

HPLC法测定注射用泮托拉唑钠中的有关物质

张静*, 翟丽杰#, 高立娜 (吉林大学第二医院药学部, 长春 130041)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2142-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.35

摘要 目的:建立测定注射用泮托拉唑钠中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil Hypersil ODS,流动相为0.01 mol/L磷酸氢二钾溶液(调节pH为7.0)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为290 nm,柱温为40 ℃,进样量为20 μL。结果:杂质A、B、C+E、D检测质量浓度线性范围分别为0.416 8~1.042 0 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.195 0~0.487 5 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.389 0~0.972 5 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.198 6~0.496 5 μg/mL($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.834、0.780、1.556、0.794 ng/mL,检测限分别为0.417、0.390、0.778、0.397 ng/mL;精密度试验的RSD<1.0%,重复性试验中总杂质峰面积的RSD<1.0%;回收率分别为98.81%~102.49%(RSD=1.18%, $n=9$)、95.31%~98.44%(RSD=0.91%, $n=9$)、96.88%~98.44%(RSD=0.52%, $n=9$)、97.87%~101.28%(RSD=1.05%, $n=9$)。结论:该方法简便、准确,可用于注射用泮托拉唑钠中有关物质的测定。

关键词 高效液相色谱法;注射用泮托拉唑钠;有关物质;测定

Determination of Related Substances in Pantoprazole Sodium for Injection by HPLC

ZHANG Jing, ZHAI Lijie, GAO Lina (Dept. of Pharmacy, the Second Hospital of Jinlin University, Changchun 130041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Pantoprazole sodium for injections. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil Hypersil ODS column with mobile phases consisting of 0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution (pH adjusted to 7.0)-acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 290 nm, and the column temperature was 40 ℃, and injection volume was 20 μL. RESULTS: The linear ranges of impurity A, impurity B, impurity C+E, and impurity D were 0.416 8-1.042 0 μg/mL($r=0.999\ 8$), 0.195 0-0.487 5 μg/mL($r=0.999\ 9$), 0.389 0-0.972 5 μg/mL($r=0.999\ 8$), 0.198 6-0.496 5 μg/mL($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantitation were 0.834, 0.780, 1.556, 0.794 ng/mL; the limits of detection were 0.417, 0.390, 0.778, 0.397 ng/mL, respectively. RSD of precision test was lower than 1.0%; in repetitive test, RSD for total peak area of impurity was lower than 1.0%; the recoveries were 98.81%-102.49% (RSD=1.18%, $n=9$), 95.31%-98.44% (RSD=0.91%, $n=9$), 96.88%-98.44% (RSD=0.52%, $n=9$) and 97.87%-101.28% (RSD=1.05%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is convenient, accurate and suitable for the determination of related substance in Pantoprazole sodium for injection.

KEYWORDS HPLC; Pantoprazole sodium for injection; Related substances; Determination

泮托拉唑钠由德国百克顿(Gulden)公司开发上市,是继奥美拉唑、兰索拉唑之后的新一代质子泵抑制剂(PPI),为消化性溃疡的一线治疗药^[1-6]。在全球上市后,因其抑酸作用强而持久、溃疡愈合率高、不良反应少和药物相互作用少的显著优势,迅速成为治疗与胃酸有关的消化系统功能紊乱性疾病的特效药物。其与奥美拉唑和兰索拉唑相比,对质子泵具有更高的选择性,抑制胃酸的分泌达到一个新水平,疗效明显占优。目前,该制剂已被新版《中国药典》^[7]、《英国药典》^[8]、《美国药典》^[9]和《欧洲药典》^[10]收载。而《英国药典》《美国药典》《欧洲药典》收载的仅有泮托拉唑钠原料药标准,无注射用无菌粉末标准;而《中国药典》中虽收载了泮托拉唑钠原料药和注射用无菌粉末标准,但是并没有对各杂质作相应

的限度要求。因此,本研究参考相关文献^[7],采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定注射用泮托拉唑钠中有关物质的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC-20AD XR二元梯度泵、SIL 20A HT自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-M20A二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);FE20K型酸度计(瑞士Mettler-Toledo公司);ZH-2型漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

注射用泮托拉唑钠[石药集团中诺药业(石家庄)有限公司,批号:C058131101、C058131102、C058131103,规格:60 mg/支];注射用泮托拉唑钠(原研药,德国奈科明制药有限公司,批号:203869,规格:40 mg/支);泮托拉唑钠对照品(批号:20140511,纯度:99%)、杂质A对照

