

HPLC法测定不同厂家盐酸曲美他嗪原料药及其制剂中的有关物质含量

华 莲*,唐素芳(天津市药品检验所,天津 300070)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3516-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.22

摘要 目的:建立能同时检出盐酸曲美他嗪原料药与制剂中有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法梯度洗脱法,色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C₁₈,流动相A为0.287%无水庚烷磺酸钠溶液-甲醇(643:357, pH 3.0),流动相B为甲醇,梯度洗脱,流速为1.0 ml/min,检测波长为240 nm。共测定来自7个厂家共22批产品(包括原料药、片剂和胶囊)的有关物质。结果:盐酸曲美他嗪检测质量浓度线性范围为0.4~200.0 μg/ml($r=0.999\ 9, n=6$);精密度($n=5$)、重复性($n=6$)和稳定性($n=5$)试验中RSD≤3.7%。在本色谱系统下,不同产品有关物质检验结果均达到限度要求。结论:本方法结果准确,可用于同时考察盐酸曲美他嗪原料药、片剂和胶囊产品的质量。

关键词 高效液相色谱法;梯度洗脱法;盐酸曲美他嗪;原料药;片剂;胶囊;有关物质;含量测定

Content Determination of Related Substances in Trimetazidine Hydrochloride Crude Drug and Its Preparations from Different Manufacturers by HPLC

HUA Lian, TANG Su-fang(Tianjin Municipal Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of related substances in crude drug and preparations of trimetazidine hydrochloride. METHODS: HPLC method and gradient elution were adopted. The determination was performed on Thermo Hypersil Gold C₁₈ column with mobile phase A consisted of 0.287% sodium 1-heptanesulfonate-methanol (643:357, pH 3.0) and mobile phase B consisted of methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 240 nm. The contents of related substance were determined in 22 batches of samples (crude drug, tablet and capsule) from 7 manufacturers. RESULTS: The linear range of trimetazidine hydrochloride was 0.4-200.0 μg/ml ($r=0.999\ 9, n=6$). RSDs of precision ($n=5$) and repeatability ($n=6$) and stability ($n=5$) tests were all lower than 3.7%. All the results of samples from different manufacturers met the limits under this chromatographic condition. CONCLUSIONS: The established method is accurate and suitable for the quality control of crude drug, tablet and capsule of trimetazidine hydrochloride.

KEY WORDS HPLC; Gradient elution; Trimetazidine hydrochloride; Crude drug; Tablet; Capsule; Related substances; Content determination

盐酸曲美他嗪(Trimetazidine hydrochloride, TH)为抗心绞痛心血管药物,临床主要用于心绞痛发作的预防性治疗。TH原料药在《英国药典》(BP)2012年版^[1]、《欧洲药典》7.0版、《日本药局方》第16版^[2]及国家标准^[3-5]中均有收载,但其片剂在国内外药典中未见收载,仅在国家标准^[6-10]中收载。BP 2012年版中检查TH有关物质共涉及到8种已知杂质(A、B、C、D、E、F、H、I),方法是采用高效液相色谱(HPLC)梯度洗脱法。在TH片的国家标准中涉及到3种已知杂质(C、D、Y145),方法是采用HPLC等度洗脱法。由于目前标准中的色谱系统未能达到原料药与制剂的有关物质检查方法的统一,不能使各已知杂质在同一色谱系统中完全分离。因此,本文采用HPLC梯度洗脱法将TH原料药及制剂中的有关物质及标准中涉及到的所有杂质同时检出,使其在同一标准尺度下测定、比较,以考察不同厂家产品质量,保证产品的安全、有效和质量可控。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪(日本岛津公司)。

* 主管药师。研究方向:药物分析。电话:022-23374074。E-mail:lian0622@gmail.com

1.2 药品与试剂

TH对照品(批号:46668,纯度:100.0%)及杂质C、D、E、Y145(批号:SB686、SB699、L0022129、SB551,纯度:均为100%)均由天津D药厂提供;TH原料药(原1[#]:北京A药厂提供,批号:110301,纯度:99.4%;原2[#]:山东B药厂提供,批号:11011606,纯度:99.7%;原3[#]~原5[#]:苏州C药厂提供,批号:090808、H100901、H101101,纯度:均为99.9%);TH片(片1[#]~片3[#]:北京G药厂提供,批号:20101002、20101106、20101105;片4[#]~片6[#]:天津D药厂提供,批号:2001541、2001587、2001595;片7[#]~片9[#]:苏州C药厂提供,批号:090907、100118、110304;片10[#]~片12[#]:山东B药厂提供,批号:11041001、11041002、11041005;片13[#]:南京E药厂提供,批号:20110401;规格:均为每片20 mg);TH胶囊(胶1[#]~胶3[#]:北京A药厂提供,批号:110302、110303、110502;胶4[#]:山西F药厂提供,批号:110201;规格:均为每粒20 mg);甲醇、庚烷磺酸钠均为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil Gold C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5

