, 张前龙, 等. GC-MS测定人血清中酞酸酯类环境污染物[J]. 理化检验: 化学分册, 2006, 42(2): 115.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录31、78.

[6] 中国食品药品检定研究院. 2011年国家评价性抽样品种塑化剂检测任务工作手册[S]. 2011.

(收稿日期: 2012-02-22 修回日期: 2012-03-27)

2695-2988 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Waters 公司)。

别嘌醇对照品(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司,批号:00817,纯度:99.5%);别嘌醇杂质 A 对照品(欧洲药典对照品,欧洲药品质量管理局提供,代码:A0350010,纯度:100%);别嘌醇缓释片(批号:090631、090632、090633,规格:每片 0.25 g)、辅料均由海南普利制药有限公司提供;甲醇为色谱纯,试验用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil®ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.125%磷酸二氢钾溶液(10:90, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:220(有关物质)、250 nm(主药);柱温:40 °C;进样量:20 μl。

2.2 主药含量测定方法

取本品细粉适量(约相当于别嘌醇 50 mg),置于 100 ml 量瓶中,加 0.4% 氢氧化钠溶液 50 ml 使溶解,用盐酸溶液(9→1 000)稀释至刻度,摇匀,滤过;精密量取 5 ml,置于 100 ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;另取别嘌醇对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算,即得。

2.3 有关物质检查法

取本品细粉适量(约相当于别嘌醇 50 mg),置于 100 ml 量瓶中,加 0.4% 氢氧化钠溶液 50 ml 使溶解,用盐酸溶液(9→1 000)稀释至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。精密量取 1 ml,置于 100 ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。另取别嘌醇杂质 A 约 2 mg,精密称定,置于 100 ml 量瓶中,加入 0.4% 氢氧化钠溶液 5 ml 使溶解,加盐酸溶液(9→1 000) 5 ml,用水稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 ml,置于 100 ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为别嘌醇杂质 A 对照品溶液。记录色谱图至主成分峰保留时间的 2.5 倍。

2.4 测定波长的选择

将含别嘌醇和杂质 A 的对照品溶液进行二极管阵列扫描,在 210~400 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果,杂质 A 在 220、253 nm 波长处有最大吸收;别嘌醇在 250 nm 波长处有最大吸收。因此在 220 nm 波长处测定杂质 A 和其他相关杂质,在 250 nm 波长处测定别嘌醇含量。光谱图见图 1。

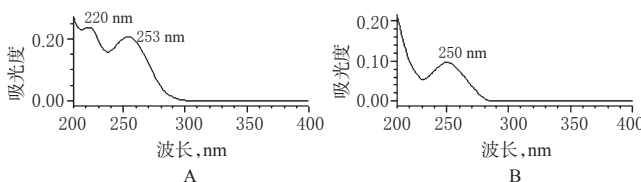


图 1 紫外扫描光谱图

A. 杂质 A; B. 别嘌醇

Fig 1 UV scanning spectrum

A. impurity A; B. allopurinol

2.5 进样浓度和色谱图记录时间的选择

制备 0.5、1.0、2.0 mg/ml 的供试品溶液进样、测定,记录色谱图。结果,随浓度增加,未发现新增杂质,未见可识别的色谱峰,因此选择 0.5 mg/ml 作为供试品浓度。供试品图谱在相当于主成分峰保留时间的 2 倍处有 1 个杂质峰;在主峰保留时间 2.5 倍后,基线平整。因此有关物质测定保留时间定为主峰保留时间的 2.5 倍。

2.6 分析方法的验证

2.6.1 专属性考察。(1)辅料干扰考察。取制备供试品溶液的溶剂和辅料适量分别按建立的有关物质测定法测定,记录色谱图。结果,在别嘌醇主峰及杂质 A 峰处未见吸收峰干扰;但均在 2.4~3.0 min 处有小色谱峰,二者相似,因此在计算时扣除供试品色谱中的溶剂峰即可。(2)降解产物的检查。为了考察该方法能否有效检测出本品在生产及贮存过程中可能产生的降解产物,根据药物结构特点、合成工艺及贮存条件等,进行了以下适度的强制降解试验(加速破坏试验),以验证分析方法对相关降解产物检查的专属性。