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0431-88796629。E-mail:jingwei_zhang@sina.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0431-88796413。E-mail:109788809@qq.com

品(批号:20140511,纯度:99%)、杂质B对照品(批号:20140511,纯度:99%)、杂质C对照品(批号:20140511,纯度:99%)、杂质E对照品(批号:20140511,纯度:99%)均购自深圳达尔森科技有限公司;杂质D对照品(美国Waters公司,批号:20140511,纯度:99%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil Hypersil ODS(125 mm×4.0 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L 磷酸氢二钾溶液(调节pH为7.0)(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~40 min, 80%→20% A; 40~45 min, 20%→80% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:290 nm;柱温:40 ℃;进样量为20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取泮托拉唑钠对照品和杂质A、B、C、D、E对照品各约1 mg,分别置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,即得泮托拉唑钠和杂质A、B、C、D、E的单一对照品贮备液。分别量取上述泮托拉唑钠单一对照品贮备液1 mL,杂质A单一对照品贮备液80 μL,杂质B、C、D、E单一对照品贮备液各40 μL,置于同一10 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,置于25 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取处方比例辅料适量(约相当于泮托拉唑钠4 mg处方所需辅料量),置于100 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

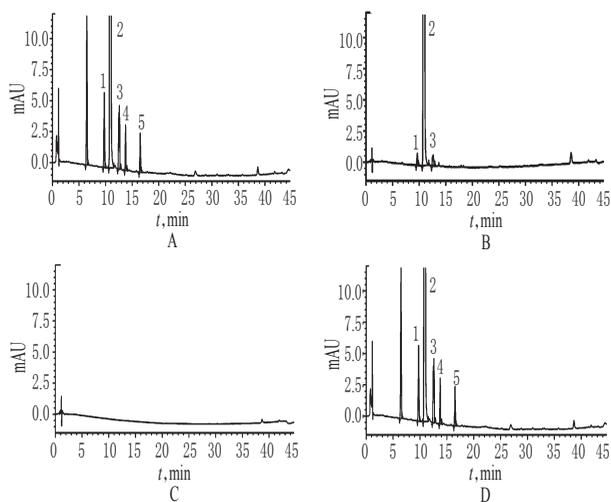
2.2.4 系统适用性溶液 取杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、泮托拉唑钠对照品各适量,置于5 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.3 系统适用性和专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液、系统适用性溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各待测有关物质均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以泮托拉唑钠峰计为15 800,保留时间为11.025 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 破坏性试验

按如下方法制备各破坏样品溶液——(1)酸破坏样品溶液:取样品适量(约相当于泮托拉唑钠40 mg),置于100 mL量瓶中,加0.01 mol/L盐酸溶液12 mL,于室温下静置10 min,加适量0.01 mol/L氢氧化钠溶液中和,再加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。(2)碱破坏样品溶液:取样品适量(约相当于泮托拉唑钠40 mg),置于100 mL量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠



A.混合对照品溶液;B.供试品溶液;C.空白对照溶液;D.系统适用性溶液;1.杂质A;2.泮托拉唑钠;3.杂质C+E;4.杂质D;5.杂质B
A.mixed control solution; B.test sample solution; C.blank control solution; D.system suitability solution; 1.impurity A; 2.pantoprazole sodium; 3.impurity C+E; 4.impurity D; 5.impurity B

图1 系统适用性和专属性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability and specificity test