μm);流动相A为0.287%庚烷磺酸钠溶液-甲醇(643:357,用10%磷酸调节pH为3.0),流动相B为甲醇,梯度洗脱,流速:1.0 ml/min;检测波长:240 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μl。

梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间, min	流动相A比例, %	流动相B比例, %
0~10	100~100	0~0
10~60	100~40	0~60
60~62	40~100	60~0
62~70	100~100	0~0

2.2 系统适用性试验

称取供试品适量(约相当于TH 20 mg),加入30%过氧化氢5 ml,室温放置3 h以上(制剂需滤过,取续滤液),作为系统适用性溶液,量取溶液注入色谱仪,记录色谱图。结果色谱图中与主峰相对保留时间约为0.95,且峰面积达到主峰面积2%以上的氧化杂质峰与主峰及其相邻的杂质峰的分度均符合规定。

2.3 专属性试验

取片1#细粉适量(约相当于TH 0.2 g),置于50 ml量瓶中(共6份),进行以下破坏性试验:在①、②2个量瓶中加水适量振摇使溶解,分别加2 mol/L盐酸2 ml和2 mol/L氢氧化钠2 ml,60 ℃水浴加热2 h,调节pH至中性,加水稀释至刻度,摇匀,分别作为酸破坏和碱破坏溶液。在③、④2个量瓶中加水适量,振摇使溶解,加水稀释至刻度,摇匀:③量瓶在日光下照射1周以上,作为光照破坏溶液;④量瓶在100 ℃水浴中加热6 h,作为高温破坏溶液。⑤量瓶加水适量振摇使溶解,加30%过氧化氢5 ml,室温下放置3 h,加水稀释至刻度,摇匀,作为氧化破坏溶液。分别取上述5种溶液进样,色谱结果见图1。

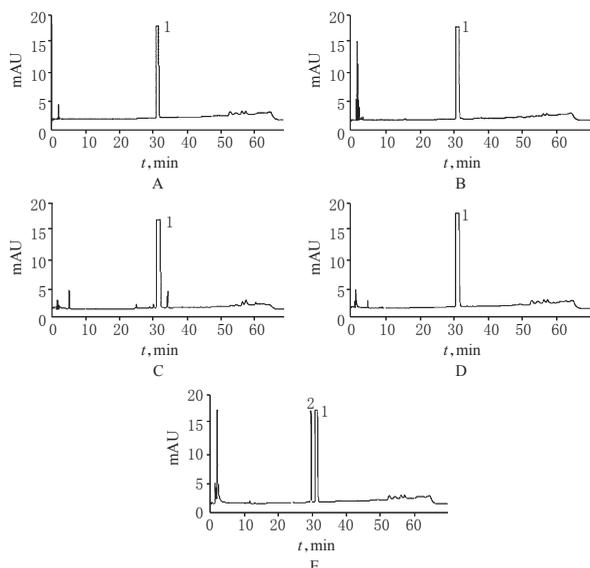


图1 破坏性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏溶液; B. 碱破坏溶液; C. 光照破坏溶液; D. 高温破坏溶液; E. 氧化破坏溶液; 1. TH; 2. 氧化破坏后杂质

Fig 1 HPLC chromatograms of destructive test

A. solution destroyed by acid; B. solution destroyed by alkali; C. solution destroyed by strong light; D. solution destroyed by high temperature; E. solution destroyed by oxidation; 1. TH; 2. impurity destroyed by oxidation

图1结果显示,试验溶液在各条件下产生的主要杂质峰均能与主峰达到良好的分离,表明该方法的专属性良好,可以准确定量供试品溶液中的所有杂质。

照“2.4.2”和“2.4.3”项下方法制备TH片和胶囊的辅料溶液并另取空白溶液进样分析,结果辅料峰和空白溶剂均对测定无影响,色谱图略。

2.4 溶液制备

2.4.1 TH原料药供试品溶液。精密称取TH原料药适量,用流动相溶解并稀释制成4 mg/ml的溶液,即得。

2.4.2 TH片供试品溶液。取样品20片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于TH 0.2 g)置于50 ml量瓶中,加水适量超声使溶解,加水稀释至刻度,摇匀,离心15 min,取上清液即得。

