

HPLC 测定普瑞巴林含量

丁逸梅^{1,2}, 严相平^{1,2}, 张晓蕾³, 张爱华^{1,2} (1. 南京工业大学药学院, 南京 210009; 2. 南京工业大学江苏省药物研究所, 南京 210009; 3. 南京中医药大学, 南京 210029)

摘要:目的 建立普瑞巴林的含量测定方法。方法 以 2,4,6-三硝基苯磺酸作为衍生化试剂, 采用柱前衍生化 HPLC。色谱柱为 C₁₈ 柱, 流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(用磷酸调 pH 至 4.0)-乙腈(43:57), 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 40 °C; 检测波长为 350 nm。结果 回收率 99.18%, RSD = 1.15%, 普瑞巴林在 3.320~49.80 μg·mL⁻¹ 内呈良好线性关系($r = 0.9999$)。最低定量限: 0.5 μg·mL⁻¹。结论 所建立的方法快速、简便、准确、灵敏, 可用于普瑞巴林的含量测定。

关键词:普瑞巴林; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101; R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2009)03-0243-03

Determination of Pregabalin by HPLC

DING Yimei^{1,2}, YAN Xiangping^{1,2}, ZHANG Xiaolei³, ZHANG Aihua^{1,2} (1. School of Pharmacy Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute of Material Medical, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 3. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of pregabalin. **METHODS** Samples were derivatized with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA). Separation was achieved on a reversed-phase C₁₈ column with the mobile phase of 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate (pH = 4.0)-acetonitrile (43:57). The wavelength was 350 nm. **RESULTS** The average recovery was 99.18%, RSD = 1.15%. The calibration curve was linear between 3.320-49.80 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), the limit of quantification was 0.5 μg·mL⁻¹ for pregabalin. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and practicable for the assay of pregabalin.

KEY WORDS: pregabalin; HPLC; determination

普瑞巴林(pregabalin)是γ-氨基丁酸(GABA)受体激动剂,结构与加巴喷丁类似,也是GABA的3位烷基取代物,2004年12月,FDA批准辉瑞公司(Pfizer)的普瑞巴林(商品名Lyrica)用于治疗糖尿病性外周神经痛(DPN)及疱疹后遗神经痛(PHN)。同年7月,欧盟批准Lyrica用于治疗外周神经痛及辅助治疗部分性癫痫发作。同年,在美国及其他欧洲国家相继上市。与加巴喷丁相比,本品具有剂量低、毒副作用少的优势。

普瑞巴林为(3S)-3-氨基-5-甲基己酸,是GABA类似物,本身无紫外吸收,以衍生化试剂2,4,6-三硝基苯磺酸引入紫外吸收基团,进行HPLC测定。本试验对普瑞巴林柱前衍生化HPLC进行了方法学研究。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 510 泵、Shimadzu 检测器 SPD-10A VP、HW 色谱工作站),Mettler DL53

自动电位滴定仪。2,4,6-三硝基苯磺酸由Sigma公司提供,纯度:99.4%,规格:10 mL,浓度为5%。吡啶、冰乙酸、磷酸、乙酸铵(分析纯,南京化学试剂厂);蒸馏水;乙腈(色谱纯,TEDIA)。氢氧化钠(0.1 mol·L⁻¹)滴定液根据药典配制;高氯酸(0.1 mol·L⁻¹)滴定液根据药典配制;基准物邻苯二甲酸氢钾(优级纯,上海试剂三厂);酚酞指示剂;结晶紫指示剂(分析纯,上海化学试剂厂)。

普瑞巴林样品、对照品(纯度99.3%)由南京工业大学江苏省药物研究所合成研究室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.01 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液(用磷酸调节pH至4.0)-乙腈(43:57);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:40 °C;检测波长:350 nm;进样量:20 μL。

作者简介:丁逸梅,女,副研究员 Tel:(025)83258221 E-mail:dingyimei743@sohu.com

2.2 溶液的配制

对照品储备溶液的制备:精密称取普瑞巴林对照品约 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50% 乙腈稀释至刻度,作为对照品储备液。

对照品溶液的制备:精密量取上述储备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,分别加入衍生化试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸 0.2 mL,吡啶 3.0 mL,蒸馏水 2.0 mL,密闭,振摇混匀 30 s。85 °C 水浴加热 1 h,冷水冷却 10 min,加 2.0 mL 冰乙酸,振摇混匀 30 s,加水稀释至刻度,摇匀作为对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取普瑞巴林样品约 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50% 乙腈稀释至刻度,作为供试品储备液。依法制备供试品溶液。

空白溶液的制备:精密量取 50% 乙腈 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,依法制备空白溶液。

2.3 系统适应性试验与空白干扰试验

取普瑞巴林对照品溶液在上述色谱条件下进行测定,结果以主峰计算理论板数为 15 548,拖尾因子为 1.03,与前一峰分离度为 2.32。取对照品溶液,连续进样 5 次,计算普瑞巴林峰面积相对标准偏差, $RSD = 0.38\%$ 。另依法进行空白试验,结果空白无干扰。见图 1。