选择经光照[(4 500 ± 500) lx, 24 h]、加热氧化(在分别使用加热和氧化条件下,杂质增加不明显;而在 2 种条件同时作用下,杂质质量增加明显,因此采用加入 H₂O₂ 后 60 °C 加热 30 min 降解样品,更便于考察杂质与主成分之间的分离情况)、酸破坏(加入 0.1 mol/L 盐酸溶液放置 1 h 后,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中和)、碱破坏(加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液放置 1 h 后,加 0.1 mol/L 盐酸溶液中和)的供试品溶液,以流动相等度洗脱,供试品溶液经强光照射和加热氧化降解得到的降解产物最多,色谱图见图 2。

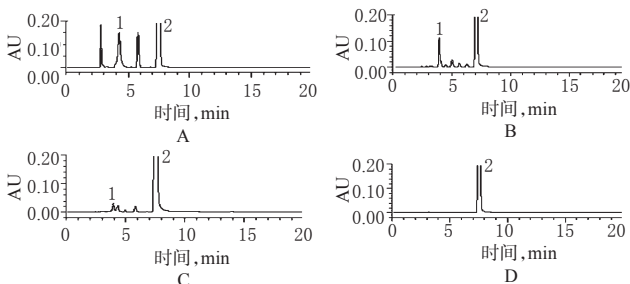


图 2 降解试验色谱图

A. 加热氧化降解后产物; B. 光照降解后产物; C. 碱降解后产物; D. 酸降解后产物; 1. 杂质 A; 2. 别嘌醇

Fig 2 Chromatograms of degradation testing

A. destroyed by heat and oxidation; B. destroyed by light; C. destroyed by alkali; D. destroyed by acid; 1. impurity A; 2. allopurinol

从上述降解后图谱可知,本品在弱酸性条件下较稳定;主要降解产物在主成分峰前,在主成分峰后主要有 2 个小杂质;各种破坏条件下得到的降解产物均能与主成分、杂质 A 完全分离。流动相以 0.125% 磷酸二氢钾溶液-甲醇(90:10)在 0~30 min 以线性梯度改变流动相比比例(70:30)洗脱测定,未检出更多杂质。因此选择以 0.125% 磷酸二氢钾溶液-甲醇(90:10)为流动相,等度洗脱。

另上述试验表明,有关物质检查法具有良好的专属性,适用于本品在生产及贮存过程中因各种影响所产生的有关物质检查。

2.6.2 线性关系及检测限。取别嘌醇和杂质 A 对照品适量,精密称定,用流动相制备成一系列不同浓度的混合对照品溶液,进样,测定。以质量浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标作回归直线。结果,别嘌醇标准曲线方程为 $A = 67\ 930c + 902.69$ ($r = 0.999\ 9$),表明别嘌醇检测质量浓度线性范围为 1~100 μg/ml;别嘌醇杂质 A 标准曲线方程为 $A = 86\ 474c + 150.52$ ($r = 0.999\ 9$),表明别嘌醇杂质 A 检测质量浓度线性范围为 0.02~4 μg/ml。质量浓度为 0.01 μg/ml、进样 20 μl 时,信噪比

约为3,因此杂质A检测限为0.2 ng。

2.6.3 回收率试验。称取空白辅料约50 mg,置于100 ml量瓶中,分别加别嘌醇对照品40、50、60 mg和别嘌醇杂质A对照品溶液(20 μg/ml)4、5、6 ml于同一量瓶中,按含量测定法测定,计算回收率。结果别嘌醇和杂质A平均回收率分别为100.1%、95.3%(n=9),具体见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

化合物	加入量,mg	测定量,mg	回收率,%
别嘌醇	40.05	40.27	100.60
	40.01	39.98	99.90
	39.52	39.98	101.20
	50.15	49.74	99.20
	49.94	49.86	99.80
	50.28	50.22	99.90
	59.88	59.88	100.00
	59.67	59.60	99.90
	59.21	59.34	100.20
	杂质A	0.08	0.076 2
0.08		0.075 8	94.74
0.08		0.076 7	95.89
0.10		0.096 2	96.21
0.10		0.095 2	95.24
0.10		0.095 1	95.12
0.12		0.114 5	95.43
0.12		0.114 2	95.18
0.12		0.113 5	94.58