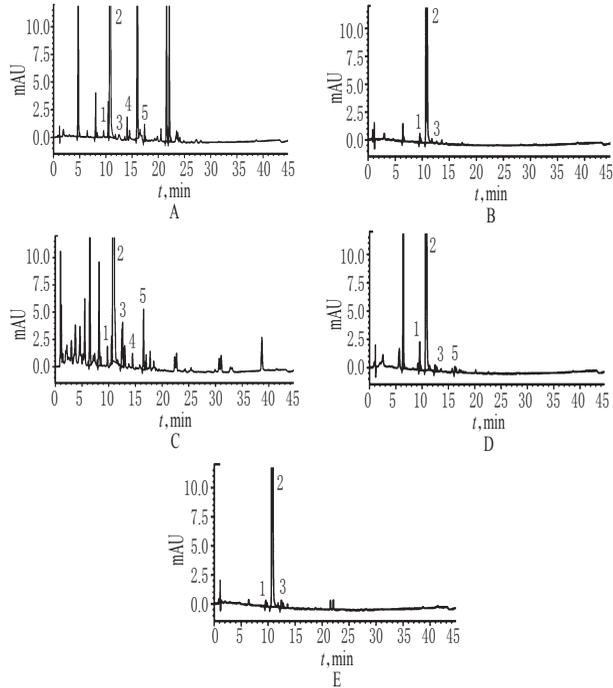
溶液12 mL,振摇使其全部溶解,于室温下放置1 h,加适量1 mol/L盐酸溶液中和,再加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。(3)高温破坏样品溶液:取样品适量(约相当于泮托拉唑钠40 mg),置于圆皿内,于120 ℃加热40 min,取出,冷却至室温,置于100 mL量瓶中,加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。(4)高湿破坏样品溶液:取样品适量(约相当于泮托拉唑钠40 mg),置于平皿内,开口置于盛有硝酸钾饱和溶液的密闭容器中(湿度为92.5%),于25 ℃条件下放置72 h,置于100 mL量瓶中,加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。(5)光照破坏样品溶液:取样品适量(约相当于泮托拉唑钠100 mg),置于平皿内,开口置于(7 500±500)lx强光下照射72 h,置于100 mL量瓶中,加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

取上述破坏样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可知,样品在酸、碱、高温、高湿、光照条件下均有不同程度的降解,杂质峰有所增多,但各降解杂质峰与主成分峰之间以及各降解杂质峰之间分离良好(分离度均>1.5)。

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液10、15、18、20、22、25 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测有关物质的质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性

范围见表1。



A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.高温破坏样品;D.光照破坏样品;E.高湿破坏样品;1.杂质A;2.泮托拉唑钠;3.杂质C+E;4.杂质D;5.杂质B

A.destroyed by acid; B.destroyed by base; C.destroyed by heat; D.destroyed by light; E.destroyed by moisture; 1.impurity A; 2.pantoprazole sodium; 3.impurity C+E; 4.Impurity D; 5.impurity B

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测有关物质	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
杂质A	$y=43.631x-386.44$	0.999 8	0.416 8~1.042 0
杂质B	$y=44.533x-90.054$	0.999 9	0.195 0~0.487 5
杂质C+E	$y=39.208x+240.55$	0.999 8	0.389 0~0.972 5
杂质D	$y=39.208x+240.55$	0.999 8	0.198 6~0.496 5

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得杂质A、B、C+E、D的定量限(LOQ)分别为0.834、0.780、1.556、0.794 ng/mL;当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)分别为0.417、0.390、0.778、0.397 ng/mL。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,杂质A、B、C+E、D峰面积的RSD分别为0.03%、0.03%、0.06%、0.05% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:C058131101)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,供试品溶液中只检出杂质A和杂质C+E,杂质A峰面积的RSD=0.22% ($n=6$),杂质C+E峰面积的RSD=0.17% ($n=6$),总杂质峰面积的RSD=0.98% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

分别量取“2.2.1”项下杂质A、B、C、D、E的单一对照品贮备液各适量,置于同一10 mL量瓶中,加0.001 mol/L氢氧化钠溶液-乙腈(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,即得。按上述方法制备低、中、高质量浓度的混合对照品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery test($n=9$)

待测有关物质	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %			
杂质A	0.013 4	0.013 6	101.49	100.82	1.18			
	0.013 4	0.013 5	100.75					
	0.013 4	0.013 6	101.49					
	0.016 8	0.016 7	99.40					
	0.016 8	0.016 6	98.81					
	0.016 8	0.016 8	100.00					
	0.020 1	0.020 4	101.49					
	0.020 1	0.020 4	101.49					
	0.020 1	0.020 6	102.49					
	杂质B	0.006 4	0.006 3			98.44	97.20	0.91
		0.006 4	0.006 1			95.31		
		0.006 4	0.006 2			96.88		
0.008 0		0.007 8	97.50					
0.008 0		0.007 8	97.50					
0.008 0		0.007 8	97.50					
0.009 6		0.009 4	97.92					
0.009 6		0.009 3	96.88					
0.009 6		0.009 3	96.88					
杂质C+E		0.012 9	0.012 5	97.67	97.42	0.52		
		0.012 9	0.012 6	97.67				
		0.012 9	0.012 6	96.88				
	0.016 0	0.015 5	97.50					
	0.016 0	0.015 6	97.50					
	0.016 0	0.015 6	97.40					
	0.019 2	0.018 7	98.44					
	0.019 2	0.018 9	96.88					
	0.019 2	0.018 6	96.88					
	杂质D	0.006 2	0.006 2	100.00			99.49	1.05
		0.006 2	0.006 2	100.00				
		0.006 2	0.006 1	98.39				
0.007 8		0.007 9	101.28					
0.007 8		0.007 8	100.00					
0.007 8		0.007 8	100.00					
杂质D	0.009 4	0.009 3	98.94					
	0.009 4	0.009 3	98.94					
	0.009 4	0.009 2	97.87					