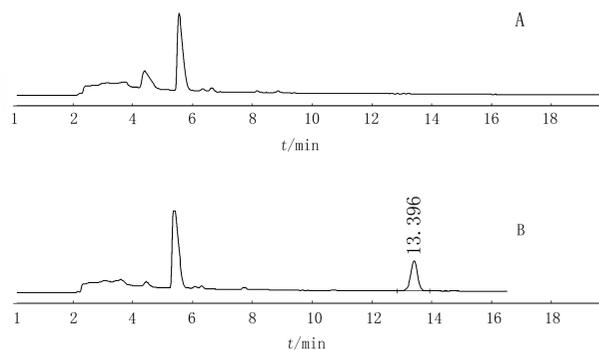


图 1 高效液相色谱图
A - 空白样品; B - 普瑞巴林

Fig 1 HPLC chromatograms

A - blank sample; B - pregabalin

2.4 线性范围与标准曲线

分别精密吸取对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.2, 1.5 mL 置 10 mL 量瓶中,加入衍生化试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸 0.2 mL,吡啶 3.0 mL,分别加入蒸馏水 2.9, 2.5, 2.0, 1.8, 1.5 mL, 密塞,振摇混匀 30 s。85 °C 水浴加热 1 h,冷水冷却 10 min,加 2.0 mL 冰乙酸,振摇混匀 30 s,加水稀释至刻度,摇匀,分别进样 20 μL 。以浓度 C 为 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 横坐标,峰面积 A 为纵坐标,进行线性回归。普瑞巴林回归方程

为: $A = 0.418 0 \times 10^4 + 5.629 \times 10^4 C$, $r = 0.999 9$ 。结果表明普瑞巴林在 3.320 ~ 49.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。

2.5 溶液稳定性试验

取供试品溶液,室温放置,分别于 0, 1, 3, 4, 5 h 进样,峰面积 RSD 为 0.55%,表明衍生化溶液在 5 h 内是稳定的。

2.6 回收率试验

精密称取已知含量样品适量,加入对照品适量,配制成约相当于含量测定浓度的 80%, 100%, 120% 的供试品溶液各 3 份。依法测定,计算。平均回收率为 99.18%, RSD 为 1.15%。

2.7 重复性试验

精密称取样品(批号:050203)6 份,进行普瑞巴林的含量测定, RSD 为 0.89%。结果表明本方法重复性好。

2.8 中间精密度

由 2 名不同试验者在不同时间、以不同仪器、采用不同色谱柱测定同一批原料样品普瑞巴林的含量, RSD 为 0.96%, 结果表明本方法中间精密度良好。

2.9 灵敏度试验

本品最低定量限: 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低检测限 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.10 样品测定

进行了三批样品含量测定,并与甲醛滴定及非水滴定测定结果相比较,结果一致,见表 1。

表 1 三种含量测定方法样品测定结果比较 (%)

Tab 1 Contents of pregabalin determined by three methods (%)

批号	HPLC	甲醛滴定 ¹⁾	非水滴定 ²⁾
050203	99.32	99.42	99.37
050311	99.16	99.23	99.09
050323	98.85	98.76	98.94

注: ¹⁾ 甲醛滴定法: 与甲醛溶液反应, 以酚酞为指示剂, 用氢氧化钠滴定液 (0.1 mol \cdot L⁻¹) 滴定。 ²⁾ 非水滴定法: 以结晶紫作为指示剂, 高氯酸为滴定剂 (0.1 mol \cdot L⁻¹) 滴定。

Note: ¹⁾ Formaldehyde Titration: Reaction with formaldehyde solution to phenolphthalein as indicator, titrated with sodium hydroxide solution (0.1 mol \cdot L⁻¹) titration; ²⁾ non-aqueous titration: with crystal violet as an indicator for the titrant perchloric acid (0.1 mol \cdot L⁻¹) titration

3 结果与讨论

普瑞巴林是 GABA 类似物, 没有明显的紫外吸收 (仅有较弱的末端吸收), 因而用 HPLC-UV 法测定时, 需进行衍生化处理, 引入紫外吸收基团以便检

测。采用正交设计考察了衍生化时间、温度、冰乙酸用量^[1-3]对衍生化结果的影响。结果证明 85℃,加热 1 h,加冰乙酸 2.0 mL 时衍生化效果最佳,衍生化产物稳定。

采用衍生化 RP-HPLC 测定普瑞巴林的含量,该方法灵敏、稳定,为有效控制普瑞巴林的质量提供了一种可行的方法。

REFERENCES

- [1] WANG M J. The analysis of amikacin sulfate injection and its related substances by RP-HPLC [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2001, 26(5): 345-347.
- [2] EP3[S]. 2000(Suppl): 267.
- [3] USP24[S]. 1999: 107.

收稿日期: 2007-12-18