2.6.4 重复性试验。取同批样品6份制备成供试品溶液,同“2.2”、“2.3”项下方法操作,测定主药及杂质含量,结果见表2。

表2 重复性试验结果

Tab 2 Results of repeatability test

编号	含量,%		
	杂质A	其他杂质	主药
1	0.009 1	0.080	101.09
2	0.006 9	0.083	102.62
3	0.008 1	0.086	102.23
4	0.006 3	0.083	103.33
5	0.006 8	0.081	102.90
6	0.008 1	0.083	102.41
平均值,%	0.010 0	0.100	102.40
RSD,%	14	2.5	0.7

由表2可知,主药和有关物质测定结果重复性较好。

2.6.5 供试品溶液稳定性考察。在室温20℃下取供试品溶液,按“2.2”和“2.3”项下方法分别在不同时间(0、1、2、4、6、8 h)测定有关物质和主药含量。结果,主峰面积RSD为0.3%,杂质A和其他有关物质含量未增加。表明供试品溶液在8 h内稳定,能够满足日常检测的要求。

2.6.6 样品含量测定和有关物质检查结果。按“2.2”和“2.3”项下方法测定3批样品主药和有关物质含量,结果见表3。

3 讨论

《中国药典》2010年版只收录了别嘌醇原料药和片剂,国外药典均未见收录该剂型。查阅文献也未见别嘌醇缓释剂的质量标准研究报告。在类似品种参考文献^[2-5]中,采用HPLC

表3 3批样品含量测定和有关物质检查结果

Tab 3 Results of content determination of main component and related substances in 3 batches of samples

批号	含量,%		
	杂质A	其他杂质	主药
090631	0.01	0.1	101.9
090632	0.01	0.1	102.4
090633	0.01	0.1	101.7

法测定时的色谱条件均不同,有的流动相采用甲醇-水-冰醋酸(75:25:0.2),有的采用0.125%磷酸二氢钾溶液和甲醇梯度洗脱。前种条件下出峰快,未与杂质分离;后种条件下梯度洗脱时间长。而本法采用的流动相组成简单,等度洗脱,采用二极管阵列检测器筛选测定波长,对别嘌醇及杂质A分别进行定量,提高了杂质A检测灵敏度。

在别嘌醇缓释片(试行)标准^[1]中,样品前处理方法较为复杂:取本品细粉适量(约相当于别嘌醇50 mg),置于100 ml量瓶中(使粉末尽量散开),加0.1 mol/L的氢氧化钠溶液5 ml(边加液边振摇),超声直至完全溶解,立即用混合溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。而本文的供试品溶液制备方法则相对更简单:由于本品在碱性条件下易溶解也易降解,在弱酸性或中性条件下,溶液较稳定,因此建立了“2.2”项下的供试品制备方法,所制溶液显弱酸性。《欧洲药典》和《美国药典》中供试品溶液需在温度8℃时保存^[6-7],笔者结合实际情况,在室温20℃时,供试品溶液经稳定性考察,在8 h内基本稳定(主成分峰面积RSD为0.3%),未见杂质质量增加。

上述各项试验结果证实,本文所建的含量测定和有关物质检查法具有良好的专属性、灵敏度和重复性,适用于别嘌醇缓释片的质量控制。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.YBH19022004 别嘌醇缓释片:试行[S].2004.
- [2] 陈建琴.高效液相色谱法测定别嘌醇片的含量[J].中国药师,2006,9(11):993.
- [3] 姚慧敏,李三鸣,刘洪卓,等.反相高效液相色谱法测定注射用别嘌醇钠的含量[J].中国新药杂志,2006,15(13):1 095.
- [4] 吴川彦,朱蓉.高效液相色谱法测定别嘌醇有关物质[J].现代医药卫生,2009,25(9):1 298.
- [5] 姚慧敏,李三鸣,刘洪卓,等.高效液相梯度洗脱法测定注射用别嘌醇钠中的有关物质[J].沈阳药科大学学报,2007,24(4):223.
- [6] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia: National Formulary (USP32-N27)* [S].Baltimore, Maryland (USA): United Book Press, 2009:1 450-1 453.
- [7] Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). *The European Pharmacopoeia (EP6.8)* [S]. Nordlingen (Germany): Druckerei C. H.Beck, 2010:5 869-5 871.

(收稿日期:2012-02-07 修回日期:2012-07-17)