2.4.3 TH胶囊供试品溶液。取胶囊内容物,混合均匀,精密称取适量(约相当于TH 0.2 g),其余操作同“2.4.2”项下,即得。

2.4.4 对照溶液。精密量取“2.4.2”项下供试品溶液1 ml置于100 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得1.0%对照溶液。

2.5 线性关系考察

精密称取TH对照品适量,用水溶解并稀释制成200 μg/ml的溶液,作为对照品贮备液;精密量取适量,加水稀释制成质量浓度为0.4、2、4、20、40、80 μg/ml的系列溶液;分别精密量取对照品贮备液及上述溶液注入色谱仪,记录色谱图。以质量浓度(c)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,结果得线性方程为 $A = 1.05 \times 10^2 c - 3.07 \times 10^3$ ($r = 0.9999$, $n = 6$)。表明TH检测质量浓度线性范围为0.4~200 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.5”项下的对照品溶液(40 μg/ml),连续进样5次,结果按峰面积计算, RSD=0.60% ($n=5$)。

2.7 重复性试验

分别取原1#、片1#和胶1#样品,按照“2.4”项下方法各制备供试品溶液6份,分别精密量取10 μl进样,依法测定各6份样品中的杂质含量。结果最大单一杂质含量的RSD均为0,杂质总量的RSD分别为0.9%、2.3%、3.7% ($n=6$)。

2.8 稳定性试验

取片1#供试品溶液,室温放置,分别于0、4、8、12、24 h测定。结果主峰和杂质峰面积的RSD分别为0.6%、1.7% ($n=5$)。表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

可见,在精密度、重复性和稳定性试验中, RSD均≤3.7%。

2.9 样品中有关物质的测定

精密量取1.0%对照溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,作为灵敏度测试溶液(0.01%)。量取灵敏度测试溶液10 μl注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主峰峰高为噪音峰高的10倍。精密量取“2.4”项下的对照溶液和供试品溶液各10 μl分别注入色谱仪,色谱图见图2,测定结果见表2。

表2数据显示,总体来说TH片剂质量较原料药与胶囊更好,原因可能是由于该剂型生产厂家较多,工艺水平较为成熟;胶囊中杂质总量较大,但符合杂质限度规定。综合考虑,以片1#~片6#产品质量较好。

3 讨论

(1)在破坏性试验中以氧化破坏产生的降解杂质更显著,并且该氧化杂质峰与主峰距离接近,故以氧化破坏溶液为系统适用性溶液。

(2)在供试品色谱图中,当流动相比例变化剧烈时,溶剂

表2 样品中有关物质测定结果

Tab 2 Results of the determination of related substance in samples

样品	编号	最大单一杂质含量, %	杂质总量, %
原料药	1 [#]	0.19	0.51
	2 [#]	0.12	0.22
	3 [#]	0.05	0.09
	4 [#]	0.04	0.07
片	5 [#]	0.07	0.07
	1 [#]	0.04	0.11
	2 [#]	0.03	0.11
	3 [#]	0.03	0.08
	4 [#]	0.03	0.08
	5 [#]	0.03	0.08
	6 [#]	0.03	0.09
	7 [#]	0.27	0.51
	8 [#]	0.20	0.60
	9 [#]	0.11	0.43
	10 [#]	0.14	0.38
	11 [#]	0.14	0.40
	12 [#]	0.14	0.40
13 [#]	0.09	0.28	
胶囊	1 [#]	0.14	0.41
	2 [#]	0.14	0.45
	3 [#]	0.13	0.55
	4 [#]	0.14	0.38

场竞争力。

[注:盐酸曲美他嗪及制剂为国家药典委员会2010—2011年度国家药品标准提高工作(化药)品种]

参考文献

[1] British Pharmacopoeia Commission. *British pharmacopoeia*[S]. 2012 edition.London; the Stationary Office, 2011; 2 225.

[2] Society of Japanese Pharmacopoeia. *Japanese pharmacopoeia*[S]. 16 edition. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011:1 535.

[3] 国家食品药品监督管理局.YBH28562005 盐酸曲美他嗪标准[S].2005-10-10.

[4] 国家食品药品监督管理局.YBH15582005 盐酸曲美他嗪标准[S].2005-06-21.

[5] 国家食品药品监督管理局.YBH27682005 盐酸曲美他嗪标准[S].2005-09-15.