2.10 样品有关物质测定

取4批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中含有关物质的量,结果见表3。由表3可知,3批国产样品均只检测出两个已知杂质,即杂质A以及杂质C+E,并均 $<0.2\%$,总杂质 $<1.0\%$;原研药样品中杂质C+E含量 $>0.2\%$,杂质A未达到检测限。

表3 样品有关物质测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Results of related substances determination of samples($n=3, \%$)

样品批号	杂质A	杂质B	杂质C+E	杂质D	总杂质
C058131101	0.049	-	0.071	-	0.120
C058131102	0.048	-	0.068	-	0.116
C058131103	0.047	-	0.070	-	0.117
203869	未达到检测限	-	0.310	-	0.310

注:“-”为未检出

Note:“-” means not detected

3 讨论

3.1 柱温的选择

笔者考查了不同柱温(30℃和40℃)对样品分离的影响。结果表明,不同柱温的测试结果均符合系统适用性要求,保留时间无明显差别;但柱温40℃条件下各峰对称性、分离度及柱效更好,更有利于样品的分离。因此,本试验的柱温选择为40℃。

3.2 流动相A的pH考察

笔者考查了流动相A的不同pH(6.5、7.0和7.5)对样品中已知杂质分离的影响。结果表明,流动相A的pH为6.5时,杂质A与主峰无法分离;流动相A的pH为7.5时,杂质C+E与杂质D无法完全分离;而流动相A的pH为7.0时,各杂质与主峰以及各杂质间的分离均较好。故本试验选择流动相A的pH为7.0。

3.3 稳定性试验

本试验曾进行稳定性试验,考察了供试品溶液(批号:C058131101)在室温下放置0、1、2、3、4 h时的总杂质峰面积。结果,总杂质峰面积在4 h内明显增加,表明进行有关物质测定时,供试品溶液应在制备后立即测定,以免对测定结果产生不必要的干扰。

3.4 杂质C+E的考察

注射用泮托拉唑钠中的杂质C为5-(二氟甲氧基)-2-[(RS)-(3,4-二甲氧基-2-吡啶基)甲基]亚磺酰基-1-甲基-1H-苯并咪唑,杂质E为6-(二氟甲氧基)-2-[(RS)-(3,4-二甲氧基-2-吡啶基)甲基]亚磺酰基-1-甲基-1H-苯并咪唑,杂质C是以杂质B(硫醚)为起始原料经过氧化物氧化得到的,其与杂质E互为异构体,无法完全分离^[9-10]。本文参考《欧洲药典》和《美国药典》系统适用性标准^[9-10],测定杂质C和E时,以其总量C+E表示,作为同一杂质考虑。

综上所述,本方法简便、准确,可用于注射用泮托拉唑钠中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 李军,部敬顺,张鉴.注射用泮托拉唑钠的稳定性考察[J].中国药房,2005,16(21):1655-1657.
- [2] 孙丹,朱娴.注射用泮托拉唑钠在各注射液中的稳定性考察[J].化工中间体,2015(10):114-115.
- [3] 王丽云,吕旭幸.注射用泮托拉唑钠的杂质含量及其杂质谱的比较[J].抗感染药学,2015,12(4):499-504.
- [4] 蒋鹏,钱新毅.质子泵抑制剂:泮托拉唑[J].医药导报,2003,22(3):184-186.
- [5] 王婧斯,李桂龙,王成港,等.泮托拉唑钠有关物质分析方法的比较[J].药物评价研究,2012,35(2):109-112.
- [6] 王荔,毕煌垒.泮托拉唑不良反应分析[J].中国药房,2010,21(28):2582-2683.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:704-706.
- [8] British Pharmacopoeia Commission Office. *British Pharmacopoeia 2015: Volume II* [S].2015:494.
- [9] The United States Pharmacopoeia Commission Office. *The United States Pharmacopoeia*:37[S].2015:3264.
- [10] European Pharmacopoeia Commission Office. *European Pharmacopoeia*:8.0[S].2015:4680.

(收稿日期:2016-08-18 修回日期:2016-12-19)

(编辑:刘柳)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