[6] 国家食品药品监督管理局.YBH13562005 盐酸曲美他嗪片标准[S].2005-05-20.

[7] 国家食品药品监督管理局.YBH02912007 盐酸曲美他嗪片标准[S].2007-03-16.

[8] 国家食品药品监督管理局.YBH19942006 盐酸曲美他嗪片标准[S].2006-06-22.

[9] 国家食品药品监督管理局.YBH12372006 盐酸曲美他嗪片标准[S].2006-05-04.

[10] 国家食品药品监督管理局.YBH08262008 盐酸曲美他嗪片标准[S].2008-04-18.

(收稿日期:2012-12-11 修回日期:2013-03-18)

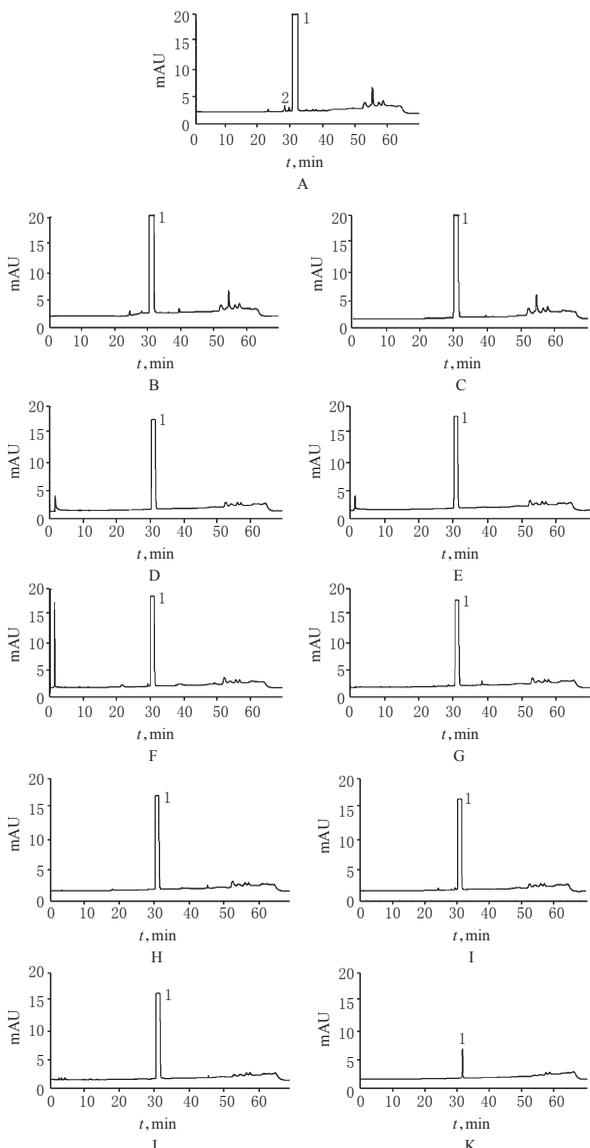


图2 有关物质测定高效液相色谱图

A.原1[#];B.原2[#];C.原3[#];D.片1[#];E.片4[#];F.片7[#];G.片10[#];H.片13[#]; I.胶1[#];J.胶4[#];K.1.0%对照溶液;1.TH;2.氧化破坏后杂质

Fig 2 HPLC chromatograms of related substance

A. crude drug 1[#]; B. crude drug 2[#]; C. crude drug 3[#]; D. tablet 1[#]; E. tablet 4[#]; F. tablet 7[#]; G. tablet 10[#]; H. tablet 13[#]; I. capsule 1[#]; J. capsule 4[#]; K. 1.0% solution control; 1. TH; 2. impurity destroyed by oxidation

峰在色谱图中并无明显变化,并且同时记录空白溶剂色谱图予以扣除。供试品色谱图中的所有杂质均在溶剂峰波动前完全检出,不受溶剂峰影响。

(3)有关物质的测定可以反映出药品在生产、贮存条件下所合成及降解的杂质。经破坏性试验证明,TH在氧化条件下降解剧烈,此外光照对产品也有一定的影响,因此改善产品包装材料、减少药品与空气接触、避光尤为重要。贮存条件也会影响药品在货架期的质量,高温、高湿必然导致药品杂质质量增加,控制适宜的温湿度是保证药品质量的重要方面。除此之外,各药厂的处方不尽相同,生产工艺亦有差别,应在改变合成路线、优化生产工艺等方面进行更加细致、深入和全面的研究,才能提高产品的内在品质和临床疗效,从而提升产品的市